

Evaluación de medios de cultivo para la Δ^1 -deshidrogenación de esteroides por *Arthrobacter simplex* ATCC 6946

Alina Falero, Nury Llanes, Blanca Rosa Hung, Belinda Aguila, Magdalena Fonseca, Celso Pérez e Ileana Pérez.

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

Recibido: 5 de abril de 1998. Aceptado: 4 noviembre de 1998.

Palabras clave: esteroide-1-deshidrogenasa, 4-androsten-3,17-diona, 1,4-androstadien-3,17-diona, *Arthrobacter simplex*.
Key words: steroid-1-dehydrogenase, 4-androstene-3,17-dione, 1,4-androstadiene-3,17-dione, *Arthrobacter simplex*.

RESUMEN. La transformación de esteroides por microorganismos para la obtención de precursores esteroidales avanzados ha sido ampliamente estudiada. Estos precursores son sustancias que si bien no presentan una marcada actividad farmacológica por sí mismas, pueden ser utilizadas como productos de partida en la síntesis de un número variado de medicamentos de amplio uso por la población a nivel mundial. Dentro de los precursores esteroidales más valiosos y comúnmente empleados en la industria farmacéutica se encuentran el 4-androsten-3,17-diona (AD) y el 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD). A partir del AD, se pueden obtener diversos derivados que presentan actividad androgénica, así como la espironolactona, sustancia empleada como diurético. A partir del ADD, se pueden obtener diversas sustancias con actividad estrogénica que forman parte de los componentes de las tabletas anticonceptivas. En este trabajo, se estudiaron varios medios de cultivo con el propósito de incrementar tanto la producción de biomasa como la actividad específica esteroide Δ^1 -deshidrogenasa de *A. simplex* ATCC 6946 durante la 1,2-deshidrogenación de esteroides. Los medios evaluados fueron los siguientes: extracto de levadura, miel, peptona, maíz y maíz con suplementos, tomando como control el medio de Montes y Magaña. Las mayores concentraciones de biomasa se encontraron al emplear el medio maíz. Sin embargo, en el medio extracto de levadura la actividad específica fue superior. Las muestras provenientes de los experimentos de bioconversión fueron identificadas y analizadas por cromatografía de capa delgada y líquida de alta resolución, respectivamente. Los resultados permitieron seleccionar el extracto de levadura como el medio más apropiado para realizar el crecimiento de *A. simplex* ATCC 6946 que posteriormente realizará la biotransformación del esteroide más eficientemente.

ABSTRACT. Steroid transformation for obtaining advanced steroid precursors by microorganisms has been widely studied. These precursors are substances which in general do not possess remarkable pharmacological activities, but they can be used as a raw material for the synthesis of various compounds of biomedical importance throughout the world. The most useful and widespread precursors in pharmaceutical industry are 4-androstene-3,17-dione (AD) and 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD). For instance, some derivatives from AD show an androgen activity, as well as spironolactone, a well-known diuretic. Furthermore, a number of different compounds with a high estrogenic activity may be synthesized from ADD. They are essential components of contraceptive pills. This paper shows the results of studies about the composition of culture media in order to increase both biomass yield and the specific activity of the enzyme Δ^1 -dehydrogenase from *A. simplex* ATCC 6946 in the reaction of steroid 1,2-dehydrogenation. The following media were evaluated: yeast extract, molasses, peptone, corn-steep liquor and supplemented corn-steep liquor. Control medium was the one of Montes and Magaña. Higher biomass amounts were found in the corn-steep liquor medium. Nevertheless, the enzyme specific activity in the yeast extract medium was the highest. Samples from bioconversion experiments were identified and analyzed by thin-layer chromatography and high-pressure liquid chromatography respectively. The results strongly suggest the yeast extract medium as the most suitable for growing *A. simplex* ATCC 6946 cells and later biotransforming steroids efficiently.

INTRODUCCION

La producción de drogas esteroidales y hormonas mediante procesos biotecnológicos alcanza un valor estimado de cuatrocientos millones de dólares anualmente.¹ Las Δ^1 -deshidrogenaciones son esenciales para la elaboración de corticosteroides análogos. Por otra parte, los métodos de deshidrogenación química no compiten con los métodos biotecnológicos, que son más específicos y eficientes.²

La actividad Δ^1 -deshidrogenasa se encuentra presente en muchos microorganismos tales como: *Mycobacterium* sp.,³ *Corynebacterium*⁴ y *Arthrobacter simplex*,⁵ entre otros y consiste en la introducción de un doble enlace en la posición 1 del anillo A del núcleo esteroide.

