



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.³: C 07 J 9/00
C 12 P 33/02
// C 12 R 1/06
C 12 R 1/13

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENT SCHRIFT** A5

⑪

646 442

⑳ Gesuchsnummer: 6289/80

⑦③ Inhaber:
Kuraray Co., Ltd., Kurashiki-shi/Okayama-ken
(JP)

㉒ Anmeldungsdatum: 20.08.1980

③⑩ Priorität(en):
21.08.1979 JP 54-106768
31.08.1979 JP 54-112307
27.09.1979 JP 54-124866
17.06.1980 JP 55-82256
19.06.1980 JP 55-83478

⑦② Erfinder:
Tsuji, Masao, Kurashiki-shi/Okayama-ken (JP)
Ichihara, Yoshihiro, Kurashiki-shi/Okayama-ken
(JP)

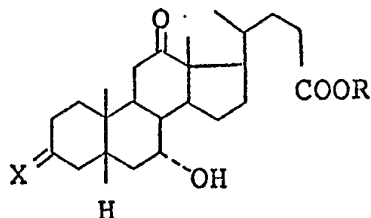
㉔ Patent erteilt: 30.11.1984

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 30.11.1984

⑦④ Vertreter:
A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG,
Patentanwälte, Basel

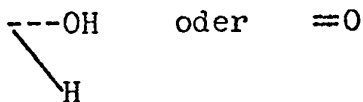
⑤④ **Mikrobielles Verfahren für die Herstellung von Cholansäurederivaten und in einem solchen Verfahren verwendete Mikroorganismen.**

⑤⑦ Das mikrobielle Verfahren für die Herstellung von Cholansäurederivaten der folgenden allgemeinen Formel:



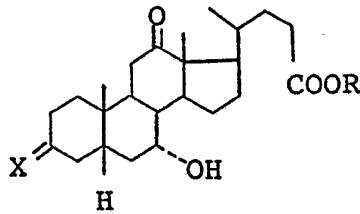
und R das Wasserstoffatom, ein Alkalimetall oder ein Erdalkalimetall bedeuten, besteht in der Züchtung eines Mikroorganismus, welcher in einem Cholsäure oder ein Salz davon als Substrat enthaltenden Medium zu wachsen vermag und aus den Gattungen Arthrobacter, Brevibacterium oder Corynebacterium gewählt ist, in einem ein solches Substrat enthaltenden Kulturmedium, worauf das so erhaltene Cholansäurederivat gesammelt wird.

worin X

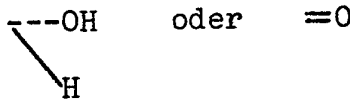


PATENTANSPRÜCHE

1. Mikrobielles Verfahren für die Herstellung von Cholan-säurederivaten der folgenden allgemeinen Formel:



worin X



und R das Wasserstoffatom, ein Alkalimetall oder ein Erdalkalimetall bedeuten, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Mikroorganismus, welcher in einem Cholsäure oder ein Salz davon enthaltenden Medium als Substrat unter Bildung eines oben erwähnten Cholansäurederivates zu wachsen vermag und welcher aus den Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium* oder *Corynebacterium* entnommen ist, in einem ein solches Substrat enthaltenden Kulturmedium züchtet und schliesslich das so erhaltene Derivat sammelt.

2. Mikrobielles Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Mikroorganismus einen solchen vom Stamm *Arthrobacter* CA-35, ATCC Nr. 31651; Stamm *Arthrobacter* CA-35-A589-29-32, ATCC Nr. 31652; Stamm *Arthrobacter* CA-35-A589-47, ATCC Nr. 31653; Stamm *Arthrobacter* CA-35-A849, ATCC Nr. 31654; Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1071-15, ATCC Nr. 31655; Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1448, ATCC Nr. 31656; Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1475, ATCC Nr. 31657; Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1766-15, ATCC Nr. 31658; Stamm *Arthrobacter* CA-35-M-965-3, ATCC Nr. 31659; Stamm *Arthrobacter* CA-35-Y-37-12, ATCC Nr. 31660; Stamm *Brevibacterium* CA-6, ATCC Nr. 31661; oder vom Stamm *Corynebacterium* CA-53, ATCC Nr. 31662, einsetzt.

3. Mikrobielles Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Cholansäurederivat die 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure erzeugt wird.

4. Mikrobielles Verfahren gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als Mikroorganismus einen solchen vom Stamm *Arthrobacter* CA-35-A589-29-32, ATCC Nr. 31652; Stamm *Arthrobacter* CA-35-A589-47, ATCC Nr. 31653; Stamm *Arthrobacter* CA-35-A849, ATCC Nr. 31654; Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1071-15, ATCC Nr. 31655; Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1448, ATCC Nr. 31656; Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1475, ATCC Nr. 31657; Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1766-15, ATCC Nr. 31658; Stamm *Arthrobacter* CA-35-M-965-3, ATCC Nr. 31659; oder vom Stamm *Arthrobacter* CA-35-Y-37-12, ATCC Nr. 31660, verwendet.

5. Mikrobielles Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Cholsäure in einer Konzentration von 1 bis 500 g/l als Substrat verwendet.

6. Mikrobielles Verfahren gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man Cholsäure in einer Konzentration von 5 bis 300 g/l als Substrat verwendet.

7. Mikrobielles Verfahren gemäss Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man Cholsäure in einer Konzentration von 10 bis 200 g/l als Substrat verwendet.

8. Mittel zur Ausführung des Verfahrens nach Anspruch 1 in Form eines Mikroorganismus der Art *Arthrobacter*.

9. Mittel gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es der Stamm *Arthrobacter* CA-35, ATCC Nr. 31651 ist.

10. Mittel gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A589-29-32, ATCC Nr. 31652 ist.

11. Mittel gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A589-47, ATCC Nr. 31653 ist.

12. Mittel gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A849, ATCC Nr. 31654 ist.

13. Mittel gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1071-15, ATCC Nr. 31655 ist.

14. Mittel gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1448, ATCC Nr. 31656 ist.

15. Mittel gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1475, ATCC Nr. 31657 ist.

16. Mittel gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1766-15, ATCC Nr. 31658 ist.

17. Mittel gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es der Stamm *Arthrobacter* CA-35-M-965-3, ATCC Nr. 31659 ist.

18. Mittel gemäss Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es der Stamm *Arthrobacter* CA-35-Y-37-12, ATCC Nr. 31660 ist.

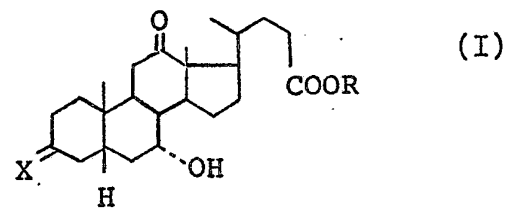
19. Mittel zur Ausführung des Verfahrens nach Anspruch 1 in Form eines Mikroorganismus der Art *Brevibacterium*.

20. Mittel gemäss Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass es der Stamm *Brevibacterium* CA-6, ATCC Nr. 31661 ist.

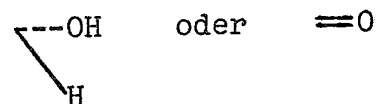
21. Mittel zur Ausführung des Verfahrens nach Anspruch 1 in Form eines Mikroorganismus der Art *Corynebacterium*.

22. Mittel gemäss Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass es der Stamm *Corynebacterium* CA-53, ATCC Nr. 31662 ist.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein mikrobielles Verfahren für die Herstellung von Cholansäurederivaten der folgenden allgemeinen Formel:



worin X



und R das Wasserstoffatom, ein Alkalimetall oder ein Erdalkalimetall bedeuten, sowie auf in diesem Verfahren verwendete Mikroorganismen. Insbesondere lassen sich gemäss vorliegender Erfindung die Cholansäurederivate der obigen allgemeinen Formel I in hoher Ausbeute innerhalb kurzer Zeit herstellen, indem man einen spezifischen Mikroorganismus in einem Cholsäure oder ein Salz davon als Substrat enthaltenden Kulturmedium züchtet.

Die Cholsäurederivate der obigen Formel I, worin X die Gruppierung



bedeutet, nämlich die 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholsäure oder ein Salz davon, sind wertvolle Zwischenprodukte für die Herstellung eines Gallensteine auflösenden Mittels, nämlich der Chenodesoxycholsäure (CDCA), auch 3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β -cholsäure genannt. Die Cholsäurederivate der obigen Formel I, worin X das Sauerstoffatom bedeutet, nämlich die 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholsäure oder deren Salze sind wertvolle Zwischenprodukte für die Herstellung der Desoxycholsäure, welche ihrerseits wiederum ein wertvolles Ausgangsmaterial für die Herstellung des Progesterons und von Nebennierenrindensteroiden (Corticosteroiden) darstellt.

Bekanntlich lassen sich die Cholsäurederivate der obigen Formel I auf mikrobiellem Wege unter Verwendung von Cholsäure oder einem Salz davon als Substrat herstellen. So beschreiben beispielsweise Hayakawa et al. ein Verfahren zur Herstellung der 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholsäure unter Verwendung des Stammes *Streptomyces gelaticus* 1164 [The Journal of Biochemistry (Japan), Bd. 44, Nr. 2, Seiten 109 bis 113 (1957); und Proceedings of Japan Academy, Bd. 32, Seiten 519 bis 522 (1956)]. Ferner beschreiben Hasegawa et al. Verfahren zur Herstellung der 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholsäure unter Verwendung des Stammes *Aspergillus cinnamomeus* HUT 2026 [Hiroshima Journal of Medical Science, Bd. 8, Nr. 3, Seiten 277 bis 283 (1959)]. Kikuchi et al. beschreiben ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung der 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholsäure unter Verwendung des Stammes *Staphylococcus epidermidis* H-1 [Journal of Biochemistry, Bd. 72, Nr. 1, Seiten 165 bis 172 (1972)]. Ferner beschreiben Hayakawa et al. ein Verfahren zur Herstellung der 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholsäure unter Verwendung des Stammes *Streptomyces gelaticus* 1164 [Proceedings of Japan Academy, Bd. 32, Seiten 519 bis 522 (1956)].

Diese Verfahren bedingen aber eine niedrige Konzentration an Cholsäure als Substrat in einem Kulturmedium, und zwar von nicht mehr als 10 g/l. Aufgrund von Versuchen der Patentinhaberin konnte festgestellt werden, dass die Cholsäure tatsächlich in einer geringen Konzentration beim Arbeiten nach den bekannten mikrobiellen Verfahren für die Herstellung von Cholsäurederivaten zur Anwendung gelangen muss, da die zu verwendenden Mikroorganismen bei einer Konzentration von nicht weniger als 20 g/l Cholsäure kaum wachsen oder überhaupt nicht wachsen. Hinzu kommt, dass diese bekannten Methoden eine allzu lange Züchtungsdauer erfordern. Daraus ergibt sich der Wunsch zur Entwicklung eines Verfahrens für die Herstellung von Cholsäurederivaten, welches innerhalb einer kurzen Zeitdauer die gewünschten Produkte in hoher Ausbeute liefert. Es wurde nun gefunden, dass gewisse Mikroorganismen, die zu den Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium* und *Corynebacterium* gehören, in einem Cholsäure oder ein Salz davon als Substrat enthaltenden Medium in einer stark gestreuten Konzentration zu wachsen fähig sind und die besagten Cholsäurederivate in hoher Ausbeute innerhalb einer kurzen Zeitdauer zu liefern vermögen.

Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Schaffung eines mikrobiellen Verfahrens für die Herstellung von Cholsäurederivaten der obigen allgemeinen Formel I, dank welchem man diese Verbindungen in hoher Ausbeute innerhalb kurzer Zeit erhält. Als Mittel zur Ausführung dieses Verfah-

rens eignen sich gewisse neue Mikroorganismen, welche in einem Cholsäure oder ein Salz davon als Substrat enthaltenden Medium zu wachsen fähig sind. Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehende Beschreibung erläutert.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auf ein mikrobielles Verfahren für die Herstellung von Cholsäurederivaten der obigen allgemeinen Formel I, welches Verfahren darin besteht, dass man einen Mikroorganismus, welcher unter Bildung der Cholsäurederivate in einem Cholsäure oder ein Salz davon als Substrat enthaltenden Medium zu wachsen fähig ist, züchtet, wobei man als Mikroorganismen solche der Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium* und *Corynebacterium* einsetzt und die Züchtung in einem das Substrat enthaltenden Kulturmedium vornimmt und daraus das entstandene Derivat gewinnt.

Die für die vorliegende Erfindung in Frage kommenden Mikroorganismen sind aus dem Boden isolierte Mikroorganismen und Mutanten davon, welche man durch natürliche Mutation oder beispielsweise durch Röntgenstrahlenbehandlung, Ultraviolettbestrahlung, mit Hilfe eines mutationsauslösenden Agens, wie z.B. N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, 4-Nitrochinolin-N-oxid, Acriflavin oder Äthylmethansulfonat, oder einer Kombination davon und dergleichen erhält.

Die neuen, in einem Cholsäure oder ein Salz davon enthaltenden Kulturmedium Cholsäurederivate der allgemeinen Formel I zu erzeugen vermögenden Mikroorganismen wurden beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, 8-1 Inage-Igashi 5 chome, Chiba City, Japan (nachstehend mit FERM bezeichnet) und am 17. Juni 1980 bei American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA (nachstehend mit ATCC bezeichnet) hinterlegt, und zwar der Stamm *Arthrobacter* CA-35 (FERM-P Nr. 5145; ATCC Nr. 31651), der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A589-29-32 (FERM-P Nr. 5522; ATCC Nr. 31652), der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A589-47 (FERM-P Nr. 5523; ATCC Nr. 31653), der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A849 (FERM-P Nr. 5524; ATCC Nr. 31654), der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1071-15 (FERM-P Nr. 5525; ATCC Nr. 31655), der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1448 (FERM-P Nr. 5526; ATCC Nr. 31656), der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1475 (FERM-P Nr. 5527; ATCC Nr. 31657), der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1766-15 (FERM-P Nr. 5528; ATCC Nr. 31658), der Stamm *Arthrobacter* CA-35-M-965-3 (FERM-P Nr. 5529; ATCC Nr. 31659), der Stamm *Arthrobacter* CA-35-Y-37-12 (FERM-P Nr. 5530; ATCC Nr. 31660), der Stamm *Brevibacterium* CA-6 (FERM-P Nr. 5144; ATCC Nr. 31661) und der Stamm *Corynebacterium* CA-53 (FERM-P Nr. 5532; ATCC Nr. 31662). Die Stämme *Arthrobacter* CA-35, *Brevibacterium* CA-6 und *Corynebacterium* CA-53 sind wilde Stämme, während die übrigen neun *Arthrobacter*-Stämme Mutanten vom Stamm *Arthrobacter* CA-35 sind. Der Stamm *Arthrobacter* CA-35-Y-37-12 wird durch Ultraviolettbestrahlung erzeugt. Die übrigen acht Mutanten des Stammes *Arthrobacter* CA-35 werden durch Behandlung des Ausgangs-Stammes mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin erhalten.

