

REVISION BIBLIOGRAFICA

Sistemas de fermentación utilizados para biotransformar esteroides

Sofía Borrego.

Departamento de Esteroides, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 27 de enero de 1998. Aceptado: 16 de marzo de 1998.

Palabras clave: Biotransformación, sistemas de fermentación, esteroides, tensioactivos, inmovilización, aceites vegetales, medio liposomal.
Key words: Biotransformation, fermentation systems, steroids, surfactants, immobilization, vegetable oils, liposomal media.

RESUMEN. En este trabajo se describen los sistemas de fermentación utilizados para llevar a cabo la biotransformación de los esteroides entre los que se encuentran el empleo de tensioactivos, la fermentación en una y dos fases, el empleo de polímeros y de medios liposomales y la inmovilización microbiana. También se mencionan sus ventajas y desventajas, así como ejemplos de algunos procesos fermentativos.

ABSTRACT. The fermentation systems used in the biotransformation of steroids are described which comprise the use of surfactants, the fermentation in one phase and two-liquid-phases, the utilization of polymers, the liposomal media and the microbial immobilization. The advantages, disadvantages and various examples of fermentative processes are also considered.

INTRODUCCION

Los esteroides son sustancias que presentan gran importancia para el hombre, pues representan diferentes papeles bioquímicos y fisiológicos en el organismo humano. Entre los esteroides fisiológicamente importantes se incluyen, los ácidos biliares, las hormonas adrenocorticales, los andrógenos y los estrógenos.¹

Debido a sus propiedades fisiológicas, cada día aumenta el empleo de las drogas esteroidales para el tratamiento de múltiples enfermedades y por ello, se emplean materias primas nuevas en los procesos de biotransformación de esteroides, destacándose los fitosteroides por su gran abundancia en la naturaleza y el bajo costo para obtenerlos.

Se conoce que una gran variedad de sistemas microbiológicos se emplean en la producción de las drogas esteroidales y sus protocolos de síntesis, que generalmente comprenden tanto la vía química como microbiológica, están diseñados para que las transformaciones microbio-

lógicas conduzcan a las etapas terminales cercanas a ellas.²

El presente trabajo tuvo como objetivo concentrar la información que existe con relación a los sistemas de fermentación más utilizados para biotransformar esteroides.

Sistemas fermentativos utilizados para biotransformar esteroides

Es conocido que los esteroides, y dentro de estos, los esteroides son muy poco solubles en agua,³⁻⁵ siendo este el problema más serio que confronta su biotransformación. Para lograr una mejor solubilización de estos compuestos y por tanto, facilitar un contacto adecuado del microorganismo con el sustrato a biotransformar, se han empleado dos métodos fundamentalmente:

Empleo de agentes tensioactivos

Entre los agentes tensioactivos no iónicos más empleados se encuentran diferentes tipos de Tween (20, 40, 60 y 80). Son muchos los autores que han estudiado el efecto de todos ellos o de alguno en particular, sobre el proceso de biotransfor-

mación de esteroides. Schöemer y Wagner⁶ estudiaron la influencia de diferentes tipos de ellos en la biotransformación del β -sitosterol mediante la cepa *Nocardia* M 29-40. De igual forma, Nakamatsu y colaboradores⁷ analizaron la influencia de una gran cantidad de agentes tensioactivos sobre la biotransformación de fitosteroides obtenidos de la soya empleando un mutante de *Nocardia corallina* NG-511.

Desde el punto de vista químico la diferencia entre los diversos tipos de Tween radica en el ácido graso que esterifica el núcleo de polioxi-etileno sorbitan. En la actualidad existen autores que utilizan los agentes tensioactivos para solubilizar esteroides.⁸⁻¹¹

Empleo de un vehículo orgánico para adicionarlo al medio de fermentación

Recientemente, se ha visto un creciente interés en el empleo de procesos fermentativos en los cuales una fase orgánica constituye una fracción significativa del volumen total de la fermentación. En general, en este tipo de sistema se pueden presentar dos variantes:

a) La fase orgánica es miscible con agua, lo que da lugar a un sistema homogéneo.¹²⁻²² En los procedimientos correspondientes se presenta como inconveniente que al emplearse solventes de gran polaridad el sistema no resulta lo suficiente hidrofóbico como para permitir la solubilización del sustrato y de los productos de su biotransformación en concentraciones elevadas.