Las células de *Arthrobacter simplex* muestran una capacidad superior como biocatalizadoras y son capaces de transformar la hidrocortisona al Δ^1 -deshidrogenado análogo, la prednisolona (Fig. 1). Este paso es uno de los más importantes en la biotecnología de la transformación microbiana de los esteroides.⁶

Los medios de cultivo constituyen un aspecto importante en los procesos de biotransformación de esteroides. La fuente de nitrógeno es fundamental para el crecimiento microbiano, ya que garantiza la síntesis de proteínas y enzimas.⁷ Un buen rendimiento en biomasa microbiana y consiguientemente de enzimas, particularmente las responsables de la biotransformación

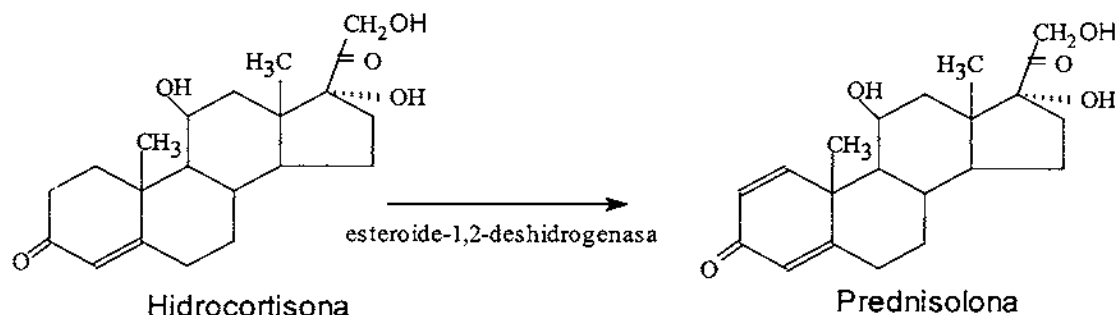


Fig. 1. Reacción de deshidrogenación de la hidro cortisona.

de esteroides, debe contribuir en gran medida al éxito en la producción de compuestos esteroideos.⁷ Por otra parte, el empleo de células inmovilizadas en la biotransformación de esteroides demanda una elevada actividad específica. Sin embargo, este parámetro ha sido poco estudiado en relación con la composición del medio de cultivo.²

La conversión de hidro cortisona a prednisolona pudiera ser más eficiente si se logra disponer de un medio de cultivo que incremente la actividad de la enzima. El objetivo de este trabajo consistió en el estudio de diferentes medios de cultivo de composición diversa, evaluando tanto su capacidad biotransformadora como la producción de biomasa para seleccionar aquel donde se manifieste la mayor actividad esteroide 1,2-deshidrogenasa de *Arthrobacter simplex* en la biotransformación de esteroides.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo

Se empleó la cepa *Arthrobacter simplex* ATCC-6946.

Medios

Como medio de mantenimiento fue utilizado el medio agar nutritivo (OXOID), enriquecido con glicerol, 2%.

Se evaluó el crecimiento en los medios siguientes: extracto de levadura,⁸ maíz,⁹ peptona¹⁰ y miel.¹¹

Además, se evaluaron los medios maíz con suplemento de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0,3 % (maíz I) o urea, 0,2 % (maíz II) o harina de soya 2 % (maíz III). El medio utilizado como control fue el reportado por Montes y Magaña.¹² Todos los medios fueron ajustados a pH 7,2.

La biotransformación se realizó en el medio reportado por Falero y col.¹³

Condiciones de cultivo para la obtención de células (crecimiento)

A partir de colonias aisladas de *A. simplex* fueron inoculados culti-

vos de 100 mL de cada uno de los medios a evaluar. Los cultivos fueron crecidos a 30 °C, 150 r/min en zaranda orbital durante 24 h. Luego del crecimiento, 100 mL de cultivo fueron transferidos a erlenmeyers de 2 L, que contenían 500 mL de medio fresco. Los experimentos posteriores se realizaron a partir de los cultivos inducidos con 4-androsten-3,17-diona (AD), 0,05 mg/mL durante 5 h. Finalmente, fueron centrifugados a 6 000 r/min, 4 °C durante 20 min y las células resuspendidas en 10 mL de medio de biotransformación y homogenizadas con perlas de vidrio.

La actividad enzimática se determinó según se indica en la tabla 1.

