

Conversión de androstadiona (AD) en androstadiendiona (ADD) en cultivos mixtos *Mycobacterium* – *Nocardiodes*.

C.E. Pérez, N.Llanes, B.R.Hung, A.Falero, B.Aguila, M.E. Hervé, M.Fonseca, E. Martí.

Departamento de Procesos Biotecnológicos. Centro Nac. Invest. Científicas. Ave 25 y 158, Cubanacán, Playa, POBox 6990, Habana, Cuba. email: celso@biocenic.cneuro.cu

Recibido: 9 de agosto de 2002

Aceptado: 4 de diciembre de 2002

Palabras clave: *Mycobacterium*, *Nocardiodes*, bioconversión, esteroides, AD, ADD.

Key words: *Mycobacterium*, *Nocardiodes*, bioconversion, steroids, AD, ADD.

RESUMEN: La producción de ADD en fermentaciones con cepas de *Mycobacterium*, en ocasiones ven limitados sus rendimientos por una cierta proporción de AD presente en los caldos fermentativos, que por demás puede interferir en los procesos posteriores de cristalización y purificación del ADD. La experiencia demuestra que para porcentajes de AD superiores al 10 %, con respectp al total, la interferencia es notable. Una forma de solucionar esta dificultad pudiera ser tratar de ensayar la bioconversión del AD en ADD en el propio caldo de fermentación, aprovechando la actividad esteroide 1,2 deshidrogenasa, característica de *Nocardiodes*. La actividad esteroide 1,2 deshidrogenasa de *Nocardiodes simplex* NCIMB 8929, es utilizada para la conversión de AD en ADD. Luego de 96 h de biotransformación inicial de colesterol a AD mediante *Mycobacterium sp.* MB3683, se añaden células frescas de *Nocardiodes*, que son capaces de transformar totalmente el AD producido en ADD, al cabo de las 18 horas subsiguientes. Se demuestra que la bioconversión fue mas efectiva en cultivos previamente inducidos con AD, 0.05 mg/mL durante 5 horas. Además, se observa que la eficiencia de esta conversión se incrementa si se utilizan mutantes con una actividad incrementada de la enzima en cuestión. Estos resultados permiten sugerir esta metodología como una alternativa para la recuperación de fermentaciones de ADD en procesos a mayor escala.

ABSTRACT: ADD yield in fermentations from cholesterol using mycobacteria may be limited by a certain amount of AD, also produced in fermentation broths, which can interfere further crystalization and purification processes. In general, it has been demonstated that for AD over 10%, the interference is highly remarkable. In order to face this problem, the 1,2 dehydrogenase activity from NCIMB 8929 *Nocardiodes simplex* was used for AD conversion to ADD in cholesterol fermentations by an AD-producing mycobacterial strain *Mycobacterium sp.* MB 3683. After 96 hours of an initial biotransformation by mycobacteria, *Nocardiodes* young cultures were added and 18 hours later, all the AD produced was transformed to ADD. If *Nocardiodes* cultures were previously induced with AD, 0.05 mg/mL, for 5 hours, a better response was noticed. Furthemore, It was observed that efficiency of conversion was higher in a derived mutant showing a higher activity of this enzyme. The results may suggest the use of this strategy for recovering and thus enhancing ADD yield in scale-up fementations that otherwise must be discarded.

INTRODUCCIÓN

La biotransformación de esteroides es un proceso bien establecido para la obtención de precursores esteroidales avanzados tipo androstanos ¹. De ellos, el Androstadiona (AD) y el Androstadienediona (ADD) son los mas empleados en la industria para la síntesis química posterior de esteroides de interés farmacológico ². Estos compuestos tradicionalmente pueden ser obtenidos mediante fermentaciones a partir de diferentes materias primas (colesterol o mezclas de fitosteroles, por ejemplo) que utilizan cepas de diversos géneros microbianos, tales como *Nocardiodes* y *Mycobacterium* entre otros, con rendimientos relativamente altos, en procesos costeables ³.

Sin embargo, en ocasiones la producción de ADD en fermentaciones con cepas de *Mycobacterium*, ven limitados sus rendimientos por una cierta proporción de AD presente en los caldos fermentativos, que por demás puede interferir en los procesos posteriores de cristalización y purificación del ADD ⁴. Se conoce que por encima del 10 % de AD en tales casos, la interferencia en estos procesos es notable.

Una forma de solucionar esta dificultad pudiera ser tratar de ensayar la bioconversión del AD en ADD en el propio caldo de fermentación, aprove-

chando la actividad esteroide 1,2 deshidrogenasa, característica de *Nocardiodes*⁵.

