

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

PATENTE DE INVENCION

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en el presente documento y según consta en el libro de la Memoria adjunta.

11	NUMERO	479.639	10	A1
12	FECHA DE PRESENTACION	17-4-79		

13	PRIORIDADES:	14	ES	15	FECHA	16	PAIS			
	17	NUMERO			18	FECHA			19	PAIS
		A 2662/78			17 de abril de 1978					Austriaca

20	FECHA DE PUBLICIDAD	21	CLASIFICACION INTERNACIONAL	22	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C12D 13/08		

23	TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE COMPUESTOS DE ACIDO 17-C-ESTEROIDE- α -PROPIONICO	

24	SOLICITANTE (S)
HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN	

25	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Henkelstrasse 67, 4000 Düsseldorf-Holthausen, República Federal Alemana.	

26	INVENTOR (ES)
Dr. Frank Hill; Dr. Wolfgang Preuss; Dr. Joachim Schindler; Dr. Rolf Schmid; Dr. Alfred Struve	

27	TITULAR (ES)

28	REPRESENTANTE
Don José Miguel Gómez-Acebo Pombo.	

CADUCADO

El primer informe relacionado con la conversión micro-
bial de compuestos esteroide data de 1937 cuando Mamoli y Ver-
cellone (Ber. 70, 470 y Ber. 70, 2079), describieron la reduc-
ción esteroespecífica de 17-cetoesteroides a 17- β -hidroxieste-
roides. En el año 1952 describieron Peterson y Murray (Patente
5. US 2 602 769) un procedimiento industrialmente importante para
la 11- α -hidroxilación de progesterona por *Rhizopus nigricans*.

Desde entonces se han descrito numerosas transforma-
ciones compuestos esteroides mediante microorganismos (véase,
10. por ejemplo W. Charney y H.L. Herzog, *Microbial Transformation
of Steroids*, Academic Press, New York, 1967).

A pesar de estas numerosas proposiciones para la trans-
formación microbial de compuestos esteroide solo pocas de estas
reacciones son adecuadas para la obtención de las importantes
15. hormonas de esteroide a partir de productos de partida que sean
facilmente obtenibles y se dispongan en grandes cantidades. Aquí
son de mencionar, en primer lugar, los compuestos de estearina
conteniendo cadenas laterales 17-C-alquilo de origen vegetal o
animal, por ejemplo, las estearinas de las series colestano, cam-
20. pestano y stigmastano.

Es sabido que numerosas cepas de microorganismos, por
ejemplo, aquellas de *achromobacter*, *arthrobacter*, *bacillus*, *brevi-*
vibacterium, *corynebacterium*, *flavobacterium*, *microbacterium*,
mycobacterium, *nocardia*, *protaminobacter*, *serratia* y *streptomyces*,
25. son capaces de crecer sobre compuestos de estearina de la clase
mencionada, por ejemplo, sobre colestarina, como fuente de carbo-
no (véase, por ejemplo, Arima et al., 1969, *Agr. Biol. Chem.* 33:
1636-1643). Aquí son por regla general atacados en forma no espe-
cífica el sistema de anillo como también las cadenas laterales
30. eventualmente presentes en el sistema de anillo por los micro-

organismos o bién degradados en su crecimiento. Principalmente son aquí el ataque y la degradación en el sistema de anillo la reacción preferente y/o más rápida. En un trabajo recién publicado de Arima et al., Agric. Biol. Chem. 42(2), 411-416 se informa sobre trabajos para la transformación de colesteroína por la degradación microbial de las cadenas laterales en presencia de inhibidores para inhibir así la degradación del anillo en el armazón esteroide. Según estas indicaciones una parte considerable de las 200 cepas salvajes aproximadamente comprobadas era capaz de conducir bajo la influencia de los inhibidores a una degradación ampliamente selectiva de las cadenas laterales en C-17 del material de partida. Algunas cepas condujeron aquí al ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico (Δ -1,4 BNC) en rendimientos alternos.

Debido a la significancia potencial de los compuestos de estearina naturales que están en grandes cantidades a disposición con cadenas laterales 17-C, de origen animal (fitosterinas) o de origen animal (colesterina) como productos de partida para farmacéuticos de alta calidad con estructura básica esteroide se han realizados numerosos ensayos para la degradación selectiva de las cadenas laterales por vía microbiológica. Un resumen de estos trabajos se encuentra en Adv. Appl. Microbiol. 22, 29 (1977), 29-58, Christoph K.A. Martin "Microbial Cleavage of Sterol Side Chains". Se hace especial referencia al capítulo IV de esta publicación que desglosa las tres vías hasta ahora tomadas para la degradación selectiva de las cadenas laterales bajo A hasta C. Las proposiciones del estado de la técnica se subdividen por lo tanto en los siguientes tres grupos: transformación de la estructura del anillo de los compuestos de partida de esterina de manera que se inhiba el mecanismo de la disocia-

5. ción del anillo y con ello sea posible la degradación selectiva de las cadenas laterales. El empleo simultáneo de inhibidores para evitar la degradación del anillo esteroide y/o del crecimiento de los microorganismos, así como finalmente la búsqueda hacia mutantes de microorganismos que conduzcan a la degradación deseada, lo más ampliamente selectiva, de las cadenas laterales.

10. Principalmente se obtienen según este procedimiento del actual estado de la técnica como producto final de la degradación microbial compuestos 17-ceto-esteroides que, si bien son valiosos como productos intermedios para la obtención industrial de hormonas de las series estran-androstano y spirostano, son sin embargo menos adecuados para la obtención de hormonas de esteroide de las series pregnano, por ejemplo, pro-
15. gesterona, hidrocortisona, cortisona, prednisona, prednisolona, triamcinolona y similares. En los casos mencionados en último lugar se han de volver a incorporar en la posición 17 químicamente cadenas laterales estereoespecíficas.

20. Solo ocasionalmente se ha logrado hasta ahora obtener como productos del metabolismo de la degradación microbial compuestos esteroides que contengan en la posición 17-C un resto de cadenas laterales de alquilo, y aquí, especialmente el resto del ácido α -propiónico. Los compuestos esteroides de esta clase serían especialmente adecuados para la obtención en escala
25. industrial de esteroide-hormonas de la serie pregnano de esterina de origen natural. Resulta aquí evidente que la obtención de productos de degradación parcial de esterina de esta clase resulta especialmente difícil ya que aquí no solo se necesita la degradación selectiva de cadenas laterales - evitando simul-
30. táneamente la ruptura y degradación de la estructura anular -,

sino que además adicionalmente se ha de interrumpir el crecimiento de los microorganismos bajo degradación de las cadenas laterales en un estado que, según los conocimientos actuales, solo es una estación de paso para alcanzar la estructura 17-ce-
5. toesteroide. J.M. Whitmarsh describe en "The Biochemical Journal", 90, 1964, 23 p hasta 24 p, la disociación microbiológica de coles-
terina con un cultivo de Norcardia en presencia de inhibidores, tales como 8-hidroxiquinolina, bajo formación de
reducidas cantidades de ácido 3-oxo-pregna-4-en-20-carboxílico
10. (Δ -4 BNC) y ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico (Δ -1,4
BNC). La patente US 4 029 549 recién publicada (Antosz et al.)
describe el mutante de microorganismos NRRL B-8119, con la cual
ha de ser posible degradar selectivamente los compuestos de
17-C-esteroide con 8 hasta 10 átomos de carbono en el resto
15. 17-C-alquilo a 9 α -OH AD y 9 α -OH BN-ácido. Como muestra sin
embargo especialmente el capítulo IV C de la publicación C.K.A.
Martin a.a.O., páginas 50 hasta 52, hasta hoy día no existe
ninguna vía fiable para la obtención microbiológica de compues-
tos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico de los sustratos de
20. esteroides de cadenas laterales 17-C o bien para la obtención
en forma reproducible de mutantes de bloque de defecto micro-
organismos que en forma fiable y en altos rendimientos también
puedan suministrar compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propio-
nico como producto final de la degradación enzimática cuando
25. se trabaje bajo ausencia de los inhibidores de la clase men-
cionada. El trabajar bajo ausencia o en presencia de solo redu-
cidas cantidades de inhibidores parece ser sin embargo desea-
ble por razones técnicas, por ejemplo, debido a los rendimien-
tos volumen-tiempo indeseadamente altos.

30.

La invención tiene por cometido posibilitar la obten-

- ción de compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico en rendimientos industrialmente utilizables y mejorados por disociación microbial de sustratos de esteroides de cadenas laterales 17-C-. Aquí se han de emplear mutantes de bloque de defecto obtenidos en forma dirigida y seleccionados, que se han obtenido previamente de cepas salvajes adecuadas. Aquí es especialmente posible - si bién no es forzoso - trabajar con los mutantes de bloque de defecto seleccionado también bajo ausencia de inhibidores que inhiban la degradación del anillo esteroide y/o el crecimiento de los microorganismos. Un ulterior cometido de la invención es la obtención segura y reproducible de mutantes de bloque de defecto de microorganismos que son adecuados para la obtención industrial mejorada, especialmente, libre de inhibidores, de compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico a partir de esterinas de origen natural.
- 5.
- 10.
- 15.

En sentido más concreto tiene la invención aquí el cometido especial de la obtención microbial de ácido 3-oxo-pregna-4-en-20-carboxílico (Δ -A BNC) y/o ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico (Δ -1,4 BNC) en la vía descrita. Producto de partida para la obtención microbiológica de estos compuestos han de ser especialmente las esterinas naturales y/o vegetales que hasta ahora como productos residuales casi no tenían importancia práctica. Para la invención también han de ser adecuados los derivados sencillos de estos productos de partida naturales.

20.

En una forma ejecutiva especial ha de crear la invención en especial vías para la obtención de mutantes de bloque de defecto de microorganismos de alta eficacia para el material de partida de esterina determinado empleado en cada caso en el procedimiento técnico y con ello permitir la adaptación del material esterina empleado y de los mutantes de bloque de defec-

25.

