

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁGORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATALSZABADALMI
LEÍRÁS

(11) 183 201

A bejelentés napja: (22) 80. 08. 18.

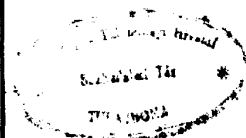
(21) (2051/80)

A bejelentés elsőbbsége:

(33)
JP(32)
79. 08. 21.
79. 08. 31.
80. 06. 17.
80. 06. 19.(31)
(106768/79),
(112307/79),
(82256/80),
(83478/80)

A közzététel napja: (41) (42) 83. 06. 28.

Megjelent: (45) 86. 10. 30.

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO₃C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15

Feltaláló(k): (72)

Tsuji Masao, vegyész, Okayama, Ichihara Yoshihiro, vegyész,
Okayama, JP

Szabadalmaz: (73)

Kuraray Company, Limited, Okayama, JP

(54)

MIKROBIOLÓGIAI ELJÁRÁS KOLÁNSAV-SZÁRMAZÉKOK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

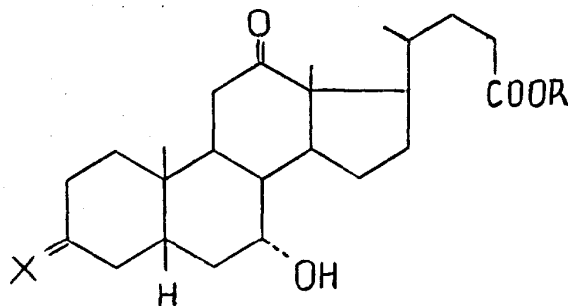
A találmány tárgya javított mikrobiológiai eljárás az
(I) általános képletű kolánsav-származékok előállítására

— ahol X oxigénatomot vagy  csoportot jelent,
és

R jelentése hidrogénatom, alkálifém-atom vagy alkáliföldfém-atom.

A találmány szerinti eljárás során kólsavat vagy egy kólsav-sót tartalmazó tápközegben az adott tápközegen növekedni képes, (I) általános képletű kolánsav-származékokat termelő, az Arthrobacter, Brevibacterium vagy Corynebacterium nemzetségbe tartozó mikroorganizmust, nevezetesen az Arthrobacter CA-35, Brevibacterium CA-6 vagy Corynebacterium CA-53 törzsek valamelyikét, illetve ezek mutánsait vagy variánsait tenyésztik, majd a kapott termékeket elkülönítik. Ezzel az eljárással a kívánt kolánsav-származékok jó hozammal, rövid tenyésztési idő alatt állíthatók elő.

Az (I) általános képletű vegyületek a kenodezoxi-kólsav és a dezoxi-kólsav előállításának értékes közbenő termékei, illetve kiindulási anyagai.



(I)

A találmány tárgya mikrobiológiai eljárás az (I) általános képletű kolánsav-származékok előállítására – ahol X oxigénatomot vagy $\begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \text{H} \end{smallmatrix}$ csoportot jelent, és

R jelentése hidrogénatom, alkálifém-atom vagy alkáliföldfém-atom.

A találmány szerinti eljárással az (I) általános képletű kolánsav-származékokat rövid idő alatt, nagy hozammal állíthatjuk elő úgy, hogy egy szubsztrátumként kólsavat vagy kólsav-sót tartalmazó fermentáléban specifikus mikroorganizmusokat tenyésztünk.

Az X helyén $\begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \text{H} \end{smallmatrix}$ csoportot tartalmazó (I) általános képletű kolánsav-származék, azaz a 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsav és sói az epekőoldó hatással rendelkező kenodezoxi-kólsav (CDCA) előállításának értékes közbelső termékei. Az X helyén oxigénatomot tartalmazó (I) általános képletű kolánsav-származék, azaz a 7 α -hidrox-3,12-diketo-5 β -kolánsav és sói a dezoxi-kólsav előállításában használhatók fel közbelső termékeként. A dezoxi-kólsav a progeszteron és számos adrenokortikoszteroid-származék előállításának értékes kiindulási anyaga.

Már korábban is ismertettek mikrobiológiai eljárásokat az (I) általános képletű kolánsav-származékok előállítására, amelyekben szubsztrátumként kólsavat vagy kólsav-sókat használtak fel. A Hayakawa és munkatársai által kidolgozott eljárás szerint a 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavat *Streptomyces gelaticus* 1164 törzs felhasználásával állítják elő [The Journal of Biochemistry (Japan), 44 (2), 109–113 (1957); Proceedings of Japan Academy, 32, 519–522 (1956)]. Hasegawa és munkatársai eljárást ismertettek 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsav előállítására *Aspergillus cinnamomeus* HUT 2026 törzs felhasználásával [Hiroshima Journal of Medical Science, 8 (3), 277–283 (1959)]. A Kikuchi és munkatársai által közölt eljárásban a 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsav előállításához *Staphylococcus epidermidis* H-1 törzset alkalmaznak [Journal of Biochemistry, 72 (1), 165–172 (1972)]. A Hayakawa és munkatársai által ismertett, *Streptomyces gelaticus* 1164 törzset felhasználó eljárás 7 α -hidrox-3,12-diketo-5 β -kolánsav előállítására is alkalmas [Proceedings of Japan Academy, 32, 519–522 (1956)].

Valamennyi ismert eljárás közös hátránya, hogy a fermentlé a kólsav szubsztrátumot kis – például 10 g/l-t meg nem haladó – koncentrációban tartalmazza. Kísérleteink szerint a kolánsav-származékok előállítására irányuló ismert mikrobiológiai eljárásokban azért kell a kólsav koncentrációját kis értéken tartani, mert ellenkező esetben (20 g/l-t meghaladó kólsav-koncentráció esetén) a felhasznált mikroorganizmusok visszafejlődnek vagy alig növekednek. Az ismert mikrobiológiai eljárások további hátránya, hogy a tenyésztéshez igen hosszú időt igényelnek. Olyan eljárás kidolgozására van tehát szükség, amellyel a kolánsav-származékok rövid idő alatt nagy hozammal állíthatók elő. Azt tapasztaltuk, hogy az *Arthrobacter*, *Brevibacterium* és *Corynebacterium* nemzetségbe tartozó egyes mikroorganizmusok széles határok között változó mennyiségű kólsavat vagy kólsav-sót tartalmazó táptalajokon is növekednek, és nagy hozammal, rövid idő alatt termelnek (I) általános képletű kolánsav-származékokat.

A találmány tárgya tehát eljárás (I) általános képletű kolánsav-származékok előállítására mikrobiológiai úton. A találmány értelmében úgy járunk el, hogy kólsavat vagy egy kólsav-sót tartalmazó tápközegeben az adott tápközegeben növekedni képes, (I) általános képletű kolánsav-származékokat termelő, az *Arthrobacter*, *Brevibacterium* vagy *Corynebacterium* nemzetségbe tartozó mikroorganizmust, nevezetesen az *Arthrobacter* CA-35, *Brevibacterium* CA-6 vagy *Corynebacterium* CA-53 törzsek valamelyikét, illetve ezek mutánsait vagy variánsait tenyésztjük, majd a kapott termékeket elkülönítjük.

A találmány szerinti eljárásban talajból elkülönített mikroorganizmusokat, azok természetes mutánsait, illetve az azokból mutagén kezeléssel (például röntgensugárzással vagy ultrabolya fénnel végzett besugárzással, mutagén vegyszerek, így N-metil-N-nitro-N-nitrozo-guanidin, 4-nitro-kinolin-N-oxid, akriflavin vagy etil-metán-szulfonát felhasználásával, illetve e módszerek kombinálásával) kialakított mutánsokat használhatjuk fel.

A kólsavat vagy kólsav-sókat tartalmazó tápközegeben (I) általános képletű kolánsav-származékokat termelő, általunk elkülönített mikroorganizmusokat a Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology intézetben (Japán; a továbbiakban: FERM), illetve az Amerikai Egyesült Államok-beli American Type Culture Collection törzsgyűjteményben (a továbbiakban: ATCC) helyeztük letétbe. A letétbe helyezett törzsek a következők: *Arthrobacter* CA-35 (FERM-P No. 5145, ATCC No. 31651), *Arthrobacter* CA-35-A589-29-32 (FERM-P No. 5522, ATCC No. 31652), *Arthrobacter* CA-35-A589-47 (FERM-P No. 5523, ATCC No. 31653), *Arthrobacter* CA-35-A849 (FERM-P No. 5524, ATCC No. 31654), *Arthrobacter* CA-35-A-1071-15 (FERM-P No. 5525, ATCC No. 31655), *Arthrobacter* CA-35-A-1448 (FERM-P No. 5526, ATCC No. 31656), *Arthrobacter* CA-35-A-1475 (FERM-P No. 5527, ATCC No. 31657), *Arthrobacter* CA-35-A-1766-15 (FERM-P No. 5528, ATCC No. 31658), *Arthrobacter* CA-35-M-965-3 (FERM-P No. 5529, ATCC No. 31659), *Arthrobacter* CA-35-Y-37-12 (FERM-P No. 5530, ATCC No. 31660), *Brevibacterium* CA-6 (FERM-P No. 5144, ATCC No. 31661) és *Corynebacterium* CA-53 (FERM-P No. 5532, ATCC No. 31662). Az *Arthrobacter* CA-35, *Brevibacterium* CA-6 és *Corynebacterium* CA-53 törzs természetből elkülönített („vad”) törzs; a további kilenc *Arthrobacter* törzs pedig az *Arthrobacter* CA-35 törzs mutánsa. Az *Arthrobacter* CA-35-Y-37-12 törzset ultrabolya fénnel végzett besugárzással alakítottuk ki, míg az *Arthrobacter* CA-35 törzs további nyolc mutánsa esetén az alaptörzset N-metil-N'-nitro-N-nitrozo-guanidinnel kezeltük.

A felsorolt törzsek morfológiai, tenyésztési és élet-tani jellemzőit az 1. táblázatban foglaljuk össze. Összehasonlítás céljából az *Arthrobacter* CA-35 törzssel rokon *Arthrobacter simplex* IAM 1660 törzs megfelelő adatait is feltüntetjük.

Az 1. táblázatban említett BCP-tej táptalajt úgy készítjük, hogy a tejből centrifugálással eltávolítjuk a zsíradékot, majd a sovány tejhez brómkrezol-bíbort (BCP) adunk. A vizsgált mikroorganizmus növekedőképességét az indikátor (BCP) színváltozása jelzi.

1. táblázat

J e l l e m z ő k	Arthrobacter simplex IAM 1660 törzs	Arthrobacter CA-35 törzs
Mikroszkópos jellemzők:		
Alak	pálca (néha duzzadt vagy görbült)	pálca (néha megtört vagy görbült)
Osztódás	—	kettéhasadás
Méret (μ)	0,4–0,5 $\times$ 1–3	0,8–0,9 $\times$ 1,7–2,2
Flagellum	nincs	nincs
Spóra	nincs	nincs
Gram-festés	pozitív-változó	pozitív
Saválló festés	nem festődik	nem festődik
Tenyésztési jellemzők:		
Húsleves-agarlemez	körkörös, enyhén kiemelkedő, színtelen, sima, csillogó, átlátszó	körkörös, enyhén kiemelkedő, sárga–krémszínű, sima, csillogó, átlátszatlan
Zselatin-szúrás	tömlős elfolyósodás	nem folyósodik el
Lakmusz-tej	a lakmusz redukálódik, a tej átlátszóvá válik	a lakmusz redukálódik, a tej változatlan
BCP-tej	átlátszóvá és lúgossá válik	lúgos, nem koagulál, nem peptonizál

J e l l e m z ő k	Arthrobacter simplex IAM 1660 törzs	Arthrobacter CA-35 törzs
Élettani jellemzők¹		
Nitrát redukció	+	+
Denitrifikálás	—	—
Metilvörös-próba	—	—
Voges-Proskauer próba	—	—
Indol-termelés	—	—
Kénhidrogén-termelés	+	+
Keményítő hidrolízis	—	—
Citrát-hasznosítás	+	+
Szervetlen nitrogén-források asszimilálása	+	+
Ureáz	—	—
Oxidáz	—	+ -től —-ig
Kataláz	+	+
Oxigén-igény	aerob	anaerob
Oxidációs/fermentációs próba	—	oxidatív

J e l l e m z ő k		Arthrobacter simplex IAM 1660 törzs			Arthrobacter CA-35 törzs			
Savak és gázok fejlesztése szénhidrátokból ²	növekedés	savak	gázok	asszimi- lálás	növekedés	savak	gázok	asszimi- lálás
1. L-arabinóz	+	—	—	—	±	—	—	+++
2. D-xilóz	+	—	—	—	+	—	—	+ -től —ig
3. D-glükóz	+	—	—	++	+	+	—	+++
4. D-mannóz	+	—	—	—	+	—	—	++
5. D-fruktóz	+	—	—	+	+	+	—	+++
6. D-galaktóz	+	—	—	—	+	—	—	+++
7. Maltóz	+	—	—	+	+	—	—	+++
8. Szacharóz	+	—	—	±	+	—	—	±
9. Laktóz	+	—	—	—	+	—	—	—
10. Trehalóz	+	—	—	+	+	—	—	—
11. D-szorbit	+	—	—	—	+	—	—	—
12. D-mannit	+	—	—	—	+	—	—	—
13. Inozit	+	—	—	—	+	—	—	—
14. Glicerín	+	—	—	—	+	—	—	+++
15. Keményítő	+	—	—	—	+	—	—	—

J e l l e m z ő k	Arthrobacter CA-35-A589-29-32 törzs	Arthrobacter CA-35-A589-47 törzs
Mikroszkópos jellemzők:		
Alak	rövid pálca	rövid pálca
Osztódás	—	—
Méret (μ)	0,8–1,0 × 1,3–2,0	0,8–1,0 × 1,3–2,3
Flagellum	poláros flagellum	flagellum
Spórák	nincs	nincs
Gram-festés	pozitív	pozitív
Saválló festés	nem festődik	nem festődik
Tenyésztési jellemzők:		
10 g/l kólsavat tartalmazó húsleves-agar lemez	körkörös, lapos, sárga, sima, csillogó, átlátszatlan	körkörös, lapos, sárga, sima, csillogó, átlátszatlan
Zselatin-szűrés	elfolyósodás	elfolyósodás
Lakmusz-tej	a lakmusz redukálódik, a tej nem koagulál, nem peptonizál	a lakmusz redukálódik, a tej nem koagulál, nem peptonizál
BCP-tej	lúgos, nem koagulál, nem peptonizál	lúgos, nem koagulál, nem peptonizál

J e l l e m z ő k	Arthrobacter CA-35-A589-29-32 törzs	Arthrobacter CA-35-A589-47 törzs
Élettani jellemzők ¹ :		
Nitrát redukció	+	+
Denitrifikálás	–	–
Metilvörös-próba	–	–
Voges–Proskauer próba	–	–
Indol-termelés	–	–
Kénhidrogén-termelés	+	+
Keményítő-hidrolízis	–	–
Citrát-hasznosítás	+	+
Szervetlen nitrogénforrások asszimilálása: ammónium	+	+
nitrát	+	+
Ureáz	–	–
Oxidáz	–	–
Kataláz	+	+
Oxigén-igény	aerob	aerob
Oxidációs/fermentációs próba	oxidatív	–

J e l l e m z ő k	Arthrobacter CA-35-A589-29-32 törzs		Arthrobacter CA-35-A589-47 törzs	
Savak és gázok fejlesztése szénhidrátokból ²	savak	gázok	savak	gázok
1. L-arabinóz	+	–	+	–
2. D-xilóz	–	–	–	–
3. D-glükóz	+	–	–	–
4. D-mannóz	–	–	–	–
5. D-fruktóz	+	–	+	–
6. D-galaktóz	–	–	–	–
7. Maltóz	+	–	+	–
8. Szacharóz	–	–	–	–
9. Laktóz	–	–	–	–
10. Trehalóz	–	–	–	–
11. D-szorbit	–	–	–	–
12. D-mannit	–	–	–	–
13. Inozit	–	–	–	–
14. Glicerín	–	–	–	–
15. Keményítő	–	–	–	–

Jellemzők	Arthrobacter CA-35-A-849 törzs	Arthrobacter CA-35-A-1071-15 törzs
Élettani jellemzők ¹ :		
Nitrát redukció	+	+
Denitrifikálás	—	—
Metilvörös-próba	—	—
Voges–Proskauer próba	—	—
Indol-termelés	—	—
Kénhidrogén-termelés	+	+
Keményítő-hidrolízis	—	—
Citrát-hasznosítás	+	+
Szervetlen nitrogénforrások asszimilálása: ammónium	+	+
nitrát	+	+
Ureáz	—	—
Oxidáz	—	—
Kataláz	+	+
Oxigén-igény	aerob	aerob
Oxidációs/fermentációs próba	oxidatív	oxidatív

J e l l e m z ő k	Arthrobacter CA-35-A-849 törzs		Arthrobacter CA-35-A-1071-15 törzs	
Savak és gázok fejlesztése szénhidrátokból ²	savak	gázok	savak	gázok
1. L-arabinóz	—	—	+	—
2. D-xilóz	—	—	—	—
3. D-glükóz	+	—	+	—
4. D-mannóz	—	—	—	—
5. D-fruktóz	+	—	+	—
6. D-galaktóz	—	—	+	—
7. Maltóz	+	—	+	—
8. Szacharóz	—	—	—	—
9. Laktóz	—	—	—	—
10. Trehalóz	—	—	—	—
11. D-szorbit	—	—	—	—
12. D-mannit	—	—	—	—
13. Inozit	—	—	—	—
14. Glicerín	+	—	+	—
15. Keményítő	—	—	—	—

