



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Trabajo presentado para aspirar al título de
Doctor en Química

Biotransformación de esteroides para la obtención de compuestos de alto valor agregado

Q.F. Victoria Giorgi Dilacio

Orientadores:

Dra. María del Pilar Menéndez

Dr. Carlos García Carnelli

Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones
Departamento de Química Orgánica
Facultad de Química-Universidad de la República
2019

Dedicado a mis padres y a Emilio, con todo mi amor.

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que a lo largo de estos 5 años han contribuido a que este doctorado haya sido realizado, disfrutado y este llegando a su fin...



A Pilar y Carlos por haberme iniciado y formado en el mundo de las biotransformaciones y productos naturales, por su confianza en mí, su orientación científica y personal, y por el apoyo que me brindaron siempre.

Agradezco a quienes muy amablemente aceptaron formar parte del tribunal, Gabriela Garmendia, Ignacio Carrera y Alejandro Orden.

A todos los integrantes del LBB por haberme acompañado en el camino, todos los días. Todos contribuyeron en el desarrollo de esta tesis, y el agradecimiento es inmenso. Los quiero, aprendo y disfruto mucho con ustedes: David, Sonia, Paula, Nacho, Wilson, Paola, Lari, Cesar, Agus, Emi, Facu, Diego, Luis, Mariela, Ariel y Gonzalo. También a los que ya no están todos los días, Diego R. y Ale. Un especial agradecimiento a Sonia, Paula, Nacho, Lari (mi tutora estudiantil!) y Agus por haberme dedicado mucho de su tiempo, corregido varias veces informes y manuscritos, y por ayudarme con su guía en el desarrollo de algunas de las actividades.

A mis compañeros y amigos de Farmacognosia, Microbiología, LEQ, LSO, Bioquímica y Farmacéutica (casi todo FQ!). Por la ayuda en varias ocasiones, las charlas, el apoyo, prestarme reactivos/materiales, y dejarme usar sus equipos y laboratorios.

A Fabiana Maruca, por haber contribuido al desarrollo de este trabajo dedicando horas honorarias en el laboratorio con mucho entusiasmo y dedicación.

A Gustavo Seoane por haberme ayudado en la interpretación de varios RMN.

A Guillermo Moyna por su ayuda con los experimentos e interpretación de los RMN, y al Jefe Moyna por sus valiosas contribuciones y su tiempo dedicado a las correcciones.

A todos los que hicieron de mis pasantías de investigación en la UNICAMP (Campinas, Brasil) y Northumbria University (Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) una hermosa experiencia de aprendizaje científico y personal. Especialmente a los orientadores Dra. Anita J. Marsaioli, Dr. Justin Perry y Dr. Gary Black por su confianza en mí y el tiempo que me dedicaron. A la Dra. María Lair Sabóia por abrirme las puertas de su casa y acompañarme durante toda mi estadía en Campinas, por la amistad que generamos, y por enseñarme a realizar los ensayos de HTS. Al Dr. Michel J. Barros Chaves por su colaboración en la identificación por MALDI-TOF MS. A la Dra. Stefania Santoni, al Dr. Graeme Turnbull y a la BSc. Samantha Bowerbank por el tiempo que dedicaron en enseñarme y orientarme durante mi estadía en Northumbria University.

A Lanatur S.A. por haberme permitido recolectar muestras para realizar los aislamientos, especialmente al Ing. Ind. Eduardo Gründel. A LANCO S.A. por regalarme el colesterol y estar siempre dispuestos al intercambio, en especial al Ing. Qco. Juan Dutto por el libro del colesterol.

A quienes apoyaron y/o financiaron este trabajo: PEDECIBA, ANII, Comisión Académica de Posgrado, CSIC y Facultad de Química-UdelAR.

A mis afectos por todo su apoyo, ánimo y compañía a lo largo de estos años. A mis amigas de siempre que no me da el espacio para nombrarlas a todas, pero ellas saben que son esenciales para mí. A Fede, Felipe y Leandro por ser mi familia uruguaya en otros rincones del mundo, y por el ánimo que siempre me dan. A toda mi familia por acompañarme y alentarme siempre a hacer lo que quiera. En especial a mis padres Graciela y Victor, mis hermanos Leo y Juan, mis cuñadas Flo e Inés, y mis queridos sobrinos. A Gaby, Ger y Sol; y a Renzo y Platón por su compañía y amor incondicional.

Al final del final, le agradezco infinitamente a Emilio por hacer mis días más felices con su amor. Por soportarme, impulsarme y motivarme durante este doctorado y mucho más. Gracias a él por estar siempre acompañándome a recorrer este y todos los caminos.

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos.....	v
Tabla de contenido.....	vii
Índice de figuras	xi
Índice de tablas.....	xvi
Abreviaturas y siglas	xix
Resumen.....	xx
1. Introducción.....	1
1.1. Biotecnología y biotransformaciones	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Ventajas de las biotransformaciones frente a la síntesis orgánica convencional	3
1.1.3. Enzimas aisladas vs. células enteras	5
1.1.4. Búsqueda de nuevos biocatalizadores.....	6
1.2. Esteroides	8
1.2.1. Generalidades	8
1.2.2. Esteroles y ácidos biliares: estructura, función biológica biosíntesis y distribución.....	12
1.2.3. Esteroides en la industria farmacéutica	19
1.3. Biotransformaciones de esteroides	23
1.3.1. Biocatálisis en síntesis de drogas esteroideas	23
1.3.2. Biotransformación del colesterol.....	25
1.3.2.1 Catabolismo del Colesterol	25
1.3.2.2 Biotransformación del colesterol para obtener compuestos de mayor valor agregado	32
1.3.3. Biotransformación de ácidos biliares.....	43
1.3.3.1 Catabolismo microbiano de los ácidos biliares.....	43
1.3.3.2 Reacciones de biotransformación de ácidos biliares.....	45
1.3.4. Estrategias para mejorar la eficiencia de la biotransformación de esteroides	46
1.4. Objetivos.....	50
1.4.1. Objetivo general.....	50
1.4.2. Objetivos específicos	50
2. Resultados y discusión	51

2.1.	Aislamiento de microorganismos a partir de un hábitat rico en esteroides	51
2.2.	Identificación de los microorganismos aislados	54
2.2.1.	Identificación de bacterias.....	54
2.2.2.	Identificación de hongos.....	58
2.3.	Detección de actividades enzimáticas de los microorganismos aislados: screening de alto rendimiento (HTS).....	67
2.4.	Biotransformación del colesterol.....	75
2.4.1.	Screening primario de la biotransformación	75
2.4.2.	Elucidación estructural de los productos mayoritarios y estudio de su valor agregado respecto al colesterol.....	83
2.4.3.	Estudio de la biotransformación del colesterol con <i>Tsukamurella</i> sp.....	94
2.5.	Biotransformación de fitoesteroides	97
2.6.	Biotransformación de ácidos biliares	99
2.6.1.	Biotransformación del ácido litocólico con <i>Tsukamurella</i> sp.	103
2.6.1.1.	Biotransformación del ácido litocólico con <i>Tsukamurella</i> sp. utilizando diferentes agentes dispersantes del sustrato	107
2.6.1.2.	Evaluación del rendimiento de bioconversión en función del tiempo de reacción	109
2.6.1.3.	Biotransformación del ácido litocólico con células en reposo de <i>Tsukamurella</i> sp.	110
2.6.1.4.	Biotransformación del ácido litocólico con <i>Tsukamurella</i> sp. realizando adiciones sucesivas del sustrato	111
2.6.1.5.	Biotransformación con diferentes concentraciones iniciales de sustrato	112
2.6.1.6.	Curva de crecimiento de <i>Tsukamurella</i> sp.....	113
2.6.2.	Biotransformación del ácido cólico con <i>Tsukamurella</i> sp.	115
2.6.2.1.	Evaluación del porcentaje de bioconversión en función del tiempo de reacción.....	118
2.6.2.2.	Biotransformación del ácido cólico con células en reposo de <i>Tsukamurella</i> sp.	119
2.6.2.3.	Biotransformación del ácido cólico con <i>Tsukamurella</i> sp. utilizando diferentes agentes dispersantes del sustrato.....	120
2.6.3.	Capacidad de <i>Tsukamurella</i> sp. de utilizar distintas fuentes de carbono y energía	121
2.6.4.	Producción del ácido 3-cetolítico con <i>Tsukamurella</i> sp. en fermentador de 5 L ..	122
2.7.	Análisis de la secuencia del genoma completo de <i>Tsukamurella</i> sp.	127
3.	Conclusiones y perspectivas	133
4.	Parte experimental.....	137
4.1.	Reactivos y materiales.....	138

4.2.	Aislamiento de microorganismos a partir de un hábitat rico en esteroides	138
4.2.1.	Conservación de las cepas aisladas.....	140
4.3.	Identificación de microorganismos	141
4.3.1.	Identificación de bacterias.....	141
4.3.1.1.	Identificación mediante prueba bioquímicas primarias.....	141
4.3.1.2.	Identificación mediante MALDI-TOF MS	141
4.3.1.3.	Identificación mediante métodos moleculares	142
4.3.2.	Identificación de hongos filamentosos y levaduras.....	144
4.3.2.1.	Observación macroscópica y microscópica	144
4.3.2.2.	Identificación mediante métodos moleculares	144
4.3.2.2.1.	Identificación a nivel de especie del hongo filamentoso denominado H3	146
4.4.	Detección de actividades enzimáticas de los microorganismos aislados: screening de alto rendimiento (HTS).....	148
4.5.	Biotransformación del colesterol.....	151
4.5.1.	Screening primario de biotransformación del colesterol mediante los microorganismos aislados y de la colección del LBB	151
4.5.1.1.	Ensayos de biotransformación con bacterias.....	151
4.5.1.2.	Ensayos de biotransformación con hongos filamentosos	152
4.5.1.3.	Ensayos con levaduras	152
4.5.2.	Ensayos de biotransformación en mayor escala	153
4.5.3.	Separación y caracterización de los productos obtenidos. Evaluación de los porcentajes de bioconversión.....	153
4.5.4.	Elucidación estructural de los productos mayoritarios obtenidos con <i>Trichoderma koningiopsis</i> (H3) y <i>Mucor circinelloides</i> (Y2 y H4)	154
4.5.5.	Estudio de la biotransformación del colesterol por <i>Tsukamurella</i> sp.....	155
4.5.5.1.	Ensayos de biotransformación del colesterol variando del tiempo de agregado de sustrato y tiempo de reacción	155
4.5.5.2.	Ensayo de biotransformación del colesterol en medio de cultivo mínimo con colesterol como única fuente de carbono y energía	156
4.5.5.3.	Ensayo de biotransformación del colesterol mediante células de <i>Tsukamurella</i> sp. en reposo	157
4.6.	Biotransformación de fitoesteroides	158
4.7.	Biotransformación de ácidos biliares	158
4.7.1.	Ensayos de biotransformación.....	158

4.7.2.	Análisis de los productos obtenidos mediante GC-MS y evaluación de los porcentajes de bioconversión.....	159
4.7.3.	Ensayo de biotransformación de ácidos biliares por <i>Tsukamurella</i> sp.	160
4.7.3.1.	Ensayo en mayor escala.....	160
4.7.3.2.	Separación, purificación y elucidación estructural de productos	160
4.7.3.3.	Evaluación de rendimientos y porcentajes de bioconversión	161
4.7.3.4.	Biotransformación utilizando diferentes agentes dispersantes del sustrato.....	162
4.7.3.5.	Evaluación de la capacidad de crecimiento de <i>Tsukamurella</i> sp. con distintas fuentes de carbono y energía	163
4.7.3.6.	Evaluación de rendimientos y porcentajes de bioconversión en función del tiempo de reacción	163
4.7.3.7.	Evaluación del rendimiento de reacción de transformación del ácido litocólico por <i>Tsukamurella</i> sp. con distintas concentraciones de sustrato.....	164
4.7.3.8.	Biotransformación de ácidos biliares mediante células de <i>Tsukamurella</i> sp. en reposo	164
4.7.3.9.	Biotransformación del ácido litocólico con <i>Tsukamurella</i> sp. realizando adiciones sucesivas del sustrato	165
4.7.3.10.	Curva de crecimiento de <i>Tsukamurella</i> sp.....	166
4.7.4.	Producción del ácido 3-cetolitocólico con <i>Tsukamurella</i> sp. en fermentador de 5 L ..	167
4.8.	Secuenciado y análisis del genoma de <i>Tsukamurella</i> sp.....	168
4.8.1.	Análisis filogenético de <i>Tsukamurella</i> sp.....	168
4.8.2.	Análisis de la secuencia genómica	169
5.	Referencias	170
6.	Anexos	189
	Anexo I- Medios de cultivo y soluciones.....	189
	Anexo II- Certificados de depósito de cepas	191
	Anexo III- Espectros de RMN	194
	Anexo IV- Publicaciones	224

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- 1. a) Número de procesos de biotransformación que han sido iniciados a escala industrial por año. (Extraído de Straathof et al. 2002). b) Número de publicaciones y patentes que se refieren a “biocatálisis farmacéutica” en periodos de 5 años considerando los últimos 50 años (Extraído de Truppo 2017).	2
Figura 1- 2. Tipo de compuestos producidos usando procesos de biotransformación (basado sobre 134 procesos industriales) (Extraído de Straathof et al. 2002).	3
Figura 1- 3. Estructura y nomenclatura general de esteroides a) Gonano: estructura básica de todos los esteroides. b) Anillos del núcleo gonano en configuración <i>trans-trans-trans</i> . c) Anillos del núcleo gonano en configuración <i>cis-trans-trans</i> . d) Numeración en la estructura del colesterol.	9
Figura 1- 4. Estructura hidrocarbonada básica de esteroides. a) Gonanos. b) Estranos. c) Androstanos. d) Pregnanos. e) Colestanos. f) Colanos.	11
Figura 1- 5. Estructura de los principales esteroides presentes en la naturaleza.	13
Figura 1- 6. Estructura de los ácidos biliares C24: ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico y ácido quenodesoxicólico.....	14
Figura 1- 7. Esquema general de la biosíntesis de escualeno a partir de mevalonato.	16
Figura 1- 8. Esquema general de la biosíntesis de compuestos esteroidales a partir del escualeno.	17
Figura 1- 9. Producción de drogas esteroidales utilizando sapogeninas y esteroides como materiales de partida. Las líneas llenas representan reacciones de biotransformación mientras que las líneas ralladas indican reacciones químicas convencionales. Adaptado de (Fernandes et al. 2003).	22
Figura 1- 10. Principales sitios de biotransformación sobre sustratos esteroidales. Adaptada de (Nassiri-Koopaei & Faramarzi 2015).	24
Figura 1- 11. Conversión de colesterol a colesterolona. a) Reacción catalizada por ChOx. b) Reacción catalizada por 3 β -HSD.....	27
Figura 1- 12. Reacciones propuestas involucradas en la β -oxidación de la cadena lateral del colesterol. Adaptada de (García et al. 2012).	29
Figura 1- 13. Esquema general del catabolismo del colesterol en actinobacteria. ChOX: colesterol oxidasa; 3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; KstD: 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa; KsH: 3-cetoesteroide-9 α -hidroxilasa. Adaptado de (Kreit 2017).	31

Figura 1- 14. Principales productos obtenidos mediante biotransformación del colesterol. Código de colores de las flechas: Azul: hidroxilaciones; Verde: oxidación del grupo 3 β -hidroxilo e isomerización $\Delta^5 \rightarrow 4$; Naranja: clivaje de la cadena lateral; Violeta: oxidación; Amarillo: esterificación; Celeste: Reducción; Negro: oxidorreducciones de los metabolitos intermediarios obtenidos.	33
Figura 1- 15. Vía de degradación hipotética del ácido cólico. Propuesta por Philipp teniendo en consideración las enzimas, genes y metabolitos identificados en distintas bacterias capaces de degradar ácidos biliares: <i>Comamonas testosteroni</i> ; <i>Clostridium scindens</i> ; <i>Rhodococcus erythropolis</i> ; <i>Pseudomonas sp.</i> y <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Adaptada de (Philipp 2011).	44
Figura 1- 16. Reacciones de biotransformación para obtener el ácido ursodesoxicólico. a) Hidroxilación en C7 del ácido litocólico usando células enteras de <i>Fusarium equiseti</i> b) Epimerización del grupo hidroxilo en C7 mediante células enteras de <i>Xanthomonas maltophilia</i> . Adaptado de (Eggert et al. 2014).	46
Figura 2- 1. Lugar donde se realizó el muestreo para el aislamiento de microorganismos: pileta de tratamiento aerobio de efluentes de lavado de lana.	51
Figura 2- 2. Morfología de <i>Talaromyces purpureogenus</i> (H5). A) Apariencia de la colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C, B) Apariencia de la colonia al reverso de la placa, C) Conidióforo, D) Conidios.	58
Figura 2-3. Morfología de <i>Fusarium sp.</i> (H6). A) Apariencia de la colonia a los 3 días de crecimiento, B) Apariencia de la colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C, C) Apariencia de la colonia al reverso de la placa, D) Clamidospora, E) Microconidios, F) Macroconidio. Imágenes E-F: observación al microscopio del micelio teñido con safranina (D y F: aumento 100X; E: aumento 40X).	59
Figura 2-4. Morfología de <i>Fusarium sp.</i> (Y3). A) Apariencia de la colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C, B) Apariencia de la colonia al reverso de la placa, C) Macroconidio, D) Microconidio, E) Clamidosporas en cadena (de a dos).	60
Figura 2- 5. Morfología de <i>Trichoderma Koningiopsis</i> (H3). A) Apariencia de la colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C, B) Apariencia de la colonia al reverso de la placa, C) Conidios, D) Conidióforos, E) Fiálides.	61
Figura 2- 6. Morfología de <i>Trichoderma asperellum</i> (Y5). A) Apariencia de la colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C, B) Apariencia de la colonia al reverso de la placa, C) Conidios, D) Conidióforos, E) Fiálides, F) Clamidosporas.	61

Figura 2- 7. Morfología de <i>Aspergillus</i> sp. (Y6). A) Apariencia de la colonia en PDA a los 3 días de crecimiento a 28 °C, B) Apariencia de la colonia a los 7 días de crecimiento en PDA a 28 °C, C) Apariencia de la colonia al reverso de la placa, D) Conidios, E) Conidióforos.....	62
Figura 2- 8. Morfología de <i>Mucor circinelloides</i> (H4). A) Apariencia de la colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C, B) Apariencia de la colonia al reverso de la placa. C) Columela D) Esporangiosporas.....	63
Figura 2- 9. Morfología de <i>Mucor circinelloides</i> (Y2). A) Apariencia de la colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C. B) Apariencia de la colonia al reverso de la placa. C) Micelio aéreo, D) Columela, E) Esporangiosporas.....	63
Figura 2- 10. Sondas fluorogénicas utilizadas en el ensayo HTS para detectar actividad esterasa (ES1), epoxidasa (EP1), lipasa (LIP) y Baeyer-Villiger monooxigenasa (BV1, BV3 y BV4).	68
Figura 2- 11. Porcentajes de bacterias con actividad enzimática detectada sobre el total de bacterias evaluadas (13).	73
Figura 2- 12. Porcentajes de hongos filamentosos con actividad enzimática detectada sobre el total de los hongos filamentosos aislados (8).	73
Figura 2- 13. Esquema general y resultados obtenidos en el screening primario de la biotransformación del colesterol.....	75
Figura 2- 14. Transformación del colesterol (I) a 7 β -hidroxicolesterol (II), colesterona (III) y 5,6-epoxicoolesterol (IV) catalizada por <i>Trichoderma koningiopsis</i> y dos cepas de <i>Mucor circinelloides</i> respectivamente.	83
Figura 2- 15. Asignaciones en el espectro de ¹ H RMN del producto 7 β -hidroxicolesterol.	87
Figura 2- 16. Espectros de 7 β -hidroxicolesterol en MeOD A) Señal de H7 en el espectro de protón. B) Señal de H7 en el espectro de ¹ H NMR desacoplando a 5.27 ppm (señal de H6). C) Representación de la estructura de 7 β -hidroxicolesterol mostrando el acoplamiento axial <i>trans</i> entre H7-H8 β	88
Figura 2- 17. Fitoesteroides utilizados como sustratos en la biotransformación.	97
Figura 2- 18. Transformación del ácido litocólico catalizada por <i>Tsukamurella</i> sp.....	103
Figura 2- 19. Porcentaje de bioconversión obtenido en la transformación del ácido litocólico a con <i>Tsukamurella</i> sp. utilizando distintos agentes dispersantes del sustrato.	108
Figura 2- 20. Rendimiento de bioconversión del ácido litocólico a ácido 3-cetolítico mediante células en crecimiento de <i>Tsukamurella</i> sp. en función del tiempo (a partir de agregado el sustrato disperso en aceite de ricino etoxilado 0.2 %).	110
Figura 2- 21. Curvas de crecimiento de <i>Tsukamurella</i> sp.	113

Figura 2- 22. Curva de crecimiento de <i>Tsukamurella</i> sp. y formación de ácido 3-cetolítico.	114
Figura 2- 23. Transformación del ácido cólico catalizada por <i>Tsukamurella</i> sp.	115
Figura 2- 24. Porcentaje de bioconversión del ácido cólico a ácido 3-cetolítico mediante células en crecimiento de <i>Tsukamurella</i> sp. en función del tiempo (a partir de agregado el sustrato).	118
Figura 2- 25. Porcentaje de bioconversión obtenido en la transformación del ácido cólico con <i>Tsukamurella</i> sp. utilizando distintos agentes dispersantes del sustrato.	120
Figura 2- 26. Curvas de crecimiento de <i>Tsukamurella</i> sp. en ensayos a escala matraz y fermentador de 5 L (experimentos N°1 y N°2).	124
Figura 2- 27. Foto del fermentador mostrando A) la generación de espuma en el medio B) la adhesión de las células de <i>Tsukamurella</i> sp. a la pared del fermentador.	125
Figura 2- 28. Árbol filogenético construido empleando el método Neighbour-Joining basado en las secuencias del gen ARNr 16S de la cepa aislada: <i>Tsukamurella</i> sp. M9B2 (marcada con un rombo rojo) y cepas relacionadas de especies del género <i>Tsukamurella</i> . Los valores de Bootstrap fueron calculados desde 1000 réplicas y expresados en porcentaje. Los nombres de las cepas y los números de acceso del GenBank son citados de la base de datos GenBank del NCBI.	128
Figura 4- 1. Esquema general de las actividades realizadas.	137
Figura 4- 2. Lavadero de lana donde se recolectaron muestras para el aislamiento de microorganismos, M1 y M2. a) Imagen de Google Earth Pro. b) Foto del lugar.	139
Figura 4- 3. Programa de PCR utilizado para la amplificación del gen del ARN ribosomal 16S de las cepas bacterianas.	143
Figura 4- 4. Programa de PCR utilizado para la amplificación de la región ITS de hongos filamentosos y la región ITS y el dominio D1/D2 del ADN ribosomal 26S de levaduras.	145
Figura 4- 5. Programa de PCR utilizado para la amplificación de la región ITS y del gen <i>tef1</i>	146
Figura 4- 6. Compuestos usados como sondas fluorogénicas en el ensayo HTS.	149
Figura 4- 7. Esquema de ensayo enzimático utilizando sondas fluorogénicas derivadas de umbeliferona para la detección de hidrolasas y Baeyer-Villiger monooxigenasas. EPH= epoxidasa; EST= esterasa; LIP= lipasa; BVMO: Baeyer-Villiger monooxigenasa; Cum= cumarina; BSA=albúmina de suero bovino. Adaptado de (Zucoloto 2011).	150
Figura 4- 8. Esquema general de los ensayos de biotransformación del colesterol con <i>Tsukamurella</i> sp.	155

Figura 4- 9. Estructura de los sustratos (ácido cólico y litocólico) derivatizados como trimetilsilil metil ésteres para su análisis por GC-MS.....	159
Figura 4- 10. Curva de calibración del ácido 3-cetolitocólico.....	164

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1- 1. Ventajas y desventajas asociadas a las enzimas y células enteras como biocatalizadores en comparación con catalizadores químicos. Adaptado de (Buchholz et al. 2012).	4
Tabla 1- 2. Transformación del colesterol. Producción de colestero, 5-colesten-3-one, 6 β -hidroperoxi-4-colesten-3-ona, 1,4-colestadiene-3-ona y 4,6-colestadien-3-ol mediante célula entera y/o enzima ChOx purificada. Reacciones reportadas durante el periodo 2000-2019.	35
Tabla 1- 3. Productos e intermediarios obtenidos por clivaje de la cadena lateral y oxidación de los anillos del colesterol mediante biocatalizador de célula entera. Reacciones reportadas durante el periodo 2000-2019.	39
Tabla 1- 4. Hidroxilación del colesterol mediante biotransformaciones. Reacciones reportadas durante el periodo 2000-2019.	42
Tabla 2- 1. Microorganismos aislados, muestra a partir de la cual fueron aislados y medio de cultivo utilizado.	53
Tabla 2- 2. Resultados de las pruebas bioquímicas primarias realizadas a las bacterias.	54
Tabla 2- 3. Resultados obtenidos en la identificación de las bacterias mediante MALDI-TOF MS.	56
Tabla 2- 4. Identificación de las bacterias mediante análisis filogenético de la secuencia del gen ARNr 16S.	57
Tabla 2- 5. Resultados de la identificación de los hongos filamentosos aislados mediante análisis de la secuencia de la región ITS1-5.8S ADN ribosomal-ITS2 y de la levadura H2 mediante análisis de la secuencia del dominio D1/D2 del ARNr 26S.	64
Tabla 2- 6. Porcentaje de bioconversión de las sondas para BVMO con bacterias como biocatalizadores.	69
Tabla 2- 7. Porcentaje de bioconversión de las sondas para BVMO con hongos como biocatalizadores.	70
Tabla 2- 8. Porcentaje de bioconversión de las sondas para epoxihidrolasas, esterasas y lipasas con bacterias como biocatalizadores.	71
Tabla 2- 9. Porcentaje de bioconversión de las sondas para epoxihidrolasas, esterasas y lipasas con hongos como biocatalizadores.	71
Tabla 2- 10. Caracterización mediante GC-MS de productos obtenidos en la transformación del colesterol con bacterias (96 horas de reacción).	79

Tabla 2- 11. Caracterización mediante GC-MS de productos obtenidos en la transformación del colesterol con hongos filamentosos.	81
Tabla 2- 12. Porcentajes de bioconversión de los productos mayoritarios obtenidos en la transformación del colesterol.	82
Tabla 2- 13. Desplazamientos químicos (δ) y constates de acoplamiento (J) de las señales observadas en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de los productos de transformación 7β -hidroxicolesterol y colesterona en CDCl_3	84
Tabla 2- 14. Datos de espectroscopia de masa (MS) de los productos 7β -hidroxicolesterol, colesterona y 5,6-epoxicoolesterol.	86
Tabla 2- 15. Desplazamientos químicos (δ) y constates de acoplamiento (J) de las señales observadas en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de los productos de transformación $5\beta,6\beta$ -epoxicoolesterol y $5\alpha,6\alpha$ -epoxicoolesterol en CDCl_3	91
Tabla 2- 16. Precio, cantidad por presentación, pureza, efectos biológicos y utilidad de los productos obtenidos en la biotransformación del colesterol por <i>Trichoderma koningiopsis</i> (H3) y <i>Mucor circinelloides</i> (H4 e Y2).	93
Tabla 2- 17. Caracterización por GC-MS de productos obtenidos en la transformación del colesterol con <i>Tsukamurella</i> sp. en 48 horas de reacción (ensayos A y C).	96
Tabla 2- 18. Resultados obtenidos en la biotransformación del ácido cólico.	100
Tabla 2- 19. Resultados obtenidos en la biotransformación del ácido litocólico.	101
Tabla 2- 20. Desplazamientos químicos (δ) y constates de acoplamiento (J) de las señales observadas en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del ácido 3-cetolítico.	105
Tabla 2- 21. Rendimiento de la bioconversión promedio y desviación estándar en función del tiempo (a partir de agregado el sustrato).	109
Tabla 2- 22. Rendimiento de la bioconversión promedio y desviación estándar obtenido en la biotransformación con diferentes concentraciones iniciales de sustrato.	112
Tabla 2- 23. Desplazamientos químicos (δ) y constates de acoplamiento (J) de las señales observadas en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del ácido 3-cetocólico.	116
Tabla 2- 24. Porcentaje de bioconversión promedio y desviación estándar en función del tiempo (a partir de agregado el sustrato).	118
Tabla 2- 25. Comparación de las condiciones de ensayos a escala matraz y fermentador de 5 L (experimentos N°1 y N°2).	122
Tabla 2- 26. Genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de esteroides, identificados en el genoma de <i>Tsukamurella</i> sp. M9B2. Descripción de las enzimas según	

información encontrada en la base de datos BRENDA (www.brenda-enzymes.org) (Jeske et al. 2019).	131
---	-----

ABREVIATURAS Y SIGLAS

3 β -HSD- 3 β -hidroxiesteroide

deshidrogenasa / Δ^5 - Δ^4 isomerasa

3 α -HSDH- 3 α -hidroxiesteroide

deshidrogenasa

9 α -OH-AD- 9 α -hidroxi-4-andosten-3,17-diona

AcOEt- Acetato de Etilo

AD- 4-androsten-3,17-diona o androstendiona

ADD- 1,4-androstadien-3,17-diona o androstendiendiona

ADN- Ácido desoxirribonucleico

ATP- Trifosfato de adenosina

BLAST- Basic Local Alignment Search Tool (NCBI)

BSA- Albúmina de suero bovino

ChOx- 3 β -hidroxiesteroide: oxígeno oxidorreductasa

CoA- Coenzima A

Csp- Cantidad suficiente para

DMSO- Dimetil sulfóxido

FAD- Flavín adenín dinucleótido

FPP- Pirofosfato de farnesilo

GC- Cromatografía gaseosa

GPP- Pirofosfato de geranilo

HPLC- Cromatografía líquida de alta eficiencia

HTS- High throughput screening; screening de alto rendimiento.

IPP- Pirofosfato de isopentenilo

KsH- 3-cetoesteroide-9 α -monooxigenasa

KStD- 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa

LBB- Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones de Facultad de Química, UdeLaR

MALDI-TOF MS- Espectroscopia de masas con fuente de desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo.

MAPP- Pirofosfato de dimetilalilo

MS- Espectroscopia de masas

NADH- Nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NCBI- National Center for Biotechnology Information

OD₆₀₀- Densidad óptica a 600 nm

PCR- Polymerase Chain Reaction

RMN- Resonancia magnética nuclear

ARNr- Ácido ribonucleico ribosomal

RESUMEN

Los fármacos esteroidales son usados para un amplio rango de propósitos terapéuticos, representado uno de los más grandes sectores de la industria farmacéutica. Es conocido que las transformaciones microbianas de esteroides para la producción de fármacos son uno de los ejemplos más exitosos de procesos biotecnológicos aplicados a escala industrial. Estas permiten obtener precursores e intermediarios claves para la síntesis de fármacos mediante procesos que cumplan con los principios de la química verde y el desarrollo sustentable. En este contexto es que surge el interés de investigar la biotransformación de esteroides en productos de mayor valor agregado.

En esta tesis se realizó el aislamiento de microorganismos desde efluentes de lavado de lana ricos en esteroides con el fin de encontrar biocatalizadores capaces de transformar esteroides. Como resultado, se logró recuperar 15 bacterias, 8 hongos filamentosos y 2 levaduras. La mayoría de ellos fueron identificados utilizando distintas metodologías: métodos moleculares, observación de las características macroscópicas y microscópicas de hongos filamentosos e identificación de bacterias empleando pruebas bioquímicas primarias y MALDI-TOF MS. Además, los microorganismos fueron caracterizados en función de sus capacidades catalíticas realizando la detección de actividades epoxihidrolasas, esterasas, lipasas y Baeyer-Villiger monooxigenasas en células enteras. Al mismo tiempo, se evaluó la capacidad de biotransformación del colesterol en los microorganismos aislados. Cuatro bacterias y cinco hongos filamentosos, identificados como *Acinetobacter* sp., *Exiguobacterium* sp., *Tsukamurella* sp., *Streptomyces* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Trichoderma koningiopsis* y las dos cepas de *Mucor circinelloides* mostraron la capacidad de transformar el colesterol, obteniéndose los productos 7 β -hidroxicolesterol, colesteroona y 5,6-epoxicolesterol.

Por otra parte, las bacterias capaces de transformar el colesterol fueron evaluadas en la biotransformación de los ácidos litocólico y cólico. De esta forma se logró determinar que *Tsukamurella* sp. es un biocatalizador novedoso para la obtención de los ácidos 3-cetolitocólico y 3-cetocólico. Fueron estudiadas distintas condiciones de las reacciones de biotransformación de

esteroides con esta bacteria, incluyendo el escalado de la oxidación del ácido litocólico a un fermentador de 5 L.

Al mismo tiempo, se logró identificar la secuencia de los genes que codifican para varias enzimas relacionadas a la biotransformación de sustratos esteroidales en la secuencia genómica de *Tsukamurella* sp.

De esta forma, este trabajo contribuye al desarrollo de las biotransformaciones de esteroides aportando nuevos biocatalizadores para obtener compuestos con potencial aplicación en síntesis de fármacos y/o con actividad farmacológica por sí mismos.

1. Introducción

1.1. Biotecnología y biotransformaciones

1.1.1. Generalidades

La biotecnología es definida como la aplicación técnica de sistemas biológicos o sus partes para proveer productos y servicios con el fin de satisfacer necesidades humanas (Buchholz et al. 2012). Esta se origina de la superposición de diferentes áreas como biología, química e ingeniería de procesos. Una de las áreas que se encuentra dentro de la biotecnología es la de biocatálisis y biotransformaciones. En el marco de esta tesis resulta necesario definir estos términos, los cuales muchas veces son utilizados indistintamente. La biocatálisis se refiere a la conversión química de una sustancia a un producto deseado utilizando una enzima aislada (libre o inmovilizada) (Leresche & Meyer 2006). En cambio, las biotransformaciones se refieren a la conversión química de una sustancia a un producto deseado utilizando usualmente células enteras, que contienen la/s enzima/s necesarias (Leresche & Meyer 2006). Otro término muy utilizado es el de bioconversión, el cual abarca tanto a la biocatálisis como a las biotransformaciones, refiriéndose a la conversión química de una sustancia usando agentes biológicos, los cuales se denominan biocatalizadores (Leresche & Meyer 2006). Estos agentes biológicos que pueden ser enzimas aisladas y/o células enteras de microorganismos (hongos filamentosos, bacterias y levaduras), tanto en su forma libre como inmovilizadas.

Las biotransformaciones se han convertido en una poderosa herramienta para la síntesis química de compuestos de valor agregado de una manera sustentable. El concepto de sustentabilidad fue introducido por la Comisión Mundial sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo con el propósito de promover el necesario "...desarrollo que satisface las necesidades de la generación presente sin comprometer la capacidad de las futuras generaciones para satisfacer sus propias necesidades" (Organización de Naciones Unidas 1987). Para que un nuevo proceso sea económica y medioambientalmente más sustentable que uno ya existente debe ser diseñado para reducir el consumo de recursos (ej. de materiales, energéticos, aire, agua), la producción de

residuos, el impacto medioambiental, y aumentar el reciclaje de los residuos o subproductos generados (Truppo 2017; Sun et al. 2018). Es así como las biotransformaciones surgen como una solución para lograr procesos industriales que cumplan con los principios de la química verde y el desarrollo sustentable, con varias ventajas asociadas a su aplicación en la síntesis de fármacos e intermediarios en comparación con los métodos químicos convencionales.

En los últimos años ha crecido rápidamente el número de biotransformaciones que han sido llevadas a escala industrial (Fig. 1-1 a) (Truppo 2017). La aplicación de procesos biocatalíticos en la industria farmacéutica ha tenido un gran incremento en las últimas dos décadas (Fig. 1-1 b) (Truppo 2017).

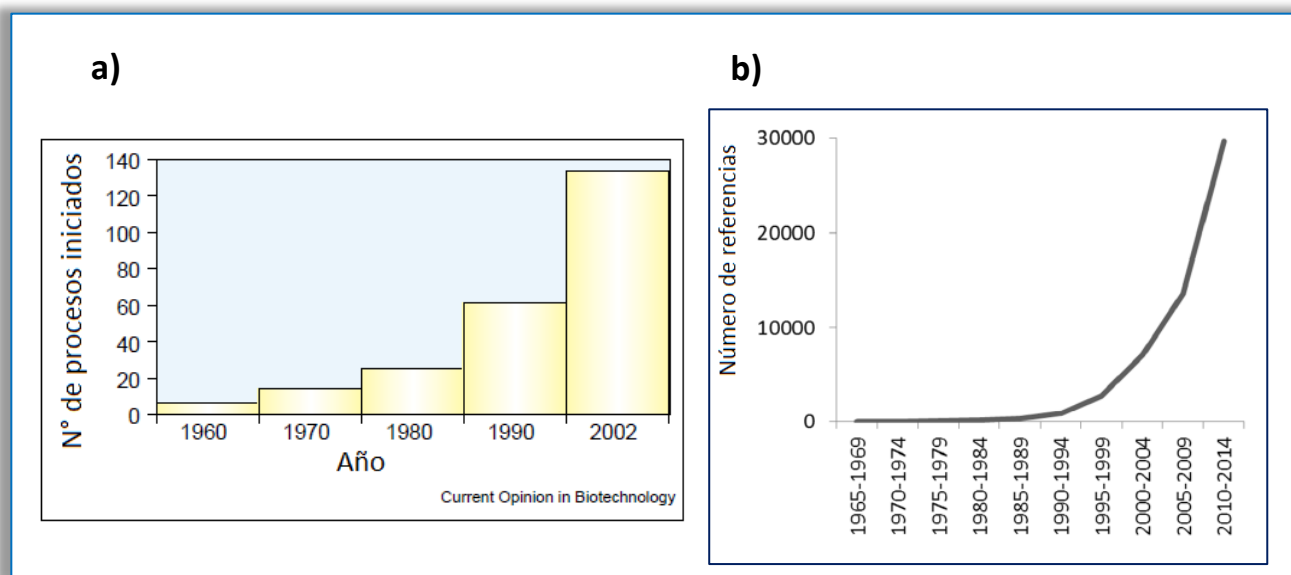


Figura 1- 1. a) Número de procesos de biotransformación que han sido iniciados a escala industrial por año. (Extraído de Straathof et al. 2002). **b)** Número de publicaciones y patentes que se refieren a “biocatálisis farmacéutica” en periodos de 5 años considerando los últimos 50 años (Extraído de Truppo 2017).

El análisis de las biotransformaciones utilizadas en la industria demuestra que estas son en su mayoría aplicadas para generar productos naturales y/o derivados de los mismos (Fig. 1-2) (Straathof et al. 2002). Particularmente en el caso de los compuestos esteroidales y sus derivados, los cuales poseen una estructura compleja difícil de sintetizar por métodos químicos convencionales, las biotransformaciones resultan ser un método apropiado para su producción

(Bhatti & Khera 2012). Además, sumado a las ventajas asociadas a las biotransformaciones de compuestos orgánicos en general, estas permiten obtener nuevos metabolitos a partir de compuestos esteroidales, los cuales pueden presentar propiedades terapéuticas diferentes o mejoradas (Fernandes & Cabral 2010).

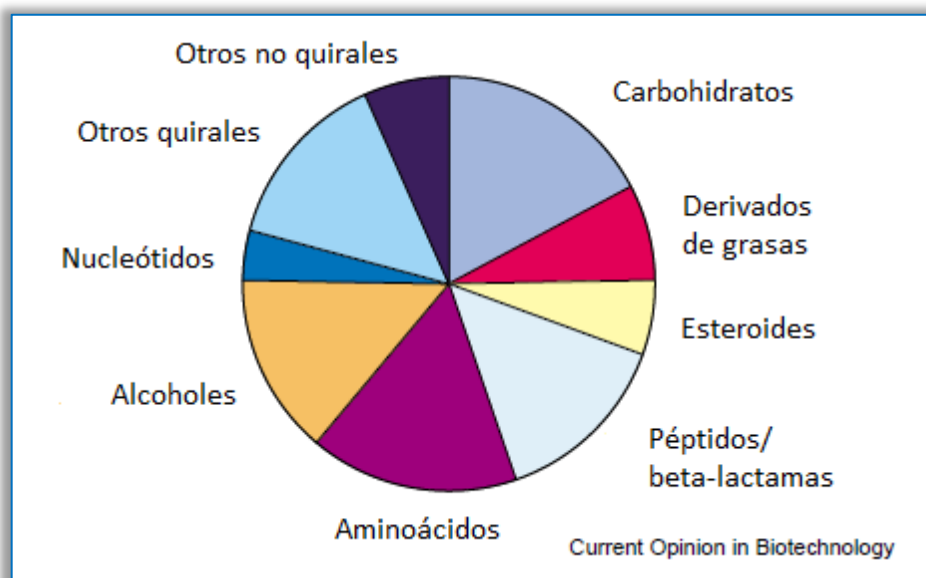


Figura 1- 2. Tipo de compuestos producidos usando procesos de biotransformación (basado sobre 134 procesos industriales) (Extraído de Straathof et al. 2002).

1.1.2. Ventajas de las biotransformaciones frente a la síntesis orgánica convencional

El uso de biocatalizadores en síntesis orgánica presenta una serie de ventajas sobre la catálisis convencional. Estos son reactivos biodegradables, pueden catalizar un amplio rango de reacciones, la mayoría actúan bajo condiciones suaves de reacción, por lo general a temperaturas cercana a la temperatura ambiente (20-40 °C) y a pH cercano al neutro (pH 5-8), lo cual hace a la biocatálisis una metodología amigable con el medioambiente (Faber 2011).

A estas ventajas se le suma la alta quimio-, regio- y estereoselectividad de las enzimas, lo cual es más difícil de lograr por métodos químicos convencionales. En estos últimos, generalmente son necesarios pasos de protección y desprotección de los grupos funcionales de una molécula para poder lograr la regio- y estereoselectividad requerida en el producto final de síntesis, mientras que las biotransformaciones generalmente no requieren estos pasos de

protección/desprotección. Sumado a esto, las biotransformaciones permiten la síntesis de derivados difíciles o imposibles de obtener por síntesis clásica (Tabla 1-1).

Tabla 1- 1. Ventajas y desventajas asociadas a las enzimas y células enteras como biocatalizadores en comparación con catalizadores químicos. Adaptado de (Buchhloz et al. 2012).

Ventajas:	Desventajas:
• Estereo- y regio- selectivas • Requieren bajas temperaturas • Bajo consumo de energía • Muchas de ellas activas a pH 2-12 • Menos subproductos • No tóxicos cuando son correctamente usados • Pueden ser reusadas • Pueden ser degradadas biológicamente • Pueden ser producidas en grandes cantidades	• Células y enzimas pueden ser: -inestables a altas temperaturas -inestables a valores de pH extremos -inestables frente a solventes agresivos -inhibidas por algunos metales -hidrolizadas por peptidasas • Algunas enzimas: -son todavía muy caras -requieren cosustratos caros

Sin embargo, resulta necesario resaltar que el uso de biocatalizadores muchas veces puede estar limitado por sus propiedades biológicas y químicas. Las principales limitaciones del uso de las biotransformaciones son la baja disponibilidad de cepas y enzimas para catalizar una reacción determinada, la posible inhibición del biocatalizador por el producto formado y la posible necesidad de regeneración de cofactores (Bracco 2014). Por otro lado, el desarrollo de un proceso de biotransformación desde la búsqueda del biocatalizador hasta su aplicación a escala industrial demanda mucho tiempo (Demirjian et al. 1999).

Por tanto, muchas veces la combinación de métodos químicos convencionales y reacciones de biotransformación resulta ser la mejor opción para la síntesis de un determinado compuesto.

1.1.3. Enzimas aisladas vs. células enteras

Como biocatalizadores es posible usar enzimas aisladas o células enteras de los microorganismos, tanto en forma libre como inmovilizada, dependiendo la elección fundamentalmente del tipo de reacción, la necesidad de cofactores y la escala a la que se realiza la biotransformación (Buchholz et al. 2012). Cuando se trata de procesos multienzimáticos y/o reacciones que requieren cofactores, las biotransformaciones llevadas a cabo mediante células enteras son de preferencia frente al uso de las enzimas aisladas (Fernandes & Cabral 2010). En la célula entera el propio metabolismo celular es el que recicla el cofactor (ej. NADH, FAD) a partir de una fuente de energía más barata, por ejemplo glucosa, por lo cual no es necesario agregar el mismo externamente, siendo el proceso económicamente más rentable en comparación con el uso de la enzima aislada (Bracco 2014). La alternativa a esto es el uso de enzimas aisladas donde la regeneración es llevada a cabo por otro sistema enzimático agregando una coenzima y un cosustrato barato. Además, utilizando células enteras para la biotransformación no sólo se reducen los costos relacionados al cofactor (en caso de que este sea necesario) sino también se reduce el costo de producción del biocatalizador ya que no son necesarios los pasos de aislamiento y purificación de la enzima (Bortolini et al. 1997).

Por otro lado, las enzimas aisladas tienen la ventaja de permitir un mayor control sobre las reacciones, y la alta especificidad para la reacción seleccionada lleva a que raramente se produzcan reacciones secundarias no deseadas (Bortolini et al. 1997). Mientras que en el uso de células enteras es probable que se den reacciones secundarias, restricciones difusionales y lisis celular en el caso de que el producto o sustrato utilizado resulte tóxico para las células. Las estrategias más eficientes para resolver estas últimas limitantes incluyen la selección de cepas tolerantes a altas concentraciones del sustrato o producto tóxico y la recuperación in situ del producto formado (Malaviya & Gomes 2008; Donova & Egorova 2012). Las enzimas aisladas requieren equipamiento simple y el *work-up* de la reacción resulta más fácil en comparación con el uso de células enteras (Bortolini et al. 1997). Además, generalmente las enzimas aisladas pueden catalizar la biotransformación en ambas direcciones dependiendo de las condiciones experimentales, mientras que las células enteras usualmente catalizan sólo una de las dos posibles reacciones (Bortolini et al. 1997).

Con respecto a la producción industrial de drogas esteroidales, las células enteras son el biocatalizador de elección debido a que la mayoría de las biotransformaciones involucradas son reacciones redox que requieren cofactores, por lo que su utilización es económicamente más rentable que el uso de enzimas aisladas (Donova 2007).

1.1.4. Búsqueda de nuevos biocatalizadores

La metodología tradicional para encontrar nuevos biocatalizadores se basa en el cultivo y aislamiento de microorganismos a partir de muestras del medioambiente como agua o suelo, residuos o efluentes industriales, tejidos animales o vegetales, entre otros ejemplos (Buchhloz et al. 2012). Una vez que el microorganismo con la actividad deseada es encontrado e identificado, puede realizarse la purificación y caracterización bioquímica de la enzima o utilizar el biocatalizador en forma de célula entera. También es posible descubrir nuevas enzimas mediante la búsqueda de microorganismos que se encuentran depositados en las colecciones de cepas como la ATCC (American Type Culture Collection) o la DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) (Buchhloz et al. 2012).

Sin embargo, sólo muy pocos microorganismos pueden ser exitosamente cultivados en el laboratorio. Dependiendo del hábitat, se estima que menos del 1% de los microorganismos presentes en una muestra medioambiental pueden ser cultivados en las condiciones estándar del laboratorio (Amann et al. 1990). Esto se debe a que las condiciones adecuadas de cultivo de ese microorganismo son desconocidas o el crecimiento de ese microorganismo se da a una velocidad muy lenta y/o depende de otras especies que le proveen los nutrientes que necesita (Buchhloz et al. 2012).

Por esto, las herramientas metagenómicas son ampliamente empleadas para aislar e identificar enzimas con nuevas actividades biocatalíticas desde comunidades microbianas sin necesidad de cultivar los microorganismos (Steele et al. 2008; Madhavan et al. 2017). El avance en técnicas moleculares como la clonación y secuenciación ha permitido el estudio del genoma de microorganismos no cultivables. A través de la metagenómica, definida como el análisis genómico de comunidades microbianas, es posible analizar poblaciones de microorganismos recuperando su material genético directamente desde el medioambiente, de manera independiente de su cultivo (Madhavan et al. 2017). Las técnicas metagenómicas involucran la construcción de

librerías mediante el clonado de fragmentos de ADN genómico en vectores de expresión adecuados obteniendo así clones que son usados para transformar un hospedero heterólogo, el cual en la mayoría de los casos es *Escherichia coli* (Madhavan et al. 2017).

Además de la metodología clásica de cultivo de microorganismos y la aproximación metagenómica, existe una tercera metodología para la búsqueda de nuevos biocatalizadores: la búsqueda *in silico* de enzimas (Buchhloz et al. 2012). Las secuencias de proteínas obtenidas por el secuenciado de enzimas, genomas completos o consorcios microbianos se encuentran depositadas en bases de datos públicas como GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) o EMBL Nucleotide Sequence Database del EBI (European Bioinformatic Institute). Sin embargo, de todas esas secuencias depositadas solo una pequeña fracción corresponde a enzimas que han sido producidas en el laboratorio, cuya actividad y propiedades bioquímicas han sido experimentalmente comprobadas (Kusnezowa & Leichert 2017). Para muchas de estas proteínas cuya secuencia se encuentra depositada en bases de datos, una posible actividad enzimática es inferida por homología de secuencias, pero esta asignación puede muchas veces ser errónea. Esta gran cantidad de proteínas de desconocida o inferida actividad enzimática representa un gran potencial biotecnológico. Cuanta más información acerca de una clase de enzimas existe, más fácil es descubrir nuevos biocatalizadores a partir de bases de datos. Si muchas enzimas con una actividad definida ya están descritas en la literatura, una comparación de la secuencia de esas proteínas junto a datos experimentales que confirmen la actividad o especificidad permite detectar regiones conservadas entre esas secuencias, y una búsqueda de esas secuencias en las bases de datos abre la posibilidad de encontrar nuevos y útiles biocatalizadores (Buchhloz et al. 2012).

A pesar de la variedad de estrategias disponibles para la búsqueda de nuevos biocatalizadores, no todas las enzimas encontradas en la naturaleza son adecuadas para determinadas aplicaciones. Por ejemplo, la actividad y estabilidad de la enzima, la especificidad por el sustrato y la enantioselectividad del biocatalizador no siempre son las adecuadas. Estas limitaciones pueden ser superadas por la optimización del biocatalizador empleando métodos de ingeniería de proteínas (Buchhloz et al. 2012).

El descubrimiento de cepas adecuadas capaces de catalizar las reacciones deseadas sigue siendo un desafío en el campo de la biotransformación de esteroides (Deshcherevskaya et al. 2016). Hasta ahora, han sido descubiertos muy pocos microorganismos capaces de transformar eficientemente esteroides a compuestos de valor agregado, por lo que continúa la necesidad de aislar nuevas cepas (Malaviya & Gomes 2009). La gran mayoría de las enzimas involucradas en el metabolismo de plantas y bacterias son aún desconocidas o se han caracterizado únicamente por sus propiedades bioquímicas pero no así desde su potencial sintético (Riva 2013).

1.2. Esteroides

1.2.1. Generalidades

Los esteroides son lípidos terpenoides que contienen en su estructura un esqueleto básico de cuatro anillos fusionados entre sí denominado núcleo gonano (Fig. 1-3 a). Este esqueleto consiste en 17 átomos de carbonos arreglados en forma de un sistema de anillos conocido como ciclopentanoperhidrofenantreno. En la mayoría de los esteroides naturales la unión entre los anillos A y B, B y C; y C y D posee configuración *trans*, pudiéndose presentar la configuración *cis* en la unión de los anillos A y B en algunos esteroides naturales (Fig. 1-3 b-c). Los sustituyentes del esqueleto básico que se encuentran por encima del plano definido por la molécula se nombran β , y aquellos que se encuentran por debajo de dicho plano son nombrados α (Fig. 1-3 b).

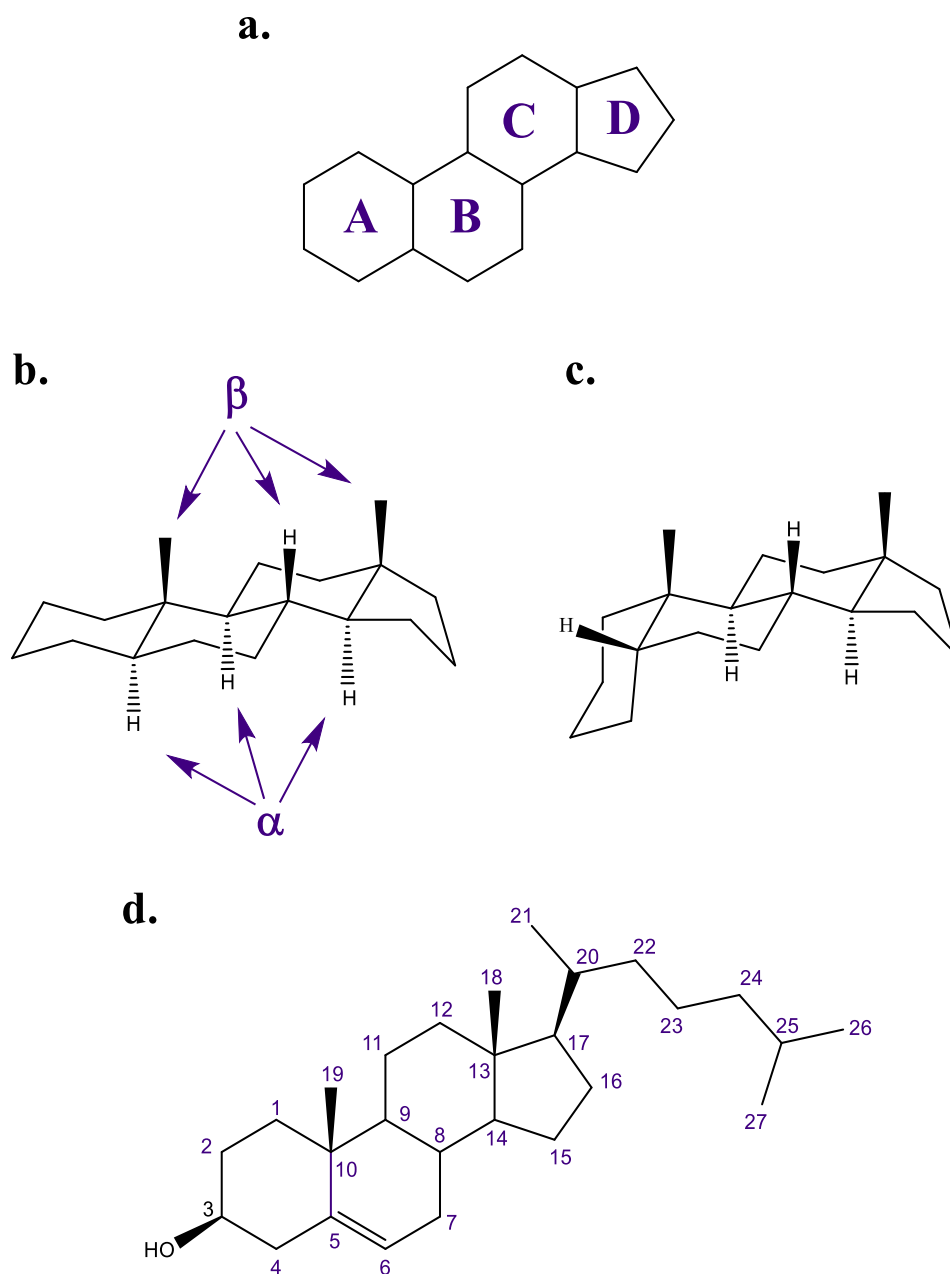


Figura 1- 3. Estructura y nomenclatura general de esteroides **a)** Gonano: estructura básica de todos los esteroides. **b)** Anillos del núcleo gonano en configuración *trans-trans-trans*. **c)** Anillos del núcleo gonano en configuración *cis-trans-trans*. **d)** Numeración en la estructura del colesterol.

Los esteroides incluyen gran variedad de estructuras y compuestos relacionados, pudiéndose clasificar en diferentes grupos según el grado de saturación del esqueleto gonano y la presencia de cadenas carbonadas laterales y grupos funcionales sustituyentes en su estructura (Fig. 1-4). Es así como se distinguen las siguientes series de esteroides según la estructura básica de la que derivan (Lednicer 2011):

- *Gonanos*: estructuras con 18 átomos de carbono, no poseen el grupo metilo en C10.
- *Estranos*: estructuras con 18 átomos de carbono con aromaticidad en el anillo A, no poseen el grupo metilo en C10. Ej. estradiol, estrona.
- *Androstanos*: estructuras con 19 átomos de carbono, poseen dos grupos metilos en C10 y C13. Ej. testosterona.
- *Pregnanos*: estructuras de 21 o 22 átomos de carbono, poseen dos grupos metilos en C10 y C13 y una cadena lateral en C17 de 2 o 3 átomos de carbonos. Incluye a los progestágenos y corticoesteroides. Ej. progesterona y cortisol.
- *Colestanos*: estructuras con 27 a 29 átomos de carbono, poseen dos grupos metilos en C10 y C13 y una cadena lateral hidrocarbonada de entre 8 a 10 átomos de carbono en C17. Ej. esteroides y derivados.
- *Colanos*: estructuras con 24 átomos de carbono, poseen dos grupos metilos en C10 y C13 y una cadena lateral en C17 de 5 carbonos con grupo alcohol o ácido. Ej. ácidos biliares y derivados.

