



# Università degli Studi di Ferrara

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
"Scienze Chimiche"**

**CICLO XXIX**

Coordinatore Prof. Carlo Alberto Bignozzi

**Biotrasformazioni di acidi biliari: valorizzazione dei  
prodotti di "scarto" nella lavorazione di acido  
ursodesossicolico. Parte II**

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/06

**Dottorando**

Dott. Irene Rugiero

---

*(firma)*

**Tutore**

Prof. Alessandro Medici

---

*(firma)*

**Co-tutore**

Prof. Paola Pedrini

---

*(firma)*

Anni 2014/2016

## INDICE

<b>Capitolo 1. Introduzione</b>	pag. 3
Acidi biliari: funzioni e sintesi	pag. 4
Acido ursodesossicolico: proprietà e produzione industriale	pag. 14
Biotrasformazioni di acidi biliari	pag. 22
Gli attinomiceti	pag. 36
Obiettivi della ricerca	pag. 40
<b>Capitolo 2. Biotrasformazioni di acidi biliari</b>	pag. 43
Isolamento di attinomiceti	pag. 44
Screening biotrasformativo	pag. 49
Parte sperimentale	pag. 58
<b>Capitolo 3. Biotrasformazioni di acidi biliari: sintesi di HADD</b>	pag. 93
Allegato A	pag. 99
Allegato B	pag.103
<b>Capitolo 4. Biotrasformazioni di acidi biliari: sintesi di bendigoli</b>	pag. 107
Allegato A	pag. 116
Allegato B	pag. 123
<b>Capitolo 5. Conclusioni</b>	pag. 127
<b>Capitolo 6. Appendice</b>	pag. 131
<b>Capitolo 7. Bibliografia</b>	pag. 136
<b>Ringraziamenti</b>	pag. 141

# *CAPITOLO 1*

---

## **Introduzione**

## Acidi biliari: funzioni e sintesi

La bile è una soluzione acquosa isotonica prodotta dagli epatociti e costituita principalmente da acqua (95%), elettroliti, lipidi (acidi biliari, colesterolo e fosfolipidi), proteine e pigmenti (bilirubina); il suo pH è compreso tra i valori di 6.8 e 8. La quantità di bile, prodotta giornalmente, varia tra i 500 e 1500 mL.

In condizioni di digiuno la bile si accumula nella cistifellea, dove viene progressivamente concentrata (fino al 10%); il riassorbimento coinvolge l'acqua, il cloruro di sodio e i bicarbonati, mentre sali biliari, pigmenti e lipidi non vengono riassorbiti e si concentrano sempre più. Le differenti composizioni della bile del fegato e della cistifellea sono riportate nella Tabella 1 [1].

**Tabella 1.** Composizione della bile

	<b>Bile del fegato</b>	<b>Bile della cistifellea</b>
Acqua	97.5 g/dL	92 g/dL
Sali biliari	1.1 g/dL	6 g/dL
Bilirubina	0.04 g/dL	0.3 g/dL
Colesterolo	0.1 g/dL	0.3-0.9 g/dL
Acidi grassi	0.12 g/dL	0.3-1.2 g/dL
Lecitina	0.04 g/dL	0.3 g/dL
Na <sup>+</sup>	145 mEq/L	130 mEq/L
K <sup>+</sup>	5 mEq/L	12 mEq/L
Ca <sup>2+</sup>	5 mEq/L	23 mEq/L
Cl <sup>-</sup>	100 mEq/L	25 mEq/L
HCO <sup>3-</sup>	28 mEq/L	10 mEq/L

La secrezione della bile è fondamentale per la digestione e l'assorbimento intestinale dei lipidi e delle vitamine liposolubili, grazie alla presenza dei sali biliari. Questi ultimi sono derivati polari del colesterolo e sono molecole anfipatiche, in quanto è possibile evidenziare una parte della molecola lipofila e una idrofila.

Dopo essere stati immessi nell'intestino, i sali biliari vanno ad inserirsi nelle gocce lipidiche con la loro porzione liposolubile. In questo modo riducono la coesione tra i vari trigliceridi, emulsionandoli in piccole micelle ed aumentando l'area accessibile a specifici enzimi pancreatici, detti lipasi, deputati alla digestione lipidica.

L'intero processo, che prende il nome di emulsione, è irreversibile poiché la riaggregazione lipidica viene impedita dalla carica elettrica negativa associata alla componente idrosolubile dei sali biliari che stabilizza l'emulsione respingendo le varie micelle. Inoltre, le micelle contenenti gli acidi biliari favoriscono l'assorbimento dei grassi portandosi, assieme alle lipasi, vicino alla membrana dei microvilli intestinali [2].

Oltre alla funzione di emulsionare i grassi, gli acidi biliari rappresentano la via principale mediante la quale il colesterolo è metabolizzato nel corpo, in quanto circa la metà del colesterolo prodotto dal corpo viene utilizzato per la sintesi degli acidi biliari [3]. Un essere umano adulto secerne nell'intestino da 12 a 18 g di acidi biliari al giorno. Circa il 95% di questi sono riassorbiti mediante trasporto attivo nell'ileo e ritrasportati verso il fegato per essere di nuovo secreti nel sistema biliare e nella cistifellea [4].

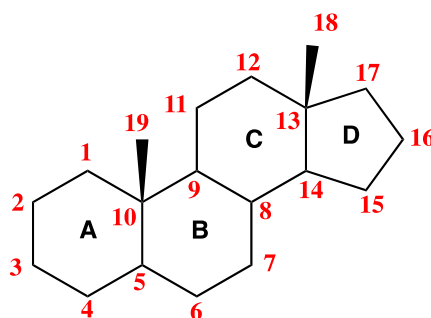
Gli acidi biliari hanno anche la funzione di eliminare numerose sostanze endogene ed esogene dal sangue, come ormoni e farmaci o i loro rispettivi cataboliti. Un esempio è rappresentato dalla bilirubina, uno dei prodotti finali della demolizione dell'emoglobina [5]. Infine gli acidi biliari hanno funzione ormonale ed agiscono attraverso specifici recettori. Essi sono in grado di regolare l'attività di alcuni enzimi e dei canali ionici (proteine transmembrana che consentono il passaggio di ioni tipo  $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$ ) e la sintesi di diverse sostanze, inclusi alcuni acidi grassi endogeni. Sono ad esempio i ligandi fisiologici dei recettori X farnesoidi (FXR) che intervengono nell'omeostasi dei lipidi e del glucosio [6].

Le varie attività svolte dagli acidi biliari all'interno dell'organismo sono collegate alla particolare struttura che queste molecole possiedono; esiste una stretta relazione tra funzione fisiologica e struttura che viene definita dalle proprietà chimico-fisiche proprie di queste molecole. In particolar modo la loro natura anfipatica ne garantisce la capacità di trasportare molecole lipidiche. La natura anfipatica è data dalla presenza di due regioni:

- una polare costituita dai gruppi ossidrilici presenti in diverso numero e posizione ed  $\alpha$ -orientati;
- una non polare composta, identificabile con i sostituenti metilici  $\beta$ -orientati.

La struttura degli acidi biliari è quella tipica degli steroidi, alcoli solidi ampiamente distribuiti nel regno animale e vegetale, la cui struttura base contiene il sistema tricyclico del

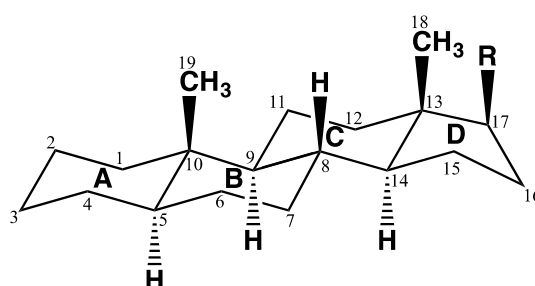
fenantrene (anelli A, B, C) coniugato con un anello a cinque termini (anello D): i quattro anelli costituiscono l'anello ciclopentanperidrofenantrenico. In Figura 1 è riportata la numerazione degli atomi di carbonio della struttura steroidea, usando come riferimento la struttura del colesterolo, dal quale procede la biosintesi dei principali steroidi endogeni. Nella molecola steroidica i metili in C-10 e C-13, indicati rispettivamente come C-19 e C-18, sono detti angolari e sono perpendicolari al piano medio della molecola.



**Figura 1.** Numerazione dell'anello steroideo

Per convenzione, negli steroidi i gruppi che si trovano dalla stessa parte dei metili angolari sono indicati come sostituenti  $\beta$ , mentre quelli che stanno dalla parte opposta vengono denominati sostituenti  $\alpha$ .

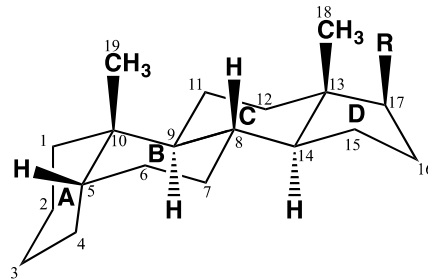
L'attività biologica degli steroidi dipende dal tipo di sostituenti, dal grado e tipo di saturazione ed anche dalla stereochimica del nucleo steroideo. Gli anelli cicloesani A, B e C degli steroidi hanno conformazione a sedia, e mentre le giunzioni degli anelli B, C e D sono sempre *trans* (in *trans* gli idrogeni in C-8 e C-9 e il metile in C-13 e l'idrogeno in C-14), la giunzione tra gli anelli A e B può essere sia *cis* sia *trans*. L'idrogeno in C-5, nel caso di giunzione *trans* tra gli anelli A e B, è orientato verso il basso: questo tipo di giunzione identifica gli steroidi della serie  $5\alpha$  (Figura 2).



**Figura 2.** Steroidi della serie  $5\alpha$

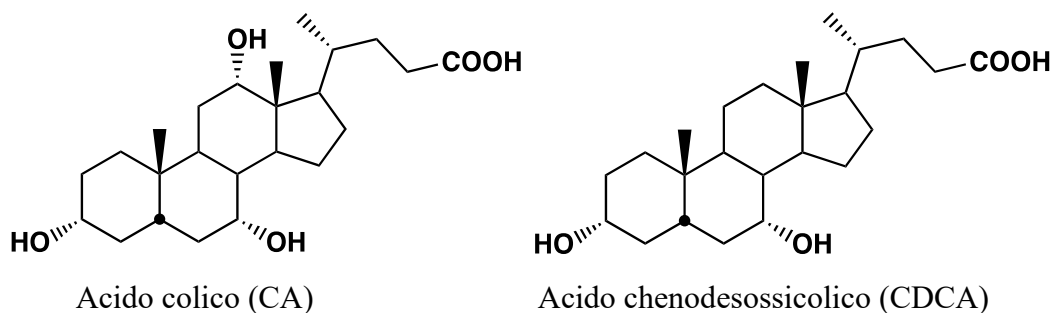
Un esempio di giunzione *trans* è quella presente nell'idrocortisone e nel testosterone. Negli acidi biliari la giunzione tra gli anelli A e B è *cis*, in questo caso l'idrogeno in C-5 è dalla

stessa parte dei metili angolari (Figura 3), questo tipo di giunzione identifica gli steroidi della serie 5 $\beta$ .



**Figura 3.** Steroidi della serie 5 $\beta$

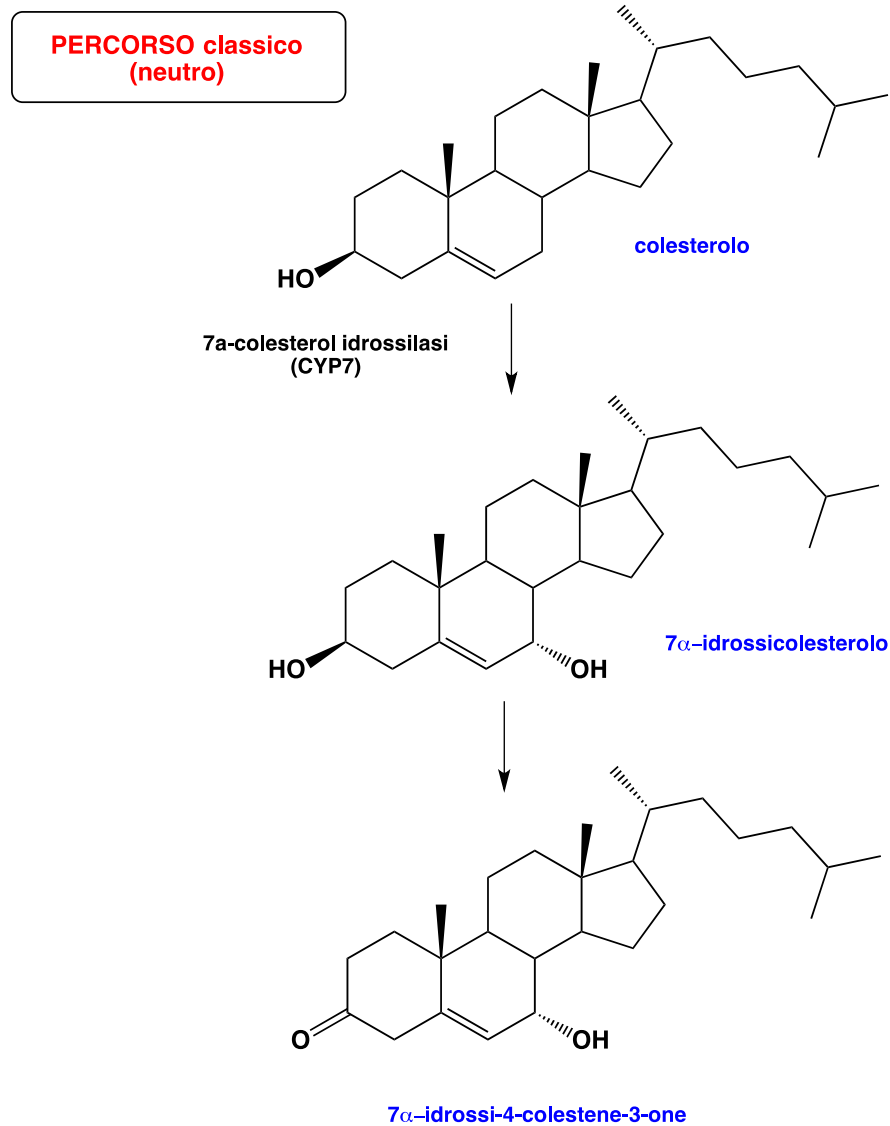
Gli acidi biliari, sono i principali prodotti della degradazione catabolica e di eliminazione del colesterolo e sono sintetizzati esclusivamente negli epatociti [7]. Nella trasformazione del colesterolo in acidi biliari primari, quali l'acido colico (CA) e chenodesossicolico (CDCA) (Figura 4), sono coinvolti numerosi enzimi. Molti di questi enzimi sono citocromi P450 (CYP) in grado di idrossilare la molecola steroidea.



**Figura 4**

La via classica (o neutra) di sintesi degli acidi biliari comincia con la modifica dell'anello steroideo ed è seguita da reazioni di scissione della catena laterale [8].

Il primo enzima che interviene in questa via metabolica è anche quello limitante la velocità di reazione. Si tratta della colesterolo 7 $\alpha$ -idrossilasi (CYP7A1), un citocromo P450 localizzato nel reticolo endoplasmatico liscio degli epatociti. Questo enzima determina l'idrossilazione del colesterolo in posizione C-7, convertendolo in 7 $\alpha$ -idrossicolesterolo (Schema 1).



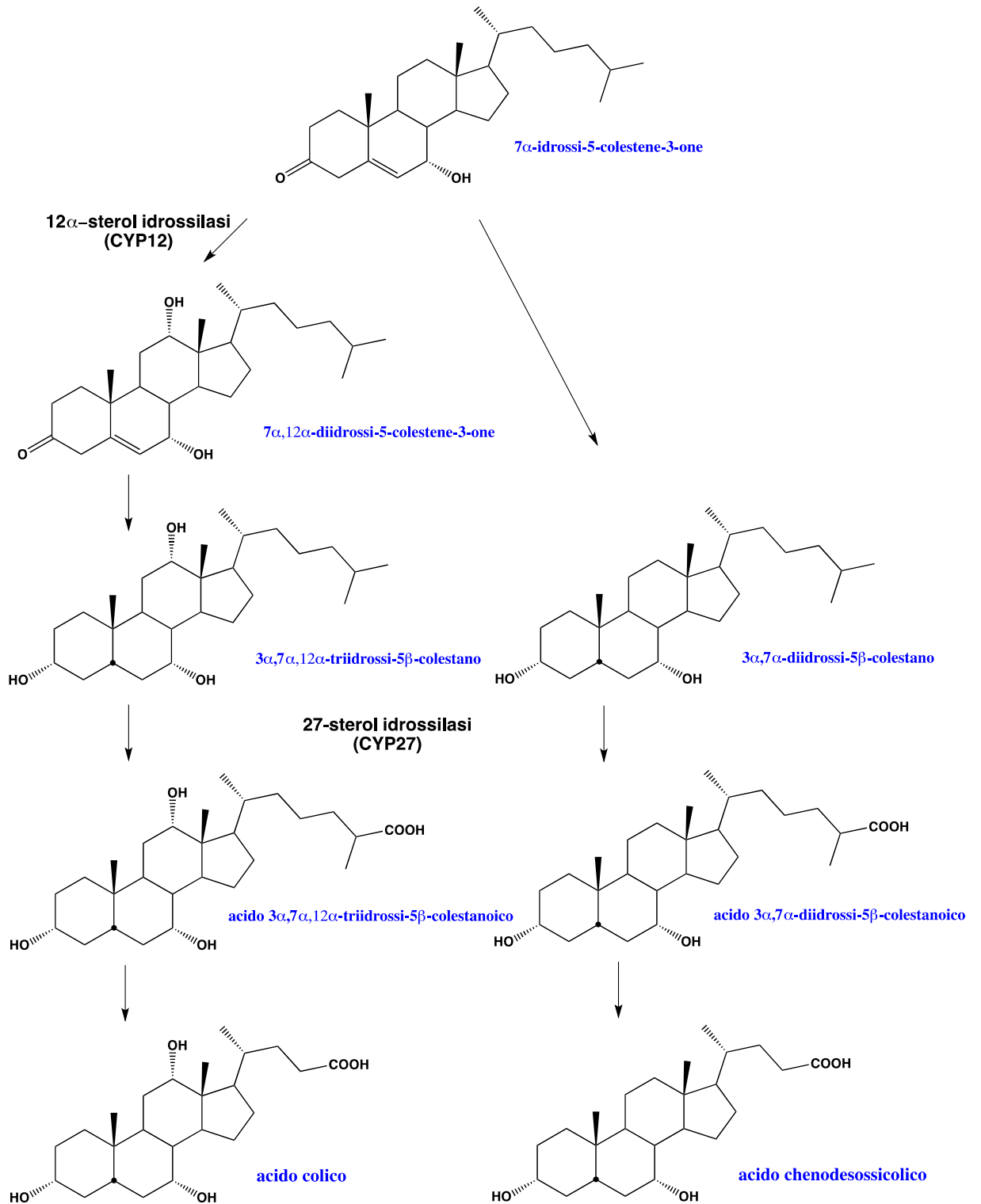
**Schema 1**

Questo enzima viene inibito dal monossido di carbonio; per svolgere la sua attività necessita di NADPH, ossigeno, lecitina e NADPH-citocromo P450-reduttasi e sembra che risenta di un meccanismo a feedback negativo da parte del flusso di acidi biliari idrofobici che ritornano al fegato tramite la circolazione portale .

Il 7α-idrossi-colesterolo viene convertito in 7α-idrossi-4-colestene-3-one da una 3β-idrossi-Δ<sup>5</sup>-C<sub>27</sub>-steroidi ossido-reduttasi/isomerasi. Il 7α-idrossi-4-colestene-3-one è un intermedio nella biosintesi degli acidi biliari che può essere convertito sia nel precursore dell'acido colico sia in quello dell'acido chenodesossicolico.

Nella via che porta alla formazione dell'acido colico, esso viene idrossilato nella posizione C-12 da una sterolo 12α-idrossilasi (CYP12) (Schema 2).





**Schema 2**

Successivamente l'intermedio viene ridotto a 5 $\beta$ -colestano-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triolo da due enzimi citosolici:  $\Delta^4$ -3-chetosteroidi-5 $\beta$ -riduttasi e 3 $\alpha$ -idrossisteroidi deidrogenasi.

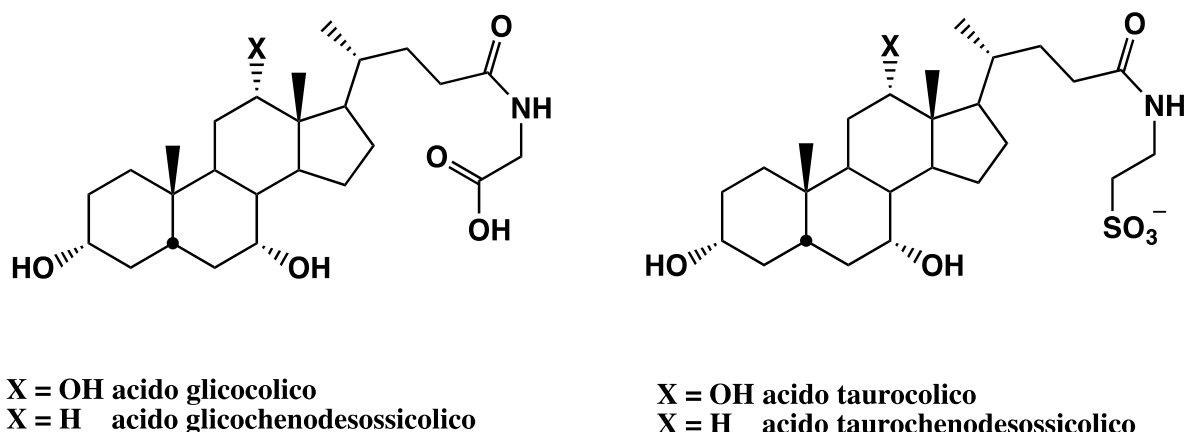
Una via alternativa è quella in cui il  $7\alpha$ -idrossi-4-colestene-3-one viene ridotto ad acido  $3\alpha,7\alpha$ -diidrossi- $5\beta$ -colestanoico. Lo step iniziale nell'ossidazione della catena laterale coinvolge l'idrossilazione in posizione C-27 che è catalizzata dalla sterolo 27-idrossilasi (CYP27). Questo enzima ha la speciale abilità di idrossilare il gruppo metilico C-27 a gruppo  $\text{CH}_2\text{OH}$  e successivamente di convertire quest'ultimo a  $\text{COOH}$ .

Il passaggio successivo nella scissione della catena laterale coinvolge il legame dell'acido  $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -triidrossi- $5\beta$ -colestanoico o  $3\alpha,7\alpha$ -diidrossi- $5\beta$ -colestanoico (via alternativa) al coenzima A tramite un coenzima A ligasi ATP-dipendente.

Lo step finale nell'ossidazione della catena laterale avviene principalmente nei perossisomi del fegato e si pensa sia simile alla  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi. Essa comprende l'introduzione di un doppio legame tra C-24 e C-25 tramite un'ossidasi, l'idratazione e deidrogenazione per formare osso-derivati attraverso una idratasi/deidrogenasi bifunzionale seguita dalla tiolisi che porterebbe alla formazione di propionil-CoA e colil-CoA o chenodesossicolil-CoA, passando quindi da steroidi C27 ad acidi biliari C24.

Prima della secrezione da parte degli epatociti, gli acidi biliari liberi vengono coniugati in posizione C-24 alla glicina o alla taurina, reazione catalizzata da una amminoacido-N-aciltransferasi.

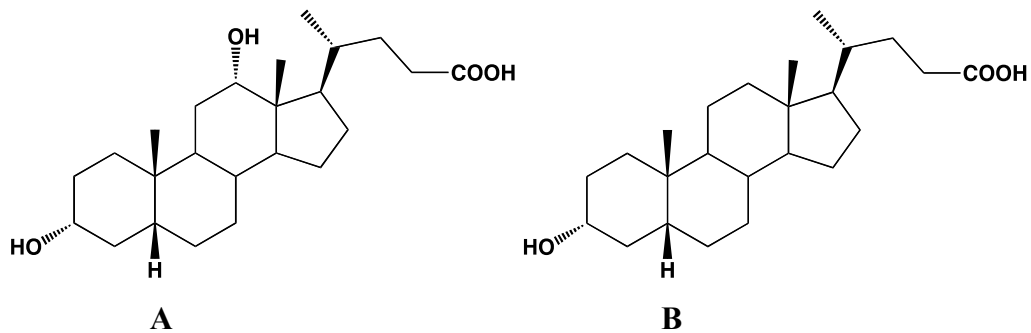
L'acido colico e l'acido chenodesossicolico coniugati con taurina o glicina mediante legame ammidico al carbossile C-24 derivanti dalle vie biosintetiche appena descritte sono acidi biliari primari. Negli esseri umani, l'acido glicocolico e taurocolico, e l'acido glicochenodesossicolico e taurochenodesossicolico (Figura 5) sono i principali sali biliari e sono approssimativamente uguali in concentrazione [8].



**Figura 5**

La coniugazione trasforma gli acidi biliari in molecole che sono impermeabili all'epitelio del tratto biliare e del piccolo intestino distale, un fattore che contribuisce alla loro elevata concentrazione micellare nella bile e allo scarso contenuto intestinale.

Quando i sali biliari sono secreti nel lume intestinale, la parziale deidrossilazione dovuta all'azione batterica e la rimozione dei gruppi della glicina e taurina, comporta la formazione degli acidi biliari secondari, acido desossicolico e litocolico (Figura 6), derivati 7 $\alpha$ -deidrossilati rispettivamente dell'acido colico e chenodesossicolico.



**Figura 6.** Acido desossicolico (A) e acido litocolico (B)

Gli acidi biliari coniugati sono in gran parte riassorbiti dall'intestino distale dopo la secrezione nell'intestino prossimale e ritrasportati, tramite il flusso sanguigno, nel fegato. Qui vengono convogliati di nuovo nella bile. Il risultato finale è l'accumulo di un insieme di sali biliari che circolano tra l'intestino e il fegato (**circolazione enteroepatica**).

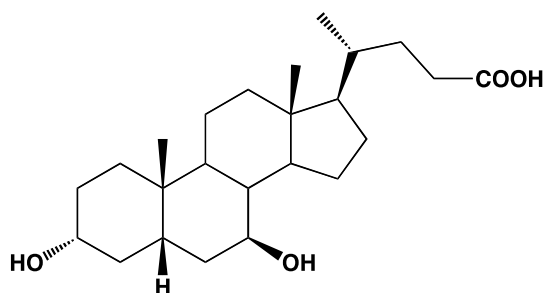
La frazione di sali biliari che non viene riassorbita dal piccolo intestino distale viene persa attraverso l'escrezione fecale. La quantità escreta di acido biliare è equivalente alla quantità biosintetizzata a partire dal colesterolo.

La pKa degli acidi biliari non coniugati varia tra 5 e 6.5 mentre il pH del duodeno varia tra 3 e 5, quindi quando gli acidi biliari non coniugati si trovano nel duodeno, sono quasi sempre protonati e quindi relativamente insolubili in acqua. Gli acidi biliari coniugati con amminoacidi hanno la pKa più bassa (1-4) e quindi si trovano quasi sempre nella loro forma deprotonata: sono molto più solubili in acqua e maggiormente in grado di svolgere la loro funzione fisiologica di emulsionare i grassi [9].

Come già accennato, la principale modificazione dei batteri intestinali sugli acidi biliari primari è la deidrossilazione sul C-7, preceduta dalla deconiugazione. Gli acidi biliari secondari così formati, possono essere ulteriormente processati nel fegato e nell'intestino, formando altri tipi di acidi biliari.

In molte specie di vertebrati avviene di nuovo l'idrossilazione sul C-7, che riporta alla formazione dell'acido biliare di partenza, ma l'idrossilazione può anche verificarsi in altre posizioni. Inoltre gli enzimi batterici possono anche ossidare o epimerizzare gruppi idrossilici (da  $\alpha$ -idrossi a  $\beta$ -idrossi o viceversa) [10].

Ad esempio il gruppo ossidrilico in C-7 dell'acido chenodesossicolico viene epimerizzato passando dalla configurazione  $\alpha$  a  $\beta$  e dando origine all'*acido ursodesossicolico* (Figura 7).



**Figura 7.** Acido ursodesossicolico

Anche l'acido litocolico subisce un'ulteriore trasformazione ad *acido sulfolitocolico*, considerato un acido biliare terziario perché deriva dalla trasformazione di uno secondario. Questa reazione avviene nel fegato dove l'acido litocolico, di cui è nota l'epatotossicità, viene solfato dagli epatociti, diventando maggiormente idrosolubile e più facilmente eliminabile con l'urina.

L'insieme di reazioni metaboliche degli enzimi epatici e della flora intestinale genera oltre 20 diversi tipi di acidi biliari secondari che assicurano la perfetta solubilizzazione ed assorbimento di un gran numero di molecole lipofile [11].

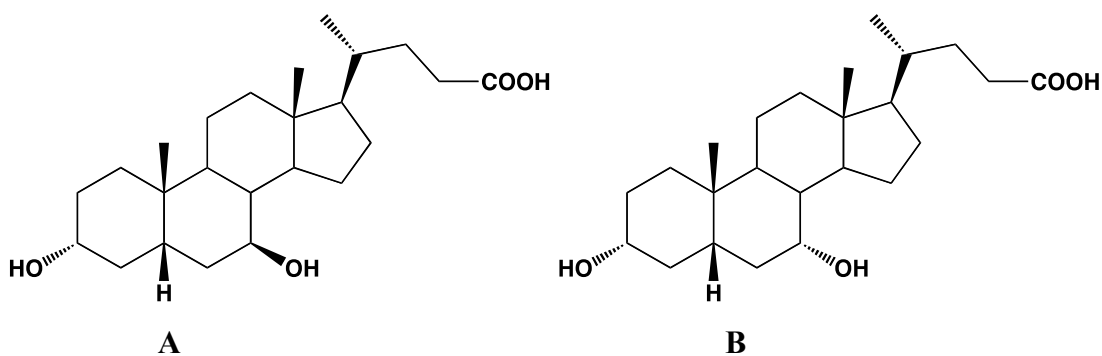
Nella Tabella 2 sono riportati i principali acidi biliari.

**Tabella 2.** Acidi biliari

<b>Nomenclatura sistematica (IUPAC)</b>	<b>Nome comune</b>	<b>Sigla</b>
Acido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triidrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido colico	CA
Acido glico 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triidrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido glicocolico	GCA
Acido tauro 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triidrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido tauro-colico	TCA
Acido 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diidrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido chenodesossicolico	CDCA
Acido glico 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diidrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido glico-chenodesossicolico	GCDCA
Acido tauro 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diidrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido tauro-chenodesossicolico	TCDCA
Acido 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diidrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido desossicolico	DCA
Acido glico 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diidrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido glico-desossicolico	GDCA
Acido tauro 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diidrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido tauro-desossicolico	TDCA
Acido 3 $\alpha$ -idrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido litocolico	LCA
Acido glico 3 $\alpha$ -idrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido glico-litocolico	GLCA
Acido tauro 3 $\alpha$ -idrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido tauro-litocolico	TLCA
Acido 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diidrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido ursodesossicolico	UDCA
Acido glico 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diidrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido glico-ursodesossicolico	GUDCA
Acido tauro 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diidrossi-5 $\beta$ -colanico	Acido tauro-ursodesossicolico	TUDCA

## Acido ursodesossicolico: proprietà e produzione industriale

L'acido ursodesossicolico (UDCA) ed il suo coniugato tauroursodesossicolico (TUDCA), sono gli unici acidi biliari presenti in commercio e utilizzati sia nella terapia della calcolosi biliare che nelle malattie croniche colestatiche. Altri acidi biliari quali l'acido deidrocolico e il chenodesossicolico (CDCA) sono stati abbandonati rispettivamente per la loro scarsa di attività e per gli effetti collaterali provocati. L'utilizzo di UDCA è ormai entrato nella pratica clinica da molti anni; inizialmente veniva utilizzato per la dissoluzione di calcoli biliari, per poi essere anche impiegato nella dispepsia, in patologie pediatriche, e giungere ad un utilizzo nella terapia della cirrosi biliare primitiva e di alcune forme di epatopatie colestatiche. Queste ultime due applicazioni terapeutiche, sono le stesse riconosciute ormai da centinaia di anni nella medicina orientale. Se da un lato il CDCA presenta come effetto collaterale un aumento della transaminasi in pazienti trattati cronicamente, l'UDCA è in grado di ridurre le transaminasi in pazienti con epatopatie colestatiche. Questo caso mette in rilievo una situazione quasi paradossale nella quale, due acidi biliari molto simili (epimeri) presentano proprietà e tossicità contrastanti (Figura 8). Studi chimico-fisici su una serie rappresentativa di acidi biliari naturali hanno evidenziato come minime modifiche strutturali, quali il numero degli ossidrili, la loro posizione e orientamento, siano in grado di causare delle modifiche sulle loro proprietà detergenti e sulla loro lipofilia [12].



**Figura 8.** UDCA (A), CDCA (B)

L'acido ursodesossicolico rappresenta solo una piccola percentuale degli acidi biliari totali presenti nella bile umana mentre è presente in discreta quantità nella bile dell'orso, da cui deriva il nome. L'estrazione in continuo con l'utilizzo di cateteri da orsi in cattività viene adottata da diversi paesi asiatici quali la Cina, il Vietnam e la Corea, tanto da creare le così

dette “fattorie della bile”. Non esistono dati ufficiali, visto che tale pratica è illegale, ma si stima che più di 20.000 orsi vengano torturati per l'estrazione della loro bile che poi viene impiegata come farmaco e per molti altri usi tradizionali nei paesi asiatici.

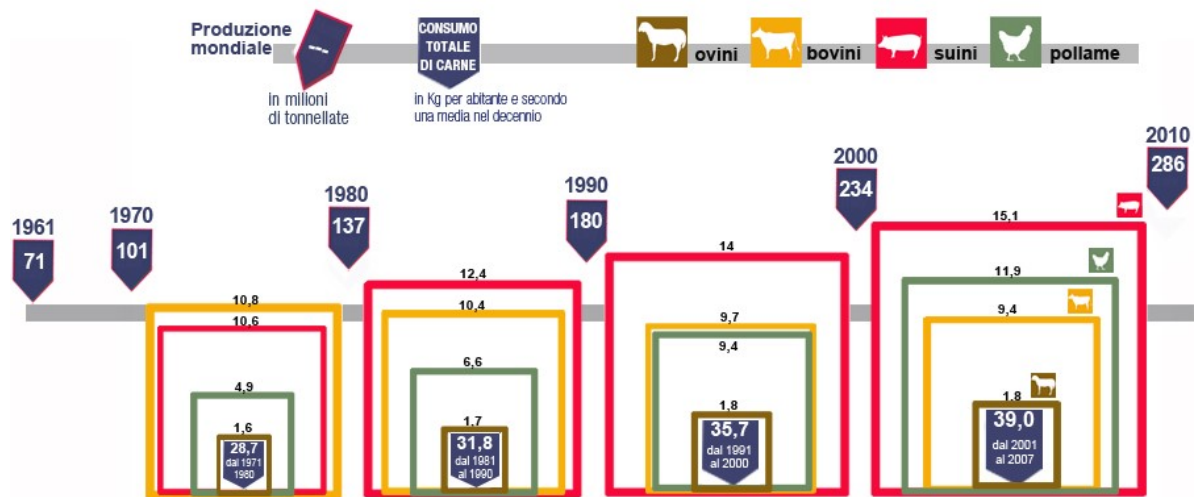
Nei paesi occidentali, dove non sarebbero pensabili pratiche del genere, vi è la necessità di produrre l'UDCA in grande quantità e questo ha portato alla messa a punto di metodologie di sintesi che utilizzano come prodotti di partenza i taurinati e i glicinati dell'acido colico e chenodesossicolico.

Quindi, la produzione su larga scala dell'acido ursodesossicolico usa come prodotti di partenza gli acidi biliari presenti nella bile degli animali destinati alla macellazione. Nella Tabella 3 sono riportate le percentuali dei vari acidi biliari presenti nella bile degli animali destinati alla macellazione.

**Tabella 3.** Contenuto di acidi biliari nelle bili degli animali da macello

<b>Acido biliare</b>	<b>Bile bovina</b>	<b>Bile suina</b>	<b>Bile di pollo</b>
<b>Acido colico (CA)</b>	<b>45-50%</b>		<b>9%</b>
<b>Acido chenodesossicolico (CDCA)</b>	<b>10-15%</b>	<b>25-30%</b>	<b>85%</b>
<b>Acido desossicolico (DCA)</b>	<b>20%</b>		
<b>Acido iodesossicolico (YDCA)</b>		<b>40%</b>	
<b>Acido iocolico (YCA)</b>		<b>10%</b>	

Secondo le statistiche FAO (l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura), nel 2010 sono state consumate 286 milioni di tonnellate di carne, ovvero 42 chili annui a testa per ogni abitante del mondo. Ogni cittadino USA mangia in media 120 chili di carne all'anno, quasi il triplo della media mondiale e quasi il quadruplo della media dei Paesi in via di sviluppo (32 chili). Sono però queste realtà a registrare i tassi di crescita dei consumi più elevati. Anche il mix di carni consumate sta cambiando (Figura 9). Se negli anni 70 la tipologia più consumata era quella bovina, oggi complice il boom economico asiatico, il vero boom è quello dei suini e del pollame. Infatti, i tassi di crescita più imponenti sono quelli cinesi: nel 1961 i chili annui consumati procapite erano meno di 4, oggi sono più di 58.



**Figura 9.** Aumento del consumo di carne a livello mondiale

L'aumento del consumo di carne, e conseguentemente dei capi macellati, è direttamente riconducibile all'incremento della produzione di bile e quindi di acidi biliari. Secondo i dati della FAO, la produzione mondiale di carne è aumentata dell'1,1% nel 2014 rispetto al 2013, portando a 311,8 milioni di tonnellate (l'unità di misura è il peso carcassa equivalente) il volume del mercato della carne a livello mondiale. Guardando in particolare alla zona UE, la FAO indica un leggero aumento della produzione che arriverà a toccare i 45 milioni di tonnellate.

Parlando di pollame, a questa categoria appartiene la principale importazione di carne nei paesi della UE con il 50% del totale del mercato della carne. Il motivo è certamente la competitività del prezzo rispetto ad altri tipi di carne a livello internazionale. Per quanto riguarda le esportazioni, il 64% del totale esportato dall'Unione Europea è costituito dalle carni suine. Il Vecchio continente è anche il terzo più grande produttore di carni bovine del mondo con 7.4 milioni di tonnellate.

Per la sintesi di acido ursodesossicolico, viene utilizzata prevalentemente la bile bovina che ricca in chenodesossicolico, ed acido tauroursodesossicolico ed è prodotta principalmente nei paesi occidentali. Visto il diverso consumo di carni fatto nel mondo e di conseguenza di bile prodotta, nei paesi asiatici la matrice di partenza per la produzione di acido ursodesossicolico è quella proveniente da suini e pollame.

La cistifellea di un bovino mediamente contiene 150-200 ml di bile liquida. A livello mondiale (dati FAO 2011) vengono macellati circa 320 milioni di capi bovini all'anno.



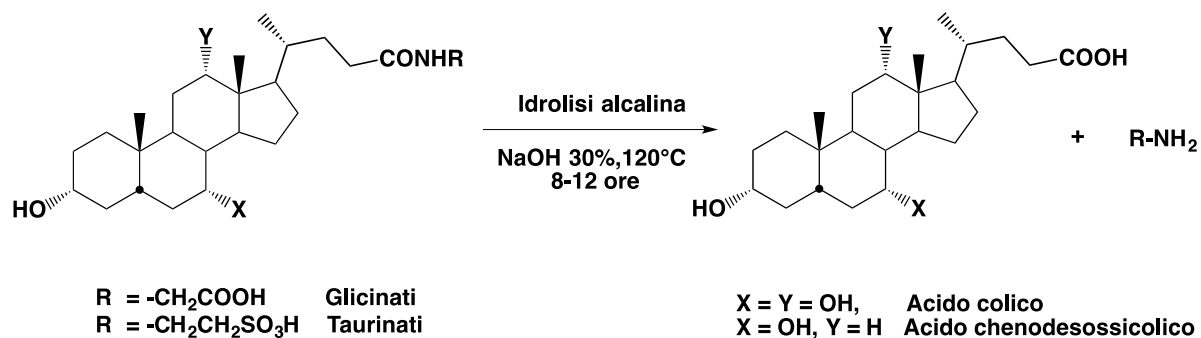
Considerando che il contenuto in acidi biliari della bile bovina è circa il 7-10% e che la quantità teorica di bile bovina prodotta è di circa 48 milioni di litri a livello mondiale, gli acidi biliari prodotti ammontano a 4.8 tonnellate. Dopo il processo di macellazione la bile del bovino viene conservata con una soluzione di idrossido di sodio diluita oppure con una soluzione di formaldeide per evitare che gli acidi biliari vengano degradati dai batteri presenti nella bile. Tale lavorazione viene effettuata prima del processo di concentrazione della bile stessa effettuata generalmente a pressione ambiente o sottovuoto per eliminare la maggior parte di acqua (il contenuto di acqua della bile liquida è l'85% p/p ca.) ed arrivare ad un contenuto minimo di acido colico del 33% p/p ed un contenuto di acqua minore od uguale al 25%. Una volta concentrata la bile viene stoccata in fusti di ferro o acciaio dal volume di ca. 200 litri.

Nei paesi orientali, Cina in primo luogo, la produzione di UDCA deriva dalla lavorazione dell'acido chenodesossicolico, principale componente della bile di pollo e dalla bile di maiale. In Cina si macellano circa 9 miliardi di polli l'anno. Ogni cistifellea di pollo contiene mediamente 2.5 ml di bile, il contenuto di acidi biliari nella bile di pollo è circa il 10%. La difficoltà nell'utilizzo della bile di pollo per la produzione di AUDC sono le piccole dimensioni dell'organo che li contiene (cistifellea), che rende difficile il maneggiamento da parte degli operatori e quindi la raccolta.

Per quanto riguarda i suini vengono macellati circa 1.4 miliardi di capi l'anno dai quali si ricavano 69 milioni di litri di bile (considerando circa 50 ml di bile/maiale). Il contenuto di acidi biliari nella bile suina è del 10% per cui si ottengono 6.9 tonnellate di acidi biliari. Il contenuto di acido chenodesossicolico nella bile suina è del 25% circa ma il suo recupero come prodotto puro dalla miscela di acidi biliari di questa bile risulta essere piuttosto difficoltoso.

Ad oggi, gli acidi biliari utilizzati per sintetizzare chimicamente acido ursodesossicolico sono acido colico e acido chenodesossicolico quindi, tutti gli altri acidi biliari vengono considerati prodotti di scarto. Una sfida delle moderne biotecnologie è proprio quella di valorizzare tali prodotti di scarto.

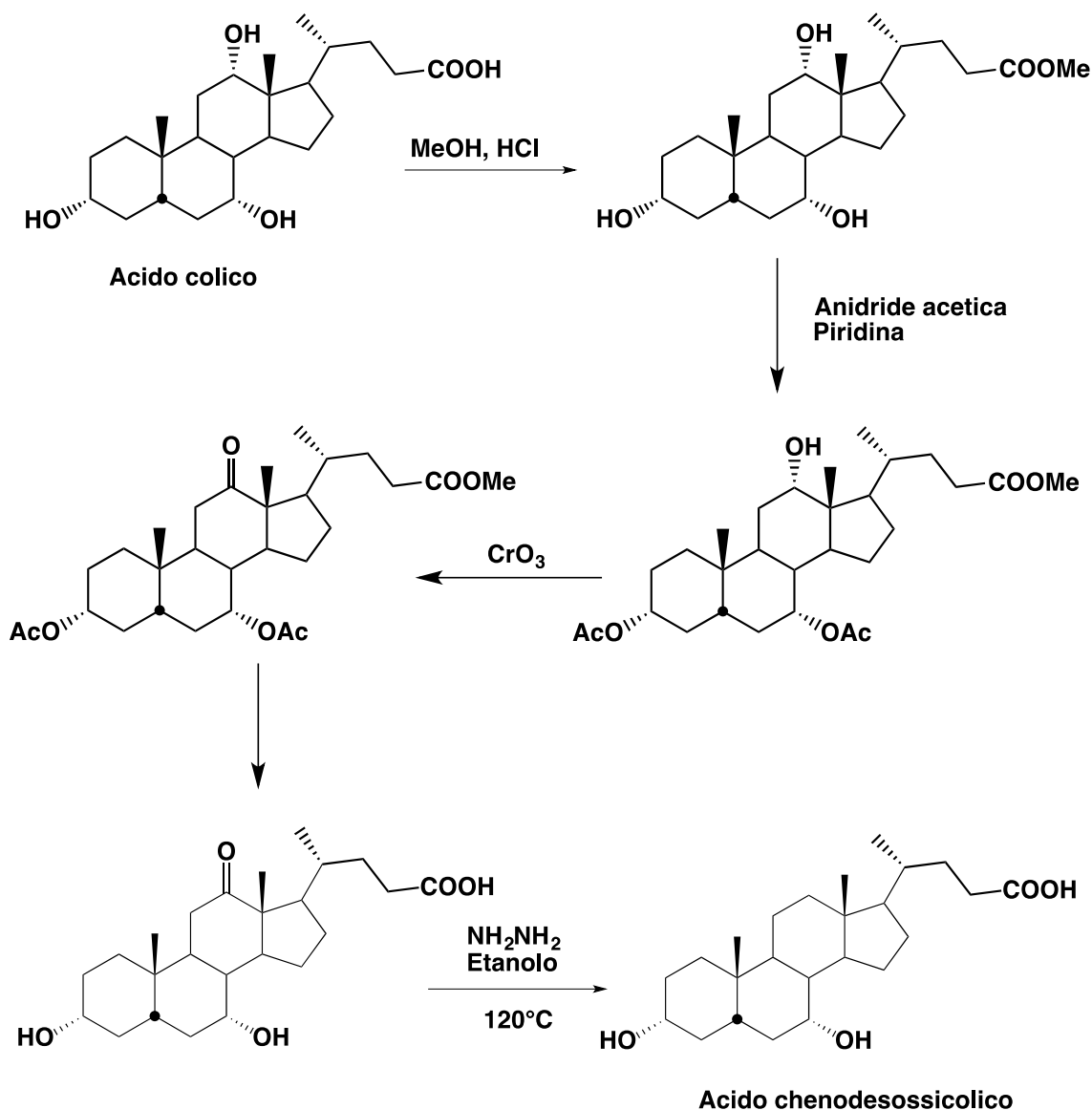
Se si considera la bile bovina che è attualmente il prodotto di partenza più utilizzato per la sintesi di UDCA, il primo passaggio per ottenere gli acidi biliari liberi, che fisiologicamente sono coniugati con taurina e glicina, consiste nell'idrolisi alcalina che prevede l'utilizzo di grosse quantità di NaOH al 30% ed alte temperature (120° C) per tempi molto lunghi (8-12 ore) (Schema 3).



**Schema 3**

Negli anni '50 e '60, Fieser e Hofmann hanno riportato un procedimento chimico in cinque tappe per la preparazione dell'acido chenodesossicolico dall'acido colico [13,14] (Schema 4):

1. Esterificazione con metanolo e conseguente formazione di metilcolato;
2. Acetilazione regioselettiva con piridina e anidride acetica degli ossidrili in posizione C-3 e C-7 (protezione dei gruppi funzionali);
3. Ossidazione in C-12 con CrO<sub>3</sub>;
4. Idrolisi degli esteri metilico e acetilici;
5. Riduzione di Wolff-Kishner per ottenere l'acido chenodesossicolico.

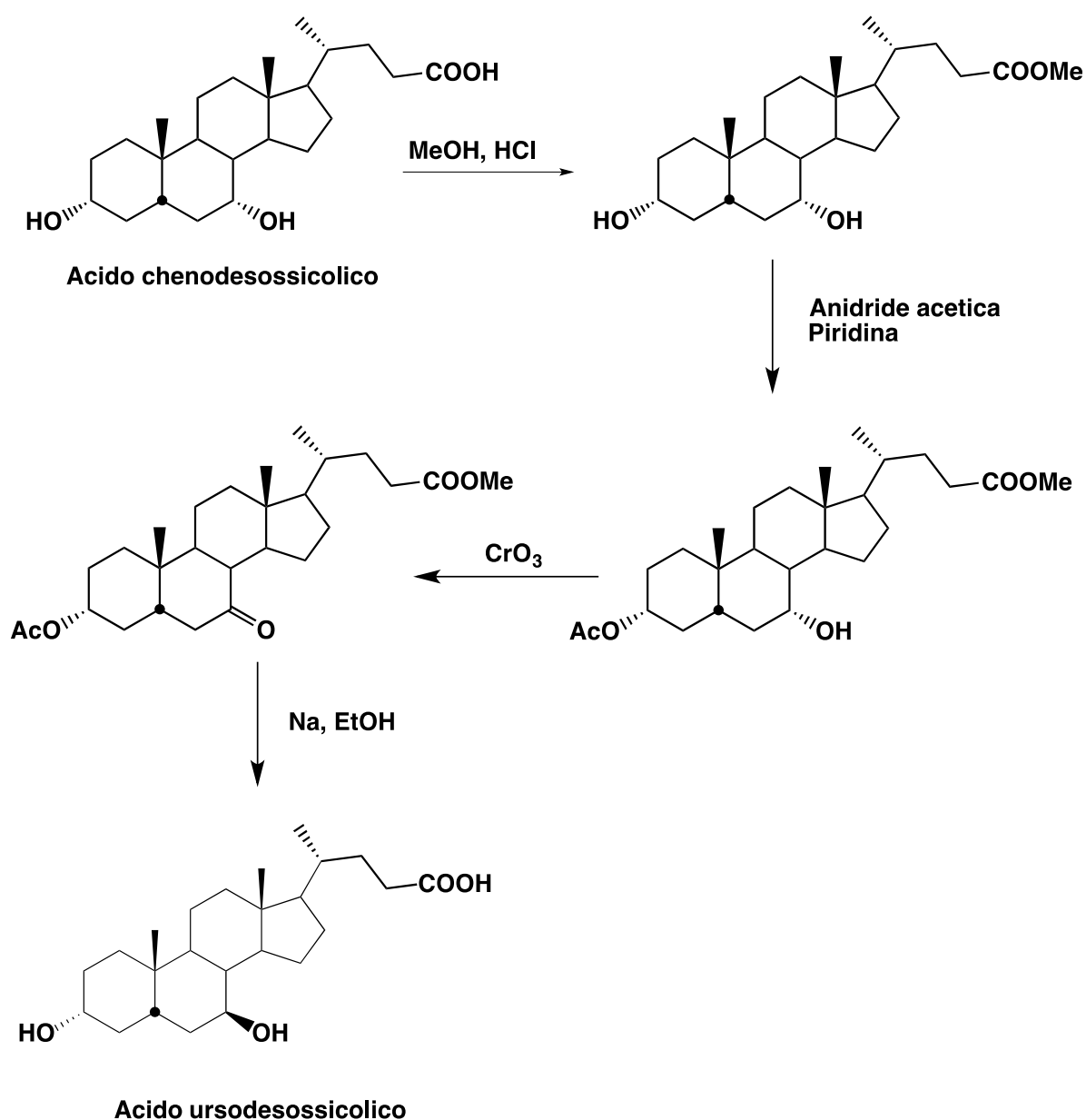


Schema 4

L'acido ursodesossicolico è quindi preparato industrialmente dall'acido chenodesossicolico attraverso una sequenza di reazioni chimiche, in cui le ultime due tappe coinvolgono l'inversione selettiva  $\alpha/\beta$  dell'ossidrilile in posizione 7 (Schema 5). Sono previsti quattro passaggi:

1. Esterificazione con metanolo e formazione di metilchenossicolato;
2. Acetilazione regioselettiva con piridina e anidride acetica dell'ossidrilile in posizione C-3;
3. Ossidazione in C-7 con CrO<sub>3</sub>;

## 4. Riduzione stereoselettiva del gruppo chetonico in C-7 con Na.



Schema 5

In conclusione emerge come la sintesi organica finalizzata all'ottenimento dei substrati di interesse (UDCA e CDCA) da taurinati e glicinati di acido colico sia lunga, complicata ed in qualche misura rischiosa a causa della natura e della tossicità dei reagenti impiegati. L'utilizzo di elevate concentrazioni di NaOH per l'idrolisi della bile è senza dubbio un processo che comporta ingenti spese per lo smaltimento dei prodotti di rifiuto.

