

ALIŃA BIESTEK,

HELENA KĄKOL, JADWIGA BOGUĆKA, HANNA GAJCY

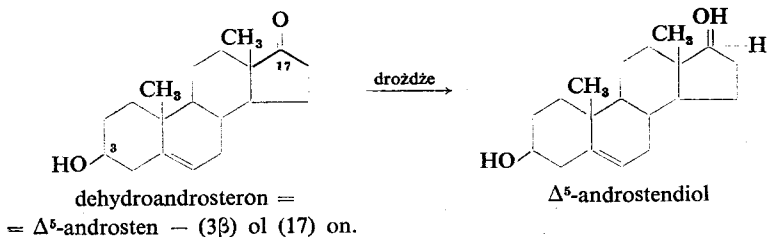
PRÓBA SYNTEZY TESTOSTERONU  
Z DEHYDROIZOANDROSTERONU NA DRODZE  
MIKROBIOLOGICZNEJ

Z Zakładu Badania Organopreparatów i Witamin Instytutu Leków w Warszawie  
Kierownik Zakładu: mgr J. Iwanowska

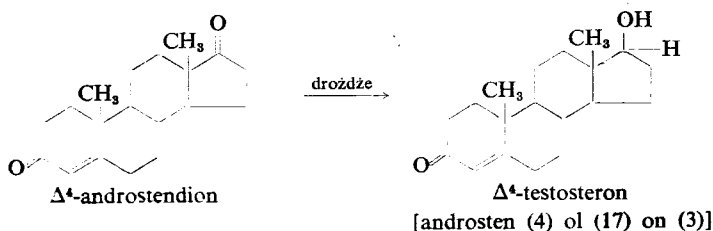
Jedną z cech charakterystycznych związków stanowiących grupę hormonów steroidowych jest to, że w ich cząsteczce występuje grupa ketonowa, względnie 2-rzędowa hydroksylowa lub obydwie razem.

Stwierdzono, że na drodze chemicznej udaje się łatwo te związki przeprowadzić jeden w drugi stosując redukcję grup ketonowych lub utlenienie grup hydroksylowych. Wobec tego podjęto próby nad przeprowadzeniem reakcji uwodornienia przy pomocy mikroorganizmów.

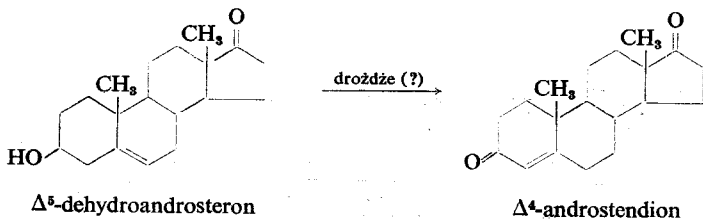
Mamoli i Vercellone w 1937 r. [9] osiągnęli redukcję grupy karbonylowej poddając działaniu drożdży dehydroandrosteron rozpuszczony w alkoholu.



Ci sami [7] autorzy przeprowadzili przemianę  $\Delta^4$ -androstendionu w testosteron również pod wpływem drożdży.



Mamoli i Vercellone w 1938 r. w szeregu prac związanych z utlenieniem 2-rzędowych grup hydroksylowych do ketonowych w hormonach steroidowych przeprowadzili również przy pomocy drożdży przemianę dehydroandrosteronu [10] w  $\Delta^4$ -androstendion.



W kilka miesięcy po opublikowaniu tej pracy ukazało się wyjaśnienie (6,5) dotyczące tej przemiany. Okazało się, że utlenienie dehydroandrosteronu spowodowały bakterie, którymi drożdże użyte do przemiany zostały przypadkowo zakażone. Ustalono, że wyizolowane z płynu fermentacyjnego aerobowe pałeczki przypominają szczep *Corynebacterium helvolum* L. N. Nazwano je *Corynebacterium mediolanum* nie identyfikując bliżej, wymieniono tylko kilka danych charakterystycznych dla tego szczepu jak: wzrost na bulionie, żelatynie, kartoflu itp. Mamoli [8] w 1938 r. opracował po szeregu doświadczeń prostą metodę, pozwalającą na otrzymanie testosteronu o dużej wydajności, wynoszącej 81<sup>0</sup>/<sub>o</sub>.