Además, se ha detectado que algunos solventes y a determinadas concentraciones, son capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos en agua^{23,24} debido a que pueden incidir negativamente sobre la membrana celular y sus funciones,²⁵ o pueden ser tóxicos para alguna de las enzimas no sólo de su metabolismo primario tal como las enzimas respiratorias, pudiendo causar una disminución del potencial oxidativo de la célula, sino incluso, de alguna(s) de las enzimas involucradas en el proceso de biotransformación.²⁶ Por todo ello, es necesario seleccionar el solvente adecuado para que no afecte al microorganismo y facilite la solubilización del esterol.

Tienen como ventaja para su aplicación industrial, que al trabajarse con una sola fase, se facilita el control de los parámetros fermentativos, así como el diseño de los bioreactores.

b) La fase orgánica no es miscible con el agua, lo que se conoce como sistema fermentativo en dos fases líquidas.

Dentro de estos sistemas, en algunos casos se utilizan solventes orgánicos que no son miscibles con el agua y en otros, se emplean aceites vegetales. Buckland y colaboradores²⁷ efectuaron la conversión enzimática del colesterol en colesteno mediante una especie de *Nocardia*, utilizando una alta proporción de tetracloruro de carbono. Desde entonces, muchos autores han seguido utilizando diversos solventes apolares con este objetivo.^{23,28,30}

Teniendo en cuenta que la utilización de solventes orgánicos puede resultar dañina para el microorganismo por su toxicidad y que para poder biotransformar altas concentraciones de esteroides se necesitan mayores volúmenes de solventes que son altamente tóxicos, en muchos casos se ha preferido utilizar otros vehículos de solubilización, entre los cuales, los aceites vegetales son los más empleados.

Se conoce³¹ la biotransformación de diferentes esteroides en ADD (androstadiendiona) mediante un variado número de microorganismos de distintos géneros y el empleo en el medio de fermentación de diferentes aceites de origen animal y vegetal, teniendo en cuenta que los glicéridos presentes en el aceite pueden ser asimilados por los microorganismos. Si bien estos experimentos se realizaron a nivel de zaranda, demostraron la factibilidad de utili-

zar a los aceites vegetales como fase orgánica en lugar de los solventes orgánicos convencionales.

No obstante, es conocido que los aceites vegetales contienen pequeñas cantidades de ácidos grasos libres que pueden resultar tóxicos,^{32,33} de ahí que se deba tener en cuenta este aspecto para que no se afecte el microorganismo y poder lograr altos rendimientos de los productos.

Asimismo, Kominek y col.³⁴ utilizaron extracto de grasa de cerdo seca para biotransformar acetato de cortisona. Imada y col.³⁵ utilizaron un medio de cultivo que contenía aceite de silicona con el objetivo de biotransformar colesterol empleando la cepa *M. parafortuitum* MCI-1297 y Paskova y col.³⁶ lograron incrementar la concentración de ergosterol en levaduras utilizando manteca de cerdo y aceites de girasol, soya o colza.

Ceen y col.³⁷ emplearon también aceites vegetales para mejorar los rendimientos de los productos de la biotransformación al trabajar con *A. ochraceus* y progesterona como sustrato. Por su parte, Park y Hoffman³⁸ utilizaron aceite de silicona para facilitar la solubilización de la hidrocortisona y del oxígeno cuando realizaron el proceso de biotransformación utilizando la cepa *Arthrobacter simplex* ATCC 6946 inmovilizada en el copolímero N-isopropil-acrilamida/acrilamida.

