

Mikrobiologische Umwandlung von Steroiden, XV¹⁾

Mikrobiologische Hydroxylierung von 3 α -Acetoxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure und deren Methylester mit *Calonectria decora* und *Syncephalastrum racemosum*

Hans-J. Vidic, Douwe Rosenberg und Klaus Kieslich*

Forschungslaboratorien der Schering AG Berlin/Bergkamen,
Müllerstr. 170–178, D-1000 Berlin 65

Eingegangen am 7. September 1977

3 α -Acetoxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure (**1**) wird durch Fermentation mit *Calonectria decora* unter Verseifung der 3-Acetylgruppe in 12 β - (**3**), 7 β ,11 β - (**4**) und 1 β ,12 β -Stellung (**5**) hydroxyliert. Der Methylester **2** wird analog in 7 α ,12 β - (**6**), 7 β ,11 α - (**7**) und 12 β , 15 α -Position (**8**) angegriffen. *Syncephalastrum racemosum* bildet aus **1** die Hydroxylierungsprodukte in den Positionen 11 β (**9**), 12 β (**3**), 7 β ,11 β (**4**) und 11 β ,15 β (**10**) sowie die weiteren Umwandlungsprodukte 3 α -Hydroxy- (**13**), 3 α ,11 β -Dihydroxy- (**14**), 3 α ,12 β -Dihydroxy-5 β ,20 α -pregnan-20,18-carbolacton (**11**) sowie 11, 18-Epoxy-3 α -hydroxy-5 β ,20 α -pregnan-20,18-carbolacton (**16**). Durch *Mycobacterium smegmatis* wird **1** zu 3-Oxo-4-pregnen- (**18**) und 3-Oxo-1,4-pregnadien-20-carbonsäure-methylester (**20**) umgewandelt.

Microbial Transformations of Steroids, XV¹⁾

Microbial Hydroxylation of 3 α -Acetoxy-5 β -pregnane-20-carboxylic Acid and of its Methyl Ester by *Calonectria decora* and *Syncephalastrum racemosum*

3 α -Acetoxy-5 β -pregnane-20-carboxylic Acid (**1**) is hydroxylated by fermentation with *Calonectria decora* in 12 β - (**3**), 7 β ,11 β - (**4**), and 1 β ,12 β -position (**5**) with hydrolysis of the 3-acetoxy group. The methyl ester **2** is attacked in 7 α ,12 β - (**6**), 7 β , 11 α - (**7**), and 12 β ,15 α -position (**8**). *Syncephalastrum racemosum* forms from **1** the hydroxy products in positions 11 β (**9**), 12 β (**3**), 7 β ,11 β (**4**), and 11 β ,15 β (**10**) as well as the further transformation products 3 α -hydroxy- (**13**), 3 α ,11 β -dihydroxy- (**14**), 3 α ,12 β -dihydroxy-5 β ,20 α -pregnane-20,18-carbolactone (**11**), and 11,18-epoxy-3 α -hydroxy-5 β ,20 α -pregnane-20,18-carbolactone (**16**). **1** is transformed by *Mycobacterium smegmatis* into methyl 3-oxo-pregnane- (**18**) and 3-oxo-1,4-pregnadiene-20-carboxylate (**20**).

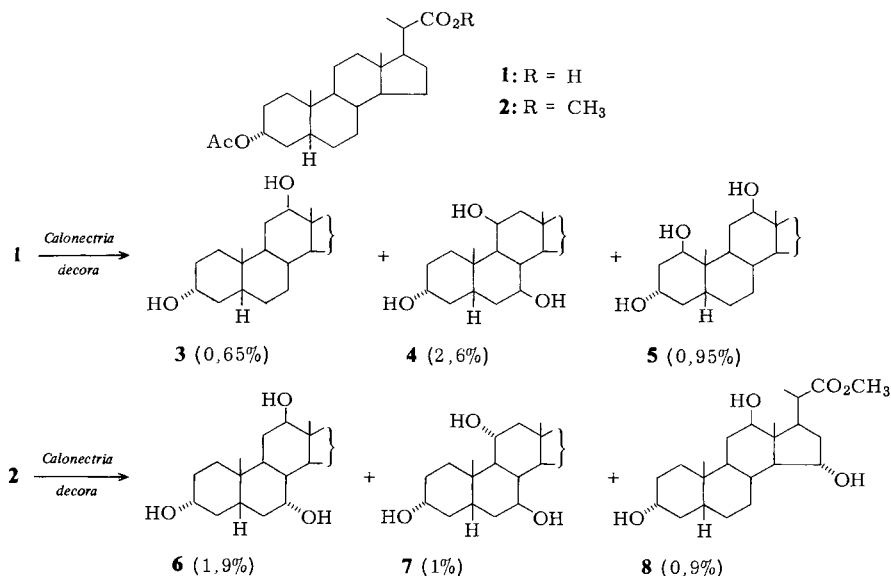
¹⁾ Als vorausgegangene Mitteilungen sollen gelten: XIV. Mittel.: G. Cleve, G.-A. Hoyer, K. Kieslich und H. Wiegglepp, Chem. Ber. **105**, 658 (1972). – XIII. Mittel.: K. Kieslich und H. Wiegglepp, Chem. Ber. **104**, 205 (1971). – XII. Mittel.: K. Kieslich, H. Wiegglepp, K. Petzoldt und F. Hill, Tetrahedron **27**, 445 (1971). – XI. Mittel.: H. Kosmol, F. Hill, U. Kerb und K. Kieslich, Tetrahedron Lett. **1970**, 641. – X. Mittel.: K. Kieslich und H. J. Koch, Chem. Ber. **103**, 610 (1970). – IX. Mittel.: H. J. Koch, G. Schulz und K. Kieslich, Chem. Ber. **103**, 603 (1970). – VIII. Mittel.: K. Kieslich, Tetrahedron **25**, 5863 (1969). – VII. Mittel.: K. Kieslich, K. Petzoldt, H. Kosmol und W. Koch, Liebigs Ann. Chem. **726**, 168 (1969). – VI. Mittel.: K. Kieslich, H. D. Berndt, R. Wiechert, U. Kerb, G. Schulz und H. J. Koch, Liebigs Ann. Chem. **726**, 161 (1969). – V. Mittel.: K. Petzoldt und K. Kieslich, Liebigs Ann. Chem. **724**, 194 (1969). – IV. Mittel.: W. Koch, K. Kieslich, H. Kosmol und K. Petzoldt, Arch. Mikrobiol. **65**, 228 (1969). – III. Mittel.: H. Kosmol, K. Kieslich, R. Vössing, H. J. Koch, K. Petzoldt und H. Gibian, Liebigs Ann. Chem. **701**, 198 (1967). – II. Mittel.: G. Raspé, K. Kieslich und U. Kerb, Arzneim.-Forschung **14**, 450 (1964). – I. Mittel.: G. Raspé und K. Kieslich, Naturwissenschaften **48**, 479 (1961).