30.

to de los microorganismos a seleccionar. Los productos del procedimiento de la presente invención Δ -4 BNC y Δ -1,4 BNC son valiosos productos intermedios, por ejemplo, para la obtención de los compuestos de la serie progesterona.

5. Objeto de la invención es, por lo tanto, en una primera forma de ejecución, un procedimiento para la obtención de compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico por disociación de la cadena lateral enzimática en los sustratos de esteroide de de cadena laterales 17-C, caracterizado porque

10. a) mutantes de bloque de defecto de microorganismos, que también bajo ausencia de los inhibidores de la degradación del anillo esteroide y/o inhibidores del crecimiento de los microorganismos suministran compuestos esteroides con el resto ácido 17-C- α -propiónico, se cultivan en un medio nutriente
15. acuoso bajo condiciones aerobicas en presencia del sustrato de esteroide bajo enriquecimiento de los compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico en el caldo de fermentación y
- b) los compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico formados se aislan.
- 20.

En especial es aquí objeto de la invención un procedimiento para la obtención de ácido 3-oxo-pregna-4-en-20-carboxílico (Δ -4 BNC) y/o ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico (Δ -1,4 BNC) por degradación de la cadena lateral micro-

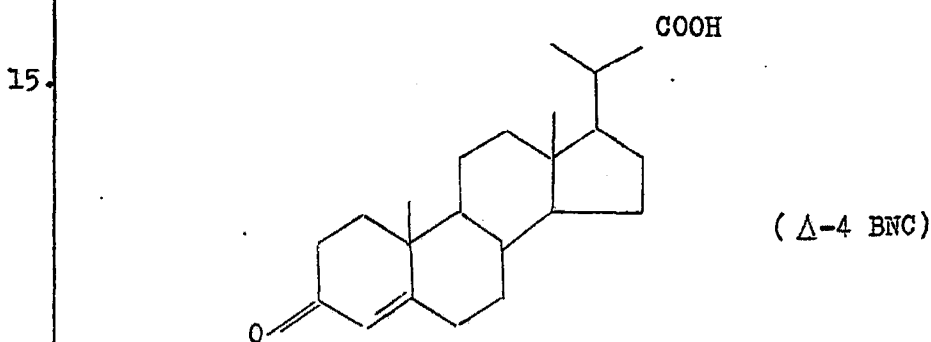
25. bial en los sustratos de esteroide de cadenas laterales 17-C, caracterizado porque

- a) un microorganismo suministrador, también bajo ausencia de inhibidores para la inhibición de la degradación del anillo esteroide y/o del crecimiento de los microorganismos, de
30. Δ -4 BNC y/o Δ -1,4 BNC se cultiva en un medio acuoso bajo

condiciones aerólicas y en presencia de un sustrato de esteroide de cadena lateral 17-C bajo enriquecimiento de ácido 3-oxo-pregna-4-en-20-carboxílico y/o ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico y

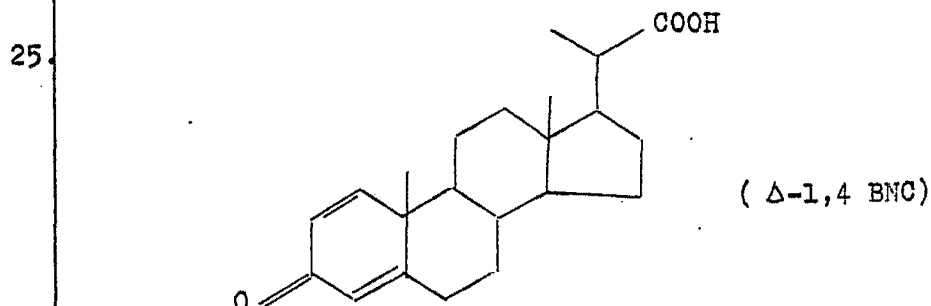
5. b) a continuación se aísla el ácido 3-oxo-pregna-4-en-20-carboxílico y/o ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico. El rendimiento en Δ -4 BNC y/o Δ -1,4 BNC deberá ascender aquí preferentemente como mínimo a un 15 % en peso, referido al sustrato de esteroide empleado.

10. La forma estructural de los compuestos aquí indicados Δ -4 BNC y Δ -1,4 BNC son los siguientes:



20.

ácido 3-oxo-pregna-4-en-20-carboxílico.



30.

ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico.

- En una ulterior forma de ejecución se refiere la invención a un procedimiento para la obtención de mutantes de bloque de defecto de microorganismos de trabajo aeróbico capaces para la obtención industrial de compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico, especialmente para la obtención de ácido 3-oxo-pregna-4-en-20-carboxílico y/o ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico de sustratos esteroide de cadenas laterales 17-C, por ejemplo, de compuestos de esterina de origen animal o vegetal, por degradación como mínimo ampliamente selectiva de las cadenas laterales, en caso deseado también bajo ausencia de inhibidores de la degradación del anillo esteroide y/o inhibidores del crecimiento de los microorganismos, caracterizándose este procedimiento porque
15. 1) se aísla y cultiva una cepa salvaje de microorganismos capacitada para el crecimiento aeróbico sobre compuestos de esterina como única fuente de carbono y aquí da preferencia a la degradación de las cadenas laterales 17-C con respecto a la degradación del anillo,
 20. 2) la cepa salvaje se somete a un tratamiento de mutación en sí conocido,
 - 3) la población de mutantes se cultiva sobre un medio de separación (medio de enriquecimiento para los mutantes deseados) sobre el cual los mutantes suministradores de los compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico no crecen o prácticamente no crecen, mientras crecen las cepas de mutantes indeseadas acompañantes y de esta manera o bien durante su crecimiento se matan y
 25. 4) el resto que queda de las cepas de mutantes se cultivan sobre esterinas de cadenas laterales 17-C y de esta manera se
 - 30.

aislan las cepas con producción óptima de los compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico.

Objeto de la invención son, además, los mutantes de bloque de defecto obtenidos según este procedimiento y, aquí, especialmente, los mutantes de bloque de defecto suministradores de Δ -4 BNC y/o Δ -1,4 BNC. En especial se refiere la invención en esta relación a la nueva mutante de bloque Chol. spec. 73-M11 que se ha depositado en el Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda, bajo el número CBS 437.77 así como en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, bajo el número ATCC 31385. Esta nueva mutante de bloque es adecuada para la obtención libre de inhibidor de ácido 3-oxo-pregna-4-en-20-carboxílico o ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico, también bajo ausencia de los inhibidores mencionados, de las esterinas de origen natural o vegetal. Esta se obtiene según el procedimiento de la presente invención de la nueva cepa salvaje Chol.spec. 73 así que pertenece al grupo de las bacterias corineformes, asimismo aislada por primera vez por el solicitante, y que pertenece al objeto de la invención y ha sido depositada en el Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda, bajo el número CBS 660.77 así como en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, bajo el número ATCC 31384.

La obtención de los mutantes de bloque de defecto de microorganismo según la invención.

Un objeto decisivo de la invención se encuentra en la creación por primera vez de un procedimiento reproducible seguro para la obtención de mutantes de bloque de defecto de la clase descrita, es decir, de microorganismos que se pueden obtener por una combinación muy determinada de selecciones

- y mutaciones con selección de nuevo a continuación de cepas salvajes que son capaces de crecer sobre compuestos esteroide de la clase descrita. Los mutantes de bloque de defecto de los microorganismos obtenidos según el procedimiento de la presente invención se caracterizan porque, por una parte, consta como mínimo ampliamente bloqueados con respecto a un crecimiento sobre la estructura del anillo esteroide bajo consumo de estos anillos como fuente de carbono, por otra parte, los mutantes de los microorganismos obtenidos según la presente invención están sin embargo también suficientemente bloqueados con respecto a la degradación de un resto de ácido α -propiónico presente o bien que se forma en la posición 17-C del esteroide de manera que industrialmente resulta posible una obtención dirigida de los compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico de los correspondientes sustratos de esteroide con cadenas laterales 17-C más largas y su aislamiento del caldo de fermentación en buenos rendimientos. Es aquí especialmente ventajoso que, en el caso deseado, se puede trabajar bajo ausencia de inhibidores de la clase mencionada - véase, por ejemplo, Christoph K.A. Martin, a.a.O., capítulo IVB - . Mediante la combinación según la presente invención de una selección determinada de cepas salvajes y ulteriores etapas de mutación y selección esto resulta posible.

En el procedimiento según la presente invención para la obtención de los mutantes de bloque deseados se sigue entre sí las siguientes cuatro etapas de procedimiento:

- Etapa 1: Selección dirigida de cepas salvajes de microorganismos,
- Etapa 2: tratamiento de la mutación,
- Etapa 3: separación de la población de mutantes obtenida de la

etapa 2, o bién enriquecimiento de los mutantes deseados de la población de mutantes en total obtenida,

5. Etapa 4: cultivo de las cepas de mutantes separadas o bién enriquecidas en la etapa 3 y selección de las cepas de mutantes de bloque con producción óptima del producto de procedimiento deseado, el ácido 17-C-esteroide- α -propiónico.

10. Estas cuatro etapas de procedimiento se pueden realizar en una sola pasada para la obtención de los mutantes de bloque de defecto deseados. Pero también puede ser conveniente repetir las etapas de procedimiento 2 y 3 una o varias veces sometiendo la población de mutantes deseada, separada o bién enriquecida, en la etapa 3, de nuevo a un tratamiento de mutación según la etapa 2 y después separar de nuevo en la etapa 3.

15. A continuación se describen los detalles de las etapas 1 hasta 4 mencionadas.

Etapa 1: aislamiento de las cepas salvajes adecuadas

20. Las cepas salvajes de microorganismos a seleccionar deberán estar capacitadas para crecer bajo condiciones aeróbicas sobre compuestos esteroideos y aquí especialmente sobre el compuesto esteroide con cadenas laterales 17-C. Las cepas adecuadas para la invención poseen aquí preferentemente como mínimo aproximadamente la misma velocidad de degradación para la cadena lateral como para la parte del anillo del compuesto esteroide. Preferentemente muestran las cepas salvajes sin embargo una velocidad de degradación de las cadenas laterales más elevada en comparación con la degradación del anillo.