Phase y Patil³⁹ emplearon aceite de soya para biotransformar colesterol en 17-cetosteroides, utilizando la cepa *M. fortuitum* NRRL B-0153 con la cual obtuvieron rendimientos elevados. Además, Lilly⁴⁰ y Lilly y col.⁴⁰ dieron a conocer aspectos generales del sistema fermentativo en dos fases líquidas y las características de los reactores para llevar a cabo estos procesos. Después de ello, Van Sonsbeek y col.⁴¹ publicaron una amplia revisión acerca de estos temas.

El sistema de fermentación en dos fases tiene como ventajas:

- Presenta alta capacidad para solubilizar grandes cantidades de sustratos, así como sus productos de transformación.
- Evita la posibilidad de que ocurra la llamada cocrystalización al encontrarse tanto los sustratos iniciales como sus productos finales disueltos en una fase orgánica.
- Disminuye los efectos tóxicos causados por los productos de la biotransformación al pasar éstos a la fase orgánica.

En este tipo de fermentación se forman generalmente emulsiones que presentan el inconveniente de que algunas variables del proceso no son fáciles de controlar, tales como el pH y el oxígeno disuelto. Asimismo, el diseño de los fermentadores puede tener características específicas, así como la clase de impelente a usar que generalmente es del tipo propela marina u otro que garantice una adecuada agitación de la emulsión. Por otro lado, hay que tener extremo cuidado en la selección de la fase orgánica a emplear de modo que no resulte tóxica al microorganismo.

Además de los sistemas de fermentación antes mencionados, se utilizan otros que tienen como objetivo aumentar la solubilidad de los esteroides, disminuir el efecto tóxico de los productos sobre las células microbianas y aumentar el poder biocatalítico, los cuales se pueden agrupar de manera general en:

Los que emplean polímeros

Dentro de los polímeros más utilizados se encuentran la dextrana, la cual es capaz de formar un sistema de dos fases acuosas,⁴² las ciclodextrinas que actúan como agentes emulsificantes facilitando la suspensión eficiente de las partículas esteroideas^{43,44} y el polietilenglicol que junto a un solvente polar forma un medio acuoso bifásico.⁴⁵

Los que emplean inmovilización microbiana

Son múltiples los casos en que se utiliza la inmovilización microbiana para llevar a cabo la biotransformación de esteroides. Koshcheenko y col.⁴⁶ utilizaron cerámica para inmovilizar *A. globiformis* y transformar la hidrocortisona en prednisolona. Krysteva y Grigorova⁴⁷ inmovilizaron covalentemente *A. simplex* en gránulos de celulosa para transformar cortisol en prednisolona. También Flygare y Larsson⁴⁸ emplearon la inmovilización magnética de *Mycobacterium sp.* NRRL B-3683 para producir ADD.

Steinert y col.⁴⁹ utilizaron aceite de soya como una fase orgánica para llevar a cabo la biotransformación del β -sitosterol a AD y ADD utilizando una cepa de *M. fortuitum* inmovilizada en silicona sólida y quitosan. Por su parte, Flygare y Larsson⁴⁸ estudiaron también la biotransformación del colesterol a AD y ADD utilizando la cepa *Mycobacterium sp.* NRRL B-3683 inmovilizada en una mezcla de polímeros que le permitieron obtener tamaños de esferas muy pequeñas en el medio para aumentar la superficie de contacto y facilitar el proceso de transformación.

Lee y Liu⁶ produjeron ADD a partir de colesterol, utilizando células de *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 inmovilizadas en carrageno. Días y col.⁵ han empleado polímeros para inmovilizar células de *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 con el objetivo de obtener AD utilizando solventes orgánicos inmiscibles en agua y Falero y col.⁵ utilizaron *Arthrobacter simplex* inmovilizada en peptina para transformar AD en ADD.