Pregnan-20-carbonsäuren sind über den Seitenkettenabbau von Stigmasterin oder Ergosterin auf chemischem Weg²⁾ oder über die partielle mikrobiologische Seitenkettenoxidation verschiedener Sterine³⁾ relativ leicht zugänglich.

Die weitere mikrobiologische Umwandlungsmöglichkeit derartiger Strukturen sollte am Beispiel der 3 α -Acetoxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure (**1**) abgetastet werden.

In einer Voruntersuchung wurden 39 unterschiedliche Mikroorganismen mit diesem Substrat (**1**) und dessen Methylester (**2**) inkubiert, wobei nach uniformer Verseifung des 3 α -Acetats vielfältige Umwandlungen nach dünnschichtchromatographischer Analyse beobachtet wurden. Für eingehendere Untersuchungen wählten wir drei besonders rasch angreifende Stämme aus, mit welchen die Umwandlungen im präparativen Maßstab im 30-l-Versuchsfermenter durchgeführt wurden.

Der Pilz *Calonectria decora* (ATCC 14767) ergab bei Einsatz der freien 3 α -Acetoxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure (**1**) als Hauptprodukt die dihydroxylierte Verbindung 3 $\alpha,7\beta$,11 β -Trihydroxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure (**4**) mit den beiden Nebenprodukten 3 $\alpha,12\beta$ -Dihydroxy- und 1 $\beta,3\alpha,12\beta$ -Trihydroxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure **3** und **5**.



Die Fermentation des Methylesters **2** zeigte innerhalb gleicher Kontaktzeit nur Dihydroxylierungen. Als Umwandlungsprodukte wurden 3 $\alpha,7\alpha,12\beta$ -, 3 $\alpha,7\beta,11\alpha$ - und 3 $\alpha,12\beta,15\alpha$ -Trihydroxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure-methylester (**6–8**) isoliert.

Die Angriffspunkte in 12 β -⁴⁾, 15 α -⁵⁾ und seltener in 11 α -Stellung⁵⁾ durch diesen Pilz sind bereits seit langem bekannt, während die Positionen 1 β und 7 als Hydroxylierungspunkte bisher nur bei speziellen Substraten beschrieben wurden⁶⁾.

²⁾ F. W. Heyl und M. E. Herr, J. Am. Chem. Soc. **72**, 2617 (1950).

³⁾ C. Martin, Dissertation, Techn. Univ. Braunschweig 1974.

⁴⁾ A. Schubert und R. Siebert, Chem. Ber. **91**, 1856 (1958).

⁵⁾ A. Schubert, K. Heller und R. Siebert, Tetrahedron **16**, 993 (1962).

⁶⁾ A. M. Bell, W. A. Denny, E. R. H. Jones, G. D. Meakins und W. E. Müller, J. Chem. Soc. **1972**, 2759.

Mit den Ausnahmen der 7 β -Hydroxylierung bei der Bildung von **4** und **7** und der 11 β -Hydroxylierung bei **4** wurden alle Hydroxylgruppen in äquatorialer Stellung eingeführt. Die bevorzugte Position ist die 12 β -Stellung.

Die Abweichung der parallelen oder weiteren Angriffe zwischen freier Säure (1 β , 7 β und 11 β) und Ester (7 α , 7 β , 11 α und 15 α) könnten nur bei quantitativen Betrachtungen gedeutet werden, was bei den vorliegenden Bilanzen mit ca. 90% Stoffverlust nicht möglich ist.