W pierwszej fazie doświadczenia poddawano dehydroandrosteron utleniającemu działaniu szczepu *Corynebacterium mediolanum*, otrzymując androstendion, na który w drugiej fazie działały drożdże powodujące jego przemianę w testosteron.

Arnaudi [2] w tym samym roku badał wpływ szczepu *Micrococcus dehydrogenans* na steroidy i stwierdził, że dehydroizoandrosteron [ $\Delta^5$  androsten ( $3\beta$ ) ol (17) on] zostaje utleniony do androstendionu.

Ercoli [3] w 1940 r. podał do wiadomości o prawie ilościowej przemianie również dehydroizoandrosteronu w androstendion, zachodzącej pod wpływem bakterii wyizolowanych z odpowiedniego środowiska.

Hughes i Schmidt w 1942 r. donieśli, że szczep *Alcaligenes faecalis* wyizolowany w 1940 r. z jelita ślepego prosiąt utlenia dehydroizoandrosteron do androstendionu. Podłoże fermentacyjne stanowiła surowica barania, czas fermentacji trwał 6 dni.

Molina i Ercoli w 1944 r. ustalili, że wyizolowany przez nich szczep *Flavobacterium carbonilicum* powoduje przemianę dehydroizoandrosteronu do androstendionu oraz androstendiolu do mieszaniny testosteronu i androstendionu. Turfitt w 1946 r. opisał przebieg przemiany dehydroizoandrosteronu w  $\Delta^4$  androstendion.

Szczep należący do rodzaju *Proactinomyces* hodowano na pożywce mineralnej z dodatkiem steroidu, w ciągu 4—7 dni. Wydajność wynosiła 96%.

Celem niniejszej pracy była próba odtworzenia syntezy testosteronu z dehydroizoandrosteronu pod wpływem różnych rodzajów bakterii zbliżonych do opisanych w piśmiennictwie oraz pod wpływem drożdży.

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

W pierwszym etapie niniejszej pracy zajęto się otrzymaniem andro-  
stendionu z dehydroizoandrosteronu (preparat angielski pt. 147°C) po-  
przez utlenienie substratu za pomocą odpowiednich bakterii.

Opierając się na danych z piśmiennictwa, próbowano utworzyć mieszanki utleniające bakterii, składające się z następujących szczepów:

- |  |   |
|--|---|
| <p>I. <i>Acetobacter mesoxydans</i> 11<br/><i>Acetobacter mesoxydans</i> 9<br/><i>Bacillus cereus</i><br/><i>Serratia marescens</i>.</p> | <p>III. <i>Escherichia coli</i><br/><i>Bacillus cereus</i><br/><i>Serratia marescens</i><br/><i>Acetobacter mesoxydans</i> 11<br/><i>Acetobacter xylinum</i>.</p> |
| <p>II. <i>Escherichia coli</i><br/><i>Bacillus cereus</i><br/><i>Serratia marescens</i><br/><i>Acetobacter mesoxydans</i> 11.</p>        | <p>IV. <i>Corynebacterium</i> sp.<br/><i>Acetobacter mesoxydans</i> 11<br/><i>Acetobacter xylinum</i>.</p>  |