Además de todas las variantes antes mencionadas, se conoce el empleo de un medio liposomal que se caracteriza por la formación de vesículas de fosfolípidos que permiten la solubilización de los compuestos hidrofóbicos y facilita el crecimiento microbiano; este sistema fue utilizado por Goetschel y col.^{58,59} para transformar hidrocortisona en prednisolona utilizando *Arthrobacter simplex* y oxidar colesterol a colesteno en presencia de *Rhodococcus erythropolis*, respectivamente.

Como se aprecia, son múltiples los sistemas fermentativos que se emplean con el objetivo de hacer eficientes los procesos de biotransformación de esteroides.

BIBLIOGRAFIA

- Quintana M., Coto O., Reboredo M.R., Carballo M.E. y Martínez J. *Revista de Ciencias Biológicas*, 16, 209, 1985.
- Mahato S.B. y Mukherjee A. *Phytochemistry*, 23, 2131, 1984.
- Boeren S. and Laane C. *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 305, 1987.
- Flygare S. and Larsson P.O. *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 752, 1989.
- Días A.C.P., Cabral J.M.S. and Pinheiro H.M., *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 708, 1994.
- Schöemer U. and Wagner F. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 99, 1980.
- Nakamatsu T., Beppu T. and Arima K. *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1449, 1983.
- Lee C.Y. and Liu W.H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 598, 1992.
- Smith M., Zahinley J., Pfeifer D. and Goff D. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1425, 1993.
- Lee C.Y., Chen C.D. y Liu W.H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 447, 1993.
- Liu W.H., Kuo C.W., Wu K.L., Lee C.Y. and Hsu W.Y. *J. Ind. Microbiol.*, 13, 167, 1994.
- Prome D., Lacave C., Monsarrat B., David H. and Prome J.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 753, 60, 1983.
- Abul-Hajj Y.J. and Quian X. *J. Natural Products*, 49, 244, 1986.
- Iida M., Tsuyuki K., Kitazawa S. and Iizuka H. *J. Ferment. Technol.*, 65, 525, 1987.
- Iida M., Mikami A., Yamakawa K. and Nishitani K.J. *Ferment. Technol.*, 66, 51, 1988.
- Iida M., Wakuri S., Mineki S., Nishitani K. and Yamakawa K.J. *Ferment. Bioeng.*, 76, 206, 1993.
- Silbiger E. and Freeman A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 413, 1988.
- Madyastha K.M. y Joseph T.J. *Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 45, 563, 1993.
- Dhar A. y Samanta T.B. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 44, 101, 1993.
- Brzezowska E., Dmochowska-Gladysz J., Kolek T. y Nobilic E.J. *Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 46, 259, 1993.
- Krischenowski D. y Kieslich K. *Steroids*, 58, 278, 1993.
- Holland H.L., Dorie S., Xu W. y Brown F.M. *Steroid*, 59, 642, 1994.
- Park T.G. y Hoffman A.S. *Biotechnol. Lett.*, 11, 17, 1989.
- Oda S. y Ohta H. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 2041, 1992.
- Harrop A.J., Hocknall M.D. y Lilly M.D. *Biotechnol. Lett.*, 11, 807, 1989.
- Szentermai A. *J. Ind. Microbiol.*, 6, 101, 1990.
- Buckland B.C., Dunnill P. y Lilly M.D. *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 815, 1975.
- Chibata I., Fukui S. and Wingard J.W. Jr. *Enzyme Eng.*, 6, 157, 1982.
- Venkatasubramanian K., Constantinides A. and Vieth W.R., *Biotech. Eng. III, Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 413, 548, 1983.
- Carrea G. and Cremonesi P., Enzyme-catalyzed steroid transformation in water-organic solvent two-phase systems. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 136, Immobilized Enzymes and Cells, Part C, (Mosbach K., Ed.), Academic Press, Orlando, Florida, 1987.
- Nishikawa D., Imada Y., Kinoshita M., Takahashi K., Machida H. and Nagasawa M., Japanese Patent 1055862, 1975.
