

Umwandlung von Naturstoffen durch mikrobielle Enzyme [*]

VON PROF. DR. CH. TAMM

INSTITUT FÜR ORGANISCHE CHEMIE DER UNIVERSITÄT BASEL

Mikroorganismen können mit den von ihnen gebildeten Enzymen viele Reaktionen katalysieren, die im Laboratorium schwierig sind oder nur über viele Stufen gelingen. Sie setzen dabei auch solche Stoffe um, die ihnen normalerweise fremd sind. Besonders vorteilhaft ist die häufig hohe Stereospezifität mikrobiologischer Reaktionen. Die wichtigsten Reaktionstypen sind: Hydroxylierungen, Dehydrierungen (Oxydationen) und Hydrierungen (Reduktionen). Hinzu kommen Spaltungen von Ester- und C–C-Bindungen und bei Glykosiden Transglykosidierungen. Die Vielfalt der umgesetzten Stoffklassen ist außerordentlich groß.

1. Einleitung
2. Methodik
3. Steroide
 - a) Hormone der Androstan- und Pregnan-Reihe
 - b) Östrogene Hormone
 - c) Gallensäuren
 - d) Cardenolide und Bufadienolide
4. Terpene
5. Phenole
6. Kohlenhydrate
7. Antibiotika
8. Alkaloide
9. Natur der Enzyme. Reaktionsmechanismen
 - a) Hydroxysteroid-Dehydrogenasen
 - b) Δ -Dehydrogenasen und Δ -Reduktasen
 - c) Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase
 - d) Hydroxylasen
10. Schlußbemerkung

1. Einleitung

Die Mikroorganismen scheinen ihre Armut an äußeren Formen, ein Merkmal, das sie von morphologisch differenzierten höheren Pflanzen unterscheidet, durch einen differenzierten inneren Chemismus zu kompensieren. Ihre Stoffwechselprodukte (Metabolite) umfassen das ganze Spektrum chemischer Strukturen, wobei es sich um sehr einfache, aber auch um äußerst komplizierte Verbindungen handeln kann. Die vielen in den letzten beiden Jahrzehnten entdeckten Antibiotika illustrieren dies in eindrucklichster Weise. Die Erforschung der Pilzmetabolite hat nicht nur zur Entdeckung interessanter biologischer Wirkungen geführt, welche die therapeutischen Möglichkeiten der Medizin revolutioniert haben, sondern auch neuartige und bemerkenswerte chemische Strukturtypen erschlossen.

Neben den niedermolekularen Stoffwechselprodukten bilden die Mikroorganismen auch sehr aktive Enzym-

systeme, welche chemische Reaktionen an artfremden Stoffen zu katalysieren vermögen, wenn man solche Stoffe z. B. zu einer Kulturlösung gibt, in welcher der Organismus gezüchtet wird. In der Regel sind diese Stoffe für das Wachstum des Mikroorganismus nicht lebenswichtig, da ihm in der Nährflüssigkeit genügend andere Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zur Verfügung stehen. Die mikrobiellen Enzyme übernehmen vielmehr die Rolle chemischer Reagentien, die sich durch eine hohe Selektivität und Stereospezifität auszeichnen. Mikroorganismen sind dadurch häufig in der Lage, Reaktionen in einem einzigen Schritt auszuführen, für die im Laboratorium viele komplizierte Stufen notwendig wären.

Am ältesten ist wohl die mikrobiologische Oxydation, wie sie schon seit Jahrhunderten zur Herstellung von Essig verwendet wird. Nicht minder ehrwürdig dürfte die Fabrikation von Bier sein, die ebenfalls auf einem fermentativen Vorgang beruht. Auch die älteren Methoden der Indigofärberei benutzen mikrobiologische Reaktionen. Die wissenschaftlichen Grundlagen dieser empirisch gefundenen Prozesse wurden erst vor etwa

[*] Erweiterte Fassung von Vorträgen in Braunschweig (1960), Berlin (1960) und Basel (1961).

100 Jahren durch *Pasteur* geschaffen, als er 1864 die Oxydation von Äthanol zu Essigsäure mit *Acetobacter acetii* untersuchte [1]. 40 Jahre später entdeckte *Schradinger* in der Hydrolyse der Stärke zu Dextrinen mit *Bacillus macerans* einen weiteren Reaktionstyp [2]. Mit Hefe ließen sich bald auch Reduktionen durchführen, z. B. von Chloral zu Trichloräthanol [3]. Bis in die Mitte der dreißiger Jahre waren mikrobiologische Reaktionen meist nur von akademischem Interesse. Dies änderte sich jedoch, als auf Grund der Untersuchungen von *Reichstein* gefunden wurde, daß sich die zur Vitamin-C-Synthese benötigte L-Sorbose aus Sorbit durch Oxydation mit *Acetobacter suboxydans* im industriellen Maßstab herstellen ließ [4]. Die Entdeckung des Penicillins, der Streptomycine und weiterer Antibiotika während und nach dem zweiten Weltkrieg führte zu einer ungeahnten Entwicklung der chemischen Mikrobiologie, sowohl in wissenschaftlicher wie auch in industrieller Hinsicht, die noch nicht abgeschlossen ist. Im Zuge dieser Forschungen wurden nicht nur neue Pilzmetabolite, sondern auch zahlreiche Reaktionen mit mikrobiellen Enzymen entdeckt. Sie sind in Tabelle 1 zusammengestellt [5].

Oxydation	Spaltung von Kohlenstoffbindungen
Reduktion	Decarboxylierung
Hydrolyse	Wasserabspaltung
Veresterung	Aminierung
Acylierung	Desaminierung
Transglykosidierung	Amidierung
Methylierung	Phosphorylierung
Kondensation	Halogenierung

Tabelle 1. Typen mikrobiologischer Reaktionen

2. Methodik

Die für die Umsetzungen benötigten Mikroorganismen können entweder selbst gezüchtet oder in der Regel auch von Sammlungen als Schrägagarkulturen bezogen werden. Am bekanntesten sind die „American Type Culture Collection“ (ATCC) in Washington, D. C., USA; das „Centraalbureau voor Schimmelcultures“ (CBS) in Baarn, Niederlande; und die „Agriculture Culture Collection, Northern Utilization Research and Development Division“ (NRRL) in Peoria, Illinois, USA.

Der Organismus wird in einem Medium meist unter aeroben Bedingungen kultiviert. Zu dieser Kultur gibt man steril eine Lösung oder Suspension des Substrats in einem mit Wasser mischbaren und für den Organismus nicht-toxischen Lösungsmittel (Aceton, Alkohol, Dioxan) und inkubiert mehrere Stunden oder Tage unter Belüftung durch Schütteln oder Rühren. Dann wird das Mycel abgetrennt (durch Nutschen, eventuell unter Zusatz von Kieselgur als Filtrierhilfe) und gründlich mit Alkohol oder Aceton gewaschen. Die Pro-

[1] *P. Pasteur*: Mémoire sur la Fermentation Acétique (1864).

[2] *F. Schradinger*, Z. Unters. Nahr. Genußm. 6, 865 (1903); Wiener klin. Wschr. 17, 207 (1904).

[3] *C. J. Lintner* u. *H. Lüers*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 72, 449 (1911).

[4] Vgl. *T. Reichstein* u. *A. Grüssner*, Helv. chim. Acta 17, 311 (1934).

[5] Vgl. *F. H. Stodola*: Chemical Transformations by Microorganisms. John Wiley & Sons, New York 1958, S. 38 ff., wo sich Beispiele für alle diese Typen finden.

dukte werden aus dem Kulturfiltrat mit einem organischen, mit Wasser nicht-mischbaren Lösungsmittel extrahiert, durch Säulenchromatographie oder Gegenstromverteilung getrennt, isoliert und charakterisiert. Für die Entdeckung und Verfolgung einer Umsetzung sind Papierchromatographie und Dünnschichtchromatographie unerläßliche Hilfsmittel. Bei Vorversuchen arbeitet man mit kleinen Substanzmengen, z. B. mit 3–5 mg Substrat und 20 ml Nährlösung in 100-ml-Erlenmeyerkolben, bevor man die Reaktion mit größeren Mengen, z. B. in Gärtanks in submerser Kultur, versucht (bei solchen Ansätzen können bis zu 1 g Substrat pro Liter Nährlösung eingesetzt werden). Die Übertragung einer Reaktion in größere Gefäße stellt oft zusätzliche Probleme, da sich die Wachstumsbedingungen für den Mikroorganismus stark ändern können. Aus Gründen, die noch besprochen werden, muß man immer noch mit ganzen, meist wachsenden Kulturen arbeiten; zellfreie Enzymlösungen können bisher nur in speziellen Fällen verwendet werden.

In Tabelle 2 sind einige Mikroorganismen genannt, die häufig verwendet werden.

Phycomycetes:

Cunninghamella, *Helicostylum*, *Mucor*, *Phycomyces*, *Rhizopus*.

Fungi imperfecti und *Ascomycetes*:

Alternaria, *Aspergillus*, *Calonectria*, *Cephalosporium*, *Cephalothecium*, *Curvularia*, *Didymella*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Neurospora*, *Ophiobolus*, *Penicillium*, *Pestalotia*, *Saccharomyces*, *Septomyxa*, *Trichothecium*

Basidiomycetes:

Lenzites

Strahlenpilze (*Actinomycetes*):

Nocardia, *Streptomyces*

Bakterien:

Bacillus, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*.

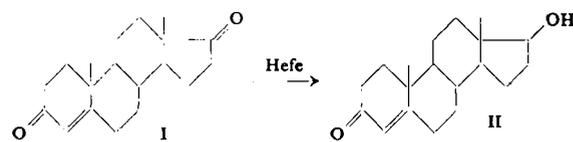
Tabelle 2. Häufig verwendete Mikroorganismen [6]

Die folgenden Ausführungen sollen zeigen, welche Möglichkeiten zur chemischen Umwandlung von Naturstoffen sich mit mikrobiellen Enzymen bieten. Dabei werden wir nicht eine lückenlose Aufzählung versuchen, sondern wir wollen einige Beispiele aus neuerer Zeit herausgreifen, welche die Vielfalt der Stoffe und Reaktionen illustrieren [7]. Die Frage nach der Art der Enzyme und Reaktionsmechanismen diskutieren wir am Ende des Artikels.

3. Steroide

a) Hormone der Androstan- und Pregnan-Reihe

Eine besonders große Bedeutung haben die mikrobiologischen Reaktionen auf dem Gebiet der Steroide erlangt, wo sie auch in technischen Verfahren benutzt werden. Die ersten Untersuchungen gehen hier auf die beiden Italiener *Mamoli* und *Vercellone* [8] zurück, die 1937 Δ^4 -Androsten-3,17-dion (I) durch selektive Reduktion der 17-Ketogruppe mit Hefe in das männliche Sexualhormon Testosteron (II) überführten.

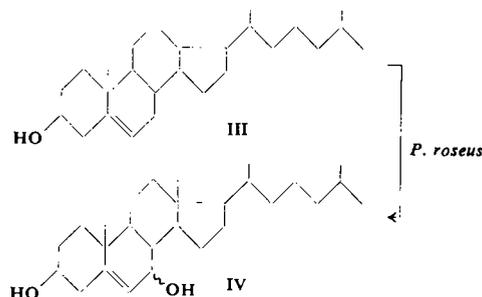


[6] Bei den Fungi kennt man etwa 40000 Species, bei den Bakterien etwa 2000 und bei den Hefen etwa 500.

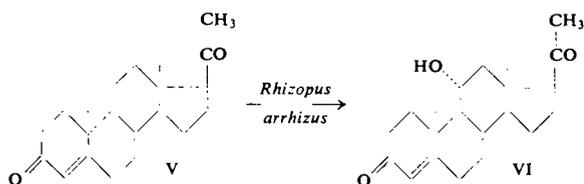
[7] Vgl. *Ch. Tamm*, Planta Medica 8, 331 (1960).

[8] *L. Mamoli* u. *A. Vercellone*, Ber. dtsh. chem. Ges. 70, 470 (1937).

Die erste mikrobiologische Oxydation eines Steroids beschrieben 11 Jahre später *Krámlí* und *Horváth* [9]. Sie erhielten mit Kulturen von *Proactinomyces roseus* aus Cholesterin (III) durch Oxydation des allylischen C-Atoms 7 ξ -Hydroxycholesterin (IV).



Diese und ähnliche Befunde fanden aber wenig Beachtung. Die Situation änderte sich jedoch schlagartig, als *Peterson* und *Murray* [10] 1952 in den USA fanden, daß Progesteron (V) durch Inkubation mit Kulturen von *Rhizopus*-Arten quantitativ in 11 α -Hydroxyprogesteron (VI) umgewandelt werden kann.



Das Interesse für Steroide, die an C-11 eine Sauerstoff-Funktion tragen, war durch die Entdeckung der klinischen Wirkungen von Cortison und Cortisol [*] bei der Behandlung der rheumatischen Arthritis von *Hench* und *Kendall* enorm gestiegen. Allein die Einführung dieser 11-Sauerstoff-Funktion hatte in den Partial- und Total-synthesen der Corticosteroide zahlreiche komplizierte chemische Operationen erfordert [10a], die jetzt durch eine einzige mikrobiologische ersetzt wurden. Dadurch konnten neue, billigere und leichter zugängliche Ausgangsmaterialien zur Herstellung dieser biologisch und medizinisch bedeutungsvollen Stoffe und ihrer Derivate nutzbar gemacht werden. In den folgenden Jahren wurde die mikrobiologische Umwandlung der Steroide auf breiter Basis erforscht, und zahlreiche neue enzymatische Reaktionen wurden entdeckt.

Die meisten Ergebnisse sind bereits in ausgezeichneten Übersichtsartikeln [7, 11–18] dargestellt worden, so daß

[9] A. *Krámlí* u. J. *Horváth*, *Nature* (London) 162, 619 (1948); 163, 219 (1949).

[10] D. H. *Peterson* u. H. C. *Murray*, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 1871 (1952).

[*] In der deutschen Literatur auch als Hydrocortison bezeichnet.

[10a] Übersicht: L. F. *Fieser* u. M. *Fieser*: *Steroide*. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1961, S. 693.

[11] J. *Fried*, R. W. *Thoma*, D. *Perlmann*, J. E. *Herz* u. A. *Bormann*, *Recent Progr. Hormone Res.* 11, 149 (1955).

[12] A. *Wettstein*, *Experientia* 11, 465 (1955).

[13] S. H. *Eppstein*, P. D. *Meister*, H. C. *Murray* u. D. W. *Peterson*, *Vitamins and Hormones* 14, 359 (1956).

[14] G. M. *Shull*, *Trans. N.Y. Acad. Sci., Ser. II*, 19, 147 (1956).

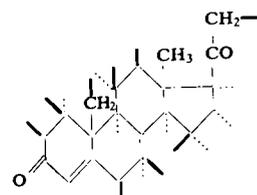
[15] P. *Talalay*, *Physiol. Rev.* 37, 362 (1957).

[16] E. *Vischer* u. A. *Wettstein*, *Angew. Chem.* 69, 456 (1957).

wir uns an dieser Stelle kurz fassen können und nur einige interessante Beobachtungen aus neuerer Zeit erwähnen wollen.