Alle successive reazioni di sintesi chimica, che non permettono un facile controllo della stereochimica, si aggiungono inoltre reazioni secondarie con conseguente formazione di sottoprodotti, i quali rendono necessaria la purificazione dei prodotti ottenuti ad ogni step di reazione. Tutto ciò allunga i tempi, diminuisce le rese e contribuisce all'aumento dei costi di produzione.

La necessità di metodologie alternative per l'ottenimento di UDCA e CDCA maggiormente sicure ed economicamente più convenienti ha spinto molti ricercatori a dedicarsi ad un approccio microbiologico ed enzimatico.

Per questo motivo le biotrasformazioni, sono diventate un valido strumento per i chimici sintetici, non solo per il minor impatto ambientale che deriva dalla loro applicazione, ma sempre più spesso essa rappresenta un'alternativa economicamente vantaggiosa rispetto ai processi chimici classici. Le trasformazioni enzimatiche effettuate da enzimi purificati o cellule intere come catalizzatori, sono sempre più utilizzate per la produzione di una moltitudine di prodotti chimici.

## **Biotrasformazioni di acidi biliari**

Una biotrasformazione è una reazione accelerata da catalizzatori biologici (cellule intere o enzimi isolati) definiti biocatalizzatori. I biocatalizzatori possono essere utilizzati per processi di trasformazione a scopo preparativo. In altri termini, le biotrasformazioni, possono essere utilizzate per promuovere reazioni volte all'accumulo di molecole organiche, e per questo motivo le biotrasformazioni possono essere utilizzate per applicazioni industriali. Le biotrasformazioni, rappresentano dei processi di vitale importanza, se si pensa che tutti i composti organici e molti inorganici sono costantemente soggetti a trasformazioni e turnover.

Le biotrasformazioni sono un valido strumento per i chimici sintetici, non solo per il minor impatto ambientale che deriva dall'utilizzo di microrganismi e/o enzimi, ma sempre più spesso esse rappresentano un'alternativa economicamente vantaggiosa rispetto ai processi chimici classici. I processi biotrasformativi sfruttano la chemoselettività, la regioselettività e specialmente la stereoselettività che cellule intere ed enzimi (puri o parzialmente purificati) possiedono. La produzione di molecole come singoli enantiomeri o diastereoisomeri è di importanza crescente non solo in campo farmaceutico ma anche nei settori della chimica fine, agroalimentare e dei materiali [15]. In particolare, le esigenze che regolano la commercializzazione di farmaci richiedono studi tossicologici per ogni impurezza presente in concentrazioni superiori all'1%, compresi possibili enantiomeri e diastereoisomeri del principio attivo.

L'alta selettività, inoltre, è molto auspicabile in sintesi chimica in quanto può offrire diversi benefici come la riduzione o nessun uso di protettori di gruppi funzionali, le reazioni collaterali ridotte al minimo, una semplice separazione dei prodotti e un minor numero di problemi ambientali. Quindi, l'alta efficienza catalitica e le condizioni operative blande, risultano molto attraenti nella messa in atto di strategie commerciali.

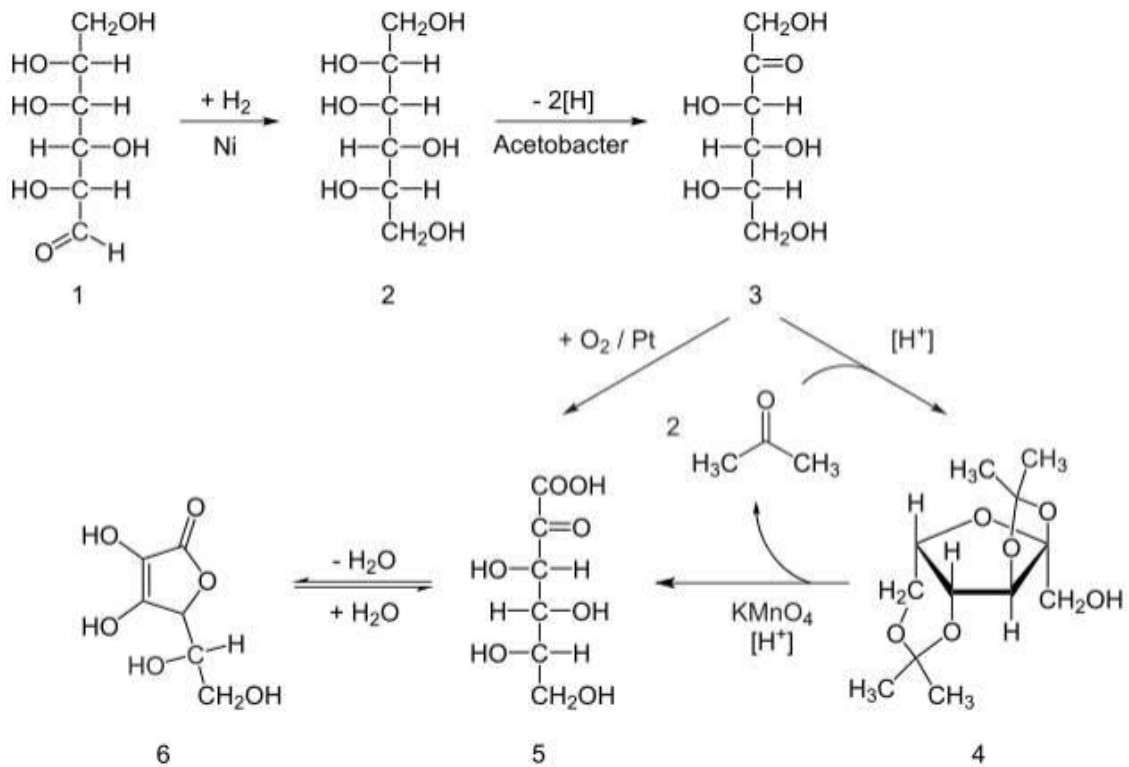
Nonostante tutti i vantaggi elencati, naturalmente esistono degli svantaggi: limitati campi operativi, l'inibizione da prodotto e le reazioni in soluzioni acquose sono stati spesso considerati come i più gravi inconvenienti dei biocatalizzatori. Molti di questi inconvenienti, tuttavia, risultano essere dei pregiudizi. Per esempio, molti enzimi utilizzati commercialmente mostrano eccellente stabilità con emivita di mesi o addirittura anni in condizioni di processo [16]. La varietà delle reazioni biocatalizzate è molto vicina a quella riscontrabile in un testo di chimica organica. E' necessario comunque distinguere tra classi

di biotrasformazioni sviluppate come metodi preparativi veri e propri e reazioni esistenti in natura come parte di un cammino biosintetico, ma non ancora di interesse applicativo. Nella Tabella 4 viene riportato il grado di sviluppo delle varie classi di biotrasformazioni [15]. Attualmente, circa 100 differenti processi biocatalitici sono utilizzati nel settore farmaceutico, chimico, agricolo e alimentare. Nonostante questi successi, tuttavia, il vasto potenziale della biocatalisi deve ancora essere pienamente realizzato.

**Tabella 4.** Grado di sviluppo applicativo di biotrasformazioni.

Grado di sviluppo	Tipo di reazione
Elevato	Riduzione di chetoni; idrolisi di esteri, ammidi, glucosidi; formazione di esteri e ammidi e glicosidi; idrolisi di nitrili; isomerizzazione di zuccheri; idrossilazioni
Medio/alto	Diidrossilazioni; reazioni di Baeyer-Villiger; ossidazioni di alcoli primari; idrolisi di epossidi; formazione di cianidrine; condensazione aciloiniche e alcoliche; amminazioni riduttive di carbonili
Medio/basso	Riduzioni di doppi legami; idratazione e addizione elettrofila di doppi legami; determinazione di nuclei aromatici; rottura di legami eterici; epossidazioni
Molto basso	Riduzione di carbossili; formazione di legami eterici, riduzione di ammine; idrolisi di acetali; reazioni pericicliche

La maggior parte delle applicazioni delle biotrasformazioni riguarda lo sviluppo di sintesi chemo-enzimatiche. Con questo termine si intende una strategia sintetica nella quale sono coinvolti passaggi di chimica organica convenzionale e passaggi di biotrasformazione. Un classico esempio è la sintesi chemo-enzimatica dell'acido ascorbico, dove vengono impiegate cellule di batteri acetici per l'ossidazione regio- e stereoselettiva del D-sorbitolo a L-sorbitolo convertito successivamente in acido ascorbico mediante trasformazioni chimiche (Schema 6).



**Schema 6**

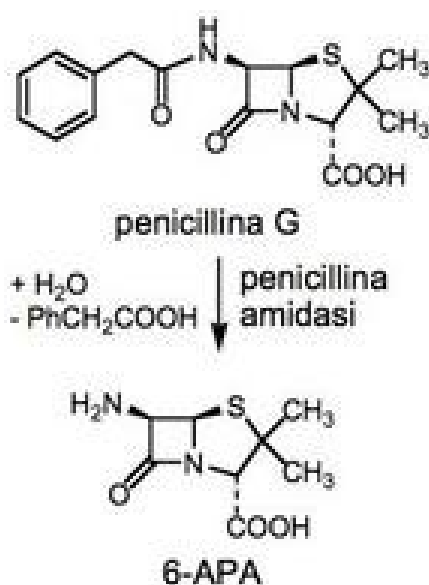
La potenzialità dei microrganismi nel biotrasformare composti organici naturali e non, è data dal fatto che la trasformazione/degradazione rappresenta per loro una possibilità di utilizzo del composto organico sia come fonte energetica ma anche per la costruzione di strutture cellulari. La grande varietà di microrganismi in grado di biotrasformare composti organici e non, viene utilizzata per applicazioni biotecnologiche. La scelta del biocatalizzatore (cellula intera o enzima isolato) dipende dal tipo di reazione che si vuole catalizzare. La produzione di biocatalizzatori prevede in ogni caso l'uso di cellule intere.

Le cellule intere possono essere utilizzate come colture in crescita, questo soprattutto nella fase di screening. Il substrato può essere aggiunto in diverse fasi di crescita allo scopo di verificare in quale fase si produce la più alta attività desiderata. Questo tipo di tecnica però, non è indicata per biotrasformazioni su scala industriale. Questo perché, la variabilità metabolica durante la crescita cellulare può portare a problemi di recupero del prodotto dovuti alla presenza di altri metaboliti. Per questo motivo, le cellule intere sono impiegate come cellule non proliferanti. Queste vengono ottenute eliminando il brodo di coltura e sospendendo la biomassa in tamponi contenenti sali minerali essenziali per la funzionalità enzimatica. Le cellule intere possono essere anche utilizzate come cellule secche, ottenute per liofilizzazione che ne permettono il facile utilizzo e lunga conservazione.



Oltre alle cellule intere, nei processi industriali di biotrasformazione vengono utilizzati gli enzimi isolati dall'organismo produttore con diverso grado di purificazione. Il grado di purificazione è funzione del costo del prodotto desiderato. Naturalmente, l'utilizzo di enzimi isolati garantisce una maggiore specificità di produzione del prodotto [15].

Una delle trasformazioni più note catalizzata da un enzima isolato è rappresentata dall'idrolisi selettiva della penicillina G, mediante penicillina amidasi, per produrre l'acido 6-amminopennicilannico (6-APA) il precursore fondamentale per la sintesi di penicilline semisintetiche (Schema 7)



Schema 7

Una delle problematiche associate all'utilizzo di enzimi è la loro solubilità in acqua, che rende più difficile il loro recupero e l'allestimento di un processo in continuo, è per questo motivo vengono utilizzati enzimi immobilizzati. Le principali tecniche di immobilizzazione sono:

- enzimi legati ad un supporto;
- enzimi aggregati (cross-linked);
- enzimi intrappolati.

Date queste premesse, la produzione di farmaci steroidei e ormoni è uno degli esempi più consolidati e di maggiore successo dell'applicazione delle biotrasformazioni microbiche. Ampi programmi di screening sono stati sviluppati a partire dagli anni 50. Gli steroidi

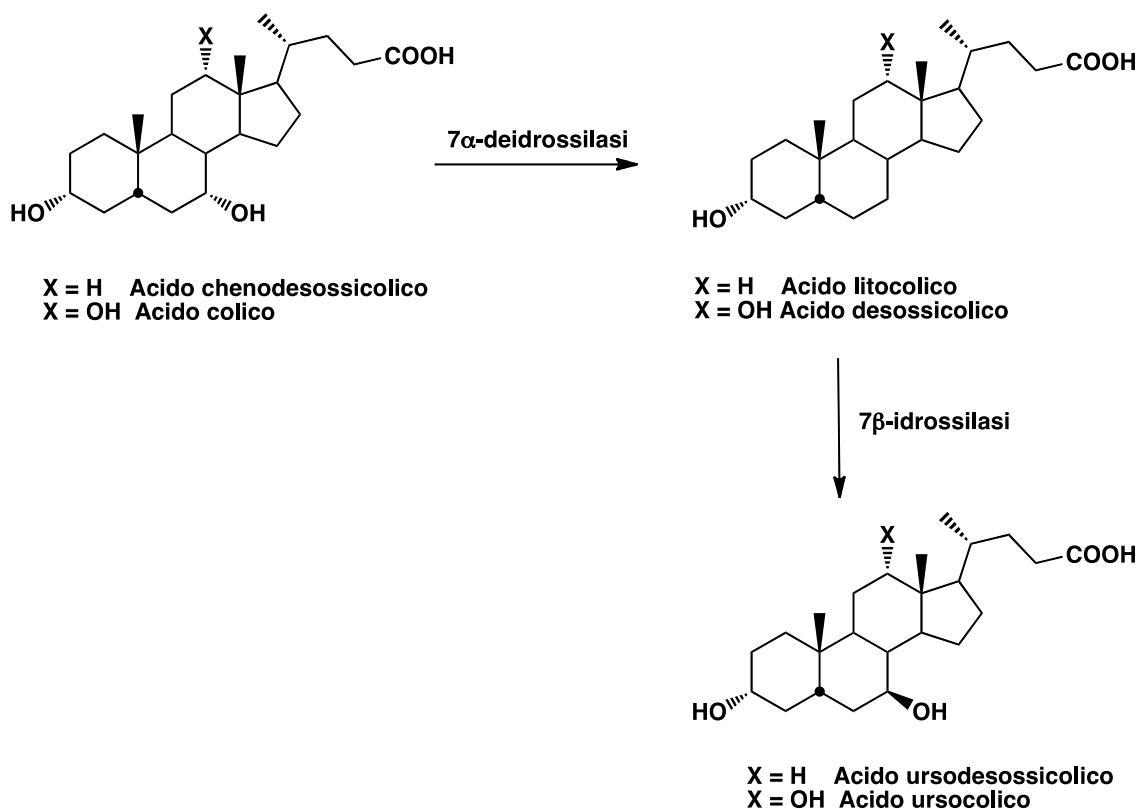
costituiscono una classe vasta e diversificata di composti naturali. Molti steroidi sono disponibili a basso costo, basti pensare agli acidi biliari di scarto che derivano dalla lavorazione della bile per la produzione dell'acido ursodesossicolico oppure agli steroli derivati dai vegetali. Molte di queste molecole vengono utilizzate come substrati per ottenere molecole di interesse farmacologico, quali ormoni steroidei e steroidi con importanti attività antiinfiammatoria.

Le biotrasformazioni di molecole steroidee di maggiore importanza sono:

- idrossilazione;
- degradazione e deacetilazione;
- ossidazione di funzioni alcoliche
- deidrogenazione (introduzione di doppi legami).

### *Idrossilazioni*

L'idrossilazione avviene attraverso l'introduzione di un atomo di ossigeno in un legame C-H. Questo tipo di reazione permette di creare intermedi chiave per la sintesi di molecole di interesse terapeutico. Un esempio molto importante è costituito dalla possibilità di idrossilare in posizione C-7 l'acido litocolico e l'acido desossicolico, ad oggi considerati prodotti di scarto della lavorazione della bile. In particolare l'idrossilazione di acido litocolico porta ad acido chenodesossicolico ( $7\alpha$ -idrossilazione) o ad acido ursodesossicolico ( $7\beta$ -idrossilazione). Per quanto riguarda l'acido desossicolico una  $7\alpha$ -idrossilasi permette di ottenere acido colico mentre una  $7\beta$ -idrossilasi fornisce acido ursocolico. Queste reazioni hanno grande importanza perché permettono di utilizzare questi prodotti di bassissimo valore commerciale per la sintesi di UDCA (Schema 8).



**Schema 8**

Estesi screening hanno permesso di selezionare diversi ceppi microbici con i quali è possibile ottenere l'idrossilazione di quasi tutti gli ossidrili nelle diverse posizioni della struttura steroidea. Alcuni esempi sono dati da *Absidia cerulea* e *Rhizoctonia solani* che sono in grado di idrossilare l'acido litocolico in C-7: in questo caso si ottengono anche prodotti di idrossilazione in C-1 ed in C-6 [17].

Altro risultato è quello ottenuto con *Gibberella zeae* VKM F-2600, fungo filamentoso recentemente testato sull'acido litocolico, che ha dimostrato avere attività  $\beta$ -idrossilasica in posizione C-7. Tale biotrasformazione, effettuata utilizzando cellule intere, genera oltre ad UDCA anche altri prodotti di ossidazione dello stesso UDCA come il 3-cheto derivato [18]. Molti brevetti sono stati depositati riguardo la reazione di idrossilazione in C-7 in quanto direttamente collegata alla sintesi di questo principio attivo [19-21]

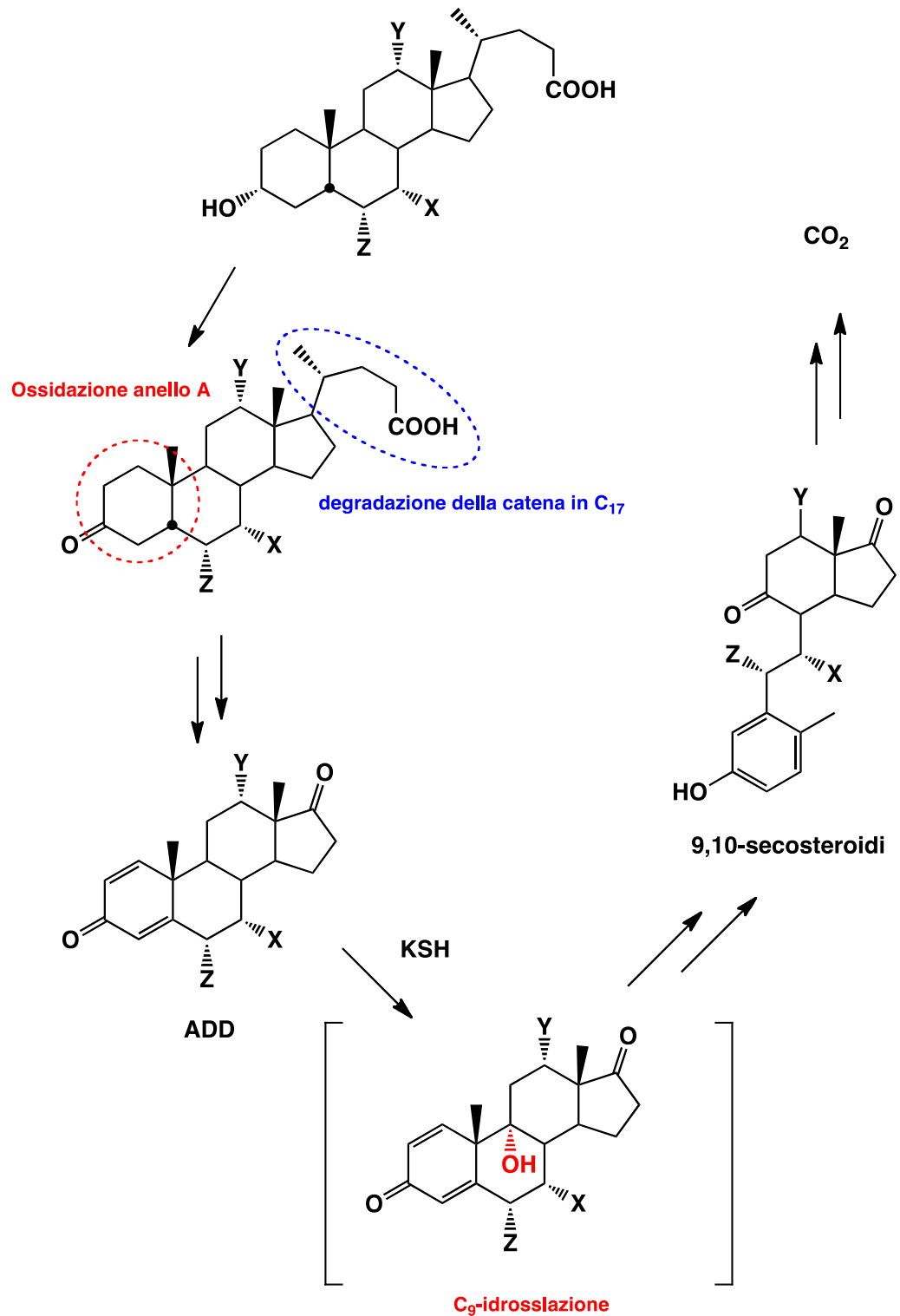
### ***Degradazione e deacetilazione***

La trasformazione di steroidi in composti farmacologicamente attivi prevede in molti casi la degradazione parziale o totale della catena laterale alifatica [7,22]. Batteri provenienti da diversi gruppi, con diversa filogenetica, hanno dimostrato di possedere la capacità di degradare parzialmente o completamente gli acidi biliari (acido colico, chenodesossicolico,

desossicolico e iodesossicolico) e usarli come fonti di carbonio e di energia. Rispetto alla degradazione di altri composti naturali, quali composti aromatici, relativamente poco si sa circa la degradazione batterica di acidi biliari. Fino ad oggi, è stato descritto in dettaglio un solo percorso metabolico mediato da batteri per la degradazione aerobica di acidi biliari: questo è chiamato percorso del 9,10-secosteroide [23]. Il percorso 9,10-secosteroide inizia con reazioni ossidative che interessano il gruppo ossidrilico in posizione C-3 dell'anello A dell'acido biliare: questa reazione è catalizzata da 3 $\alpha$ -HSDH, enzima NAD(P) dipendente. La successiva deidrogenazione dei 3-cheto derivati **2a-d** ad opera di  $\Delta^{1,4}$ -3-chetosteroide deidrogenasi e la rimozione graduale della catena laterale in C-17 portano alla produzione di idrossiandrosta-1,4-diene-3,17-dioni **3a-d** (HADD), che sono gli intermedi principali di questa via metabolica di degradazione (Schema 9)

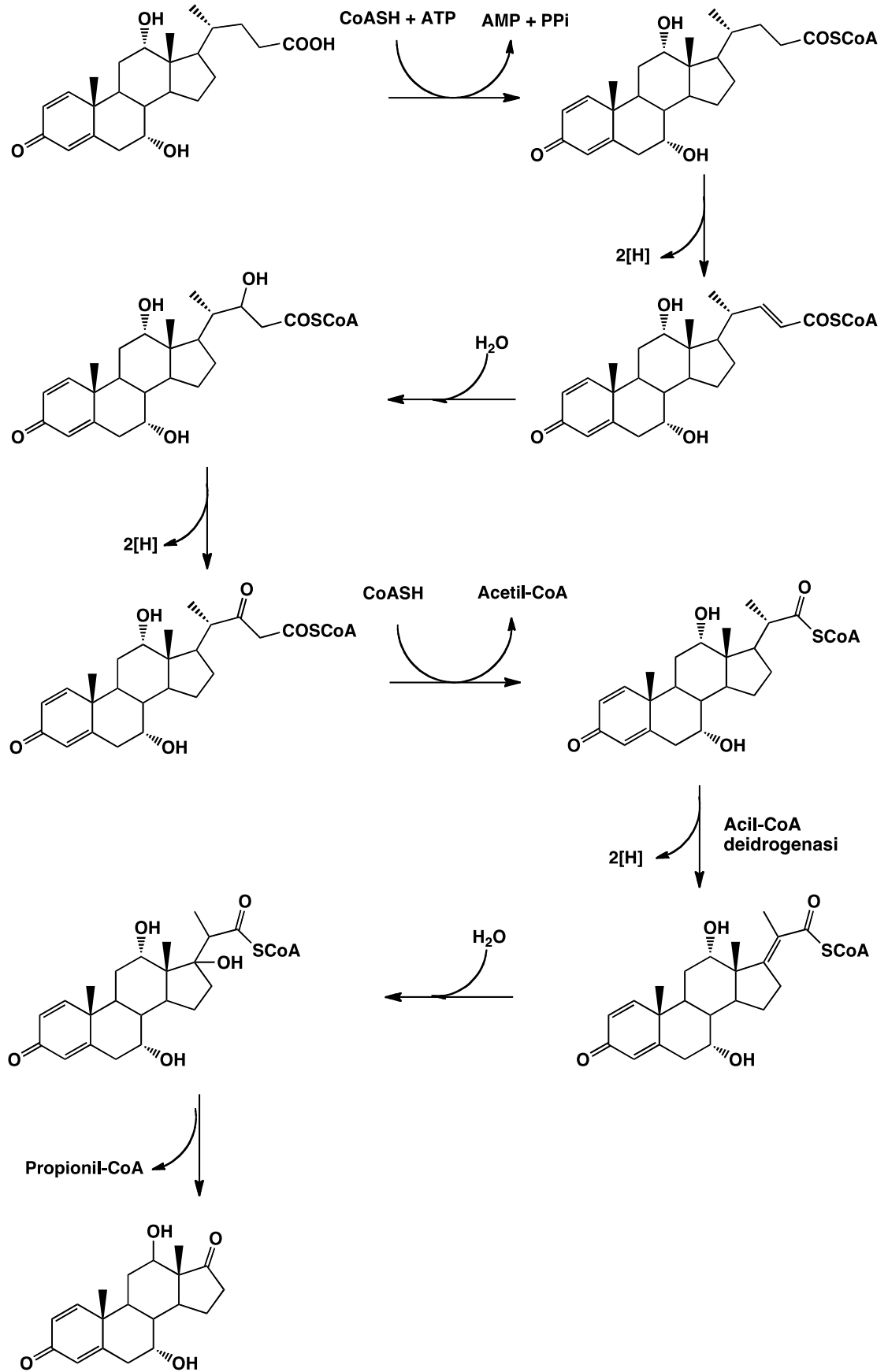
Gli HADD sono ulteriormente idrossilati in C-9 da KSH (9 $\alpha$ -chetosteroide idrossilasi). Questo provoca l'apertura dell'anello B, con concomitante aromatizzazione dell'anello A fornendo i 9,10-secosteroidi **4a-d**. Questi ultimi sono ulteriormente degradati, attraverso reazioni ancora non conosciute a CO<sub>2</sub>

Recentemente, è stato dimostrato che l'aromatizzazione dell'anello A e l'apertura dell'anello B può precedere la degradazione della catena laterale. La degradazione della catena laterale è un passaggio fondamentale per la formazione degli HADD. Nello Schema 10 vengono descritti i passaggi chiave. Il 3-cheto-1,4-diene derivato dell'acido colico viene attivato con il coenzima A, formando il colil-CoA, che viene deidrogenato in C<sub>22</sub>-C<sub>23</sub> [24]. Il doppio legame viene idrolizzato con formazione del C<sub>22</sub>-idrossi derivato e successivamente ossidato a chetone ( $\beta$ -ossidazione). Questo passaggio permette l'uscita del gruppo acetilico come acetil-CoA, portando ad una prima parziale degradazione della catena. La successiva C<sub>17</sub>-C<sub>18</sub>-deidrogenazione e l'aggiunta di acqua al doppio legame portano all'uscita di propionil-CoA con formazione del carbonile in C<sub>17</sub> ottenendo così 1,4-diene-3,17-dione derivato (analogo dell'androstadienedione HADD). La formazione di colil-CoA oltre al CoA-esteri di 3-chetocolato e  $\Delta^{1,4}$ -3-chetocolato, è stata riscontrata in estratti di cellule di *Pseudomonas sp.* (ceppo Cho11). Tuttavia non è ancora chiaro se l'ossidazione dell'anello A preceda l'attivazione con CoA o se i CoA-esteri siano i substrati per le deidrogenazioni a carico dell'anello A. In studi con diverse *Pseudomonas sp.* sulla degradazione di acido colico [25] sono stati isolati composti steroidici la cui struttura concorda con la degradazione della catena laterale acilica tramite  $\beta$ -ossidazione.



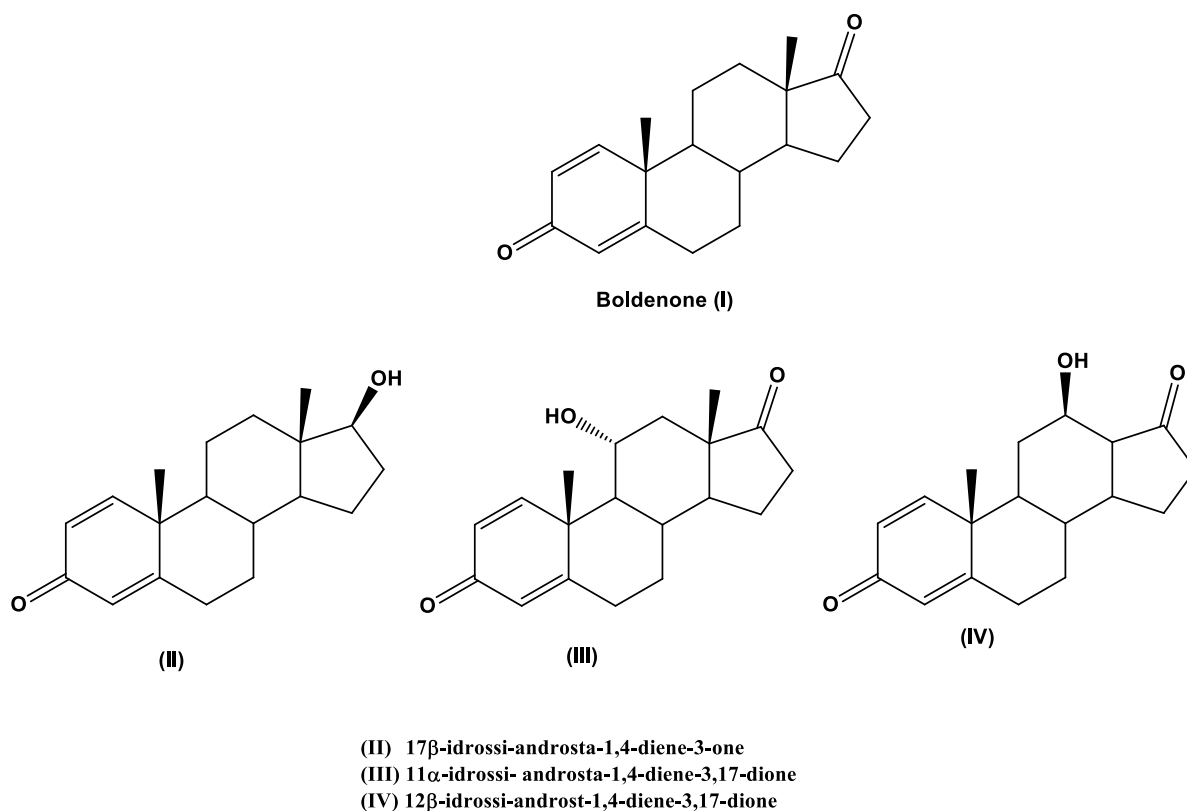
X = Y = OH; Z = H,    acido colico  
 X = Z = H; Y = OH,    acido deossicolico  
 X = OH; Y = Z = H,    acido chenodesossicolico  
 X = Y = H; Z = OH,    acido iodesossicolico

Schema 9



Schema 10

Gli HADD, che si formano nella via degradativa degli steroidi sono importanti intermedi per la produzione di alcuni fondamentali composti steroidei di interesse farmaceutico, inoltre sono stati utilizzati in molti studi come substrato per ulteriori biotrasformazioni [26], che portano alla formazione del boldenone, chiamato anche 1-deidrotosterone o androsta-1,4-dien-17 $\beta$ -ol-3-one, steroide che differisce dal testosterone solo per un doppio legame in posizione C-1. Quindi, la riduzione del gruppo 17-cheto dell'ADD porta alla formazione di boldenone. Il boldenone (Figura 10) con le sue caratteristiche androgene blande ma accentuate caratteristiche anabolizzanti permette di migliorare i processi anabolici; come la crescita e lo sviluppo della massa muscolare, senza effetti collaterali indesiderati [27]

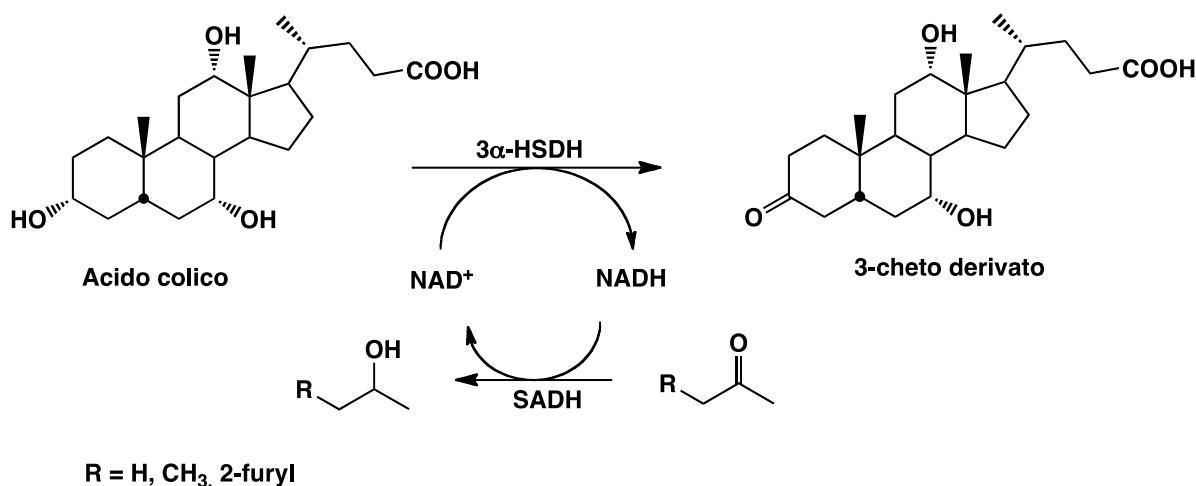


**Figura 10**

### *Ossidazione di funzioni alcoliche*

Le reazioni di ossidazione degli acidi biliari sono quelle a carico degli ossidrili presenti nelle diverse posizioni del nucleo steroideo. Gli enzimi che catalizzano questo tipo di reazioni sono le idrossisteroide-deidrogenasi (HSDH) [28]. Si tratta di ossidoreduttasi NADH- o NADPH-dipendenti, una classe di enzimi che catalizzano l'ossidazione reversibile di gruppi idrossilici o chetonici degli steroidi [29].

Nel gruppo di ricerca dove ho svolto il periodo di dottorato l'ossidazione regiospecifica delle funzioni ossidrili degli acidi biliari è stata oggetto di vari screening [3,30]. La reazione di ossidazione più frequentemente osservata nel campo delle biotrasformazioni degli acidi biliari è quella a carico dell'ossidrile presente in posizione C-3. Un esempio significativo è l'ossidazione regioselettiva di acido colico con rese eccellenti per incubazione con *Pseudomonas paucimobilis* [31] (Schema 11).



Schema 11

La parziale purificazione della 3 $\alpha$ -HSDH da questo ceppo ha rivelato la presenza di una seconda frazione enzimatica caratterizzata come alcool deidrogenasi specifica per alcoli secondari (SADH). Tale enzima, che ha NADH come cofattore e catalizza la riduzione di carbonili a funzioni idrossiliche secondarie, è stato utilizzato come sistema di riciclo nella reazione di ossidazione mediata da 3 $\alpha$ -HSDH.

Per quanto riguarda l'ossidazione del gruppo C<sub>7</sub>-OH, ceppi di *Eubacterium lentum* mostrano attività 7 $\alpha$ -OH deidrogenante che viene considerevolmente soppressa in presenza di ossigeno [32]. La deidrogenazione del gruppo 7 $\alpha$ -OH dell'acido chenodesossicolico e dell'acido colico è stata osservata sia in ceppi batterici isolati sia in colture microbiche miste provenienti da feci umane a dimostrazione del fatto che questo tipo di attività in *Eubacterium lentum* è fortemente favorita da condizioni anaerobiche [33, 34].

Edenharder *et al.* hanno riportato dati sulle biotrasformazioni di CDCA operate da specie saccarolitiche di *Bacteriodes* [35]. La maggior parte dei ceppi attivi (se coltivati in condizioni anaerobiche) appartengono alle specie *Bacteriodes fragilis* e *Bacteriodes thetaiotaomicron*. In aggiunta *Clostridium bif fermentans* F6, isolato dal suolo, ossida l'acido

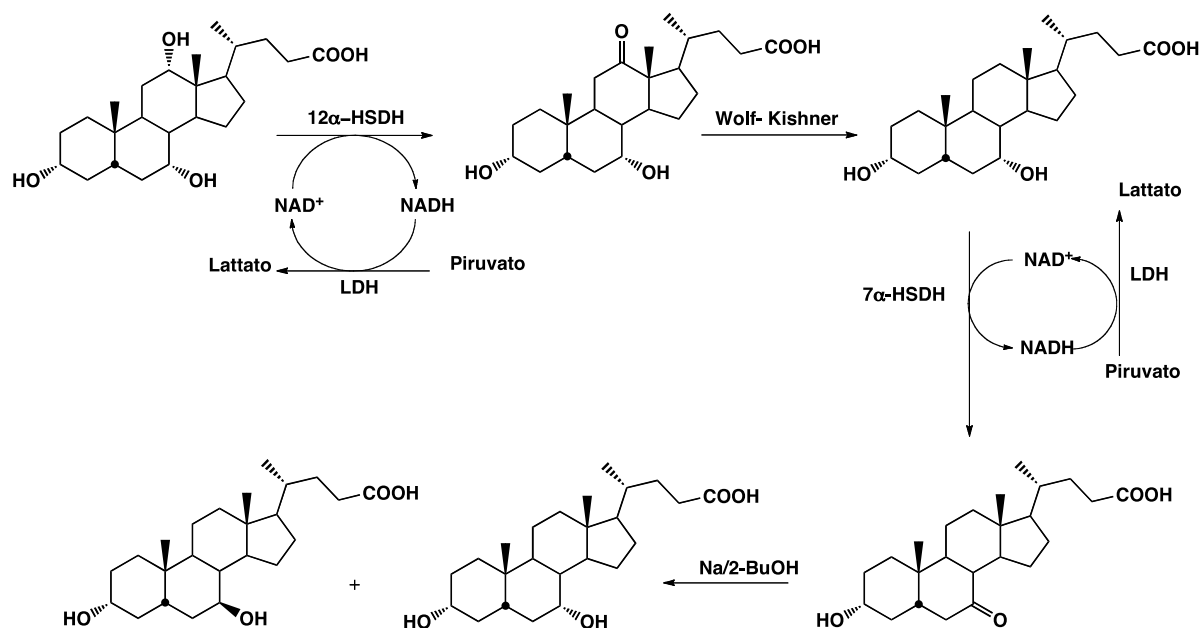


colico e l'acido chenodesossicolico ai corrispondenti 7-cheto derivati ma non è in grado di ossidare l'acido ursocolico (UCA) e l'acido ursodesossicolico (UDCA) [36].

Per quanto riguarda l'ossidazione dell'ossidrilile presente in C-12 numerosi sono gli esempi in letteratura di microrganismi dotati di 12 $\alpha$ -HSDH: *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides vulgatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* e *Peptococcus magnus* [32]. L'ossidazione del gruppo C<sub>12</sub>-OH dell'acido desossicolico si ottiene anche con *Arthrobacter simplex* anche se in miscela col 3,12-dicheto derivato [37].

Data l'importanza industriale di questa reazione, in quanto l'ossidazione dell'ossidrilile in C-12 è la via per l'eliminazione di questo gruppo funzionale che non è presente nei più comuni farmaci o ormoni steroidei, sono stati depositati numerosi brevetti nei quali il comune denominatore è la sintesi di vari prodotti di ossidazione partendo da diversi acidi biliari [38,39].

Un esempio di approccio chemo-enzimatico alla sintesi di acido ursodesossicolico partendo da acido colico è riportato in letteratura [40] (Schema 12).



**Schema 12**

Gli enzimi coinvolti sono 7 $\alpha$ - e 12 $\alpha$ -HSDH purificati da *Acinetobacter calcoaceticus lwoffii*, un ceppo batterico isolato da un campione di terreno proveniente dall'azienda ICE srl di Reggio Emilia. Gli enzimi sono stati parzialmente purificati ed utilizzati in questa nuova metodologia di sintesi chemo-enzimatica.

Gli step di reazione sono i seguenti:

- Ossidazione di acido desossicolico in posizione C-12 catalizzata da  $12\alpha$ -HSDH;
- Rimozione del gruppo carbonilico attraverso la reazione di Wolf-Kishner, per dare CDCA;
- Ossidazione di CDCA ad acido 7-chetochenodesossicolico con  $7\alpha$ -HSDH;
- Riduzione a UDCA e UCA con Na e 2-butanolo anidro.

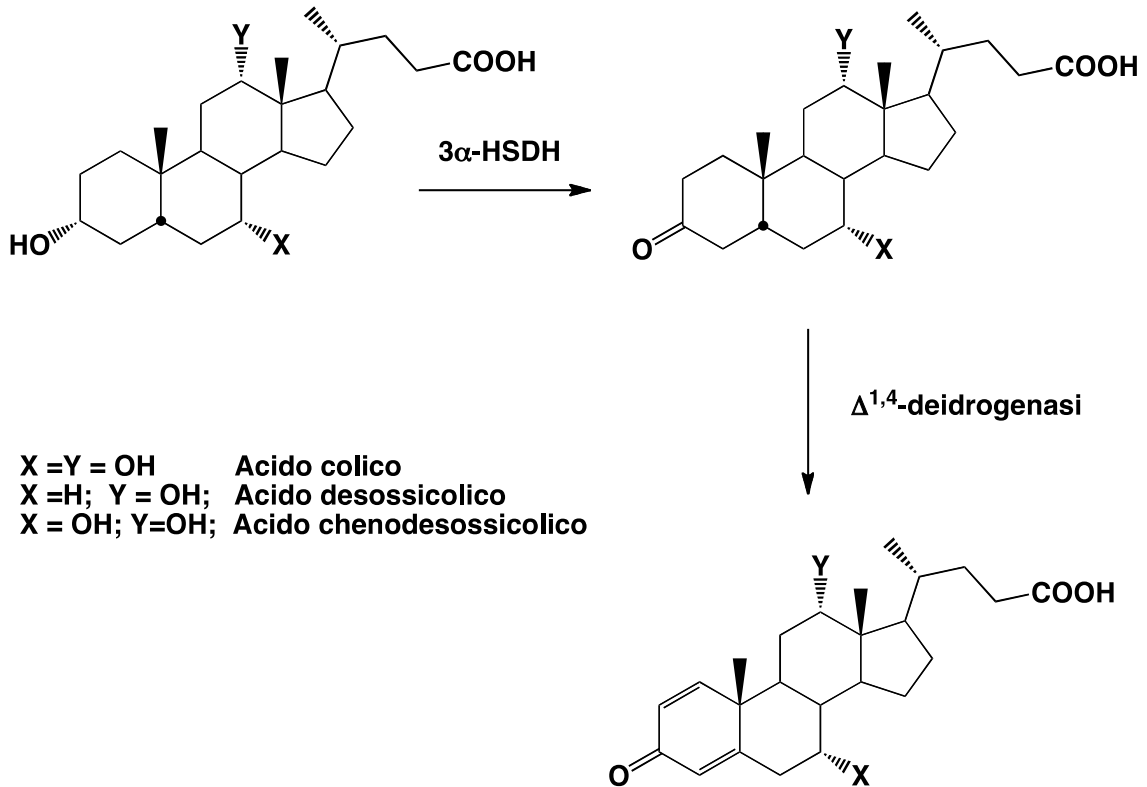
In questo approccio chemo-enzimatico la riduzione del numero di step necessari per la sintesi di UCDA e la sostenibilità in termini di impatto ambientale costituiscono un grande vantaggio rispetto alla sintesi chimica, per cui questa metodologia può costituire un'ottima alternativa alla classica sintesi di UDCA.

### ***Deidrogenazione***

La capacità di deidrogenare legami C-C in composti steroidei è una caratteristica distintiva degli attinobatteri appartenenti ai generi *Actinoplanes*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Rhodococcus* e *Streptomyces*, ceppi capaci di introdurre doppi legami tra: C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>, C<sub>9</sub>-C<sub>11</sub>, e C<sub>16</sub>-C<sub>17</sub> [41]. La capacità microbiologica di effettuare la C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-deidrogenazione di 3-chetosteroidi da parte di attinobatteri (un processo noto dal 1950) è alla base di tecnologie per la produzione di prednisolone. *Arthrobacter simplex* è stato utilizzato per la C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> deidrogenazione di pregnani, androstani e derivati di steroli e acidi biliari per più di 30 anni [42,43]. L'ossidazione dell'ossidril in posizione C-3 è considerato il passaggio fondamentale per permettere poi le successive deidrogenazioni dei legami C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>. Le deidrogenazioni a carico dell'anello A sono reazioni che vengono catalizzate da  $\Delta$ -3-chetosteroidi deidrogenasi (Schema 13).

Questi enzimi sono stati isolati da *Rhodococcus erythropolis* SQ1, *Comamonas testosteroni* e *Rhodococcus rhodochrous* e sono stati caratterizzati come flavoproteine [44,45].

Possiamo dire che le biotrasformazioni svolgono un ruolo insostituibile nella sintesi di molecole con attività biologica e che in questo caso la  $\Delta^1$ -deidrogenazione è una delle trasformazioni più importanti. L'introduzione di doppi legami tra gli atomi di carbonio C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> in alcuni ormoni steroidei, quali ormoni adrenocorticali, può aumentarne notevolmente l'attività e diminuire i loro effetti collaterali [46].



Schema 13

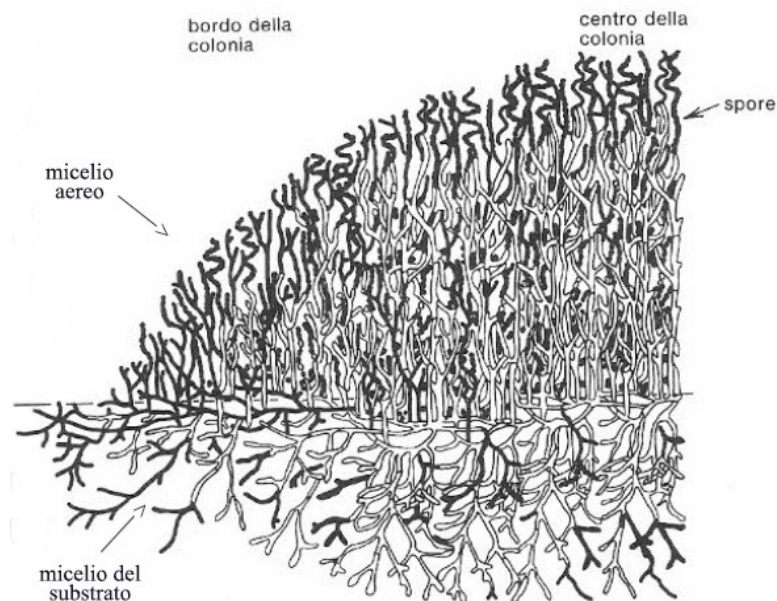
Gli enzimi coinvolti nella  $\Delta^1$ -deidrogenazione di steroidi sono delle 3-chetosteroidi- $\Delta^1$ -deidrogenasi (EC 1.3.99.4) flavoproteine-dipendenti. In generale, i microrganismi isolati con buona attività deidrogenasica sono attinobatteri. In questi microrganismi, il ruolo fisiologico delle 3-chetosteroidi- $\Delta^1$ -deidrogenasi è quello di utilizzare gli steroidi come fonte di carbonio. Diversi sono gli studi fino ad adesso fatti su questi enzimi e diverse 3-chetosteroidi deidrogenasi sono ad oggi conosciute, ad esempio 3-chetosteroidi  $\Delta^1$ -deidrogenasi ( $\Delta^1$ -KSTD), 3-chetosteroidi  $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -deidrogenasi ( $\Delta^4$ -(5 $\alpha$ )-KSTD) e 3-chetosteroidi  $\Delta^4$ -5 $\beta$ -deidrogenasi ( $\Delta^4$ -(5 $\beta$ )-KSTD), che sono tutti enzimi FAD-dipendenti [47]. I prodotti derivanti da queste biotrasformazioni sono la base di partenza per gli steroidi della serie 5 $\alpha$  per cui queste trasformazioni batteriche offrono un'ottima alternativa alla sintesi chimica per la produzione di farmaci steroidei.

## Gli Attinomiceti

Il phylum degli attinomiceti è grande e complesso e contiene molti generi distinguibili in base a combinazioni di caratteri strutturali e biochimici.

Questo gruppo presenta ancora molte incognite dal punto di vista tassonomico, in quanto esistono tuttora molti organismi di cui non sono chiare le relazioni con gli altri.

Sono batteri filamentosi e hanno una crescita di tipo miceliare (Figura 11). Alcuni organismi possiedono solo la capacità di crescere in modo miceliare e si riproducono tramite la formazione di spore unicellulari dette conidi che si formano alle estremità delle ife, singolarmente o raggruppate in catenelle. Gli organismi che rispondono a queste caratteristiche vengono chiamati *sporoattinomiceti* o *euattinomiceti*. In altri attinomiceti invece, la crescita miceliare è meno completa: può essere transitoria e avvenire durante la fase di crescita attiva ed essere seguita da frammentazione quando la velocità di crescita diminuisce; può essere limitata formando solo cellule ramificate oppure può avvenire soltanto in particolari condizioni di crescita. Per questi organismi viene utilizzato il termine *proattinomiceti*.



**Figura 11**

Il ciclo vitale degli sporoattinomiceti è suddiviso in due fasi distinte:

1. crescita vegetativa miceliare;
2. formazione delle spore.

Il secondo stadio inizia di solito a causa della carenza di nutrienti essenziali. Dal momento che la porzione di micelio al centro della colonia può essere in carenza di nutrienti mentre quella al bordo della colonia si trova ancora nello stadio di crescita attiva, le due fasi si possono verificare contemporaneamente. Il micelio alla periferia è in attiva crescita, mentre più internamente sta iniziando la fase di sporulazione che è già terminata al centro, con la lisi del micelio vegetativo. Le ife nere sono vitali, mentre quelle bianche sono lisate. Il micelio di un attinomicete può essere immerso per intero nel substrato: è questo il caso più comune tra gli attinomiceti non sporigeni.

Molti sporoattinomiceti e alcuni proattinomiceti, inoltre, sono caratterizzati dal possedere un micelio aereo, che ha la peculiarità di emergere dal substrato. In questo gruppo di organismi, le spore, se presenti, si formano usualmente all'estremità delle ife aeree. Il micelio del substrato generalmente è settato anche se le cellule multinucleate sono normalmente abbastanza lunghe (20  $\mu\text{m}$  e più).

Le ife hanno diametro costante dal momento che, nella maggior parte dei batteri, l'accrescimento avviene solo in lunghezza senza aumento del diametro cellulare.

Alcuni attinomiceti, però, oltre che in lunghezza crescono anche in larghezza; sintetizzano pareti che dividono la cellula secondo l'asse longitudinale oltre che secondo il piano trasversale e ne risulta una massa di cellule aggregate a formare una struttura simile a un tessuto, che prende il nome di tallo o sclerozio [48].

In base al loro ciclo vitale e alle loro caratteristiche biochimiche, gli attinomiceti si possono dividere in cinque gruppi: attinobatteri, batteri nocardioformi, il gruppo *Dermatophilus*, streptomiceti e attinoplaneti.

***Gli attinobatteri.*** Sono un gruppo eterogeneo di organismi prevalentemente unicellulari. Usualmente non presentano crescita miceliare, o se è presente, è di tipo rudimentale. La maggior parte degli attinobatteri sono aerobi stretti con metabolismo respiratorio, pochi però sono dei fermentanti. E' possibile isolarli da moltissimi habitat diversi.

