Transformacje mikrobiologiczne. VIII.

Badanie możliwości wybranych gatunków grzybów do redukcji sekodionu i etylosekodionu.

J. DMOCHOWSKA, A. NESPIAK, L. NOWAK, A. SIEWIŃSKI

Instytut Podstaw Chemii Akademii Rolniczej we Wrocławiu
Zakład Botaniki Akademii Medycznej we Wrocławiu

Dmochowska J., Nespiak A., Nowak L., Siewiński A., (Department of General Chemistry, College of Agriculture, Wrocław Norwida 25; Department of Botany, Medical Academy, Wrocław Kochanowskiego 10), *Microbiological transformations. VIII — Studies of the capability of selected species of fungi to reduce of secodione and ethylosecodione*. Acta Mycol. 13 (1): 85-97, 1977.

Screening tests were carried out with 29 strains of fungi for stereospecific reduction of ketone groups in 13-methyl- and 13-ethyl-3-methoxy-8(14)-seco-1,3,5(10),9(11)-oestratetraen-14,17-dione.

WSTĘP

Reakcje mikrobiologiczne należą do coraz częściej stosowanych wspólnych syntez związków organicznych. W reakcjach tych wykorzystuje się między innymi grzyby, które są zdolne do przekształcania w określonym kierunku substratów organicznych. Wśród związków przekształcanych mikrobiologicznie największą grupę stanowią steroidy (Achrem, Titov, 1970). Stereospecyficzna redukcja mikrobiologiczna achiralnych substratów 13-metylo-3-metoksy-8(14)-seco-1,3,5(10),9(11)-estratetraen-14,17-dionu, zwanego w dalszej części pracy secodionem (związek Ia), oraz 13-etylo-3-metoksy-8(14)-seco-1,3,5(10),9(11)-estratetraen-14,17-dionu, zwanego w dalszej części pracy etylosecodionem (związek Ib), prowadzącą do optycznie czynnych ketoalkoholi (związki IIa, IIb oraz IIIa i IIIb), jest węzłowym etapem w totalnej syntezie hormonów steroidowych. Za interesowanie chemików tym przekształceniem koncentruje się na otrzymaniu ketoalkoholu IIa lub IIb — w zależności od użytego substratu, którego dalsza kondensacja prowadzi do powstania naturalnego układu steroidu. Ten kierunek jest najistotniejszy ze względów przemysłowych.

Redukcja prowadząca do otrzymania produktu IIIa lub IIIb budzi również zainteresowanie z punktu widzenia syntezy asymetrycznej. Obydwa kierunki redukcji mikrobiologicznej stanowią przedmiot licznych publikacji i patentów.

Pierwszym etapem w badaniach nad transformacjami mikrobiologicznymi jest przeprowadzenie prób screeningowych — poszukiwań szczepów zdolnych do pożądanego przekształcenia. Szczep grzyba lub szczep bakterii wykazujący te właściwości musi pod względem biologicznym charakteryzować się szybkim wzrostem na sztucznych podłożach i nie wykazywać objawów zbyt szybkiej degeneracji. Z literatury patentowej i licznych publikacji wiadomo, że tylko nieliczne szczepy grzybów i bakterii metabolizują omawiane związki w pożądanym sposób. Między innymi można wymienić szczególnie pod tym względem aktywne gatunki: *Saccharomyces carlsbergensis*, *S. pastorianus*, *S. uvarum*, *S. elipsoides*, *Curvularia lunata*, *Rhodotorula glutinis*, oraz *Torulopsis utilis*. Redukują one secodion Ia do produktu IIa (Gibian i in., 1967; Greenspan i in., 1970; Kosmoli i in., 1967). W tych samych pracach opisano redukcję związku Ib do IIb przy pomocy niektórych spośród wyżej wymienionych grzybów. Zastrzeżeniami patentowymi objęto również szczepy transformujące substrat Ia do IIIa. Wśród gatunków przydatnych w tym przekształceniu wymieniane są: *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium notatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus* i *Candida utilis* (Greenspan i in., 1970; Kosmoli i in., 1967). Znalazły one zastosowanie w przemyśle. Względy ekonomiczne powodują, iż poszukiwania nowych gatunków grzybów lub bakterii zdolnych do przeprowadzania podobnych reakcji z opłacalną wydajnością trwają nadal.

