

Mikrobiologische Reaktionen¹

Seitenketten-Abbau und Dehydrierung bei Steroiden²

In neuerer Zeit hat die von PETERSON und Mitarbeitern³ eingeführte Methode zur mikrobiologischen Hydroxylierung von Steroiden, die insbesondere in 11 α - aber auch in 11 β -Stellung, ferner beispielsweise in 6-, 7-, 8-, 14- oder 16-Stellung erfolgt, praktische Bedeutung erlangt. Bei dieser Reaktion tritt gelegentlich auch Hydrierung von Doppelbindungen ein.

Die Untersuchung einer grösseren Anzahl von Schimmelpilzen ergab nun, dass gewisse Arten, speziell solche der Gattung *Fusarium*, wie *F. solani* oder *F. caucasicum*, erstaunlicherweise die Fähigkeit besitzen, Progesteron (I) unter aeroben Bedingungen in 1–2 Tagen mit sehr guter Ausbeute in $\Delta^{1,4}$ -Androstadien-3,17-dion (III) umzuwandeln. Diese bekannte Substanz wurde durch Mischschmelzpunkt, spezifische Drehung, Ultraviolett- und IR-Spektrum, durch Überführung in das Bis-2,4-dinitrophenylhydrazon und das Androstan-3,17-dion (Hydrierung mit Platinoxid in Eisessig und anschließende Oxydation mit Chromsäure) identifiziert. Bei dieser Reaktion wird also die Seitenkette zum Ringketon abgebaut und zugleich im Ring A durch Dehydrierung eine zweite konjugierte Doppelbindung eingeführt.

In weiteren Versuchen wurden eine Reihe anderer Steroide entsprechend behandelt (siehe Tabelle) und die Reaktionsprodukte teils in präparativem Maßstabe isoliert, teils papierchromatographisch nachgewiesen⁴. Dabei zeigte sich, dass 11-Desoxy-corticosteron (II) und Δ^4 -Androsten-3,17-dion (IV) ebenso rasch und gut in III umgewandelt werden wie I. Demgemäss ergaben auch Gemische von I und IV, wie sie durch Chromsäure-Oxydation von Cholesterylacetat-dibromid, anschlies-

sende Entbromung, Verseifung und Oppenauer-Oxydation erhalten werden, in guter Ausbeute III. Wurden hingegen Δ^5 -3 β -Oxyderivate, wie Pregnenolon (V) oder Dehydroisoandrosteron (VI), inkubiert, so waren die Ausbeuten an III geringer. Bei der Umwandlung von V liess sich zeigen, dass zuerst die Seitenkette zu VI abgebaut und letzteres dann zu III dehydriert wird. Offensichtlich verläuft also in diesen Fällen der Seitenkettenabbau und die dehydrierende Einführung der zweiten Doppelbindung sehr rasch, die Dehydrierung der Δ^5 -3 β -Oxy- zur Δ^4 -3-Keto-Gruppierung langsamer und schlechter.

Wurde die Pilzkultur längere Zeit, nämlich etwa eine Woche, einwirken gelassen, so entstand aus allen genannten Ausgangsstoffen sowie aus III eine neue Substanz mit zusätzlicher Sauerstofffunktion («Oxydationsprodukt 2»).

Bei der Verwendung von Steroiden, die keine vom Kohlenstoffatom 5 ausgehende Doppelbindung aufweisen, wie Allopregnan-3,20-dion (VIII) und 3 β -Acetoxyallopregnan-20-on (IX), trat ebenfalls rascher Abbau der Seitenkette ein, wobei in den genannten Fällen das Androstan-3,20-dion (X) entstand. Letzteres liess sich aber nur langsam und mit mässiger Ausbeute zu III dehydrieren.

Nicht in der Seitenkette abgebaut wurden 17 α -Oxy-20-oxo-pregnene, wie REICHSTEIN'S Substanz S und Cortison, sowie die untersuchten Verbindungen mit längerer Seitenkette (Δ^4 -3-Keto-bisnorcholensäuremethylester; Δ^4 -3-Keto- und Δ^5 -3 β -Oxy-norcholen-22-on; Δ^5 -3 β -Acetoxy-27-norcholesten-25-on).

Progesteron ist heute zweifelsohne das am leichtesten zugängliche Steroidhormon. Statt chemisch durch eine Vielzahl von Reaktionen kann es nun mikrobiologisch in nur einer Operation in der Seitenkette abgebaut und zugleich im Ring A dehydriert werden. Die Bedeutung des so entstehenden Androstadien-dions (III) liegt darin, dass es sich durch Aromatisierung nach INHOFFEN¹ wiederum in nur einer Reaktion zum Follikelhormon Oestron (VII) umwandeln lässt. Damit ist auch die