***I batteri nocardioformi.*** A questo gruppo appartengono quattro generi strettamente correlati (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*) che presentano una parete cellulare peculiare e complessa. Il peptidoglicano è costituito da N-acetilglucosammina e dall'acido N-glicosilmurammico. Il principale carboidrato della parete cellulare è un copolimero di arabinosio e galattosio chiamato arabinogalattano, legato covalentemente al

gruppo acetilico o glicosidico del peptidoglicano con legame fosfodiesterico, grazie alla presenza nella parete di un modello fosfolipidico costituito da difosfatidil-glicerolo, fosfatidil-etanolamina, fosfatidil-inositolo e fosfatidil-inositolo mannoside. Esterificati all'arabinogalattano si trovano i lipidi che caratterizzano questo gruppo, cioè i  $\beta$ -ossiacidi ramificati chiamati acidi micolici. Gli acidi micolici possono essere anche esterificati con il trealosio (1- $\alpha$  glucopiranosile-1- $\alpha$ -glucopiranoside), come trealosio 6,6-dimicolato. Nella parete di questi organismi comunque, si possono trovare anche molti altri lipidi complessi. La superficie delle cellule dei nocardioformi può essere così idrofoba da conferire un aspetto ceroso alle colonie e da far sì che la crescita in liquido dia aggregati cellulari in mancanza di un opportuno tensioattivo. La morfologia di questi batteri è variabile.

***Il gruppo Dermatophilus.*** Gli organismi che fanno parte di questo gruppo formano spore a partire da una massa di cellule che, grazie ad una serie di divisioni su diversi piani, sono organizzate a formare una struttura simile ad un tessuto. Le spore di *Dermatophilus* e di *Geodermatophilus* sono mobili grazie a ciuffi di flagelli mentre quelle di *Geodermatophilus* sono uniche per la loro capacità di moltiplicarsi come organismi unicellulari gemmanti. La crescita viene controllata dalla disponibilità dei nutrienti: in mancanza di un determinato nutriente, le zoospore crescono per gemmazione mentre se il nutriente è presente, le spore sviluppano un micelio rudimentale. *Dermatophilus* e *Geodermatophilus* sono abbastanza simili, sia dal punto di vista morfologico che da quello della crescita, ma nonostante ciò, filogeneticamente si possono considerare piuttosto distanti. Ognuno dei tre membri di questo gruppo (*Dermatophilus*, *Geodermatophilus* e *Frankia*) vive in un habitat particolare: *Dermatophilus* è un parassita della pelle di animali ed occasionalmente dell'uomo, *Geodermatophilus* è un organismo del suolo e *Frankia* infetta le radici di un'ampia gamma di specie vegetali, ad eccezione delle leguminose. *Frankia* può essere considerato un simbionte in quanto, analogamente ai rizobatteri che colonizzano le radici delle leguminose, permette la formazione di noduli azotofissatori sulle radici di diverse specie vegetali provenienti da almeno 17 generi, a loro volta appartenenti a ben sette ordini. L'endofita è stato isolato e fatto crescere in coltura pura; la crescita è risultata straordinariamente lenta (1 mese per la formazione di colonie visibili); i dati mostrano come siano preferite le condizioni microaerofile e come le richieste nutrizionali del battere siano estremamente complesse. Un nuovo inoculo di semi sterilizzati della pianta ospite ha permesso di

dimostrare che il simbionte è il responsabile della capacità azotofissatrice della pianta nodulata.

***Gli streptomiceti.*** Sono organismi miceliari che si riproducono mediante la formazione di spore immobili (conidi) alle estremità delle ife aeree. Abbondano nel suolo e producono un certo numero di sostanze volatili responsabili del caratteristico odore della terra nei luoghi umidi. Negli stadi di crescita giovanili, le colonie degli streptomiceti appaiono compatte e dure, e può essere difficoltoso prelevarle per formare nuove subcolture. Man mano che la crescita avanza, si forma un micelio aereo che ricopre il micelio del substrato con un tipo di crescita più rilassato e cotonoso. Il micelio aereo e le spore sono ricoperti da una guaina idrofoba che probabilmente ne favorisce la dispersione. Gli streptomiceti sono organismi aerobi stretti e sono molto versatili dal punto di vista nutrizionale. Sono in grado di utilizzare un'ampia gamma di composti organici come fonti di energia, tra cui polimeri complessi quali lattice, chitina, lignocellulosa e peptidoglicano. Sono considerati organismi importanti nei processi di mineralizzazione e non hanno bisogno di fattori di crescita. Molti ceppi sono importanti dal punto di vista economico, in quanto responsabili della produzione di antibiotici. Alcuni streptomiceti (*Chainia*) formano sclerozi al cui interno le cellule sono aggregate assieme per mezzo di un materiale che contiene acido L-2,3-diaminopropionico. La capacità di formare sclerozi comunque si perde rapidamente in condizioni colturali di laboratorio.

***Gli attinoplaneti.*** Sono organismi che formano le loro spore all'interno di uno sporangio che prende origine direttamente dal micelio del substrato. Lo sporangio si origina grazie alla spiralizzazione di un'ifa sporangiale all'interno della parete dello sporangio. Il numero di spore che si forma nello sporangio è variabile, da una a più di 1000. Le spore sono mobili in quanto presentano ciuffi polari di flagelli.

L'organismo *Micromonospora* si discosta da queste caratteristiche, in quanto forma spore singole non racchiuse da una parete sporangiale.

Gli attinoplaneti sono organismi comuni nell'acqua e nel suolo. Ad eccezione di pochi ceppi di *Micromonospora*, sono aerobi stretti. Al genere *Micromonospora* invece appartengono alcuni ceppi anaerobi stretti e fermentanti la cellulosa che sono stati isolati dall'intestino delle termiti [49].

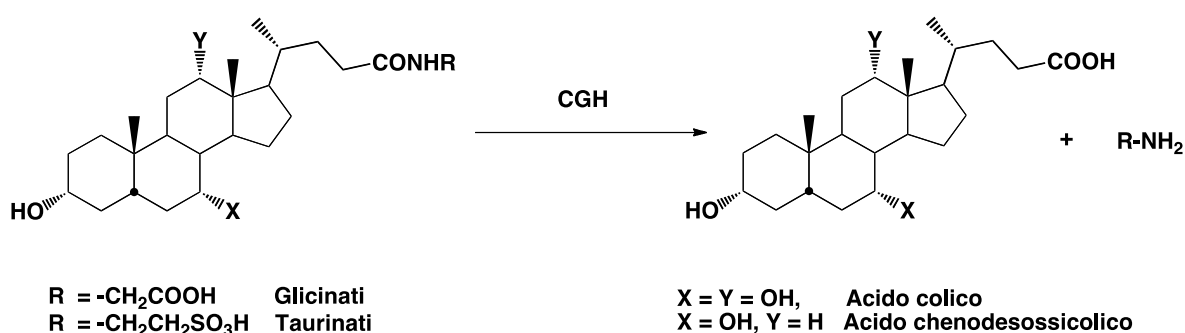
## Obiettivi della ricerca

Il lavoro della mia tesi di Dottorato si è svolto presso il Dipartimento di Scienze Chimiche in collaborazione con il laboratorio di Biocatalisi e Biotrasformazioni del Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie dell'Università degli Studi di Ferrara e si inserisce in un progetto di ricerca finanziato dalla ditta ICE riguardante lo studio delle biotrasformazioni di acidi biliari. L'interesse sulle biotrasformazioni degli acidi biliari nasce più di vent'anni fa dall'esigenza dell'industria ICE (leader mondiale per la produzione di acido ursodesossicolico) di introdurre delle alternative biotecnologiche quindi ecosostenibili nel processo chimico di sintesi di tale acido.

In questo ambito sono stati fatti molti screening di batteri, lieviti e funghi concentrando via via l'attenzione su ceppi batterici soprattutto focalizzando l'attenzione su reazioni di idrolisi dei coniugati presenti nella bile, su reazioni di ossidazione selettiva delle varie funzioni idrossiliche e su potenziali idrossilazioni del C7 per rientrare acidi biliari inutilizzabili per la sintesi di UDCA nel processo produttivo.

Questo ha portato all'isolamento presso la ditta ICE di un battere *Xanthomonas maltophilia* CBS 897.97 da cui sono stati purificati tre enzimi molto interessanti: una colilglicina idrolasi (CGH) e una 7 $\alpha$ - e una 7 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi (7 $\alpha$ -HSDH e 7 $\beta$ -HSDH).

La colilglicina idrolasi permette di idrolizzare glicinati e taurinati degli acidi biliari [50] con rese quantitative in tempi brevi evitando l'uso di basi concentrate (Schema 14).

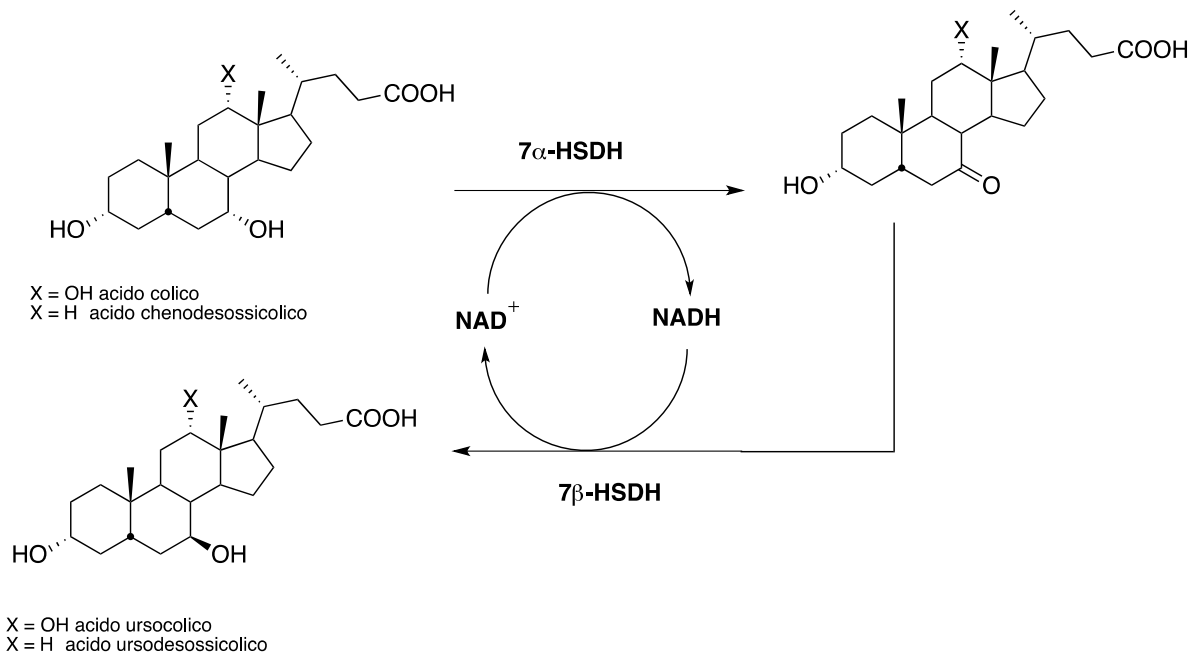


Schema 14

Le 7 $\alpha$ -HSDH e 7 $\beta$ -HSDH vengono impiegate per l'inversione di configurazione della funzione idrossilica in C7 permettendo di trasformare l'acido chenodesossicolico in



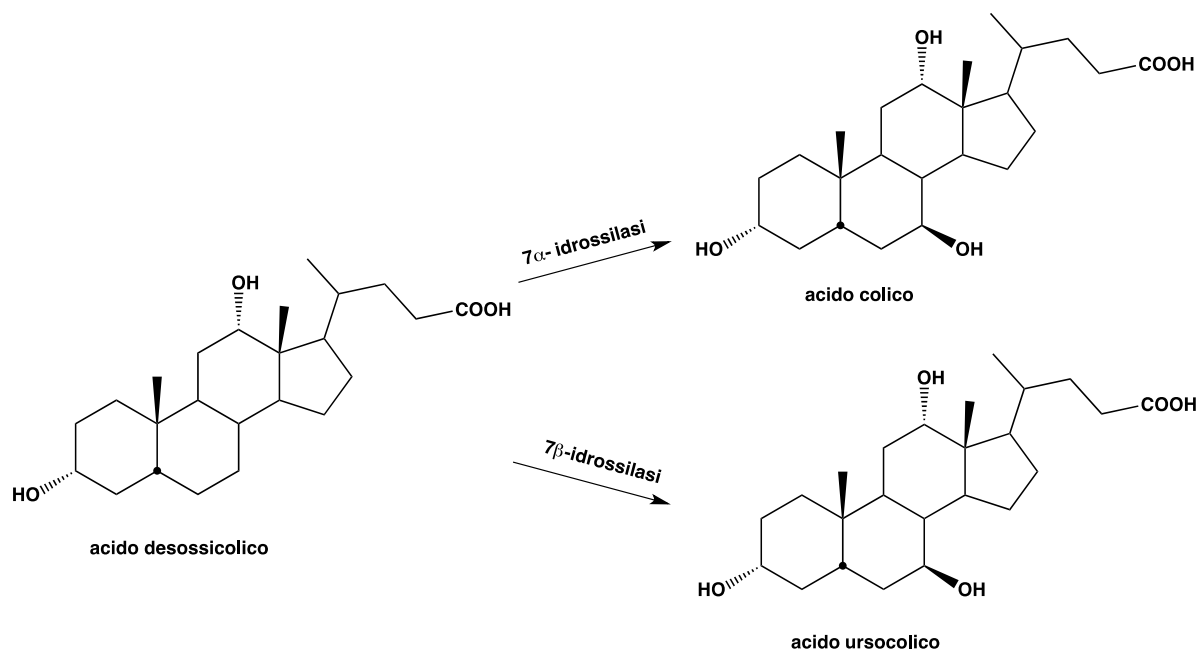
ursodesossicolico (Schema 15). Questo processo enzimatico è allo studio per l'utilizzo industriale.



**Schema 15**

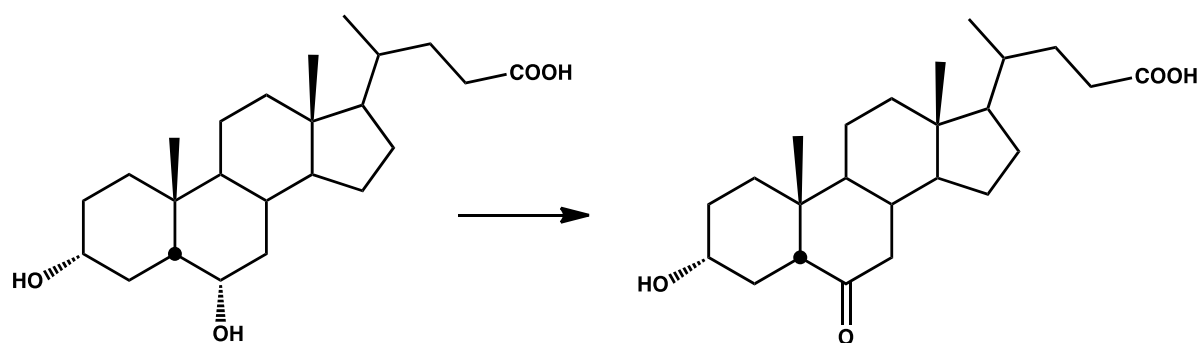
Negli ultimi anni la ricerca si è focalizzata sul recupero di alcuni acidi biliari ottenuti dalla lavorazione della bile bovina e suina considerati di “scarto” in quanto non utilizzabili come tali nella produzione di acido ursodesossicolico: l'acido desossicolico (20% nella bile bovina) e acido iodesossicolico (40% nella bile suina).

Da questa esigenza nasce il progetto di ricerca della mia tesi dottorato, finalizzata alla ricerca di microrganismi, in particolare attinomiceti, in grado di idrossilare la posizione C7 dell'acido desossicolico (Schema 16),



Schema 16

di ossidare selettivamente la posizione C6 dell'acido iodesossicolico (Schema 17)



Schema 17

o di trasformare i suddetti acidi biliari in altri steroidi biologicamente attivi o utilizzabili come materiali di partenza della loro sintesi.

## ***CAPITOLO 2***

---

### **Biotrasformazioni di acidi biliari**

## **Isolamento di Attinomiceti**

I campionamenti degli attinomiceti sono stati effettuati in luoghi in cui la concentrazione ambientale di acidi biliari è importante, in modo da sfruttare la versatilità metabolica dei microrganismi procariotici, che è molto maggiore di quella che si riscontra negli organismi superiori. La capacità dei microrganismi procarioti di utilizzare qualunque composto organico di origine naturale è il risultato di diversi fattori. In primo luogo i procarioti, i primi organismi viventi comparsi sul nostro pianeta, hanno avuto a disposizione per la loro evoluzione un tempo estremamente lungo; a ciò va aggiunto il fatto che, riproducendosi in tempi molto più brevi di quelli necessari alla riproduzione degli eucarioti, i procarioti possono avere e fissare nuovi caratteri molto più rapidamente di organismi che presentano una maggiore complessità e maggiore tempo di riproduzione.

In questo lavoro di ricerca sono stati utilizzati campionamenti effettuati in Italia e in Ecuador in anni precedenti al mio periodo di dottorato. Il campionamento fatto in Italia nel 2013, mi ha coinvolto personalmente mentre, quelli fatti in Ecuador (2011 e 2013), sono stati effettuati in collaborazione con l'Università Politecnica Salesiana di Quito.

Per quanto riguarda l'Italia il campionamento è stato fatto presso lo stabilimento dell'Industria Chimica Emiliana (ICE), leader mondiale della produzione di acido ursodesossicolico, che ha in parte finanziato il mio dottorato di ricerca. Tale stabilimento si trova a Reggio Emilia e rappresenta il sito di stoccaggio della bile proveniente da diversi paesi quali Argentina, Brasile, Colombia, India, Paraguay, Uruguay, Stati Uniti e Venezuela. Nello stabilimento sono presenti uffici, laboratori e locali di produzione nei quali la bile viene lavorata. I campionamenti sono stati fatti in vari punti dello stabilimento che presenta una superficie complessiva di 15000 m<sup>2</sup>. Sono stati effettuati campionamenti sia nei locali all'interno dello stabilimento dove erano presenti centrifughe di varie dimensioni e gli essiccatori a letto fluido. Sono stati siti di prelievo non solo gli strumenti ma anche i diversi tubi di scarico, i pozzetti e gli anfratti sia all'interno sia all'esterno dello stabilimento.

I prelievi dei campioni sono stati effettuati con tamponi di cotone sterile immersi in una soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) anch'essa sterile, il tutto chiuso in tubi di vetro etichettati. Una volta effettuato il prelievo i tamponi sono stati rimmersi nella soluzione sterile e richiusi. I campioni sono stati poi portati nei laboratori dell'Università di Ferrara mantenendoli durante il trasporto ad una temperatura di 4° C.

Le fasi successive hanno previsto:

- ✓ diluizioni seriali fino a  $10^{-8}$ ;
- ✓ semina delle diluizioni in piastre Petri contenenti Columbia Agar. Per la selezione di attinomiceti è stata aggiunta 1 compressa di antibiotico Mast Diagnostic Selectatab ogni 100 mL di terreno.

Dopo 24-48 ore di crescita i microorganismi isolati sono stati seminati in nuove piastre Petri contenenti il medesimo terreno, fino all'ottenimento di una colonia morfologicamente pura.

Una volta isolati gli attinomiceti sono stati trasferiti in almeno due slants (contenenti Columbia Agar). Il lavoro di isolamento ci ha permesso di isolare 86 attinomiceti (Tabella 1).

I campionamenti effettuati in Ecuador nascono da un progetto di collaborazione tra l'Università degli Studi di Ferrara e l'Università Politecnica Salesiana (UPS) di Quito iniziato circa 14 anni fa. Lo scopo iniziale era il supporto alle comunità indigene dei territori interni grazie alla fornitura di strumenti e conoscenza delle potenzialità del patrimonio forestale della Amazzonia, allo scopo di tutelare la biodiversità dell'Ecuador. In particolare, la popolazione indigena della comunità Achuar (provincia di Morona) è stata aiutata su come migliorare il territorio a scopo agricolo e sulla possibilità di ottenere materie prime di alta qualità per l'industria alimentare e farmaceutica. All'interno di questa collaborazione è nato un corso di specializzazione universitario basato sulle tecnologie dei prodotti naturali non tradizionali, le cui lezioni si sono svolte all'interno dell'UPS.

In questo ambito sono nati anche progetti di valorizzazione della biodiversità nel caso specifico applicata alla potenziale ricerca di attinomiceti in grado di biotrasformare gli acidi biliari ritenuti prodotti di scarto nella lavorazione dell'acido ursodesossicolico.

Sono stati fatti vari campionamenti in aree di macellazione di bovini e suini ed ovini in cui il controllo igienico piuttosto scarso ha potenzialmente permesso l'instaurarsi di comunità microbiche che potrebbero aver sviluppato capacità interessanti di elaborazione degli acidi biliari.

**Tabella 1.** Attinomiceti isolati presso la ditta ICE

<b>Zona</b>	<b>Luogo</b>	<b>Microorganismi isolati</b>
Esterno locali essiccamento	<b>1</b> = tombino esterno vicino alla vasca con acido cloridrico	<b>1A, 1B</b>
	<b>2</b> = suolo adiacente alla stessa vasca	<b>2A, 2B, 2C, 2D</b>
Zona esterna di essiccamento	<b>3</b> = acqua di scolo	<b>3A</b>
	<b>4</b> = suolo vicino allo scolo	<b>4A</b>
	<b>5</b> = interno strumento utilizzato per l'idrolisi della bile	<b>5A, 5B</b>
Stoccaggio dell'acido ursodesossicolico	<b>6</b> = base del pilastro	<b>6A, 6B, 6C, 6D, 6E</b>
	<b>7</b> = pavimento sotto il secondo silos	<b>7A, 7B, 7C</b>
	<b>8</b> = tombino nell'impianto di controllo	<b>8A</b>
	<b>9</b> = pavimento sotto silos bianco	<b>9A</b>
	<b>10</b> = interno della centrifuga	<b>10A</b>
	<b>11</b> = pozza vicino alla centrifuga	<b>11A, 11B</b>
	<b>12</b> = crepa nel pavimento	<b>12A, 12B, 12C</b>
	<b>13</b> = interno del sacco di stoccaggio dell'acido desossicolico	--
	<b>14</b> = scolo dell'acido colico	<b>14A</b>
	<b>15</b> = pavimento vicino allo scolo dell'acido colico	<b>15A, 15B, 15C, 15D, 15E</b>
	<b>16</b> = pavimento sotto lo strumento di scolo	<b>16A</b>
<b>17</b> = pozzanghera all'uscita della zona	<b>17A, 17B, 17C</b>	
Esterno azienda	<b>18</b> = pozzetto di raccolta di tutto lo stabilimento	<b>18A, 18B, 18C</b>
Esterno adiacente alla ferrovia	<b>19</b> = terriccio sottostante a pallet di fusti contenenti acidi biliari	<b>19A, 19B, 19C</b>
Esterno azienda oltre cancello automatico	<b>20</b> = suolo sotto pedana	<b>20A, 20B, 20C, 20D, 20E, 20F, 20G</b>
	<b>21</b> = acqua stagnante sulla parte superiore dei fusti	<b>21A, 21B, 21C, 21D</b>
	<b>22</b> = acqua stagnante sulla parte superiore dei fusti conservati da più tempo	<b>22A, 22B, 22C, 22D, 22E, 22F, 22G,</b>
	<b>23</b> = suolo sabbioso sottostante ai fusti	<b>23A, 23B, 23C, 23D, 23E</b>
Magazzino "pulito"	<b>24</b> = zona di stoccaggio dell'acido desossicolico proveniente dal Brasile	<b>24A, 24B, 24C, 24D, 24E</b>
Magazzino "sporco"	<b>25</b> = pavimento sotto sacco di stoccaggio	<b>25A</b>
	<b>26</b> = pavimento sotto un pallet, probabile presenza di truciolato	<b>26A, 26B</b>
	<b>27</b> = angolo nascosto all'interno del magazzino	<b>27A</b>
Stanza adiacente alla lavorazione dei sali di Mg	<b>28</b> = acqua presente nel tombino	<b>28A, 28B, 28C, 28D, 28E, 28F</b>
Stoccaggio della bile suina	<b>29</b> = crepa nel pavimento	<b>29A, 29B</b>
	<b>30</b> = muffa sulla parete	<b>30A, 30B, 30C</b>

In Ecuador i processi di produzione alimentare sono ancora gestiti in maniera tradizionale e questo include la macellazione degli animali. Nel paese esistono leggi che regolamentano e controllano il processo per garantire qualità e salute ambientale, ma tuttavia esistono lacune nella gestione dei rifiuti speciali ottenuti dalla macellazione, tali da rendere ancora lontano l'obiettivo di essere compatibili con le esigenze della salute pubblica ed ambientale.

L'Ecuador presenta più di 200 macelli, la maggior parte dei quali è di proprietà e di gestione comunale. L'80% dei macelli si trova in aree urbane, mentre il restante 20% in contesti suburbani ed in aree rurali. In questo lavoro sono stati oggetto di screening ceppi di attinomiceti campionati ed isolati, con la stessa metodica utilizzata per il campionamento presso ICE, sul fiume Machangara, dove vengono scaricati residui di macellazione, presso una fattoria (Granja) situata nei dintorni di Macas, capitale della provincia di Morona Santiago e presso il macello di Sucúa. Nella Tabella 2 sono riportati i 61 ceppi isolati nei vari siti di campionamento.

Il *rio Machangara* (Provincia: Pichincha; Cantón: Quito) fa parte del sistema idrografico della città di Quito che è composto da tre fiumi: il rio Machangara, che attraversa l'area urbana da sud a nord, il rio Monache che scorre a nord della città, e il rio San Pedro che attraversa le valli del distretto orientale. I tre corsi d'acqua hanno un certo livello di contaminazione che dipende soprattutto dallo scarico di acque reflue domestiche, acque reflue derivanti da processi industriali, e dallo smaltimento illegale di rifiuti solidi sulle sue sponde e canali. Il 75 % della popolazione dell'area urbana scarica le acque reflue nel rio Machangara che è il più grande beneficiario del drenaggio naturale dalle pendici del vulcano Pichincha. Un altro fattore importante per la qualità ambientale delle acque del fiume è costituito dai rifiuti prodotti dagli stabilimenti impegnati in varie attività commerciali e industriali situati in diverse zone del Distretto Metropolitano di Quito. Queste ragioni fondamentali, e altre di minore entità, determinano il suo alto livello di inquinamento.

La "**Granja**" (Provincia: Morona Santiago; Cantón: Morona) o "fattoria" è una delle attività messe in campo dalla Missione Salesiana della Provincia di Morona Santiago, ed è localizzata più precisamente nel villaggio di Sevilla Don Bosco, vicino a Macas, nell'Ecuador sudorientale. Venne costruita nel 1943 per opera del Padre Luigi Casiraghi. La "granja" ha offerto diverse opportunità di lavoro ai giovani nel campo dell'agricoltura e dell'allevamento. In particolare all'interno della fattoria è possibile trovare allevamenti di bovini, equini, suini, pollame, oltre al tradizionale porcellino d'India.

Il *macello di Sucua* (Provincia: Morona Santiago; Cantón: Sucua) fornisce il servizio di custodia del bestiame fino al momento della macellazione di bovini e suini. La bile prodotta dal processo di macellazione di bovini e suini non viene sottoposta ad alcun trattamento, non viene venduta o utilizzata, ma viene semplicemente eliminata insieme agli altri rifiuti. I rifiuti solidi e liquidi, prodotti dalla macellazione, vengono versati nello scarico o in corsi d'acqua. Il macello è di tipo tradizionale, come lo dimostrano le tecniche di sacrificio del bestiame, basate sullo stordimento diretto tramite commozioni cerebrali.

**Tabella 2.** Attinomiceti isolati in Ecuador

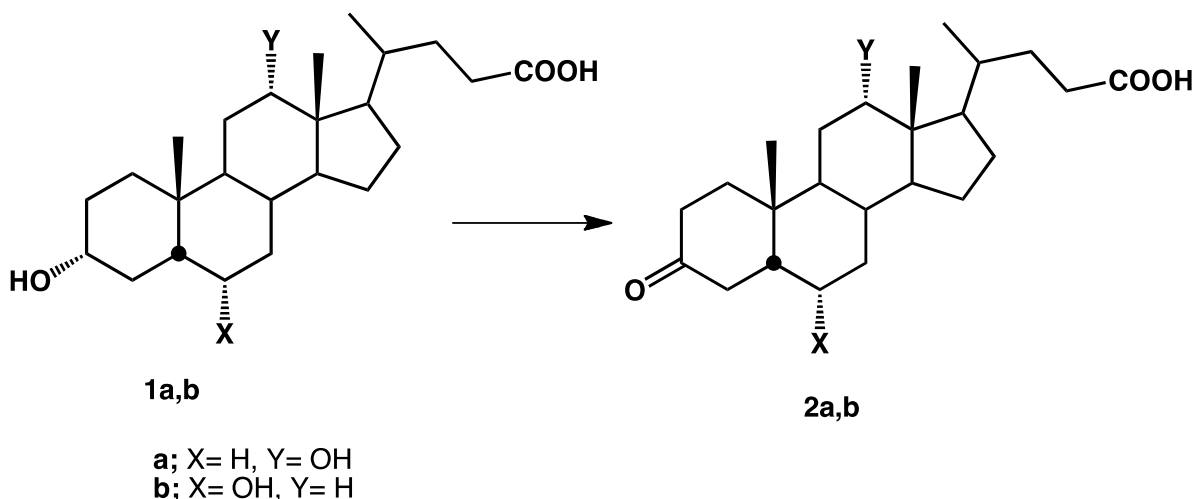
<b>Sito</b>	<b>Luogo di Prelievo</b>	<b>Sigla</b>
Machangara	entrata parco, pozzetto di acqua stagnante	AE1A
Machangara	entrata parco, zona fangosa	AE2A
Machangara	entrata parco, tratto di turbolenza del fiume	--
Machangara	entrata parco pozzetto di acqua stagnante contaminato	AE4A, AE4B
Machangara	centro parco, meandri sabbiosi del fiume	AE6A, AE7A, AE8A, AE9A, AE10A, AE10B
Machangara	uscita parco, riva del fiume	AE11A, AE12A, AE13A, AE14A, AE15A
“Granja”	lavaggio maiali, canale di scarico di acque provenienti dal lavaggio	AE16D
“Granja”	lavaggio maiali, pozzo di raccolta di acque provenienti dal lavaggio	AE17A, AE17B, AE17C, AE17D
“Granja”	lavaggio maiali, pozzo di raccolta di acque provenienti dal lavaggio	AE18A
“Granja”	zona mucche, letamaio	AE19A, AE19B, AE19C, AE19D, AE19E, AE19F, AE19G, AE19H, AE19I
“Granja”	zona mucche, pavimento di lavaggio dei bovini	AE20A
“Granja”	zona mucche, zona lavaggio bovini	AE21A, AE21B, AE21C, AE21D, AE21F
“Granja”	zona mucche, pozzo di raccolta di acque provenienti dal lavaggio	AE22A, AE22B, AE22C, AE22D, AE22E, AE22F
“Granja”	lago di raccolta, acque provenienti dalla fattoria	AE23A
“Granja”	lago di raccolta, acque provenienti dalla fattoria	AE24A, AE24B
Sucua	canale di scarico acque provenienti dal lavaggio delle viscere	AE25A, AE25B, AE25C
Sucua	pozzetto di acqua contenenti acque di lavaggio	AE26A, AE26B, AE26C, AE26D
Sucua	pavimento area di raccolta delle viscere	AE27A
Sucua	area di lavorazione dell'animale	AE28A, AE28B, AE28C, AE28D
Sucua	pavimento area di raccolta delle viscere	AE29A, AE29B
Sucua	acque provenienti dal lavaggio dell'area di macellazione	AE30A, AE30B



## Screening biotrasformativo

Successivamente all'isolamento, i ceppi sono stati testati, per valutare la loro capacità biotrasformativa nei confronti di: acido desossicolico **1a**, acido iodesossicolico **1b**. La procedura utilizzata per le biotrasformazioni su scala analitica prevede l'inoculo dei batteri in 10 ml di terreno liquido ATT (ceppi ICE e Ecuador). Le colture vengono tenute in agitazione a temperatura controllata (28°C, 110 rpm) per 48 h per permetterne la crescita e successivamente viene addizionato il substrato come sale sodico sciolto in acqua in concentrazione di 1 g/L. L'incubazione continua nelle stesse condizioni e le biotrasformazioni vengono monitorate per TLC. Le biotrasformazioni risultate positive vengono ripetute su scala preparativa, i prodotti di reazione vengono poi estratti, purificati mediante cromatografia su colonna e caratterizzati mediante spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ .

Alcuni dei ceppi derivanti dai campionamenti hanno fornito i 3-cheto derivati **2** sia partendo dall'acido desossicolico **1a** che dall'acido iodesossicolico **1b** in rese praticamente quantitative (Schema 1, Tabella 3).



Schema 1

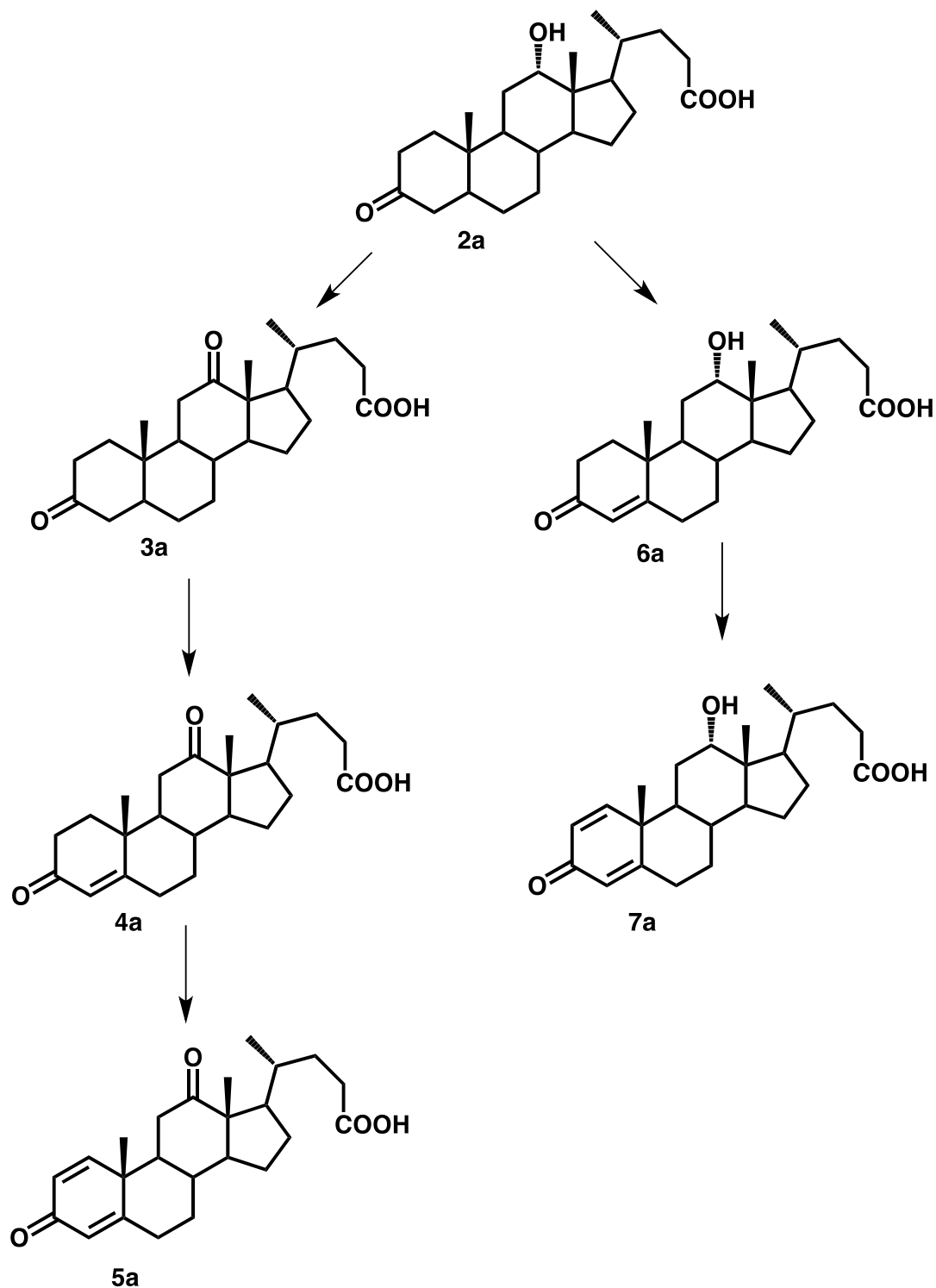
**Tabella 3.** Formazione di 3-cheto derivati **2** con ceppi di attinomiceti (isolamento ICE).

<b>Ceppo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>2a (resa %)</b>	<b>2b (resa %)</b>
<b>7C</b>	96	95	95
<b>18A</b>	24	95	90
<b>19C</b>	240	90	95
<b>23B</b>	168	50	90

**Tabella 4.** Formazione di 3-cheto derivati **2** con ceppi di attinomiceti (isolamento Ecuador).

<b>Ceppo</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>2a (resa %)</b>	<b>2b (resa %)</b>
<b>AE 6A</b>	168 ( <b>1a</b> ), 24 ( <b>1b</b> )	87	70
<b>AE 9A</b>	48	--	89
<b>AE 10B</b>	24	90	--
<b>AE 12A</b>	168	87	--
<b>AE 19D</b>	72	22	--
<b>AE 22B</b>	168	35	--
<b>AE 24A</b>	168	40	--
<b>AE 26A</b>	168 ( <b>1a</b> ), 24 ( <b>1b</b> )	30	75
<b>AE 29A</b>	168	14	95

Oltre ai prodotti di ossidazione in C-3, le varie biotrasformazioni con **1a** hanno fornito una serie di prodotti che possono essere considerati intermedi nella formazione di 12 $\alpha$ -HADD uno dei composti chiave nella via degradativa dell'acido desossicolico **1a**, come descritto nello Schema 9 del Capitolo 1. I prodotti di biotrasformazione derivano dal 3-cheto derivato **2a** per ossidazione in C-12 e/o parziale aromatizzazione dell'anello A, con l'introduzione di doppi legami tra il C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> e C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> (Schema 2).

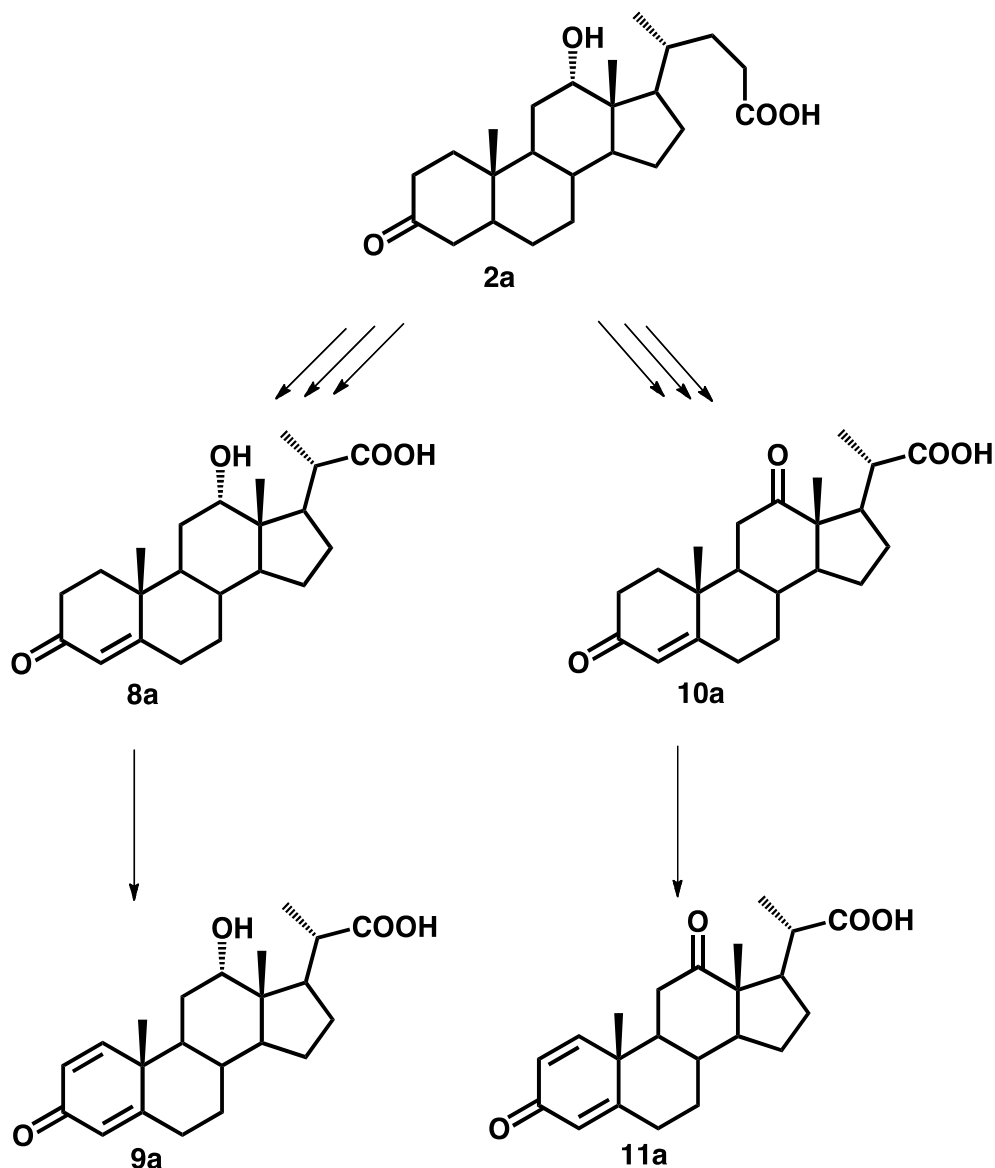


**Schema 2**

In questo caso possiamo distinguere due diversi percorsi di reazione anche se, come è già stato messo in evidenza nel percorso biodegradativo degli acidi biliari, è impossibile determinare la tempistica di queste biotrasformazioni. In un percorso si ottiene l'acido 3,12-

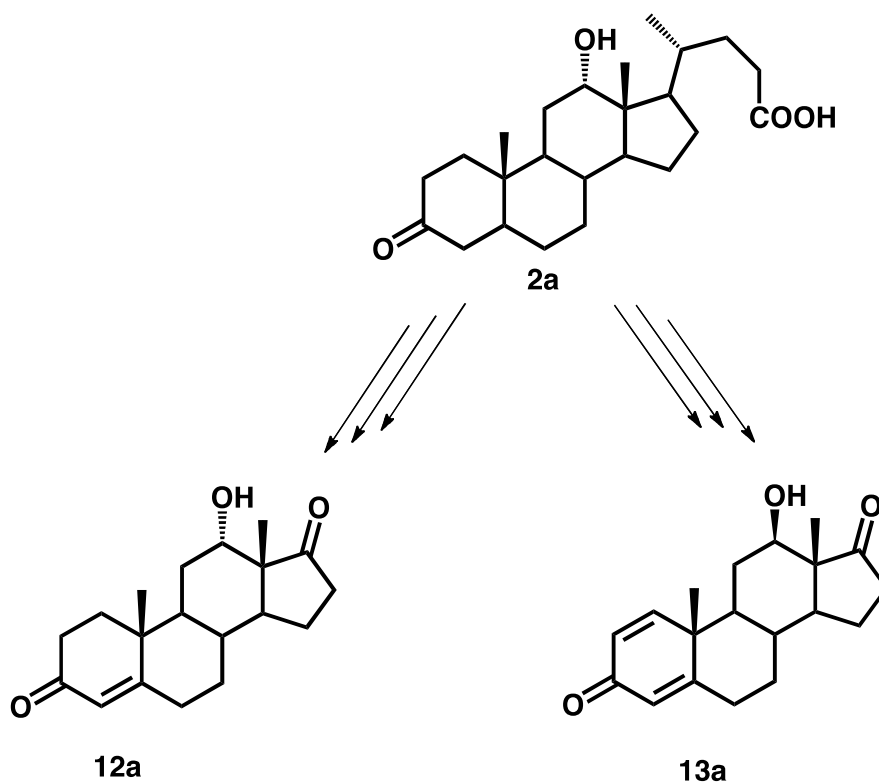
dicheto-24-oico **3a** che viene deidrogenato in posizione C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> fornendo l'acido 3,12-dicheto-4-colen-24-oico **4a** [51] e ulteriormente deidrogenato in posizione C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> per dare l'acido 3,12-dicheto-1,4-diene-colan-24-oico **5a**. Nel secondo percorso partendo sempre da **2a** l'ossidrilico in C12 non viene ossidato e si ottengono i due prodotti di deidrogenazione, l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-4-colen-24-oico **6a** e l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-col-1,4-dien-24-oico **7a**.

Insieme a questi prodotti, sempre partendo dal 3-cheto derivato **2a** si ottengono prodotti analoghi che presentano la parziale degradazione della catena laterale in C-17 (Schema 3).



Schema 3

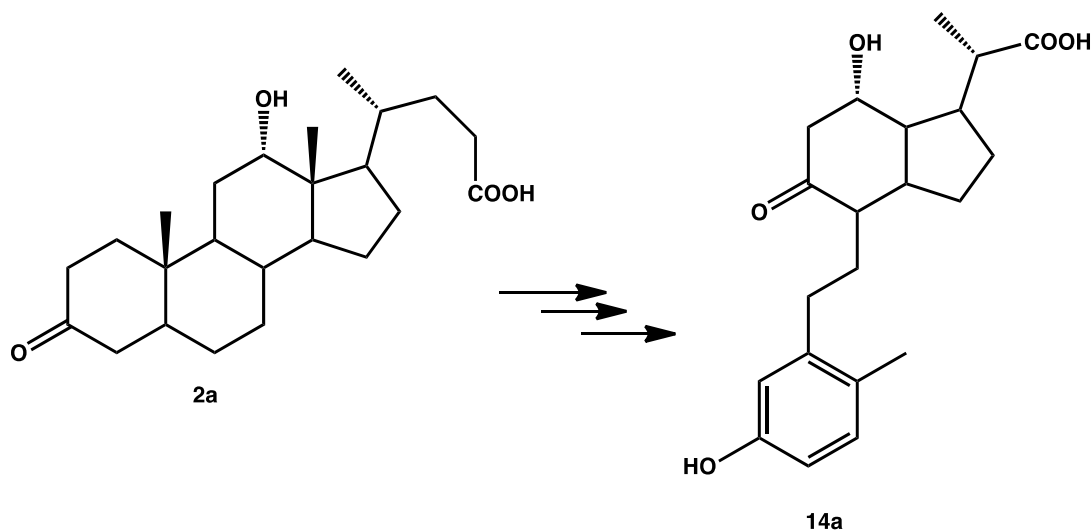
Partendo da **2a**, anche in questo caso insieme alla parziale degradazione della catena in C-17 si ottengono due prodotti che mantengono l'ossidrilico in C12 e sono deidrogenati nell'anello A, in particolare l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcolan-4-en-22-oico **8a** e l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcolan-1,4-dien-22-oico **9a**, e due derivati analoghi ossidati in C12, l'acido 3,12-dicheto-4-ene-23,24-dinorcolan-22-oico **10a** e l'acido 3,12-dicheto-1,4-diene-23,24-dinorcolan-22-oico **11a**. Anche in questo caso, come già precedentemente detto, la tempistica delle biotrasformazioni è impossibile da determinare. Sempre nell'ottica del processo biodegradativo rientrano le biotrasformazioni dell'acido desossicolico **1a** che a partire dal 3-cheto derivato **2a** portano al 12 $\alpha$ -idrossi-4-androstene-3,17-dione **12a**, caratterizzato dalla presenza dell'insaturazione in C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> e dalla totale degradazione della catena laterale e al 12 $\beta$ -HADD **13a** analogo del 12 $\alpha$ -androstadienedione (12 $\alpha$ -HADD) (Schema 4).



**Schema 4**

Il microrganismo in grado di fornire il 12 $\beta$ -HADD **13a** è stato studiato utilizzando anche altri acidi biliari e i risultati sono riportati nel Capitolo 3.

Un altro prodotto ottenuto nello screening biotrasformativo dell'acido desossicolico **1a** attraverso sempre il primo stadio che è la biotrasformazione in 3-cheto derivato **2a** è il 9,10-secosteroide **14a** (Schema 5).



Schema 5

L'acido 3,12 $\alpha$ -diidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-oico [52] **14a** deriva dall'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcolan-1,4-dien-22-oico **9a** a seguito dell'idrossilazione della posizione C9 (percorso degradativo degli acidi biliari) e successiva dall'apertura dell'anello B, ed è caratterizzato dall'aromatizzazione dell'anello A e dalla catena laterale parzialmente degradata.

Nella Tabella 5 vengono riportati i risultati delle biotrasformazioni dell'acido desossicolico **1a** con i ceppi campionati presso la ditta ICE.

Tabella 5. Biotrasformazioni di **1a** con i ceppi isolati presso la ditta ICE.

Ceppo	Prodotti (resa %)				
	5a	10a	11a	13a	14a
3A				95	
23C		15	15		15
28D	80				

La biotrasformazione di **1a** con il ceppo **3A** fornisce in rese praticamente quantitative (95%) il 12 $\beta$ -HADD **13a**, a seguito di aggiunte via via crescenti del prodotto di partenza. I dettagli

di questa biotrasformazione e le applicazioni ad altri acidi biliari verranno discussi nel Capitolo 3.

Il ceppo **23C**, dopo una prima aggiunta standard di **1a** (1g/L) ha di metabolizzato completamente il prodotto in 24 h. Una successiva aggiunta di **1a** (1g/L) dopo 18 h di incubazione ha portato alla formazione in rese identiche (15%) di 'acido 3,12-dicheto-4-ene-23,24-dinorcolan-22-oico **10a**, acido 3,12-dicheto-1,4-diene-23,24-dinorcolan-22-oico **11a** e acido 3,12 $\alpha$ -diidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-oico **14a**.

Lo stesso approccio metodologico è stato utilizzato con il ceppo **28D** in quanto la prima aggiunta di acido desossicolico **1a** (1g/L) è stata completamente degradata in 24 h mentre la seconda aggiunta (1g/L) ha fornito dopo 18 h l'acido 3,12-dicheto-1,4-diene-colan-24-oico **5a** in rese dell'80%.

Nella Tabella 6 vengono riportati i risultati delle biotrasformazioni dell'acido desossicolico **1a** con i ceppi campionati in Ecuador.

**Tabella 6.** Biotrasformazioni di **1a** con i ceppi isolati in Ecuador.

Ceppo	Prodotti (resa %)								
	2a	3a	4a	6a	7a	8a	9a	10a	12a
AE4A	12	30			15				
AE4B				15	18				
AE9A						15	17		
AE20A			46 <sup>1</sup>						
AE20A								16 <sup>2</sup>	51 <sup>2</sup>
AE29A		30							
AE29B		45							

<sup>1</sup> 1g/L di **1a**; <sup>2</sup> 2 g/L di **1a**.

Per quanto riguarda il campionamento Ecuador 2013, i risultati più interessanti si ottengono ceppi AE4A, AE4B, AE9A e AE20A. Dopo 7 g di biotrasformazione il ceppo AE4A fornisce, oltre al 3-cheto derivato **2a** (12%), il 3,12-dicheto **3a** (30%) e l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-col-1,4-dien-24-oico **7a** (15%). I ceppi AE4B ed AE9A sono invece molto rapidi (24 h) a biotrasformare l'acido desossicolico **1a**: in particolare il ceppo AE4B produce l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-4-colen-24-oico **6a** (15%) e l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-col-1,4-diene-24-oico **7a** (18%), mentre il ceppo AE9A fornisce l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-23,24-

dinorcol-4-en-22-oico **8a** (15%) e l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcolan-1,4-dien-22-oico **9a** (17%). Nel caso del ceppo AE20A l'acido desossicolico **1a** (concentrazione 1g/L) dopo 24 h di biotrasformazione fornisce l'acido 3,12-dicheto-4-colen-24-oico **4a** (46%). La reazione ripetuta raddoppiando la concentrazione di **1a** (2g/L) fornisce, invece, dopo 24h, l'acido 3,12-dicheto-4-ene-23,24-dinorcolan-22-oico **10a** (16%) e 12 $\alpha$ -idrossi-4-androstene-3,17-dione **12a** (51%).