25. El aislamiento de las cepas salvajes se puede efectuar aquí en forma en sí conocida de muestra de tierra. Tanto debido
30. a la amplia difusión de los compuestos esterínicos vegetales y

animales se encuentran cepas salvajes adecuadas de la clase mencionada prácticamente con regularidad en muestras de tierra de origen arbitrario. Su cultivo se efectúa bajo condiciones aeróbicas en presencia de un medio nutriente acuoso y, preferentemente, en presencia de un compuesto esteroide con una cadena lateral 17-C como única fuente de carbono. Aquí es posible, pero sin embargo no imprescindible, presentar ya en este lugar del procedimiento de selección según la presente invención el tipo de compuestos esteroides como fuente de carbono, que finalmente se ha de degradar con el mutante de bloque de defecto deseado. Si por ejemplo se ha de degradar colesteroína o una fitosterina finalmente al compuesto ácido 17-C-esteroide- α -propiónico entonces se puede presentar en caso deseado el compuesto esterínico determinado a emplear en el proceso industrial, preferentemente como única fuente de carbono en el medio de cultivo, por lo demás convencional, para la selección y cultivo de las cepas salvajes. Sin embargo se ha demostrado también que no es imprescindible efectuar ya en este lugar una concordancia entre la fuente de esterina-carbono en la selección y cultivo de la cepa salvaje y del compuesto esterino a emplear finalmente en el procedimiento para la degradación del esteroide.

Dentro del marco del procedimiento total tiene la selección de las cepas salvajes correctas una importancia especial. Se ha demostrado que generalmente las cepas salvajes principalmente dan preferencia a la disociación del anillo en comparación con una degradación de las cadenas laterales. Las cepas salvajes a seleccionar según la presente invención deberán tener como mínimo aproximadamente la misma velocidad de degradación para las cadenas laterales como para la parte del anillo de los compuestos esteroides. Con especial preferencia se seleccio-

nan y cultivan sin embargo aquellas cepas salvajes que al crecer sobre compuestos de esterina con restos alquilo saturados o insaturados en la posición 17-C, preferentemente restos con 8 hasta 10 átomos de carbono, dan un rendimiento de degradación selectivo - medido bajo las condiciones standar descritas a continuación - según la fórmula general

$$I = a \cdot 10^b$$

10. Aquí es a el factor de crecimiento y b el factor de selectividad del crecimiento de la cepa salvaje como definido a continuación. El índice de selectividad I, que es característico para la selección de las cepas salvajes adecuadas y preferentes, se desprende por lo tanto como producto según la fórmula indicada del factor de crecimiento a y del factor de selectividad b. El valor

15. numeral I asciende para las cepas salvajes de los microorganismos preferentes como mínimo a 10. Valores numerales superiores a I son indeseables y pueden encontrarse por ejemplo como mínimo en 100. En la selección de las cepas salvajes de una población

20. de cepas salvajes aisladas mayor puede ser deseable someter las cepas con los valores numerales para uno máximos a las ulteriores etapas del procedimiento de la presente invención. Así puede ser especialmente conveniente seleccionar aquellas cepas salvajes para los cuales en el valor numeral I ascienda como

25. mínimo a 10^5 . Por lo demás se ha demostrado que valor absoluto de I de puede influenciar por la selección del sustrato de esteroide empleado en cada caso como fuente de carbono. Así es por ejemplo posible que una cepa salvaje seleccionada en su cultivo en un compuesto de esterina de origen animal en la primera etapa

30. de selección aquí discutida crezcan considerablemente mejor - y

por lo tanto suministre un valor superior para I - que sobre una esterina vegetal como fuente de carbono. Independientemente de esto valen las condiciones preferentes anteriormente indicadas para la selección de la cepa salvaje.

5. La determinación del factor de crecimiento a y del factor de selectividad b del crecimiento de la cepa libre se efectúa aquí bajo las siguientes condiciones standard (procedimiento realizado en forma aeróbica):

Factor de crecimiento a:

10. La correspondiente cepa de microorganismos se incubaba en matraces de Erlenmeyer de 500 cc de capacidad (100 cc de solución nutriente de la composición descrita a continuación) a 30°C en la máquina agitadora (frecuencia de agitación: 150 r.p.m.).

15. El medio nutriente tiene la siguiente composición (por litro):

- 1,0 g de KH_2PO_4
0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
0,1 g de NaCl
20. 0,1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
1,0 g de Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitano)
2,0 g del compuesto de esterina de cadenas laterales 17-C, por ejemplo, colesteroína o sitosterina
25. 0,5 g de extracto de levadura
0,01 g de l-histidina
0,02 g de dl-metionina
0,02 g de dl-triptofano
2 μg de biotina
30. 400 μg de pantotenato de calcio

- 2 μg de ácido fólico
- 2000 μg de inosita
- 400 μg de niacina
- 200 μg de ácido p-aminobenzoico
- 5. 400 μg de hidrocloreuro de piridoxina
- 200 μg de riboflavina
- 400 μg de hidrocloreuro de tiamina
- solución de elementos en huellas
- pH del medio de cultivo 6,8.

10. Para la medición del crecimiento (densidad de las células) se extraen en periodos temporales de los cultivos agitados cantidades alicuotas de suspensión de células y se mide la correspondiente extinción (E') en el fotómetro de Zeiss (tipo PL 4) con una longitud de onda de 620 nm (esposor de capa $d = 1$ cm) contra agua destilada. La extinción de salida E_0 asciende antes de comenzar el crecimiento - es decir en el momento t_0 - aproximadamente a 0,775. Las suspensiones se diluyen entonces en cada caso hasta que se pueda medir en la zona $E' = 0,7$.

20. El factor de crecimiento a se desprende como la densidad óptica máxima de la suspensión de las células al final de la fase de crecimiento logarítmica (momento t_1 , extinción E_1) que bajo las condiciones de cultivo indicadas se alcanza a más tarda después de 5 días, es decir, $a = \Delta E = E_1 - E_0$.

25. Factor de selectividad b:

Las cepas a comprobar se cultivan en caldo nutriente I (Merck) más un 0,1 % de Tween 80 (monocoleato de polioxietilensorbitano) más un 0,1 % de compuesto de esterina, por ejemplo, colesteroína, durante 48 horas a 30°C, las células se lavan a continuación con tampón y se vuelven a suspender en tampón de

fosfato (p_H 7,5). La degradación del compuesto de esterina se mide en preparados paralelos con compuestos de esterina radioactivamente marcados, por ejemplo, 4- ^{14}C - y 26- ^{14}C -colesterina o correspondientes compuestos de sitosterina más radioactivamente marcados en repientes de Warburg.

5.

A 2,4 cc de suspensión de células en el recipiente principal se agregan 0,2 cc de solución de esterina (por ejemplo solución de colesterina) (5μ moles con aproximadamente 0,1 μ Ci de sustrato marcado en solución al 0,1 % de Tween-80), el preparado se incuba durante 6 horas a 30°C y la reacción se para a continuación mediante adición de 0,2 cc de H_2SO_4 4-n.

10.

El CO_2 activo que se forma en la disociación del sustrato se recoge en etanolamina (0,2 cc) y se mide en contador de escintilación (muestras de 0,1 cc en cada caso en 15 cc de líquido de scintilantar "Unisolv I", de la firma Zinsser).

15.

El factor de selectividad es la proporción sin dimensión de la radioactividad así medida

$^{14}CO_2$ de la cadena lateral del compuesto (26- ^{14}C)-esterinico

$$b = \frac{^{14}CO_2 \text{ de la cadena lateral del compuesto (26-}^{14}C\text{)-esterinico}}{^{14}CO_2 \text{ del sistema anular del compuesto (4-}^{14}C\text{)-esterinico}}$$

20.

En esta ecuación significa la expresión "compuesto de esterina" del compuesto de esterina radioactivamente marcado en cada caso, esto es, por ejemplo, los correspondientes compuestos de colesterina o de β -sitosterina.

25.

La técnica de la determinación de la degradación microbiológica de los compuestos de esterina por el marcado radioactivo bien de un átomo de carbono de anillo o de un átomo de las cadenas laterales es, por lo demás, un método conocido en el actual estado de la técnica y sobre cuyos detalles aquí se

30.

hace referencia. Se señalan, por ejemplo, las siguientes publicaciones: Steroids, 677-688 (1964), G.E. Peterson y J.R. Davis "Cholesterol Utilization by Streptomyces spp. " así como J.B.C. 206, 511-523 (1954) Thressa C. Stadtman et al., "Studies on the Microbiological Degradation of Cholesterol".

5.

Para la selección de las cepas salvajes en esta etapa 1 del procedimiento de la presente invención es además preferente que el factor de selectividad b de las cepas salvajes ascienda como mínimo a 1, preferentemente como mínimo a 2. El factor de crecimiento a de las cepas salvajes debiera ascender como

10.

mínimo a 0,1, preferentemente como mínimo a 0,2 y asciende especialmente asimismo como mínimo a 1.

Para la selección de las cepas salvajes mejor adecuadas para las ulteriores etapas del procedimiento de la presente invención puede ser conveniente ponderar entre sí los factores a y b. Así, dentro del margen de la invención, puede ser conveniente dar preferencia a las cepas salvajes con un factor de selectividad de especialmente alto y en la selección entre las distintas cepas salvajes aisladas seleccionar primeramente según este factor de selectividad b con valores numerales para ver lo más alto posibles. A la inversa naturalmente también se puede dar preferencia a un crecimiento especialmente bueno - expresado por un valor numeral especialmente alto para el factor de crecimiento a - para la mutación a continuación y ulterior selección de la población de mutantes de una cepa salvaje de éstas.

15.

20.

25.

Como cepas salvajes en la etapa 1 entran en consideración, por ejemplo, aquellas de acromobacter, artrobacter, bacillus, brevibacterium, corynebacterium, flavobacterium, microbacterium, mycobacterium, nocardia, protaminobacterium, serratia o streptomyces en Frage. Decisivo para el procedimiento de la

30.