Se muestran los resultados del ensayo de fermentaciones mixtas *Mycobacterium* – *Nocardiodes*, empleando cepas de colección y mutantes aislados mediante mutagénesis química clásica con nitrosoguanidina. Luego de una primera fase (96 h) de conversión del colesterol a AD con *Mycobacterium*, se observa una conversión completa de todo el AD en ADD al cabo de 18 h de incubación adicionales con células de *Nocardiodes*. El proceso se acelera si se emplean mutantes con una mayor actividad de la enzima en cuestión.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Microorganismos

Cepa MB3683 *Mycobacterium* sp., ampliamente utilizada en la biotransformación de esteroides, convierte estos precursores mayoritariamente a AD y a ADD en una menor proporción¹.

Cepa NCIMB 8929 *Nocardiodes simplex*, con una alta actividad esteroide 1,2 deshidrogenasa⁵.

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Todas las cepas utilizadas fueron conservadas en agar nutriente, según se reporta en la literatura⁶. Los

cultivos fueron preparados a partir de células frescas, crecidas durante cinco días a 30° C, en cuñas de agar nutriente.

En el caso de las cepas de *Mycobacterium*, los medios utilizados y las condiciones de crecimiento fueron semejantes a los reportados anteriormente⁷.

Para las cepas de *Nocardiodes*, el protocolo seguido fue el reportado por Falero *et al.*⁵.

Aislamiento de mutantes con actividad esteroide deshidrogenasa incrementada.

Cultivos jóvenes NB (0.8% nutrient broth, 0.1% yeast extract, 2% glicerol) de *Nocardiodes simplex* fueron centrifugados y resuspendidos en 0.8 M Tampón Citrato de Sodio, pH 5.6. Luego de mutagénesis con nitrosoguanidina (1 mg/mL), durante 30 min., las células fueron sembradas sobre medio NBA (medio NB + 2% agar OXOID No.3) conteniendo ADD, 1 mg/mL. Las colonias resistentes a ADD que crecieron de forma estable, fueron seleccionadas y sometidas a estudios posteriores de actividad enzimática.

Ensayos de biotransformación del colesterol.

50 mL de medio MS (5.4 % v/v miel final, 0.6% NO₃Na, 0.3% NH₄(PO₄)₂, 0.6% glucosa), fueon inoculados con células frescas de *Mycobacterium*, previamente crecidas en medio NB + 1% Tween 80.

Como sustrato fue empleado el colesterol, 1 mg/mL resuspendido en 1 % Tween 80.

Luego de 96 horas de incubación en zaranda, 200 rpm y a 30 ° C, los cultivos fueron esterilizados en autoclave. Finalmente, 5 mL de cultivos de *Nocardiodes* en medio YEL (1% yeast extract, K₂HPO₄, KH₂PO₄, pH7.2), crecidos durante 24 horas, 30 °C y 200 rpm en zaranda, fueron inoculados a los caldos fermentativos a diferentes tiempos.

La cuantificación final de los intermediarios AD y ADD fue realizada según protocolo establecido⁷, luego de esterilización por autoclave de los caldos fermentativos. Los valores mostrados corresponden a los promedios de tres determinaciones independientes.

Determinación de la actividad esteroide 1,2 deshidrogenasa

Para determinar la actividad enzimática esteroide deshidrogenasa, las suspensiones celulares fueron preparadas a partir de cultivos en medio YEL, de acuerdo a resultados previos de Falero *et al.*⁵

La determinación de la actividad enzimática se realizó según se muestra en la Tabla 1.

Los resultados de las actividades se refieren a las biomásas obtenidas, expresadas como masa seca, en mg/mL

Tabla 1. Condiciones experimentales para determinar la actividad esteroide-1,2-deshidrogenasa en *N. Simples* CIMB 8929.

Mezcla de reacción (vol. total 1 mL)	Sustrato	Blanco Muestra (uL)	Reacción (uL)
Tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 8.8	50	940	40
Azul de metileno* (0.4 mg/mL)	50	50	50
AD (20 mg/mL)	-	10	10
Suspensión celular	900	-	900

* Aceptor electrónico

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de mutantes con una actividad esteroide 1,2 deshidrogenasa incrementada.

La posibilidad de emplear mutantes resistentes a androstanos ha sido señalada por otros autores como una vía para incrementar los rendimientos finales de estos precursores esteroideos en fermentaciones diseñadas a tales fines⁸. En estas condiciones, la célula micro-

biana sería capaz de sobreponerse al efecto tóxico que suponen los androstanos producidos, ya sea el AD o el ADD.

Si bien los mecanismos bioquímicos implicados en este fenotipo no han sido totalmente dilucidados, resultados parciales en *Mycobacterium* indican que la resistencia al ADD puede estar relacionada en ciertos casos con un aumento relativo en la actividad de la enzima esteroide 1,2 deshidroge-

nasa⁹.