- Kanetsuna F. *Microbiol. Immunol.*, 29, 127, 1985.
- Gutiérrez M., Efecto de los ácidos grasos sobre el crecimiento y la biotransformación de fitosteroides por *Mycobacterium* sp. Tesis de Diploma, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, 1990.
- Kominek L.A., Wolf H.J. and Evans T.W., Patente Francesa 2531101, 1982.
- Imada Y., Osozawa T., Morimoto Y. and Kinoshita M., US Patent 4397946, 1983.
- Paskova J., Spacek B. and List J. *Kuassny Prum.*, 32, 236, 1986.
- Ceen E.G., Herrman J.P.R. and Dunnill P. *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 365, 1987.
- Phase N. and Patil S., World J. *Microbiol. Biotechnol.*, 10, 228, 1994.
- Lilly M.D. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 32, 162, 1985.
- Lilly M.D., Harbron S. and Narendranathan T.J., Two-liquid-phase biocatalytic reactors. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 36: Immobilized enzymes and cells, Part C, (Mosbach K., Ed.) Academic Press, Orlando, FL, 1987.
- Van Sonsbeek H.M., Beekunck H.H. and Tramper J. *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 722, 1993.
- Kaul R. y Mattiasson B., Biotransformation of hydrocortisone into prednisolone. In: *Aqueous two-phase system. Methods in Enzymology*, Vol. 228, Section VI, (Walter H. and Johansson G., Eds.) Academic Press, Inc., San Diego, 1994.
- Udvardy E., Pechany C., Bartho I., Hantos G., Trinn M., Vida Z., Szejth J., Stadler A., Habon I. et Balazs M., Patente Francesa 2513656, 1982.
- Udvardy E., Pechany C., Bartho I., Hantos G., Trinn M., Vida Z., Szejth J., Stadler A., Habon I. and Balazs M., US Patent 4528271, 1985.
- Nagy E.U., Bartho I., Hantos G., Trinn M., Vida Z., Szejth J., Stadler A., Habon I. and Balazs M., US Patent 4528271, 1985.
- Hesselink P., de Vries H. and Witholt B., Enhancement of microbial side chain cleavage by addition of cyclodextrins. In: *Proceeding of the 4th European Congress on Biotechnology* (Neijssel O., Van der Meer R. and Luyben K., Eds.), Vol. 2, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1987.
- Hesselink P., van Vleet S., de Vries H. and Witholt B., *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 1989.
- Singer Y., Shity H. and Bar R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 731, 1991.
- Jadoun J. y Bar R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 230, 1993.
- Schlosser D., Irigang S. and Schmauder H.P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 1993.
- Takeda K., Asou T., Matsuda A., Kimura K., Okamura K., Okamoto R., Sasaki J., Adachi T. and Omura S. *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 380, 1994.
- Santos R.A., Caldeira J.C.G., Pinheiro H.M.P. and Cabral J.M.S. *Biotechnol. Lett.*, 13, 349, 1991.
- Koshcheenko K.A., Arinbasarna A.Y., Tyurin V.S., Nikitin Y.S. y Skryabin A.Y. *Biokhimiya*, 3, 204, 1987.
- Krysteva M. and Grigorova P. *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 494, 1987.
- Flygare S. and Larsson P.O. *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 494, 1987.
- Steinert H.J., Vorlop K.D. and Klein J., Steroid side chain cleavage with immobilized living cells in organic solvents. In: *Biocatalysis in organic media. Proceeding of an Industrial Symposium Held at Wageningen*, (Laane C., Tramper J. and Lilly M.D., Eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1987.
- Falero A., Hung B.R., Llanes N., Aguila B. y Fonseca M. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 26, 21, 1996.
- Goetschel R. and Bar R., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 230, 1991.
- Goetschel R., Barenholz Y. and Bar R., *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 390, 1992.