5. presente invención no es tanto la pertenencia de la cepa determinada tal como a conceptos de clases. Más bien son importantes sus propiedades anteriormente discutidas para el cultivo en medios nutrientes conteniendo compuestos de esterina y en especial su índice de selectividad I, que se determina por el factor de crecimiento a y el factor de selectividad b.

Etapa 2:

10. La mutación de la cepa salvaje seleccionada se efectúa en forma en sí conocida. Puede realizarse, por ejemplo, por irradiación rica en energía tal como con rayos ultravioletas o rayos X. Especialmente es sin embargo adecuado el tratamiento de las células con agentes mutágenos. Agentes mutágenos adecuados son, por ejemplo, los compuestos de nitrosoguanidina, tales como 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina o metansulfonato-etílico. En detalle se puede hacer aquí referencia a los datos generales del actual estado de la técnica, véase a este respecto, por ejemplo, la patente US 4 029 549, columna 2, líneas 57 y siguientes, con las preferencias allí contenidas.

20. Fundamentalmente vale también para la invención que el resultado de la mutación de la cepa salvaje resulta indeterminado ya que no se pueden determinar por adelantado en detalle las propiedades de los mutantes de defecto obtenido. Sin embargo se pueden fijar los principios para una iniciación óptima de la mutación ya que se pueden emplear las leyes de la estadística en una población de microorganismos. Por la literatura se conocen procedimientos para determinar las condiciones óptimas para la inducción de mutaciones (véase también E.A. Adelber, M. Mandel, G.C. Chen (1965) "Optimal Conditions for Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Escherichia coli", Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 788-795).

Por lo general se seleccionará para elevar la frecuencia de las mutaciones en las poblaciones de microorganismos la concentración y el tiempo de actuación de los agentes mutantes de manera que ya se dañe letalmente una parte de la población de los microorganismos. Aquí sube más o menos fuertemente la frecuencia de las distintas mutaciones en la parte superviviente de la población.

Dentro del marco del procedimiento de la presente invención se seleccionan las condiciones de concentración y tiempo de actuación del agente mutágeno de manera que la población de partida sea inactividad por el tratamiento en un 10-99,999 %. Preferentemente se seleccionará una proporción de muertes de un 90-99,99 %. A continuación de la etapa de procedimiento 2 de la mutación se realizan las etapas de procedimiento 3 y 4 que tienen por objeto ulteriores etapas de selección para determinar y enriquecer los mutantes de bloque de defecto deseado.

Etapa 3:

Para la siguiente selección de mutantes de bloque de defecto deseados determinadamente según la presente invención de la gran población de los microorganismos después del tratamiento de mutación se seleccionan según la presente invención condiciones de cultivo bajo las cuales resultan las propiedades específicas modificadas de las cepas de mutantes formadas como ventaja para la selección. El enriquecimiento de los mutantes de bloque de defecto deseado se efectúa según la presente invención frecuentemente bajo condiciones bajo las cuales el mutante especial no crece o prácticamente no crece, mientras si crecen los organismos acompañantes indeseados y por su crecimiento o durante su crecimiento son matados. De es-

5. ta manera se logra aislar aquellas cepas de mutantes de bloque de defecto cuyas encimas degradadoras de anillo están bloqueadas, pero que como antes siguen capacitadas para la degradación de las cadenas laterales 17-C en el compuesto de esterina, donde mediante ulteriores medidas, especialmente en esta etapa 3, se asegura que justamente se puedan aislar aquellos mutantes de bloque de defecto que en la degradación de las cadenas laterales desarrollan preferentemente el resto ácido α -propiónico en la posición 17-C.

10. Para ello se cultiva en la etapa de procedimiento 3 la población de mutantes sobre un "medio de separación" que finalmente sirve como medio de enriquecimiento para las cepas de mutantes deseadas. Como medio de separación de los mutantes se puede emplear un medio de cultivo acuoso que como fuente de nitrógeno contenga un compuesto esteroide con una cadena lateral 17-C- con solo un número determinado de C o también ninguna cadena lateral en la posición 17-C. Como fuente de carbono en este medio de separación de mutantes son adecuados además de los compuestos esteroide no sustituidos en la posición 17-C especialmente aquellos que contienen cadenas laterales con hasta 5 átomos de carbono.

15. Sin embargo es preferente emplear como fuente de carbono en este medio de separación de mutantes o bien medio de enriquecimiento un compuesto esteroide con 3 átomos de carbono en la cadena lateral 17-C, empleándose convenientemente aquí un compuesto de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico, o también un número múltiple de tales compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico deseados como única fuente de carbono.

20. Aquí también puede ser preferente emplear en este medio de separación de los mutantes como fuente de carbono

aquellos compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico cuya obtención es el final deseado mediante los mutantes de bloque cultivados según la presente invención. Si por lo tanto dentro del marco de la invención de esterinas de origen vegetal o animal se han de obtener finalmente como producto del procedimiento

5. Δ -4 BNC o Δ -1,4 BNC, entonces puede ser conveniente emplear en el medio de separación de los mutantes o bien en el medio de enriquecimiento de esta etapa 3 como única fuente de carbono Δ -4 BNC y/o Δ -1,4 BNC.

10. Por lo demás se trabaja aquí con soluciones nutritivas convencionales bajo condiciones aeróbicas.

- Aquellos microorganismos mutantes que debido al tratamiento de mutación han perdido su capacidad para crecer sobre las fuentes de carbono ahora presentes no se pueden multiplicar al incubar el medio de separación de los mutantes. Estos, por lo tanto, no crecen. Otra parte de la población de los mutantes que bien durante el tratamiento de mutación de la etapa 2 no han sido dañados suficientemente o hayan sufrido otros defectos, está capacitada para crecer sobre la fuente de carbono del medio de separación de los mutantes. Durante la incubación se presenta aquí por lo tanto una multiplicación.
- 15.
- 20.

- La invención se aprovecha de estos distintos comportamientos seleccionándose las condiciones del medio de separación de los mutantes de manera que las cepas crecientes debido a su crecimiento o durante su crecimiento sean matadas, sin por ello dañar aquí las cepas de mutantes que no crecen.
- 25.

- Una separación de éstas es por ejemplo lo posible mediante adición de antibióticos, por ejemplo, mediante adición de compuestos de penicilina. La adición de los compuestos de penicilina conduce a la muerte de proporción de las cepas de
- 30.

microorganismos que crecen mientras se mantienen sin dañar las cepas que no crecen.

Otra posibilidad de la separación de los mutantes en este estado es la incorporación de componentes dañadores de las células, especialmente radioactivos, en la parte de la población de mutantes que crece sobre el medio de separación. Aquí es adecuada, por ejemplo, la incorporación de p^{32} en las cepas de los mutantes crecientes. Esto es por ejemplo posible por el empleo simultáneo de sales marcadas radioactivamente correspondientes en la solución nutriente de esta etapa de selección. Para la separación mediante p^{32} se ha acreditado especialmente el empleo simultáneo de $NaH_2^{32}P_4$ en la solución nutriente.

De los mutantes de bloque de defecto sin dañar que quedan se pueden aislar entonces, por ejemplo, mediante el método de estampado según Lederberg en sí conocido las cepas de mutantes de bloque de defecto deseadas según la presente invención. Respecto a la técnica de procedimiento aquí empleada y al método de enriquecimiento de la penicilina y con respecto al método de estampación según Lederberg se hace especial referencia a J. Amer. Chem. Soc. 70, 4267, (1948) Davis, B.D. (Penicillin-Anreicherungsverfahren), J. Bact. 63, 399 (1952) Lederberg, J., Lederberg, E.M. (Lederbergsche Stempelverfahren).

Etapa 4:

Los mutantes de bloque de defecto así aislados y seleccionados se pueden cultivar ahora en un medio nutriente usual y después, en caso dado, someter a una ulterior selección. La selección se puede efectuar aquí, por ejemplo, según el resultado deseado de las cepas de microorganismos, sobre el material de empleo intencionado, por ejemplo, por lo tanto, sobre compuestos de estearina naturales o vegetales, pudiendo ser aquí

determinante especialmente la naturaleza química de los productos de metabolismo del crecimiento de los microorganismos y la propensidad del crecimiento de las cepas. Naturalmente se dará preferencia a mutantes de bloque con productividad óptima del producto de procedimiento deseado como resultado. Estas cepas se pueden emplear entonces en el procedimiento industrial. El cultivo y la selección se pueden repetir aquí una sola vez o varias veces.

Dentro del marco del procedimiento de la presente invención también es posible repetir la secuencia de las etapas de procedimiento de la mutación según la etapa 2 y la separación de los mutantes a continuación según la etapa 3 una o varias veces, siempre que parezca deseable una actuación aún más fuerte de los agentes mutágenos sobre las cepas de mutantes defectuosas para lograr finalmente resultados de producción óptimos. A continuación se elabora por regla general según la etapa 4.

Para la determinación de los mutantes de bloque de defecto especialmente activos deseados se puede emplear un estándar para la determinación de los rendimientos, que se efectúa bajo ausencia de inhibidores bajo las condiciones siguientes de ensayo:

La cepa de mutantes de bloque de defecto a determinar se cultivo en un matraz de Erlenmeyer de 500 cc de capacidad con 100 cc de solución nutriente de la siguiente composición: 0,8 % de peptona, 0,9 % de extracto de levadura, 0,3 % de glucosa, 0,06 % de Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitano), 0,06 % de colesteroína o sitosterina, p_H 7,2. El cultivo se cultiva previamente en la máquina vibradora (frecuencia de la vibración 150 r.p.m.) a 30°C durante 62 horas, a continuación se agrega

5. un 0,1 % de BRIJ 35 (polioxietilenmonolauriléter) y un 0,1 % del compuesto de esterina y se sigue incubando durante otras 120 horas. Después de interrumpir los cultivos se toman muestras y éstas se extraen y se analizan por cromatografía de capa delgada.