Die weitaus häufigste Reaktion ist die Oxygenierung, d.h. die Einführung eines Sauerstoffatoms am Steroid-Skelett, an den angulären Methylgruppen oder an der Seitenkette. Interessanterweise werden nicht nur aktivierte Kohlenstoffatome, wie bei den Δ^4 -3-Ketonen das allylische C-Atom 6, oder C-17 und C-21, sondern auch nicht-aktivierte primäre, sekundäre und tertiäre C-Atome angegriffen.

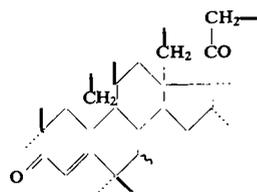
Für fast alle Stellungen der Steroidmolekel, nicht etwa nur für die biologisch bedeutsamen, kennt man heute hydroxylierende Enzyme. Einzig an C-4, C-8 und C-18 ist noch keine Hydroxylierung beobachtet worden. Lange war die 9 α -Hydroxylierung nicht eindeutig bewiesen. Als Alternative wurde die 8 β -Stellung in Erwägung gezogen. Spätere Untersuchungen [19–21] lieferten jedoch eindeutige chemische Beweise für die 9 α -Konfiguration der fraglichen OH-Gruppe. Eine Oxygenierung an C-3 und C-20 ist bisher nicht beobachtet worden, da alle Ausgangsstoffe an diesen C-Atomen bereits eine Sauerstoff-Funktion besaßen.



Oxygenierung durch mikrobielle Enzyme [21a]: 1 α , 2 β , 6 β , 7 α , 7 β , 9 α , 11 β , 12 β , 14 α , 15 α , 15 β , 16 α , 17 α , 19, 21.
19-nor-Steroide: 10 β

Cardenolide: 1 β , 5 β

Interessant ist der Vergleich mit Enzymen des Säugetierorganismus, für die z. B. auch die 18-Oxygenierung nachgewiesen worden ist.



Oxygenierung durch Enzyme von Säugetieren:

Nebennieren: 6 α , 6 β , 11 β , 16 α , 17 α , 18, 19, 21.

andere Gewebe: 2 α , 2 β , 6 α , 6 β , 7 ξ , 16 α , 21.

Die mikrobiellen Enzyme vermitteln gewöhnlich die Einführung eines Sauerstoffatoms, seltener die Ein-

[17] E. *Vischer* u. A. *Wettstein*, *Advances in Enzymol.* 20, 237 (1958).

[18] D. H. *Peterson*: *Steroid-Symposium des 4. Internat. Kongresses für Biochemie*, Wien, September 1958. Pergamon Press, London 1959, Bd. 4, S. 83.

[19] S. H. *Eppstein*, P. D. *Meister*, D. H. *Peterson*, H. C. *Murray*, H. M. *Leigh Osborn*, A. *Weintraub*, L. M. *Reinecke* u. R. C. *Meeks*, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 3382 (1958).

[20] R. M. *Dodson* u. R. D. *Muir*, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 6148 (1958); 83, 4631 (1961).

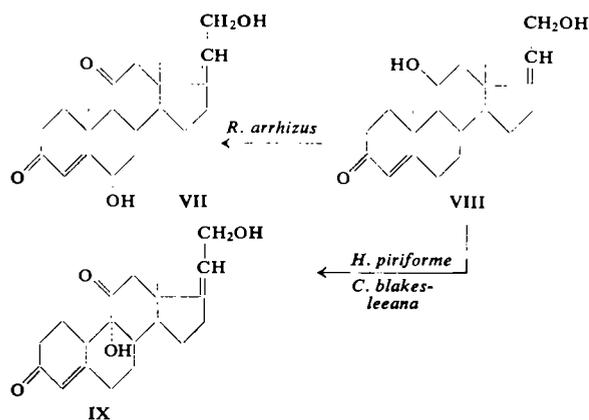
[21] A. *Schubert*, D. *Onken*, R. *Siebert* u. K. *Heller*, *Chem. Ber.* 91, 2549 (1958).

[21a] Eine 12 α -Hydroxylierung wurde bisher nur in der Patentliteratur bei einem Δ^9 -11-Steroid erwähnt (US-Pat. 2914543).

führung von zwei O-Atomen. Polyhydroxylierungen sind bisher nicht beobachtet worden. Je mehr Hydroxyle das Substrat schon enthält, d. h. je hydrophiler sein Charakter ist, desto schlechter läßt es sich in der Regel oxygenieren.

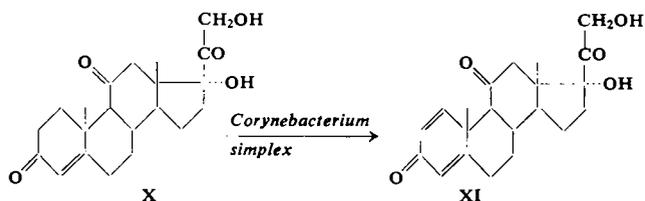
Besitzt das Ausgangsmaterial eine isolierte C=C-Doppelbindung, so können Organismen, welche in die hydrierte Verbindung eine axiale Hydroxygruppe einführen würden, an die Doppelbindung Sauerstoff anlagern unter Bildung eines Epoxyds (Epoxydierung).

Neben der eigentlichen Oxydation trifft man häufig auch die Dehydrierung an. Sie betrifft alkoholische Hydroxylgruppen (besonders an C-3 und C-17), welche in Keto-Gruppen übergehen. Diese Reaktion wird vorzugsweise durch bakterielle Enzyme katalysiert. Hanze et al. [22] beobachteten kürzlich am ungesättigten Pregnanderivat VIII eine Dehydrierung der 11 β -Hydroxylgruppe mit gleichzeitiger 6 β - und 9 α -Hydroxylierung durch *Rhizopus arrhizus* bzw. *Helicostylum piriforme* und *Cunninghamella blakesleeana*.



Einen weiteren Reaktionstyp stellt die Dehydrierung einer gesättigten Kohlenstoffkette unter Bildung einer olefinischen Doppelbindung dar. Besonders wichtig ist die Einführung der Δ^1 -Doppelbindung in das Steroidskelett geworden. So kann man in einer einzigen Reaktion z. B. mit *Corynebacterium simplex* Cortison (X) in Prednison (XI) überführen [23].

Bei diesen Dehydrierungen kann als Nebenreaktion die Spaltung einer C-C-Bindung auftreten, z. B. ein Abbau

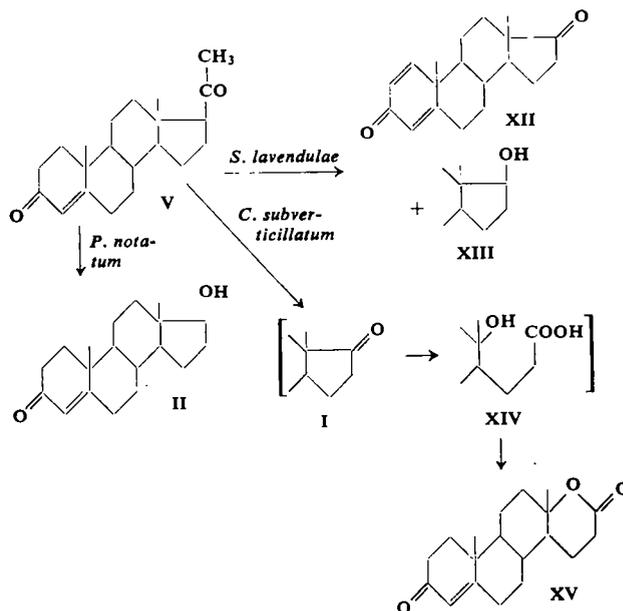


der Seitenkette in der Pregnanreihe unter Bildung von Androstan-Derivaten. Nach Inkubation von Progesteron (V) mit Kulturen von *Streptomyces lavendulae* entsteht via Δ^1 -Dehydroprogesteron ein Gemisch von

[22] A. R. Hanze, O. K. Sebek u. H. C. Murray, J. org. Chemistry 25, 1968 (1960).

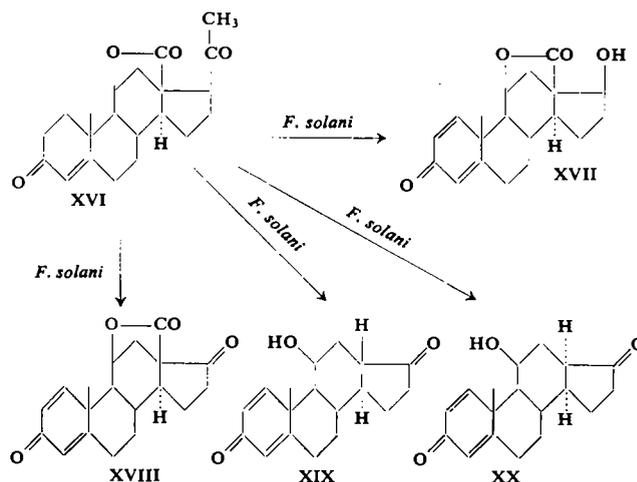
[23] A. Nobile, W. Charney, P. L. Perlman, H. L. Herzog, C. C. Payne, M. E. Jevnik u. E. B. Hershberg, J. Amer. chem. Soc. 77, 4184 (1955).

Δ^1 -Androstadien-3,17-dion (XII) und Δ^1 -Androstadien-3-on-17 β -ol (XIII) [24].



Mit *Penicillium notatum* liefert Progesteron (V) hingegen in guter Ausbeute Testosteron (II) [25], während mit *Cephalosporium subverticillatum* durch eine weitere oxydative Öffnung des Ringes D und Lactonisierung der intermediären δ -Hydroxy-carbonsäure (XIV) Testolacton (XV) entsteht [26].

Das Lacton der 11 β -Hydroxyprogesteron-18-säure (XVI) gab mit *Fusarium solani* die vier Produkte XVII, XVIII, XIX und XX [26a]. Alle haben eine Δ^1 -Doppelbindung erhalten und die Seitenkette verloren. Die 18-nor-Ketone XIX und XX dürften durch Decarboxylierung der dem Lacton XVIII zu Grunde liegenden β -Ketocarbonsäure entstanden sein. Ob das CO₂ enzymatisch oder spontan abgespalten wird, ist noch nicht geklärt. Jedenfalls sind die beiden 18-nor-Ketone durch diese mikrobielle Reaktion leichter zugänglich geworden.



[24] J. Fried, R. W. Thoma u. A. Klingsberg, J. Amer. chem. Soc. 75, 5764 (1953); G. E. Peterson, R. W. Thoma, D. Perlman u. J. Fried, J. Bacteriology 74, 684 (1957).

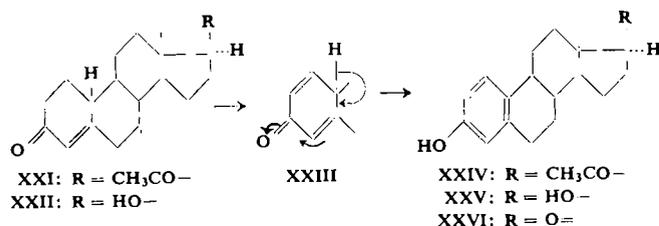
[25] O. Hanč, A. Capek, M. Tadra, K. Macek u. A. Simek, Arzneimittelforsch. 7, 175 (1957).

[26] A. Bodánszky, J. Kollonitsch u. G. Wix, Experientia 11, 384 (1955).

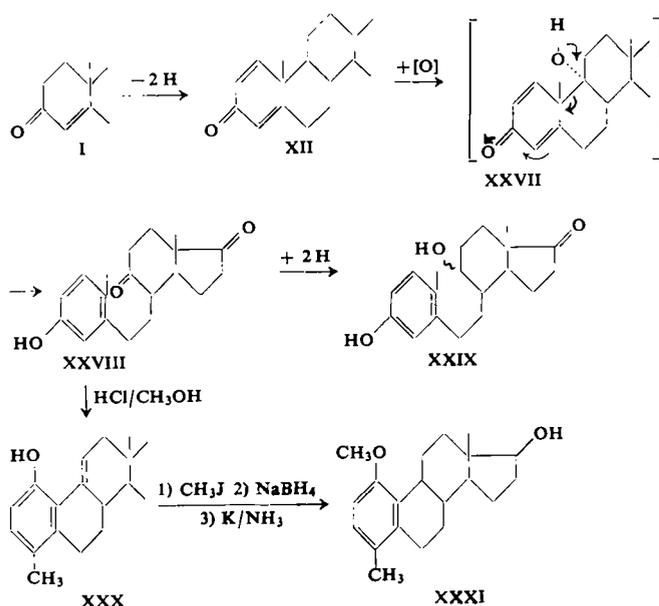
[26a] J. Urech, E. Vischer u. A. Wettstein, Mitt. Versammlung Schweiz. Chem. Ges., Sept. 1961.

Fonken et al. [27] konnten nach Inkubation von Progesteron (V) mit Kulturen von *Cladosporium resinae* Δ^4 -Androsten-3.17-dion (I), Testosteron (II) und, was besonders bemerkenswert ist, Testosteron-acetat isolieren. Wurde markiertes Progesteron-(21¹⁴C) eingesetzt, so befand sich nach der Umsetzung die gesamte Radioaktivität im Testosteron-acetat. Da Testosteron (II) selbst unter den gleichen Bedingungen durch den Organismus nicht acetyliert wird, scheint Testosteron-acetat nicht ein Acetylierungsprodukt von II, sondern ein Zwischenprodukt beim Abbau der Seitenkette von V zu sein. Es ist möglich, daß diese Reaktion eine enzymatische Parallele zum Abbau von 20-Ketosteroiden mit Persäuren darstellt (vgl. [24]).

Der Dehydrierung von 19-nor-Steroiden in 1-Stellung kann eine Aromatisierungsreaktion folgen, wie Bowers et al. [28] bei der Umsetzung von 19-nor-Progesteron (XXI) und Kushinsky [29] von 19-nor-Testosteron (XXII) mit *Corynebacterium simplex* feststellten. Es entstanden aus XXI das Analogon XXIV der östrogenen Hormone und aus XXII Östradiol (XXV) als Hauptprodukt und Östron (XXVI) als Nebenprodukt. Die $\Delta^{1,4}$ -Dien-3-on-Zwischenstufe, entsprechend XXIII, wurde nur bei der Aromatisierung von XXII in Spuren gefaßt. Analoge Resultate erzielten Peterson et al. [30] mit 2 α -Methyl- und 4-Methyl-19-nor-testosteron.



Nach der Inkubation von Δ^4 -Androsten-3.17-dion (I) mit einer *Pseudomonas*-Art isolierten Dodson und Muir



[27] G. G. Fonken, H. C. Murray u. L. M. Reineke, J. Amer. chem. Soc. 82, 5507 (1960).

[28] A. Bowers, C. Casas-Campillo u. C. Djerassi, Tetrahedron 2, 165 (1958).

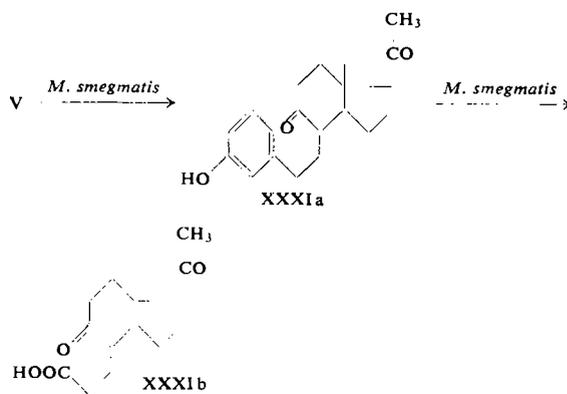
[29] S. Kushinsky, J. biol. Chemistry 230, 31 (1958).