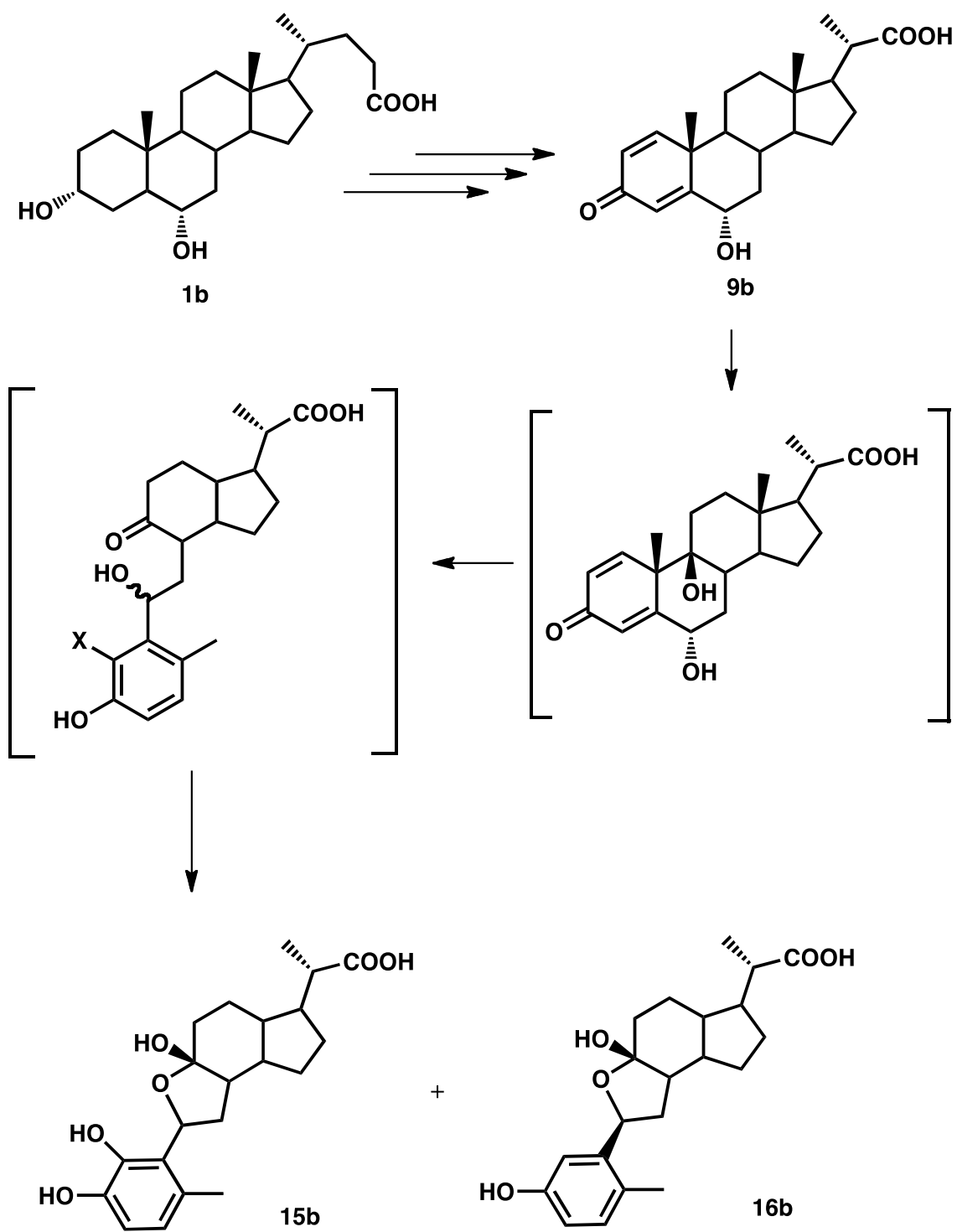
Infine le biotrasformazioni di **1a** con i ceppi AE29A e AE 29B dopo 72 h producono il 3,12-dicheto derivato **3a** rispettivamente con rese 30 e 45%

Come nelle biotrasformazioni con **1a**, anche nelle biotrasformazioni con l'acido iodesossicolico **1b**, si ottengono oltre al 3-cheto derivato **2b** (dati riportati nella Tabella 2 e 3), prodotti riconducibili alla via degradativa degli acidi biliari e dei secosteroidi.

La biotrasformazione di **1b** con con il ceppo 23C viene condotta con la stessa metodologia usata per **1a**: dopo una prima aggiunta di **1b** (concentrazione di 1g/L) si osserva la totale scomparsa del substrato e quindi viene aggiunta una seconda aliquota di **1b** (1g/L) . Dopo 18 h di incubazione si ottengono l'acido 3-cheto-6 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcolan-1,4-dien-22-oico **9b** (5%), l'acido 3,9 $\beta$ -diidrossi-6 $\xi$ -epossi-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colantrien-22-oico **15b** (5%) e l'acido 3,4,9 $\beta$ -triidrossi-6 $\beta$ -epossi-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colantrien-22-oico **16b** (45%) (Schema 6).

In questo caso a differenza di quello che avviene nel processo di degradazione classico, l'apertura dell'anello B a seguito dell'idrossilazione in C9 avviene senza la totale degradazione della catena in C17. La formazione dei secosteroidi **15b** e **16b** avviene infatti per idrossilazione del 3-cheto-6 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcolan-1,4-dien-22-oico **9b**, con conseguente rottura spontanea del legame C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>. Data la presenza di un gruppo ossidrilico in C-6, il prodotto di apertura riarrangia per attacco nucleofilo del gruppo ossidrilico sul carbonile in C-9 portando alla formazione dei due secosteroidi in forma emiacetalica **15b** e **16b**.





Schema 6

## **Parte sperimentale**

### **Isolamento attinomiceti. Procedura Generale**

#### ***Preparazione del terreno solido***

In 1 L di acqua distillata vengono sciolti 39 g di terreno Columbia agar composto da: digerito enzimatico della caseina (5 g), digerito enzimatico di tessuti animali (8 g), peptone arricchito in lieviti (10 g), amido di mais (1 g), NaCl (5 g) e agar (14 g).

Dopo sterilizzazione in autoclave a 121° C per 15 minuti, la soluzione viene lasciata raffreddare fino a 50-55° C, temperatura alla quale viene aggiunta la miscela di antibiotici Selectatab, presente sotto forma di compresse a base di metronidazolo (2.5 mg/L) e acido nalidixico (25 mg/L). Si aggiunge una compressa ogni 100 mL di terreno ed è importante rispettare la temperatura sopraindicata per evitare la solidificazione dell'agar e la degradazione dell'antibiotico.

#### ***Preparazione delle piastre***

Si lavora sotto cappa a flusso laminare per garantire condizioni di sterilità. Le piastre di Petri (Ø 90 mm x h 15 mm) vengono riempite con il terreno agarizzato (20-25 mL) mantenuto a 50 °C sotto agitazione magnetica in modo da impedire al terreno di raffreddare e quindi solidificare. Le piastre vengono lasciate sotto cappa per consentire la solidificazione.

#### ***Diluizione dei campioni***

Si lavora sotto cappa a flusso laminare per garantire condizioni di sterilità. Vengono effettuate sette diluizioni seriali (da  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) del campione madre, che consiste nello slant contenente la soluzione fisiologica in cui è immerso il tampone con la quale è stato effettuato il prelievo.

Per la prima diluizione si preleva 1 mL dal campione originale e lo si diluisce con 9 mL di H<sub>2</sub>O distillata sterile. Per la successiva diluizione si preleva 1 mL della prima diluizione e si ripete l'operazione e così per le successive diluizioni.

#### ***Piastratura***

Per l'isolamento dei microrganismi viene utilizzata la diluizione  $10^{-4}$  come diluizione di riferimento. Un'aliquota nota di questa diluizione (100 µL) viene pipettata sulla superficie

del terreno agarizzato versato nelle piastre. Con l'aiuto di un'ansa l'inoculo viene distribuito sul terreno e la piastra viene incubata (in genere per non meno di 24h) a 30 °C.

Qualora la diluizione sopraindicata non risulti idonea a causa della scarsa o eccessiva quantità di microrganismi presenti, si procede a selezionare rispettivamente piastre con diluizioni minori ( $10^{-2/-3}$ ), o maggiori ( $10^{-5}$ ).

Nelle piastre con la diluizione scelta vi possono essere diverse colonie microbiche. Ognuna di queste colonie viene purificata mediante striscio su altre piastre fino ad avere una colonia morfologicamente pura. L'operazione di striscio dei vari ceppi può essere ripetuta più volte. I vari ceppi isolati vengono etichettati, il numero del ceppo corrisponde al sito di campionamento e la lettera identifica ceppi diversi dal medesimo sito.

### Biotrasformazioni di acidi biliari su scala analitica. Procedura generale

I batteri provenienti dall'isolamento conservati a 4° C in slant su terreno Columbia agar vengono trasferiti sul terreno denominato ATT, che viene preparato in laboratorio aggiungendo ad acqua distillata triptone (5 g/L), estratto di carne (8 g/L), peptone da caseina (10 g/L), amido di mais (1 g/L) e NaCl (5 g/L). Il terreno così preparato viene trasferito in beute da 50 mL, contenenti ciascuna 20 mL di brodo di coltura. Le beute vengono poi sterilizzate in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Dopo mediamente 72-96 h di crescita per i microrganismi ICE e 48 h isolati in Ecuador (sotto agitazione 110 rpm a 30° C), i sali sodici degli acidi biliari scelti vengono addizionati in concentrazione di 1 g/L (400µL di una soluzione preparata sciogliendo 50 mg di prodotto in 1 mL di acqua distillata). La biotrasformazione viene seguita prelevando campioni (400 µl) ogni 24 h. I campioni vengono acidificati con HCl 1M ed estratti con etil acetato. La fase organica viene analizzata per TLC, utilizzando come solvente etil acetato/cicloesano/acido acetico 70/30/2 per l'acido desossicolico **1a** ed etil acetato/acido acetico 50/2 per l'acido iodesossicolico **1b**. Nel caso in cui si noti la scomparsa del substrato senza la formazione di prodotti, si procede con nuove somministrazioni di substrato. Le biotrasformazioni vengono seguite fino a 10 giorni con prelievi giornalieri. I risultati preliminari della capacità biotrasformativa di questi substrati vengono riportati nelle rispettive Tabelle 8 e 9.

Dall'isolamento ICE solo alcuni hanno biotrasformato i substrati di partenza **1a** e **1b**. I microrganismi dell'isolamento ICE in grado di biotrasformare acido desossicolico e acido iodesossicolico sono riportati in Tabella 8.

**Tabella 8.** Screening biotrasformativo degli attinomiceti (isolati alla ICE) con **1a** e **1b**

Ceppo	Terreno	Acido desossicolico ( <b>1a</b> )	Acido iodesossicolico ( <b>1b</b> )
<b>3A</b>	ATT	SI	SI
<b>7C</b>	ATT	SI	SI
<b>18A</b>	ATT	SI	SI
<b>19C</b>	ATT	SI	SI
<b>23B</b>	ATT	SI	SI
<b>23C</b>	ATT	SI	SI
<b>28D</b>	ATT	SI	NO
<b>29A</b>	ATT	SI	SI

NO = si recupera il prodotto di partenza; SI = si ottengono prodotti identificabili e quantificabili.

**Tabella 9.** Screening biotrasformativo degli attinomiceti (isolati in Ecuador) con **1a** e **1b**

<b>Ceppo</b>	<b>Terreno</b>	<b>Acido desossicolico (1a)</b>	<b>Acido iodesossicolico (1b)</b>
AE 4A	ATT	SI	NO
AE 4B	ATT	SI	NO
AE 6A	ATT	SI	SI
AE 9A	ATT	SI	SI
AE 10B	ATT	SI	NO
AE 12A	ATT	SI	NO
AE 19D	ATT	SI	NO
AE 20A	ATT	SI	SI
AE 22B	ATT	SI	NO
AE 24A	ATT	SI	NO
AE 26A	ATT	SI	SI
AE 29A	ATT	DEGRADA	SI
AE 29B	ATT	DEGRADA	SI

NO = si recupera il prodotto di partenza; SI = si ottengono prodotti identificabili e quantificabili; DEGRADA= il substrato sparisce e non si ottengono altri prodotti.

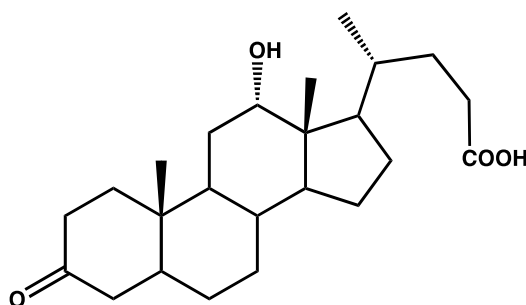
## **Biotrasformazioni di acidi biliari su scala preparativa. Procedura generale**

In una beuta da 50 mL contenente 20 mL di terreno fresco ATT il ceppo microbico selezionato è fatto crescere per 24 h a 30° C sotto agitazione a 110 rpm. Questo preinoculo viene aggiunto in una beuta da 500 mL contenente 100 mL di terreno fresco. Dopo 72-96 h di crescita per i microrganismi ICE e 48 h per i ceppi isolati in Ecuador si aggiunge il sale sodico dell'acido biliare (100 mg, 1g/L di concentrazione) previa valutazione. La biotrasformazione viene seguita per TLC. A fine reazione le colture vengono centrifugate (5000 rpm, 20 min) per eliminare le cellule. Il surnatante viene acidificato a pH 2-3 con HCl 1M ed estratto con etile acetato (3 x 100 mL). Le fasi organiche riunite vengono anidrificate con l'aggiunta di sodio solfato anidro, successivamente rimosso per filtrazione.

Dopo l'evaporazione del solvente, i residui sono stati sottoposti a PLC (Preparative Layer Chromatography), utilizzando come eluente una miscela di etile acetato/cicloesano/acido acetico, ove necessario, variando le proporzioni. o cromatografati su colonna di gel di silice per purificare i prodotti di reazione.

## Biotrasformazioni dell'acido desossicolico 1a

Le biotrasformazioni dell'acido desossicolico **1a** con i ceppi **7C**, **18A**, **19C**, **23B**, (isolamento ICE) e **AE6A**, **AE10B**, **AE12A**, **AE19D**, **AE22B**, **AE24A**, **AE26A** (isolamento Ecuador), utilizzando la procedura generale, hanno dato come prodotto il corrispondente 3-cheto derivato **2a**.



Acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-5 $\beta$ -colan-24-oico **2a**

L'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-5 $\beta$ -colan-24-oico **2a** [3] mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche:  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) segnali selezionati:  $\delta$  0.72 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 0.98 (*d*, 3H,  $J = 9.3\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ -21), 1.0 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 4.06 (*s*, 1H, H-12 $\beta$ ).

I risultati delle biotrasformazioni sono riportati in Tabella 10 (isolamento ICE) e Tabella 11 (isolamento Ecuador).

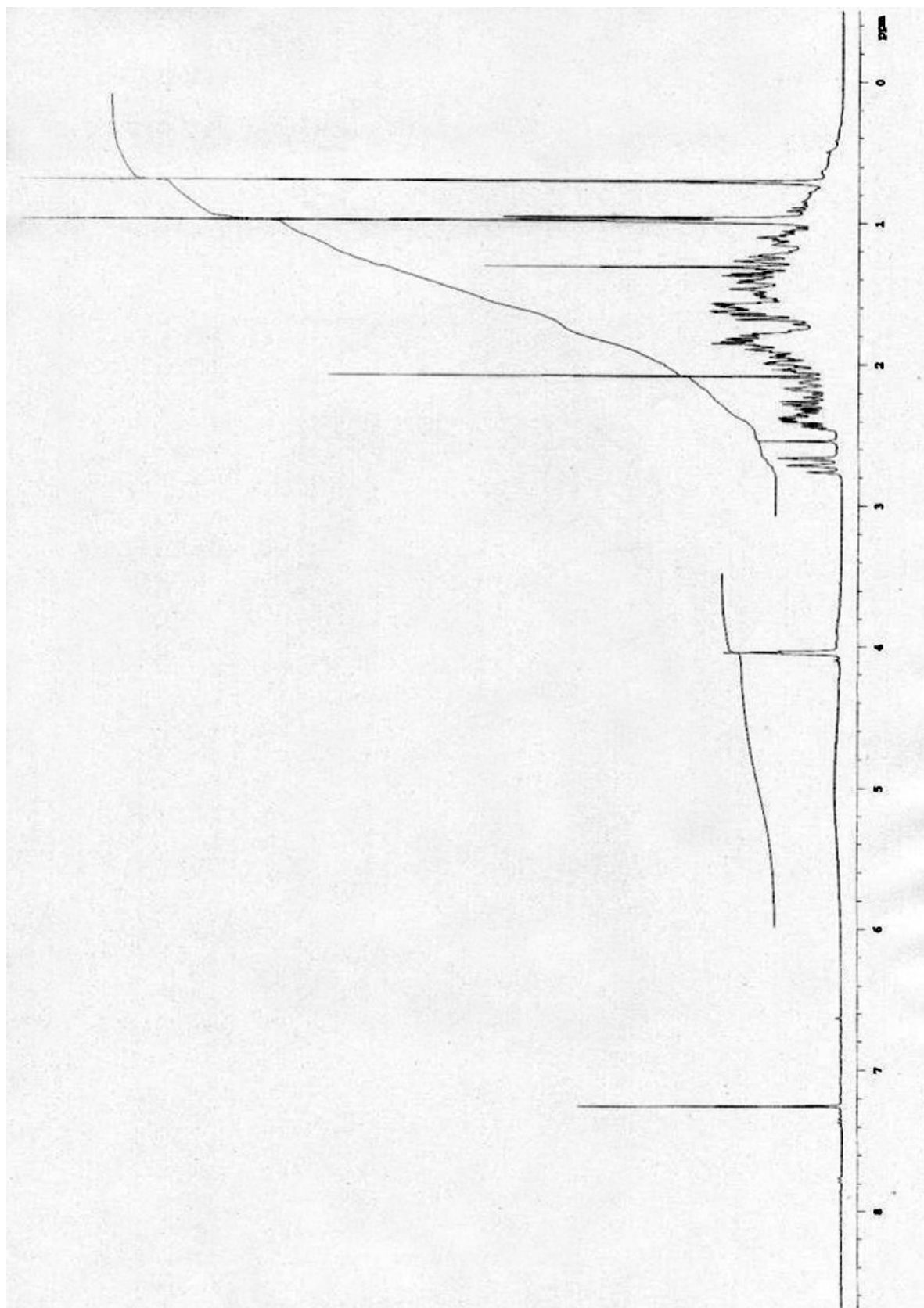
**Tabella 10.** Biotrasformazioni dell'acido desossicolico **1a**

Ceppo	Tempo (h)	<b>2a</b> (resa%)
<b>7C</b>	96	95
<b>18A</b>	24	95
<b>19C</b>	240	90
<b>23B</b>	168	50

**Tabella 11.** Biotrasformazioni dell'acido desossicolico **1a**

<b>Ceppo</b>	<b>Tempo (7)</b>	<b>2a (resa %)</b>
AE6A	168	87
AE10B	24	90
AE12A	168	87
AE19D	72	22
AE22B	168	35
AE24A	168	40
AE26A	168	30

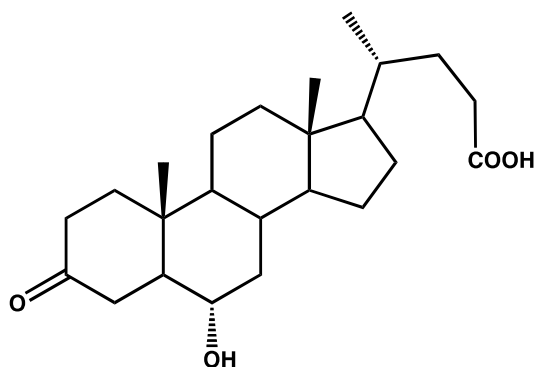




Acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-5 $\beta$ -colan-24-oico **2a**

## Biotrasformazioni dell'acido iodesossicolico **1b**

Le biotrasformazioni dell'acido iodesossicolico **1b** con i ceppi **7C**, **18A**, **19C**, **23B**, **29A** (isolamento ICE), **AE6A**, **AE9A**, **AE26A**, **AE29A** (isolamento Ecuador) utilizzando la procedura generale, hanno dato come prodotto il corrispondente 3-cheto derivato **2b**.



Acido 3-cheto-6 $\alpha$ -idrossi-5 $\beta$ -colan-24-oico **2b**

L'acido 3-cheto-6 $\alpha$ -idrossi-5 $\beta$ -colan-24-oico **2b** [40] mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) segnali selezionati:  $\delta$  0.68 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 0.95 (*d*, 3H,  $J = 7\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ -21), 1.0 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 4.1 (*m*, 1H, H6).

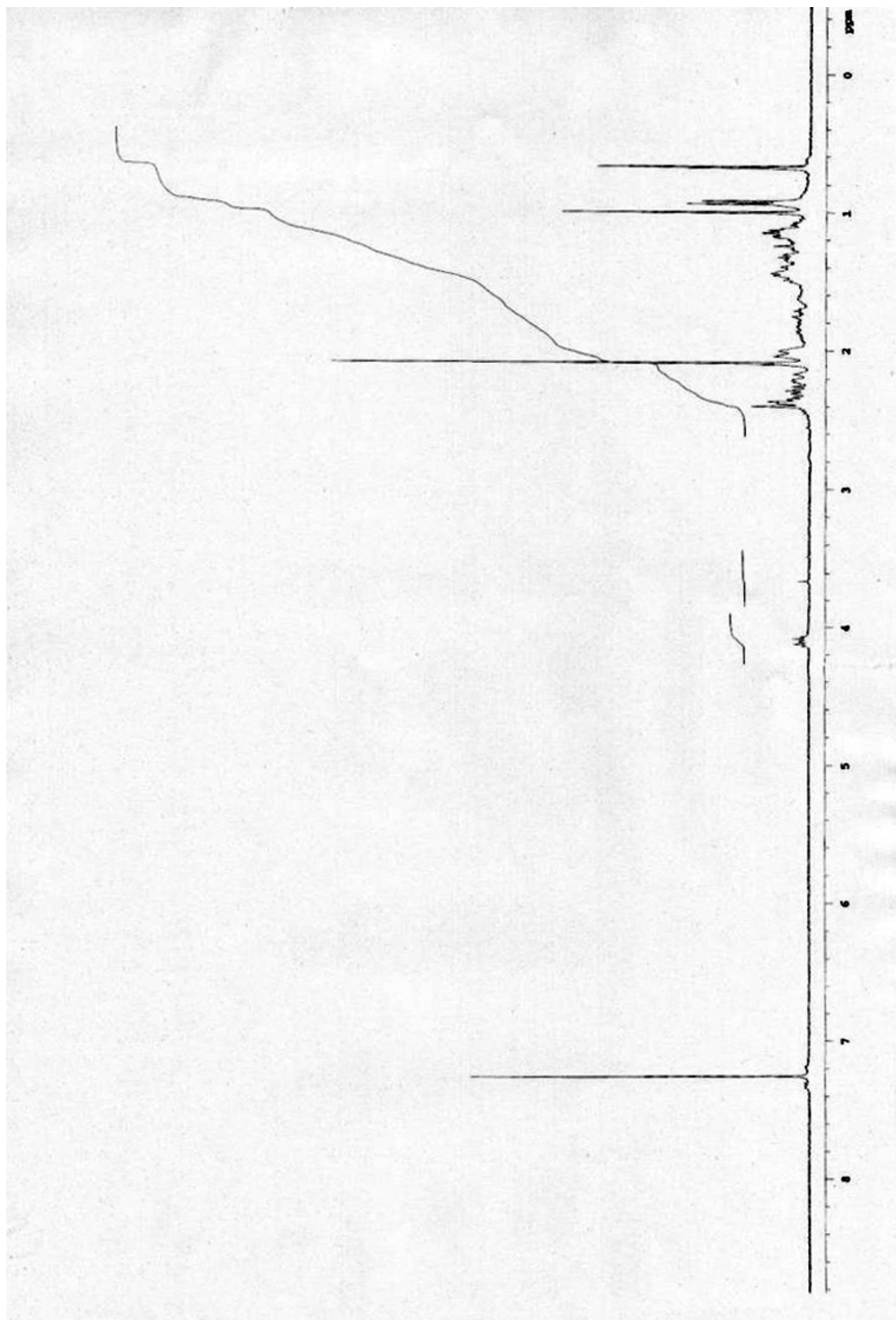
I risultati delle biotrasformazioni sono riportati in Tabella 12 (isolamento ICE) e Tabella 13 (isolamento Ecuador).

**Tabella 12.** Biotrasformazioni dell'acido iodesossicolico **1b**

Ceppo	Tempo (h)	<b>2b</b> (resa%)
<b>7C</b>	96	95
<b>18A</b>	24	95
<b>19C</b>	240	90
<b>23B</b>	168	50
<b>29A</b>	24	90

**Tabella 13.** Biotrasformazioni dell'acido iodesossicolico **1b**

Ceppo	Tempo (h)	<b>2b</b> (resa%)
<b>AE6A</b>	24	70
<b>AE9A</b>	48	89
<b>AE26A</b>	24	75
<b>AE29A</b>	168	95

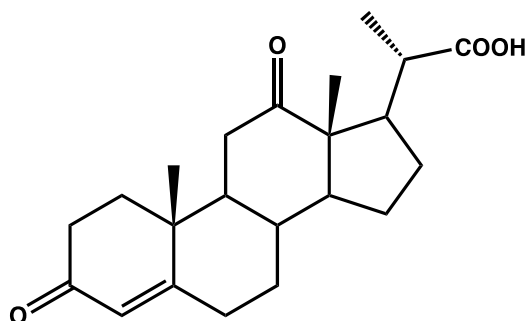


Acido 3-cheto-6 $\alpha$ -idrossi-5 $\beta$ -colan-24-oico **2b**

## Biotrasformazione di acido desossicolico **1a** con il ceppo 23C

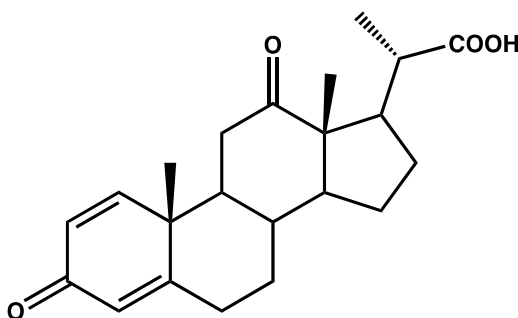
La biotrasformazione dell'acido desossicolico **1a** con il ceppo 23C viene condotta secondo la procedura generale somministrando, a crescita avvenuta, 1g/L di acido desossicolico **1a** sotto forma di sale sodico. La biotrasformazione viene monitorata per TLC. A 24 h dalla somministrazione di **1a** la TLC mostra la totale scomparsa del prodotto di partenza. Si procede quindi a una seconda aggiunta di **1a** come sale sodico (1g/L). A 18h dalla seconda somministrazione, la reazione viene fermata e i prodotti separati come descritto nella procedura generale. Da cromatografia su colonna di silice (eluente etilacetato/cicloesano/acido acetico 50:50:1) si sono ottenuti l'acido 3,12-dicheto-4-ene-23,24-dinorcolan-22-oico **10a** (15%), l'acido 3,12-dicheto-1,4-diene-23,24-dinorcolan-22-oico **11a**, (15%) e l'acido 3,12 $\alpha$ -diidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-oico **14a** [52] (15%).

L'acido 3,12-dicheto-4-ene-23,24-dinorcolan-22-oico **10a** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) segnali selezionati:  $\delta$  1.05 (*s*,  $\text{CH}_3$ -18), 1.2 (*d*,  $J = 7$  Hz,  $\text{CH}_3$ -21), 1.25 (*s*,  $\text{CH}_3$ -19), 5.80 (*s*, 1H-4).



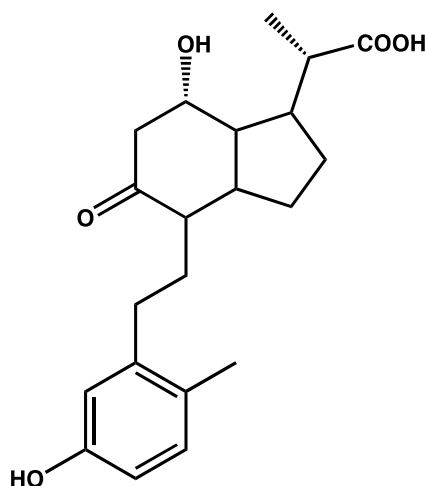
Acido 3,12-dicheto-4-ene-23,24-dinorcolan-22-oico **10a**

L'acido 3,12-dicheto-1,4-diene-23,24-dinorcolan-22-oico **11a** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche:  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) segnali selezionati:  $\delta$  1.10 (*s*,  $\text{CH}_3$ -18) 1.19 (*d*,  $J = 6.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ -21), 1.27 (*s*,  $\text{CH}_3$ -19), 6.10 (*s*, 1H-4), 6.22 (*dd*,  $J = 9$  e 1 Hz, 1H), 6.85 (*d*,  $J = 9$  Hz, 1H).



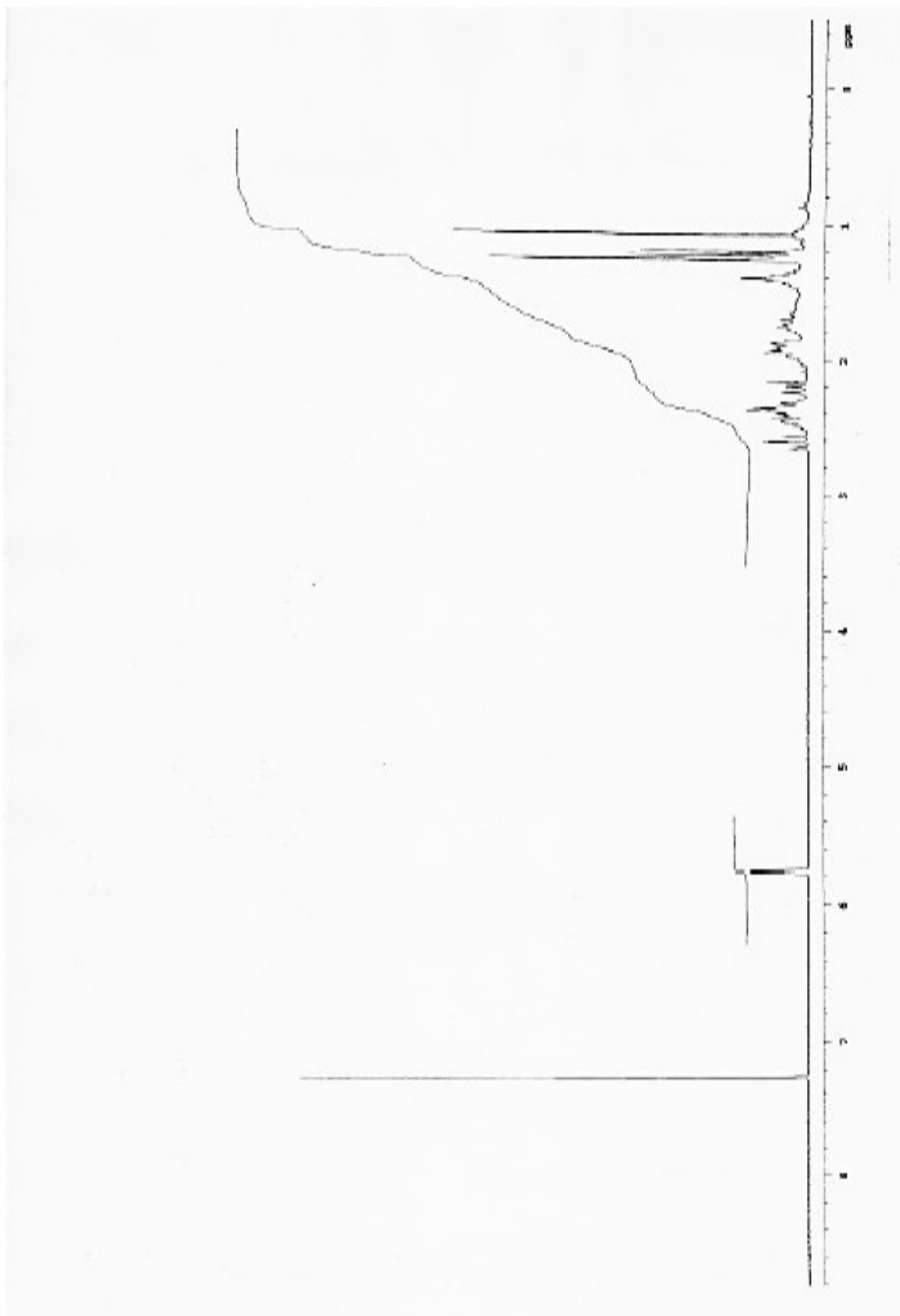
Acido 3,12-dicheto-1,4-diene-23,24-dinorcolan-22-oico **11a**

L'acido 3,12 $\alpha$ -diidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-oico **14a** mostra le seguenti caratteristiche: cristalli bianchi (da metanolo/acqua) p.f. 165-167°C; IR (CHCl<sub>3</sub>, come estere metilico)  $\nu_{\max}$  3300, 1730, 1700 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) picchi selezionati:  $\delta$  1.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.25 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.13 (m, 1H, H-12 $\beta$ ), 6.48 (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.56 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.89 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  12.6, 16.9, 18.5, 25.6, 28.3, 28.8, 30.8, 32.0, 44.0, 44.5, 47.8, 48.0, 51.6, 74.0, 113.6, 116.7, 127.7, 131.8, 143.3, 156.3, 180.1, 213.6; ESI-MS: calcolato per C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>: 374.21. Trovato m/z (% relativa al picco base): 373.27 (100) [M-H]<sup>-</sup>.

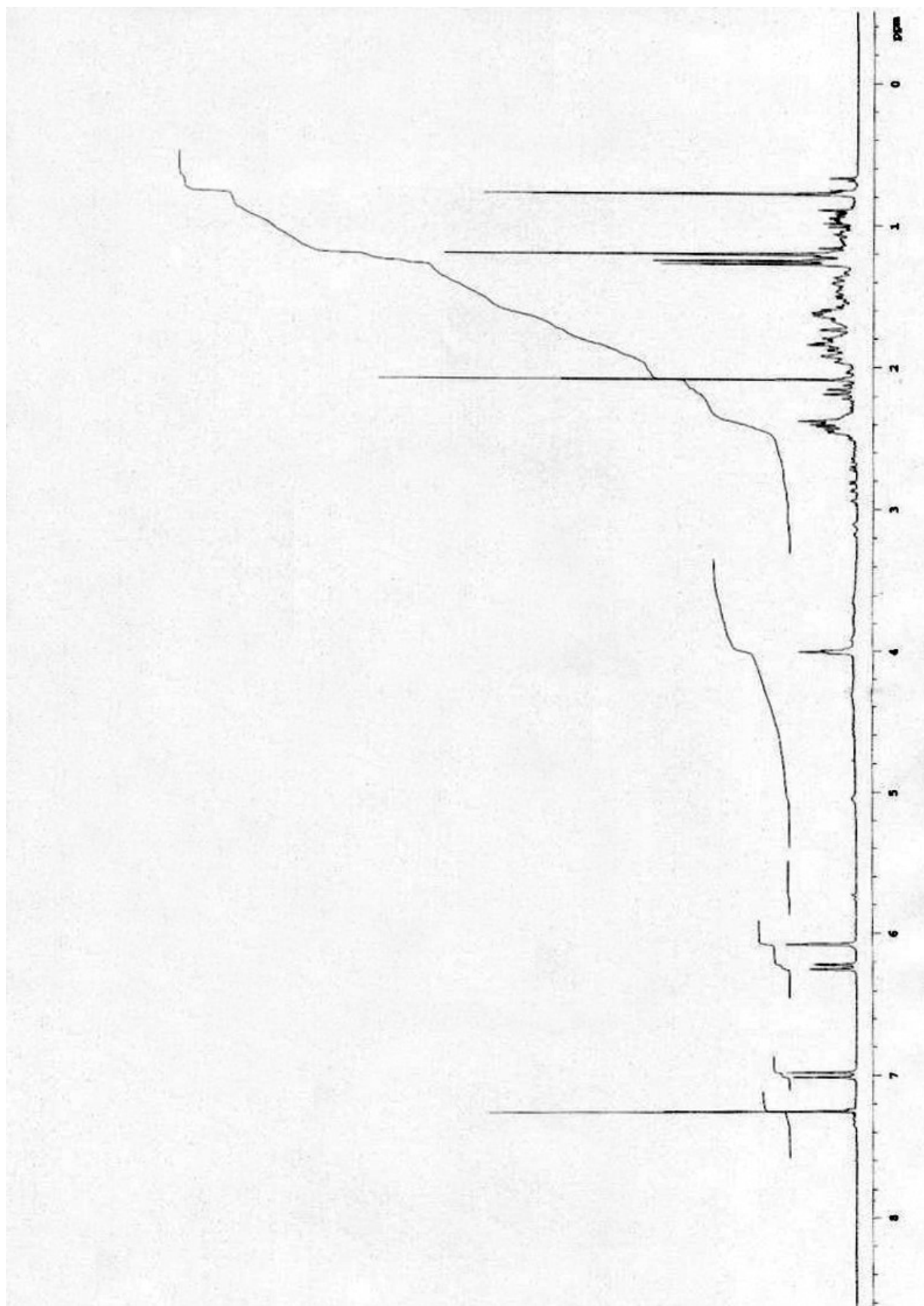


**14a**

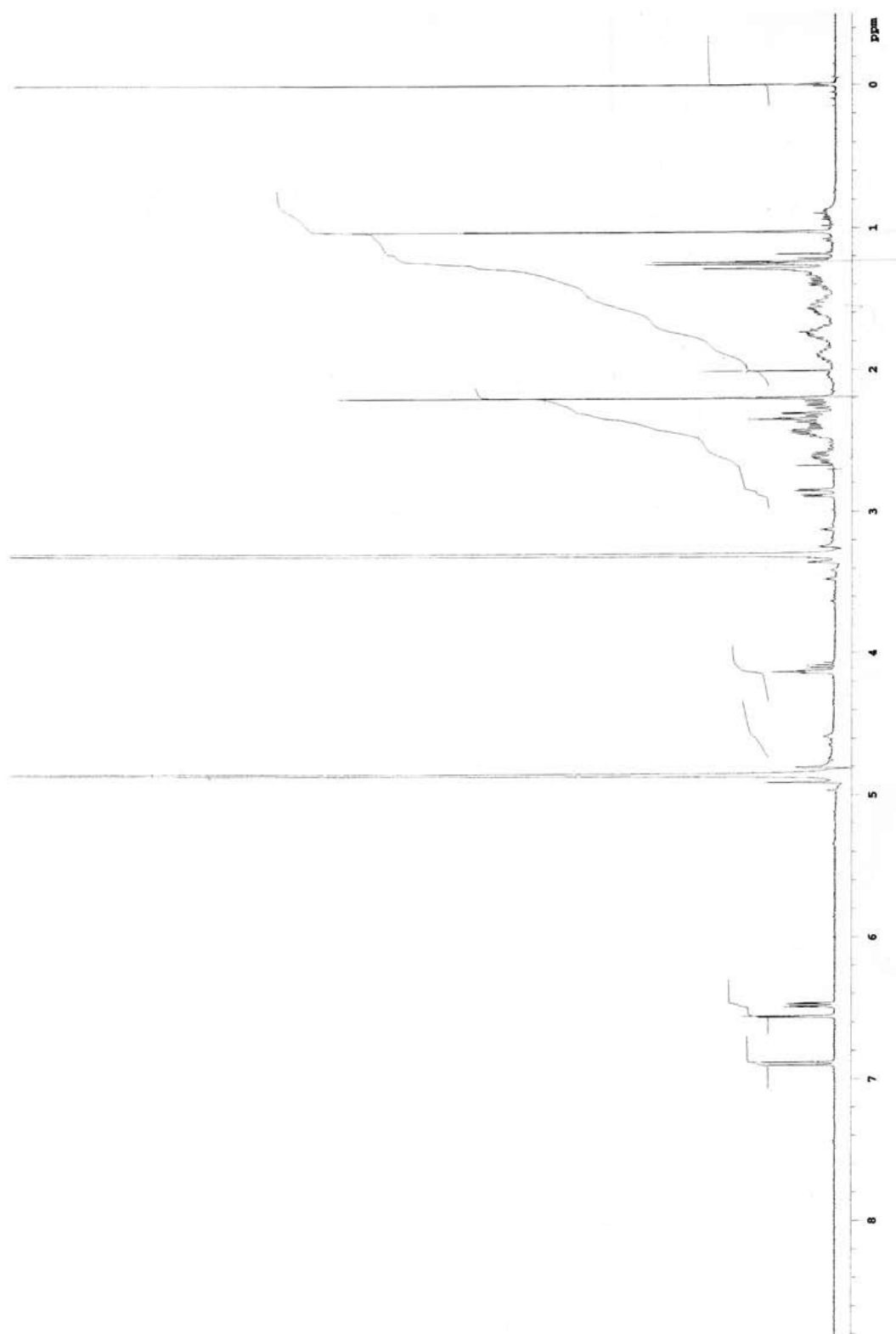
Acido 3,12 $\alpha$ -diidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-oico **14a**



Acido3,12-dicheto-4-ene-23,24-dinorcolan-22-oico **10a**



Acido 3,12-dicheto-1,4-diene-23,24-dinorcolan-22-oico **11a**

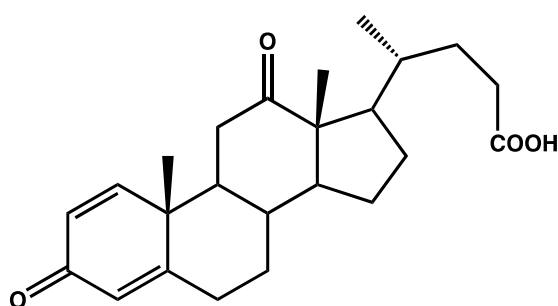


Acido 3,12 $\alpha$ -diidrossi-9-osso-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colatrien-22-oico **14a**



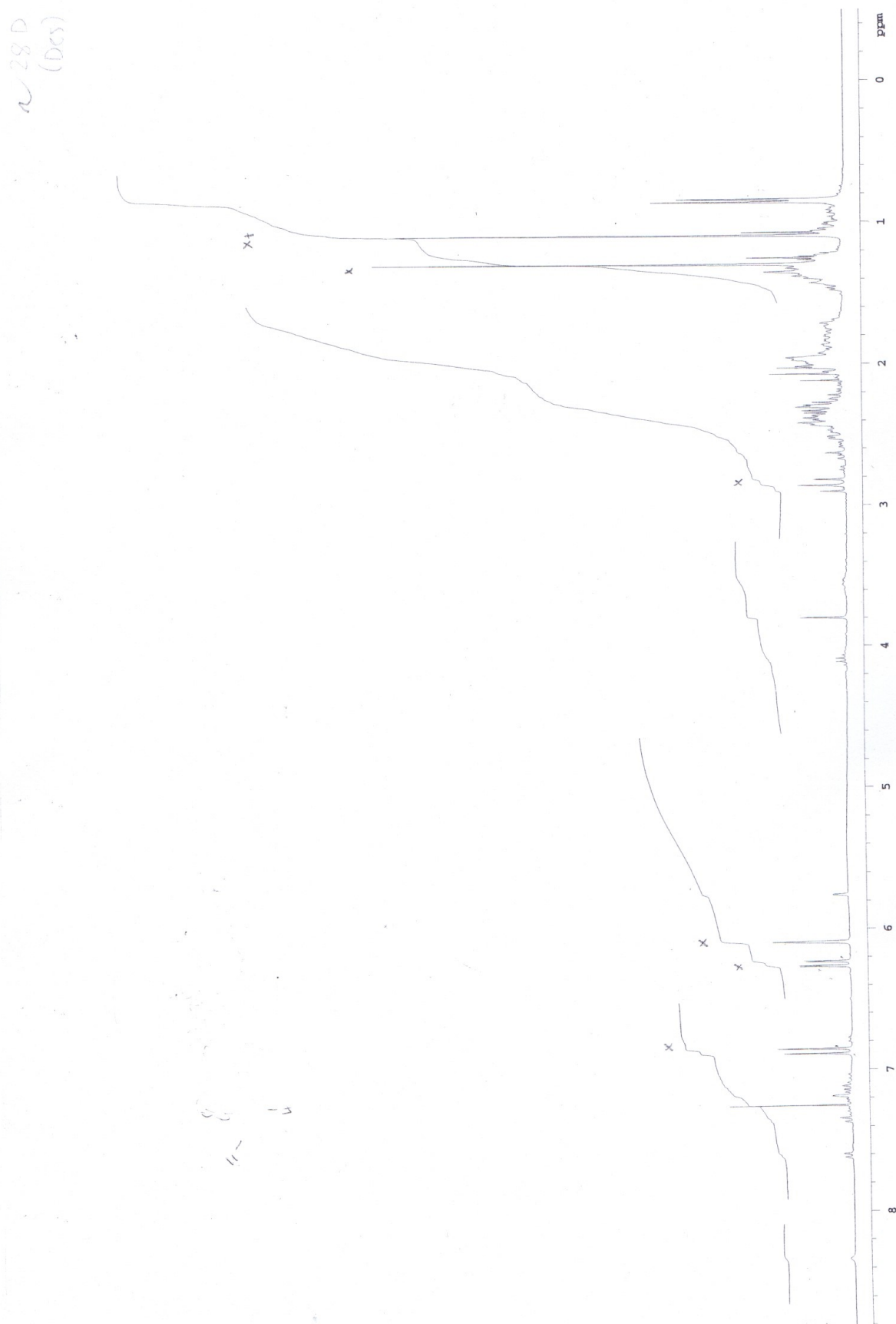
## Biotrasformazione di acido desossicolico **1a** con il ceppo **28D**

La biotrasformazione dell'acido desossicolico **1a** con il ceppo **28D** viene condotta secondo la procedura generale somministrando, a crescita avvenuta, 1g/L di acido desossicolico **1a** sotto forma di sale sodico. La biotrasformazione viene monitorata per TLC. A 24 h dalla somministrazione di **1a** la TLC mostra la totale scomparsa del prodotto di partenza. Si procede quindi a una seconda aggiunta di **1a** come sale sodico (1g/L). A 18h dalla seconda somministrazione, la reazione viene fermata e dopo cromatografia (eluente 70/30/2.) l'acido 3,12-dicheto-1,4-diene-colan-24-oico **5a** [53] (80%).



Acido 3,12-dicheto-1,4-diene-colan-24-oico **5a**

L'acido 3,12-dicheto-1,4-diene-colan-24-oico **5a** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche:  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) segnali selezionati:  $\delta$  0.80 (*d*,  $J = 6.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ -21), 1.10 (*s*,  $\text{CH}_3$ -18) 1.25 (*s*,  $\text{CH}_3$ -19), 6.10 (*s*, 1H- $\text{H}_4$ ), 6.22 (*dd*,  $J = 9$  e 1 Hz, 1H), 6.85 (*d*,  $J = 9$  Hz, 1H).

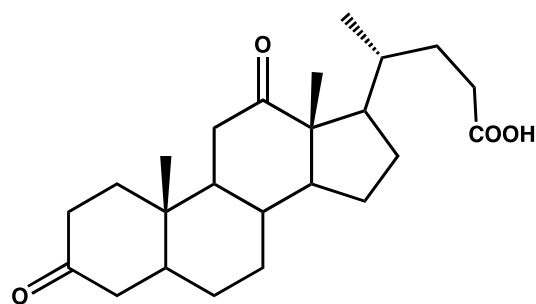
Acido 3,12-dicheto-1,4-diene-colan-24-oico **5a**

## Biotrasformazione di acido desossicolico **1a** con i ceppi AE29A e AE29B

Le biotrasformazioni di **1a** con i ceppi AE29A e AE29B, utilizzando la procedura generale, dopo 24 h mostrano la totale scomparsa del prodotto di partenza. Viene quindi ripetuta l'aggiunta del sale sodico dell'acido desossicolico **1a** aumentando le quantità (400 mg pari 2 g/L di concentrazione) e dopo 24 h si ancora **1a** totale scomparsa di **1a**. Si ripete l'aggiunta usando 2 g di **1a** come sale sodico (concentrazione 10 g/L).

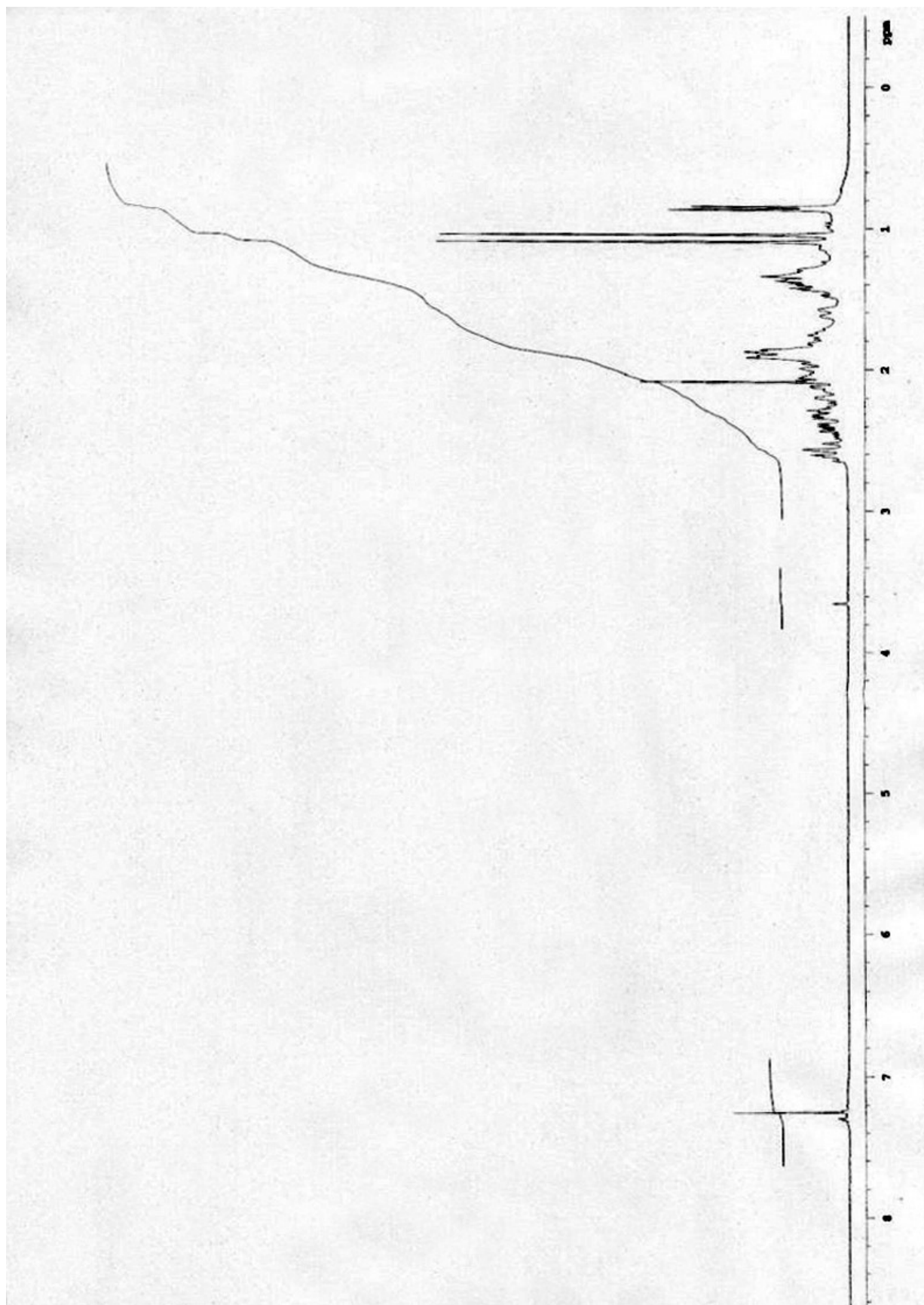
Con il ceppo AE29A la reazione viene fermata dopo 48h e la cromatografia su colonna di silice (eluente etilacetato/cicloesano/acido acetico 70:30:2) fornisce il 3-cheto derivato **2a** (14%) e il 3,12-dicheto derivato [54] **3a** (30%).

Con il ceppo 29B dopo 72h la cromatografia su colonna di silice (eluente etilacetato/cicloesano/acido acetico 50:50:2) fornisce il 3,12-dicheto-derivato **3a** (45%).



Acido 3,12-dicheto-5 $\beta$ -colan-24-oico **3a**

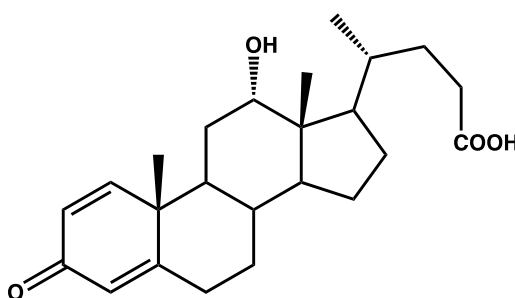
L'acido 3,12-dicheto-5 $\beta$ -colan-24-oico **3a** mostra le seguenti caratteristiche:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) picchi selezionati:  $\delta$  0.82 (*d*, 3H,  $\text{CH}_3$ -21) 1.05 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 1.05 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 1.1 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -18).