10. Los mutantes de bloque de defecto preferentes según la presente invención suministran un rendimiento en derivado de ácido 17-C- -propiónico y aquí, especialmente, Δ -4 BNC y/o Δ -1,4 BNC de como mínimo un 15 % en peso, preferentemente, como mínimo en un 30 % en peso sobre coles-terina o sobre sitosterina. Sobre coles-terina se encuentra el rendimiento especial-mente en como mínimo un 50 % en peso y se puede encontrar, por ejemplo, en la zona entre un 70 hasta 80 % en peso, en cada caso, referido a la esterina empleada. Sobre sitosterina se
15. encuentran los rendimientos por regla general algo más bajos, pero también aquí pueden alcanzar, por ejemplo, un 40 hasta 50 % en peso. Para el modo de trabajo y libre de inhibidor se logran por lo tanto unos resultados hasta ahora desconocidos.

Procedimiento para la obtención de compuestos de ácido 17-C-es-terioide- Δ -propiónico y, especialmente, para la obtención de ácido 3-oxo-pregna-4-en-20-carboxílico y/o ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico

25. La transformación selectiva del sustrato de esteroides seleccionado como material de partida, por ejemplo, por lo tanto un compuesto de esterina natural, se puede efectuar según creación y selección de los mutantes de defecto según el procedimiento anteriormente descrito, en forma conocida. Así se puede agregar, por ejemplo, el compuesto esteroide seleccionado como material de empleo, al cultivo durante el periodo de incuba-
30. ción o se ha agregado al medio nutriente antes de la inoculación

de los mutantes de bloque. Se puede emplear un compuesto esteroide o también una mezcla de varios compuestos esteroides. Preferentemente se emplean los compuestos esteroides a degradar selectivamente en el cultivo en cantidades de aproximadamente 0,1 hasta 100 g/l. La concentración óptima del compuesto de esterina a transformar en la etapa de cultivo depende por lo general de la cepa y se puede determinar en cada caso mediante simples ensayos previos. Por lo general se encuentra la concentración del compuesto esterídico en el medio preferentemente no por encima de 20 g/l y, frecuentemente, no por encima de 15 g/l, dándose sin embargo preferencia a cantidades superiores a 1 g/l.

Aquí puede ser preferente no agregar el sustrato a someter a la degradación de las cadenas laterales, en una sola vez al medio de reacción sino efectuar ésta adición poco a poco en el transcurso de la reacción. Preferentemente se agrega el sustrato de partida en esta forma de ejecución esencialmente en forma continua a la mezcla de reacción en el transcurso de la reacción de degradación. De esta manera se puede elevar frecuentemente el rendimiento de los productos de degradación deseados.

El cultivo se cultiva en un medio nutriente que como fuente de carbono contenga bien las esterinas a transformar o también además ulteriores fuentes de carbono metabolizables, así como las sustancias nutrientes y de crecimiento necesarias por estos microorganismos. Especialmente ventajoso para el crecimiento de los microorganismos son, por ejemplo, parafina, glicerina, ácidos carboxílicos, fécula, dextrina, sacarosa, glucosa, fructosa y productos residuales conteniendo azúcar. Fuentes de nitrógeno adecuadas son las sales amónicas, nitratos,

peptonas, agua de esponjamiento de maíz, harina de soja y harina de pescado. Además se pueden agregar aceleradores de la fermentación, tales como, extracto de levadura y vitaminas. El medio nutriente contiene además convenientemente sales inorgánicas, tales como fosfatos de sodio, potasio, amonio, así como sales de calcio, magnesio, manganeso o hierro.

El emulsionado de las esterinas en el medio nutriente se efectúa preferentemente mediante emulsionantes conocidos, por ejemplo, mediante ácido graso-éster de sorbitano o sus productos de adición de óxido etilénico, polioxietilenmonclauril-éter o amidoalquilbetaina de ácido graso.

El medio de cultivo empleado se esteriliza antes de comenzar el cultivo de las bacterias, convenientemente por calentamiento. Después de enfriar e inyectar el medio de cultivo con un cultivo previo adecuado de la cepa de bacterias a transformar se incuba entre 25 hasta 55°C, preferentemente a 27 hasta 30°C. El p_H de la solución nutriente se encuentra entre el p_H 4 hasta 8,5, preferentemente 7,0 hasta 8,0. El cultivo se alimenta con oxígeno por agitación, vibración o introducción de gas y se incuba hasta la degradación completa de la esterina hasta el grado deseado. La degradación de la esterina exige, según la concentración del sustrato y las demás condiciones de fermentación, por regla general 24 hasta 160 horas.

El producto de procedimiento obtenido se esta manera, que generalmente se enriquecimiento en el caldo de fermentación, se puede obtener en forma en sí conocida de la mezcla de reacción. Así se pueden aislar, por ejemplo, compuestos de BNC por extracción con disolventes orgánicos, tales como metilisobutilcetona, éster acético, n-hexanol, n-octanol, cloroformo o n-hexano, del medio de cultivo antes o después de separar las cé-

lulas.

5. Por ejemplo se logra un aislamiento de los compuestos de BNC extrañendo un litro de una solución de fermentación, que contiene 1 g de BNC, con aproximadamente el mismo volumen de disolvente orgánico, tal como con metilisobutilcetona, éster acético, n-hexanol, n-octanol, cloroformo o n-hexano, en el perforador, turbo-agitador o embudo-separador.

10. En los dos casos mencionados en último lugar se ha de realizar para la separación de la fase orgánica que contiene el BNC de la emulsión se ha realizar a continuación una etapa de centrifugación.-

15. Después de evaporar el disolvente queda un residuo conteniendo el BNC que, después de recristalizar, por ejemplo, en benceno, se puede elaborar al BNC puro del p.f. 233 hasta 236°C.

20. La extracción del disolvente es especialmente posible en la zona de p_H ácida. Para ello se ajusta por ejemplo con H_2SO_4 al 50 % a aproximadamente un p_H 2 y se extrae con metilisobutilcetona, éster ácido acético, n-hexanol, n-octanol, cloroformo o n-hexano en la forma anteriormente indicada. Después de evaporar la fase orgánica se obtiene también aquí un residuo que contiene BNC, a su vez, después de recristalizar, conduce al producto puro del p.f. 233 hasta 236°C. La extracción se puede realizar también en la zona neutra.

25. Alternativamente también es posible una purificación por intercambio de iones. Para ello se concentra convenientemente primeramente la solución de fermentación y después se ajusta a un valor alcalino, por ejemplo, a un p_H 12. Después de agregar una cantidad limitada de metanol y agitar en el turbo-agitador se separa la masa de células mediante una centrifuga de paso.

30.

Lo sobrenadante acuoso-metanólico se bombea a través de una columna intercambiadora de iones que está llena con una resina intercambiadora de aniones, por ejemplo, en forma de acetato. El BNC formado es aquí ligado totalmente en el intercambiador de iones. Por elución con ácido acético al 10 % en metanol se obtiene un producto que primeramente contiene principalmente BNC, después de recrystalizar se obtiene también aquí el BNC puro del p.f. 233 hasta 236°C.

Según una forma de ejecución preferente se logra el aislamiento de los compuestos de BNC del líquido fermentador simplemente mediante precipitación en la zona ácida y separación por filtración. Para ello se filtra primeramente el líquido fermentador ajustado alcalinamente para retirar el material de células y demás componentes sólidos. A continuación se acidifica precipitándose así el BNC en forma sólida, filtrable, y se puede obtener, por ejemplo, por simple separación por succión.

Para acidificar se puede emplear cualquier ácido mineral, pero también se pueden emplear ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético y hasta CO₂ gaseoso. A un p_H 5 se ha logrado una precipitación prácticamente total. Para la mejor filtrabilidad puede ser ventajoso calentar brevemente la suspensión.

El sólido aislado puede contener hasta un 90 % de compuestos de BNC. De éstos se pueden obtener los compuestos puros por recrystalización.

25. Detalles especiales respecto a la invención

Las enseñanzas de la invención no solo se pueden realizar con ~~sustratos~~ de esteroides naturales tales como colesteroína, sitosterina, etc. Productos de partida adecuados para una transformación a, por ejemplo, Δ-4- y/o Δ-1,4 BNC son también los derivados del mismo, tales como colestenoína, sitostenona,

- estigmastenona y similares. Dentro del marco de los trabajos de desarrollo se ha descubierto que una cepa libre perteneciente al grupo de las bacterias corineformes puede ser un producto de partida especialmente adecuado para la obtención de los mu-
5. tantes de bloque de defecto deseado. Esta cepa Chol. 73, que se ha depositado con el número de depósito CBS 660.77 en Baarn, Holanda, así como bajo el número de depósito ATCC 31384 en Rockville, Maryland, USA, se comprobó con más detalle morfológicamente y desde el punto de vista del crecimiento fisiológico:
10. Se apreciaron aquí las siguientes propiedades:
- | | | |
|-----|---|---|
| 15. | 1. Forma de células | irregular, principalmente bastoncillos cortos, parcialmente cocoides o también bastoncillos más largos, parcialmente ramificados, en parte acodados; cultivos muy jóvenes: con bastoncillos principalmente largos, ligeramente ramificados. |
| | 2. Formación de esporas | negativo |
| | 3. Gramobión coloreamiento | positivo |
| | 4. Forma de las colonias sobre placas de bouillon de agar | pequeñas colonias redondas, color crema, margen liso, convexas, lisas, brillantes. |
| 20. | 5. Crecimiento sobre glucosa-agar | Crecimiento más voluminoso, por lo demás como bajo 4. |
| | 6. Crecimiento sobre glucosa-nitrato-agar | crecimiento algo más voluminoso, por lo demás como bajo 4. |
| | 7. Crecimiento sobre agar de patata | colonias en conjunto algo más rojizas, por lo demás como bajo 4. |
| 25. | 8. Crecimiento sobre glucosa-asparagina-agar | colonias mucho más pequeñas, redondas, de color crema, borde liso, brillantes. |
| | 9. Crecimiento sobre fécula-agar | colonias de tamaño medio, redondas, en parte solapadas, de color crema, brillante, más húmedas que sobre BA. |
| 30. | 10. Crecimiento sobre calcio-caseinato-agar | crecimiento más lento, ninguna formación de halo caseolítico. |