[30] D. H. Peterson, L. M. Reineke, H. C. Murray u. O. K. Sebek, Chem. and Ind. 1301 (1960).

[31] das Scopphenol XXVIII, das durch eine ganze Sequenz von mikrobiologischen Reaktionstypen entstanden sein muß:

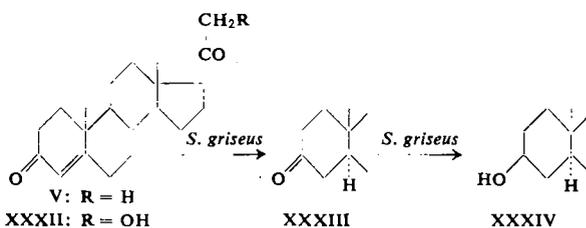
1. Dehydrierung an C-1, 2. Hydroxylierung an C-9 und
3. Retroaldolkondensation unter Öffnung von Ring B.

Mycobacterium smegmatis und einige andere Mycobakterien vermögen die gleiche Umwandlung zu bewirken. Neben XXVIII wurde noch das Hydroxysecofenol XXIX erhalten [32]. Zum Strukturbeweis wurde XXVIII mit Säure zu XXX cyclisiert und dieses nach Methylierung, NaBH₄-Reduktion der 17-Ketogruppe und Absättigung der $\Delta^{9,11}$ -Doppelbindung mit Kalium in flüssigem NH₃ in das bekannte 1-Methoxy-4-methyl-Derivat XXXI übergeführt [31]. Analoge chemische Retroaldolkondensationen von $\Delta^{1,4}$ -3-Ketonen sind bekannt; sie sind basenkatalysiert und verlaufen schon unter sehr milden Bedingungen. Die Umwandlung der Corticosteroide und der Androgene in Östrogene im tierischen Organismus dürfte nach der gleichen Reaktionsfolge ablaufen.



Bei der Inkubation von Progesteron (V) mit *M. smegmatis* konnten Schubert und Mitarb. [32a] neben dem Phenolketon XXXIa noch die Ketocarbonsäure XXXIb isolieren. Der aromatische Ring in XXXIa hat einen tiefgreifenden oxydativen Abbau erfahren.

Die bisher besprochenen Umwandlungen waren Oxydationen. Es gibt aber auch zahlreiche mikrobielle Enzyme, die Reduktionen, z. B. die Hydrierung von Carbonylgruppen oder die Sättigung von olefinischen Doppelbindungen in α,β -ungesättigten Ketonen katalysieren. Ein instruktives Beispiel ist die von Vischer und Wettstein [32b] quantitativ untersuchte Reduktion von Progesteron (V) und Cortexon (XXXII) durch *Streptomyces griseus*. Sie fanden, daß zuerst die C=C-Bindung (XXXIII) und dann erst die Carbonylgruppe (XXXIV) angegriffen wird. Mit einer anderen *Streptomyces*-Art ließ sich Prednison (XI) an der Δ^4 -Doppel-



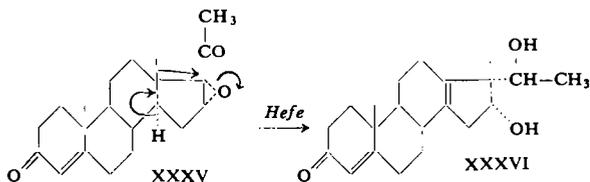
[31] R. M. Dodson u. D. Muir, J. Amer. chem. Soc. 80, 5004 (1958); 83, 4627 (1961).

[32] K. Schubert, K.-H. Böhme u. C. Hörhold, Z. Naturforsch. 15b, 584 (1960).

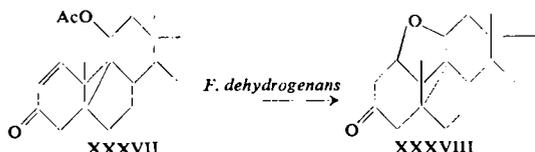
[32a] K. Schubert, K.-H. Böhme u. C. Hörhold, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 325, 260 (1961).

[32b] E. Vischer u. A. Wettstein, Experientia 16, 355 (1960).

bindung selektiv reduzieren [32c]. *Camerino* et al. [33] haben beim 16 α .17 α -Epoxy-20-keto-Steroid XXXV mit fermentierender Hefe eine selektive Hydrierung der 20-Ketogruppe beobachtet, der sich eine Retropinakolin-Umlagerung anschloß unter Bildung von XXXVI. Solche Wagner-Meerwein-Umlagerungen lassen sich auch chemisch mit Hilfe von Acylierungsmitteln und sauren Katalysatoren erzielen.



Bemerkenswert ist die Fähigkeit gewisser Mikroorganismen, Ester zu hydrolysieren, die chemisch schwer hydrolysierbar sind. So vermag das *Flavobacterium dehydrogenans* var. *hydrolyticum* nicht nur 21-Acetoxygruppen, was sehr häufig vorkommt, sondern auch 11 β -Acetoxygruppen zu verseifen [34]. Bei der Behandlung des 5,9-Cyclo-Steroids XXXVII mit diesem Organismus folgte der Abspaltung der Acetylgruppe an C-11 eine spontane Isomerisierung zum 1 β .11 β -Oxido-5,9-cyclo-Derivat XXXVIII [35].



In jüngster Zeit wurde zum ersten Male auch über die Esterbildung durch mikrobielle Enzyme berichtet. *McGuire* und Mitarb. [36] wiesen die Bildung von Testosteronacetat aus Δ^4 -Androsten-3,17-dion (I) durch die Hefe *Saccharomyces fragilis* nach. Eine selektive 21-Acetylierung beobachteten *Holmlund* et al. [37] bei 9 α -Fluoro-11 β -21-dihydroxy-16 α -17 α -isopropylendioxy- Δ^4 -pregnen-3,20-dion mit einem Stamm von *Trichoderma glauca*. Diese Reaktion scheint sehr substratspezifisch zu sein, denn sie trat nur bei Ausgangsmaterialien ein, die eine 16 α .17 α -Isopropylendioxy-Gruppierung besitzen.

b) Östrogene Hormone

Über die mikrobiologische Umwandlung von Steroiden die einen aromatischen Ring A besitzen, liegen nur wenige Untersuchungen vor. Sie stammen aus der jüngsten Zeit. Stämme von *Streptomyces halstedii* und *Streptomyces medicidicus* sind in der Lage, sowohl im Östron (XXXIX) als auch in

[32c] G. Greenspan, C. P. Schaffner, W. Charney, M. J. Gentles u. H. L. Herzog, J. org. Chemistry 26, 1676 (1961).

[33] B. Camerino u. R. Modelli, Gazz. chim. ital. 86, 1219 (1956); B. Camerino, R. Modelli u. C. Spalla, ibid. 86, 1226 (1956).

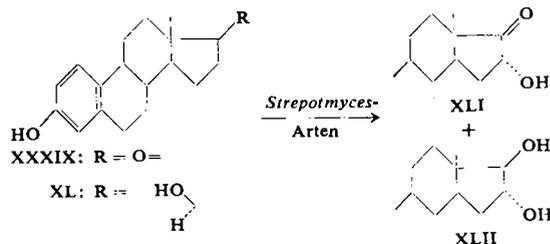
[34] W. Charney, L. Weber u. E. Oliveto, Arch. Biochem. Biophysics 79, 402 (1959).

[35] O. Gnoj, E. P. Oliveto, C. H. Robison u. D. H. R. Barton, Proc. chem. Soc. (London) 207 (1961).

[36] J. S. McGuire, E. S. Maxwell u. G. M. Tomkins, Biochim. biophysica Acta 45, 392 (1960).

[37] C. E. Holmlund, L. I. Feldman, N. E. Rigler, B. E. Nielsen u. R. H. Evans jr., J. Amer. chem. Soc. 83, 2586 (1961).

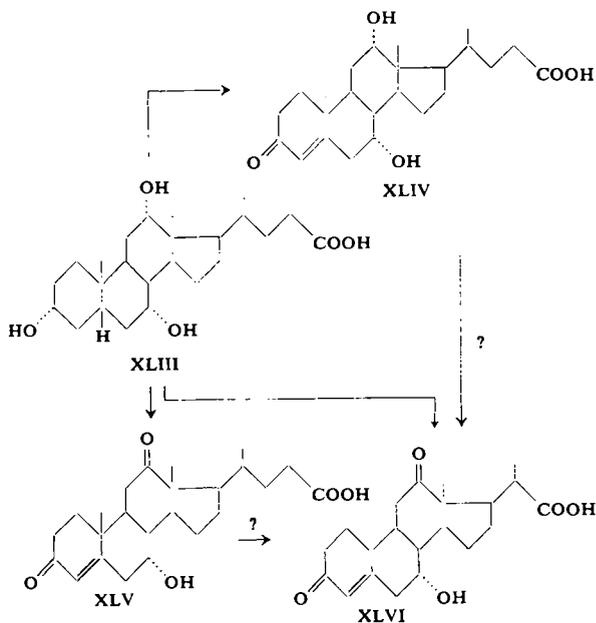
Östradiol (XL), eine 16 α -Hydroxygruppe einzuführen [38]. Beide Substrate wurden in 16 α -Hydroxy-östron (XLI) und Östriol (XLII) verwandelt. Zum Teil war eine zusätzliche



Hydrierung der 17-Ketogruppe bzw. Dehydrierung des 17 β -Hydroxyls eingetreten. Die 16 α -Hydroxylierung gelang auch mit *Streptomyces bikiniensis* [39], die Hydrierung und Dehydrierung der Sauerstofffunktion an C-17 mit Kulturen von *Rhizopus arrhizus* [40] und *Fusarium lini* [40].

c) Gallensäuren

Eine Sequenz von mikrobiellen Enzymen tritt bei der Inkubation der Cholsäure (XLIII) mit *Streptomyces gelaticus* 1164 in einem synthetischen Medium auf, in dem XLIII die einzige C-Quelle ist. Das Endprodukt ist nach *Hayakawa* et al. [41] die 7 α -Hydroxy-3,12-diketo- Δ^4 -bisnorcholensäure (XLVI). Bemerkenswert ist, daß der Seitenketten-Abbau, nach Entfernung von zwei C-Atomen stehen bleibt. Er tritt wahrscheinlich in einer späten Phase des gesamten Prozesses ein und benötigt vermutlich ein Substrat mit der Δ^4 -3-Keto-7 α -hydroxy-Gruppierung, denn unter geänderten Wachstumsbedingungen oder mit anderen *Streptomyces*-Arten blieb die Reaktion bei den Cholsäuren XLIV und XLV stehen. Die 7 α -Hydroxygruppe wird dabei nicht dehydriert.



d) Cardenolide und Bufadienolide

Während in den letzten acht Jahren die mikrobiologischen Umwandlungen vor allem von Steroiden der Androstan- und Pregnan-Reihe intensiv bearbeitet wor-

[38] D. A. Kita, J. L. Sardinas u. G. M. Shull, Nature (London) 190, 627 (1961).

[39] B. F. Stimmel, T. E. Bucknell u. V. Notchev, Fed. Proc. 115 (1960).

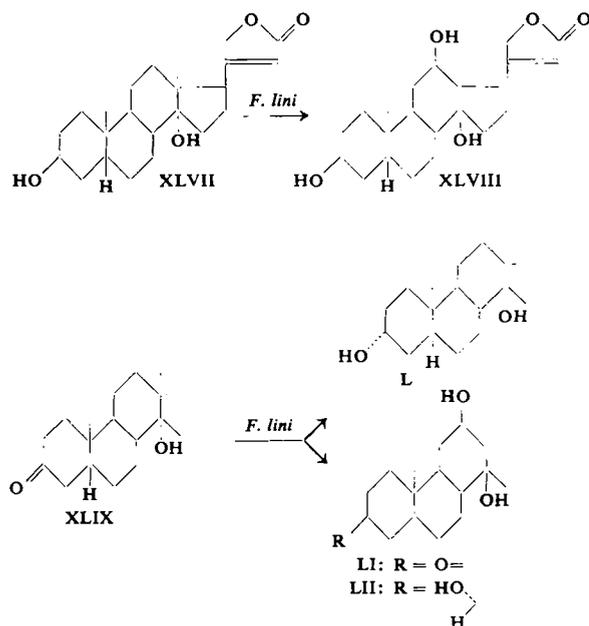
[40] Ch. Tamm u. W. Zürcher, unveröffentlicht.

[41] S. Hayakawa, T. Fuji, Y. Saburi u. T. Egudei, Nature (London) 179, 537 (1957). Dort auch ältere Literatur.

den sind, ist das Verhalten der strukturell nahe verwandten herzaktiven Glykoside und Aglykone gegenüber mikrobiellen Enzymssystemen nicht untersucht worden. Wir haben uns deshalb vor einiger Zeit die Aufgabe gestellt, einen Einblick in den Zusammenhang zwischen der Konstitution dieser anders gearteten Substrate und der Reaktionsfähigkeit der mikrobiellen Enzyme zu gewinnen. Die Struktur- und Stereospezifität der Enzyme in bezug auf Ausgangsstoffe und Produkte ermöglicht es gleichzeitig, zu neuen interessanten Cardenolid- und Bufadienolid-Derivaten zu gelangen, deren Herstellung auf rein chemischem Wege wegen der großen Empfindlichkeit dieser Verbindungen schwierig ist. Mikrobiologische Reaktionen sind auch zur Lösung von Konstitutionsproblemen von Nutzen.

Digitoxigenin (XLVII), ist der einfachste Vertreter der cardiotonisch wirksamen digitaloiden Lactone (Grundtyp der Cardenolide, Aglykon des Digitoxins und des Lanatosids A). Seine Umsetzung mit Kulturen von *Fusarium lini*, einem Organismus der bisher bei Steroiden nicht verwendet worden war, ergab als einziges Reaktionsprodukt in guter Ausbeute Digoxigenin (XLVIII). Es hatte somit eine 12 β -Hydroxylierung stattgefunden, wobei der gegenüber chemischen Reagentien empfindliche Butenolidring intakt geblieben war [42, 43].

Diese mikrobiologische Reaktion findet eine interessante Parallele in der von *Wright* [44] und *Repke* [45] beobachteten 12 β -Hydroxylierung von Digitoxigenin, Digitoxin und Gitoxin im menschlichen und tierischen Organismus. – Beim Formyl- und Acetyl-Derivat des Digitoxigenins fand neben der Hydroxylierung Spaltung der Esterbindung statt. Andere Species von Fusarien vermochten XLVII ebenfalls in 12-Stellung zu hydroxylieren [46]. Bei der Inkubation von 3-Dehydro-digitoxigenin (XLIX) als Ausgangsmaterial mit *F. lini* entstanden als Hauptprodukt 3-epi-Digitoxigenin (L) sowie 3-Dehydro-digoxigenin (LI) und 3-epi-Digoxigenin (LII) [42, 43].