Die morphologischen Eigenschaften, die Züchtungseigenschaften und die physiologischen Eigenschaften dieser Stämme finden sich in der folgenden Tabelle 1. Zu Vergleichszwecken finden sich in der folgenden Tabelle 1 auch die Eigenschaften des Stammes *Arthrobacter simplex* IAM 1660, welcher mit dem Stamm *Arthrobacter* CA-35 verwandt ist.

55

Tabelle 1

Eigenschaften	Stamm <i>Arthrobacter simplex</i> IAM 1660			Stamm <i>Arthrobacter</i> CA-35				
Mikroskopische Beobachtung								
Form	Stäbchenförmig (manchmal angeschwollen oder gekrümmt) im engl. Sprachgebrauch mit «rods (sometimes swollen or curved)» bezeichnet			Stäbchenförmig (manchmal aufgebrochen oder gekrümmt) im engl. Sprachgebrauch mit «rods (sometimes snapped or curved)» bezeichnet				
Zellteilung	-			Aufbrechend (im engl. Sprachgebrauch mit «snapping» bezeichnet)				
Grösse (µ)	0,4 bis 0,5 × 1 bis 3			0,8 bis 0,9 × 1,7 bis 2,2				
Flagellen	Keine			Keine				
Sporen	Keine			Keine				
Gram-Färbung	Positiv-variabel			Positiv				
Färbung der säurefesten Bakterien	Keine			Keine				
Beobachtung des Züchtungsmediums								
Bouillon-Agar-Platte	Kreisförmig, schwach erhöht, farblos, glatt, glitzernd, transparent (im engl. mit «circular, slightly raised, colorless, smooth, glistening, transparent» bezeichnet)			Kreisförmig, schwach erhöht, gelb bis creme-farbig, glatt, glitzernd, opak (im engl. Sprachgebrauch mit «circular, slightly raised, yellow to cream-colored, smooth, glistening, opaque» bezeichnet)				
Gelatine-Stichkultur	Taschenförmige Verflüssigung (im engl. Sprachgebrauch mit «saccate liquefaction» bezeichnet)			Keine Verflüssigung				
Lackmus-Milch	Lackmus reduziert, Milch geklärt (im engl. mit «litmus reduced, milk cleared» bezeichnet)			Lackmus reduziert, Milch unverändert (im engl. mit «litmus reduced, milk unchanged» bezeichnet)				
BCP-Milch	Klar werdend, alkalisch werdend (im engl. als «clearing, becoming alkaline» bezeichnet)			Alkalisch, nicht koaguliert und nicht peptonisiert				
Physiologische Eigenschaften ¹								
Nitratreduktion	+			+				
Denitrifizierung	-			-				
Methylrot-Test	-			-				
Voges-Proskauer-Test	-			-				
Indolerzeugung	-			-				
H ₂ S-Erzeugung	+			+				
Stärkehydrolyse	-			-				
Citratverwertung	+			+				
Assimilation anorganischer Stickstoffquellen	+			+				
Urease	-			-				
Oxidase	-			± bis -				
Catalase	+			+				
Sauerstoffbedarf	Aerob			Aerob				
Oxidations-Fermentations-Test	-			Oxidativ				
Erzeugung von Säuren und Gasen aus Kohlehydraten ²	Wachstum	Säuren	Gase	Assimilation	Wachstum	Säuren	Gase	Assimilation
1. L-Arabinose	+	-	-	-	±	-	-	+++
2. D-Xylose	+	-	-	-	+	-	-	± bis -
3. D-Glucose	+	-	-	++	+	+	-	+++
4. D-Mannose	+	-	-	-	+	-	-	++
5. Fructose	+	-	-	+	+	+	-	+++
6. D-Galactose	+	-	-	-	+	-	-	+++
7. Maltose	+	-	-	+	+	-	-	+++
8. Saccharose	+	-	-	±	+	-	-	±
9. Lactose	+	-	-	-	+	-	-	-
10. Trehalose	+	-	-	+	+	-	-	-
11. D-Sorbit	+	-	-	-	+	-	-	-
12. D-Mannit	+	-	-	-	+	-	-	-
13. Inosit	+	-	-	-	+	-	-	-
14. Glycerin	+	-	-	-	+	-	-	+++
15. Stärke	+	-	-	-	+	-	-	-

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Eigenschaften	Stamm Arthrobacter CA-35-A589-29-32	Stamm Arthrobacter CA-35-A589-47		
Mikroskopische Beobachtung				
Form	Kurze Stäbchen	Kurze Stäbchen		
Zellteilung	–	–		
Grösse (µ)	0,8 bis 1,0 × 1,3 bis 2,0	0,8 bis 1,0 × 1,3 bis 2,3		
Flagellen	Polare Flagellen	Flagellen		
Sporen	Keine	Keine		
Gram-Färbung	Positiv	Positiv		
Färbung säurefester Bakterien	Keine	Keine		
Beobachtung des Züchtungsmediums				
Bouillon-Agar-Platte	Kreisförmig, flach, gelb, glatt, glitzernd, opak	Kreisförmig, flach, gelb, glatt, glitzernd, opak		
Cholsäure (10 g/l) enthaltende Bouillon-Agar-Platte	Kreisförmig, flach, gelb, glatt, glitzernd, opak	Kreisförmig, flach, weiss bis blass cremefarbig, glatt, glitzernd, opak		
Gelatine-Stichkultur	Verflüssigung	Verflüssigung		
Lackmus-Milch	Lackmus reduziert, Milch nicht koaguliert und nicht peptonisiert	Lackmus reduziert, Milch nicht koaguliert und nicht peptonisiert		
BCP-Milch	Alkalisch, nicht koaguliert und nicht peptonisiert	Alkalisch, nicht koaguliert und nicht peptonisiert		
Physiologische Eigenschaften¹				
Nitratreduktion	±	+		
Denitrifizierung	–	–		
Methylrot-Test	–	–		
Voges-Proskauer-Test	–	–		
Indolerzeugung	–	–		
H ₂ S-Erzeugung	+	+		
Stärkehydrolyse	–	–		
Citratverwertung	+	+		
Assimilation anorganischer Stickstoffquellen				
Ammonium	+	+		
Nitrat	+	+		
Urease	–	–		
Oxidase	–	–		
Catalase	+	+		
Sauerstoffbedarf	Aerob	Aerob		
Oxidations-Fermentations-Test	Oxidativ	–		
Erzeugung von Säuren und Gasen aus Kohlehydraten²				
	Säuren	Gase	Säuren	Gase
1. L-Arabinose	+	–	+	–
2. D-Xylose	–	–	–	–
3. D-Glucose	+	–	–	–
4. D-Mannose	–	–	–	–
5. D-Fructose	+	–	+	–
6. D-Galactose	–	–	–	–
7. Maltose	+	–	+	–
8. Saccharose	–	–	–	–
9. Lactose	–	–	–	–
10. Trehalose	–	–	–	–
11. D-Sorbit	–	–	–	–
12. D-Mannit	–	–	–	–
13. Inosit	–	–	–	–
14. Glycerin	–	–	–	–
15. Stärke	–	–	–	–

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Eigenschaften	Stamm Arthrobacter CA-35-A 849	Stamm Arthrobacter CA-35-A-1071-15		
Mikroskopische Beobachtung				
Form	Kurze Stäbchen	Kurze Stäbchen		
Zellteilung	-	-		
Grösse (μ)	0,7 bis 1,0 \times 1,3 bis 2,3	0,8 bis 1,0 \times 1,3 bis 2,5		
Flagellen	Keine	Keine		
Sporen	Keine	Keine		
Gram-Färbung	Positiv	Positiv		
Färbung säurefester Bakterien	Keine	Keine		
Beobachtung des Züchtungsmediums				
Bouillon-Agar-Platte	Kreisförmig, flach, gelb, glatt, glitzernd, opak	Kreisförmig, flach, gelb, glatt, glitzernd, opak		
Cholsäure (10 g/l) enthaltende Bouillon-Agar-Platte	Kreisförmig, flach, weiss bis blass cremefarbig, glatt, glitzernd, opak	Kreisförmig, flach, weiss bis blass cremefarbig, glatt, glitzernd, opak		
Gelatine-Stichkultur	Verflüssigung	Verflüssigung		
Lackmus-Milch	Lackmus reduziert, Milch nicht koaguliert und nicht peptonisiert	Lackmus reduziert, Milch nicht koaguliert und nicht peptonisiert		
BCP-Milch	Alkalisch, nicht koaguliert und nicht peptonisiert	Alkalisch, nicht koaguliert und nicht peptonisiert		
Physiologische Eigenschaften ¹				
Nitratreduktion	+	+		
Denitrifizierung	-	-		
Methylrot-Test	-	-		
Voges-Proskauer-Test	-	-		
Indolerzeugung	-	-		
H ₂ S-Erzeugung	+	+		
Stärkehydrolyse	-	-		
Citratverwertung	+	+		
Assimilation anorganischer Stickstoffquellen				
Ammonium	+	+		
Nitrat	+	+		
Urease	-	-		
Oxidase	-	-		
Catalase	+	+		
Sauerstoffbedarf	Aerob	Aerob		
Oxidations-Fermentations-Test	Oxidativ	Oxidativ		
Erzeugung von Säuren und Gasen aus Kohlehydraten ²	Säuren	Gase	Säuren	Gase
1. L-Arabinose	-	-	+	-
2. D-Xylose	-	-	-	-
3. D-Glucose	+	-	+	-
4. D-Mannose	-	-	-	-
5. D-Fructose	+	-	+	-
6. D-Galactose	-	-	+	-
7. Maltose	+	-	+	-
8. Saccharose	-	-	-	-
9. Lactose	-	-	-	-
10. Trehalose	-	-	-	-
11. D-Sorbit	-	-	-	-
12. D-Mannit	-	-	-	-
13. Inosit	-	-	-	-
14. Glycedrin	+	-	+	-
15. Stärke	-	-	-	-

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Eigenschaften	Stamm Arthrobacter CA-35-A-1448	Stamm Arthrobacter CA-35-A-1475		
Mikroskopische Beobachtung				
Form	Kurze Stäbchen	Kurze Stäbchen bis «Coccus»-ähnlich (im engl. als «short rod to coccus» bezeichnet)		
Zellteilung	–	–		
Grösse (µ)	0,7 bis 1,0 × 1,2 bis 2,0	1,0 bis 1,3 × 1,2 bis 1,8		
Flagellen	Flagellen	Flagellen		
Sporen	Keine	Keine		
Gram-Färbung	Positiv	Positiv		
Färbung säurefester Bakterien	Keine	Keine		
Beobachtung des Züchtungsmediums				
Bouillon-Agar-Platte	Kreisförmig, flach, gelb, glatt, glitzernd, opak	Kreisförmig, flach, gelb, glatt, glitzernd, opak		
Cholsäure (10 g/l) enthaltende Bouillon-Agar-Platte	Kreisförmig, flach, weiss bis blass cremefarbig, glatt, glitzernd, opak	Kreisförmig, flach, weiss bis blass cremefarbig, glatt, glitzernd, opak		
Gelatine-Stichkultur	Verflüssigung	Verflüssigung		
Lackmus-Milch	Lackmus reduziert, Milch nicht koaguliert und nicht peptonisiert	Lackmus reduziert, Milch nicht koaguliert und nicht peptonisiert		
BCP-Milch	Alkalisch, nicht koaguliert und nicht peptonisiert	Alkalisch, nicht koaguliert und nicht peptonisiert		
Physiologische Eigenschaften ¹				
Nitratreduktion	+	+		
Denitrifizierung	–	–		
Methylrot-Test	–	–		
Voges-Proskauer-Test	–	–		
Indolerzeugung	–	–		
H ₂ S-Erzeugung	+	+		
Stärkehydrolyse	–	–		
Citratverwertung	+	+		
Assimilation anorganischer Stickstoffquellen				
Ammonium	+	+		
Nitrat	+	+		
Urease	–	–		
Oxidase	–	–		
Catalase	+	–		
Sauerstoffbedarf	Aerob	Aerob		
Oxidations-Fermentations-Test	Oxidativ	–		
Erzeugung von Säuren und Gasen aus Kohlehydraten ²	Säuren	Gase	Säuren	Gase
1. L-Arabinose	+	–	–	–
2. D-Xylose	–	–	–	–
3. D-Glucose	+	–	–	–
4. D-Mannose	–	–	–	–
5. D-Fructose	+	–	+	–
6. D-Galactose	–	–	–	–
7. Maltose	+	–	–	–
8. Saccharose	–	–	–	–
9. Lactose	–	–	–	–
10. Trehalose	–	–	–	–
11. D-Sorbit	–	–	–	–
12. D-Mannit	–	–	–	–
13. Inosit	–	–	–	–
14. Glycerin	+	–	–	–
15. Stärke	–	–	–	–

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Eigenschaften	Stamm Arthrobacter CA-35-A-1766-15	Stamm Arthrobacter CA-35-M-965-3	
Mikroskopische Beobachtung			
Form	Kurze Stäbchen	Kurze Stäbchen bis «Coccus»-ähnlich (im engl. «short rod to coccus» bezeichnet)	
Zellteilung	–	–	
Grösse (µ)	0,6 bis 1,2 × 1,0 bis 2,3	1,0 bis 1,2 × 0,8 bis 1,6	
Flagellen	Flagellen	Flagellen	
Sporen	Keine	Keine	
Gram-Färbung	Positiv	Positiv	
Färbung säurefester Bakterien	Keine	Keine	
Beobachtung des Züchtungsmediums			
Bouillon-Agar-Platte	Kreisförmig, flach, gelb, glatt, glitzernd, opak	Kreisförmig, flach, gelb, glatt, glitzernd, opak	
Cholsäure (10 g/l) enthaltende Bouillon-Agar-Platte	Kreisförmig, flach, gelb, glatt, glitzernd, opak	Kreisförmig, flach, weiss bis blass cremefarbig, glatt, glitzernd, opak	
Gelatine-Stichkultur	Verflüssigung	Keine Verflüssigung	
Lackmus-Milch	Lackmus reduziert, Milch nicht koaguliert und nicht peptonisiert	Lackmus reduziert, Milch nicht koaguliert und nicht peptonisiert	
BCP-Milch	Alkalisch, nicht koaguliert und nicht peptonisiert	Alkalisch, nicht koaguliert und nicht peptonisiert	
Physiologische Eigenschaften ¹			
Nitratreduktion	+	+	
Denitrifizierung	–	–	
Methylrot-Test	–	–	
Voges-Proskauer-Test	–	–	
Indolerzeugung	–	–	
H ₂ S-Erzeugung	+	+	
Stärkehydrolyse	–	–	
Citratverwertung	+	+	
Assimilation anorganischer Stickstoffquellen			
Ammonium	+	+	
Nitrat	–	–	
Urease	–	–	
Oxidase	–	–	
Catalase	+	+	
Sauerstoffbedarf	Aerob	Aerob	
Oxydations-Fermentations-Test	Oxidativ	Oxidativ	
Erzeugung von Säuren und Gasen aus Kohlehydraten ²	Säuren	Säuren	
	Gase	Gase	
1. L-Arabinose	–	+	–
2. D-Xylose	–	–	–
3. D-Glucose	+	+	–
4. D-Mannose	–	–	–
5. D-Fructose	+	+	–
6. D-Galactose	–	–	–
7. Maltose	+	+	–
8. Saccharose	–	–	–
9. Lactose	–	–	–
10. Trehalose	–	–	–
11. D-Sorbit	–	–	–
12. D-Mannit	–	–	–
13. Inosit	–	–	–
14. Glycerin	+	–	–
15. Stärke	–	–	–

