

OBTENCION DE TESTOSTERONA A PARTIR DE PRECURSORES ESTEROIDALES

N. Llanes Machado, B.R. Hung, A. Falero, C. Pérez y B. Aguila.

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Cubanacán, Playa 16, Apartado Postal 6880, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 18 de diciembre de 1996.

RESUMEN. La obtención de testosterona a partir de 4-androsteno-3,17-diona (AD) o de 1,4-androstadieno-3,17-diona (ADD) es catalizada por la enzima 17-OH esteroide reductasa presente en diferentes cepas de microorganismos. El estudio de la capacidad biotransformadora de diferentes cepas de micobacterias y levaduras demostró que tanto *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 como YSD-196 son capaces de reducir el ADD o AD respectivamente a testosterona. Para ambos casos, los mejores resultados se obtuvieron cuando se emplea amortiguador fosfato pH 7 en el medio de reacción. YSD-196 resultó más eficiente que *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 puesto que forma 76,4 µg/mL de testosterona en 48 h; mientras que *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 requirió 60 h para producir 55 µg/mL del mismo compuesto.

ABSTRACT. The production of testosterone from 4-androstene-3,17-dione (AD) or 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) is catalyzed by 17-OH steroid-reductase which is present in different strains of microorganisms. The biotransformation ability study of several strains of micobacteria and yeasts showed that *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 and YSD-196 were capable to reduce ADD or AD to testosterone, respectively. In both cases the best results were obtained when phosphate buffer pH 7 was used in the reaction medium. YSD-196 was more efficient than *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683, due to YSD-196 produced 76,4 µg/mL of testosterone in 48 h while *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 needed 60 h to obtain 55 µg/mL of the same compound.

INTRODUCCION

La conversión de esteroides resulta de gran importancia para la industria médico-farmacéutica debido al amplio y variado uso terapéutico que presentan. La testosterona es uno de estos esteroides obtenidos a partir de precursores tales como 4-androsteno-3,17-diona (AD) y 1,4-androstadieno-3,17-diona (ADD). Su obtención por síntesis química resulta sin lugar a dudas, un proceso costoso. Es por esta razón que se ha estudiado el empleo de microorganismos para la formación de estos compuestos, entre los que se encuentran géneros de *Pseudomonas*,¹ *Saccharomyces*,² *Marchantia*³ y *Arthrobacter simplex*.⁴

La catálisis enzimática de las reacciones garantiza un mínimo de formación de productos colaterales, garantizando una mayor pureza del producto y además, el proceso transcurre con mayor rapidez. Esto motiva la necesidad de conocer no sólo, los microorganismos que presentan la batería enzimática capaz de llevar a cabo estas reacciones, sino también, las condiciones óptimas de la catálisis.

Teniendo en cuenta estos aspectos, los objetivos del presente trabajo estuvieron dirigidos a: seleccionar cepas de micobacterias y levaduras capaces de formar testosterona y evaluar el efecto del pH y la naturaleza del amortiguador en la reacción de reducción.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Los microorganismos que se emplearon fueron:

Mycobacterium sp. NRRL B-3683

Mycobacterium ATCC 6842

Saccharomyces uvarum

Levaduras: YSD-196, YSD-23, YSD-25 y YSD-10.

Obtención de células libres

Mycobacteria

Se inocularon por asada erlemmeyers de 250 mL con 50 mL de caldo nutriente enriquecido (CN⁺), (g/L): CN, 8; extracto de levadura, 1; glicerol, 5; Tween 80, 7. Se colocaron en zarandao rotatoria 200 0 r/min a 30 °C durante 48 h. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 4 000 r/min durante 10 min a 20 °C y el sobrenadante fue eliminado. Las células fueron lavadas dos veces con 10 mL de Tween 40 al 0,7 %.

La biomasa se resuspendió en 40mL del amortiguador a estudiar.