[42] A. Gubler u. Ch. Tamm, *Helv. chim. Acta* 41, 297 (1958).

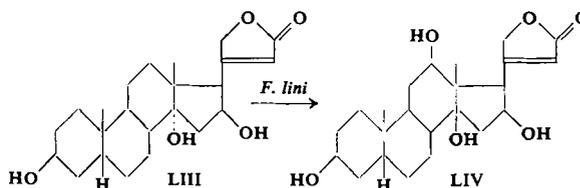
[43] Ch. Tamm u. A. Gubler, *Helv. chim. Acta* 42, 239 (1959).

[44] B. T. Brown, S. E. Wright u. G. T. Okita, *Nature* (London) 180, 607 (1957).

[45] K. Repke, *Naturwissenschaften* 45, 94, 366 (1958).

[46] Ch. Tamm, E. Weiss-Berg u. G. Juhasz, unveröffentlicht.

Die 12 β -Hydroxylierung von Digitoxigenin (XLII) und 3-Dehydro-digitoxigenin (XLIX) zeigt eine hohe Substratspezifität, denn nach systematischer Abwandlung des Substrats (Umkehrung von Asymmetriezentren, Entfernung oder Einführung von Substituenten, Hydrierung des Lactonrings, Einführung einer Δ^4 -3-Keton-Gruppierung) trat praktisch keine Veränderung mehr ein [43]. Einzig Gitoxigenin (LIII) ließ sich, wenn auch sehr schlecht, zu einem Monohydroxy-Derivat umsetzen, das sich mit Diginatigenin (LIV) (Aglykon von Diginatin und Lanatosid D) als identisch erwies [47]. Die Strukturformel von LIV war zu jenem Zeitpunkt noch unsi-



cher. Durch die Verknüpfung mit Gitoxigenin (LIII), einem Steroid bekannter Konstitution, waren für Diginatigenin (LIV) durch eine einzige mikrobiologische Reaktion das Grundskelett, der 17 β -ständige Butenolidring, die β -ständigen OH-Gruppen an C-3, C-14 und C-16 bewiesen und das 12 β -Hydroxyl sehr wahrscheinlich gemacht worden. Durch die Verknüpfung von LIV mit Digoxigenin (XLVIII) durch chemische Reaktionen wurde diese Annahme später bestätigt [48, 49].

Zur weiteren Überprüfung der Substratspezifität der Hydroxylase von *F. lini* wurden die Versuche auf die Bufadienolide (Krötengifte) ausgedehnt, in denen der an C-17 haftende Butenolidring durch den Hexadienolidring ersetzt ist. Bufalin (LV) lieferte ein unbekanntes Monohydroxylierungsprodukt [50]. Seine Konstitution als 12 β -Hydroxy-bufalin (LVI) ließ sich durch den oxydativen Abbau zum bekannten Ätiansäure-Derivat LVIII beweisen [50].

3-Dehydro-bufalin (LVII) ergab nur 3-Dehydro-12 β -hydroxy-bufalin (LX) und kein 3-epi-Bufalin (LIX) [50]. Zur selektiven chemischen Reduktion der 3-Ketogruppe in LVII bewährte sich $\text{LiAlH}[\text{OC}(\text{CH}_3)_3]_3$, das Reagens von H. C. Brown, nachdem NaBH_4 überraschenderweise erhebliche Mengen eines Nebenproduktes LXI geliefert hatte, in dem wider Erwarten der Lactonring reaktiv geöffnet worden war [51].

Wurden statt der Aglykone die Glykoside als Ausgangsmaterial verwendet, so war das Ergebnis enttäuschend. Es traten, wohl wegen des stark hydrophilen Charakters der Substrate, keine Oxygenierungen ein. In Acetylderivaten wurden lediglich Esterbindungen gespalten, in glucose-haltigen Glykosiden entständig β -glykosidisch gebundene D-Glucosereste entfernt, unabhängig davon ob sie mit einem weiteren Zucker oder direkt mit dem Aglykon verknüpft waren [43].

Mit diesen Untersuchungen sind in *F. lini* vier Enzymsysteme nachgewiesen worden: 1. eine Hydroxylase,

[47] Ch. Tamm u. A. Gubler, *Helv. chim. Acta* 41, 1762 (1958).

[48] H. Linde, J. E. Murphy u. K. Meyer, *Helv. chim. Acta* 42, 2040, 2753 (1959).

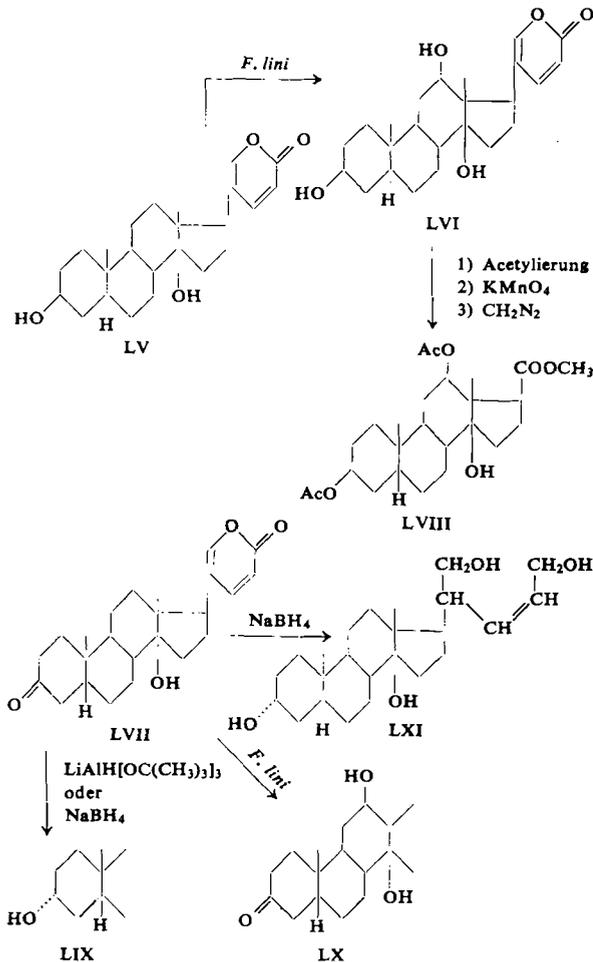
[49] M. Okada, A. Yamada u. M. Ishidate, *Chem. Pharm. Bull.* (Japan) 8, 535 (1960).

[50] Ch. Tamm u. A. Gubler, *Helv. chim. Acta* 42, 473 (1959).

[51] Ch. Tamm, *Helv. chim. Acta* 43, 338 (1960).

2. eine Hydrogenase, 3. eine Acylase und 4. eine β -Glucosidase.

Durch mikrobielle Enzyme bewirkte Glykosidspaltungen hatten schon früher *Stoll et al.* [52, 53] beobachtet. Insbesondere war ihnen die Herstellung von intaktem Scillarenin aus Proscillaridin A und Scillirosidin aus Scillirosid gelungen. Sie verwendeten einen adaptierten



Penicillium-Stamm, dessen Nährlösung Rhamnose bzw. Glucose als einzige Kohlenstoffquelle enthält. – Auch Saponine lassen sich enzymatisch in Aglykon und Zucker spalten. Beim Digitonin gelang die Hydrolyse mit einem bakteriellen Enzym [54] und beim Heconin mit Enzymen verschiedener Mikroorganismen [55].

Nachdem wir gefunden hatten, daß die Herzgifte durch *F. lini* in 12 β -Stellung oxygeniert werden, interessierte uns das Verhalten der gewöhnlichen Androstan- und Pregnan-Derivate gegenüber diesem Organismus. Das Resultat war überraschend: Statt der erwarteten 12 β -Hydroxylierung trat 15 α -Hydroxylierung ein [56]: Δ^4 -Androsten-3,17-dion (I) und Testosteron (II) ergaben die entsprechenden 15 α -Hydroxy-Derivate. Beim Progesteron (V) wurden neben der 15 α -Monohydroxylierung zu LXIII noch 6 β ,15 α -Dihydroxylierung zu LXV und

[52] A. Stoll, J. Renz u. A. Brack, *Helv. chim. Acta* 34, 397 (1951).

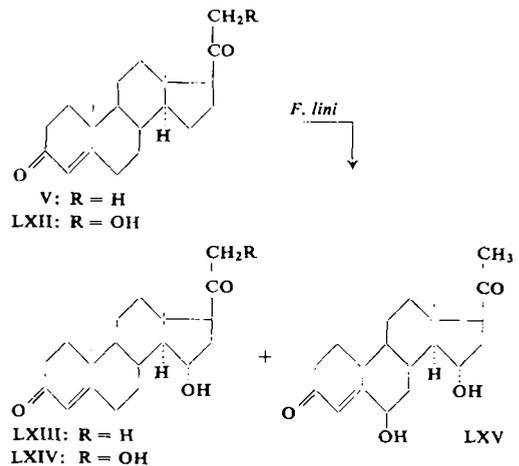
[53] A. Stoll, J. Renz u. A. Brack, *Helv. chim. Acta* 34, 2301 (1951).

[54] A. Schiesser, *Ricerca sci.* 22, 449 (1952); *Chem. Abstr.* 49, 4085 (1955).

[55] C. H. Hassall u. B. S. W. Smith, *Chem. and Ind.* 1570 (1957).

[56] A. Gubler u. Ch. Tamm, *Helv. chim. Acta* 41, 301 (1958).

Absättigung der Δ^4 -Doppelbindung gefunden. Cortexon (LXII) gab ausschließlich 15 α -Hydroxy-cortexon (LXIV).



Wie lassen sich diese Befunde erklären? Bildet der Mikroorganismus zwei spezifisch hydroxylierende Enzyme, eine 12 β - und eine 15 α -Hydroxylase, deren Wirkung durch die beiden Substrattypen angeregt wird? Oder handelt es sich nur um ein einziges relativ unspezifisches Enzym? Da hier ein grundsätzliches Problem der biologischen Oxydation angeschnitten worden war, unternahmen wir zu seiner Klärung einige quantitative Versuche [57].

Das erste Experiment ging von der Hypothese der Enzym-Induktion aus. In der Periode, in welcher die eine Hydroxylase durch den einen Substrattyp voll aktiviert ist, wird der zweite Substrattyp zugegeben und hierauf Ort und Geschwindigkeit der Hydroxylierung festgestellt. Es trat weder beim Digitoxigenin (XLVII) eine 15 α -Hydroxylierung (vgl. Abb. 1) noch beim Cortexon (LXII) eine 12 β -Hydroxylierung ein (vgl. Abb. 2). Die

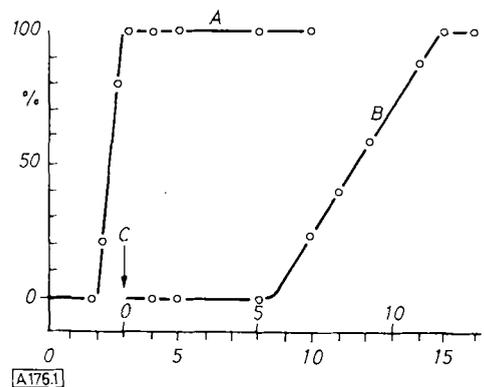


Abb. 1. Versuch zur Substratspezifität der Hydroxylase von *F. lini*. Inkubation mit Cortexon (LXII) und spätere Zugabe von Digitoxigenin (XLVII). – Kurve A.: Bildung von 15 α -Hydroxy-cortexon – Kurve B: Bildung von Digoxigenin (12 β -Hydroxylierung). – C: Zugabe von Digitoxigenin. – Ordinate: Ausbeute [%]. – Abszisse: Tage

Gegenwart von Cortexon (LXII) im Digitoxigenin-Ansatz beschleunigte sogar die normale 12 β -Hydroxylierung des Digitoxigenins (XLVII). Aus den Abb. 1 und 2 ist auch ersichtlich, daß die Reaktionsgeschwin-

[57] Ch. Tamm u. E. Weiss-Berg, unveröffentlicht.

digkeit in der Pregnan-Reihe (auch in der Androstan-Reihe) viel größer ist als beim Digitoxigenin (XLVII). Diese Feststellung gilt für alle von uns untersuchten Cardenolide und Bufadienolide.

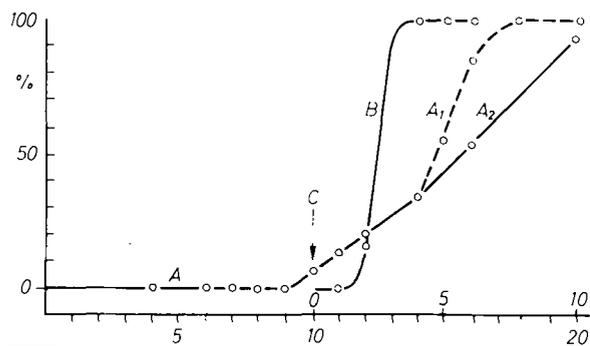


Abb. 2. Versuche zur Substratspezifität der Hydroxylase von *F. lini*. Inkubation mit Digitoxigenin (XLVII) und spätere Zugabe von Cortexon (LXII). — Kurve A: Bildung von Digoxigenin (12 β -Hydroxylierung). — A₁: in Gegenwart von Cortexon. — A₂: in Abwesenheit von Cortexon. — Kurve B: Bildung von 15 α -Hydroxy-Cortexon. — C: Zugabe von Cortexon. — Ordinate: Ausbeute [%]. — Abszisse: Tage

Im zweiten Experiment (vgl. Abb. 3) wurden Digitoxigenin und Cortexon gleichzeitig zur wachsenden Kultur des Organismus gegeben und mit entsprechenden Kontrollen verglichen. Bei XLVII wurde wieder die 12 β -Stellung und in LXII die 15 α -Stellung hydroxyliert. Das

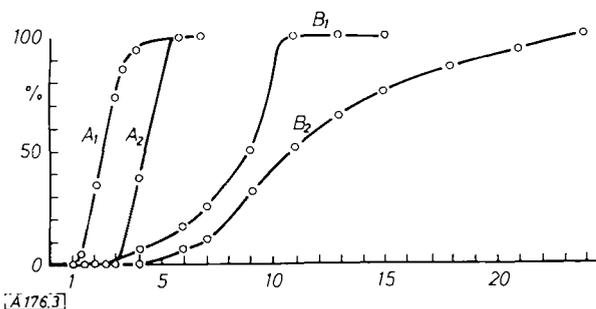


Abb. 3. Versuche zur Substratspezifität der Hydroxylase von *F. lini*. Digitoxigenin (XLVII) und Cortexon (LXII) zusammen inkubiert. — Kurven A: Bildung von 15 α -Hydroxy-Cortexon. — A₁: in Abwesenheit von Digitoxigenin. — A₂: in Gegenwart von Digitoxigenin. — Kurven B: Bildung von Digoxigenin (12 β -Hydroxylierung). — B₁: in Gegenwart von Cortexon. — B₂: in Abwesenheit von Cortexon. — Ordinate: Ausbeute [%]. — Abszisse: Tage