	11. Crecimiento sobre leche desnatada	negativo y ninguna coagulación.
	12. Formación de indol de triptofano	negativo.
	13. Formación de ácido/prueba rojo de metilo	negativo.
5.	14. Reacción de voges-proskauer (formación de acetoina):	negativo.
	15. Crecimiento sobre citrato	muy débil hasta negativo.
	16. Reducción de NO_2 e NO_2	negativo.
	17. Reducción de NO_2	ligeramente positivo.
10.	18. Aprovechamiento de hidrato de carbono	crecimiento sobre glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manosa, lactosa, galactosa, manita, ramnosa, arabinosa y fécula; sin embargo en ningún caso formación de gas o de ácido.
15.	19. Caldo de NaCl	buen crecimiento hasta un 3 % de NaCl, débil crecimiento hasta un 5 %, ningún crecimiento a partir de un 7%.
	20. Disociación de urea	positivo.
	21. Necesidades de oxígeno	estrictamente aeróbico.
20.	22. Temperaturas de crecimiento	crecimiento entre 19 y 37°C, buen crecimiento alrededor de 30°C.
	23. Crecimiento sobre	pequeñas colonias blancas después de 6 días.
	0,5 g de NaH_2PO_4	
	1,8 g de K_2HPC_4	
25.	0,5 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	
	0,2 g de $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	
	0,2 g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	2,0 g de colessterina
	0,02 g de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1000 cc de dest. H_2O , pH 6,8
	0,5 g de NH_4NO_3	
30.	1,0 g de Tween 80	

- Esta cepa salvaje se muta por tratamiento con 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina como descrito en los ejemplos siguientes. La población de mutantes se elabora en el procedimiento según la presente invención. Se obtuvieron así nuevos mutantes de bloque Chol.spec. 73-M11 que se depositaron en Baarn, Holanda, bajo el número de depósito CBS 437.77 así como bajo el número de depósito ATCC 31385 en Rockville, Maryland, USA. Este nuevo mutante de bloque adecuado para la obtención libre de inhibidor de ácido 3-oxo-pregna-4-en-20-carboxílico y/o ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico, también bajo ausencia de inhibidores que inhiban la degradación del anillo esteroide y/o el crecimiento. Así se obtiene, por ejemplo, de colesteroína como producto de partida el Δ -4 BNC y/o Δ -1,4 BNC en altos rendimientos - junto con solo ligeras cantidades de AD y/o ADD.

15. Ejemplo 1

A Obtención de cepas salvajes adecuadas

- Después de los métodos de enriquecimiento en sí usuales se aíslan de muestras de tierra microorganismos degradadores de esterina que primeramente se comprueban en un ensayo de placas de agar con respecto a su capacidad de crecer sobre colesteroína. Las cepas que con colesteroína como única fuente de carbono muestran un claro crecimiento de colonias se someten a un procedimiento de selección ulterior.

B Determinación del factor de crecimiento a

25. Para determinar el factor de crecimiento a se cultivan los cultivos puros aislados aeróbicamente en cultivos de agitación en el siguiente medio (por litro):

1,0 g de KH_2PO_4

0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

30. 0,1 g de NaCl

- 0,1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
1,0 g de Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitano)
2,0 g del compuesto de esterina de cadenas laterales 1;-C,
5. por ejemplo, colestерina o sitosterina
0,5 g de extracto de levadura
0,01 g de l-histidina
0,02 g de dl-metionina
0,02 g de dl-triptofano
10. 2 μg de biotina
400 μg de pantotenato de calcio
2 μg de ácido fólico
2000 μg de inosita
400 μg de niacina
15. 200 μg de ácido p-aminobenzoico
400 μg de hidrocloreuro de piridoxina
200 μg de riboflavina
400 μg de hidrocloreuro de tiamina
solución de elementos en huellas
20. pH del medio de cultivo 6,8.

- Para determinar la densidad óptica de la suspensión de células se toman cada vez en periodos de 24 horas muestras y se mide la extinción (E') en el fotómetro de Zeiss (tipo PL 4) con una longitud de onda de 620 nm ($d = 1 \text{ cm}$) contra agua destilada. El factor de crecimiento a se desprende como densidad óptica máxima al final de la fase de crecimiento logarítmica menos la extinción de partida E_0 .
- 25.

C Determinación del factor de selección b

- Aquellas cepas salvajes que en el ensayo del matraz agitador con colestерina muestran el mejor crecimiento se com-
- 30.

prueban a continuación en el ensayo de Warburg con colestero-
na marcada $26-^{14}\text{C}$ y $4-^{14}\text{C}$, con respecto a su capacidad de de-
gradar la cadena lateral de la colestero-
lina.

- El cultivo de las cepas se efectúa en un matraz de
5. Erlenmeyer de 500 cc con 150 cc de solución nutriente de la si-
guiente composición: 1,56 % de peptona, 0,28 % de extracto de
levadura, 0,56 % de NaCl, 0,10 % de glucosa, 0,10 % de Tween 80,
0,05 % de colestero-
lina, p_{H} 7,2. Las cepas se cultivan durante
48 horas a 30°C en la máquina vibradora, las células se separan
10. a continuación por centrifugación, se lavan dos veces con tam-
pón de PO_4 0,05 molar (p_{H} 7,2) y se vuelven a suspender en el
mismo volumen de tampón.

- Para el ensayo de Warburg se incuban 2,4 cc de suspen-
sión de células con 0,2 cc de solución de colestero-
lina (5 u mol-
15. les de colestero-
lina y 20000 cpm de $4-^{14}\text{C}$ o $26-^{14}\text{C}$). El CO_2 radioac-
tivo disociado se recoge en 0,2 cc de etanolamina (en el reci-
piente central). La reacción se para después de 6 horas a 30°C
mediante vertido de 0,2 cc de H_2SO_4 6-n y simultáneamente se
expusa el CO_2 aún existente en la suspensión. Para la medición
20. del $^{14}\text{CO}_2$ absorbido se extraen del recipiente de Warburg 0,1 cc
de etanolamina y se mide la actividad en el contador sczintila-
dor (firma Berthold u. Frieseke, tipo bF 5 000). El factor de
selectividad b es el cociente de $26-^{14}\text{CO}_2/4-^{14}\text{CO}_2$.

- Según este proceder se selecciona finalmente la cepa
25. salvaje Chol 73 que muestra un factor de crecimiento $a = 3,71$
y un factor de selectividad $b = 5,0$. Esta cepa se emplea para la
obtención de los mutantes de bloque deseados.

- A continuación se señalan una serie de cepas salvajes
que en el ensayo de Warburg muestran un factor de selectividad
30. favorable $b(26-^{14}\text{CO}_2/4-^{14}\text{CO}_2)$ y que han sido aislados por el so-

licitante:

Demonación interna	nº de depósito	factor de selección b
SC- 18	DSM 1 419	1,1
SC- 89	DSM 1 421	1,2
SC-104	ATCC 31 455	1,9
SC-338	DSM 1 425	1,7
SC-358	DSM 1 427	1,2
SC-372	DSM 1 428	2,3

10.

Ejemplo 2

A Mutación

15. Partiendo de la cepa Chol 73 se aislaron según el método de mutación y selección ya detalladamente descrito la mutante Chol 73-M 11.

B Obtención de mutantes con rendimientos de BNC incrementados

1. Tratamiento de mutación mediante radiación ultravioleta:

20. Para elevar los rendimientos de BNC se somete la cepa de mutantes Col 73-M 11 a un nuevo tratamiento de mutación. La cepa se multiplica primeramente en la siguiente solución nutritiva a 30°C en la máquina vibradora (solución nutritiva A): 0,8 % de peptona, 0,9 % de extracto de levadura, 0,3 % de glucosa, 0,06 % de Tween 80, 0,06 % de colesteroína, p_H 7,2.

25. Después de alcanzarse la fase crecimiento logarítmica se separan las células por centrifugación, se lavan dos veces con tampón de PO₄ 0,1 molar esterilizado (p_H 6,5), se vuelven a suspender en el mismo tampón y bajo el microscopio se ajusta la densidad de células a 10⁸ células/cc. 8 cc de ésta suspensión de células se trasladan a un cuenco de Petri y se irradian durante 30. durante 90 segundos bajo la lámpara ultravioleta (separación 30 m,

lámpara de irradiación UV de la firma Schütt Jun., Göttingen).

C Selección y aislamiento de las cepas de mutantes deseadas

1. Enriquecimiento de las cepas con inhibición reducida del producto final:

5. La suspensión de células irradiadas con UV se cultiva a continuación en el siguiente caldo nutriente: 0,05 % de NaH_2PO_4 , 0,20 % de K_2HPO_4 , 0,05 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 % de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,005 % de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,005 % de $(\text{Fe})_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,10 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,0001 % de Biotin, 0,10 % de BRIJ 34 (polioxietilenmonolauriléter), 0,50 % de clolesterina, 0,50 % de CNC, p_H 7,2. Después de una duración de incubación de 72 horas se traslada 1 cc de solución de cultivo a solución nutriente A fresca y nuevamente se cultiva aeróbicamente durante 48 horas a 30°C.
- 10.
15. 2. Método de penicilina:
- Para eliminar posibles revertantes se somete la solución de cultivo crecida a continuación a un tratamiento de penicilina. 0,1 cc de esta suspensión de células se trasladan a 10 cc de la siguiente solución nutriente: 0,05 % de NaH_2PO_4 , 0,20 % de K_2HPO_4 , 0,05 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 % de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,005 % de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,005 % de $(\text{Fe})_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,10 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,0001 % de Biotin, 0,10 % de BRIJ 35 (polioxietilenmonolauriléter), 0,10 % de BNC, p_H 7,2. Después de agitar durante 18 horas a 30°C se diluye con solución nutriente fresca, previamente calentada, de la misma composición, a aproximadamente 10^6 células por cc, se agregan 1000 UI de penicilina G y se sigue incubando durante 5 horas a 30°C. Después se retira el antibiótico mediante separación por centrifugación de las células y lavado con solución de sal común esterilizada, fisiológica, y las células se incuban en el medio arriba mencionado con
- 20.
- 25.
- 30.

