

MIKROBIOLOGISCHE VERSEIFUNG VON SUBSTITUIERTEN
1-DEHYDROCORTICOSTERON-21-TRIMETHYLACETATEN

H. Kosmol, F. Hill, U. Kerb und K. Kieslich
Schering AG, Hauptlaboratorium
Berlin-West

(Received in Germany 10 December 1969; received in UK for publication 20 January 1970)

21-Trimethylacetates of corticosterones are microbiologically saponificated by fungi as *Corticium*, *Helminthosporium* and *Curvularia*.

Die mikrobiologische Verseifung von acetylierten Steroidalkoholen ist eine häufig verwendete Reaktion, da Hydroxylgruppen mit unterschiedlicher Position und Konfiguration im Syntheseverlauf als Acetate geschützt werden¹⁾. Die Verseifung von Formiaten²⁾, Propionaten²⁻⁵⁾, Butyraten^{3,5)} und auch eines *i*-Butyrates⁶⁾ ist nur an wenigen Beispielen beschrieben. Stets könnte jedoch der von M. L. Bender⁷⁾ vorgeschlagene Reaktionsmechanismus zutreffen, bei welchem das verseifende Enzym eine Hydroxyl- und Imidazolgruppe enthalten muß. Als bestgeeigneter Mikroorganismus wird *Flavobacterium dehydrogenans* mit seinem hohen Esterasenanteil eingesetzt.

Versuche, mit diesem Bakterienstamm auf gleichem Wege 21-Trimethylacetate zu verseifen, scheiterten.

Auch einige andere acetatverseifende Bakterien, Hefen und Pilze zeigten keine Enzymaktivität zur Pivalatspaltung.

Bei der Prüfung einer größeren Anzahl von unterschiedlichen Mikroorganismen konnten dennoch die Testsubstanzen 6α -Fluor⁸⁾, $6\alpha,9\alpha$ -Difluor⁸⁾- und 6α -Fluor-, 9α -chlor-21-trimethylacetoxy-11 β -hydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dion⁸⁾ zu den 21-Hydroxystrukturen⁹⁾

verseift werden.

Dabei zeigten die Bakterienstämme *Bacillus esterificans*, *Bacillus subtilis* (mesentericus) und *Flavobacterium esteroaromaticum* nur sehr unvollständige Umsetzungen, ebenso wie die Hefestämme *Pichia fermentans* und *Torulopsis famata*. Nur der Bakterienstamm *Proteus vulgaris* ließ eine deutliche Reaktion bei der 6 α ,9 α -Difluorverbindung erkennen.

Dagegen wurden rasche Verseifungen beobachtet mit einigen Arten der Pilzgattungen *Corticium*, *Helminthosporium* und *Curvularia*.

Mit dem bestgeeigneten Stamm *Curvularia lunata* (Scheringsammlung Nr. 755) wurden in 12-l-Fermentationsansätzen bei einer Substratkonzentration von 100 mg/l 6 α -Fluor- und 6 α ,9 α -Difluorverbindung nach einer Kontaktzeit von 6 Stdn. (Fermentationszeit 18 Stdn.) Ausbeuten von 64% und 56% d.Th. an verseiften Reinprodukten⁹⁾ isoliert. Die Verseifung der 6 α -Fluor-9 α -chlor-substituierten Struktur verlief dagegen deutlich verzögert und selbst bei verlängerter Kontaktzeit mit über 30 Stdn. unvollständig, wobei schlechte Stoffbilanzen und Nebenprodukte beobachtet wurden.

Die Hydrolyse ist eindeutig auf eine Enzymreaktion und nicht auf eine während der Fermentation mögliche pH-Verschiebung zurückzuführen, da einerseits der pH-Wert durch automatische Einstellung zwischen 6 und 7 gehalten wurde, andererseits unter diesen Bedingungen in unbeimpfter Kulturbrühe keine Spaltung stattfindet.

Obwohl diese Verseifung grundsätzlich auch mit bekannten chemischen Methoden erzielt wird, kann das mikrobiologische Verfahren mit seinen milden Reaktionsbedingungen speziell bei einer Pivalatspaltung manchmal vorteilhaft sein.

Die schlechte Eignung normaler esterasebildender Stämme und die besondere Verseifungsfähigkeit spezieller Pilzgattungen könnte als Hinweis gewertet werden, daß für diese Spaltung der sterisch behinderten und durch die drei Methylgruppen ungünstig polarisierten Estergruppe möglicherweise nicht mehr der allgemeine Reaktionsmechanismus von Bender⁷⁾ zutrifft.

1. Microbial Transformations of Steroids, W. Charney und H. L. Herzog, Academic Press New York (1967) S. 64
2. A. Čapek und O. Hanč, Folia Microbiol. (Prag) 5, 251 (1960)
3. L. Mamoli, Ber. 71, 2278 (1938)
4. E. J. Agnello, G. D. Laubach und W. T. Morcland, US Patent 3 067 197 (4.12.1962)
5. H. C. Murray und D. H. Peterson, US Patent 2 721 828 (25.10.1955)
6. A. L. Nussbaum und E. P. Oliveto, US Patent 2 908 696 (13.10.1959)
7. M. L. Bender und F. J. Kezdy, Ann. Rev. Biochem. 34, 49 (1965)
8. K. Kieslich, U. Kerb und G. Raspé, US Patent 3 426 128 (4.2.1969)
9. K. Kieslich, U. Kerb und G. Raspé, US Patent 3 232 839 (1.2.1966)