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Eigenschaften	Stamm Arthrobacter CA-35-Y-37-12	Stamm Brevibacterium CA-6			
Mikroskopische Beobachtung					
Form	Kurze Stäbchen	Stäbchen			
Zellteilung	–	–			
Grösse (μ)	0,8 bis 1,0 \times 1,5 bis 2,5	1,0 \times 2,5 bis 4,0			
Flagellen	Flagellen	Polare Flagellen			
Sporen	Keine	Keine			
Gram-Färbung	Positiv	Positiv			
Färbung säurefester Bakterien	Keine	Keine			
Beobachtung des Züchtungsmediums					
Bouillon-Agar-Platte	Kreisförmig, flach, gelb, glatt, glitzernd, opak	Wellenförmig, leicht aufgerichtet, farblos, glatt, glitzernd, durchscheinend			
Cholsäure (10 g/l) enthaltende Bouillon-Agar-Platte	Kreisförmig, flach, cremefarbig, glatt, flitzernd, opak	–			
Gelatine-Stichkultur	Verflüssigung	Verflüssigung			
Lackmus-Milch	Lackmus reduziert, Milch nicht koaguliert und nicht peptonisiert	Peptonisiert und alkalisch geworden			
BCP-Milch	Alkalisch, nicht koaguliert und nicht peptonisiert	Peptonisiert und alkalisch geworden			
Physiologische Eigenschaften ¹					
Nitratreduktion	+	–			
Denitrifizierung	–	+			
Methylrot-Test	–	–			
Voges-Proskauer-Test	–	–			
Indolerzeugung	–	–			
H ₂ S-Erzeugung	+	+			
Stärkehydrolyse	–	+			
Citratverwertung	+	+			
Assimilation anorganischer Stickstoffquellen					
Ammonium	+	+			
Nitrat	+	–			
Urease	–	±			
Oxidase	–	±			
Catalase	+	+			
Sauerstoffbedarf	Aerob	Aerob			
Oxydations-Fermentations-Test	Oxidativ	–			
Erzeugung von Säuren und Gasen aus Kohlehydraten ²	Säuren Gase Wachstum	Säuren Gase Assimilation			
1. L-Arabinose	+	–	+	–	+++
2. D-Xylose	–	–	+	–	±
3. D-Glucose	+	–	+	–	+++
4. D-Mannose	–	–	+	–	+
5. D-Fructose	+	–	+	–	+++
6. D-Galactose	–	–	+	±	+++
7. Maltose	+	–	+	–	+++
8. Saccharose	–	–	+	–	–
9. Lactose	–	–	+	–	–
10. Trehalose	–	–	+	–	±
11. D-Sorbit	–	–	+	–	–
12. D-Mannit	–	–	+	–	–
13. Inosit	+	–	+	–	+++
14. Glycerin	+	–	+	+	+++
15. Stärke	–	–	+	–	–

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Eigenschaften	Stamm <i>Corynebacterium</i> CA-53	
Mikroskopische Beobachtung		
Form	stabförmig, «coryneförmig»	
Zellteilung	«snapping», d.h. aufbrechend	
Grösse (μ)	1,3 bis 2,4 \times 1,0 bis 1,2	
Flagellen	Keine	
Sporen	Keine	
Gram-Färbung	Positiv	
Färbung säurefester Bakterien	Keine	
Beobachtung des Züchtungsmediums		
Nähr-Agar-Platte	Kreisförmig, flach, gelb, glatt, glitzernd, opak	
Gelatine-Stichkultur	Keine Verflüssigung	
Lackmus-Milch	Lackmus reduziert mit braunem Sediment	
BCP-Milch	Alkalisch	
Physiologische Eigenschaften ¹		
Nitratreduktion	+	
Denitrifizierung	-	
Methylrot-Test	-	
Voges-Proskauer-Test	-	
Indolerzeugung	-	
H ₂ S-Erzeugung	+	
Stärkehydrolyse	-	
Citratverwertung	+	
Assimilation anorganischer Stickstoffquellen	+	
Urease	-	
Oxidase	+	
Catalase	+	
Sauerstoffbedarf	Aerob	
Oxidations-Fermentations-Test	-	
Erzeugung von Säuren und Gasen aus Kohlehydraten ²	Säuren	Gase
1. L-Arabinose	-	-
2. D-Xylose	-	-
3. D-Glucose	-	-
4. D-Mannose	-	-
5. D-Fructose	-	-
6. D-Galactose	-	-
7. Maltose	-	-
8. Saccharose	-	-
9. Lactose	-	-
10. Trehalose	-	-
11. D-Sorbit	-	-
12. D-Mannit	-	-
13. Inosit	-	-
14. Glycerin	-	-
15. Stärke	-	-

Wie nachstehend erwähnt, sind die englischen Bezeichnungen und die Kurvenbezeichnungen dem Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7. und 8. Auflagen, zu entnehmen.

Bemerkungen:

1. Die im Zusammenhang mit den physiologischen Eigenschaften zur Anwendung gelangten Symbole bedeuten folgendes:

+ Der Stamm besitzt die entsprechenden Eigenschaften oder erzeugt das entsprechende Produkt

± Es ist schwierig zu bestimmen, ob der Stamm die entsprechenden Eigenschaften aufweist oder das entsprechende Produkt erzeugt oder nicht

- Der Stamm besitzt nicht die entsprechenden

Eigenschaften oder erzeugt nicht das entsprechende Produkt.

2. Die bei der Erzeugung von Säuren und Gasen aus Kohlehydraten verwendeten Symbole bedeuten folgendes:

i) Wachstum, Säuren und Gase:

60 Der Stamm wurde in einem Hugh- und Leifson-Medium gezüchtet, mit der Bedingung, dass jedes der Kohlehydrate 1 bis 15 als Kohlenstoffquelle eingesetzt wurde, wobei dessen Wachstum und die Erzeugung von Säuren und Gasen beobachtet wurden.

65 + Der Stamm wächst oder eine Säure oder ein Gas wird erzeugt

± Es ist schwierig festzustellen, ob der Stamm wächst oder eine Säure oder ein Gas erzeugt wird oder nicht

- Der Stamm wächst nicht oder es wird keine Säure oder kein Gas erzeugt

ii) Assimilation:

Das NH_4NO_3 (2 g/l), KH_2PO_4 (2 g/l), K_2HPO_4 (5 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/l), Hefeextrakt (0,1 g/l) und eines der Kohlehydrate 1 bis 15 (5 g/l) enthaltende Kulturmedium wurde in ein Rohr mit einem Durchmesser von 21 mm eingebracht, der Stamm unter Schütteln darin gezüchtet und dessen Assimilation (Wachstum) beobachtet.

- Es findet kein Wachstum des Stammes statt
- ± Der Stamm wächst schwach
- + Der Stamm wächst
- + + Der Stamm wächst gut
- + + + Der Stamm wächst sehr gut

Aufgrund der obigen morphologischen, Züchtungs- und physiologischen Eigenschaften wurde die Klassifikation der Stämme nach dem Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7. und 8. Auflagen bestimmt.

Es kann festgestellt werden, dass der Stamm *Arthrobacter* CA-35 aufgrund der mikroskopischen Beobachtungen, wie z.B. Form, Gram-Färbung usw., sowie aufgrund dessen physiologischen Eigenschaften eine Beziehung zu *Arthrobacter simplex* besitzt. Der Stamm *Arthrobacter* CA-35 ist aber bezüglich der Pigmenterzeugung, der Assimilation von Kohlehydraten und dem Wachstum in einem Cholsäure enthaltenden Medium vom Stamm *Arthrobacter simplex* IAM 1660 verschieden. Der Stamm *Arthrobacter* CA-35 kann in einem Natriumcholat als alleinige Kohlenstoffquelle enthaltendem Medium bei hoher Konzentration von beispielsweise ungefähr 20 bis 500 g/l wachsen, wobei als hauptsächlichste metabolische Produkte die 7α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure, $7\alpha,12\alpha$ -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure und/oder deren Natriumsalze erzeugt werden, während der Stamm *Arthrobacter simplex* IAM 1660 in einem Natriumcholat als einzige Kohlenstoffquelle enthaltenden Medium bei einer Konzentration von 10 g/l kaum wachsen kann.

Der Stamm *Arthrobacter* CA-35 erzeugt gelbe bis cremefarbene Pigmente. Andererseits existieren als Mikroorganismen, welche zur Gattung *Arthrobacter* gehören und eine Pigmentproduktivität aufweisen, *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter aureus* und *Arthrobacter ureafaciens*. Der Stamm *Arthrobacter* CA-35 unterscheidet sich aber ebenfalls von diesen Mikroorganismen, denn *Arthrobacter oxydans* und *Arthrobacter aureus* sind gewöhnlich gramnegativ und hydrolysieren Stärke, während *Arthrobacter ureafaciens* im allgemeinen gram-negativ ist und Nitrat nicht reduziert. Es darf daher angenommen werden, dass der Stamm *Arthrobacter* CA-35 eine neue Art darstellt, welche zur Gattung *Arthrobacter* gehört und dies deshalb, weil er sich von den üblichen zur Gattung *Arthrobacter* gehörenden Arten unterscheidet.

Wenn auch gewisse Mutanten des Stammes *Arthrobacter* CA-35 sich vom Ausgangs-Stamm wegen des Vorliegens von Flagellen grundsätzlich unterscheiden, wird festgestellt, dass diese Mutanten zur Gattung *Arthrobacter* gehören, weil eine Mutante im allgemeinen in der gleichen Art ihres Ausgangs-Stammes klassifiziert wird.

Es wird festgestellt, dass der Stamm *Brevibacterium* CA-6 angesichts der mikroskopischen Beobachtungen, wie z.B. der Gram-Färbung und dergleichen, und wegen seiner physiologischen Eigenschaften zur Gattung *Brevibacterium* gehört. Der Stamm *Brevibacterium* CA-6 ist allerdings etwas verschieden von den anderen Mikroorganismen, die zur Gattung *Brevibacterium* gehören, weil die anderen Mikroorganismen zu den Peritrichen gehörige (bewimperte) Flagellen aufweisen, während der Stamm *Brevibacterium* CA-6 ein polares Flagellum aufweist usw.

Ferner wird festgestellt, dass der Stamm *Corynebacterium* CA-53 mit *Corynebacterium equi* nahe verwandt ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch Züchtung eines Mikroorganismus durchgeführt, welcher in einem Cholsäure oder ein Salz davon als Substrat enthaltenden Medium zu wachsen fähig ist, wobei die Mikroorganismen den Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium* und *Corynebacterium* entnommen werden, wobei die Züchtung in einem Medium erfolgt, welches Cholsäure oder ein Salz davon als Substrat enthält.

Gemäss vorliegender Erfindung kann die Cholsäure als solche als Substrat eingesetzt werden. Man kann aber auch ein Alkalimetallsalz der Cholsäure, wie z.B. Natriumcholat, Kaliumcholat oder dergleichen, oder ein Erdalkalimetallsalz der Cholsäure, wie z.B. Calciumcholat, Magnesiumcholat oder dergleichen, vorzugsweise aber ein Alkalimetallsalz davon, verwenden. Verwendet man ein Cholat, so wird dieses in Wasser gelöst, um eine wässrige Lösung zu erhalten, welche das Cholat in einer vorbestimmten Konzentration enthält. Andererseits kann man eine gewisse Menge einer Alkalimetallverbindung oder einer Erdalkalimetallverbindung, welche mit Cholsäure ein Salz bildet, zuvor in Wasser lösen und dann dieser Lösung Cholsäure zusetzen, wobei man eine wässrige, ein Cholat in einer vorbestimmten Konzentration enthaltende Lösung erhält. Die Konzentration der Cholsäure oder ihres Salzes kann in einem grossen Bereich von ungefähr 1 bis 500 g/l, als Cholsäure berechnet, schwanken. Jenach der gewünschten Ausbeute an einem der Cholsäurederivate der Formel I, je nach den Züchtungsbedingungen und je nach der wirtschaftlichen Effizienz, wie z.B. Handhabung und Bearbeitungsmöglichkeiten und dergleichen, ist es empfehlenswert, die Cholsäure oder ein Salz davon in einer Konzentration von ungefähr 5 bis 300 g/l und vorzugsweise von ungefähr 10 bis 200 g/l, berechnet als Cholsäure, zu verwenden.

Die Züchtung kann in an sich bekannter Weise geschehen, wobei man gewöhnlich eine Schüttelkultur oder eine submerse Kultur unter Verwendung einer flüssigen Mediums anwendet.

Als Medium kann man ein solches verwenden, welches durch den zur Anwendung gelangenden Mikroorganismus assimilierbare Nährstoffe enthält. Das Medium kann Cholsäure oder ein Salz davon als einzige Kohlenstoffquelle oder eine zusätzliche Kohlenstoffquelle, wie z.B. eine Pentose, z.B. Arabinose usw., eine Hexose, wie z.B. Glucose, Mannose, Fructose, Galactose usw., ein Disaccharid, wie z.B. Maltose usw., ein Stärkezersetzungsprodukt, wie z.B. Dextrin usw., einen Zuckeralkohol, wie z.B. Sorbit usw., einen mehrwertigen Alkohol, wie z.B. Glycerin usw., eine Mischung davon oder dergleichen und/oder andere Nährstoffe, wie z.B. ein Polypepton, ein Pepton, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellflüssigkeit, Hefeextrakt, eine Aminosäure, ein Gemisch davon oder dergleichen, enthalten. Im allgemeinen kann man dem Medium eine zusätzliche Kohlenstoffquelle und/oder einen anderen Nährstoff in einer Konzentration von 0,1 bis 10 g/l zusetzen. Als Stickstoffquellen kommen beispielsweise Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Kaliumnitrat, Mischungen davon und dergleichen in Frage. Im allgemeinen kann die Stickstoffquelle einem solchen Medium in einer Konzentration von ungefähr 0,5 bis 5 g/l zugesetzt werden. Dem Medium kann man ferner auch anorganische Salze, z.B. Dikaliumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumsulfat oder dergleichen, üblicherweise in einer Menge von ungefähr 0,1 bis 10 g/l zugeben. Die Züchtung kann in einer Schüttelkultur oder in einer submersen Kultur während 6 Stunden bis 5 Tagen bei 25 bis 35 °C erfolgen.