J e l l e m z ő k	Arthrobacter CA-35-A-1448 törzs	Arthrobacter CA-35-A-1475 törzs
Mikroszkópos jellemzők:		
Alak	rövid pálca	rövid pálca — coccus
Osztódás	—	—
Méret (μ)	0,7–1,0 × 1,2–2,0	1,0–1,3 × 1,2–1,8
Flagellum	flagellum	flagellum
Spóra	nincs	nincs
Gram-festés	pozitív	pozitív
Saválló festés	nem festődik	nem festődik
Tenyésztési jellemzők:		
Húsleves-agar lemez	körkörös, lapos, sárga, sima, csillogó, átlátszatlan	körkörös, lapos, sárga, sima, csillogó, átlátszatlan
10 g/l kólsavat tartalmazó húsleves-agar lemez	körkörös, lapos, fehér–halvány krémszínű, sima, csillogó, átlátszatlan	körkörös, lapos, fehér–halvány krémszínű, sima, csillogó, átlátszatlan
Zselatin-szűrés	elfolyósodás	elfolyósodás
Lakmusz-tej	a lakmusz redukálódik, a tej nem koagulál, nem peptonizál	a lakmusz redukálódik, a tej nem koagulál, nem peptonizál
BCP-tej	lúgos, nem koagulál, nem peptonizál	lúgos, nem koagulál, nem peptonizál

J e l l e m z ő k	Arthrobacter CA-35-A-1448 törzs	Arthrobacter CA-35-A-1475 törzs
Élettani jellemzők ¹ :		
Nitrát redukció	+	+
Denitrifikálás	—	—
Metilvörös-próba	—	—
Voges–Proskauer próba	—	—
Indol-termelés	—	—
Kénhidrogén-termelés	+	+
Keményítő-hidrolízis	—	—
Citrát-hasznosítás	+	+
Szervetlen nitrogénforrások asszimilálása: ammónium nitrát	+	+
Ureáz	—	—
Oxidáz	—	—
Kataláz	+	—
Oxigén-igény	aerob	aerob
Oxidációs/fermentációs próba	oxidatív	—

J e l l e m z ő k	Arthrobacter CA-35-A-1448 törzs		Arthrobacter CA-35-A-1475 törzs	
Savak és gázok fejlesztése szénhidrátokból ²	savak	gázok	savak	gázok
1. L-arabinóz	+	—	—	—
2. D-xilóz	—	—	—	—
3. D-glükóz	+	—	—	—
4. D-mannóz	—	—	—	—
5. D-fruktóz	+	—	+	—
6. D-galaktóz	—	—	—	—
7. Maltóz	+	—	—	—
8. Szacharóz	—	—	—	—
9. Laktóz	—	—	—	—
10. Trehalóz	—	—	—	—
11. D-szorbit	—	—	—	—
12. D-mannit	—	—	—	—
13. Inozit	—	—	—	—
14. Glicerín	+	—	—	—
15. Keményítő	—	—	—	—

J e l l e m z ő k	Arthrobacter CA-35-A-1766-15 törzs	Arthrobacter CA-35-M-965-3 törzs
Mikroszkópos jellemzők:		
Alak	rövid pálca	rövid pálca – coccus
Osztódás	—	—
Méret (μ)	0,6–1,2 $\times$ 1,0–2,3	1,0–1,2 $\times$ 0,8–1,6
Flagellum	flagellum	flagellum
Spóra	nincs	nincs
Gram-festés	pozitív	pozitív
Saválló festés	nem festődik	nem festődik
Tenyésztési jellemzők:		
Húsleves-agar lemez	körkörös, sima, sárga, lapos, csillogó, átlátszatlan	körkörös, sima, sárga, lapos, csillogó, átlátszatlan
10 g/l kólsavat tartalmazó húsleves-agar lemez	körkörös, lapos, sárga, sima, csillogó, átlátszatlan	körkörös, lapos, fehér–krémszínű, sima, csillogó, átlátszatlan
Zselatin-szűrés	elfolyósodás	nincs elfolyósodás
Lakmusz-tej	a lakmusz redukálódik, a tej nem koagulál, nem peptonizál	a lakmusz redukálódik, a tej nem koagulál, nem peptonizál
BCP-tej	lúgos, nem koagulál, nem peptonizál	lúgos, nem koagulál, nem peptonizál

J e l l e m z ő k	Arthrobacter CA-35-A-1766-15 törzs	Arthrobacter CA-35-M-965-3 törzs
Élettani jellemzők¹:		
Nitrát redukció	+	+
Denitrifikálás	—	—
Metilvörös-próba	—	—
Voges–Proskauer próba	—	—
Indol-termelés	—	—
Kénhidrogén-termelés	+	+
Keményítő-hidrolízis	—	—
Citrát-hasznosítás	+	+
Szervetlen nitrogénforrások asszimilálása: ammónium	+	+
nitrát	—	+
Ureáz	—	—
Oxidáz	—	—
Kataláz	+	+
Oxigén-igény	aerob	aerob
Oxidációs/fermentációs próba	oxidatív	oxidatív

J e l l e m z ő k	Arthrobacter CA-35-A-1766-15 törzs	Arthrobacter CA-35-M-965-3 törzs
Savak és gázok fejlesztése szénhidrátokból ²	savak	savak
1. L-arabinóz	—	+
2. D-xilóz	—	—
3. D-glükóz	+	+
4. D-mannóz	—	—
5. D-fruktóz	+	+
6. D-galaktóz	—	—
7. Maltóz	+	+
8. Szacharóz	—	—
9. Laktóz	—	—
10. Trehalóz	—	—
11. D-szorbit	—	—
12. D-mannit	—	—
13. Inozit	—	—
14. Glicerín	+	—
15. Keményítő	—	—

J e l l e m z ő k	Arthrobacter CA-35-Y-37-12 törzs	Brevibacterium CA-6 törzs
Mikroszkópos jellemzők:		
Alak	rövid pálca	pálca
Osztódás	—	—
Méret (μ)	0,8–1,0 × 1,5–2,5	1,0 × 2,5–4,0
Flagellum	flagellum	poláros flagellum
Spóra	nincs	nincs
Gram-festés	pozitív	pozitív
Saválló festés	nem festődik	nem festődik
Tenyésztési jellemzők:		
Húsleves-agar lemez	körkörös, lapos, sárga, sima, csillogó, átlátszatlan	hullámos, enyhén kiemelkedő, színtelen, sima, csillogó, áttetsző
10 g/l kólsavat tartalmazó húsleves-agar lemez	körkörös, lapos, krémszínű, sima, csillogó, átlátszatlan	—
Zselatin-szúrás	elfolyósodás	elfolyósodás
Lakmusz-tej	a lakmusz redukálódik, a tej nem koagulál, nem peptonizál	peptonizál és meglúgosodik
BCP-tej	lúgos, nem koagulál, nem peptonizál	peptonizál és meglúgosodik

J e l l e m z ő k	Arthrobacter CA-35-Y-37-12 törzs	Brevibacterium CA-6 törzs
Élettani jellemzők ¹ :		
Nitrát redukció	+	—
Denitrifikálás	—	+
Metilvörös-próba	—	—
Voges–Proskauer próba	—	—
Indol-termelés	—	—
Kénhidrogén-termelés	+	+
Keményítő-hidrolízis	—	+
Citrát-hasznosítás	+	+
Szervetlen nitrogénforrások asszimilálása: ammónium nitrát	+	—
Ureáz	—	—
Oxidáz	—	±
Kataláz	+	+
Oxigén-igény	aerob	aerob
Oxidációs/fermentációs próba	oxidatív	—

J e l l e m z ő k	Arthrobacter CA-35-Y-37-12 törzs			Brevibacterium CA-6 törzs		
Savak és gázok fejlesztése szénhidrátokból ²	savak	gázok	növekedés	savak	gázok	asszimilálás
1. L-arabinóz	+	—	+	+	—	+++
2. D-xilóz	—	—	+	+	—	±
3. D-glükóz	+	—	+	+	—	+++
4. D-mannóz	—	—	+	+	—	+
5. D-fruktóz	+	—	+	+	—	+++
6. D-galaktóz	—	—	+	±	—	+++
7. Maltóz	+	—	+	—	—	+++
8. Szacharóz	—	—	+	—	—	—
9. Laktóz	—	—	+	—	—	—
10. Trehalóz	—	—	+	—	—	±
11. D-szorbít	—	—	+	—	—	—
12. D-mannit	—	—	+	—	—	—
13. Inozit	+	—	+	—	—	+++
14. Glicerín	+	—	+	+	—	+++
15. Keményítő	—	—	+	—	—	—

J e l l e m z ő k

Corynebacterium CA-53 törzs

Mikroszkópos jellemzők:

Alak	pálca, kettéágazó
Osztódás	kettéhasad
Méret (μ)	1,3–2,4 $\times$ 1,0–1,2
Flagellum	nincs
Spóra	nincs
Gram-festés	pozitív
Saválló festés	nem festődik

Tenyésztési jellemzők:

Tápagar-lemez	körkörös, lapos, sárga, sima, csillogó, átlátszatlan
Zselatin-szűrés	nincs elfolyósodás
Lakmusz-tej	a lakmusz redukálódik, barna üledék képződik
BCP-tej	lúgos

J e l l e m z ő k

Corynebacterium CA-53 törzs

Élettani jellemzők¹:

Nitrát-redukció	+
Denitrifikálás	–
Metilvörös-próba	–
Voges–Proskauer próba	–
Indol-termelés	–
Kénhidrogén-termelés	+
Keményítő-hidrolízis	–
Citrát-hasznosítás	+
Szervetlen nitrogénforrások asszimilálása	+
Ureáz	–
Oxidáz	+
Kataláz	+
Oxigén-igény	aerob
Oxidációs/fermentációs próba	–

J e l l e m z ő k

Corynebacterium CA-53 törzs

Savak és gázok fejlesztése szénhidrogénekből²

1. L-arabinóz
2. D-xilóz
3. D-glükóz
4. D-mannóz
5. D-fruktóz
6. D-galaktóz
7. Maltóz
8. Szacharóz
9. Laktóz
10. Trehalóz
11. D-szorbit
12. D-mannit
13. Inozit
14. Glicerín
15. Keményítő

savak

gázok

—	—
—	—
—	—
—	—
—	—
—	—
—	—
—	—
—	—
—	—
—	—
—	—
—	—
—	—
—	—

Megjegyzések az 1. táblázathoz:

1) Az „Élettani jellemzők” című felsorolásban használt jelek jelentése a következő:

+: A törzs az adott jellemzővel rendelkezik, illetve az adott anyagot termeli.

±: Csak nehezen határozható meg, illetve nem dönthető el teljes bizonyossággal, hogy a törzs rendelkezik-e az adott jellemzővel vagy termeli-e az adott anyagot.

–: A törzs nem rendelkezik az adott jellemzővel, illetve nem termeli az adott anyagot.

2) A „Savak és gázok fejlesztése szénhidrátokból” című felsorolásban használt jelek jelentése a következő:

(i) Növekedés, savak és gázok:

A törzseket Hugh–Leifson tápközegen tenyésztettük, azzal az eltéréssel, hogy a Hugh–Leifson tápközeg eredeti szénforrását az 1–15. sz. szénhidráttal helyettesítettük. Megfigyeltük a törzsek növekedését, illetve a sav- és gáztermelést.

+: A törzs növekedik, illetve savat vagy gázt fejleszt.

±: Nem dönthető el teljes bizonyossággal, hogy a törzs növekedik-e, illetve fejleszt-e savat vagy gázt.

–: A törzs nem növekedik, illetve sem savat, sem gázt nem fejleszt.

(ii) Asszimiláció:

21 mm átmérőjű kémcsőbe 2 g/l ammónium-nitrátot, 2 g/l kálium-dihidrogénfoszfátot, 5 g/l dikálium-hidrogénfoszfátot, 0,2 g/l magnéziumsulfát-heptahidrátot, 0,1 g/l élesztő kivonatot és 5 g/l szénhidrátot tartalmazó tápközeget töltöttünk, a törzset rázás közben tenyésztettük a tápközegen, és megfigyeltük a szénforrás asszimilációját, azaz a törzs növekedését.

–: A törzs nem növekedik.

±: A törzs gyengén növekedik.

+: A törzs növekedik.

++: A törzs jól növekedik.

+++ : A törzs igen jól növekedik.

A törzseket a felsorolt morfológiai, tenyésztési és élettani jellemzők alapján a Bergey's Manual of Deter-

minative Bacteriology című szakkönyv 7. és 8. kiadásában közöltek szerint osztályoztuk.

Megállapítottuk, hogy az Arthrobacter CA-35 törzs mikroszkópos képe (alakja, Gram-festése stb.) és élettani jellemzői alapján rokonságot mutat az Arthrobacter simplex törzsekkel. Az Arthrobacter CA-35 törzs azonban pigment-termelése, szénhidrát-asszimilációja és kólsavat tartalmazó közegben észlelt növekedése szempontjából eltér az Arthrobacter simplex IAM 1660 törzstől. Az Arthrobacter CA-35 törzs egyedüli szénforrásként nagy mennyiségű (például kb. 20–500 g/l) nátrium-kolátot tartalmazó tápközegen növekedni képes és ilyen körülmények között fő anyagcsere-termékként 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsavat, 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavat, 7 α ,12 α -dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsavat és/vagy ezek nátriumsóit termeli; ezzel szemben az Arthrobacter simplex IAM 1660 törzs egyedüli szénforrásként 10 g/l nátrium-kolátot tartalmazó tápközegen alig növekedik.

Az Arthrobacter CA-35 törzs sárga–krémszínű pigmentet termel. Az Arthrobacter nemzetségbe három további pigment-termelő mikroorganizmus, és pedig az Arthrobacter oxydans, az Arthrobacter aurescens és az Arthrobacter ureafaciens tartozik. Az Arthrobacter CA-35 törzs azonban mindhárom pigment-termelő Arthrobacter mikroorganizmustól eltér, mert az Arthrobacter oxydans és az Arthrobacter aurescens törzsek rendszerint Gram-negatívak és a keményítőt elhidrolizálják, az Arthrobacter ureafaciens-törzsek pedig rendszerint Gram-negatívak és a nitrátokat nem redukálják. Feltetésünk szerint tehát az Arthrobacter CA-35 törzs az Arthrobacter nemzetségbe tartozó új törzstípusnak tekintendő, mert különbözik az Arthrobacter nemzetségbe tartozó egyéb törzstípusoktól.

Noha az Arthrobacter CA-35 törzs mutánsai közül egyesek a flagellumok tekintetében alapvetően eltérnek a kiindulási törzstől, ezeket a mutánsokat az Arthrobacter nemzetségbe soroltuk, mert az általánosan alkalmazott osztályozási elvek szerint a mutánsokat az alap-törzsével azonos nemzetségbe sorolják.

Megállapítottuk, hogy a *Brevibacterium* CA-6 törzs mikroszkópos képe (például Gram-festése stb.) és élet-tani jellemzői alapján a *Brevibacterium* nemzetségbe sorolható. A *Brevibacterium* CA-6 törzs azonban több jellemző tekintetében eltér a *Brevibacterium* nemzetségbe tartozó egyéb törzstípusoktól; így például a *Brevibacterium* nemzetségbe tartozó egyéb törzseknek ostorokkal borított flagellumai vannak, míg a *Brevibacterium* CA-6 törzs flagellumai polárosak stb.

Megállapítottuk azt is, hogy a *Corynebacterium* CA-53 törzs szoros rokonságban van a *Corynebacterium equi* törzssel.

Miként már közöltük, a találmány értelmében úgy járunk el, hogy szubsztrátumként kólsavat vagy kólsav-sót tartalmazó tápközegen az adott tápközegen növekedni képes, a fentieknek megfelelő, az *Arthrobacter*, *Brevibacterium* vagy *Corynebacterium* nemzetségbe tartozó mikroorganizmus-törzset tenyésztünk.

A találmány szerinti eljárásban szubsztrátumként szabad kólsavat is felhasználhatunk, azonban a kólsavat alkálifém- vagy alkáliföldfém-sója, például nátrium-kolát, kálium-kolát, kalcium-kolát vagy magnézium-kolát formájában is felhasználhatjuk. Szubsztrátumként előnyösen alkálifém-kolátokat alkalmazunk. Ha szubsztrátumként kolátokat használunk fel, a kolátokból vízzel előre meghatározott koncentrációjú oldatot készítünk. Eljárhatunk úgy is, hogy a kólsavval sót képező, előre meghatározott mennyiségű alkálifém- vagy alkáliföldfém-vegyületet oldunk fel vízben, és ehhez az oldathoz adjuk a kólsavat; ekkor előre meghatározott mennyiségű kolátot tartalmazó vizes oldatot kapunk. A táptalaj kólsav, illetve kólsav-só-tartalma széles határok között változhat; a táptalaj a szubsztrátumot (kólsavban kifejezve) például körülbelül 1–500 g/l koncentrációban tartalmazhatja. Az (I) általános képletű kolánsav-származékok elérti kívánt hozamát, a tenyésztés körülményeit és a gazdasági hatékonyság (például kezelhetőség, feldolgozhatóság stb.) követelményeit figyelembe véve a kólsavat, illetve a kólsav-sókat előnyösen körülbelül 5–300 g/l, célszerűen körülbelül 10–200 g/l koncentrációban alkalmazzuk (a megadott értékek kólsavra vonatkoznak).