MATERIAL I METODY

Podstawą naszych badań były uprzednio wykonane prace (Dmochowska i in., 1969; Dmochowska i in., 1970; Nespiak i in., 1969). Istotą są poszukiwania wśród morfologicznie i fizjologicznie zidentyfikowanych szczepów takich grzybów, które by redukowały selektywnie jedną z grup ketonowych w obydwóch substratach — Ia i Ib. Uzyskane efekty rozpatrywano zarówno od strony chemicznej, jak również pod kątem przydatności ich jako ewentualnej nowej cechy diagnostycznej, która mogłaby mieć pewne znaczenie szczególnie dla gatunków o słabo różnicowanych cechach morfologicznych.

Materiałem do badań było 29 szczepów grzybów izolowanych z różnych podłoży naturalnych. Stanowią one część kolekcji szczepów Zakładu Botaniki Akademii Medycznej we Wrocławiu. Większość z nich były to grzyby drożdżoidalne, pięć szczepów reprezentowało rodzaje z klasy *Zygomycetes*, pozostałe należały do *Deuteromycetes* (tab. 1).

Morfologiczne i fizjologiczne oznaczenia
użytych do badań szczepów

Identyfikacji badanych szczepów dokonywano posługując się analizą ich cech morfologicznych względnie fizjologicznych otrzymanych na podłożach standardowych. Podstawowym podłożem dla wzrostu wszystkich badanych grzybów był agar maltozowy o składzie: 20 g ekstraktu „Malto”, 15 g agaru, 1000 ml wody. Dla grzybów z rodzaju *Penicillium* stosowano ponadto podłoże Czapka-Doxa, grzyby z klasy *Zygomycetes* identyfikowano na podłożu SMA (Zycha, 1969). Dla określania szczepów drożdży używano podłoża podstawowego Wickerhama (Lodder, 1970). Testy stwierdzające stopień asymilacji źródeł węgla wykonano posługując się: glukozą, sacharozą, maltozą, laktozą, salicyną, D-melibiozą, trehalozą, L-arabinozą, D-arabinozą, D-galaktozą, D-mannitem, inozytem, sorbozą i skrobią rozpuszczalną. Do badań zdolności fermentacji posłużono się glukozą, sacharozą i maltozą. Zdolność przyswajania azotu sprawdzono na podłożu podstawowym z glukozą z dodatkiem 0,78 g KNO_3 względnie 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Odczyty stopnia wzrostu komórek poszczególnych szczepów dokonano po 7, 14 i 21 dniach. Wszystkie próby wykonywano w czterech powtórzeniach.

Przeprowadzanie reakcji mikrobiologicznych

Wstępną hodowlę mikroorganizmów wykonano w kolbach o pojemności 250 ml na płynnej pożywce w objętości 100 ml o składzie 2 g wyciągu słodowego „Malto” firmy Warta w Śremie (skład: 72% maltozy,

Tabela 1 — Table 1

Wykaz szczepów grzybów użytych do badań
List of the strains of fungi used for the tests

Gatunek Species	Numer kolekcji Z-du Botaniki AM Wrocław Number of collection, Dpt. of Bo- tany, Medical Academy, Wrocław	Podłoże, z którego szczep został wyizolowany Medium from which the strain was isolated	Miejsce wyizolowania szczepu Place of isolation	Miejsce oznaczenia szczepu Place of determination
<i>Rhodotorula rubra</i> (Demme) Lodder	4	torf sfagnowy sphagnum peat	Z-d Mykol. AR Wrocław Dpt. of Mycology, Coll. of Agric. Wrocław	Z-d Botaniki AM Wrocław Dpt. of Botany, Medical Academy, Wrocław
<i>R. rubra</i> (Demme) Lodder	7	gleba soil	Inst. Przem. Ferment. Warszawa Institute of Fermentation Industry Warszawa	Inst. Przem. Ferment. Warszawa Institute of Fermentation Industry Warszawa
<i>R. glutinis</i> (Fr.) Harrison	81	gleba ogrodowa garden soil	Z-d Botaniki AM Wrocław Dpt. of Botany Medical Academy Wrocław	Z-d Botaniki AM Wrocław Dpt. of Botany Medical Academy Wrocław
<i>R. glutinis</i> (Fr.) Harrison	82	zrogowaciała tkanka paznokci keratotic nail tissue	Klinika Dermat. AM Wrocław Dermatological Clinic, Medical Academy, Wrocław	"