Levaduras

Se inocularon por asada erlemmeyers de 250 mL con 50 mL de YPG (g/L): peptona, 10; extracto de levadura, 10; glucosa, 20. Se colocaron en zarandaa 200 0 r/min, 30 °C durante 24 h. El cultivo se centrifugó a 4 000 r/min durante 5 min a 28 °C y fue eliminado el sobrenadante.

La biomasa se resuspendió en 40mL del amortiguador a estudiar.

Experimentos de biotransformación

Cada tubo de ensayo contenía un 1 mL en total de la mezcla de reacción:

Mezcla de reacción	Reacción (µL)	Blanco (µL)	
		Muestra	Sustrato
Amortiguador	9010	0	990
Suspensión celular	900	900	—
Sustrato (20m g/mL)	10—	—	10
Glucosa 50%	—	—	—

Los tubos fueron colocados en una zaranda orbital a 115 r/min, 30 °C . Se determinó la cinética de formación de productos desde 0 hasta 72 h . Se tomaron muestras a intervalos de 5 h . Para detener la reacción se empleó la muerte celular por calor.

Los productos de la reacción fueron extraídos con acetato de etilo, volumen final 4 mL . Posteriormente, se evaporaron las muestras a temperatura ambiente. Su concentración finalmente fue determinada mediante un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al analizar la capacidad biotransformadora de las cepas de *Mycobacterium* (Tabla I) se pudo observar que solamente *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 tuvo la propiedad de acumular testosterona. Este microorganismo emplea ADD como sustrato; en cambio de las cinco cepas de levaduras estudiadas tres exhibieron actividad. Los mayores valores correspondieron a la cepa YSD-196 que utilizó AD como sustrato. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Singer y col.² en 1991, en los cuales se refiere la obtención de testosterona a partir de AD, empleando cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

TABLA I
Selección de cepas formadoras de testosterona en amortiguador fosfato 0,1 mo l/L, pH 7

Cepas	Testosterona (g/mL)
<i>Mycobacterium</i> NRRL	14,0
YSD-196	76,4
<i>Saccharomyces uvarum</i>	43,8
YSD-10	52,8

Comparativamente se puede apreciar la superioridad de la levadura en cuanto a su capacidad biotransformadora, por lo que no es recomendable usar *Mycobacterium* para estos fines.

Las micobacterias, además de formar cantidades muy pequeñas de testosterona, requieren de un tiempo superior para la biotransformación, esto se explica teniendo en cuenta que el sustrato empleado es el ADD, por lo tanto, para la formación de la testosterona es necesario una doble reducción del compuesto; se reduce la insaturación en posición 1,2 del anillo A y además, el grupo carbonilo ubicado en posición 17 del anillo D (Fig. 1). La testosterona no es el único producto de la reacción, ya que además, se forma la dehidrotestosterona.⁵

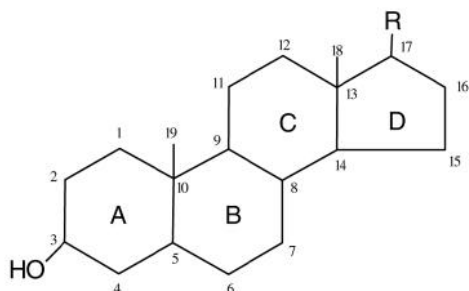


Fig. 1. Estructura química general de los esteroides.

La cepa *Mycobacterium* sp. solamente utilizó como sustrato precursor de la testosterona al ADD, por lo que no apareció el producto en cualquier mezcla de reacción, sino que requirió la presencia de amortiguador fosfato pH 6,7 y en el caso del Tris, el pH necesario fue 7,8 (Tabla II). Además, la cantidad de testosterona obtenida resultó inferior en comparación con la producida por la cepa YSD-196 (Tabla II). El comportamiento de este microorganismo resultó diferente, pues solamente emplea como sustrato el esteroide reducido (AD) y es capaz de biotransformarlo tanto en presencia de amortiguador fosfato como de Trisap H6,7y8 .