A tenyésztést önmagában ismert módon hajthatjuk végre. Rendszerint rázott vagy szubmerz tenyésztést végzünk, folyékony tápközeg felhasználásával.

Tápközegként a felhasznált mikroorganizmus számára asszimilálható tápanyagokat tartalmazó közegeket használhatunk fel. A tápközeg egyedüli szénforrásként is tartalmazhatja a kólsavat vagy a kólsav-sót, a tápközeghez azonban adott esetben további szénforrást, például pentózokat (így arabinózt vagy hasonló vegyületeket), hexózokat (így glükózt, mannózt, fruktózt, galaktózt stb.), diszacharidokat (így maltózt vagy hasonló vegyületeket), keményítő-bomlástermékeket (például dextrint vagy hasonló vegyületeket), cukoralkoholokat (például szorbitot vagy hasonló vegyületeket), polialkoholokat (például glicerint vagy hasonló vegyületeket), a felsorolt szénforrások elegyeit és/vagy egyéb tápanyagokat, például polipeptont, peptont, húskivonatot, maláta-kivonatot, kukorica-lekvárt, élesztő-kivonatot, aminosavakat, a felsorolt tápanyagok elegyeit és hasonló anyagokat adhatunk. A további szénforrást és/vagy további tápanyagokat rendszerint körülbelül 0,1–10 g/l koncentrációban adhatjuk a tápközeghez. Nitrogénforrásként például ammónium-szulfátot, ammónium-kloridot, ammónium-foszfátot, ammónium-nitrátot, nátrium-nitrátot,

kálium-nitrátot és a felsorolt vegyületek elegyeit használhatjuk fel. A nitrogénforrást rendszerint körülbelül 0,5–5 g/l koncentrációban adhatjuk a tápközeghez. A táptalajhoz továbbá szervesetlen sókat, így dikálium-hidrogénfoszfátot, kálium-dihidrogénfoszfátot, magnézium-szulfátot és hasonló vegyületeket is adhatunk, rendszerint körülbelül 0,1–10 g/l koncentrációban. A mikroorganizmust rázott vagy szubmerz tenyészetben 25–35 °C-on tenésztethetjük; a tenyésztés például 6 órá-tól 5 napig terjedő időt vehet igénybe.

A találmány szerinti eljárás során a szubsztrátumként felhasznált kólsav vagy kólsav-sók (I) általános képletű kolánsav-származékokká alakulnak, ezen kívül – amennyiben a fermentációhoz *Arthrobacter* CA-35 törzset használunk fel – csekély mennyiségben 7 α ,12 α -dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsav is képződik. Amennyiben az *Arthrobacter* CA-35 törzs korábban felsorolt mutánsait használjuk fel, tapasztalataink szerint főtermékként az X helyén $\begin{smallmatrix} \text{OH} \\ | \\ \text{H} \end{smallmatrix}$ csoportot tartalmazó (I) általános képletű

kolánsav-származék, azaz 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsav vagy e vegyület sója képződik. Abban az esetben tehát, ha 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavat vagy e vegyület sóit kívánjuk előállítani, a fermentációhoz előnyösen az *Arthrobacter* CA-35 törzs mutánsait, célszerűen az *Arthrobacter* CA-35-A589-29-32 (FERM-P No. 5522, ATCC No. 31652), *Arthrobacter* CA-35-A589-47 (FERM-P No. 5523, ATCC No. 31653) vagy *Arthrobacter* CA-35-A-1766-15 (FERM-P No. 5528, ATCC No. 31658) törzset használjuk fel. Ebből a szempontból különösen előnyösnek bizonyult az *Arthrobacter* CA-35-A589-29-32 és az *Arthrobacter* CA-35-A589-47 törzs. Ha a fermentációhoz *Brevibacterium* CA-6 törzset használunk fel, a kólsav, illetve a kólsav-só (I) általános képletű kolánsav-származékokká alakul, és ugyanakkor csekély mennyiségben 7 α -hidroxi-3,12-diketo- Δ^4 -kolánsav vagy e vegyület sója is képződik. Ha a fermentációt *Corynebacterium* CA-53 törzssel végezzük, a kólsav, illetve a kólsav-só (I) általános képletű kolánsav-származékokká és 7 α -hidroxi-3,12-diketo- Δ^4 -kolánsavvá vagy e vegyület sójává alakul át.

A fermentáció lezajlása után a felhalmozódott termékeket elkülönítjük a fermentléből, majd a termékeket tisztítjuk. Először az oldhatatlan anyagokat, például mikroorganizmus-sejteket stb. távolítjuk el a fermentléből önmagukban ismert módszerekkel, így szűréssel, centrifugálással vagy hasonló eljárással. Ezután a szűrlet-hez vagy a felülúszóhoz savat adunk; a sav (például só-sav) hatására a termékek kiválnak a folyadékfázisból. Ugyanekkor az át nem alakult kólsav vagy kólsav-só is kiválik szabad kólsav formájában. A kivált csapadékot elkülönítjük, majd a szűrletet vagy a felülúszót közös-bős szerves oldószerrel (például etilacetáttal) extraháljuk, és az extraktumot bepároljuk. Ezzel a módszerrel a fermentlében oldva maradt terméket és szubsztrátumot csaknem teljes egészében visszanyerhetjük. A bepárlás során kapott maradékot egyesítjük a savas kezeléskor kapott csapadékkal.

Az így kapott szilárd anyagból – amely a mikrobiológiai reakció során képződött termékek és a kólsav elegye – kromatográfiás úton elkülönítjük el az egyes vegyületeket. Az *Arthrobacter* CA-35 törzs vagy mutánsai felhasználásakor kapott szilárd anyagot például a következőképpen dolgozhatjuk fel: A termékeket és a kólsavat a megfelelő metilészterekké alakítjuk, majd

a metilésztetek elegyét szilikagéllal töltött oszlopon kromatografáljuk. Eluálószerként rendre kloroformot, 99:1 térfogatarányú kloroform : etanol elegyet, végül 97:3 térfogatarányú kloroform : etanol elegyet használunk fel. A kívánt 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav-
metilészter a kloroformos eluátumban jelenik meg. Az eluálást 99:1 térfogatarányú kloroform : etanol eleggyel folytatva először a melléktermékként képződött 7 α ,12 α -dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsav oldódik le; a további eluátumfrakciók a kívánt 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -
kolánsav-metilésztert tartalmazzák. Végül az eluálást 97:3 térfogatarányú kloroform : etanol eleggyel fejezzük be; ekkor a kólsav-metilésztert oldjuk le az oszlopról. A kapott metilészteteket ismert módon, hidrolízissel alakíthatjuk át a szabad savakká.

Abban az esetben, ha a fermentációt *Brevibacterium* CA-6 törzssel vagy *Corynebacterium* CA-53 törzssel végeztük, a termékeket például a következőképpen különíthetjük el: A termékek és a kólsav elegyét közvetlenül felvisszük egy szilikagéllal töltött oszlopra, és az oszlopot először 98:2, majd 97:3 térfogatarányú kloroform : etanol eleggyel eluáljuk. A kívánt 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsavat a 98:2 térfogatarányú kloroform : etanol elegy oldja le az oszlopról. Az eluálást 97:3 térfogatarányú kloroform : etanol eleggyel folytatva először a melléktermékként képződő 7 α -hidroxi-3,12-diketo- Δ^4 -kolánsavat oldjuk le; a további eluátumfrakciók a kívánt 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavat tartalmazzák.

A találmány szerinti eljárással előállított 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavat vagy sóit Huang Minlon módszerrel redukálva könnyen átalakíthatjuk a kíváló epekőoldó hatással rendelkező kenodezoxi-kólsavvá (CDCA).

A 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kólsavat vagy sóit könnyen átalakíthatjuk dezoxi-kólsavvá. Miként már közöltük, a dezoxi-kólsav a progeszteron és az adreno-kortikoszteroid-származékok szintézisének értékes kiindulási anyaga. A dezoxi-kólsav előállításánál során a 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kólsavat először vízelvonásnak vetjük alá, majd a kapott terméket ismert módon hidrogénezünk.

A találmány szerinti eljárást az oltalmi kör korlátozása nélkül az alábbi példákban részletesen ismertetjük.

A. példa

Mutánsok előállítása

Arthrobacter CA-35 törzset (FERM-P No. 5145, ATCC No. 31651) ferde tenyészetben 0,5 % nátriumhidroxidot, 5,0 % kólsavat, 0,5 % peptont, 0,5 % élesztőkivonatot, 0,5 % nátriumkloridot és 1,5 % agart tartalmazó táptalajon („A” táptalaj) tenyésztünk. A tenyészetből platinakacsnyi mintát veszünk, és a mintával 200 mm hosszú, 21 mm átmérőjű kémcsőbe töltött 10 ml „B” tápközeget oltunk be. A „B” tápközeg 1 % nátriumhidroxidot, 10 % kólsavat, 0,2 % ammónium-nitrátot, 0,2 % kálium-dihidrogénfoszfátot, 0,5 % dikálium-hidrogénfoszfátot, 0,02 % magnéziumszulfát-heptahidrátot és 0,01 % élesztőkivonatot tartalmaz. Az elegyet rázás közben 24 órán át 30 °C-on inkubáljuk. Az így kapott tenyészetből 0,3 ml térfogatú mintát veszünk, és a mintával egy 200 mm hosszú, 21 mm átmérőjű kémcsőbe töltött 10 ml „C” tápközeget oltunk

be. A „C” tápközeg 0,05 % nátriumhidroxidot, 0,5 % kólsavat, 0,5 % glükózt, 0,2 % ammónium-nitrátot, 0,2 % kálium-dihidrogénfoszfátot, 0,5 % dikálium-hidrogénfoszfátot, 0,02 % magnéziumszulfát-heptahidrátot és 0,01 % élesztőkivonatot tartalmaz. Az elegyet rázás közben 15–16 órán át 30 °C-on inkubáljuk. A logaritmikus szaporodási szakaszban lévő mikroorganizmus-sejteket 0,45 μ porusméretű membránszűrőn aseptikus körülmények között kiszűrjük, 20 ml 0,1 mólos foszfátpuffer-oldattal (pH = 7,0) mossuk, majd 25 ml, a mosófolyadékkal azonos pufferoldatban szuszpendáljuk.

A mutagén kezelést a következőképpen végezzük: 4 ml sejtsuszpenziót egy 200 mm hosszú, 21 mm átmérőjű kémcsőbe töltünk, a sejtsuszpenzióhoz 50 μ g/ml végső koncentrációnak megfelelő mennyiségű N-metil-N'-nitro-N-nitrozo-guanidint adunk, és az elegyet rázás közben 45 percig 30 °C-on inkubáljuk. Ilyen körülmények között az *Arthrobacter* CA-35 törzs sejteinek körülbelül 80 %-a elpusztul.

A kezelt sejteket 0,45 μ porusméretű membránszűrőn aseptikus körülmények között kiszűrjük, 20 ml 0,1 mólos foszfátpuffer-oldattal (pH = 7,0) mossuk, majd 25 ml, a mosófolyadékkal azonos pufferoldatban szuszpendáljuk. A kapott sejtsuszpenziót steril normál vizes nátriumklorid-oldattal hígítjuk, majd agar-lemezekre terítjük szét. A felhasznált táptalaj („D” táptalaj) 0,1 % nátriumhidroxidot, 1,0 % kólsavat, 0,2 % ammónium-nitrátot, 0,2 % kálium-dihidrogénfoszfátot, 0,5 % dikálium-hidrogénfoszfátot, 0,02 % magnéziumszulfát-heptahidrátot, 0,01 % élesztőkivonatot és 1,5 % agart tartalmaz. A lemezekre annyi sejtsuszpenziót viszünk fel, hogy minden egyes lemezen 300–500 telep képződjék. A lemezeket 4 napon át 30 °C-on inkubáljuk. A kialakult, tűhegynyi telepeket elkülönítjük, majd agar-lemezen 24 órán át 30 °C-on inkubáljuk. A felhasznált táptalaj („E” táptalaj) 0,5 % peptont, 0,5 % élesztőkivonatot, 0,5 % nátriumkloridot és 1,5 % agart tartalmaz. Az „E” táptalajból készített lemezekre fejlődő telepeket replika-módszerrel a „D” táptalajból készített lemezekre visszük át, majd 20 órán át 30 °C-on inkubáljuk.

Az „E” táptalajról elkülönített azon telepeket, amelyek a következő tenyésztési lépésben a „D” táptalajból készített lemezen nem növekednek, ferde agar-tenyészetben 24 órán át 30 °C-on inkubáljuk. A felhasznált táptalaj („F” táptalaj) 0,1 % nátriumhidroxidot, 1,0 % kólsavat, 0,5 % peptont, 0,5 % élesztőkivonatot, 0,5 % nátriumkloridot és 1,5 % agart tartalmaz. A ferde tenyészetből platinakacsnyi mintát veszünk, a mintával egy 200 mm hosszú, 21 mm átmérőjű kémcsőbe töltött 10 ml tápközeget oltunk be, és az elegyet rázás közben 3 napon át 30 °C-on inkubáljuk. A felhasznált tápközeg („G” táptalaj) 0,5 % nátriumhidroxidot, 5,0 % kólsavat, 0,5 % glükózt, 0,2 % ammónium-nitrátot, 0,2 % kálium-dihidrogénfoszfátot, 0,5 % dikálium-hidrogénfoszfátot, 0,02 % magnéziumszulfát-heptahidrátot és 0,01 % élesztőkivonatot tartalmaz.

A „G” tápközegekben felhalmozódott termékeket vékonyrétegekromatográfiásan elemezzük. A törzset, amely az elemzési adatok szerint szelektíven 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavat, illetve e sav sóit termeli, *Arthrobacter* CA-35-M-965-3 törzsnek neveztük el.

A fenti eljárást a következőkben „M” eljárásnak nevezzük. Ezután az „M” eljárást az *Arthrobacter* CA-

35-M-965-3 törzsön hajtjuk végre. A mutagén kezelés hatására három olyan törzset kapunk, amely szelektíven $3\alpha,7\alpha$ -dihidroxi-12-keto- 5β -kolánsavat, illetve e sav sóit termeli. Ezeket a törzseket *Arthrobacter* CA-35-A589, *Arthrobacter* CA-35-A849, illetve *Arthrobacter* CA-35-A-1071 törzseknek neveztük el.

Az *Arthrobacter* CA-35-A589 törzs telepeiből két jobb termelőképességű törzset különítettünk el. Ezeket a törzseket *Arthrobacter* CA-35-A589-29-32, illetve *Arthrobacter* CA-35-A589-47 törzsnek neveztük el. Az *Arthrobacter* CA-35-A-1071 törzs telepeiből is el különítettünk egy jobb termelőképességű törzset, amit *Arthrobacter* CA-35-A-1071-15 törzsnek neveztünk.

Az „M” eljárást az *Arthrobacter* CA-35-A849 törzsre alkalmazva egy további jobb termelőképességű törzset kaptunk, amit *Arthrobacter* CA-35-A-1448 törzsnek neveztünk. Az *Arthrobacter* CA-35-A-1475 törzset úgy alakítottuk ki, hogy az „M” eljárást az *Arthrobacter* CA-35-A-1448 törzsön hajtottuk végre. Az *Arthrobacter* CA-35-A-1766 törzset szintén az „M” eljárással alakítottuk ki; ebben az esetben alaptörzsként az *Arthrobacter* CA-35-A-1071 törzset alkalmaztuk. Az *Arthrobacter* CA-35-A-1766-15 törzset a kapott *Arthrobacter* CA-35-A-1766 törzs telepeiből különítettük el.

Az *Arthrobacter* CA-35-Y-37-12 törzset a következő eljárással alakítjuk ki:

Az *Arthrobacter* CA-35 törzs (FERM-P No. 5145, ATCC No. 31651) „A” táptalajon készített ferde tenyészetéből platinakacsnyi mintát veszünk. A mintával 200 mm hosszú, 21 mm átmérőjű kémcsőbe töltött 10 ml „B” tápközeget oltunk be, és az elegyet rázás közben 20 órán át 30°C -on inkubáljuk. A mikroorganizmus-sejteket 10 000 fordulat/perc sebességgel végzett centrifugálással elkülönítjük; a centrifugálást 5 percig 5°C -on, aszeptikus körülmények között végezzük. A kapott sejteket 10 ml steril vízben szuszpendáljuk, a szuszpenziót 7,5 cm átmérőjű Petri-csészébe töltjük, a Petri-csészét csiramentes dobozban elhelyezett 15 W-os ultraibolya fényforrás (2537 Å) alá helyezzük (a csésze és a fényforrás távolsága kb. 27 cm), és 10 percig ultraibolya fénnel besugározzuk. Ilyen körülmények között az *Arthrobacter* CA-35 törzs sejteinek körülbelül 99,9%-a elpusztul.