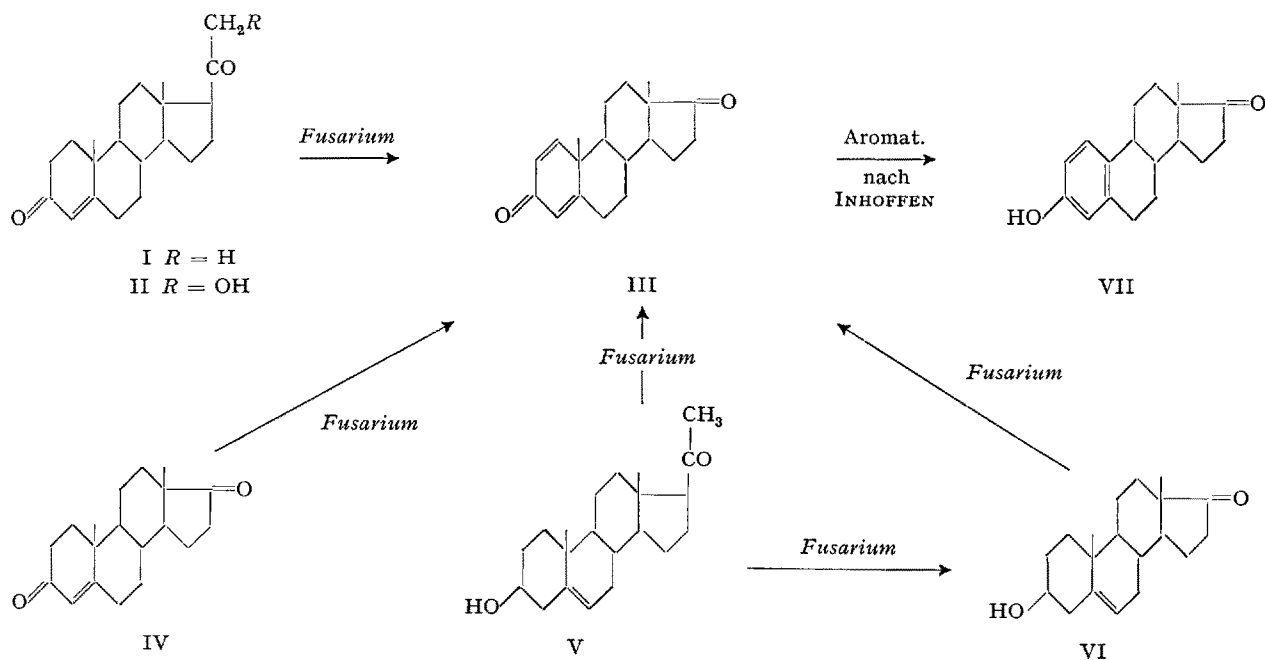
¹ 2. Mitt.; auszugsweise vorgetragen am 6. September 1953 vor der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft, Lugano; 1. Mitt. s. Exper. 8, 422 (1952).

² Gleichzeitig 119. Mitt. *Über Steroide*; 118. Mitt. s. Helv. chim. Acta 36, Fasc. 6, im Druck (1953).

³ Literatur zum Beispiel bei D. H. PETERSON, Research 6, 309 (1953).

⁴ R. NEHER und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 35, 276 (1952).

¹ H. H. INHOFFEN, Ang. Chemie 53, 471 (1940); 59, 207 (1947). – E. B. HERSBERG, M. RUBIN und E. SCHWENK, J. Org. Chem. 15, 292 (1950).



Einwirkung von *Fusarium solani* auf verschiedene Steroide

Eingesetzte Substanz (0,025 % in Azeton oder Methanol zur Kultur gegeben)	Produkt nach Inkubation von Tagen		
	1	2	7
Progesteron (I)	III	III	«Oxyd. prod. 2»
11-Desoxy-corticosteron (II) . . .	III	III	«Oxyd. prod. 2»
Δ^4 -Androsten-3,17-dion (IV) . . .	III	III	«Oxyd. prod. 2»
$\Delta^{1,4}$ -Androstadien-3,17-dion (III).	III	III	«Oxyd. prod. 2»
Pregnenolon (V)	III + VI	III+	«Oxyd. prod. 2»
Dehydro-isoandrosteron (VI). . .	III + 1 weitere Substanz	2 weitere Substanzen III +	+ 2 weitere Substanzen «Oxyd. prod. 2»
Allopregnan-3,20-dion (VIII) . .	X	X	+ 2 weitere Substanzen III
3 β -Azetoxo-allopregnan-20-on (IX)	X	X	III
Androstan-3,17-dion (X)	X	X	III
REICHSTEIN's Substanz S	S + 1 weitere Substanz	S + 1 weitere Substanz	2 unbekannte Substanzen
Cortison (Compound E)	E + 1 weitere Substanz	E + 1 weitere Substanz	E + 1 weitere Substanz

letztere, bisher noch verhältnismässig kostbare Substanz auf einem neuen, äusserst einfachen Wege gewonnen, der zweifelsohne technische Anwendung finden wird. Im folgenden sei ein typischer Ansatz mit Progesteron beschrieben:

Die Nährlösung, enthaltend pro Liter Leitungswasser 15 g Pepton, 6 cm³ Maisquellwasser und 50 mg Rohglukose, wurde durch Zugabe von 2-n. Natronlauge auf pH 6,5 gebracht.