Verwendet man den Stamm *Arthrobacter* CA-35, so wird beim vorliegenden erfindungsgemässen Verfahren die als

Substrat verwendete Cholsäure oder deren Salz in ein Cholsäurederivat der allgemeinen Formel I übergeführt, wobei man auch eine kleine Menge der $7\alpha,12\alpha$ -Dihydroxy-3-keto- 5β -cholansäure erhält. Es wurde ferner festgestellt, dass die Cholsäurederivate der allgemeinen Formel I, worin X die Gruppierung



bedeutet, nämlich die $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy-12-keto- 5β -cholansäure oder ein Salz davon, vorwiegend anfallen, wenn man die obigen Mutanten von *Arthrobacter* CA-35 verwendet. Wünscht man somit die $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy-12-keto- 5β -cholansäure oder ein Salz davon zu erhalten, so wird man vorzugsweise diese Mutanten und insbesondere den Stamm *Arthrobacter* CA-35-A589-29-32 (FERM-P Nr. 5522; ATCC Nr. 31652), Stamm *Arthrobacter* CA-35-A589-47 (FERM-P Nr. 5523; ATCC Nr. 31653) und Stamm *Arthrobacter* CA-35-A1766-15 (FERM-P Nr. 5528; ATCC Nr. 31658) verwenden. Insbesondere werden die Stämme *Arthrobacter* CA-35-A589-29-32 und *Arthrobacter* CA-35-A589-47 bevorzugt. Verwendet man den Stamm *Brevibacterium* CA-6, so wird die Cholsäure bzw. deren Salz in ein Cholsäurederivat der Formel I übergeführt, wobei man auch noch eine kleine Menge der 7α -Hydroxy-3,12-diketo- Δ^4 -cholensäure bzw. ein Salz davon erhält. Verwendet man den Stamm *Corynebacterium* CA-53, so wird Cholsäure oder ein Salz davon in ein Cholsäurederivat der Formel I übergeführt, wobei man überdies 7α -Hydroxy-3,12-diketo- Δ^4 -cholensäure oder ein Salz davon erhält.

Nach beendeter Züchtung werden die im Medium angeereicherten Produkte aus dem Medium abgetrennt und gereinigt. Zuerst werden in an sich bekannter Weise, z.B. durch Filtrieren, Zentrifugieren oder dergleichen, aus dem Medium die darin vorhandenen unlöslichen Materialien, wie z.B. die mikrobiellen Zellen und dergleichen, entfernt. Dann wird das Filtrat oder die überstehende Flüssigkeit durch Zugabe einer Säure, wie z.B. Salzsäure, angesäuert, um die darin vorhandenen Produkte auszufällen. Gleichzeitig wird die als Substrat verwendete und noch vorhandene Cholsäure oder eines ihrer Salze auch als Cholsäure ausgefällt. Nach dem Abtrennen des entstandenen Niederschlages wird das Filtrat oder die überstehende Flüssigkeit mit einem inerten, organischen Lösungsmittel, wie z.B. Äthylacetat oder dergleichen, extrahiert und das Lösungsmittel dann aus dem Extrakt abdestilliert, wobei man einen Rückstand erhält. Auf diese Weise werden die verbleibenden Produkte und das Substrat beinahe vollständig zurückgewonnen. Der entstandene Rückstand wird mit dem nach den obigen Angaben erhaltenen Niederschlag vereinigt.

Ein Gemisch der so erhaltenen Produkte und Cholsäure wird dann chromatographiert, um das gewünschte Produkt zu isolieren. So kann man beispielsweise die bei Verwendung des Stammes *Arthrobacter* CA-35 erhaltenen Produkte oder die mit einer Mutante davon erzielten Produkte in folgender Weise isolieren: Die Produkte und die Cholsäure werden in die entsprechenden Methylester übergeführt, und die so erhaltenen Methylester in einer Kieselsäule chromatographiert, wobei man nacheinander mit Chloroform, einer Mischung von Chloroform und Äthanol im Mischungsverhältnis von 90:1 Vol.-Teilen und schliesslich einer Mischung von Chloroform und Äthanol im Mischungsverhältnis von 93:3 Vol.-Teilen eluiert. Der erwünschte Methylester der 7α -Hydroxy-3,12-diketo- 5β -cholansäure wird dann mit Chloroform eluiert. Durch Eluieren mit einer Mischung von Chloroform und Äthanol im Mischungsverhältnis von 99:1 Vol.-Teilen erhält man zuerst als Nebenprodukt den Methylester der $7\alpha,12\alpha$ -Dihydroxy-3-keto- 5β -cholansäure und hierauf

durch weiteres Eluieren den gewünschten Methylester der $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy-12-keto- 5β -cholansäure. Der Cholsäuremethylester wird mit einer Mischung von Chloroform und Äthanol im Mischungsverhältnis von 97:3 Vol.-Teilen eluiert. Alle diese Methylester lassen sich durch Hydrolyse nach bekannten Methoden in die entsprechenden Säuren überführen. Andererseits können die bei Verwendung des Stammes *Brevibacterium* CA-6 oder *Corynebacterium* CA-53 erhaltenen Produkte beispielsweise in folgender Weise isoliert werden. Ein Gemisch der Produkte und der Cholsäure wird unmittelbar der Chromatographie über Kieselgel unterworfen, wobei man nacheinander mit einer Mischung von Chloroform und Äthanol im Mischungsverhältnis von 98:2 Vol.-Teilen und hierauf mit einer Mischung von Chloroform und Äthanol im Mischungsverhältnis von 97:3 Vol.-Teilen eluiert. Die erwünschte 7α -Hydroxy-3,12-diketo- 5β -cholansäure wird dabei mit einer Mischung von Chloroform und Äthanol im Mischungsverhältnis von 98:2 Vol.-Teilen eluiert. Durch Eluieren mit einer Mischung von Chloroform und Äthanol im Mischungsverhältnis von 97:3 Vol.-Teilen erhält man zuerst als Nebenprodukt die 7α -Hydroxy-3,12-diketo- Δ^4 -cholensäure und durch weiteres Eluieren anschliessend die gewünschte $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy-12-keto- 5β -cholansäure.

Die erfindungsgemäss erhaltene $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy-12-keto- 5β -cholansäure oder deren Salze lassen sich leicht nach der Huang-Minlon-Reduktionsmethode reduzieren, wobei man ein wertvolles Gallenstein auflösendes Mittel, nämlich die Chenodesoxycholinsäure (CDCA), erhält.

Die 7α -Hydroxy-3,12-diketo- 5β -cholansäure oder deren Salze lassen sich leicht in die Desoxycholsäure überführen, welche ihrerseits ein wertvolles Ausgangsmaterial für die Herstellung von Progesteron und von Nebennierenrindensteroiden (Corticosteroiden) ist. Dies geschieht durch Dehydratisierung und anschliessende Hydrierung nach bekannten Methoden.

Die folgenden Beispiele und Bezugsbeispiele erläutern die vorliegende Erfindung in ausführlicher Weise. Die Beispiele sollen aber keineswegs einschränkenden Charakter aufweisen.

Herstellung von Mutanten

Eine Öse des Stammes *Arthrobacter* CA-35 (FERM-P Nr. 5145; ATCC Nr. 31651), die in einer Schrägkultur (Medium A: NaOH 0,5%, Cholsäure 5,0%, Pepton 0,5%, Hefeextrakt 0,5%, NaCl 0,5% und Agar 1,5%) gezüchtet worden war, wurde in ein Medium (10 ml, Medium B: NaOH 1%, Cholsäure 10%, NH_4NO_3 0,2%, KH_2PO_4 0,2%, K_2HPO_4 0,5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02% und Hefeextrakt 0,01%) in einem Reagenzglas von 200 x 21 mm Durchmesser inokuliert und unter Schütteln während 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die so erhaltene Kultur (0,3 ml) wurde einem Medium (10 ml, Medium C: NaOH 0,05%, Cholsäure 0,5%, Glucose 0,5%, NH_4NO_3 0,2%, KH_2PO_4 0,2%, K_2HPO_4 0,5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02% und Hefeextrakt 0,01%) in einem Reagenzglas von 200 x 21 mm Durchmesser eingebracht und unter Schütteln während 15 bis 16 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die mikrobiellen Zellen wurden mit Hilfe eines Membranfilters (Porengrösse 0,45 μ) unter aseptischen Bedingungen geerntet, mit einer 0,1 molaren Phosphatpufferlösung (pH 7,0, 20 ml) gewaschen und in der gleichen Pufferlösung (25 ml) suspendiert.

Eine Mutationsbehandlung erfolgte durch Zugabe von N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zur obigen Zellsuspension (4 ml) in einem Reagenzglas von 200 x 21 mm Durchmesser, wobei die Inkubation des Gemisches während 45 Minuten unter Schütteln bei 30 °C bewirkt wurde. Unter diesen Bedingungen betrug die letale Rate des Stammes *Arthrobacter* CA-35 ungefähr 80%.

Die so behandelten Zellen wurden durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µ unter aseptischen Bedingungen geerntet, mit einer 0,1 molaren Phosphatpufferlösung (pH 7,0, 20 ml) gewaschen und in der gleichen Pufferlösung (25 ml) suspendiert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit einer sterilisierten, normalen Kochsalzlösung verdünnt und über Agarplatten (Medium D: NaOH 0,1%, Cholsäure 1,0%, NH₄NO₃ 0,2%, KH₂PO₄ 0,2%, K₂HPO₄ 0,5%, MgSO₄·7H₂O 0,02%, Hefeextrakt 0,01% und Agar 1,5%) so ausgebreitet, dass pro Platte 300 bis 500 Kolonien gebildet wurden. Die Platten wurden während 4 Tagen bei 30 °C inkubiert. Jede so gebildete Kolonie wurde isoliert und auf einer Platte (Medium E: Pepton 0,5%, Hefeextrakt 0,5%, Natriumchlorid 0,5% und Agar 1,5%) während 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Jede auf der Platte des Mediums E gebildete Kolonie wurde auf eine Platte des Mediums D übertragen und während 20 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Jede Kolonie auf der obigen Platte des Mediums E, bei welcher die übertragene Kolonie auf der Platte des Mediums D nicht wuchs, wurde in einem Schrägkulturmedium (Medium F: NaOH 0,1%, Cholsäure 1,0%, Pepton 0,5%, Hefeextrakt 0,5%, NaCl 0,5% und Agar 1,5%) während 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Eine Öse voll dieser Schrägkultur wurde dann in ein Medium (10 ml, Medium G: NaOH 0,5%, Cholsäure 5,0%, Glucose 0,5%, NH₄NO₃ 0,2%, KH₂PO₄ 0,2%, K₂HPO₄ 0,5%, MgSO₄·7H₂O 0,02% und Hefeextrakt 0,01%) in einem Reagenzglas (200 × 21 mm Durchmesser) inokuliert und unter Schütteln während 3 Tagen bei 30 °C inkubiert.

Beim Prüfen durch Dünnschichtchromatographie der in jedem Medium G angereicherten Produkte fand man einen Mikroorganismus, welcher in selektiver Weise die 3α,7α-Dihydroxy-12-keto-5β-cholansäure oder ein Salz davon erzeugte. Diesem Mikroorganismus gab man den Namen Stamm *Arthrobacter* CA-35-M-965-3.

Die obige Arbeitsmethode wird nachstehend als «Methode M» bezeichnet. Gemäss dieser Methode M wurde eine Mutationsbehandlung unter Verwendung des Stammes *Arthrobacter* CA-35-M-965-3 als Ausgangs-Stamm durchgeführt. Es ergaben sich drei Stämme, welche in selektiver Weise die 3α,7α-Dihydroxy-12-keto-5β-cholansäure oder ein Salz davon bildeten. Diesen Stämmen wurden die Bezeichnungen *Arthrobacter* CA-35-A589, *Arthrobacter* CA-35-A849 bzw. *Arthrobacter* CA-35-A-1071-Stämme gegeben.

Aus der Kolonie des Stammes *Arthrobacter* CA-35-A589 wurden zwei überlegene Stämme isoliert und ihnen die Namen *Arthrobacter* CA-35-A589-29-32 und *Arthrobacter* CA-35-A589-47-Stämme gegeben. Ein überlegener Stamm wurde gleichfalls aus der Kolonie des Stammes *Arthrobacter* CA-35-A-1071 isoliert und als Stamm *Arthrobacter* CA-35-A1071-15 bezeichnet.

Ein weiterer überlegener Stamm wurde unter Verwendung des Stammes *Arthrobacter* CA-35-A849 als Ausgangs-Stamm nach der Methode M erzeugt und bekam den Namen Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1448. *Arthrobacter* CA-35-A-1475-Stamm wurde unter Verwendung des Stammes *Arthrobacter* CA-35-A-1448 als Ausgangs-Stamm nach der Methode M erzeugt. Der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1766 wurde unter Verwendung des Stammes *Arthrobacter* CA-35-A-1766 wurde unter Verwendung des Stammes *Arthrobacter* CA-35-A-1071 als Ausgangs-Stamm nach der Methode M erzeugt und aus der Kolonie des entstandenen Stammes *Arthrobacter* CA-35-A-1766 wurde Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1766-15 isoliert.

Der Stamm *Arthrobacter* CA-35-Y-37-12 wurde nach der folgenden Methode erzeugt.

Eine Öse voll vom Stamm *Arthrobacter* CA-35 (FERM-P Nr. 5145; ATCC Nr. 31651), welcher auf einer Schrägkultur in Medium A gezüchtet worden war, wurde in das Medium B

(10 ml) in einem Reagenzglas (200 × 21 mm Durchmesser) inokuliert und während 20 Stunden unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Mikrobielle Zellen wurden durch Zentrifugieren (10 000 Umdrehungen pro Minute) während 5 Minuten bei 5 °C unter aseptischen Bedingungen geerntet. Dann wurden die Zellen in 10 ml sterilisiertem Wasser suspendiert. Die Suspension wurde in eine Petrischale (Durchmesser 7,5 cm) gefüllt und diese in einem Abstand von ungefähr 27 cm unter einer 15 Watt Ultraviolettampe (2537 Å) in einen keimfreien Behälter gestellt, worauf man die Bestrahlung mit den Ultraviolettstrahlen während 10 Minuten vornahm. Unter diesen Bedingungen gelangte man zu einer letalen Rate des Stammes *Arthrobacter* CA-35 von ungefähr 99,9%.