Besugárzás után a mikroorganizmus-sejteket membrán-szűrőn elkülönítjük, 0,1 mólós foszfátpuffer-oldattal mossuk, majd a felhasznált mosófolyadékkal azonos foszfátpuffer-oldatban szuszpendáljuk. A kapott szuszpenziót normál vizes nátriumklorid-oldattal hígítjuk, majd a „D”–„G” tápközegeken tenyésztjük a korábban közöltek szerint. Az alaptörzsnél jobb termelőképességű mutáns törzset kapunk, amely szelektíven $3\alpha,7\alpha$ -dihidroxi-12-keto- 5β -kolánsavat, illetve e vegyület sóit termeli.

1. példa

Arthrobacter CA-35 törzset (FERM-P No. 5145, ATCC No. 31651) tenyésztünk a következő körülmények között:

A tápközeg összetétele:

Kólsav	100 g
Ammonium-nitrát	2,0 g

Kálium-dihidrogén-foszfát	2,0 g
Dikálium-hidrogén-foszfát	5,0 g
Magnéziumsulfát-heptahidrát	0,2 g
Élesztőkivonat	0,1 g
5 Nátriumhidroxid	10 g
Desztillált víz	q.s. ad 1 liter

A komponensek összekeverésével kapott, 1 liter térfogatú tápközeget 100 ml-es részletekben 10, egyenként 500 ml űrtartalmú Sakaguchi-lombikba töltjük szét, majd a lombikokba töltött táptalajt 15 percig 120°C -on autoklávban kezeljük. Az egyes lombikokhoz 10–10 ml oltótenyészetet adunk (az oltótenyészet előállításánál az *Arthrobacter* CA-35 törzset a fenti összetételű tápközegen, rázás közben 2 napig 30°C -on inkubáljuk). Az egyes lombikokba töltött elegyeket rázógépen 2 napon át 30°C -on inkubáljuk.

A tenyésztés befejeztével a fermentleveket egyesítjük, és a mikroorganizmus-sejteket centrifugálással eltávolítjuk. A felülúszót 600 ml 1 n vizes sósavoldattal megsavanyítjuk. A kivált csapadékot elkülönítjük, és a folyadékfázist 1 liter etilacetáttal extraháljuk. Az extraktumból forgó bepárlókészüléken lepároljuk az etilacetátot, és a kapott maradékot egyesítjük az előzőekben el különített csapadékkal. 85 g szilárd anyagot kapunk, amely kólsav és kolánsav-származékok keveréke.

A kapott elegy kis mintájából 1 %-os metanolos oldatot készítünk. 10 μl metanolos oldatot $\mu\text{Bondapak C-18}$ oszloppal felszerelt nagysebességű folyadékkromatográfiás berendezésbe (HLC-GPC-244 típusú berendezés; gyártja a Waters cég, Amerikai Egyesült Államok) fecskendezünk.

Az oszlopot 1 ml/perc sebességgel 30:70 térfogatarányú víz – metanol eleggyel ($\text{pH} = 2,5$) eluáljuk, és mérjük az eluátum törésmutatóját.

A kapott kromatogramot az 1. ábrán mutatjuk be. Az 1. ábrán feltüntetett A, B, C és D csúcs – a felvett referenciamintákkal összehasonlítva – rendre a következő vegyületeknek felel meg: 7α -hidroxi-3,12-diketo- 5β -kolánsav, $3\alpha,7\alpha$ -dihidroxi-12-keto- 5β -kolánsav, $7\alpha,12\alpha$ -dihidroxi-3-keto- 5β -kolánsav és kólsav.

Az A, B és C csúcsoknak megfelelő frakciókból elkülönítjük a termékeket, és a termékek szerkezetét tömegspektrum, infravörös spektrum és NMR-spektrum felvételével vizsgáljuk. A spektrumok adatai egyértelműen igazolják, hogy termékeként rendre 7α -hidroxi-3,12-diketo- 5β -kolánsavat, $3\alpha,7\alpha$ -dihidroxi-12-keto- 5β -kolánsavat és $7\alpha,12\alpha$ -dihidroxi-3-keto- 5β -kolánsavat kaptunk. A 2., 3. és 4. ábrán az A, B és C csúcsnak megfelelő frakciókból elkülönített vegyületek metilésztereinek infravörös spektrumát mutatjuk be, a hiteles minták (A', B', illetve C' jelű termékek) spektrumaival összehasonlítva.

Az A, B és C csúcsnak megfelelő vegyületek és metilészterek olvadáspont-értékeit a 2. táblázatban közöljük.

Az egyes termékek hozamát, valamint az át nem alakult kólsav mennyiségét az 1. ábrán bemutatott kromatogram alapján, az egyes görbeszakaszok alatti területek arányából számítottuk ki. Az eredményeket a 3. táblázatban közöljük.

2. táblázat

Vegyület	A metilészterek olvadáspontja, °C		A szabad savak olvadáspontja, °C	
	Talált	Irodalmi	Talált	Irodalmi
A csúcs	150–152	152–154	—	—
B csúcs	154–156	156–157	219–220	221–222
C csúcs	168–169	169–172	185–186	186–188

3. táblázat

Vegyület	Területarány	Konverzió, %	Hozam, g
7 α -Hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav (A csúcs)	28,54	28,54	24,3
3 α ,7 α -Dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsav (B csúcs)	63,06	63,06	53,6
7 α ,12 α -Dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsav (C csúcs)	1,54	1,54	1,30
Kólsav (D csúcs)	6,86	6,86	5,80

2. példa

Az 1. példában közöltek szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy a tápközeghez 5,0 g/l glükózt is adunk. 91,0 g szilárd terméket kapunk, amely átalakulatlan kólsav és kolánsav-származékok keveréke. Ezt a szilárd anyagot 270 ml metanolban oldjuk, és az oldathoz 9 ml tömény vizes sósavoldatot adunk. A kapott oldatot 20 percig visszafolyatás közben forralva a szabad savakat a megfelelő metilészterekké alakítjuk.

1200 mm hosszú, 70 mm átmérőjű oszlopba 1500 g szilikagél C-200-at töltünk, és a fentiek szerint előállított metilésztereket a szilikagélen adszorbeáltatjuk. A géloszlopot kloroformmal eluáljuk; ekkor 25,1 g 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav-metilésztert kapunk. Ezután az eluálást 99:1 térfogatarányú kloroform : etanol eleggyel folytatjuk. Az első frakciókból 1,40 g 7 α ,12 α -dihidroxi-

30 3-keto-5 β -kolánsav-metilésztert, majd a további frakciókból 56,4 g 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsav-metilésztert különítünk el.

35 A kapott metilészterek hidrolízisével 24,8 g 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsavat, 1,38 g 7 α ,12 α -dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsavat és 56,0 g 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavat állítunk elő.

3. példa

40 Az 1. példában közöltek szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy változtatjuk a kólsav koncentrációját, és a reakcióelegyhez a felhasznált kólsav mennyiségére vonatkoztatva 10 súly % nátriumhidroxidot is adunk. A képződött termékek és az át nem alakult kólsav mennyiségét a 4. táblázatban soroljuk fel.

4. táblázat

Vegyület	50 g/l	Hozam, g	
		200 g/l szubsztrátum-koncentráció esetén	300 g/l
3 α ,7 α -Dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsav	27,1	108,3	47,4
7 α -Hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav	12,3	49,0	21,4
7 α ,12 α -Dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsav	0,7	2,65	1,20
Kólsav	csekély	20,1	230

4. példa

A 2. példában közöltek szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy a lombikokat rázógépen, 24 órán át 30 °C-on inkubáljuk. 98,0 g szilárd anyagot kapunk, amely a termékek és az át nem alakult kólsav elegye. Az elegy összetételét az 1. példában ismertetett nagysebességű folyadékkromatográfiás eljárással határozzuk meg. Az eredményeket az 5. táblázatban közöljük.

5. táblázat

Vegyület	Részarány
3 α ,7 α -Dihidrox-12-keto-5 β -kolánsav	67,7
7 α -Hidrox-3,12-diketo-5 β -kolánsav	8,3
7 α ,12 α -Dihidrox-3-keto-5 β -kolánsav	4,0
Kólsav	20,0

5. példa

A 2. példában közöltek szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy az egyes lombikokba 20–20 ml oltótenyésztet töltünk. Az oltótenyésztet 24 órán át 30 °C-on végzett tenyésztéssel állítjuk elő. 117,0 g szilárd anyagot kapunk, amely kolánsav-származékok és át nem alakult kólsav elegye. Az elegy összetételét az 1. példában ismertetett nagysebességű folyadékkromatográfiás eljárással határozzuk meg. Az eredményeket a 6. táblázatban közöljük.

6. táblázat

Vegyület	Részarány
3 α ,7 α -Dihidrox-12-keto-5 β -kolánsav	63,3
7 α -Hidrox-3,12-diketo-5 β -kolánsav	23,5
7 α ,12 α -Dihidrox-3-keto-5 β -kolánsav	2,0
Kólsav	11,2

6. példa

Arthrobacter CA-35-A589-29-32 (FERM-P No. 5521, ATCC No. 31652) törzset tenyésztünk a következő körülmények között:

A tápközeg összetétele:

Kólsav	100 g
Ammónium-nitrát	2,0 g
Kálium-dihidrogén-foszfát	2,0 g
Dikálium-hidrogén-foszfát	5,0 g
Magnéziumszulfát-heptahidrát	0,2 g
Élesztő kivonat	0,1 g
Nátriumhidroxid	10 g

Glükóz

5,0 g

Csapvíz

q.s. ad 1 liter

A tápközeg komponenseit – a glükóz kivételével – csapvízzel keverjük össze, az oldat térfogatát 800 ml-re állítjuk be, és az oldatot autoklávban 15 percig 120 °C-on hőkezeljük. A glükózt 200 ml csapvízben oldjuk, és az oldatot autoklávban 30 percig 110 °C-on hőkezeljük. Lehűlés után az oldatokat egyesítjük, és a kapott, 1 liter térfogatú fermentációs közeget egyenlő részletekben 10 db, egyenként 500 ml térfogatú Sakaguchi-lombikba töltjük szét aseptikus körülmények között. Minden egyes lombikba 2 ml oltótenyésztet mérünk be. Az oltótenyésztet előállításánál a törzset a fentivel azonos összetételű tápközegen rázás közben 14 órán át 30 °C-on tenyésztjük. A lombikokat 3 napon át rázógépen, 30 °C-on inkubáljuk.

A tenyésztési időszak végén a fermentleveket egyesítjük, és a mikroorganizmus-sejteket centrifugálással elválogatjuk. A felülúszót 600 ml 1 n vizes sósavoldattal megsavanyítjuk. A kivált csapadékot elkülönítjük, és az oldatot 1 liter etilacetáttal extraháljuk. Az extraktumból forgó bepárlókészüléken lepároljuk az etilacetátot, és a maradékot egyesítjük az előzőekben elkülönített csapadékkal. 99,3 g szilárd anyagot kapunk, amely kolánsav-származékok és kólsav elegye.

A kapott elegy kis mintájából 2 %-os metanolos oldatot készítünk. 10 μ l metanolos oldatot μ Bondapak C-18 oszloppal felszerelt nagysebességű folyadékkromatográfiás berendezésbe (HLC-GPC-244 típusú berendezés) fecskendezünk.

Az oszlopot 1 ml/perc sebességgel 30:70 térfogatarányú víz : metanol eleggyel (pH = 4,0) eluáljuk, és mérjük az eluátum törésmutatóját.

A kapott kromatogramot az 5. ábrán mutatjuk be. Az 5. ábrán megjelölt B és D csúcs megfelel a 3 α ,7 α -dihidrox-12-keto-5 β -kolánsav, illetve a kólsav hiteles mintáján mért csúcsnak.

A B csúcsnak megfelelő frakcióból elkülönítjük a terméket, és a termék szerkezetét tömegspektrum, infravörös spektrum és NMR-spektrum felvételével vizsgáljuk. A spektrumok adatai egyértelműen igazolják, hogy termékként 3 α ,7 α -dihidrox-12-keto-5 β -kolánsavat kaptunk.

Az egyes termékek hozamát, valamint az át nem alakult kólsav mennyiségét az 5. ábrán bemutatott kromatogram alapján, az egyes görbeszakaszok alatti területek arányából számítottuk ki. Az eredményeket a 7. táblázatban közöljük.

7. táblázat

55	Vegyület	Konverzió- arány, % *	Hozam, g
	3 α ,7 α -Dihidrox-12-keto-5 β -kolánsav (B csúcs)	98,85	98,16
60	Kólsavból képződő egyéb származékok	0,59	0,59
	Kólsav (D csúcs)	0,56	0,56

*A konverzióarányt a területarány alapján számítottuk ki.

A 6. példában közöltek szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy a lombikokba a 6. példa szerint felhasznált 2 ml oltótenyészet helyett mikroorganizmus-sejtszuszpenziót adunk. A sejtszuszpenziót úgy állítjuk elő, hogy 10 ml oltótenyészetből centrifugálással elkülönítjük a sejteket, majd a sejteket 10 ml steril vízben szuszpendáljuk. Termékként 99,5 g szilárd anyagot kapunk, amely kolánsav-származékok és át nem alakult kólsav elegye. Ezt a szilárd anyagot 270 ml metanolban oldjuk, és az oldathoz 9 ml tömény vizes sósavoldatot adunk. A kapott oldatot 20 percig visszafolyatás közben forralva a kólsavat és a fermentáció termékeit a megfelelő metilészterekké alakítjuk.

1200 mm hosszú, 70 mm átmérőjű oszlopba 1500 g szilikagél C-200-at töltünk, és a fentiek szerint előállított metilésztereket a szilikagélen adszorbeáltatjuk. A géloszlopot 99:1 térfogatarányú kloroform:etanol eleggyel eluáljuk. 102,0 g 3 α ,7 α -dihidroxil-12-keto-5 β -kolánsavmetilésztert kapunk, amelyből hidrolízissel 98,5 g 3 α ,7 α -dihidroxil-12-keto-5 β -kolánsavat állítunk elő.

8. példa

A 6. példában közöltek szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy változtatjuk a kólsav koncentrációját, a fermentációs elegyhez a felhasznált kólsav mennyiségére vonatkoztatva 10 súly % nátriumhidroxidot adunk, és a csapadék leválasztása során 1 g nátriumhidroxidra 30 vonatkoztatva 60 ml 1 n vizes sósavoldatot használunk fel. A konverzió-arányokat, az elért hozamot, valamint az át nem alakult kólsav mennyiségét a 8. táblázatban tüntetjük fel.

8. táblázat

Konverzióarány vagy hozam az alábbi szubsztrátum-koncentrációk esetén	3 α ,7 α -Dihidroxil-12-keto-5 β -kolánsav	Kólsav
1 g/l	96,7 %*	0,4 %
5 g/l	98,0 %*	0,7 %
10 g/l	9,3 g	0,1 g
20 g/l	19,5 g	0,2 g
50 g/l	49,6 g	0,1 g
100 g/l	98,2 g	0,6 g
200 g/l	129,2 g	70,0 g

*Konverzióarány

9. táblázat

Vegyület	Konverzióarány, %	Hozam, g
7 α -Hidroxil-3,12-diketo-5 β -kolánsav + egy azonosítatlan anyag (A csúcs)	0,80	0,39
3 α ,7 α -Dihidroxil-12-keto-5 β -kolánsav (B csúcs)	98,01	48,33
7 α ,12 α -Dihidroxil-3-keto-5 β -kolánsav (C csúcs)	0,25	0,13
Egyéb származékok	0,24	0,12
Kólsav (D csúcs)	0,70	0,35

10. példa

A 9. példában közöltek szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy az *Arthrobacter* CA-35-A589-47 törzs helyett *Arthrobacter* CA-35-A849 törzset (FERM-P No. 5524, ATCC No. 31654) használunk fel. 49,34 g szilárd anyagot kapunk, amely a fermentációs termékek és az át nem alakult kólsav elegye.

Az elegyet a 6. példában ismertetett körülmények között nagysebességű folyadékkromatográfiás elemzésnek vetjük alá.

A kromatogramot a 7. ábrán mutatjuk be. A kromatogram A, B, C és D csúcsa – hiteles mintákkal végzett összehasonlítás alapján – rendre a 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsavnak, 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavnak, 7 α ,12 α -dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsavnak, illetve kólsavnak felel meg.

Az A, B, C és D csúcsnak megfelelő frakciókat elkülönítjük, majd vékonyréteggromatográfián vizsgáljuk. Valamennyi frakció csak egyetlen vegyületet tartalmaz.

Az egyes termékek hozamát, valamint az át nem alakult kólsav mennyiségét a 7. ábrán feltüntetett kromatogram alapján, az egyes görbeszakaszok alatti területek arányából számítottuk ki. Az eredményeket a 10. táblázatban közöljük.

11. példa

A 9. példában közöltek szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy az *Arthrobacter* CA-35-A589-47 törzs helyett *Arthrobacter* CA-35-A-1071-15 törzset (FERM-P No. 5525, ATCC No. 31655) használunk fel. 49,31 g szilárd anyagot kapunk, amely a fermentációs termékek és az át nem alakult kólsav elegye.

A kapott elegyet a 6. példában ismertetett körülmények között nagysebességű folyadékkromatográfiás elemzésnek vetjük alá.

A kromatogramot a 8. ábrán mutatjuk be. A kromatogram A, B, C és D csúcsa – hiteles mintákkal végzett összehasonlítás alapján – rendre a 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsavnak, 7 α ,3 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavnak, 7 α ,12 α -dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsavnak és kólsavnak felel meg.