Acido 3,12-dicheto-5β-colan-24-oico 3a

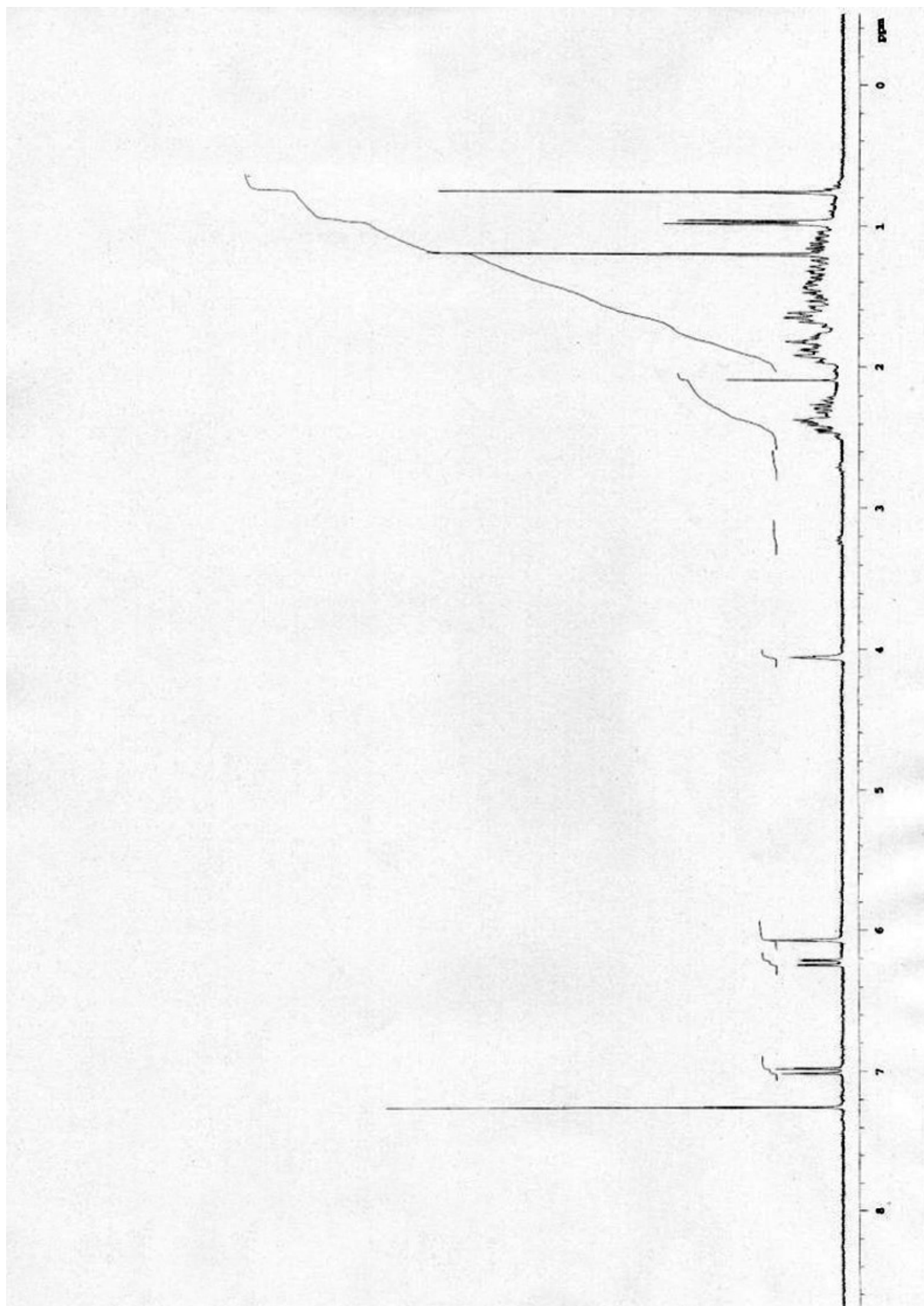
## Biotrasformazioni di acido desossicolico **1a** con il ceppo AE4A

La biotrasformazione viene condotta secondo la procedura generale e viene fermata a 168 h (7 giorni). La cromatografia su colonna di silice (eluente etilacetato/cicloesano/acido acetico 40:60:1) fornisce come prodotti l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-5 $\beta$ -colan-24-oico **2a** (12%), l'acido 3,12-dicheto-5 $\beta$ -colan-24-oico **3a** (30%) e l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-col-1,4-dien-24-oico **7a** (15%).



Acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-col-1,4-dien-24-oico **7a**

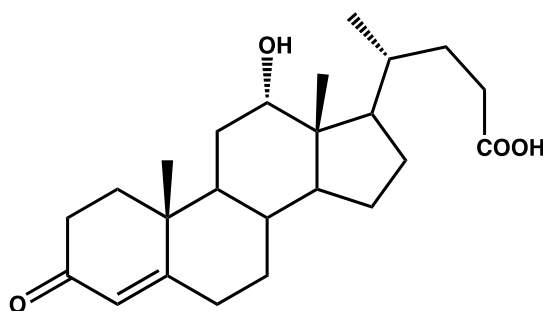
L'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-col-1,4-dien-24-oico **7a** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) picchi selezionati:  $\delta$  0.78 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 1.01 (*d*, 3H,  $J$  = 9 Hz,  $\text{CH}_3$ -21), 1.21 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 4.05 (*s*, 1H, H-12 $\beta$ ), 6.07 (*s*, 1H, H-4), 6.22 (*dd*, 1H,  $J$  = 10 e 1 Hz, H-2), 7.00 (*d*, 1H,  $J$  = 10 Hz, H-1).



Acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-col-1,4-dien-24-oico **7a**

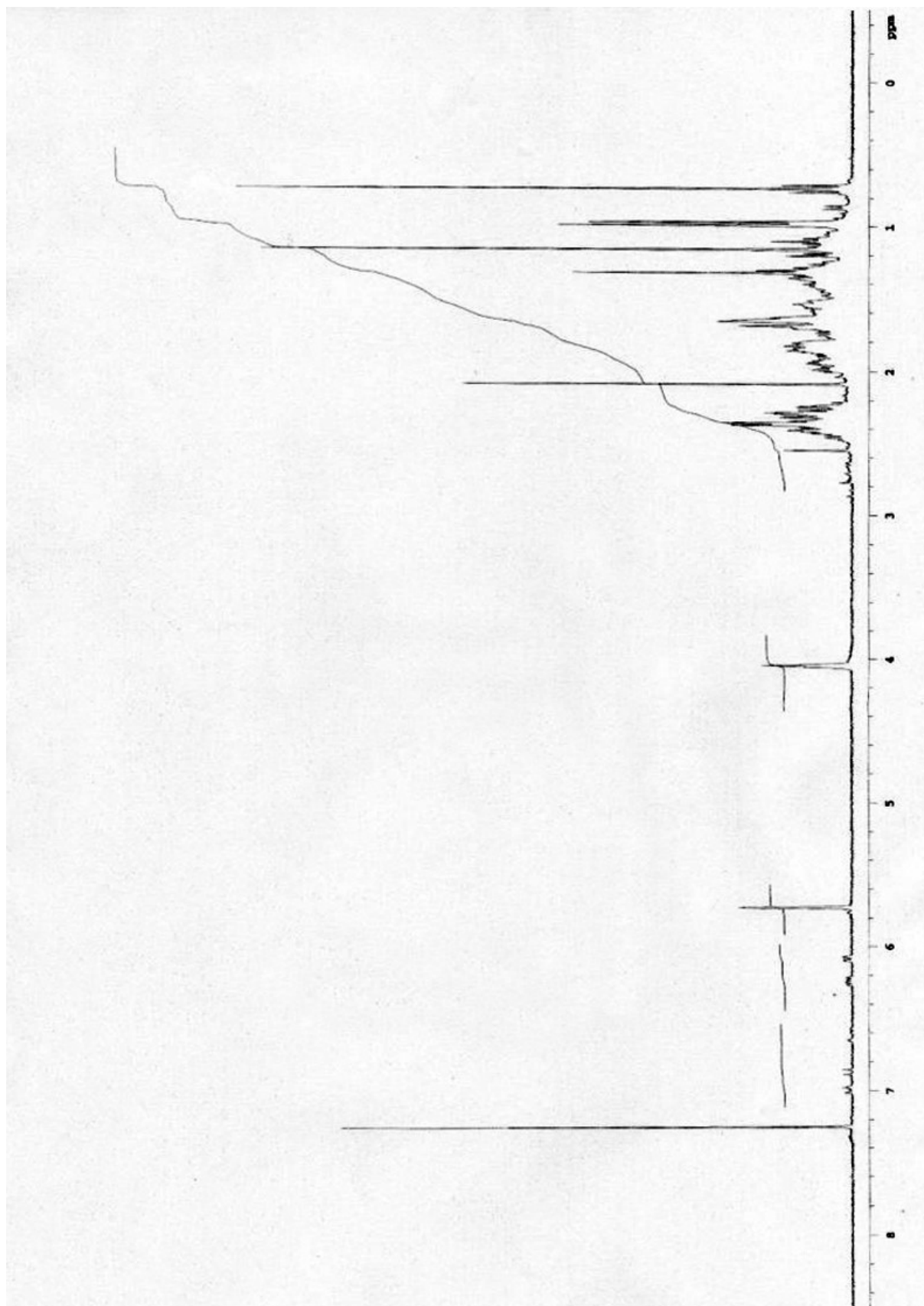
## Biotrasformazioni di acido desossicolico **1a** con il ceppo AE4B

La biotrasformazione viene condotta secondo la procedura generale e viene fermata a 24h. La cromatografia su colonna di silice (eluente etilacetato/cicloesano/acido acetico 60:40:2) e la successiva PLC su silice (eluente etilacetato/cicloesano/acido acetico 70:30:2), forniscono come prodotti l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-col-4-en-24-oico **6a** (15%) e l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-col-1,4-dien-24-oico **7a** (18%).



Acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-col-4-en-24-oico **6a**

L'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-col-4-en-24-oico **6a** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) picchi selezionati:  $\delta$  0.75 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 0.99 (*d*, 3H,  $J$  = 7 Hz,  $\text{CH}_3$ -21), 1.18 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 4.05 (*s*, 1H, H-12 $\beta$ ), 5.73 (*s*, 1H, H-4).



Acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-col-4-en-24-oico **6a**

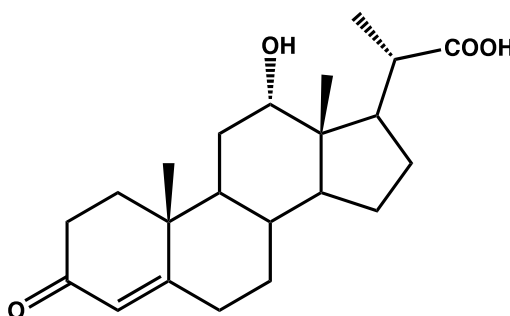


## Biotrasformazioni di acido desossicolico **1a** con il ceppo AE9A

La biotrasformazione viene condotta secondo la procedura generale.

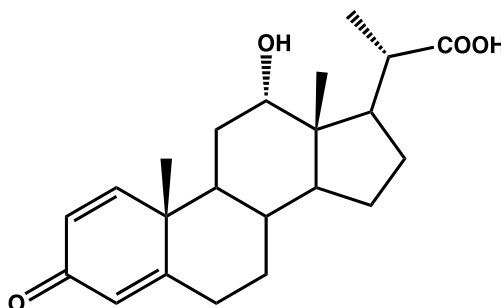
Dopo 24 h la biotrasformazione viene fermata e la cromatografia su colonna di silice (eluente etilacetato/cicloesano/acido acetico 70:30:2) fornisce come prodotti l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcol-4-en-22-oico **8a** (15%) e l'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcol-1,4-dien-22-oico **9a** [54] (17%).

L'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcol-4-en-22-oico **8a** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) picchi selezionati:  $\delta$  0.75 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 1.17 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 1.24 (*d*, 3H,  $J = 7$  Hz,  $\text{CH}_3$ -21), 3.99 (*s*, 1H, H-12 $\beta$ ), 5.73 (*s*, 1H, H-4).

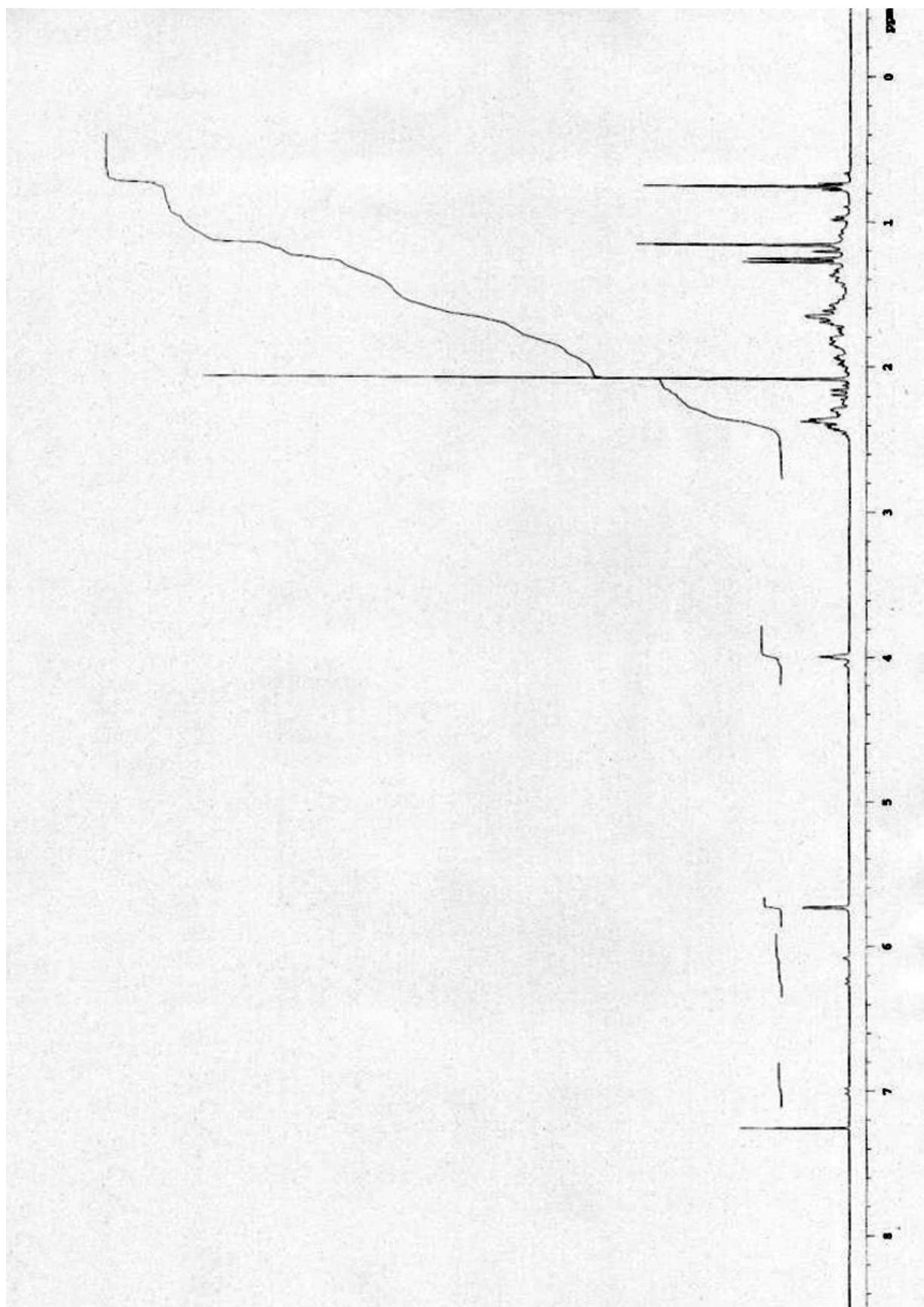


Acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcol-4-en-22-oico **8a**

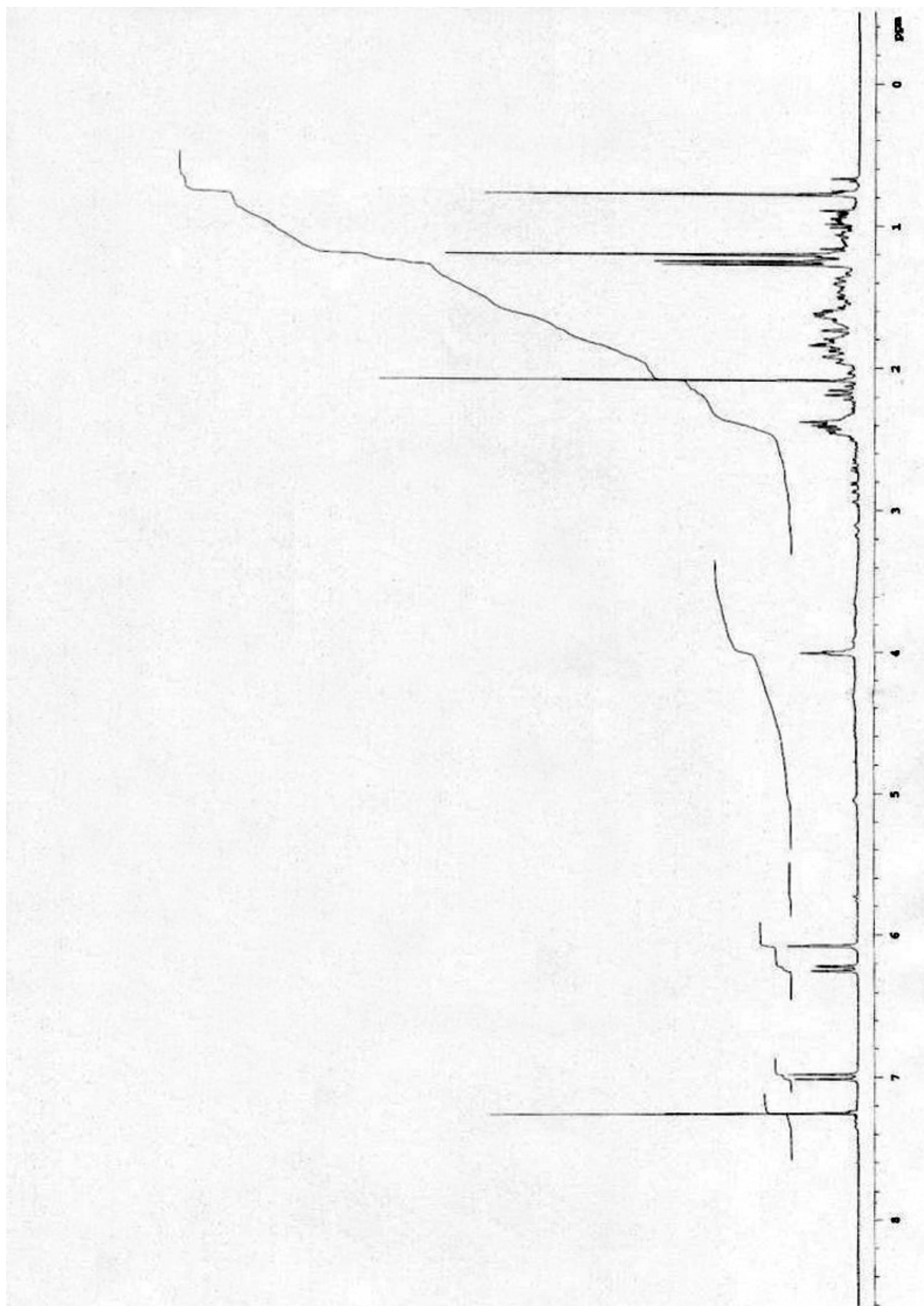
L'acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcolan-1,4-dien-22-oico **9a** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) picchi selezionati:  $\delta$  0.79 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 1.2 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 1.23 (*d*, 3H,  $J = 6$  Hz,  $\text{CH}_3$ -21), 4.0 (*s*, 1H, H-12 $\beta$ ), 6.05 (*s*, 1H, H-4), 6.22 (*dd*, 1H,  $J = 10$  e 1 Hz, H-2), 7.01 (*d*, 1H,  $J = 10$  Hz, H-1).



Acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcol-1,4-dien-22-oico **9a**.



Acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcol-4-en-22-oico **8a**



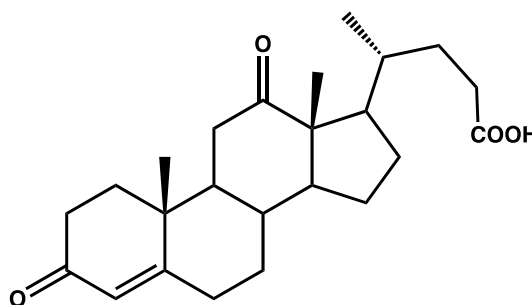
Acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcol-1,4-dien-22-oico **9a**

## Biotrasformazioni di acido desossicolico **1a** con il ceppo AE20A

La biotrasformazione viene condotta secondo la procedura generale ma, essendo piuttosto rapida, viene ripetuta variando la concentrazione di **1a**.

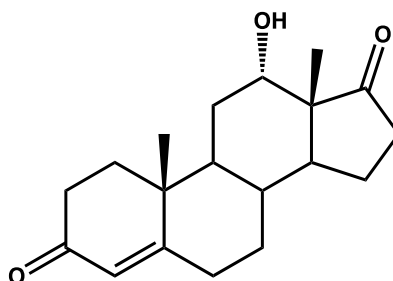
La reazione condotta con concentrazione 1g/L di **1a** viene fermata dopo 24h. La cromatografia su silice (eluente etilacetato/cicloesano/acido acetico 70:30:2) fornisce l'acido 3,12-dicheto-4-ene-23,24-dinorcolan-22-oico **10a** (16%) e il 12 $\alpha$ -idrossi-4-androstene-3,17-dione **12a** (51%).

La stessa reazione, somministrando 2g/L **1a**, fornisce, dopo 24 h e cromatografia su silice (eluente etilacetato/cicloesano/acido acetico 50:50:2), l'acido 3,12-dicheto-4-colen-24-oico **4a** (46%) questo prodotto mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) picchi selezionati:  $\delta$  0.8 (*d*, 3H,  $J = 7$  Hz,  $\text{CH}_3$ -21), 1.1 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 1.25 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 5.78 (*s*, 1H, H-4).

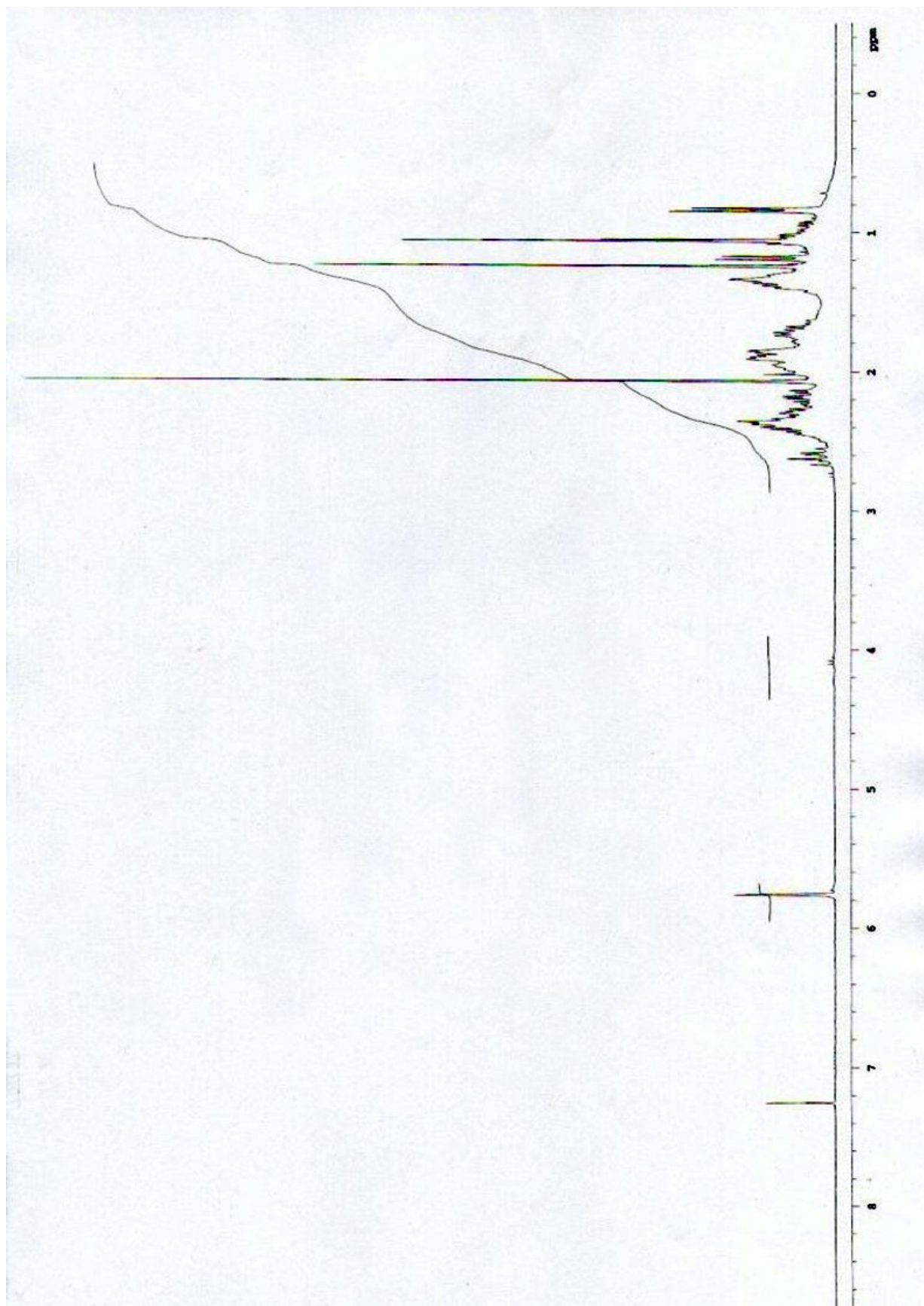


Acido 3,12-dicheto-colen-24-oico **4a**

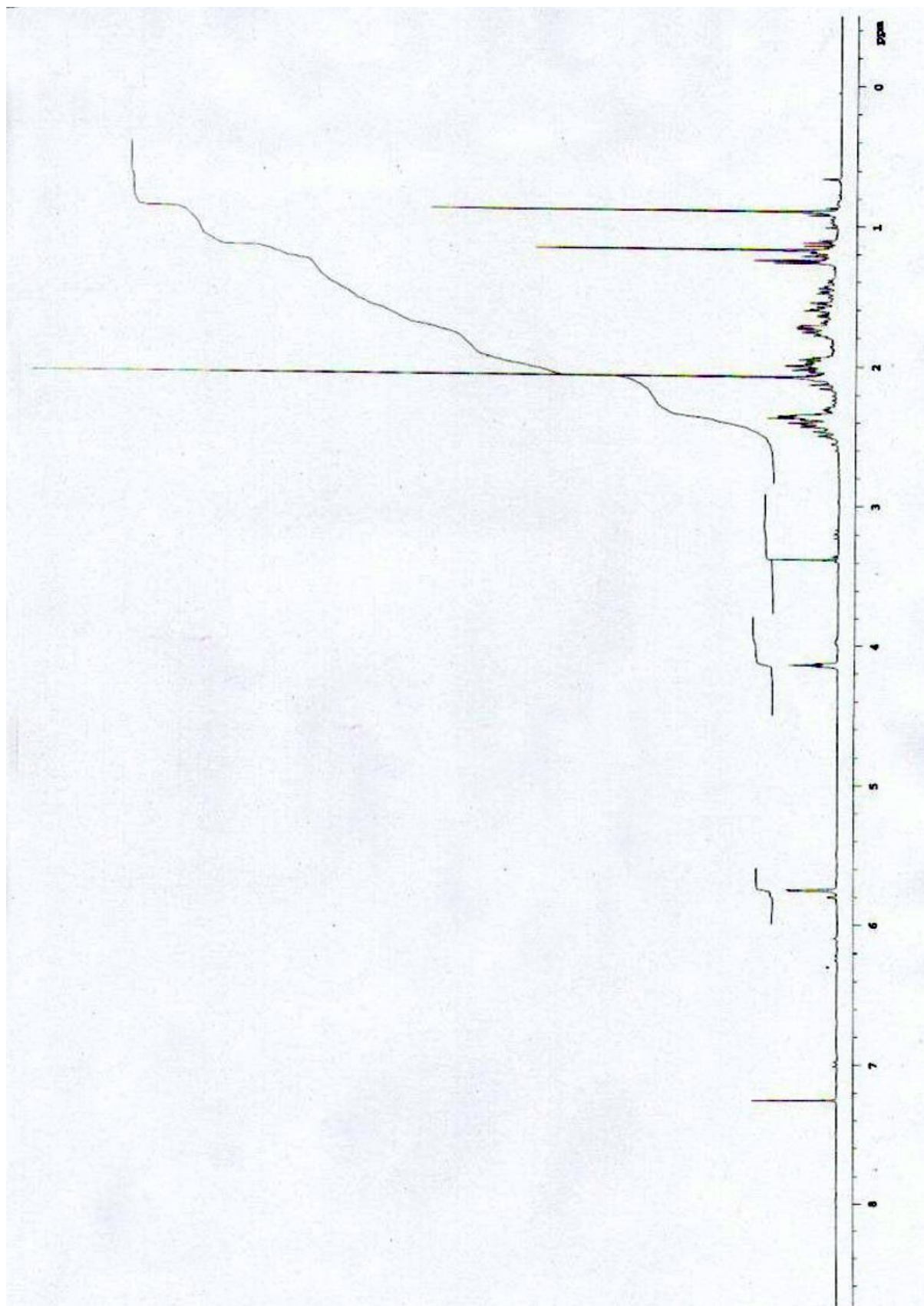
Il 12 $\alpha$ -idrossi-4-androstene-3,17-dione **12a** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) picchi selezionati:  $\delta$  0.89 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -19), 1.18 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ -18), 4.18 (*s*, 1H, H-12 $\beta$ ), 5.78 (*s*, 1H, H-4).



12 $\alpha$ -idrossi-4-androstene-3,17-dione **12a**



Acido 3,12-dicheto-4-colen-24-oico **4a**

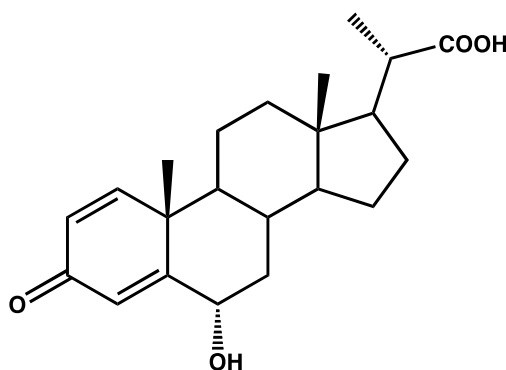


12 $\alpha$ -idrossi-4-androstene-3,17-dione **12a**

## Biotrasformazione di acido iodesossicolico **1b** con il ceppo **23C**

La biotrasformazione dell'acido iodesossicolico **1b** con il ceppo **23C** viene condotta secondo la procedura generale somministrando, a crescita avvenuta, 1g/L di acido iodesossicolico **1b** sotto forma di sale sodico. La biotrasformazione viene monitorata per TLC. Dopo 24 h la TLC mostra la totale scomparsa di **1b** prodotto di partenza. Si procede quindi a una seconda aggiunta di **1b** come sale sodico (1g/L). Dopo 18 h la reazione viene fermata e i prodotti separati come descritto nella procedura generale. Da PLC su silice (eluente etilacetato/cicloesano/acido acetico 50:50:1) si sono ottenuti, l'acido 3-cheto-6 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcolan-1,4-diene-22-oico **9b** (5%), e l'acido 3,9 $\beta$ -diidrossi-6 $\xi$ 1-epossi-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colantrien-22-oico **15b** (5%) e l'acido 3,4,9 $\beta$ -triidrossi-6 $\beta$ -epossi-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colantrien-22-oico **16b** (45%) [55].

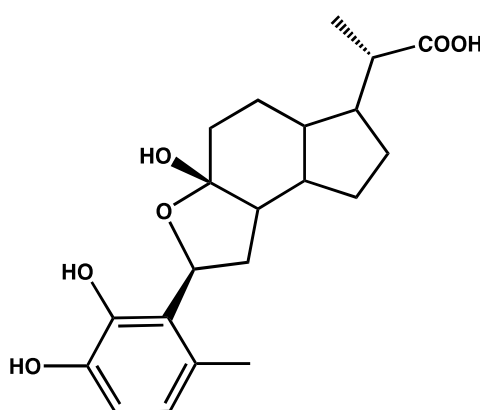
L'acido 6 $\alpha$ -idrossi-3-cheto-23,24-dinorcolan-1,4-diene-22-oico **9b** mostra le seguenti caratteristiche spettroscopiche: cristalli bianchi (da metanolo/acqua) p.f. 270-272° C. IR (CHCl<sub>3</sub>, come metil estere)  $\nu_{\max}$  3360, 1720, 1650, 1610 cm<sup>-1</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) segnali selezionati:  $\delta$  0.80 (*s*, CH<sub>3</sub>) 1.19 (*d*, *J* = 6.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.27 (*s*, CH<sub>3</sub>), 4.48 (*m*, 1H), 6.22 (*dd*, *J* = 10, 2.1 Hz, 1H), 6.43 (*s*, 1H), 7.26 (*d*, *J* = 10 Hz, 1H). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  12.5, 17.6, 19.5, 23.8, 25.4, 28.3, 35.2, 40.5, 43.7, 43.8, 43.9 45.4, 53.9, 54.0, 56.4, 68.8, 119.9, 127.6, 159.2, 174.6, 180.7, 186.6; ESI-MS: calcolato per C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>: 358.21. Trovato m/z (% relativa al picco base): 357.27 (100) [M-H<sup>-</sup>].



Acido 6 $\alpha$ -idrossi-3-cheto-23,24-dinorcolan-1,4-diene-22-oico **9b**

L'acido 3,4,9 $\beta$ -triidrossi-6 $\beta$ -epossi-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colantrien-22-oico **15b** (45%), mostra le seguenti caratteristiche: cristalli bianchi (da metanolo/acqua) p.f. 160-

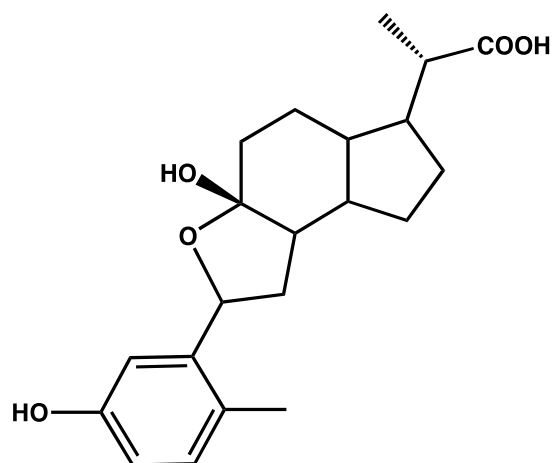
162°C. IR (CHCl<sub>3</sub>, come estere metilico)  $\nu_{\max}$  3660, 3480, 1715, 1595 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  0.87 (s, CH<sub>3</sub>), 1.19 (m, 1H), 1.22 (d,  $J = 6.8$ , CH<sub>3</sub>), 1.28 (m, 1H), 1.43 (m, 1H), 1.47 (m, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.68 (m, 1H), 1.85 (m, 1H), 1.97 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 2.12 (s, CH<sub>3</sub>), 2.13 (m, 1H), 2.37 (m, 1H), 2.41 (m, 1H), 5.26 (d,  $J = 7$  Hz, 1H) 6.43 (dd,  $J = 8.2$  e 0.8 Hz, 1H), 6.53 (d,  $J = 8.2$  Hz); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  11.1, 17.1, 17.7, 25.5, 28.5, 31.3, 37.0, 41.9, 43.2, 43.8, 49.7, 53.1, 58.1, 75.3, 109.3, 115.2, 121.6, 123.4, 128.7, 140.4, 143.6, 180.6; ESI-MS: calcolato per C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>: 390.20. Trovato, m/z (% relativa al picco base): 371.27 (100) [M-H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>].



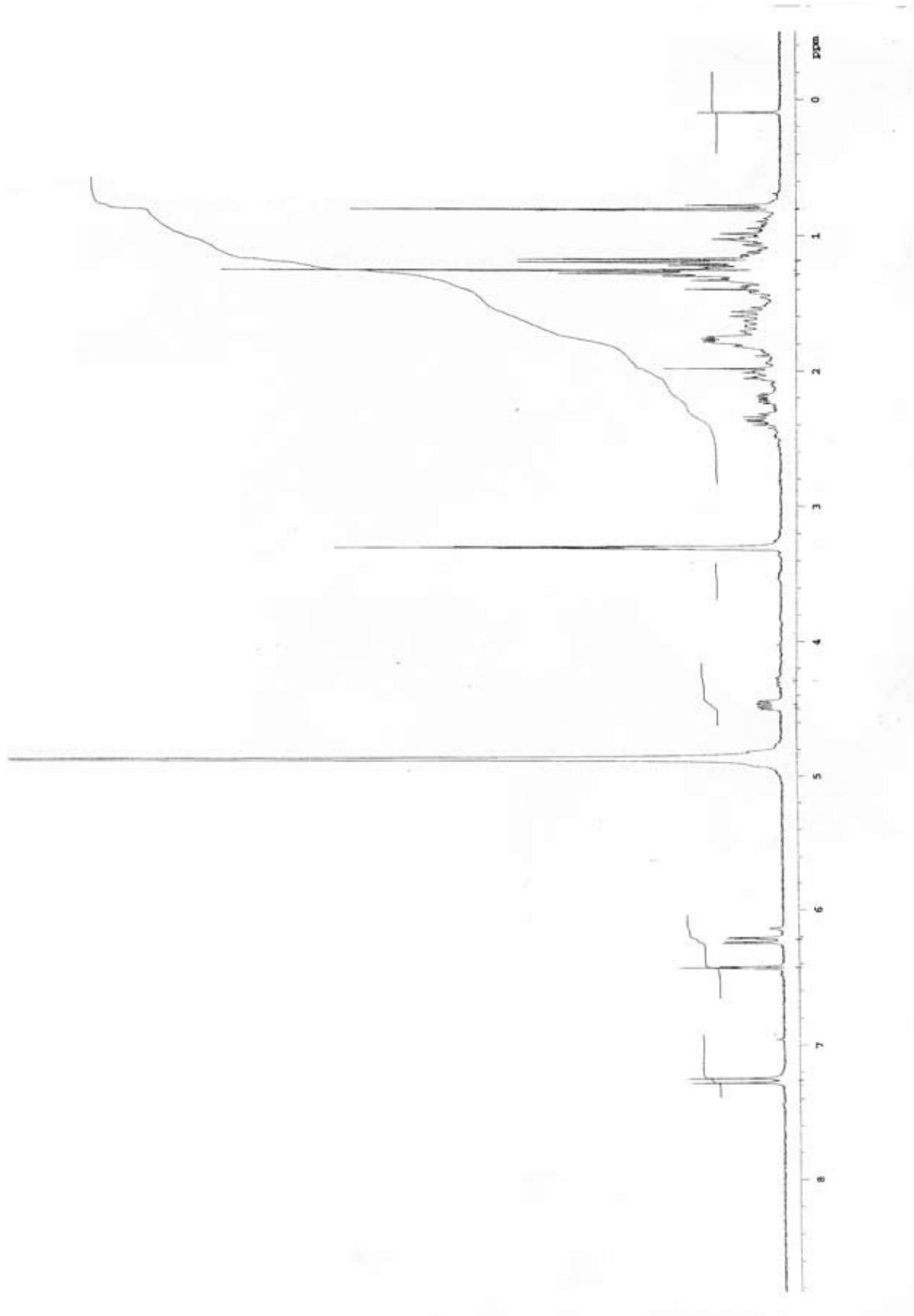
Acido 3,4,9 $\beta$ -triidrossi-6 $\beta$ -epossi-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colantrien-22-oico **15b**

L'acido 3,9 $\beta$ -diidrossi-6 $\xi$ -epossi-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colantrien-22-oico **16b** (5%) mostra le seguenti caratteristiche: cristalli bianchi (da metanolo/acqua) p.f. 150-153° C. IR (CHCl<sub>3</sub>, come estere metilico)  $\nu_{\max}$  3655, 3480, 1715, 1595 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  0.81 (s, CH<sub>3</sub>), 1.22 (d,  $J = 6.8$ , CH<sub>3</sub>), 1.25 (m, 1H), 1.37 (m, 1H), 1.48 (m, 1H), 1.54 (m, 1H), 1.66 (m, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 1.89 (m, 1H), 1.92 (m, 1H), 2.11 (m, 2H), 2.14 (m, 1H), 2.17 (m, 1H), 2.22 (s, CH<sub>3</sub>), 3.39 (m, 1H), 5.40 (dd,  $J = 9.1$  e 6.4 Hz, 1H), 6.66 (dd,  $J = 8.0$  e 2.7 Hz, 1H), 6.92 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 6.99 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  10.9, 17.8, 18.6, 26.0, 28.6, 28.7, 36.6, 37.0, 42.9, 43.8, 48.4, 50.9, 53.4, 8.6, 109.7, 113.9, 114.9, 126.8, 131.9, 143.5, 156.7, 180.6; ESI-MS: calcolato per C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>: 374.21. Trovato m/z (% relativa al picco base): 355.25 (100) [M-H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>].

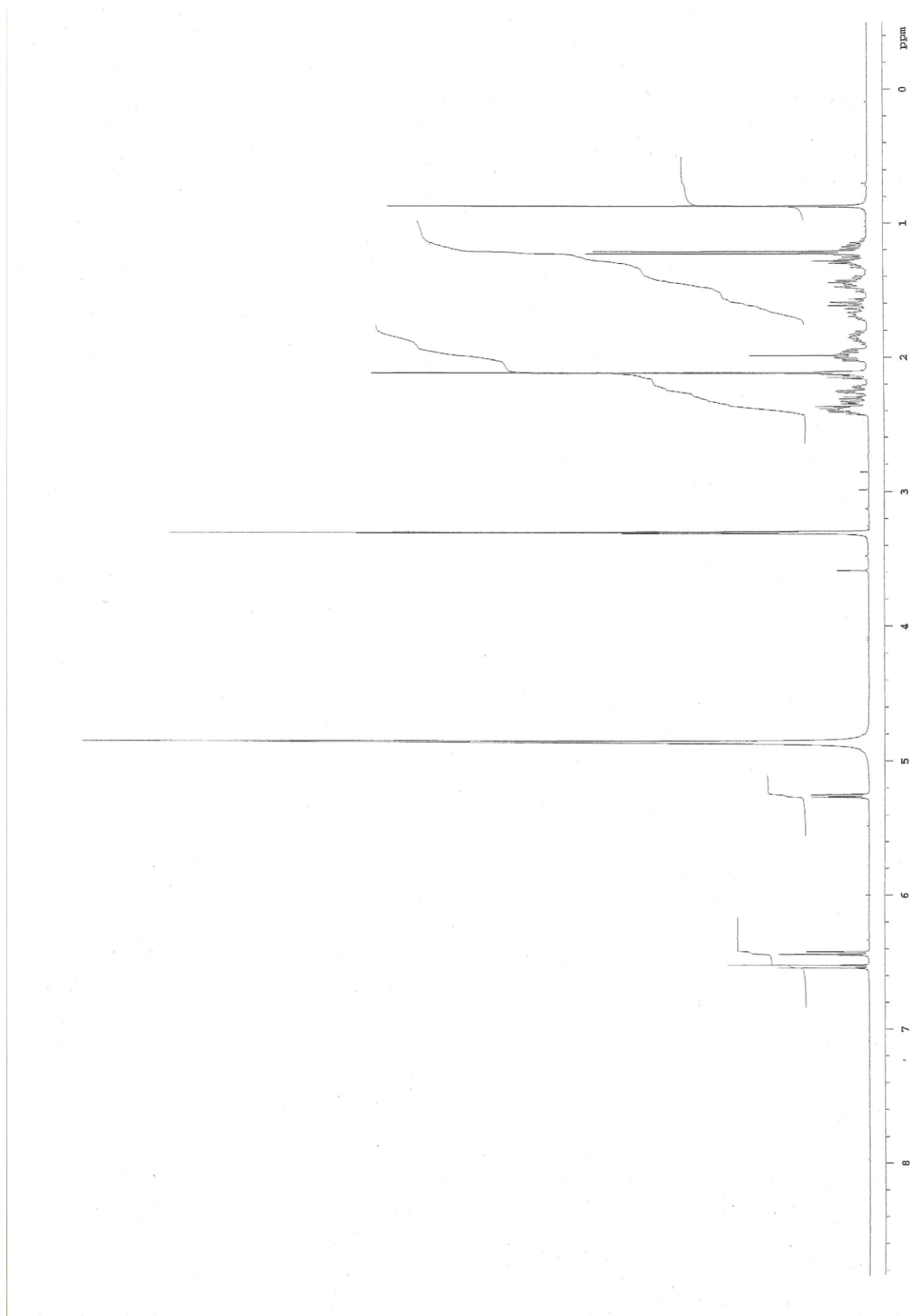




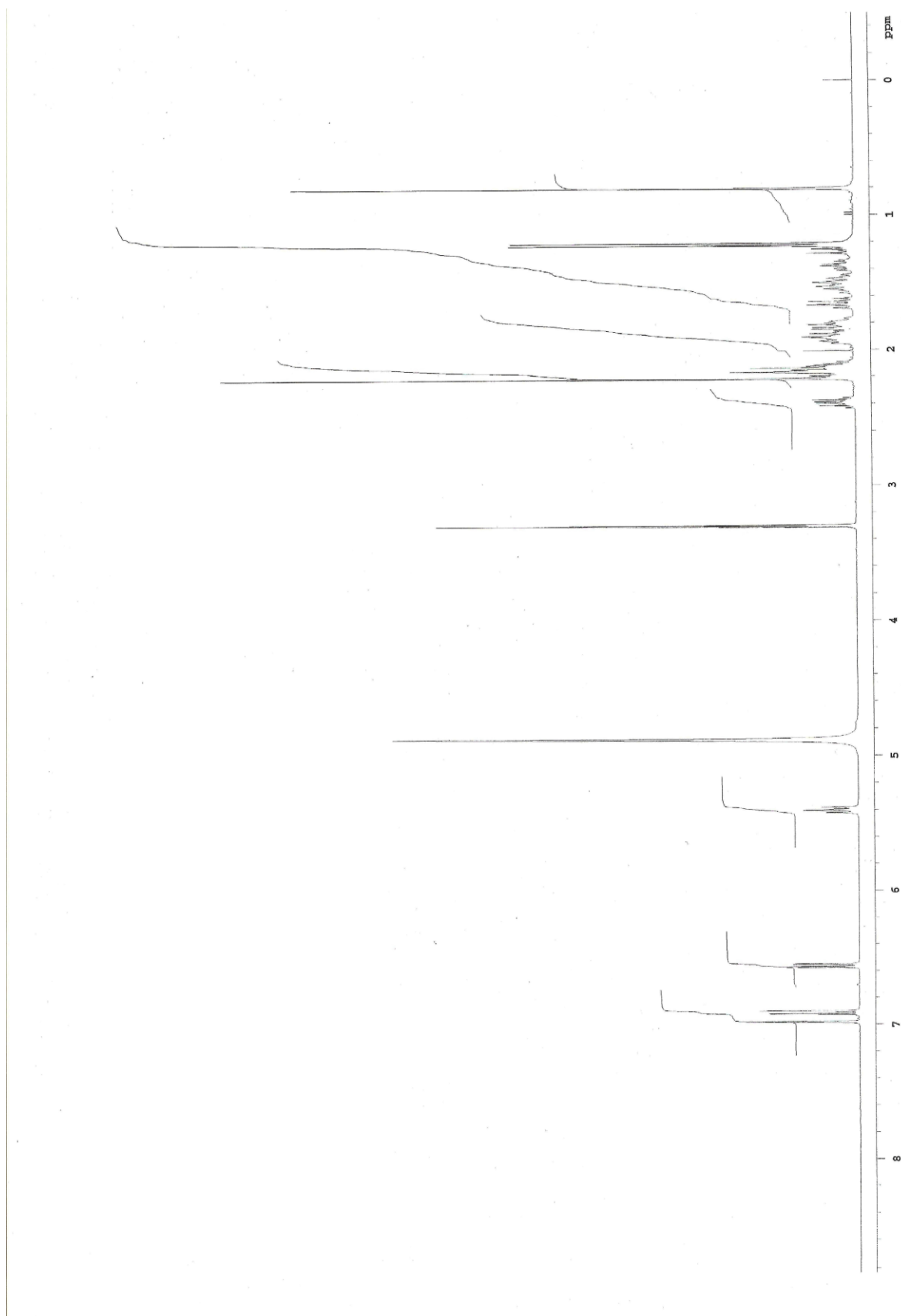
Acido 3,9 $\beta$ -diidrossi-6 $\xi$ -eossi-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colantrien-22-oico **16b**



Acido 6 $\alpha$ -idrossi-3-cheto-23,24-dinorcolan-1,4-diene-22-oico **9b**



Acido 3,4,9 $\beta$ -triidrossi-6 $\beta$ -epossi-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colantrien-22-oico **15b**



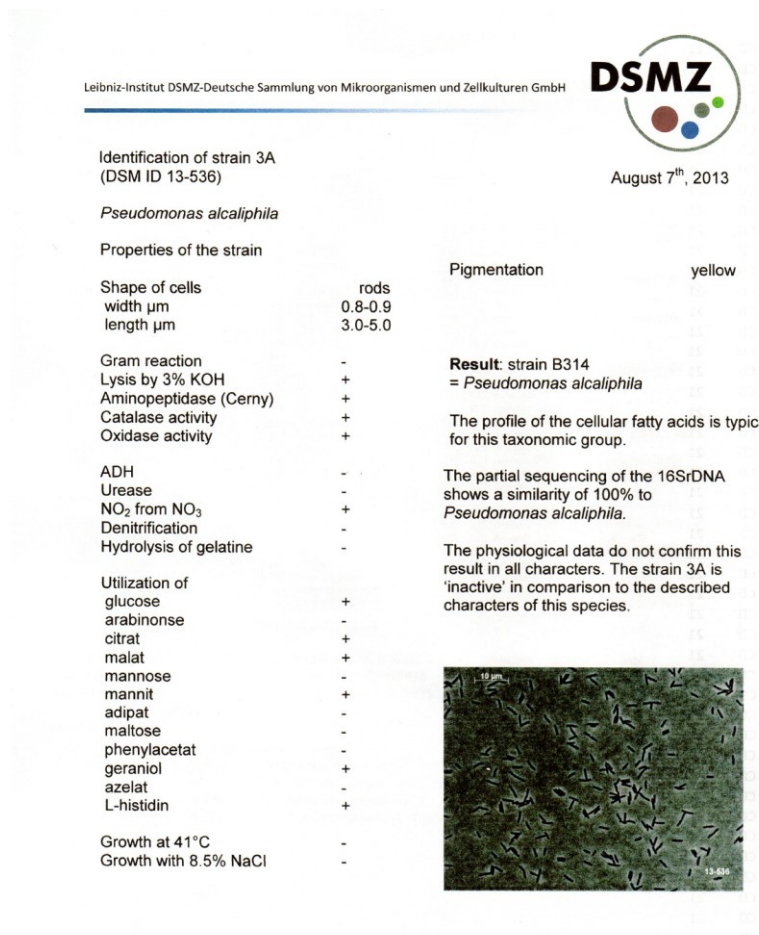
Acido 3,9 $\beta$ -diidrossi-6 $\xi$ -epossi-9,10-seco-23,24-dinor-1,3,5(10)-colantrien-22-oico **16b**

***CAPITOLO 3***

---

**Biotrasformazioni di acidi biliari:  
sintesi di HADD**

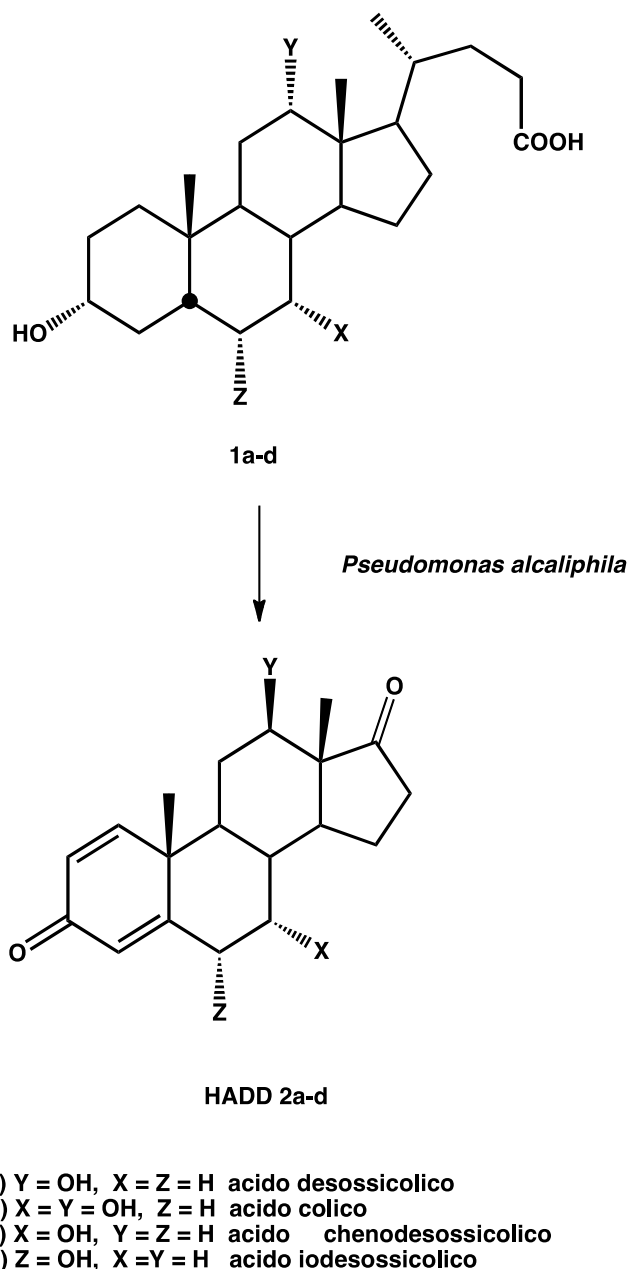
In questo capitolo vengono riportate le biotrasformazioni ottenute con il ceppo **3A** isolato da un pozzetto di scolo di un essiccatore presso l'ICE. Poiché i risultati ottenuti nello screening con acido desossicolico **1a** e iodesossicolico **1b** erano molto promettenti il ceppo è stato caratterizzato dal Leibniz-Institute DSMZ- German Collection of Microorganism and Cell (Figura 1).