Podłoże	Szczep
1. Brzeczka 18° Bal — 280 ml; m/5 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ — 10 ml; m/5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 ml; $\text{CaCO}_3$ 0,1%	<i>Acetobacter xylinum</i> <i>Aspergillus niger</i>
2. Wyciąg mięsny + pepton 1%; NaCl 0,5; glikoza 1%.	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriae</i>
3. Glikoza 20 g; ekstrakt drożdż. — 5 g; pepton 5 g; trypton — 5 g; $\text{CaCO}_3$ — 2,5 g do 1 litra $\text{H}_2\text{O}$	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriae</i>
4. $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 0,1%; $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,025%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025%; NaCl 0,0005%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0001%; $\text{CaCO}_3$ 0,5%; glikoza 0,1%.	<i>Corynebacterium</i> sp. <i>Alcaligenes faecalis</i>
5. Surowica końska	<i>Alcaligenes faecalis</i>
6. $\text{KH}_2\text{PO}_4$ — 1 g; KCl — 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01 g; $\text{ZnSO}_4$ — 0,01 g; $\text{NH}_4\text{NO}_3$ — 3 g; glikoza — 3 g do 1 litra $\text{H}_2\text{O}$ .	<i>Aspergillus niger</i>

Posługiwano się również pojedynczymi szczepami mikroorganizmów jak: *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter pasteurianum*, *Aspergillus niger*,

*Alcaligenes faecalis*, *Corynebacterium pseudodiphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Escherichia coli*. Ponadto podłoża szczepiono ziemią oraz bakteriami z powietrza.

Zasadniczym podłożem użytym do przeprowadzenia procesu utleniania było wzięte z prac *Mamolięgo* następujące podłoże: woda drożdżowa 60 ml; m/5  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 ml; m/5  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 ml.

Oprócz tego podłoża stosowano — starając się stworzyć najlepsze warunki dla przebiegu syntezy — cały szereg innych, ponieważ zasadnicze podłoże było zbyt ubogie dla uzyskania wzrostu pewnych bakterii.

Do wyżej wymienionych podłoży dodawano dehydroizoandrosteron w ilościach od 50—300 mg na 100 ml pożywki. Dehydroizoandrosteron dodawano w postaci sproszkowanej, bądź rozpuszczony w dioxanie, acetonie lub etanolu. Dodawanie dehydroizoandrosteronu do pożywki w rozpuszczalniku wywoływało wytrącenie sterolu. Do doświadczeń używano również octanu dehydroizoandrosteronu w postaci nierozpuszczonej lub w rozpuszczalniku (aceton, etanol). Dehydroizoandrosteron dodawano do pożywki bezpośrednio po jej wyjałowieniu lub po trzech dniach inkubacji szczepu w danym podłożu.

Przemianę dehydroizoandrosteronu w androstendion przy pomocy mieszanek bakterii lub czystych kultur przeprowadzano w różny sposób. Stosowano hodowle stojące, wytrząsane, napowietrzane i natleniane w czasie od 6—30 dni, w temperaturach właściwych dla danych szczepów.

Przed zaszczepieniem podłoży, bakterie szczepiono na odpowiednie pożywki hodowlane w celu uzyskania jak największego inoculum.

Po skończonej inkubacji przystępowano do ekstrakcji otrzymanego produktu. Każdą próbę autoklawowano i sączono. Następnie sączek wraz z zawartością zalewano odpowiednią ilością eteru, acetonu lub chloroformu, które są głównymi rozpuszczalnikami sterolu i ekstrahowano pod chłodnicą zwrotną. Po ekstrakcji, pozbywano się zanieczyszczeń przy pomocy 1 n NaOH, 1 n HCl i wody destylowanej, po czym eterowy roztwór pozostawiano do wykrystalizowania.

W otrzymanym po krystalizacji produkcie, oznaczano temperaturę topnienia porównując z temperaturą topnienia androstendionu. W celu przekonania się, czy dehydroizoandrosteron wpływa na metabolizm stosowanych w pracy bakterii, przeprowadzono odpowiednie badanie w aparacie Warburga [1]. Zawieszony w soli fizjologicznej szczep bakteryjny wprowadzono do roztworu zawierającego bufor fosforowy, 1% glikozę i dehydroizoandrosteron rozpuszczony w etanolu: obserwowano intensywność oddychania w porównaniu z kontrolnym naczynkiem nie zawierającym sterolu.