Syncephalastrum racemosum (ATCC 18192) ist als 11 α -hydroxylierender Pilz⁷⁾ mit Nebenhydroxylierungen in 6 β -, 7 α -, 14 α -, 15 α - und 15 β -Stellung bekannt⁸⁾. Überraschenderweise war das Hauptprodukt der Fermentation von 3 α -Acetoxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure (**1**) die 11 β -Hydroxyverbindung **9**, die zu geringen Anteilen zusätzlich in 7 β - bzw. 15 β -Position zu **4** und **10** hydroxyliert wird. Als gleichrangige Nebenreaktionen wurden Hydroxylierungen in 12 β - und neuartig in 18-Stellung gefunden. Die 18-Hydroxyverbindung bildet offenbar spontan mit der freien 20-Carboxygruppe ein stabiles Lacton (**13**), so daß das primäre 18-Hydroxylierungsprodukt (**12**) nicht gefaßt werden konnte. Das Lacton selbst wird vermutlich anschließend in 11 β - oder 12 β -Position zusätzlich zu **14** und **11** hydroxyliert.

Der Lactonring in den Verbindungen **11**, **13** und **14** ergibt sich aus der im IR-Spektrum vorhandenen Bande bei 1730 cm⁻¹ und dem Fehlen der typischen Carbonsäurebanden sowie aus dem NMR-Spektrum, das ein CH₂-System zwischen $\delta = 4$ und 5 mit einer geminalen Kopplung von 12 Hz aufweist, während das für die 13-Methylgruppe typische Singulett zwischen $\delta = 1$ und 2 fehlt.

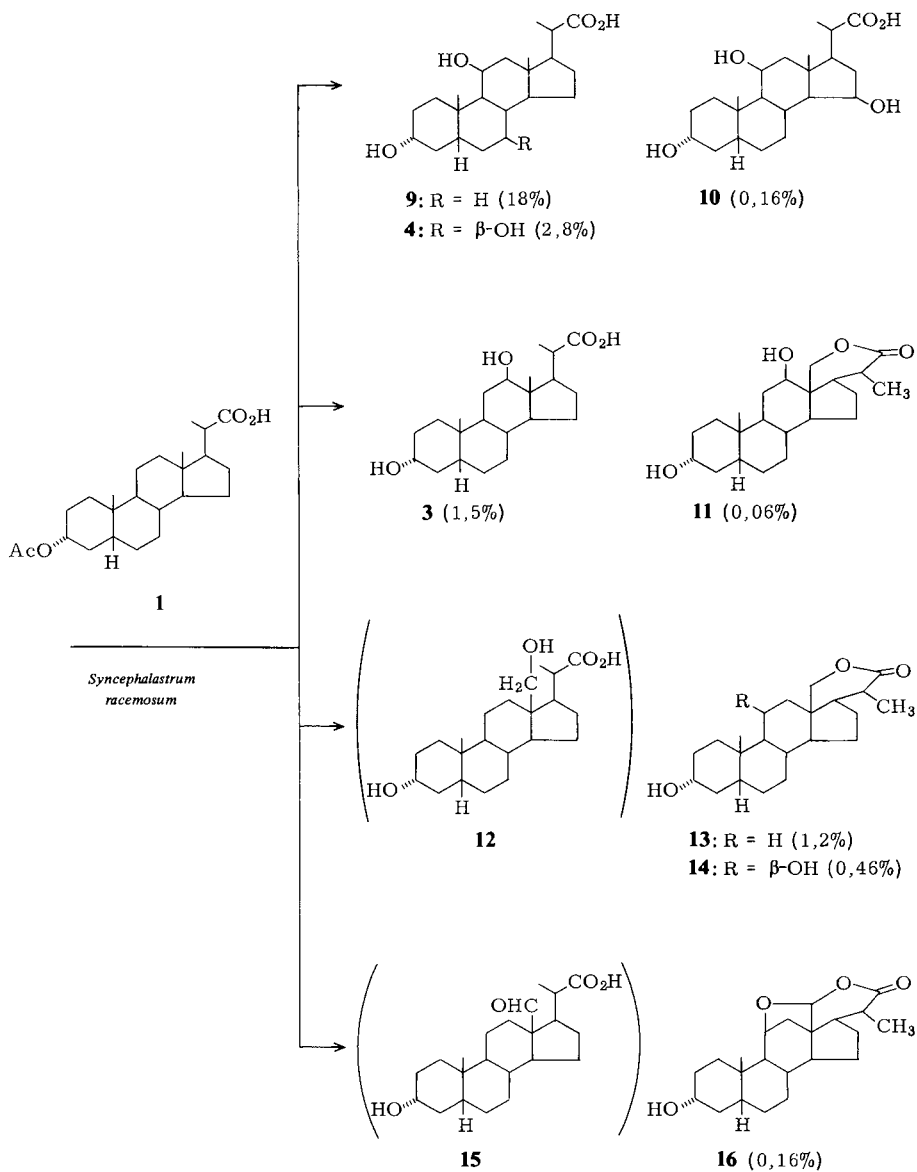
Als weiteres Umwandlungsprodukt wurde schließlich 11,18-Epoxy-3 α -hydroxy-5 β ,20 α -pregnan-20,18-carbolacton (**16**) isoliert. Nach dem Massenspektrum enthält diese Verbindung ein Sauerstoffatom mehr als das oben beschriebene **13**. Auch ist nach dem Infrarotspektrum ein Lactonring vorhanden und keine Carbonsäure. Im NMR-Spektrum ist keine 13-Methyl- oder Methylengruppe erkennbar. Auffällig ist ein Signal ohne Kopplung bei $\delta = 5.41$, das nur von einem einzigen Proton herrührt. Die Lage deutet auf ein CH-Atom mit zwei benachbarten Sauerstoffatomen hin, wobei ein Sauerstoffatom zur Lactonbildung mit der Position 20 benutzt wird.