Einsetzen der Oxygenierung von Cortexon (Kurve A₁) wurde in Gegenwart von Digitoxigenin etwas verzögert (Kurve A₂). Die viel langsamere Reaktion von Digitoxigenin (Kurve B₂) erfuhr in Gegenwart von Cortexon eine merkliche Beschleunigung (Kurve B₁). Diese Versuche erlauben den Schluß, daß *F. lini* nur eine einzige Hydroxylase bildet. Der Ort des Angriffs dieses Enzyms wird offenbar durch die Stereochemie des Substrates kontrolliert. Dies wird beim Vergleich der Molekülmodelle der herzaktiven Aglykone (Ringe A und B sowie Ringe C und D cis-verknüpft) und der Hormone (Δ^4 -3-Keton, Ring C und D trans-verknüpft) deutlich (vgl. Abb. 4). Bei den letzteren ist das Steroidgerüst nahezu planar und gestreckt und die 15-Stellung, besonders das pseudoäquatoriale 15 α -H-Atom, sterisch kaum behin-

dert. Der Angriff des Enzyms auf die 15 α -Stellung begegnet keinen Schwierigkeiten. Quantitative Messungen haben gezeigt, daß diese Oxygenierung sehr rasch verläuft. Warum das Enzym ausgerechnet die 15-Stellung

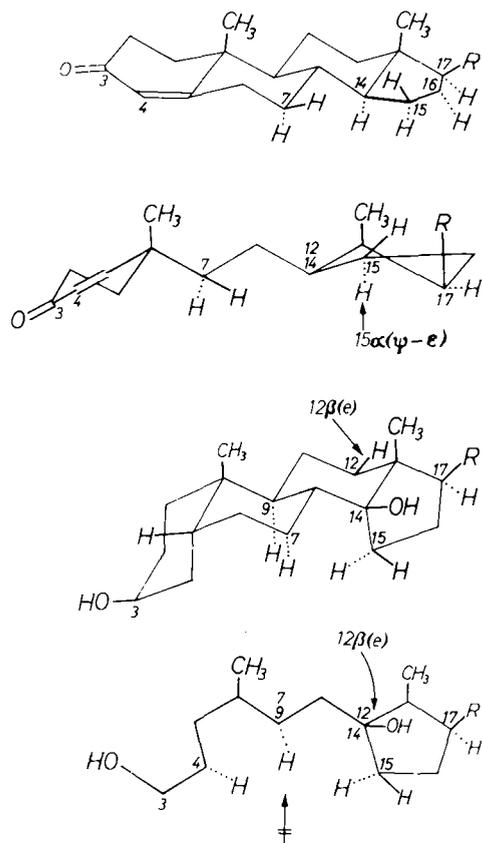


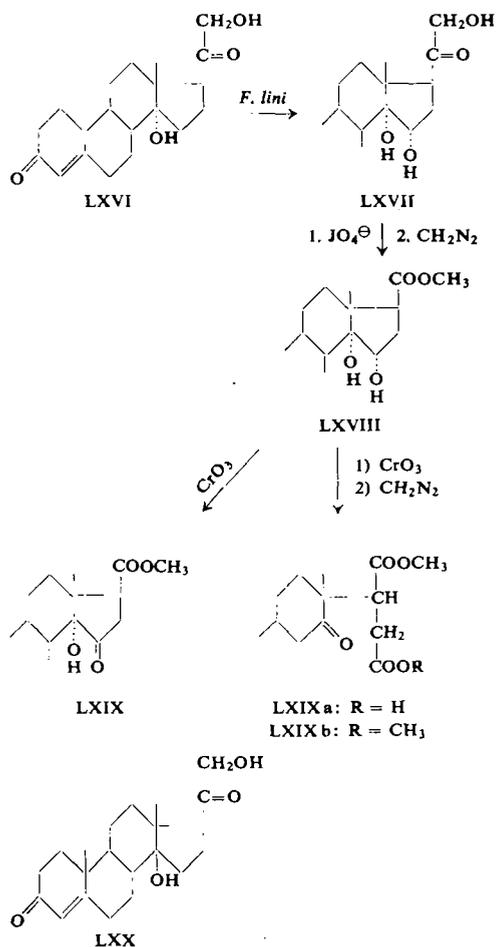
Abb. 4. Molekülmodelle der Corticoide (Δ^4 -3-Ketone; C/D-trans; obere Zeilen) und der herzaktiven Aglykone (A/B-cis; C/D-cis; untere Zeilen)

auswählt, kann allerdings nicht erklärt werden. Durch cis-Verknüpfung der Ringe A/B und C/D hingegen wird die Molekel beidseitig stark verbogen und dadurch die 15 α -Stellung, besonders durch die H-Atome in 4 α -, 7 α - und 9 α -Stellung, stark gehindert. Demgegenüber ist das äquatoriale 12 β -H-Atom sterisch kaum beeinflusst.

Entscheidend für den Ort der Hydroxylierung ist die Stereochemie des Ringgerüsts. Von einer gewissen, wenn auch untergeordneten Bedeutung ist die Raumerfüllung einer benachbarten OH-Gruppe an C-14. So verlief die Hydroxylierung von 14 α -Hydroxy-cortexon (LXVI) durch *F. lini* bereits viel langsamer als diejenige von Cortexon.

In dem aus LXVI erhaltenen Hydroxylierungsprodukt LXVII ist die eingeführte OH-Gruppe acetylierbar. Sie befindet sich in 15 α -Stellung, obwohl LXVII nur 1 Mol JO_4^- verbraucht. Es wird dabei einzig die Ketol-Seitenkette gespalten; die sekundär-tertiäre 14 α .15 α -Diol-Gruppierung bleibt intakt. Nach Methylierung des sauren Spaltprodukts entstand der Abbauester LXVIII. Bei der Behandlung mit CrO_3 in Eisessig lieferte er neben dem neutralen Ketoester LXIX als Folge einer oxydativen Öffnung des Ringes D hauptsächlich die Ketosäure LXIXa. Letztere ließ sich mit CH_2N_2 in den Dimethylester LXIXb überführen, der nach dem IR-Spektrum eine Ketogruppe in einem sechsgliedrigen Ring enthält.

Damit ist für das Hydroxylierungsprodukt von 14 α -Hydroxy-cortexon (LXVI) die Konstitution des 14 α .15 α -Dihydroxy-cortexons bewiesen [58]. Noch viel langsamer als LXVI ließ sich das raumisomere 14 β -Hydroxy-Derivat LXX durch *F. lini* hydroxylieren. Da es strukturell am weitestgehenden den Aglykonen entspricht, (Ringe C und D cis-ständig verknüpft) wird vermutlich die 12 β -Stellung hydroxyliert [58].



Befindet sich die zusätzliche OH-Gruppe der Cortexon-Molekel räumlich noch weiter von C-15 entfernt, nämlich in 17 α -Stellung, was in *Reichsteins* Substanz S der Fall ist, so greift auch hier die Hydroxylase in 15 α -Stellung an [59]. Verglichen mit Cortexon ist die Reaktionsgeschwindigkeit wesentlich kleiner.

Die Beispiele zeigen, daß enzymatische Umwandlungen in verschiedenen Steroid-Klassen ganz verschieden verlaufen können, und daß Analogieschlüsse nur mit Vorsicht gezogen werden dürfen.

Zu ähnlichen Schlußfolgerungen sind inzwischen auch andere Autoren gelangt. Einige Beispiele seien hier erwähnt. 4-Methyl-testosteron wird durch *Rhizopus nigricans* vorwiegend in 7 β -Stellung, in geringem Maße in 11 α - und gar nicht in 6 β -Stellung hydroxyliert, während beim Testosteron das 11 α -Hydroxy-Derivat das Hauptprodukt und 6 β -Hydroxy-testosteron das Nebenprodukt ist [60]. Mit *Absidia regnieri* werden 17 α -Hydroxy-progesteron und *Reichsteins* Substanz S in 11 α -Stellung, Cortexon-acetat und 11-Dehydro-corticosteron hin-

[58] Ch. Tamm, W. Zürcher u. G. Juhasz, unveröffentlicht.

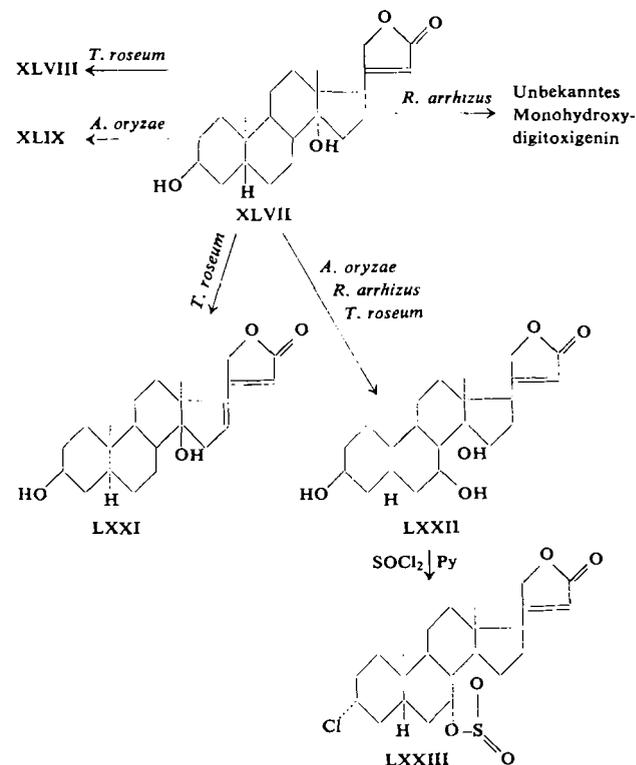
[59] Ch. Tamm, E. Weiss-Berg u. W. Zürcher, unveröffentlicht.

[60] D. N. Kirk, V. Petrow u. M. H. Williamson, J. chem. Soc. (London) 3872 (1960).

gegen in 14 α -Stellung hydroxyliert [61]. Kulturen von *Botrytis cinera* katalysieren 6 β - und 15 β -Hydroxylierungen. Die Gegenwart eines 11 β -Hydroxyls im Substrat verhindert die 6 β -Hydroxylierung. Ist eine 17 α -Hydroxygruppe vorhanden, so wird die 15 β -Hydroxylierung unterdrückt [61]. Nach Urech et al. [62] bewirkt *Gibberella saubinetii* bei 11 β -Hydroxy- Δ^4 -androst-3.17-dion hauptsächlich 15 α - und in geringerem Maße 6 β -Hydroxylierung. Zusätzliche 17 α -ständige Substituenten in der Substratmolekel (17 α -OH; 17 α - CH_3) erschweren offenbar durch ihre Raumerfüllung die 15 α -Hydroxylierung, weshalb es zu einer vermehrten 6 β -Hydroxylierung kommt. Digitoxigenin (XLVII), 3-Dehydro-digitoxigenin (XLIX), Gitoxigenin (LIII) und Oleandrigenin werden hingegen durch *G. saubinetii* in 12 β -Stellung hydroxyliert [63]. Dieser Organismus besitzt demnach bezüglich seiner Enzyme die gleichen Eigenschaften wie *Fusarium lini*.

Weitere mikrobiologische Umwandlungen in der Cardenolid-Reihe haben Nawa et al. [64] beobachtet [64a]. Inkubation von Digitoxigenin (XLVII) mit *Helicostylum piriforme* führte zu Digoxigenin (XLVIII) und Gitoxigenin (LIII), mit *Cunninghamella blakesleeana* zu LIII und mit *Gibberella fujikuroi* zu Digoxigenin (XLVIII). Die 12 β -Hydroxylierung ist auch von diesen Organismen bevorzugt. Bemerkenswert ist der gleichzeitige Angriff auf die 16 α -Stellung durch *H. piriforme*. Wir fanden, daß Kulturen von *Aspergillus oryzae* Digitoxigenin (XLVII) in 3-Dehydro-digitoxigenin (XLIX) (Nebenprodukt) und in 7 β -Hydroxy-digitoxigenin (LXXII) (Hauptprodukt) verwandeln [65].

LXXII ist ein neues Cardenolid, von dem bisher auch keine Glykoside in der Natur gefunden worden sind.



[61] M. Shirasaka, Chem. Pharm. Bull. (Japan) 9, 54, 152 (1961).
[62] J. Urech, E. Vischer u. A. Wettstein, Helv. chim. Acta 43, 1077 (1960).

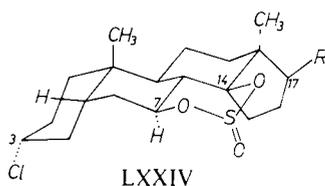
[63] M. Okada, A. Yamada u. M. Ishidate, Chem. Pharm. Bull. (Japan) 8, 530 (1960).

[64] H. Nawa, M. Uchibayashi, T. Kamiya, T. Yamano, H. Arai u. M. Abe, Nature (London) 184, 469 (1959).

[64a] Vgl. E. Titus, Adv. applied Microbiol. 3, 279 (1961).

[65] G. Juhasz u. Ch. Tamm, Helv. chim. Acta 44, 1063 (1961).

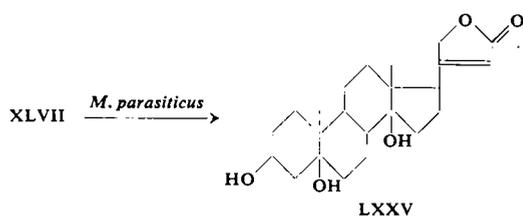
Seine Konstitution ließ sich u. a. durch die Bildung des 3 α -Chlor-7.14-cyclo-sulfits (LXXIII) mit SOCl_2 /Pyridin beweisen. Aus seiner Raumformel LXXIV ist zu erkennen, daß die beteiligten Substituenten an C-17 und C-14



äquatorial orientiert sind, was für die Anellierung eines weiteren spannungsfreien Sechsrings besonders günstig ist.

Rhizopus arrhizus ergab ebenfalls 7 β -Hydroxy-digitoxigenin (LXXII) [65,66], sowie ein isomeres, kristallisiertes Monohydroxy-digitoxigenin [65], dessen Struktur noch nicht geklärt wurde. Zahlreiche andere Cardenolide wurden nicht verändert. Androstan- und Pregnan-Derivate mit der Δ^4 -3-Ketogruppe werden durch diesen Organismus in 6 β - und 11 α -Stellung hydroxyliert, während gesättigte Pregnane ebenfalls in der 7 β -Stellung oxygeniert werden können. – Die Umsetzung von Digitoxigenin (XLVII) mit *Trichothecium* (Cephalothecium) *roseum* wurde von Titus et al. [67] und uns [65] untersucht. Das Hauptprodukt war wiederum 7 β -Hydroxy-digitoxigenin (LXXII), das allerdings von den amerikanischen Autoren [67] zuerst als das ebenfalls noch unbekannte 6 β -Isomer angesprochen wurde. Titus et al. [67] wiesen als weiteres Produkt 16-Anhydro-digitoxigenin (LXXI), das möglicherweise durch 17 α -Hydroxylierung und anschließende Wasserabspaltung entstanden ist, sowie Sarmantogenin nach. Wir fanden kein Sarmantogenin, sondern Digoxigenin. Worauf diese Diskrepanz beruht, ist nicht geklärt.

