
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

IDA GALIMBERTI, BIANCA MARIA RANZI, FIAMMA
RONCHETTI

Sulla degradazione microbica della catena laterale del β -sitosterolo

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 64 (1978), n.2, p. 236–238.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1978_8_64_2_236_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biochimica. — *Sulla degradazione microbica della catena laterale del β -sitosterolo.* Nota di IDA GALIMBERTI, BIANCA MARIA RANZI e FIAMMA RONCHETTI (*), presentata (**) dal Corrisp. E. MARRÈ.

SUMMARY. — Microbial degradation of the side chain of $[25,26-^3\text{H}_2]$ - β -sitosterol by *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 affords mainly labelled acetic acid; this seems to indicate that the cleavage of the side chain occurs with a mechanism different from that proposed for cholesterol.

I fitosteroli, tipici steroli delle piante, sono caratterizzati dalla presenza di un gruppo alchilico in posizione 24, il quale ha origine, attraverso una reazione di doppia transmetilazione ad opera della S-adenosilmetionina, da un precursore sterolico che abbia un doppio legame fra le posizioni 24 e 25 [1].

Per lo studio dell'andamento stereochimico di questo processo era necessario poter disporre di una reazione che avvenisse con altissima stereospecificità su uno solo dei due metili del gruppo isopropilico terminale della catena laterale dei fitosteroli. Una reazione di tal genere è ad esempio quella che durante la trasformazione del colesterolo in acidi biliari ad opera della frazione mitocondriale degli omogenati di fegato di ratto, ossida stereospecificamente a carbossile il metile *pro* S del gruppo isopropilico, che viene poi staccato sotto forma di acido propionico [2].

Questo tipo di reazione sembra essere operante in alcune specie di microorganismi, *Nocardia* [3, 4, 5, 6, 7] o *Mycobacterium* [8, 9], che attaccano sia la catena laterale dei fitosteroli che quella del colesterolo, trasformando questi steroli in derivati androstanici o pregnanici. Nel caso del colesterolo la formazione di acido propionico dal gruppo isopropilico terminale è stata riscontrata sperimentalmente [3, 6].

Il meccanismo di questa degradazione non è stato ancora studiato nel dettaglio, ma è ragionevole supporre, in analogia a quanto avviene per la stessa trasformazione ad opera degli omogenati di fegato di ratto [2], che l'acido propionico derivi da una ossidazione stereospecifica su uno solo dei due metili del gruppo isopropilico.

Non sono viceversa noti studi sul meccanismo della degradazione microbica della catena laterale dei fitosteroli: abbiamo quindi intrapreso uno studio preliminare di tale degradazione, sottoponendo un tipico fitosterolo, il β -sitosterolo (I), marcato sul gruppo isopropile, all'azione del *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683.

(*) Istituto di Chimica Organica della Facoltà di Scienze dell'Università Statale di Milano. Centro di Studio per le Sostanze Organiche Naturali del CNR. Via Saldini, 50 - 20133 Milano.

(**) Nella seduta dell'11 febbraio 1978.

[25, 26-³H₂]-β-SITOSTEROLO

Il β-sitosterolo marcato sul gruppo isopropile è stato sintetizzato per tritiazione regiospecifica con catalizzatore di Wilkinson del doppio legame 25,26 del clerosterolo [(24 S)-24-etilcolesta-5,25-dien-3β-olo], un Δ²⁵⁽²⁶⁾ fitosterolo che si estrae dal *Clerodendrum vulgare*.

A 1 mg di benzoilclerosterolo⁽¹⁾, sciolto in 0.5 ml di benzene-etanolo (1:1, v/v) è stato aggiunto 1 mg di catalizzatore di Wilkinson ((Ph₃P)₃RhCl) e la miscela è stata sottoposta a idrogenazione con tritio (attività specifica = 2.59 Ci/ml) per 5 h.

L'idrogenato, dopo aggiunta di 10 mg di benzoil β-sitosterolo non radioattivo, è stato purificato su PTLC/AgNO₃ (eluente esano-benzene 7:3, v/v), ottenendo 9.5 mg di benzoil β-sitosterolo, da cui per saponificazione con KOH metanolica al 5% si sono ottenuti 9 mg di β-sitosterolo puro (attività totale = 40 mCi di ³H) che vengono diluiti a 20 g totali (attività specifica 2 mCi/g).

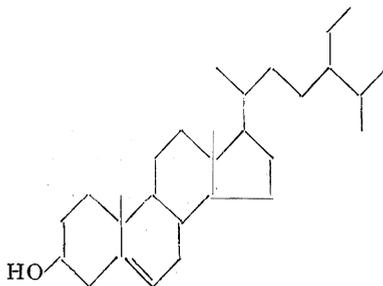


Fig. 1.