Gatunek Species	Numer kolekcji Z- du Botani- ki AM Wrocław Number of collection, Dpt. of Bo- tany, Medical Academy, Wrocław	Podłoże, z którego szczep został wyizolowany Medium from which the strain was isolated	Miejsce wyizolowania szczepu Place of isolation	Miejsce oznaczenia szczepu Place of determination
<i>R. glutinis</i> (Fr.) Harrison	83	"	"	"
<i>R. glutinis</i> (Fr.) Harrison	84	"	"	"
<i>R. glutinis</i> (Fr.) Harrison	85	wysięk ropny purulent exudate	"	"
<i>R. glutinis</i> (Fr.) Harrison	199	"	"	"
<i>R. glutinis</i> (Fr.) Harrison	86	obumierające pędy goździków necrotizing carnation stems	Z-d Fitopatol. AR Wrocław Dpt. of Phytopathology, Coll. of Agric Wrocław	"
<i>Candida pelliculosa</i> Redaelli	A 117	zmiany skórne dermal lesions	Klinika Dermatol. AM Wrocław Dermatological Clinic, Medical Academy, Wrocław	"
<i>C. albicans</i> (Robin) Berkhout	A 117	"	"	"
<i>C. pelliculosa</i> Redaelli	A 122	"	"	"
<i>C. albicans</i> (Robin) Berkhout	A 128	"	"	"
<i>C. pelliculosa</i> Redaelli	A 132	"	"	"
<i>C. albicans</i> (Robin) Berkhout	A 138	"	"	"
<i>Candida</i> sp.	A 268	"	"	"

Gatunek Species	Numer ko- lekcji Z-du Botaniki AM Wrocław Number of collection, Dpt. of Bota- ny, Medical Academy, Wrocław	Podłoże, z którego szczep został wyzolowany Medium from which the strain was isolated	Miejsce wyizolowania szczepu Place of isolation	Miejsce wyizolowania Place of determination
<i>Mucor luteus</i> Linnemann	99	gleba leśna forest soil	Z-d Botan. AM Wrocław Dpt. of Botany, Medical Academy, Wrocław	"
<i>M. racemosus</i> Fresenius	103	"	"	"
<i>M. hiemalis</i> Wehmer	101	"	"	"
<i>Absidia coerulea</i> Bainier	93	"	"	"
<i>Zygorhynchus moelleri</i> Vuillemin	96	"	"	"
<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll.	49	nasiona kapusty abisyńskiej Abyssinian cabbage seeds	Z-d Fitopatol. AR Wrocław Dpt. of Phytopathology, Coll. of Agric.	"
<i>P. phoeniceum</i> v. Beyma	48	"	"	"
<i>P. albidum</i> Sopp.	47	"	"	"
<i>P. lilacinum</i> Thom.	61	namul w jaskini Kamienne Mleko w Tatrach silt in the cave Kamienne Mleko, the Tatra Mountains	Z-d Mikrobiol. AR Wrocław Dpt. of Microbiology, Coll. of Agric. Wrocław	"

Gatunek Species	Numer ko- lekcji Z-du Botaniki AM Wrocław Number of collection, Dpt. of Bota- ny, Medical Academy, Wrocław	Podłoże, z którego szczep został wyzolowany Medium from which the strain was isolated	Miejsce wyizolowania szczepu Place of isolation	Miejsce oznaczenia szczepu Place of determination
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries	82	namul jaskini Jama Solna w Sudetach silt in the cave Jama Solna, the Sudetes	"	"
Grzybnia płonna Mycelium sterile	92	gleba leśna forest soil	Z-d Botaniki AM Wrocław Dpt. of Botany Medical Academy, Wrocław	"
Mycelium sterile	94	"	"	"
Mycelium sterile	100	"	"	"