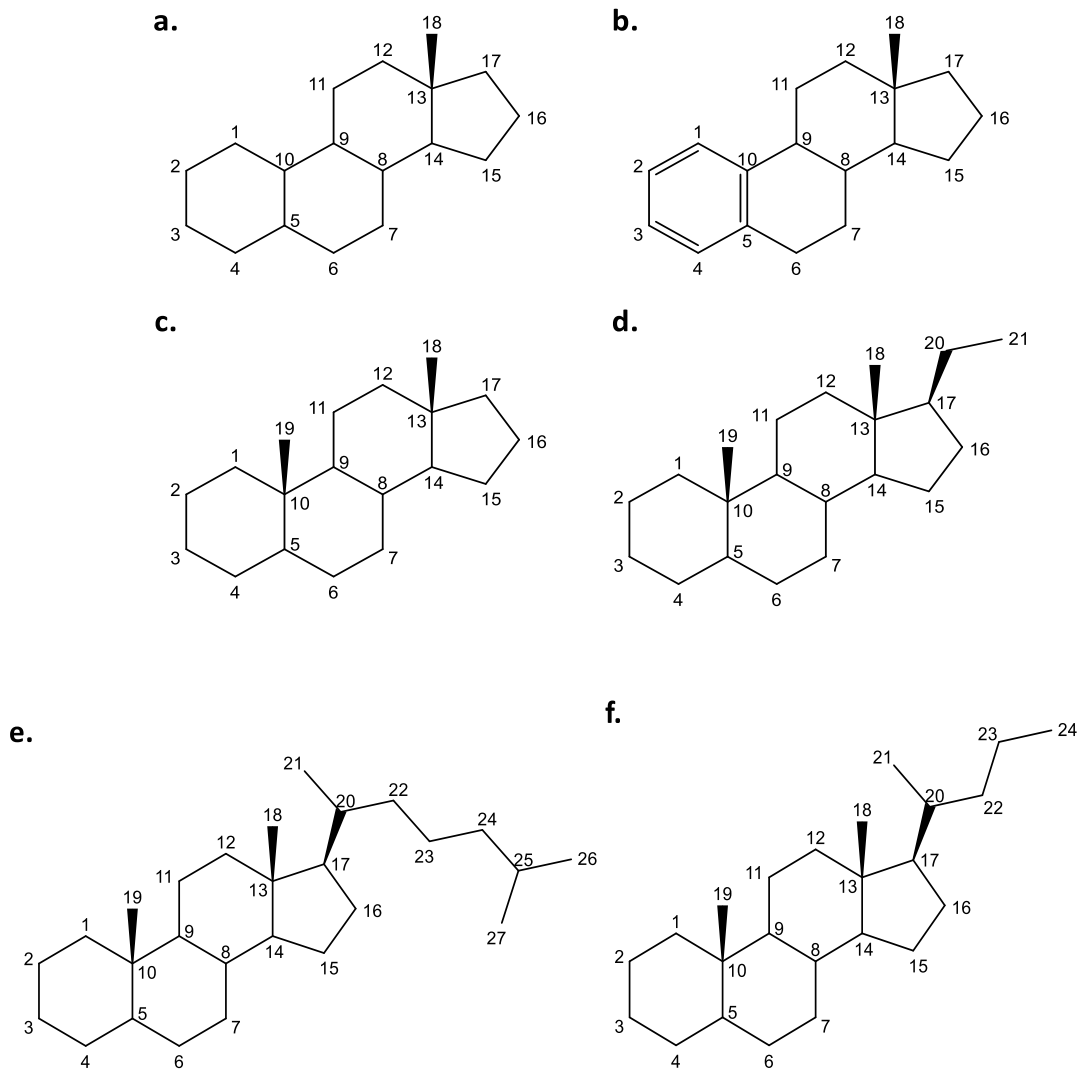


Figura 1- 4. Estructura hidrocarbonada básica de esteroides. **a)** Gonanos. **b)** Estranos. **c)** Androstanos. **d)** Pregnanos. **e)** Colestanos. **f)** Colanos.

Muchos compuestos esteroidales han sido reportados en sistemas vivos como plantas (ej. fitoesteroles, diosgenina, brasinoesteroides), insectos (ej. ecdisteroides), hongos y levaduras (ej. ergosterol) y vertebrados (ej. colesterol, corticoesteroides, hormonas sexuales, ácidos biliares, vitamina D) (Fernandes et al. 2003; Hannich et al. 2011; Donova & Egorova 2012; Muthukrishnan et al. 2012).

Algunos esteroides cumplen funciones biológicas esenciales en humanos y animales. Por ejemplo, las hormonas esteroidales mineralocorticoides y glucocorticoides- como aldosterona y cortisol- regulan la presión sanguínea por sus funciones en la retención de sodio y agua y en la

regulación de los niveles de potasio en sangre, incrementan los niveles de glucosa en sangre a través de la gluconeogénesis y actúan como antiinflamatorios (Lednicer 2011). Las hormonas sexuales que incluyen los andrógenos, estrógenos y progestágenos cumplen un importante rol en la reproducción de vertebrados. Los andrógenos están involucrados en el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales masculinas y la regulación de la producción de esperma. Los estrógenos son responsables del desarrollo de las características sexuales femeninas y tienen un importante rol en el mantenimiento de la estructura ósea. Los progestágenos, como la progesterona, están involucrados en el ciclo menstrual femenino, el embarazo y la embriogénesis (Al Jasem et al. 2014). Además, algunos esteroides cumplen funciones vitales en la regulación de los niveles de colesterol, control de la fertilidad, menopausia, proliferación y diferenciación celular, entre otras (Donova 2017).

1.2.2. Esteroles y ácidos biliares: estructura, función biológica biosíntesis y distribución.

Los esteroides son esteroides que contienen en su estructura un grupo hidroxilo en posición 3 con orientación β y dos grupos metilo en las posiciones 10 y 13 del núcleo gonano, también con orientación β . Además, poseen una cadena lateral en C17 que tiene entre 8 a 10 átomos de carbono y un doble enlace en C5 (Fig. 1-5).

Los esteroides están ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo componentes estructurales de las células eucariotas y raramente encontrados en células procariotas (Bloch 1991). En las plantas se encuentran los llamados fitoesteroides, los cuales son importantes componentes estructurales de las membranas vegetales y estabilizan la bicapa de fosfolípidos presente en la membrana de la célula vegetal. La mayoría de los fitoesteroides contienen entre 28 y 29 átomos de carbono y uno o dos dobles enlaces (generalmente uno en el núcleo esteroide y otro en la cadena lateral). Más de doscientos tipos de fitoesteroides han sido reportados en plantas, siendo el beta-sitosterol, estigmasterol y campesterol los más abundantes (Fig. 1-5) (Moreau et al. 2002; Fernandes & Cabral 2007). En hongos y levaduras el principal esteroide y más abundante es el ergosterol (Fig. 1-5).

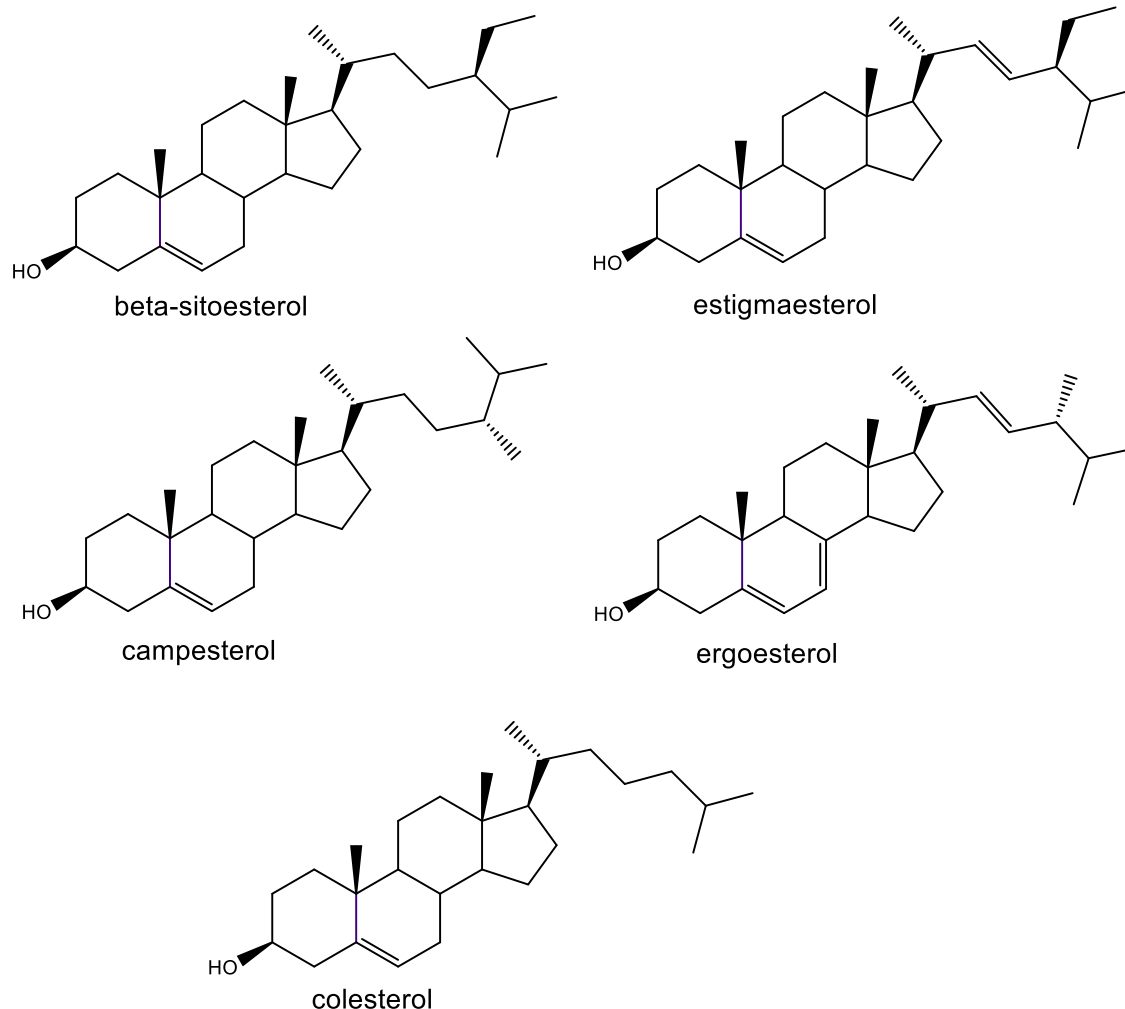


Figura 1- 5. Estructura de los principales esteroides presentes en la naturaleza.

En mamíferos se encuentra principalmente el colesterol, el cual es un importante constituyente de la membrana celular. Este es esencial para su estabilidad y para el crecimiento y proliferación celular, además de ser precursor de vitamina D, hormonas esteroideas y ácidos biliares (Fig. 1-5) (Bhatti & Khera 2012). Estos últimos son los principales componentes de la bilis sintetizada en el hígado de la mayoría de los vertebrados y secretada en intestino para facilitar la absorción y digestión de nutrientes hidrofóbicos (Begley et al. 2005). A su vez, los ácidos biliares están involucrados en la regulación de procesos metabólicos lipídicos y energéticos y en la homeostasis de la glucosa, actuando como moléculas señales que activan receptores específicos para ácidos biliares (Molinaro et al. 2018). Desde el punto de vista estructural, la mayoría de los ácidos biliares naturales contienen entre 1 a 3 grupos hidroxilo en orientación α en las posiciones C3,

C7 y/o C12, y una cadena lateral en C17 que contiene 5 ó 8 átomos de carbono con un grupo carboxilo en el extremo siendo denominados ácidos biliares C24 y C27 respectivamente (Fig. 1-6). Por su ruta biosintética, la mayoría de los ácidos biliares naturales tienen el protón en C5 en orientación β , siendo así la configuración de los anillos *cis-trans-trans*. Sin embargo, los ácidos biliares pueden ser transformados por microorganismos en el tracto intestinal y a su vez esos metabolitos pueden ser reabsorbidos y transformados otra vez. Por tanto, puede ocurrir que el protón en C5 tenga orientación α , los hidroxilos en C3, C7 y/o C12 configuración β y/o el largo de la cadena lateral varíe entre 1 a 10 átomos de carbono, dependiendo de las modificaciones estructurales que puedan suceder debido a la acción de enzimas hepáticas, intestinales y/o microbianas (Prabha & Ohri 2006; Kasal 2010).

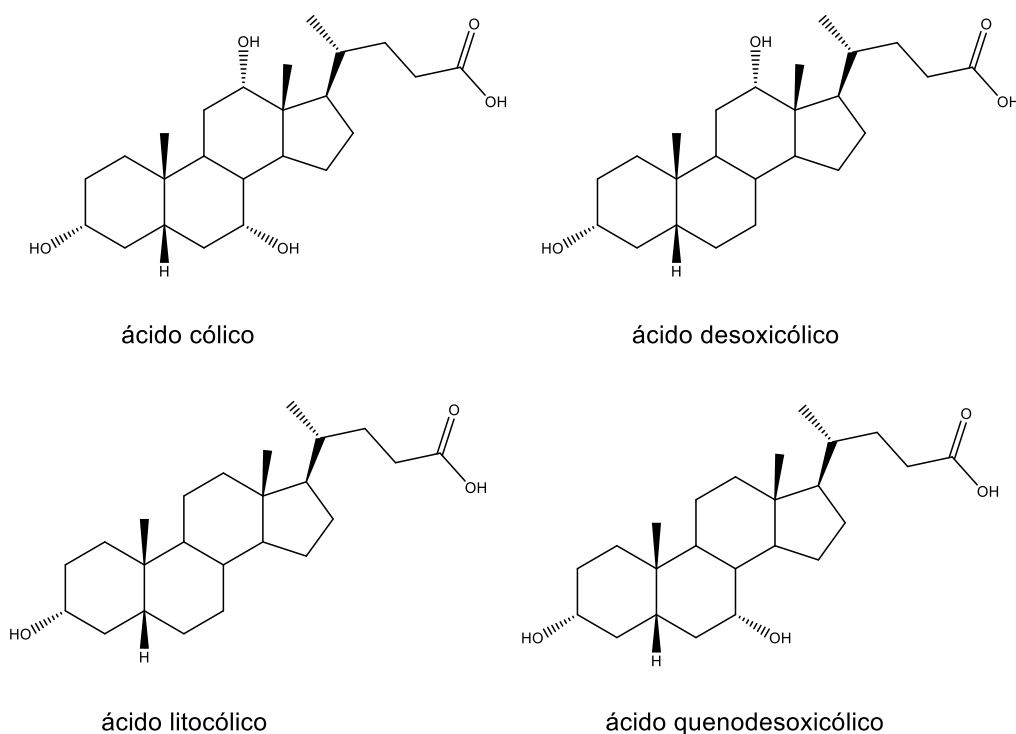


Figura 1- 6. Estructura de los ácidos biliares C24: ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico y ácido quenodesoxicólico.

La biosíntesis de esteroides comienza por la síntesis de pirofosfato de isopentenilo (IPP) y pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), moléculas que sirven como base para la biosíntesis de

lanoesterol y cicloartenol (Murooka & Yamashita 2001; Lednicer 2011; Tong 2013). El lanosterol es el precursor de esteroides como el colesterol en mamíferos y ergosterol en hongos filamentosos y levaduras, mientras que el cicloartenol es el precursor de los fitoesteroides en plantas.

En la vía del mevalonato 3 moléculas de acetil-CoA llevan a la formación del mevalonato. En las siguientes reacciones en secuencia, dos grupos fosfatos son ligados al ácido mevalónico, seguido por la pérdida del grupo carboxilo y un par de átomos de hidrógeno llevando a la formación de IPP y su isómero DMAPP, formas activadas de la unidad de isopreno. En la biosíntesis de lanoesterol y cicloartenol, la condensación de una molécula de IPP y una de DMAPP dando lugar a la formación de pirofosfato de geranilo (GPP). A continuación, una molécula de GPP condensa con otra molécula de IPP llevando a la formación de pirofosfato de farnesilo (FPP). Dos moléculas de FPP condensan perdiendo los grupos pirofosfatos, lo que conlleva a la formación del triterpeno escualeno (Fig. 1-7). Una serie de reacciones enzimáticas generan a la epoxidación del escualeno y a la ciclación del epóxido formándose el esteroide lanosterol. Una serie de transformaciones posteriores llevan a la formación del C27 colesterol en mamíferos, o a al C27 cicloartenol en plantas, desde el C30 lanosterol (Fig. 1-8).

En animales, el colesterol es convertido en el hígado en ácidos biliares por distintas rutas biosintéticas que involucran 17 enzimas distintas (Russell 2003). Los productos de esas vías se denominan ácidos biliares primarios, cuya estructura varía entre los vertebrados según la especie. En los humanos, los ácidos cólico y quenodesoxicólico son los ácidos biliares primarios. En la ruta de biosíntesis clásica de estos ácidos biliares primarios, el colesterol es convertido en 7 α -hidroxicolesterol por la acción de la 7 α -hidroxilasa. A continuación, la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa cataliza la isomerización del doble enlace desde la posición 5 a la 4 y la oxidación del hidroxilo en C3 del 7 α -hidroxicolesterol, llevando a la formación del Δ^4 3-oxo intermediario. Luego, dos posibles rutas llevan a la síntesis de los ácidos biliares primarios. En una de ellas, la acción de la 12 α -hidroxilasa lleva a la hidroxilación en C12 seguida por la acción de la Δ^4 -3-oxoesteroide 5 β -reductasa la cual reduce el doble enlace obteniéndose la orientación β del protón en C5, lo que le confiere la orientación *cis-trans-trans* de los anillos esteroidales.

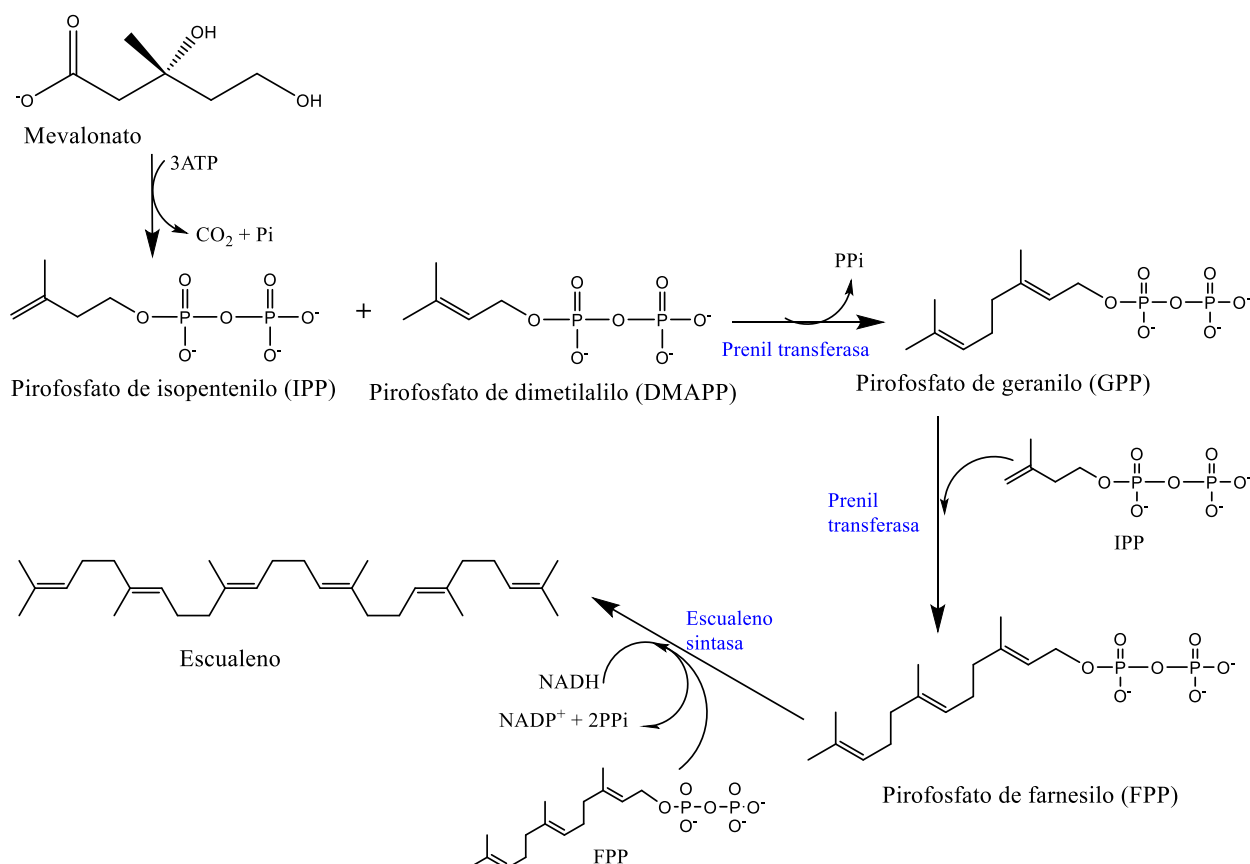


Figura 1- 7. Esquema general de la biosíntesis de escualeno a partir de mevalonato.

Posteriormente, la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa lleva a la reducción de la cetona en C3 con la consecuente formación del 3 α -hidroxilo. Posteriores reacciones de oxidación de la cadena lateral en C17 llevarán a la síntesis del ácido cólico. En la otra vía posible desde el intermediario 7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona, la Δ^4 -3-oxoesteroide 5 β -reductasa es la primera enzima que actúa llevando a la configuración *cis-trans-trans* de los anillos esteroidales. Luego, la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa lleva a la formación del 3 α -hidroxilo y posteriores oxidaciones en la cadena lateral en C17 llevan a la síntesis del ácido quenodesoxicólico.

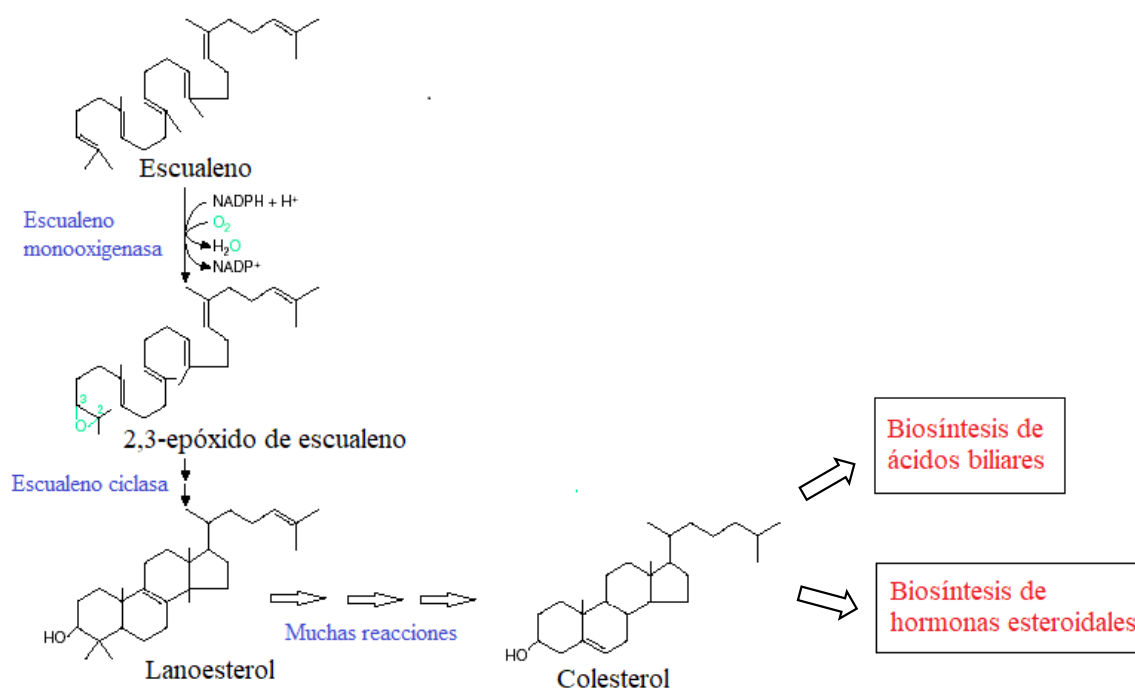


Figura 1- 8. Esquema general de la biosíntesis de compuestos esteroidales a partir del escualeno.

Estos ácidos primarios son conjugados en el hígado con glicina o taurina y secretados al duodeno en la bilis. A su vez, estos son transformados por la acción de la microbiota intestinal a ácidos biliares secundarios como el ácido desoxicólico y ácido litocólico (Russell 2003; Molinaro et al. 2018).

La presencia de esteroides en procariotas es muy rara, incluyendo a los esteroides y ácidos biliares (Lamb et al. 2007). La membrana de las bacterias, tanto Gram-positivas y Gram-negativas, no contienen esteroides. Sin embargo, algunas bacterias contienen en su membrana celular hopanoides, los cuales son triterpenoides pentacíclicos estructuralmente similares a los esteroides y derivan del mismo precursor: el escualeno (Kannenberg & Poralla 1999). El rol fisiológico de estos lípidos no es del todo claro aún pero existe evidencia de que estos interactúan con los glucolípidos presentes en membrana bacteriana externa para formar una bicapa de forma análoga a la interacción del colesterol con fosfolípidos en la membrana de las células eucariotas (Sáenz et al. 2015).

A pesar de ser muy poco común, algunas bacterias presentan esteroides y son capaces de sintetizarlos. Por ejemplo, genes codificantes para enzimas involucradas en la biosíntesis de lanosterol (escualeno monooxigenasa y escualeno ciclasa) fueron identificados en los genomas de algunas bacterias como *Methylococcus capsulatus* y *Gemmata obscuriglobus* (Jackson et al. 2002; Pearson et al. 2003; Lamb et al. 2007). En esta última, la extracción de lípidos de las células logró detectar la presencia de los esteroides lanosterol y su isómero parkeol (Pearson et al. 2003). Respecto al colesterol, este ha sido excepcionalmente encontrado en procariotas. Colesterol fue detectado en la forma L (variante carente de pared celular) de dos cepas de *Staphylococcus aureus* (Hayami et al. 1979). Los autores de este trabajo sugieren que estas cepas adquirieron la capacidad de sintetizar dicho esteroide, lo que las diferencia de su cepa parental. Estos estudios se basaron en la detección de radioactividad en la fracción de esteroides cuando los microorganismos fueron cultivados en un medio que contiene [^{14}C]-acetato. En algunos otros casos la biosíntesis de colesterol en bacterias, como *Mycobacterium smegmatis*, también ha sido afirmada basándose en estudios de detección de radioactividad utilizando moléculas marcadas con ^{14}C (Lamb et al. 1998). Sin embargo, estos estudios en los que el colesterol fue detectado dejan lugar a dudas. Respecto a esto, Volkman discute que en estos estudios la radioactividad en la fracción de esteroides fue asignada al colesterol pero podría tratarse de hopanoides u otros alcoholes separados en esa fracción en lugar de esteroides, remarcando que futuros estudios utilizando herramientas de biología molecular son necesarios para proveer mayor claridad en el tema (Volkman 2003).

Respecto a los ácidos biliares, algunos ácidos biliares como ácido cólico y ácido desoxicólico se encuentran ampliamente distribuidos entre los mamíferos, tanto en su forma libre como conjugados a aminoácidos como glicina o taurina. Existe un único reporte respecto a la producción de estos y sus derivados conjugados con glicina en hongos filamentosos, particularmente por una cepa endofítica *Penicillium* sp. SA29 aislada desde tallos jóvenes de *Scurrula atropurpurea* (Ohashi et al. 2008). También es muy poco común la biosíntesis y presencia de ácidos biliares en procariotas. Han sido reportadas en muy pocas bacterias aisladas desde el mar y esponjas marinas (Maneerat et al. 2005; Kim et al. 2007; Li et al. 2009). En estos estudios fue reportada la síntesis del éster metílico del ácido cólico por parte de *Streptococcus faecium* y

la de varios ácidos biliares desde *Myroides* sp. cepa SM1 y desde *Psychrobacter* sp. La bacteria marina *Myroides* sp. cepa SM1 también fue capaz de producir ácidos biliares cuando es cultivada en un medio con colesterol, demostrándose así la presencia de la ruta biosintética de ácido cólico desde colesterol.

1.2.3. Esteroides en la industria farmacéutica

La actividad fisiológica de los esteroides depende directamente de su estructura, el tipo, número y posición de grupos funcionales presentes en el núcleo esteroidal, así como el grado de oxidación de los anillos. Por ejemplo, la presencia de un hidroxilo en C-11 β es crucial para la actividad antiinflamatoria, mientras que un hidroxilo en C-17 β determina las propiedades androgénicas, y la aromatización del anillo A se relaciona con los efectos estrogénicos, entre otros ejemplos (Donova & Egorova 2012).

Las drogas esteroidales y sus derivados son usados para un amplio rango de propósitos terapéuticos, representando uno de los más grandes sectores de la industria farmacéutica con un mercado global evaluado en alrededor de 10 billones de dólares y más de un millón de toneladas anuales (Barredo & Herráiz 2017). Al Jasem et al. reportan el ingreso por ventas en 2011 en 900 millones de dólares, considerando únicamente los corticoesteroides. Mientras que Barreiro et al. reportan el mercado global de venta de esteroides en 8 billones de dólares ese mismo año (Al Jasem et al. 2014; Barreiro et al. 2017).

Las drogas esteroidales y derivados presentan actividad antiinflamatoria, inmunosupresora, diurética, antialérgica, antiepiléptica y anticonceptiva. También son utilizados como antifúngicos, antimicrobianos, antivirales, antidepresivos, para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, en osteoporosis, para la prevención de enfermedades coronarias, para tratamiento de ciertos tipos de diabetes, obesidad, desórdenes metabólicos, asma, hipertensión, y para la prevención y tratamiento de infecciones por HIV (Fernandes et al. 2003; Donova & Egorova 2012).

Los principales materiales de partida para la síntesis de estos esteroides farmacológicamente activos son compuestos naturales: sapogeninas y esteroides. Para ello se utilizan tanto métodos químicos convencionales como reacciones de biotransformación (Fig. 1-9). Las principales sapogeninas utilizadas son la diosgenina, hecogenina y solasodina. La diosgenina es aislada desde

bulbos de plantas del género *Dioscorea*, aunque también se puede encontrar en algunas otras plantas como *Solanum lyratum* y *Trillium erectum* (Al Jasem et al. 2014). Fue en los 1940s que Russell Marker y colaboradores descubren el potencial de las sapogeninas extraídas de plantas como material de partida para la síntesis de hormonas esteroidales (Lednicer 2011). En la llamada síntesis de Marker la diosgenina es transformada a progesterona (Olivares 2001). Pero, debido a la protección y limitada disponibilidad de plantas de *Dioscorea*, el precio de la diosgenina aumentó drásticamente y fue necesario encontrar otras fuentes para la obtención de esteroides naturales. Es así que se desarrollaron procesos utilizando solasodina como material de partida, la cual se encuentra en numerosas plantas del género *Solanum* (Al Jasem et al. 2014). La solasodina para ser utilizada como material de partida es principalmente extraída desde *Solanum auriculatum* (Al Jasem et al. 2014). Sin embargo, la conversión química de saponinas a esteroides con mayor valor agregado resulta altamente costosa, involucra muchos pasos de síntesis y relativamente bajos rendimientos, además de agotar las fuentes naturales desde las cuales se obtienen. A pesar de esto, diosgenina y solasodina continúan siendo los principales materiales de partida en la producción de drogas esteroidales para la industria farmacéutica en muchos países (Donova & Egorova 2012).

La alternativa al uso de sapogeninas son los esteroides naturales (Fernandes & Cabral 2010). Dentro de los fitoesteroides, los más comúnmente usados son el estigmaesterol, β -sitoesterol y campesterol. Estos pueden ser obtenidos desde aceites vegetales o desde residuos industriales, como residuos de la producción de aceite de soja, aceite de colza, pulpa de papel y caña de azúcar (Fernandes & Cabral 2007). Los fitoesteroides presentan la ventaja de ser fácilmente convertibles en intermediarios para la síntesis de drogas esteroidales, y la posibilidad de obtenerlos a partir de fuentes baratas, como son los residuos industriales, permitiría reducir los costos de producción de drogas esteroidales (Fernandes & Cabral 2007). En los últimos años han sido realizadas numerosas investigaciones para mejorar las metodologías de recuperación de fitoesteroides desde residuos industriales, para lograr procesos más efectivos, menos costosos y ambientalmente amigables (Fernandes & Cabral 2007; Al Jasem et al. 2014). Otro esteroide usado como material de partida es el colesterol, el cual es obtenido desde grasas y aceites de origen animal (Fernandes et al. 2003). Además, otros esteroides como lanoesterol, derivados de

lanoesterol y ergoesterol han demostrado ser materiales de partida prometedores (Ambrus et al. 1995; Wang et al. 1995; Fernandes et al. 2003).

Los esteroides, incluyendo los esteroides, pueden ser transformados mediante microorganismos obteniéndose C17-cetoesteroides, principalmente 4-androsten-3,17-diona (androstendiona o AD), 1,4-androstadien-3,17-diona (androstendiendiona o ADD) y 9 α -hidroxi-4-andosten-3,17-diona (9 α -OH-AD), los cuales son intermediarios requeridos comercialmente para la producción industrial de corticoides, mineralocorticoides, anticonceptivos orales, entre otros. El valor de mercado de estos intermediarios, AD y ADD, es evaluado por encima de mil millones de dólares anuales (Donova & Egorova 2012). También pueden ser obtenidos otros esteroides con valor agregado utilizando biotransformaciones de esteroides, como ser la progesterona (Fig. 1-9).

Por otro lado, los ácidos biliares representan un posible material de partida atractivo para la industria farmacéutica por su bajo costo de mercado, su carácter anfipático y por su posible extracción desde la bilis, un subproducto de la industria ganadera (Kollerov et al. 2013, 2016). Algunos de los ácidos extraídos tienen valor farmacéutico por sí mismos, como el ursodesoxicólico y quenodesoxicólico, los cuales son usados para el tratamiento de enfermedades hepáticas y disolución de cálculos biliares (Ikgami & Yasushi 2008). Mientras los otros ácidos presentes en la bilis son utilizados como precursores para la síntesis de los que presentan valor farmacéutico, o son destruidos por no encontrárseles otra utilidad (Kollerov et al. 2013). Por tanto, las biotransformaciones de ácidos biliares podrían ser usadas para obtener derivados con valor agregado. En los últimos años ha aumentado el uso de los ácidos biliares en aplicaciones de química supramolecular, química de materiales y nanotecnología (Nonappa & Maitra 2008).

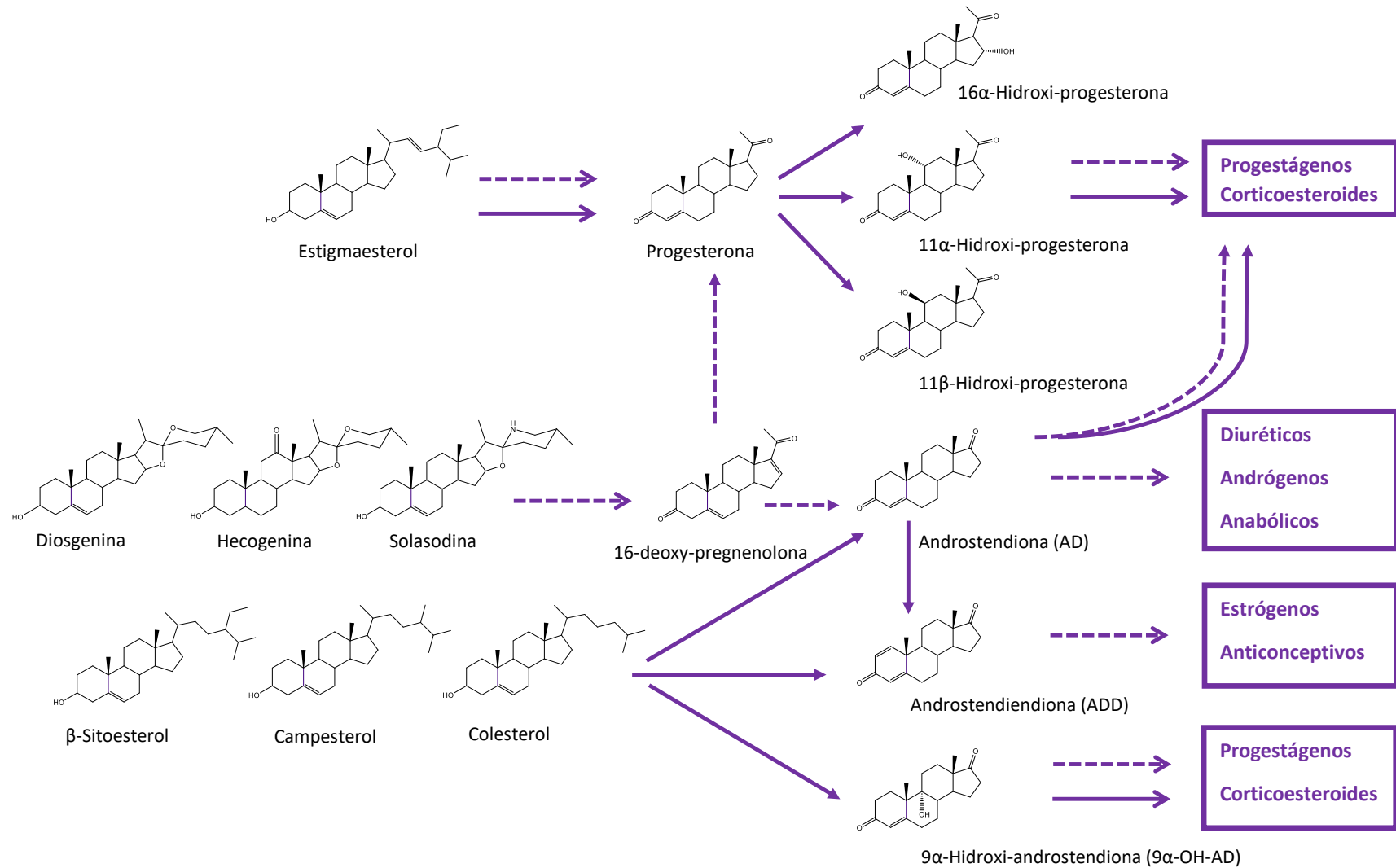


Figura 1- 9. Producción de drogas esteroidales utilizando sapogeninas y esteroides como materiales de partida. Las líneas llenas representan reacciones de biotransformación mientras que las líneas rayadas indican reacciones químicas convencionales. Adaptado de (Fernandes et al. 2003).

1.3. Biotransformaciones de esteroides

1.3.1. Biocatálisis en síntesis de drogas esteroidales

En la década de 1950 dos importantes descubrimientos estimularon el enfoque de las investigaciones en la química de esteroides: la utilidad de la cortisona en el tratamiento de los síntomas de la artritis reumatoidea por su actividad antiinflamatoria, y el potencial anticonceptivo de la hormona femenina progesterona (Hogg 1992). En esa misma década D. Peterson y H. Murray reportaron la hidroxilación en la posición 11 de la progesterona mediante el uso de hongos filamentosos del género *Rhizopus* (*R. arrhizus* y *R. nigricans*), obteniéndose la 11 α -hidroxiprogesterona (Murray & Peterson 1952; Peterson & Murray 1952; Peterson et al. 1952). Esta misma reacción de transformación pero realizada por *Aspergillus niger* fue también reportada en ese mismo año por J. Fried y colaboradores (Fried et al. 1952). La hidroxilación microbiana de la progesterona fue un paso decisivo en la síntesis de esteroides debido a que permitió, por primera vez, la funcionalización en el carbono 11 no activado. La 11 α -hidroxiprogesterona es un intermediario de síntesis de la cortisona. Este también puede ser utilizado para la síntesis de cortisol, a pesar de que se requiere el hidroxilo en 11 en orientación β en el producto final. El hidroxilo en orientación α puede ser oxidado a cetona y posteriormente reducido utilizando reacciones químicas convencionales para obtener el grupo en orientación β . El uso de estos microorganismos (*R. arrhizus* y *A. niger*) permitió la reducción de los costos de síntesis de cortisona pasando de 200 dólares el gramo (en 1949) a 6 dólar por gramo (Carballeira et al. 2009). A su vez se redujeron los pasos de síntesis desde un total de 31 a 11 (utilizando ácido desoxicólico como material de partida en la síntesis de 31 pasos) (Carballeira et al. 2009). Posteriores avances llevaron el costo de síntesis a 1 dólar por gramo de producto final en 1979 (Carballeira et al. 2009; Donova & Egorova 2012).

Las transformaciones microbianas en la producción de drogas esteroidales se convirtieron en uno de los más exitosos ejemplos de procesos biotecnológicos a escala industrial (Tong & Dong 2009). Estas presentan varias ventajas para la síntesis de esteroides frente a los procesos químicos convencionales, además de las numerosas ventajas asociadas a las biotransformaciones previamente discutidas en la sección 1.1.2. La estructura compleja de los

esteroides hace que generalmente se requieran múltiples pasos de síntesis, involucrando la preparación de intermediarios con grupos protectores, llevando a rendimientos de reacción generalmente bajos y procesos costosos. Por otra parte, la síntesis química convencional muchas veces utiliza reactivos peligrosos para la salud y el medioambiente como ser la piridina, el dióxido de selenio (SeO_2) y el trióxido de azufre (SO_3) (Fernandes et al. 2003). Sumado a las ventajas mencionadas anteriormente, el éxito de la aplicación de las biotransformaciones en la funcionalización de núcleos esteroidales radica en que es la forma más eficiente para resolver un problema de la química de esteroides: la oxidación de carbonos inactivados, sumándose que esas funcionalizaciones pueden darse con elevada regio y estereoespecificidad (Donova & Egorova 2012).

Numerosas bioconversiones de esteroides han sido reportadas, con énfasis en reacciones de hidroxilación, reducción de cetonas, oxidaciones de Baeyer-Villiger (BVO), isomerización, deshidrogenación en enlaces C-C, reducción de dobles enlaces C-C y clivaje de la cadena lateral de los esteroides. Los mayores sitios de biotransformación sobre sustratos esteroidales son mostrados en la figura 1-10. La mayoría de estas reacciones son cofactor-dependientes, siendo de preferencia en los procesos industriales para llevar a cabo estas biotransformaciones el uso de células enteras frente al uso de enzimas asiladas (Donova & Egorova 2012).

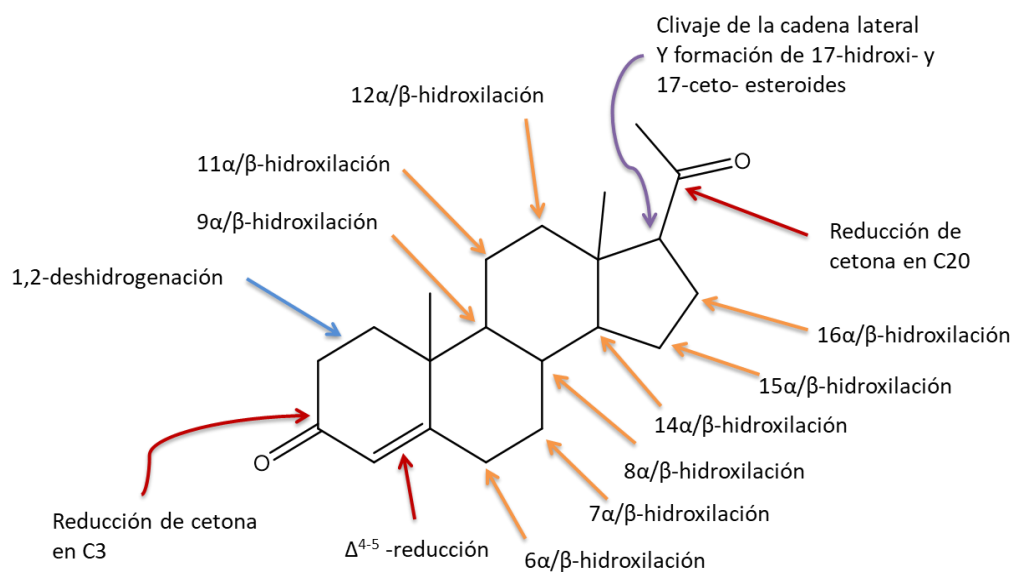


Figura 1- 10. Principales sitios de biotransformación sobre sustratos esteroidales. Adaptada de (Nassiri-Koopaei & Faramarzi 2015).

1.3.2. Biotransformación del colesterol

1.3.2.1 Catabolismo del Colesterol

Los esteroides son altamente recalcitrantes a la degradación microbiana debido a los pocos grupos funcionales que están presentes en su estructura y su baja solubilidad en agua (Galán et al. 2017). Sin embargo, existen varios microorganismos capaces de utilizar esteroides como fuente de carbono para el crecimiento y propagación. Algunos microorganismos degradan completamente los esteroides ya que son capaces de metabolizar el esqueleto esteroide y la cadena carbonada por diferentes sistemas enzimáticos (de forma simultánea y/o independiente) (García et al. 2012).

Varias cepas bacterianas han sido descritas como capaces de degradar por completo el colesterol, tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Particularmente, especies pertenecientes a los filos actinobacteria y proteobacteria. Esta degradación puede ser bajo condiciones aerobias o anaeróbicas (Galán et al. 2017). Hasta ahora, sólo dos cepas de proteobacterias desnitrificantes, 72Chol y *Sterolibacterium denitrificans* cepa Chol-15^T, han sido descritas como capaces de metabolizar el colesterol a dióxido de carbono bajo condiciones anaerobias (Harder & Probian 1997; Tarlera & Denner 2003). Estas son capaces de crecer en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas utilizando colesterol como única fuente de carbono y energía. Durante el crecimiento anaeróbico es necesario el agregado de nitrato al medio como aceptor de electrones (Tarlera & Denner 2003).

El catabolismo del colesterol ha sido mayoritariamente estudiado en actinobacterias. Miembros de los géneros *Dietzia*, *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, y *Tsukamurella* mostraron la capacidad de degradar el colesterol y genes pertenecientes a esta vía han sido identificados en los genomas de sus representantes (Van Hamme et al. 2016). Se ha demostrado que esta vía metabólica es altamente conservada entre diferentes especies pertenecientes al filo actinobacteria, y ha sido caracterizada más profundamente en representantes del suborden *Corynebacterineae*, incluidos los géneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, y *Gordonia*. Además, esta vía metabólica está presente en algunas especies de otros géneros de actinobacterias, como *Actinoplanes*, *Saccharomonospora* y *Streptomyces*, pero no es conservada (Van Hamme et al. 2016). En la base de datos MetaCyc se encuentran detalladas las enzimas y estructuras de

los metabolitos involucrados en la degradación del colesterol en especies de los géneros *Rhodococcus* y *Mycobacterium* (<https://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?object=Cholesterol-Degradation>) (Caspi et al. 2014).

La vía de degradación aeróbica del colesterol se puede organizar según las partes de la molécula: degradación de la cadena lateral, de los anillos A/B y de los anillos C/D del esterol. Para explicar los procesos y enzimas involucradas en la vía de degradación aeróbica en actinobacteria, el proceso es dividido en las siguientes secciones: formación de colestero, degradación de la cadena lateral y ruptura de los anillos esteroidales.

Formación de colestero

La vía de degradación de los anillos A/B comienza en la llamada vía aerobia de degradación 9,10-seco (Donova 2017). El paso inicial de la oxidación del núcleo esteroide resulta en la obtención de 4-cholesten-3-ona (colestero). Esta conversión puede ser catalizada por dos enzimas diferentes: 3 β -hidroxiesteroide/oxígeno oxidorreductasa, comúnmente llamada colesterol oxidasa (ChOx), y 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) (Fig. 1-11). Ambas enzimas muestran funciones duales, catalizando las reacciones de oxidación del grupo 3 β -hidroxilo y la isomerización $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$. Sin embargo, en algunas proteobacterias fueron reportadas distintas enzimas como responsables de la reacción de isomerización (Shtratnikova et al. 2016).

La 3 β -HSD es bifuncional, contiene un dominio 3- β -hidroxi- Δ^5 -esteroide deshidrogenasa (EC 1.1.1.145) y un dominio esteroide Δ^5 - Δ^4 isomerasa (EC 5.3.3.1) (BRENDA, www.brenda-enzymes.org) (Jeske et al. 2019). Es una enzima dependiente de NADH/NADPH, que ha sido identificada en diferentes especies de hongos, bacterias y otros organismos (Hunter et al. 2009; Donova & Egorova 2012; Nassiri-Koopaei & Faramarzi 2015).

ChOx (EC. 1.1.3.6) es una enzima FAD-dependiente exclusiva de hongos y bacterias, la cual en la mayoría de los casos cataliza la oxidación de colesterol a colestero usando oxígeno como aceptor de electrones para formar peróxido de hidrógeno. Todas las ChOx aisladas hasta ahora son extracelulares, tanto secretadas como asociadas a la superficie celular dependiendo del microorganismo que la produce y de las condiciones de crecimiento del mismo (Kreit & Sampson 2009).

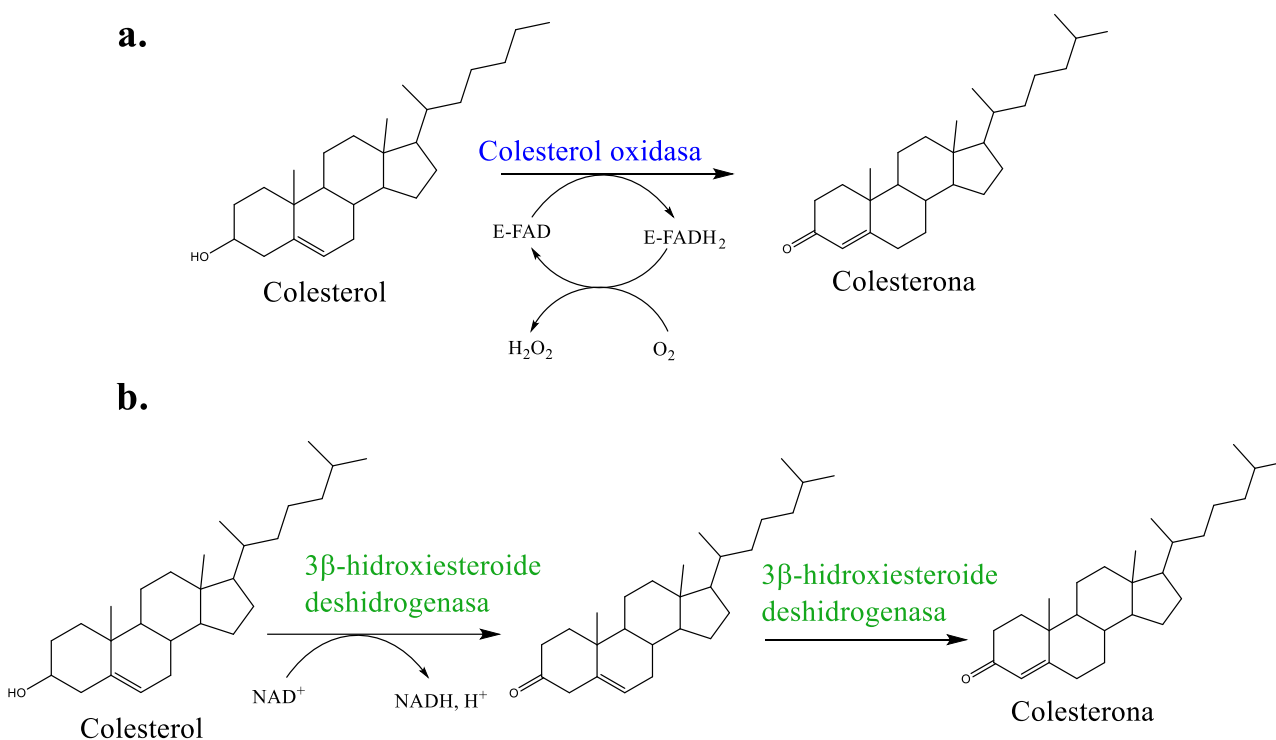


Figura 1- 11. Conversión de colesterol a colesterona. **a)** Reacción catalizada por ChOx. **b)** Reacción catalizada por 3β-HSD.

La conversión de colesterol a colesterona es considerado el primer paso del catabolismo del esterol (Kreit 2017). Sin embargo, las enzimas ChOx y 3β-HSD no serían críticas para la asimilación del colesterol en algunos microorganismos. Excepto para *Mycobacterium neoaurum*, las colesterol oxidasas no son esenciales en microorganismos de los géneros *Mycobacterium* y *Rhodococcus* (Griffin et al. 2011; Uhía et al. 2011; Ivashina et al. 2012; Shtratnikova et al. 2016). Los genes codificantes para las enzimas 3β-HSD and ChOx fueron suprimidos en una cepa mutante de *Mycobacterium smegmatis* (cepa mc²155), y la cepa conservó la habilidad de crecer en colesterol (Uhía et al. 2011). Este estudio sugiere que otras deshidrogenasas/isomerasas podrían catalizar el primer paso en el catabolismo del colesterol.

Por otro lado, fue demostrado que en *Rhodococcus jostii* RHA1 el catabolismo del colesterol es iniciado mediante la oxidación de la cadena lateral, y este es un paso obligatorio que ocurre antes de la oxidación de los anillos, es decir, no ocurre la formación de colesterona (Rosloniec

et al. 2009). Estos autores demostraron que la oxidación de la cadena lateral comienza por la introducción un grupo hidroxilo en C26, catalizado por la enzima esteroide C26-monooxigenasa (CYP125), seguido por la oxidación al correspondiente ácido carboxílico en C26.

Siguiendo el primer paso de transformación a colesteroona, dos vías pueden ocurrir: la degradación de la cadena lateral del colesterol o la ruptura de los anillos esteroidales. Fue confirmado que estos procesos son independientes ente sí, al menos en actinobacteria, y el orden de ellos puede variar incluso en un mismo género (Donova & Egorova 2012).

Degradación de la cadena lateral

La degradación de la cadena lateral del colesterol es un proceso similar a la β -oxidación de los ácidos grasos, iniciando con la hidroxilación en C26, catalizada por citocromo CYP125, la cual lleva a la formación del 26-hidroxicolestesten-3-ona (Fig. 1-12) (García et al. 2012). La misma enzima cataliza la oxidación de este metabolito al ácido carboxílico correspondiente. Además de la CYP125, se ha demostrado que en *M. tuberculosis* H37Rv existe otra enzima perteneciente a la familia del citocromo P450 que también es capaz de hidroxilar en C26, la cual es denominada CYP145 (Szaleniec et al. 2018). Después de la formación del ácido carboxílico intermediario, la degradación de la cadena procede mediante 3 ciclos. Los primeros dos son ciclos de β -oxidación convencionales, mientras que el último ciclo no lo es debido a la presencia del anillo ciclopentano D. La degradación comienza con la activación de este metabolito a través de la unión a una molécula de CoA, catalizada por la enzima esterol CoA-ligasa dependiente de ATP. Luego, la acción de varias enzimas como acil-CoA deshidrogenasas, enoil-coA-hidratasas, hidroxiacetil-CoA deshidrogenasas y tiolasas, da lugar a la formación del 17-cetoesteroide derivado AD, dos moléculas de popionil-CoA y una de acetil-CoA (Fig. 1-12) (García et al. 2012).