Nach erfolgter Bestrahlung wurden die mikrobiellen Zellen mit einem Membranfilter geerntet, mit einer 0,1 molaren Phosphatpufferlösung gewaschen und in der gleichen Pufferlösung suspendiert. Die entstandene Suspension wurde mit einer normalen Kochsalzlösung verdünnt und die obige Züchtung unter Verwendung der Medien D bis G wiederholt, um einen überlegenen Stamm zu erhalten, welcher in selektiver Weise die 3α,7α-Dihydroxy-12-keto-5β-cholansäure oder ein Salz davon erzeugte.

Beispiel 1

Der Stamm *Arthrobacter* CA-35 (FERM-P Nr. 5145; ATCC Nr. 31651) wurde wie folgt gezüchtet:

Zusammensetzung des Züchtungsmediums:

Cholsäure	100 g
Ammoniumnitrat	2,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,0 g
Dikaliumhydrogenphosphat	5,0 g
Magnesiumsulfat-heptahydrat	0,2 g
Hefeextrakt	0,1 g
Natriumhydroxyd	10 g
destilliertes Wasser bis	1 Liter

Die obigen Bestandteile wurden miteinander vermischt, um ein Kulturmedium in einer Menge von 1 Liter zu erhalten.

Jeweils 100-ml-Portionen dieses Kulturmediums wurden in zehn Sakaguchi-Kolben (Volumen 500 ml) verteilt und während 15 Minuten bei 120 °C in einem Autoklaven behandelt. Jeder Kolben wurde jeweils mit 10 ml Impfkultur versehen, welche durch vorgängiges Züchten des Stammes im gleichen Medium unter Schütteln bei 30 °C während 2 Tagen erhalten worden war. Jeder Kolben wurde auf einer Schüttelvorrichtung während 2 Tagen bei 30 °C inkubiert.

Nach beendeter Züchtung wurden die Kulturbrühen vereinigt und zentrifugiert, um mikrobielle Zellen zu entfernen. Die entstandene, überstehende Flüssigkeit wurde durch Zugabe von 600 ml einer wässrigen 1n-Salzsäurelösung sauer gestellt, wodurch ein Niederschlag gebildet wurde. Dieser Niederschlag wurde abgetrennt und die verbleibende Lösung mit 1 Liter Äthylacetat extrahiert. Das Äthylacetat wurde aus dem Extrakt mit Hilfe eines Rotationsverdampfers abdestilliert und der Rückstand mit dem obigen Niederschlag vereinigt, wobei man ein Gemisch von Cholansäurederivaten und Cholsäure (85 g) erhielt.

Eine kleine Menge dieser Mischung wurde in Methanol in einer Konzentration von 1% gelöst. Dann wurde die Lösung (10 µl) in eine mit hoher Geschwindigkeit arbeitende Flüssigchromatographievorrichtung injiziert, welche mit einer µ-Bondapak-C-18-Säule (vom HLC-GPC-244-Typus der Fa. Waters in USA) ausgerüstet war.

Die Säule wurde mit einer Mischung von Wasser und Methanol im Mischungsverhältnis von 30:70 Vol.-Teilen und einem pH-Wert von 2,5 mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min eluiert und der Refraktionsindex des Eluates gemessen.

Die beiliegende Fig. 1 zeigt das erhaltene Chromatogramm. Die Peaks A, B, C und D in Fig. 1 entsprechen jenen der Referenzstandardverbindungen 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure, 7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure bzw. Cholsäure.

Beim Isolieren der Verbindungen in den Fraktionen, welche den Peaks A, B und C entsprachen, und bei der Bestimmung ihrer chemischen Konstitutionen aufgrund der Massenspektren, Infrarotspektren und magnetischen Kernresonanzspektren davon ergab sich, dass es sich um die 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure bzw. 7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure handelte. Die beiliegenden Fig. 2, 3 und 4 zeigen die Infrarotspektren (A, B und C) der Methylester der Verbindungen, welche den Peaks A, B und C entsprechen, im Vergleich mit jenen der Referenzstandardverbindungen (A', B' und C').

Die Schmelzpunkte der Verbindungen und ihrer Methylester, welche den Peaks A, B und C entsprechen, finden sich in der folgenden Tabelle 2.

Tabelle 2

Verbindungen	Schmelzpunkte der Methylester (°C)		Schmelzpunkte der freien Säuren (°C)	
	Gefunden	Literatur	Gefunden	Literatur
Peak A	150-152	152-154	-	-
Peak B	154-156	156-157	219-220	221-222
Peak C	168-169	169-172	185-186	186-188

Die Ausbeute an Produkten und die Menge an Cholsäure, welche unverändert zurückblieb, wurden berechnet aufgrund des Flächenverhältnisses des Chromatogramms von Fig. 1. Die Resultate finden sich in der folgenden Tabelle 3.

Tabelle 3

Verbindungen	Flächenverhältnis	Umwandlungsrate (%)	Ausbeute bzw. Menge (g)
7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure (Peak A)	28,54	28,54	24,3
3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure (Peak B)	63,06	63,06	53,6
7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure (Peak C)	1,54	1,54	1,30
Cholsäure (Peak D)	6,86	6,86	5,80

Beispiel 2

Es wurde in der gleichen Weise wie in Beispiel 1 gearbeitet mit dem Unterschied, dass dem Medium überdies 5,0 g/l Glucose zugesetzt wurde, um eine Mischung von Produkten und nicht umgesetzter Cholsäure zu erhalten. Die Menge des Gemisches betrug 91,0 g. Dieses Gemisch von 91,0 g wurde dann in 270 ml Methanol gelöst und mit 9 ml konzentrierter Salzsäure versetzt. Die erhaltene Lösung wurde während 20 Minuten unter Rückfluss zum Sieden erhitzt, um die Produkte und die Cholsäure in die entsprechenden Methylester überzuführen.

Dann wurde eine Säule von 1200 x 70 mm Durchmesser mit 1500 g Kieselgel C-200 beschickt, worauf die nach den obigen Angaben erhaltenen Methylester darin adsorbiert wurden. Die Säule wurde mit Chloroform eluiert, wobei man 25,1 g 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäuremethylester erhielt. Hierauf wurde die Säule mit einer Mischung von Chloroform und Äthanol im Mischungsverhältnis von 99:1

Vol.-Teilen eluiert, wobei man zuerst 1,40 g 7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäuremethylester und hierauf 56,4 g 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäuremethylester erhielt.

Diese Methylester wurden hydrolysiert, wobei man 24,8 g 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, 1,38 g 7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure und 56,0 g 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure erhielt.

Beispiel 3

Man wiederholte das Verfahren gemäss Beispiel 1 mit dem Unterschied, dass die Konzentration an Cholsäure variiert und 10 Gew.-% Natriumhydroxyd, bezogen auf die verwendete Cholsäure, dem Medium zugegeben wurde. Die Ausbeute an Produkten und die Menge an nicht umgesetzter Cholsäure bei verschiedenen Konzentrationswerten des Substrates (Cholsäure) finden sich in der folgenden Tabelle 4.

Tabelle 4

Verbindungen	Ausbeuten Substratkonzentration (g/l)		
	50	200	300
3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure	27,1 g	108,3 g	47,4 g
7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure	12,3 g	49,0 g	21,4 g
7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure	0,7 g	2,65 g	1,20 g
Cholsäure	kleine Menge	20,1 g	230 g

Beispiel 4

Man wiederholte das Verfahren gemäss Beispiel 2 mit dem Unterschied, dass jeder Kolben während 24 Stunden bei 30 °C auf einer Schüttelvorrichtung inkubiert wurde, um ein Gemisch von Produkten und nicht umgesetzter Cholsäure zu erhalten. Auf diese Weise erhielt man 98,0 g Material. Dieses Gemisch wurde unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 1 der Flüssigchromatographie mit hoher Geschwindigkeit unterworfen, um die Zusammensetzung festzustellen. Die Resultate finden sich in der folgenden Tabelle 5.

Tabelle 5

Verbindungen	Verhältnis
3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure	67,7
7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure	8,3
7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure	4,0
Cholsäure	20,0

Beispiel 5

Man arbeitete in der gleichen Weise wie in Beispiel 2 mit dem Unterschied, dass man 20 ml Portionen der Impfkultur, wie sie durch Züchten während 24 Stunden bei 30 °C erhalten worden war, einem jeden Kolben hinzugab, um eine Mischung von Produkten und nicht umgesetzter Cholsäure zu erhalten. Auf diese Weise erhielt man 117,0 g eines Gemisches, das man der Chromatographie mit hoher Geschwindigkeit unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 1 unterzog, um die Zusammensetzung festzustellen. Die Resultate finden sich in der folgenden Tabelle 6.

Tabelle 6

Verbindungen	Verhältnis
3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure	63,3
7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure	23,5
7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure	2,0
Cholsäure	11,2

Beispiel 6

Der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A589-29-32 (FERM-P Nr. 5521; ATCC Nr. 31652) wurde wie folgt gezüchtet:

Die Zusammensetzung des Kulturmediums war die folgende:

Cholsäure	100 g
Ammoniumnitrat	2,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,0 g
Dikaliumhydrogenphosphat	5,0 g
Magnesiumsulfat-heptahydrat	0,2 g
Hefeextrakt	0,1 g
Natriumhydroxyd	10 g
Glucose	5,0 g
Leitungswasser bis	1 Liter

Die obigen Ingredienzien mit Ausnahme der Glucose wurden in Leitungswasser gemischt, um ein Volumen von 800 ml zu erreichen, und dann während 15 Minuten bei 120 °C in einem Autoklaven behandelt. Getrennt davon wurde die Glucose in 200 ml Leitungswasser gelöst und während 30 Minuten bei 110 °C im Autoklaven behandelt. Nach dem Kühlen wurden beide Lösungen miteinander vereinigt, wobei man ein Kulturmedium (1 Liter) erhielt. Jeweils 100-ml-Portionen dieses Kulturmediums wurden auf zehn Sakaguchi-Kolben (Volumen 500 ml) unter aseptischen Bedingungen verteilt. Jeder Kolben wurde mit 2 ml der Impfkultur versetzt, die man dadurch erhielt, dass man zuvor den Stamm in dem gleichen Medium unter Schütteln während 14 Stunden bei 30 °C züchtete. Jeder Kolben wurde während 3 Tagen bei 30 °C auf einer Schüttelvorrichtung inkubiert.

Nach beendeter Züchtung wurden die Kulturbrühen vereinigt und zentrifugiert, um mikrobielle Zellen zu entfernen. Die erhaltene, überstehende Flüssigkeit wurde durch Zugabe von 600 ml einer wässrigen 1n-Salzsäurelösung angesäuert, wodurch ein Niederschlag gebildet wurde. Dieser Niederschlag wurde abgetrennt und die verbleibende Lösung mit 1 Liter Äthylacetat extrahiert. Das Äthylacetat wurde aus dem Extrakt mit Hilfe eines Rotationsverdampfers abdestilliert und der Rückstand mit dem obigen Niederschlag vereinigt, wobei man eine Mischung von Cholansäurederivaten und Cholsäure (99,3 g) erhielt.

Eine kleine Menge dieser Mischung wurde in Methanol in einer Konzentration von 2% gelöst. Die Lösung (10 μ l) wurde in eine rasch arbeitende Flüssigchromatographievorrichtung, die mit einer μ -Bondapak- C-18-Säule (vom HLC-GPC-244-Typus) ausgerüstet war, injiziert.

Die Säule wurde mit einer Mischung von Wasser und Methanol im Mischungsverhältnis von 30:70 Vol.-Teilen bei einem pH-Wert von 4,0 mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min eluiert und der Refraktionsindex des Eluates gemessen.

Die beiliegende Fig. 5 zeigt das erhaltene Chromatogramm. Die Peaks B und D in Fig. 5 entsprechen jenen der Bezugsubstanzen 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure bzw. Cholsäure.

Beim Isolieren der Verbindung der dem Peak B entsprechenden Fraktion und bei der Bestimmung ihrer chemischen Konstitution mit Hilfe des Massenspektrums, Infrarotspektrums und magnetischen Kernresonanzspektrums bewiesen

die Spektren, dass es sich bei dieser Verbindung um die 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure handelt.

Die Ausbeute an den Produkten und die Menge an Cholsäure, welche ohne irgendwelche Änderungen zurückblieb, wurden aufgrund des Flächenverhältnisses des Chromatogramms von Fig. 5 berechnet. Die Resultate finden sich in der folgenden Tabelle 7.

Tabelle 7

Verbindungen	Umwandlungsrate* (%)	Ausbeute bzw. Menge (g)
3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure (Peak B)	98,85	98,16
andere aus Cholsäure		
erhaltene Derivate	0,59	0,59
Cholsäure (Peak D)	0,56	0,55

* Die Umwandlungsrate wurde aufgrund des Flächenverhältnisses berechnet.

Beispiel 7

Es wurde in gleicher Weise vorgegangen wie in Beispiel 6 mit dem Unterschied, dass man eine mikrobielle Zellsuspension, die man herstellte, indem man mikrobielle Zellen aus 10 ml der Impfkultur durch Zentrifugieren isolierte und sie in 10 ml sterilisiertem Wasser suspendierte, jedem Kolben anstelle von 2 ml Impfkultur hinzugab, wodurch man eine Mischung von Produkten und verbliebener Cholsäure (99,5 g) erhielt. Diese 99,5 g der Mischung wurden in 270 ml Methanol gelöst und mit 9 ml konzentrierter Salzsäure versetzt. Die so erhaltene Lösung wurde hierauf während 20 Minuten unter Rückfluss zum Sieden erhitzt, um die Produkte und die Cholsäure in die entsprechenden Methylester überzuführen.

Eine Säule von 1200 \times 70 mm Durchmesser wurde mit 1500 g Kieselgel C-200 beschickt, und dann wurden die obigen Methylester darin adsorbiert. Die Säule wurde mit einer Mischung von Chloroform und Äthanol im Mischungsverhältnis von 99:1 Vol.-Teilen eluiert, wobei man 102,0 g 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäuremethylester erhielt, den man zur Bildung von 98,5 g 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure hydrolysierte.

Beispiel 8

Man wiederholte das Verfahren gemäss Beispiel 6 mit dem Unterschied, dass die Konzentration an Cholsäure variiert wurde, dass man ferner dem Medium 10 Gew.-% Natriumhydroxyd, bezogen auf die verwendete Cholsäure, hinzugab und überdies wässrige 1n-Salzsäurelösung in einer Menge von 60 ml pro 1 g Natriumhydroxyd hinzugab, wodurch man einen Niederschlag erhielt. Die Umwandlungsrate bzw. die Ausbeute an Produkt und die Menge an verbliebener Cholsäure bei der jeweiligen Konzentration des Substrates (Cholsäure) sind aus der Tabelle 8 ersichtlich.