1,0 % de colessterina en lugar de BNC, durante otras 48 horas. A continuación se coloca la suspensión de células sobre el mismo medio nutriente más 1,6 % de agar en placas y las colonias de sobre este medio de mayor concentración de sustrato muestran el mejor crecimiento se emplean como cultivos de cepas.

De esta manera se aislan las cepas que después de la incubación con colessterina dieron buenos rendimientos en BNC. Algunas de estas cepas se depositaron en la Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSM) en Göttingen.

10.	<u>Denominación interna</u>	<u>nº de depósito</u>	<u>Rendimientos de BNC</u>
	T 137	DSM 1 435	315 mg/100 cc
	T 139	DSM 1 437	305 mg/100 cc
	T 162	DSM 1 439	321 mg/100 cc
15.	T 166	DSM 1 442	308 mg/100 cc
	T 190	DSM 1 443	318 mg/100 cc
	T 191	DSM 1 444	392 mg/100 cc
	T 244	DSM 1 445	302 mg/100 cc

20. Ejemplo 3

A Rendimientos en BNC de las cepas de mutantes más activas

Las cepas se cultivaron aeróbicamente en el matraz de Erlenmeyer de 500 cc de capacidad con 100 cc de solución nutriente de la siguiente composición: 0,5 % de peptona, 0,8 % de extracto de levadura, 0,4 % de gluten de maíz, 0,3 % de glucosa, 0,05 % de Tween 80, 0,05 % de colessterina, p_H 7,2. El cultivo se cultivó previamente en la máquina agitadora (frecuencia de agitación 150 r.p.m.) a 30°C durante 48 horas, a continuación se agregaron un 0,2 % de emulsionante y 0,5 % de colessterina y se siguió incubando durante otras 120 horas. Des-

pués de interrumpir los cultivos se tomaron muestras que se ajustaron a un p_H 2,0, se extrajeron 1:1 con éster acético y se analizaron por cromatografía de capa delgada. Los rendimientos de las distintas cepas se han indicado en el ejemplo 2 en la tabla bajo C/2.

5.

Ejemplo 4

La acumulación de los metabolitos indeseados colest-4-en-3-on y colest-1,4-dien-3-ona del sustrato colesteroína por la cepa ATCC 3 185 se puede inhibir ampliamente si el sustrato a transformar se agrega en forma continua al preparado de reacción. Vale lo correspondiente para los demás sustratos de esterina.

10.

Dos fermentadores de un litro de capacidad conteniendo 400 cc de solución nutriente esterilizada (0,9 % de peptona, 0,9 % de agua de esponjamiento de maíz, 0,9 % de extracto de levadura, 0,5 % de K_2HPO_4 , 0,5 % de glicerina, 0,1 % de polipropilenglicol, p_H 6,5) se inyectan con 50 cc de un cultivo previo bien crecido de la cepa ATCC 3 185 que había sido incubada en un medio nutriente (0,9 % de peptona, 0,9 % de extracto de levadura, 0,5 % de glicerina, p_H 6,5) durante 48 horas a 30°C. Los fermentadores se agitaron a 30°C y se ventilaron con 500 cc de aire/minuto.

15.

20.

En un fermentador se introduce, después de incubar durante 24 horas, una emulsión de 5 g de colesteroína, 1 g de monostearato de sorbitano, 4 cc de polipropilenglicol y 4 cc de NaOH 1-n en 100 cc de H_2O a través de una bomba dosificadora. La bomba dosificadora conducía por hora 5 cc de suspensión de manera que la adición del sustrato se extendió desde la hora de fermentación 24 hasta la hora de fermentación 44. Después de 44 y 78 horas se tomaron del fermentador 100 cc de cal-

25.

30.

do de cultivo, después de acidificar con ácido sulfúrico y extraer con metilisobutilcetona se determinaron los productos de fermentación cuantitativamente mediante cromatografía de capa delgada.

5. En el preparado de control se introdujo la cantidad de sustrato total después de 24 horas en el fermentador.

Con la adición en forma continuada del sustrato se determinaron después de una duración de fermentación de 44 horas las siguientes cantidades: (mg/100 cc): coles-
10. tenona más colestadienona 40, ácido bisnorcolonónico 100; después de 78 horas de fermentación: coles-
terina 20, coles-
tenona más colestadienona 5, ácido bisnorcolonónico 260.

En la adición en tandas del sustrato se determinaron después de 44 horas de duración de la fermentación (mg/100 cc):
15. coles-
terina 100, coles-
tenona más colestadienona 240, ácido bis-
norcolonónico 80; después de 78 horas de fermentación: coles-
terina 40, coles-
tenona 100, ácido bisnorcolonónico 180.

Ejemplo 5

Tratamiento de mutación con metansulfonato de etilo:

20. La cepa SC 104 se cultiva en una solución nutriente de 0,9 % de peptona más 0,9 % de extracto de levadura y después de alcanzar la fase de crecimiento logarítmica se separa por cen-
trifugación, se lava dos veces con tampón de fosfato esteriliza-
do (0,5 molar, p_H 7,5) y se vuelve a suspender en el mismo tam-
pón de manera que la densidad de células ascienda a 10⁸ células/
25. cc. A la suspensión de células se agrega el metansulfonato de
etilo de manera que la concentración de la sustancia mutágena
sea de 0,1 molar. El preparado se agita durante 2 horas a tem-
peratura ambiente, a continuación se separan las células por cen-
trifugación, se lava dos veces con tampón de fosfato y a conti-
30. nuación se vuelven a suspender en solución nutriente fresca y

se incubaba.

Ejemplo 6

Obtención de la mutante CBS 437.77 o bien ATCC 31 385 de la cepa salvaje Chol 73 (CBS 660.77 o bien ATCC 31 384).

5. A) Numerosos microorganismos degradadores de esterina se aislaron de muestra de tierra según los métodos de enriquecimiento usuales. Entre estas cepas se buscaron a continuación por incubación con colessterina marcada 4-14 C y 26-14 C microorganismos que degradan las esterinas preferentemente por el lado de las cadenas laterales. Aquí demostró la cepa Chol 73 con 26-14 C-colessterina las máximas proporciones de degradación y demostró ser así especialmente adecuada para la selección de los mutantes defectuosos de degradación.

15. El método descrito a continuación del aislamiento de los mutantes no solo se puede emplear para la presente cepa Chol 73 perteneciente al grupo de las bacterias corineformes, sino también para cualquier otra especie.

20. La mutación de la cepa Chol 73 se efectuó por tratamiento con 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina. Las células se cultivaron durante 48 horas a 30°C en medio A.

Medio A: 1,0 % de extracto de levadura
1,0 % de peptona
0,5 % de glucosa

pH 7,5.

25. El cultivo de células con un título de células de 2×10^8 células/cc se trató durante 1 hora a 30°C con el compuesto mutágeno (1 mg/cc), a continuación se lavó y se cultivó durante otros 3 días en medio nutriente B hasta un título de células 10^9 células/cc.

- Medio B: 0,05 % de dihidrogenofosfato sódico
0,20 % de dihidrogenofosfato dipotásico
0,05 % de sulfato de magnesio x 7 H₂O
0,02 % de cloruro de calcio x 2 H₂O
5. 0,005 % de sulfato de manganeso x 4 H₂O
0,005 % de sulfato de hierro II x 7 H₂O
0,10 % de sulfato amónico
0,0001 % de D-biotina.
10. B) 0,1 cc de esta solución de cultivo así obtenida se trasladó a 10 cc de medio nutriente B con adición de 0,1 % de polioxi-
metilmonolauriléter y 0,1 % de ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-
carboxílico y se incubó durante 36 horas a 30°C. Para formentar
los mutantes con defectos en el sistema degradador del anillo
se diluyó con medio nutriente fresco, previamente calentado, de
15. la misma composición, a 10⁶ células/cc, se agregaron 1000 UI
de penicilina G/cc y se incubó durante otras 24 horas a 30°C.
Después se lavaron las células se aplicaron sobre placas de
agar con medio nutriente B más un 2 % de agar y 0,5 % de glice-
rina. Después de multiplicarse las células a colonias grandes
20. visibles se estampó con la técnica de estampación de Replica
sobre agar nutriente B más un 0,1 % de polioxietilenmonolauril-
éter y 0,1 % de ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico y
se incubó de nuevo. Dentro del marco de este tamizado se aisla-
ron más de 50 colonias de mutantes que, después de estampar so-
25. bre terreno nutriente conteniendo esteroide ya no crecieron más.
- Para la selección de los mutantes más interesantes se
inyectaron las cepas con 2 cc de solución nutriente A, se incubó
durante 24 horas a 30°C, después se mezcló adicionalmente con
un 0,2 % de polioxietilenmonolauriléter y 0,2 % de colessterina y
30. después de otras 72 horas se analizó la solución de cultivo. El

5. contenido de los tubitos se agitó en cada caso con 0,5 cc de metilisobutilcetona, se centrifugó, se aplicaron cantidades alicuotas de la fase orgánica sobre placas de gel de sílice de Merck y se reveló en la mezcla de eluyente benceno-acetato de etilo (70 + 30). La demostración de los esteroides sobre la placa de cromatografía se realizó por pulverización con la mezcla de H₂SO₄ concentrado + etanol (1 + 1) y calentamiento a continuación a 120°C. Aquí se apreció la cepa de CBS 437.77 o bien ATCC 31 385 como mutante que posee un bloque en la degradación del sistema de anillo de la esterina.
- 10.

Ejemplo 7

15. Para la comprobación más exacta de la transformación de esterina por el corynebacterium CBS 437.77 o bien ATCC 31 385 se cultivó previamente la cepa en un preparado de matraz de agitación con 100 cc de solución nutriente A a 30°C y una frecuencia de agitación de 150 r.p.m. durante 24 horas. Después se agregaron un 0,1 % de solución de colessterina y en distintos periodos de tiempo se tomaron muestra que se analizaron.