**Figura 1.** Scheda di 3A

Dalle caratteristiche fenotipiche e genotipiche è risultato appartenere al genere *Pseudomonas* specie *alcaliphila*, batterio Gram negativo, catalasi positivo, ossidasi positivo dalla forma bastoncellare.

Il ceppo *Pseudomonas alcaliphila* è stato quindi utilizzato con l'acido desossicolico **1a**, acido colico **1b**, acido chenodesossicolico **1c** e acido iodesossicolico **1d**. In questo capitolo verrà descritta la sintesi di idrossi-1,4-diene-3,17-dione derivati (HADD) (**2a-d**) derivanti dalla biotrasformazione di alte concentrazioni di acidi biliari (**1a-d**) con *Pseudomonas alcaliphila* (Schema 1). Questo lavoro è stato oggetto di pubblicazione [56].



**Schema 1**

Come già descritto nel Capitolo 1, la biodegradazione degli acidi biliari inizia con l'ossidazione dell'anello A con la formazione di composti 3-cheto-1,4-diene derivati [57, 23]. Contemporaneamente o successivamente, la catena laterale in C17 dell'anello D viene rimossa probabilmente attraverso due passaggi di  $\beta$ -ossidazione consecutivi [58], che portano alla formazione di idrossi-androsta- $\Delta^{1,4}$ -diene-3,17-dioni (HADD), intermedi centrali della via di degradazione [23].

Gli HADD sono ulteriormente degradati grazie alla idrossilazione in posizione C-9, che provoca l'apertura dell'anello B e concomitante aromatizzazione dell'anello A [59]. I risultanti 9,10-secosteroidi sono ulteriormente degradati per apertura dell'anello aromatico [59-61] mentre gli anelli C e D vengono ulteriormente degradati da reazioni non ancora conosciuti [62].

In questo ambito il catabolismo aerobico di acidi biliari da parte di *Pseudomonas* spp. è ben documentato [63]. In letteratura esistono studi su diversi acidi biliari quali l'acido colico (CA), l'acido desossicolico (DCA), l'acido chenodesossicolico (CDCA) e l'acido iodesossicolico (HDCA) che forniscono i vari idrossiandrosta-1,4-diene-3,17-dione derivati, in particolare rese molto elevate si ottengono da biotrasformazioni catalizzate da trasposoni mutanti di *Pseudomonas putida*. Recentemente la degradazione della catena acilica in C17 dell'acido colico con *Pseudomonas* sp. (ceppo Chol1) ha permesso di caratterizzare il 7 $\alpha$ ,12 $\beta$ -diidrossi-androsta-1,4-diene-3,17-dione (12 $\beta$ -DHADD) [64].

In questo lavoro *Pseudomonas alcaliphila*, ceppo wild isolato da un ambiente inquinato da acidi biliari (ditta ICE), è stato utilizzato nelle biotrasformazioni degli acidi biliari **1a-d**. La reazione con acido desossicolico **1a** è stata condotta facendo crescere *P. alcaliphila* per 72 h in ATT (brodo di coltura) a 28° C sotto agitazione. Al brodo di coltura viene aggiunto **1a** sotto forma di sale sodico in concentrazione 1 g/L e dopo 24 h la TLC mostra la completa degradazione di **1a**. Nello stesso brodo di coltura viene aggiunta una seconda aliquota di **1a** (2g/L) e anche in questo caso dopo 24 h di incubazione la TLC mostra la completa degradazione dell'acido biliare. Si procede all'aggiunta di una terza aliquota (10g/L) di **1a** (concentrazione considerata tossica per la maggior parte dei microrganismi) e dopo 32 h di incubazione nelle condizioni precedenti si ottiene 12 $\beta$ -idrossi-1,4-androstadiene-3,17-dione (12 $\beta$ -HADD, **2a**) con una resa del 95% se calcolata su 10g/L di **1a**, del 73% se calcolata su gli effettivi 13g/L aggiunti (Tabella 1).



**Tabella 1.** Biotrasformazione con acidi biliari **1a-d** con *Pseudomonas alcaliphila*

Acido biliare	1 <sup>a</sup> aliquota <sup>a</sup> h	2 <sup>a</sup> aliquota <sup>b</sup> h	3 <sup>a</sup> aliquota <sup>c</sup> h	HADD (resa%)	HADD (resa %) <sup>f</sup>
<b>1a</b>	24	24	32	<b>2a</b> (95) <sup>d</sup>	<b>2a</b> (73)
<b>1b</b>	24	48	72-96	<b>2b</b> (23) <sup>d</sup>	<b>2b</b> (18)
<b>1c</b>	24	24-32	72	<b>2c</b> (52) <sup>d</sup>	<b>2c</b> (40)
<b>1d</b>	8-9			<b>2d</b> (83) <sup>e</sup>	

<sup>a</sup> Tempo di biotrasformazione con 1g/L di acido biliare (**1a-d**) come sale sodico; <sup>b</sup> Tempo di biotrasformazione con 2g/L di acido biliare (**1a,1c,1d**) come sale sodico; <sup>c</sup> Tempo di biotrasformazione con 10g/L di acido biliare (**1a,1c,1d**) come sale sodico; <sup>d</sup> Calcolata su 10g/L; <sup>e</sup> Calcolata su 1g/L; <sup>f</sup> Calcolata su 13g/L.

Procedura analoga è stata utilizzata anche per gli acidi biliari **1b** ed **1c**. A tempi diversi le varie colture di *Pseudomonas alcaliphila* sono state centrifugate (5000 rpm, 15 min), e il brodo di coltura ha subito un'estrazione e una purificazione cromatografica, da questa sono stati ottenuti i composti **2b** e **2c**. Il risultato interessante che deriva da questo studio è che, sebbene si ha la completa degradazione anche con la seconda aggiunta di substrato, le rese di (**2b-c**), risultano buone. D'altra parte, la metodologia adottata (successive aggiunte di **1a** dopo la completa degradazione, quindi effettuando uno scale-up di concentrazione) ha dimostrato essere necessaria per ottenere il prodotto 12 $\beta$ -HADD **2a** con alte rese, infatti procedendo senza effettuare lo scale-up di concentrazione (unica somministrazione di 10g/L di **1a**) si ha una resa di **2a** dell'80% dopo 72 h di incubazione. Questo mette in evidenza che la via di degradazione è facilitata dalla bassa concentrazione di **1a**, mentre è inibita da alte concentrazioni. D'altra parte l'attivazione della via metabolica con basse concentrazioni è necessaria a superare l'inibizione dovuta alla somministrazione di concentrazioni più elevate. E' stato, inoltre, osservato che la scarsa presenza di ossigeno, che favorisce 9 $\alpha$ -idrossilazione, abbassa le rese dei vari HADD [65]. Nel nostro caso l'elevata velocità di formazione e quindi l'alta concentrazione di 12 $\beta$ -HADD nel brodo di coltura (l'acido desossicolico era completamente biotrasformato dopo 32 h) rende probabilmente insufficiente l'ossigeno per la degradazione. Lo stesso approccio è stato utilizzato con l'acido colico **1b** e il prodotto 7 $\alpha$ ,12 $\beta$ -diidrossi-1,4-androstadiene-3,17-dione (7 $\alpha$ ,12 $\beta$ -HADD) **2b** è stato ottenuto in rese del 23% (18% se si calcola la resa complessiva). L'acido colico **1b** viene biotrasformato meno rapidamente da *P. alcaliphila* (48 h per degradare 2 g/L) mentre sono necessarie 72-96 h (10 g/L) per ottenere l'HADD corrispondente. Questo

comporta una inferiore resa di **2b** (23%). In questo caso la quantità di ossigeno è stata probabilmente sufficiente a degradare il composto **2b** abbassandone la resa: questo è in accordo con l'ipotesi precedente. La competizione tra la velocità di degradazione e la produzione di HADD è stata confermata dalla biotrasformazione dell'acido chenodesossicolico **1c**. La degradazione di **1c** da parte di *P. alcaliphila* (24-32 h per 2 g/L) è più rapida rispetto a **1b** e la successiva aggiunta (10 g/ L), dopo 72 h di incubazione, permette di ottenere 7 $\alpha$ -idrossi-1,4-androstadiene-3,17-dione **2c** (52%, resa complessiva 40%). Entrambe le biotrasformazioni di **1b** e **1c** non hanno dato altri prodotti, mentre erano ancora presenti in tracce i substrati di partenza. Completamente diversa è stata la biotrasformazione dell'acido iodesossicolico **1d**. L'incubazione di 1 g/L di **1d** con *P. alcaliphila* ha fornito 6 $\alpha$ -idrossi-1,4-androstadiene-3,17-dione (6 $\alpha$ -HADD, **2d**) con rese dell'83% dopo 8-9 giorni di incubazione. L'elevata resa in 6 $\alpha$ -HADD, nonostante i tempi di biotrasformazione, è dovuta probabilmente all'inibizione della 9 $\alpha$ -idrossilazione a causa della presenza del gruppo 6 $\alpha$ -OH. Le ultime prove effettuate con *P. alcaliphila* hanno confermato che il batterio non è stato in grado di biotrasformare l'acido ursodesossicolico e l'acido litocolico.

La caratterizzazione degli HADD, la descrizione della procedura sperimentale e il dettaglio dei materiali e metodi utilizzati vengono riportati nell'articolo (allegato A) e gli spettri <sup>1</sup>H NMR nell' allegato B.



## Synthesis of Hydroxy-Androstane-1,4-Diene-3,17-Dione Derivatives by Biotransformations of Bile Acids with *Pseudomonas alcaliphila*

 Stefania Costa<sup>1</sup>, Irene Rugiero<sup>2</sup>, Elena Tamburini<sup>1\*</sup>, Alessandro Medici<sup>2</sup>, Giancarlo Fantin<sup>2</sup> and Paola Pedrini<sup>1</sup>
<sup>1</sup>Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Via L. Borsari 46, I-44121 Ferrara, Italy

<sup>2</sup>Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Ferrara, Via Fossato di Mortara 17, I-44121 Ferrara, Italy

### Abstract

The synthesis of hydroxy-androstane-1,4-diene-3,17-dione derivatives (2a-d) by biotransformations with *Pseudomonas alcaliphila* of bile acids (1a-d) was reported. The scale-up of addition of deoxycholic acid (1a), cholic acid (1b), and chenodeoxycholic acid (1c) (1 g/L until 10 g/L) to the culture broth of *P. alcaliphila* switches the degradation process to the synthesis of 12 $\beta$ -hydroxy-androstane-1,4-diene-3,17-dione (2a, 95%), 7 $\alpha$ ,12 $\beta$ -dihydroxy-androstane-1,4-diene-3,17-dione (2b, 52%), and 7 $\alpha$ -hydroxy-androstane-1,4-diene-3,17-dione (2c, 23%) Also hyodeoxycholic acid (1d) was transformed by *P. alcaliphila* to 6 $\alpha$ -hydroxy-androstane-1,4-diene-3,17-dione (2d) with as much good yields (83%) but with lower concentration (1 g/L) in the culture broth.

**Keywords:** Hydroxy-androstane-1,4-diene-3,17-dione; *Pseudomonas alcaliphila*; Bile acids; Biotransformation

### Introduction

Steroids constitute an important class of natural compounds that have various function in eukaryotic organisms but occur rarely in prokaryotic organisms. Nevertheless many bacteria are able to transform steroids and this ability is used for the production of steroids drugs [1-3]. On the other hand, although many bacteria are able to degrade completely naturally occurred steroids and use them as sources of carbon and energy, only one bacterial metabolic pathway for aerobic degradation, the 9,10-*seco* pathway, has been described in details [4-6] (Scheme 1). Biodegradation of bile acids: The 9,10-*seco* pathway of bile acids [4,6] starts with the oxidation of the A ring with the formation of 1,4-3-keto compounds. At the same time or subsequently, the acidic C<sub>17</sub>-side chain of D ring is removed probably through two consecutive  $\beta$ -oxidation steps [7], leading to the androsta-1,4-diene-3,17-diones (ADDs) which are the central intermediates of the degradation pathway [6]. ADDs are further degraded by a monooxygenase-catalyzed hydroxylation at C<sub>6</sub>, which causes the opening of the B ring concomitantly with the aromatization of the A ring [8,9]. The resulting 9,10-*secosteroids* are further degraded by the breakdown of the aromatic ring [10,11]. The remaining C and D rings form acidic perhydroindane derivatives that are further degraded by as-yet-unknown reactions [12]. In this field the aerobic catabolism of bile acids by *Pseudomonas* spp. is well documented [13-21]. Various hydroxylated androsta-1,4-diene-3,17-dione from bile acids (i.e., cholic acid (CA), deoxycholic acid (DCA), chenodeoxycholic acid (CDCA) and hyodeoxycholic acid (HDCA) were obtained in high yield by transposon mutants of *Pseudomonas putida* [22]. Recently the degradation of the acyl chain attached to C<sub>17</sub> of cholic acid with *Pseudomonas* sp. strain Chol1 to afford 7 $\alpha$ ,12 $\beta$ -dihydroxy-androsta-1,4-diene-3,17-dione (12 $\beta$ -DHADD) has been studied [23]. In this paper the synthesis of hydroxylated androsta-1,4-diene-3,17-diones (2a-d) by the biotransformation of bile acids (1a-d) (23-95% yield) with *Pseudomonas alcaliphila* with high concentration of starting materials in the culture broth was reported.

### Results and Discussion

*Pseudomonas alcaliphila* isolated from an environment [24] potentially adapted to the presence of bile acids, showed a high affinity to bile acids, in particular after 72 h of growth in ATT broth at 28°C the added sodium salt of deoxycholic acid **1a** (1 g/L) was completely degraded in 24 h incubation. Another aliquot of **1a** (2 g/L) was added

and the same result was obtained after 24 h incubation: no traces of **1a** and no products were detected. A third aliquot (10 g/L) was added and after 32 h incubation 12 $\beta$ -hydroxy-1,4-androstadiene-3,17-dione (12 $\beta$ -HADD, **2a**) was obtained in 95% yield if calculated on the last addition (overall yield 73%) (Table 1) (Scheme 2). Synthesis of hydroxy-androstane-1,4-diene-3,17-dione derivatives (2a-d): A loopful of *Pseudomonas alcaliphila* was inoculated in ATT broth (100 mL). After 72 h at 28°C and 150 rpm (pH 8.5-9 of culture broth), the sodium salt of the selected bile acid (**1**) (0.1 g) was added (28°C, 150 rpm). After 24 h the bile acids (1a-c) (excluding hyodeoxycholic acid **1d**) were completely degraded (TLC and HPLC). Another aliquot of the bile acid (1a-c) was added (0.2 g) that was also completely degraded in 32-76 h (see Table 1). So a third aliquot of 1a-c (1 g) was added. After the appropriate time (see Table 1), centrifugation (5.000 rpm, 15 min), extraction with ethyl acetate and chromatography, compounds 2a-d were obtained. The mechanism of the complete degradation of (**1a**) is described in Scheme 1. It was interesting that, although the complete degradation was repeated with the second addition of the substrate, the third process provided excellent yields of (**2a**) and no other products were detected by TLC and HPLC. Equally good results have been obtained so far only with mutant strains of *Pseudomonas putida* [22]. On the other hand, the adopted methodology (subsequent addition of (**1a**) after the complete degradation with a scale-up of concentration) showed to be necessary for obtaining 12 $\beta$ -HADD (**2a**), in fact the initial addition of (**1a**) in 10 g/L concentration inhibited the degradation process. In this case deoxycholic acid (**1a**) was recovered (80%) after 72 h incubation. It is possible to point out that the degradation pathway occurred easily with low concentration of (**1a**) while was inhibited with high concentration. On the other hand the activation of the

\*Corresponding author: Elena Tamburini, Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Via L. Borsari 46, I-44121 Ferrara, Italy, Tel: +390532455329; Fax: +390532455715; E-mail: [tme@unife.it](mailto:tme@unife.it)

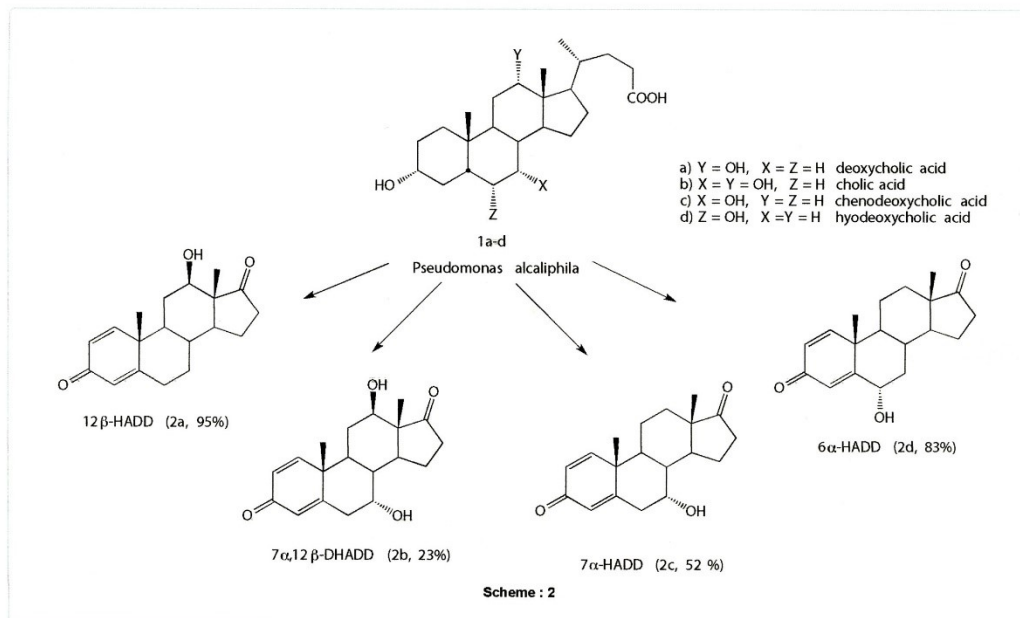
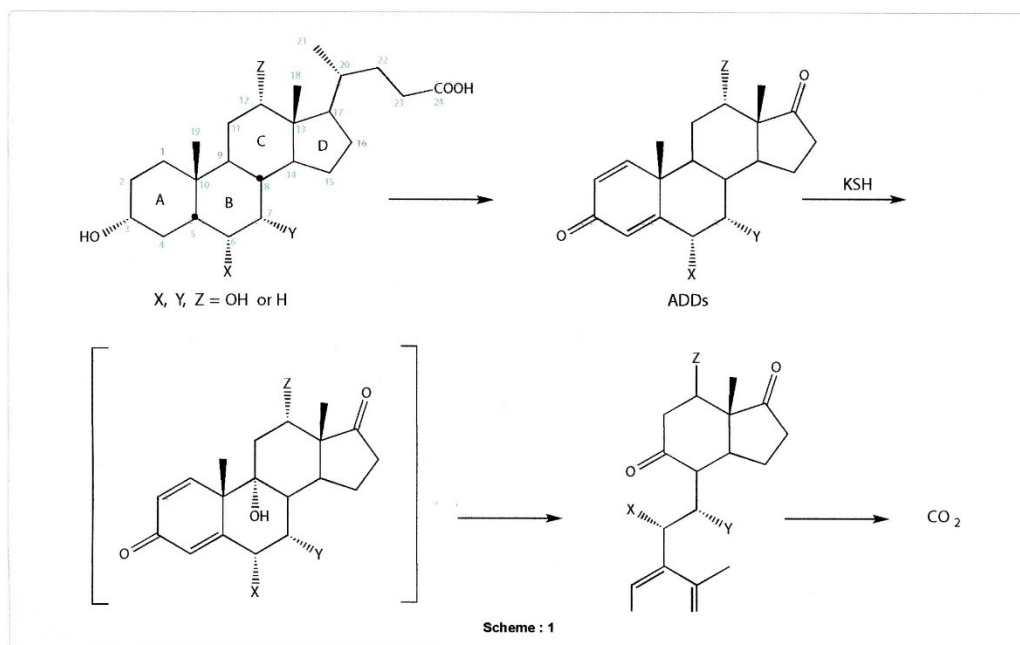
Received: December 03, 2015; Accepted: December 15, 2015; Published: December 22, 2015

Citation: Costa S, Rugiero I, Tamburini E, Medici A, Fantin G, et al. (2015) Synthesis of Hydroxy-Androstane-1,4-Diene-3,17-Dione Derivatives by Biotransformations of Bile Acids with *Pseudomonas alcaliphila*. Organic Chem Curr Res 4:155. doi:10.4172/2161-0401.1000155

Copyright: © 2015 Costa S, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Citation: Costa S, Rugiero I, Tamburini E, Medici A, Fantin G, et al. (2015) Synthesis of Hydroxy-Androstane-1,4-Diene-3,17-Dione Derivatives by Biotransformations of Bile Acids with *Pseudomonas alcaliphila*. *Organic Chem Curr Res* 4:155. doi:10.4172/2161-0401.1000155

Page 2 of 4



Citation: Costa S, Rugiero I, Tamburini E, Medici A, Fantin G, et al. (2015) Synthesis of Hydroxy-Androstane-1,4-Diene-3,17-Dione Derivatives by Biotransformations of Bile Acids with *Pseudomonas alcaliphila*. *Organic Chem Curr Res* 4:155. doi:10.4172/2161-0401.1000155

Page 3 of 4

Bile acid	1 <sup>st</sup> addition <sup>a</sup> h	2 <sup>nd</sup> addition <sup>b</sup> h	3 <sup>rd</sup> addition <sup>c</sup> h	HADD (Yield %)	HADD (Overall yield %) <sup>d</sup>
1a	24	24	32	2a (95) <sup>e</sup>	2a (73)
1b	24	48	72-96	2b (23) <sup>e</sup>	2b (18)
1c	24	24-32	72	2c (52) <sup>f</sup>	2c (40)
1d	8-9 day	--	--	2d (83) <sup>g</sup>	

<sup>a</sup>Time of biotransformation with 1 g/L of bile acids (1a-d) as sodium salt; <sup>b</sup>Time of biotransformation with 2 g/L of bile acids (1a-c) as sodium salt; <sup>c</sup>Time of biotransformation with 10 g/L of bile acids (1a-c) as sodium salt; <sup>d</sup>Calculated on 10 g/L addition; <sup>e</sup>Calculated on 1 g/L addition; <sup>f</sup>Calculated on 13 g/L addition.

Table 1: Biotransformation of bile acids 1a-d with *Pseudomonas alcaliphila*.

metabolic pathway with low concentration was necessary to overcome the inhibition due to high concentration. Moreover, it has been reported that the presence of insufficient amounts of oxygen, which make possible the 9 $\alpha$ -hydroxylation, lowered the yields of HADD [25]. In our case the rate of formation and then the high concentration of 12 $\beta$ -HADD in the culture broth (deoxycholic acid was completely biotransformed after 32 h) probably makes insufficient the oxygen for the following degradation. The same approach (three consecutive addition) has been used with cholic acid (1b) and 7 $\alpha$ ,12 $\beta$ -dihydroxy-1,4-androstadiene-3,17-dione (7 $\alpha$ ,12 $\beta$ -DHADD) (2b) was obtained in 23% yield (overall yield 18%). The cholic acid (1b) is biotransformed less rapidly by *P. alcaliphila* (48 h to degrade 2 g/L) and the lower rate of formation of HADD (72-96 h) allowed less concentration of (2b) in the culture broth. In this case the amount of oxygen was sufficient to degrade partially the compound (2b) and lowered its yields; this is in agreement with the previous hypothesis. The competition between the rate of degradation and HADD production was confirmed by the biotransformation of chenodeoxycholic acid (1c). The degradation of (1c) by *P. alcaliphila* (24-32 h for 2 g/L) is more rapid with respect to (1b) and the following addition (10 g/L concentration) afforded, after 72 h incubation, 7 $\alpha$ -hydroxy-1,4-androstadiene-3,17-dione (2c) in 52% yield (overall yield 40%). In both biotransformations of (1b) and (1c) no other products were detected while traces of 1b and 1c were yet present. Completely different was the biotransformation of hyodeoxycholic acid (1d). The incubation of 1g/L of (1d) with *P. alcaliphila* afforded 6 $\alpha$ -hydroxy-1,4-androstadiene-3,17-dione (6 $\alpha$ -HADD, (2d) in 83% yield after 8-9 days. The high yield in 6 $\alpha$ -HADD, in spite of long time incubation, was probably due to the 9 $\alpha$ -hydroxylation inhibition due to 6 $\alpha$ -OH group. Moreover *P. alcaliphila* was not able to biotransform ursodeoxycholic acid and lithocholic acid to give the corresponding hydroxyl-1,4-androstadiene-3,17-dione derivatives.

## Experimental

### General

Sodium salt of bile acids 1a-d and have been supplied by ICE industry [24]. Melting points are uncorrected and were determined on a 510 Buchi melting point instrument. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were obtained with a Mercury Plus 400 spectrometer operating at 400 MHz (<sup>1</sup>H) and 100 MHz (<sup>13</sup>C), with Me<sub>4</sub>Si as internal standard. TLC were performed on pre-coated Silica Gel plates (thickness 0.25 mm, Merck) with cyclohexane/ethyl acetate/acetic acid 60:40:1 as eluent and Silica Gel (Fluka, Kieselgel 60, 70-230 mesh) was used for preparative column chromatography. HPLC analysis were obtained with a Jasco Borwin LC 1500 instrument: detector RI-1530; column Agilent Zorbax SB-C18; flux 0.7 ml/min; temp. 23°C; isocratic conditions MeOH/CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 53/23/24.

### Isolation of *Pseudomonas alcaliphila*

The bacterium was sampled in external cockpitt drainage of ICE

industry. The sterilized physiological solution was conveniently diluted (about 10<sup>-4</sup>) and put on Petri dishes containing PCA (Difco) to isolate the bacterium. The identification of bacterium *P. alcaliphila* was performed by DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

### Synthesis of hydroxy-androstane-1,4-diene-3,17-dione derivatives (2a-d)

A loopful of *Pseudomonas alcaliphila* from a culture on Columbia agar (Sigma) was inoculated in ATT broth (100 mL) containing tryptone (5 g/L), peptone (10 g/L) meat extract (8 g/L), starch (1 g/L) and NaCl (5 g/L). After 72 h at 28°C and 150 rpm (pH 8.5-9 of culture broth), the sodium salt of the selected bile acid 1 (0.1 g) was added and the culture was maintained in the same conditions. After 24 h (excluding hyodeoxycholic acid 1d) all the bile acid 1a-c were degraded (no product by TLC) and another aliquot of bile acids 1a-c was added (0.2 g). After 32-76 h (see Table 1) in the same conditions also this aliquot of bile acid 1a-c was completely degraded. So a third aliquot of 1a-c (1 g) was added. The reaction was monitored by TLC and HPLC and after the appropriate time (see Table 1) the biomass was removed by centrifugation (5.000 rpm, 15 min). The solution was extracted with ethyl acetate (3 × 100 mL), the organic layer dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent evaporated. For deoxycholic acid (1a), the crude mixture was chromatographed (silica gel, ethyl acetate/cyclohexane/acetic acid 70/30/2 as eluent) to give 12 $\beta$ -hydroxy-1,4-androstadiene-3,17-dione (12 $\beta$ -HADD, 2a) (0.69 g); 95% yield (overall 73% yield); m.p. 222-224°C [18];  $\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>)

(selected data) 1.02 (3H, s, C<sub>18</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.25 (3H, s, C<sub>19</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.75 (1H, dd, *J*=10.5 and 6.3 Hz, C<sub>12 $\alpha$</sub> -H), 6.1 (1H, s, C<sub>1</sub>-H), 6.25 (1H, dd, *J*=10 and 1 Hz, C<sub>1</sub>-H), 7.02 (1H, d, *J*=10 Hz, C<sub>2</sub>-H) ppm;  $\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 221.71 (C<sub>17</sub>), 186.17 (C<sub>3</sub>), 167.71 (C<sub>2</sub>), 154.93 (C<sub>1</sub>), 127.83 (C<sub>2</sub>), 124.37 (C<sub>2</sub>), 71.95 (C<sub>12</sub>), 51.60, 50.29, 47.90, 43.18, 35.55, 34.19, 32.46, 31.60, 29.53, 21.84, 18.67, 8.31 ppm. For cholic acid (1b), the crude mixture was chromatographed (silica gel, ethyl acetate/acetic acid 50/1 as eluent) to give 7 $\alpha$ ,12 $\beta$ -dihydroxy-1,4-androstadiene-3,17-dione (7 $\alpha$ ,12 $\beta$ -HADD, 2b) (0.17 g); 23% yield (18% overall yield); m.p. 245-246°C [15];  $\delta_{\text{H}}$  (CD<sub>3</sub>OD) (selected data) 1.01 (3H, s, C<sub>18</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.30 (3H, s, C<sub>19</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.65 (1H, br m, C<sub>12 $\alpha$</sub> -H), 4.18 (1H, s, fine splitting, C<sub>7 $\beta$</sub> -H), 6.11 (1H, s, C<sub>1</sub>-H), 6.23 (1H, dd, *J*=10 and 1 Hz, C<sub>2</sub>-H), 7.27 (1H, d, *J*=10 Hz, C<sub>1</sub>-H) ppm;  $\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 8.36, 18.78, 21.85, 30.77, 31.59, 36.30, 39.38, 41.87, 44.02, 44.92, 52.69, 68.58 (C<sub>2</sub>), 72.23 (C<sub>12</sub>), 127.32 (C<sub>2</sub>), 127.91 (C<sub>2</sub>), 158.47 (C<sub>1</sub>), 168.98 (C<sub>2</sub>), 188.10 (C<sub>3</sub>), 222.01 (C<sub>17</sub>) ppm. For chenodeoxycholic acid (1c), the crude mixture was chromatographed (silica gel, ethyl acetate/acetic acid 50/3 as eluent) to give 7 $\alpha$ -hydroxy-1,4-androstadiene-3,17-dione (7 $\alpha$ -HADD, 2c) (0.38 g); 52% yield (40% overall yield); m.p. 289-291°C [18];  $\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) (selected data) 0.91 (3H, s, C<sub>18</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.22 (3H, s, C<sub>19</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.17 (1H, s, fine splitting, C<sub>7 $\beta$</sub> -H), 6.12 (1H, s, C<sub>1</sub>-H), 6.20 (1H, dd, *J*=10 and 1 Hz, C<sub>2</sub>-H), 7.05 (d, 1H, *J*=10 Hz, C<sub>1</sub>-H) ppm;  $\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 13.67, 18.41, 21.49, 21.92, 30.95, 35.71, 39.52, 41.05, 43.52, 44.42, 45.54, 47.52, 68.30 (C<sub>2</sub>), 127.35 (C<sub>2</sub>), 127.74 (C<sub>2</sub>), 155.65 (C<sub>1</sub>), 164.72 (C<sub>2</sub>), 185.82 (C<sub>2</sub>), 220.26 (C<sub>17</sub>) ppm. For hyodeoxycholic acid (1d), the crude mixture was chromatographed (silica gel, acetone/hexane 2/1 as eluent) to give 6 $\alpha$ -hydroxy-1,4-androstadiene-3,17-dione (6 $\alpha$ -HADD, 2d) (0.06 g); 83% yield; m.p. 240-241°C [22];  $\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) (selected data) 0.96 (3H, s, C<sub>18</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.25 (3H, s, C<sub>19</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.65 (1H, m, C<sub>6 $\alpha$</sub> -H), 6.27 (1H, dd, *J*=10 and 1 Hz, C<sub>2</sub>-H), 6.48 (1H, s, C<sub>1</sub>-H), 7.01 (1H, d, *J*=10 Hz, C<sub>1</sub>-H) ppm;  $\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 219.63 (C<sub>17</sub>), 185.7 (C<sub>2</sub>), 168.89 (C<sub>2</sub>), 154.88 (C<sub>1</sub>), 127.96 (C<sub>2</sub>), 119.99 (C<sub>2</sub>), 68.20 (C<sub>2</sub>), 52.19, 50.30, 47.78, 43.51, 41.31, 36.68, 33.74, 31.15, 22.09, 22.02, 19.26, 13.91 ppm.

**Citation:** Costa S, Rugiero I, Tamburini E, Medici A, Fantin G, et al. (2015) Synthesis of Hydroxy-Androstane-1,4-Diene-3,17-Dione Derivatives by Biotransformations of Bile Acids with *Pseudomonas alcaliphila*. *Organic Chem Curr Res* 4:155. doi:10.4172/2161-0401.1000155

Page 4 of 4

## Conclusions

*Pseudomonas alcaliphila*, isolated from an environment potentially adapted to the presence of bile acids, produces by biotransformation of some bile acids hydroxy-androstane-1,4-diene-3,17-dione derivatives with good yields and in high concentration in the culture broth (10 g/L). This strain is a wild type and there are various possibility to scale-up and improve the process both regarding the yields and the concentration in the culture broth.

## Acknowledgements

We thank the ICE (Industria Chimica Emiliana) industry (Reggio Emilia, Italy) for financial support.

## References

- Bortolini O, Medici A, Poli S (1997) Biotransformations on steroid nucleus of bile acids. *Steroids* 62: 564-577.
- Donova MV, Egorova OV (2012) Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 94: 1423-1447.
- Mahato SB, Garai S (1997) Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids* 62: 332-345.
- Hayakawa S (1982) Microbial transformation of bile acids. A unified scheme for bile acid degradation, and hydroxylation of bile acids. *Z Allg Mikrobiol* 22: 309-326.
- Horinouchi M, Hayashi T, Kudo T (2012) Steroid degradation in *Comamonas testosteroni*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 129: 4-14.
- Philipp B (2011) Bacterial degradation of bile salts. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 903-915.
- Birkenmaier A, Holert J, Erdbrink H, Möller HM, Friemel A, et al. (2007) Biochemical and genetic investigation of initial reactions in aerobic degradation of the bile acid cholate in *Pseudomonas* sp. strain Chol. *J Bacteriol* 189: 7165-7173.
- Petrusma M, Hessels G, Dijkhuizen L, van der Geize R (2011) Multiplicity of 3-Ketosteroid-9 $\alpha$ -Hydroxylase enzymes in *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269 for specific degradation of different classes of steroids. *J Bacteriol* 193: 3931-3940.
- Park RJ (1984) Phenolic 9,10-secosteroids as products of the catabolism of bile acids by a *Pseudomonas* sp. *Steroids* 44: 175-193.
- Dresen C, Lin LY, D'Angelo I, Tocheva EI, Strynadka N, et al. (2010) A flavin-dependent monooxygenase from *Mycobacterium tuberculosis* involved in cholesterol catabolism. *J Biol Chem* 285: 22264-22275.
- Yam CK, D'Angelo I, Kalscheuer R, Zhu H, Wang JX, et al. (2009) Studies of a Ring-Cleaving Dioxygenase Illuminate the Role of Cholesterol Metabolism in the Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens* 5: e1000344.
- Lack NA, Yam KC, Lowe ED, Horsman GP, Owen RL, et al. (2010) Characterization of a carbon-carbon hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis* involved in cholesterol metabolism. *J Biol Chem* 285: 434-443.
- Barnes PJ, Baty JD, Bilton RF, Mason AN (1976) Degradation of deoxycholic acid by *Pseudomonas* Sp. NCIB 10590. *Tetrahedron* 32: 89-93.
- Tenneson ME, Baty JD, Bilton RF, Mason AN (1979) The degradation of hydoxycholic acid by *Pseudomonas* spp. N.C.I.B. 10590. *J Steroid Biochem* 10: 311-316.
- Tenneson ME, Baty JD, Bilton RF, Mason AN (1979) The degradation of cholic acid by *Pseudomonas* sp. N.C.I.B. 10590. *Biochem J* 184: 613-618.
- Bilton RF, Mason AN, Tenneson ME (1981) Microbial degradation of deoxycholic acid by *Pseudomonas* sp. NCIB 10590. Characterization of products and a postulated path. *Tetrahedron* 37: 2509-2513.
- Leppik RA (1981) Deoxycholic acid degradation by a *Pseudomonas* sp.: phenolic and neutral products. *Tetrahedron* 37: 1747-1751.
- Park RJ (1981) The major neutral products of the aerobic catabolism of cattle bile by *Pseudomonas* sp. ATCC 31752. *Steroids* 38: 383-395.
- Leppik RA (1982) Deoxycholic acid degradation by a *Pseudomonas* species. Acidic intermediates from the initial part of the catabolic pathway. *Biochem J* 202: 747-751.
- Leppik RA, Park RJ, Smith MG (1982) Aerobic catabolism of bile acids. *Appl Environ Microbiol* 44: 771-776.
- Leppik RA (1983) Deoxycholic acid degradation by a *Pseudomonas* sp. Acidic intermediates with A-ring unsaturation. *Biochem J* 210: 829-836.
- Ide JA, Park RJ, Dunn NW (1986) Bile acid catabolites accumulated by transposon-induced mutants of *Pseudomonas putida*: production of hydroxylated 1,4-androstadiene-3,17-diones. *Biotech Lett* 8: 763-768.
- Holert J, Kulic Z, Yücel O, Suvekbal V, Suter M.F, et al. (2013) Degradation of the Acyl Side Chain of the Steroid Compound Cholate in *Pseudomonas* sp. Strain Chol1 Proceeds via an Aldehyde Intermediate. *J Bacteriol* 195: 585-595.
- ICE (Industria Chimica Emiliana) Extracts and purifies bile acids from raw materials (Ox and pig bile).
- Smith MG, Park RJ (1984) Effect of restricted aeration on catabolism of cholic acid by two *Pseudomonas* species. *Appl Environ Microbiol* 48: 108-113.

**Citation:** Costa S, Rugiero I, Tamburini E, Medici A, Fantin G, et al. (2015) Synthesis of Hydroxy-Androstane-1,4-Diene-3,17-Dione Derivatives by Biotransformations of Bile Acids with *Pseudomonas alcaliphila*. *Organic Chem Curr Res* 4:155. doi:10.4172/2161-0401.1000155

## OMICS International: Publication Benefits & Features

### Unique features:

- Increased global visibility of articles through worldwide distribution and indexing
- Showcasing recent research output in a timely and updated manner
- Special issues on the current trends of scientific research

### Special features:

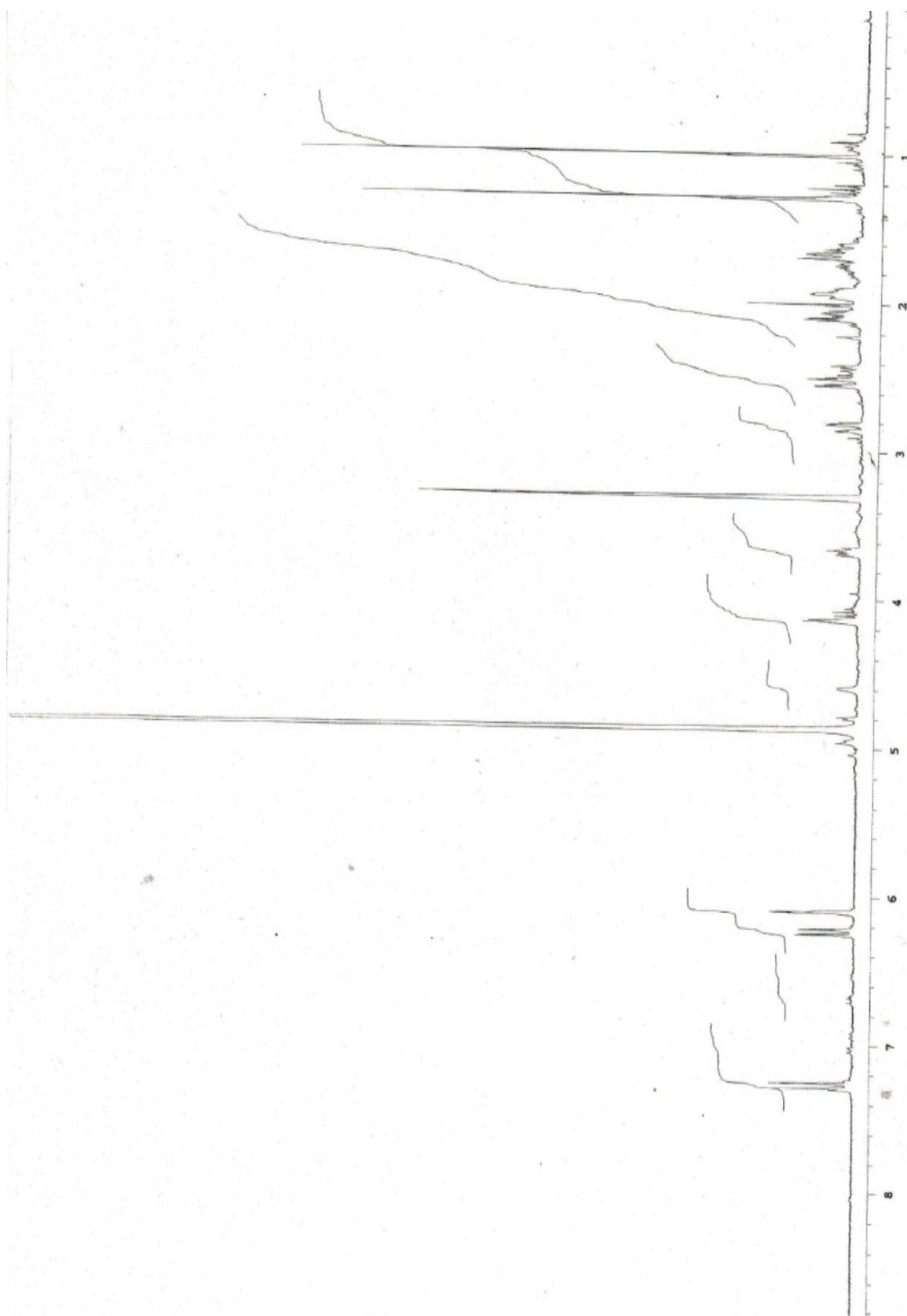
- 700 Open Access Journals
- 50,000 Editorial team
- Rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus, Google Scholar etc.
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.omicsgroup.org/journals/submit>

## ALLEGATO B

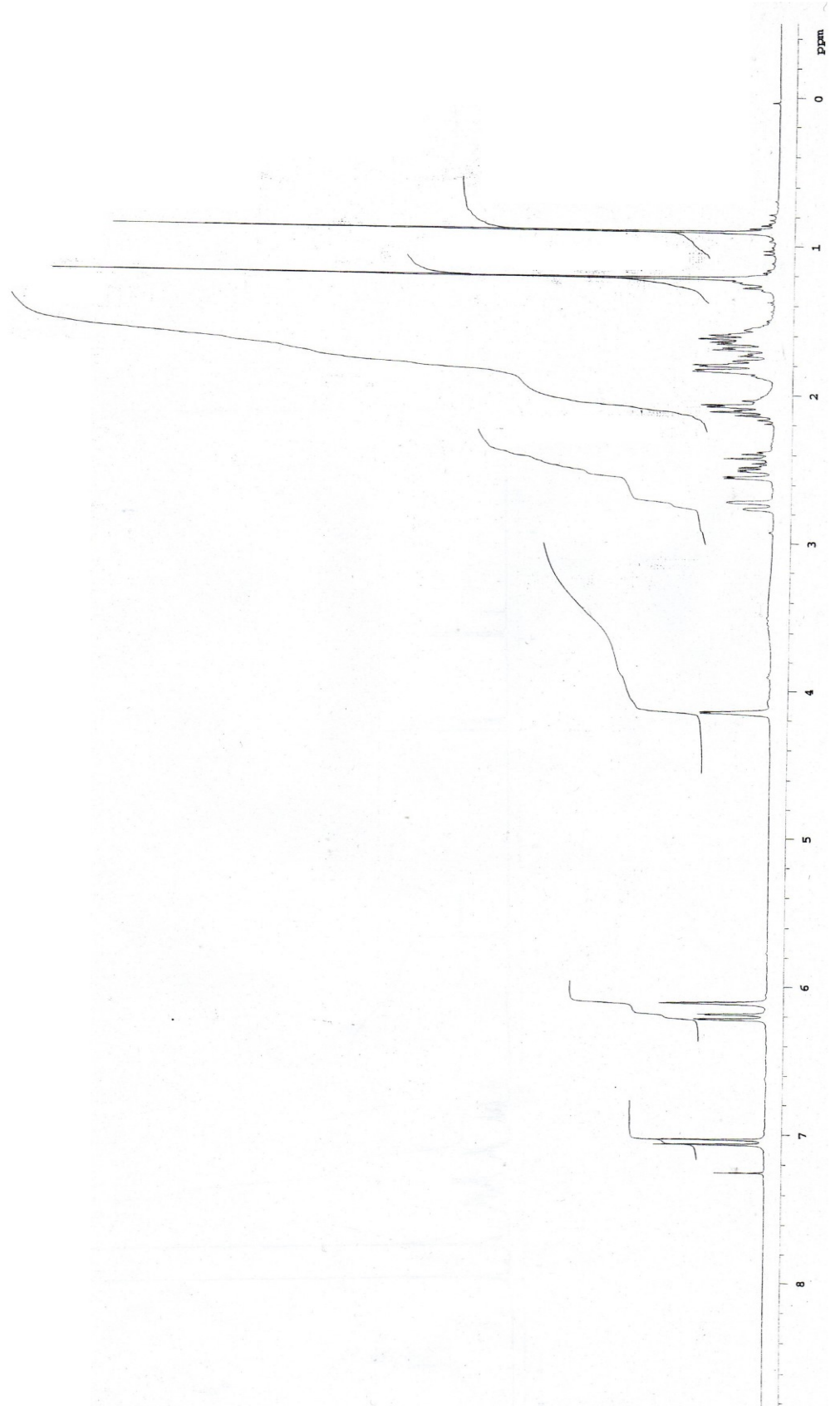


12β-idrossi-1,4-androstadiene-3,17-dione (12β-HADD, 2a)

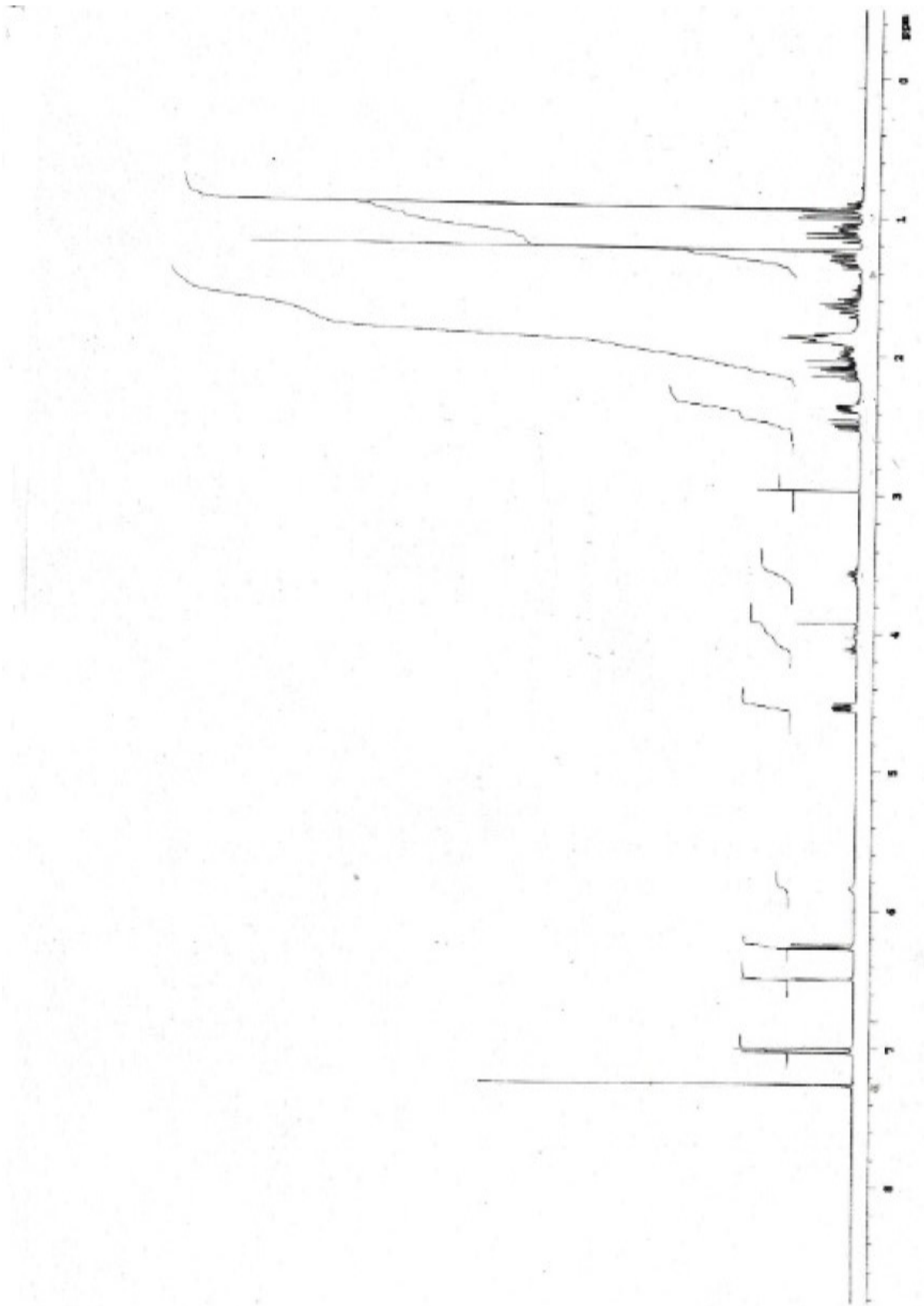


7 $\alpha$ ,12 $\beta$ -diidrossi-1,4-androstadiene-3,17-dione (7 $\alpha$ ,12 $\beta$ -HADD 2b)





7 $\alpha$ -idrossi-1,4-androstadiene-3,17-dione (7 $\alpha$ -HADD 2c)



6 $\alpha$ -idrossi-1,4-androstadiene-3,17-dione (6 $\alpha$ -HADD 2d)

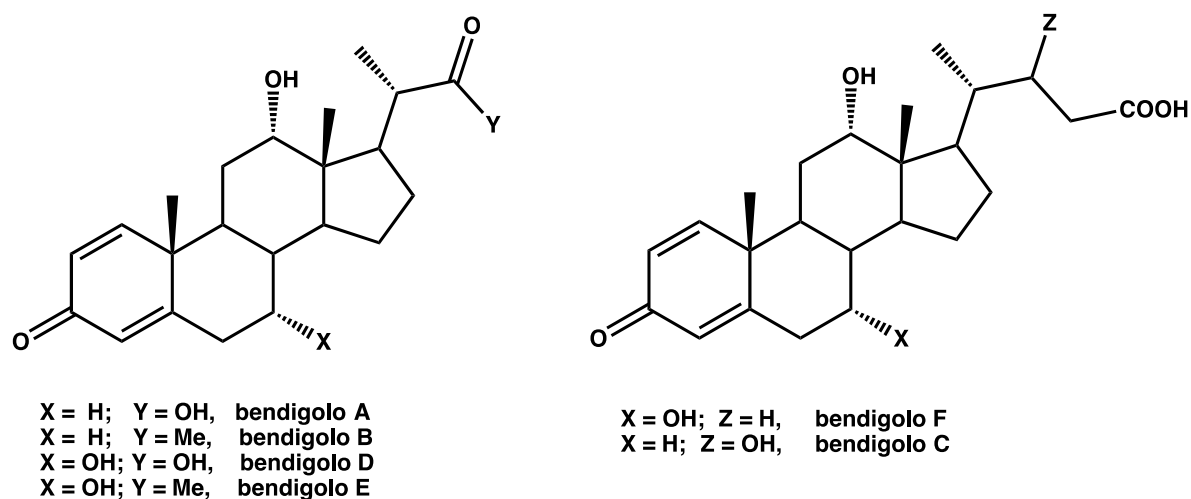
***CAPITOLO 4***

---

**Biotrasformazioni di acidi biliari:  
sintesi di bendigoli**

In questo capitolo verranno approfonditi i risultati derivanti da un campionamento di batteri fatto in Ecuador presso il macello di Cayambe. I microrganismi in oggetto sono stati utilizzati in uno screening biotrasformativo riportato nella tesi di dottorato della Dr. Maria Elena Maldonado Rodriguez [66], docente presso l'Università Politecnica Salesiana (Quito), che ha lavorato nell'ambito del progetto di Cooperazione allo Sviluppo tra l'Università ecuadoregna e l'Università di Ferrara.