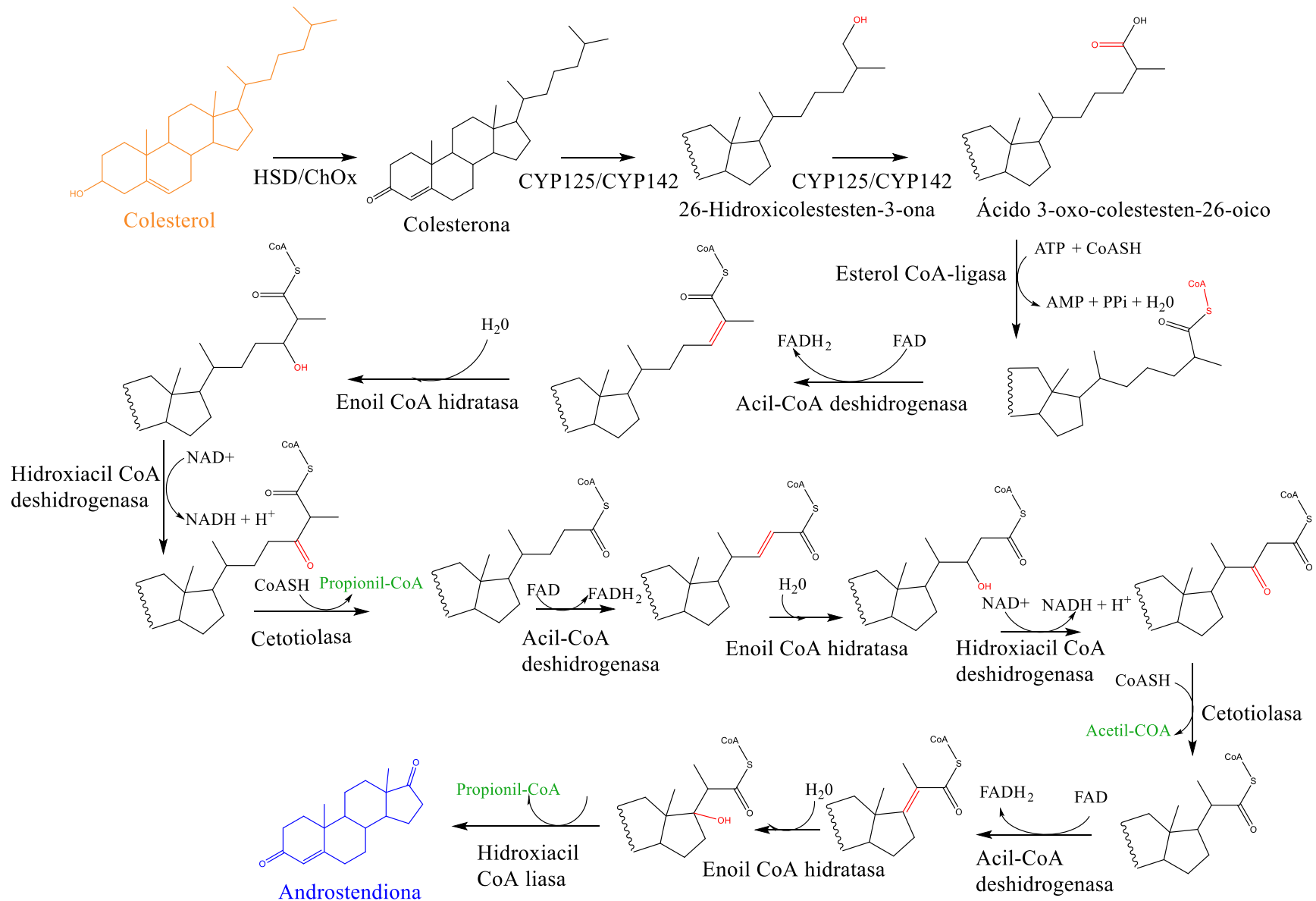


Figura 1- 12. Reacciones propuestas involucradas en la β -oxidación de la cadena lateral del colesterol.
Adaptada de (García et al. 2012).

Ruptura de los anillos esteroidales

En la ruptura de los anillos esteroidales, es la acción simultánea de 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa (KStD) (EC. 1.3.99.4) y 3-cetoesteroide-9 α -monooxigenasa (KsH) (EC. 1.14.13.142) la que conlleva a la formación de un 9(10)-secoesteroide el cual presenta aromaticidad en el anillo A (Fig. 1-13) (Donova 2017). Estas enzimas pueden actuar tanto sobre colesterol, como sobre los productos de degradación de la cadena lateral del esteroide: AD y ADD (Kreit 2017). El producto final de la combinación de todas las reacciones anteriores lleva a la formación de 9 α -hidroxi-1,4-androstadien-3,17-diona (9OH-ADD), un metabolito inestable que sufre un rearrreglo espontáneo a su derivado 9(10)-secoesteroide: secoandrosta-1,3,5,(10)-trien-9,17-diona (Fig. 1-13). Posteriores reacciones que incluyen la acción de hidroxilasas, oxigenasas e hidrolasas conducen a la formación de un metabolito con 13 carbonos que contiene los anillos C y D, o un derivado de los mismos (Donova 2007; Wilbrink 2011; García et al. 2012). La vía de degradación de este último derivado no ha sido elucidada todavía (Donova 2017). Sin embargo, un estudio reciente basado en análisis bioinformáticos con la construcción de mutantes de las actinobacterias *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* y *R. jostii* RHA1, y la elucidación de los metabolitos intracelulares generados, propone un modelo de las transformaciones enzimáticas e intermediarios involucrados en esta vía catabólica (Casabon et al. 2017).

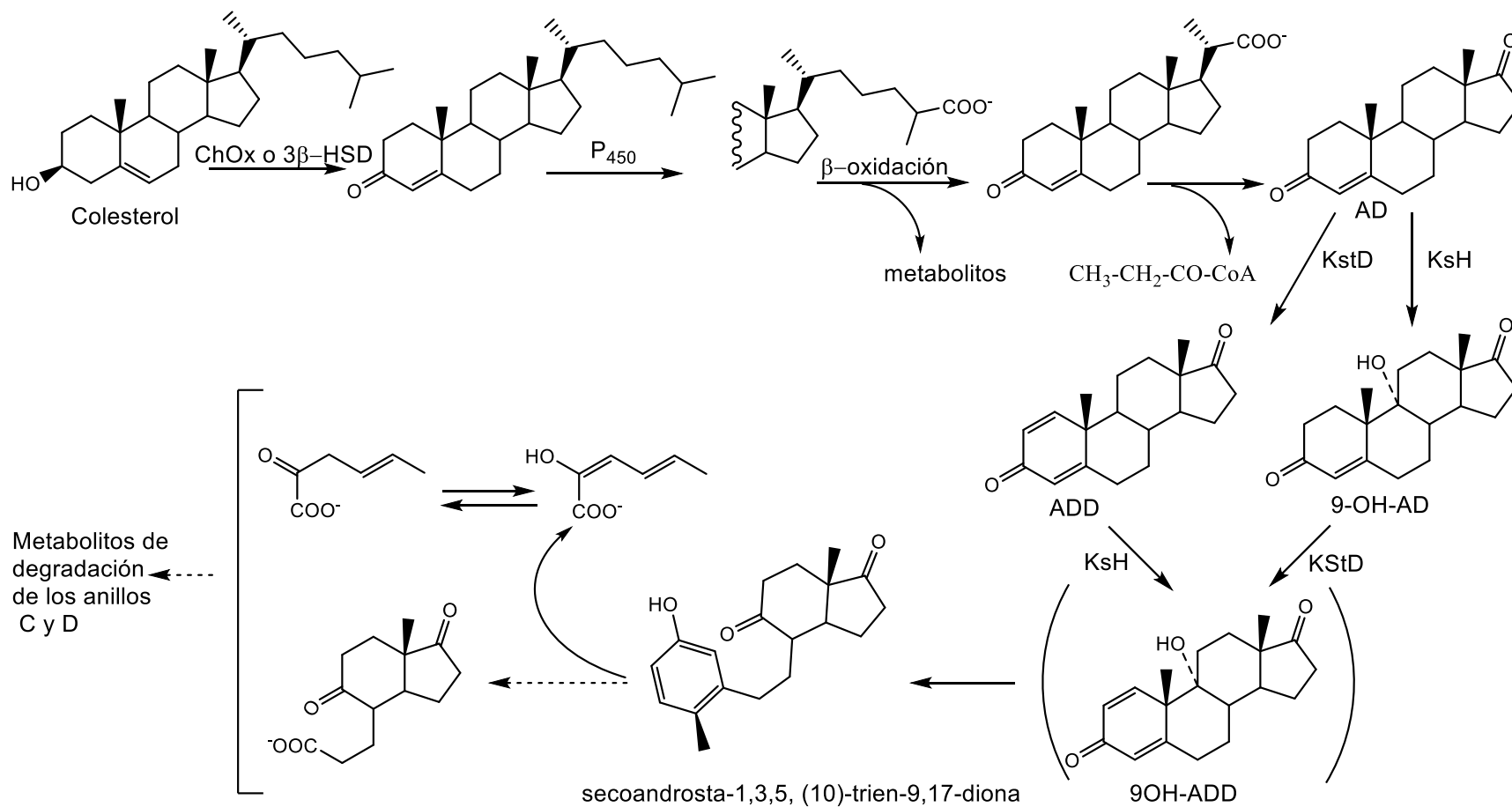


Figura 1- 13. Esquema general del catabolismo del colesterol en actinobacteria. ChOX: colesterol oxidasa; 3β-HSD: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; KstD: 3-cetoesteroide-Δ¹-deshidrogenasa; KsH: 3-cetoesteroide-9α-hidroxilasa. Adaptado de (Kreit 2017).

Los significativos avances en el entendimiento del catabolismo microbiano del colesterol promueven el desarrollo de nuevos microorganismos mediante herramientas de ingeniería metabólica, los cuales puedan utilizarse como biocatalizadores para síntesis de esteroides bioactivos de mayor valor agregado. Además, la degradación microbiana completa del esqueleto esteroideal es mayoritariamente estudiada para su uso en biorremediación debido al potencial riesgo medioambiental generado por la presencia de esteroides en residuos (Donova & Egorova 2012). Estos compuestos presentan potentes actividades metabólicas que pueden alterar varios procesos celulares (Hotchkiss et al. 2008). La presencia y acumulación de esteroides en aguas residuales y ciertos nichos ecológicos puede producir efectos fisiológicos perjudiciales para los seres humanos y los organismos del ecosistema, incluso a bajas concentraciones (ng/L) (Hotchkiss et al. 2008; Yu et al. 2019).

Por otro lado, el estudio de la vía metabólica del colesterol en *Mycobacterium tuberculosis* ha tenido especial atención por su rol en la patogenicidad de este microorganismo. El catabolismo del colesterol le permiten al patógeno utilizar el colesterol del hospedero, una característica necesaria para el mantenimiento de la infección y su supervivencia en macrófagos (VanderVen et al. 2015; Casabon et al. 2017). Las enzimas involucradas en este metabolismo representan un potencial blanco para nuevos agentes terapéuticos, los cuales son requeridos para el tratamiento de la tuberculosis.

1.3.2.2 Biotransformación del colesterol para obtener compuestos de mayor valor agregado

Las primeras biotransformaciones del colesterol fueron realizadas con cepas de los géneros *Proactinomyces* y *Azotobacter*, obteniéndose colesterona, 7-dehidrocolesterol, y un producto de estructura desconocida formado por la degradación de la cadena lateral (Turfitt 1945; Horvath & Kramli 1947). Desde entonces muchas biotransformaciones sobre el colesterol han sido reportadas, incluyendo el clivaje de la cadena lateral, hidroxilaciones, deshidrogenación/reducción, isomerización y esterificación. Los principales productos de transformación obtenidos son mostrados en la figura 1-14.

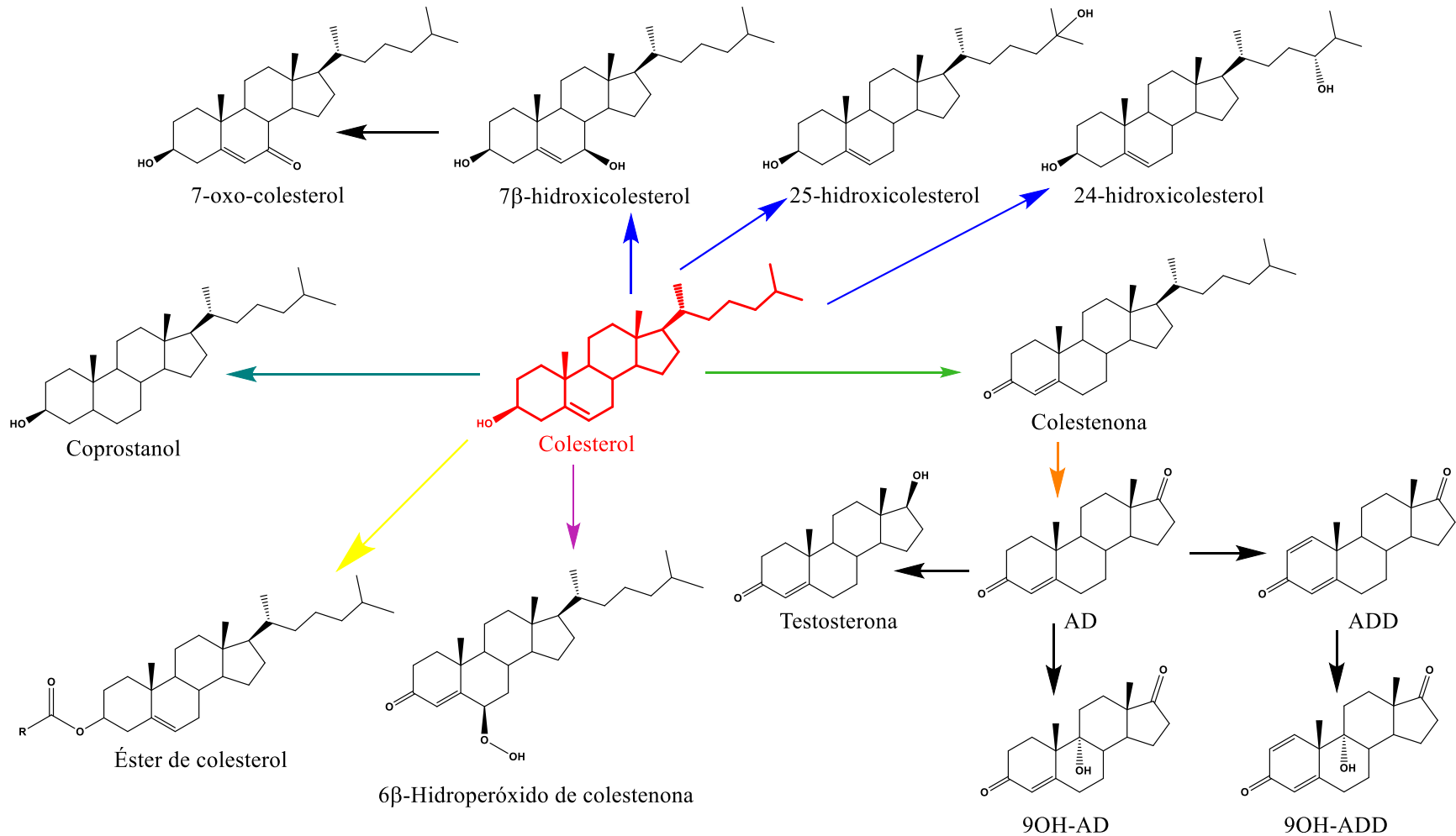


Figura 1- 14. Principales productos obtenidos mediante biotransformación del colesterol. Código de colores de las flechas: **Azul:** hidroxilaciones; **Verde:** oxidación del grupo 3β-hidroxilo e isomerización $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$; **Naranja:** clivaje de la cadena lateral; **Violeta:** oxidación; **Amarillo:** esterificación; **Celeste:** Reducción; Negro: oxidorreducciones de los metabolitos intermediarios obtenidos.

La oxidación del grupo alcohol y la isomerización del doble enlace para formar colestero es una de las reacciones más estudiadas. Esta ha sido realizada por biocatalizadores de célula entera, ya sea células en crecimiento y/o en reposo, y por la enzima ChOx purificada, tanto en su forma libre como inmovilizada (Tabla 1-2). Han sido reportadas varias propiedades medicinales asociadas a la colestero es. Esta puede ser usada para el control de la obesidad, para el tratamiento de enfermedades hepáticas y como agente para evitar la queratinización de la piel (Suzuki 1993; Hisao & Taku 1995; Kashima et al. 1995; Suzuki et al. 1998). Además, es utilizada como precursor de algunos intermediarios para la producción de drogas esteroidales, como AD y ADD, generando un amplio rango de esteroides como andrógenos, estrógenos, glucocorticoides, progestágenos y mineralocorticoides (Shao et al. 2014).

Por otro lado, la enzima ChOx tiene valor comercial por sí misma. Es empleada para la determinación analítica de los niveles de colesterol en sangre, en otras muestras clínicas y en alimentos. La determinación puede ser realizada empleando un método totalmente enzimático en el cual la enzima colesterol hidrolasa es usada para hidrolizar los ésteres del colesterol, dejando el colesterol libre para la acción de la ChOx. La ChOx oxida el colesterol produciendo colestero es y peróxido de hidrógeno, el cual es utilizado por una peroxidasa que cataliza la reacción de acoplamiento oxidativo de un indicador, como 4-aminoantipiridina y fenol, resultando en la formación de una quinoneimina que absorbe a 500 nm. La medida de absorbancia del cromóforo resultante permite la estimación del colesterol en la muestra analizada. También es posible utilizar un método electroquímico para estimar el consumo de oxígeno por la ChOx y así determinar el nivel de colesterol (Maclachlan et al. 2000). Además, la enzima ChOx tiene aplicaciones en agricultura como agente para el control de plagas por su efecto letal contra larvas (Moradpour & Ghasemian 2016). Han sido reportados muchos trabajos de revisión que examinan las funciones fisiológicas, fuentes, características y aplicaciones biotecnológicas de las ChOx (Maclachlan et al. 2000; Aparicio & Martín 2008; Doukyu 2009; Kreit & Sampson 2009; Pollegioni et al. 2009; Moradpour & Ghasemian 2016).

Tabla 1- 2. Transformación del colesterol. Producción de colesteroona, 5-colesten-3-one, 6 β -hidroperoxi-4-colesten-3-ona, 1,4-colestadiene-3-ona y 4,6-colestadien-3-ol mediante célula entera y/o enzima ChOx purificada. Reacciones reportadas durante el periodo 2000-2019.

Producto	Microrganismo	Biocatalizador	Condiciones de la biotransformación ^a	Agente dispersante del colesterol ^b	Referencia
Colesterona	<i>Agrobacterium</i> sp. M4	Célula entera	CC, AO, 150 rpm, 30 °C	0.2% Isopropanol y 0.1% Tween 80	(Yazdi et al. 2000)
Colesterona	<i>Bacillus subtilis</i> SFF34	Dos ChOxs purificadas	60°C y 40°C	-	(Kim et al. 2002)
Colesterona	<i>Mycobacterium smegmatis</i> PTCC 1307	Célula entera	CC, AO, 150 rpm, 30 °C; I	-	(Naghibi et al. 2002)
Colesterona	<i>Fusarium solani</i>	Célula entera	Células en reposo, AO, 200 rpm, 30 °C; I	-	(Sallam et al. 2005)
5-Colesten-3-ona					
1,4-Colestadien-3-ona					
Colesterona	<i>Chryseobacterium gleum</i>	Célula entera	CC, AO, 120 rpm, 30 °C	0.1% Tween 80	(Chaudhari et al. 2010)
Colesterona	<i>Gordonia neofelifaecis</i> NRRL B-59395	Célula entera	CC, AO, 200 rpm, 30 °C	0.2% Tween 80	(Liu et al. 2011)
1,4-cholestadien-3-ona					
Colesterona	—	ChOx comercial	Reactores de micro-canales de vidrio	Sistema bifásico 1:1 buffer: n-heptano o monofásico en n-heptano	(Marques et al. 2012)

4,6-Colestadien-3-ol	<i>Lactobacillus helveticus</i> CD6	Célula entera	GC, 37 °C	0.2% Tween 80	(Ahire et al. 2014)
Colesterona	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIM 2891	ChOx purificada inmovilizada en quitosano	Agitación, 260 rpm, T. ambiente	-	(Ahmad & Goswami 2014)
Colesterona	<i>Rhodococcus ruber</i> Chol-4	ChOx	AO, 250 rpm, 30°C	16.5 mM Ciclodextrina	(Fernández De Las Heras et al.
Colesterona	<i>Chryseobacterium gleum</i> DSM 1677)	ChOx purificada expresada en <i>E. coli</i> JM109	25 °C	5% Triton X-100	(Reiss et al. 2014)
Colesterona	<i>Micobacterium neoaurum</i>	Célula entera de <i>Bacillus subtilis</i> expresando ChOx de <i>M. neoaurum</i>	Células en reposo, AO.	0.3% (w/v) Hidroxipropil-β-ciclodextrina	(Shao et al. 2014)
Colesterona	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PseA, <i>Rhodococcus erythropolis</i> MTCC 3951	ChOx inmovilizada sobre nanopartículas, y enzima libre	AO, 30°C	-	(Ghosh et al. 2018)
Colesterona	<i>Mucor circinelloides</i> VGY2	Célula entera	CC, AO, 150 rpm, 28 °C	0.1% Tween 80	(Giorgi et al. 2019)
6β-Hidroperoxi-4-colesten-3-ona	<i>Burkholderia cepacia</i> ST-200	ChOx purificada expresada en <i>E. coli</i>	30°C	Diferentes detergentes	(Doukyu & Aono 2001)
6β-Hidroperoxi-4-colesten-3-ona	<i>Chromobacterium</i> sp. DS-1	ChOx purificada	30°C	0.34% Triton X-100	(Doukyu et al. 2008)

^a CC: Células en crecimiento; AO: Agitador orbital; I: inhibidor de la degradación del núcleo esteroideal. ^b (-): Ningún agente dispersante del colesterol o aditivo o no hay información disponible.

Existen algunas ChOxs que en vez de oxidar el colesterol a colesteroona lo transforman a otro producto de oxidación, el 6 β -hidroperoxicolest-4-en-3-ona, como las recientemente reportadas ChOxs de *Burkholderia cepacia* cepa ST-200 y *Chromobacterium* sp. cepa DS-1 (Fig. 1-14; Tabla 1-2) (Doukyu & Aono 2001; Doukyu et al. 2008).

Por otro lado, como se describió anteriormente (sección 1.3.2.1.), el catabolismo microbiano del colesterol lleva a la formación de 17-cetoesteroides como AD, ADD y 9-OH-ADD (Fig. 1-14). Varios microorganismos capaces de transformar el esteroide a estos valiosos metabolitos han sido reportados, incluidas bacterias y algunos hongos filamentosos, como se muestra en la tabla 1-3. Otro proceso biocatalítico interesante que ha sido investigado es la producción de testosterona desde colesterol (Tabla 1-3) (Liu et al. 1994; Borrego et al. 2000; Kumar et al. 2001).

La hidroxilación de esteroides es una de las reacciones más importantes en el campo de la biocatálisis. Esto se debe fundamentalmente a que la hidroxilación de carbonos no activados es un desafío para la química orgánica tradicional, y las biotransformaciones son una eficiente herramienta para lograrlo con alta estereo- y regioespecificidad, como fue explicado en la sección 1.3.1 (Donova & Egorova 2012). Los derivados hidroxilados tienen mayor polaridad que sus análogos esteroidales no hidroxilados, lo cual afecta su toxicidad y su transporte a través de la membrana celular influyendo así en la actividad biológica del compuesto (Szaleniec et al. 2018).

Hay tres clases distintas de enzimas responsables de la hidroxilación de esteroides en bacterias: las hidroxilasas de la familia del citocromo P450, la 3-cetoesteroide-9 α -monooxigenasa perteneciente a la familia de las proteínas de Rieske, y la esteroide C25 deshidrogenasa que contienen molibdeno (Szaleniec et al. 2018). Cuando los biocatalizadores son hongos, las hidroxilaciones son las reacciones más comunes en la bioconversión de esteroides (Nassiri-Koopaei & Faramarzi 2015). Las hidroxilasas del citocromo P450 fúngicas son generalmente inducibles por un esteroide exógeno, la mayoría se encuentran en la membrana del retículo endoplasmático y representan un mecanismo de defensa contra esteroides tóxicos (Stytsenko et al. 2007; Cresnar & Zakelj-Mavric 2009; Donova & Egorova 2012). Diferentes hongos son capaces de hidroxilar cada carbono de la estructura esteroide sobre diferentes sustratos. Han sido reportadas las hidroxilaciones: 1 β , 2 β , 4 (sobre anillos aromáticos), 5 α , 6 β , 7 α , 7 β , 9 α , 10 β ,

12 α , 12 β , 14, 15 α , 15 β , 17 α , 19, 22, y 26, siendo las 11 α , 11 β , y 16 α hidroxilasas las que proveen los metabolitos de mayor valor comercial (Nassiri-Koopaei & Faramarzi 2015).

Respecto a la hidroxilación del colesterol, los principales metabolitos de hidroxilación reportados son: 25-hidroxicolesterol, 24(S)-hidroxicolesterol, 7-hidroxicolesterol y su derivado oxidado 7-cetocolesterol (Fig. 1-14, tabla 1-4).

Tabla 1- 3. Productos e intermediarios obtenidos por clivaje de la cadena lateral y oxidación de los anillos del colesterol mediante biocatalizador de célula entera. Reacciones reportadas durante el periodo 2000-2019.

Producto	Microorganismo	Condiciones de la biotransformación ^a	Agente dispersante del colesterol ^b	Referencia
AD	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	CC, fermentador aereado, 250 rpm, 30 °C	0.1% Ciclodextrina	(Kumar et al. 2001)
Testosterona				
AD	<i>Micrococcus roseus</i>	CC, AO, 174 rpm, 30 °C	0.1% Tween 80	(Dogra & Qazi 2001)
ADD				
AD	<i>Mycobacterium</i> sp.	CC, AO, 160 rpm, 30 °C	1 g/L Lecitina de soja o 3 g/L Tween 80	(Wang et al. 2002)
ADD		Células en reposo, AO, 150 rpm, 30 °C		
AD	<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B3683 y cepas mutantes <i>Mycobacterium</i> sp. EX4; M2 y M10	CC, AO, 200 rpm, 30°C	0.5% Tween 80	(Perez et al. 2003)
ADD				
AD	<i>Fusarium solani</i>	Células en reposo, AO, 200 rpm, 30 °C; I	-	(Sallam et al. 2005)
ADD				
AD	<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B-3683 y NRRL B-3805	CC, AO, 200 rpm, 25 °C	8% Tween 80	(Sripalakit et al. 2006)
ADD				
ADD	<i>Mycobacterium neoaurum</i> VKPM Ac-	CC, AO, 220 rpm, 30 °C	0.3% Tween 80	(Molchanova et al. 2007)
ADD	<i>Chryseobacterium gleum</i>	CC, AO, 120 rpm, 30 °C	0.1% Tween 80	(Chaudhari et al. 2008)
AD	<i>Gordonia neofelifaecis</i> NRRL B-59395	CC, AO, 200 rpm, 30 °C	0.2% Tween 80	(Liu et al. 2011)
ADD				
Ácido 3-oxo-23,24-bisnorcola-1,4-dien-22-oico				

17-cetoesteroides (no identificados)	<i>Nocardia</i> sp. MTCC 1534	CC, AO, 100 rpm, 37 °C, I	1% Acetona	(Vyas et al. 2012)
AD	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CC, 37 °C; I	0.2% Tween 80	(Ahire et al. 2012)
ADD				
AD	<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155, <i>M. tuberculosis</i> H37RV y mutantes	CC, AO, 130 rpm, 37 °C	50:50 96% Etanol: agua	(Brzostek et al. 2013)
9 α -Hydroxy-4-androsten-3,17-dione				
ADD	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> DSM43269 cepa mutante RG32	CC; AO, 220 rpm, 30 °C	Acetona	(Wilbrink et al. 2011)
Ácido 3-oxo-23,24-bisnorcola-1,4-dien-22-oico				
AD	<i>Mycobacterium smegmatis</i> PTCC 1307	CC, AO, 150 rpm, 30 °C; I	-	(Naghbi et al. 2002)
ADD				
ADD	<i>Cepa mutante Mycobacterium</i> sp. MB-3683	CC; SF	1% Metanol	(Borrego et al. 2000)
AD				
Testosterona				
AD	Cepa mutante <i>Mycobacterium</i> sp MB-3683	Células en reposo, AO, 200 rpm, 30°C	0.1% Tween 80	(Borrego et al. 2004)
AD	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	CC, AO, 37 °C	Tiloxapol y Tween 80	(Nesbitt et al. 2010)
ADD				
Pregnenolona	<i>Bacillus megaterium</i> recombinante produciendo CYP11A1 de origen bovino	GC, AO, 150 rpm, 30°C	Hidroxipropil- β -ciclodextrina y saponina de <i>Quillaja</i>	(Gerber et al. 2015)

^a CC: Células en crecimiento; AO: Agitador orbital; I: inhibidor de la degradación del núcleo esteroidal. ^b (-): Ningún agente dispersante del colesterol o aditivo o no hay información disponible.

Han sido demostradas varias propiedades biológicas del 25-hidroxicolesterol. Este cumple funciones regulatorias en el sistema inmunológico, posee actividad antiviral significativa y ha sido recientemente investigado por su potencial uso como anti zika virus (Rugor et al. 2017; Tricarico et al. 2018). Sin embargo, su síntesis es un desafío que limita la investigación sobre sus potenciales aplicaciones en medicina, siendo la biocatálisis una alternativa a la síntesis tradicional de este compuesto. La vía sintética tradicional de este compuesto involucra varios pasos, resultando en bajos rendimientos finales (Rugor et al. 2017). Este compuesto ha sido recientemente obtenido mediante biotransformación del colesterol (Rugor et al. 2017; Putkaradze et al. 2018).

Por otra parte, los productos 7 β -hidroxicoolesterol y su derivado oxidado 7-cetocolesterol son valiosos por su evidenciados efectos citotóxicos sobre celulares tumorales (Olkkonen et al. 2012; Nury et al. 2013).

Los recientes avances en el área de la biotransformación de esteroides están relacionados al descubrimiento de nuevos microorganismos capaces de hidroxilar distintos esteroides en diferentes posiciones del núcleo esteroideal, o que permitan sintetizar nuevos esteroides (Donova & Egorova 2012). También, como es explicado en el trabajo de revisión de Donova *et al.* 2012; muchas investigaciones recientes se enfocan en la sobreexpresión heteróloga de sistemas enzimáticos P450 en microorganismos hospederos apropiados, que permitan la generación de nuevas cepas capaces de hidroxilar en posiciones específicas el núcleo esteroideal sin catalizar reacciones secundarias no deseadas.

Tabla 1- 4. Hidroxilación del colesterol mediante biotransformaciones. Reacciones reportadas durante el periodo 2000-2019.

Producto	Microorganismo	Biocatalizador	Condiciones de la biotransformación ^a	Agente dispersante ^b	Referencia
7 β -Hidroxicolesterol	<i>Cladosporium</i> sp. IS547	Célula entera	CC, AO, 180 rpm, 28-30 °C	0.2% Tween 80	(Pang et al. 2016)
7-cetocolesterol					
7 β -Hidroxicolesterol	<i>Burkholderia cepacia</i> SE-1	Célula entera/ colesterol hidroxilasa purificada	Células en reposo, AO, 220 rpm, 30 °C	-	(Xiangdong et al. 2016)
7-cetocolesterol		Célula entera			
25-hidroxicolesterol	<i>Sterolibacterium denitrificans</i> Chol-1S	Enzima C25 esteroide deshidrogenasa purificada	Reactor anaerobio, 25 °C	8% 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina y 1.25-3.75% 2-metoxietanol	(Rugor et al. 2017)
24(S)-hidroxicolesterol	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 319	Célula entera de <i>B. megaterium</i> sobreexpresando hidroxilasa CYP109E1 o <i>E. coli</i> expresando CYP109E1	CC	0.2% saponinas de <i>Quillaja</i> o 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina	(Putkaradze et al. 2018)
25-hidroxicolesterol					
7 β -Hidroxicolesterol	<i>Trichoderma koningiposis</i>	Célula entera	CC; AO, 150 rpm, 28 °C	0.1% Tween 80	(Giorgi et al. 2019)
5,6-epoxicolestano-3-ol	<i>Mucor circinelloides</i> VGH4				

^a CC: Células en crecimiento; AO: Agitador orbital. ^b (-): Ningún agente dispersante del colesterol o aditivo o no hay información disponible.

1.3.3. Biotransformación de ácidos biliares

1.3.3.1 Catabolismo microbiano de los ácidos biliares

Los ácidos biliares son transformados en el tracto intestinal principalmente por bacterias anaerobias estrictas pertenecientes a los géneros *Bacteroides*, *Eubacterium* y *Clostridium* (Baron & Hylemon 1997; Philipp 2011). Por otro lado, muchas bacterias aerobias aisladas de suelo o agua son capaces de crecer utilizando ácidos biliares como única fuente de carbono y energía, degradando el esteroide por completo hasta CO₂. Han sido reportadas varias bacterias capaces de degradar aeróbicamente los ácidos biliares, incluyendo los filos actinobacteria, betaproteobacteria y gammaproteobacteria. Dentro de actinobacteria, han sido estudiadas cepas de los géneros *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*, entre otros. Dentro de proteobacteria, distintas cepas de *Comamonas testosteroni* (conocida como *Pseudomonas testosteroni*), una cepa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* y diferentes especies de *Pseudomonas* han sido reportadas por su capacidad de degradación de ácidos biliares (Philipp 2011). Existe evidencia de que la vía de degradación aeróbica del colesterol emerge en la vía de degradación de los ácidos biliares. La degradación de la cadena lateral del esteroide lleva a la formación de un C₂₄ esteroide luego del primer ciclo de β -oxidación (ver sección 1.3.2.1, Fig. 1-12). A su vez, ambas vías catabólicas emergen en los intermediarios AD y ADD, cuya degradación continúa en los anillos A y B mediante la vía 9-10-seco, como fue previamente descrito en la sección 1.3.2.1.

Como es explicado en el trabajo de revisión publicado por Philipp, la degradación bacteriana de los ácidos biliares comienza con la oxidación del grupo alcohol en C₃, catalizada por la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la cual es una enzima dependiente de NAD(P) (Philipp 2011). Luego, la acción de Δ^4 y Δ^1 -3-cetoesteroide deshidrogenasas conduce a la formación del intermediario 3-ceto-1,4-dieno esteroide. Después o simultáneamente a esta oxidación del anillo A, la cadena lateral es degradada hasta la formación del 17-cetoesteroide, obteniéndose el metabolito derivado de ADD hidroxilado según el ácido biliar que este siendo degradado (hidroxilo en C₁ y/o C₁₂). La degradación de ADD continúa con la formación de 9 α -OH-ADD y la aromatización del anillo A. En los pasos siguientes se produce la apertura de los anillos A y B,

formándose un intermediario carboxílico con 6 carbonos y un derivado del ácido perhidroindano que son degradados hasta CO_2 (Fig. 1-15) (Philipp 2011).

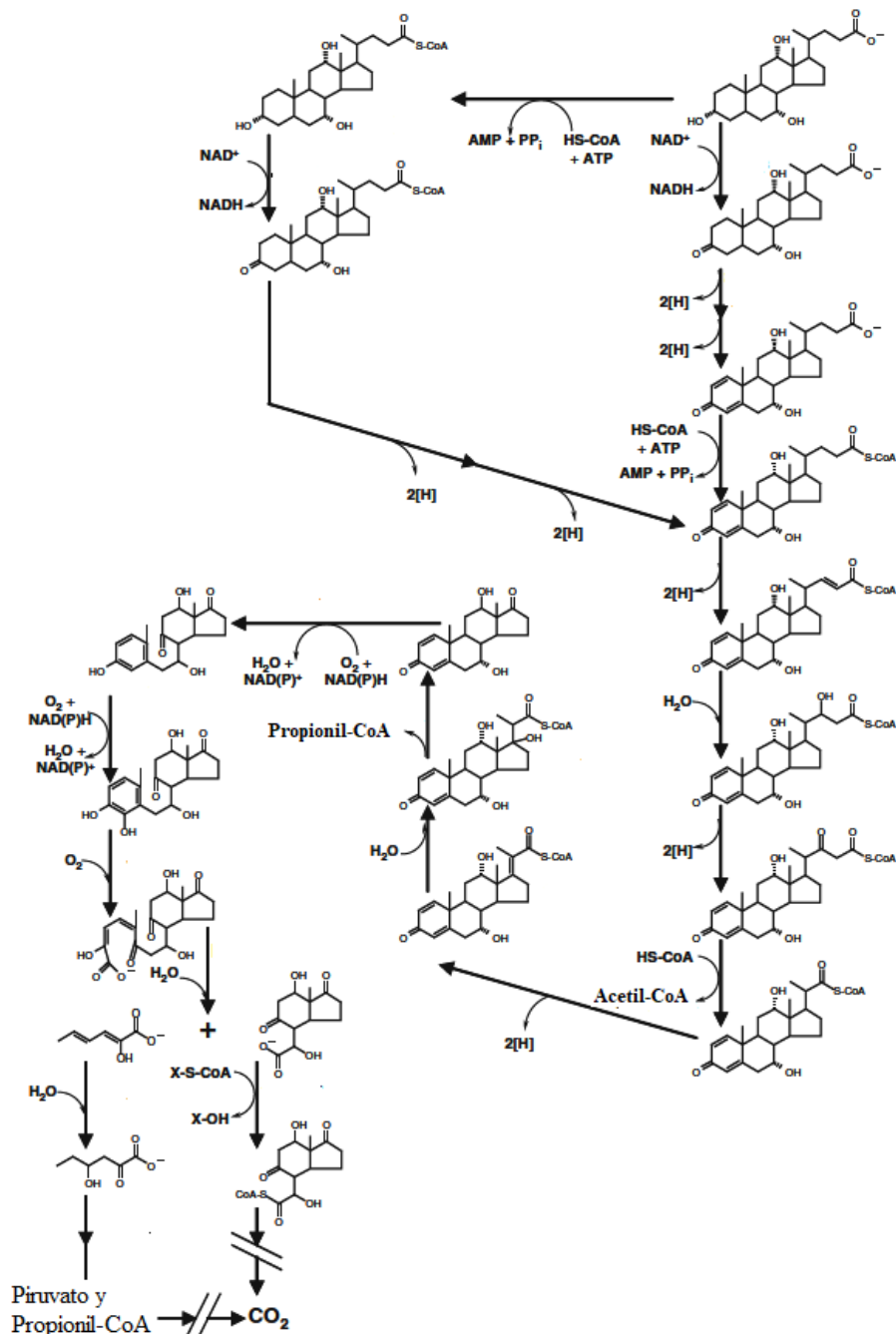


Figura 1- 15. Vía de degradación hipotética del ácido cólico. Propuesta por Philipp teniendo en consideración las enzimas, genes y metabolitos identificados en distintas bacterias capaces de degradar ácidos biliares: *Comamonas testosteroni*; *Clostridium scindens*; *Rhodococcus erythropolis*; *Pseudomonas sp.* y *Mycobacterium tuberculosis*. Adaptada de (Philipp 2011).

1.3.3.2 Reacciones de biotransformación de ácidos biliares

Las reacciones de transformación de ácidos biliares reportadas hasta el momento involucran la epimerización de los grupos hidroxilo en C3, C7, y C12, la oxidación de estos, la reducción de grupos cetona, la hidroxilación en distintas posiciones del núcleo esteroidal, la formación de dobles enlaces y la pérdida de grupos alcohol (Bortolini et al. 1997; Prabha & Ohri 2006).

La inversión de la estereoquímica sobre un carbono específico sin cambio en su estado de oxidación, denominada epimerización, ha recibido mucho interés en los ácidos biliares. Fundamentalmente porque la inversión de la orientación α a β del hidroxilo en C7 del ácido quenodesoxicólico permite la obtención del ácido ursodesoxicólico, el cual es ampliamente usado en medicina (Fig. 1-16 b) (Bortolini et al. 1997; Ikgami & Yasushi 2008; Williams & Shaffer 2008). La oxidación del grupo hidroxilo seguida por la reducción del grupo cetona resulta en la epimerización del grupo hidroxilo original. Esto puede lograrse con microorganismos que poseen 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 7 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa o en cultivos mixtos de bacterias que contengan una u otra enzima (Eggert et al. 2014).

Otra forma de obtener el ácido ursodesoxicólico es mediante la hidroxilación específica en C7 del ácido litocólico con orientación β (Fig. 1-16 a). Varias cepas de hongos filamentosos y actinobacteria han sido capaces de catalizar esta conversión (Kollerov et al. 2013). Otra ruta quimio-enzimática para la obtención del ácido ursodesoxicólico es utilizando el ácido cólico como material de partida, por lo que es necesario transformar la orientación del grupo hidroxilo en C7 de α a β , y remover el grupo hidroxilo en C12 (Eggert et al. 2014).

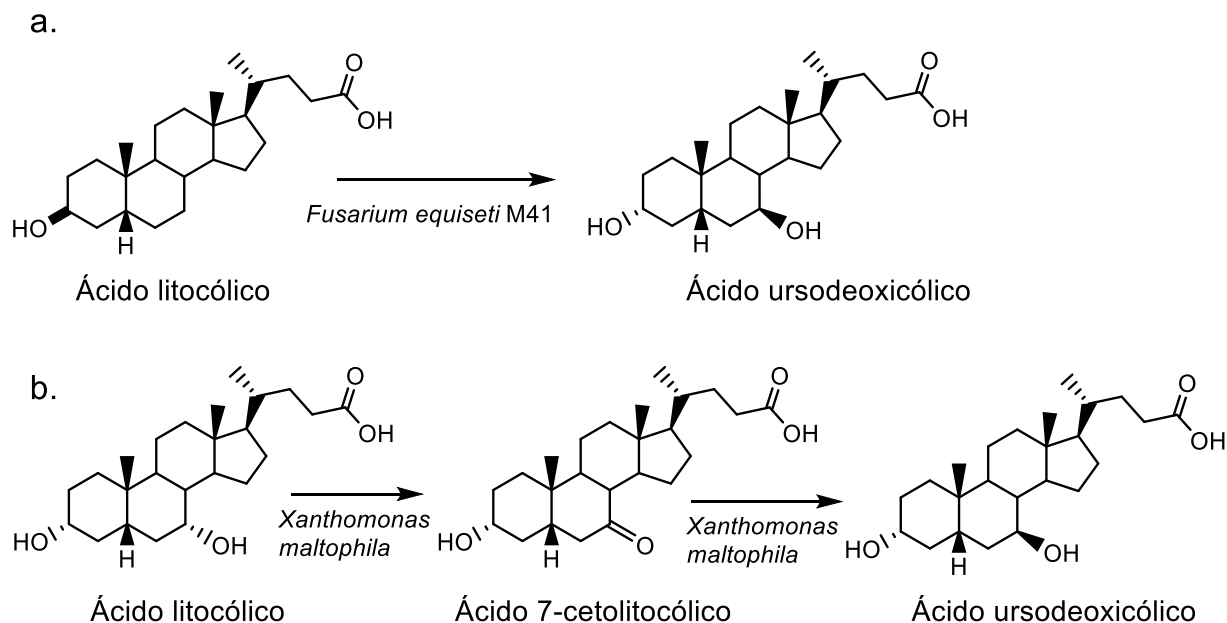


Figura 1- 16. Reacciones de biotransformación para obtener el ácido ursodesoxicólico. **a)** Hidroxilación en C7 del ácido litocólico usando células enteras de *Fusarium equiseti* **b)** Epimerización del grupo hidroxilo en C7 mediante células enteras de *Xanthomonas maltophilia*. Adaptado de (Eggert et al. 2014).

1.3.4. Estrategias para mejorar la eficiencia de la biotransformación de esteroides

En varios bioprocesos la eficiencia de bioconversión se ve reducida debido a la baja solubilidad de los esteroides en medios acuosos, lo cual limita la biodisponibilidad del sustrato al biocatalizador. En los últimos años se han desarrollado distintas estrategias para mejorar las bioconversiones, como por ejemplo la micronización o la emulsificación con tensoactivos de los sustratos, la aplicación de sistemas bifásicos con solventes orgánicos, polímeros líquidos, ciclodextrinas y/o combinación de varias metodologías (Donova & Egorova 2012). Los compuestos utilizados para solubilizar el colesterol en las reacciones de transformación reportadas durante el periodo 2000-2019 son presentados en las tablas 1-2, 1-3 y 1-4.

Tensoactivos como Tween 80 y Triton X-100, son muy usados para mejorar la dispersión y solubilidad del sustrato en medios acuosos. La estructura anfipática de la molécula del tensoactivo cumple un rol importante en facilitar el contacto entre el sustrato hidrofóbico y la superficie hidrofílica del microorganismo. Sin embargo, estos presentan algunos problemas

asociados a la formación de espuma durante procesos que requieran agitación, y pueden presentar efectos tóxicos sobre algunos microorganismos aún a bajas concentraciones (Wang et al. 2002).

Una alternativa a esto es el uso de lecitina de soja, la cual fue demostrado que no causa problemas significantes de formación de espuma (Wang et al. 2002). Debido a sus características estructurales, puede formar bicapas en el agua similar a lo que sucede con los tensoactivos. Además es biocompatible con la mayoría de los microorganismos y no genera alteraciones sobre el crecimiento celular (Wang et al. 2002).

Otra estrategia ampliamente usada es la adición de ciclodextrinas naturales o modificadas para aumentar la eficiencia de la biotransformación. Esta mejora se atribuye fundamentalmente al aumento de la solubilidad de los esteroides través de la formación de complejos de inclusión con las ciclodextrinas (Fenyvesi et al. 2018a). A su vez, estas moléculas interactúan con la bicapa lipídica de la pared celular aumentando la permeabilidad de la misma a sustratos y nutrientes en *Mycobacteria* spp. (Shtratnikova et al. 2017; Fenyvesi et al. 2018b). Por otra parte, se demostró que las tres ciclodextrinas que presentan distinto tamaño de cavidad, denominadas α , β y γ , aumentan la velocidad de bioconversión de esteroides en comparación con la realizada sin el agregado de estas (Hesselink et al. 1989). El efecto observado fue distinto según el sustrato y el tamaño de la cavidad de la ciclodextrina en estudio. Para el colesterol, el aumento de la velocidad de bioconversión utilizando las ciclodextrinas en la misma relación molar fue: sin ciclodextrina < α - << β - $\approx$ γ - ciclodextrina (Hesselink et al. 1989). Por otro lado, la β -ciclodextrina modificada, hidroxipropil- β - ciclodextrina y sus complejos con el sustrato esteroideal presentan mayor solubilidad en agua y su capacidad de formar complejos es más fuerte en comparación con la no modificada, por lo que es ampliamente utilizada en transformaciones de esteroides (Shen et al. 2012).

La aplicación de metodologías combinadas también es extensamente usada. Por ejemplo, en un trabajo recientemente publicado se utiliza hidroxipropil- β - ciclodextrina y saponinas de *Quillaja* (una mezcla de glicósidos naturales obtenidos de *Quillaja saponaria*) capaces de permeabilizar la membrana bacteriana, para la transformación de colesterol, 7-dehidrocolesterol y β -sitoesterol mediante una cepa recombinante de *Bacillus megaterium* expresando la hidroxilasa

bovina CYP11A1 (Gerber et al. 2015). Se ha demostrado que las saponinas incrementan la solubilidad del colesterol en soluciones acuosas por la formación de micelas, y que son capaces de formar poros en las membranas biológicas (Mitra & S.R. Dungan 2001; Francis et al. 2003). Por otro lado, distintos solventes orgánicos son usados para solubilizar sustratos esteroidales, los cuales a su vez facilitan el proceso de purificación posterior a la biotransformación. Sin embargo, la mayoría de los solventes orgánicos utilizados presentan algunos inconvenientes asociados a la toxicidad que pueden producir sobre el biocatalizador y a su peligrosidad sobre la salud y el medioambiente. Una alternativa a su uso es utilizar solventes biocompatibles, conocidos como “solventes verdes”, definidos como solventes compatibles con el medioambiente, no tóxicos, no inflamables y que permiten su reúso (Marques et al. 2010). Ejemplos de estos son los fluidos supercríticos, líquidos iónicos, aceites naturales y polímeros líquidos (Donova & Egorova 2012).

Existen otras limitaciones asociadas a la biotransformación de estos sustratos. En algunos casos, existen efectos inhibitorios y de toxicidad de sustratos/productos sobre las células microbianas, así como también la degradación no deseada de los productos obtenidos (Donova & Egorova 2012).

Ha sido evidenciado que ADD presenta efectos tóxicos sobre bacterias del género *Mycobacterium* y otras, y es esperado que AD también los presente (Donova 2017). Se han explorado distintas estrategias para superar estas limitaciones, como el uso de resinas o biocatalizadores inmovilizados sobre un soporte adecuado. Resinas como amberlita XAD-7 o copolímeros de divinilbenceno y estireno modificados, adsorben el producto obtenido facilitando su separación y evitando los efectos de toxicidad sobre el biocatalizador (Liu et al. 1994; Molchanova et al. 2007). Otra forma de evitar la toxicidad de sustratos y productos es el uso de células inmovilizadas, las cuales a su vez presentan la ventaja de ser reutilizables (Niwas et al. 2014).

Recientemente, varias metodologías se han explorado para evitar la degradación no deseada de los productos de biotransformación. Cuando el objetivo es el clivaje de la cadena lateral del colesterol sin romper el esqueleto esteroideal, para lograr la acumulación de los metabolitos AD, 9-OH-AD o ADD, es necesario evitar la acción de las enzimas que continúan en la vía del

catabolismo microbiano del colesterol: 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa (KStD) y 3-cetoesteroide-9 α -monooxigenasa (KsH). Para lograrlo, varios agentes inhibidores de estas enzimas han sido evaluados, como colorantes redox, metales, agentes quelantes y solventes orgánicos, entre otros (Sallam et al. 2005). La enzima KsH contiene el ion ferroso y requiere de este para su función (Petrusma et al. 2014). Por lo que remover este ion del medio provoca la inhibición de la actividad enzimática, lo que puede lograrse con agentes quelantes como 2,2'-dipiridil, hidroxiquinolina, o remplazando el ion ferroso por otros iones como Co^{2+} o Ni^{2+} (Shah et al. 1980; Ahmad et al. 1992). La conversión de colesterol a AD y ADD en presencia de varios inhibidores enzimáticos fue estudiada, obteniéndose los más altos rendimientos de AD y ADD con 8-hidroxiquinolina y metanol respectivamente (Sallam et al. 2005). Otra forma de evitar la degradación no deseada es mediante la construcción de cepas mutantes con la supresión de genes que codifican para las actividades enzimáticas de 9 α -hidroxilación y/o 1,2-dehidrogenación (Ahmad et al. 1992; Donova 2007).

A pesar de que las bioconversiones de esteroides están bien establecidas en la actualidad, existen ciertas dificultades para la aplicación de algunas de estas biotransformaciones a nivel industrial (Donova & Egorova 2012). Las investigaciones en el campo continúan para superar las limitaciones descritas anteriormente, la relativa baja productividad e insuficiente selectividad de algunos biocatalizadores. A su vez, investigaciones recientes se enfocan principalmente en la identificación de nuevos metabolitos esteroidales con potencial actividad fisiológica, y en el descubrimiento de nuevos biocatalizadores capaces de transformar eficientemente reacciones nuevas o ya conocidas (Donova & Egorova 2012). En este sentido, resulta relevante continuar los esfuerzos para buscar nuevos biocatalizadores capaces de realizar transformaciones en las posiciones específicas deseadas sin o con muy pocas reacciones secundarias, logrando desarrollar biotecnologías eficientes para producir esteroides con valor comercial para su aplicación en la industria farmacéutica principalmente.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Biotransformación de esteroides fácilmente asequibles para la obtención de compuestos con potencial actividad farmacológica por sí mismos y/o útiles para la síntesis de fármacos.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Búsqueda y aislamiento de microorganismos biotransformadores de esteroides a partir de una fuente rica en los sustratos.
2. Identificación y caracterización de los microorganismos aislados.
3. Estudio de la biotransformación de esteroides fácilmente asequibles, particularmente colesterol, con los microorganismos aislados y con algunos pertenecientes a la colección de microorganismos del Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones de la Facultad de Química.
4. Estudio de la biotransformación de ácido litocólico y ácido cólico, con microorganismos seleccionados por su capacidad de transformar el colesterol.
5. Identificación de los productos de biotransformación obtenidos.
6. Estudio de variables de forma de obtener mejores rendimientos de la biotransformación de aquellas reacciones que resulten de interés.
7. Identificación de la/s enzima/s participante/s en estas biotransformaciones.

2. Resultados y discusión

2.1. Aislamiento de microorganismos a partir de un hábitat rico en esteroides

Como fue explicado en la sección 1.1.4, existen varias estrategias para el descubrimiento de nuevos biocatalizadores capaces de realizar las biotransformaciones deseadas. En esta tesis, se siguió la estrategia tradicional de aislamiento de microorganismos a partir de un hábitat rico en el sustrato. Para esto se seleccionó un hábitat rico en esteroides como lo es la pileta de tratamiento aerobio de los efluentes de lavado de lana de la industria Lanatur S.A. (Fig. 2-1). El efluente de lavado consiste en suciedad, esteroides, ácidos grasos libres, y lanolina, estabilizada por detergentes (Gutiérrez et al. 1999). La lanolina o cera de lana es una mezcla compleja de ésteres de ácidos grasos con colesterol, lanosterol y otros esteroides derivados de la lana de oveja.



Figura 2- 1. Lugar donde se realizó el muestreo para el aislamiento de microorganismos: pileta de tratamiento aerobio de efluentes de lavado de lana.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2-1. Un total de 25 microorganismos fueron aislados de efluentes de lavado de lana y del suelo adyacente a la pileta de lavado. De estos, 15 fueron bacterias, 8 hongos filamentosos y 2 levaduras. Para el aislamiento se utilizaron medios de cultivo ricos (TSB, PDB) suplementados con colesterol y mínimos (M9 e YNB) con colesterol

como única fuente de carbono y energía (Anexo I). La cantidad de microorganismos recuperados de medios ricos fue mayor a la de microorganismos recuperados de medios mínimos. Resulta importante resaltar que un total de 8 microorganismos (5 hongos y 3 bacterias) fueron recuperados de medios mínimos suplementados con colesterol disuelto en Tween 80 (monooleato de sorbitán polioxietilenado), por lo que estos pueden haber utilizado colesterol y/o Tween 80 como fuente de carbono y energía. Es conocido que algunos microorganismos son capaces de hidrolizar el Tween 80 (por acción de lipasas) y utilizar como fuente de carbono los ácidos grasos (ácido oleico) liberados de esa hidrólisis (Barrow & Feltham 1993; Smith et al. 1993; Kumar et al. 2012). Además, dos hongos filamentosos (Y3 e Y5) fueron recuperados tanto de medio rico como de medio mínimo.

A continuación se detalla la cantidad de microorganismos aislados a partir de las diferentes muestras:

❖ Aislamiento a partir de efluente de las piletas de lavado (M1)

i) Utilizando colesterol y/o Tween 80 como única fuente de carbono y energía (M)

Se recuperaron 4 hongos filamentosos y no se recuperaron bacterias

ii) En medio de cultivo enriquecido suplementado con colesterol 0.1% (R)

Se recuperaron 2 hongos filamentosos, 1 levadura y 3 bacterias

❖ Aislamiento a partir de tierra adyacente a las piletas de lavado (M2)

i) Utilizando colesterol y/o Tween 80 como única fuente de carbono y energía (M)

Se recuperaron 1 hongo filamentosos y 3 bacterias

ii) En medio de cultivo enriquecido suplementado con colesterol 0.1% (R)

Se recuperaron 3 hongos filamentosos, 1 levadura y 9 bacterias

Tabla 2- 1. Microorganismos aislados, muestra a partir de la cual fueron aislados y medio de cultivo utilizado.

Denominación asignada	Muestra de la cual se aisló ^a	Medio de cultivo ^b
Bacterias		
M3W	M2	R
M3Z	M2	R
M3U	M2	R
M2A	M1	R
M1E	M1	R
M12D	M1	R
M3F	M2	R
M3S	M2	R
M3X1	M2	R
M3Y	M2	R
M3T	M2	R
M3R	M2	R
M9B2	M2	M
M9B1	M2	M
M9A	M2	M

Denominación asignada	Muestra de la cual se aisló ^a	Medio de cultivo ^b
Hongos filamentosos		
H5	M2	R
H6	M2	M
Y2	M1	M
Y3	M1	M y R
H3	M2	R
Y5	M1	M y R
Y6	M1	M
H4	M2	R
Levaduras		
H2	M2	R
P2	M1	R

^a M1: efluente; M2: tierra adyacente al efluente. ^b R: medio rico suplementado con 0.1 % de colesterol; M: medio mínimo suplementado con 0.1 % de colesterol disuelto en Tween 80.

2.2. Identificación de los microorganismos aislados

2.2.1. Identificación de bacterias

La identificación de las bacterias recuperadas se llevó a cabo mediante la combinación de diferentes metodologías: pruebas bioquímicas primarias (Tabla 2-2), MALDI-TOF MS (Tabla 2-3) y análisis filogenético basado en la secuencia del gen ARN ribosomal 16S (Tabla 2-4). De esta manera se logró establecer que las bacterias aisladas pertenecen a los géneros *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Exiguobacterium*, *Acinetobacter*, *Tsukamurella*, *Bacillus* y *Streptomyces*, identificándose 8 de estas bacterias a nivel de especie. La mayoría de las bacterias aisladas fueron bacilos Gram-negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Tabla 2-2).