Az A, B, C és D csúcsnak megfelelő frakciókat elkülönítjük, majd vékonyréteggromatográfián vizsgáljuk. A B, C és D csúcsnak megfelelő frakciók csak egy vegyületet tartalmaznak, míg az A csúcsnak megfelelő frakció a 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav mellett egy további azonosítatlan anyagot is tartalmaz.

Az egyes termékek hozamát, valamint az át nem alakult kólsav mennyiségét a 8. ábrán feltüntetett kromatogram alapján, az egyes görbeszakaszok alatti területek arányából számítottuk ki. Az eredményeket a 11. táblázatban közöljük.

10. táblázat

Vegyület	Konverzióarány, %	Hozam, g
7 α -Hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav (A csúcs)	3,2	1,58
3 α ,7 α -Dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsav (B csúcs)	83,5	41,20
7 α ,12 α -Dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsav (C csúcs)	7,9	3,90
Egyéb származékok	2,8	1,38
Kólsav (D csúcs)	2,6	1,28

11. táblázat

Vegyület	Konverzióarány, %	Hozam, g
7 α -Hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav + egy azonosítatlan anyag (A csúcs)	5,2	2,56
3 α ,7 α -Dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsav (B csúcs)	93,9	46,30
7 α ,12 α -Dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsav (C csúcs)	0,2	0,10
Egyéb származékok	0,2	0,10
Kólsav (D csúcs)	0,5	0,25

12. példa

A 9. példában közöltek szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy az *Arthrobacter* CA-35-A589-47 törzs helyett *Arthrobacter* CA-35-A-1448 törzset (FERM-P No. 5526, ATCC No. 31656) használunk fel. 49,30 g szilárd anyagot kapunk, amely a fermentációs termékek és az át nem alakult kólsav elegye.

Az elegyet a 6. példában ismertetett körülmények között nagysebességű folyadékkromatográfiás elemzésnek vetjük alá.

A kromatogramot a 9. ábrán mutatjuk be. A kromatogram A, B, C és D csúcsa – hiteles mintákkal végzett összehasonlítás alapján – rendre a 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsavnak, 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavnak, 7 α ,12 α -dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsavnak és kólsavnak felel meg.

Az A, B, C és D csúcsnak megfelelő frakciókat elkülönítjük, majd vékonyréteggromatográfián vizsgáljuk. A B, C és D csúcsnak megfelelő frakciók csak egy vegyületet tartalmaznak, míg az A csúcsnak megfelelő frakció a 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav mellett egy további azonosítatlan anyagot is tartalmaz.

Az egyes termékek hozamát, valamint az át nem alakult kólsav mennyiségét a 9. ábrán feltüntetett kromatogram alapján, az egyes görbeszakaszok alatti területek arányából számítottuk ki. Az eredményeket a 12. táblázatban közöljük.

12. táblázat

Vegyület	Konverzióarány, %	Hozam, g
7 α -Hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav + egy azonosítatlan anyag (A csúcs)	6,5	3,20
3 α ,7 α -Dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsav (B csúcs)	88,0	43,39
7 α ,12 α -Dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsav (C csúcs)	0,3	0,15
Egyéb származékok	0,1	0,05
Kólsav (D csúcs)	5,1	2,51

13. táblázat

Vegyület	Konverzióarány, %	Hozam, g
7 α -Hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav (A csúcs)	3,26	1,61
3 α ,7 α -Dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsav (B csúcs)	92,0	45,40
7 α ,12 α -Dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsav (C csúcs)	0,20	0,10
Egyéb származékok	csekély mennyiség	—
Kólsav (D csúcs)	4,54	2,24

14. példa

A 9. példában közöltek szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy az *Arthrobacter* CA-35-A589-47 törzs helyett *Arthrobacter* CA-35-A-1766-15 törzset (FERM-P No. 5528, ATCC No. 31658) használunk fel. 49,27 g szilárd anyagot kapunk, amely a fermentációs termékek és az át nem alakult kólsav elegye.

Az elegyet a 6. példában ismertetett körülmények között nagysebességű folyadékkromatográfiás elemzésnek vetjük alá.

A kromatogramot a 11. ábrán mutatjuk be. A kromatogram A, B és D csúcsa – hiteles mintákkal végzett összehasonlítás alapján – rendre a 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsavnak, 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavnak és kólsavnak felel meg.

Az A, B és D csúcsnak megfelelő frakciókat elkülönítjük, majd vékonyréteggkromatográfián vizsgáljuk. Valamennyi frakció csak egy vegyületet tartalmaz.

Az egyes termékek hozamát, valamint az át nem alakult kólsav mennyiségét a 11. ábrán feltüntetett kromatogram alapján, az egyes görbeszakaszok alatti területek arányából számítottuk ki. Az eredményeket a 14. táblázatban közöljük.

15. példa

A 9. példában közöltek szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy az *Arthrobacter* CA-35-A589-47 törzs helyett *Arthrobacter* CA-35-M-965-3 törzset (FERM-P No. 5529, ATCC No. 31659) használunk fel. 49,36 g szilárd anyagot kapunk, amely a fermentációs termékek és az át nem alakult kólsav elegye.

Az elegyet a 6. példában ismertetett körülmények között nagysebességű folyadékkromatográfiás elemzésnek vetjük alá.

A kromatogramot a 12. ábrán mutatjuk be. A kromatogram A, B és D csúcsa – hiteles mintákkal végzett összehasonlítás alapján – rendre a 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsavnak, 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavnak és kólsavnak felel meg.

Az A, B és D csúcsnak megfelelő frakciókat elkülönítjük, majd vékonyréteggkromatográfián vizsgáljuk. Az A csúcsnak megfelelő frakció a 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav mellett egy további azonosítatlan anyagot is tartalmaz, míg a B és a D csúcsnak megfelelő frakció csak egy vegyületet tartalmaz.

Az egyes termékek hozamát, valamint az át nem alakult kólsav mennyiségét a 12. ábrán feltüntetett kromatogram alapján, az egyes görbeszakaszok alatti területek arányából számítottuk ki. Az eredményeket a 15. táblázatban közöljük.

14. táblázat

Vegyület	Konverzióarány, %	Hozam, g
7 α -Hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav (A csúcs)	0,23	0,11
3 α ,7 α -Dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsav (B csúcs)	97,02	47,80
Egyéb származékok	0,75	0,37
Kólsav (D csúcs)	2,0	0,99

15. táblázat

Vegyület	Konverzióarány, %	Hozam, g
7 α -Hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav + egy azonosítatlan anyag (A csúcs)	8,6	4,24
3 α ,7 α -Dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsav (B csúcs)	85,3	42,11
Egyéb származékok	2,0	0,99
Kólsav	4,1	2,02

16. példa

A 9. példában közöltek szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy az *Arthrobacter* CA-35-A589-47 törzs helyett *Arthrobacter* CA-35-Y-37-12 törzset (FERM-P No. 5530, ATCC No. 31660) használunk fel. 49,33 g szilárd anyagot kapunk, amely a fermentációs termékek és az át nem alakult kólsav elegye.

Az elegyet a 6. példában ismertetett körülmények között nagysebességű folyadékkromatográfiás elemzésnek vetjük alá.

A kromatogramot a 13. ábrán mutatjuk be. A kromatogram A, B, C és D csúcsa – hiteles mintákkal végzett összehasonlítás alapján – rendre a 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsavnak, 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavnak, 7 α ,12 α -dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsavnak és kólsavnak felel meg.

Az A, B, C és D csúcsnak megfelelő frakciókat elkülönítjük, majd vékonyréteggromatográfiásan vizsgáljuk. Valamennyi frakció csak egy vegyületet tartalmaz.

Az egyes termékek hozamát, valamint az át nem alakult kólsav mennyiségét a 13. ábrán feltüntetett kromatogram alapján, az egyes görbeszakaszok alatti területek arányából számítottuk ki. Az eredményeket a 16. táblázatban közöljük.

17. példa

Az 1. példában közöltek szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy az *Arthrobacter* CA-35 törzs helyett *Brevibacterium* CA-6 törzset (FERM-P No. 5144, ATCC No. 31661) használunk fel.

A kapott szilárd anyagot, amely a fermentációs termékek és a kólsav elegye, az 1. példában ismertetett körülmények között nagysebességű folyadékkromatográfiás elemzésnek vetjük alá.

A kromatogramot a 14. ábrán mutatjuk be.

Az E, A, B és D csúcsnak megfelelő frakciókból elkülönítjük a termékeket, és az egyes termékek kémiai szerkezetét tömegspektrum, infravörös spektrum és NMR-spektrum felvételével vizsgáljuk. A spektrum-adatok egyértelműen igazolják, hogy a felsorolt frakciók rendre 7 α -hidroxi-3,12-diketo- Δ^4 -kolánsavat, 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsavat, 7 α ,3 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavat, illetve kólsavat tartalmaznak. Az X és Y csúcsnak megfelelő frakciókban lévő vegyületeket nem azonosítottuk.

A 14. ábrán bemutatott kromatogramban az X és Y 50 csúcstól eltérő csúcsok alatti területek aránya (vagyis az E : A : B : D területarány) 12,2 : 22,2 : 44,9 : 20,7.

16. táblázat

Vegyület	Konverzióarány, %	Hozam, g
7 α -Hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav (A csúcs)	7,7	3,80
3 α ,7 α -Dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsav (B csúcs)	90,0	44,40
7 α ,12 α -Dihidroxi-3-keto-5 β -kolánsav (C csúcs)	0,3	0,15
Kólsav (D csúcs)	2,0	0,98

18. példa

Az 1. példában közöltek szerint járunk el, azzal a különbséggel, hogy az *Arthrobacter* CA-35 törzs helyett *Corynebacterium* CA-53 törzset (FERM-P No. 5532, ATCC No. 31662) használunk fel. 82 g szilárd anyagot kapunk, amely a fermentációs termékek és az át nem alakult kólsav elegye.

A kapott elegyet nagysebességű folyadékkromatográfiás elemzésnek vetjük alá. Az elemzést az 1. példában közöltek szerint végezzük, azzal a különbséggel, hogy eluálószerként a 30:70 térfogatarányú víz – metanol elegy (pH = 2,5) helyett 30:70 térfogatarányú, 4,0 pH-értékű víz – metanol elegyet használunk fel.

A kromatogramot a 15. ábrán mutatjuk be. A kromatogram A, B, C és D csúcsa – hiteles mintákkal végzett összehasonlítás alapján – rendre a 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsavnak, 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavnak, 7 α -hidroxi-3,12-diketo- Δ^4 -kolánsavnak és kólsavnak felel meg.

Az A, B és C csúcsnak megfelelő frakciókból elkülönítjük a termékeket, és a termékek kémiai szerkezetét tömegspektrum, infravörös spektrum és NMR-spektrum felvételével vizsgáljuk. A spektrum-adatok egyértelműen igazolják, hogy termékként rendre 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsavat, 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavat és 7 α -hidroxi-3,12-diketo- Δ^4 -kolánsavat kaptunk.

1. összehasonlító példa

Háromnyakú gömblombikba 10 g, a fentiek szerint előállított 3 α ,7 α -dihidroxi-12-keto-5 β -kolánsavat mérünk be, és a vegyülethez lassú ütemben 100 ml etilén-glikolt és 20 ml vízben oldott 10 g kálium-hidroxidot adunk. Ezután az elegyhez 10 ml 85 %-os hidrazin-hidrátot adunk, majd a kapott elegyet 2 órán át 100 °C-on visszafolytatás közben forraljuk. Ezután az elegy hőmérsékletét fokozatosan növelve a forralást 4 órán át 185–190 °C-on folytatjuk, és eközben kidesztilláljuk a hidrazin-hidrátot. A reakcióelegyet lehűtjük, vízzel hígítjuk, majd az elegy pH-ját 3-ra állítjuk. A kivált csapadékot leszűrjük, vízzel mossuk és levegőn szárítjuk. 8,5 g 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -kolánsavat (CDCA) kapunk.

2. összehasonlító példa

Háromnyakú gömblombikba 3 g, a fentiek szerint előállított 7 α -hidroxi-3,12-diketo-5 β -kolánsav 70 ml piridin-nel készített oldatát mérjük be, és az oldathoz 1 mól p-toluolszulfonil-kloridot adunk. A kapott elegyet 1

órán át 0 °C-on tartjuk, majd 5 órán át visszafolytatás közben forraljuk. Ezután az elegyhez 3 n vizes sósav-oldatot adunk, majd az elegyet 100 ml éterrel extraháljuk. Az extraktumból csökkentett nyomáson lepároljuk az étert. 2,5 g Δ^6 - és/vagy Δ^7 -3,12-diketo-kolénsavat kapunk. 2 g így kapott maradékot 10 ml 1 n vizes nátriumhidroxid-oldatban oldunk, az oldathoz 0,1 g Raney-nikkelt adunk, majd az elegybe 0,01 mól hidrogéngázt vezetünk, és a reakcióelegyet éjszakán át állni hagyjuk. Termékként 3 α ,12 α -dihidrox-5 β -kolénsavat (deoxi-kolsavat) és 3 α ,12 β -dihidrox-5 β -kolénsavat kapunk 90 %-os hozammal.

Szabadalmi igénypontok

1. Mikrobiológiai eljárás az (I) általános képletű kolán-sav-származékok előállítására – ahol

X oxigénatomot vagy $\begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{H} \end{smallmatrix}$ csoportot jelent, és

R jelentése hidrogénatom, alkálifém-atom vagy alkáliföldfém-atom, *azzal jellemezve*, hogy kolsavat vagy egy kolsav-sót tartalmazó tápközegeben az adott tápközegeben növekedni képes, (I) általános képletű kolán-sav-származékokat termelő, az Arthrobacter, Brevibacterium vagy Corynebacterium nemzetségbe tartozó mikroorganizmust, nevezetesen az Arthrobacter CA-35 (FERM-P No. 5145, ATCC No. 31651), Brevibacterium CA-6 (FERM-P No. 5144, ATCC No. 31661) vagy Corynebacterium CA-53 (FERM-P No. 5532, ATCC No. 31662) törzsek valamelyikét, illetve ezek mutánsait vagy variánsait tenyésztjük, majd a kapott termékeket elkülönítjük. (Elsőbbsége: 1980. augusztus 18.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy a megnevezett mikroorganizmusok mutánsaiként vagy variánsaiként Arthrobacter CA-35 (FERM-P No. 5145, ATCC No. 31651), Arthrobacter CA-35-A589-29-32 (FERM-P No. 5522, ATCC No. 31652), Arthrobacter CA-35-A589-47 (FERM-P No. 5523, ATCC No. 31653), Arthrobacter CA-35-A849 (FERM-P No. 5524, ATCC No. 31654), Arthrobacter CA-35-A-1071-15 (FERM-P No. 5525, ATCC No. 31655), Arthrobacter CA-35-A-1448 (FERM-P No. 5526, ATCC No. 31656), Arthrobacter CA-35-A-1475 (FERM-P No. 5527, ATCC No. 31657), Arthrobacter CA-35-A-1766-15 (FERM-P No. 5528, ATCC No. 31658), Arthrobacter CA-35-M-965-3 (FERM-P No. 5529, ATCC No. 31659), Arthrobacter CA-35-Y-37-12 (FERM-P No. 5530, ATCC No. 31660), Brevibacterium CA-6 (FERM-P No. 5144, ATCC No. 31661) vagy Corynebacterium CA-53 (FERM-P No. 5532, ATCC No. 31662) törzset használunk fel. (Elsőbbsége: 1980. augusztus 18.)

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja 3 α ,7 α -dihidrox-12-keto-5 β -kolénsav előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti törzseket,

illetve azok mutánsait vagy variánsait tenyésztjük, majd a kapott terméket elkülönítjük. (Elsőbbsége: 1979. augusztus 21.)

4. A 3. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy a fermentációban az Arthrobacter CA-35 (FERM-P No. 5532, ATCC No. 31662) vagy Brevibacterium CA-6 (FERM-P No. 5144, ATCC No. 31661) törzsek valamelyikét, illetve ezek mutánsait vagy variánsait használjuk fel. (Elsőbbsége: 1979. augusztus 21.)

5. A 4. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy a megnevezett mikroorganizmusok mutánsaiként vagy variánsaiként Arthrobacter CA-35-A589-29-32 (FERM-P No. 5522, ATCC No. 31652), Arthrobacter CA-35-A589-47 (FERM-P No. 5523, ATCC No. 31653), Arthrobacter CA-35-A849 (FERM-P No. 5524, ATCC No. 31654), Arthrobacter CA-35-A-1071-15 (FERM-P No. 5525, ATCC No. 31655), Arthrobacter CA-35-A-1448 (FERM-P No. 5526, ATCC No. 31656), Arthrobacter CA-35-A-1766-15 (FERM-P No. 5528, ATCC No. 31658), Arthrobacter CA-35-A-1475 (FERM-P No. 5527, ATCC No. 31657), Arthrobacter CA-35-M-965-3 (FERM-P No. 5529, ATCC No. 31659) vagy Arthrobacter CA-35-Y-37-12 (FERM-P No. 5530, ATCC No. 31660) törzset használunk fel. (Elsőbbsége: 1980. június 17.)

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja 7 α -hidrox-3,12-diketo-5 β -kolénsav előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti törzseket, illetve azok mutánsait vagy variánsait tenyésztjük, majd a kapott terméket elkülönítjük. (Elsőbbsége: 1979. augusztus 31.)