In jüngster Zeit berichtete Ishii [68] über die Bildung von Periplogenin (LXXV) aus Digitoxigenin (XLVII) mit



Hilfe von *Mucor parasiticus*. Diese Umformung stellt die erste 5 β -Hydroxylierung in der Steroidreihe dar. *M. parasiticus* hydroxyliert die Vertreter der C₁₉- und C₂₁-Reihe, die eine Δ^4 -3-Ketogruppe besitzen, in der Regel in 14 α -Stellung, also auch an einem tertiären C-Atom. Bei der Inkubation von Digitoxigenin (XLVII) mit Vertretern der Ordnung *Mucorales* kann sich neben 7 β -Hydroxy-digitoxigenin (LXXII) durch 1 β -Hydroxylierung Acovenosigenin A als Nebenprodukt bilden [68a,b]. Gleichzeitig wurden Dihydroxylierungen von XLVIII, möglicherweise in 1 β .7 β - und in 5 β .7 β -Stellung, beobachtet [68a].

[66] H. Ishii, Y. Nozaki, T. Okumura u. D. Satoh, J. pharmac. Soc. (Japan) 80, 1150 (1960).

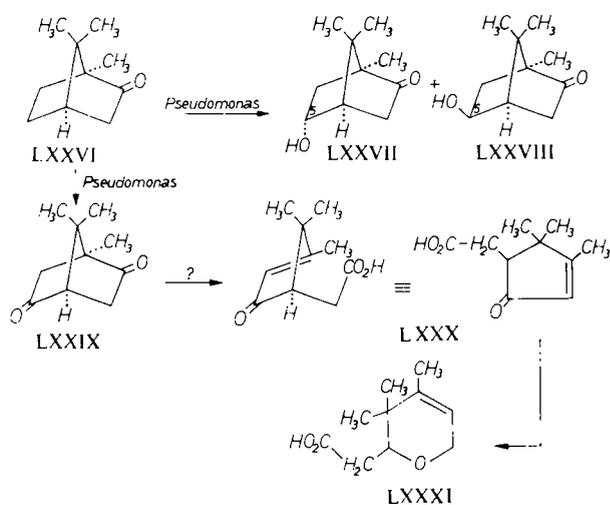
[67] E. Titus, A. W. Murray u. H. E. Spiegel, J. biol. Chemistry 235, 3399 (1960).

[68] H. Ishii, J. pharmac. Soc. (Japan) 81, 153 (1961).

[68a] H. Ishii, Y. Nozaki, T. Okumura u. D. Satoh, J. pharmac. Soc. (Japan) 81, 1051 (1961).

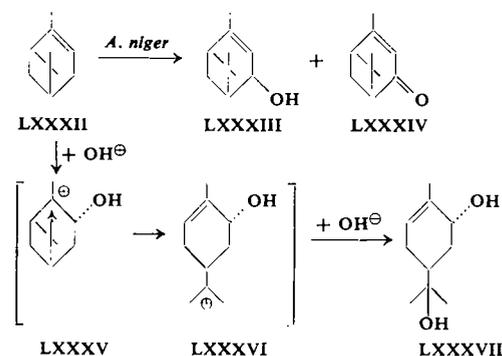
[68b] Y. Nozaki u. T. Okumura, Agr. biol. Chem. (Japan) 25, 515 (1961).

Die vielseitige Anwendbarkeit mikrobiologischer Umwandlungen in der Steroidreihe gab den Anlaß, solche Reaktionen auf andere Naturstoffklassen zu übertragen. So ist in jüngster Zeit bei den biogenetisch mit den Steroiden eng verknüpften Terpenen durch Bradshaw et al. [69] die enzymatische Umwandlung von (+)-Campher (LXXVI) mit einem *Pseudomonas*-Stamm studiert worden. Campher war in diesen Versuchen die einzige C-Quelle.



Es resultierten die Neutralstoffe 5-endo-Hydroxy- und 5-exo-Hydroxy-campher (LXXVII) bzw. (LXXVIII) und 2.5-Diketo-campher (LXXIX), sowie – durch Spaltung einer C–C-Bindung in LXXIX – die Säure LXXX. Wird die vollständige Oxydation durch 2.2'-Dipyridin verhindert, so entsteht durch nochmalige Spaltung einer C–C-Bindung und Ringschluß der Sauerstoff-Funktion das Dihydropyran-Derivat LXXXI.

Bei der Inkubation von α -Pinen (LXXXII) mit *Aspergillus niger* bildeten sich neben CO_2 und H_2O cis-Verbenol (LXXXIII) als Hauptprodukt, sowie Verbenol (LXXXIV) und trans-Sobrerol (LXXXVII) als Nebenprodukte [70]. Während LXXXIII und LXXXIV durch Oxydation der Allylstellung entstanden sind, dürfte sich trans-Sobrerol (LXXXVII) durch Angriff des elektrophilen Agens (OH^\oplus) an der Doppelbindung, Umlagerung und Addition von OH^\oplus an das Carboniumion LXXXVI gebildet haben. An der Entstehung von LXXXVII dürften somit zwei prinzipiell ver-



[69] W. H. Bradshaw, H. E. Conrad, E. J. Corey, I. C. Gunsalus u. D. Lednicer, J. Amer. chem. Soc. 81, 5507 (1959).

[70] P. K. Bhattacharyya, B. R. Prema, B. D. Kulkarni u. S. K. Pradhan, Nature (London) 187, 689 (1960).

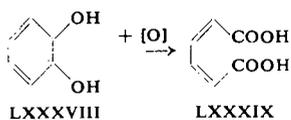
schiedene Reaktionstypen beteiligt sein, was allerdings noch zu beweisen wäre.

Weitere mikrobiologische Umwandlungen sind in der Terpenreihe nicht bekannt geworden.

5. Phenole

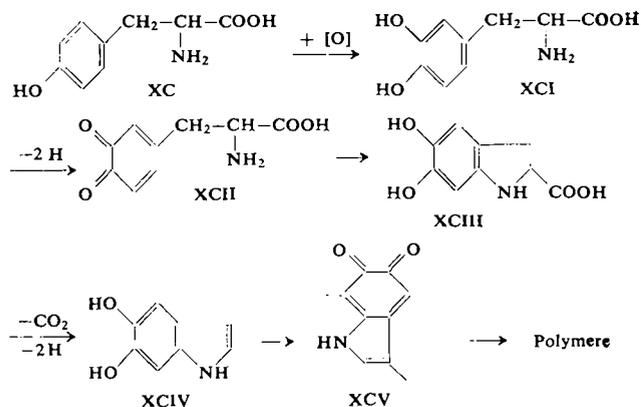
Eine hervorragende Rolle spielen mikrobiologische Oxydationen beim natürlichen Abbau von phenolischen Stoffen. Sie sind z. B. an der Bildung von Lignin beim Absterben der Pflanzen beteiligt und an der Braunfärbung von pflanzlichen Gewebeschnitten erkenntlich. Eine Parallele findet sich im Tierreich in der Bildung von Melanin aus Tyrosin oder der Ommochrome aus Tryptophan. Man trifft als Reaktionstypen Hydroxylierungen, Dehydrierungen, Spaltung von C-C-Bindungen und Demethylierungen von Methyläthern an. Nach *Mason* [71] kann man die Oxydasen in drei Gruppen einteilen, für die im folgenden je ein Beispiel gegeben wird.

Typ I: Sauerstoff-Transferasen: $A + O_2 \rightarrow AO_2$



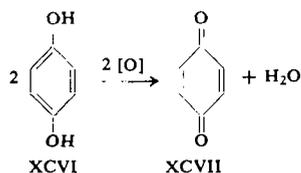
Durch oxydative Spaltung einer C=C-Bindung geht o-Dihydroxybenzol (LXXXVIII) in die cis,cis-Muconsäure (LXXXIX) über.

Typ II: „Mixed function oxydases“: $AH + 2e + O_2 \rightarrow AOH + O^{2-}$



Aus Tyrosin (XC) bilden sich in einer Sequenz von mehreren Reaktionsstufen (XCI bis XCV) die Melanine im Tierreich.

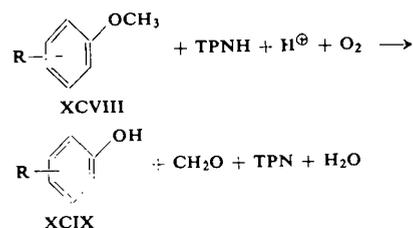
Typ III: Elektronen-Transferasen $4e + O_2 \rightarrow 2 O^{2-}$ ($2 H_2O$) oder $2e + O_2 \rightarrow O_2^{2-}$ (H_2O_2)



Aus Hydrochinon (XCVI) bildet sich durch einfache Dehydrierung p-Benzochinon (XCVII).

[71] H. S. Mason, *Advances in Enzymol.* 19, 79 (1957).

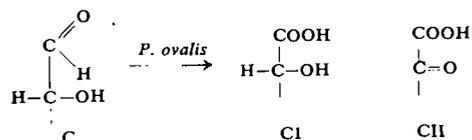
Im tierischen Organismus werden Ätherbindungen durch ein TPNH-abhängiges Enzym gespalten [72]. Aus dem Methyläther XCVIII entsteht das Phenol XCIX, Formaldehyd und Wasser. Nach dem gleichen Reaktionsschema dürften die



mikrobiellen Enzyme ihre Wirkung ausüben. Zahlreiche weitere Beispiele für mikrobielle Umwandlungen phenolischer Stoffe finden sich in der kürzlich erschienenen Zusammenfassung von *Flaig* und *Haider* [73].

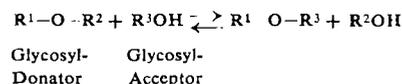
6. Kohlenhydrate

Die Oxydation reduzierender Zucker mit bakteriellen Enzymen ist eingehend studiert worden. Zum Beispiel vermag *Pseudomonas ovalis* Glucose (C) zu Gluconsäure (CI) zu oxydieren (Ausbeute: 80 %). *P. fluorescens* ergibt die 2-Keto-gluconsäure (CII) [74]. Analog lassen



sich reduzierende Disaccharide in die sogenannten Biosäuren umwandeln. Selektive Dehydrierungsreaktionen an sekundären Hydroxylgruppen sind bei Zuckeralkoholen und den Cycliten (Cyclitolen) schon lange bekannt.

Besonders weite Anwendungsmöglichkeiten bieten die mikrobiellen Transglykosidierungen in der Reihe der Oligosaccharide und Polysaccharide. Sie laufen nach folgendem Schema ab:



Der Glycosyl-Donator kann ein Hexosephosphat, ein Disaccharid oder ein Polysaccharid sein. Alkohole, Mono- und Polysaccharide und H_3PO_4 übernehmen die Rolle des Acceptors. Es entstehen Hexosephosphate, Glykoside, Di- und Polysaccharide, neben Mono- und Polysacchariden bzw. H_3PO_4 [75]. Ein typisches Beispiel ist

[72] J. Axelrod, *Biochem. J.* 63, 634 (1956); J. Axelrod, S. Senoh u. B. Witkop, *J. biol. Chemistry* 233, 697 (1958); J. Axelrod u. R. Tomchick, *J. biol. Chemistry* 233, 702 (1958).

[73] W. Flaig u. K. Haider, *Planta Medica* 9, 123 (1961).

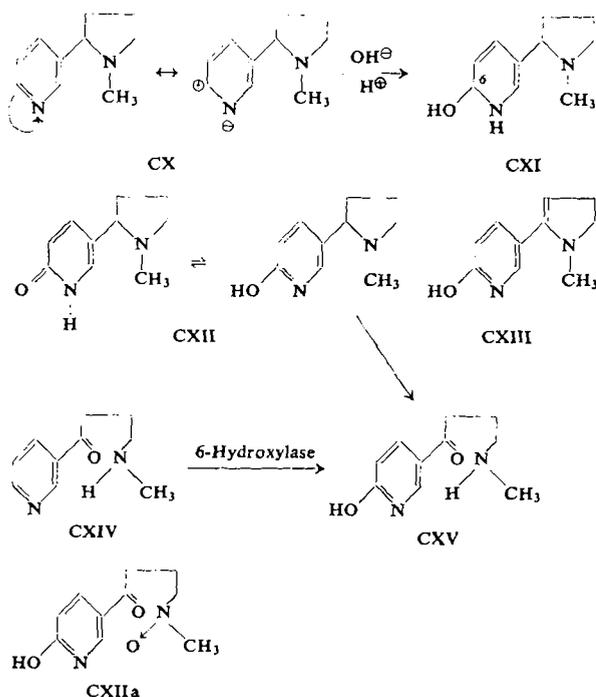
[74] F. H. Stodola: *Chemical Transformations by Microorganism*, John Wiley and Sons, New York 1958, S. 50.

[75] Vgl. die Zusammenfassungen von E. J. Hehre, *Advances in Enzymol.* 11, 297 (1951); E. J. Hehre in S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York 1955, Bd. I, S. 178; F. H. Stodola: *Chemical Transformations by Microorganism*. John Wiley and Sons, New York 1958, S. 65 ff.

8. Alkaloide

Mit Ausnahme der Penicilline und des Agaritins betreffen die bisher besprochenen mikrobiellen Umwandlungen Naturstoffe, die nur C, H und O jedoch kein N enthalten. Über das Verhalten von basischen Substraten, in welchen N ringgebunden ist, d. h. von Alkaloiden und ihren Bausteinen, gegenüber diesen Enzymen liegen noch sehr wenige Berichte vor.

Genauer untersucht wurde das Nicotin (CX) durch Hochstein und Rittenberg [87]. Bei der Inkubation mit zellfreien Rohextrakten aus einem nicht identifizierten Bodenbakterium mit Nicotin als einziger C- und N-Quelle wurden 3 Mol O₂ pro Mol Nicotin verbraucht. Die Autoren beobachteten die Bildung von drei Produkten, von denen zwei isoliert und aufgeklärt wurden. Zuerst bildet sich ein α -Pyridon-Derivat, nämlich (1)6-Hydroxy-nicotin (CXII), vermutlich durch nucleophilen Angriff von OH[⊖] an CX über die Pseudobase CXI. Im nächsten Schritt wird der Pyrrolidin-Ring oxydativ geöffnet unter Bildung von 6-Hydroxy-pseudooxynico-



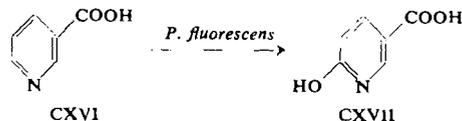
tin (CXV), welches auch aus Pseudooxynicotin (CIV) durch 6-Hydroxylierung mit dem gleichen Bakterium gewonnen werden kann. Ob bei dieser Ringöffnung zuerst eine Dehydrierung stattfindet, ist nicht geklärt. Jedenfalls konnte das entsprechende 6-Hydroxy-N-methylmyosmin (CXIII) bisher nicht als Zwischenprodukt nachgewiesen werden. Über sehr ähnliche Untersuchungen mit zellfreien Extrakten aus *Arthrobacter oxydans* berichteten Decker et al. [88]. Diese Autoren beobach-

[87] L. I. Hochstein u. S. C. Rittenberg, *J. biol. Chemistry* 234, 151, 156 (1959); 235, 795 (1960).