Un número de colonias de *Nocardiodes simplex*, seleccionadas como resistentes a ADD, según Materiales y Métodos, mostraron una actividad enzimática superior a la cepa de origen. De ellas fue tomada la colonia designada como R17, de fenotipo estable y con una actividad enzimática que prácticamente duplica el valor observado en la cepa de origen. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividad enzimática esteroide 1,2 deshidrogenasa en *Nocardiodes simplex* NCIMB 8929 y mutante R17.

Cepa	ADD (μg)	$\Delta\text{E}(\text{U})^*$	Masa seca (mg/mL)	$\Delta\text{esp. (U/mg)}^*$
NCIMB 8929				
<i>N.simplex</i>	148.4	26.1	19	1.4
R17	135.3	23.8	9.7	2.5

* $\Delta\text{E} = \mu\text{g ADD} / \text{PM} / 20 \text{ min} = \mu\text{mol} / \text{min}$, actividad enzimática.

$\Delta\text{esp} = \Delta\text{E} / \text{MS}(\text{mg/mL}) = \text{U} / \text{mg}$, actividad específica

PM = 284, peso molecular ADD.

A partir de los resultados anteriores, se hicieron ensayos de biotransformación mixta *Mycobacterium* – *Nocardiodes* empleando ambas cepas. Es de esperar que en el caso del mutante R17 debido a la mayor actividad de la enzima esteroide 1,2 deshidrogenasa, de alguna forma la conversión del AD a ADD sea mas eficiente. Un estudio de la cinética del proceso puede esclarecer esta cuestión.

Cinética de bioconversión AD a ADD en cultivos mixtos.

Con el objetivo de determinar los tiempos mas adecuados para llevar a cabo la bioconversión AD a ADD mediante células de *Nocardiodes*, se ensayaron biotransformaciones mixtas a diferentes tiempos. La Fig.1 muestra los resultados.

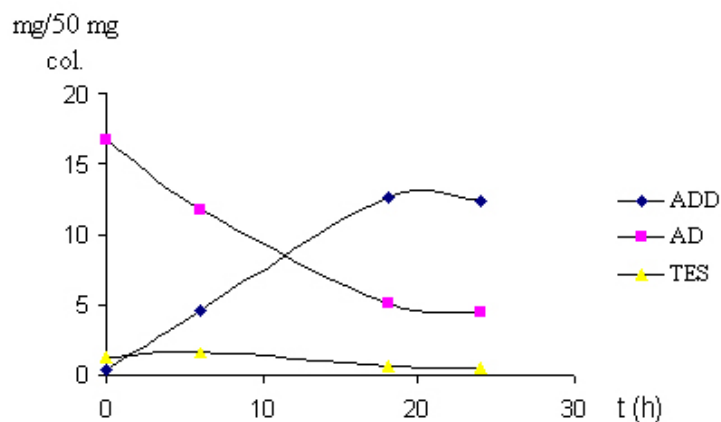


Fig. 1. Bioconversión AD a ADD mediante células de *Nocardiodes simplex* NCIMB 8929. Col: colesterol, TES: testosterona.

Los valores que aparecen en la figura representan el promedio de tres determinaciones independientes.

Se observa una conversión efectiva del AD a ADD, al cabo de las 18 h de incubación adicional con células de *Nocardiodes*, prácticamente el 75.6 % de todo el AD producido es transformado a ADD. Sin embargo, para tiempos posteriores el efecto cesa, de forma tal que siempre queda una cierta cantidad remanente de AD. Bioconversión mixta mediante células de *Nocardiodes simplex* inducidas con AD.

Las cantidades remanentes de AD en los experimentos anteriores pudieran ser transformadas totalmente a ADD, si las células de *N.simplex* fueran inducidas previamente con AD. Debido a su naturaleza inducible¹⁰, la deshidrogenación de AD a ADD debe ocurrir mucho mas eficientemente en tales condiciones. Para la inducción de los cultivos de *Nocardiodes*, el AD fue añadido 5 horas previamente, a una concentración de 0.05 mg/mL.

La deshidrogenación parece ser mas eficiente (Fig.2) a las 17 horas después de añadidas las células de *N.simplex*. Aparentemente todo el AD presente en el experimento control fue transformado a ADD. No es posible en estas condiciones evitar ciertos niveles de AD que parecen ser refractarios a la 1,2 deshidrogenación.

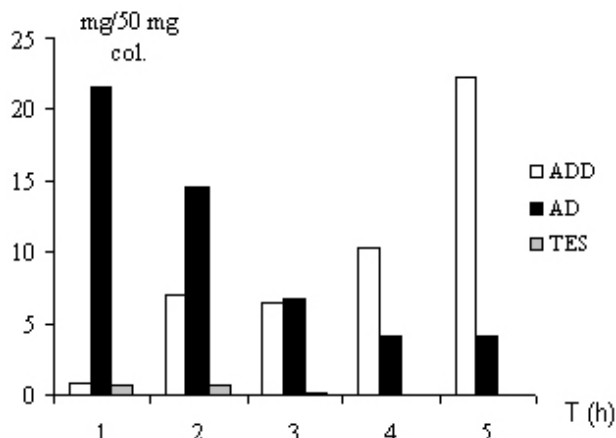


Fig.2. Conversión mixta AD a ADD con células inducidas de *Nocardiodes simplex*.