Para seguir el curso de la Δ^1 -deshidrogenación se utilizó la reacción análoga de AD a 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD). La unidad enzimática (U) se definió como 1 μmol de ADD $\cdot \text{min}^{-1}$.

El crecimiento celular fue determinado por peso seco, en volúmenes de 25-50 mL de cultivo. Los resultados se expresan en por ciento (p/v).

Los esteroides fueron extraídos con acetato de etilo, evaporados a sequedad y disueltos en metanol para su posterior análisis. La identificación y determinación cuantitativa de los esteroides se realizó por cromatografía de capa delgada y líquida de alta resolución. La detección se realizó a 254 nm empleando una columna de fase reversa RP-8 (LiChroCART 125-4 mm) y como fase móvil metanol-agua (65:35) a un flujo de 1,5 mL/min. El análisis se llevó a cabo por el método del estándar interno¹⁴ utilizando para ello, 17 α -metilttestosterona. Los resultados representan el promedio de tres determinaciones independientes.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al estudiar el comportamiento de la cepa en los medios de cultivo: maíz, peptona y extracto de levadura (Tabla 2) se encontró la mejor actividad específica, en el medio extracto de levadura, lo cual concuerda con lo reportado por Weuster-Botz et al.² En estudios realizados sobre el desa-

Tabla 1. Condiciones experimentales para determinar la actividad enzimática.

Mezcla de reacción (Volumen total 1 mL)	Blanco		Reacción
	Sustrato	Muestra (μL)	
Medio de biotransformación	50	940	40
Menadiona ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	50	50	50
AD ($6,98 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	-	10	10
Suspensión celular	900	-	900

Tabla 2. Comparación del comportamiento del microorganismo frente a los cuatro medios de cultivo en estudio.

Medios de cultivo	Costo (USD/L)	Peso (%)	Actividad específica (U $\cdot \text{g}^{-1}$ de biomasa seca)
Maíz	0,32	1,18	0,13
Peptona	4,8	1,08	0,11
Extracto de levadura	1,32	0,89	0,70
Montes y Magaña ¹²	0,88	1,08	0,051

rollo de un medio sintético de crecimiento para *A. simplex*, estos autores detectaron una elevada actividad Δ^1 -deshidrogenasa para la hidrocortisona. La actividad detectada en el resto de los medios estudiados fue considerablemente inferior a la que exhibió el medio extracto de levadura.

Los resultados sugieren que la presencia de elementos nutritivos tales como la glucosa y los aminoácidos presentes en el maíz y diferentes sales, incrementan la actividad de las enzimas encargadas del crecimiento celular.¹⁶ En el caso particular del medio extracto de levadura, el incremento de la actividad específica de deshidrogenación del sustrato pudiera explicarse por la presencia en el medio de vitaminas (fundamentalmente del complejo B), las cuales constituyen cofactores que favorecen la actividad enzimática.

Teniendo en cuenta estos resultados, el medio extracto de levadura fue seleccionado como el más apropiado para el crecimiento de *A. simplex* que finalmente realiza la 1,2-deshidrogenación. Aunque este medio tiene un costo ligeramente superior al reportado por Montes y Magaña, la magnitud de la actividad específica supera 14 veces a este último, lo que lo hace mucho más eficiente.

Como el medio maíz tiene un costo relativamente más bajo, se valoró la posibilidad de incrementar su

actividad específica con la adición de los suplementos siguientes: urea, harina de soya y sulfato de amonio. Estas consideraciones se sustentan en los requerimientos nutricionales del microorganismo y en la factibilidad económica del empleo de dichos productos. Además, en trabajos realizados por Herrera y col.,⁷ se concluye que la presencia de urea y sales en el medio de cultivo incrementa la reacción de deshidrogenación del AD en *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683. También fue estudiado el medio miel enriquecido con urea.

De acuerdo con los resultados (Tabla 3) el valor máximo de actividad se logró nuevamente cuando se empleó el medio extracto de levadura. Al enriquecer el medio maíz, se logró incrementar la actividad específica con respecto al maíz inicial. Sin embargo, la actividad resultó inferior a la obtenida con el medio extracto de levadura.

Los resultados del medio maíz enriquecido con harina de soya no se muestran en la tabla 2. Como la harina interfiere en el peso de la biomasa, no es posible determinar ni el peso seco, ni la actividad específica. No obstante, se determinó la actividad enzimática y la cantidad de producto obtenido resultó similar a la del maíz sin suplementos, siendo inferior a la obtenida con los demás tratamientos.