Tabla 2- 2. Resultados de las pruebas bioquímicas primarias realizadas a las bacterias.

	Pruebas bioquímicas primarias								
Bacteria aislada	Gram	Forma	Esporas	Oxidasa	Catalasa	Movilidad	OF ^a	Aerobio	Anaerobio
M3W	-	bacilo	-	-	+	+	F	+	+
M3Z	-	bacilo	-	-	+	+	F	+	+
M3U	-	bacilo	-	-	+	+	F	+	+
M2A	-	bacilo	-	-	+	+	F	+	+
M1E	-	bacilo	-	-	+	+	F	+	+
M12D	-	bacilo	-	-	+	+	F	+	+
M3F	-	bacilo	-	-	+	-	F	+	+
M3S	+	bacilo	-	+	+	+	F	+	+
M3X1	-	cocobacilo	+	-	+	-	O	+	-
M3Y	-	cocobacilo	+	-	+	-	O	+	-
M3T	-	cocobacilo	+	-	+	-	O	+	-
M3R	+	bacilo	+	-	+	+	F	+	+
M9B1	+	bacilo	+	-	+	+	I	+	-
M9B2	+	bacilo	-	-	+	-	I	+	-
M9A	+	bacilos	+	-	+	-	O	+	-

^aOF: Óxido/fermentación de la glucosa. O: oxida, F: fermenta; I: inactivo.

El análisis por MALDI-TOF MS permite identificar las bacterias en poco tiempo directamente desde las colonias crecidas según el espectro de masas del perfil proteico del microorganismo. Como es explicado en la sección 4.3.1.2 de la parte experimental, en esta metodología se compara el espectro obtenido con los depositados en la base de datos, generando un valor numérico que provee información acerca de la validez de la identificación (Wieser et al. 2012).

Esta metodología es utilizada para identificar bacterias a nivel de género, especie y algunas veces a nivel de subespecie. Presenta la ventaja de ser rápido ya que el procesamiento y análisis de las muestras puede ser realizado directamente desde la colonia del microorganismo en pocos minutos. Además, a pesar de la alta inversión inicial que se requiere para la adquisición del equipamiento necesario, esta metodología presenta un bajo costo por análisis (USD 2/muestra) en comparación con los métodos convencionales (Wieser et al. 2012; Avanzi et al. 2017). La identificación por MALDI-TOF MS ha sido y es todavía utilizada principalmente en análisis microbiológico de muestras clínicas por la importancia de la rápida identificación de microorganismos en este campo (Wieser et al. 2012; Hou et al. 2019). Debido a sus principales ventajas comentadas anteriormente, su aplicación puede proveer una significativa contribución en otros campos, como la microbiología ambiental y biorremediación (Santos et al. 2016). Sin embargo, debido a la complejidad de las muestras medioambientales y la diversidad de microorganismos, la base de datos de espectros proteicos necesita ser expandida para poder identificar exitosamente microorganismos que no son de relevancia clínica (Santos et al. 2016). En esta tesis, MALDI-TOF MS resultó ser una metodología rápida y eficiente para identificar las bacterias aisladas, demostrando su prometedor potencial en el campo de la biocatálisis y las biotransformaciones.

Analizando los resultados obtenidos mediante MALDI-TOF MS se observa que este método permitió la identificación de nueve bacterias a nivel de especie, tres a nivel de género y sólo en tres casos la identificación no fue posible (Tabla 2-3). En algunos casos la identificación por MALDI-TOF MS no llevó a la obtención de resultados confiables, o sólo se logró a nivel de género. La causa más probable de esos resultados es que la información de esas especies no se encuentre depositada en la base de datos, la cual contiene mayoritariamente espectros del perfil proteico de microorganismos relevantes para diagnóstico clínico (Wieser et al. 2012). Por tanto, la identificación de las bacterias aisladas fue realizada en combinación con los otros métodos utilizados. Los resultados de la identificación por análisis de la secuencia del ARN ribosomal son presentados en la tabla 2-4. La identificación por MALDI-TOF MS y análisis filogenético fue concordante con los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas primarias (Tabla 2-2).

Tabla 2- 3. Resultados obtenidos en la identificación de las bacterias mediante MALDI-TOF MS.

Bacterias aisladas	MALDI-TOF MS ^a		
	Cepa más similar depositada en la base de datos	Valor	Identificador de NCBI
M3W	<i>Citrobacter freundii</i> DSM 30039T DSM	2.256	546
M3Z	<i>Citrobacter freundii</i> 22054_1 CHB	2.416	546
M3U	<i>Citrobacter freundii</i> 22054_1 CHB	2.949	546
M2A	<i>Proteus vulgaris</i> DSM 30119 DSM	1.848	585
M1E	<i>Proteus vulgaris</i> DSM 13387_QC DSM	2.447	585
M12D	<i>Proteus vulgaris</i> LMG 5586 LMG	2.068	585
M3F	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. ozaenae DSM 16358T DSM	2.378	574
M3S	Identificación no confiable	1.325	/
M3X1	<i>Acinetobacter johnsonii</i> V773 MCRFzx	2.415	40214
M3Y	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006T HAM	2.054	471
M3T	<i>Acinetobacter johnsonii</i> LMG 1326 LMG	2.286	40214
M3R	Identificación no confiable	1.538	/
M9B1	Identificación no confiable	1.613	/
M9B2	<i>Tsukamurella</i> sp.	1,803	2060
M9A	<i>Streptomyces badius</i>	1.986	1941

^a Verde: identificación a nivel de especie (valor $\geq$ 2.0); Amarillo: identificación a nivel de género (1.7 $\leq$ valor $\leq$ 1.9); Rojo: identificación no confiable (valor $\leq$ 1.7).

Tabla 2- 4. Identificación de las bacterias mediante análisis filogenético de la secuencia del gen ARNr 16S.

Bacterias aisladas	Estrategia de aislamiento ^a	ARNr 16S		
		Identificación	Posibles especies	Identidad (%)
M3W	R	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Citrobacter freundii</i>	99
M3Z	R	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Citrobacter freundii</i>	99
M3U	R	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Citrobacter freundii</i>	100
M2A	R	<i>Proteus</i> sp.	-	100
M1E	R	<i>Proteus</i> sp.	<i>Proteus vulgaris</i>	100
M12D	R	<i>Proteus</i> sp.	-	98
M3F	R	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100
M3S	R	<i>Exiguobacterium</i> sp.	-	99
M3X1	R	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99
M3Y	R	<i>Acinetobacter</i> sp.	-	99
M3T	R	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	100
M3R	R	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus cereus</i>	100
M9B1	M	<i>Bacillus</i> sp.	-	100
M9B2	M	<i>Tsukamurella</i> sp.	-	100
M9A	M	<i>Streptomyces</i> sp.	-	100

^aM: medio mínimo; R: medio rico.

Muchas bacterias pertenecientes a los géneros *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*, entre otros han sido previamente reportados por su habilidad de crecer usando esteroides como única fuente de carbono y energía (Swizdor et al. 2012). En nuestro estudio, tres bacterias Gram-positivas (M9B1, M9B2 y M9A) fueron aisladas utilizando un medio mínimo suplementado con colesterol disperso en Tween 80 como única fuente de carbono y energía (Tabla 2-1). Estas fueron identificadas como *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp., y *Tsukamurella* sp. Bacterias pertenecientes a estos géneros ya habían sido previamente reportadas por su capacidad de degradar por completo el colesterol (Nagasawa et al. 1969; Swizdor et al. 2012; Merino et al. 2013).

2.2.2. Identificación de hongos

Las observaciones microscópicas y macroscópicas de las características morfológicas de los hongos filamentosos aislados son descriptas a continuación. Estas fueron concordantes con los resultados obtenidos en la identificación mediante el análisis de la secuencia de la región ITS (Tabla 2-5).

El hongo H5 fue identificado como *Talaromyces purpureogenus*. Creciendo en PDA a 28 °C durante 7 días, el color de la colonia es verde oscuro, de color naranja y blanco en los márgenes. Del lado reverso, la colonia es blanca y rosada (Fig. 2-2 A y B). Al microscopio se observan conidióforos ramificados y conidios de forma elipsoidal (Fig. 2-2 C y D).

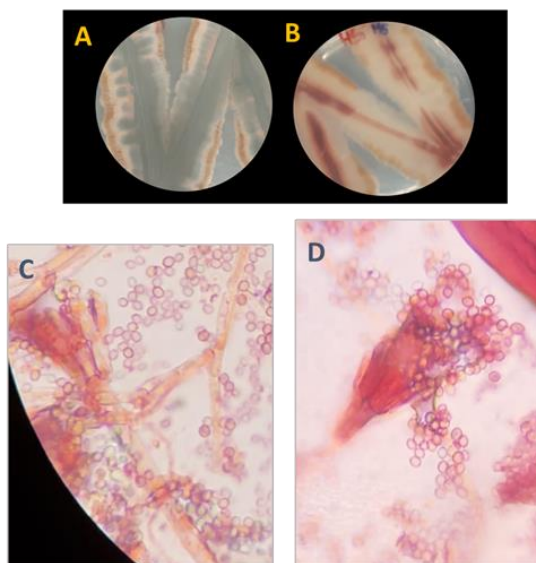


Figura 2- 2. Morfología de *Talaromyces purpureogenus* (H5). **A)** Apariencia de la colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C, **B)** Apariencia de la colonia al reverso de la placa, **C)** Conidióforo, **D)** Conidios.

Imágenes C y D: observación al microscopio del micelio teñido con safranina (aumento 100X).

El hongo H6 fue identificado como *Fusarium* sp. La colonia es blanca-rosada a los tres días de crecimiento, desarrollando un color blanco a violeta a los 7 días, creciendo en PDA a 28 °C. Al reverso de la placa, la coloración es rojo-violeta intenso (Fig. 2-3 A-C). Al microscopio se observa macroconidios tabicados (con 3-5 tabiques); hifa monofiálide; microconidios ovales y unicelulares; clamidosporas intercaladas y solitarias (Fig. 2-3 D-F).

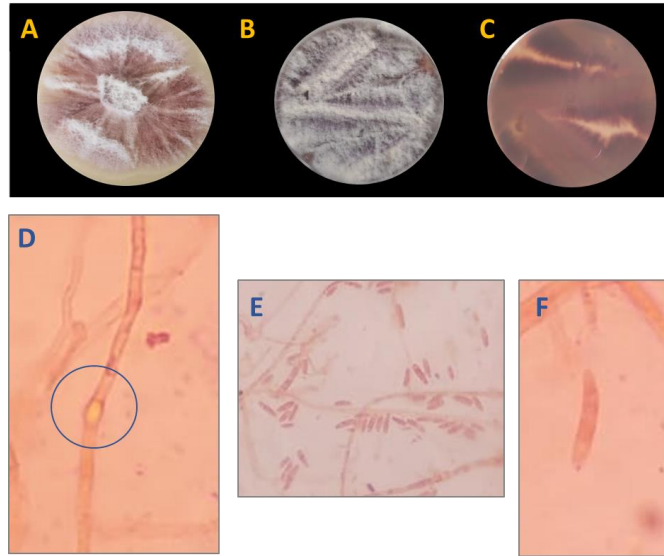


Figura 2-3. Morfología de *Fusarium* sp. (H6). **A)** Apariencia de la colonia a los 3 días de crecimiento, **B)** Apariencia de la colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C, **C)** Apariencia de la colonia al reverso de la placa, **D)** Clamidospora, **E)** Microconidios, **F)** Macroconidio. Imágenes E-F: observación al microscopio del micelio teñido con safranina (D y F: aumento 100X; E: aumento 40X).

El hongo Y3 fue identificado como *Fusarium* sp.; a los 7 días de crecimiento a 28 °C el micelio es blanco-rosa pálido, con coloración blanca-rosa tenue al reverso de la placa de PDA (Fig. 2-4 A y B). Al microscopio se observa macroconidios con 3-5 septos; microconidios ovales formados desde monofiálides (Fig. 2-4 C y D). Clamidosporas en pares, en cadena de a 2 o 3 (Fig. 2-4 E).

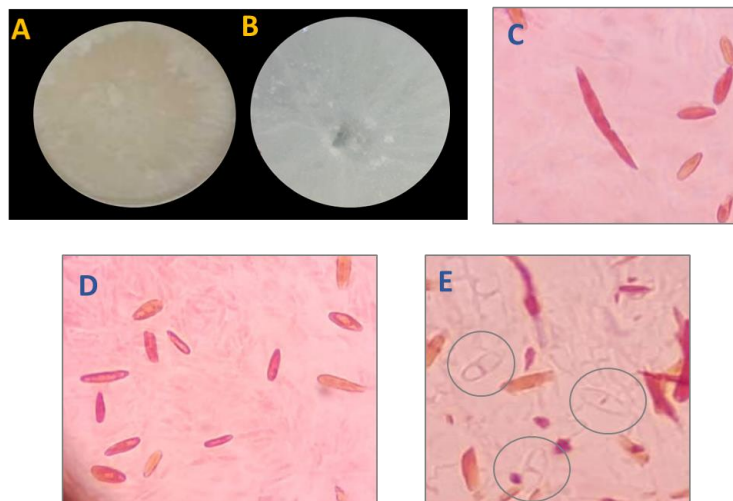


Figura 2-4. Morfología de *Fusarium sp.* (Y3). **A)** Apariencia de la colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C, **B)** Apariencia de la colonia al reverso de la placa, **C)** Macroconidio, **D)** Microconidio, **E)** Clamidosporas en cadena (de a dos).

Imágenes C-E: observación al microscopio (aumento 100X) del micelio teñido con safranina.

El hongo H3 fue identificado como *Trichoderma koningiopsis*. Al crecer en PDA a 28°C, la colonia es blanca desarrollando un color verde claro con tonos amarillos a lo largo de los días, con coloración amarilla al reverso que se observó a los 7 días de crecimiento (Fig. 2-5 A y B). Al microscopio se observó conidióforos altamente ramificados, con presencia de fiálides (Fig. 2-5 D y E). Las clamidosporas son terminales y globulosas. Los conidios son verdes y con forma elipsoidal (Fig. 2-5 C).

El hongo Y5 fue identificado como *Trichoderma asperellum*. Al crecer en PDA a 28°C, la colonia es blanca desarrollando un color verde oscuro a lo largo de los días, incolora al reverso, a los 7 días de crecimiento (Fig. 2-6 A y B). Al microscopio se observó conidióforos altamente ramificados, con presencia de fiálides (Fig. 2-6 D y E). Las clamidosporas son terminales e intercaladas entre las hifas, globulosas (Figura 2-6 F). Los conidios son verdes y con forma elipsoidal (Fig. 2-6 C).

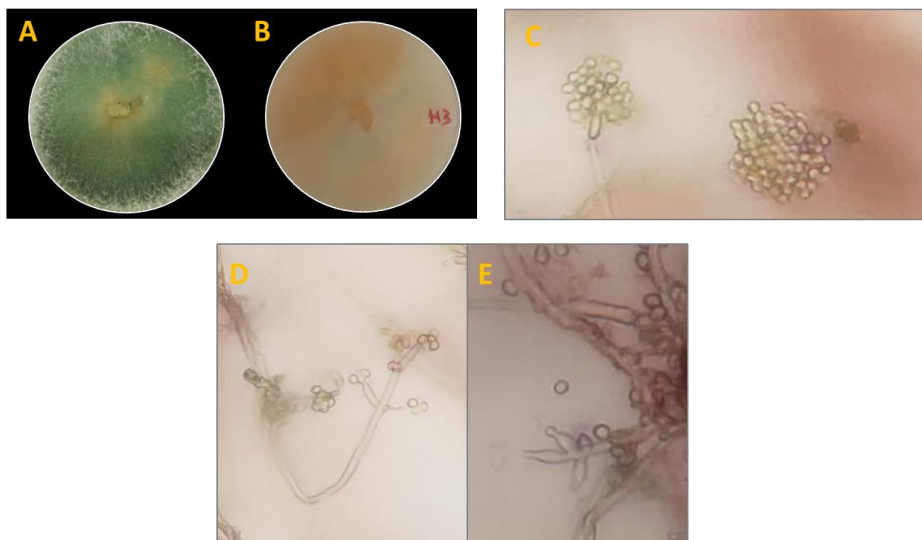


Figura 2- 5. Morfología de *Trichoderma Koningiopsis* (H3). **A)** Apariencia de la colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C, **B)** Apariencia de la colonia al reverso de la placa, **C)** Conidios, **D)** Conidióforos, **E)** Fiálides.

Imágenes C-E: observación al microscopio con aumento 40X.

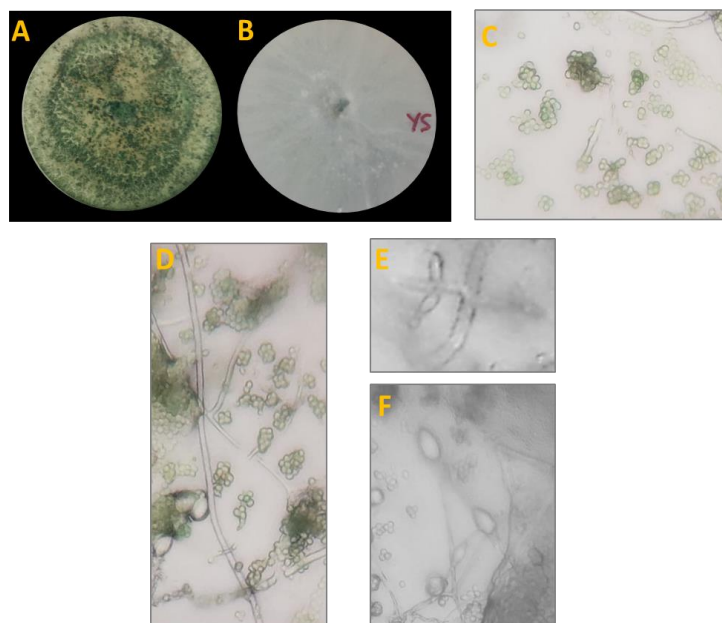


Figura 2- 6. Morfología de *Trichoderma asperellum* (Y5). **A)** Apariencia de la colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C, **B)** Apariencia de la colonia al reverso de la placa, **C)** Conidios, **D)** Conidióforos, **E)** Fiálides, **F)** Clamidosporas.

Imágenes C-F: observación al microscopio con aumento 40X.

El hongo Y6 fue identificado como *Aspergillus* sp. Al crecer en PDA a 28°C, la colonia es de muy rápido crecimiento, de color negro desarrollando un color negro oscuro a lo largo de los días, incolora al reverso, a los 7 días de crecimiento (Fig. 2-7 A-C). Al microscopio se observó el aparato conidióforo, hinchado en el extremo apical, formando una vesícula, y esporas de color negro oscuro (Fig. 2-7 D y E).

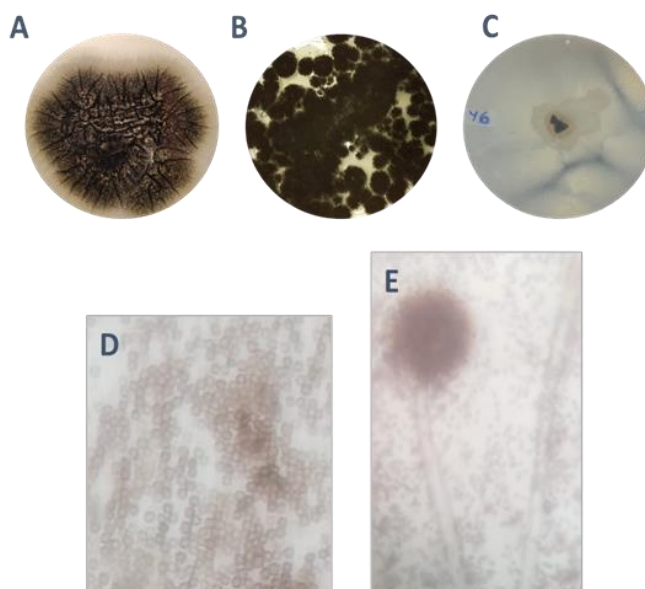


Figura 2- 7. Morfología de *Aspergillus* sp. (Y6). **A)** Apariencia de la colonia en PDA a los 3 días de crecimiento a 28 °C, **B)** Apariencia de la colonia a los 7 días de crecimiento en PDA a 28 °C, **C)** Apariencia de la colonia al reverso de la placa, **D)** Conidios, **E)** Conidióforos. Imágenes D y E: observación al microscopio con aumento 40X.

Los hongos filamentosos Y2 y H4 fueron identificados como *Mucor circinelloides*. Sus colonias son de rápido crecimiento y con micelio tipo aéreo, de color gris-marrón pálido, cuando crecen entre 5 a 7 días en PDA a 28° C. Al reverso son de color incoloro o levemente amarillo (Fig. 2-8 A y B; Fig. 2-9 A y B). Sus colonias crecen cubriendo toda la placa de Petri a los 5 días de incubación en PDA, a 28°C. Los esporangióforos son largos y ramificados, esporangio globuloso, esporangiosporas elipsoidales, de paredes finas y lisas (Fig. 2-8 C y D; Fig. 2-9 D y E). Clamidosporas ausentes.

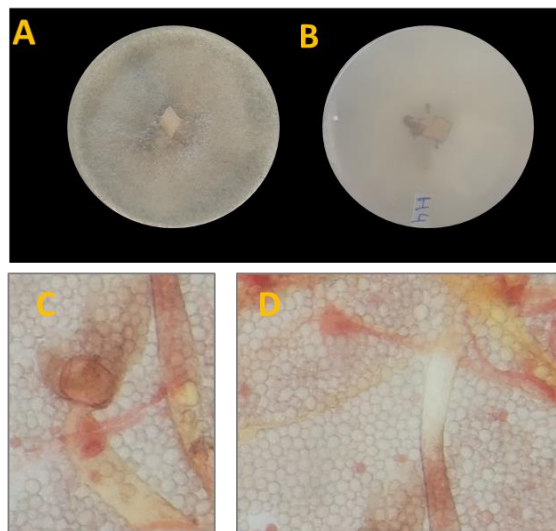


Figura 2- 8. Morfología de *Mucor circinelloides* (H4). **A)** Apariencia de la colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C, **B)** Apariencia de la colonia al reverso de la placa. **C)** Columela **D)** Esporangiosporas.

Imágenes C y D: Observación al microscopio (aumento 40X) del micelio teñido con safranina.

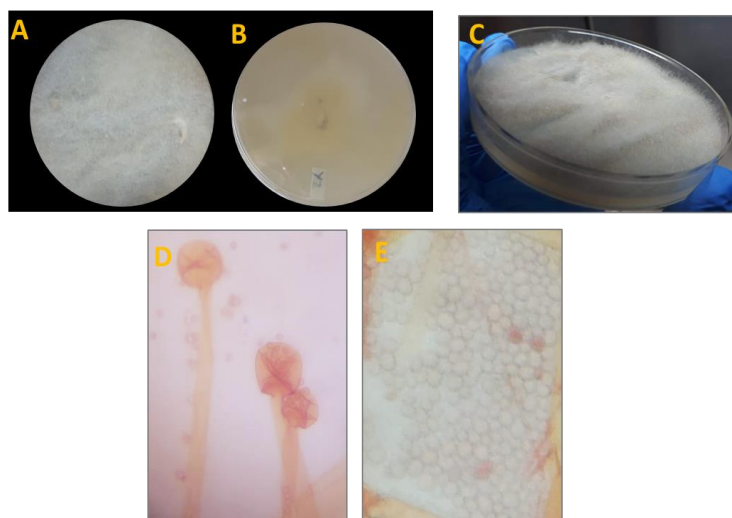


Figura 2- 9. Morfología de *Mucor circinelloides* (Y2). **A)** Apariencia de la colonia en PDA a los 7 días de crecimiento a 28 °C. **B)** Apariencia de la colonia al reverso de la placa. **C)** Micelio aéreo, **D)** Columela, **E)** Esporangiosporas.

Imágenes D y E: observación al microscopio (aumento 40X) del micelio teñido con safranina.

La amplificación de la región ITS1-5.8S ADN ribosomal-ITS2 (ITS) y la comparación de su secuencia utilizando la base de datos BLAST (NCBI) (Altschul et al. 1990), junto a la observación de las características morfológicas, permitió la identificación de todos los hongos filamentosos aislados (Tabla 2-5). Estos pertenecen a los géneros *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Mucor* y *Aspergillus*.

Por otro lado, las levaduras fueron identificadas mediante el análisis de la secuencia del dominio D1/D2 del ADN ribosomal 26S (Tabla 2-5). La identificación de la levadura denominada P2 no fue posible y al tratarse de un microorganismo que no demostró la capacidad de transformar el colesterol se decidió no continuar trabajando para su identificación.

Tabla 2- 5. Resultados de la identificación de los hongos filamentosos aislados mediante análisis de la secuencia de la región ITS1-5.8S ADN ribosomal-ITS2 y de la levadura H2 mediante análisis de la secuencia del dominio D1/D2 del ADNr 26S.

Denominación asignada	Estrategia de aislamiento ^a	Identificación	Posible especie	Identidad (%)
H5	R	<i>Talaromyces</i> sp.	<i>Talaromyces purpureogenus</i>	98
H6	M	<i>Fusarium</i> sp.	-	97
Y2	M	<i>Mucor circinelloides</i>	<i>Mucor circinelloides</i>	99
Y3	M y R	<i>Fusarium</i> sp.	-	97
H3	R	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	98
Y5	M y R	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma asperellum</i>	99
Y6	M	<i>Aspergillus</i> sp.	-	100
H4	R	<i>Mucor circinelloides</i>	<i>Mucor circinelloides</i>	99
H2	R	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100

^a M: medio mínimo; R: medio rico.

Debido a los resultados obtenidos en la biotransformación del colesterol mediante los hongos filamentosos *Mucor circinelloides* (Y2 y H4) y *Trichoderma koningiopsis* (H3), estas cepas resultaron de interés por lo que fueron depositados en la colección de cultivos Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) como *Mucor circinelloides* cepa VGY2 (CECT 21101), *Mucor circinelloides* cepa VGH4 (CECT 21102) y *Trichoderma koningiopsis* cepa VGH3 (CECT 21104) respectivamente (Certificados de depósito en anexo II).

La comparación de la secuencia de ITS para H3 mostró un 100% de identidad con la especie *Trichoderma koningiopsis* y otras utilizando la base de datos BLAST (NCBI) (Altschul et al. 1990). La secuencia de ITS obtenida también mostró similitud con varias otras especies pertenecientes al mismo género (*T. koningi*; *T. hispanicum*; *T. ovalisporum*, entre otras), utilizando la misma base de datos. Al utilizar las bases de datos MycoBank (<http://www.mycobank.org>) (Robert et al. 2005) y TrichOKEY (<http://www.ISTH.info>) (Druzhinina et al. 2005) se obtuvieron los mismos resultados. Por lo tanto, resultó necesario el análisis de la región del factor de elongación TEF-1 α para lograr la identificación de esta cepa a nivel de especie. La secuencia obtenida para la región TEF-1 α mostró un 98% de similitud con *Trichoderma koningiopsis*, seguido de un 94% de similitud con *T. texanum* y un 93% de similitud con *T. ovalisporum*. Estos resultados, sumados a las características morfológicas observadas, permiten afirmar que el aislamiento H3 es *T. koningiopsis*.

Las secuencias de ITS de H4 e Y2 mostraron un 99% de similitud con *Rhizomucor variabilis* var. *regularior* y con *Mucor circinelloides*, seguido de otra especie de *Mucor*: *M. racemosus*, con un 96% de similitud para el aislamiento H4 y *M. ramosissimus* con 95% de similitud para Y2. *Rhizomucor variabilis* var. *regularior*, conocido como *R. regularior* ha sido considerado sinónimo de *Mucor circinelloides* en varios estudios previos donde fue reportado el alto nivel de similitud de la secuencia y morfología de ambas especies (Schwarz et al. 2006; Alvarez et al. 2009, 2010). Basado en estos resultados y en las características morfológicas observadas, las cepas H4 e Y2 fueron identificadas como *Mucor circinelloides*. Esta especie presenta 4 variedades, denominadas *circinelloides*, *lusitanicus*, *janssenii*, y *griseocyanus*, las cuales presentan 25 sinónimos y difieren principalmente entre ellas por el color de sus colonias, las esporangiosporas y en la apariencia de sus columelas (Gherbawy et al. 2010). Si bien en esta tesis no fue posible

llegar a la identificación de las variedades de *Mucor circinelloides* de las cepas Y2 y H4, es probable que Y2 y H4 sean cepas distintas debido a los resultados obtenidos en el screening de actividades enzimáticas HTS y en los ensayos de biotransformación. La comparación entre sus secuencias de ITS en el BLAST da un 98% de similitud; las actividades enzimáticas detectadas mediante HTS fueron diferentes entre ellas; y se obtuvieron distintos productos en la biotransformación del colesterol catalizada por estos microorganismos, bajo las mismas condiciones de ensayo (ver secciones 2.3 y 2.4.2).

Los 5 hongos filamentosos recuperados a partir de un medio mínimo suplementado con colesterol como única fuente de carbono fueron identificados como dos cepas de *Fusarium* sp., *Mucor circinelloides*, *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. . Si bien muchas transformaciones de esteroides realizadas por hongos filamentosos han sido previamente reportadas, se conoce muy poco en lo que se refiere a su habilidad de usar esteroides como fuente de carbono y energía (Mahato et al. 1989; Fernandes et al. 2003; Črešnar and Žakelj-Mavrič 2009; Bhatti and Khera 2012; Nassiri-Koopaei and Faramarzi 2015 y otros). Cresnar y colaboradores establecieron que los microorganismos eucariotas, a diferencia de las bacterias, no pueden degradar completamente los esteroides, y que las modificaciones sobre esteroides serían una respuesta de detoxificación al sustrato (Cresnar & Zakelj-Mavric 2009). Los microorganismos de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Mucor* y *Fusarium* recuperados de medio mínimo, han sido previamente reportados por su capacidad de degradar el colesterol (Nagasawa et al. 1969). No queda claro si la degradación ha sido parcial o completa ya que el estudio previo se basa en la disminución de la concentración de colesterol en los cultivos en un medio definido suplementado con 0.5 % de extracto de malta y 0.1% de colesterol, sin determinar los productos obtenidos en esa descomposición. En esta tesis, la única fuente de carbono agregada al medio mínimo YNB fue el colesterol y el tensoactivo para poder disolverlo en el medio acuoso, Tween 80.

2.3. Detección de actividades enzimáticas de los microorganismos aislados: screening de alto rendimiento (HTS)

Los microorganismos aislados fueron caracterizados en función de sus capacidades catalíticas mediante la realización de un ensayo, denominado HTS, que consiste en la detección de actividades epoxihidrolasas, esterasas, lipasas y Baeyer-Villiger monooxigenasas en células enteras. Esta herramienta para la prospección de enzimas permite un análisis rápido de las actividades enzimáticas presentes en un microorganismo por lo que fue realizada para caracterizar enzimáticamente los microorganismos aislados del lavadero de lana, los cuales pasaron a formar parte de la colección del LBB.

Como es explicado en la sección 4.4 de la parte experimental, en estos ensayos se calcula el porcentaje de bioconversión de la sonda fluorogénica que permite detectar la actividad enzimática deseada (Fig. 2-10). Si el porcentaje de bioconversión es igual o mayor al 5 % de considera que el microorganismo presenta la actividad catalítica en estudio (Porto da Silva 2012).

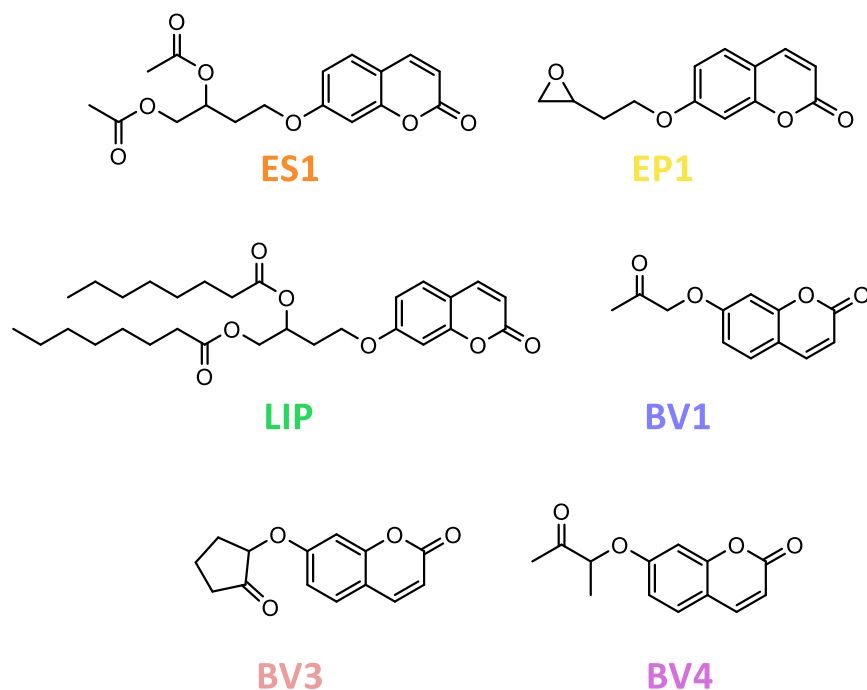


Figura 2- 10. Sondas fluorogénicas utilizadas en el ensayo HTS para detectar actividad esterasa (ES1), epoxidasa (EP1), lipasa (LIP) y Baeyer-Villiger monooxigenasa (BV1, BV3 y BV4).

Todos los microorganismos aislados fueron caracterizados enzimáticamente mediante HTS, con excepción de las bacterias *Bacillus* sp. (M9B1) y *Tsukamurella* sp. (M9B2) que no estaban aisladas en el momento de realizar el ensayo.

Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 2-6 a 2-9, donde se resaltan en color los resultados positivos. Del total de 13 bacterias a las que se le realizó el ensayo HTS con las sondas para la detección de BVMO (BV1, BV3 y BV4), 5 bacterias presentaron esta actividad enzimática detectándose con las 3 sondas fluorogénicas (Tabla 2-6). Los resultados más prometedores fueron obtenidos con las cepas de *Acinetobacter* sp. (M3Y) y *Proteus* sp. (M1E). Por otro lado, las bacterias identificadas como pertenecientes a la misma especie mostraron distintas actividades catalíticas, lo que sugiere que son cepas distintas (Tablas 2-6 y 2-8).

Respecto a los hongos filamentosos, todos mostraron actividad BVMO con excepción de *Aspergillus* sp. (Y6) (Tabla 2-7). No se detectó actividad BVMO en las dos levaduras aisladas.

Tabla 2- 6. Porcentaje de bioconversión de las sondas para BVMO con bacterias como biocatalizadores.

Bacteria	Denominación asignada	Porcentaje de bioconversión (%)								
		BV1			BV3			BV4		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<i>Citrobacter</i> sp.	M3W	4	12	17	1	5	9	3	7	8
<i>Citrobacter</i> sp.	M3Z	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter</i> sp.	M3U	0	0	1	0	0	1	0	1	1
<i>Proteus</i> sp.	M2A	16	28	36	7	13	18	8	9	9
<i>Proteus</i> sp.	M1E	14	31	46	7	16	24	6	9	10
<i>Proteus</i> sp.	M1/2D	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella</i> sp.	M3F	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Exiguobacterium</i> sp.	M3S	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>Acinetobacter</i> sp.	M3X1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Acinetobacter</i> sp.	M3Y	51	71	82	14	26	34	6	9	10
<i>Acinetobacter</i> sp.	M3T	15	27	33	8	14	17	6	9	9
<i>Bacillus</i> sp.	M3R	1	1	1	0	0	0	1	1	1
<i>Streptomyces</i> sp.	M9A	0	0	0	2	2	2	0	0	0

Tabla 2- 7. Porcentaje de bioconversión de las sondas para BVMO con hongos como biocatalizadores.

Hongo	DA*	Porcentaje de bioconversión (%)											
		BV1				BV3				BV4			
		24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
<i>Talaromyces</i> sp.	H5	0	1	13	27	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Fusarium</i> sp.	H6	4	8	10	11	2	6	4	2	2	3	2	1
<i>Mucor circinelloides</i>	Y2	0	10	20	23	0	2	5	5	0	1	5	4
<i>Fusarium</i> sp.	Y3	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	5	6
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	H3	0	0	1	1	0	0	0	0	4	4	5	6
<i>Trichoderma</i> sp.	Y5	0	2	13	20	0	0	12	15	0	1	4	5
<i>Aspergillus</i> sp.	Y6	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mucor circinelloides</i>	H4	0	1	2	3	1	3	6	6	0	1	0	2
<i>Rhodotorula</i> sp.	H2	0	1	2	-	0	0	0	-	0	0	0	-
No identificada	P2	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-

*DA: denominación asignada.

Respecto a la actividad hidrolasa, la actividad esterasa para ésteres de cadena corta es detectada con la sonda ES1, mientras que la hidrólisis de ésteres de cadena larga es detectada con la sonda LIP, referida dicha actividad como lipasa.

Al analizar cada bacteria individualmente se puede observar que los porcentajes de conversión obtenidos para la hidrólisis de ésteres de cadena larga, detectadas con la sonda LIP, son mayores que para los ésteres de cadena corta (Tabla 2-8).

Es remarcable que las bacterias pertenecientes al género *Proteus* (M2A, M1E y M1/2D) mostraron muy altos porcentajes de conversión (mayores al 90 %) en la hidrólisis de esteres de cadena larga.

Tabla 2- 8. Porcentaje de bioconversión de las sondas para epoxihidrolasas, esterases y lipasas con bacterias como biocatalizadores.

Bacteria	Denominación asignada	Porcentaje de bioconversión (%)								
		EP1			ES1			LIP		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<i>Citrobacter</i> sp.	M3W	0	0	0	2	3	4	57	67	70
<i>Citrobacter</i> sp.	M3Z	0	0	0	1	1	2	1	1	2
<i>Citrobacter</i> sp.	M3U	0	0	0	0	0	0	37	55	63
<i>Proteus</i> sp.	M2A	4	3	3	6	10	12	99	97	94
<i>Proteus</i> sp.	M1E	5	5	4	2	3	3	74	89	95
<i>Proteus</i> sp.	M1/2D	0	0	0	0	0	1	96	99	>99
<i>Klebsiella</i> sp.	M3F	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Exiguobacterium</i> sp.	M3S	2	3	4	0	0	0	0	1	1
<i>Acinetobacter</i> sp.	M3X1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acinetobacter</i> sp.	M3Y	7	5	3	42	59	65	36	43	45
<i>Acinetobacter</i> sp.	M3T	1	1	0	3	5	7	80	85	88
<i>Bacillus</i> sp.	M3R	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>Streptomyces</i> sp.	M9A	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 2- 9. Porcentaje de bioconversión de las sondas para epoxihidrolasas, esterases y lipasas con hongos como biocatalizadores.

Hongo	DA*	Porcentaje de bioconversión (%)											
		EP1				ES1				LIP			
		24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
<i>Talaromyces</i> sp.	H5	2	1	1	1	8	16	24	38	16	23	27	31
<i>Fusarium</i> sp.	H6	8	14	15	10	10	28	39	39	>99	>99	>99	>99
<i>Mucor circinelloides</i>	Y2	0	0	0	0	0	1	1	1	6	18	20	22
<i>Fusarium</i> sp.	Y3	5	4	4	4	12	20	29	37	>99	>99	>99	>99
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	H3	0	0	0	0	30	37	36	34	>99	>99	>99	>99
<i>Trichoderma</i> sp.	Y5	12	11	9	9	37	46	52	57	>99	>99	>99	>99
<i>Aspergillus</i> sp.	Y6	9	9	10	10	1	2	4	6	8	11	13	16
<i>Mucor circinelloides</i>	H4	5	5	4	4	25	36	48	59	>99	>99	>99	>99
<i>Rhodotorula</i> sp.	H2	0	0	0	-	24	41	44	-	40	61	69	-
No identificada	P2	0	0	0	-	0	0	1	-	0	1	2	-

*DA: denominación asignada.

Respecto a los hongos filamentosos, en todos se detectó actividad esterasa para esteres de cadena larga obteniéndose altos porcentajes de bioconversión de dicha sonda (LIP), desde 45 % a más de 99 %, lo cual es concordante con el hecho de que estos microorganismos fueron

aislados de un hábitat rico en lípidos y ésteres de ácidos grasos con esteroides, como fue explicado en la sección 2.1 (Tabla 2-9). Al igual que lo observado para las bacterias, los porcentajes de conversión obtenidos para la hidrólisis de ésteres de cadena larga, detectados con la sonda LIP, son mayores que para los ésteres de cadena corta para cada uno de los hongos. Los microorganismos pertenecientes a los géneros *Fusarium* (H6 e Y3) y *Trichoderma* (H3 e Y5) mostraron muy altos porcentajes de conversión con la sonda LIP, mayores al 99 %. Es interesante notar que una de las cepas pertenecientes a *Mucor circinelloides* (H4) también mostró un alto porcentaje, a diferencia de la otra cepa de *M. circinelloides* (Y2). Este resultado sugiere que se trata de cepas distintas, ya que las condiciones de ensayo fueron las mismas para todos los microorganismos en estudio.

En la levadura *Rhodotorula* sp. se detectó actividad esterasa para ésteres de largo de cadena variable, es decir, con las sondas ES1 y LIP.

Analizando los resultados en forma global, podemos afirmar que los microorganismos aislados son potenciales biocatalizadores para reacciones de hidrólisis de ésteres, y que estos presentan más afinidad por ésteres de cadena larga (Fig. 2-11 y 2-12). Esto era esperable ya que fueron aislados de un ambiente rico en esteroides, ácidos grasos libres y lanolina, como se discutió previamente en la sección 2.1 (Gutiérrez et al. 1999).

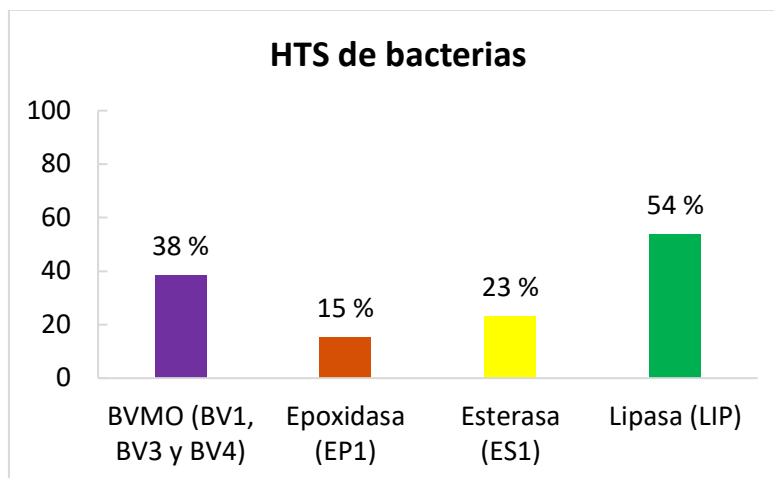


Figura 2- 11. Porcentajes de bacterias con actividad enzimática detectada sobre el total de bacterias evaluadas (13).

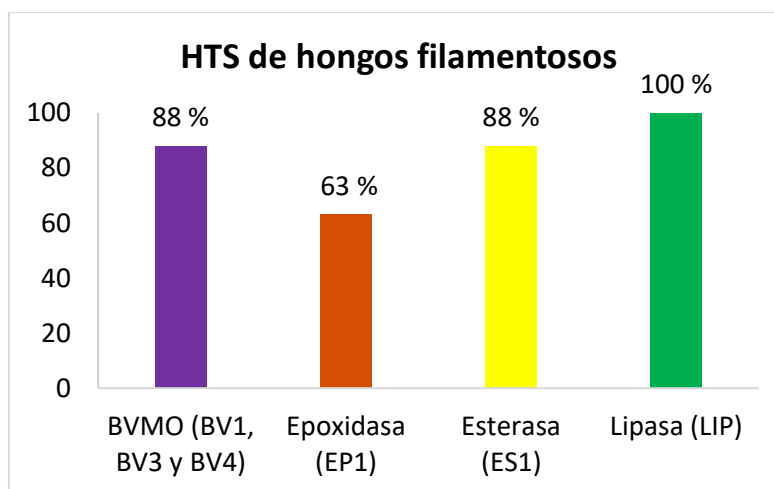


Figura 2- 12. Porcentajes de hongos filamentosos con actividad enzimática detectada sobre el total de los hongos filamentosos aislados (8).

Es importante destacar que este ensayo es un screening primario que permitió una rápida detección de actividades enzimáticas en las células enteras. Las sondas fluorogénicas utilizadas no son estructuralmente similares al colesterol por lo que las enzimas detectadas en los microorganismos en estudio pueden o no ser capaces de transformar dicho sustrato. Además, las actividades enzimáticas detectadas actúan sobre grupos funcionales que no se encuentran presentes en el colesterol, con excepción de las esterases y lipasas, las cuales podrían catalizar la esterificación del grupo alcohol en el carbono 3 del colesterol. Sin embargo, los productos

formados a partir de la conversión del colesterol podrían ser potenciales sustratos para estas actividades enzimáticas. A pesar de que el ensayo de HTS no es útil para la selección de los biocatalizadores a evaluar sobre la conversión del colesterol, es de gran importancia conocer las actividades enzimáticas presentes en los microorganismos aislados en el marco de esta tesis, ya que serán incluidos en la colección de microorganismos del LBB y podrán ser utilizados para futuros proyectos.

2.4. Biotransformación del colesterol

2.4.1. Screening primario de la biotransformación

Se realizó un screening primario para evaluar la capacidad de distintos microorganismos de biotransformar el colesterol a través de ensayos en medios de cultivo líquidos (TSB y PDB) con células en crecimiento. Los ensayos se realizaron con los 25 microorganismos aislados de los efluentes del lavadero de lana y con dos cepas pertenecientes a la colección del LBB. En estas cepas, *Rhodococcus* sp. y *Aspergillus terreus*, había sido demostrada actividad oxidasa sobre un sustrato no esteroidal (Rodríguez et al. 2006; García et al. 2009).

Los microorganismos pertenecientes a la colección del LBB y las dos levaduras aisladas no mostraron la capacidad de transformar el colesterol en las condiciones ensayadas. Del total de los microorganismos aislados, 4 bacterias y 5 hongos filamentosos mostraron la capacidad de transformar el sustrato en estudio. Los resultados son presentados en la figura 2-13.

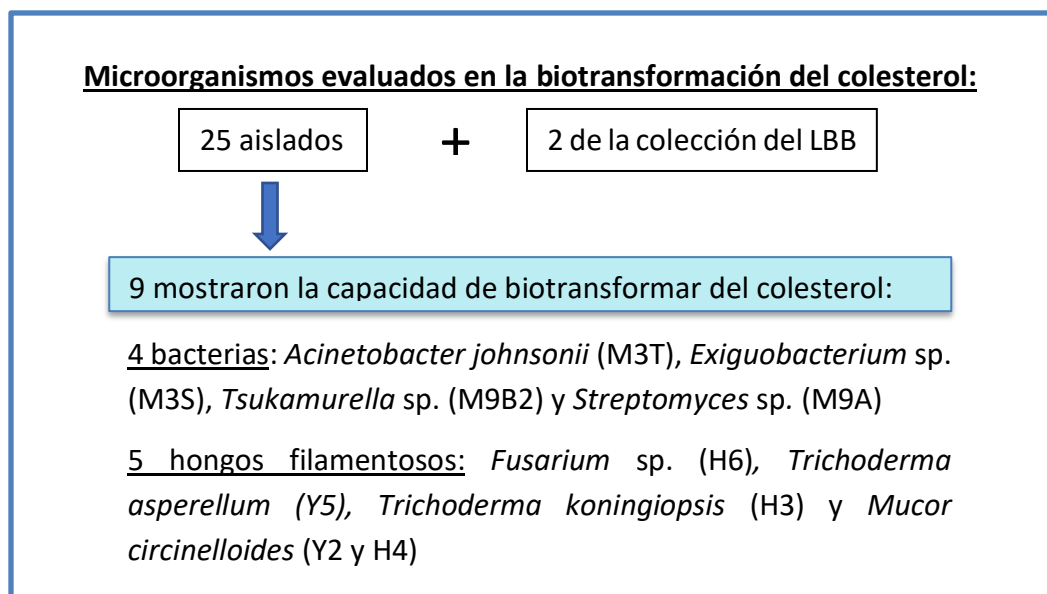


Figura 2- 13. Esquema general y resultados obtenidos en el screening primario de la biotransformación del colesterol.

Las cepas *Tsukamurella* sp. (M9B2) y *Streptomyces* sp. (M9A) fueron recuperadas en medios mínimos suplementados con colesterol, como fue discutido en la sección 2.1, por lo que su capacidad de metabolizar el colesterol era esperable. Sin embargo, en el ensayo de

transformación del colesterol con la otra bacteria recuperada del mismo medio, *Bacillus* sp. (M9B1), no se detectaron productos de transformación. Esto podría deberse a que las condiciones de reacción no fueron las adecuadas para obtener productos de transformación con esta cepa. El microorganismo, al crecer en un medio enriquecido (TSB) y tener otra fuente de carbono además del esteroles, puede ser que no metabolice este sustrato. Otra posibilidad es que esta cepa, al ser recuperada estuviera utilizando el Tween 80 (usado como dispersante del colesterol en el medio acuoso) en vez del colesterol como fuente de carbono.

Respecto a los hongos filamentosos, las cepas *Fusarium* sp. (H6), *Trichoderma asperellum* (Y5) y *Mucor circinelloides* (Y2) habían sido recuperadas utilizando medios mínimos suplementados con colesterol, como fue discutido en la sección 2.1. Otras cepas recuperadas en las mismas condiciones, *Fusarium* sp. (Y3) y *Aspergillus* sp. (Y6) no mostraron la capacidad de transformar el colesterol en las condiciones de este ensayo. Las posibles razones de esto son las mismas que las discutidas anteriormente en la biotransformación con la bacteria *Bacillus* sp. (M9B1).

Más de 1500 microorganismos han sido estudiados para la conversión de esteroides, encontrándose varios reportes donde la bioconversión es llevada a cabo por cepas pertenecientes al género *Streptomyces* (Gadda et al. 1997; Maclachlan et al. 2000; Donova 2007; Koshimura et al. 2010). Respecto al colesterol como sustrato de biotransformación, muchos estudios previos reportan la producción, purificación, caracterización y/o inmovilización de la enzima colesterol oxidasa proveniente de varias especies de *Streptomyces* (Lolekha and Jantaveesirirat 1992; Yue et al. 1999; Maclachlan et al. 2000; Chauhan et al. 2009; Li et al. 2010; Praveen and Srivastava 2011; Niwas et al. 2013, 2014; El-Naggar et al. 2016, 2017; Moradpour, Ghasemian 2016 y otros).

De la transformación de colesterol por el género *Acinetobacter*, existe un único reporte en el cual se demuestra la presencia de la enzima colesterol esterasa. Esta enzima fue purificada y evaluada en su capacidad para hidrolizar esteres del colesterol con ácidos grasos de cadena corta y larga, tanto saturados como insaturados (Por ej. acetato, palmitato, oleato, entre otros) (Du et al. 2010).

Respecto a la transformación de colesterol mediante representantes del género *Tsukamurella* existe un único reporte en el que se demuestra la capacidad de tres cepas de crecer en un medio

mínimo definido suplementado con colesterol como única fuente de carbono, y también con otros esteroides como ergosterol (Merino et al. 2013). Sin embargo, en ese estudio previo realizado por Merino y colaboradores no fueron caracterizados los productos de degradación obtenidos.

Hasta el momento, no hay reportes previos de la transformación del colesterol con representantes del género *Exiguobacterium*, por lo que este sería un nuevo biocatalizador para transformar el colesterol encontrado en el marco de esta tesis.

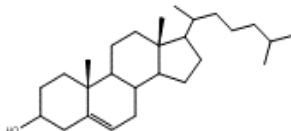
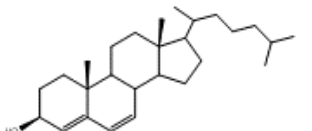
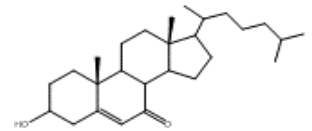
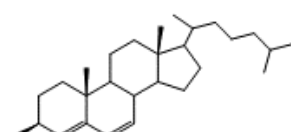
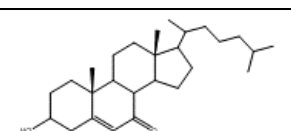
Con respecto a la biotransformación con hongos filamentosos, existen reportes de la transformación de varios sustratos esteroidales por cepas del género *Fusarium* (Kolek & Świzdor 1998; Cotillon & Morfin 1999; Kolek 1999; Sallam et al. 2005; Nassiri-Koopaei & Faramarzi 2015 y otros). Utilizando colesterol como sustrato, ha sido reportada la biotransformación con *Fusarium solani* obteniéndose colesteroona, 5-colesten-3-ona, 1,4-colestadien-3-ona, AD y ADD, como fue previamente mencionado en la sección 1.3.2.2 (Tablas 1-2 y 1-3) (Sallam et al. 2005). Por otro lado, existen reportes de la capacidad de diferentes cepas pertenecientes los géneros *Trichoderma* y *Mucor* de hidroxilar distintos sustratos esteroidales (El-Kadi & Eman Mostafa 2004; Bartmaska & Dmochowska-Gladysz 2007; Liu et al. 2007; Nassiri-Koopaei & Faramarzi 2015; Heidary & Habibi 2016). Además, 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas, enzima que cataliza la conversión reversible de 17-hidroxi a 17-ceto esteroides, fueron detectadas en varios hongos filamentosos, incluyendo *Fusarium lini*, *Trichoderma viride* y *Mucor spinosus*, entre otros (Lanisnik & Zakelj-Mavric 2000). Sin embargo, no hay estudios de la biotransformación del colesterol mediante microorganismos de los géneros *Mucor* y *Trichoderma*, por lo que los biocatalizadores *Trichoderma asperellum* (Y5), *Trichoderma koningiopsis* (H3) y *Mucor circinelloides* (Y2, H4) encontrados en el marco de esta tesis, son novedosos en la transformación del colesterol.

Los productos obtenidos en las reacciones de biotransformación por bacterias y hongos filamentosos durante 96 horas y 7 días respectivamente fueron detectados mediante TLC comparando con los controles correspondientes (sin sustrato y sin biocatalizador). Las posibles estructuras de los productos y modificaciones sobre el sustrato esteroide se presentan en las tablas 2-10 y 2-11, las cuales fueron propuestas en base al análisis del espectro de masa según

los patrones de fragmentación de esteroides y por comparación con los espectros de la base de datos NIST (Mass Spectrometry Data Center).

Los principales productos de biotransformación obtenidos involucran reacciones redox: deshidrogenación de enlaces C-C, oxidación de grupos hidroxilo, hidroxilaciones y epoxidaciones de alquenos (Tablas 2-10 y 2-11). Además, resulta importante destacar que las estructuras propuestas de los productos obtenidos con *Tsukamurella* sp. corresponden a reacciones de oxidación y degradación de la cadena lateral. Como se explicó en la sección 1.3.2.1, la degradación de la cadena lateral es uno de los procesos involucrados en el catabolismo del colesterol por actinobacteria. Considerando que esta bacteria utiliza el colesterol como fuente de carbono, los metabolitos detectados concuerdan con la ruta metabólica de degradación del colesterol.

Tabla 2- 10. Caracterización mediante GC-MS de productos obtenidos en la transformación del colesterol con bacterias (96 horas de reacción).