Das NMR-Spektrum weist zusätzlich ein Dublett bei $\delta = 4.68$ auf ($J = 6$ Hz; 1 H), das gekoppelt mit einem Proton bei $\delta = 2.25$ ist, welches als doppeltes Dublett erscheint ($J = 6$ und 11 Hz; 1 H). Letzteres koppelt wieder mit einem Proton bei $\delta = 1.23$ ($J = 11$ Hz; 1 H). Diese drei Protonen bilden ein ABX-System, wobei $J_{AX} = 0$ und die geminale Kopplung 11 Hz beträgt. Ein solches System, das aus einer Etherbrücke zwischen C-18 und einem C-Atom des Steroidgrundgerüsts hervorgehen muß, kann nur bei einer Verknüpfung C-11 – C-18 realisiert werden. Hierbei bilden die Protonen in der Position 12 den AB-Teil, das Proton in 11 den X-Teil, wobei die Kopplung $H_{9\alpha}$ - $H_{11\alpha}$ null wird. Dreiding-Modelle bestätigen, daß der Torsionswinkel zwischen $H_{11\alpha}$ und $H_{9\alpha}$ bzw. $H_{12\alpha}$ bei einer C-11 – C-18-Verknüpfung 90° beträgt, so daß die beiden Kopplungen null werden.

⁷⁾ T. Asai, K. Aida, T. Tanake, E. Ohki, T. Matsuhisa, Y. Takeda und T. Inui, J. Gen. Appl. Microbiol. **5**, 127 (1959).

⁸⁾ T. Asai, K. Aida, T. Tanake, E. Ohki und T. Matsuhisa, J. Agric. Chem. Soc. **33**, 985 (1959).

Eine analoge Verknüpfung wird auch in Aldosteron gefunden, das ebenfalls ein Signal bei $\delta = 4.8$ mit nur einer Kopplung von 6 Hz aufweist⁹⁾.



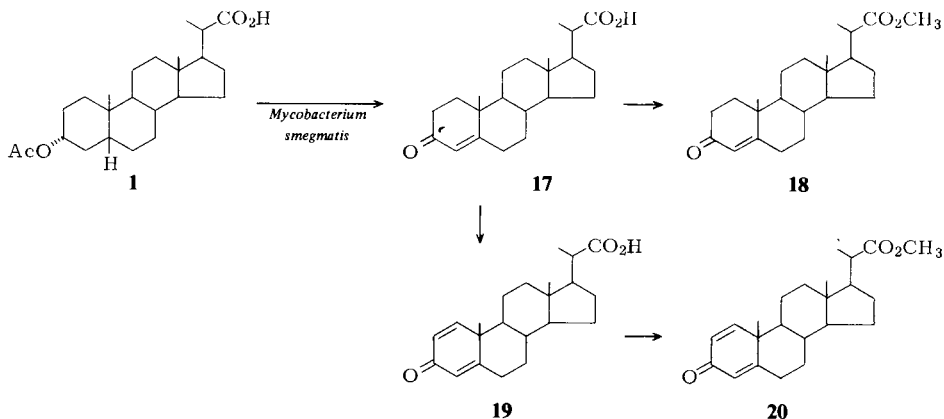
⁹⁾ P. Genard, Contribution à la détermination de la configuration et de la conformation moléculaires des corticostéroïdes, S. 114, Masson et Cie, Paris 1974.

Die Bildung dieses Metaboliten (**16**) wird am wahrscheinlichsten über eine intermediäre 13-Aldehydstruktur (**15**) erklärt, die in geringen Anteilen unter den oxidativen Bedingungen der Fermentation oder spezifisch enzymatisch entstehen kann. Der Aldehyd wird in 11 β -Stellung hydroxyliert, wonach sich ein inneres Hemiacetal ausbildet, das sich mit der Carboxylgruppe als Lacton stabilisiert. Diese Einzelschritte könnten jedoch auch in anderer Reihenfolge verlaufen, indem eine initiale 11 β -Hydroxylierung die Oxidation der 18-Hydroxygruppe zur Aldehydstruktur begünstigt und die Hemiacetalbildung einleitet.

Die 20-Methylgruppe im Lactonring besitzt stets β -Stellung, weil die Ausgangsverbindung aus natürlichem Ergosterin entstanden ist, welches immer eine α -ständige 20-Methylgruppe besitzt.

Die mikrobiologische Einführung einer 18-Hydroxygruppe ist bisher nur am 4-Androsten-3,17-dion als 9 α ,18-Dihydroxylierung neben vielen Nebenreaktionen mit *Cercospora melonis* (CBS)¹⁰, leider schwer reproduzierbar mit *Aspergillus niger* (ATCC 9142)¹¹ sowie am Corticosteron und 18-Desoxyaldosteron mit *Corynespora cassicola* (IMI 56007) als Hauptreaktion beschrieben¹².