20% dekstryn, 40% substancji białkowych, 10% soli mineralnych, 12% wody). Po czterech dniach wzrostu prowadzonego metodą wstrząsania (80 wahań/min) dodawano do kultury 5 g substratu Ia lub Ib rozpuszczonego w 0,5 ml acetonu lub etanolu. Czas fermentacji substratów w temperaturze 27°C i przy pH pożywki ok. 6,5 trwał od 1-9 dni. Po tym okresie przerywano fermentację i ekstrahowano produkty z roztworu metabolicznego chloroformem lub eterem etylowym. Po odparowaniu rozpuszczalnika organicznego mieszaninę produktów badano metodą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym firmy Merck. Eluentami dla mieszaniny produktów z substratu Ia były: benzen, eter etylowy (85:15). Dla mieszaniny produktów z substratu Ib były: benzen, octan etylu (5:1). Chromatogramy rozwijano jedno- lub trójkrotnie i wywoływano kwasem siarkowym z dodatkiem metanolu. Otrzymane plamy porównywano równolegle z plamami oryginalnych związków. Wyjątkowo dla produktu IIb plamę pomarańczową o R_f 0,30 z chromatogramu produktów z Ib przypisano związkowi IIIb na zasadzie analogii z produktem IIIa (mała różnica w budowie chemicznej).

Substrat	Wartość R_f	Kolor plamy
Substrat Ia	0,71	jasnożółty
Produkt IIa	0,25	zielenoszary
Produkt IIIa	0,20	czerwony
Substrat Ib	0,80	żółty
Produkt IIb	0,32	pomarańczowozielony
Produkt IIIb	0,30	pomarańczowy

Własności związków użytych do porównań:

Substrat Ia (secodio): tt. 78-79°C; IR ν nujol 1750, 1720 cm^{-1}

Substrat Ib (etylosecodion): tt. 66-68°C; IR ν nujol 1760, 1710 cm^{-1}

Produkt IIa (ketoalkohol-17 β)13-metylo-3-metoksy-8(14)seco-1,3,5(10),9(11)-estratetraen-14-on-17 β -ol: tt. 110-111°C IR ν nujol 3585, 3440, 1715 cm^{-1} $[\alpha]_D^{20} - 39^\circ$ (c = 1, dioksan)

Produkt IIIa (ketoalkohol-14 α)13-metylo-3-metoksy-8(14)seco-1,3,5(10),9(11)-estratetraen-14 α -ol-17-om: tt. 103°C; IR ν nujol 3450, 1720 cm^{-1} , $[\alpha]_D^{20} + 47^\circ$ (c = 1, dioksan)

Produkt IIb (etylo-ketoalkohol-17 β)13-metylo-3-metoksy-8(14)seco-1,3,5(10),9(11)-estratetraen-14-on-17 β -ol: tt. 88-89°C; IR ν nujol 3500, 1722 cm^{-1} $[\alpha]_D^{20} + 10$ (c = 1, dioksan)

Chromatogramy cienkowarstwowe wykazywały obok wymienionych związków obecność innych produktów o R_f dla związków bardziej polarnych.

Tabela 2 — Table 2
Wzrost badanych szczepów grzybow z rodzaju *Rhodotorula* w zależności od źródeł azotu i węgla
Growth of the tested yeast strains from the genus *Rhodotorula* on various nitrogen azotu i węgla

Numer szczepu Number of strain	4		7		81		82		83		84		85		86		109	
Wzrost po 1, 14, 21 dniach Growth after 1, 14, 21 days*	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
KNO_3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
D-melchioses	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
maltoza	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
sacharoza	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
gluktoza	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
rafinoza	++	++	+++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
laktuloza	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
celuloza bez proteiny	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
witamin without vitamins	—	—	—	—	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	+++	—

* Wartości średnie z czterech powtórzeń — Mean values of four experiments
 Dla określonej słoju, określonej wzrostu kultur podługowano na następującą skalę — The following scale has been used to determine the culture growth
 +++ wyraźny osad, czystość i pierścień na powierzchni pożywki — distinct sediment, cloudiness and a ring on the medium surface
 ++ wyraźny osad, zmniejszona i słaby pierścień na powierzchni pożywki — distinct sediment, cloudiness and a weak ring on the medium surface
 + wyraźny osad, zmniejszony i słaby pierścień na powierzchni pożywki — distinct sediment, cloudiness and a weak ring on the medium surface
 — brak wzrostu — no growth

Tabela 3 — Table 3

Wzrost badanych szczepów grzybów z rodzaju *Candida* w zależności od źródeł azotu i węgla
 Growth of the tested yeast strains from the genus *Candida* on different nitrogen and carbon sources