7. A 6. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy a fermentációban az Arthrobacter CA-35 (FERM-P No. 5532, ATCC No. 31662) vagy Brevibacterium CA-6 (FERM-P No. 5144, ATCC No. 31661) törzsek valamelyikét, illetve ezek mutánsait vagy variánsait használjuk fel. (Elsőbbsége: 1979. augusztus 31.)

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy a fermentációban Corynebacterium CA-53 (FERM-P No. 5144, ATCC No. 31661) törzset vagy ennek mutánsait vagy variánsait használjuk fel. (Elsőbbsége: 1980. június 19.)

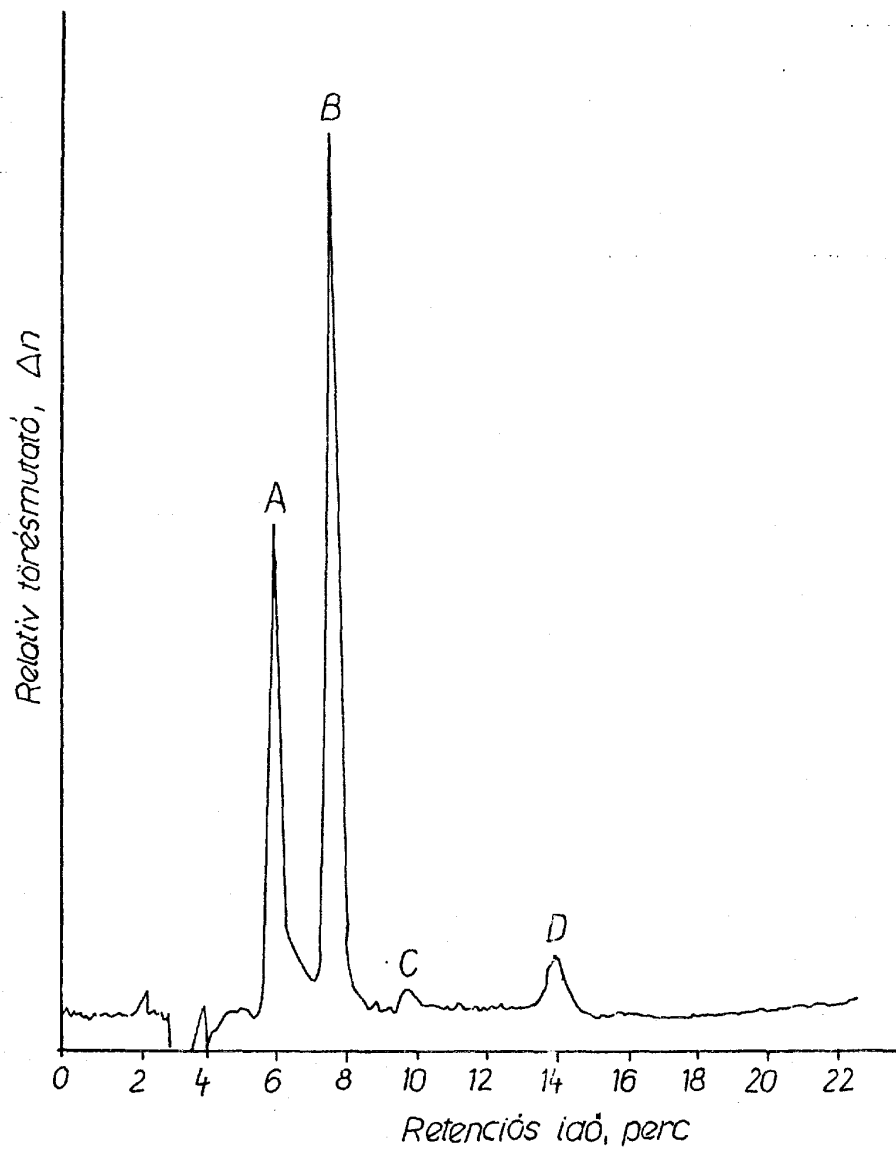
9. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy a szubsztrátumot – kolsavban kifejezve – 1–500 g/l koncentrációban használjuk fel. (Elsőbbsége: 1980. augusztus 18.)

10. A 9. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy a szubsztrátumot – kolsavban kifejezve – 5–300 g/l koncentrációban használjuk fel. (Elsőbbsége: 1980. augusztus 18.)

11. A 10. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy a szubsztrátumot – kolsavban kifejezve – 10–200 g/l koncentrációban használjuk fel. (Elsőbbsége: 1980. augusztus 18.)

183 201

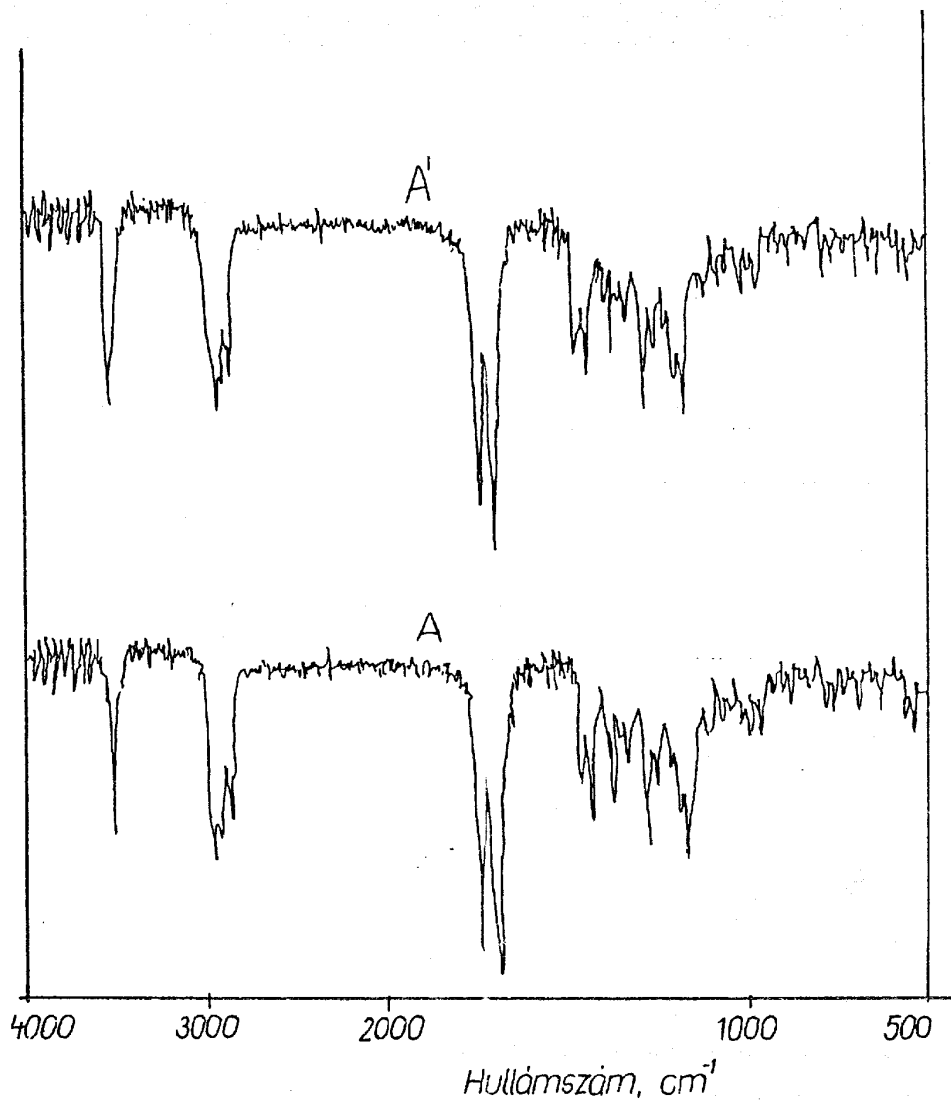
NSZO₃: C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



1. ábra

183 201

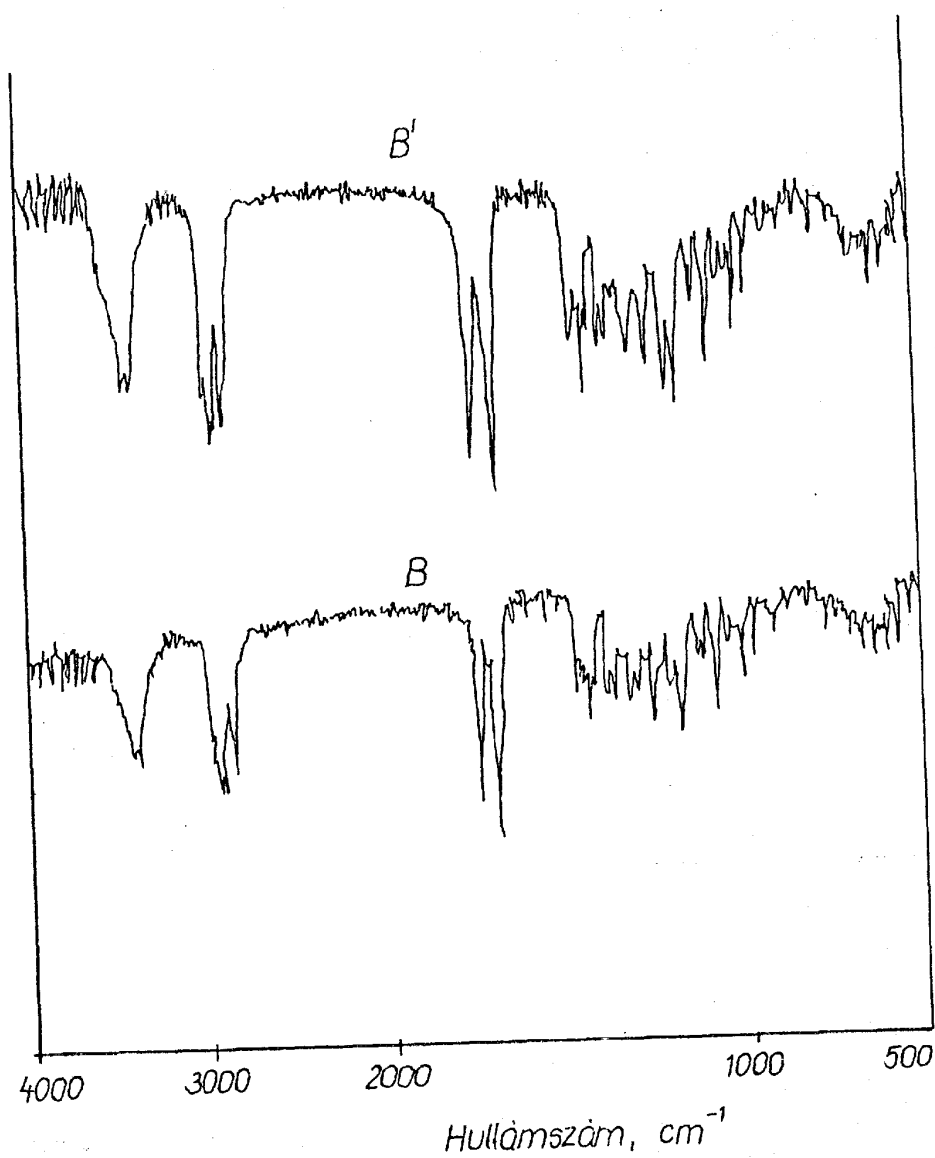
NSZ O_3 : C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



2. ábra

183 201

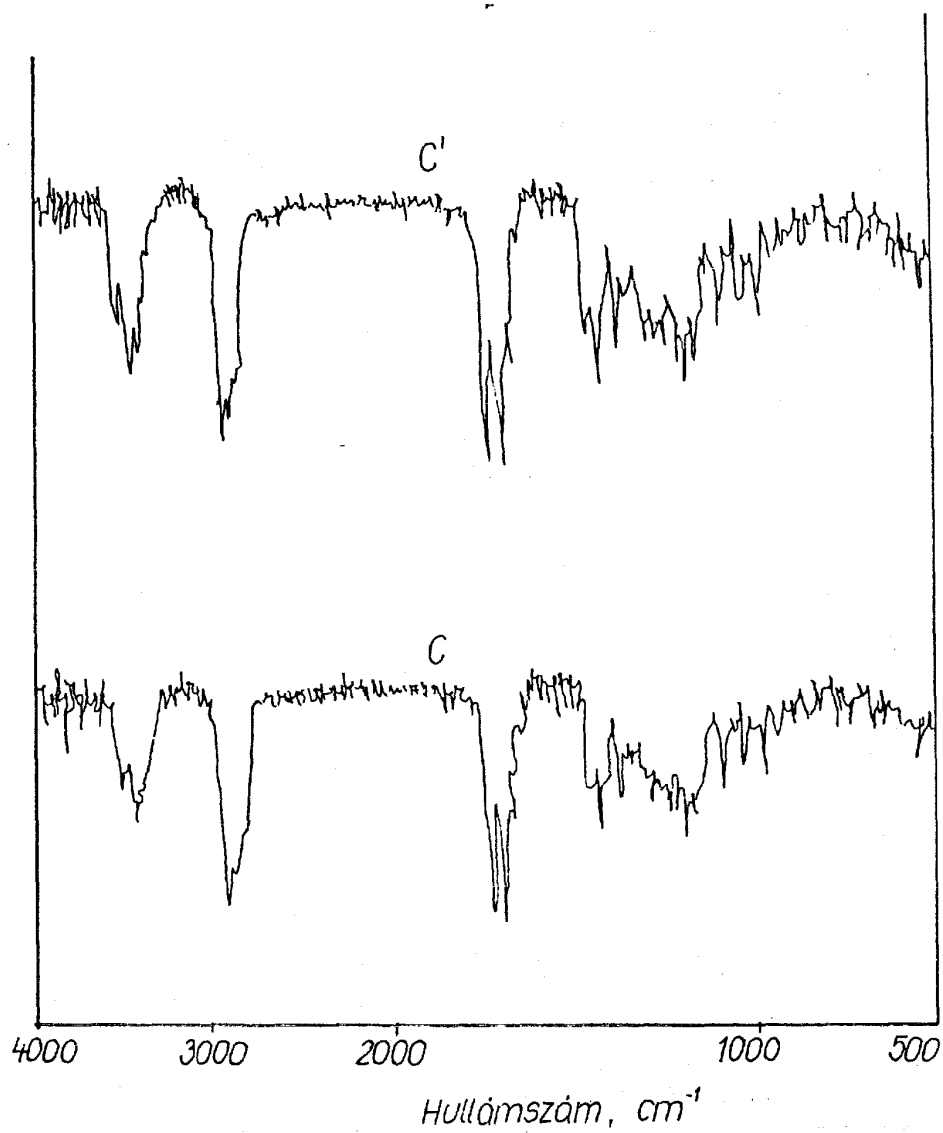
NSZ O_3 : C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



3. ábra

183 201

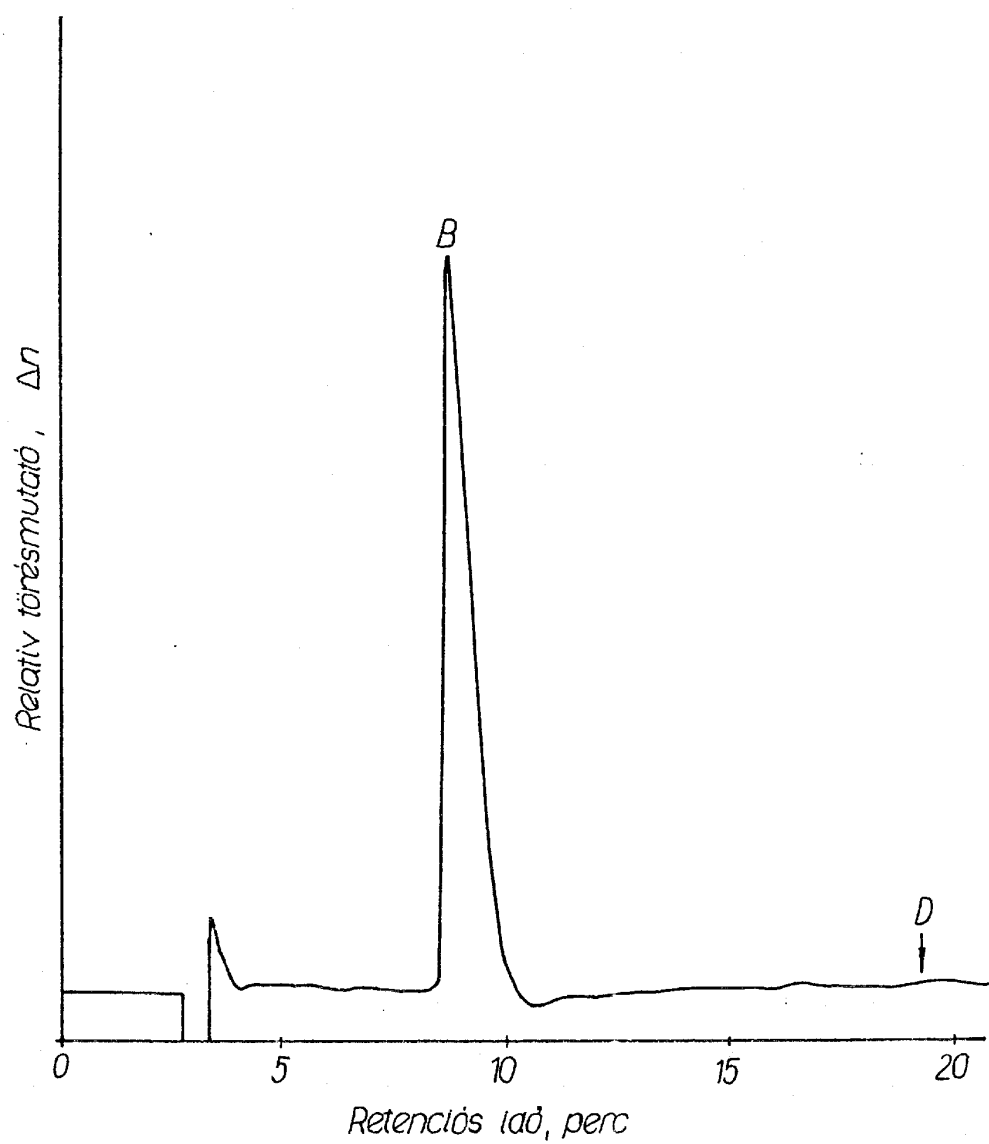
NSZ O_3 : C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