Mycobacterium smegmatis (ATCC 14468) oxidierte schließlich das Substrat **1** zu UV-aktiven Metaboliten. In Analogie zu einer Umwandlung von 3 α -Hydroxy-5 β -androstano-17-on mit *M. smegmatis* (IMISG 98)¹³ wurden Gemische aus 3-Oxo-4-en- und 3-Oxo-1,4-dien-Strukturen erhalten. Die Metabolite mit Säurecharakter wurden nach dünn-schichtchromatographischen Vergleichen wie erwartet als 3-Oxo-4-pregnen-20-carbonsäure (**17**) und 3-Oxo-1,4-pregnen-20-carbonsäure (**19**) bestimmt und abgetrennt. Die Neutralfraktion enthielt die gleichen Säuren in Form ihrer Methylester **18** und **20**.



Eine enzymatische Methylesterbildung ist bisher relativ selten gefunden worden¹⁴. *Martin*³ isolierte jedoch das gleiche Produkt **20** beim partiellen Seitenkettenabbau mit *Nocardia*-Arten.

¹⁰ E. Kondo und K. Tori, J. Am. Chem. Soc. **86**, 736 (1964).

¹¹ B. J. Auret und H. L. Holland, J. Chem. Soc. D **1971**, 1157.

¹² E. Kondo, T. Mitsugi und K. Tori, J. Am. Chem. Soc. **87**, 4655 (1965).

¹³ K. Schubert, K. H. Böhme und C. Hörhold, Z. Naturforsch., Teil B **15**, 584 (1960).

¹⁴ K. Kieslich, H. Wiegglepp, G.-A. Hoyer und D. Rosenberg, Chem. Ber. **106**, 2636 (1973).

Es wurde nachgewiesen, daß die Methylgruppe des Esters aus dem intrazellulär vorhandenen Methionin stammt¹⁵⁾, wodurch auch die Bildung der Methylester durch den verwendeten *Mycobacterium*-Stamm erklärt wird.

Experimenteller Teil

Säulenchromatographie: Kieselgel-Woelm (0.063–0.1). – IR-Spektren: Perkin-Elmer PE 621 in getemperten KBr-Tabletten. – UV-Spektren: Cary 14, in Methanol. – NMR-Spektren: Varian HA 100 mit TMS als internen Standard. Die Zuordnung einzelner Protonen erfolgte durch Entkopplungsexperimente. – Massenspektren: Varian MAT CH 4 bei 70 eV.

Fermentation von 3 α -Acetoxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure (1) mit Calonectria decora (ATCC 14767): In einem 2-l-Erlenmeyerkolben wurden 500 ml eines sterilen Mediums bestehend aus 5% Glucose, 0,5% Cornsteep liquor, 0,2% NaNO₃, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% KCl, 0,05% MgSO₄ · 7 aq und 0,002% FeSO₄ · 7 aq mit der Abschwemmung einer 10 d alten Schrägagarkultur von *Calonectria decora* (ATCC 14767) beimpft und 5 d bei 30°C auf einem Rotationsschüttler (145 U/min) geschüttelt. Mit dieser Anzuchtkultur wurde ein 50-l-Fermenter aus nichtrostendem Stahl, beschickt mit 29,5 l einer sterilen Nährlösung bestehend aus 10% flüssigem Stärkezucker, 0,5% Cornsteep liquor, 0,2% NaNO₃, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% KCl, 0,05% MgSO₄ · 7 aq und 0,002% FeSO₄ · 7 aq, inoculiert und 72 h bei 29°C unter Belüftung von 30 l Luft/min bei 0,7 atü ohne Rühren germiniert. Der Ausgangs-pH-Wert blieb weitgehend unverändert. 1,8 l der Kulturbrühe wurden in einen gleichgroßen Fermenter übergeführt, der mit 28 l der angegebenen, jedoch 1:1 mit Wasser verdünnten Nährlösung beschickt war, und unter gleichen Bedingungen germiniert. Nach 20 h wurde eine sterilfiltrierte Lösung von 6,0 g **1** in 300 ml Dimethylformamid zugesetzt und weitere 124 h fermentiert. Die saure Kulturbrühe (pH 4,5) wurde mit Isobutylmethylketon mehrmals extrahiert; die Extrakte wurden i. Vak. eingengt. Der Rückstand (4,14 g) wurde an 75 g Kieselgel (Woelm) mit einer Gradientenelution (3 l Chloroform + 3 l Chloroform/Methanol 9:1) chromatographiert (25-ml-Fractionen).

Fraktion 31–37: 431 mg Rohprodukt, aus Aceton/Hexan umkristallisiert 110 mg, Schmp. 214–215°C, unumgewandeltes Ausgangsmaterial.

Fraktion 97–106: 94,6 mg Rohprodukt, aus Aceton/Hexan umkristallisiert 36 mg (0,65%), Schmp. 225–228°C, 3 α ,12 β -Dihydroxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure (**3**). – ¹H-NMR (Pyridin): δ = 0,91 (s; 19-H); 1,01 (s; 18-H); 1,79 (d, *J* = 7,0 Hz; 21-H); 3,63 (d, *J* = 10 Hz; 12-H); 3,83 (m; 3-H).