Numer szczepu Number of strain	A 117			A 126			A 138			A 114			A 122			A 132			A 268		
Wzrost po 7, 14, 21 dniach Growth after 7, 14, 21 days*	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
KNO ₃ (NH ₄) ₂ SO ₄	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
glukoza	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
glukozę	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
sacharoza	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
sacharozę	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
maltoza	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
maltozę	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
laktosa	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
laktosę	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
salicyna	—	+	+	—	—	+	—	—	+	—	+	—	—	+	—	+	—	+	—	+	—
salicynę	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-melibioza	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-melibiozę	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
trehaloza	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
trehalosę	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
L-arabinoza	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
L-arabinozę	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
D-arabinoza	—	—	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabinozę	—	—	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-galaktoza	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
D-galaktozę	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
D-mantol	+	++	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++
D-mantolol	+	++	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++
inocytol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
inosytol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L-sorboza	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L-sorbozę	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
skrobia	—	—	+	+	+	+++	+	+	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
skrobię	—	—	+	+	+	+++	+	+	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* Wartość średnie z czterech powtórzeń — Mean values of four experiments

DYSKUSJA WYNIKÓW BADAŃ

Na podstawie identyfikacji morfologicznej i fizjologicznej stwierdzono, że użyte do badań szczepy należą głównie do rodzajów *Rhodotorula*, *Candida*, *Penicillium* oraz przedstawicieli rzędu *Mucorales*. Szczepy nr 81, 82, 83, 84, 85, 86, 199 wyglądem makroskopowym kolonii, wielkością i kształtem komórek, oraz formą wzrostu były identyczne z oznaczonymi poprzednio (Nespiak i in., 1969) szczepami *Rhodotorula mucilaginosa* (Jörg.) Harrison i *Rhodotorula rubra* (Demme) Lodder (szczepy nr 4 i 7). W wyniku wykonanych testów formy przyswajania źródeł węgla oraz azotu stwierdzono, że dwa pierwsze (nr 4 i 7) zachowały nadal typowe cechy gatunku *R. rubra* (Demme) Lodder, pozostałe zaś stanowią formy gatunku *Rhodotorula glutinis* (Fres) Harrison różniące się pomiędzy sobą formą wzrostu na podłożu bezwitaminowym (tab. 2). Szczepy nr A 114, A 117, A 122, A 128, A 132, A 268 tworzyły kolonie mlecznobiałe lśniąco, gładkie lub pomarszczone. W obrazie mikroskopowym stwierdzono obecność pseudogrybni rozpadającej się na krótkie lub dłuższe fragmenty, lub wykazującej tendencję do rozgałęzień okółkowych z licznymi okrągłymi lub owalnymi, łatwo pączkującymi na obu końcach konidiami, które tworzyły niekiedy krótkie łańcuszki. Wymiary konidiów dla szczepów A 114, A 117, A 122, A 128, A 132, A 138 wahały się w granicach $2,5-6,5 \times 8 \mu\text{m}$. Nie zauważono tworzenia się chlamydospor. W szczepie nr A 268 stwierdzono brak okółkowych rozgałęzień grzybni, a wśród konidiów przeważały owalne lub jajowate o wymiarach $2,5-5,5 \times 1,5 \mu\text{m}$. U wielu z nich stwierdzono obecność jednej lub dwóch kropelek.

Testy przyswajania źródeł węgla i azotu (tab. 3) pozwoliły na zakwalifikowanie badanych szczepów do rodzaju *Candida*. Szczepy nr A 117, A 128, A 138 zaliczono do gatunku *Candida albicans* (Robin) Berkhout. Wykazywały one odchylenia od typu w słabym przyswajaniu D-arabinozy oraz salicyny. W szczepach A 117 i A 138 nie stwierdzono przyswajania skrobi. Szczepy A 117 i A 128 charakteryzowały się silnym przyswajaniem sorbozy. Wśród szczepów asymilujących azot azotanowy trzy (A 114, A 122, A 132) odpowiadały najbardziej cechom gatunku *Candida pelliculosa* Redaelli, którego heterotaliczne grzybnie mogą tworzyć stadium doskonałe — *Hansenula anomala* (Hansen) H. et E. Sydow var. *anomala*. Badane przez nas szczepy charakteryzowały się bardzo słabym przyswajaniem skrobi oraz dość wyraźnym przyswajaniem D-arabinozy. W szczepie A 122 stwierdzono słabe przyswajanie maltozy. Szczep A 268 odbiegający nieco wyglądem komórek od wszystkich pozostałych należał do grupy szczepów przyswajających KNO_3 , różnił się natomiast stopniem przyswajania salicyny oraz sorbozy. Na podstawie wykonanych testów nie udało się go zidentyfikować do gatunku.