TABLA II
Efecto de la naturaleza del amortiguador y el pH en la formación de testosterona, por *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 y YSD-196

<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B-3683					
Sustrato	pH	Amortiguador			
		Fosfato		Tris	
		AD(D)	T	AD(D)	T
(μg/mL)					
AD	6	8,3	—	9,2	—
	7	13,5	—	14,5	—
	8	17,4	—	20,2	—
ADD	6	32,09,	0		
	7	64,2	14,06	5,4	12,3
	8	30,4	—	16,8	1,0
YSD-196					
AD	6	—	65,0	—	32,7
	7	—	76,4	—	55,0
	8	—	48,0	—	—
ADD	6	10,6	—	65,5	—
	7	20,6	—	97,5	—
	8	7,6	—	71,0	—

T Testosterona.

Concentración del amortiguador: 0,1 mol/L .

Para ambas cepas, la condición óptima es el empleo de amortiguador fosfato a pH neutro, a diferencia de los resultados obtenidos por Wen-Hsiung Liu,⁶ 1994, en la transformación del colesterol a testosterona por *Mycobacterium* sp., en los que reporta el pH 6 como una condición óptima para la reacción. Es de señalar que los resultados de este autor fueron obtenidos a partir de extracto parcialmente purificado de la enzima 17-βOH esteroide deshidrogenasa, el comportamiento de la enzima puede estar sujeto a variaciones según el medio en el cual se encuentra. Habitualmente, las enzimas están en un ambiente reductor en el interior de las células, condiciones éstas que se deben mantener cuando se trabaja con extractos crudos por lo que generalmente aparecen diferencias en los pH óptimos de una misma enzima, no siendo iguales cuando se utiliza la célula entera que cuando es empleado un extracto de ella.

A pH > 7 la formación de testosterona resulta extremadamente baja y en la mayoría de los casos, es nula. Esto se explica por la necesidad de un medio reductor que facilite la

catálisis enzimática, evidentemente un medio rico en grupos hidroxilos favorece la oxidación y no hay formación de testosterona.

CONCLUSIONES

Las cepas de *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 y YSD-196 son capaces de formar testosterona a partir de ADD y AD respectivamente.

Con el empleo de amortiguador fosfato pH 7, se obtienen los mejores resultados de biotransformación para ambas cepas.

La cepa YSD-196 resulta más eficiente en la biotransformación que la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683.

BIBLIOGRAFIA

1. Schultz R.M., Groman E.V. and Engel L.L. B-hydroxysteroid dehydrogenase of *Pseudomonas testosteroni*. **J. Biol. Chem.**, **252**, 3775, 1977.
2. Singer Y., Shity H. and Bar R. Microbial transformations in a cyclodextrin medium. Part 2. Reduction of androstenedione to testosterone by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **35**, 731, 1991.
3. Hamada H. and Kawabe S. Biotransformation of AD by green cell suspension of *Marchantia polymorpha*: stereoselective reduction at carbon 17. **Life Science**, **48**, 613, 1991.
4. Wen-Hsiung L., Wen-Chang H. and Miaw-Sheve T. Bioconversion of cholesterol to cholest-4-en-3-one in aqueous/organic solvent two-phase reactors. **Enzyme and Microbial. Tech.**, **18**, 184, 1996.
5. Hung B.R., Falero A., Llanes N., and Pérez I. Testosterone as biotransformation product in steroid conversion by *Mycobacterium* sp. **Biotechnology Letters**, **16**, 497, 1994.
6. Wen-Hsiung L., Chih-Wei K., Kuo-Liang W., Chung-Yi L. and Wen-Yih H. Transformation of cholesterol to testosterone by *Mycobacterium* sp. **J. of Ind. Microbiol.**, **13**, 167, 1994.