4. ábra

183 201

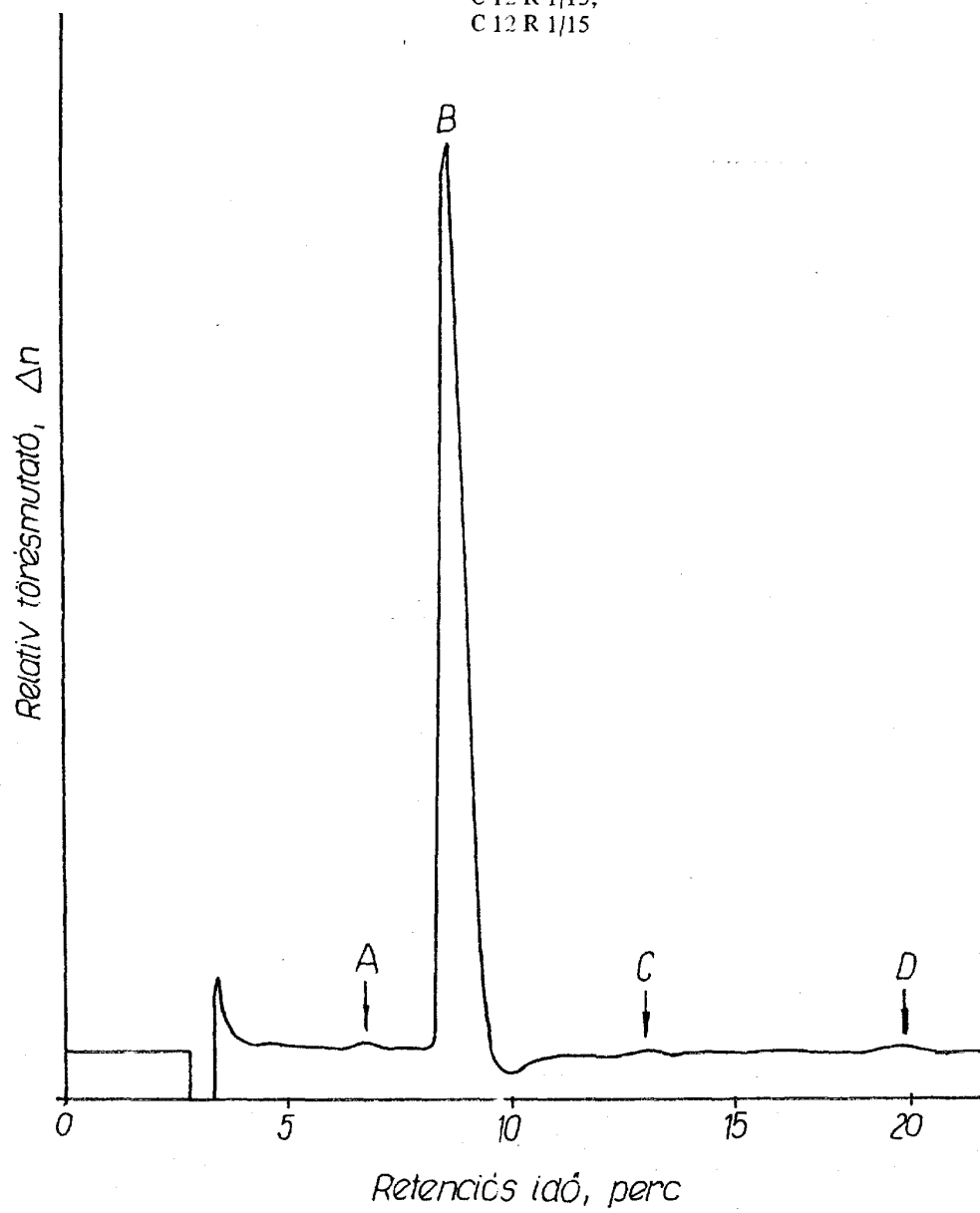
NSZO₃: C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



5. ábra

183 201

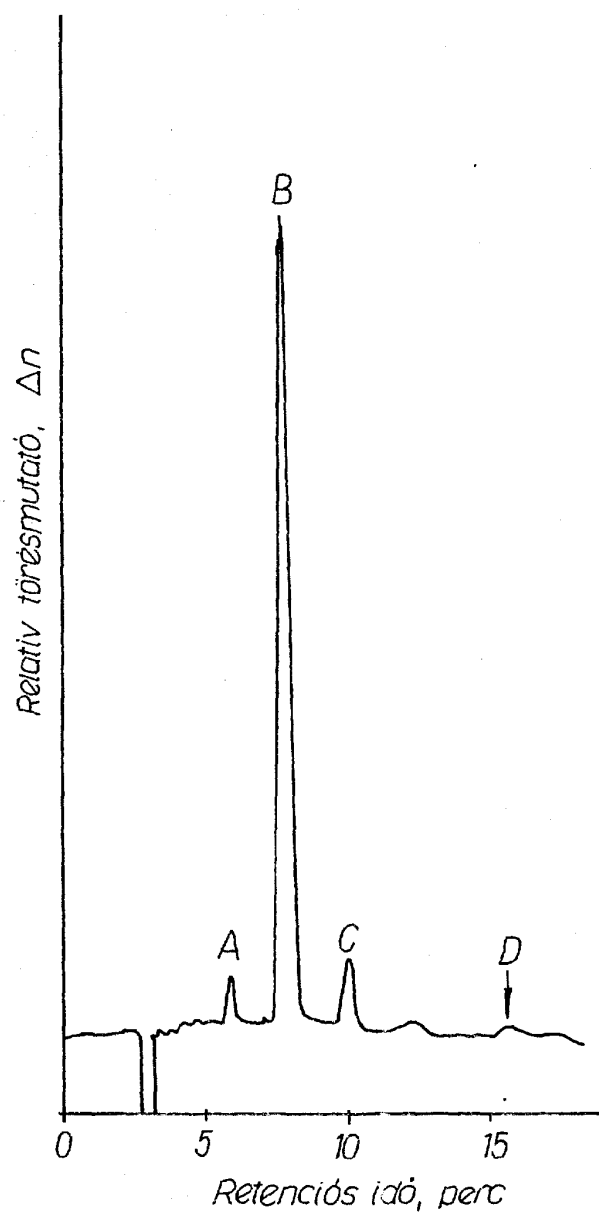
NSZ₃: C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



6. dbra

183 201

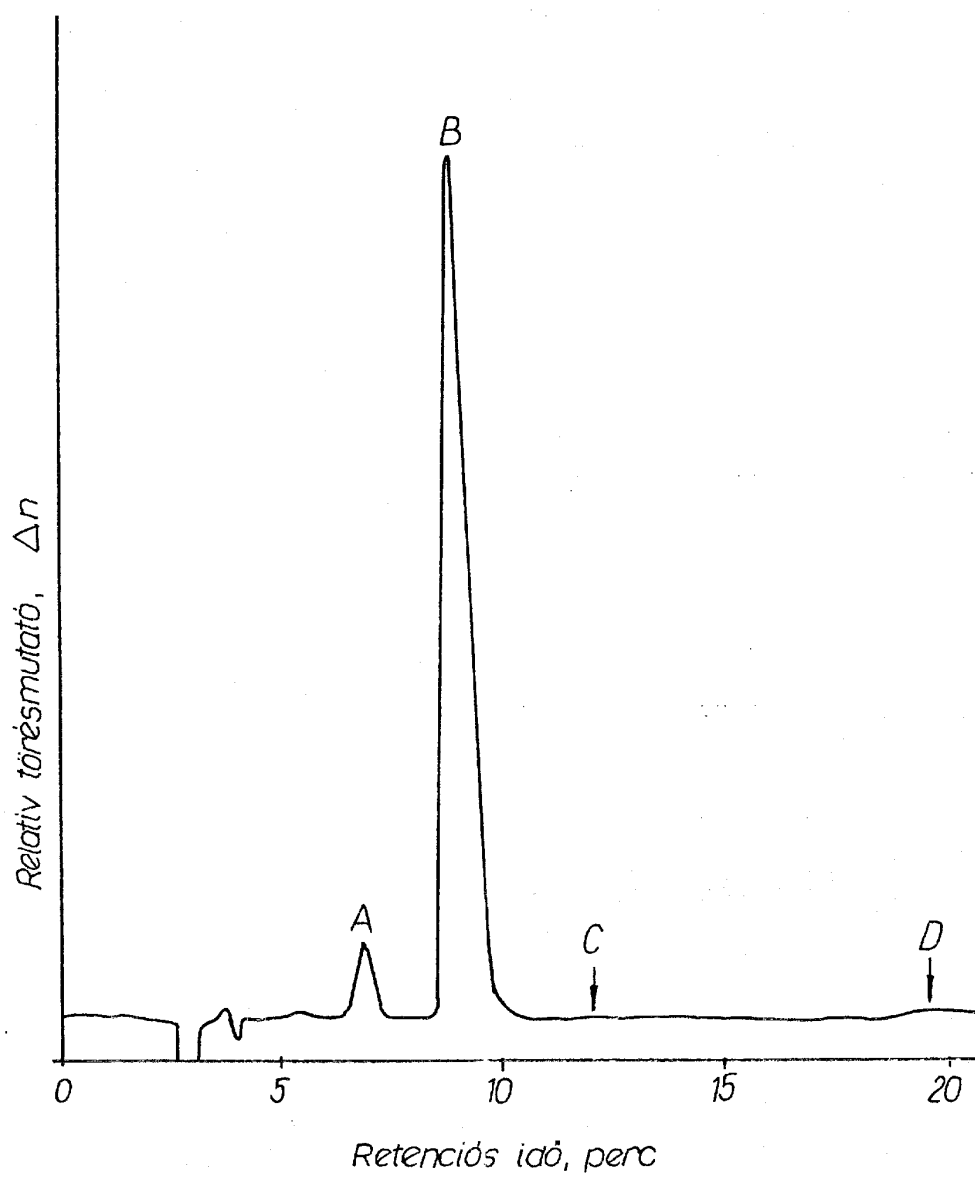
NSZ₃: C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



7. ábra

183 201

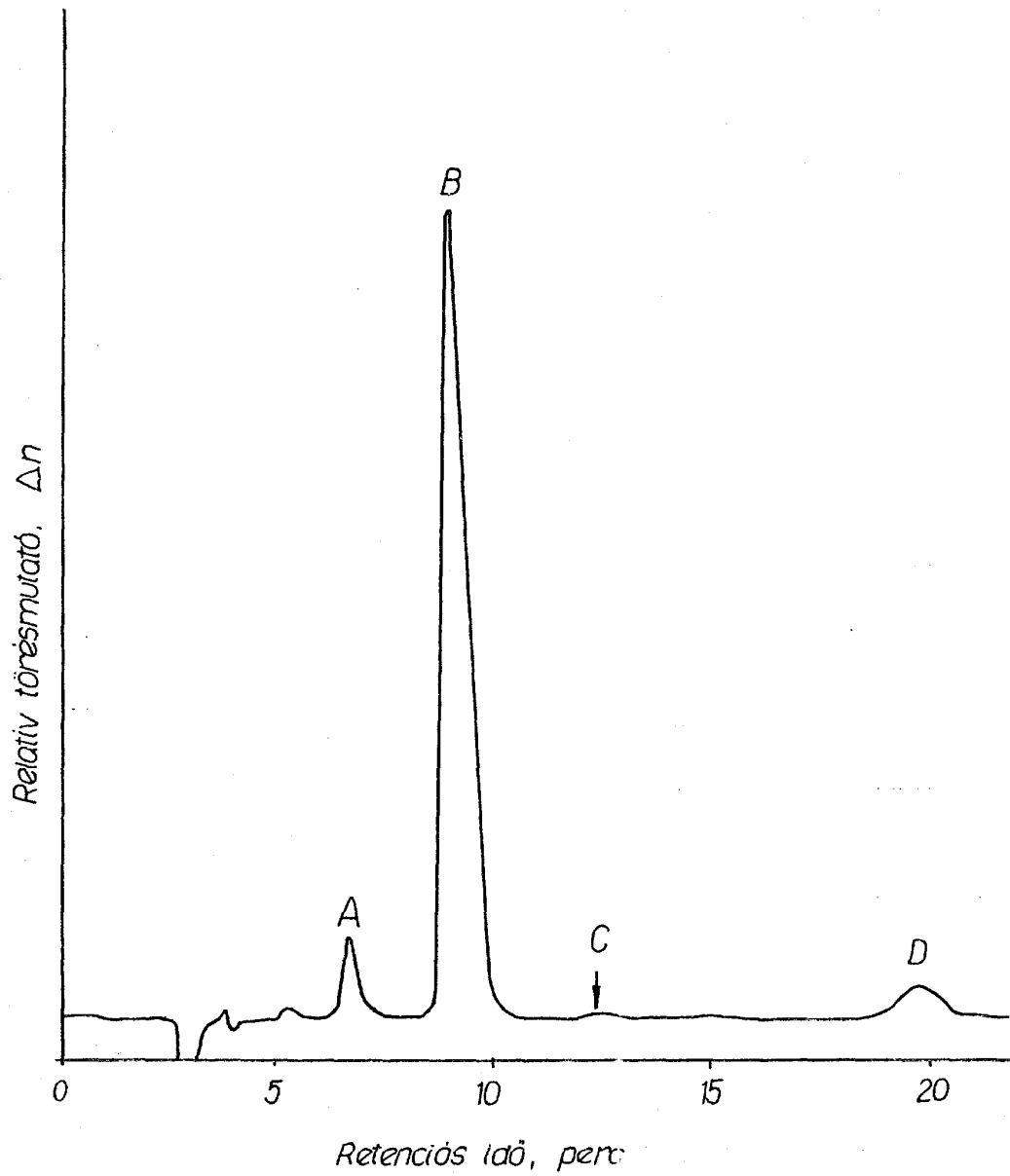
NSZ₃: C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



8. ábra

183 201

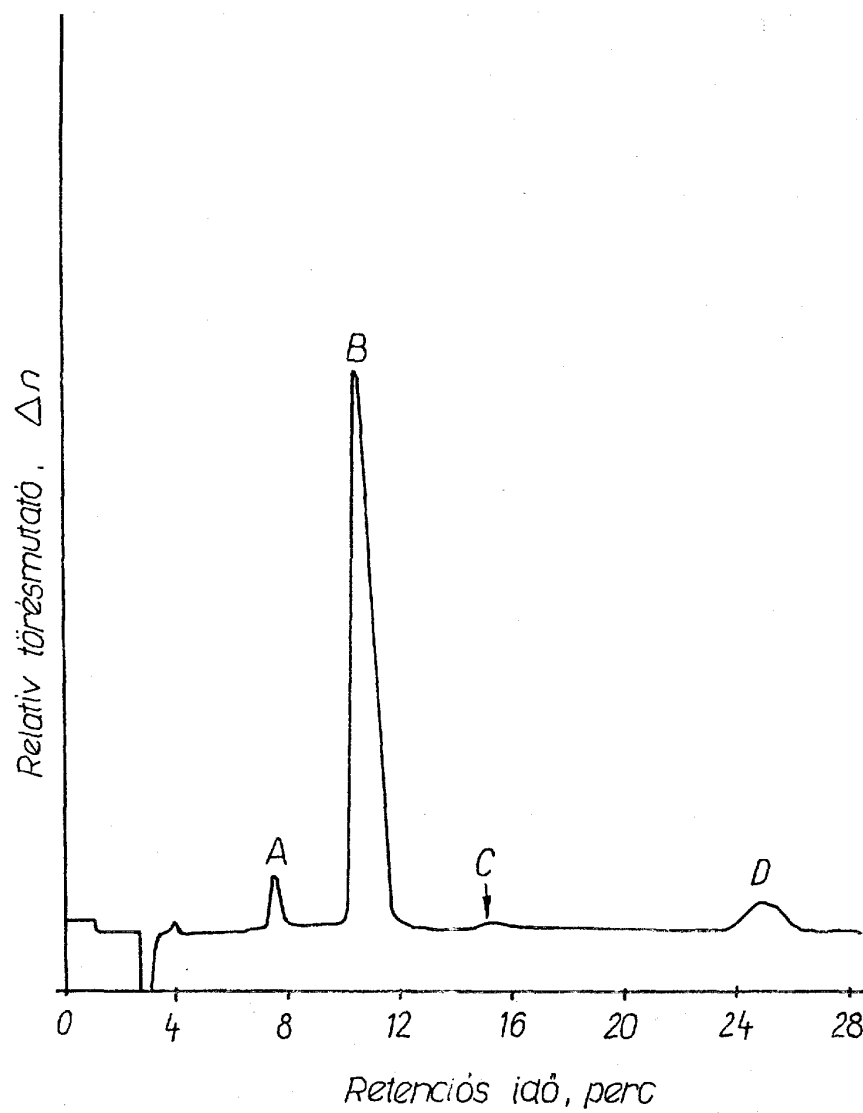
NSZ₃: C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