Il mio lavoro di tesi ha riguardato lo studio delle biotrasformazioni in grado di fornire prodotti o intermedi chiave per la produzione di molecole con attività biologica. In particolare la nostra attenzione si focalizzata sulle biotrasformazioni che portano alla formazione di una serie di composti denominati bendigoli (Figura 1). Alcuni di questi sono già noti in letteratura (bendigoli A-F).



**Figura 1.** Struttura dei bendigoli

I bendigoli A-C, mostrato affinità di legame al recettore degli androgeni, questi metaboliti sono stati isolati come metaboliti secondari da *Gordonia australis* Acta 2299 [54], un ceppo appartenente alla classe degli attinobatteri isolati dalla schiuma di fanghi attivi nel paese di Bendigo (Victoria, Australia) [67]. Altri steroli bioattivi come i bendigoli D-F (Figura 1) sono prodotti da *Actinomadura* sp. SBMs009, microrganismi che vivono associati a spugne marine. Gli *Actinomadura* appartengono al genere degli attinomiceti, che comprendono specie batteriche ambientali. Questi ceppi sono stati isolati dalla spugna marina *Suberites japonicus* [68]. Per quanto riguarda l'attività biologica associata al bendigolo D, è stato dimostrato che è in grado di provocare citotossicità nei confronti della linea cellulare L929

(fibroblasti di topo) ed inibisce i fattori di trascrizione dei recettori dei glucocorticoidi (GR), mentre il bendigolo F è un efficace inibitore del fattore di trascrizione NF-kB [69]. In un recente lavoro il prodotto 6 $\alpha$ -idrossi-3-cheto-23,24-dinorcolan-1,4-diene-22-oico, strutturalmente analogo ai bendigoli A e D, è stato ottenuto da biotrasformazioni dell'acido iodesossicolico con vari *Rhodococcus* sp. [55], mentre i bendigoli A e D sono stati proposti come intermedi nella biotrasformazione di acidi biliari (acido desossicolico e acido colico, rispettivamente) con *Rhodococcus ruber* a nuovi 9,10-secosteroidi [51].

In questo capitolo verranno descritte le biotrasformazione dell'acido colico **1a**, dell'acido desossicolico **1b** e dell'acido iodesossicolico **1c** che hanno portato alla formazione di bendigoli e altri metaboliti con i batteri isolati dal macello rurale di Cayambe (provincia di Pichincha, Ecuador). Questo lavoro è stato oggetto di pubblicazione [70].

I batteri sono stati campionati nell'area di raccolta delle viscere (come i contenitori, tavoli, lavanderia) del macello Cayambe (Ecuador, provincia di Pichincha) (Tabella 1).

**Tabella 1.** Batteri derivante dal macello di Cayambe

<b>Luogo</b>	<b>Batteri</b>
Contenuto delle viscere di bovini non a digiuno	<b>ECS1, ECS2, ECS3</b>
Contenitori per la raccolta di interiora	<b>ECS4, ECS5</b>
Tavolo lavorazioni viscere	<b>ECS6, ECS7, ECS8, ECS9, ECS10</b>
Piano di trasformazione delle viscere	<b>ECS11, ECS12, ECS13, ECS14, ECS15, ECS16, ECS17, ECS18</b>
Pareti dei macelli	<b>ECS19, ECS20, ECS21, ECS22</b>
Area consegna viscere	<b>ECS23, ECS24</b>
Area di lavaggio viscere	<b>ECS25</b>

Tutti i batteri campionati e isolati sono stati utilizzati per uno screening biotrasformazione di acidi biliari **1a-c** su scala analitica, il substrato è stato aggiunto in concentrazioni di (1g/L) e le colture coltivate a 28-30° C per 2 giorni in PCB (Plate Count Broth) o TSB (Tryptic Soy Broth).

Solo sei ceppi (ESC1, ESC9, ES10, ECS12, ESC22, ESC25) hanno mostrato capacità di biotrasformare gli acidi biliari **1a-c**. Gli altri ceppi hanno dato degradazione completa o nessuna reazione. I batteri ESC1, ESC9, ES10, ECS12, ESC22, ESC25 sono stati caratterizzati sulla base dei dati di sequenza del 16S rRNA, da questi dati emerge che appartengono ai generi *Pseudomonas* e *Rhodococcus* (Tabella 2).

**Tabella 2.** Caratterizzazione batterica

Ceppo	Luogo	Identificazione
ECS1	Contenuti budello bovino	<i>Pseudomonas prosekii</i> ECS1
ECS9	Tavolo lavorazioni viscere	<i>Pseudomonas fragi</i> ECS9
ECS10	Tavolo lavorazioni viscere	<i>Pseudomonas mendocina</i> ECS10
ECS12	Piano di trasformazione delle viscere	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ESC12
ECS22	Pareti dei macelli	<i>Pseudomonas fragi</i> ECS22
ECS25	Area di lavaggio viscere	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ECS25

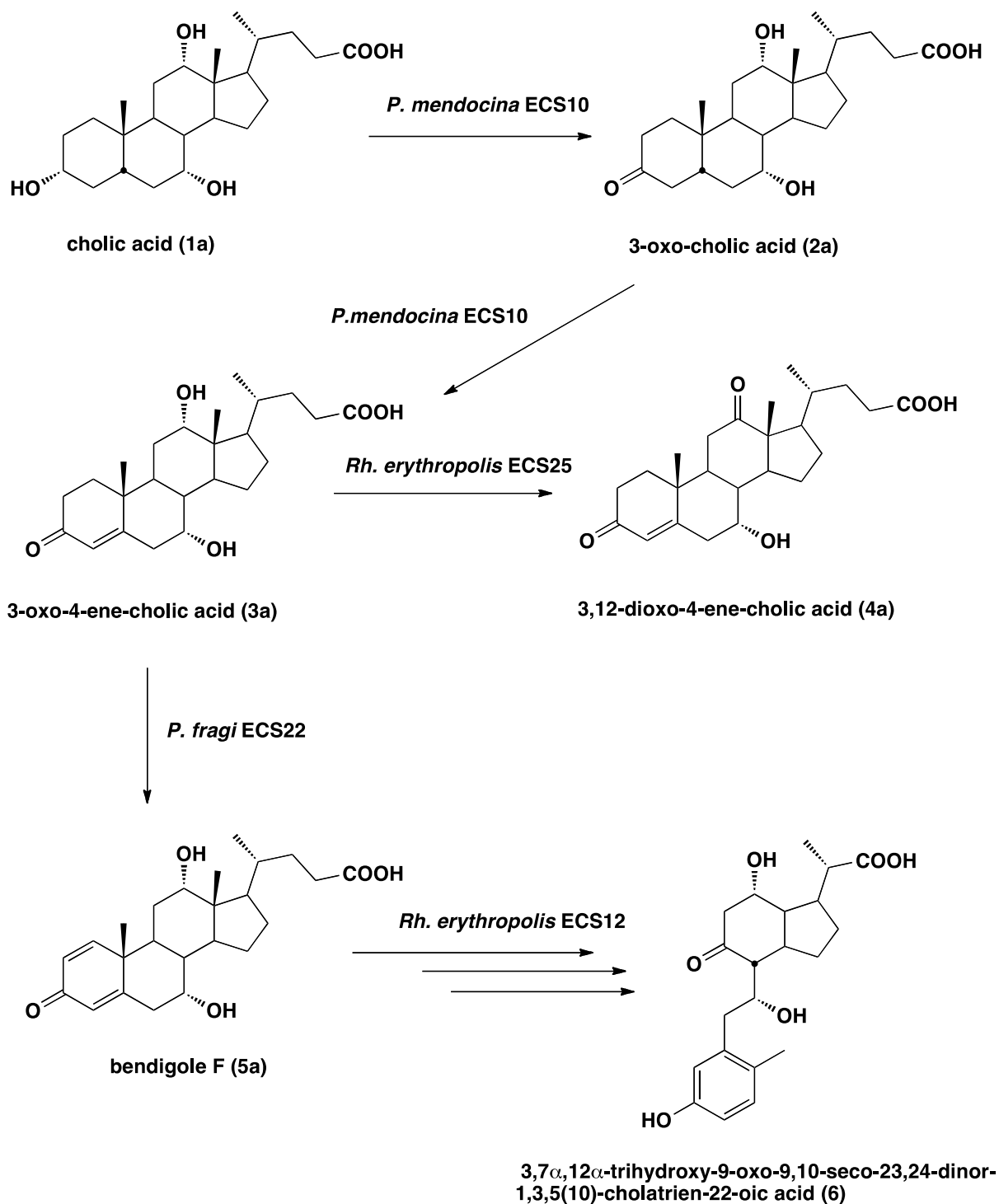
Le biotrasformazioni con gli acidi biliari **1a-c** sono state ripetute su scala preparativa con i ceppi selezionati ed identificati, ed i prodotti sono stati isolati mediante cromatografia e caratterizzati con  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.

La biotrasformazione di **1a** con *Pseudomonas mendocina* ECS10 ha dato, in quantità apprezzabili il 3-cheto derivato **2a** (45%), insieme al 3-cheto-4-ene derivato **3a** (45%) (Schema 1, Tabella 3).

**Tabella 3.** Biotrasformazioni di acido colico **1a** con generi *Pseudomonas* e *Rhodococcus*

Batteri	Terreno	Tempo (h)	Prodotti (resa %)				
			<b>2a</b> (45)	<b>3a</b> (45)			
<i>P. mendocina</i> ECS10	TSB <sup>a)</sup>	72	<b>2a</b> (45)	<b>3a</b> (45)			
<i>Rh. erythropolis</i> ECS25	TSB <sup>a)</sup>	48 <sup>b)</sup>			<b>4a</b> (60)		
<i>P. fragi</i> ECS22	TSB <sup>a)</sup>	120				<b>5a</b> (20)	
<i>Rh. erythropolis</i> ECS12	TSB <sup>a)</sup>	48 <sup>b)</sup>					<b>6a</b> (15)

<sup>a)</sup>Triptic-soy broth (Fluka); <sup>b)</sup>24 h biotrasformazione con 0.2 g of **1a** e ulteriori 24 h di biotrasformazione con 0.4 g **1a**



**Schema 1**

L'acido  $7\alpha,12\alpha$ -diidrossi-3-cheto-4-ene-24-oico **3a** è un interessante intermedio per ottenere steroidi della serie  $5\alpha$  partendo da acidi biliari (steroidi della serie  $5\beta$ ). Un analogo 4-ene derivato, l'acido  $7\alpha$ -idrossi-3,12-dicheto-4-ene-24-oico **4a**, è stato ottenuto con *Rhodococcus erythropolis* ECS25. In questo caso la prima aliquota di **1a** (0.2 g) è stata

completamente degradato in 24 h, quindi è stata aggiunta una seconda aliquota (0.4 g) e dopo altre 24 h di biotrasformazione **4a** è stato prodotto con il 60% di resa (resa complessiva 40%). Il bendigolo F (acido 7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diidrossi-3-cheto-1,4-diene-24-oico, **5a**) è stato ottenuto con una resa del 20% dalla biotrasformazione con *Pseudomonas fragi* ECS22. Tutti questi prodotti sono intermedi del percorso di degradazione degli acidi biliari, come il 9,10-secosteroide **6** (cioè l'acido 3,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triidrossi-9-cheto-9,10-seco-23,24-dinorcolan-1,3,5(10)-triene-22-oico) ottenuto con *Rhodococcus erythropolis* ECS12 in 15% di resa. Il prodotto **6** proviene dalla ossidazione dell'ossidrile in posizione C-3, con successiva deidrogenazione dei legami C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> e la parziale degradazione della catena laterale in C-17, che porta alla formazione del 3-cheto-1,4-diene derivato che dopo idrossilazione in C-9 che causa la scissione spontanea dei legami C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub> porta alla formazione del 9,10-secosteroide **6** [55].

Per quanto riguarda la biotrasformazione dell'acido desossicolico **1b** con *Pseudomonas prosekii* ECS1 si ottengono il 3-cheto e il 3-cheto-4-ene derivati in quantità comparabili (**2b**; 20%, e **3b**, 22%, rispettivamente) (Schema 2, Tabella 4).

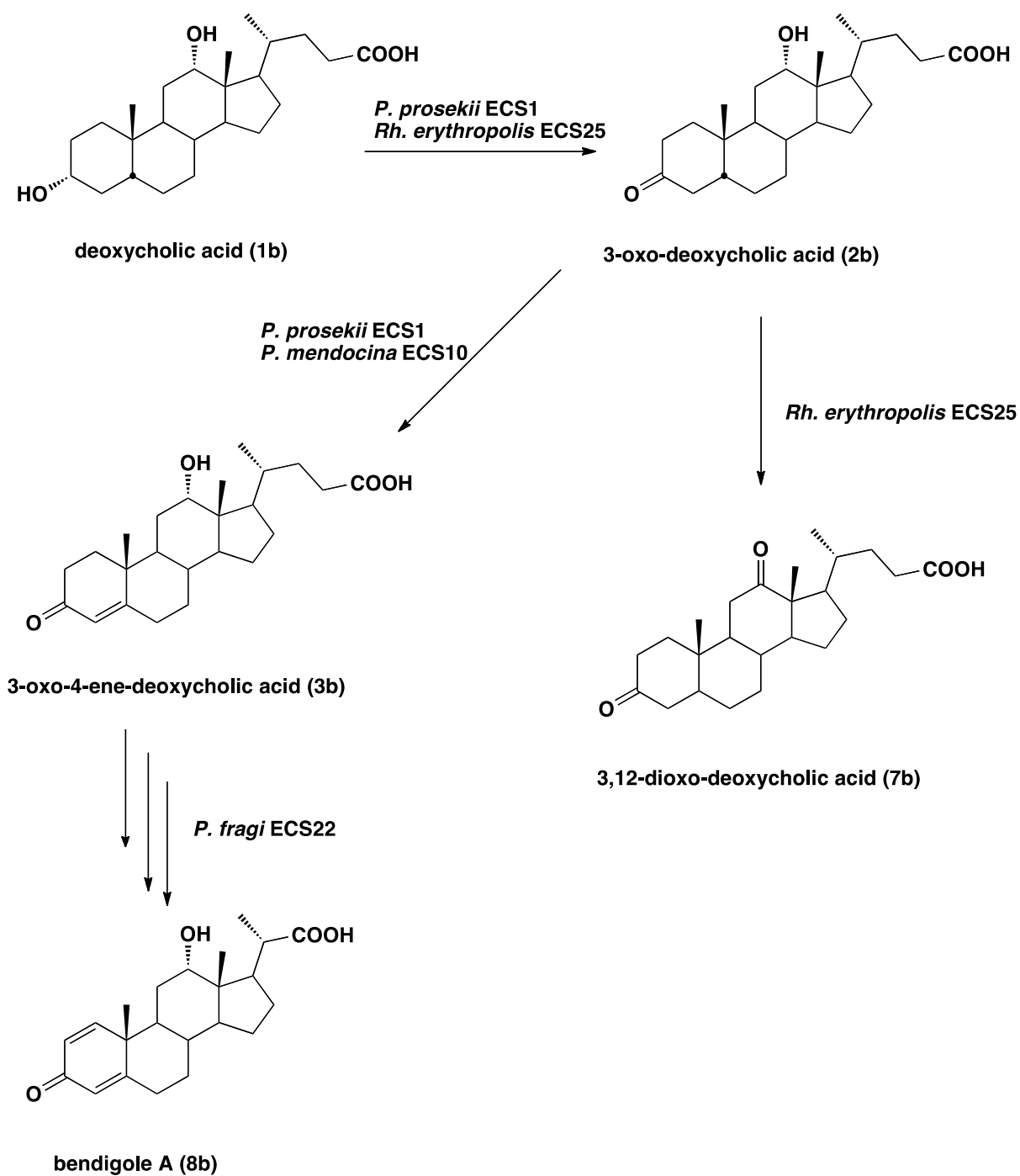
**Tabella 4.** Biotrasformazioni di acido desossicolico **1b** con generi *Pseudomonas* e *Rhodococcus*

Batteri	Terreno	Tempo (h)	Prodotti (resa %)			
<i>P. prosekii</i> ECS1	PCB <sup>a</sup>	72	<b>2b</b> (20)	<b>3b</b> (22)		
<i>P. mendocina</i> ECS10	TSB <sup>b</sup>	24		<b>3b</b> (95)		
<i>Rh. erythropolis</i> ECS25	TSB <sup>b</sup>	48 <sup>c</sup>	<b>2b</b> (61)		<b>7b</b> (30)	
<i>P. fragi</i> ECS9	TSB <sup>b</sup>	48				<b>8b</b> (80)

<sup>a</sup>)Plate count broth (Fluka); <sup>b</sup>)Tryptic-soy broth (Fluka); <sup>c</sup>)24 h biotrasformazione con 0.2 g of **1b** e ulteriori 24 h di biotrasformazione con 0.4 g **1b**

Il 3-cheto-4-ene derivato (**3b**; 95%) è stato ottenuto con resa praticamente quantitativa dalla biotrasformazione con *P. mendocina* ECS10. D'altra parte la biotrasformazione di **1b** con *Rh. erythropolis* ECS25 ha dato il 3-cheto e 3,12-dicheto derivati, (**2b**; 61%, e **7b**; 30%, rispettivamente). Infine il bendigolo A (cioè l'acido 12 $\alpha$ -idrossi-3-cheto-pregna-1,4-diene-20-oico, **8b**) è stato prodotto con resa del 80% con *P. fragi* ESC9.





Schema 2

Anche nella biotrasformazione dell'acido iodesossicolico **1c** con *P. mendocina* ESC10 si ottiene il 3-cheto derivato (**2c**; 50%) (Schema 3, Tabella 5).

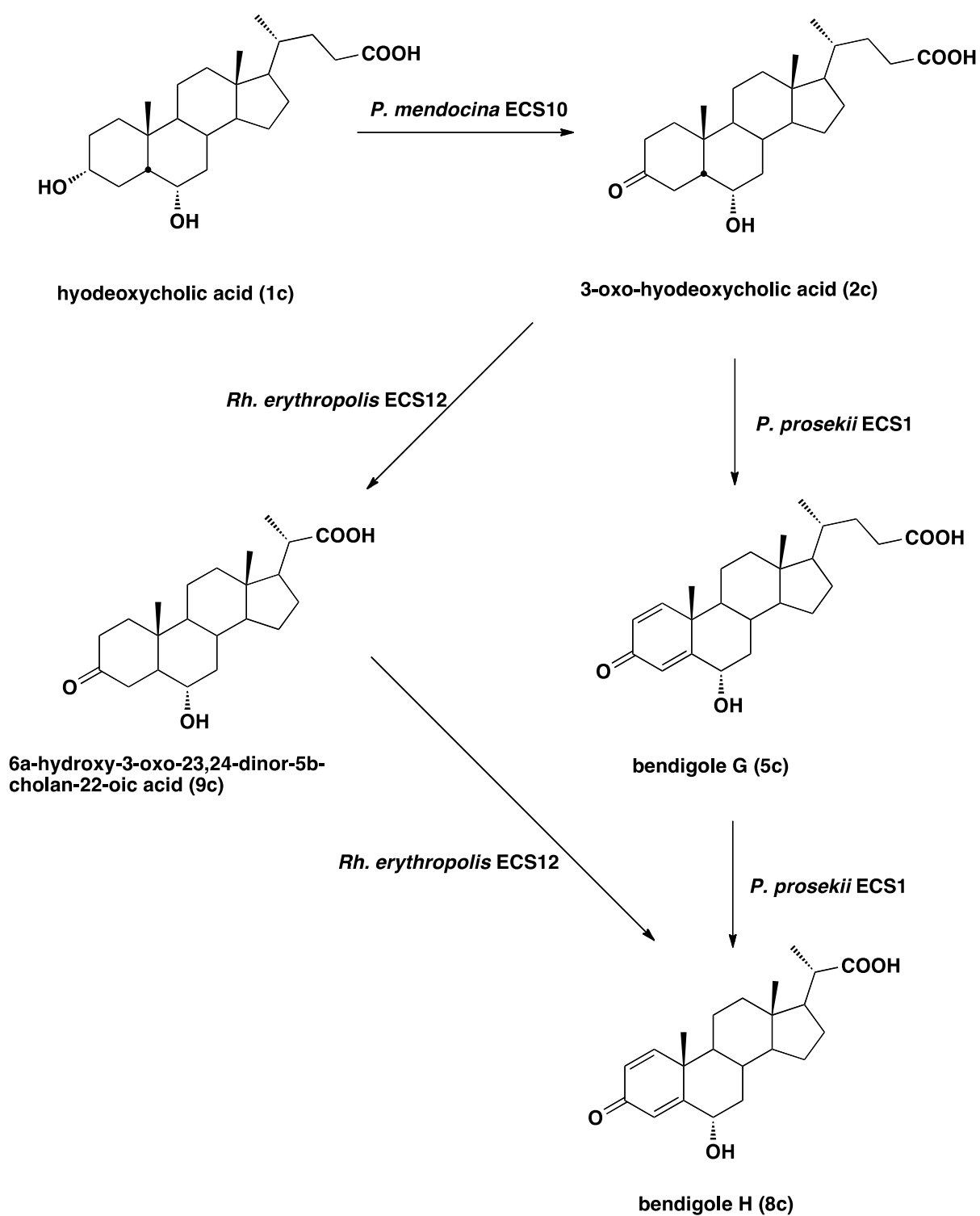
**Tabella 5.** Biotrasformazioni di acido iodesossicolico **1c** con generi *Pseudomonas* e *Rhodococcus*

Batteri	Terreno	Tempo (h)	Prodotti (resa %)			
<i>P.mendocina</i> ECS10	TSB <sup>a)</sup>	24	<b>2c</b> (50)			
<i>P. prosekii</i> ECS1	PCB <sup>b)</sup>	72		<b>5c</b> (13)	<b>8c</b> (20)	
<i>Rh. erythropolis</i> ECS12	TSB <sup>a)</sup>	24			<b>8c</b> (16)	<b>9c</b> (66)

<sup>a)</sup>Triptic-soy broth (Fluka); <sup>b)</sup>Plate count broth (Fluka)

Altri analoghi dei bendigoli sono stati ottenuti dalla biotrasformazione di **1c** con *P. prosekii* ECS1: l'acido 6 $\alpha$ -idrossi-3-cheto-1,4-diene-24-oico (bendigolo G, **5c**; 13%) e l'acido 6 $\alpha$ -idrossi-3-cheto-pregna-1,4-diene-20-oico (bendigolo H, **8c**; 20%). Inoltre il composto **8c** (16%) è stato ottenuto dalla biotrasformazione di **1c** con *Rh. erythropolis* ESC12 insieme all'acido 6 $\alpha$ -idrossi-3-cheto-23,24-dinorcolan-5 $\beta$ -22-oico (**9c**, 66%). In questo caso la parziale degradazione in C-17 della catena alchilica sembra avvenire prima dell'ossidazione dell'anello A.

La caratterizzazione dei bendigoli e degli altri prodotti, la descrizione della procedura sperimentale e il dettaglio dei materiali e metodi utilizzati vengono riportati nell'allegato A.



Schema 3

## FULL PAPER

## Biotransformations of Bile Acids with Bacteria from Cayambe Slaughterhouse (Ecuador): Synthesis of Bendigoles

by Stefania Costa<sup>a</sup>), Maria Elcna Maldonado Rodriguez<sup>b</sup>), Irene Rugiero<sup>c</sup>), Morena De Bastiani<sup>a</sup>), Alessandro Medici<sup>c</sup>), Elena Tamburini<sup>a</sup>), and Paola Pedrini<sup>a\*</sup>)<sup>a</sup>) Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Università di Ferrara, Via L. Borsari 46, IT-44121 Ferrara (phone: +39 0532 455700 fax: +39 0532 455715, e-mail: pdp@unife.it)<sup>b</sup>) Ingeniería en Biotecnología de los RRNN, Universidad Politécnica Salesiana, Av. 12 de Octubre y Wilson, Quito, Ecuador<sup>c</sup>) Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche, Università di Ferrara, Via Fossato di Mortara 17-27, IT-44121 Ferrara

The biotransformations of cholic acid (**1a**), deoxycholic acid (**1b**), and hyodeoxycholic acid (**1c**) to bendigoles and other metabolites with bacteria isolated from the rural slaughterhouse of Cayambe (Pichincha Province, Ecuador) were reported. The more active strains were characterized, and belong to the genera *Pseudomonas* and *Rhodococcus*. Various biotransformation products were obtained depending on bacteria and substrates. Cholic acid (**1a**) afforded the 3-oxo and 3-oxo-4-ene derivatives **2a** and **3a** (45% and 45%, resp.) with *P. mendocina* ECS10, 3,12-dioxo-4-ene derivative **4a** (60%) with *Rh. erythropolis* ECS25, and 9,10-secosteroid **6** (15%) with *Rh. erythropolis* ECS12. Bendigole F (**5a**) was obtained in 20% with *P. fragi* ECS22. Deoxycholic acid (**1b**) gave 3-oxo derivative **2b** with *P. prosekii* ECS1 and *Rh. erythropolis* ECS25 (20% and 61%, resp.), while 3-oxo-4-ene derivative **3b** was obtained with *P. prosekii* ECS1 and *P. mendocina* ECS10 (22% and 95%, resp.). Moreover, *P. fragi* ECS9 afforded bendigole A (**8b**; 80%). Finally, *P. mendocina* ECS10 biotransformed hyodeoxycholic acid (**1c**) to 3-oxo derivative **2c** (50%) and *Rh. erythropolis* ECS12 to 6 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-5 $\beta$ -cholan-22-oic acid (**9c**, 66%). Bendigole G (**5c**; 13%) with *P. prosekii* ECS1 and bendigole H (**8c**) with *P. prosekii* ECS1 and *Rh. erythropolis* ECS12 (20% and 16%, resp.) were obtained.

**Keywords:** Biotransformations, Bile acids, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, Bendigoles.

## Introduction

Bile acids (BAs), their conjugates, and salts are natural products, and are fundamental constituents of bile [1]. The primary bile acids in human bile are cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA), mainly present as glycine and taurine conjugates, while deoxycholic (DCA) and lithocholic (LCA) acids are commonly known as secondary bile acids (Fig. 1).

Chenodeoxycholic and its 7-hydroxy epimer ursodeoxycholic acid (UDCA) have important pharmaceutical applications related to their ability to solubilize cholesterol gallstones and are prepared in large scale [2] [3] from raw material with high bile acids content such as bovine and porcine gall.

In recent years, the biotransformations of bile acids have been widely studied [4], and various approaches to improve the synthesis of UDCA using microorganisms and enzymes have been made [5 – 10].

Also, the aerobic bacterial degradation of bile salts was intensely investigated and a general scheme based on the

structure of isolated degradation intermediates have been proposed [11]. A recent review [12] suggests that the degradation pathway of bile acids starts with the oxidation of the OH group at C(3), followed by dehydrogenation of the C(1)–C(2) and C(4)–C(5) bonds to 3-keto-1,4-diene structures (Scheme 1). Concomitant with or after A-ring oxidation, the acyl side chain is shortened and finally removed from the steroid skeleton yielding 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) derivatives with OH groups at C(7), C(6), and/or C(12). After A-ring oxidation, the C(9)-position is subject to hydroxylation by 3-ketosteroid 9 $\alpha$ -hydroxylase (KSH), a two-component iron-sulfur-containing monooxygenase [13 – 15]. This reaction leads to the spontaneous cleavage of the B-ring by a *retro*-aldol cleavage and the aromatic 9,10-secosteroids are obtained [16].

In a recent work, we have pointed out that the complete C(17)-side chain degradation is not essential for KSH 9 $\alpha$ -hydroxylation, since two 9,10-secosteroids were obtained with a partial degradation of C(17)-side chain by biotransformation of hyodeoxycholic acid with some *Rhodococcus* spp. [17].

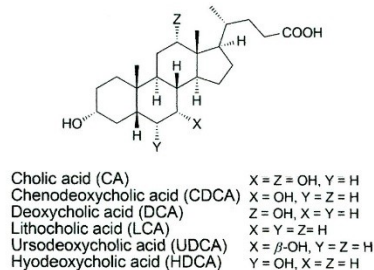


Fig. 1. Structures of bile acids.

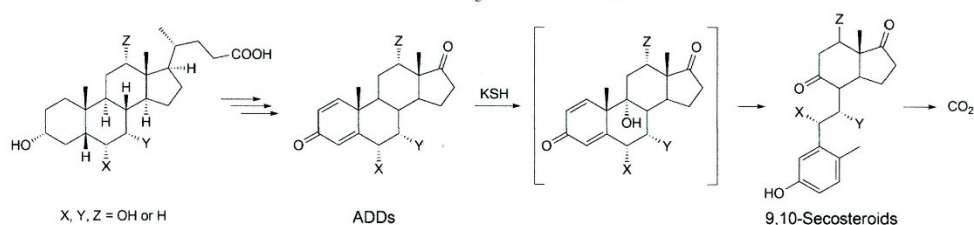
## Results and Discussion

### Biotransformation Screening of Bile Acids (1a–1c)

Various bacteria were sampled in the area of the gut production (such as containers, tables, laundry) of the slaughterhouse of Cayambe (Ecuador, Province of Pichincha) (Table 1).

Cayambe is an agricultural service town in highland Ecuador (70 km northeast of Quito) and lies at the foot of the Cayambe volcano. The town is mainly inhabited by Mestizos, while the surrounding rural population is primarily composed of indigenous people who are mainly involved in subsistence agriculture, dairy farming, and procurement

Scheme 1. Biodegradation of bile acids.



The lacking or partial degradation of the C(17)-side chain is present in recently investigated bile acids metabolites named bendigoles A–C (Fig. 2). Bendigoles A–C, that showed binding affinity to androgen receptor, have been isolated as secondary metabolites of *Gordonia australis* Acta 2299 [18], a strain from activated sludge foam [19] near Bendigo (Victoria, Australia).

Other bioactive sterols, such as bendigoles D–F (Fig. 2), are produced by *Actinomadura* sp. SBMs009 from marine sponge *Suberites japonicus* [20]. In particular, bendigole D displayed cytotoxicity against the L929 (mouse fibroblast) cell line and was the most active inhibitor of GR translocation, while bendigole F was an effective inhibitor of NF- $\kappa$ B nuclear translocation [21].

In a recent article, 6 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo-23,24-dinorchol-1,4-dien-22-oic acid, structurally analogous to bendigoles A and D, has been obtained by biotransformation of hyodeoxycholic acid with various *Rhodococcus* sp. [17], while bendigoles A and D have been proposed as intermediates in the biotransformations of bile acids (i.e., deoxycholic acid and cholic acid, resp.) with *Rhodococcus ruber* to new 9,10-secosteroids [22].

In this article, the biotransformations of cholic acid (1a), deoxycholic acid (1b), and hyodeoxycholic acid (1c) to bendigoles and other metabolites with bacteria isolated from the rural slaughterhouse of Cayambe (Pichincha Province, Ecuador) are reported.

of lumber. The rural slaughterhouse of Cayambe produces much pollution due to waste, and due to improper disposal of byproducts such as blood, rumen, dung, and offal.

All sampled and purified bacteria were used for a biotransformation screening of bile acids 1a–1c on analytical scale adding the substrate (1 g/l) to the cultures grown at 28–30 °C for two days in PCB and TSB broth.

Only six strains (i.e., ECS1, ECS9, ECS10, ECS12, ECS22, and ECS25) showed ability to biotransform bile acids 1a–1c. The other strains gave complete degradation or no reaction at all. The bacteria ECS1, ECS9, ECS10, ECS12, ECS22, and ECS25 were identified as those belonging to *Pseudomonas* and *Rhodococcus* genera on the basis of 16S rRNA sequence data (Table 2). The biotransformations of bile acids 1a–1c were repeated on

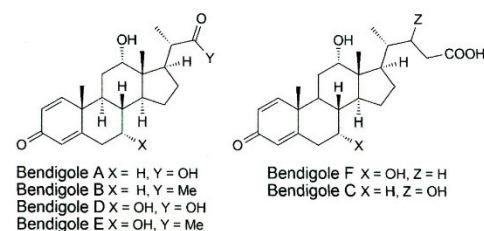


Fig. 2. Structures of bendigoles.

Table 1. Bacteria from Cayambe slaughterhouse (Ecuador)

Location	Bacteria
Stomach's content of not fasting bovines	ECS1, ECS2, ECS3
Container for entrails collection	ECS4, ECS5
Entrails processing table	ECS6, ECS7, ECS8, ECS9, ECS10
Entrails processing floor	ECS11, ECS12, ECS13, ECS14, ECS15, ECS16, ECS17, ECS18
Slaughterhouse walls	ECS19, ECS20, ECS21, ECS22
Entrails delivery area	ECS23, ECS24
Entrails washing area	ECS25

Table 2. Characterization of bacteria

Bacteria	Location	Identification <sup>a)</sup>
ECS1	Bovine gut content	<i>Pseudomonas prosekii</i> ECS1
ECS9	Entrails processing table	<i>Pseudomonas fragi</i> ECS9
ECS10	Entrails processing table	<i>Pseudomonas mendocina</i> ECS10
ECS12	Entrails processing floor	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ECS12
ECS22	Slaughter area walls	<i>Pseudomonas fragi</i> ECS22
ECS25	Entrails wash house	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ECS25

<sup>a)</sup> On the basis of 16S rRNA sequence data.

preparative scale with the selected and identified strains, and the products were isolated by chromatography and characterized (<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR).

#### Biotransformation of Cholic Acid (1a)

The biotransformation of **1a** with *Pseudomonas mendocina* ECS10 gave, in appreciable amounts, the 3-oxo derivative **2a** (45%) together with the 3-oxo-4-ene **3a** (45%; Scheme 2, Table 3).

7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-3-oxo-chole-4-en-24-oic acid (**3a**) is an interesting intermediate to obtain steroids ( $H_x-C(5)$ ) from bile acid ( $H_{\beta}-C(5)$ ). An analogous 4-ene derivative, 7 $\alpha$ -hydroxy-3,12-dioxochole-4-en-24-oic acid (**4a**), was obtained with *Rhodococcus erythropolis* ECS25. In this case, the first amount of **1a** (0.2 g) was completely degraded in 24 h, so a second aliquot (0.4 g) was added, and after further 24 h biotransformation, **4a** was produced in 60% yield (overall yield 40%). Moreover, bendigole F (*i.e.*, 7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-3-oxochole-1,4-dien-24-oic acid (**5a**))

Scheme 2. Biotransformation of cholic acid (1a).

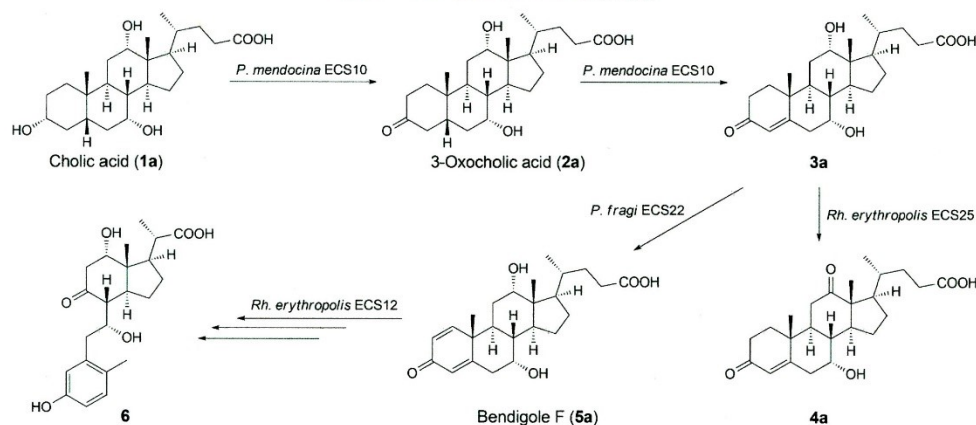
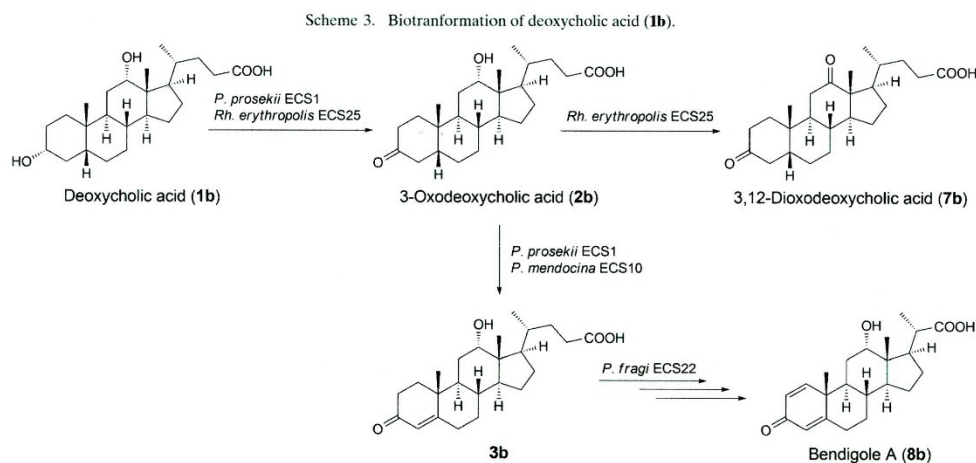


Table 3. Biotransformations of bile acids **1a** – **1c** with *Pseudomonas* and *Rhodococcus* strains

Bacteria	BA <sup>a)</sup>	Broth	Time [h]	Products (yield [%])			
<i>P. mendocina</i> ECS10	<b>1a</b>	TSB <sup>b)</sup>	72	<b>2a</b> (45)	<b>3a</b> (45)		
<i>Rh. erythropolis</i> ECS25	<b>1a</b>	TSB <sup>b)</sup>	48 <sup>d)</sup>			<b>4a</b> (60)	
<i>P. fragi</i> ECS22	<b>1a</b>	TSB <sup>b)</sup>	120				<b>5a</b> (20)
<i>Rh. erythropolis</i> ECS12	<b>1a</b>	TSB <sup>b)</sup>	48 <sup>d)</sup>				<b>6</b> (15)
<i>P. prosekii</i> ECS1	<b>1b</b>	PCB <sup>c)</sup>	72	<b>2b</b> (20)	<b>3b</b> (22)		
<i>P. mendocina</i> ECS10	<b>1b</b>	TSB <sup>b)</sup>	24		<b>3b</b> (95)		
<i>Rh. erythropolis</i> ECS25	<b>1b</b>	TSB <sup>b)</sup>	48 <sup>d)</sup>	<b>2b</b> (61)		<b>7b</b> (30)	
<i>P. fragi</i> ECS9	<b>1b</b>	TSB <sup>b)</sup>	48				<b>8b</b> (80)
<i>P. mendocina</i> ECS10	<b>1c</b>	TSB <sup>b)</sup>		<b>2c</b> (50)			
<i>P. prosekii</i> ECS1	<b>1c</b>	PCB <sup>c)</sup>			<b>5c</b> (13)	<b>8c</b> (20)	
<i>Rh. erythropolis</i> ECS12	<b>1c</b>	TSB <sup>b)</sup>				<b>8c</b> (16)	<b>9c</b> (66)

<sup>a)</sup> Bile acid. <sup>b)</sup> Tryptic-soy broth (*Fluka*). <sup>c)</sup> Plate-count broth (*Fluka*). <sup>d)</sup> 24 h Biotransformation with 0.2 g of **1** and further 24 h biotransformation with 0.4 g of **1**.



was obtained in 20% yield by biotransformation with *Pseudomonas fragi* ECS22. All these products are intermediates of the complex degradation pathway of bile acids, such as the 9,10-secosteroid **6** (i.e., 3,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-9-oxo-9,10-seco-23,24-dinorchola-1,3,5(10)-trien-22-oic acid) obtained with *Rhodococcus erythropolis* ECS12 in 15% yield. The product **6** hails from the oxidation of the HO-C(3), the dehydrogenation of the C(1)–C(2) and C(3)–C(4) bonds, and the partial degradation of the side chain at C(17) to 3-oxo-1,4-diene intermediate that after hydroxylation at C(9) leads to the spontaneous cleavage of the C(9)–C(10) bond to the 9-oxo-9,10-secosteroids **6** [17].

#### Biotransformation of Deoxycholic Acid (**1b**)

The biotransformation of deoxycholic acid (**1b**) with *Pseudomonas prosekii* ECS1 gave the 3-oxo and 3-oxo-4-

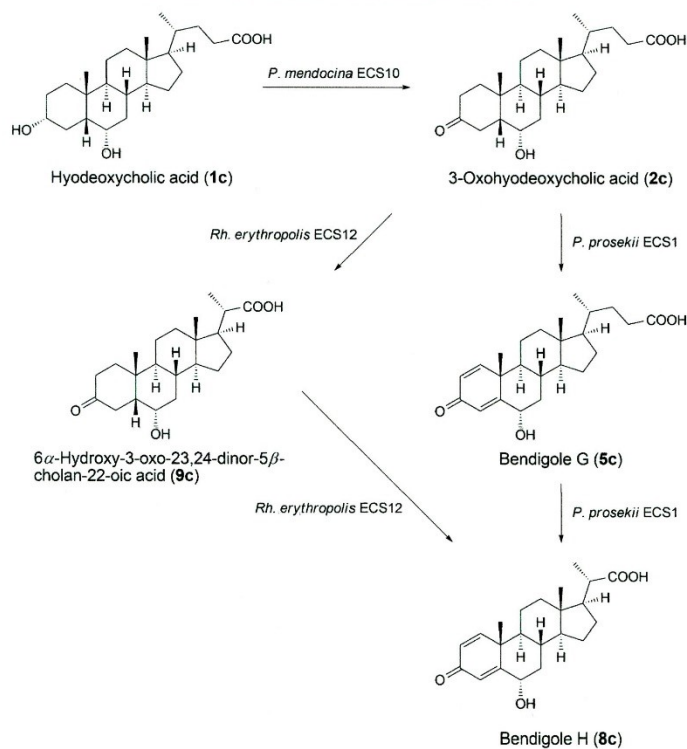
ene derivatives in comparable amounts (**2b**: 20%, and **3b**: 22%, resp.; Scheme 3, Table 3).

Practically quantitative yield of the 3-oxo-4-ene derivative (**3b**; 95%) was obtained with *P. mendocina* ECS10. However, the biotransformation of **1b** with *Rh. erythropolis* ECS25 gave 3-oxo and 3,12-dioxo derivatives (**2b**: 61%, and **7b**: 30%, resp.). Finally, bendigole A (i.e., 12 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo-pregna-1,4-diene-20-carboxylic acid (**8b**)) was produced in 80% yield with *P. fragi* ECS9.

#### Biotransformation of Hyodeoxycholic Acid (**1c**)

Also in the biotransformation of hyodeoxycholic acid (**1c**), *P. mendocina* ECS10 produced the 3-oxo derivative (**2c**: 50%; Scheme 4, Table 3).

However, analogous bendigole compounds were obtained by biotransformation of **1c** with *P. prosekii* ECS1:

Scheme 4. Biotransformation of hydeoxycholic acid (**1c**).

6 $\alpha$ -hydroxy-3-oxochola-1,4-diene-24-oic acid (bendigole G, **5c**; 13%) and 6 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo-pregna-1,4-diene-20-carboxylic acid (bendigole H, **8c**; 20%). Moreover, the compound **8c** (16%) was also obtained by biotransformation of **1c** with *Rh. erythropolis* ECS12 together with 6 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-5 $\beta$ -cholan-22-oic acid (**9c**; 66%). In this case, the partial degradation of C(17)-alkyl chain seems to take place before the oxidation of the ring A.

### Conclusions

In conclusion, the screening of bacteria isolated from Cayambe slaughterhouse (Ecuador) has allowed the identification of different strains belonging to the genera *Pseudomonas* and *Rhodococcus* able to produce bendigoles. Bendigoles A, known as a secondary metabolite of a marine sponge, has androgenic activity, while bendigole F shows glucocorticoid receptor activity. However, bendigoles H and G, so far known as degradation products of hydeoxycholic acid, could also have biological activity.

We thank the ICE (*Industria Chimica Emiliana*) industry (Reggio Emilia, Italy) for financial support.

### Experimental Part

#### General

Sodium salts of cholic acid (**1a**), deoxycholic acid (**1b**), and hydeoxycholic acid (**1c**) have been supplied by ICE industry [23]. TLC were performed on precoated silica gel plates (thickness 0.25 mm; *Merck*, Darmstadt, Germany), silica gel (*Kieselgel 60, 70 – 230 mesh*; *Sigma–Aldrich*, St. Louis, Missouri, USA) were used for prep. column chromatography (CC), and silica gel plates (thickness 500  $\mu$ m; *Merck*) for prep. layer chromatography (PLC). Melting points are uncorrected and were determined on a 510 *Büchi* (Flawil, Switzerland) melting-point instrument. NMR Spectra: *Varian Gemini 300* spectrometer at 300 ( $^1\text{H}$ ) or 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ); in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ;  $\delta$  in ppm rel. to  $\text{Me}_4\text{Si}$  as internal standard,  $J$  in Hz.



Various culture media have been used: PCA (plate-count agar; trypton, 5 g/l; glucose, 1 g/l; yeast extract, 2.5 g/l; agar, 15 g/l), PCB (plate-count broth; trypton, 5 g/l; glucose, 1 g/l; yeast extract, 2.5 g/l), and TSB (triptic-soy broth; casein pepton, 17 g/l; soy pepton, 3 g/l; NaCl, 5 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5 g/l; glucose, 2.5 g/l).

#### Isolation of Bacteria

The bacteria were sampled in various places of the area of the gut production (such as containers, tables, laundry) of the slaughterhouse of Cayambe (Ecuador, Province of Pichincha). The sterilized physiological soln. was conveniently diluted (about 10<sup>-4</sup>) and put on two Petri dishes containing PCA (*Difco, Becton Dickson*, Lawrence, Kansas, USA), the first containing the sodium salt of deoxycholic acid (5%) and the second the sodium salt of hydoxycholic acid (5%), resp. After 24 h incubation at 28 °C, 26 strains of bacteria were isolated and numbered (Table 1).

#### Screening of Biotransformation of Bile Acids 1a – 1c with Bacteria on Analytical Scale: General Procedure

Sterilized PCB (or TSB) (20 ml) was inoculated with a loopful of the isolated bacteria on PCA medium. The mixture was incubated for 2 d at 28 °C and 100 rpm. The selected substrate (200 µl; the soln. was prepared dissolving 0.1 g of substrate in 1 ml of H<sub>2</sub>O) was added to the resulting suspension of grown cells and the incubation was continued for 5 d. Aliquots (1 ml) were withdrawn and centrifuged to remove the cells (2375 g; 20 min). The supernatant was acidified to pH 2 with 1M HCl and extracted with AcOEt (1 ml). The org. layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and analyzed by TLC.

#### 16S rRNA Gene Sequencing and Strain Identification

Six strains were selected on the basis of the biotransformations of bile acids 1a – 1c: ECS1, ECS9, ECS10, ECS12, ECS22, and ECS25. Genomic DNA of bacterial strains was extracted by *GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit* (*Sigma–Aldrich*, St. Louis, Missouri, USA). 16S rRNA Gene sequences (about 1000 nucleotides) were obtained after PCR amplification with universal forward (pA: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') and reverse primers (pH: 5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3') [24]. PCR was performed according to the procedure described [25] with minor modifications and using *FideliTaq™ PCR Master Mix* (*USB, Affymetrix*, Santa Clara, California, USA). PCR products were purified with *GenElute™ PCR Clean-Up kit* (*Sigma–Aldrich*) and sequenced through commercial service of *BMR genomics*, Padua, Italy (<http://www.bmr-genomics.it>). Finally, the isolate was identified using the *EzTaxon* server (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) [26] on the basis of 16S rRNA sequence data. The results are reported in Table 3.

#### Biotransformations of Bile Acid 1a – 1c with Bacteria: General Procedure

Sterilized PCB (or TSB) (20 ml) was inoculated with a loopful of the isolated bacteria on PCA medium. The mixture was incubated for 2 d at 28 °C and 100 rpm and then was added to sterilized PCB or TSB (200 ml). The mixture was incubated for further 2 d at 28 °C and 100 rpm. To the resulting suspension of grown cells, a soln. of the sodium salt of the selected bile acid (0.2 g) in H<sub>2</sub>O (2 ml) was added. After the appropriate time of incubation, the mixture was centrifuged (2375 g; 20 min), the supernatant was acidified to pH 2 with 37% HCl and extracted with AcOEt (3 × 200 ml). The org. layer was dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and the solvent removed under vacuum. The crude mixture was then chromatographed over SiO<sub>2</sub> to obtain the pure products.

In some cases, reported below, the selected bile acid was completely degraded, and a second amount was added (0.4 g in 4 ml H<sub>2</sub>O) to have the reaction products (Table 3).

The products obtained with cholic acid 1a are shown below:

*Pseudomonas mendocina* ECS10, after PLC (AcOEt/AcOH 50:2), afforded:

**7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-3-oxo-5 $\beta$ -cholan-24-oic Acid (2a)** [27]. Yield: 45%. <sup>1</sup>H-NMR selected data: 0.78 (s, 3 H); 1.05 (s, 3 H); 1.06 (d, J = 7, 3 H); 3.82 (s, 1 H); 4.0 (s, 1 H).

**7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-3-oxochol-4-en-24-oic Acid (3a)** [28]. Yield: 45%. <sup>1</sup>H-NMR selected data: 0.78 (s, 3 H); 1.02 (d, J = 7, 3 H); 1.21 (s, 3 H); 3.92 (s, 1 H); 4.0 (s, 1 H); 5.78 (s, 1 H).

*Rhodococcus erythropolis* ECS25, after 24 h biotransformation (0.2 g of 1a), further 24 h biotransformation (0.4 g of 1a), and PLC (AcOEt/AcOH 50:2), afforded **7 $\alpha$ -hydroxy-3,12-dioxochol-4-en-24-oic acid (4a)** [29]. Yield: 60%. Overall yield: 40%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) selected data: 1.08 (s, 3 H); 1.22 (d, J = 7, 3 H); 1.25 (s, 3 H); 4.05 (s, 1 H); 5.82 (s, 1 H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 221.97 (C(12)); 198.23 (C(3)); 180.07 (C(22)); 165.24 (C(5)); 127.60 (C(4)); 67.34 (C(7)); 56.19; 51.47; 47.24; 43.47; 42.54; 40.86; 39.33; 38.75; 37.33; 35.07; 33.70; 26.47; 23.58; 17.74; 16.44; 11.68.