W wypadku *Alcaligenes faecalis*, *Corynebacterium* sp., *Aspergillus niger* oraz szczepu E izolowanego z ziemi, stwierdzono nieznaczny wpływ de-

hydroizoandrosteronu na zwiększenie procesu oddychania, w porównaniu z próbą kontrolną. Brak powtarzalności uzyskanych na aparacie Warburga wyników, nie pozwala na stwierdzenie z całą pewnością przyswajalności badanego sterolu przez stosowane w pracy bakterie.

Po przeprowadzeniu kilkudziesięciu doświadczeń z zastosowaniem różnych warunków: podłoża, sposobu prowadzenia hodowli, czasu trwania inkubacji, gęstości szczepu, różnych kombinacji bakterii oraz sposobów ekstrakcji, nie stwierdzono biochemicznej syntezy androstendionu przy użyciu dehydroizoandrosteronu jako substratu.

Potwierdzenie otrzymanych wyników niniejszej pracy znaleziono w piśmiennictwie. Mianowicie: *Ulmann* podaje w związku z pracą *Mamoliego*, że jakkolwiek pozornie najprostszym sposobem otrzymania testosteronu z dehydroizoandrosteronu jest metoda mikrobiologiczna, jednak w praktyce jest ona nie do przeprowadzenia.

*A. Běstek, G. Konkół, Я. Богущка, Г. Гайцы*

#### ПОПЫТКА СИНТЕЗА ТЕСТОСТЕРОНА ИЗ ДЕГИДРОИЗОАНДРОСТЕРОНА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПУТЕМ

##### *Содержание*

Опираясь на литературных данных авторы пытались разработать биохимический метод получения тестостерона из дегидроизоандростерона. Первый этап этого синтеза, получение из дегидроизоандростерона-андростендиона, проводился в различных условиях выращивания на различных питательных средах и штаммах. Разработаны также соответственные методы экстракции.

В представленных условиях андростендион не был получен.

*A. Běstek, H. Kąkol, J. Bogucka, H. Gajcy*

#### AN ATTEMPT TO SYNTHESIZE TESTOSTERONE FROM DEHYDROISOANDRO- STERONE MICROBIOLOGICALLY

##### *Summary*

On the basis of data from the literature an attempt was made to synthesize biochemically testosterone from dehydroisoandrosterone. The first stage of the synthesis, preparation of androstendione from dehydroisoandrosterone, was carried out in various conditions of cultivation and with various media and strains. Appropriate methods of extraction were also developed. The attempt to synthesize androstendione was unsuccessful.

#### PIŚMIENICTWO

1. *Čapek A.*: Folia Biol., 9, 1958, Fasc. 6, 337.
2. *Hanc O., Riedl-Tumova E.*: Pharmazie, 1954, 7, 877.

3. *Hanc O., Riedl-Tumova E.*: Pharmazie, 1954, 7, 877.
4. *Hughes H. B., Schmidt L. H.*: Proceedings of Soc. f. Explt. Biol. a. Med. vol., 1942. 51, 162.
5. *Mamoli L.*: Ber. d. dtsh. chem. Gesell., 1938, 71, 8, 1686.
6. *Mamoli L., Koch R., Teschau H.*: Naturwissenschaften Heift, 1939, 19, 305.
7. *Mamoli L., Vercellone A.*: Ber. d. dtsh. chem. Gesell. 1937, 70, 3, 470.
8. *Mamoli L.*: Ber. d. dtsh. chem. Gesell., 1938, 71, 11, 2278.
9. *Mamoli L., Vercellone A.*: Ztsch. physiol. chem., 1937, 245, 93.
10. *Mamoli L., Vercellone A.*: Ber. d. dtsh. chem. Gesell. 1938, 71, 1, 154.
11. *Molina L., Ercoli A.*: Boll. Ist. Sieroterap Milanese, 1944, 23, 164.
12. *Turfitt G. E.*: Biochem. J., 1946, 40, 79.
13. *Ulmann Encyklopädie der technischen Chemie Hand., 1957, 8, 646.*

Otrzymano: 10. 5. 1961.

Adres autorów: Warszawa, Długa 16, Instytut Leków.