Tabelle 8

Verbindungen	Umwandlungsrate bzw. Ausbeute Substratkonzentration (g/l)				
	1	5	10	20	50 100 200
3 α ,7 α -Dihydroxy--12-keto-5 β -cholansäure	96,7- %*	98,0- %*	9,3 g	19,5 g	49,6 g 98,2 g 129,2 g
Cholsäure	0,4- %*	0,7- %*	0,1 g	0,2 g	0,1 g 0,6 g 70,0 g

* Umwandlungsrate

Beispiel 9

Man arbeitete gemäss den Angaben in Beispiel 6 mit dem Unterschied, dass man den Stamm *Arthrobacter* CA-35-A589-47 (FERM-P Nr. 5523; ATCC Nr. 31653) anstelle des Stammes *Arthrobacter* CA-35-A589-29-32 einsetzte, die Konzentrationen an Cholsäure und Natriumhydroxyd im Medium mit 50 g/l bzw. 5 g/l einsetzte und jeden Kolben während 35 Stunden bei 30 °C inkubierte. Auf diese Weise gelangte man zu einer Mischung von Produkten und verbliebener Cholsäure (49,31 g).

Das Gemisch wurde unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 6 der raschen Flüssigchromatographie unterworfen.

Die beiliegende Fig. 6 zeigt das so erhaltene Chromatogramm. Die Peaks A, B, C und D in Fig. 6 entsprechen jenen der Referenzverbindungen, d.h. 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure, 7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure bzw. Cholsäure.

Wurden die den Peaks A, B, C und D entsprechenden Fraktionen getrennt und der Dünnschichtchromatographie unterworfen, so enthielt jede der Peaks B, C bzw. D entsprechende Fraktion eine einzige Verbindung. Die dem Peak A entsprechende Fraktion bestand aus einer Mischung von 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure und anderem nicht-identifiziertem Material.

Die Ausbeute an Produkten und die Menge an Cholsäure, welche unverändert verblieb, wurden aufgrund des Flächenverhältnisses des Chromatogramms gemäss Fig. 6 berechnet. Die Resultate finden sich in Tabelle 9.

Tabelle 9

Verbindungen	Umwandlungsrate (%)	Ausbeute bzw. Menge (g)
7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure und nicht identifiziertes Material (Peak A)	0,80	0,39
3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure (Peak B)	98,01	48,33
7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure (Peak C)	0,25	0,13
andere Derivate	0,24	0,12
Cholsäure (Peak D)	0,70	0,35

Beispiel 10

Die Arbeitsweise war die gleiche wie in Beispiel 9 mit dem Unterschied, dass man den Stamm *Arthrobacter* CA-35-A849 (FERM-P Nr. 5524; ATCC Nr. 31654) anstelle des Stammes *Arthrobacter* CA-35-A589-47 einsetzte, wobei man zu einer Mischung von Produkten und verbliebener Cholsäure (49,34 g) gelangte.

Dieses Gemisch wurde unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 6 der raschen Flüssigchromatographie unterworfen.

Die beiliegende Fig. 7 gibt das erhaltene Chromatogramm wieder. Die Peaks A, B, C und D in Fig. 7 entsprechen jenen der Referenzverbindungen, nämlich 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure, 7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure bzw. Cholsäure.

Wurden die den Peaks A, B, C und D entsprechenden Fraktionen getrennt und der Dünnschichtchromatographie unterworfen, so enthielt jede Fraktion eine einzige Verbindung.

Die Ausbeute an Produkten und die Menge an Cholsäure, welche ohne verändert zu werden, darin verblieb, wurden aufgrund des Flächenverhältnisses des Chromatogramms

gemäss Fig. 7 berechnet. Die Resultate finden sich in der folgenden Tabelle 10.

Tabelle 10

Verbindungen	Umwandlungsrate (%)	Ausbeute bzw. Menge (g)
7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure (Peak A)	3,2	1,58
3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure (Peak B)	83,5	41,20
7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure (Peak C)	7,9	3,90
andere Derivate	2,8	1,38
Cholsäure (Peak D)	2,6	1,28

Beispiel 11

Es wurde in gleicher Weise wie in Beispiel 9 gearbeitet mit dem Unterschied, dass man den Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1071-15 (FERM.P Nr. 5525; ATCC Nr. 31655) anstelle des Stammes *Arthrobacter* CA-35-A589-47 einsetzte. Auf diese Weise gelangte man zu einem Gemisch von Produkten und verbliebender Cholsäure (49,1 g).

Dieses Gemisch wurde der raschen Flüssigchromatographie unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 6 unterzogen.

Die beiliegende Fig. 8 zeigt das erhaltene Chromatogramm. Die Peaks A, B, C und D in Fig. 8 entsprechen jenen der Referenzverbindungen, nämlich 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure, 7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure bzw. Cholsäure.

Beim Trennen der den Peaks A, B, C und D entsprechenden Fraktionen und nach erfolgter Flüssigchromatographie enthielt jede der den Peaks B, C oder D entsprechende Fraktion eine einzige Verbindung. Die dem Peak A entsprechende Fraktion bestand aus einer Mischung der 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure und einem anderen nicht identifizierten Material.

Die Ausbeuten dieser Produkte und die Mengen der verbliebenen Cholsäure wurden aufgrund des Oberflächenverhältnisses des Chromatogramms gemäss Fig. 8 berechnet. Die Resultate finden sich in der folgenden Tabelle 11.

Tabelle 11

Verbindungen	Umwandlungsrate (%)	Ausbeute bzw. Menge (g)
7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure und nicht identifiziertes Material (Peak A)	5,2	2,56
3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure (Peak B)	93,9	46,30
7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure (Peak C)	0,2	0,10
andere Derivate	0,2	0,10
Cholsäure	0,5	0,25

Beispiel 12

Es wurde nach den Angaben gemäss Beispiel 9 gearbeitet mit dem Unterschied, dass der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1448 (FERM-P Nr. 5526; ATCC Nr. 31656) anstelle des Stammes *Arthrobacter* CA-35-A589-47 verwendet wurde, wobei man zu einer Mischung von Produkten und verbliebener Cholsäure (49,30 g) gelangte.

Dieses Gemisch wurde in der gleichen Weise wie in Beispiel 6 der raschen Flüssigchromatographie unterworfen.

Die beiliegende Fig. 9 zeigt das erhaltene Chromato-

gramm. Die Peaks A, B, C und D gemäss Fig. 9 entsprechen jenen der Referenzverbindungen, nämlich 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure, 7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure bzw. Cholsäure.

Wurden die den Peaks A, B, C und D entsprechenden Fraktionen getrennt und der Dünnschichtchromatographie unterzogen, so enthielt jede der den Peaks B, C oder D entsprechende Fraktion eine einzige Verbindung. Die dem Peak A entsprechende Fraktion bestand aus einer Mischung der 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure und anderem nicht identifiziertem Material.

Die Ausbeuten an Produkten und die Mengen an Cholsäure, welche unverändert blieb, wurden aufgrund des Flächenverhältnisses des Chromatogramms gemäss Fig. 9 berechnet. Die Resultate finden sich in der folgenden Tabelle 12.

Tabelle 12

Verbindungen	Umwandlungsrate (%)	Ausbeute bzw. Menge (g)
7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure und nicht identifiziertes Material (Peak A)	6,5	3,20
3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure (Peak B)	88,0	43,39
7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure (Peak C)	0,3	0,15
andere Derivate	0,1	0,05
Cholsäure (Peak D)	5,1	2,51

Beispiel 13

Es wurde nach den gleichen Angaben wie in Beispiel 9 gearbeitet mit dem Unterschied, dass man den Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1475 (FERM-P Nr. 5527; ATCC Nr. 31657) anstelle des Stammes *Arthrobacter* CA-35-A589-47 einsetzte. Auf diese Weise erhielt man eine Mischung von Produkten und Cholsäure, welche unverändert blieb (49,35 g).

Dieses Gemisch wurde unter den gleichen Bedingungen, wie dies in Beispiel 6 beschrieben worden ist, einer rasch verlaufenden Flüssigchromatographie unterworfen.

Die beiliegende Fig. 10 zeigt das erhaltene Chromatogramm. Die Peaks A, B, C und D in Fig. 10 entsprechen jenen der Referenzverbindungen, nämlich 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure, 7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure bzw. Cholsäure.

Wurden die den Peaks A, B, C und D entsprechenden Fraktionen getrennt und der Dünnschichtchromatographie unterworfen, so enthielt jede Fraktion eine einzige Verbindung.

Die Ausbeuten an Produkten und die Mengen an Cholsäure wurden aufgrund des Flächenverhältnisses des Chromatogramms gemäss Fig. 10 berechnet. Die Resultate finden sich in der folgenden Tabelle 13.

Tabelle 13

Verbindungen	Umwandlungsrate (%)	Ausbeute bzw. Menge (g)
7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure (Peak A)	3,26	1,61
3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure (Peak B)	92,0	45,40
7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure (Peak C)	0,20	0,10
andere Derivate	geringe Menge	-
Cholsäure (Peak D)	4,54	2,24

Beispiel 14

Man arbeitete nach den Angaben gemäss Beispiel 9 mit dem Unterschied, dass der Stamm *Arthrobacter* CA-35-A-1766-15 (FERM-P Nr. 5528; ATCC Nr. 31658) anstelle des Stammes *Arthrobacter* CA-35-A589-47 verwendet wurde. Auf diese Weise erhielt man eine Mischung von Produkten und Cholsäure (49,27 g).

Dieses Gemisch wurde unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 6 der Flüssigchromatographie mit grosser Geschwindigkeit unterworfen.

Die beiliegende Fig. 11 zeigt das erhaltene Chromatogramm. Die Peaks A, B und D in der Fig. 11 entsprechen jenen der Referenzverbindungen, d.h. der 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure bzw. Cholsäure.

Wurden die den Peaks A, B und D entsprechenden Fraktionen getrennt und der Dünnschichtchromatographie unterworfen, so enthielt jede der Fraktionen eine einzige Verbindung.

Die Ausbeuten an Produkten und die Menge an verbleibender Cholsäure wurden aufgrund des Flächenverhältnisses des Chromatogramms gemäss Fig. 10 berechnet. Die Resultate finden sich in der folgenden Tabelle 14.

Tabelle 14

Verbindungen	Umwandlungsrate (%)	Ausbeute bzw. Menge (g)
7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure (Peak A)	0,23	0,11
3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure (Peak B)	97,02	47,80
andere Derivate	0,75	0,37
Cholsäure (Peak D)	2,0	0,99

Beispiel 15

Es wurde nach den gleichen Angaben wie in Beispiel 9 gearbeitet mit dem Unterschied, dass man den Stamm *Arthrobacter* CA-35-M-965-3 (FERM-P Nr. 5529; ATCC Nr. 31659) anstelle des Stammes *Arthrobacter* CA-35-A589-47 einsetzte, wobei man zu einem Gemisch von Produkten und Cholsäure (49,36 g) gelangte.

Dieses Gemisch wurde der raschen Flüssigchromatographie unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 6 unterzogen.

Die beiliegende Fig. 12 zeigt das erhaltene Chromatogramm. Die Peaks A, B und D gemäss Fig. 12 entsprechen jenen der Referenzverbindungen, nämlich 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure bzw. Cholsäure.

Wurden die den Peaks A, B und D entsprechenden Fraktionen getrennt und der Dünnschichtchromatographie unterworfen, so enthielt jede der Peaks B oder D entsprechende Fraktion eine einzige Verbindung. Die dem Peak A entsprechende Fraktion bestand aus einem Gemisch der 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure und einem anderen nicht identifizierten Material.

Die Ausbeuten an Produkten und die Menge an verbleibender Cholsäure wurden aufgrund des Flächenverhältnisses des Chromatogramms gemäss Fig. 12 berechnet. Die Resultate finden sich in der folgenden Tabelle 15.

Tabelle 15

Verbindungen	Umwandlungsrate (%)	Ausbeute bzw. Menge (g)
7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure und nicht identifiziertes Material (Peak A)	8,6	4,24
3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure (Peak B)	85,3	42,11
andere Derivate	2,0	0,99
Cholsäure (Peak D)	4,1	2,02

Beispiel 16

Man arbeitete in gleicher Weise wie in Beispiel 9 mit dem Unterschied, dass man den Stamm *Arthrobacter* CA-35-Y-37-12 (FERM-P Nr. 5530; ATCC Nr. 31660) anstelle des Stammes *Arthrobacter* CA-35-A589-47 einsetzte. Auf diese Weise erhielt man ein Gemisch von Produkten und Cholsäure (49,33 g).

Dieses Gemisch wurde unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 6 einer raschen Flüssigchromatographie unterworfen.

Beiliegende Fig. 13 zeigt das erhaltene Chromatogramm. Die Peaks A, B, C und D gemäss Fig. 13 entsprechen jenen der Referenzverbindungen, nämlich 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure, 7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure bzw. Cholsäure.

Beim Trennen der den Peaks A, B, C und D entsprechenden Fraktionen und nach erfolgter Dünnschichtchromatographie erhielt man in jeder Fraktion eine einzige Verbindung.

Die Ausbeute an Produkten und die Menge an verbleibender Cholsäure wurden aufgrund des Flächenverhältnisses gemäss Fig. 13 berechnet. Die Resultate finden sich in der Tabelle 16.

Tabelle 16

Verbindungen	Umwandlungsrate (%)	Ausbeute bzw. Menge (g)
7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure (Peak A)	7,7	3,80
3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure (Peak B)	90,0	44,40
7 α ,12 α -Dihydroxy-3-keto-5 β -cholansäure (Peak C)	0,3	0,15
Cholsäure (Peak D)	2,0	0,98

Beispiel 17

Es wurde in der gleichen Weise wie in Beispiel 1 gearbeitet, wobei man aber den Stamm *Brevibacterium* CA-6 (FERM-P Nr. 5144; ATCC Nr. 31661) anstelle des Stammes *Arthrobacter* CA-35 zur Anwendung brachte.

Das so erhaltene Gemisch von Produkten und verbleibender Cholsäure wurde mit hoher Geschwindigkeit der Flüssigchromatographie gemäss Angaben in Beispiel 1 unterworfen.

Die beiliegende Fig. 14 zeigt das erhaltene Chromatogramm.

Wurden die den Verbindungen in den Peaks E, A, B und D entsprechenden Fraktionen isoliert und ihre chemischen Konstitutionen mittels Massenspektren, Infrarotspektren und magnetischen Kernresonanzspektren bestimmt, so ergaben diese Spektren, dass es sich bei diesen Verbindungen um die 7 α -Hydroxy-3,12-diketo- Δ^4 -cholensäure, 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure bzw. Cholsäure handelte. Die Verbindungen in den den Peaks X und Y entsprechenden Fraktionen wurden nicht identifiziert.