[AD]: 0.05 mg/mL, 1=0, 2=6, 3=12, 4=15, 5=17 horas, son los valores expresados en la abcisa.

Este efecto también es observado si se emplean cultivos inducidos del mutante R17. En este caso, la bioconversión AD a ADD es particularmente eficiente. A las 12 horas de incubación los valores de ADD formado son cercanos al doble respecto a la cepa de origen (Fig.3).

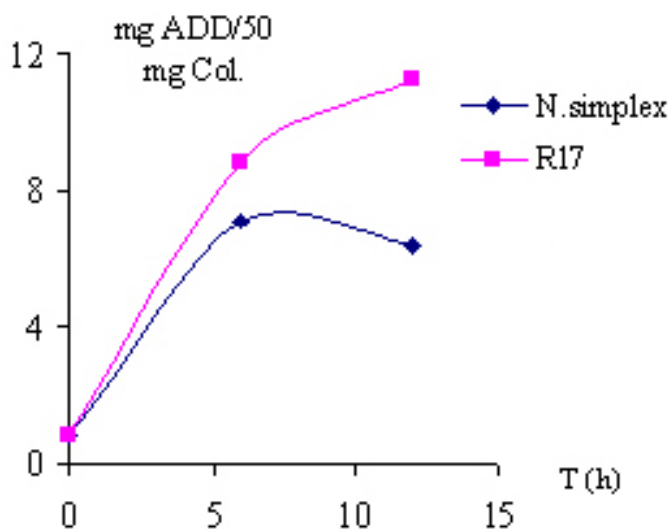


Fig. 3. Cinética de conversión AD a ADD en mutante R17 y cepa de origen *N. simplex* NCIMB 8929.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con las actividades enzimáticas observadas, notablemente superiores en el mutante R17 respecto a la cepa original. A pesar de que el gráfico sólo expresa valores parciales, estos son suficientes como para recomendar el uso de este mutante en este tipo de bioconversión.

CONCLUSIONES

Es posible emplear la 1,2 deshidrogenación del AD a ADD mediante células de *Nocardiodes*, en fermentaciones con *Mycobacterium* a nivel de zaranda.

Este efecto puede ser incrementado si se emplean mutantes de *Nocardiodes* con una actividad esteroide 1,2 deshidrogenasa incrementada.

REFERENCIAS

1. Martin C.K. Microbial cleavage of sterol side chain. **Adv App Microbiol.** 22: 29, 1977.
2. Wovcha, M.G., Antosz F.J., Knight J.C., *et al.* Bioconversion of sitosterol to useful steroidal intermediates by mutants of *Mycobacterium fortuitum*. **Biochim Biophys Acta**, 531, 308-321, 1978.
3. Mahato S.B. and Majundar I. Current Trends in Microbial Steroid Bio transformation. **Steroids**, 62, 332-345, 1997.
4. Orozco R., Pérez I., Borrego S., *et al.* Metodología para la obtención de ADD a partir de mezcla de fitosteroles mediante fermentación en dos fases. Dpto. de Esteroides, CNIC, 1993.
5. Falero A., Llanes N., Hung B.R., *et al.* Evaluación de medios de cultivo para la Δ^1 -deshidrogenación por *Arthobacter simplex* ATCC 6946. **Rev CENIC Cienc Biol**, 31,7-10, 2000.
6. Marcheck W.J., Kraychy S., Muir R.. Micobial degradation of sterols. **Appl Microbiol**, 23, 72-77, 1972.
7. Pérez C., Pérez I. and Hervé M.E. Isolation and partial characterization of a new mutant for sterol biotransformation in *Mycobacterium* sp. **Biotechnol Lett**, 17, 1241- 6, 1995.
8. Lee C. and Liu W. Production of androsta-1, 4-diene-3, 17-dione from cholesterol using immobilized growing of *Mycobacterium* sp. NRRRL B-3683 adsorbed on solid carriers. **Appl Micobiol Biotechnol**, 36, 598-603, 1992.
9. Pérez C, A. Falero, N. Llanes, B.R. Hung, M. E. Hervé, A. Palmero. Resistance to androstanes as an approach for androstendione yield enhancement in industrial mycobacteria. 2002 (en prensa).
10. Fujui Ch., Morii S., Kadode M., *et al.* **J Biochem**, 126, 662-7, 1999