Wyniki badań nad zdolnością analizowanych grzybów do przekształceń

Tabela 4 — Table 4

Wyniki redukcji mikrobiologicznej substratu Ia (secodionu)
The results of microbiological reduction of substrate Ia (secodione)

Numer kolekcji Z-u Botanik AM Number of collection Dpt. of Bo- tany, Medi- cal Academy	Gatunki Species	Substrat Ia Substrate Ia	Produkt Product		Inne produkty Other products	Ilość dni reakcji Duration of reaction days	Ilość składników w mieszaninie Number of components in mixture
			IIIa	IIa			
4	<i>Rhodotorula rubra</i>	—	+	—	+	8	2
7	<i>Rhodotorula rubra</i>	—	+	—	—	8	1
81	<i>Rhodotorula glutinis</i>	—	+	+	+	7	3
82	<i>Rhodotorula glutinis</i>	—	+	—	+	8	2
83	<i>Rhodotorula glutinis</i>	—	+	—	+	9	2
84	<i>Rhodotorula glutinis</i>	—	+	—	+	9	2
85	<i>Rhodotorula glutinis</i>	—	+	—	+	8	2
199	<i>Rhodotorula glutinis</i>	—	+	—	+	4	1
86	<i>Rhodotorula glutinis</i>	—	+	—	—	9	1
A 114	<i>Candida pelliculosa</i>	śl	+	+	śl	6	2
A 117	<i>Candida pelliculosa</i>	śl	+	+	śl	6	2
A 122	<i>Candida pelliculosa</i>	+	+	—	+	1	3
A 128	<i>Candida albicans</i>	+	+	—	śl	9	2
A 132	<i>Candida pelliculosa</i>	+	+	+	śl	1	4
A 138	<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	6	3
A 268	<i>Candida sp.</i>	+	+	+	+	4	4
49	<i>Penicillium purpurogenum</i>	—	+	—	+	5	2
48	<i>Penicillium phoeniceum</i>	—	+	—	+	5	2
47	<i>Penicillium albidum</i>	—	+	—	—	5	2
61	<i>Penicillium tilacinum</i>	—	+	—	—	5	1
99	<i>Mucor luteus</i>	—	+	—	—	5	2
103	<i>Mucor racemosus</i>	śl	+	—	+	4	1
101	<i>Mucor hiemalis</i>	—	+	—	—	4	2
93	<i>Absidia coerulea</i>	—	+	—	—	1	1
96	<i>Zygorhynchus moelleri</i>	+	+	—	—	6	2
62	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+	—	—	—	4	2
92	<i>Grzybnia płonna</i>	+	—	—	+	5	1
	<i>Sterile mycelium</i>	—	—	—	+	4	2
94	<i>Grzybnia płonna</i>	—	+	—	+	4	2
	<i>Sterile mycelium</i>	—	—	—	—	3	1
100	<i>Grzybnia płonna</i>	—	+	—	—		
	<i>Sterile mycelium</i>	—	—	—	—		

+ obecny w chromatogramie — present in chromatogram

— nieobecny w chromatogramie — not present in chromatogram

śl — ślady w chromatogramie — traces in chromatogram

Tabela 5 — Table 5 .

Rezultaty redukcji mikrobiologicznej substratu Ib (etylosecodionu)
The results of microbiological reduction of substrate Ib (ethyl-secodione)

Numer kolekcji Z-Botaniki AM	Gatunek Species	Substrat Ib Substrate Ib	Produkt Product		Inne produkty Other products	Ilość dni reakcji Duration of reaction days	Ilość składników w mieszaninie Number of components in mixture
			IIIb	IIB			
4	<i>Rhodotorula rubra</i>	—	+	—	—	4	1
7	<i>Rhodotorula rubra</i>	—	+	—	—	4	1
86	<i>Rhodotorula glutinis</i>	śl	+	—	—	4	1
81	<i>Rhodotorula glutinis</i>	—	—	—	+	7	1
199	<i>Rhodotorula glutinis</i>	śl	+	—	—	4	1
114	<i>Candida pelliculosa</i>	+	+	—	+	9	3
A 132	<i>Candida pelliculosa</i>	+	+	+	+	4	4
A 122	<i>Candida pelliculosa</i>	+	—	—	+	9	2
49	<i>Penicillium purpurogenum</i>	śl	—	—	+	4	1
101	<i>Mucor hiemalis</i>	—	—	—	+	7	1
96	<i>Zygorhynchus moelleri</i>	—	śl	—	+	4	1
92	Grzybnia płonna Sterile mycelium	—	śl	—	+	4	1