Im Chromatogramm gemäss Fig. 14 ist das Flächenverhältnis der Peaks mit Ausnahme der Peaks X und Y (d.h. das Flächenverhältnis E:A:B:D) = 12,2:22,2:44,9:20,7.

5 Beispiel 18

Es wurde in gleicher Weise wie in Beispiel 1 gearbeitet mit dem Unterschied, dass man den Stamm *Corynebacterium* CA-53 (FERM-P Nr. 5532; ATCC Nr. 31662) anstelle des Stammes *Arthrobacter* CA-35 verwendete, wobei man zu einem Gemisch von Produkten und Cholsäure (82 g) gelangte.

Das so erhaltene Gemisch wurde unter den gleichen Bedingungen wie in Beispiel 1 der rasch verlaufenden Flüssigchromatographie unterworfen, mit dem Unterschied jedoch, dass man anstelle der Mischung von Wasser und Methanol im Mischungsverhältnis von 30:70 Vol.-Teilen bei einem pH-Wert von 2,5 eine Mischung von Wasser und Methanol im Mischungsverhältnis von 30:70 Vol.-Teilen bei einem pH-Wert von 4,0 einsetzte.

Die beiliegende Fig. 15 zeigt das erhaltene Chromatogramm. Die Peaks A, B, C und D in Fig. 15 entsprechen jenen der Referenzverbindungen, nämlich 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure, 7 α -Hydroxy-3,12-diketo- Δ^4 -cholensäure bzw. Cholsäure.

Wurden die Verbindungen in den den Peaks A, B und C entsprechenden Fraktionen isoliert und ihre chemischen Konstitutionen mittels Massenspektren, Infrarotspektren und magnetischen Kernresonanzspektren bestimmt, so zeigten diese Spektren, dass es sich bei diesen Verbindungen um die 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure, 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure bzw. 7 α -Hydroxy-3,12-diketo- Δ^4 -cholensäure handelte.

Referenzbeispiel 1

10 g der so erhaltenen 3 α ,7 α -Dihydroxy-12-keto-5 β -cholansäure wurden in einen Dreihalsrundkolben eingetragen und langsam mit 100 ml Äthylenglycol und einer wässrigen Kaliumhydroxydlösung (10 g Kaliumhydroxyd + 20 ml Wasser) versetzt. Hierauf gab man 10 ml 85%iges Hydrazinhydrat hinzu und erhitze das erhaltene Gemisch während 2 Stunden bei 100 °C unter Rückfluss. Hierauf wurde die Temperatur allmählich erhöht und das Gemisch während 4 Stunden bei einer Rückflusstemperatur von 185 bis 190 °C behandelt, um das Hydrazinhydrat abdestillieren. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch mit einem Überschuss von Wasser verdünnt und der pH-Wert auf 3 eingestellt. Dabei bildete sich ein Niederschlag. Der Niederschlag wurde durch Filtrieren gesammelt, mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet, wobei man 8,5 g 3 α ,7 α -Dihydroxy-5 β -cholansäure (CDCA) bei einer Ausbeute von 8,5 g erhielt.

Referenzbeispiel 2

In einem Dreihalsrundkolben wurden 3 g der nach den obigen Beispielen erhaltenen 7 α -Hydroxy-3,12-diketo-5 β -cholansäure in 70 ml Pyridin gelöst und diese Lösung dann mit 1 Mol Tosylchlorid versetzt. Das so erhaltene Gemisch wurde während 1 Stunde bei 0 °C umgesetzt und hierauf während 5 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Anschliessend wurde wässrige 3n-Salzsäure hinzugegeben und das Reaktionsgemisch mit 100 ml Äther extrahiert. Der Äther wurde unter vermindertem Druck aus dem Extrakt abdestilliert, wobei man 2,5 g Δ^6 - und/oder Δ^7 -Diketo-cholensäure erhielt. 2 g des so erhaltenen Produktes wurden in 10 ml einer wässrigen 1n-Natriumhydroxydlösung gelöst und diese Lösung mit 0,1 g Raneynickel versetzt. Nach der Zugabe von 0,01 Mol Wasserstoff wurde das Gemisch über Nacht zur Umsetzung gebracht, wobei man 3 α ,12 α -Dihydroxy-5 β -cholansäure (Desoxycholinsäure) und 3 α ,12 β -Dihydroxy-5 β -cholansäure in einer Ausbeute von 90% erhielt.