9. ábra

183 201

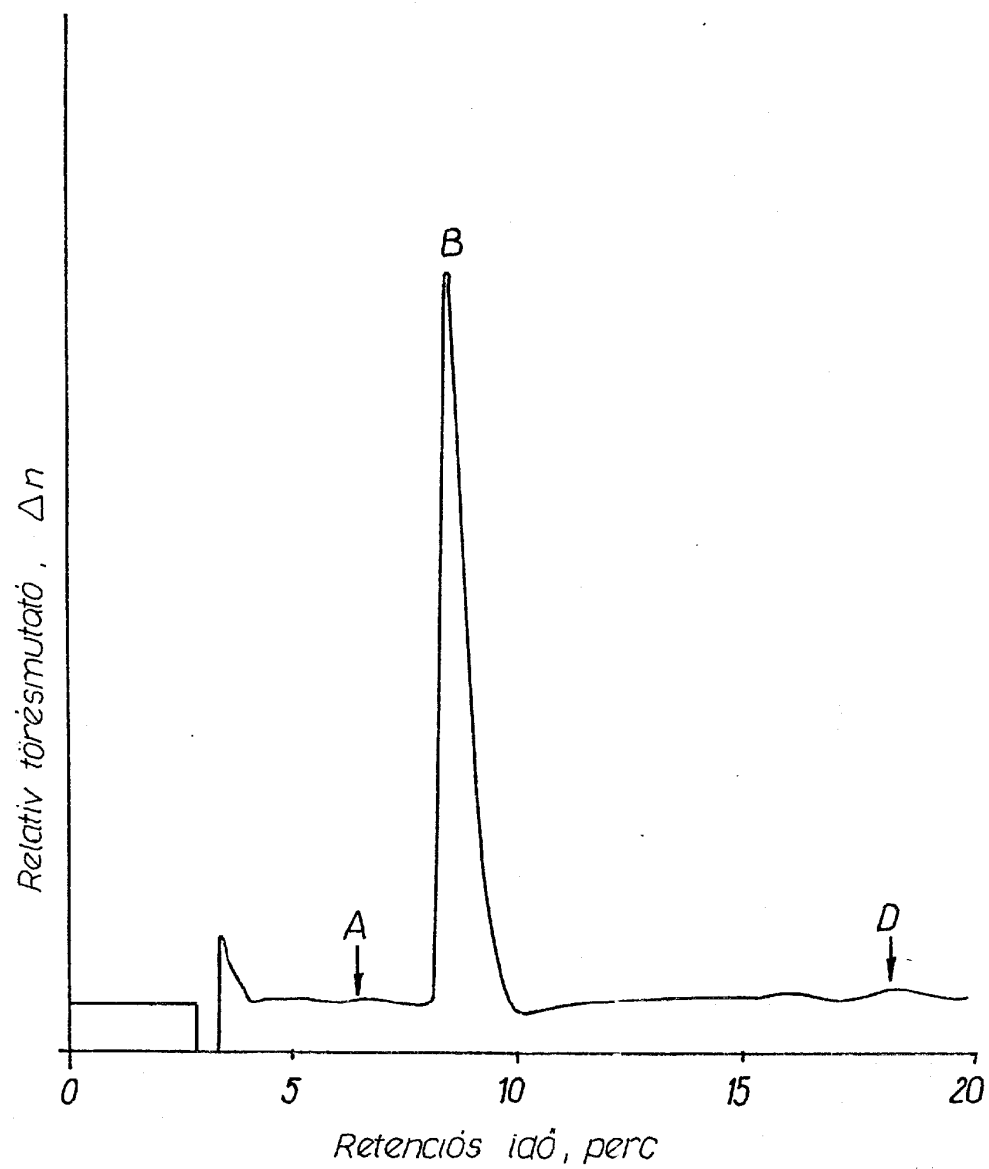
NSZ₃: C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



10. ábra

183 201

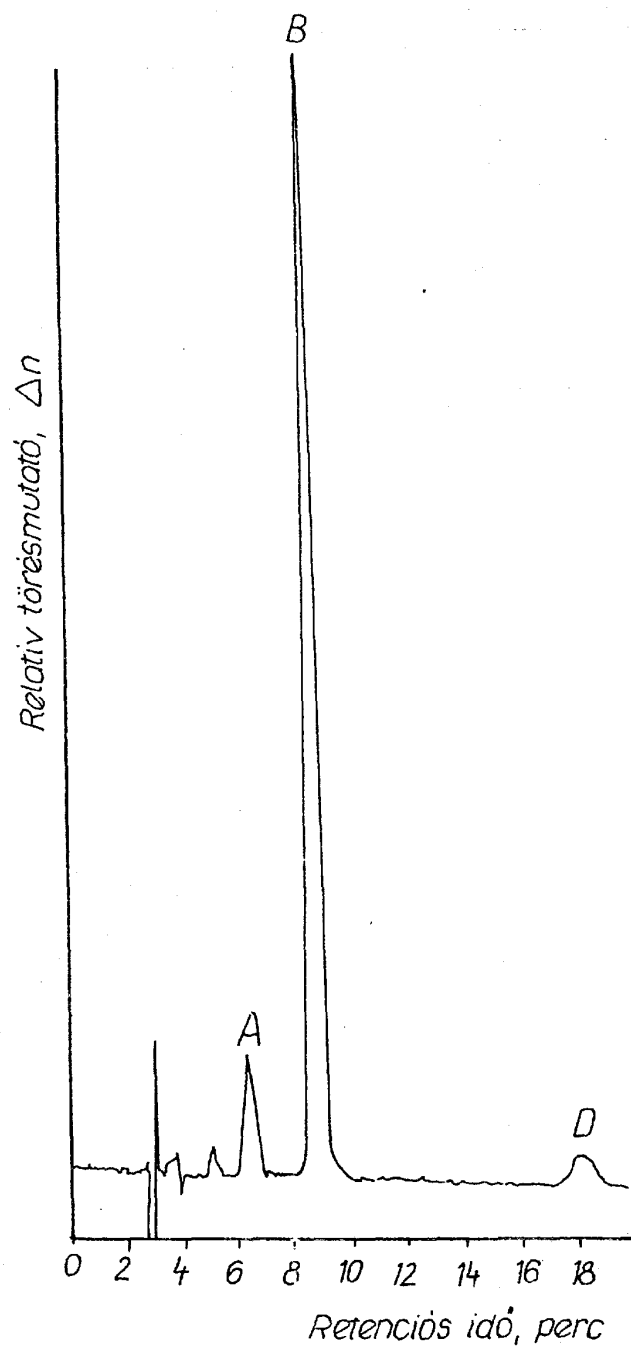
NSZO₃: C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



11. ábra

183 201

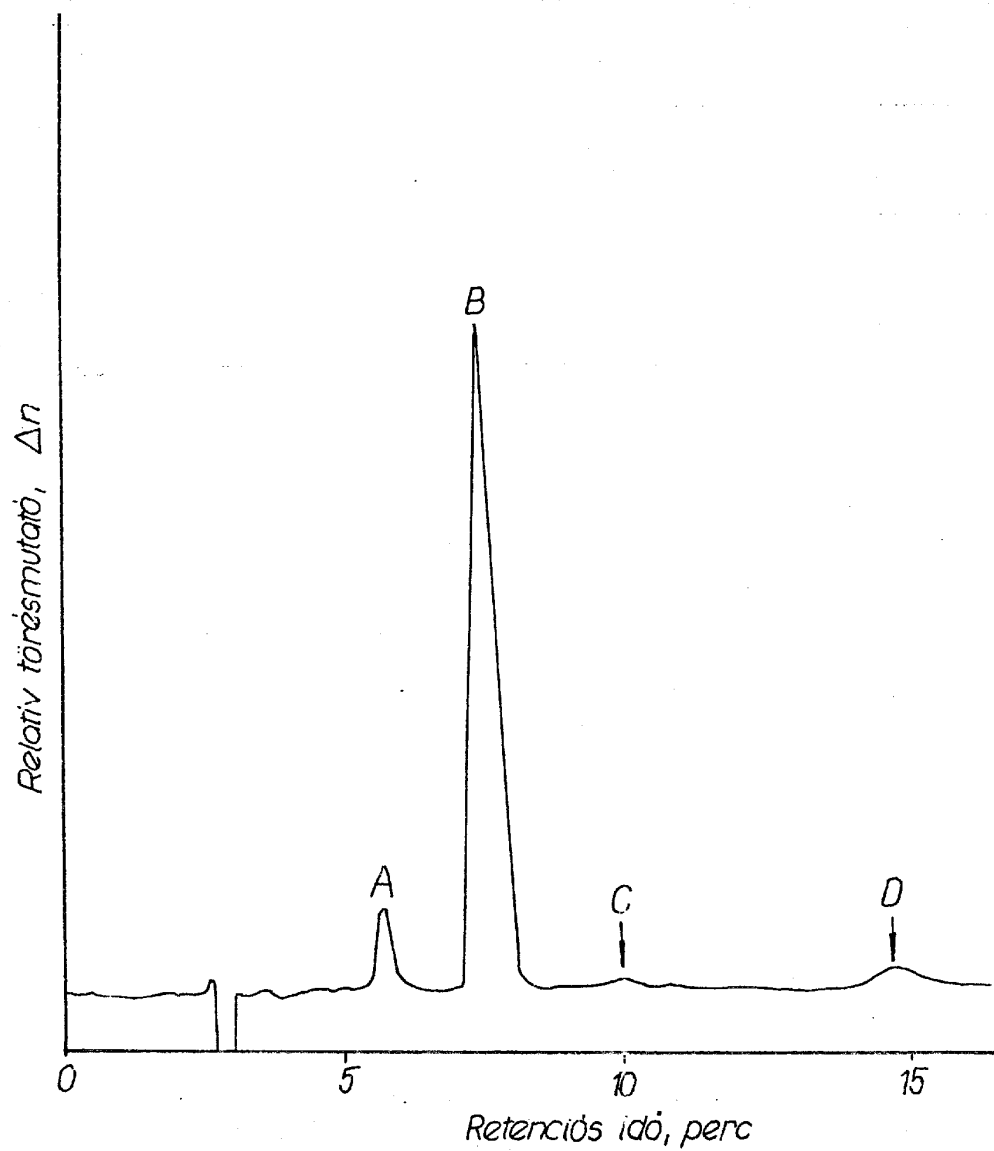
NSZ₃: C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



12. ábra

183 201

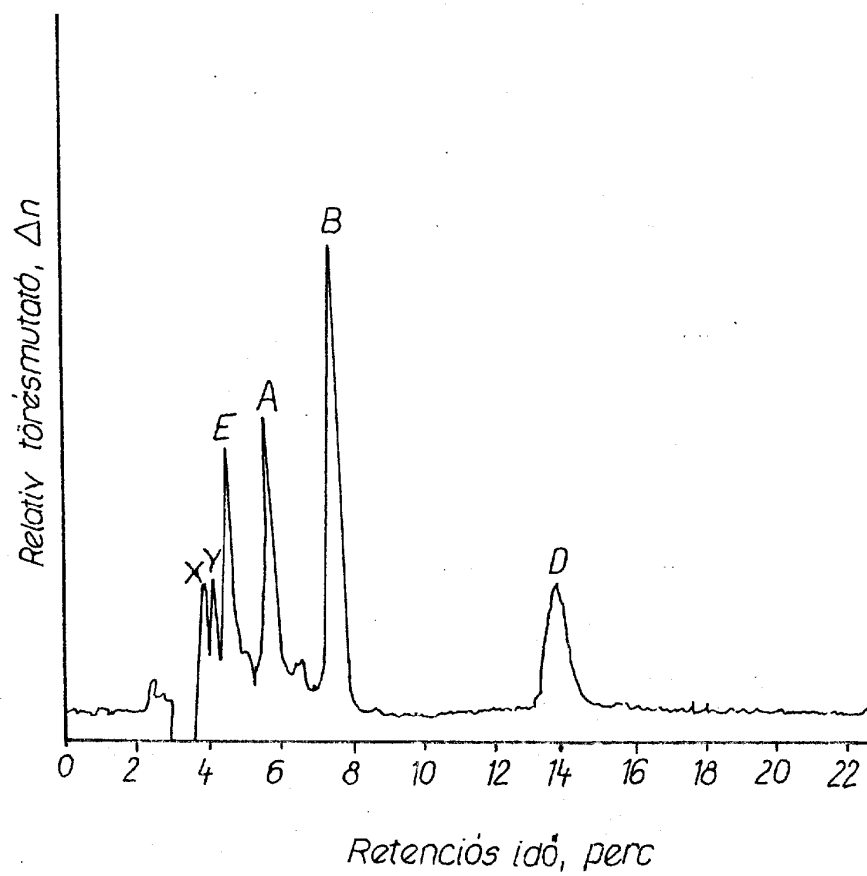
NSZO₃: C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



13. ábra

183 201

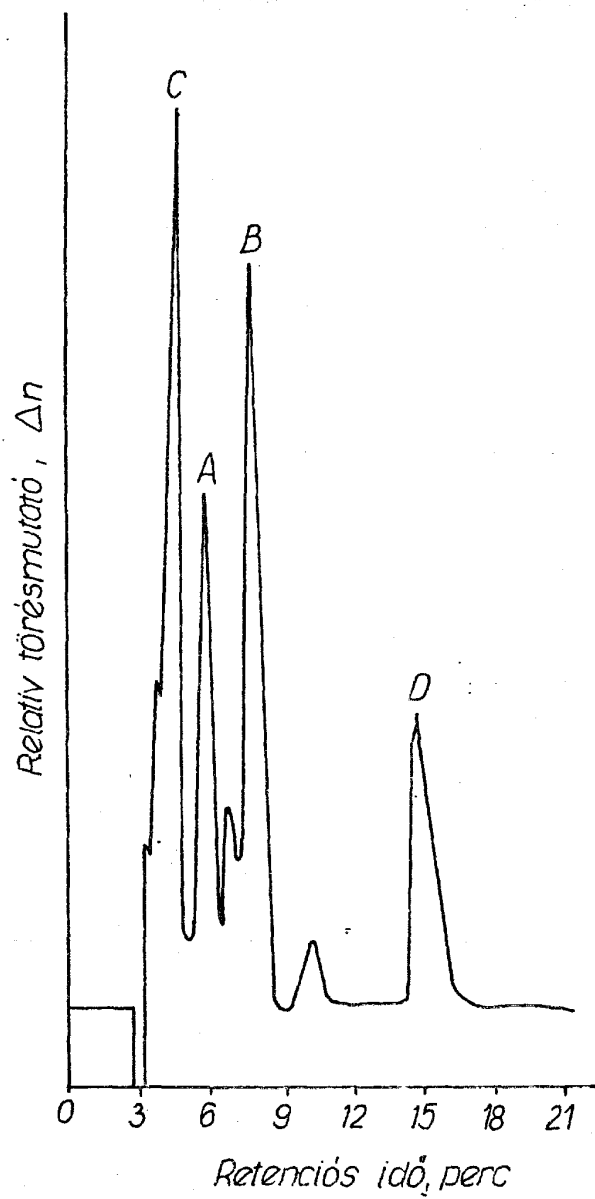
NSZ₃: C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



14. ábra

183 201

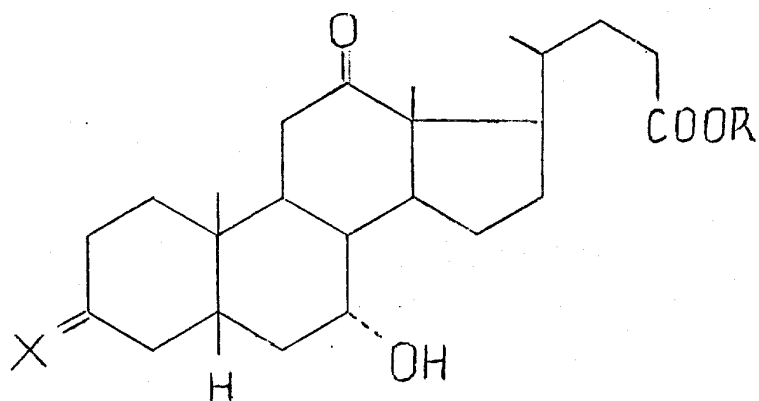
NSZ₃: C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



15. ábra

183 201

NSZO₃: C 12 P 33/16;
C 12 R 1/06;
C 12 R 1/13;
C 12 R 1/15



(I)

20

Felelős kiadó: Himer Zoltán osztályvezető
Megjelent a Műszaki Könyvkiadó gondozásában
ZÖLDÉRT Nyomda – Miskolc