Fraktion 126–145: 313 mg Rohprodukt, aus Aceton/Hexan umkristallisiert 149 mg (2,6%), Schmp. 177–179°C, 3 α ,7 β ,11 β -Trihydroxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure (**4**). – ¹H-NMR (Pyridin): δ = 1,24 (s; 18-H); 1,40 (d, *J* = 7,0 Hz; 21-H); 1,50 (s; 19-H); 3,80 (m; 3-H); 3,90 (m; 7-H); 4,42 (m; 11-H).

C₂₂H₃₄O₅ (378,5) Ber. C 69,81 H 9,05 O 21,14 Gef. C 69,61 H 9,27 O 21,31

Fraktion 231–300: 420 mg Rohprodukt, aus Aceton/Hexan umkristallisiert 54 mg (0,95%), Schmp. 195–197°C, 1 β ,3 α ,12 β -Trihydroxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure (**5**). – ¹H-NMR (Pyridin): δ = 1,01 (s; 18-H); 1,28 (s; 19-H); 1,78 (d, *J* = 7,0 Hz; 21-H); 3,62 (d, *J* = 10 Hz; 12-H); 4,19 (m; 11-H); 4,72 (m; 3-H).

C₂₂H₃₄O₅ (378,5) Ber. C 69,81 H 9,05 O 21,14 Gef. C 69,53 H 9,31 O 21,35

Fermentation von 3 α -Acetoxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure-methylester (2) mit Calonectria decora (ATCC 14767): Unter gleichen Bedingungen wurden in zwei Ansätzen je 3,0 g **2**, gelöst in 150 ml Dimethylformamid, mit einer Kontaktzeit von 66 h fermentiert und aufgearbeitet. Das Rohprodukt beider Ansätze wurde mit Hexan von dem als Antischaummittel verwendeten anhaftenden Silicon-

¹⁵⁾ R. Megnet und C. Martin, unveröffentlicht.

öl SH freigewaschen und an 70 g Silicagel (Woelm) mit einer Gradientenelution (4 l Methylenchlorid + 4 l Methylenchlorid/Aceton 3:1) chromatographiert.

Fraktion III: nach Umkristallisieren aus Aceton/Hexan 112 mg (1.9%), Schmp. 204–206°C, *3 α ,7 α ,12 β -Trihydroxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure-methylester* (6). — ¹H-NMR (Pyridin): δ = 0.95 (s; 18-H); 0.97 (s; 19-H); 1.58 (d, J = 7.0 Hz; 21-H); 3.70 (d, J = 10 Hz; 12-H); 3.80 (m; 7-H); 3.90 (m; 3-H).

$C_{23}H_{36}O_5$ (392.5) Ber. C 70.38 H 9.25 O 20.38 Gef. C 70.51 H 9.41 O 20.49

Zur Konstitutionsbestätigung wurden 51 mg 6 mit CrO₃/Eisessig nach Jones oxidiert. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Aceton/Hexan umkristallisiert: 16 mg, Schmp. 199°C, *3,7,12-Trioxo-5 β -pregnan-20-carbonsäure-methylester*. — ¹H-NMR (Pyridin): δ = 1.02 (s, 18-H); 1.32 (s, 19-H); 1.34 (d, J = 7.0 Hz, 21-H).

Fraktion V: öliges Produkt, das nicht kristallisiert werden konnte; 61 mg (1%), *3 α ,7 β ,11 α -Trihydroxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure-methylester* (7). — ¹H-NMR (Pyridin): δ = 0.77 (s; 18-H); 1.22 (d, J = 7.0 Hz; 21-H); 1.26 (s; 19-H); 3.80 (m; 3-H); 3.80 (m; 7-H); 4.05 (m; 11-H).

Fraktion VII: öliges Produkt, das nicht kristallisiert werden konnte; 51 mg (0.9%), *3 α ,12 β ,15 α -Trihydroxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure-methylester* (8). — ¹H-NMR (Chloroform): δ = 0.70 (s; 18-H); 0.95 (s; 19-H); 1.28 (d, J = 7.0 Hz; 21-H); 3.58 (d, J = 10 Hz; 12-H); 3.70 (m; 3-H); 4.00 (td, J = 8; 4 Hz; 15-H).

Fermentation von 1 mit Syncephalastrum racemosum (ATCC 18192): 100 g sterilisierte Maiskörner wurden mit der Abschwemmung einer gut ausgewachsenen Schrägagarkultur beimpft, 15 d bei 30°C gehalten und mit 300 ml eines sterilen Mediums bestehend aus 3% Glucose, 1% Cornsteep liquor, 0.2% NaNO₃, 0.1% KH₂PO₄, 0.2% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄, 0.002% FeSO₄ · 7 aq und 0.05% KCl abgespült. Diese Mycelsuspension diente zur Beimpfung eines 50-l-Fermenters, der mit 29.5 l des gleichen sterilen Mediums beschickt war. Nach 20 h Anwachzeit wurde eine sterilfiltrierte Lösung von 9.0 g 1 in 150 ml Dimethylformamid zugesetzt und unter den oben beschriebenen Bedingungen fermentiert. Nach 11 h Kontaktzeit wurde aufgearbeitet. Der Isobutylmethylketon-Extrakt wurde mit 2 N NaOH ausgezogen, der wäßrige Auszug wieder auf pH 4 angesäuert und mit Essigester reextrahiert = Säurefraktion. (Die im Isobutylmethylketon verbliebenen Neutralstoffe wurden als Neutralfraktion gesondert aufgetrennt.) Zur Aufarbeitung wurden mehrere Ansätze mit einem Gesamteinsatz von 60 g zusammengefaßt. Das Rohproduktgemisch der Säurefraktion wurde an 1.1 kg Kieselgel (Woelm 0.063–0.1) mit folgenden Gradientenelutionen chromatographiert:

1. 5 l Methylenchlorid + 5 l Methylenchlorid/Methanol (95:5).

2. 5 l Methylenchlorid/Methanol (96:4) + 5 l Methylenchlorid/Methanol (9:1).

3. 5 l Methylenchlorid/Methanol (92:8) + 5 l Methylenchlorid/Methanol (4:1) (jeweils 25-ml-Fractionen).

Fractionen 506–580: 14.92 g Rohprodukt. Nach Umkristallisieren aus Aceton/Hexan 10.91 g (18%), Probe durch zusätzliche präp. DC im System Benzol (130 Teile), Methanol (12 Teile) und Eisessig (12 Teile) mit zweimaliger Entwicklung gereinigt. Schmp. 285–286°C, *3 α ,11 β -Dihydroxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure* (9). — ¹H-NMR (Pyridin): δ = 1.18 (s; 18-H); 1.44 (s; 19-H); 1.46 (d, J = 7.0 Hz; 21-H); 3.90 (m; 3-H); 4.35 (m; 11-H).

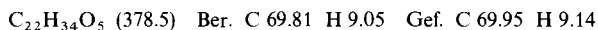
$C_{22}H_{34}O_4$ (362.5) Ber. C 72.89 H 9.45 O 17.65 Gef. C 72.75 H 9.32 O 17.59

Eine Probe wurde mit Dimethylsulfat umgesetzt; aus Aceton/Hexan Schmp. 140–141°C, *3 α ,11 β -Dihydroxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure-methylester*. — ¹H-NMR (Pyridin): δ = 1.12 (s; 18-H); 1.24 (d, J = 7.0 Hz; 21-H); 1.49 (s; 19-H); 3.96 (m; 3-H); 4.39 (m; 11-H).

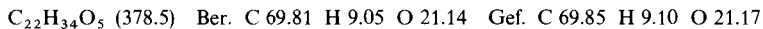
Fractionen 637–672: 1.80 g Rohprodukt, aus Aceton/Hexan umkristallisiert 820 mg (1.5%) 3, Schmp. 230–231°C. — ¹H-NMR (Pyridin): δ = 0.91 (s; 19-H); 1.01 (s; 18-H); 1.79 (d, J = 7.0 Hz; 21-H); 3.63 (d, J = 10 Hz; 12-H); 3.83 (m; 3-H).

$C_{22}H_{34}O_4$ (362.5) Ber. C 72.89 H 9.45 O 17.65 Gef. C 72.82 H 9.39 O 17.60

Fractionen 869–893: 440 mg Rohprodukt, aus Aceton/Hexan 2mal umkristallisiert 90 mg (0.16%), Schmp. 196–197°C, $3\alpha,11\beta,15\beta$ -Trihydroxy-5 β -pregnan-20-carbonsäure (**10**). – $^1\text{H-NMR}$ (Pyridin): 1.45 (d, $J = 7.0$ Hz; 21-H); 1.51 (s; 19-H); 1.72 (s; 18-H); 3.92 (m; 3-H); 4.42 (m; 11-H); 4.45 (m; 15-H).



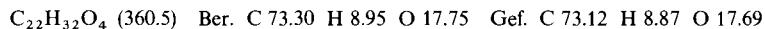
Fractionen 894–1020: 2.120 g Rohprodukt, aus Aceton/Hexan umkristallisiert 1.6 g (2.8%) **4**, Schmp. 185–186°C.



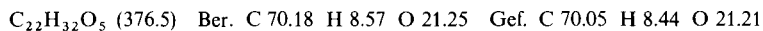
Das Rohproduktgemisch der Neutralfraktion (42 g) wurde in Methylenchlorid gelöst, wobei 2.58 g schwerlöslicher Rückstand verblieben. Die Methylenchloridlösung wurde an 500 g Kieselgel mit den Gradienten 1. 5 l Methylenchlorid/Aceton (5:1) und 2. 2 l Methylenchlorid/Aceton (5:1) + 2 l Methylenchlorid/Aceton (2:1) chromatographiert.

Fractionen 66–102: 3.454 g Rohprodukt, aus Hexan/Aceton mehrmals umkristallisiert 209 mg, Schmp. 148/50–51°C. Das IR-Spektrum dieser Substanz stimmte überein mit dem des *Ergosterins*.