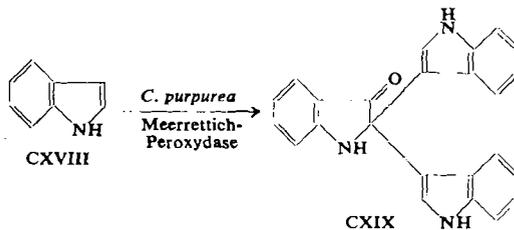
[88] K. Decker, H. Eberwein, F. A. Gries u. M. Brühmüller, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 319, 279 (1960); H. Eberwein, F. A. Gries u. K. Decker, *ibid.* 323, 236 (1961); K. Decker, F. A. Gries u. M. Brühmüller, *ibid.* 323, 249 (1961); F. A. Gries, K. Decker u. M. Brühmüller, *ibid.* 325, 229 (1961).

teten die Bildung blauer Pigmente und vermuten, daß sich CXV über das N-Oxyd CXIIa von CXII bildet.

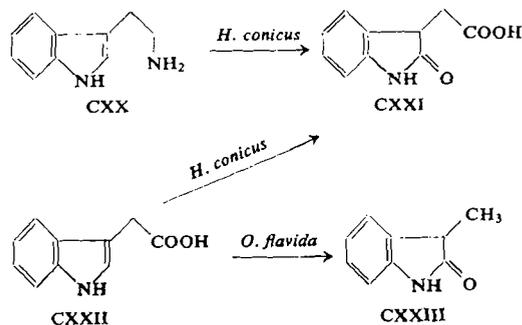
Analoge 6-Hydroxylierungen sind schon früher bei der Nicotinsäure (CXVI) durch zellfreie Extrakte aus Bakterien, z. B. *Pseudomonas fluorescens*, beobachtet worden [89]. Ein anaerobes Bodenbakterium, das CXVI als C- und N-Quelle verwenden kann, ergab nicht die 6-Hydroxynicotinsäure (CXVII) als Endprodukt, sondern baute CXVI zu Propionsäure, Essigsäure, CO₂ und NH₃ ab [90].



Angesichts der großen medizinischen Bedeutung der Rauwolfia- und Mutterkorn-Alkaloide ist es nicht verwunderlich, daß man versucht hat, auch hier mit mikrobiellen Enzymen zu neuen Wirkstoffen zu gelangen. Die Ergebnisse waren bisher, im Gegensatz zu den Steroiden, wenig erfolgversprechend, denn die Reaktionen verliefen, wenn überhaupt, nur sehr langsam und ergaben nur niedere Ausbeuten. Bei der Muttersubstanz dieser Reihe, dem Indol (CXVIII), tritt mit *Claviceps purpurea* [91] Oxydation unter Trimerisierung zu CXIX ein, wie sie auch durch Meerrettich-Peroxydase bewirkt



wird [92]. *Hygrophorus conicus* vermag sowohl Tryptamin (CXX) als auch die Indol-3-essigsäure (CXXII) in die Oxindol-3-essigsäure (CXXI) umzuwandeln [93], während CXXII durch *Omphalia flavida* oxydativ zu 3-Methyl-oxindol (CXXIII) abgebaut wird [94]. Bei den



[89] D. E. Hughes, *Biochem. J.* 60, 303 (1955); A. L. Hunt, D. E. Hughes u. J. M. Lowenstein, *ibid.* 66, 2 P (1957); 69, 170 (1958).

[90] J. Harary, *J. biol. Chemistry* 227, 815 (1957).

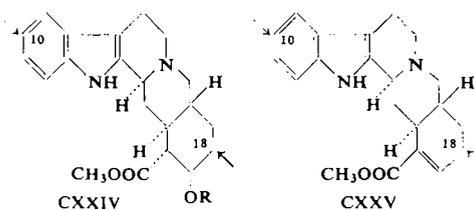
[91] Y. H. Loo u. D. O. Woolf, *Chem. and Ind.* 1123 (1957).

[92] A. G. Holmes-Siedle u. B. C. Saunders, *Chem. and Ind.* 265 (1957).

[93] D. J. Siehr, *J. Amer. chem. Soc.* 83, 2401 (1961).

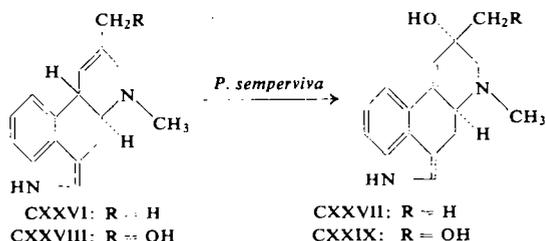
[94] P. M. Ray u. K. V. Thimann, *Arch. Biochem. Biophysics* 64, 175 (1956).

Alkaloiden, die das Yohimban-Gerüst besitzen, wurden beim 3-epi- α -Yohimban, allo-Yohimbin und Rauwolfcin [95], sowie beim β -Yohimmethylläther, 3-epi-Apoyohimbin und Apoyohimbin [96] (vgl. die Strukturtypen CXXIV und CXXV) mit *Streptomyces platensis* und *Cunninghamella blakesleeana* Oxygenierungen in 10-Stellung unter Bildung einer phenolischen OH-Gruppe beobachtet. Beim Apoyohimbin griff *C. blakes-*



leeana auch das allylische C-Atom 18 an. Eine 18 α -Hydroxylierung von Yohimbin und α -Yohimbin gelang mit *Streptomyces aureofaciens* und *S. rimosus*, allerdings nur in Ausbeuten von 5 % [97].

Eine Hydroxylierung unter gleichzeitiger Allylumlagerung fanden *Brack et al.* [98] bei der Inkubation von Mutterkorn-Alkaloiden des Clavin-Typs mit Kulturen von *Psilocybe semperviva*. Agroclavin (CXXVI) wandelt sich in 1 bis 7 Tagen weitgehend in Setoclavin (CXXVII) um. Aus Elymoclavin (CXXVIII) entsteht Penniclavin (CXXIX). In geringer Menge bildeten sich auch iso-Setoclavin und iso-Penniclavin. Beim Ergotamin und Ergobasin trat unter gleichen Bedingungen entweder nur Isomerisierung oder ein tiefgreifender Abbau des Ringgerüsts ein.



Wird Colchicin oder Thiocolchicin mit Kulturen von *Streptomyces griseus* inkubiert, so wird selektiv eine der drei am Ring A haftenden Methoxygruppen entmethyliert [99], eine Reaktion, die mit chemischen Reagentien kaum gelingt. Die Monodesmethyl-Derivate unterscheiden sich von den bekannten Isomeren (Substanzen E und F).

Eigene Versuche bei Tropan-Derivaten mit *Fusarium lini* verliefen enttäuschend. Ein positives Resultat wurde einzig mit Tropinon erhalten, das zu Tropin und φ -Tropin reduziert wurde. Eine Dehydrierung der beiden Alkohole war nicht zu beobachten [100]. Über weitere mikrobiologische Umwandlungen in der Alkaloid-Reihe ist nichts bekannt geworden.

[95] Y. H. Loo u. M. Reidenberg, Arch. Biochem. Biophysics 79, 257 (1959).

[96] W. O. Godtfredsen, G. Korsby, H. Loreck u. S. Vangedal, Experientia 14, 88 (1958).

[97] S. C. Pan u. F. L. Weisenborn, J. Amer. chem. Soc. 80, 4749 (1958).

[98] A. Brack, R. Brunner u. H. Kobel, Helv. chim. Acta 45 (1962), im Druck; ich danke Dr. Brack und Dr. Kobel für die Mitteilung ihrer Resultate vor der Veröffentlichung.

[99] L. Velluz u. P. Bellet, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 248, 3453 (1959).

[100] Ch. Tamm, H. P. Sigg u. W. Zürcher, unveröffentlicht.

9. Natur der Enzyme, Reaktionsmechanismen

Nachdem wir die Reaktionstypen und Beispiele ihrer Anwendung, auf verschiedene Stoffklassen kennengelernt haben, wollen wir uns abschließend der Frage nach der Natur der mikrobiellen Enzyme und der Mechanismen der Reaktionen, die sie katalysieren, zuwenden. Es sei ausdrücklich betont, daß wir uns damit in ein Gebiet der Enzymologie begeben, das noch sehr wenig erforscht und deshalb in vielen Punkten spekulativ ist. So weiß man heute noch nicht, welche Bedeutung die hier genannten Enzyme für den mikrobiellen Stoffwechsel haben. Die von ihnen umgewandelten Fremdstoffe sind für die Mikroorganismen nicht lebenswichtig. Viele Organismen produzieren sogar selbst Steroide, z. B. die Hefe das Ergosterin. Diese Sterine werden aber nicht vom gleichen Organismus hydroxyliert. Setzt man der Kultur jedoch ein Fremdsteroid zu, so beobachtet man eine Hydroxylierung. Man hat deshalb vermutet, daß es sich um eine Detoxikationsreaktion handeln könnte. Durch die Hydroxylierung wird der Fremdkörper in eine wasserlöslichere Form gebracht und kann so rascher aus dem engeren Lebensbereich des Organismus entfernt werden. Analog kann sich bekanntlich der tierische Organismus entgiften, wobei der Hydroxylierung noch die Sulfat- bzw. Glucuronidbildung folgen können. Für diese Hypothese würde die Tatsache sprechen, daß hydroxylreiche Substrate nicht weiter oxygeniert werden. Häufig beobachtet man auch eine Hemmung des Pilzwachstums nach Zugabe des Fremdsubstrates. Während und nach der mikrobiologischen Reaktion erholt sich der Organismus wieder. Ungeklärt ist die Frage, ob die Enzyme nativ sind oder ob ihre Bildung durch das Substrat induziert wird. Es wurde gezeigt, daß das Kulturfiltrat fast nur Reaktionsprodukt enthält, während im Mycel das Ausgangsmaterial angereichert ist [17, 101]. Die Transformation spielt sich offenbar an der Lipoid-Oberfläche des Mikroorganismus ab.

a) Hydroxysteroid-Dehydrogenasen

Sie sind die am besten untersuchten Enzyme. Wir verdanken unsere Kenntnisse vor allem den Arbeiten von *Talalay* [15, 102]. Er konnte zwei Dehydrogenasen aus einem testosteron-adaptierten *Pseudomonas*-Stamm isolieren (eine 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase sowie eine 3 β - und 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase). Eine 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase [*] ist kürzlich sogar in kristalliner Form von *Hübener et al.* [103] aus Extrakten von *Streptomyces dehydrogenans* gewonnen worden. Die von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen sind reversibel und benötigen Diphosphopyridin-nucleotid (DPN), oder eventuell Triphosphopyridin-

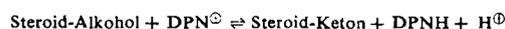
[101] G. Wix u. K. Albrecht, Nature (London) 183, 1279 (1959).

[102] P. Talalay u. H. R. Levy in: Steric Course of Microbiological Reactions. J. A. Churchill, London 1959, S. 53.

[*] Nomenklatur (20 β F) siehe: L. F. Fieser u. M. Fieser: Steroide. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1961, S. 372.

[103] H. J. Hübener, F. G. Sahrholz, J. Schmidt-Thomé, G. Neesemann u. R. Junk, Biochim. biophysica Acta 35, 270 (1959).

nucleotid (TPN), das, wie Isotopenversuche mit Deuterium gezeigt haben, als Wasserstoffüberträger fungiert. Die Enzyme sind stereospezifisch. Die β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase oxydiert nur eines der beiden Enantiomere von totalsynthetisch vorbereitetem rac. Testosteron [102]. Die Reaktionen sind wie folgt zu formulieren:

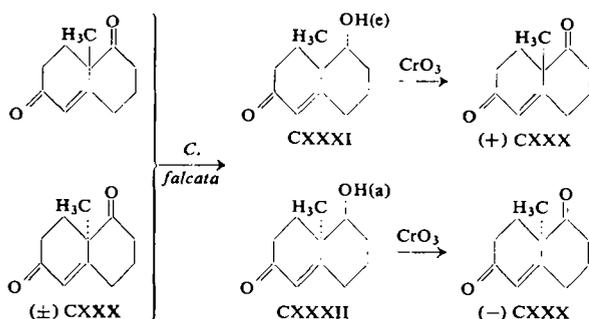


Für die Gleichgewichtskonstante der 3-Hydroxysteroid-Dehydrogenase wurden folgende Werte gefunden:

$$K_{\text{H}} = \frac{[\text{Keton}][\text{DPNH}][\text{H}^{\oplus}]}{[\text{Alkohol}][\text{DPN}^{\ominus}]} = 10^{-9} \text{ bis } 40 \cdot 10^{-9}$$

Gereinigte Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Präparate haben sich als empfindliche Reagentien zur quantitativen Bestimmung von Steroidalkoholen- und Ketonen im Mikromaßstab erwiesen [103 a].

Prelog und seine Mitarbeiter sind damit beschäftigt, die Erkenntnisse über die Stereospezifität der enzymatischen Reduktion zu vertiefen. Sie benutzen für ihre Untersuchungen als Substrate racemische Derivate des 1-Dekalons, des 2-Dekalons und des Hydrindanons, weil diese einfachen Verbindungen die wichtigsten stereochemischen Eigenschaften der Steroide wiedergeben. Mikroorganismen (*Curvularia falcata*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger*) zeigen bei diesen bicyclischen Modellverbindungen keine Selektivität für das Ausgangsmaterial, sondern nur noch Produkt-Spezifität, wobei sich *C. falcata* durch eine besonders große Stereospezifität auszeichnet. Steroide werden durch diese Organismen vorwiegend hydroxyliert. Dagegen entstanden mit *C. falcata* [104] aus (\pm) - Δ^4 -9-Methyloktalin-3,8-dion (CXXX) nur die zwei Δ^4 -8-Hydroxy-oktalone-(3), (CXXXI) und (CXXXII), indem jedes der beiden Enantiomere von CXXX stereospezifisch zum Produkt mit (8 S)-Konfiguration reduziert wurde.

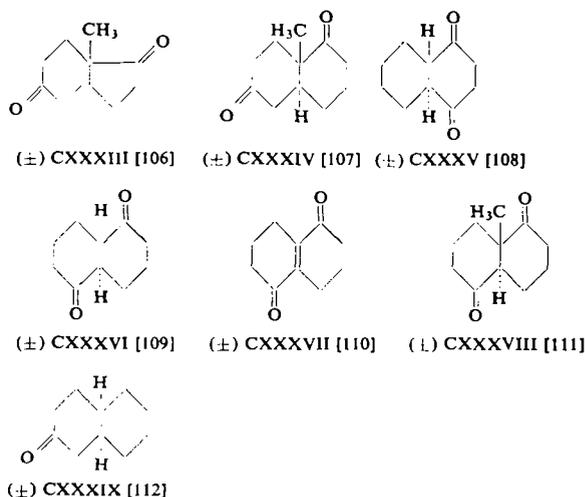


Rückoxydation der beiden Produkte mit CrO_3 ergab die beiden Antipoden des Ausgangsmaterials, nämlich (+)CXXX und (-)CXXX. Da sich CXXXI und CXXXII als Diastereomere trennen lassen, läuft die Gesamtreak-

[103 a] Vgl. H. J. Hübener u. W. Rick in H. U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim-Bergstr. 1962.