*Pseudomonas fragi* ECS22, after PLC (AcOEt/AcOH 50:2), afforded **7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihydroxy-3-oxochol-1,4-dien-24-oic acid (= Bendigole F; 5a)** [20]. Yield: 20%. <sup>1</sup>H-NMR selected data: 0.80 (s, 3 H); 1.01 (d, J = 7, 3 H); 1.23 (s, 3 H); 4.01 (s, 2 H); 6.08 (s, 1 H); 6.20 (dd, J = 6.5, 2.8, 1 H); 7.25 (d, J = 6.5, 1 H).

*Rhodococcus erythropolis* ECS12, after 24 h biotransformation (0.2 g of 1a), further 24 h biotransformation (0.4 g of 1a), and PLC (AcOEt/AcOH 50:2), afforded **3,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-9-oxo-9,10-seco-23,24-dinorchol-1,3,5 (10)-trien-22-oic acid (6)** [22]. Yield: 15%. Overall yield: 10%. <sup>1</sup>H-NMR selected data: 0.91 (s, 3 H); 1.25 (d, J = 6.5, 3 H); 2.20 (s, 3 H); 3.90–3.96 (m, 1 H); 4.06–4.10 (m, 1 H); 6.52 (dd, J = 8.0, 2.7, 1 H); 6.62 (d, J = 2.7, 1 H); 6.93 (d, J = 8.2, 1 H).

The products obtained with deoxycholic acid **1b** are shown below:

*Pseudomonas prosekii* ECS1, after PLC (AcOEt/cyclohexane/AcOH 70:30:2) afforded:

**12 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-5 $\beta$ -cholan-24-oic Acid (2b)** [27]. Yield: 20%. <sup>1</sup>H-NMR selected data: 0.75 (s, 3 H); 1.01 (d, J = 7, 3 H); 1.02 (s, 3 H); 4.05 (s, 1 H).

**12 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxochol-4-en-24-oic Acid (3b)** [30]. Yield: 22%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) selected data: 0.75 (s, 3 H); 0.95 (d, J = 7, 3 H); 1.15 (s, 3 H); 4.05 (br. s, 1 H); 5.78 (s, 1 H).

*Pseudomonas mendocina* ECS10, after CC (cyclohexane/AcOEt/AcOH 60:40:1), afforded **3b**. Yield: 95%.

*Rhodococcus erythropolis* ECS25, after 24 h biotransformation (0.2 g of **1b**), further 24 h biotransformation (0.4 g of **1b**), and CC (cyclohexane/AcOEt/AcOH 60:40:1), afforded:

**2b**. Yield: 61%. Overall yield 39%.

**3,12-Dioxo-5 $\beta$ -cholan-24-oic Acid (7b)** [27]. Yield: 30%. Overall yield: 20%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) selected data: 0.82 (d, J = 7, 3 H); 1.05 (s, 3 H); 1.10 (s, 3 H).

*Pseudomonas fragi* ECS9, after PLC (AcOEt/cyclohexane/AcOH 70:30:2), afforded **12 $\alpha$ -hydroxy-3-oxopregna-1,4-diene-20-carboxylic acid (= bendigole A; 8b)** [18]. Yield: 80%. <sup>1</sup>H-NMR selected data: 0.80 (s, 3 H); 1.23 (d, J = 6, 3 H); 1.25 (s, 3 H); 3.95 (s, 1 H); 6.05 (s, 1 H); 6.21 (dd, J = 10, 1, 1 H); 7.11 (d, J = 10, 1 H).

The products obtained with hyodeoxycholic acid **1c** are shown below:

*Pseudomonas mendocina* ECS10, after CC (cyclohexane/AcOEt/AcOH 60:40:1), afforded **6 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo-5 $\beta$ -cholan-24-oic acid (2e)** [27]. Yield: 50%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) selected data: 0.68 (s, 3 H); 0.95 (d, J = 6, 3 H); 1.00 (s, 3 H); 4.15 (m, 1 H).

*Pseudomonas prosekii* ECS1, after PLC (AcOEt/cyclohexane/AcOH 70:30:2), afforded:

**6 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxochol-1,4-dien-24-oic Acid (= Bendigole G; 5c)** [31]. Yield: 13%. <sup>1</sup>H-NMR selected data: 0.80 (s, 3 H); 0.98 (d, J = 7, 3 H); 1.25 (s, 3 H); 4.42–4.53 (m, 1 H); 6.22 (dd, J = 10, 2.1, 1 H); 6.42 (s, 1 H); 7.25 (d, J = 10, 1 H).

**6 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxopregna-1,4-diene-20-carboxylic Acid (= Bendigole H; 8c)** [22]. Yield: 20%. <sup>1</sup>H-NMR selected data: 0.81 (s, 3 H); 1.20 (d, J = 6.5, 3 H); 1.25 (s, 3 H); 4.4–4.5 (m, 1 H); 6.22 (dd, J = 10, 2.1, 1 H); 6.41 (s, 1 H); 7.25 (d, J = 10, 1 H).

*Rhodococcus erythropolis* ECS12, after CC (cyclohexane/AcOEt/AcOH 50:50:1), afforded: **bendigole H (8c)**. Yield: 16%.

**6 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-23,24-dinor-5 $\beta$ -cholan-22-oic Acid (9c)** [17]. Yield: 66%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) selected data: 0.71 (s, 3 H); 1.02 (s, 3 H); 1.25 (d, J = 6.2, 3 H); 4.05–4.18 (m, 1 H).

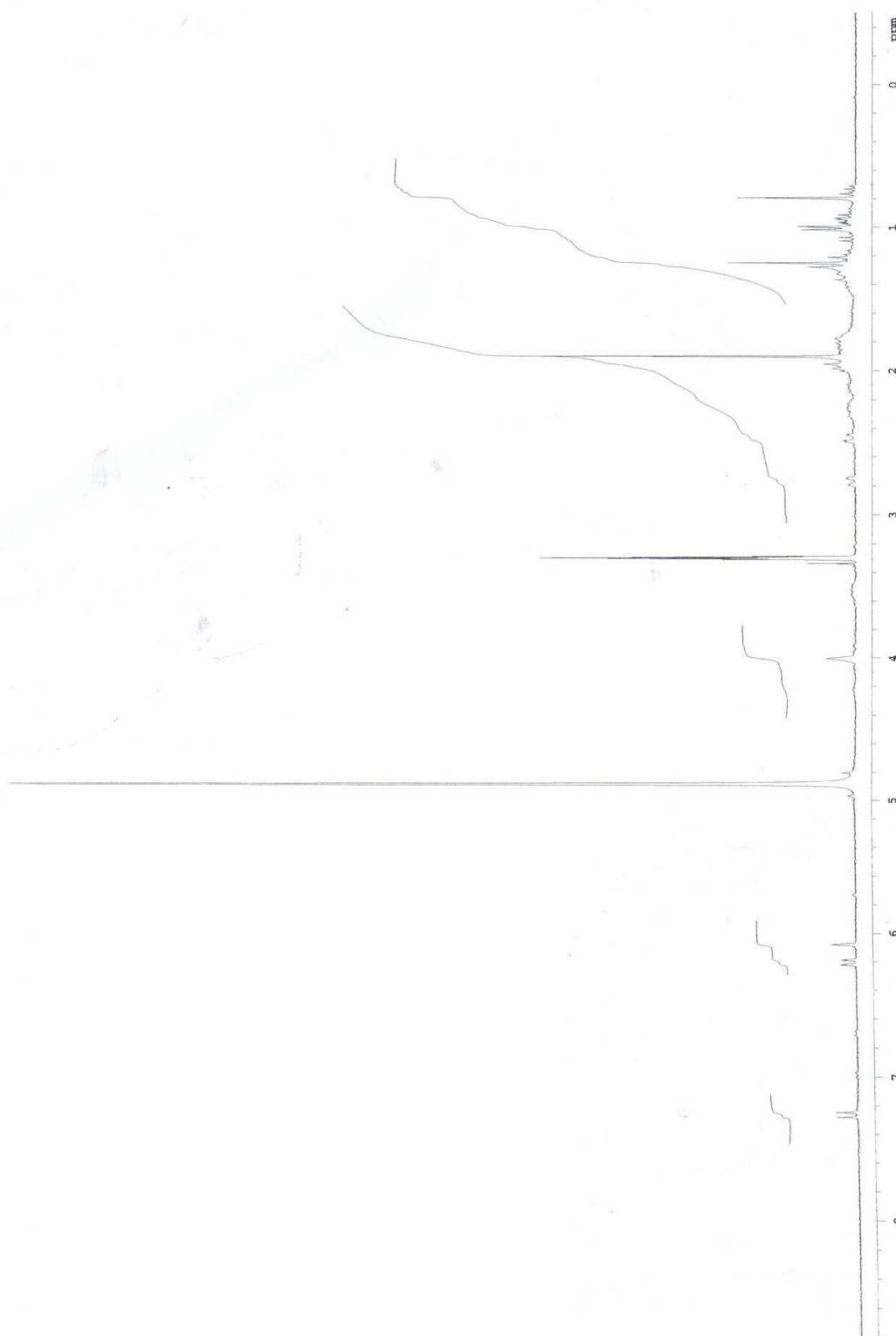
## REFERENCES

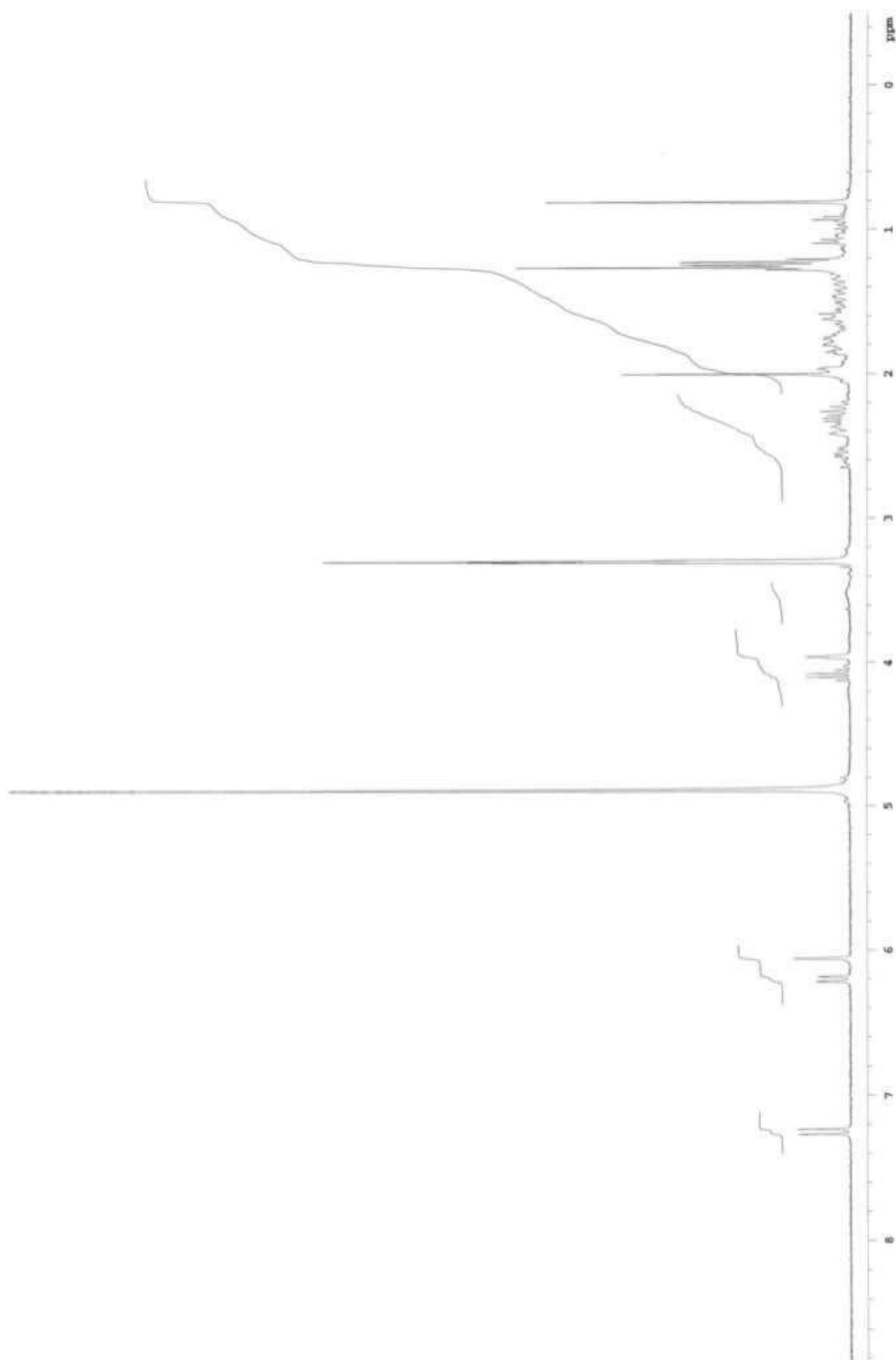
- [1] D. Kritchevsky, in 'Chemistry of Bile Acids. The Bile Acids – Chemistry, Physiology and Metabolism', Eds. P. P. Nair and D. Kritchevsky, Plenum Press, New York-London, 1971, Vol. 1, Chapt. 1, p. 1.
- [2] L. F. Fieser, S. Rajagopalan, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 5530.
- [3] A. F. Hofmann, *Acta Chem. Scand.* **1963**, *14*, 17.
- [4] O. Bortolini, A. Medici, S. Poli, *Steroids* **1997**, *62*, 564.
- [5] G. Fantin, S. Ferrarini, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 1937.
- [6] A. Medici, P. Pedrini, E. Bianchini, G. Fantin, A. Guerrini, B. Natalini, R. Pellicciari, *Steroids* **2002**, *67*, 51.
- [7] M. Dean, C. Cervellati, E. Casanova, M. Squerzanti, V. Lanzara, A. Medici, P. Polverino De Laureto, C. M. Bergamini, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3126.
- [8] P. Pedrini, E. Andreotti, M. Dean, G. Fantin, P. P. Giovannini, A. Guerrini, *Steroids* **2006**, *71*, 189.
- [9] P. P. Giovannini, A. Grandini, D. Perrone, P. Pedrini, G. Fantin, M. Fogagnolo, *Steroids* **2008**, *73*, 1385.
- [10] T. Eggert, D. Bakonyi, W. Hummel, *J. Biotech.* **2014**, *191*, 11.
- [11] S. Hayakawa, *Z. Allg. Mikrobiol.* **1982**, *22*, 309.
- [12] B. Philipp, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 903.
- [13] Y. Hu, R. van der Geize, G. S. Besra, S. S. Gurcha, A. Liu, M. Rohde, M. Singh, A. Coates, *Mol. Microbiol.* **2010**, *75*, 107.
- [14] J. K. Capyk, I. D'Angelo, N. C. Strynadka, L. D. Eltis, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9937.
- [15] M. Petrusma, L. Dijkhuizen, R. van der Geize, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 5300.
- [16] R. J. Park, *Steroids* **1984**, *44*, 175.
- [17] S. Costa, P. P. Giovannini, G. Fantin, A. Medici, P. Pedrini, *Helv. Chim. Acta* **2013**, *96*, 1062.
- [18] K. Schneider, E. Graf, E. Iran, G. Nicholson, F. M. Stainsby, M. Goodfellow, S. A. Borden, S. Keller, R. D. Süßmuth, H.-P. Fiedler, *J. Antibiot.* **2008**, *61*, 356.
- [19] F. M. Stainsby, J. Soddell, R. Seviour, J. Upton, M. Goodfellow, *Water Sci. Technol.* **2002**, *46*, 81.
- [20] L. Simmons, K. Kaufmann, R. Garcia, G. Schwär, V. Huch, R. Müller, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6570.
- [21] K. Kaufmann, L. Simmons, J. Herrmann, G. Schwär, N. Luniak, R. Müller, *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35*, 11.
- [22] S. Costa, P. P. Giovannini, G. Fantin, A. Medici, P. Pedrini, *Helv. Chim. Acta* **2013**, *96*, 2124.
- [23] ICE (*Industria Chimica Emiliana*) extracts, and purifies bile acids from raw materials (ox and pig bile), <http://www.iccitaly.com/>.
- [24] U. Edwards, T. Rogall, H. Blocker, M. Emde, E. C. Böttger, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 7843.
- [25] A. M. Rodas, S. Ferrer, I. Pardo, *Syst. Appl. Microbiol.* **2003**, *26*, 412.
- [26] O. S. Kim, Y. J. Cho, K. Lee, S. H. Yoon, M. Kim, H. Na, S. C. Park, Y. S. Jeon, J. H. Lee, H. Yi, S. Won, J. Chun, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2012**, *62*, 716.
- [27] S. Barnes, D. N. Kirk, in 'Methods and Applications. The Bile Acids – Chemistry, Physiology and Metabolism', Eds. P. P. Nair and D. Kritchevsky, Plenum Press, New York-London, 1988, Vol. 4, Chapt. 3.
- [28] E. Mukhrjee, S. Banerjee, S. B. Mahato, *Steroids* **1993**, *58*, 484.
- [29] K. Tamaki, *J. Biochem.* **1958**, *45*, 693.
- [30] R. A. Leppik, *Steroids* **1983**, *41*, 475.
- [31] R. W. Owen, R. F. Bilton, *J. Steroid Biochem.* **1983**, *19*, 1355.

Received September 18, 2015

Accepted January 25, 2016

## ALLEGATO B

Acido 3-cheto-7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diidrossi-col-1,4-dien-24-oico (bendigolo F; **5a**)

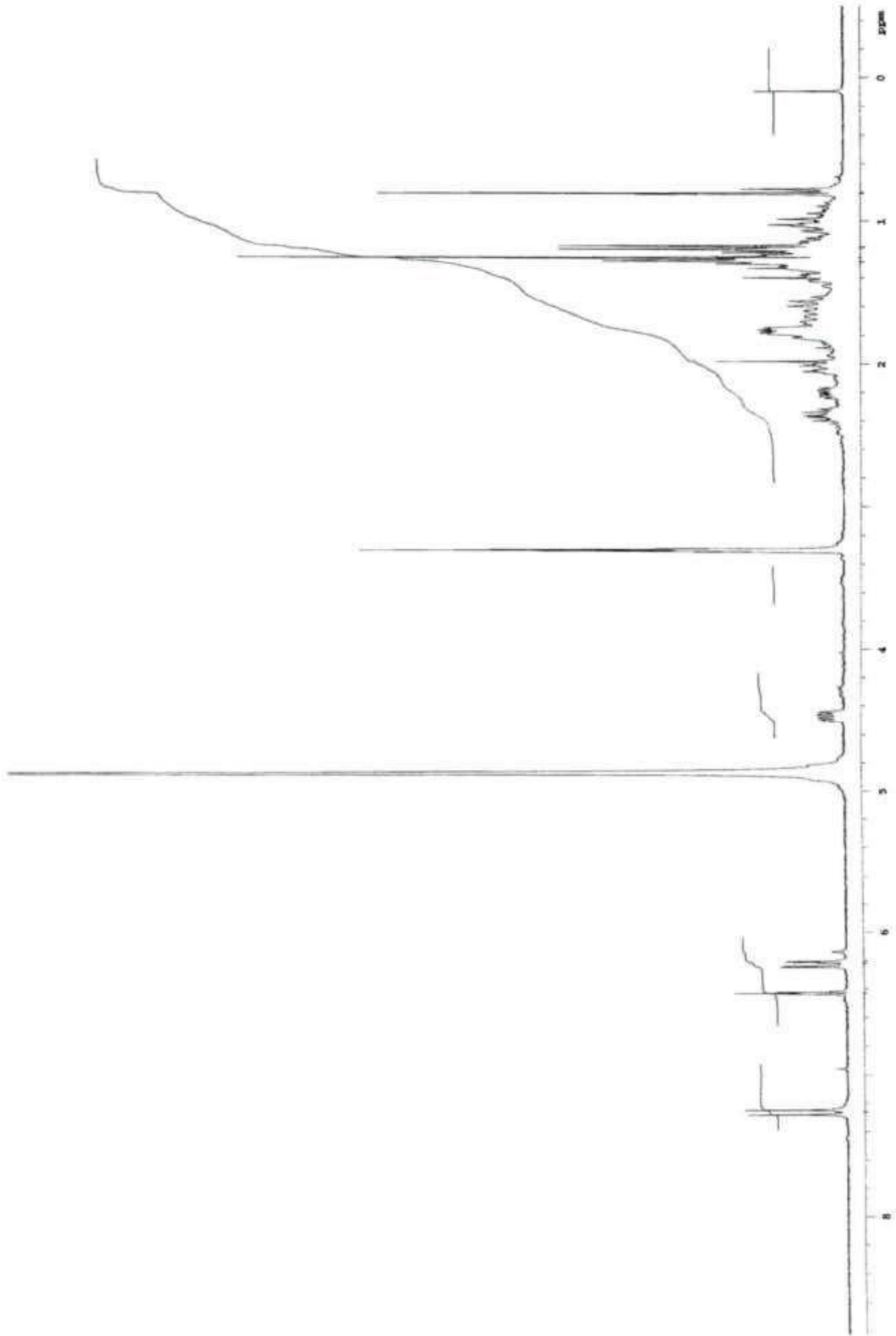


Acido 3-cheto-12 $\alpha$ -idrossi-23,24-dinorcol-1,4-dien-22-oico (bendigolo A; **8b**)



Acido 3-cheto-6 $\alpha$ -idrossi-1,4-dien-24-oico (bendigolo G; 5c)

)



Acido 3-cheto-6 $\alpha$ -idrossi-pregna-1,4-diene-22-oico (bendigolo H; **8c**)

## ***CAPITOLO 5***

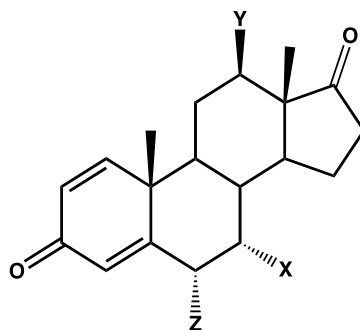
---

### **Conclusioni**

Il progetto di questo lavoro di tesi, finanziato dalla ditta ICE srl di Reggio Emilia, azienda leader nella produzione di acido ursodesossicolico (UDCA), aveva come scopo principale la valorizzazione degli acidi biliari di “scarto” nella lavorazione della bile bovina e suina che forniscono come acido colico e acido chenodeossicolico come basi di partenza per la sintesi. Gli obiettivi erano la C-7 idrossilazione (acido desossicolico) e C-6 ossidazione (acido iodesossicolico) per utilizzare questi acidi nella sintesi di UDCA o la biotrasformazione di queste molecole in prodotti biologicamente attivi o utilizzabili come base di partenza per la sintesi di steroidi della serie 5 $\alpha$ .

I campionamenti fatti in Italia e in Ecuador hanno permesso di isolare in totale 147 ceppi di attinomiceti che sono stati oggetto di screening. I primi due obiettivi (C7-idrossilazione e C6-ossidazione) sono stati disattesi in quanto nessun ceppo ha dato le reazioni sperate, mentre per quanto riguarda in generale la valorizzazione di questi acidi biliari si sono ottenuti risultati interessanti.

Dall'isolamento presso la ditta ICE è stato identificato un ceppo appartenente al genere *Pseudomonas* specie *alcaliphila*, che ha dato con acido desossicolico, colico, chenodesossicolico e iodesossicolico in rese molto interessanti i corrispondenti idrossiandrosteradiene-dicheto derivati **2a-d**.



2a-d

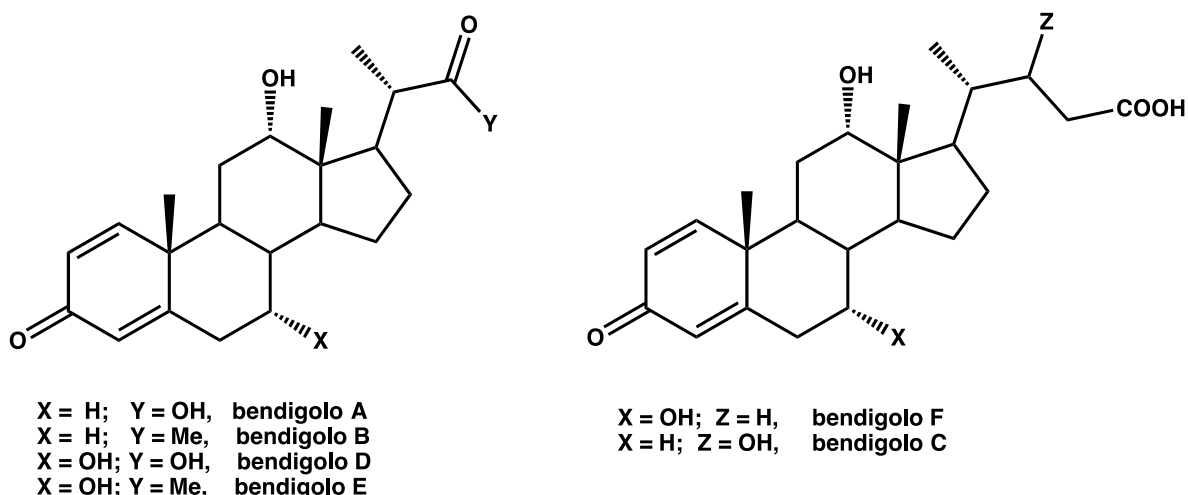
- |                      |                              |
|----------------------|------------------------------|
| a) Y = OH, X = Z = H | 12 $\beta$ -HADD             |
| b) X = Y = OH, Z = H | 7 $\alpha$ ,12 $\beta$ -HADD |
| c) X = OH, Y = Z = H | 7 $\alpha$ -HADD             |
| d) Z = OH, X = Y = H | 6 $\alpha$ -HADD             |

Tali composti sono analoghi del boldenone che ha blande caratteristiche androgene ma accentuate caratteristiche anabolizzanti e permette di migliorare i processi anabolici come la crescita e lo sviluppo della massa muscolare, senza effetti collaterali indesiderati

Tali risultati sono stati oggetto di pubblicazione [S. Costa, I. Rugiero, E. Tamburini, A. Medici, G. Fantin, P. Pedrini, *Org. Chem: Curr. Res.* **4** (4), 155-159 (2015)].

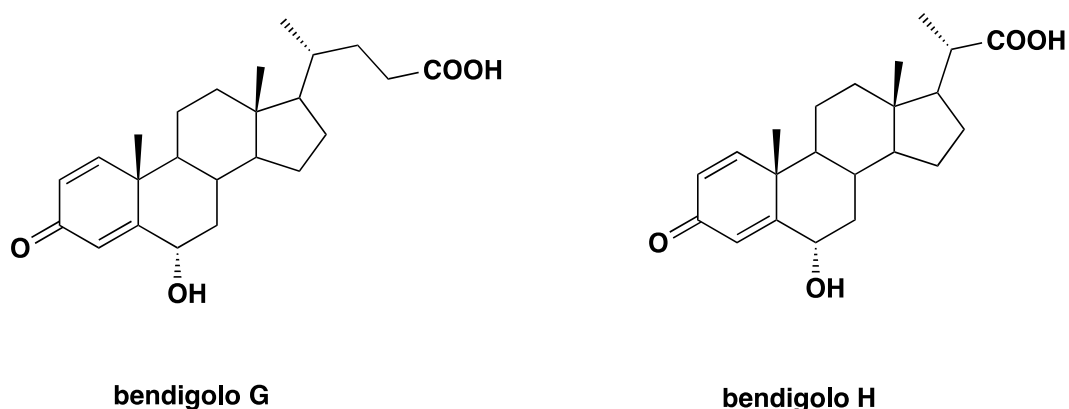


Oltre a questo dai vari isolamenti fatti in Ecuador si sono ottenuti ceppi in grado di degradare parzialmente gli acidi biliari presi in esame. Abbiamo focalizzato l'attenzione su 5 ceppi isolati presso il macello di Cayambe (oggetto di screening di una precedente tesi di dottorato) in grado di fornire prodotti chiamati bendigoli perché isolati come metaboliti secondari da *Gordonia australis* presente nella schiuma di fanghi attivi nel paese di Bendigo (Victoria, Australia).



I bendigoli A-C, mostrato affinità di legame al recettore degli androgeni.

Nel nostro lavoro insieme ad altri prodotti dalle biotrasformazioni con acido colico, acido deossicolico si sono ottenuti rispettivamente il bendigolo A e il bendigolo F. Dalle biotrasformazioni con acido iodesossicolico si sono ottenuti due nuovi bendigoli che noi abbiamo etichettato come bendigolo G e bendigolo H.



Anche questo lavoro è stato oggetto di pubblicazione.

[S. Costa, M. E. Maldonado, I. Rugiero, M. De Bastiani, A. Medici, E. Tamburini, P. Pedrini. *Chemistry & Biodiversity* **13**, 969-975 (2016).]

In appendice viene riportato l'inizio di un lavoro, proseguimento di questa tesi, che ha come scopo l'isolamento e la purificazione degli enzimi responsabili della C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> e C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> deidrogenazione.

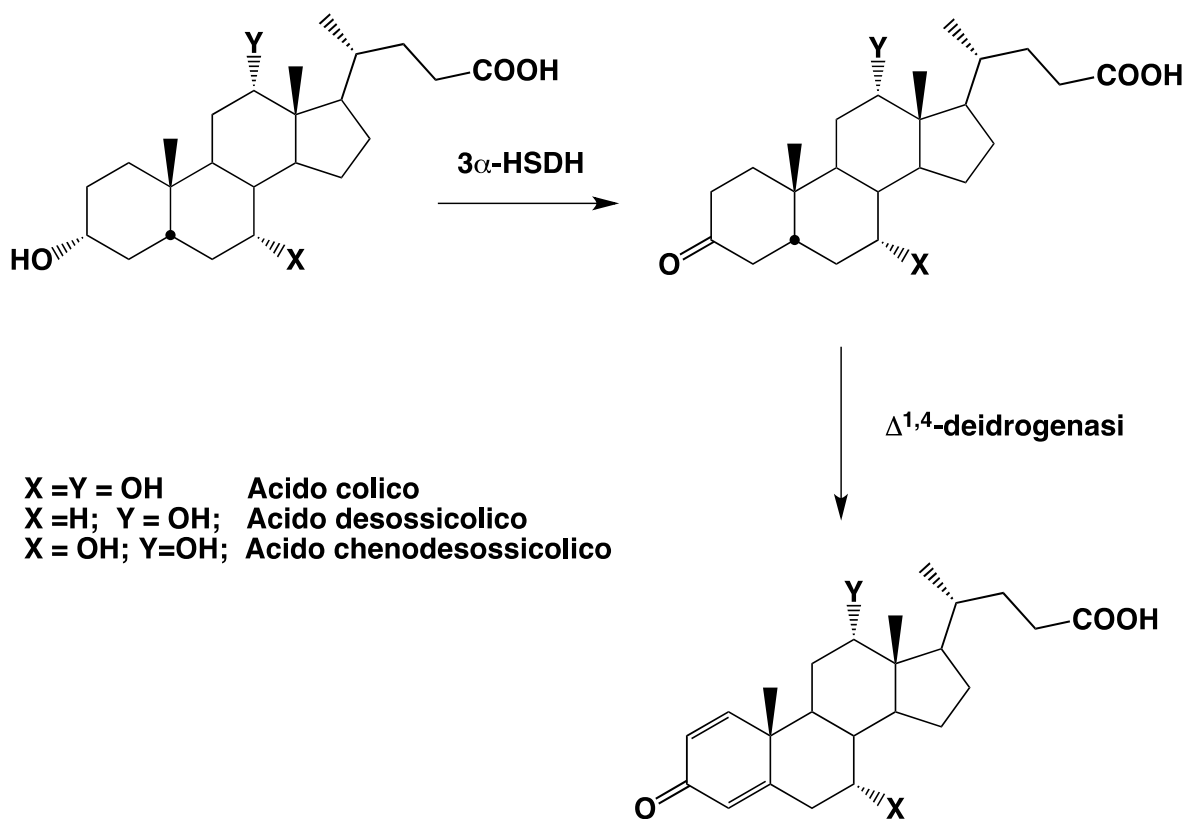
***CAPITOLO 6***

---

**Appendice**

Nell'ultimo periodo del Dottorato mi sono occupata della possibilità di isolare e purificare gli enzimi responsabili delle reazioni chiave nella parziale aromatizzazione dell'anello A che sono la C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> e C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> deidrogenazione.

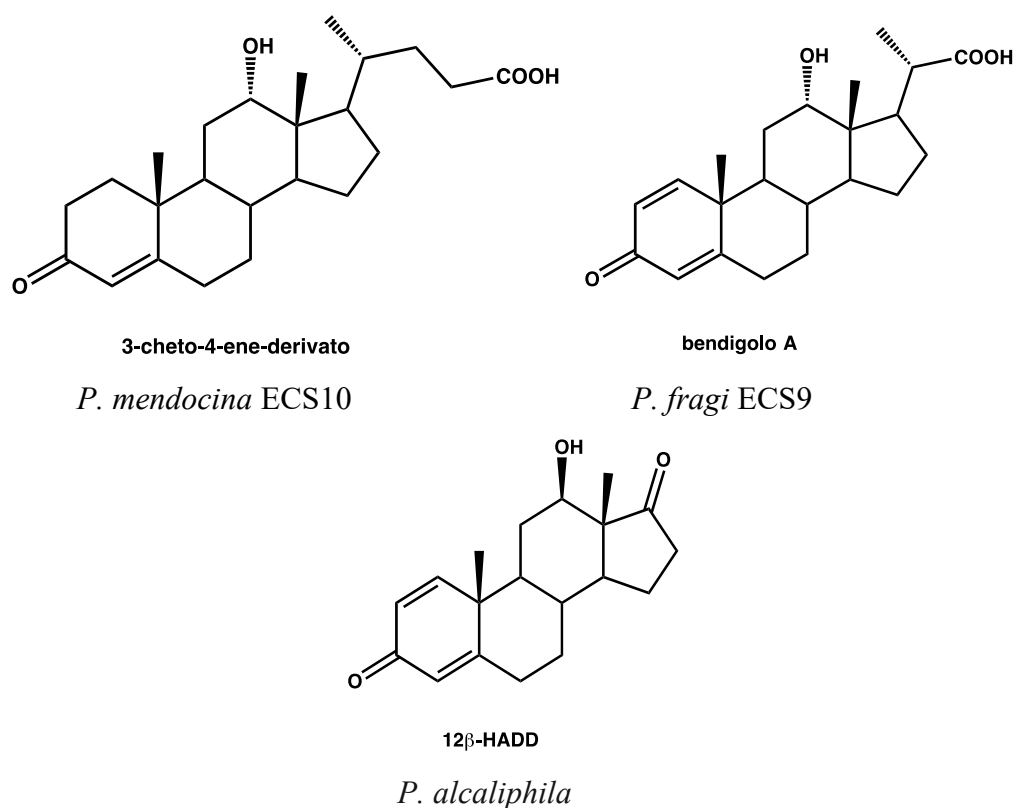
In letteratura è riportato che tali reazioni sono il primo importante passo verso la sintesi di ormoni steroidei [71]. Diverse 3-chetosteroidi-deidrogenasi (KSDH) sono note promuovere queste reazioni, quali: la 3-chetosteroidi- $\Delta^1$ -deidrogenasi ( $\Delta^1$ -KSDH), 3-chetosteroidi- $\Delta^4$ -(5 $\alpha$ )-deidrogenasi ( $\Delta^4$ -(5 $\alpha$ )-KSDH), e 3-chetosteroidi  $\Delta^4$ -(5 $\beta$ )-deidrogenasi ( $\Delta^4$ -(5 $\beta$ )-KSDH), tutti enzimi FAD-dipendenti. Le  $\Delta^1$ -KSDH catalizzano la deidrogenazione del legame C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> mentre le  $\Delta^4$ -KSDH del legame C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>. [48]. L'ossidazione dell'ossidril in posizione C-3 è considerato il passaggio fondamentale per permettere poi le successive deidrogenazioni dei legami C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> (Schema 1). Gli studi sulle reazioni di ossidazione dell'anello A degli steroidi sono state effettuate utilizzando il testosterone come substrato ma vi sono evidenze in letteratura che dimostrano che tale attività viene riscontrata anche sugli acidi biliari.



**Schema 1**

È stato dimostrato che le KSDH sono associate a particelle di membrana, con due lunghi tratti idrofobici che formano due domini transmembrana. La sovra-espressione delle proteine di membrana rappresenta un importante problema nello studio della struttura e delle funzioni di queste proteine. [72]. Questi enzimi sono presenti in diversi batteri. Studi sull'isolamento e caratterizzazione in termini molecolari e capacità catalitiche sono stati effettuati con enzimi isolati da *Rhodococcus rhodochrous*, i geni responsabili della codificazione proteica sono stati clonati e sequenziati. Il gene delle KSDH ( $\Delta^1$ -deidrogenasi) formato da 1.536 nucleotidi che codificano per l'enzima proteico costituito da 511 residui amminoacidici è stato clonato in *E. coli*. [73]. In questa appendice verranno illustrate le preliminari prove per la determinazione della localizzazione enzimatica delle KSDH presenti nei ceppi che hanno dato prodotti deidrogenati in posizione C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> e C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>.

I ceppi presi in considerazione sono *Pseudomonas mendocina* ECS10 che ha dato il 3-cheto-4-ene-derivato con rese del 95%, *Pseudomonas fragi* ECS9 che ha prodotto il bendigolo A con rese dell'80% e *Pseudomonas alcaliphila* che ha fornito 12 $\beta$ -idrossi androsta-diene derivato (12 $\beta$ -HADD) con rese del 95%, (Figura 1).



**Figura 1**

Il primo approccio è definire dove si trovi l'enzima all'interno della cellula o se venga secreto all'esterno. Sulla base di questo verrà impostata la strategia di purificazione. Per questo motivo nell'ultimo mese di Dottorato, mi sono occupata di individuare dove siano gli enzimi responsabili della deidrogenazione dell'anello A. Sono state allestite una serie di prove in parallelo che hanno riguardato i tre ceppi sopra indicati. La procedura utilizzata è simile a quella della biotrasformazione su scala preparativa e prevede l'inoculo dei batteri in 200 ml di terreno liquido ATT. Le colture vengono tenute in agitazione a temperatura controllata (28° C) per 6 giorni, vengono effettuati prelievi giornalieri, che vengono centrifugati con recupero del pellet e del brodo di coltura. Il pellet viene risospeso in tampone fosfato 0.1M e successivamente lisato meccanicamente (French Press). Viene aggiunto l'inibitore di proteasi (2 ml) e il lisato viene centrifugato. Da questo si recupera sia il pellet che il surnatante. Le prove vengono fatte su tre matrici (brodo, pellet e surnatante) che rappresentano le possibili localizzazioni enzimatiche.

Le tre matrici così ottenute vengono suddivise in due aliquote alle quali viene addizionato l'acido desossicolico come sale sodico sciolto in acqua in concentrazione di 1 g/L. Ad una di queste, vengono aggiunti i cofattori FAD<sup>+</sup> (Flavina Adenina Dinucleotide) e NAD<sup>+</sup> (Nicotinammide Adenina Dinucleotide) in concentrazione equimolare rispetto all'acido desossicolico. Il NAD<sup>+</sup> viene aggiunto in quanto la 3 $\alpha$ -HSDH è NAD<sup>+</sup> dipendente. Nell'altra aliquota non vengono aggiunti i cofattori.

L'incubazione continua nelle stesse condizioni e le biotrasformazioni vengono monitorate per TLC (Tabella 1).

**Tabella 1.** Biotrasformazioni di **1a** con brodo, pellet e surnatante

Ceppo	Tempo (h)	Formazione prodotto					
		Bc <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>	Pc <sup>c</sup>	P <sup>d</sup>	Sc <sup>e</sup>	S <sup>f</sup>
<i>P. alcaliphila</i>	96	SI	SI	NO	NO	NO	NO
<i>P. mendocina</i> ECS10	48	SI	SI	NO	NO	NO	NO
<i>P. fragi</i> ECS9	48	SI	NO	NO	NO	NO	NO

<sup>a</sup> Bc = brodo con cofattore; <sup>b</sup> B = brodo senza cofattore; <sup>c</sup> Pc = pellet con cofattore; <sup>d</sup> P = pellet senza cofattore; <sup>e</sup> Sc = surnatante con cofattore; <sup>f</sup> S = surnatante senza cofattore;

Da questi primi risultati, si evince che gli enzimi responsabili dell'ossidazione della posizione C-3 e della deidrogenazione delle posizioni C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> e C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> sono secreti nel brodo

di coltura e sono espressi in tempi diversi. L'interesse per questi enzimi deriva dal fatto che le reazioni da loro catalizzate permettono di ottenere precursori di composti steroidei biologicamente attivi e quindi avere un utilizzo industriale.

## ***CAPITOLO 7***

---

### **Bibliografia**



1. D.U. Silvertorn, Fisiologia. Terza edizione. Casa Editrice Ambrosiana (2007).
2. A.F. Hofmann, B. Borgström. *J. Clin. Invest.* **43**: 247-257 (1964).
3. O. Bortolini, A. Medici, S. Poli. *Steroids* **62**: 564-577 (1997).
4. A.F. Hofmann. *Arch. Intern. Med.* **159**: 2647-2658 (1999).
5. P. Magotti, I. Bauer, M. Igarashi, M. Babagoli, R. Marotta, D. Piomelli, G. Garau. *Structure* **23**: 598-604 (2015).
6. J. E. Hall. Textbook of Medical Physiology. 12th edition published by Elsevier (2011).
7. S. Bergstrom, H. Danielson, B. Samuelsson, *In Lipid Metabolism*, editore K. Bloch 291-331. (1960).
8. A. F. Hofman, *in Enterohepatic circulation of bile acids. Handbook of Physiology, Section of Gastrointestinal System*, S.G. Schultz, G. J. Forte, Editore: The American Physiological Society (1988).
9. A.F. Hofmann. *Biochem. J.* **89**: 57-68 (1963).
10. A.F. Hofmann, L.R. Hagey, M.D. Krasowski. *J. Lipid Res.* **51**: 226-246 (2010).
11. P.Gérard, *Pathogens* **3**: 14-24 (2014).
12. A. Roda, E. Roda, A.F. Hofmann. Acidi biliari 2000. Aggiornamento per il futuro. Il pensiero scientifico. Masson, Milano Italia (1999).
13. L.F. Fieser, S. Rajagopalan. *J. Am. Chem. Soc.* **72**: 5530-5536 (1950).
14. A.F. Hofmann. *Acta. Chem. Scand.* **14**: 17-20 (1963).
15. S. Donadio, G. Marino. Biotecnologie microbiche. Casa editrice Ambrosiana (2012)
16. K. Faber. Biotrasformation in Organic chemistry (2011).
17. K. Castroem, D.N. Kirk, J. Sjoevall. *J. Lipid Res.* **22**: 1225-1234 (1981).
18. V.V. Kollerov, D. Monti, N.O. Deshcherevskaya, T.G. Lobastova, E. Ferrandi, A. Larovere, S.A. Gulevskaya, S. Riva, M.V. Donova. *Steroids* **78**: 370-378 (2013).
19. Yacult Honsha Co Ltd (Japan). *JP Patent* 82-37116 (1982).
20. Nisshin Shokuhin Co Ltd (Japan). *JP Patent* 84-75505(1984).
21. Toyo Rubber Industry Co Ltd (Japan). *JP Patent* 85-179810(1985).
22. M. Petrusma, G. Hessels, L. Dijkhuizen, R. Van Der Geize. *J. Bacteriol.* **193**:3931–3940 (2011).
23. S. Hayakawa. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* **22**: 309-326 (1982).
24. B. Philipp. *Appl. Microbiol. Biotech.* **89**: 903-915 (2011).

25. M.E. Tennesson, J.D. Baty, R.F. Bilton, A.F. Mason. *Biochem. J.* **184**: 613-618 (1979).
26. T. Hosseinadabadi, H. Vahidi, B. Nickavar, F. Kobarfard. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **22**:71 (2014)
27. K Verheyden, H. Noppe, H. Zorn, F. Van Immerseel, J.V. Bussche, K.Wille, K. Bekaert, C. Janssen, H. De Brabander, L. Vanhaecke. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **119**:161–170, (2010).
28. K. Drauz, H. Waldmann, Editore VCH, in *Enzyme Catalysis in Organic Syntesis, Weinheim*, Vol 1, 2 (1995).
29. C.H. Wong, G.M. Whitesides. *Tetrahedron Organic Chemistry Series, Pergamon* **12**: 159 (1994).
30. G. Fantin, S. Ferrarini, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli. *Tetrahedron* **54**: 1937 (1998).
31. E. Bianchini, N. Chinaglia, M. Dean, P.P. Giovannini, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli. *Tetrahedron* **55**: 1391-1398 (1999).
32. R. Edenharder, K.Mielek. *System. Appl. Microbiol.* **5**: 287-298 (1984).
33. S. Hirano, N. Masnuda., H. Oda, T. Imamura. *Microbiol. Immunol.* **25**: 271-282 (1981).
34. S. Hirano, N. Masnuda, H. Oda *J. Lipid Res.* **22**: 735-743 (1981).
35. R. Edenharder, S. Stubenrauch, J. Slemrova. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I Abt. Orig. Reihne B* **162**: 506-518 (1976).
36. J.D. Sutherland, C.N. Williams, D.M. Hutchinson, L.V. Holdeman. *Can. J. Microbiol.* **33**: 663-669 (1987).
37. E. Mukherjee, S. Banerjee, S.B. Mahato. *J. Chem. Res. (Synop)* 416-417 (1993).
38. Kurakay Co Ltd (Japan). *JP Patent* 81-24585(1981).
39. Kurakay Co Ltd (Japan). *JP Patent* 81-24586(1981).
40. P.P. Giovannini, A. Grandini, D. Perrone, P. Pedrini, G. Fantin, M. Fogagnolo. *Steroids* **73**: 1385-1390 (2008).
41. M.D. Donova. *Appliede Biochemistry and Microbiology* **43**: 1-14(2017).
42. A. Nobile, W. Charney, D. Perlman, H. Herzog, C. Payne, M. Tully, M. Jevnik, E. Hershberg. *J. Am. Chem. Soc.* **77**:1484–1488 (1955).
43. D.Y. Ryu, B.K. Lee, R.W. Thoma, A.E. Humphrey. *Chem. Eng. Progr. Symp.* **67**: 80–83 (1971).

44. C. Florin, T. Kohler, M. Grandguillot, P. Plesiat. *J. Bacteriol.* **178**: 3322-3330 (1996).
45. S. Morii, C. Fujii, T. Miyoshi, M. Iwami, E. Itagaki. *J. Biochem.* **124**: 1026-1032 (1998).
46. Y.J. Abul-Hajj. *J. Biol. Chem* **247**: 686-691 (1972).
47. E. Itagaki, T. Wakabayashi, T. Hatta. *Biochimica et Biophysica Acta* **1038**: 60-76 (1990).
48. R.Y. Stainer, J.L. Ingraham, M.L. Wheelis, P.R. Painter. *Il mondo dei microrganismi* (seconda edizione), Editore Zanichelli 482-496 (1988)
49. [www.inventors.com/rd/results/rdq\\_history\\_of\\_microscope/](http://www.inventors.com/rd/results/rdq_history_of_microscope/) and [www.cas.muohio.edu/~mbi-ws/microscopes/history.html/search4it.html](http://www.cas.muohio.edu/~mbi-ws/microscopes/history.html/search4it.html).
50. M. Dean, C. Cervellati, E. Casanova, M. Squerzanti, V. Lanzara, A. Medici, P. Polverino de Laureto, C.M. Bergamini. *Aplp. Environ. Microbiol.* **68**: 3126-3128 (2002).
51. S. Costa, P.P. Giovannini, G. Fantin, A. Medici, P. Pedrini. *Helvetica Chimica Acta* **96**: 2124-2132 (2013).
52. R.F. Bilton, A.N. Mason, M.E. Tennenson. *Tetraedron* **37**: 2509-2513 (1981).
53. J. C. Knight, M. C. Novcha. *Steroids* **46**: 789-796 (1985).
54. K. Schneider, E. Graf, E. Irran, G.Nicholson, F.M. Stainsby, M. Goodfellow, S.A. Borden, S. Kelller, R.D. Süssmut, H.P. Fiedler. *J. Antibiot.* **61**: 356 (2008).
55. S. Costa, P.P. Giovannini, G. Fantin, A. Medici, P. Pedrini. *Helvetica Chimica Acta* **96**: 1062-1071 (2013).
56. S. Costa, I. Rugiero, E. Tamburini, A. Medici, G. Fantin, P. Pedrini. *Org. Chem: Curr. Res.* **4**: 155 (2015).
57. A. Birkenmaier, J. Holert, H. Erdbrink, H.M. Möller, A. Friemel, R. Schoenenberger, M.J. Suter, J. Klebensberger, B. Philipp. *J Bacteriol* **189**: 7165-7173 (2007).
58. R.J. Park. *Steroids* **44**: 175-193(1984).
59. C.K. Yam, I. D'Angelo, R. Kalscheuer, H. Zhu, J.X. Wang, V. Snieckus, L.H. Ly, P.J. Converse, Jr R.W. Jacobs, N. Strynadka, D.L. Eltis. *PLoS Pathogens* **5**: e1000344 (2009).

60. N.A. Lack, K.C. Yam, E.D. Lowe, G.P. Horsman, R.L. Owen, E. Sim, L.D. Eltis. *J Biol Chem* **285**: 434-443. (2010).
61. M. Hourinouchi, T. Hayashi, T. Kudo. *J Steroid Biochem & Mol Biol* **129**: 4-14 (2012)
62. P.J. Barnes, J.D. Baty, R.F. Bilton, A.N. Mason. *Tetrahedron* **32**: 89-93 (1976).
63. J.A. Ide, R.J. Park, N.W. Dunn. *Biotech Lett* **8**: 763-768 (1986).
64. J. Holert, Z. Kulic, O. Yücel, V. Suvekbala, M.J.F. Suter, H.M. Möller, B. Philipp. *J Bacteriol* **195**: 585-595 (2013).
65. M.G. Smith, R.J. Park. *Appl Environ Microbiol* **48**: 108-113 (1984).
66. M.E. Maldonado Rodriguez. *Biotrasformazioni di Acidi Biliari* (2012).
67. F.M. Stainsby, J. Soddell, R. Seviour, J. Upton, M. Goodfellow. *Water Sci. Technol.* **46**: 81 (2002).
68. L. Simmons, K. Kaufmann, R. Garcia, G. Schwär, V. Huch, R. Müller. *Bioorg. & Med. Chem.* **19**: 6570 (2011).
69. K. Kaufmann, L. Simmons, J. Herrmann, G. Schwär, N. Luniak, R. Müller. *Biotechnol. Lett.* **35**: 11 (2013).
70. S. Costa, M.E. Maldonado Rodriguez, I. Rugiero, M. De Bastiani, A. Medici, E. Tamburini, P. Pedrini. *Che. Biodiversity.* **13**: 969-975 (2016).
71. C. Miao-Miao, W. Feng-Qing, L. Liang-Cai, Y. Kang, W. Dong-Zhi. *Applied Microbiology and Biotechnology* **96**: 133-142 (2012).
72. E.D. David, V.H. Gunnar, P. Nordlund, L.G. Jan-Willem. *FEBS Letters* **507**: 220-224 (2001).
73. M. Shingo, F. Chifumi, M. Toshio, I. Masafumi, I. Eiji. *J. Biochem.* **124**: 1026-1032 (1998).

## ***RINGRAZIAMENTI***

---

Inizio con esprimere gratitudine al *Prof. Alessandro Medici* come mio tutore,

un immenso grazie alla *Prof.ssa Paola Pedrini*, per tutto quello che ha fatto per me in questi anni di Dottorato e non, per la pazienza che ha avuto in questo ultimo periodo e per avermi supportato nella stesura di questa tesi,

alla mia cara collega e amica *Dott.ssa Stefania Costa*, per avermi aiutata nelle difficoltà scientifiche e personali,

all'azienda ICE s.r.l. per aver finanziato questo progetto,

al *Dott. Giancarlo Fantin*, al *Dott. Pier Polo Giovannini* e alla *Dott.ssa Tatiana Bernardi* per aver messo a disposizione la loro esperienza,

ai miei compagni di viaggio *Dario Cristofaro* e *Federica Tosi* e *David Landivar Valverde* per aver condiviso le ansie e le speranze di questi ultimi anni,

alle mie amiche *Valentina Donegà* e *Federica Fruscella*, che mi hanno sempre sostenuta,

naturalmente, alla mia numerosa famiglia *mamma, papà, Francesca, Antonio, Simona, Riccardo* per avermi spronato anche quando gli ostacoli mi sembravano insuperabili,

infine, a mio marito *Giovanni* il quale ha condiviso con me le ansie, le paure, le preoccupazioni ed è riuscito con le sue parole a tranquillizzarmi e a farmi vedere le cose da un'altra prospettiva.