Microorganismo	Productos	tr (min)	M ⁺ (m/z)	Principales fragmentos m/z (% abundancia relativa)	Posible estructura o modificaciones propuestas
-	Sustrato Colesterol	11.4	386	386(55), 371(21), 368(31), 353(27), 301(59), 275(44), 273(23), 255(29), 231(24), 213(24), 199(20), 187(14), 178(19), 173(26), 161(45), 159(48), 145(70), 133(48), 129(20), 119(58), 107(83), 105(100)	
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (M3X1)	A1	9.4	366	366(60), 351(9), 253(22), 247(50), 171(11), 165(11), 157(16), 143(86), 131(37), 129(100), 119(52), 117(36), 107(25), 105(43)	
<i>Exiguobacterium</i> sp. (M3S)	E1	14.8	400	400(85), 367(38), 287(25), 245(18), 205(24), 192(83), 187(41), 174(24), 161(96), 157(14), 145(36), 135(100), 121(48), 107(93), 105(95)	
<i>Streptomyces</i> sp. (M9A)	S1	9.4	366	366(68), 351(3), 253(16), 247(37), 207(17), 171(110), 165(16), 171(8), 157(40), 149(26), 143(96), 135(61), 129(100), 117(62), 107(36), 105(77)	
	S2	13.4	402	402(5), 384(100), 369(6), 351(12), 251(8), 207(10), 161(13), 135(27), 121(15), 117(12), 107(41), 105(33)	introducción de un hidroxilo
	S3	14.6	400	400(96), 367(49), 287(25), 245(30), 227(22), 219(31), 205(27), 192(62), 187(55), 174(26), 161(78), 159(42), 147(30), 131(29), 121(46), 117(28), 107(100), 105(93)	

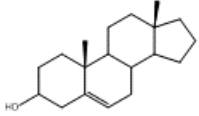
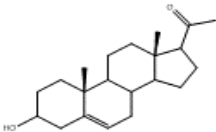
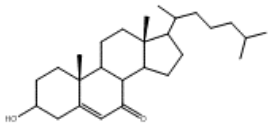
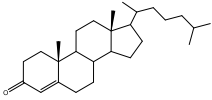
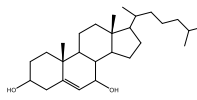
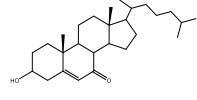
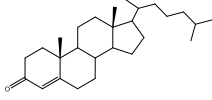
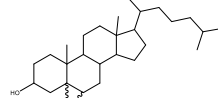
	S4	16.3	418	418(67), 400(40), 385(11), 372(19), 346(20), 332(16), 318(56), 303(29), 258(16), 245(30), 207(55), 197(22), 173(21), 165(30), 147(49), 135(54), 128(34), 121(30), 109(100), 105(65)	introducción de dos hidroxilos
<i>Tsukamurella</i> sp. (M9B2)	B1	6.8	274	274(23), 259(12), 256(14), 241(55), 189(26), 163(28), 145(31), 131(31), 119(38), 115(30), 107(59), 105(100)	
	B2	8.6	316	316(16), 298(11), 283(9), 265(5), 231(19), 187(11), 159(14), 145(20), 131(19), 129(15), 117(23), 107(30), 105(66), 91(100), 79(95)	
	B3	9.1	344	344(30), 326(10), 311(13), 273(11), 259(27), 233(27), 213(21), 173(13), 159(21), 145(36), 131(35), 121(23), 119(47), 107(53), 105(100)	no determinada
	B4	10.6	358	358(10), 325(5), 300(47), 282(17), 267(19), 253(13), 207(26), 189(23), 159(20), 145(20), 133(25), 121(28), 119(38), 107(43), 105(100)	no determinada
	B5	10.9	382	382(49), 367(5), 269(34), 251(15), 247(30), 199(15), 187(24), 161(20), 147(44), 143(28), 135(46), 131(53), 129(65), 122(32), 107(57), 105(100)	oxidación de hidroxilo a cetona y formación de un doble enlace
	B6	13.4	402	402(11), 384(24), 369(10), 273(17), 253(11), 197(15), 159(23), 147(17), 133(34), 121(20), 119(34), 107(59), 105(100)	introducción de un hidroxilo
	B7	14.6	400	400(83), 367(40), 287(22), 245(17), 205(29), 192(71), 187(43), 173(26), 161(75), 159(46), 145(34), 135(77), 121(44), 107(90), 105(100)	

Tabla 2- 11. Caracterización mediante GC-MS de productos obtenidos en la transformación del colesterol con hongos filamentosos.

Microorganismo	Productos	tr (min)	M ⁺ (m/z)	Principales fragmentos m/z (% abundancia relativa)	Posible estructura o modificaciones propuestas
<i>Fusarium</i> sp.(H6)	H6A	7.2	312	312(4), 297(1), 221(2), 207(29), 194(23), 179(5), 129(12), 117(100), 105(8), 103(9)	no determinada
	H6B	12.6	384	384(11), 369(3), 342(94), 261(11), 229(20), 187(6), 159(7), 147(19), 135(21), 135(210), 131(11), 124(100), 121(20), 107(28), 105(28)	
<i>Trichoderma asperellum</i> (Y5)	Y5A	7.8	300	300(9), 285(23), 272(4), 257(5), 215(7), 201(12), 187(19), 173(11), 159(23), 149(28), 145(24), 133(28), 119(35), 107(30), 105(58), 91(100)	no determinada
<i>Trichoderma koningiopsis</i> (H3)	H3A	12.6	402	402(25), 384(14), 369(8), 271(10), 247(11), 211(12), 175(15), 163(28), 159(21), 149(33), 145(28), 135(69), 123(77), 121(59), 117(27),	
	H3B	14.6	400	400(86), 382(6), 368(11), 367(34), 287(26), 245(18), 227(10), 192(61), 187(42), 173(77), 145(34), 133(42), 121(41), 119(39), 107(88),	
<i>Mucor circinelloides</i> (Y2)	Y2A	7.8	300	300(9), 285(24), 272(5), 257(5), 215(7), 201(3), 187(19), 161(13), 159(24), 149(27), 145(26), 133(31), 119(32), 107(32), 105(60), 91(100)	no determinada
	Y2B	12.6	384	402(3), 384(19), 370(7), 368(5), 342(6), 261(14), 229(18), 187(8), 157(11), 147(29), 133(26), 124(100), 119(21), 107(48), 105(43)	
<i>Mucor circinelloides</i> (H4)	H4A	15.9	402	402(50), 384(47), 369(27), 358(20), 271(27), 247(30), 120(100), 105(93).	

Los porcentajes de bioconversión fueron evaluados y son presentados en la tabla 2-12. Se evaluaron únicamente los porcentajes correspondientes a la obtención los productos mayoritarios obtenidos en cada una de las biotransformaciones. Se observaron muy bajos porcentajes de bioconversión en general (0.5-5.7 %), lo cual no permitió purificar todos los productos para su completa caracterización estructural. Sólo los productos mayoritarios obtenidos en las reacciones catalizadas por *Trichoderma koningiopsis* (H3) y *Mucor circinelloides* (H4 e Y2) pudieron ser aislados en cantidades suficientes para su elucidación mediante RMN, como se describe en la siguiente sección.

Tabla 2- 12. Porcentajes de bioconversión de los productos mayoritarios obtenidos en la transformación del colesterol.

Bacteria	Porcentaje de bioconversión (%)	Hongo filamentoso	Porcentaje de bioconversión (%)
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (M3X1)	0.2	<i>Fusarium</i> sp. (H6)	0.6
<i>Exiguobacterium</i> sp. (M3S)	0.1	<i>Trichoderma asperellum</i> (Y5)	0.5
<i>Streptomyces</i> sp. (M9A)	0.5	<i>Trichoderma koningiopsis</i> (H3)	0.5
<i>Tsukamurella</i> sp. (M9B2)	0.1	<i>Mucor circinelloides</i> (Y2)	2.5
		<i>Mucor circinelloides</i> (H4)	5.7

2.4.2. Elucidación estructural de los productos mayoritarios y estudio de su valor agregado respecto al colesterol

Los productos de biotransformación del colesterol que se lograron caracterizar por GC-MS y RMN fueron identificados como 7 β -hidroxicolesterol (II), colesteroona (III) y 5,6-epoxicolesterol (IV). Las estructuras de estos productos se presentan en la figura 2-14.

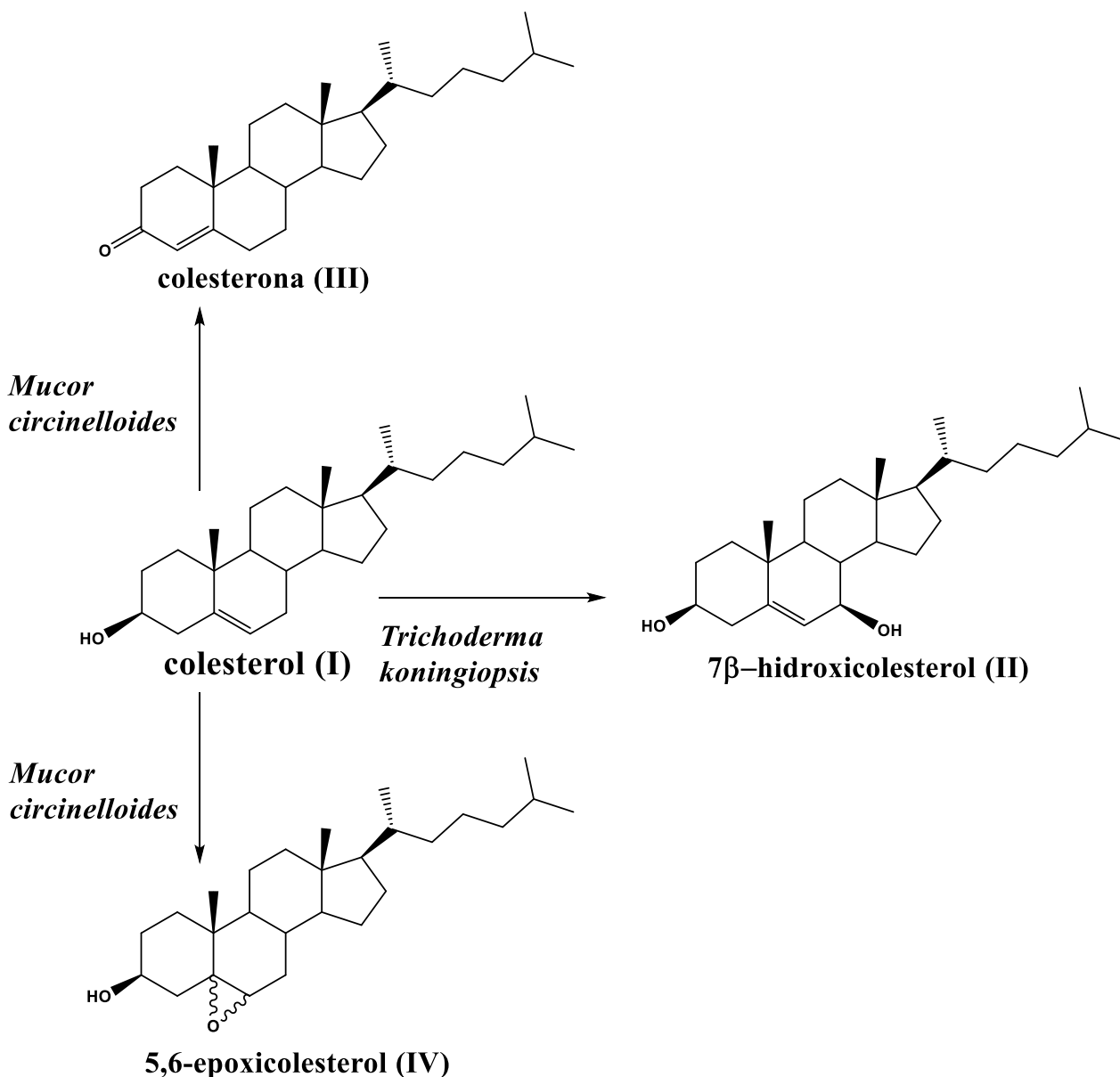


Figura 2- 14. Transformación del colesterol (I) a 7 β -hidroxicolesterol (II), colesteroona (III) y 5,6-epoxicolesterol (IV) catalizada por *Trichoderma koningiopsis* y dos cepas de *Mucor circinelloides* respectivamente.

Tabla 2- 13. Desplazamientos químicos (δ) y constates de acoplamiento (J) de las señales observadas en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de los productos de transformación 7 β -hidroxicoolesterol y colesteroona en CDCl_3 .

C	7 β -hidroxicoolesterol			Colesteroona		
	H posición	δH (ppm), multiplicidad y J	δC (ppm)	H posición	δH (ppm), multiplicidad y J	δC (ppm)
1	α	1.13 (m)	39.4	α	2.0 (m)	35.7
	β	2.02 (m)	-	β	2.03 (m)	-
2	α	1.52 (m)	31.6	α	2.24 (m)	34.0
	β	1.85 (m)	-	β	2.28 (m)	-
3	α	3.57 (m)	71.5	-	-	199.7
4	α	2.32 (m)	41.7	-	5.72 (s)	123.7
	β	2.32 (m)	-	-	-	-
5	-	-	143.5	-	-	171.8
6	-	5.31 (m)	125.4	α	2.35 (m)	34.0
	-	-	-	β	2.40 (m)	-
7	α	3.87 (bs)	72.4	α	1.00 (m)	32.0
	-	-	-	β	1.80 (m)	-
8	β	1.39 (m)	40.9	β	1.35 (m)	35.8
9	α	1.03 (m)	48.3	α	0.91 (m)	53.8
10	-	-	35.8	-	-	38.6
11	α	1.51 (m)	21.1	α	1.50 (m)	21.0
	β	1.51 (m)	-	β	1.42 (m)	-
12	α	1.01 (m)	36.2	α	2.01 (m)	39.6
	β	1.01 (m)	-	β	2.01 (m)	-
13	-	-	42.9	-	-	42.4
14	α	1.14 (m)	56.0	α	1.11 (m)	56.1
15	α	1.43 (m)	26.4	α	1.32 (m)	24.2
	β	1.81 (m)	-	β	1.61 (m)	-
16	α	1.28 (m)	28.6	α	1.50 (m)	28.0
	β	1.31 (m)	-	β	1.86 (m)	-
17	α	1.40 (m)	55.4	α	1.01 (m)	55.9
18	-	0.69 (s)	11.8	-	0.71 (s)	11.9
19	-	1.07 (s)	19.2	-	1.18 (s)	17.4
20	β	1.35 (m)	35.7	β	1.00 (m)	36.1
21	-	0.92 (d, J= 6.5 Hz)	18.8	-	0.91 (d, J=6.7 Hz)	18.6
22	α	1.05 (m)	36.5	α	1.51 (m)	35.6
	β	1.86 (m)	-	β	1.69 (m)	-
23	α	1.14 (m)	23.8	α	1.12 (m)	23.8
	β	1.33 (m)	-	β	1.12 (m)	-
24	α	1.13 (m)	39.5	α	1.11 (m)	39.6
	β	1.13 (m)	-	β	1.11 (m)	-
25	-	1.44 (m)	28.0	-	1.50 (m)	28.2
26	-	0.86 (d, J=6.6 Hz)	22.8	-	0.86 (d, J=6.6 Hz)	22.5
27	-	0.87 (d, J=6.6 Hz)	22.6	-	0.87 (d, J=6.6 Hz)	22.8

La reacción de transformación del colesterol con *Trichoderma koningiopsis* (H3) llevo a la obtención de 7 β -hidroxicolesterol (C₂₇H₄₆O₂) (II, 0.5 %) como producto mayoritario (Fig. 2-14). Las señales de ¹H y ¹³C del RMN se presentan en la tabla 2-13 (espectros en anexo III), y el espectro de ¹H RMN con las señales asignadas es presentado en la figura 2-15. El espectro de masas del producto II mostró un pico correspondiente al ion molecular en m/z 402, lo cual sugiere que fue incorporado un átomo de oxígeno a la estructura del colesterol (Tabla 2-14). El espectro de ¹H RMN mostró una nueva señal en comparación con el espectro del sustrato (espectros en anexo III): un singulete ancho en δ 3.87 ppm correspondiente al protón base del nuevo hidroxilo (H-7) indicando la hidroxilación del colesterol. También se observa un multiplete a δ 3.57 ppm, con integración 1, correspondiente a H3 y un multiplete a δ 5.31 ppm, con integración 1, asignado al protón vinílico en C6. En el espectro de ¹³C RMN se observa la presencia de señales a δ 71.4 ppm y δ 73.4 ppm correspondientes a los carbonos unidos a los dos grupos hidroxilos. El espectro de COSY mostró correlaciones entre H6 y H7, lo cual evidencia la posición del nuevo grupo hidroxilo introducido en C7. Estos resultados son coincidentes con las asignaciones y datos espectroscópicos reportados en bibliografía (Xiangdong et al. 2016). Debido a que la señal correspondiente al protón en C7 se observa como un singulete ancho en el espectro de ¹H RMN en CDCl₃, no se pueden determinar las constantes de acoplamiento de este protón con sus protones vecinos. Para determinar estas constantes y así poder conocer la orientación del nuevo grupo hidroxilo en C7 se realizó el espectro de protón y un experimento de desacoplamiento homonuclear usando metanol deuterado (MeOD) como solvente. Como el protón en C7 presenta acoplamiento con el protón del grupo hidroxilo, al utilizar MeOD como solvente se favorece el intercambio de dicho protón con el deuterio, logrando así disminuir el acoplamiento, y la señal cambia su forma de singulete ancho a doblete de tripletes (dt) (Fig. 2-16 A). Al realizar el desacoplamiento homonuclear se irradió a la frecuencia correspondiente al otro protón que acopla con H7: el protón vinílico a δ 5.27 ppm correspondiente a H6. Así se logró eliminar el acoplamiento entre H6 y H7, generando que la señal de H7 se colapse y el doblete de tripletes (dt) observado a δ 3.74 ppm (H-7) en el espectro de protón en MeOD se transforme en un doblete de dobletes (dd). Este protón presenta dos acoplamientos, uno chico correspondiente a un acople a larga distancia (J= 2.0 Hz) y uno más grande correspondiente al

acoplamiento entre H7 y H8 ($J = 8.2$ Hz) (Fig. 2-16 A y B). La determinación de la constante de acoplamiento (J) entre H7 y H8 nos permite conocer la orientación de H7 (ya que la de H8 es definida desde el sustrato de partida), y por tanto la del nuevo hidroxilo. La J observada para H-8 β /H-7 fue 8.2 Hz, demostrando que H-8 β y H-7 tienen una relación axial *trans* entre ellos (Fig. 2-16 C). Este valor de J indica que H7 está en orientación α , evidenciando que la orientación del nuevo grupo hidroxilo en C7 es β .

Tabla 2- 14. Datos de espectroscopia de masa (MS) de los productos 7 β -hidroxicolesterol, colesterona y 5,6-epoxicolesterol.

Producto	MS (EI, 70 eV) m/z (% abundancia relativa)
7 β -hidroxicolesterol	402(M ⁺ , 25), 384(14), 369(8), 273(4), 271(10), 247(11), 229(10), 213(5), 211(12), 175(15), 163(28), 159(21), 149(33), 147(27), 145(28), 135(69), 123(77), 121(59), 117(27), 107(99), 105(100).
Colesterona	384(M ⁺ , 19), 370(7), 368(5), 257(3), 342(6), 261(14), 231(2), 229(18), 213(4), 187(8), 157(11), 147(29), 145(14), 133(26), 124(100), 119(21), 107(48), 105(43).
5,6-epoxicolesterol	402(M ⁺ , 50), 384(47), 369(27), 358(20), 271(27), 247(30), 120(100), 105(93).

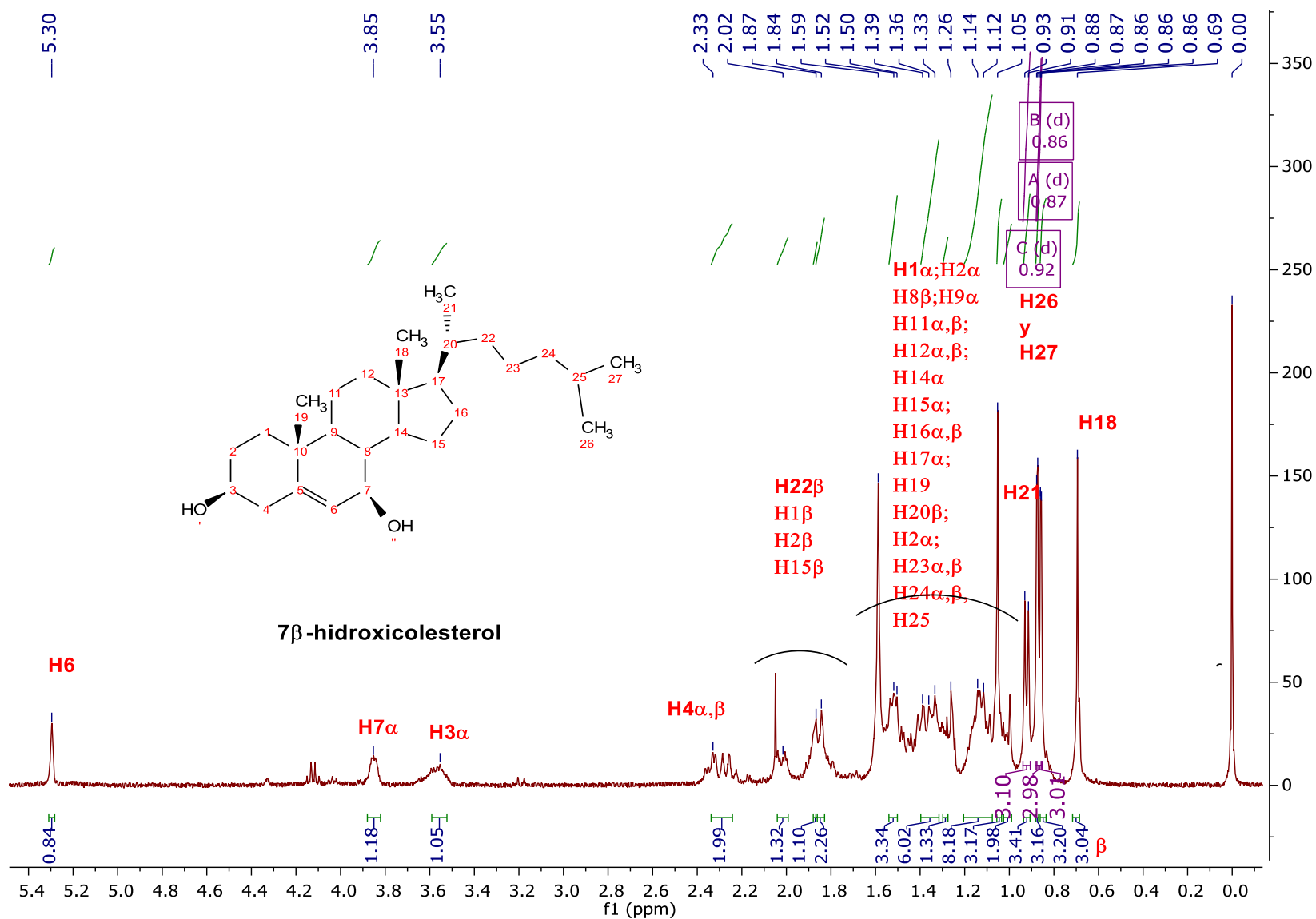


Figura 2- 15. Asignaciones en el espectro de ^1H RMN del producto 7β-hidroxicolesterol.

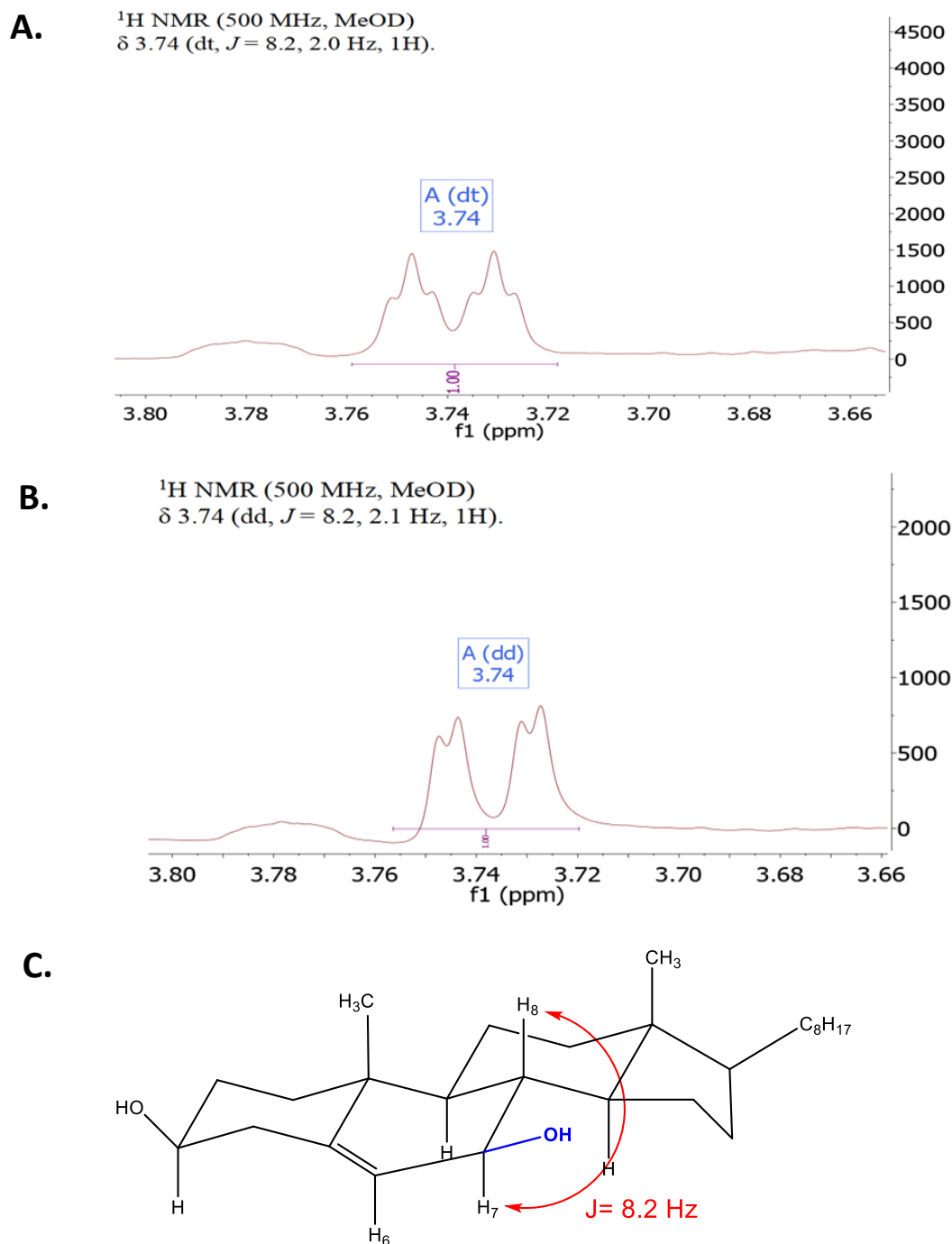


Figura 2- 16. Espectros de 7 β -hidroxicolesterol en MeOD **A)** Señal de H7 en el espectro de protón. **B)** Señal de H7 en el espectro de ^1H NMR desacoplando a 5.27 ppm (señal de H6). **C)** Representación de la estructura de 7 β -hidroxicolesterol mostrando el acoplamiento axial *trans* entre H7-H8 β .

La biotransformación del colesterol catalizada por *Mucor circinelloides* (Y2) llevó a la formación de colesteroona ($C_{27}H_{44}O$) (**III**) (2.5%) como producto mayoritario (Fig. 2-14). Las señales de los espectros de RMN 1H y ^{13}C se presentan en la tabla 2-13 (espectros en anexo III). El espectro de masas de este producto mostró un ion molecular a m/z 384, el cual sugiere la pérdida de dos átomos de hidrogeno en la estructura del colesterol (Tabla 2-14). Además, se observan iones característicos de la fragmentación de 3-cetoesteroides α,β -insaturados (Brown & Djerassi 1980). En el espectro de RMN de 1H y ^{13}C no se observan las señales correspondientes al grupo hidroxilo del colesterol (δ 3.53 y 71.8 ppm) (espectros en anexo III). En el espectro de ^{13}C se observa una nueva señal de carbono a δ 199.7 ppm (en comparación con el espectro del colesterol), la cual corresponde a un carbono carbonílico. Esto indica la oxidación del grupo hidroxilo en C3 convirtiéndose en un grupo cetona. En el espectro de 1H del colesterol se observa la señal en δ 5.37 ppm correspondiente al protón vinílico en C6 como un triplete, por su correlación con H4 y H7 (α y β) (espectro en anexo III). En el espectro del producto obtenido esta señal difiere en forma y desplazamiento químico, encontrándose como un singulete a δ 5.72 ppm, lo cual confirma la isomerización del doble enlace desde C5 a C4. La presencia del grupo carbonilo en C3 genera que el protón vinílico adyacente en C4 se encuentre menos apantallado, corriéndose así la señal a un mayor desplazamiento químico. Además se observa como un singulete ya que los carbonos adyacentes a C4, es decir C3 y C5, no presentan protones. Los datos espectroscópicos de MS, 1H y ^{13}C de este producto son concordantes con lo reportado en bibliografía (Brown & Djerassi 1980; Liu et al. 2011; Wu et al. 2015).

Por otro lado, el producto obtenido con la otra cepa de *Mucor circinelloides* (H4) fue identificado como 5,6-epoxicolesterol ($C_{27}H_{44}O_2$) (**IV**) (5.6 %) (Fig. 2-14). Este producto fue obtenido como una mezcla de los 5,6-epóxidos α y β . El espectro de masas muestra un ion molecular a m/z 402, lo cual sugiere que fue incorporado un átomo de oxígeno a la estructura del colesterol (Tabla 2-14). Las señales de los espectros de RMN 1H y ^{13}C se presentan en la tabla 2-15 (espectros en anexo III). Los diastereoisómeros del epóxido muestran desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento diferentes en varias señales de los espectros de RMN, lo que permite distinguir los epóxidos entre ellos. Los datos obtenidos son concordantes con los datos espectroscópicos reportados en bibliografía (Soto-Castro et al. 2017). La señal correspondiente al protón en C3

varía en su desplazamiento químico en los diastereoisómeros, apareciendo en δ 3.69 ppm en 5,6 β - epoxicolesterol y δ 3.90 ppm en 5,6 α - epoxicolesterol. Por otro lado, la señal correspondiente al protón en C6 aparece como un doblete a δ 3.06 ppm con $J = 2.0$ Hz y es concordante con lo reportado para 5,6 β - epoxicolesterol (Soto-Castro et al. 2017). Mientras que la señal correspondiente a este protón en el 5,6 α - epoxicolesterol se presenta como un doblete a δ 2.90 ppm con $J = 4.4$ Hz. Además, la señal correspondiente a los protones del metilo presente en C19 también varía según el diastereoisómero, presentándose en δ 0.99 ppm en el espectro de 5,6 β - y en 1.06 ppm en el del 5,6 α - epoxicolesterol. Si la señal correspondiente a H6 se integra con valor 1 (ya que corresponde a un solo protón) en el espectro para uno de los epóxidos, se puede determinar cuánto integra la señal correspondiente a ese mismo protón en el otro epóxido y así conocer la relación que hay entre los diastereoisómeros en la mezcla obtenida. Así, se puede afirmar que el 5,6 α -epoxicolesterol es el mayoritario en la mezcla, y que se obtuvo una relación 3:1 de los epóxidos α : β .

Tabla 2- 15. Desplazamientos químicos (δ) y constates de acoplamiento (J) de las señales observadas en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de los productos de transformación 5 β ,6 β -epoxicolesterol y 5 α ,6 α -epoxicolesterol en CDCl_3 .

C	5 β ,6 β -epoxicolesterol			5 α ,6 α -epoxicolesterol		
	H position	δH (ppm), multiplicidad y J	δC (ppm)	H position	δH (ppm), multiplicidad y J	δC (ppm)
1	α	1.36 (m)	32.4	α	1.36 (m)	32.4
	β	1.68 (m)	-	β	1.68 (m)	-
2	α	1.50 (m)	28.8	α	1.50 (m)	28.8
	β	1.91 (m)	-	β	1.91 (m)	-
3	α	3.69 (m)	69.5	α	3.90 (m)	68.8
4	α	1.95 (m)	39.4	α	1.95 (m)	39.4
	β	1.95 (m)	-	β	1.95 (m)	-
5	-	-	63.0	-	-	65.7
6	α	3.06 (d, J=2.0Hz)	63.8	β	2.90 (d, J=4.4Hz)	59.3
7	α	1.60 (m)	31.1	α	1.60 (m)	31.1
	β	1.91 (m)	-	β	1.91 (m)	-
8	β	1.36 (m)	29.9	β	1.36 (m)	29.9
9	α	1.24 (m)	42.6	α	1.24 (m)	42.6
10	-	-	34.9	-	-	34.9
11	α	1.36 (m)	20.7	α	1.36 (m)	20.7
	β	1.25 (m)	-	β	1.25 (m)	-
12	α	2.07 (m)	39.9	α	2.07 (m)	39.9
	β	2.07 (m)	-	β	2.07 (m)	-
13	-	-	42.4	-	-	42.4
14	α	1.05 (m)	55.9	α	1.05 (m)	55.9
15	α	1.43 (m)	24.1	α	1.43 (m)	24.1
	β	1.81 (m)	-	β	1.81 (m)	-
16	α	1.23 (m)	28.1	α	1.23 (m)	28.1
	β	1.81 (m)	-	β	1.81 (m)	-
17	α	0.95 (m)	56.9	α	0.95 (m)	56.9
18	-	0.61 (s)	11.9	-	0.61 (s)	11.9
19	-	0.99 (s)	17.1	-	1.06 (s)	16.0
20	β	1.32 (m)	35.8	β	1.32 (m)	35.8
21	-	0.89 (d, J= 6.5Hz)	18.7	-	0.89 (d, J= 6.5Hz)	18.7
22	α	0.97 (m)	36.1	α	0.97 (m)	36.1
	β	1.32 (m)	-	β	1.32 (m)	-
23	α	1.12 (m)	23.9	α	1.12 (m)	23.9
	β	1.31 (m)	-	β	1.31 (m)	-
24	α	1.11 (m)	39.4	α	1.11 (m)	39.4
	β	1.11 (m)	-	β	1.11 (m)	-
25	-	1.50 (m)	28.0	-	1.50 (m)	28.0
26	-	0.86 (d, J=6.6Hz)	22.6	-	0.86 (d, J=6.6Hz)	22.6
27	-	0.86 (d, J=6.6Hz)	22.8	-	0.86 (d, J=6.6Hz)	22.8

Como se discutió previamente en la sección 2.4.1, aunque no hay reportes del uso de hongos pertenecientes a los géneros *Trichoderma* y *Mucor* para la biotransformación del colesterol, sí existen trabajos en los que se reporta la capacidad de hidroxilar otros sustratos esteroidales por parte de diferentes cepas pertenecientes a estos géneros (El-Kadi & Eman Mostafa 2004; Bartmaska & Dmochowska-Gladysz 2007; Liu et al. 2007; Nassiri-Koopaei & Faramarzi 2015; Heidary & Habibi 2016). Según los resultados reportados en investigaciones previas, las hidroxilaciones serían la biotransformación más común en la conversión de esteroides por parte de representantes del género *Mucor* (Li et al. 2005; Lamm et al. 2007; Faramarzi et al. 2008; Torshabi et al. 2011; Wang et al. 2013 y otros). Sin embargo, los productos de biotransformación del colesterol por las cepas de *Mucor circinelloides* encontrados en este estudio, colesterona y 5,6-epoxicolesterol, no son derivados hidroxilados del colesterol.

Por otro lado, la hidroxilación de distintos esteroides por varias especies de *Trichoderma* ha sido previamente reportada, pero hasta el momento no había sido reportada la hidroxilación en el carbono 7 del núcleo esteroide por parte de hongos de este género (El-Kadi & Eman Mostafa 2004; Bartmaska & Dmochowska-Gladysz 2007). Por tanto, la biotransformación del colesterol por parte de cepas pertenecientes a los géneros *Mucor* y *Trichoderma* para obtener colesterona, 5,6-epoxicolesterol y 7 β -hidroxicolesterol fue reportada por primera vez como resultado de esta tesis (Giorgi et al. 2019).

Respecto al valor comercial de los productos caracterizados, todos son de mayor valor agregado que el sustrato de partida, como se muestra en la tabla 2-16. El precio del colesterol por gramo varía entre USD 0.4 a 9.6 (precios de Sigma Aldrich®) según la cantidad de la presentación comercial y la pureza del mismo. En Sigma Aldrich®, el colesterol de menor precio es el obtenido desde la lana de oveja con un porcentaje de pureza mayor o igual a 92.5 %, el cual se vende en varias cantidades siendo la más barata la presentación de 5 kg, valiendo así USD 0.4 el gramo de colesterol. El colesterol de más alta pureza (≥ 99 %) se puede comprar a USD 9.6 el gramo. Todos los productos de biotransformación del colesterol caracterizados en esta tesis son de mayor valor comercial que el sustrato de partida, siendo el 7 β -hidroxicolesterol el de mayor precio por gramo, valiendo aproximadamente diez mil veces más que el colesterol. Además, en la tabla 2-16 se muestra la importancia de los productos obtenidos desde el punto de vista de

sus efectos biológicos evidenciados por los estudios reportados y la utilidad de estos como precursores de síntesis e intermediarios para la obtención de otros compuestos con actividad farmacológica.

Tabla 2- 16. Precio, cantidad por presentación, pureza, efectos biológicos y utilidad de los productos obtenidos en la biotransformación del colesterol por *Trichoderma koningiopsis* (H3) y *Mucor circinelloides* (H4 e Y2).

Producto	Precio, cantidad por presentación y pureza del producto en venta en Sigma Aldrich® ¹	Precio por gramo (USD) ²	Efectos biológicos y/o utilidad	Referencias
7β-hidroxicolesterol	USD 973, 10 mg, ≥ 95%	97300	Efectos citotóxicos sobre células tumorales.	(Ryan et al. 2005; Lordan et al. 2008; Carvalho et al. 2009, 2010; Olkkonen et al. 2012; Nury et al. 2013)
Colesterona	USD 158, 10 g, ≥ 98%	15.8	Control de la obesidad; tratamiento de enfermedades hepáticas, evitar la queratinización de la piel; precursor para síntesis de intermediarios y productos farmacéuticos.	(Suzuki 1993; Hisao & Taku 1995; Kashima et al. 1995; Suzuki et al. 1998; Bordet et al. 2006; Shao et al. 2014)
5α/6α-epoxicolesterol	USD 85, 50 mg, ≥ 80%	1700	Precursor para síntesis de derivados con efectos citotóxicos sobre células tumorales. Intermediario para síntesis en la industria química y farmacéutica (antiinflamatorios, anticonceptivos, inhibidores enzimáticos).	(Carvalho et al. 2009; De Medina et al. 2009; Soto-Castro et al. 2017)
5β/6β-epoxicolesterol	USD 271, 50 mg, ≥ 98% (no disponible actualmente)	5420	Efectos citotóxicos. Precursor para síntesis de derivados con efectos citotóxicos sobre células tumorales.	(Ryan et al. 2005; Lordan et al. 2008; Carvalho et al. 2009; Olkkonen et al. 2012)

¹Datos obtenidos de la página web de Sigma-Aldrich® (<https://www.sigmaaldrich.com>)

²Precio por gramo estimado según el valor comercial de la presentación de mayor tamaño.

Cabe destacar que los estereoisómeros del 5,6-epoxicolesterol se venden puros, pero existen aplicaciones en las que se utiliza la mezcla racémica como precursor para la síntesis de 5 α -hidroxi-6 β -aminoalquilesteroles, algunos de los cuales se ha demostrado que son promisorios para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer o enfermedades neurodegenerativas (De Medina et al. 2009; Soto-Castro et al. 2017). Además, como explica Carvalho et al. (2009), la mezcla racémica del epóxido se podría discriminar mediante la hidrólisis estereoselectiva del epóxido utilizando enzimas epóxido hidrolasas, o utilizando lipasas que catalicen la esterificación selectiva del grupo hidroxilo en C3 de forma estereoselectiva para uno de los epóxidos de la mezcla de diastereoisómeros (Carvalho et al. 2009). Posteriormente, pueden ser utilizadas lipasas que hidrolicen el éster formado, obteniéndose nuevamente el hidroxilo en C3 en el epóxido puro (Carvalho et al. 2009).

2.4.3. Estudio de la biotransformación del colesterol con *Tsukamurella* sp.

Como se explicó anteriormente en la sección 2.4.1, las posibles estructuras de los productos de biotransformación del colesterol con *Tsukamurella* sp. son concordantes con los metabolitos de degradación bacteriana del colesterol, explicados en detalle en la sección 1.3.2.1. Considerando que el aislamiento de este microorganismo se realizó en un medio mínimo M9 suplementado con colesterol como única fuente de carbono y energía pero con el agregado de Tween 80 como agente dispersante, se realizaron cultivos en placa de medio mínimo sólido M9 (Anexo I) suplementado con colesterol 0.1% (sin Tween 80) y con Tween 80 1 % (sin colesterol). Estos ensayos confirmaron que *Tsukamurella* sp. efectivamente utiliza el colesterol como fuente de carbono, y también es capaz de utilizar Tween 80. Por otro lado, *Tsukamurella* sp. sería un nuevo biocatalizador para la transformación de esteroides encontrado en el marco de esta tesis, a diferencia de la otra bacteria aislada desde medio mínimo suplementado con colesterol (*Streptomyces* sp.).

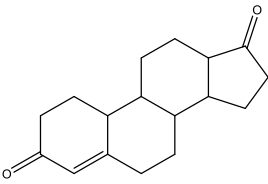
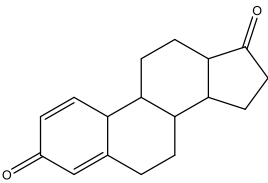
Teniendo en cuenta estos resultados y observaciones resultó interesante continuar trabajando con esta bacteria en la biotransformación del colesterol. Por esto, se probaron distintas condiciones del ensayo de biotransformación con el fin de obtener productos de valor agregado, como los conocidos androstendiona (AD) y androstenediona (ADD) que son valiosos

intermediarios de síntesis de un amplio rango de esteroides como andrógenos, estrógenos, glucocorticoides, progestágenos y mineralocorticoides (Shao et al. 2014). Para esto, se realizó el ensayo de biotransformación del colesterol con *Tsukamurella* sp. con diferentes tiempos de agregado de sustrato y tiempos de reacción; planteando la hipótesis de que menor tiempo de reacción podría resultar en una menor degradación del sustrato. Por tanto, se realizaron ensayos con las siguientes variables:

- A)** Agregado de sustrato a las 24 h; tiempo de reacción 48 h
- B)** Agregado de sustrato a las 24 h; tiempo de reacción 72 h
- C)** Agregado de sustrato a las 48 h; tiempo de reacción 48 h

Luego de fraccionar el extracto obtenido (mediante VLC), y concentrar las fracciones, estas fueron analizadas por GC-MS. En el ensayo con 72 h de reacción (B) no fueron caracterizados productos distintos a los obtenidos en el ensayo con 96 horas de reacción realizado anteriormente (resultados presentados en la tabla 2-10). En los ensayos con 48 h de reacción (A y C), se detectaron algunos productos distintos a los caracterizados en la reacción llevada a cabo por 96 horas, los cuales fueron presentados en la tabla 2-10. Dentro de los productos obtenidos, se distinguen las posibles estructuras de AD y ADD, como se muestra en la tabla 2-17. A pesar de no haber obtenido cantidades suficientes para su elucidación estructural completa, la comparación de los espectros de masa obtenidos con los depositados en las bases de datos NIST (Mass Spectrometry Data Center) y Spectral Database for Organic Compounds (<https://sdbs.db.aist.go.jp>- National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) permitió identificar las estructuras de AD y ADD. Además, se comparó con el estándar de AD, el cual presenta un tiempo de retención de 8.5 min en las mismas condiciones de análisis, y su espectro presenta la misma fragmentación que uno de los productos, confirmando que este producto es AD.

Tabla 2- 17. Caracterización por GC-MS de productos obtenidos en la transformación del colesterol con *Tsukamurella* sp. en 48 horas de reacción (ensayos A y C).

tr (min)	M+ (m/z)	Principales fragmentos m/z (% abundancia relativa)	Posible producto o modificaciones propuestas
8.5	286	286(50), 244(30), 201(16), 173(12), 162(12), 159(13), 150(23), 149(26), 148(44), 147(16), 145(27), 133(24), 131(27), 125(11), 124(100), 123(30), 122(20), 121(28), 119(34), 109(54), 107(62), 105(76)	 Androstenediona (AD)
8.6	284	284(4), 267(1), 266(1), 253(1), 207(2), 171(2), 163(2), 161(1), 160(3), 159(9), 150(4), 149(4), 147(3), 145(4), 141(3), 135(6), 134(6), 133(6), 131(4), 128(4), 123(10), 122(100), 121(20), 108(11), 107(14), 105(13)	 Androstendiendiona (ADD)
12.2	382	382(25), 269(10), 187(23), 175(18), 174(10), 173(16), 161(40), 159(37), 157(7), 147(10), 145(15), 141(7), 135(11), 134(21), 133(14), 131(11), 119(30), 117(13), 115(9), 109(11), 107(25), 103(30)	Oxidación de hidroxilo a cetona y formación de un doble enlace

Por otro lado, se realizaron ensayos en medio mínimo M9 con colesterol como única fuente de carbono y energía (agregado en Tween 80 como agente dispersante) y ensayos con células en reposo. En el análisis por TLC de los resultados obtenidos en estos ensayos no se detectaron productos de conversión.

Como se discutió en la sección 2.4.1, si bien existe una investigación previa en la que se reporta la capacidad de utilizar colesterol como fuente de carbono por parte de *Tsukamurella* sp., en ese estudio no fueron detectados los metabolitos producidos en la degradación (Merino et al. 2013). Por lo tanto, el presente trabajo es el primer estudio en el que se caracterizan productos de biotransformación del colesterol por parte de una bacteria perteneciente al género *Tsukamurella*.

2.5. Biotransformación de fitoesteros

Los fitoesteros como estigmaesterol, β -sitoesterol y campesterol, se han convertido en importantes materiales de partida para la producción de intermediarios de esteroides incluyendo AD y ADD (Malaviya & Gomes 2008). Actualmente existen algunas industrias farmacéuticas que utilizan fitoesteros como sustratos para la obtención de AD mediante biotransformaciones (Fernandes & Cabral 2010). Estos pueden ser sustratos rentables desde el punto de vista económico debido a la posibilidad de aislar mezclas de fitoesteros desde varias fuentes baratas como materiales y/o desechos vegetales, los cuales pueden ser residuos industriales (Malaviya & Gomes 2008).

Teniendo en cuenta esto, resultó atractivo investigar la posibilidad de biotransformar fitoesteros por parte de los microorganismos previamente seleccionados por su capacidad de biotransformar el colesterol. Los ensayos se realizaron con una mezcla de fitoesteros que contiene β -sitoesterol ($\geq 40\%$) como componente mayoritario, campesterol y estigmaesterol (Fig. 2-17).

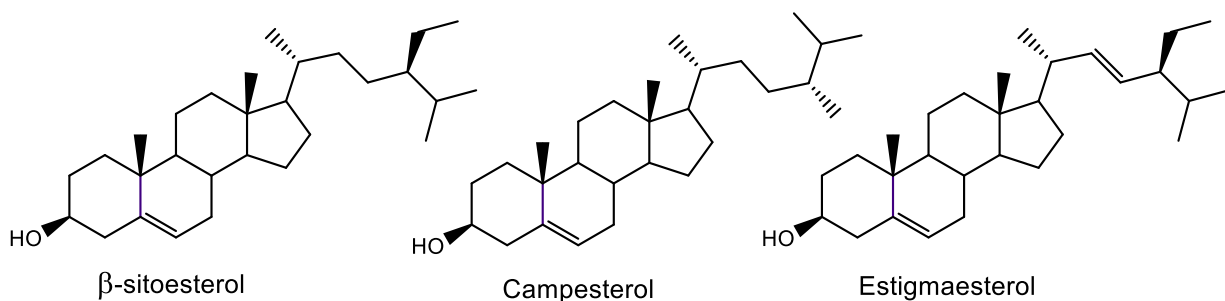


Figura 2- 17. Fitoesteros utilizados como sustratos en la biotransformación.

Estos fueron realizados en las mismas condiciones que el screening primario de transformación del colesterol, y los resultados fueron analizados mediante TLC y GC-MS comparando con los controles correspondientes (sin sustrato y sin biocatalizador). No se detectaron productos de biotransformación de este sustrato. Esto puede deberse a que los microorganismos evaluados como biocatalizadores fueron aislados de efluentes de lavado de lana, los cuales son una fuente rica en esteroides de origen animal (lanosterol y colesterol mayoritariamente). Por tanto, si bien los sustratos estudiados pertenecen al mismo grupo de productos naturales, sus estructuras

son diferentes y la fuente de obtención de los biocatalizadores puede no ser la adecuada para el aislamiento de microorganismos capaces de transformar fitoesteroides. A su vez, otra posible causa de los resultados obtenidos es la baja solubilidad de los fitoesteroides en medio acuoso. Esto limita la disponibilidad del sustrato al biocatalizador, lo que puede resultar en un bajo rendimiento del producto formado (Malaviya & Gomes 2008). Considerando esto, sería necesario probar otras concentraciones del agente dispersante utilizado en este ensayo (Tween 80) u otras estrategias para superar esta limitante.

2.6. Biotransformación de ácidos biliares

Como fue explicado en la sección 1.2.3. los ácidos biliares representan un posible material de partida atractivo para la industria farmacéutica. Debido a esto, se evaluó la capacidad de transformar los ácidos litocólico y cólico (Fig. 1-6) por parte de las bacterias seleccionadas por su capacidad de convertir el colesterol: *Exiguobacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Streptomyces* sp. y *Tsukamurella* sp. Se seleccionaron las bacterias ya que las biotransformaciones catalizadas por las mismas llevan menos tiempos de reacción en comparación con las reacciones con los hongos filamentosos como biocatalizadores. Además, se consideró la oportunidad de poder secuenciar el genoma completo de la bacteria que resulte ser un biocatalizador interesante y así conocer la secuencia que codifica para la enzima responsable de la reacción de biotransformación, como será presentado más adelante en la sección 2.7.

Los ensayos se realizaron utilizando Tween 80 al 0.1 % como agente dispersante del ácido biliar. Se detectaron productos en todas las reacciones de transformación llevadas a cabo, con excepción de la biotransformación del ácido cólico por *Exiguobacterium* sp.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante TLC y GC-MS. En las tablas 2-18 y 2-19 se muestran los tiempos de retención, los principales iones detectados en la espectroscopia de masas de los sustratos y productos, y los porcentajes de bioconversión.

Tabla 2- 18. Resultados obtenidos en la biotransformación del ácido cólico.

Bacteria	Productos obtenidos ^a	tr (min) ^a	M ⁺ (m/z) ^a	Principales iones (m/z) ^a	Porcentaje de bioconversión (%)
-	Sustrato ácido cólico	31.6	623	623, 548, 458, 368, 343, 281, 261, 253, 243, 226, 171, 157, 147, 129, 105.	-
<i>Streptomyces</i> sp.	CA-S1	31.2	400	400, 382, 367, 315, 289, 273, 255, 231, 213, 173, 163, 161, 159, 145, 119, 107, 105.	2.3
<i>Tsukamurella</i> sp.	CA-T1	36.4	564	564, 549, 474, 459, 458, 384, 369, 314, 297, 269, 242, 145, 105.	20
	CA-T2	47.3	565	565, 547, 400, 382, 372, 353, 299, 285, 261, 185, 169, 157, 145, 143, 131, 105.	0.1
<i>Acinetobacter</i> sp.	CA-A1	44.5	404	404, 386, 368, 355, 271, 253, 159, 145, 107, 105.	5.2
	CA-A2	49.2	534	533, 504, 458, 443, 389, 368, 353, 281, 261, 253, 281, 261, 253, 159, 145, 131, 119, 105.	5.1
	CA-A3	52.1	548	476, 458, 387, 351, 271, 253, 226, 197, 159, 145, 19, 105.	1.3
<i>Exiguobacterium</i> sp.			No se obtuvieron productos		

^a Correspondientes a los compuestos derivatizados como trimetilsilil éster-metil éter.

Del análisis del espectro de masas del producto de biotransformación del ácido cólico con *Tsukamurella* sp. (CA-T1) derivatizado como trimetilsilil éter metil éster, se propone que la reacción de transformación del ácido cólico corresponde a la oxidación de uno de los grupos hidroxilo a cetona (Tabla 2-18). Este espectro muestra un ion molecular con m/z 564 [M]⁺ el cual corresponde al peso molecular del ácido cólico con dos grupos trimetilsilil, metilado en el grupo ácido, y con un grupo cetona en lugar de uno de los hidroxilos presentes en el sustrato de

partida. En el espectro se observa un ion a m/z 474 y otro a m/z 384, correspondientes a la pérdida de uno y dos grupos trimetilsilil respectivamente ($[M-90]^+$ y $[M-(90 \times 2)]^+$). Además, se observa un pico base en m/z 269, correspondiente a la pérdida de dos grupos trimetilsilil y la cadena lateral $[M-(90 \times 2-115)]^+$. Sumado a esto, el espectro obtenido corresponde con los reportados en bibliografía para los derivados trimetilsilil éter metil ésteres de 7,12-dihidroxi-3-ceto- y 3,12-dihidroxi-7-ceto-5 β -colánico (Cronholm et al. 1972; Denton et al. 1974).

Tabla 2- 19. Resultados obtenidos en la biotransformación del ácido litocólico.

Bacteria	Productos obtenidos ^a	tr (min) ^a	M ⁺ (m/z) ^a	Principales iones (m/z) ^a	Porcentaje de bioconversión (%)
-	Sustrato ácido litocólico	29.1	372	372, 357, 341, 318, 285, 262, 257, 230, 215, 201, 187, 165, 161, 147, 133, 121, 119, 107.	-
<i>Streptomyces</i> sp.	LA-S1	26.8	402	402, 387, 373, 355, 345, 318, 303, 255, 249, 229, 213, 203, 173, 161, 147, 123, 109.	1.1
	LA-S2	30.3	388	388, 373, 356, 339, 318, 315, 297, 286, 273, 255, 245, 231, 213, 199, 187, 176, 161, 147, 133, 119, 107, 105.	0.3
<i>Tsukamurella</i> sp.	LA-T1	30.7	388	388, 373, 356, 339, 318, 315, 297, 284, 273, 255, 246, 231, 213, 187, 176, 147, 149, 123, 121, 119, 109, 107.	12.4
<i>Acinetobacter</i> sp.	LA-A1	30.3	388	388, 373, 372, 356, 339, 318, 315, 297, 284, 273, 255, 246, 231, 213, 176, 149, 123, 121, 119, 109, 107.	0.1
	LA-A2	31.2	386	386, 371, 341, 323, 299, 285, 257, 248, 230, 215, 187, 175, 173, 161, 147, 119.	0.1
<i>Exiguobacterium</i> sp.	LA-E1	31.7	476	476, 461, 386, 371, 323, 299, 276, 257, 230, 215, 201, 187, 173, 161, 147, 133, 121, 107.	0.4

^a Correspondientes a los compuestos derivatizados como trimetilsilil éster-metil éter.

Los productos de biotransformación del ácido litocólico con *Streptomyces* sp. (LA-S2), *Tsukamurella* sp. (LA-T1) y *Acinetobacter* sp. (LA-A1) presentan el mismo tiempo de retención en las condiciones de análisis, y muestran el mismo patrón de fragmentación en su espectro de masas, por lo que se supone que son el mismo compuesto (Tabla 2-19). Estos presentan un ion molecular m/z 388, que al comparar con el peso molecular del ácido litocólico metilado- sin sililar (390 g/mol), presenta dos protones menos que el sustrato de partida. Considerando esto, se supone que sería el producto de oxidación del grupo hidroxilo en C3. El espectro obtenido concuerda con el reportado en bibliografía para el éster metílico 3-ceto-5 β -colan-24-oato (3-cetolitocólico) (Sasaki et al. 2001). Se reconoce el ion m/z 356 correspondiente a la pérdida de dos átomos de oxígeno (M^+-32), el m/z 273 correspondiente a la pérdida de la cadena lateral (M^+-115) y el m/z 231 correspondiente a la pérdida de la cadena lateral y el anillo D ($M^+-115-42$).

El espectro de masas del producto LA-S1 derivatizado como trimetilsilil éter metil éster (Tabla 2-19) muestra un ion molecular con m/z 402 $[M]^+$, y un pico base en m/z 109. Del análisis de este espectro se propone que la reacción de transformación del ácido litocólico que lleva a la obtención de LA-S1 corresponde a la oxidación del grupo hidroxilo en posición 3 y a la incorporación de un grupo cetona en otra posición del núcleo esteroideal. Este espectro concuerda con el reportado para metil éster de 3,7-dioxo-5 β -colánico (Sasaki et al. 2001).

Kollerov *et al.* (2013) reportaron la capacidad de transformación del ácido litocólico por cepas del género *Streptomyces*, obteniéndose derivados hidroxilados como el ácido quenodesoxicólico (ácido 3 α ,7 α -dihidroxi-5 β -colánico) , ácido cólico y ácido ursocólico (ácido 3 α ,7 β ,12 α -trihidroxi-5 β -colánico) (Kollerov et al. 2013). Además, representantes del género *Streptomyces* han sido reportadas como capaces de degradar ácidos biliares (Philipp 2011).

Respecto a la transformación de los ácidos biliares con cepas pertenecientes al género *Acinetobacter*, Giovannini *et al.* (2008) y Fantin *et al.* (1998) reportaron la oxidación de los grupos hidroxilos en C7 y C12 del ácido cólico (Fantin et al. 1998; Giovannini et al. 2008).