4 l dieser Nährlösung wurden gleichmässig in 13 Erlenmeyer-Kolben à 1 l verteilt, nach dem Sterilisieren mit *Fusarium solani* beimpft und bei 25° auf einer rotierenden Maschine geschüttelt (100 U./min). Nach 48 h gab man zu den gut entwickelten Kulturen unter sterilen Bedingungen in gleichen Anteilen eine Lösung von 1,0 g Progesteron in 45 cm³ Azeton zu, schüttelte noch weitere 48 h und filtrierte dann vom Myzel ab. Das Kulturfiltrat (pH 7,9) wurde erschöpfend mit frisch destilliertem Methylenchlorid ausgezogen, der Extrakt mit 0,1-n. Salzsäure, 1%ige Natriumhydrogenkarbonatlösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der teilweise kristalline Rückstand (1,14 g) wurde an einer Säule von 30 g Aluminiumoxyd chromatographiert und letztere jeweils 3–4mal mit je 0,1 Liter Petroläther-Benzol-Gemisch (2:3), Benzol, Äther und Azeton eluiert.

Die papierchromatographische Untersuchung¹ der einzelnen Fraktionen zeigte, dass mit den beiden ersten Elutionsmitteln 84 % des Gesamtgewichtes an reiner Substanz erhalten wurde, die sich als etwas weniger polar als Desoxy-corticosteron erwies und mit Phosphorsäure im UV.² eine ganz schwache, dunkelblaue Fluoreszenz zeigte. Aus wenig Azeton mit Petroläther umkristallisiert erhielt man rhombische Platten, die bei 145–146° schmolzen; Mischprobe mit $\Delta^{1,4}$ -Androstadien-3,17-dion ebenso. $[\alpha]_D^{25} = +110^\circ \pm 3^\circ$ (c = 1,060 in Chloroform). C₁₉H₂₄O₂ (284,38): Ber. C 80,24 H 8,51 %; Gef. C 80,32 H 8,54 %. UV.-Spektrum: $\lambda_{\text{max.}} = 243 \text{ m}\mu$; log $\epsilon = 4,21$. E. VISCHER und A. WETTSTEIN

Forschungslaboratorien der Ciba Aktiengesellschaft, Basel, Pharmazeutische Abteilung, den 10. September 1953.

¹ R. NEHER und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 35, 276 (1952). – System Propylenglykol-Toluol s. R. B. BURTON, A. ZAFFARONI und E. H. KEUTMANN, J. Biol. Chem. 188, 763 (1951); System A und B s. J. E. BUSH, Biochem. J. 50, 370 (1952).

² R. NEHER und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 34, 2278 (1951).

Summary

Certain fungi, especially of the genus *Fusarium*, are capable of rapidly degrading the side chain of 20-ketopregnenes to the corresponding 17-ketones and, simultaneously, of dehydrogenating ring A. Thus $\Delta^{1,4}$ -3,17-diketo-androstadiene is formed almost quantitatively from Δ^4 -3,20-diketo-pregnenes and from Δ^4 -3,17-diketo-androstene, and in lower yields from the analogous Δ^5 -3 β -hydroxy compounds. The side chain of saturated 3-keto- or 3 β -hydroxy-allopregnane-20-ones is also degraded quickly, but dehydrogenation in ring A proceeds more slowly. 17 α -hydroxy-groups prevent the degradation of the side chain.

By means of this microbiological process in combination with INHOFFEN's aromatisation reaction, progesterone can be transformed in only two steps into estrone.

Induction of Mutations in Bacteriophage T3 by Ultra-Violet Light

It has been shown that mutations¹ in a temperate bacteriophage λ can be induced by ultraviolet (UV) irradiation of the phage and of the bacteria in which they shall multiply. It seemed interesting to see if the same method applied to a typically virulent phage produced the same results. T3 was chosen because of its relatively high resistance² to UV irradiation, for fairly large doses are necessary to produce mutations. The mutations looked for were of the host range type³ (T3h). The phages were irradiated, in buffer, with a dose of UV leaving a surviving fraction of 9·10⁻⁶. They were plated as a control, on a mixture of two strains of *Escherichia Coli*: B and B/3a (a very weak B/3) and on the same mixture of bacteria having received a dose of UV (in buffer) six times smaller than that given to phages.

As in the case of the temperate phage λ , a reactivation by UV'd bacteria of the UV inactivated phages took place: when the same number of UV'd T3 particles

¹ J. J. WEIGLE, Proc. Nat. Acad. Sci. 39, 628 (1953).
² R. DULBECCO, Radiations and Biologie, Oakridge (in press).
³ D. FRASER and R. DULBECCO, Cold Spring Harbor Symposium 1953.