Mediante los correspondientes cromatogramas (Fig. 2), se pudo apreciar la presencia de ADD en todos los medios en estudio, la mancha de mayor intensidad para este compuesto apareció en el medio extracto de levadura (f), en cambio para el AD, se obtuvo la de menor intensidad, lo que indica que ocurrió una mayor transformación del sustrato en este medio. Los resultados cromatográficos corroboran los resultados de actividad específica encontrados para los diferentes medios.

Tabla 3. Selección del medio de cultivo apropiado para el crecimiento de la cepa *Arthrobacter simplex* ATCC 6946.

Medio de cultivo	Rendimiento (%)	Actividad específica (U · g ⁻¹ biomasa seca)
Extracto de levadura	1.00	0.70
Maíz	1.72	0.14
Maíz I	0.96	0.23
Maíz II	1.78	0.21
Miel	1.50	0.14



Fig. 2. Resultados correspondientes a la CCD para cada uno de los medios evaluados (imagen digitalizada). Fueron eluidos en una mezcla de acetato de etilo-hexano (2:3, v/v). Las bandas a y b correspondieron a los patrones AD y ADD, respectivamente; c medio maíz; d medio maíz I; e medio maíz II; f medio extracto de levadura; g medio Montes y Magaña; h medio peptona; i medio miel y j medio maíz III.

CONCLUSIONES

El medio extracto de levadura resultó el más adecuado para el crecimiento de *Arthrobacter simplex* ATCC 6946 con una alta actividad específica Δ^1 -deshidrogenasa.

La presencia de vitaminas en el medio de cultivo parece ser un factor determinante en la actividad específica de deshidrogenación de los esteroides.

Al enriquecer el medio maíz, se incrementa la actividad. Sin embargo, ésta resulta inferior a la que se obtiene con el extracto de levadura.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, México, D.F., por la colaboración brindada, sin la cual hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Mahato S.B. and Majumdar I., Current trends in microbial steroid biotransformation. *Phytochemistry*, **34**, 883, 1993.
2. Weuster-Botz D., Pramatarova V., Spassov G. and Wandrey C. Use of a genetic algorithm in the development of a synthetic growth medium for *Arthrobacter simplex* with high hydrocortisone Δ^1 -dehydrogenase activity. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **64**, 386, 1995.
3. Chun-Yi L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 598, 1992.
4. Constantinides A. *Biotech. and Bioengineering*, **XXII**, 119, 1980.
5. Pinheiro H.M. and Cabral M.S. *Enzyme Microb. Technol.*, **40**, 1123, 1992.
6. Smith L.L., Steroids. In *Biotechnology*, Vol. 6a Biotransformations, Ed. H-J. Rehm and Reed. VCH Weinheim, Deerfield Beach, Florida/Basel, 31-78, 1984.
7. Herrera A., Espinosa M.E., Borrego S. Guillén F y Falero A. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de ADD a partir de fitosteroides de la caña de azúcar, utilizando una cepa de *Mycobacterium*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, **26**, 47, 1995.
8. Pinheiro H.M. and Cabral J.M.S. Effects of solvent molecular toxicity and microenvironment composition on the Δ^1 -dehydrogenation activity of *A. simplex* cells. *Biotechnol. and Bioengineering*, **37**, 97, 1991.
9. Vlahov R., Pramatarova V., Spassov G., Suchodolskaya, G.V. and Koshceenko, K.A. Transformation of microcrystalline hydrocortisone by free and immobilized cells of *Arthrobacter simplex*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 172, 1990.
10. Tae Gwan Park and Hoffman A.S. Immobilization of *A. simplex* in a thermally reversible hydrogels: effect of temperature cycling on steroid conversion. *Biotechnology and Bioengineering*, **35**, 152, 1990.
11. Saunders R., Cheetman P.S.J. y Hardman R. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 549, 1986.
12. Montes M.C. y Magaña I. Δ^1 -Dehydrogenation of steroids by *Arthrobacter simplex* immobilized in calcium polygalacturonate beads. *Journal of Industrial Microbiology*, **8**, 259, 1991.
13. Falero A., Hung B.R., Llanes N. y Aguila B. Estudio cinético de la esteroide 1,2-deshidrogenasa de *Arthrobacter simplex* inmovilizada en pectina. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, **27**, 21, 1996.
14. Snyder, L. R. and Kirkland, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Second Edition. Wiley Interscience Publication, 1980.
15. Kloosterman IV J. and Lilly M.D. Maintenance and operational stability of immobilized *Arthrobacter simplex* for the Δ^1 -dehydrogenation of steroids. *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 377, 1985.