[104] V. Prelog u. W. Acklin, Helv. chim. Acta 39, 748 (1956).

tion auf eine Racematspaltung von CXXX hinaus [104]. Als weniger produkt-spezifisch erwies sich *Aspergillus niger* [105]. Analoge Reduktionen, die jedoch je nach Mikroorganismus in der Stereospezifität variierten, gelangen bei den Ketonen CXXXIII bis CXXXIX [105-112]:



Aus zellfreien Extrakten von *C. falcata* ließ sich die Hydrogenase stark anreichern. Sie ist TPNH-abhängig, wird von Cystein aktiviert und durch Spuren von p-Chlormercuribenzoat gehemmt [113]. Auf den Vorstellungen von Vennesland und Westheimer aufbauend interpretiert Prelog seine Ergebnisse mit Hilfe einer „Zwei-Ebenen-Theorie“, welche eine Variation der „Drei-Punkte-Theorie“ von Ogston darstellt [113]. Sie besagt, daß im Übergangszustand der Reduktion der Dihydropyridin-Ring und die Carbonylgruppe des Substrates mit ihren beiden Substituenten in parallelen Ebenen liegen, wobei der größere lipophile Substituent gegenüber dem H-Atom des Coenzym und der kleinere Substituent gegenüber der hydrophilen CONH_2 -Gruppe des Coenzym zu liegen kommen. Eine analoge räumliche Anordnung wird für das Apoenzym (Protein) postuliert. Ein Enzym-Substrat-Komplex, in welchem die hydrophile (polare) Partie des Proteins, die CONH_2 -Gruppe des Coenzym und der kleinere Substituent an der Carbonylgruppe des Substrates in nächster Nachbarschaft stehen, während die apolare Partie des Apoenzym, das β -Wasserstoffatom des Coenzym und der große lipophile Substituent in ähnlicher aber verschiedener Weise angeordnet sind, sollte energetisch begünstigt sein. Der Unterschied in der freien Enthalpie sollte dann genügend groß sein, um die beobachtete Stereospezifität zu erklären. Es würde zu weit führen, im Rahmen dieses Artikels weitere Einzelheiten dieser zum Teil noch hypothetischen Vorstellungen zu diskutieren.

[105] W. Acklin, O. Dütting u. V. Prelog, Helv. chim. Acta 41, 1424 (1958).

[106] W. Acklin, V. Prelog u. A. P. Prieto, Helv. chim. Acta 41, 1416 (1958).

[107] W. Acklin, V. Prelog u. D. Zäch, Helv. chim. Acta 41, 1428 (1958).

[108] P. Baumann u. V. Prelog, Helv. chim. Acta 41, 2362 (1958).

[109] P. Baumann u. V. Prelog, Helv. chim. Acta 41, 2379 (1958).

[110] P. Baumann u. V. Prelog, Helv. chim. Acta 42, 736 (1959).

[111] V. Prelog u. D. Zäch, Helv. chim. Acta 42, 1862 (1959).

[112] V. Prelog u. H. E. Smith, Helv. chim. Acta 42, 2624 (1959).

[113] V. Prelog in: Steric Course of Microbiological Reactions. J. A. Churchill, London 1959, S. 79.

b) Δ -Dehydrogenasen und Δ -Reduktasen

Levy und Talalay [102, 114] haben aus zellfreien Extrakten von *Pseudomonas testosteroni* zwei Enzyme isoliert und gereinigt, welche die Δ^1 - und Δ^4 -Doppelbindungen in Steroide einführen. Phenazin-methosulfat ist ein guter Elektronenacceptor bei diesen Oxydationen. Nach den Untersuchungen von Levy und Talalay und anderen bewirken die Enzyme eine direkte Dehydrierung des Steroids, vermutlich unter Beteiligung einer flavinartigen prosthetischen Gruppe. Eine Hydroxylierung mit anschließender Wasserabspaltung erscheint unwahrscheinlich. Die 3-Ketogruppe darf nicht fehlen. Die Δ^1 -Dehydrierung ist stereospezifisch, indem in synthetisch bereitetem rac. Cortison oder Aldosteron nur der natürliche Antipode oxydiert wird [115]. Aufschluß über den stereochemischen Verlauf der Dehydrierung geben die Versuche von Hayano et al. [116] mit *Bacillus sphaericus*. Während Steroide, die einen Substituenten in 1β - und 2α -Stellung ($-\text{CH}_3$ bzw. $-\text{OH}$) besitzen, glatt dehydriert werden, tritt die Reaktion bei den 1α - und 2β -substituierten Isomeren nicht ein. Dieser Befund spricht für eine direkte axiale Abspaltung der 1α - und 2β -H-Atome bei der Δ^1 -Dehydrierung. Die Autoren schlagen den in Abb. 5 dargestellten Zwei-Schritt-Mechanismus vor.

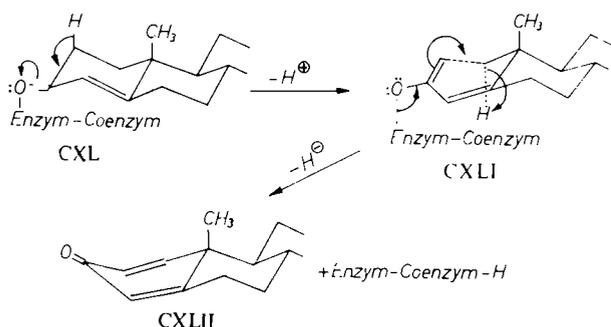


Abb. 5. Zweistufige Reaktion bei der Δ^1 -Dehydrierung von Δ^4 -3-Ketosteroiden [116]

Danach bildet sich zwischen der 3-Ketogruppe und dem Enzym ein koordinativer Komplex CXL, der unter Abspaltung des 2β -H-Atoms als Proton in das Δ^2 -Enol CXLI übergeht. Die axiale Konfiguration des 2-H-Atoms ist dabei günstiger als die äquatoriale. Im Δ^2 -Enol CXLI ist nun das H-Atom an C-1 aktiviert. Es wird als Hydrid-Ion abgespalten und auf einen noch unbekanntem Acceptor übertragen. Wiederum ist ein axiales 1-H-Atom begünstigt. Oxydation in Gegenwart von $^3\text{H}_2\text{O}$ ergab einen starken Austausch des aktivierten H-Atoms an C-2 und des (zunächst) nicht aktivierten H-Atoms an C-1 [117]. Holmlund et. al. [117a] bestätigten die Notwendigkeit des 2β -H-Atoms für die Δ^1 -Dehydrierung.

[114] H. R. Levy u. P. Talalay, J. biol. Chemistry 234, 2014 (1959).

[115] E. Vischer, J. Schmidlin u. A. Wettstein, Experientia 12, 50 (1956).

[116] M. Hayano, H. J. Ringold, V. Stefanovic, M. Gut u. R. I. Dorfman, Biochem. biophys. Res. Commun. 4, 454 (1961).

[117] M. Hayano, V. Stefanovic, Y. Kurosawa, M. Gut u. R. I. Dorfman, Fed. Proc. 20, 238 (1961).

[117a] C. E. Holmlund, L. I. Feldmann, R. H. Blank, N. Barbacci u. B. Nielsen, Sci. Repts. Ist. Super. Sanità (Italien) 1, 289 (1961).

Die Δ -Reduktasen im tierischen Organismus benötigen TPNH. Die Reaktionen scheinen irreversibel zu sein [102]. Ob dies auch für die mikrobiellen Enzyme gilt, ist unbekannt.

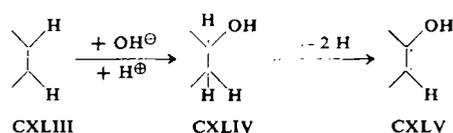
c) Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase

An der enzymatischen Isomerisierung von $\Delta^{5(6)}$ und $\Delta^{5(10)}$ -3-Ketosteroiden zu Δ^4 -3-Ketosteroiden ist vermutlich eine direkte Wasserstoff-Übertragung von C-4 nach C-6 beteiligt, da kein Deuterium oder Tritium in die Steroidmolekel eintritt, wenn z. B. Δ^5 -Androsten-3.17-dion in D_2O oder HTO zu Δ^4 -Androsten-3.17-dion umgewandelt wird [118]. Es gelang Kawahara und Talalay [119] die Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase von *Pseudomonas testosteroni* in kristalliner Form zu isolieren.

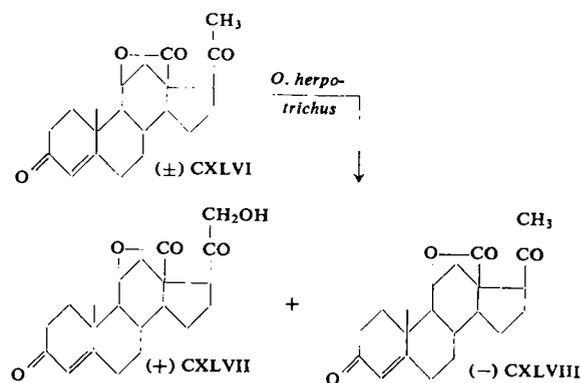
d) Hydroxylasen

Hydroxylasen sind bisher nicht zellfrei erhalten worden. Es muß sich um sehr empfindliche Enzymsysteme handeln. Vermutlich spielen sich die Oxygenierungen in den Mitochondrien ab, was einen lipophilen Charakter des Substrates voraussetzt.

Hydroxylierungen von aromatischen Systemen folgen einem grundsätzlich anderen Reaktionsweg als Hydroxylierungen an gesättigten Kohlenstoffatomen: Bei der aeroben 6-Hydroxylierung der Nicotinsäure durch *Pseudomonas fluorescens* in Gegenwart von H_2^{18}O oder von $^{18}\text{O}_2$ fanden Hunt und Mitarb. [89], daß der eingeführte Sauerstoff aus dem Wasser des Mediums stammt. Wahrscheinlich wird an das aromatische Substrat CXLIII zuerst H_2O addiert und hierauf CXLIV zum Phenol CXLV dehydriert. Es ist möglich, daß Cytochrome beim zweiten Schritt eine Rolle spielen.



Hydroxylierungen an gesättigten Kohlenstoffatomen sind, wie die Dehydrierungen, stereospezifisch. Beim totalsynthetisch bereiteten racemischen Lacton des 11β -Hydroxy-18-carboxy-progesterons (CXLVI) wurde durch *Ophiobolus herpotrichus* nur der natürliche Antipode in 21-Stellung hydroxyliert. Das unnatürliche Enantiomer



[118] P. Talalay u. V. S. Wang, Biochim. biophysica Acta 18, 300 (1955).

[119] F. S. Kawahara u. P. Talalay, J. biol. Chemistry 235, PC 1 (1960).

tigen Möglichkeiten, die sich mit der Anwendung mikrobieller Enzyme zur Lösung wissenschaftlicher Fragen und für die industrielle Praxis eröffnen. Obwohl schon beachtliche Erfolge erzielt wurden, harren noch viele grundsätzliche Probleme einer Lösung, besonders im Hinblick auf die Natur der Enzyme, ihre Wirkungsweise und die Reaktionsmechanismen. Reaktionen mit Mikro-

organismen können als biologische Modelle aufgefaßt werden. Das Studium des Verhaltens der mikrobiellen Enzyme gegenüber Naturstoffen und ihren biogenetischen Vorstufen kann daher wertvolle Hinweise auf deren Biosynthese und Stoffwechsel im Pflanzen- und Tierreich liefern.

Eingegangen am 27. Oktober 1961 [A 176]

Vorschläge zur Gestaltung des Anfängerunterrichtes

VON PROF. C. MAHR

CHEMISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT MARBURG/LAHN

Die bisherige Form des chemischen Anfängerunterrichts, in dessen Mittelpunkt die klassische qualitative Analyse steht, genügt den modernen Erfordernissen nicht mehr. Es wird eine Neugestaltung vorgeschlagen: Nach einem Vorpraktikum, in dem die Grundlagen der allgemeinen Chemie gelehrt werden, folgt das Grundpraktikum, in dessen Mittelpunkt präparative Trennungen stehen. Ein abgekürzter Kurs über qualitative Analyse schließt sich an. Auch das quantitativ-analytische Arbeitsprogramm läßt sich bei diesem Ausbildungsgang gegenüber früher kürzen.

Die Bestrebungen, das Chemiestudium zu kürzen, geben Anlaß, alle Teile des Ausbildungsganges daraufhin zu untersuchen, ob sie wirkungsvoller gestaltet und dadurch, bei mindestens gleicher Leistung, gekürzt werden können. Ein besonderes Problem stellt in diesem Zusammenhang der Anfängerunterricht dar. Man hat in den letzten Jahrzehnten zwar immer wieder versucht, ihn durch Abänderungen und Zusätze den Erfordernissen der sich stürmisch entwickelnden Chemie anzupassen, aber man hat ihn niemals grundsätzlich umgestaltet. Deshalb mußte man versuchen, einen großen Teil der neuen Arbeitsverfahren dem Studenten in Form von zusätzlichen Aufgaben in späteren Studienabschnitten zu vermitteln. Es erscheint der Verdacht gerechtfertigt, daß die untragbare Verlängerung des Chemiestudiums zu einem ganz wesentlichen Teil dadurch verursacht wurde, daß man allzu konservativ an der überlieferten und zweifellos in der Vergangenheit sehr bewährten Form des Anfängerunterrichts festhielt.

Die Entwicklung

Die Aufgaben des chemischen Grundpraktikums, welches Stoffkenntnis vermitteln, chemisches Arbeiten lehren, die Beobachtungsgabe üben und durch häufige Wiederholung wichtiger Reaktionen einen Grundstock von chemischen Kenntnissen unverlierbar und anschaulich einprägen soll, wurden in früherer Zeit in geradezu idealer Weise vom qualitativ-analytischen Praktikum erfüllt. Die qualitative Analyse bestand in einem systematischen Trennungsgang, bei dessen Durcharbeitung die Mehrzahl der damals für das anorganisch-chemische Arbeiten wichtigen Operationen, wie Fällen, Dekantie-

ren, Filtrieren, Auswaschen und Lösen, ständig wiederholt wurde. Da außerdem in diesem Trennungsgang ausschließlich anorganische Reagentien verwendet wurden, war die Beschäftigung mit qualitativer Analyse der natürliche Weg, dem Anfänger eine breite, experimentell begründete Kenntnis der anorganischen Chemie zu vermitteln.

Inzwischen hat jedoch die chemische Analyse ihre Form völlig gewandelt. Die anorganischen Identitätsreaktionen sind weitgehend durch Umsetzungen mit organischen Reagentien ersetzt worden, wodurch in vielen Fällen die Vortrennungen entbehrlich werden. Vor allem jedoch kann man sich heute nur noch selten mit rein qualitativen Angaben über die Zusammensetzung einer Substanz begnügen, sondern man benötigt fast immer wenigstens halbquantitative Aussagen. Deshalb werden in der Praxis physikalisch-chemische oder rein physikalische Verfahren auch für die qualitative Analyse den alten, naßchemischen Methoden vorgezogen.

Die Lage

Trotz dieser Entwicklung bildet in unseren Unterrichtsinstituten immer noch die qualitative anorganische Analyse den Schwerpunkt der Laboratoriumstätigkeit des Anfängers. Der Grund hierfür liegt vorwiegend in didaktischen und organisatorischen Erwägungen. Die qualitative Analyse der alten Form ermöglicht es, mit einer geringen Zahl von Lehrkräften eine große Studentenschar in ihrer praktischen Arbeit wirksam zu kontrollieren. Die Aufgaben sind wegen der fast unbegrenzten Variationsmöglichkeiten bei der Herstellung der zu analysierenden Gemenge in jedem einzelnen Fall verschie-