20. 20 cc de la solución de cultivo se ajustaron con ácido sulfúrico 2-n a un p_H 2,0 y el perforador se extrajo durante 3 horas con metilisobutilcetona, éster acético, n-hexanol, n-octanol, cloroformo o n-hexano. Cantidades alicuotas de la fase orgánica se aplicaron sobre placas de gel de sílice de Merck y se revelaron en la mezcla de eluyente tolueno-butanona (80 + 20).
25. La evaluación de la cromatografía se efectuó en un scanner de capa delgada a 250 nm. Como componente principal de la transformación de colessterina se hallaron 50 mg de ácido 3-oxo-pregna -1,4-dien-20-carboxílico junto con reducidas cantidades de androst-4-en-3,17-diona y androst-1,4-dien-3,17-diona.

30. Ejemplo 8

Ejemplo 8

5. Para la ulterior comprobación de la transformación de esterina por el corynebacterium spec. CBS 437.77 o bien ATCC 31385 se cultivó previamente la cepa en un preparado en matraz agitador con 100 cc de solución nutriente A a 30°C y una frecuencia de agitación de 150 r.p.m. durante 24 horas. Después se agregaron un 0,1 % de monooleato de polioxietilensorbitano y un 0,1 % de solución sitosterina y en distintos periodos de tiempo se tomaron muestras que se analizaron.

10. 20 cc de solución de cultivo se ajustaron con ácido sulfúrico 2-n a un p_H 2,0 y en el perforador se extrajo durante 3 horas con acetato de etilo. Cantidades alicuotas de la fase orgánica se aplicaron sobre placas de gel de sílice de Merck y se revelaron en la mezcla de eluyente polueno-butanona (80 + 15. 20). La evaluación de la cromatografía se efectuó en un scanner de capa delgada a 250 nm. Aquí se demostró la formación de 20-carboxi-pregna-1,4-dien-3-ona y 20-carboxi-pregna-4-en-3-ona junto con reducidas cantidades de androst-4-en-3,17-diona y androst-1,4-dien-3,17-diona.

20. Ejemplo 9

La solución de cultivo del ejemplo 7 se concentró en el evaporador rotativo a 1/4 de su volumen inicial, se ajustó con NaOH a un p_H 13 y se mezcló con tres veces su volumen de metanol y la masa de células se separó a continuación por cen- 25. trifugación. La solución de cultivo libre de células se pasó a través de una columna intercambiadora de aniones en forma de acetato y eluyendo con metanol se separaron primeramente la androst-4-en-3,17-diona, androst-1,4-dien-3,17-diona y huellas de colesteno. La 20-carboxi-pregna-4-en-3-ona y 20-carboxi- 30. prena-1,4-dien-3-ona se separaron a continuación del intercam-

biador de iones con ácido acético al 10 % y se enriquecieron. El eluado enriquecido se evaporó hasta sequedad, se recogió con amoníaco al 5 % bajo ligero calentamiento, se enfrió a 4°C y los productos precipitados se separaron por filtración. Mediante solubilización, extracción en éter y recristalización en benceno repetida se pudo purificar ampliamente el ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico.

- 5.
10. Describa suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

5 1.- Procedimiento para la obtención de compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico por disociación de la cadena lateral microbial en sustratos de esteroides de cadenas laterales 17-C, caracterizado porque a) mutantes de bloque de defecto de microorganismos, que también bajo ausencia de los inhibidores de la degradación del anillo esteroide y/o inhibidores del crecimiento suministran compuestos esteroides con el resto del ácido 17-C- α -propiónico, se cultivan en un medio nutriente acuoso bajo condiciones aeróbicas en presencia del sustrato de esteroide bajo enriquecimiento de los compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico en el caldo de fermentación y b) los compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico formados se aíslan.

15 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque para la obtención de ácido 3-oxo-pregna-4-en-20-carboxílico (Δ -4 BNC) y/o ácido 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico (Δ -1,4 BNC) a) un microorganismo suministrador, también bajo ausencia de inhibidores para la inhibición de la degradación del anillo esteroide y/o del crecimiento de Δ -4 BNC y/o Δ -1,4 BNC en un rendimiento de como mínimo un 15% en peso, referido al sustrato de esteroide empleado, se cultiva en un medio nutriente acuoso bajo condiciones aeróbicas y en presencia de un sustrato de esteroide de cadena lateral 17-C bajo enriquecimiento de ácido 3-oxo-pregna-4-en-20-carboxílico y/o 3-oxo-pregna-1,4-dien-20-carboxílico y b) a continuación se aísla el ácido 3-oxo-pregna-4-en-20-carboxílico y/o ácido 3-oxo-1,4-dien-20-carboxílico formado.

30 3.- Procedimiento según la reivindicaciones 1 ó 2,

caracterizado porque se trabaja con mutante de bloque de defecto como microorganismos que se han cultivado por mutación y selección a continuación de aquellas cepas salvajes seleccionadas que son capaces de crecer sobre compuestos esteroides con cadenas laterales 17-C como, preferentemente, única fuente de carbono, como mínimo con velocidad de degradación aproximadamente igual para la cadena lateral como para la parte de anillo de los compuestos esteroides, pero que, preferentemente, sin embargo, tienen una velocidad de degradación de cadena lateral mas elevada.

4.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 hasta 3, caracterizado porque los mutantes de bloque empleados se han cultivado de cepas salvajes que, en el crecimiento sobre compuestos esteroides, dan un rendimiento de degradación selectivo bajo condiciones standard según la fórmula general

$$I = a \cdot 10^b$$

donde a es el factor de crecimiento y b el factor de selectividad del crecimiento de la cepa salvaje y el índice de selectividad I muestra el valor numeral de como mínimo 10, preferentemente de como mínimo 100.

5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el índice de selectividad I de la cepa salvaje asciende como mínimo a 10^5 .

6.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 hasta 5, caracterizado porque el factor de selectividad b de la cepa salvaje empleada para el cultivo de los mutantes de bloque asciende como mínimo a 2, y el factor de crecimiento a preferentemente a 0,2, en especial asimismo a como mínimo 1.

5. 7.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 hasta 6, caracterizado porque el cultivo de las cepas salvajes para la selección a continuación según su índice de selectividad I se ha efectuado sobre un compuesto de esteroide de cadena lateral 17-C de aquella clase, como fuente de carbono, que se emplea en el procedimiento principal como material de utilización, siendo preferentemente este compuesto esteroide la única fuente de carbono empleada para el cultivo de las cepas salvajes.

10. 8.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 hasta 7, caracterizado porque se trabaja con aquellos mutantes de bloque de defecto que en el cultivo de la población de mutantes de una mutación conocida de las cepas salvajes seleccionadas no crecen o prácticamente no crecen sobre un medio de separación de mutantes, mientras las cepas de mutantes acompañantes indeseadas crecen y de esta manera o bien durante su crecimiento han sido matados.

15. 9.- Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque como medio de separación de los mutantes se ha empleado un medio nutriente acuoso que, como fuente de carbono, contiene un compuesto esteroide con una cadena lateral 17-C con hasta 5 átomos de carbono o en la posición 17-C tampoco contiene una cadena lateral, habiéndose empleado, sin embargo, preferentemente un compuesto esteroide con 3 átomos de carbono en la cadena lateral 17-C.

20. 10.- Procedimiento según las reivindicaciones 8 y 9, caracterizado porque en el medio de separación de mutantes como fuente de carbono se ha empleado como mínimo un compuesto de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico y éste se emplea aquí preferentemente como única fuente de carbono del medio de separación.

30.

5. 11.- Procedimiento según las reivindicaciones 8 hasta 10, caracterizado porque el (los) compuesto(s) de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico deseado(s) como producto del procedimiento se han empleado como única fuente de carbono en el medio de separación de los mutantes.

10. 12.- Procedimiento según las reivindicaciones 8 hasta 11, caracterizado porque las cepas que crecen en el medio de separación de los mutantes se han matado en presencia de mutantes de bloque de defecto no crecientes y sin dañarles, por ejemplo, por adición de antibióticos o bajo el empleo de p^{32} .

15. 13.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 hasta 12, caracterizado porque se trabaja bajo ausencia de α, α' -dipiridilo o 8-hidroxiquinolina y, preferentemente, también bajo ausencia de otros inhibidores que inhiben el crecimiento y/o la degradación del anillo esteroide.

20. 14.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 hasta 13, caracterizado porque se trabaja con mutantes de bloque de defecto que en el ensayo standard libre de inhibidor suministran un rendimiento de $\Delta-4$ BNC y/o $\Delta-1,4$ BNC sobre co- lesterina o sitosterina de como mínimo un 30 % en peso y prefe- rentemente sobre co- lesterina de como mínimo un 50 % en peso, referido al compuesto esteroide empleado.

25. 15.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 hasta 14, caracterizado porque se trabaja con mutantes de bloque de achromobacter, arthrobacter, bacillus, brevibacterium, ciry- nebacterium, flavobacterium, microbacterium, mycobacterium, nocardiam protaminobacterium, serratia o streptomyces.

30. 16.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 hasta 15, caracterizado porque se trabaja con una mutante de blo-

que de defecto de la cepa salvaje Chol. spec. (CBS 660.77 o bien ATCC 31384).

5 17.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 hasta 16, caracterizado porque se trabaja con la mutante de bloque Chol. spec. 73-M11 (CBS 437.77 o bien ATCC 31385).

10 18.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 hasta 17, caracterizado porque se trabaja con compuestos esteroide con cadenas 17-C-laterales saturadas y/o insaturadas y, preferentemente, con hasta 10 átomos de carbono, especialmente 8 hasta 10 átomos de carbono.

15 19.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 hasta 18, caracterizado porque se trabaja con esterinas de origen animal y/o vegetal, especialmente con colesteroína, sitosterina, estigmasterina, campesterina y/o ergosterina o sus derivados, tales como colestenoína, sitostenona o estigmastenoína.

20 20.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 hasta 19, caracterizado porque el sustrato de esteroide a transformar se agrega a la zona de reacción como mínimo en forma ampliamente continua.

20 21.- Procedimiento para la obtención de compuestos de ácido 17-C-esteroide- α -propiónico, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

Esta Memoria consta de 49 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 12 SET. 1979

HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF
AKTIEN.

J. M. GOMEZ ACEBO Y ROMERO
p. p. Firmado: Alejandro Calle López