Fig. 1

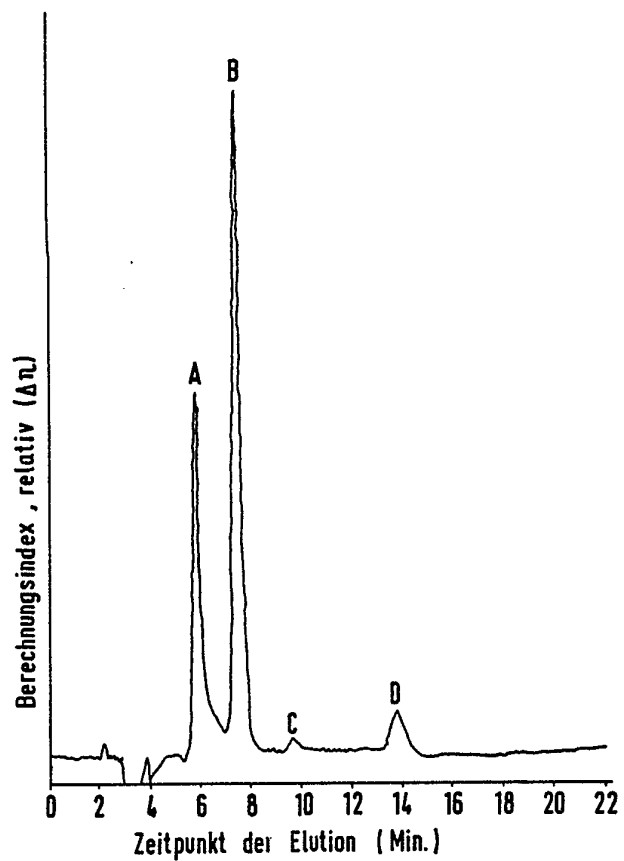


Fig. 2

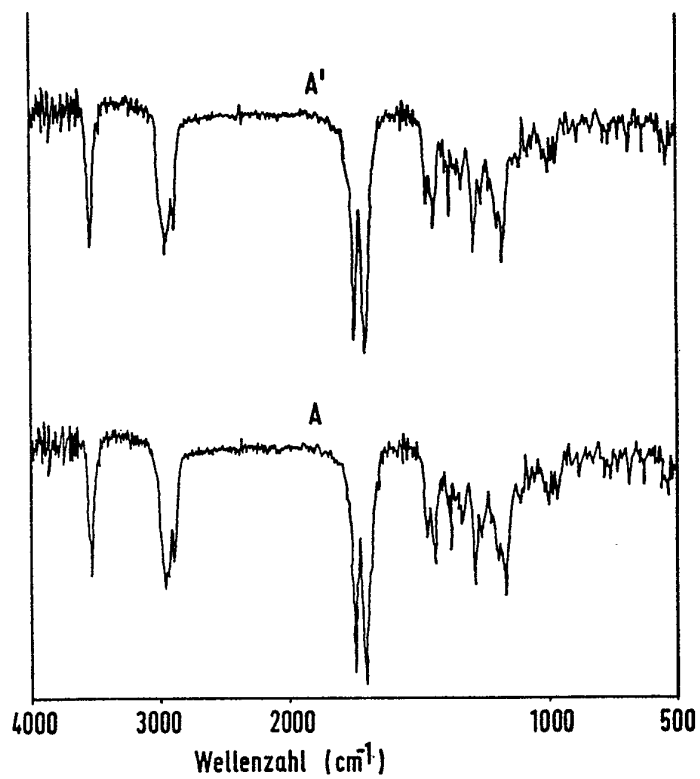


Fig. 3

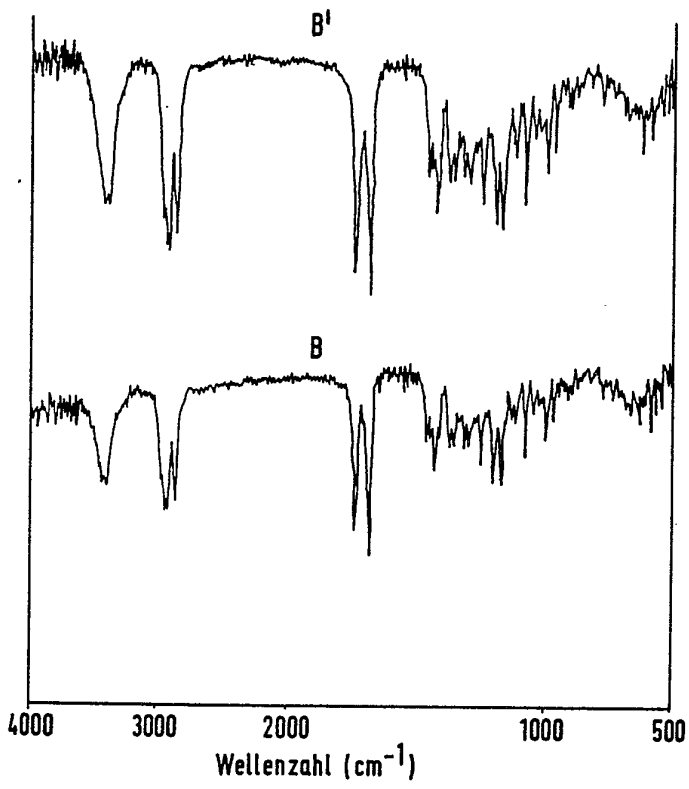


Fig. 4

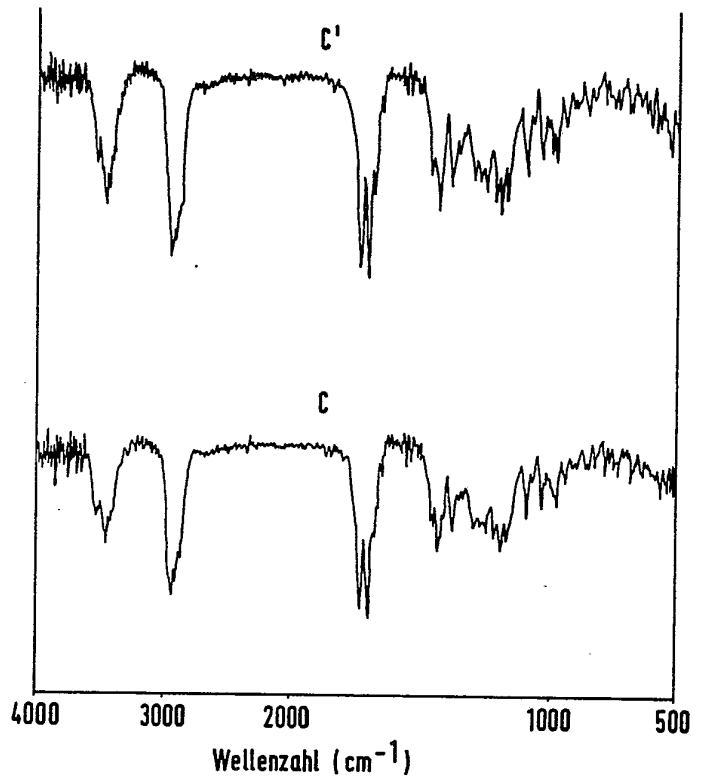


Fig. 5

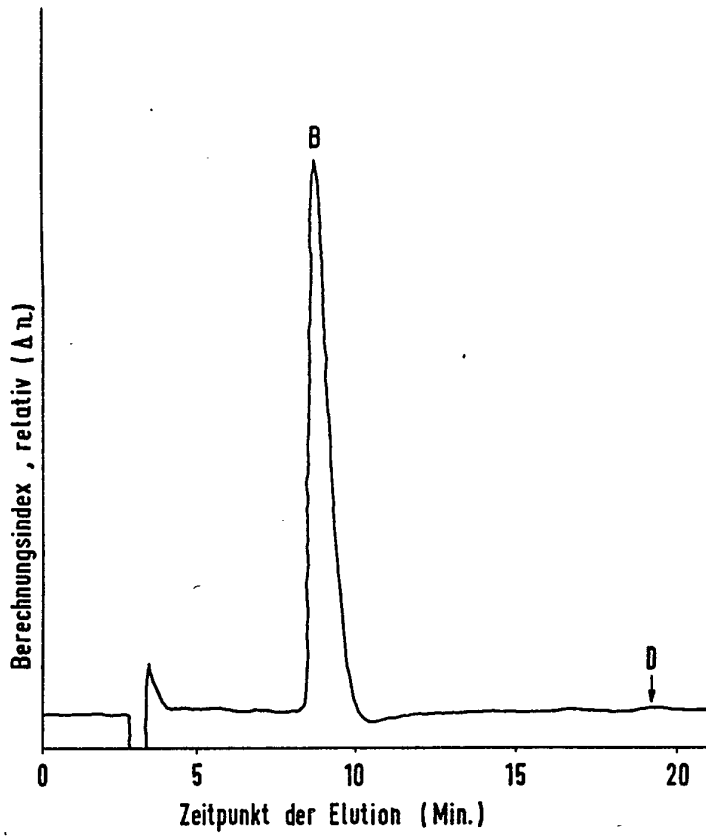


Fig. 6

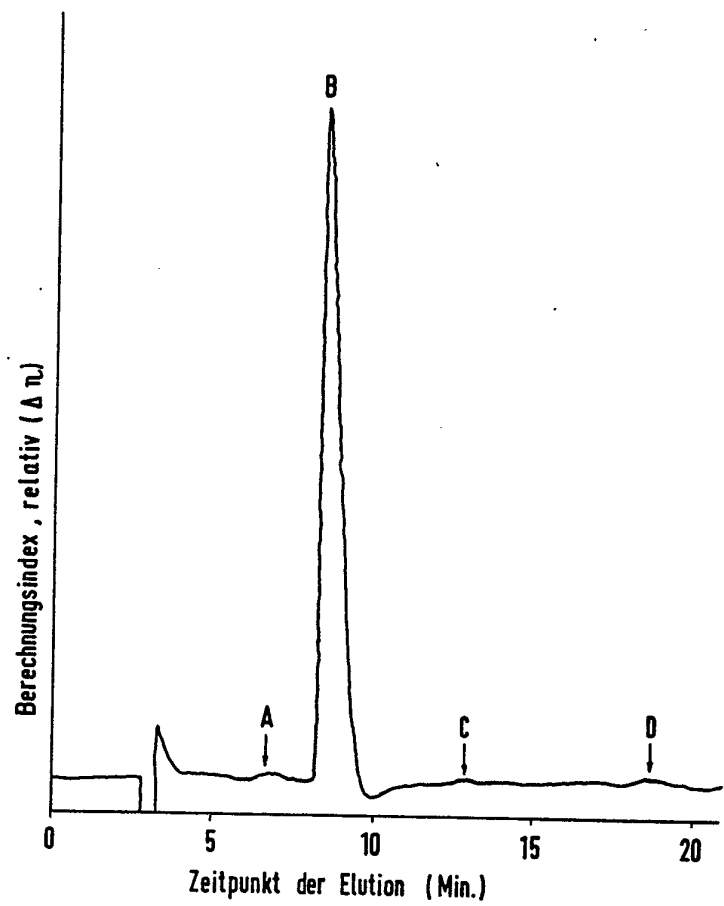


Fig. 7

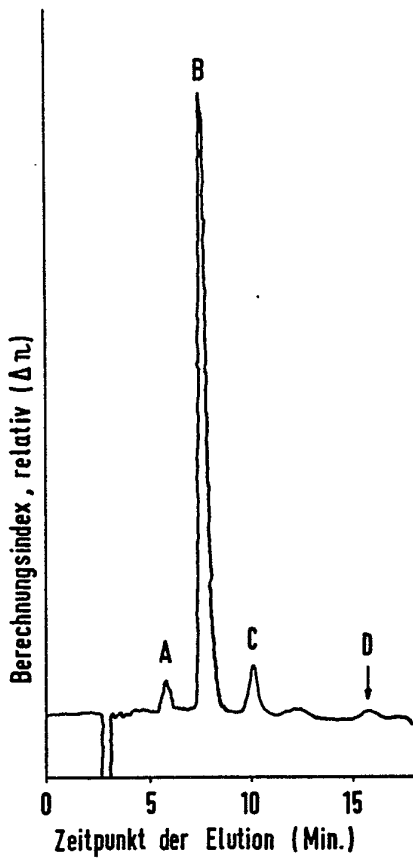


Fig. 8

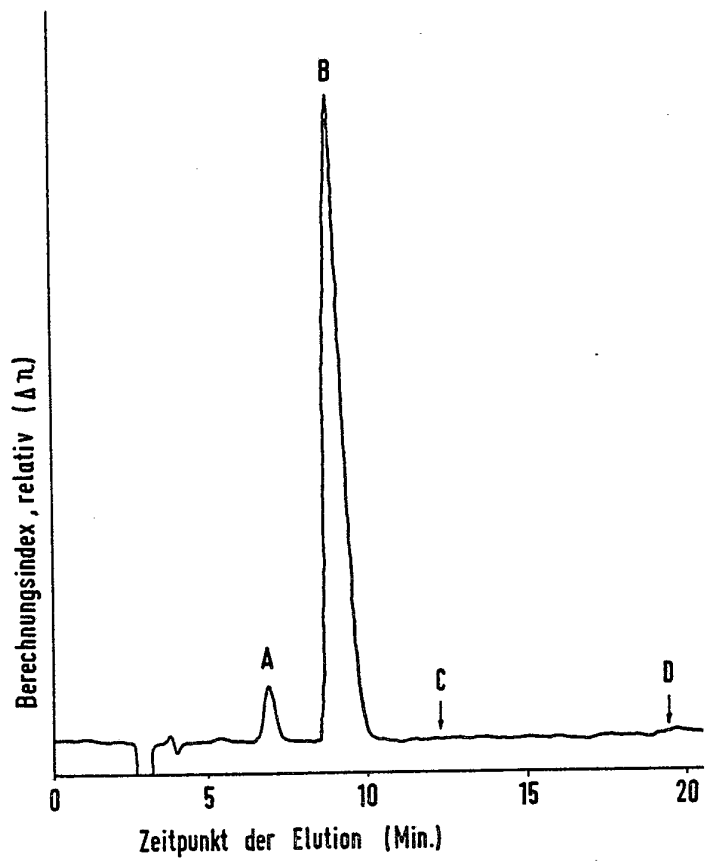


Fig. 9

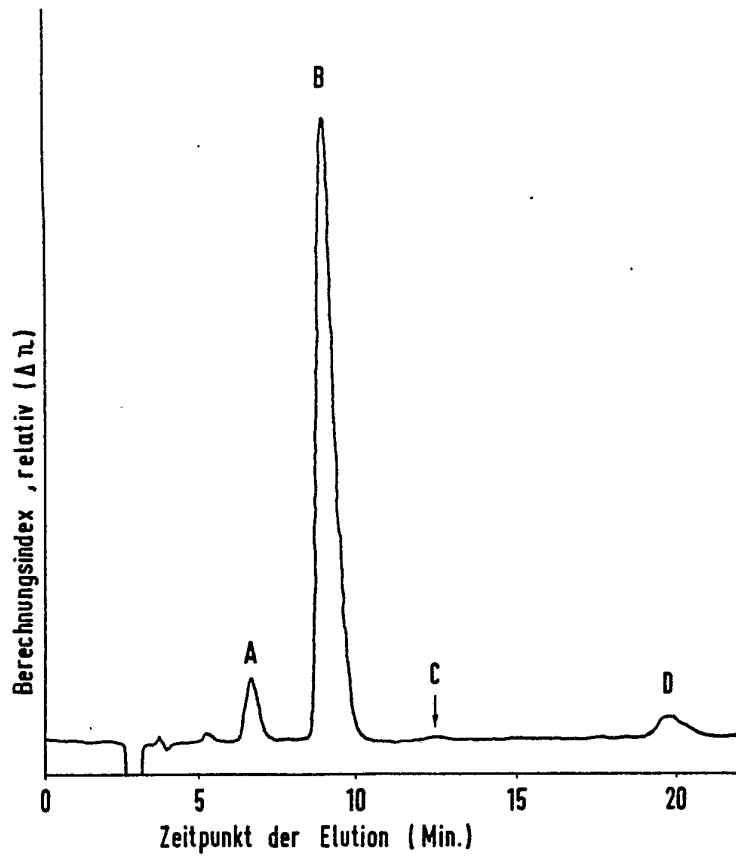


Fig. 10

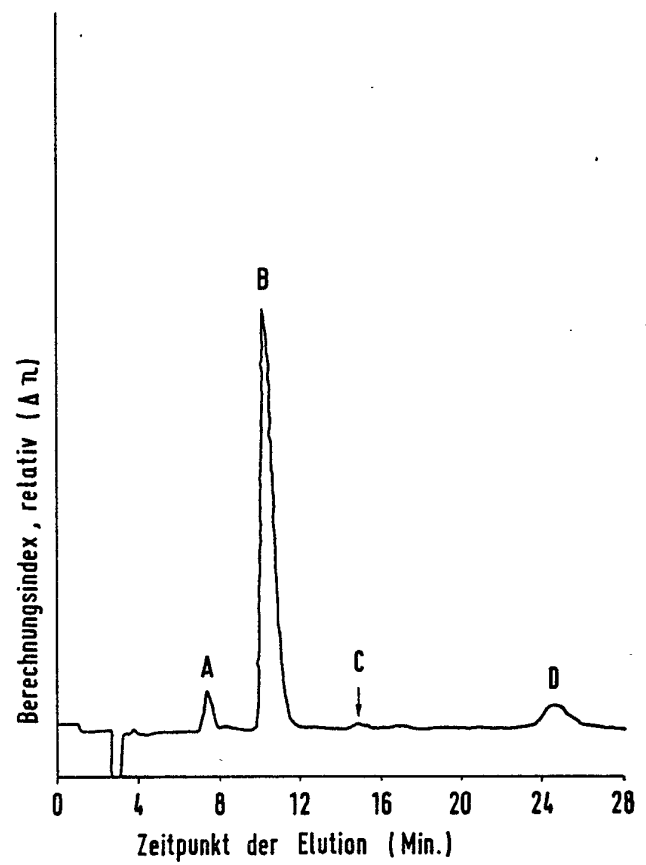


Fig. 11

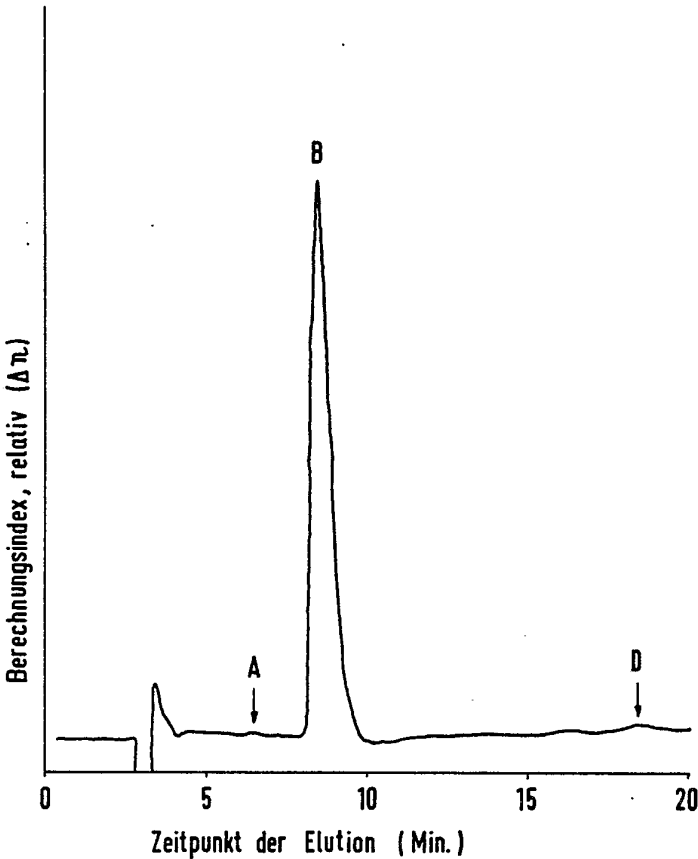


Fig. 12

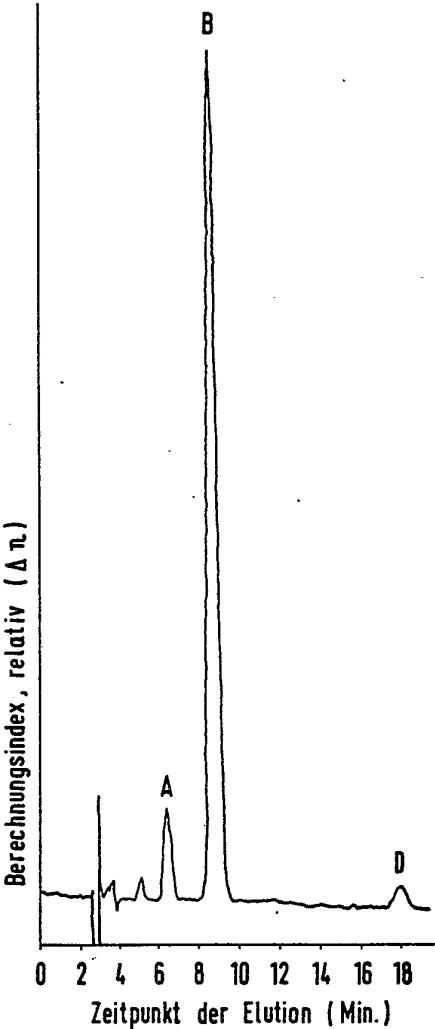


Fig. 13

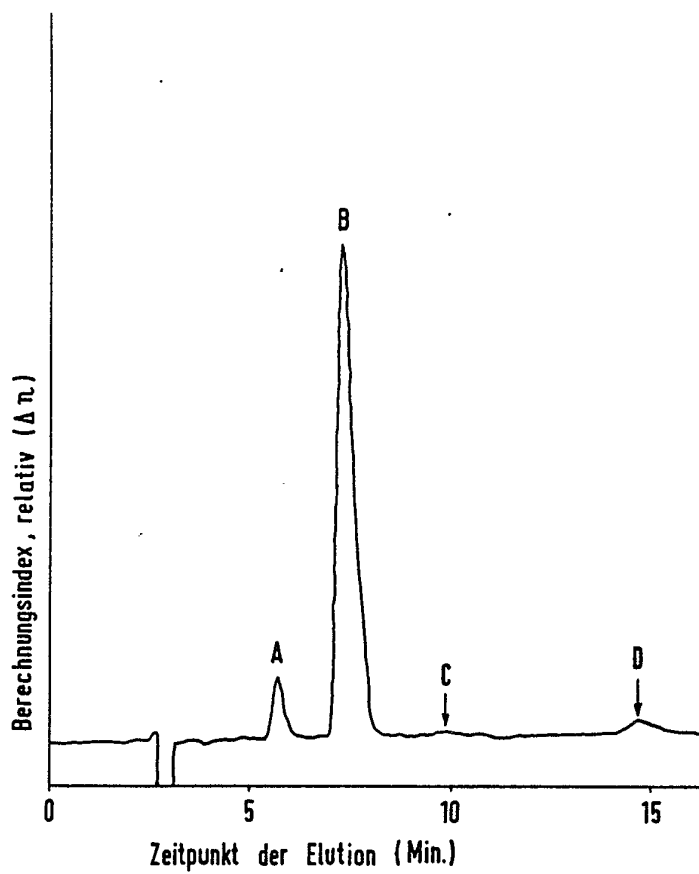


Fig. 14

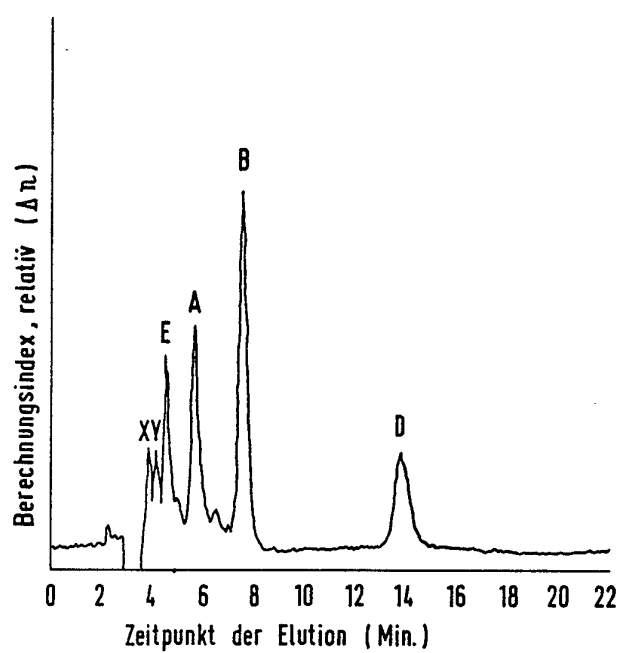


Fig. 15