+ obecny w chromatogramie — present in chromatogram

— nieobecny w chromatogramie — not present in chromatogram

śl — ślady w chromatogramie — traces in chromatogram

secodionu i etylosecodionu (substratów Ia i Ib) ukazują tabele 4 i 5. Wynika z nich, że wszystkie szczepy z rodzaju *Rhodotorula* przekształcają substrat Ia całkowicie w ciągu jednego do ośmiu dni, czego dowodem jest brak materiału wyjściowego w chromatogramach. Transformacja prowadzi w zasadzie do produktu IIIa — redukcja grupy ketonowej na C-14 do alkoholi o konfiguracji 14a. Jeden tylko szczep (nr 81) z gatunku *Rhodotorula glutinis* metabolizował substrat do obu produktów, wykazując tym niestereospecyficzność działania.

Szczepy z rodzaju *Candida* nie wykazują takiej selektywności redukcji. Hodowle średnio sześciodniowe prowadzą z reguły do powstawania obu produktów IIa i IIIa. Redukuje się zarówno keton na C-17, jak i na C-14. Chromatogram wykazuje w niektórych wypadkach obecność nieprzereagowanego materiału wyjściowego. Widoczne są również produkty bardziej polarne sugerujące powstawanie dwualkoholi.

Gatunki z rodzaju *Penicillium* charakteryzują się stosunkowo dużą selektywnością działania. Chromatogramy ich wykazują powstawanie wyłącznie produktu IIIa, przy obecności materiału wyjściowego. Brak u nich natomiast redukcji do IIa.

Gatunki z rodzaju *Mucor* charakteryzują się również wysoką specyficznością redukcji produktu IIIa, bez pozostałości materiału wyjściowego. Gatunki pozostałych badanych grzybów redukują wyjściowe substraty również głównie do substratów IIIa i IIIb.

Przedstawione próby transformacji obydwóch substratów przy użyciu przebadanych szczepów grzybów wykazują ważną ich zdolność do redukcji ketonu na węglu 14. Jest to prawdopodobnie główny kierunek metabolizmu secodionu, jak i etylosecodionu uzyskany przy pomocy tej grupy mikroorganizmów. Zbyt szczupły materiał nie pozwala na wysunięcie ogólniejszych wniosków mających zastosowanie w chemotaksonomii grzybów. Dostarcza on jednak danych do ewentualnych dalszych rozważań nad tym zagadnieniem.

LITERATURA

- Achrem A. A., Titov J. A., 1970, Steroidy i mikroorganizmy, Izd. Nauka, Moskwa.
Dmochowska J., Siewiński A., Nespiak A., 1969, Microbial Transformation I. Microbial Transformation of androstenedione and testosterone by *Rhodotorula mucilaginosa* (Jörg.) Harrison, Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol. 17, 135.
Dmochowska J., Siewiński A., Nespiak A., 1970, Patent PRL nr 59682, 9.V. Sposób równoczesnego otrzymywania androsteronu i epiandrosteronu.
Gibian H., Kieslich K., Koch H. J., Kosmol H., Rufer C., Schröder E., Vössing R., 1967, Patent NRD nr 55014, 5.IV. Verfahren zur Herstellung optisch aktiver Antipoden.

- Greenspan G., Buzby G. C., Beton J. L., 1970, Patent francuski, 2.I.
Nouveau procédé de préparation de seco-steroides.
- Kosmol H., Kieslich K., Vössing R., Koch H. J., Petzoldt K.,
Gibian H., 1967, Mikrobiologische stereospezifische Reduktion von 3-Methoxy-
8,14-seco-1,3,5,(10),9-östratetraen-14,17-dion. Ann. Chem. 701, 199.
- Lodder J., The Yeast, North Holland Publ. Comp. Amsterdam-London.
- Nespiak A., Peczyńska W., Siewiński A., 1969, Microbial Transform-
ations II. Reduction of androstene-5-3 β -ol-17-one by *Rhodotorula* strains, Arch.
Immunol. et Ther. Exp. 17, 443.
- Zycha H., Siepmann R., Linnemann G., 1969, *Mucorales*. J. Cramer,
Lehre.