No se han encontrado reportes sobre la transformación y/o degradación de ácidos biliares por bacterias del género *Exiguobacterium*.

Respecto a bacterias del género *Tsukamurella*, existe un trabajo reportado en el que se demuestra que una cepa perteneciente a este género es capaz de crecer pobremente utilizando varios sustratos esteroidales como única fuente de carbono, incluidos varios ácidos biliares como los ácidos cólico y litocólico (Merino et al. 2013). No hay estudios sobre los productos de transformación obtenidos. Por tanto, *Tsukamurella* sp. sería un biocatalizador novedoso para la oxidación de los grupos alcohol de los ácidos biliares estudiados en esta tesis. A su vez, Los mayores porcentajes de bioconversión (Tablas 2-18 y 2-19) fueron obtenidos con la cepa *Tsukamurella* sp. para ambos sustratos en estudio, por lo cual se decidió completar la elucidación estructural de los productos mayoritarios obtenidos en las reacciones con este biocatalizador (CA-T1 y LA-T1).

2.6.1. Biotransformación del ácido litocólico con *Tsukamurella* sp.

Se realizó la separación y purificación del producto LA-T1, logrando caracterizar su estructura mediante GC-MS y RMN. El producto obtenido fue identificado como ácido 3-oxo-5 β -colan-24-oico (C₂₄H₃₈O₃) (**VI**), conocido como ácido dehidrolitocólico ó 3-cetolitocólico (Fig. 2-18).

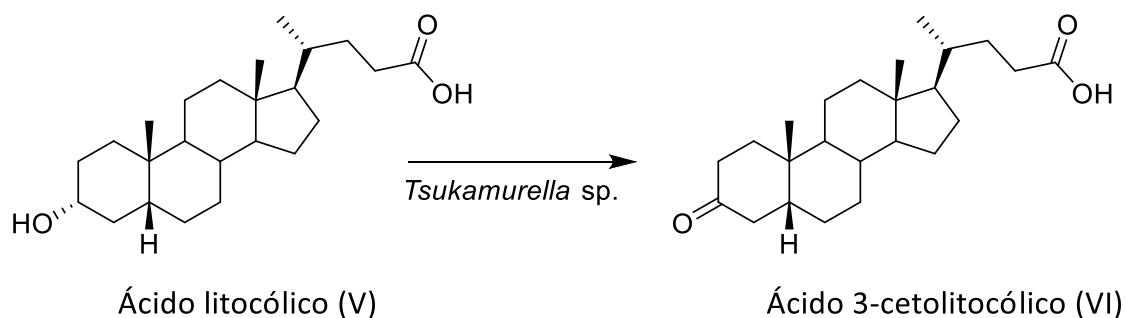


Figura 2- 18. Transformación del ácido litocólico catalizada por *Tsukamurella* sp.

El espectro de masas del producto **VI** (denominado anteriormente LA-T1) derivatizado como trimetilsilil éter metil éster se presentó en la tabla 2-19. Este presenta el ion molecular en m/z 388 e iones de fragmentación que sugieren la oxidación del grupo hidroxilo a cetona, como se discutió en la sección 2.6. Las señales de ^1H y ^{13}C del RMN se presentan en la tabla 2-20 (espectros en anexo III). El espectro de ^{13}C -RMN mostró una nueva señal a δ 211.3 ppm

correspondiente a la señal del carbonilo, en comparación con el espectro del ácido litocólico presentado en el anexo III. A su vez, desapareció la señal correspondiente al carbono 3 que contiene el hidroxilo, la cual estaba en δ 70.3 ppm en el espectro del ácido litocólico. En el espectro de ^1H RMN se observa un triplete a δ 2.75 ppm correspondiente al protón de C2, con integración 1 y $J = 14.1$ Hz que corresponde al acople de este protón en orientación α con los protones presentes en C1. Al encontrarse adyacente a un grupo carbonilo, este protón se encuentra menos apantallado por lo que presenta mayor desplazamiento químico en comparación con el H2 del sustrato (en el cual se encontraba en δ 1.60 ppm). Además, este cambió su forma de multiplete a un triplete, ya que presenta correlación con los protones de C1, y ya no hay acople con el protón base del hidroxilo como sucedía en el ácido litocólico. La otra señal que se observa cambiada es la correspondiente a los protones en C4, ya que, al igual que lo explicado para los protones en C2, no presentan acoplamiento con protones en C3 y se encuentran menos apantallados por la presencia del grupo cetona adyacente, observándose a un mayor desplazamiento químico (δ 2.36 ppm y 1.97 ppm). Las señales observadas en los espectros de ^{13}C y ^1H son concordantes con lo reportado en bibliografía para el ácido 3-cetoliotocólico (Nahar & Turner 2004; Chang et al. 2006).

Tabla 2- 20. Desplazamientos químicos (δ) y constates de acoplamiento (J) de las señales observadas en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del ácido 3-cetolitocólico.

Ácido 3-cetolitocólico				
C	Tipo	δH (ppm), multiplicidad y J (Hz)		δC (ppm)
		α	β	
1	CH ₂	1.69(m)	1.04(m)	39.9
2	CH ₂	2.75(t, J= 14.1, 1H)	1.82(m)	42.8
3	C=O	-	-	211.3
4	CH ₂	2.36(td, J= 15.2; 14.7 y 5.3, 1H)	1.97(m)	37.2
5	CH	-	1.95(m)	40.01
6	CH ₂	1.26(m)	1.83(m)	28.7
7	CH ₂	1.18(m)	1.21(m)	26.7
8	CH	-	1.97(m)	35.3
9	CH	1.38(m)	-	36.9
10	C	-	-	34.9
11	CH ₂	1.43(m)	1.30(m)	21.22
12	CH ₂	1.58(m)	1.24(m)	40.08
13	C	-	-	44.1
14	CH	-	1.07(m)	55.9
15	CH ₂	1.56(m)	1.10(m)	24.3
16	CH ₂	1.81(m)	1.20(m)	25.7
17	CH	-	1.07(m)	55.9
18	CH ₃	0.65(s)		12.3
19	CH ₃	0.96(s)		22.7
20	CH	-	1.38(m)	35.5
21	CH ₃	0.89 (d, J=6.5Hz)		18.6
22	CH ₂	1.68(m)	1.20(m)	31.2
23	CH ₂	2.28(ddd, J= 15.3, 9.5 y 5.4, 1H)	2.13(ddd, J= 15.8, 9.5 y 6.9, 1H)	31.2
24	COOH	-	-	175.34

A su vez, fue sintetizado un estándar de este compuesto mediante oxidación del ácido litocólico con yodobenzoico (YBX). Este estándar fue purificado mediante TLC preparativa y comparado con el producto de transformación obtenido. Bajo las mismas condiciones de corrida en TLC ambos presentan un R_f igual. El espectro de ^1H NMR del estándar sintetizado (espectro en anexo III) presenta las mismas señales que el producto de transformación, lo que confirma que el producto obtenido es el ácido 3-cetolitocólico.

Como se discutió previamente, no existen reportes de productos de transformación del ácido litocólico por *Tsukamurella* sp. La formación del ácido 3-cetolitocólico indica la presencia de la actividad 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 α -HSDH) en dicha bacteria (Deshcherevskaya et al. 2016). Esta reacción, la oxidación del grupo hidroxilo en C3, es considerada la primer reacción en la vía de degradación del núcleo esteroidal por bacterias (Deshcherevskaya et al. 2016). La actividad de la 3 α -HSDH sobre distintos ácidos biliares ha sido previamente reportada en varias bacterias de los géneros *Mycobacterium*, *Nocardiodes*, *Rhodococcus* *Clostridium*, *Eubacterium*, *Pseudomonas*, entre otros (Macdonald et al. 1976, 1979; Edenharder et al. 1989; Mallonee et al. 1995; Deshcherevskaya et al. 2016).

En la investigación realizada por Kollerov *et al.* (2013), un hongo filamentoso, *Gibberella zeae* VKM F-2600, mostró la capacidad de oxidar el 3 α -hidroxilo del ácido ursodesoxicólico, pero no del ácido litocólico (Kollerov et al. 2013). A partir de este hecho, estos autores afirman que la actividad 3 α -HSDH es expresada en el hongo *Gibberella zeae* y en bacterias solo para los ácidos biliares que presentan dos o tres grupos hidroxilos, basándose en que previamente ha sido demostrada en bacterias sobre sustratos como los ácidos cólico y desoxicólico, no mostrando dicha actividad sobre el ácido litocólico. Sin embargo, existe un reporte previo en el que se detectó el ácido 3-cetolitocólico como producto de transformación del ácido litocólico con células de *Eubacterium lentum* en reposo (Hirano et al. 1981). Por lo cual, la investigación de Hirano *et al.* (1981) y la llevada a cabo en el marco de esta tesis demuestran que no es necesario la presencia de más de un grupo hidroxilo en el ácido biliar para que se exprese la actividad 3 α -HSDH.

El 3-cetolitocólico es utilizado como precursor o intermediario en la síntesis de derivados estudiados por sus potenciales aplicaciones farmacológicas, y de nanopartículas utilizadas como portadores de fármacos (Nahar & Turner 2003; Sievänen et al. 2008; Dang et al. 2012; Patil et al. 2013; Do Nascimento et al. 2015). Este generalmente es obtenido mediante oxidación del grupo hidroxilo del ácido litocólico utilizando agentes oxidantes que contienen cromo (VI), como clorocromato de piridinio (PCC) o el reactivo de Jones (mezcla de trióxido de cromo, ácido sulfúrico, acetona y agua), los cuales son altamente tóxicos y pueden generar problemas medioambientales (Department of Health and Human Services 1998; US Environmental

Protection Agency 1999; Yamaguchi et al. 2001; Nahar & Turner 2003; Sievänen et al. 2008; Dang et al. 2012; International Agency for Research in Cancer (IARC) 2012; Do Nascimento et al. 2015). La producción de este compuesto usando biotransformaciones podría ser una alternativa al uso de los agentes oxidantes convencionales, siguiendo los principios de química verde. Por otro lado, el producto de biotransformación obtenido es de mayor valor comercial que el sustrato de partida. El precio del ácido litocólico es aproximadamente USD 6 por gramo (USD 250 la presentación de 25 g) en Toronto Research Chemicals® (TRC) y Tokyo Chemicals Industry® (TCI) (<https://www.tcichemicals.com>; <https://www.trc-canada.com>). Mientras que el ácido 3-cetolítico vale USD 240 por gramo en TRC y USD 606 por gramo en TCI, por lo que el producto obtenido tiene un valor comercial entre 40 y 100 veces más que el sustrato de partida.

2.6.1.1. Biotransformación del ácido litocólico con *Tsukamurella* sp. utilizando diferentes agentes dispersantes del sustrato

Como fue explicado en la sección 1.3.4 de la introducción, la baja solubilidad de los esteroides en medios acuosos limita considerablemente la productividad de la biotransformación. Han sido reportadas varias estrategias para mejorar la eficiencia de la biotransformación usando dispersiones del sustrato con agentes tensoactivos como Tween 80, Triton X-100, lecitinas, entre otros, y con la adición de ciclodextrinas que forman complejos de inclusión con el sustrato (Fernandes et al. 2003). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluó el efecto de diferentes agentes dispersantes del sustrato sobre el porcentaje de bioconversión del ácido litocólico por *Tsukamurella* sp. Los dispersantes utilizados fueron los tensoactivos no iónicos: Tween 8, aceite de ricino etoxilado 36 moles (EO36), alcohol láurico etoxilado 7 moles (EO7) y β -ciclodextrina. Tween 80 había sido utilizado en todos los ensayos anteriores en una concentración final de 0.1 %; y en este caso se evaluó al 0.2 %, al igual que los demás tensoactivos. El aceite de ricino etoxilado EO36 y alcohol láurico etoxilado EO7 no han sido reportados hasta el momento como dispersantes en la biotransformación de compuestos esteroideos.

El grado de etoxilación, esterificación y largo de la cadena del ácido graso del tensoactivo influye en sus propiedades emulsificantes, lo que se puede considerar con el valor del balance hidrófilo-

lipofílico (HLB) del tensoactivo (Zheng et al. 2015). El valor de HLB es utilizado para describir la relación entre las partes hidrofílicas y lipofílicas del tensoactivo (Griffin 1949; Williams 2007). Para los utilizados en este trabajo, el valor de HLB de Tween 80 es 15.0; el de aceite de ricino etoxilado EO36 es 13.0 y del alcohol láurico etoxilado EO7 12.5.

La reacción de biotransformación del ácido litocólico por *Tsukamurella* sp. se realizó durante 96 horas. Los porcentajes de bioconversión para obtener el ácido 3-cetolitocólico fueron determinados mediante HPLC utilizando el método de normalización de áreas. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 2-19.

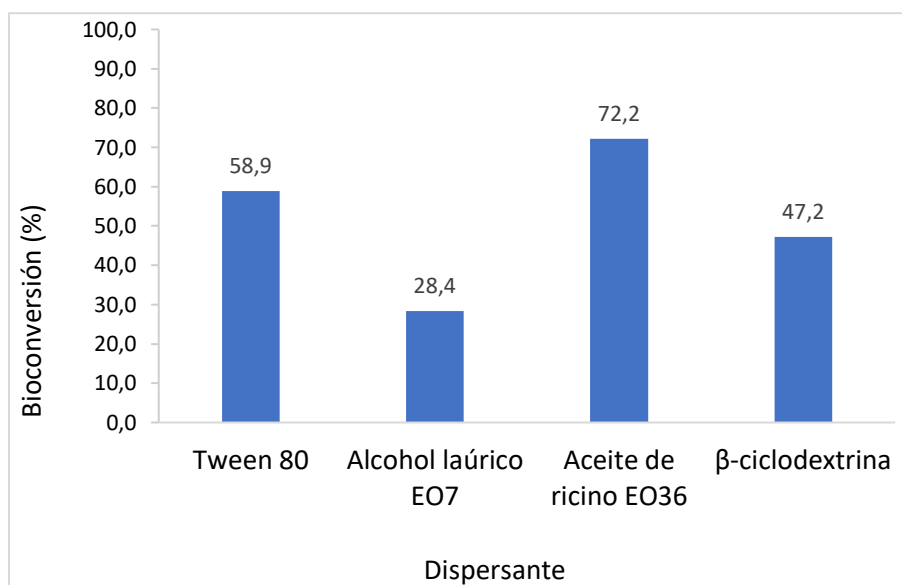


Figura 2- 19. Porcentaje de bioconversión obtenido en la transformación del ácido litocólico a con *Tsukamurella* sp. utilizando distintos agentes dispersantes del sustrato.

El aceite de ricino etoxilado demostró ser el mejor agente dispersante del ácido litocólico para utilizar en la reacción de biotransformación con *Tsukamurella* sp. Considerando este resultado, el aceite de ricino etoxilado se utilizó en los ensayos realizados para estudiar distintas condiciones de reacción como biotransformación con células en reposo, adiciones sucesivas de agregado del sustrato, tiempo de reacción, concentraciones iniciales de sustrato y biotransformación en fermentador de 5 L.

2.6.1.2. Evaluación del rendimiento de bioconversión en función del tiempo de reacción

Los rendimientos de bioconversión mediante células en crecimiento de *Tsukamurella* sp. utilizando aceite de ricino EO36 como agente dispersante del ácido litocólico fueron evaluados cada 24 horas durante los 6 días posteriores al agregado de sustrato. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los rendimientos obtenidos fueron evaluados mediante HPLC utilizando una curva de calibración del ácido 3-cetolítico sintetizado por oxidación química convencional (Fig. 4-9). Los resultados se muestran en la tabla 2-21 y en la figura 2-20.

Tabla 2- 21. Rendimiento de la bioconversión promedio y desviación estándar en función del tiempo (a partir de agregado el sustrato).

Tiempo de reacción (horas)	Rendimiento de bioconversión (%)	Desviación estándar (%)
24	10.4	0.4
48	28.4	0.6
72	43.2	7.3
96	50.8	2.2
120	61.2	4.6
144	63.9	4.5

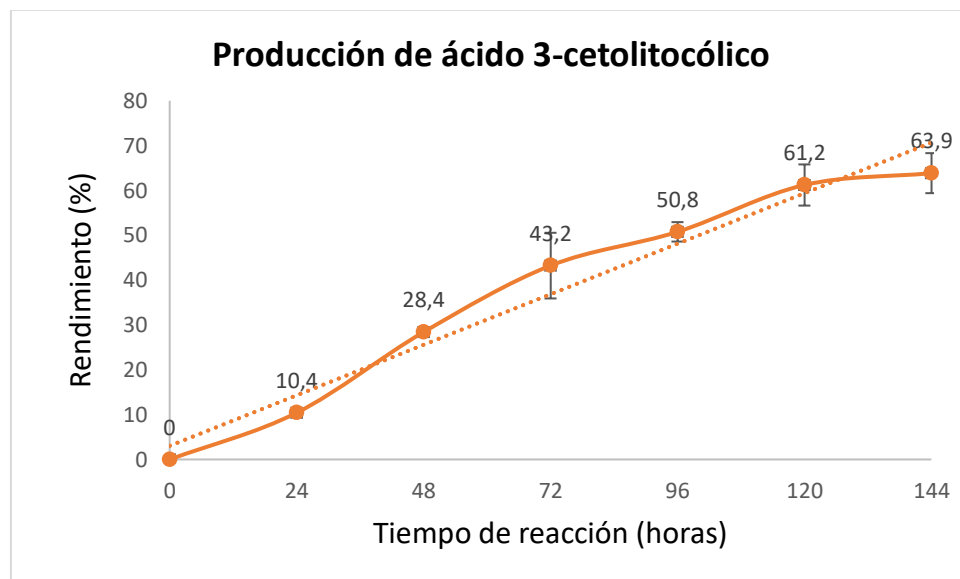


Figura 2- 20. Rendimiento de bioconversión del ácido litocólico a ácido 3-cetolítico mediante células en crecimiento de *Tsukamurella* sp. en función del tiempo (a partir de agregado el sustrato disperso en aceite de ricino etoxilado 0.2 %).

A partir de los resultados obtenidos se puede afirmar que la producción del ácido 3-cetolítico sigue una tendencia de aumento lineal en función del tiempo, obteniéndose los máximos valores entre las 120 y 144 horas de reacción dentro del periodo de tiempo evaluado. La diferencia observada entre los porcentajes de bioconversión obtenidos entre las 120 y 144 horas no es significativa, por lo que se considera que 120 horas sería un tiempo adecuado para la bioconversión.

2.6.1.3. Biotransformación del ácido litocólico con células en reposo de *Tsukamurella* sp.

Se estudió la transformación del ácido litocólico con células en reposo de *Tsukamurella* sp. Para esto se realizó un cultivo de la bacteria en medio TSB en presencia del sustrato para favorecer la posible inducción de la expresión del gen que codifica para la enzima responsable de la bioconversión. La reacción de transformación en la que se obtiene el ácido 3-cetolítico es una reacción de oxidación catalizada por la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 α -HSDH), como fue previamente explicado en la sección 2.6.1. Estudios previos han demostrado en *Comamonas testosteroni* que el gen que codifica para 3 α -HSDH (*hsdA*) se expresa en muy bajos

niveles en ausencia de esteroides, pero su expresión se induce en presencia de sustratos esteroidales (Oppermann & Maser 1996; Möbus & Maser 1998; Xiong et al. 2009). Está inducción ha sido estudiada en varios trabajos de investigación, los cuales demostraron que lo que sucede es una desrepresión (Maser et al. 2001; Xiong & Maser 2001; Xiong et al. 2003, 2009). Como es reportado en dichos trabajos, existen dos proteínas represoras denominadas RepA y RepB, las cuales regulan la expresión del gen *hsdA* a nivel de la transcripción y traducción respectivamente. En este proceso de inducción, los esteroides se unen a las proteínas represoras previniendo el bloqueo de la transcripción de *hsdA* y la traducción del ARN mensajero.

A su vez, esta enzima es dependiente de NAD(P). Por tanto, ya que la reacción requiere cofactores se realizó el ensayo con células suspendidas en buffer M9 con glucosa (Anexo I) para favorecer la regeneración de los mismos. El ensayo se realizó por duplicado. Los resultados fueron analizados por TLC, en la cual se observa una mancha muy tenue correspondiente al ácido 3-cetolítico y una mancha correspondiente al sustrato remanente de mayor intensidad. Por tanto, se decide continuar trabajando con las células en crecimiento.

Por otro lado, se detectó el ácido 3-cetolítico en el sobrenadante del cultivo celular en TSB, lo que indica que la reacción de transformación ocurre al agregarse el sustrato al mismo tiempo de la inoculación sin necesidad de precultivo.

2.6.1.4. Biotransformación del ácido litocólico con *Tsukamurella* sp. realizando adiciones sucesivas del sustrato

Se realizó la biotransformación con células en crecimiento agregando el ácido litocólico a diferentes tiempos de forma sucesiva. El primer agregado se realizó junto con el inóculo en una concentración de 0.25 mg/mL en el ensayo. A las 48 y 96 horas se realizaron dos agregados más de 50 mg de sustrato cada uno, llegando a una concentración final de 1.25 mg /mL en el ensayo, el cual se realizó durante 6 días. Antes de cada agregado de sustrato se tomaron muestras para monitorear la reacción. A las 48 horas del primer agregado no se observó producto de biotransformación. A las 48 horas del segundo agregado si se observó producto, pero el porcentaje bioconversión obtenido fue apenas de 0.5 %.

Al finalizar la reacción, con un tiempo total de 6 días (48 horas después del último agregado) se detectó el ácido 3-cetolítico y el porcentaje de bioconversión obtenido fue 9 %. Este es muy bajo en comparación con el obtenido en el ensayo realizado durante 6 días agregando el sustrato en una única adición a las 48 horas posteriores a la inoculación (63.9 ± 4.5 %) (resultado mostrado en la sección 2.6.1.2).

2.6.1.5. Biotransformación con diferentes concentraciones iniciales de sustrato

Se realizó el ensayo de biotransformación del ácido litocólico con células en crecimiento agregando el sustrato a las 48 horas desde la inoculación. Se evaluaron dos concentraciones iniciales de sustrato: 2.5 g /L y 5 g/L. La reacción se realizó durante 7 días por duplicado y se evaluaron los rendimientos de bioconversión por HPLC utilizando la curva de calibración del ácido 3-cetolítico (Fig. 4-9). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2-22.

Tabla 2- 22. Rendimiento de la bioconversión promedio y desviación estándar obtenido en la biotransformación con diferentes concentraciones iniciales de sustrato.

Concentración de ácido litocólico (g/L)	Rendimiento de bioconversión (%)	Desviación estándar (%)
2.5	41.1	8.8
5	2.8	0.3

Los porcentajes obtenidos son muy bajos en comparación con los obtenidos anteriormente en los ensayos realizados con la concentración inicial de 1 g/L de sustrato (63.9 ± 4.5 %), mostrados en la sección 2.6.1.2. Esto podría deberse a efectos inhibitorios de las altas concentraciones de ácido litocólico sobre las células de *Tsukamurella* sp. o sobre la enzima responsable de la transformación. Aunque algunas bacterias son capaces de crecer en medios con altas concentraciones de ácidos biliares, estudios previos han demostrado que los ácidos biliares exhiben efectos inhibitorios sobre el crecimiento de muchas bacterias (Kimura et al. 1994). Este efecto se relaciona a la posibilidad de que los ácidos biliares causen daño sobre la estructura de la membrana celular debido a sus propiedades tensoactivas y detergentes asociadas a su

carácter anfipático. Las bacterias Gram-positivas parecen ser más sensibles a estos efectos que las bacterias Gram-negativas (Begley et al. 2005).

Otra posible causa es la pobre solubilidad del sustrato en medio acuoso. Quizá una forma de mejorar estos rendimientos sería utilizar más cantidad de aceite de ricino etoxilado EO36 como agente dispersante, para mejorar la biodisponibilidad del sustrato al biocatalizador.

2.6.1.6. Curva de crecimiento de *Tsukamurella* sp.

Se realizó la curva de crecimiento de *Tsukamurella* sp. con el fin de evaluar en qué fase se realiza el agregado de sustrato en las condiciones de biotransformación que llevaron al mayor rendimiento de bioconversión. Estas condiciones fueron: células en crecimiento, agregado del sustrato a las 48 h posteriores a inocular, sustrato disuelto en solución de aceite de ricino etoxilado EO 36 moles, concentración de ácido litocólico 1 g/L.

Resultó necesario evaluar el crecimiento en las condiciones de ensayo con y sin agregado de sustrato y/o tensoactivo, ya que estos podrían influir en el crecimiento de *Tsukamurella* sp.

Por esto se realizó la curva de crecimiento de *Tsukamurella* sp. en las condiciones del ensayo de biotransformación del ácido litocólico:

- A) Con el sustrato disperso en aceite de ricino etoxilado EO36
- B) Sin agregado de sustrato, pero con agregado de aceite de ricino etoxilado EO36
- C) Sin agregado de sustrato ni de aceite de ricino etoxilado EO36

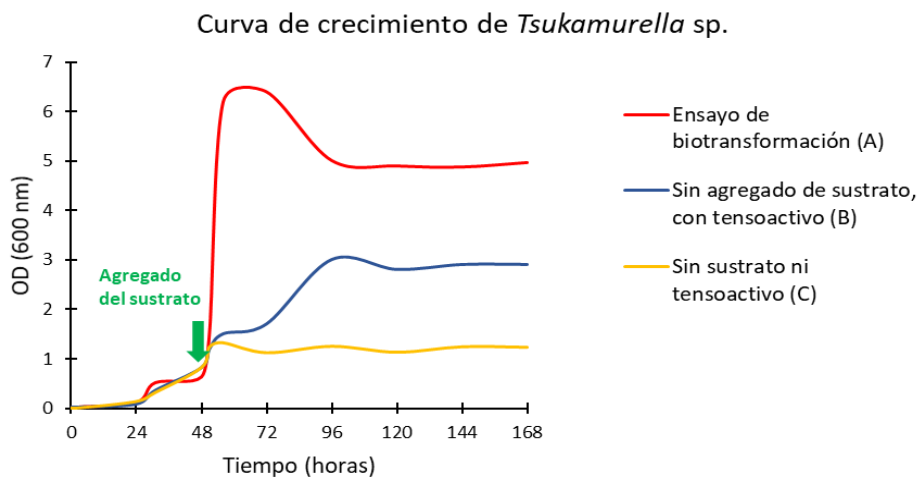


Figura 2- 21. Curvas de crecimiento de *Tsukamurella* sp.

En la figura 2-21 se presentan las curvas de crecimiento obtenidas. En la curva de crecimiento de *Tsukamurella* sp. sin agregado de sustrato ni tensoactivo (curva C) se observa que el microorganismo se encuentra al final de su fase de crecimiento exponencial y por alcanzar la fase estacionaria en el momento de agregado del sustrato.

Por otro lado, al agregar el sustrato con el tensoactivo el microorganismo crece hasta alcanzar la OD₆₀₀ máxima (OD₆₀₀ 6.4) en menos de 24 horas (curva A). En la curva de crecimiento con agregado de tensoactivo, pero no ácido litocólico (curva B) también se observa mayor crecimiento que sin el agregado (curva C), pero mucho menor que el crecimiento alcanzado en el ensayo (curva A). Estos resultados indican que posiblemente el sustrato es capaz de utilizar como fuente de carbono y energía el ácido litocólico y/o el aceite de ricino etoxilado EO36, lo cual se confirmó posteriormente (ver sección 2.6.3).

En la figura 2-22 se presenta la curva de crecimiento de *Tsukamurella* sp. en el ensayo de biotransformación y la curva de formación del ácido 3-cetolitocólico. En esta se observa que la formación de producto acompaña las fases de crecimiento exponencial y estacionaria. Posiblemente también acompañe la fase de muerte celular ya que la OD no permite evaluar la viabilidad celular.

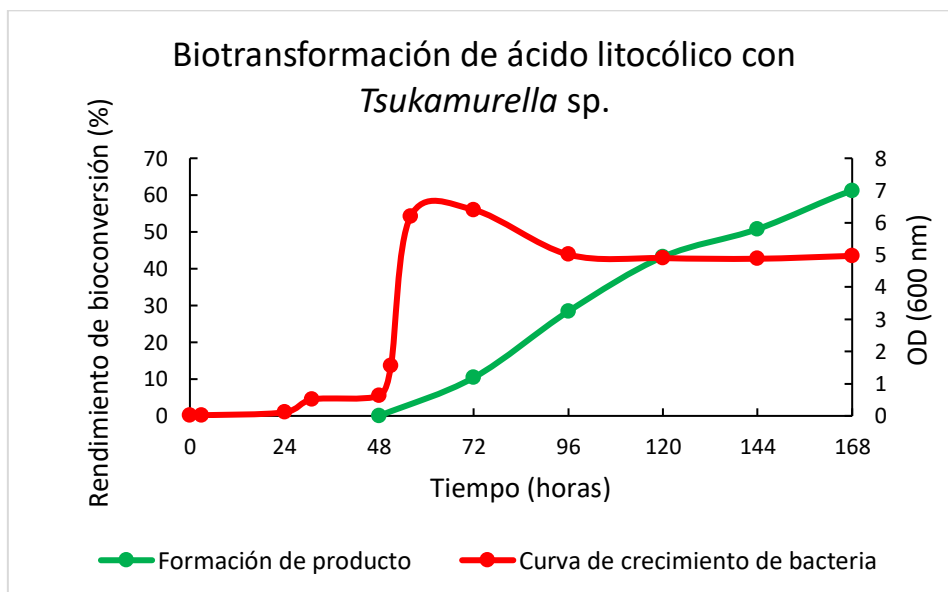


Figura 2- 22. Curva de crecimiento de *Tsukamurella* sp. y formación de ácido 3-cetolitocólico.

2.6.2. Biotransformación del ácido cólico con *Tsukamurella* sp.

Se realizó la separación y purificación del producto CA-T1, logrando caracterizar su estructura mediante GC-MS y RMN. El producto obtenido fue identificado como ácido 7 α ,12 α -dihidroxi-3-oxo-5 β -colan-24-oico (C₂₄H₃₈O₅) (**VIII**), conocido como ácido dehidrocólico ó 3-cetocólico (Fig. 2-23).

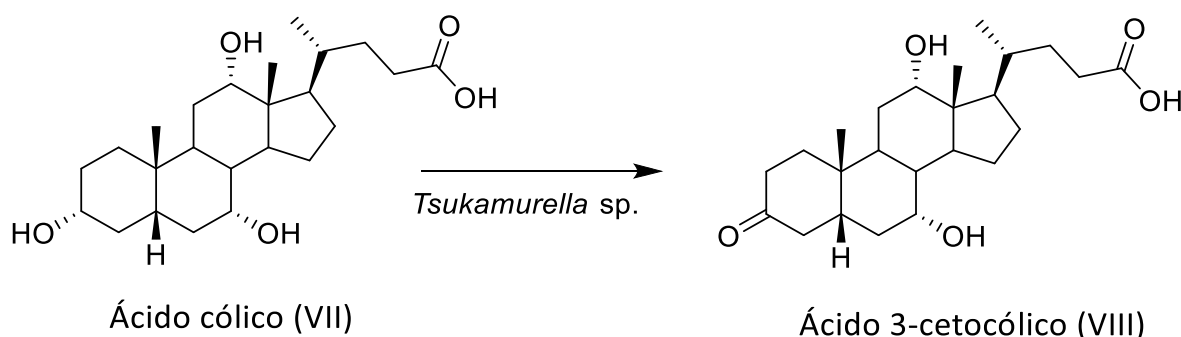


Figura 2- 23. Transformación del ácido cólico catalizada por *Tsukamurella* sp.

El espectro de masas del producto **VIII** derivatizado se presentó en la tabla 2-18 (producto CA-T1). Como se discutió en la sección 2.6, este presenta el ion molecular en m/z 564 e iones de fragmentación que sugieren la oxidación uno de los grupos hidroxilo a cetona. Las señales de ^1H y ^{13}C del RMN se presentan en la tabla 2-23 (espectros en anexo III). El espectro de ^{13}C RMN mostró una nueva señal a δ 212.3 ppm correspondiente a la señal del carbonilo, en comparación con el espectro del sustrato el cual es presentado en el anexo III. A su vez, desapareció la señal correspondiente al carbono C3 que contiene el hidroxilo, la cual estaba en δ 70.9 ppm en el espectro del ácido cólico. En el espectro se observan las señales correspondientes a los carbonos que presentan los grupos hidroxilos 7 α y 12 α en δ 66.8 ppm y 71.4 ppm respectivamente. En el espectro de ^1H RMN se observa un triplete de doblete a δ 2.42 ppm que corresponde al protón en α de C2, con integración 1. Este presenta tres constantes del acoplamiento con los protones α y β de C1, y con el protón en orientación β en C2. La correlación entre estos protones se observa en el espectro de COSY ^1H - ^1H (anexo III). Al encontrarse adyacente a un grupo carbonilo, este protón se encuentra menos apantallado por lo que presenta mayor desplazamiento químico en comparación con el H2 del sustrato (en el cual se encontraba en δ 1.43 ppm). La otra señal que se observa cambiada es la correspondiente a los protones de C4

que se observa como un doblete de dobletes (dd) a δ 3.42 ppm ($H\alpha$) y un multiplete a 1.94 ppm ($H\beta$). Estos aumentaron su desplazamiento químico con respecto a lo que se observa en el espectro del ácido cólico, lo que se relaciona a un menor apantallamiento por estar adyacente al grupo cetona. Además, la correlación entre $H4\alpha$ con $H4\beta$ y $H5\beta$ genera que la señal aparezca como un dd. Las señales observadas en el espectro de ^{13}C RMN son concordantes con lo reportado por Ray Dias y colaboradores para el ácido 3-cetocólico (Ray Dias et al. 2000).

Tabla 2- 23. Desplazamientos químicos (δ) y constates de acoplamiento (J) de las señales observadas en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del ácido 3-cetocólico.

Ácido 3-cetocólico				
C	Tipo	δH (ppm), multiplicidad y J (Hz)		δC (ppm)
		α	β	
1	CH ₂	1.94(m)	1.24(m)	37.0
2	CH ₂	2.42(td; J=14.2, 5.2 y 4.9; 1H)	1.86(m)	37.0
3	C=O	-	-	212.3
4	CH ₂	3.42(dd; J= 13.7 y 1.60;1H)	1.94(m)	45.8
5	CH	-	1.41(m)	39.7
6	CH ₂	1.40(m)	1.77(m)	34.3
7	CH-OH	-	3.67(s ancho)	66.8
8	CH	-	1.30(m)	35.5
9	CH	2.31(td; J=11.4, 6.0 y 5.0; 1H)	-	27.0
10	C	-	-	35.0
11	CH ₂	1.49(m)	1.2(m)	29.1
12	CH-OH	-	3.81(s ancho)	71.4
13	C	-	-	46.3
14	CH	-	2.01(m)	43.2
15	CH ₂	1.64(m)	0.98(m)	23.2
16	CH ₂	1.72(m)	1.18(m)	27.7
17	CH	-	1.79(m)	46.6
18	CH ₃	0.63(s,3H)		12.8
19	CH ₃	0.91(s,3H)		22.0
20	CH	-	1.68(m)	41.8
21	CH ₃	0.92(d; J=6.7; 3H)		17.5
22	CH ₂	1.66(m)	1.22(m)	31.4
23	CH ₂	2.22(ddd; 15.1, 9.7 y 5.2; 1H)	2.07(m)	31.6
24	COOH	-	-	175.4

Al igual que lo discutido en la biotransformación del ácido litocólico con *Tsukamurella* sp. (sección 2.6.1), la formación del ácido 3-cetocólico indica la presencia de la actividad 3 α -HSDH en dicha bacteria (Deshcherevskaya et al. 2016).

El ácido 3-cetocólico ya ha sido previamente obtenido mediante transformación del ácido cólico por bacterias, incluyendo *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Eubacterium lentum* y *Clostridium perfringens* (Macdonald et al. 1978; Hirano et al. 1981; Owen & Bilton 1983; Kimura et al. 1994). También existe una patente en la que se obtiene el ácido 3-cetocólico mediante biotransformación del ácido cólico por distintas cepas de *Arthrobacter*, junto a otros productos de oxidación como el ácido 7 α -hidroxi-3,12-diceto-colánico y el ácido 7 α , 12 α -3-ceto-colánico (Tsuju & Ichihara 1982). No existen reportes de productos de transformación del ácido cólico por *Tsukamurella* sp.

Respecto a los usos y posibles aplicaciones del producto obtenido, el ácido 3-cetocólico ha sido utilizado recientemente como material de partida para la síntesis de derivados buscando obtener compuestos con actividad antitumoral (Bjedov et al. 2017). A su vez, existe una patente relacionada a métodos de producción y uso de este producto y compuestos estructuralmente relacionados para su uso en tratamiento y prevención de ciertos desórdenes metabólicos y enfermedades, especialmente diabetes tipo II (Wolfrum et al. 2017).

Por otra parte, el producto de biotransformación obtenido presenta mayor valor comercial que el sustrato de partida, teniendo un precio de venta mucho mayor que el ácido cólico. El precio del ácido cólico es aproximadamente USD 0.6 por gramo en Toronto Research Chemicals® (TRC N° de catálogo C432600). Mientras que el ácido 3-cetocólico vale USD 41000 por gramo, disponible en presentaciones de 10 mg o 50 mg a USD 525 y USD 1025 respectivamente. Existen otros vendedores del producto obtenido, pero no está disponible la información sobre su precio y presentaciones de venta.

2.6.2.1. Evaluación del porcentaje de bioconversión en función del tiempo de reacción

Fueron evaluados los porcentajes de la bioconversión mediante células en crecimiento de *Tsukamurella* sp., con 48 horas de precultivo y utilizando Tween 80 al 0.2 % como agente dispersante del ácido cólico. Estos fueron evaluados cada 24 horas durante los 6 días posteriores al agregado de sustrato. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los rendimientos fueron determinados por HPLC utilizando el método de normalización de áreas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2-24 y en la figura 2-24.

Tabla 2- 24. Porcentaje de bioconversión promedio y desviación estándar en función del tiempo (a partir de agregado el sustrato).

Tiempo de reacción (horas)	Porcentaje de bioconversión (%)	Desviación estándar (%)
24	0.3	0.2
48	3.7	0.8
72	9.3	1.7
96	16.0	3.1
120	22.6	4.6
144	28.4	5.4

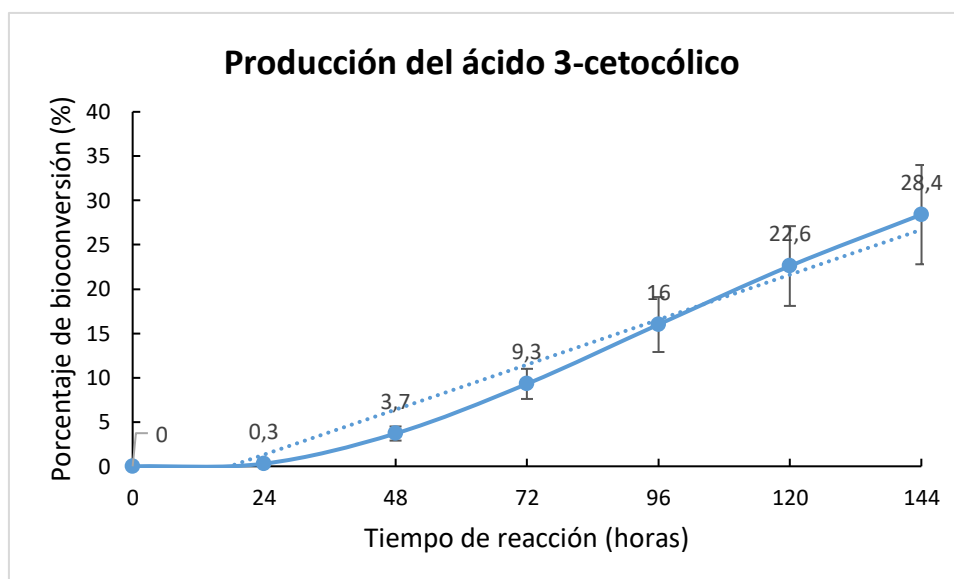


Figura 2- 24. Porcentaje de bioconversión del ácido cólico a ácido 3-cetocólico mediante células en crecimiento de *Tsukamurella* sp. en función del tiempo (a partir de agregado el sustrato).

El mayor porcentaje de bioconversión se obtuvo al mayor tiempo de reacción que es a las 144 horas (28.4 %). Sin embargo, considerando la desviación estándar de los valores obtenidos, la diferencia entre las 120 y 144 horas nos sería significativa.

2.6.2.2. Biotransformación del ácido cólico con células en reposo de *Tsukamurella* sp.

Se estudió la transformación del ácido cólico con células en reposo de *Tsukamurella* sp. Para esto se realizó un cultivo de la bacteria en medio TSB en presencia del sustrato para favorecer la posible inducción de la expresión del gen que codifica para la enzima responsable de la bioconversión. La reacción de transformación es una reacción de oxidación que requiere cofactores por lo que se realizó el ensayo con células suspendidas en buffer M9 con glucosa (Anexo I) para favorecer la regeneración de los mismos.

La reacción se llevó a cabo durante 4 días por duplicado y los porcentajes de bioconversión fueron evaluados por HPLC. El porcentaje de bioconversión promedio obtenido fue 64.4 %, considerablemente mayor al 16.0 % obtenido al mismo tiempo de reacción con las células de *Tsukumarella* sp. en crecimiento, aunque no es posible concluir cual sería el método que lleva a mejores porcentajes ya que la cantidad de células del biocatalizador es distinta en ambos ensayos (Fig. 2-24).

Por otro lado, el porcentaje de bioconversión obtenido en el sobrenadante del cultivo celular por 48 horas fue de 16.2 %. Este es mucho mayor al obtenido en el ensayo con células en crecimiento a las 48 horas de agregado el sustrato y con 48 h de precultivo (3.7 %, Fig. 2-24). Esto indica que la reacción de transformación ocurre al agregarse el sustrato al mismo tiempo de la inoculación sin necesidad de precultivo. Además, los rendimientos obtenidos en esas condiciones son mejores a los obtenidos realizando un precultivo. Una posible explicación a estos resultados es que la expresión del gen que codifica para la enzima responsable de la transformación, la 3 α -HSDH, requiera ser inducida por la presencia de esteroides en el medio; y que dicha expresión sea asociada a la fase de crecimiento exponencial del microorganismo. Como fue discutido en la sección 2.6.1.3, trabajos previos han demostrado que la expresión del gen que codifica para esta enzima en *Comamonas testosteroni* es inducible por esteroides, por

lo que podría serlo también en *Tsukamurella* sp. (Oppermann & Maser 1996; Möbus & Maser 1998; Xiong et al. 2009).

Por tanto, si la expresión del gen está asociada a la fase de crecimiento del microorganismo, al agregar el sustrato al cultivo de 48 horas el tiempo de esta fase en presencia del sustrato es menor que si se realiza el inóculo y agregado de sustrato al mismo tiempo, como fue realizado en el cultivo de células para el ensayo con células en reposo.

2.6.2.3. Biotransformación del ácido cólico con *Tsukamurella* sp. utilizando diferentes agentes dispersantes del sustrato

Como fue explicado en la sección 2.6.1.1; y demostrado con los resultados obtenidos en la transformación del ácido litocólico con *Tsukamurella* sp., el agente dispersante del sustrato influye en los porcentajes de bioconversión obtenidos. Por tanto, se estudió la biotransformación del ácido cólico utilizando distintos agentes dispersantes. Los ensayos fueron realizados con células en crecimiento de *Tsukamurella* sp., agregando el sustrato a las 48 horas de precultivo; y llevando a cabo la reacción durante las 144 horas posteriores. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 2-25.

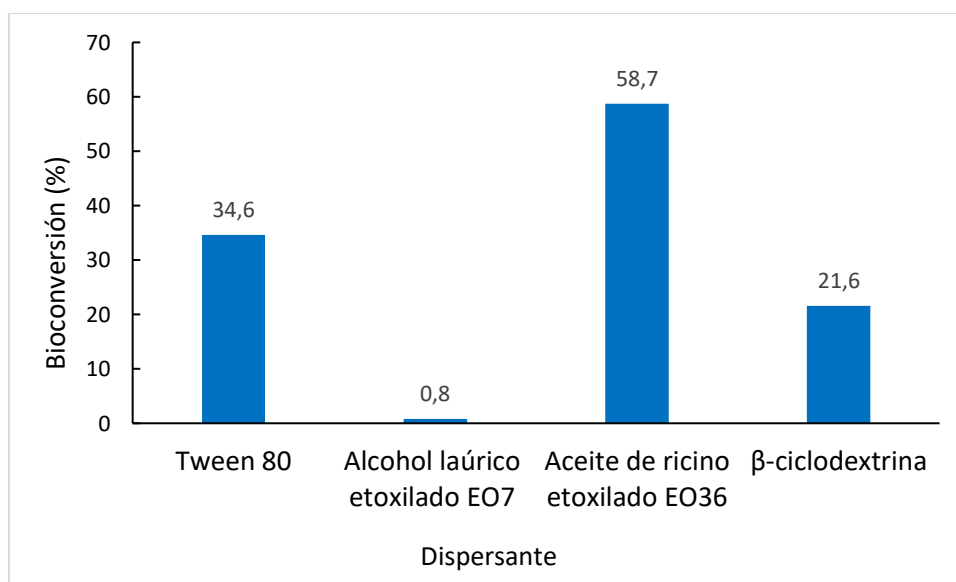


Figura 2- 25. Porcentaje de bioconversión obtenido en la transformación del ácido cólico con *Tsukamurella* sp. utilizando distintos agentes dispersantes del sustrato.

Los porcentajes de bioconversión obtenidos con los diferentes tensoactivos muestran la misma tendencia que la obtenida en la transformación del ácido litocólico con *Tsukamurella* sp. (sección 2.6.1.1). Resultando el aceite de ricino etoxilado EO36 ser el mejor agente dispersante del ácido cólico para utilizar en la reacción de biotransformación con *Tsukamurella* sp.

2.6.3. Capacidad de *Tsukamurella* sp. de utilizar distintas fuentes de carbono y energía

Considerando los resultados obtenidos en la transformación de los ácidos biliares cólico y litocólico con *Tsukamurella* sp. resultó interesante conocer si la bacteria es capaz de utilizar estos sustratos y los tensoactivos como fuente de carbono y energía. Para evaluar esto se cultivó la bacteria a 28 °C en placas de medio mínimo M9 sólido (anexo II) cada una conteniendo uno sólo de los siguientes compuestos: 0.2 % de Tween 80, 0.2 % de aceite de ricino etoxilado EO36 y 0.1 % de cada ácido biliar (agregado sin agente dispersante).

A las 24 horas de cultivo se observa un leve crecimiento en todas las placas. A los 5 días de cultivo se observa mayor crecimiento en los medios con los tensoactivos en comparación con los medios que contienen los ácidos biliares. Es importante tener en cuenta que al no utilizarse un agente dispersante para el agregado de los ácidos biliares estos no se dispersan bien en el medio, por lo que se forman agregados; lo que seguramente influya en el crecimiento de *Tsukamurella* sp. ya que dificulta el uso de estos por parte de la bacteria. En conclusión, *Tsukamurella* sp. es capaz de utilizar como única fuente de carbono y energía Tween 80, aceite de ricino etoxilado EO36, ácido cólico y ácido litocólico. La capacidad de utilizar ácidos biliares como fuente de carbono por parte de representantes del género *Tsukamurella* había sido previamente demostrada por Merino *et al.* (2013). Ellos estudiaron la capacidad de tres cepas de *Tsukamurella* sp. de crecer utilizando distintos esteroides como fuente de carbono. Sólo una de las tres cepas, denominada COL18, fue capaz de crecer utilizando los ácidos cólico y litocólico (Merino *et al.* 2013).

2.6.4. Producción del ácido 3-cetolítico con *Tsukamurella* sp. en fermentador de 5 L

El ácido 3-cetolítico presenta mayor valor agregado que el sustrato de partida (discutido en la sección 2.6.1). A su vez, se obtuvieron altos rendimientos de biotransformación con célula en crecimiento de *Tsukamurella* sp. (63,9 %), y esta bacteria resulta ser un biocatalizador novedoso para la biotransformación de esteroides.

Por otro lado, se consideró que la reacción del ácido cólico con *Tsukamurella* sp. puede realizarse con células en reposo obteniéndose buenos porcentajes de bioconversión, por lo que no sería necesario utilizar un fermentador durante el proceso de conversión. Considerando estos argumentos, se decidió estudiar la biotransformación del ácido litocólico con *Tsukamurella* sp. a mayor escala, utilizando un fermentador de 5 L.

El ensayo en escala de fermentador se realizó con un volumen de 2 L de medio rico TSB, utilizando 200 mL de una solución de aceite de ricino etoxilado EO36 al 2 % para disolver 2 g de sustrato de partida. El experimento se realizó dos veces variando distintas condiciones que se muestran en la tabla 2-25.

Tabla 2- 25. Comparación de las condiciones de ensayos a escala matraz y fermentador de 5 L (experimentos N°1 y N°2).

	Ensayo		
	Matraz	Fermentador N° 1	Fermentador N° 2
Precultivo en matraz	48 horas (no dentado)	48 horas (dentado)	24 horas (dentado)
OD600 al agregar el sustrato	0.63	7.8	3.8
Tiempo de crecimiento después de agregado el sustrato	24 horas	1 hora	24 horas
OD600 máxima alcanzada en el ensayo	6.4	8.2	7.1
pH inicial del medio (TSB)	7.4	7.4	7.4
pH al agregar el sustrato	8	7.8	7.0
pH al final del ensayo	8.5	8.6	8.7
Porcentaje de bioconversión	63.9 %	18%	17%

En el primer experimento se realizó un precultivo de *Tsukamurella* sp. en matraz dentado de 1 L con 200 mL de TSB a partir de un cultivo overnight. Este precultivo se incubó por 48 horas y se adiciono al fermentador en agitación a 250 rpm y pH inicial de 7.4. En este precultivo se observó un mayor crecimiento que lo obtenido en el precultivo de los ensayos realizados en escala matraz, en los cuales el matraz no es dentado. La geometría del sistema afecta la transferencia de oxígeno y este repercutió en un mayor crecimiento de *Tsukamurella* sp., el cual es un microorganismo aerobio estricto. Al inocular el fermentador se obtuvo una OD₆₀₀ inicial de 0.15, alcanzando un valor de 7.8 a las 23 horas desde la inoculación. Cabe destacar que se observó un aumento de pH desde 7.4 hasta un máximo de 8.6, que acompaña el crecimiento del microorganismo. Esto también fue observado en el ensayo a escala matraz. A las 23 horas desde la inoculación se agrega el sustrato disuelto en una solución de aceite de ricino etoxilado, lo que genera la formación de mucha espuma, la cual se controló agregando una mezcla de antiespumantes. Durante la etapa de crecimiento del microorganismo se observó un elevado consumo de oxígeno que se intentó mantener entre pO₂ 40 y 60 para asegurar la disponibilidad del mismo, lo que se consiguió aumentando la agitación a 400 rpm. La velocidad de agitación que se estableció estuvo limitada por el problema asociado a la generación de espuma. A las 4 horas posteriores a la adición del sustrato, la OD₆₀₀ alcanzó su valor máximo 8.2 y se mantuvo constante, lo que indica el comienzo de la fase estacionaria. Las células requieren oxígeno para su viabilidad, por lo que el consumo de oxígeno es un indicador de que el microorganismo se encuentra en la fase de crecimiento o estacionaria. Transcurridas las 37 horas de agregado el sustrato (60 horas desde la inoculación) no se observó consumo de oxígeno por lo que el microorganismo se encuentra en la fase de muerte celular.

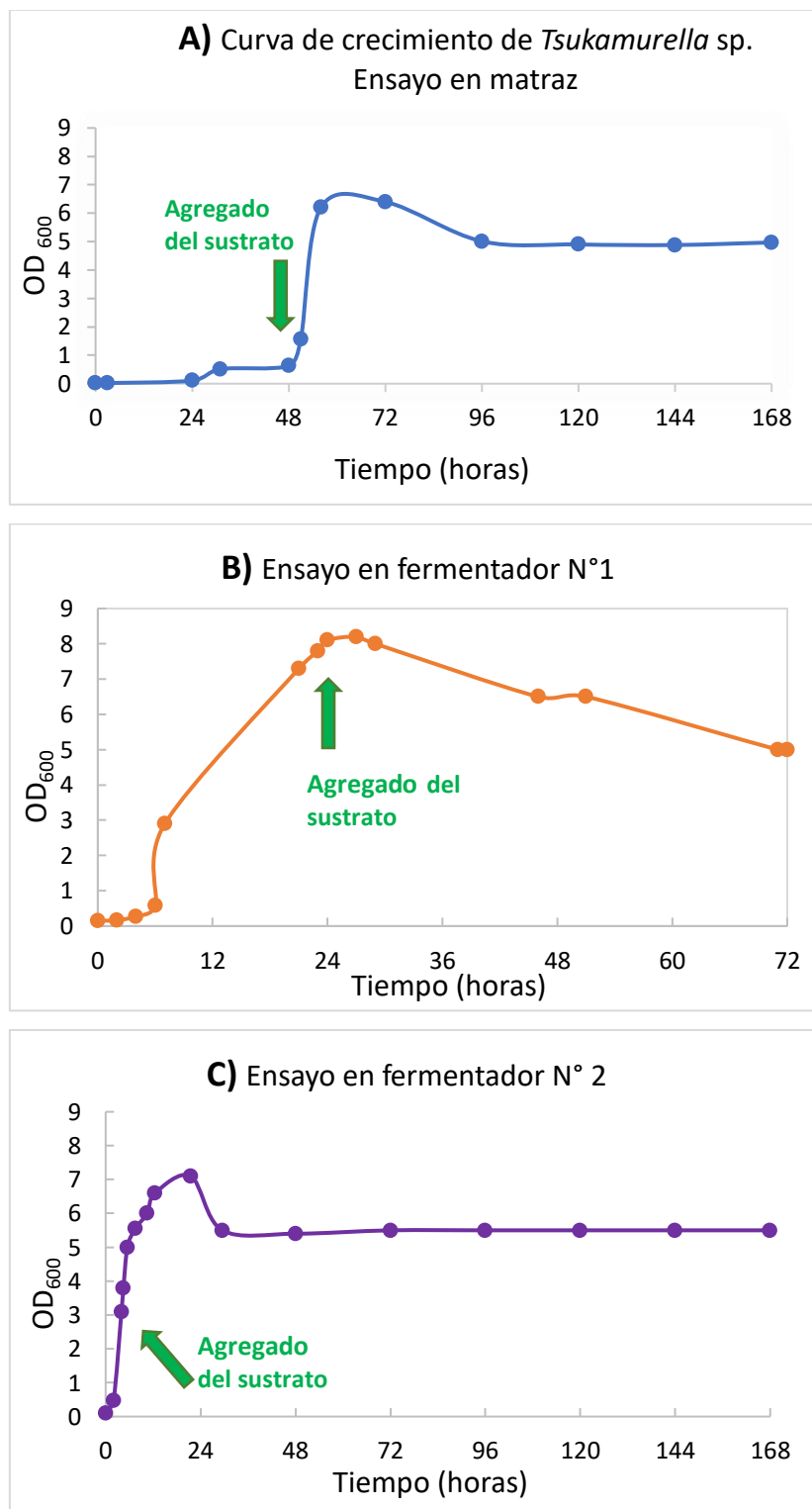


Figura 2- 26. Curvas de crecimiento de *Tsukamurella* sp. en ensayos a escala matraz y fermentador de 5 L (experimentos N°1 y N°2).

Al finalizar el experimento se obtuvo un porcentaje de bioconversión de 18 %, mucho menor al obtenido a escala matraz. Las diferencias en el crecimiento del microorganismo, el cual crece mucho más rápido en el precultivo dentado y en el fermentador con agitación con paletas hicieron que el agregado del sustrato se realice a una OD₆₀₀ mucho mayor que en el ensayo a escala matraz, y con la bacteria alcanzando el final de la fase de crecimiento (Fig. 2-26 B). Esto puede haber influido en la expresión del gen que codifica para la enzima responsable de la biotransformación (3 α -HSDH) la cual posiblemente necesite ser inducida por esteroides, como se discutió en la sección 2.6.1.3. Además, los problemas asociados a la generación de espuma y a la adhesión de las células de *Tsukamurella* sp. a la pared del fermentador afectan la disponibilidad del sustrato al biocatalizador (Fig. 2-27). Por lo cual, en el fermentador fue necesario el agregado de antiespumantes varias veces, lo cual no era necesario a escala de matraz.