CONDIZIONI CULTURALI

Sono stati effettuati diversi esperimenti, riproducibili fra di loro. Si descrive un esperimento tipo.

Alla coltura microbica ottenuta dopo 48 h di incubazione su agitatore alternativo a 37 °C in terreno contenente: brodo nutritivo (8 g), estratto di lievito (1 g), inositolo (1 g), Na₂HPO₄·2 H₂O (2 g), pH 7, si aggiungono β-sitosterolo (1 gr/l) in dimetilformamide e propionato di sodio (0,02%) come trappola metabolica.

La trasformazione è bloccata dopo 36 ore.

RECUPERO DELL'ACIDO PROPIONICO DAL BRODO DI CULTURA

Il brodo di coltura, privato delle cellule mediante centrifugazione, viene acidificato con H₂SO₄ e sottoposto a distillazione in corrente di vapore, previa aggiunta di 10 mg di propionato sodico: si raccolgono 1.5 l di distillato, che vengono titolati al pHmetro con KOH 0.1N fino a pH = 9,6. Dopo evapo-

(1) Si ringraziano i proff. L. G. Goad e W. Sucrow per un campione di clerosterolo.

razione del solvente sotto vuoto i 540 mg di residuo ottenuti vengono ripresi con 45 ml di acetonitrile ed addizionati di 1.3 g di bromuro di *p*-bromofenacile e 28 mg di dicicloesil-18-crown-6 [10].

La miscela di reazione si lascia a ricadere per 1.30 h; dopo evaporazione dell'acetonitrile sotto vuoto, si riprende il residuo con benzene e si filtra su silice-celite, ottenendo 1.2 g di grezzo che viene purificato per cromatografia su SiO₂-celite. Eluendo con esano-benzene (1 : 1, v/v) si ottengono 24 mg di propionato di *p*-bromofenacile e 374 mg di acetato di *p*-bromofenacile.

I due esteri vengono cristallizzati da esano e contati (vedi Tabella).

TABELLA

Durata dell'esperimento	β -sitosterolo somministrato	Propionato sodico aggiunto	β -sitosterolo recuperato	Propionato di <i>p</i> -bromofenacile recuperato	Acetato di <i>p</i> -bromofenacile recuperato
1.5 giorni	450 mgr (1.98×10^9 dpm ³ H)	100 mg	50 mg	24 mg (4.48×10^4 dpm ³ H)	374 mg (1.1×10^6 dpm ³ H)

I dati della Tabella indicano che per degradazione della catena laterale del β -sitosterolo si ottengono piccole quantità di acido propionico, accompagnate da acido acetico, ottenuto con una resa radiochimica circa 20 volte maggiore.

Il risultato ottenuto si può spiegare ammettendo che nel caso del β -sitosterolo la catena laterale venga degradata con un meccanismo diverso rispetto a quello proposto [2] per il colesterolo; alternativamente, si può ipotizzare che in questo caso il gruppo isopropilico terminale venga eliminato come acido propionico, che però subisce una ulteriore, veloce degradazione ad acido acetico.

Ringraziamenti. Si ringrazia il prof. G. Russo per il suo interesse in questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA

- [1] L. J. GOAD e T. W. GOODWIN (1972) - In «Progress in Phytochemistry», Academic press, New York.
- [2] K. A. MITROPOULOS e N. B. MYANT (1965) - «Biochem J.», 97, 26.
- [3] G. LEFEBRE, P. GERMAIN, G. ROVAL e R. GAY (1974) - «Phytochemistry», 13, 2125.
- [4] M. NAGASAWA, M. BAE, G. TAMURA e K. ARIMA (1969) - «Agr. Biol. Chem.», 33, 1644.
- [5] C. J. SIH, K. C. WANG e H. H. TAI (1967) - «J. Am. Chem. Soc.», 89, 1956.
- [6] C. J. SIH, H. H. TAI e Y. Y. TSONG (1967) - «J. Am. Chem. Soc.», 89, 1957.
- [7] C. J. SIH e K. C. WANG (1965) - «J. Am. Chem. Soc.», 87, 1387.
- [8] W. J. MARSHECK, S. KRAYEHY e R. D. MUIR (1972) - «Appl. Microb.», 23, 72.
- [9] A. H. CONNER, M. NAGAOKA, J. W. ROWE e D. PERLMAN (1976) - «Appl. and Envir. Microb.», 32, 310.
- [10] H. DUPON DURST (1974) - «Tetrahedron Lett.», 28, 2421.