Fractionen 103–146: 3.479 g Rohprodukt, durch zweite Säulenchromatographie (Gradient: 5 l Methylenchlorid/Aceton 98:2) und Umkristallisieren aus Aceton/Hexan gereinigt. 679 mg (1.2%), Schmp. 150–152°C, 3α -Hydroxy-5 $\beta,20\alpha$ -pregnan-20,18-carbolacton (**13**). – $^1\text{H-NMR}$ (Chloroform): $\delta = 0.95$ (s; 19-H); 1.23 (d, $J = 7.0$ Hz; 21-H); 3.64 (m; 3-H); 3.87 (d, $J = 12$ Hz; 18-H).

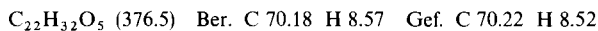


Fractionen 232–274: 1.687 g Rohprodukt, aus Aceton/Hexan umkristallisiert 276 mg (0.46%), Schmp. 231–233°C, $3\alpha,11\beta$ -Dihydroxy-5 $\beta,20\alpha$ -pregnan-20,18-carbolacton (**14**). – $^1\text{H-NMR}$ (Pyridin): $\delta = 1.17$ (d, $J = 7.0$ Hz; 21-H); 1.33 (s; 19-H); 3.86 (m; 3-H); 4.35 (m; 11-H); 4.40 (d, $J = 13$ Hz; 18-H); 4.83 (d, $J = 13$ Hz; 18-H).



Fractionen 275–355: 95 mg, durch weitere Chromatographie gereinigt, aus Aceton/Hexan umkristallisiert 92 mg (0.16), Schmp. 169–170°C, $11,18$ -Epoxy- 3α -hydroxy-5 $\beta,20\alpha$ -pregnan-20,18-carbolacton (**16**). – $^1\text{H-NMR}$ (Pyridin): $\delta = 1.03$ (s; 19-H); 1.20 (d, $J = 7.0$ Hz; 21-H); 3.82 (m; 3-H); 4.68 (d, $J = 6.0$ Hz; 11-H); 5.41 (s; 18-H).

Fractionen 377–476: 674 mg Rohprodukt, aus Aceton/Hexan mehrmals umkristallisiert 39 mg (0.06%), Schmp. über 290°C, $3\alpha,12\beta$ -Dihydroxy-5 $\beta,20\alpha$ -pregnan-20,18-carbolacton (**11**). – $^1\text{H-NMR}$ (Pyridin): $\delta = 0.90$ (s; 19-H); 1.22 (d, $J = 7.0$ Hz; 21-H); 3.78 (dd, $J = 12; 5$ Hz; 12-H); 3.80 (m; 3-H); 4.42 (d, $J = 12.0$ Hz; 18-H); 4.87 (d, $J = 12.0$ Hz; 18-H).



Fermentation von I mit Mycobacterium smegmatis (ATCC 14468): Eine 6 d alte Schrägagarkultur von *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 14468) wurde in 500 ml eines Mediums bestehend aus 0.1% Pepton, 0.2% Cornsteep liquor, 0.5% Glucose und 0.5% Hefextrakt als Schüttelkultur vermehrt. Mit 250 ml wurde ein 20-l-Glasfermenter mit 15 l des gleichen Mediums beimpft und die Hefezellen 47 h vermehrt. 900 ml dieser Kultur wurden in einen gleich großen Fermenter, der mit 14 l der gleichen Nährlösung beschickt war, übergeführt und nach 12 h mit einer Lösung von 3.0 g **I** in 150 ml Dimethylformamid versetzt. Nach 6 h Kontaktzeit wurde mit verd. Schwefelsäure auf pH 4 angesäuert und mit Isobutylmethylketon extrahiert. Der i. Vak. konzentrierte Extrakt wurde durch Waschen mit 2 N NaOH von Säureanteilen befreit. Die im Extraktückstand von 2 Ansätzen verbliebenen Neutralstoffe wurden durch Säulenchromatographie (Gradientenelution: 5 l Methylenchlorid + 5 l Methylenchlorid/Aceton 4 + 1) aufgetrennt.

Fraktion I: 731 mg Rohprodukt, aus Aceton/Hexan umkristallisiert 355 mg (6.5%), Schmp. 177–178°C, *3-Oxo-4-pregnen-20-carbonsäure-methylester* (**18**). – ¹H-NMR (Pyridin): δ = 0.63 (s; 18-H); 1.03 (s; 19-H); 1.21 (d; *J* = 7.0 Hz; 21-H); 5.81 (m; 4-H).

C₂₃H₃₄O₃ (358.5) Ber. C 77.05 H 9.56 O 13.39 Gef. C 76.93 H 9.43 O 13.26

Fraktion III: 859 mg Rohprodukt, aus Essigester/Hexan umkristallisiert 256 mg (4.6%), Schmp. 173–174°C, *3-Oxo-1,4-pregnadien-20-carbonsäure-methylester* (**20**). – ¹H-NMR (Pyridin): δ = 0.63 (s; 18-H); 1.09 (s; 19-H); 1.18 (d, *J* = 7.0 Hz; 21-H); 6.14 (m; 4-H); 6.28 (dd, *J* = 10; 2 Hz; 2-H); 6.93 (d, *J* = 10 Hz; 1-H).

C₂₃H₃₂O₃ (356.5) Ber. C 77.49 H 9.05 O 13.46 Gef. C 77.32 H 9.01 O 13.39

[305/77]