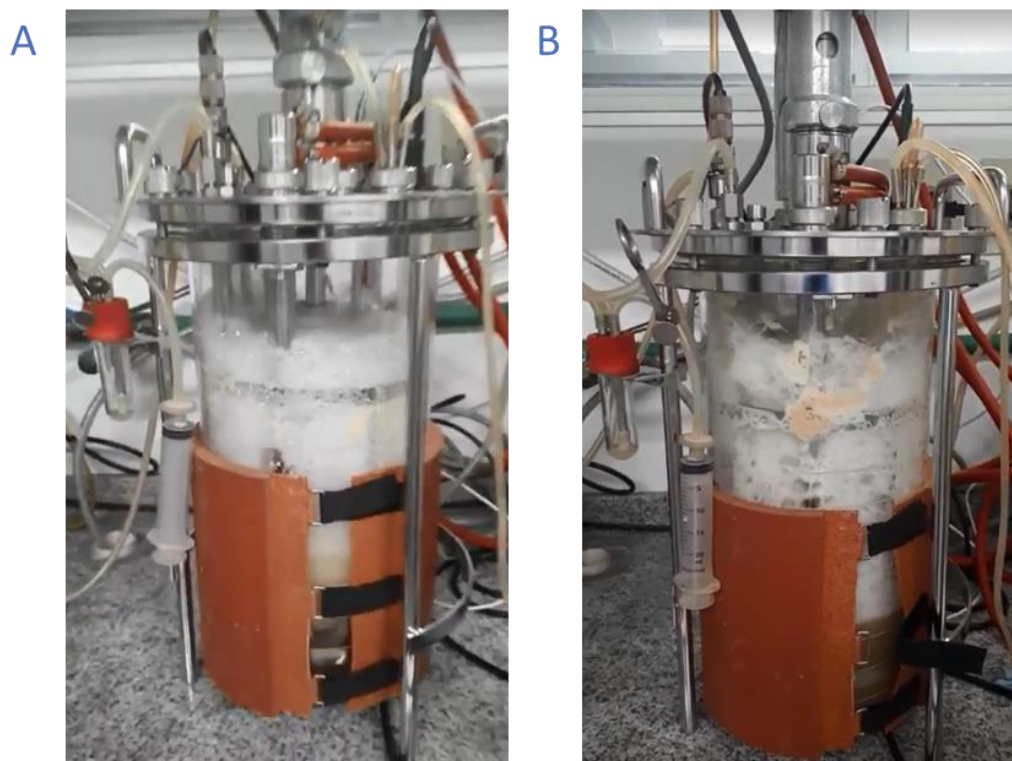


Figura 2- 27. Foto del fermentador mostrando **A)** la generación de espuma en el medio **B)** la adhesión de las células de *Tsukamurella* sp. a la pared del fermentador.

Por tanto, se decidió realizar un segundo experimento realizando el precultivo por menos tiempo, 24 horas, para lograr el agregado de sustrato a una OD₆₀₀ menor. Se buscaron condiciones similares a las del ensayo a escala matraz (Fig. 2-26 A), considerando que el porcentaje de bioconversión pudo verse afectado por la diferencia en la etapa de crecimiento del microorganismo. En el segundo experimento, al inocular el fermentador se obtuvo una OD₆₀₀ inicial de 0.11, y se agrega el sustrato a una OD₆₀₀ de 3.8, transcurridas 4.5 horas desde la inoculación (Fig. 2-26 C). Al igual que en los ensayos anteriores, el crecimiento del microorganismo estuvo acompañado de un aumento del pH. El microorganismo continuó creciendo por 17.5 horas más, hasta alcanzar una OD₆₀₀ máxima de 7.1, y luego se mantuvo constante indicando el comienzo de la fase estacionaria.

El consumo de oxígeno finalizó a las 72 horas desde la inoculación, es decir, 48 horas posteriores al agregado de sustrato. Por lo tanto, el microorganismo creció durante las 24 horas posteriores al agregado de sustrato y se mantuvo en la fase estacionaria por 24 horas más. Esto es similar a lo observado a escala matraz, en el cual el microorganismo creció 24 horas posteriores al agregado de sustrato (Fig. 2-26 A), pero se desconoce cuánto duró en la fase estacionaria porque no se evaluó la viabilidad celular. Si se consideran los tiempos de precultivo, en el ensayo a escala matraz se alcanzó la fase estacionaria aproximadamente a las 52 horas, y en el fermentador N°2 a las 48 horas. Sin embargo, el porcentaje de bioconversión obtenido fue de 17 %. Quizá el agregado de sustrato debería realizarse al momento de inocular o a una OD₆₀₀ similar a la del ensayo a escala matraz (que sería entre las 2 a 3 horas posteriores a inocular el fermentador en estas condiciones). Esto se concluye considerando que la biotransformación es posible si se agrega el sustrato al mismo tiempo que el inóculo, como fue observado en el cultivo de células para el ensayo con células en reposo (sección 2.6.1.3). Otra posibilidad es realizar el precultivo en presencia del sustrato u otro esteroide para inducir la expresión de los genes que codifican para la 3 α -HSDH.

Por otro lado, al igual que en el experimento en fermentador N°1, se tuvieron problemas asociados a la generación de espuma (por lo que se agregó antiespumantes) y a la adhesión de las células de *Tsukamurella* sp. a la pared del fermentador (Fig. 2-27). Estas son limitantes que

deben ser resultados para poder mejorar la biodisponibilidad del sustrato al biocatalizador, y así alcanzar mejores porcentajes de bioconversión en el ensayo a escala de fermentador.

2.7. Análisis de la secuencia del genoma completo de *Tsukamurella* sp.

Se realizó el secuenciado del genoma completo de la cepa de *Tsukamurella* sp. aislada de los efluentes de lavado de lana, y denominada M9B2. Como fue discutido en las secciones anteriores, esta cepa resultó ser un biocatalizador de sustratos esteroideos novedoso encontrado en el marco de esta tesis. Fue demostrada su capacidad de utilizar el colesterol, ácido cólico y ácido litocólico como fuente de carbono y energía. A su vez, se detectaron distintos productos de biotransformación de estos sustratos mediante dicha cepa. Se observaron productos de degradación del colesterol (ver tablas 2-10 y 2-17); y se obtuvo el ácido 3-cetolitocólico y ácido 3-cetocólico mediante biotransformaciones. Por tanto, resultó atractivo realizar el secuenciado del genoma completo de dicha cepa, con el fin de identificar las secuencias que codifican para las enzimas relacionadas al metabolismo de esteroides.

La secuenciación se realizó en el servicio NU-OMICS de Northumbria University, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido; en el marco de una colaboración con los Dres. Justin Perry, Gary Black y Darren Smith. El análisis de los archivos obtenidos y el ensamblado del genoma utilizando como molde el genoma de referencia de *T. paurometabola* DSM 20162 (Número de acceso GenBank CP001966.1) fueron realizados por el Dr. Adnan Tariq (NU-OMICS, Northumbria University) (Munk et al. 2011). El genoma de *Tsukamurella* sp. resultó en un genoma circular con el tamaño de 4.729.857 pb y el contenido de G+C fue de 72.50 %. Se obtuvieron un total de 113 contigs.

La comparación de la secuencia del gen ARNr 16S de *Tsukamurella* sp. M9B2 (1200 pb) presenta un 99.84 % a 99.0 % de identidad con la secuencia de gen ARNr 16S de varias especies del género *Tsukamurella*, con 100 % de cobertura. Estas secuencias pertenecen a *T. pseudoespumae*; *T. tyrosinsolvans*; *T. hominis*, *T. strandjordii*, *T. inchonensis*; *T. paurometabola* y *T. pulmonis*. Se realizó la construcción de un árbol filogenético para realizar un estudio comparativo de las secuencias del gen ARNr 16S (Fig. 2-28), utilizando como grupo externo la secuencia de la cepa

tipo de *Dietzia cinnamea*. Del análisis del árbol filogenético se desprende que la cepa se encuentra en el grupo de las cepas pertenecientes a *T. pulmonis*, aunque el valor de Bootstrap en el nodo es bajo para considerarlo confiable. Por lo general se consideran nodos consistentes aquellos que sean mayores o iguales al 70 %. Estos resultados demuestran que sería necesario utilizar otra región génica para lograr la identificación a nivel de especie. En concordancia con esto, estudios previos han demostrado que la mayoría de las especies de *Tsukamurella* tienen secuencias del gen ARNr 16S altamente similares (>99 % de identidad), por lo que este gen no puede ser confiablemente utilizado para la identificación a nivel de especie (Woo et al. 2003).

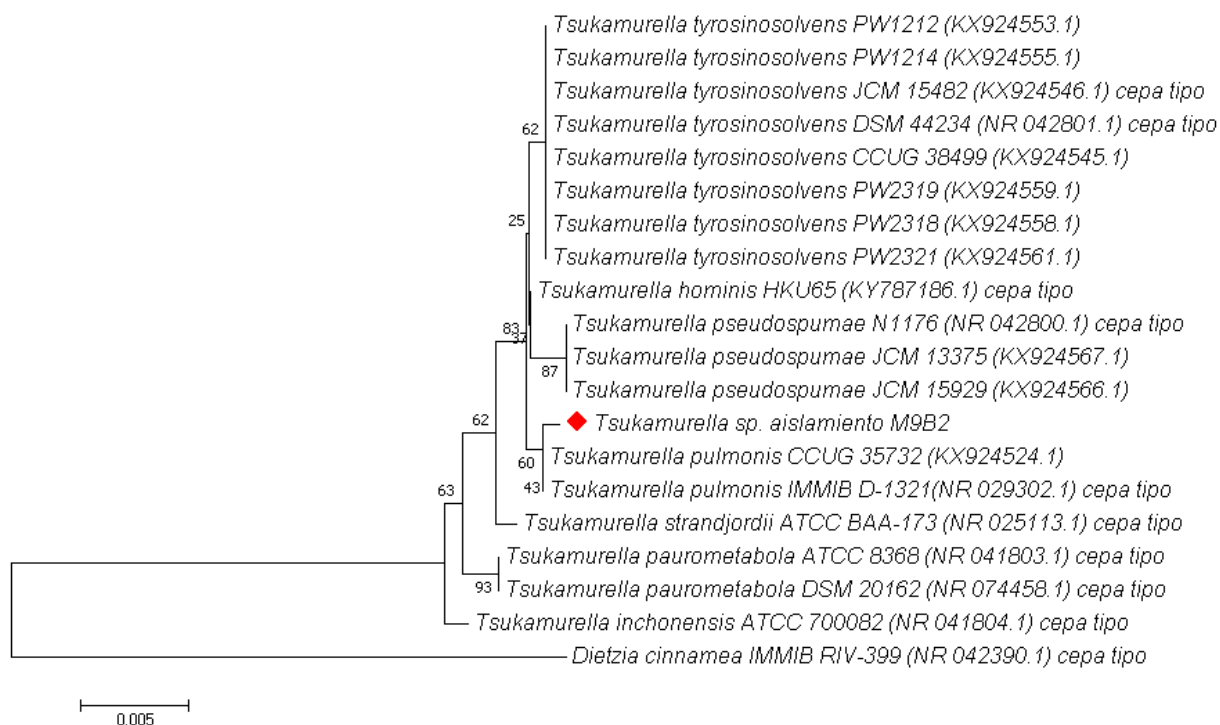


Figura 2- 28. Árbol filogenético construido empleando el método Neighbour-Joining basado en las secuencias del gen ARNr 16S de la cepa asilada: *Tsukamurella* sp. M9B2 (marcada con un rombo rojo) y cepas relacionadas de especies del género *Tsukamurella*. Los valores de Bootstrap fueron calculados desde 1000 réplicas y expresados en porcentaje. Los nombres de las cepas y los números de acceso del GenBank son citados de la base de datos GenBank del NCBI.

Secuencias de otros genes diana alternativos han sido exitosamente usados para la diferenciación a nivel de especie en otros géneros bacterianos, como *ssrA* (ARN pequeño estable); *secA* (ATPasa de secreción); *rpoB* (subunidad beta de la ARN polimerasa) y *groEL* (proteína de choque térmico 60) (Conville et al. 2006; Adékambi et al. 2008; Hossain et al. 2012; Osawa et al. 2015). Sin embargo, Teng *et al.* (2017) demostraron que en el género *Tsukamurella* sp. las secuencias de los genes *ssrA*, *secA* y *rpoB* no son útiles para diferenciar entre especies (Teng et al. 2017). En dicho estudio evidenciaron que la secuencia del gen *groEL* es mejor que la del gen del ARNr 16S para identificar a nivel de especie en el género *Tsukamurella*.

El genoma de referencia de *T. paurometabola* DSM 20162 (Número de acceso GenBank CP001966.1), fue el primer genoma secuenciado y anotado de una bacteria del género *Tsukamurella* (Munk et al. 2011). Este fue utilizado para identificar las secuencias que codifican para determinados genes en el genoma de *Tsukamurella* sp. M9B2, mediante comparación de secuencias con el programa de alineamiento de secuencias nucleotídicas del BLAST (NCBI) (Altschul et al. 1990). La secuencia del gen *groEL* presentó 676 pb. La comparación de esta secuencia presenta los siguientes porcentajes de identidad con las secuencias de los genes de *groEL* de las cepas tipo: 98.82 % con *T. hominis* HKU65 (KY787186.1), 97.78 % con *T. inchonensis* ATCC 70082 (KX958013.19), 97.64 % con *T. pulmonis* CCUG 35732 (KX957973.1) y 97.3 % con *T. tyrosolvensis* CCUG 38499 (KX 957994.1), todas con 100% de cobertura. Las secuencias del gen *GroEL* de otras cepas tipo presentan porcentajes de identidad iguales o menores al 94 % con la secuencia en análisis. Para esas mismas cepas tipo, la secuencia del gen ARNr 16S había presentado un porcentaje de identidad de 99.84 % con *T. pulmonis* CCUG 35732 (KX957973.1), 99.75 % con *T. hominis* HKU65 (KY787186.1), 99.67 % con *T. tyrosolvensis* CCUG 38499 (KX 957994.1) y 99.34 % con *T. inchonensis* ATCC 70082 (KX958013.19), todas con 100 % de cobertura. En el trabajo previo realizado por Teng *et al.* (2017) analizaron 50 cepas de *Tsukamurella* sp., y encontraron que existe una identidad intraespecie del gen *GroEL* entre 98.7% a 100 % de identidad (Teng et al. 2017). Considerando estas observaciones, la única cepa que presentó ese rango de identidad del gen *GroEL* con la cepa en estudio fue *T. hominis* HKU65 (98.82 % de identidad), por lo que sería la cepa más cercanamente relacionada a la cepa aislada.

El genoma de referencia de *T. paurometabola* DSM 20162 fue utilizado para identificar secuencias de los genes que codifican para enzimas relacionadas al metabolismo de esteroides (Munk et al. 2011). También se utilizó el genoma de *Tsukamurella tyrosolvensis* MH1 (CP019066.1), el cual fue secuenciado y anotado en estudios previos (Chiciudean et al. 2018).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con el genoma de *Tsukamurella* sp. M9B2 utilizando el programa alineamiento de secuencias nucleotídicas del BLAST (NCBI) (Altschul et al. 1990). De esta manera, se logró identificar en *Tsukamurella* sp. M9B2 la secuencia de los genes que codifican para las enzimas que se detallan en la tabla 2-26.

El gen *SMO* es el único gen que no estaba anotado en el genoma de referencia de *T. paurometabola* y si en el de *T. tyrosolvensis* MH1.

Analizando los resultados mostrados en la tabla 2-26 se confirma que *Tsukamurella* sp. M9B2 presenta varias enzimas involucradas en la vía de degradación del colesterol, como era de esperar ya que fue demostrado que es capaz de crecer utilizando colesterol como fuente de carbono y energía. Se identificaron los genes que codifican para las enzimas colesterol oxidasa y colesterol deshidrogenasa 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, involucradas en el primer paso de la degradación del colesterol. También fueron detectados los genes que codifican para las enzimas 3-cetoesteroide-9 α monooxigenasa y C27- monooxigenasa (CYP125) involucradas en la degradación del núcleo esteroidal y de la cadena lateral del colesterol, como fue introducido en la sección 1.3.2.1. La identificación de los genes *kshA* y *kshB* abre la posibilidad de realizar futuras investigaciones enfocadas a la producción de los intermediarios AD y ADD, valiosos precursores para la síntesis farmacéutica de drogas esteroidales. Estrategias de ingeniería genética podrían ser realizadas para evitar la expresión de la enzima 3-cetoesteroide-9 α -hidroxilasa (KsH) involucrada en la degradación de AD y ADD. Estudios previos han trabajado en la supresión de genes que codifican para dicha enzima en bacterias de otros géneros, como *Rhodococcus* y *Mycobacterium*, demostrando que conlleva a la acumulación de ADD (Yeh et al. 2014; Liu et al. 2018; Shao et al. 2019).

Tabla 2- 26. Genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de esteroides, identificados en el genoma de *Tsukamurella* sp. M9B2. Descripción de las enzimas según información encontrada en la base de datos BRENDA (www.brenda-enzymes.org) (Jeske et al. 2019).

Gen/es	Enzima	Descripción
<i>kshA</i> y <i>kshB</i>	3-cetoesteroide-9 α monooxigenasa (EC. 1.14.13.142)	Involucrada en la degradación del colesterol. Es un sistema de dos componentes, una oxigenasa (KshA) y una ferredoxin reductasa (KshB). El producto de la enzima es inestable y se descompone espontáneamente.
<i>hdhA</i>	7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (EC. 1.1.1.159)	Cataliza la oxidación del grupo hidroxilo en C7 en el ácido cólico y quenodesoxicólico, llevando a 7-cetocólico y 7-cetoquenodesoxicólico respectivamente. Muestra actividad sobre muchos sustratos que presentan grupo hidroxilo en la posición 7 del núcleo esteroidal. Puede catalizar la interconversión de 7-ceto a 7 α -hidroxilo en ácidos biliares. Requiere NAD(P) ⁺ . Generalmente es inducible por ácidos biliares.
<i>hsdD</i>	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (EC. 1.1.1.51)	Involucrada en la degradación del colesterol. Es bifuncional, contiene un dominio 3- β -hidroxi- Δ 5-esteroide deshidrogenasa (EC 1.1.1.145) y un dominio esteroide isomerasa (EC 5.3.3.1). Cataliza la conversión de colesterol a colesteroína, mediante dos reacciones en secuencia. Requiere NAD ⁺ .
<i>hsdA</i>	3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ carbonil reductasa (EC. 1.1.1.50)	Cataliza la oxidorreducción en C3 de una variedad de C19-C27 esteroides, incluidos androstendiona, ácido cólico, entre otros. Requiere NAD(P) ⁺ .
<i>DET2</i>	3-oxo-5 α -esteroide-4-deshidrogenasa (EC: 1.3.99.5)	Involucrada en la degradación de esteroides, como androsterona. Cataliza la deshidrogenación en C4, formando el producto Δ 4-cetoesteroide. Es una flavoproteína, requiere NAD(P) ⁺ . Sus sustratos son 5 α -3-cetoesteroides.
<i>choA</i> y <i>choD</i>	Colesterol oxidasa (EC. 1.1.36)	Involucrada en la degradación del colesterol. Es una flavoenzima bifuncional que cataliza la oxidación e isomerización en el colesterol para formar la colesteroína.
<i>SMO</i>	C27- monooxigenasa (EC. 1.14.15.29)	Involucrada en la degradación del colesterol. Inicia la degradación de la cadena lateral del colesterol. Su sustrato es la colesteroína. Cataliza la hidroxilación de C26, seguida por la oxidación del alcohol a ácido carboxílico, pasando por el aldehído intermediario. Es un sistema de dos componentes: una P450 oxigenasa (CYP 125) y una ferredoxin reductasa.

Por otro lado, también fueron identificados en el genoma de *Tsukamurella* sp. M9B2 genes que codifican para enzimas que aceptan ácidos biliares como sustratos. La 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa podría catalizar la oxidación del grupo hidroxilo en C7 del ácido cólico, aunque este producto no ha sido identificado en los ensayos de transformación realizados en el marco

de esta tesis. A su vez, se identificó el gen que codifica para la enzima 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, responsable de la transformación de los ácidos litocólico y cólico para obtener los 3-cetoesteroides, productos caracterizados durante este trabajo (secciones 2.6.1 y 2.6.2). También fue identificado el gen que codifica para la enzima 3-oxo-5 α -esteroide-4-deshidrogenasa, la cual puede utilizar como sustrato los 3-cetoesteroides obtenidos a partir de los ácidos biliares, y transformar estos catalizando la formación de un doble enlace en C4-C5. Estos posibles productos no han sido detectados en este trabajo de tesis.

3. Conclusiones y perspectivas

Esta tesis ha aportado al descubrimiento de nuevos biocatalizadores para la síntesis de compuestos esteroidales. Se ha logrado con éxito la transformación del colesterol, ácido litocólico y ácido cólico en productos de mayor valor agregado mediante el uso de células enteras de hongos filamentosos y bacterias.

En primer lugar, se realizó el aislamiento de microorganismos a partir de efluentes de lavado de lana. Se aislaron 25 microorganismos en total, de los cuales la mayoría de ellos fueron identificados utilizando varias metodologías, destacándose la identificación de las bacterias por MALDI-TOF MS. Se logró identificar microorganismos pertenecientes a los géneros: *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Exiguobacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Tsukamurella*, *Streptomyces*, *Talaromyces*, *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Rhodotorula*.

Varias actividades enzimáticas fueron detectadas en los microorganismos aislados mediante un screening de alto rendimiento que utiliza sondas fluorogénicas como sustratos. Se detectó actividad Baeyer-Villiger monooxigenasa en 12 microorganismos (5 bacterias y 7 hongos filamentosos), actividad epoxidasa en 7 microorganismos (2 bacterias y 5 hongos filamentosos), actividad hidrolasa para ésteres de cadena corta en 10 microorganismos (3 bacterias y 7 hongos filamentosos) y actividad hidrolasa para ésteres de cadena larga en 15 microorganismos (7 bacterias y 8 hongos filamentosos). La caracterización enzimática de estos microorganismos resultó de importancia ya que serán incluidos en la colección de microorganismos del LBB y podrán ser utilizados en futuros proyectos. Entre los resultados más promisorios se destaca la obtención de muy altos porcentajes de conversión (mayores al 90 %) para la hidrólisis de ésteres de cadena larga con 3 bacterias y 5 hongos filamentosos. Esto despierta el interés de desarrollar futuras investigaciones enfocadas a la hidrólisis de ésteres y/o la esterificación de sustratos esteroidales utilizando estos microorganismos, ya que han sido recuperados de un hábitat rico en ésteres esteroidales, esteroides y ácidos grasos libres. Resulta atractivo el estudio de la síntesis enzimática de ésteres de fitoesteroides, los cuales son actualmente comercializados como

nutraceúticos para agregar en alimentos y suplementos alimenticios por su demostrada habilidad de reducir los niveles de colesterol en sangre (Vaquero et al. 2016).

Se evaluó la biotransformación del colesterol mediante los microorganismos aislados. Como resultado se obtuvieron productos de transformación con 4 bacterias: *Acinetobacter johnsonii*, *Exiguobacterium* sp., *Tsukamurella* sp. y *Streptomyces* sp., y 5 hongos filamentosos: *Fusarium* sp., *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma koningiopsis* y dos cepas de *Mucor circinelloides*. Es importante señalar que de esta tesis surgió el primer reporte hasta la fecha del estudio de la capacidad de biotransformación del colesterol por parte de microorganismos pertenecientes a los géneros *Tsukamurella*, *Exiguobacterium*, *Trichoderma* y *Mucor* (Giorgi et al. 2019). Estos resultados demuestran que el hábitat seleccionado para el aislamiento de microorganismos y la estrategia utilizada resultaron exitosos para la búsqueda de nuevos biocatalizadores capaces de transformar sustratos esteroidales.

La degradación microbiana completa del esqueleto esteroide es mayoritariamente estudiada para su uso en biorremediación debido al potencial riesgo medioambiental generado por la presencia de esteroides en residuos (Donova & Egorova 2012). En el marco de esta tesis algunos microorganismos, incluyendo las bacterias *Tsukamurella* sp. y *Streptomyces* sp., fueron recuperados en medios mínimos utilizando colesterol como única fuente de carbono y energía. Sin embargo, estos resultados no resultaron novedosos ya que microorganismos pertenecientes a estos géneros habían sido previamente reportados por su capacidad de utilizar el colesterol y otros esteroides como fuente de carbono (Donova 2007; Philipp 2011; Merino et al. 2013). Particularmente, la capacidad de *Tsukamurella* sp. de catabolizar el colesterol ya había sido reportada, pero esta bacteria no había sido estudiada como biocatalizador para la biotransformación de sustratos esteroidales. Por tanto, se estudió la biotransformación del colesterol con esta bacteria, obteniéndose productos de transformación pero en bajos porcentajes de bioconversión. Teniendo en cuenta estos resultados se propone estudiar otras condiciones de ensayo para lograr mejores rendimientos. Esto se podría intentar, por ejemplo, adicionando inhibidores de la enzima 3-cetoesteroide-9 α -hidroxilasa (KsH), la cual cumple un rol clave en la degradación del núcleo esteroide del colesterol. Otra estrategia posible es utilizar

herramientas de biología molecular para la construcción de cepas mutantes a partir de esta cepa nativa, con la supresión de genes que codifican para la actividad enzimática de 9 α -hidroxilación.

La transformación del colesterol por *Trichoderma koningiopsis* y dos cepas de *Mucor circinelloides* llevó a la obtención de 7 β -hidroxicolesterol, colesteroona y 5,6-epoxicolesterol respectivamente. Estos compuestos fueron caracterizados estructuralmente utilizando técnicas espectroscópicas (GC-MS y RMN). Si bien los productos obtenidos son interesantes, los porcentajes de bioconversión son muy bajos. Resulta entonces, atractivo para investigaciones posteriores trabajar en la optimización de la biotransformación del colesterol para obtener 7 β -hidroxicolesterol por ser un producto de alto valor comercial.

Con el objetivo de ampliar la aplicación de los biocatalizadores obtenidos para la transformación de otros sustratos fácilmente asequibles, se estudió la biotransformación del ácido litocólico y ácido cólico con las bacterias capaces de transformar el colesterol. La transformación de estos dos sustratos con *Tsukamurella* sp. resultó novedosa ya que no ha sido previamente reportada y llevó a los más altos porcentajes de bioconversión. Se caracterizaron los productos ácido 3-cetolitocólico y ácido 3-cetocólico, ambos de mayor valor que el sustrato de partida respectivo. Fueron estudiadas varias condiciones de biotransformación, entre ellas el uso de distintos agentes dispersantes del sustrato como Tween 80, aceite de ricino etoxilado EO36, alcohol láurico etoxilado EO7 y β -ciclodextrina. Se determinó que los más altos porcentajes de bioconversión son obtenidos utilizando el aceite de ricino etoxilado EO36, el cual es además utilizado por *Tsukamurella* sp. como fuente de carbono.

En base a los estudios realizados, se concluye que la transformación del ácido cólico con células en reposo de *Tsukamurella* sp. lleva a la obtención de los más altos porcentajes de bioconversión en ácido 3-cetocólico (64.4 %). Estos resultados fueron obtenidos utilizando Tween 80 como agente dispersante, por lo que se deberán realizar estudios posteriores de la transformación con células en reposo utilizando aceite de ricino etoxilado EO36 como agente dispersante del ácido cólico.

Se han investigado varias condiciones del ensayo de biotransformación del ácido litocólico con *Tsukamurella* sp. Se encontró que el mayor rendimiento de biotransformación (63.9 %) es

obtenido con células en crecimiento a los 6 días de agregado el sustrato en aceite de ricino etoxilado EO36. Teniendo en cuenta estos resultados exitosos, se realizaron experimentos para lograr la producción del ácido 3-cetolítico a escala de fermentador de 5 L. Hasta el momento, no se ha logrado un buen porcentaje de bioconversión en el escalado. Se deberán continuar realizando experimentos para optimizar las condiciones de este ensayo, particularmente el tiempo y forma de agregado del sustrato. El agregado del sustrato en el precultivo y/o en el momento de la inoculación puede ser adecuado para inducir la expresión del gen que codifica para la enzima responsable de la transformación, la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Además, será necesario abordar los problemas asociados a la generación de espuma en el medio y la adhesión de las células del biocatalizador a la pared del fermentador.

Por último, se realizó el secuenciado del genoma completo de *Tsukamurella* sp. (cepa denominada inicialmente como M9B2). Se identificó las secuencias de genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de esteroides. Fueron identificados genes que codifican para las siguientes enzimas involucradas en la degradación del colesterol: colesterol oxidasa, colesterol deshidrogenasa 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3-cetoesteroide-9 α monooxigenasa y C27- monooxigenasa (CYP125). También fueron identificados genes que codifican para las siguientes enzimas que pueden utilizar como sustratos los ácidos biliares: 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 7 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 3-oxo-5 α -esteroide-4-deshidrogenasa. Conocer la secuencia de estos genes deja abierta la posibilidad de realizar investigaciones que utilicen estrategias de biología molecular para la construcción de cepas mutantes enfocadas a la producción de compuestos esteroideos valiosos, como lo son los intermediarios de la vía de degradación del colesterol AD y ADD.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis contribuyen a aumentar el conocimiento en el área de la biotransformación de esteroides, aportando nuevos biocatalizadores y el estudio de reacciones para la síntesis de compuestos esteroideos. Los productos obtenidos son de mayor valor comercial que los sustratos de partida. Además, tienen potencial aplicabilidad en la síntesis de fármacos y/o actividad farmacológica por sí mismos.

4. Parte experimental

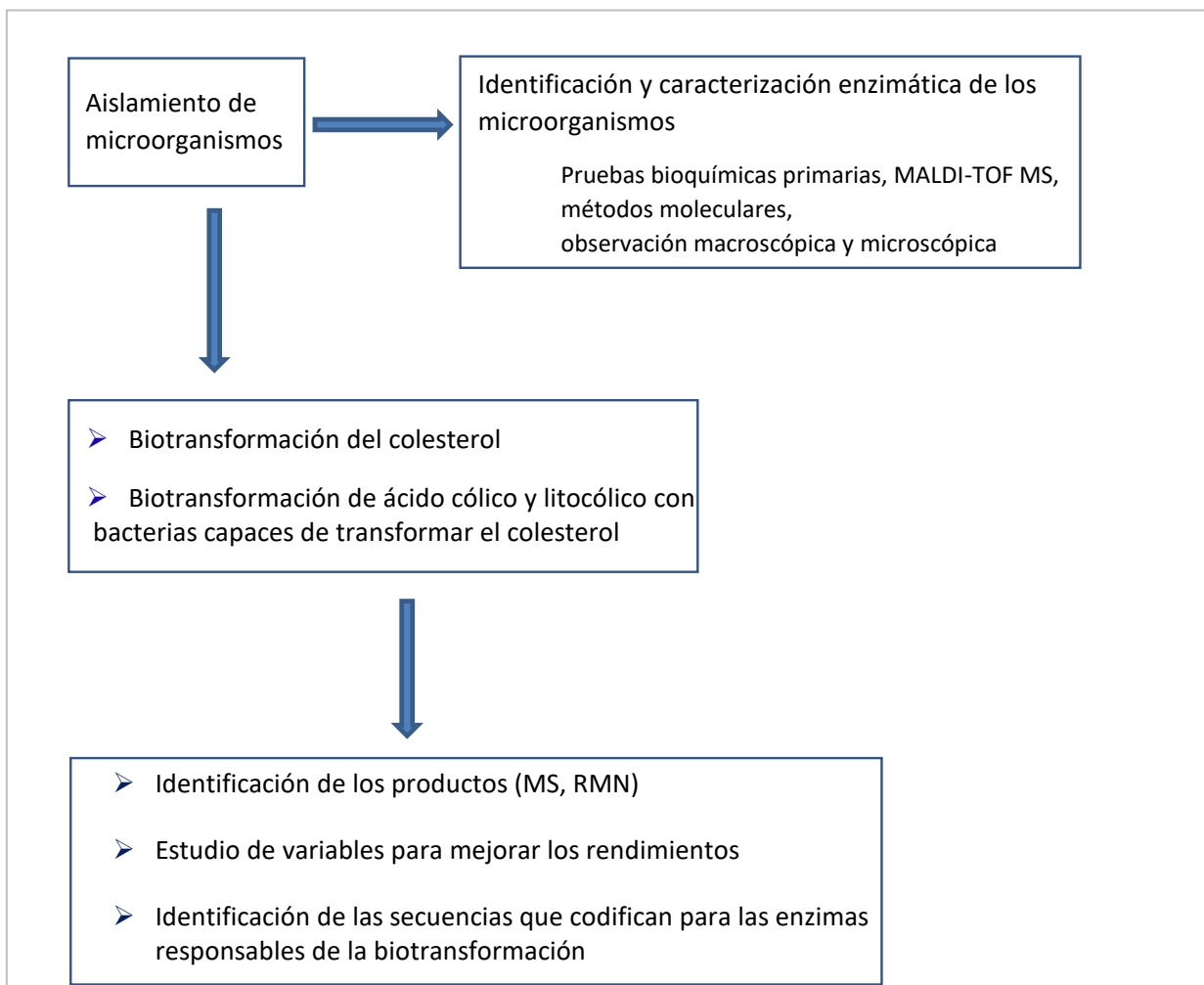


Figura 4- 1. Esquema general de las actividades realizadas.

4.1. Reactivos y materiales

Colesterol (96 %) fue adquirido de Dishman™.

Tween 80®, β -Sitoesterol (>70 %), ácido litocólico (>95 %), ácido cólico (> 98 %) y antifoam 204 fueron adquiridos de Sigma Aldrich®.

Escualano (> 98.0 %) y Δ^4 -Androsten-3,17-diona (> 98.0 %) fueron adquiridos de Tokyo Chemical Industry Co., LTD.

Alcohol laúrico etoxilado (7 moles) y aceite de ricino etoxilado (36 moles) fueron adquiridos de Enzur S.A.

Silicona antiespumante emulsión al 15 % fue adquirida de Droguería Industrial Uruguay.

Las cromatografías en capa fina se desarrollaron en placas de TLC de sílica gel Macherey-Nagel (Polygram® SIL G/UV254, 0,25 mm).

Las cromatografías en columna se llevaron a cabo usando sílica gel para columna (poro 60 Å, partícula 0,063-0,2 mm) Macherey-Nagel ó sílica gel 60 flash (poro 60 Å y partícula 0,04-0,2 mm) Macherey-Nagel, según el caso.

Revelador anisaldehído: 1 mL de anisaldehído (Sigma Aldrich®) mezclado con 4 mL de ácido sulfúrico concentrado y 95 mL de etanol 95 %.

4.2. Aislamiento de microorganismos a partir de un hábitat rico en esteroides

Se realizó la búsqueda de microorganismos capaces de biotransformar colesterol a partir de un hábitat rico en esteroides como son los efluentes del lavadero de lana LANOSUR S.A. (34° 48' 43.32" S, 56° 10' 14.57" O). Se recogieron dos muestras, una del efluente de lavado tomada de distintas zonas de la pileta de tratamiento aerobio (M1), y otra del suelo adyacente a las pilas de lavado (M2) (Fig. 4-2).

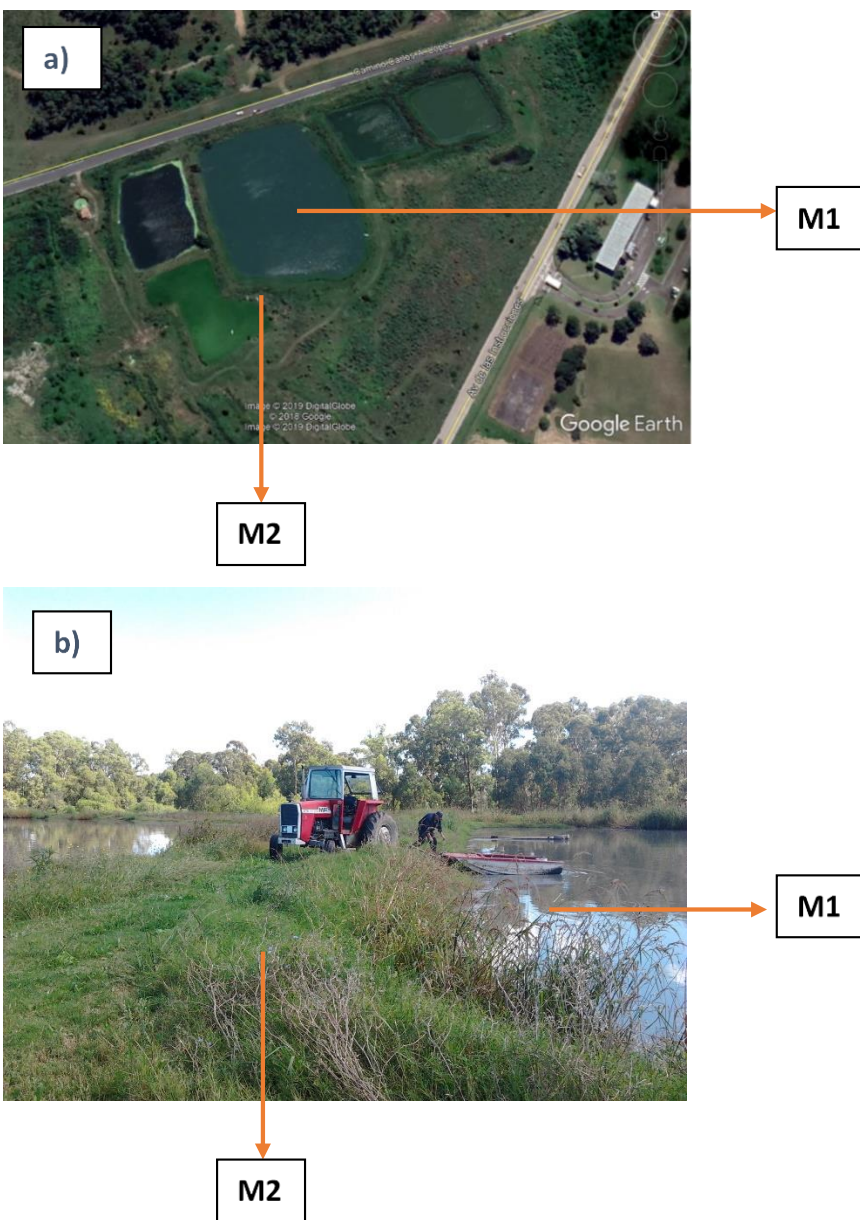


Figura 4- 2. Lavadero de lana donde se recolectaron muestras para el aislamiento de microorganismos, M1 y M2. **a)** Imagen de Google Earth Pro. **b)** Foto del lugar.

Para el aislamiento de los microorganismos se siguieron dos estrategias diferentes respecto a la fuente de carbono disponible en el medio de cultivo. En una de ellas se utilizó el colesterol como única fuente de carbono y energía y se adicionó colesterol en una concentración de 0.1% (disperso en Tween 80) a un medio que contenía otras fuentes de carbono y energía. Se buscó de esta forma aislar aquellos microorganismos capaces de crecer en presencia del esteroide.

Se inocularon 10 mL de M1 o 10 g de M2 en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo. Se utilizaron como medios de cultivo los medios mínimos M9 e YNB con colesterol al 0.1% y los medios nutrientes TSB y PDB con 0.1% de colesterol (Anexo I). Para dispersar el colesterol se preparó una solución stock de 1 g del esteroide en 100 mL de solución Tween 80 1% y 10 mL de esa solución fueron agregados a 100 mL de medio de cultivo. Los matraces se incubaron en agitador orbital 150 rpm y 28 °C. Se realizaron tomas de 0.1 mL de los cultivos en TSB y M9 a las 24, 48 y 72 h y de los cultivos en YNB y PDB a las 48 h, 72 h, 7 y 15 días. Las muestras se sembraron mediante la metodología de aislamiento por estrías en los mismos medios de cultivo pero en estado sólido (TSA, PDA, M9 sólido e YNB sólido) (Anexo I), cultivándose a 28 °C.

4.2.1. Conservación de las cepas aisladas

Cepas de bacterias y levaduras

Una colonia aislada de cada cepa se utilizó para inocular 5 mL del medio de cultivo TSB para bacterias y PDB para levaduras. Se incubó en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C durante 24-48 h. Se tomaron alícuotas de 500 µL, se les agregó 250 µL de glicerol 50 % estéril y se guardaron en freezer a -70 °C en criotubos.

Cepas de hongos filamentosos

Se conservaron mediante el método de crecimiento continuo, en tubos de ensayo conteniendo medio sólido inclinado PDA (Anexo I). Se cultivó en estufa a 28°C durante 5-7 días. El tubo se cubrió con una capa de vaselina estéril. Los tubos sellados con Parafilm® se almacenaron en heladera a aproximadamente 4°C.

También se conservaron trozos de agar de la placa crecida con el microorganismo en agua destilada estéril. Se almacenaron en heladera a aproximadamente 4°C.

Se realizaron repiques cada aproximadamente 8 meses.

4.3. Identificación de microorganismos

4.3.1. Identificación de bacterias

4.3.1.1. Identificación mediante prueba bioquímicas primarias

Se realizó el examen microscópico de células vivas y de frotis teñido por coloración Gram. Se determinó así la forma, movilidad y el Gram de las bacterias en estudio.

Se realizaron pruebas primarias según el manual “Cowan and Steel's Manual of Identification of medical bacteria” (Barrow & Feltham 1993). Las pruebas primarias realizadas fueron: morfología, catalasa, oxidasa, prueba de óxido-fermentación (O/F), fermentación de glucosa, presencia de esporas, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis.

4.3.1.2. Identificación mediante MALDI-TOF MS

Todas las bacterias aisladas fueron identificadas utilizando espectroscopia de masas con fuente de ionización MALDI (Desorción/ionización láser asistida por matriz) acoplada a un analizador TOF (Tiempo de vuelo). La identificación se realizó en el Instituto de Química de la Universidade Estadual de Campinas, San Pablo, Brasil, bajo la orientación de la Dra. Anita J. Marsaioli y Dr. Michel R. de Barros Chaves.

Se realizó la extracción de proteínas de membrana de las bacterias a partir de cultivos puros frescos con 24-48 h de crecimiento en TSA. Se preparó una suspensión de la bacteria con una colonia pura de este cultivo en 1.2 mL de Etanol 70% (calidad HPLC). Después de mezclar y centrifugar la suspensión, se descartó el sobrenadante y el precipitado obtenido se secó al aire. Se suspendió el precipitado en ácido fórmico 70% / acetonitrilo (1:1), se centrifugó y se transfirió 1 µL a un pocillo de la matriz, la cual contiene un total de 96 pocillos. Se agregó 1 µL de solución de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich™) en acetonitrilo/agua/ácido trifluoroacético 2.5% (50:47:2.5) (solución matriz) en cada pocillo y se evaporó antes de realizar la espectroscopia de masas. Todas las muestras fueron preparadas y analizadas por duplicado. Los análisis fueron realizados en un MALDI Biotyper Microflex® LT (Bruker Daltonics™) usando un rango de masas desde 2000 a 20000 Da. Se realizaron 240 lecturas de cada espectro haciendo incidir el láser con una frecuencia de 60 Hz desde diferentes posiciones (modo automático). Una

solución bacteriana estándar (BTS, Bruker Daltonics™) fue usada para calibrar el equipo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se utilizó el software Bruker Biotyper® 3.0 para la adquisición y procesamiento de los datos, el cual compara el espectro de masas de cada muestra con espectros de referencia depositados en una base de datos usando un análisis multivariado considerando la posición e intensidad de los picos. Se asigna un puntaje según el nivel de identificación alcanzado: puntaje ≥ 2.000 identificación a nivel de especie; $1.700 \leq \text{puntaje} < 1.999$ identificación a nivel de género; puntaje < 1.699 indica que la identificación obtenida no es confiable (Wieser et al. 2012).

4.3.1.3. Identificación mediante métodos moleculares

Para la identificación molecular de las bacterias aisladas se realizó la amplificación y secuenciado del gen ARN ribosomal 16S.

i) Extracción de ADN Genómico

Se realizó a partir de un cultivo puro incubado aproximadamente 12 horas en 5 mL de TSB en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. Se utilizó el kit comercial “Pure link genomic DNA mini kit” (Invitrogen®).

ii) Visualización y cuantificación de ADN

Se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa 0.8 % (SIGMA) en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X. Para la detección se utilizó agente intercalante Good View 0.05 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Beijing SBS Genetech Co., Ltd.) y visualización con luz UV. Las corridas se realizaron en buffer TBE 0.5X durante 30 minutos a 100 mV. La cuantificación de ADN se realizó por comparación con un estándar comercial (GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

iii) Amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction)

A partir del ADN genómico obtenido se amplificó por PCR el gen ARN ribosomal 16S utilizando los oligonucleótidos universales 27 forward (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492 reverse (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). La reacción se realizó en un volumen final de 50 μL conteniendo 5 μL de 10X PCR buffer -Mg, 2 μL de dNTP mix (10 mM), 1.5 μL MgCl_2 (50 mM), 2.5 μL de cada primer (10 μM), 34.1 μL de agua mili-Q estéril, 0.4 μL de Platinum® Taq ADN

polimerasa (Invitrogen™) y 2 µL de ADN molde de concentración aproximada 100 ng/µL. En la figura 4-3 se muestra el programa de PCR empleado.

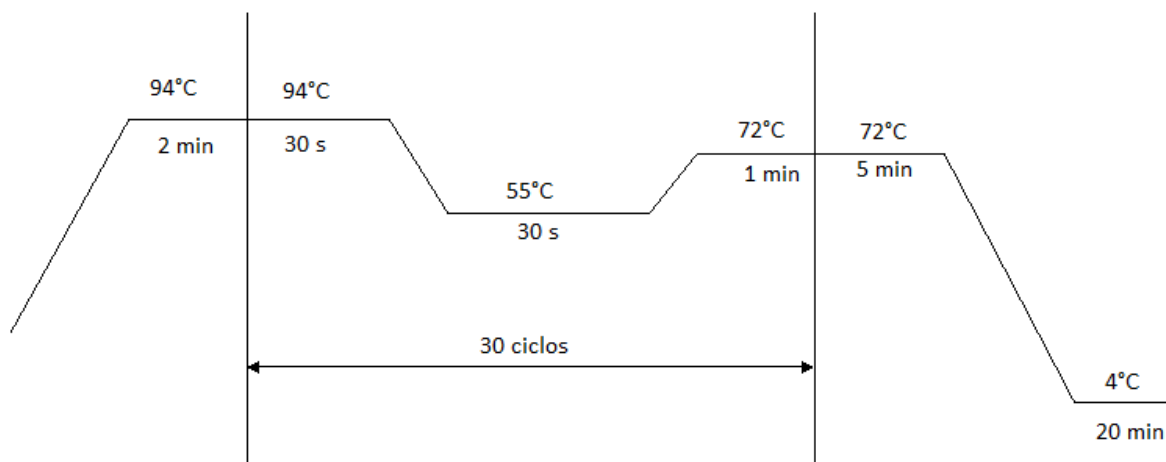


Figura 4- 3. Programa de PCR utilizado para la amplificación del gen del ARN ribosomal 16S de las cepas bacterianas.

La visualización de los productos de amplificación se realizó de igual forma que la visualización del ADN genómico (4.3.1.3-ii).

iv) Secuenciado de los genes del ARN ribosomal 16S y comparación de secuencias

Se realizó el secuenciado en ambas direcciones utilizando el servicio de secuenciación automática de Macrogen (Macrogen Inc., Seúl, Corea) con los primers universales 27 forward, 518 forward (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') y 1492 reverse. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y ensambladas utilizando el programa Vector NTI8 (Informax Inc). La secuencia depurada fue comparada con respecto a secuencias tipo depositadas utilizando el programa BLAST en la base de datos GenBank (National Center for Biotechnology Information) (Altschul et al. 1990).

4.3.2. Identificación de hongos filamentosos y levaduras

4.3.2.1. Observación macroscópica y microscópica

Se realizó la observación macroscópica de los hongos filamentosos crecidos en PDA y la observación microscópica de las estructuras fúngicas según la metodología y las claves indicadas por Pitt y Hocking (Pitt & Hocking 1997).

Para las levaduras se realizó el examen microscópico de frotis teñido por coloración Gram.

4.3.2.2. Identificación mediante métodos moleculares

Todos los hongos aislados fueron identificados mediante el análisis de la secuencia de la región ITS1-5.8S ADN ribosomal-ITS2 (ITS). Las levaduras fueron identificadas mediante el análisis de la secuencia del dominio D1/D2 del ADN ribosomal 26S. Además, los hongos filamentosos denominados Y2, H4 y H3 fueron identificados a nivel de especie mediante la amplificación de secuencias con otros primers, como es detallado más adelante.

i) Extracción de ADN Genómico

Se realizó a partir de un cultivo en PDA con 3 a 5 días de crecimiento a 28 °C, utilizando el kit comercial “ZR Fungal/ Bacterial DNA MiniPrep™” (Zymo Research™).

ii) Visualización y cuantificación de ADN

La visualización y cuantificación del ADN se realizó de igual forma que para las cepas bacterianas (4.3.1.3-ii).

iii) Amplificación por PCR

A partir de los ADN genómicos obtenidos se amplificó por PCR:

- La región ITS de hongos filamentosos utilizando los primers universales ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').
- La región ITS y el dominio D1/D2 del ADN ribosomal 26S de levaduras utilizando los primers universales ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3').

La reacción se realizó en un volumen final de 50 μL conteniendo 5 μL de 10X PCR buffer - Mg, 2 μL de dNTP mix (10 mM), 1.5 μL MgCl_2 (50 mM), 2.5 μL de cada primer (10 μM), 34.1 μL de agua mili-Q estéril, 0.4 μL de Platinum® Taq ADN polimerasa (Invitrogen™) y 2 μL de ADN molde de concentración aproximada 100 ng/ μL . En la figura 4-4 se muestra el programa de PCR empleado.

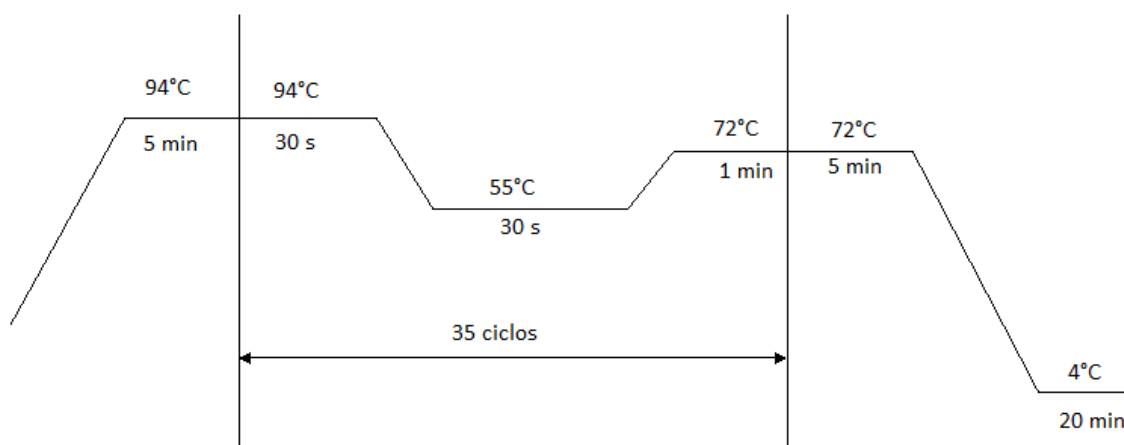


Figura 4- 4. Programa de PCR utilizado para la amplificación de la región ITS de hongos filamentosos y la región ITS y el dominio D1/D2 del ADN ribosomal 26S de levaduras.

La visualización de los productos de amplificación se realizó de igual forma que la visualización del ADN genómico (4.3.1.3-ii).

iv) Secuenciado de la región ITS1-5.8S ADN ribosomal-ITS2 y del dominio D1/D2 del ARN ribosomal 26S y comparación de secuencias

Se realizó el secuenciado utilizando el servicio de secuenciación automática de MacroGen (MacroGen Inc., Seúl, Corea). EL secuenciado de la región ITS de los hongos filamentosos se realizó en ambas direcciones con los primers universales ITS1F y ITS4. EL secuenciado del dominio D1/D2 del ADN ribosomal 26S de levaduras se realizó en una única dirección con el primer universal NL4. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y ensambladas utilizando el programa Vector NTI8 (Informax Inc). La secuencia depurada fue comparada con respecto a

secuencias depositadas utilizando el programa BLAST en las base de datos GenBank (National Center for Biotechnology Information) (Altschul et al. 1990).

4.3.2.2.1. Identificación a nivel de especie del hongo filamentoso denominado H3

Luego de la extracción y visualización del ADN genómico (ver 4.3.2.2 secciones *i*, *ii*), se realizó el el secuenciado del gen del factor de elongación 1 α (*tef1*) para la cepa *Trichoderma* H3, como es explicado a continuación.

i) Amplificación por PCR

A partir de los ADN genómicos obtenidos se amplificó por PCR el gen *tef1* utilizando los primers EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') y TEF1rev (5'-GCCATCCTTGGAGATACCAGC-3')(Carbone & Kohn 1999; Samuels et al. 2002) siguiendo la metodología reportada por Samuels y colaboradores (Samuels et al. 2006).

La reacción se realizó en un volumen final de 50 μ L conteniendo 5 μ L de 10X PCR buffer -Mg, 1 μ L de dNTP mix (10 mM), 1.5 μ L MgCl₂ (50 mM), 1.25 μ L de cada primer (10 μ M), 35.75 μ L de agua mili-Q estéril, 0.25 μ L de Platinum® Taq ADN polimerasa (Invitrogen™) y 4 μ L de ADN molde de concentración aproximada 100 ng/ μ L. En la figura 4-5 se muestra el programa de PCR empleado.

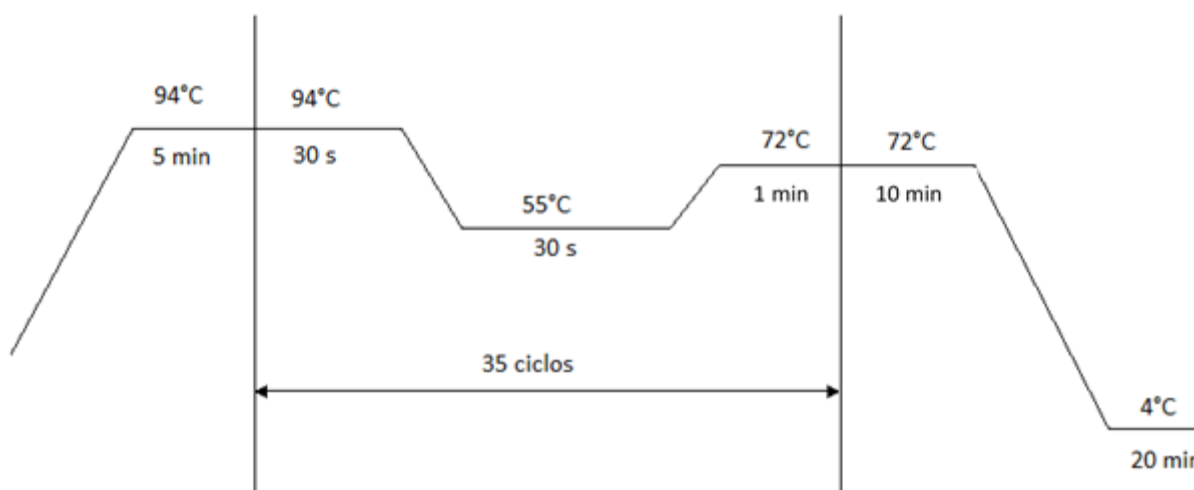


Figura 4- 5. Programa de PCR utilizado para la amplificación de la región ITS y del gen *tef1*.

La visualización de los productos de amplificación se realizó de igual forma que la visualización del ADN genómico (4.3.1.3-ii).

ii) Secuenciado del gen *tef1* y comparación de secuencias

Se realizó el secuenciado utilizando el servicio de secuenciación automática de Macrogen (Macrogen Inc., Seúl, Corea). EL secuenciado se realizó en ambas direcciones con los primers EF1-728F y TEF1rev para el gen *tef1*. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y ensambladas utilizando el programa Vector NTI8 (Informax Inc). La secuencia depurada fue comparada con respecto a secuencias depositadas utilizando el programa BLAST en las bases de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Altschul et al. 1990), MycoBank (<http://www.mycobank.org>) (Robert et al. 2005) y *TrichOKEY* (<http://www.ISTH.info>) (Druzhinina et al. 2005).

4.4. Detección de actividades enzimáticas de los microorganismos aislados: screening de alto rendimiento (HTS)

i) Screening de alto rendimiento (HTS)

Se realizó la detección de actividades enzimáticas de los microorganismos aislados mediante un screening de alto rendimiento (HTS por sus siglas en inglés: High Throughput Screening) utilizando sondas fluorogénicas. Este screening se realizó en el Instituto de Química de la Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), San Pablo, Brasil bajo la orientación de la Dra. Anita J. Marsaioli y la Dra. María Lair Sabóia; siguiendo la metodología descrita por Da Cruz y colaboradores (Da Cruz et al. 2010).

Los microorganismos fueron cultivados a 30 °C en placas de Petri: las bacterias en medio TSA durante 24 h, las levaduras en PDA durante 48 h y los hongos filamentosos en PDA durante 72 h. Se prepararon suspensiones celulares transfiriendo aproximadamente 2 mg de células a *eppendorfs* estériles, suspendiendo en buffer borato pH 7.4 (20 mM) y homogeneizando en vórtex. Las suspensiones fueron diluidas con el mismo buffer para obtener una concentración final de 0.2 mg/mL de células para bacterias y levaduras y una concentración final de 1 mg/mL de células para hongos filamentosos.

Para los ensayos se preparó una solución de las sondas fluorogénicas en acetonitrilo:agua (1:1). Las sondas fluorogénicas (Fig. 4-6) y sus productos de transformación fueron sintetizados previamente por el grupo de investigación de la Dra. Anita J. Marsaioli de la UNICAMP.

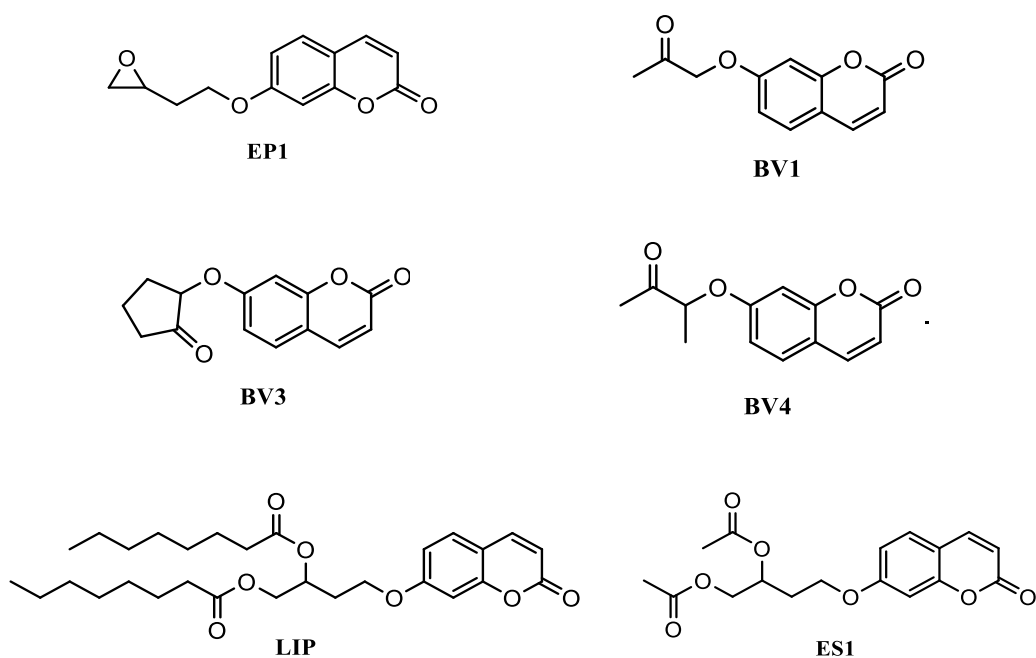


Figura 4- 6. Compuestos usados como sondas fluorogénicas en el ensayo HTS.

Los ensayos se realizaron en microplacas de cultivo celular de 96 pocillos (Costar®) con un volumen de reacción final de 200 μL por pocillo conteniendo 10 μL de NaIO_3 (20 mmol/L), 80 μL de albúmina de suero bovino (BSA) (5 mg/mL), 100 μL de suspensión celular (0.2 mg/mL para bacterias y levaduras, 1 mg/mL para hongos filamentosos) y 10 μL de solución de sonda (2 mmol/L). Cada ensayo fue realizado por cuádruplicado, con sus correspondientes controles positivo (con el agregado del producto de reacción para esa sonda) y negativo (sin agregado de suspensión celular) por duplicado. Las microplacas se incubaron en agitador orbital a 180 rpm y 28 °C.

En estos ensayos, si el microorganismo en estudio presenta la actividad catalítica a detectar, el sustrato será transformado vía catálisis enzimática y el producto de biotransformación sufre una serie de reacciones en cascada que llevan a la liberación del anión umbeliferona, el cual es fluorescente y puede ser detectado a 460 nm. El aumento tiempo-dependiente de la intensidad de fluorescencia debido a la formación de ese fluoróforo es monitoreado mediante espectrofotometría UV-VIS, detectándose así la actividad catalítica en estudio. La intensidad de

la señal de fluorescencia es dependiente de la concentración, relacionándose con la cantidad de umbeliferona producida (Badalassi et al. 2000).

En el caso de las sondas para detectar actividades hidrolasas (esterasas y lipasas) el producto resultante de la acción enzimática es un diol, el cual sufre una oxidación con ruptura del enlace carbono-carbono mediada por el periodato de sodio presente en el medio de reacción, seguido de una β -eliminación catalizada por BSA a pH básico y generando así el anión umbeliferona que es fluorescente en el pH de trabajo (Fig. 4-7) (Badalassi et al. 2000; Reetz 2006).

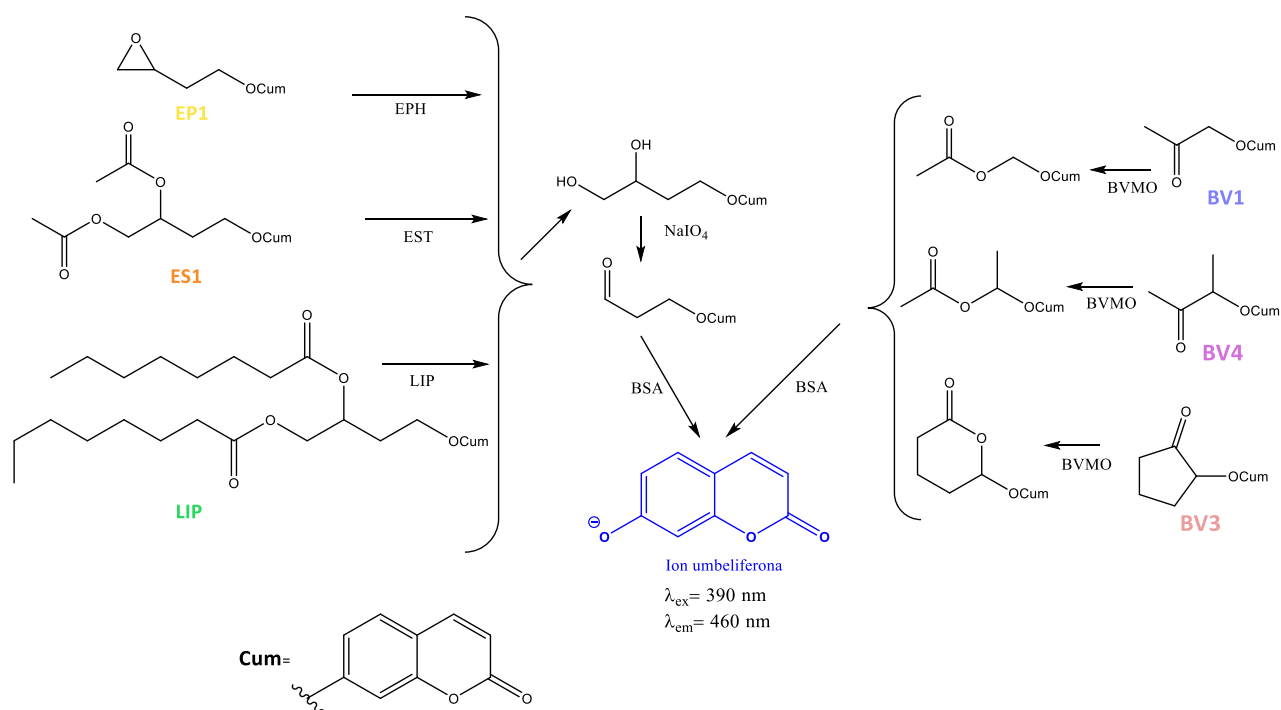


Figura 4- 7. Esquema de ensayo enzimático utilizando sondas fluorogénicas derivadas de umbeliferona para la detección de hidrolasas y Baeyer-Villiger monooxigenasas. EPH= epoxidasa; EST= esterasa; LIP= lipasa; BVMO: Baeyer-Villiger monooxigenasa; Cum= cumarina; BSA=albúmina de suero bovino. Adaptado de (Zucoloto 2011).

En la reacción enzimática realizada por las Baeyer-Villiger monooxigenasas (BVMO) la enzima cataliza la incorporación de un átomo de oxígeno en posición alfa al grupo carbonilo, y esa inserción es selectiva hacia el lado del enlace éter formándose el éster o lactona correspondiente a la sonda fluorogénica utilizada. Este último es inestable y rápidamente se

hidroliza, seguido por una reacción de β -eliminación catalizada por BSA llevando así a la liberación del ion umbeliferona (Fig. 4-6) (Sicard et al. 2005; Reymond 2009).

Las reacciones fueron monitoreadas por medida de fluorescencia en lector de microplacas *FlashScan53* (Analytic Jena®), con longitud de onda de excitación 390 nm y longitud de onda de emisión 460 nm. Se monitorearon los ensayos cada 24 h hasta las 72 h de reacción para bacterias y levaduras, y hasta las 96 h de reacción para hongos filamentosos.

ii) Cálculo de porcentajes de bioconversión

A partir de las medidas de fluorescencia obtenidas a los distintos tiempos de reacción (24 h, 48 h, 72 h y 96 h) se calculó el porcentaje de bioconversión de la siguiente manera:

$$\% \text{ bioconversión} = \frac{(\text{fluorescencia ensayo} - \text{fluorescencia control negativo}) \times 100}{\text{fluorescencia control positivo}}$$

Para el cálculo se utilizaron los valores promedio de las mediadas de fluorescencia de los cuádruplicados y duplicados de los ensayos y controles respectivamente. Si el porcentaje de bioconversión es igual o mayor a 5 % se considera que el microorganismo presenta la actividad catalítica en estudio (Porto da Silva 2012).

4.5. Biotransformación del colesterol

4.5.1. Screening primario de biotransformación del colesterol mediante los microorganismos aislados y de la colección del LBB

Todos los microorganismos aislados y dos cepas pertenecientes a la colección de microorganismos del Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones (LBB), previamente identificadas como *Rhodococcus* sp. y *Aspergillus terreus*, fueron testeados por su habilidad para transformar el colesterol.

4.5.1.1. Ensayos de biotransformación con bacterias

Para cada cepa se inoculó 5 mL de TSB tomando una colonia desde un cultivo puro en medio sólido TSA con 24 h o 48 h de crecimiento a 28 °C. Estos se incubaron *overnight*, en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. Se inoculó con 100 μ L del cultivo *overnight* un matraz de 50 mL conteniendo 10 mL de TSB. Se incubó en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. A las 24 h de cultivo

se agregó colesterol disperso en 1 mL de solución de Tween 80 al 1 %, obteniendo una concentración final de 1 g/L de colesterol en cada ensayo. A las 96 h de reacción se filtró y el sobrenadante se extrajo tres veces con 10 mL de acetato de etilo cada extracción. La biomasa fue lavada tres veces con el mismo solvente. El extracto orgánico se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró en rotavapor a 35 °C. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado y se realizaron controles: blanco sustrato (sin agregado de inóculo) y blanco bacteria (sin agregado de colesterol).

4.5.1.2. Ensayos de biotransformación con hongos filamentosos

Se preparó una solución de esporas en suero fisiológico estéril a partir de cultivos puros en PDA con 7 días de crecimiento en estufa a 28 °C. La concentración del inóculo se ajustó de forma tal que la concentración final en el matraz sea del orden de 1×10^5 esporas/mL. La concentración del inóculo se determinó por recuento en cámara de Neubauer. Se inoculó un matraz de 250 mL conteniendo 50 mL de PDB. Luego de 48 h de cultivo en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C se agregó el colesterol suspendido en 5 mL de solución de Tween 80 al 1 %, obteniendo una concentración final de 1 g/L de colesterol en el ensayo. Las reacciones fueron monitoreadas mediante TLC (condiciones descriptas en sección 4.5.3). La reacción se detuvo a los 7 días y las células se separaron por centrifugación a 5000 rpm por 20 min. El sobrenadante se extrajo con 50 mL de acetato de etilo tres veces y la biomasa se lavó tres veces con 10 mL del mismo solvente. El extracto orgánico se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró en rotavapor a 35 °C. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y se realizaron los controles: blanco sustrato (sin agregado de inóculo) y blanco hongo (sin agregado de colesterol).

4.5.1.3. Ensayos con levaduras

Para cada cepa se inocularon 5 mL de PDB tomando una colonia desde un cultivo puro en medio sólido PDA con 48 h de crecimiento en estufa a 28 °C. Los mismos se incubaron *overnight* en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. Se inoculó con 100 µL de los cultivos *overnight* un matraz de 50 mL conteniendo 10 mL de PDB. Se incubó en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. A las 48 h de cultivo se agregó colesterol disperso en 1 mL de solución de Tween 80 al 1 %, obteniéndose una concentración final de 1 g/L de colesterol en cada ensayo. A las 96 h de reacción se filtró y el

sobrenadante se extrajo tres veces con 10 mL de acetato de etilo cada extracción. La biomasa fue lavada tres veces con el mismo solvente. El extracto orgánico se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró en rotavapor a 35 °C. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado y se realizaron controles: blanco sustrato (sin agregado de inóculo) y blanco levadura (sin agregado de colesterol).

4.5.2. Ensayos de biotransformación en mayor escala

Los ensayos en los que fueron detectados posibles productos de biotransformación fueron repetidos en mayor escala (400 mg de colesterol) manteniendo las relaciones de volumen utilizadas en el screening primario (sección 4.5.1). En el caso de los ensayos con las bacterias *Streptomyces* sp. y *Tsukamurella* sp. el cultivo en matraz previo al agregado del sustrato se realizó por 48 h, ya que estas bacterias son de crecimiento lento. Además, en el *overnight* del ensayo de *Streptomyces* sp. se agregaron entre 5-10 pelotitas de vidrio de 2mm de diámetro, para evitar la agregación de las células y lograr un caldo de cultivo más homogéneo para la posterior inoculación del matraz de reacción.

4.5.3. Separación y caracterización de los productos obtenidos. Evaluación de los porcentajes de bioconversión.

Los extractos secos fueron retomados en acetato de etilo (AcOEt). La presencia de productos de transformación del colesterol fue confirmada comparando los perfiles obtenidos en TLC y cromatografía gaseosa (GC) de los ensayos y sus respectivos controles. La TLC se realizó sobre placas de sílica gel con indicador de fluorescencia UV 254 nm, usando mezclas de hexano: AcOEt 7:3 y 4:6 (v/v) como fase móvil. Se visualizó con luz UV (254 nm) y revelador anisaldehído seguido por calentamiento a 110 °C.

Previo al análisis por GC, los extractos obtenidos fueron purificados en una columna con sílica gel 60 eluida con AcOEt como fase móvil. Se realizó la detección de posibles productos y la evaluación de los porcentajes de conversión de los mayoritarios de cada una de las reacciones mediante GC utilizando el escualano como estándar interno. Los análisis por GC fueron realizados en un cromatógrafo Shimadzu™ GC-2014 equipado con detector FID y columna

capilar SE52 (0.25 mm × 30 m, 0.25 µm) como fase estacionaria. Hidrógeno (1 mL/min) fue usado como gas portador, y las muestras se inyectaron en modo split (10:01), el volumen de inyección fue de 1 µL. El programa de temperatura fue desde 150 °C (1 min) a 300 °C (20 min) a 25 °C/min. Las temperaturas del inyector y detector fueron mantenidas a 290 °C y 300 °C respectivamente. En estas condiciones, el tiempo de retención del escualano y colesterol fueron 7.4 min y 10.1 min respectivamente.

Todos los productos obtenidos fueron caracterizados mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectroscopia de masas (GC-MS) en el Departamento de Ciencias Aplicadas de Northumbria University, Newcastle upon Tyne, Reino Unido. Previo al análisis por GC-MS, se realizó el fraccionamiento del extracto obtenido de la biotransformación mediante cromatografía al vacío (VLC) con sílica gel 60 flash o en sistema de purificación por cromatografía flash Isolera® con cartuchos Biotage SNAP KP-Sil® eluyendo con mezclas de AcoEt: hexano obteniéndose distintas fracciones. Estas se concentraron y se analizaron por GC-MS en un cromatógrafo Thermo® Trace 1300 GC-ISQ MS con columna TG-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) comenzando en 150 °C y con un gradiente de temperatura de 25 °C/min hasta 300 °C. Inyector, interface y fuente de iones se ajustaron a 290 °C, 300 °C y 200 °C respectivamente. Se utilizó helio (1 mL/min) como gas portador. El volumen de inyección fue de 1 µL, modo Split (10:1), potencial de ionización 70 eV y rango de adquisición 50-500 m/z.

4.5.4. Elucidación estructural de los productos mayoritarios obtenidos con *Trichoderma koningiopsis* (H3) y *Mucor circinelloides* (Y2 y H4)

Los productos de biotransformación mayoritarios; identificados como 7β-hidroxicolesterol, colesterona y 5,6-epoxicolesterol; fueron purificados por cromatografía en columna con sílica gel 60, con gradientes de mezclas de acetato de etilo y hexano como fase móvil.

Los espectros de masas de los productos fueron registrados en un GC-MS Shimadzu™ GCMS-QP 2010 equipado con la columna HP5 (0.25 mm × 30 m, 0.25 µm). Las condiciones de análisis fueron las siguientes: helio como gas portador (1 mL/min), comenzando en 150 °C (1 min) y con un gradiente de temperatura de 25 °C/min hasta 300 °C (25 min). Inyector, interface y fuente

de iones se ajustaron a 290 °C, 300 °C y 200 °C respectivamente. El volumen de inyección fue de 1 µL, modo split (10:1), energía de ionización 70 eV y rango de adquisición 50-500 m/z. Tiempos de retención: colesterol 13.8 min; 7β-hidroxicolesterol 15.9 min, colesteroona 14.8 min y 5,6-epoxicoolesterol 15.9 min.

Los espectros de RMN ^{13}C , COSY y HSQC se obtuvieron en espectrómetro Bruker Avance® III 400 MHz y el espectro de RMN ^1H en Bruker Avance® III 500 MHz, en CDCl_3 como solvente y con TMS como estándar interno. Estos experimentos de RMN fueron realizados en el Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte-Udelar, bajo la orientación de Dr. Guillermo Moyna.

4.5.5. Estudio de la biotransformación del colesterol por *Tsukamurella* sp.

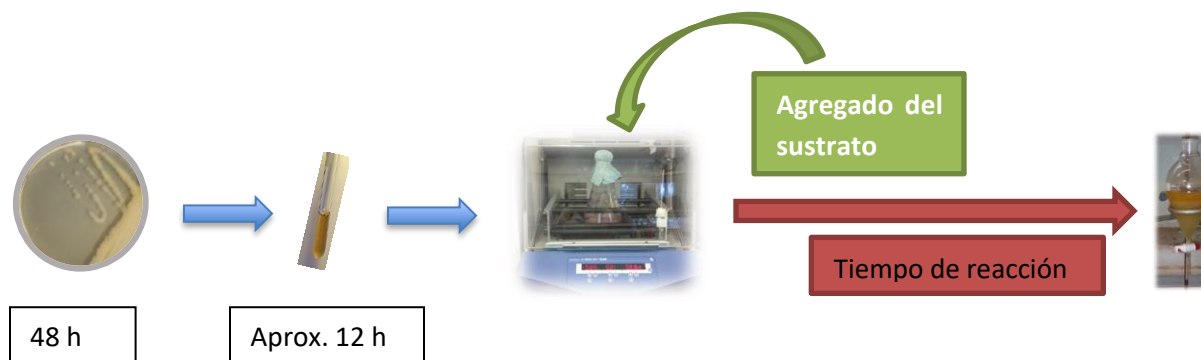


Figura 4- 8. Esquema general de los ensayos de biotransformación del colesterol con *Tsukamurella* sp.

4.5.5.1. Ensayos de biotransformación del colesterol variando del tiempo de agregado de sustrato y tiempo de reacción

Se realizó el ensayo de biotransformación del colesterol con *Tsukamurella* sp. con diferentes tiempos de agregado de sustrato y tiempos de reacción de la siguiente manera (Fig. 4-8):

- A) Agregado de sustrato a las 24 h; tiempo de reacción 48 h
- B) Agregado de sustrato a las 24 h; tiempo de reacción 72 h
- C) Agregado de sustrato a las 48 h; tiempo de reacción 48 h

Se inocularon 5 mL de TSB tomando una colonia desde un cultivo puro de *Tsukamurella* sp. en TSA con 48 h de crecimiento en estufa a 28 °C. Se incubó *overnight* en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. Del cultivo *overnight* se inoculó con 4 mL un matraz de 2 L conteniendo 400 mL de TSB. Se incubó en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. Al tiempo determinado según el ensayo, se agregaron 400 mg de colesterol disperso en 40 mL de solución de Tween 80 al 1 %, obteniéndose una concentración final de 1 g/L de colesterol en cada ensayo. Al finalizar la reacción se filtró y se realizó la extracción del sobrenadante con 400 mL de acetato de etilo cada extracción (tres veces). La biomasa fue lavada tres veces con el mismo solvente. El extracto orgánico se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró en rotavapor a 35 °C. Se realizaron controles: blanco sustrato (sin agregado de inóculo) y blanco bacteria (sin agregado de colesterol).

Los resultados fueron analizados por TLC con fase móvil 4:6 hexano:AcOEt (v/v). Se realizó el fraccionamiento del extracto obtenido de la biotransformación mediante cromatografía al vacío (VLC) con sílica gel 60 flash eluyendo con 100 mL de cada fracción con las siguientes mezclas de AcoEt: hexano (v/v): Hexano/ 10:90/ 20:80/ 30:70 y AcOEt. Las distintas fracciones obtenidas se concentraron en rotavapor a 35 °C y se analizaron por GC-MS. El análisis por GC-MS se llevó a cabo en las condiciones explicadas en la sección 4.5.3.

4.5.5.2. Ensayo de biotransformación del colesterol en medio de cultivo mínimo con colesterol como única fuente de carbono y energía

Se realizó un cultivo *overnight* de *Tsukamurella* sp. siguiendo la metodología explicada en la sección 4.5.5.1. Se inoculó con 1 mL del cultivo *overnight* un matraz de 500 mL conteniendo 100 mL de medio mínimo M9 (Anexo I) y se agregó 100 mg de colesterol disperso en 10 mL de solución de Tween 80 al 1 %, obteniéndose una concentración final de 1 g/L de colesterol en el ensayo. Se incubó en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. A las 24, 48 y 72 h de ensayo se filtró y se realizó la extracción el sobrenadante tres veces con 100 mL de acetato de etilo cada extracción. La biomasa fue lavada tres veces con el mismo solvente. El extracto orgánico se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró en rotavapor a 35 °C. Se realizaron controles: blanco

sustrato (sin agregado de inóculo) y blanco bacteria (sin agregado de colesterol). Los resultados fueron analizados por TLC con fase móvil 4:6 hexano: AcOEt (v/v).

4.5.5.3. Ensayo de biotransformación del colesterol mediante células de *Tsukamurella* sp. en reposo

Se realizó un cultivo *overnight* de *Tsukamurella* sp. siguiendo la metodología explicada en la sección 4.5.5.1. Se inoculó con 1 mL del cultivo *overnight* un matraz de 500 mL conteniendo 100 mL de medio TSB y se agregó 100 mg colesterol disperso en 10 mL de solución de Tween 80 al 1 %, obteniéndose una concentración final de 1 g/L de colesterol en el medio de cultivo. El cultivo se realiza en presencia del sustrato para inducir la expresión de los genes que codifican para las enzimas que lo metabolizan. Se incubó en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. A las 48 h se realizó la separación de las células del sobrenadante centrifugando por 15 minutos a 5000 rpm. Las células fueron lavadas dos veces con 50 mL de suero fisiológico estéril. Aproximadamente 1.5 g de células húmedas se suspendieron en 10 mL de buffer M9 con glucosa para favorecer la regeneración de cofactores (Anexo I). Se agregó 10 mg de colesterol disperso en 1 mL de solución de Tween 80 al 1 %, obteniendo una concentración final de 1 g/L de colesterol en el ensayo. A las 96 horas de reacción, se realizó la extracción el sobrenadante tres veces con 10 mL de acetato de etilo cada extracción. La biomasa fue lavada tres veces con el mismo solvente. El extracto orgánico se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró en rotavapor a 35 °C. Se realizaron controles: blanco sustrato (sin agregado de células) y blanco bacteria (sin agregado de colesterol). Los resultados fueron analizados por TLC con fase móvil 4:6 hexano: AcOEt (v/v).

4.6. Biotransformación de fitoesteroles

Los microorganismos que demostraron la capacidad de biotransformar el colesterol (*Exiguobacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Streptomyces* sp., *Tsukamurella* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma koningiopsis* y las dos cepas de *Mucor circinelloides*) fueron evaluados para la biotransformación de β -sitoesterol.

Los ensayos de biotransformación con bacterias fueron realizados siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.5.1.1; y los realizados con los hongos filamentosos siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.5.1.2 pero utilizando β -sitoesterol como sustrato en vez de colesterol.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante TLC con fase móvil 4:6 hexano: AcOEt (v/v) y GC-MS siguiendo la metodología descrita en 4.5.3.

4.7. Biotransformación de ácidos biliares

Se estudió la capacidad de transformación de los ácidos cólico y litocólico mediante las bacterias que demostraron transformar el colesterol: *Exiguobacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Streptomyces* sp. y *Tsukamurella* sp.

4.7.1. Ensayos de biotransformación

Para cada cepa se inoculó 5 mL de TSB tomando una colonia desde un cultivo puro en medio sólido TSA con 24 h o 48 h de crecimiento a 28 °C. Estos se incubaron *overnight*, en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. Se inoculó con 500 μ L del cultivo *overnight* a un matraz de 250 mL conteniendo 50 mL de TSB. Se incubó en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. A las 24 h de cultivo de *Exiguobacterium* sp., *Acinetobacter* sp.; y 48 h de cultivo de *Streptomyces* sp., *Tsukamurella* sp., se agregó 50 mg del sustrato (ácido cólico ó litocólico) en 5 mL de solución de Tween 80 al 1%, obteniéndose una concentración final de 1 mg/mL de sustrato en el ensayo. A las 96 h de reacción se separó las células del sobrenadante por centrifugación durante 15 min a 5000 rpm.

➤ Work-up y análisis por TLC

El pH del sobrenadante se ajustó a 2 con HCl 37 % (v/v) y se extrajo con 50 mL de acetato de etilo tres veces. El extracto orgánico se secó con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó el solvente en rotavapor a 35°C. Los extractos obtenidos fueron retomados en 5 mL de metanol calidad HPLC. Los resultados obtenidos se analizaron mediante TLC con diclorometano/metanol 9:1 con 3 gotas de ácido acético 99.7 % (v/v) como fase móvil.

En todos los ensayos se realizaron los controles: blanco sustrato (sin agregado de inóculo) y blanco bacteria (sin agregado de sustrato).

4.7.2. Análisis de los productos obtenidos mediante GC-MS y evaluación de los porcentajes de bioconversión

Se realizó la derivatización de los compuestos a trimetilsilil éter metil ésteres a partir de 10 mg de las muestras obtenidas en 4.7.1, y de estándares de ácidos cólico y litocólico, siguiendo la metodología reportada por Keller y Jahreis (Keller & Jahreis 2004). En la figura 4-9 se muestran las estructuras de los sustratos de partida derivatizados.

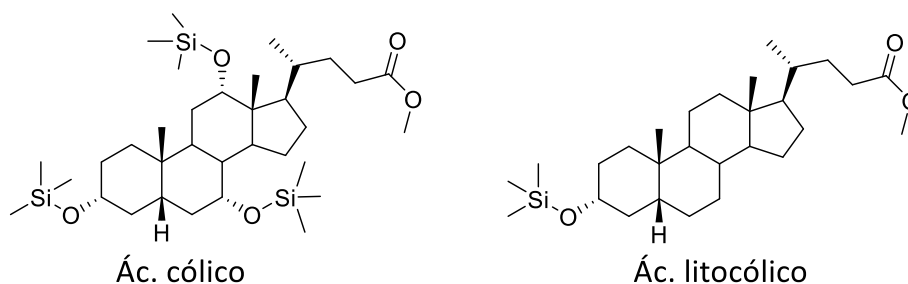


Figura 4- 9. Estructura de los sustratos (ácido cólico y litocólico) derivatizados como trimetilsilil metil ésteres para su análisis por GC-MS.

Las reacciones de biotransformación fueron analizadas por GC-MS en un cromatógrafo Thermo Trace 1300 GC-ISQ MS con columna TG-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), utilizando helio como gas portador. Se utilizó el siguiente programa de temperatura: 150 °C (5 min), 40 °C/min hasta 240 °C, 1 °C/min hasta 255 °C, 4 °C/min hasta 270 °C, 1 °C/min hasta 278 °C (9 min), 40 °C/min hasta 290 °C (4.7 min). Inyector, interface y fuente de iones se ajustaron a 290 °C, 300 °C y 200

°C respectivamente. El volumen de inyección fue de 1 µL, modo Split (10:1), energía de ionización 70 eV. Los porcentajes de bioconversión fueron evaluados por el método de normalización de áreas de los picos obtenidos en el cromatograma de corriente iónica total (TIC).

4.7.3. Ensayo de biotransformación de ácidos biliares por *Tsukamurella* sp.

4.7.3.1. Ensayo en mayor escala

Los mayores porcentajes de bioconversión de los ácidos biliares fueron obtenidos con la bacteria *Tsukamurella* sp. por lo que se realizó el ensayo a mayor escala (400 mg de sustrato de partida) conservando las relaciones de volumen según la metodología descrita en la sección 4.7.1. Se tomaron muestras de la reacción a las 24, 48, 72 y 96 h.

4.7.3.2. Separación, purificación y elucidación estructural de productos

i) Producto obtenido en la biotransformación del ácido litocólico

El producto mayoritario obtenido a las 96 horas de reacción fue purificado mediante cromatografía en columna con sílica gel 60 flash, con siembra en seco, comenzando con una mezcla de diclorometano:acetona 99:1 y finalizando con 98:2 como fase móvil.

ii) Productos obtenidos en la biotransformación del ácido cólico

El producto mayoritario obtenido a las 96 horas de reacción fue purificado mediante cromatografía en columna con sílica gel 60 flash, con siembra en seco, comenzando con una mezcla de diclorometano: metanol 95:5, seguido por 93:7 y finalizando con 90:10 como fase móvil.

El producto minoritario obtenido fue purificado mediante TLC preparativa con sílica gel sin indicador UV, en soporte de vidrio, utilizando una mezcla de diclorometano/metanol 9:1 con 3 gotas de ácido acético 99.7 % (v/v) como fase móvil.

iii) Análisis por RMN

La estructura de los productos purificados fue elucidada mediante RMN. Los espectros de ^{13}C , COSY y HSQC se obtuvieron en espectrómetro Bruker Avance® III 400 MHz y el espectro de RMN ^1H en Bruker Avance® III 500 MHz, en DMSO deuterado como solvente.

4.7.3.3. Evaluación de rendimientos y porcentajes de bioconversión

La evaluación de porcentajes de bioconversión y rendimientos de transformación fueron determinados mediante cromatografía de alta eficiencia (HPLC) en equipo Shimadzu LC – 20AT, con detector de Índice de refracción (Shimadzu RID – 10AT), según las condiciones de análisis descritas a continuación para cada ensayo.

i) Evaluación en los ensayos de biotransformación del ácido litocólico

La columna utilizada fue Discovery® C18 (15cm x 4.6 mm x 5 μm) junto con su pre-columna. Gradiente isocrático fase móvil 80:20 metanol: solución de ácido fosfórico 0.02 M pH 3.4; flujo de 1 mL/min. Tiempo de corrida: 30 min. Los análisis se llevaron a cabo a 30 °C.

Se sintetizó un estándar del producto ácido 3-cetolitocólico mediante oxidación del ácido litocólico por ácido yodobenzoico (YBX) para poder evaluar los rendimientos de reacción utilizando una curva de calibración del producto.

➤ Síntesis del ácido 3-cetolitocólico

Se disuelven 200 mg de ácido litocólico en diclorometano. Se agregan 3 equivalentes (eq.) de YBX resultando en una suspensión de aspecto lechoso. Se mantiene en agitación. Transcurridas las 6 y 18 horas de reacción se agregan otros 3 eq. de YBX. A las 24 horas se filtra la suspensión con papel de filtro y se evapora el disolvente. El producto de oxidación obtenido se purificó mediante TLC preparativa con una mezcla de diclorometano/metanol 9.5:0.5 con 3 gotas de ácido acético 99.7 % (v/v) como fase móvil. Su estructura fue confirmada mediante RMN ^1H y ^{13}C siguiendo la metodología descrita en la sección 4.7.3.2.

ii) Evaluación en los ensayos de biotransformación del ácido cólico

La columna utilizada fue Zorbax Eclipse XDB-C18® (25 cm x 4.6 mm x 5 µm) junto con su pre-columna. Adaptando la metodología descrita por Sheng y colaboradores (Sheng et al. 2017). Gradiente isocrático fase móvil 43:17:40 acetonitrilo: metanol: buffer ácido fórmico pH 2.5, flujo de 0.8 ml/min. Tiempo de corrida: 35 min. Los análisis se llevaron a cabo a 30 °C.

4.7.3.4. Biotransformación utilizando diferentes agentes dispersantes del sustrato

Se evaluó el efecto de diferentes agentes dispersantes del sustrato sobre el porcentaje de bioconversión de los ácidos cólico y litocólico por *Tsukamurella* sp. Los dispersantes utilizados fueron Tween 80, aceite de ricino etoxilado (36 moles), alcohol laúrico etoxilado (7 moles) y β -ciclodextrina.

Se inoculó 5 mL de TSB tomando una colonia desde un cultivo de *Tsukamurella* sp. en medio sólido TSA con 48 h de crecimiento a 28 °C. Este se incubó *overnight* en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. Se inoculó con 200 µL del cultivo *overnight* a un matraz de 100 mL conteniendo 20 mL de TSB. Se incubó en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. A las 48 h de cultivo se agregó 20 mg del sustrato (ácido cólico ó litocólico) en 2 mL de solución de tensoactivo correspondiente al 2 % o β -ciclodextrina en relación molar 2:1 β -ciclodextrina: sustrato. De esta forma se obtuvo una concentración final en el ensayo de 1 mg/mL de sustrato y 0.2 % de los tensoactivos utilizados. Las células fueron separadas del sobrenadante a las 96 h de reacción en la biotransformación el ácido litocólico y 144 horas para la biotransformación del ácido cólico. El *work-up* y el análisis por TLC se realizaron siguiendo la metodología descrita en la sección 4.7.1 manteniendo la relación de volúmenes.

En todos los ensayos se realizaron el control blanco bacteria (sin agregado de sustrato, pero con agregado del dispersante correspondiente).

Los porcentajes de bioconversión fueron evaluados mediante HPLC como se describió en la sección 4.7.3.3 utilizando el método de normalización de áreas.

4.7.3.5. Evaluación de la capacidad de crecimiento de *Tsukamurella* sp. con distintas fuentes de carbono y energía

Se evaluó la capacidad de crecimiento de *Tsukamurella* sp. utilizando como única fuente de carbono y energía los tensoactivos Tween 80 y aceite de ricino etoxilado (36 moles), y los ácidos cólico y litocólico. Se prepararon placas de medio mínimo M9 sólido (anexo II) cada una con 0.2 % de cada tensoactivo, o 0.1 % de cada ácido biliar (agregado sin agente dispersante). Cada una de las placas se cultivó mediante la metodología de estrías a partir de un cultivo de *Tsukamurella* sp. en medio TSA y se incubaron a 28 °C por 5 días, observándose cada 24 horas.

4.7.3.6. Evaluación de rendimientos y porcentajes de bioconversión en función del tiempo de reacción

Se realizó un cultivo *overnight* de *Tsukamurella* sp. siguiendo la metodología descrita en 4.7.3.4. Se inoculó con 200 µL del cultivo *overnight* a un matraz de 100 mL conteniendo 20 mL de TSB. Se incubó en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. A las 48 h de cultivo se agregó 20 mg del sustrato correspondiente. El ácido litocólico se agregó en 2 mL de solución de aceite de ricino etoxilado (36 moles) 2%, y el ácido cólico en 2 mL de solución de Tween 80 al 2 %. Se obtiene una concentración final en el ensayo de 1 mg/mL de sustrato y 0.2 % de los tensoactivos utilizados. Esto se realizó en 6 matraces para cada ensayo, evaluando así el porcentaje de bioconversión cada 24 horas de reacción durante 6 días. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

A cada tiempo final de reacción se separaron las células del sobrenadante por centrifugación durante 15 min a 5000 rpm. El *work-up* y el análisis por TLC se realizaron siguiendo la metodología descrita en la sección 4.7.1 manteniendo la relación de volúmenes.

Los porcentajes de bioconversión fueron evaluados mediante HPLC como se describió en la sección 4.7.3.3 utilizando el método de normalización de áreas para la biotransformación del ácido cólico. Los rendimientos de bioconversión del ácido litocólico en el ácido 3-cetoliticólico en función del tiempo de reacción fueron evaluados utilizando la curva de calibración del ácido 3-cetoliticólico sintetizado por oxidación química convencional (sección 4.7.3.3 de la parte experimental) (Fig. 4-10).

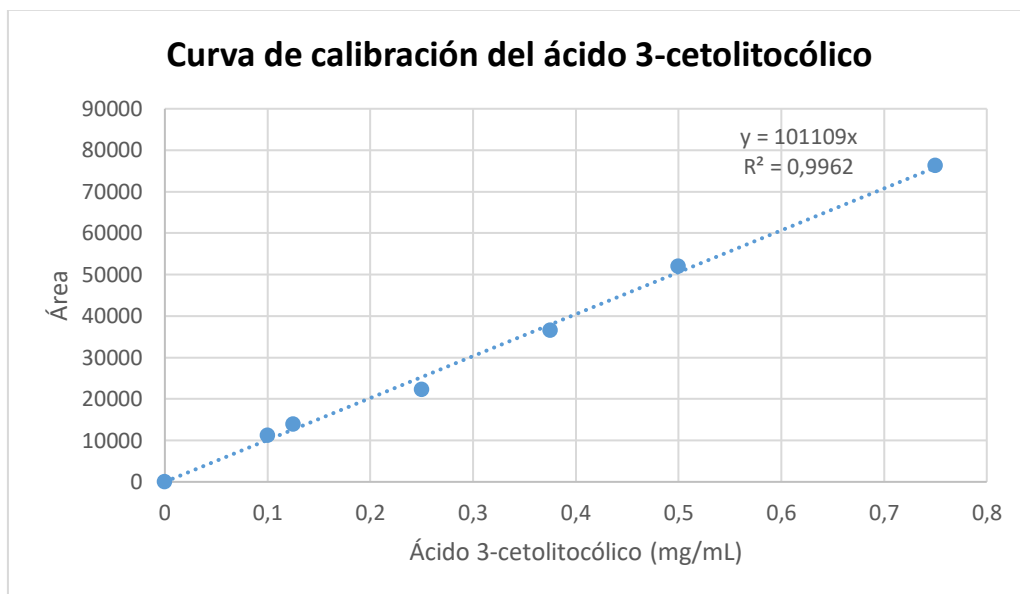


Figura 4- 10.Curva de calibración del ácido 3-cetolítico.

4.7.3.7. Evaluación del rendimiento de reacción de transformación del ácido litocólico por *Tsukamurella* sp. con distintas concentraciones de sustrato

Se realizó el ensayo de transformación del ácido litocólico siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.7.3 pero con 2.5 g/L y 5 g/L de ácido litocólico en el ensayo, agregados en 2 mL de solución de aceite de ricino etoxilado (36 moles) al 2 %. El ensayo se realizó durante 7 días luego de agregado el sustrato. Fueron evaluados los rendimientos de bioconversión del ácido litocólico en el ácido 3-cetolítico en función del tiempo de reacción mediante HPLC utilizando la curva de calibración del ácido 3-cetolítico (Fig. 4-9), como se describió en la sección 4.7.3.3.

4.7.3.8. Biotransformación de ácidos biliares mediante células de *Tsukamurella* sp. en reposo

Se realizó un cultivo *overnight* de *Tsukamurella* sp. siguiendo la metodología descrita en 4.7.3.4. Se inoculó con 1 mL del cultivo *overnight* un matraz de 500 mL conteniendo 100 mL de medio TSB y se agregó 100 mg del sustrato correspondiente. El ácido litocólico se agregó en 10

mL de una solución de aceite de ricino etoxilado (36 moles) al 2 % y el ácido cólico en 10 mL de solución de Tween 80 al 2 %, obteniéndose una concentración final de 1 g/L de sustrato en el medio de cultivo. El cultivo se realizó en presencia del sustrato para inducir la expresión de los genes que codifican para las enzimas que lo metabolizan. Se incubó en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. A las 48 h se realizó la separación de las células del sobrenadante centrifugando por 15 minutos a 5000 rpm. Las células fueron lavadas dos veces con 50 mL de suero fisiológico estéril. Aproximadamente 1.5 g de células húmedas se suspendieron en 10 mL de buffer M9 con glucosa para favorecer la regeneración de cofactores (Anexo I). Se agregó 10 mg del sustrato correspondiente. El ácido litocólico se agregó en 1 mL de una solución de aceite de ricino etoxilado (36 moles) al 2 % y el ácido cólico en 1 mL de solución de Tween 80 al 2 %, obteniéndose una concentración final de 1 g/L de sustrato en el ensayo. A las 96 horas de reacción se separaron las células por centrifugación durante 15 min a 5000 rpm. El *work-up* y el análisis por TLC se realizaron siguiendo la metodología descrita en la sección 4.7.1 manteniendo la relación de volúmenes.

Los porcentajes de bioconversión obtenidos en la transformación del ácido cólico fueron evaluados mediante HPLC como se describió en la sección 4.7.3.3 utilizando el método de normalización de áreas.

4.7.3.9. Biotransformación del ácido litocólico con *Tsukamurella* sp. realizando adiciones sucesivas del sustrato

Se realizó un cultivo *overnight* de *Tsukamurella* sp. siguiendo la metodología descrita en 4.7.3.4. Se inoculó con 1 mL del cultivo *overnight* un matraz de 500 mL conteniendo 100 mL de medio TSB y se agregaron 25 mg de ácido litocólico disuelto en 2.5 mL una solución de aceite de ricino etoxilado (36 moles) al 2 %. A las 48 horas se realizó la segunda adición de sustrato, agregándose 50 mg de ácido litocólico disuelto en 5 mL del tensoactivo. Transcurridas 48 horas se realizó la tercera adición de sustrato, agregándose 50 mg de ácido litocólico disuelto en 5 mL del tensoactivo. En total se agregaron 125 mg de sustrato en el ensayo (aprox. 1.25 mg /mL). Previo a cada adición se tomaron muestras de reacción.

A las 96 horas desde la última adición se separaron las células del sobrenadante por centrifugación durante 15 min a 5000 rpm. El *work-up* y el análisis por TLC se realizaron siguiendo la metodología descrita en la sección 4.7.1 manteniendo la relación de volúmenes. Los resultados obtenidos se analizaron mediante HPLC como se describió en la sección 4.7.3.3.

4.7.3.10. Curva de crecimiento de *Tsukamurella* sp.

Se realizó la curva de crecimiento de *Tsukamurella* sp. en las condiciones del ensayo de biotransformación del ácido litocólico:

- a) Con el sustrato en aceite de ricino etoxilado (36 moles)
- b) Sin agregado de sustrato, pero con agregado de aceite de ricino etoxilado (36 moles)
- c) Sin agregado de sustrato ni de aceite de ricino etoxilado (36 moles)

A partir del cultivo puro de *Tsukamurella* sp. en TSA con 48 h de crecimiento en estufa a 28 °C; se inocularon 5 mL del medio de cultivo TSB tomando una colonia. Se incubó overnight, en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. Se inocularon tres matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio TSB con 500 µL del overnight. A las 48 horas se agregó en uno de los matraces 50 mg de ácido litocólico disueltos en 5 mL de solución de aceite de ricino etoxilado (36 moles) al 2 %, obteniendo una concentración final de 1 mg/L de sustrato en el ensayo (matraz A). Al otro se le agregó 5 mL de solución de aceite de ricino etoxilado (36 moles) al 2 % (matraz B). Al tercer matraz no se le realizaron agregados (matraz C). Los matraces y blancos correspondientes se incubaron en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C.

Se tomaron muestras de 1 mL de cultivo a diferentes tiempos durante 7 días y se determinó la densidad óptica del cultivo a 600 nm (OD₆₀₀) en espectrofotómetro (Thermo Scientific Modelo Evolution 60S) siguiendo la metodología usada por Marín y colaboradores para evaluar el crecimiento de *Tsukamurella paurometabola* (Marín et al. 2013). Para la medida de OD₆₀₀ en de las muestras tomadas del matraz A se usó como blanco muestras tomadas de un matraz en las mismas condiciones de incubación pero sin inocular con *Tsukamurella* sp. En este banco se agregaron ácido litocólico y 5 mL de aceite de ricino etoxilado (36 moles) al 2% para evitar en la medida de OD₆₀₀ el efecto de turbidez que pueda generarse por estos compuestos. Para las

medidas de las muestras del matraz B el blanco utilizado fue TSB con aceite de ricino etoxilado (36 moles). Para las medidas de las muestras del matraz C el blanco utilizado fue TSB.

4.7.4. Producción del ácido 3-cetolítico con *Tsukamurella* sp. en fermentador de 5 L

Se realizó la biotransformación del ácido litocólico con *Tsukamurella* sp. a escala de fermentador para producir el ácido 3-cetolítico. El experimento se realizó dos veces variando los tiempos de precultivo en matraz y de agregado del sustrato:

- A) 48 horas de precultivo
- B) 24 horas de precultivo

Se realizó un cultivo *overnight* de *Tsukamurella* sp. siguiendo la metodología descrita en 4.7.3.4. Se inoculó con 2 mL del cultivo *overnight* un matraz dentado de 1 L conteniendo 200 mL de medio TSB (precultivo). Este se incubó en agitador orbital a 150 rpm y 28 °C. A las 24 o 48 horas de precultivo este se transfirió al fermentador Sartorius Biostat A plus 5 L conteniendo 2 L de medio TSB. El fermentador se mantuvo a 28 °C con agitación inicial de 250 rpm. La agitación varió a lo largo del experimento en función de la necesidad de oxígeno y la espuma generada en el medio. Se evaluó el crecimiento de *Tsukamurella* sp. por medida de OD₆₀₀ y el agregado de sustrato fue realizado según la OD₆₀₀ alcanzada en cada uno de los experimentos. Se agregan 2 g de ácido litocólico en 200 mL de solución de ricino etoxilado (36 moles) al 2 % alcanzándose una concentración final de aproximadamente 1 g/L de sustrato y 0.2 % de tensoactivo en el fermentador.

Para controlar la espuma generada se utilizaron mezclas de antiespumante antifoam 204 y silicona antiespumante emulsión al 15 %. Los niveles de oxígeno disuelto (pO₂) y pH se monitorearon con sensores previamente calibrados. Se tomaron muestras a distintos tiempos de reacción para medir el crecimiento de *Tsukamurella* sp. por medida de OD₆₀₀; y monitorear la reacción mediante TLC con diclorometano/metanol 9:1 con 3 gotas de ácido acético 99.7 % (v/v) como fase móvil.

Al finalizar la reacción se separaron las células por centrifugación durante 15 min a 5000 rpm y el pH del sobrenadante se ajustó a 2 con HCl 37 % (v/v) y se extrajo con igual volumen de acetato de etilo por triplicado. El extracto orgánico se secó con sulfato de sodio y se rotaevaporó a 30 ° C. Los rendimientos de reacción fueron evaluados mediante HPLC como se describió en la sección 4.7.3.3 utilizando el método de normalización de áreas.

4.8. Secuenciado y análisis del genoma de *Tsukamurella* sp.

Se realizó la extracción de ADN genómico de *Tsukamurella* sp. con el kit “NZY Tissue gDNA Isolation” (Nzytech®). El secuenciado del genoma completo se llevó a cabo mediante secuenciación de nueva generación (NGS) en plataforma Illumina® MiSeq® empleando la metodología SBS (secuenciado por síntesis), en el servicio NU-OMICS de Northumbria University, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido en el marco de una colaboración con los Dres. Justin Perry, Gary Black y Darren Smith. El análisis de los archivos obtenidos y el ensamblado del genoma utilizando como molde el genoma de referencia de *Tsukamurella paurometabola* DSM 20162 (accession number CP001966.1) fueron realizados por el Dr. Adnan Tariq (NU-OMICS, Northumbria University).

4.8.1. Análisis filogenético de *Tsukamurella* sp.

Se realizó la construcción de un árbol filogenético utilizando el método estadístico de neighbour-joining con el modelo de Jukes-Cantor en el programa MEGA versión 7.0 (Jukes & Cantor 1969; Saitou & Nei 1987; Kumar et al. 2016). Para la construcción del árbol filogenético se realizó una búsqueda de secuencias con el programa BLAST del NCBI (Altschul et al. 1990). En esta se seleccionaron las secuencias de cepas tipo, y secuencias de especies ya descritas, que presentaron mayor homología con la secuencia del gen del ARN ribosomal 16S de la cepa de *Tsukamurella* sp. M9B2. Se seleccionó como cepa externa *Dietzia cinnamea* cepa IMMIB RIV-399, dado que ya ha sido utilizado como grupo externo para la construcción de un árbol filogenético de cepas de *Tsukumarella* sp. en un trabajo previo (Teng et al. 2016). Las secuencias utilizadas para la construcción del árbol en esta tesis corresponden a las cepas: *T. tyrosolvensis* CCUG 38499; *T. tyrosolvensis* JCM 15482; *T. tyrosolvensis* PW1212; *T. tyrosolvensis* PW1214; *T.*

tyrosolvensis PW2318; *T. tyrosolvensis* PW2319; *T. tyrosolvensis* PW2321; *T. tyrosolvensis* DSM 44234; *T. pseudospumae* JCM 15929; *T. pseudospumae* JCM 13375; *T. pseudospumae* N1176; *T. pulmonis* CCUG 35732; *T. pulmonis* IMMIB D-1321; *T. strandjordii* ATCC BAA-173; *T. hominis* HKU65, *T. paurometabola* ATCC 8368; *T. paurometabola* DSM 20162 y *T. inchonensis* ATCC 700082.

4.8.2. Análisis de la secuencia genómica

La secuencia genómica obtenida fue analizada utilizando el programa Artemis (Sanger Institute). Las secuencias de los genes que codifican para enzimas relacionadas al metabolismo de esteroides fueron identificadas en el genoma de referencia de *Tsukamurella paurometabola* DSM 20162 (número de acceso GenBank CP001966.1) que se encuentra anotado (Munk et al. 2011). También se utilizó el genoma de *Tsukamurella tyrosolvensis* MH1 (CP019066.1), el cual fue secuenciado y anotado en estudios previos (Chiciudean et al. 2018).

Las secuencias obtenidas fueron utilizadas como referencia para identificar la secuencia de los genes que codifican para las enzimas en el genoma de la cepa en estudio, *Tsukamurella* sp. M9B2. Estas fueron comparadas con la secuencia del genoma de *Tsukamurella* sp. M9B2 utilizando el programa de alineamiento de secuencias nucleotídicas del BLAST (NCBI) (Altschul et al. 1990).

5. Referencias

- Adékambi T, Shinnick TM, Raoult D, Drancourt M (2008) Complete *rpoB* gene sequencing as a suitable supplement to DNA-DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1807–1814. doi: 10.1099/ijs.0.65440-0
- Ahire JJ, Bhat AA, Thakare JM, et al (2012) Cholesterol assimilation and biotransformation by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnol Lett* 34:103–107. doi: 10.1007/s10529-011-0733-2
- Ahire JJ, Mokashe NU, Chaudhari BL (2014) Cholesterol biotransformation to cholesta-4, 6-dien-3-ol and effect of assimilation on adhesion properties of *Lactobacillus helveticus* CD6. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 3:398–401. doi: 20143164345
- Ahmad S, Garg SK, Johri BN (1992) Biotransformation of sterols: Selective cleavage of the side chain. *Biotechnol Adv* 10:1–67. doi: 10.1016/0734-9750(92)91351-E
- Ahmad S, Goswami P (2014) Application of chitosan beads immobilized *Rhodococcus* sp. NCIM 2891 cholesterol oxidase for cholestenone production. *Process Biochem* 49:2149–2157. doi: 10.1016/j.procbio.2014.10.004
- Al Jasem Y, Khan M, Taha A, Thiemann T (2014) Preparation of steroidal hormones with an emphasis on transformations of phytosterols and cholesterol -a review. *Mediterr J Chem* 3:796–830. doi: 10.13171/mjc.3.2.2014.18.04.15
- Altschul SF, Gish W, Miller W, et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Alvarez E, Cano J, Stchigel AM, et al (2010) Two new species of *Mucor* from clinical samples. *Med Mycol* 49:62–72. doi: 10.3109/13693786.2010.499521
- Alvarez E, Sutton DA, Cano J, et al (2009) Spectrum of zygomycete species identified in clinically significant specimens in the United States. *J Clin Microbiol* 47:1650–1656. doi: 10.1128/JCM.00036-09
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, et al (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56:1919–1925. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01066.x
- Ambrus G, Jekkel A, Ilkoy É, et al (1995) Novel 26-oxygenated products in microbial degradation of ergosterol. *Steroids* 60:626–629. doi: 10.1016/0039-128X(95)00078-5
- Aparicio JF, Martín JF (2008) Microbial cholesterol oxidases: Bioconversion enzymes or signal proteins? *Mol Biosyst* 4:804–809. doi: 10.1039/b717500k
- Avanzi IR, Gracioso LH, Baltazar M dos PG, et al (2017) Rapid bacteria identification from environmental mining samples using MALDI-TOF MS analysis. *Environ Sci Pollut Res* 24:3717–3726. doi: 10.1007/s11356-016-8125-8

- Badalassi F, Wahler D, Klein G, et al (2000) A versatile periodate-coupled fluorogenic assay for hydrolytic enzymes. *Angew Chem Int Ed* 39:4067–4070. doi: 10.1002/1521-3773
- Baron SF, Hylemon PB (1997) Biotransformation of bile acids, cholesterol, and steroid hormones. In: *Gastrointest. Microbiol.* pp 470–510
- Barredo J-L, Herráiz I (2017) *Microbial Steroids*. Humana Press, Spain
- Barreiro C, Morales A, Vázquez-Iglesias I, Sola-Landa A (2017) Intra- and extra-cellular proteome analyses of steroid- producer *Mycobacteria*. In: Barredo L, Herráiz I (eds) *Microbial Steroids*. Humana Press, Spain
- Barrow GI, Feltham RKA (1993) *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge
- Bartmaska A, Dmochowska-Gladysz J (2007) Transformation of steroids by *Trichoderma hamatum*. *Enzyme Microb Technol* 40:1615–1621. doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.11.011
- Begley M, Gahan CGM, Hill C (2005) The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev* 625–651. doi: 10.1016/j.femsre.2004.09.003
- Bhatti HN, Khera RA (2012) Biological transformations of steroidal compounds: a review. *Steroids* 77:1267–1290. doi: 10.1016/j.steroids.2012.07.018
- Bjedov S, Jakimov D, Poša M, et al (2017) Synthesis and antitumor activity of alkylated bile acids and oxazolines. *Tetrahedron* 73:6932–6941. doi: 10.1016/j.tet.2017.10.058
- Bloch K (1991) Cholesterol: evolution of structure and function. In: Vance DE, Vance JE (eds) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier B.V., Amsterdam, pp 363–381
- Bordet T, Cyrille D, Buisson B (2006) Patent Application Publication US 2006/0222585 A1
- Borrego S, Espinosa ME, Martí E, Fonseca M (2004) Optimization of synthetic culture medium for androstenedione production from cholesterol by *Mycobacterium* sp. MB-3683. *Biotechnol Appl* 21:21–24
- Borrego S, Espinosa ME, Martí E, Fonseca M (2000) Conversion of cholesterol to testosterone by *Mycobacterium* sp. MB-3638. *Rev CENIC Ciencias Biológicas* 31:17–20
- Bortolini O, Medici A, Poli S (1997) Biotransformations on steroid nucleus of bile acids. *Steroids* 62:564–577. doi: 10.1016/S0039-128X(97)00043-3
- Bracco P (2014) Selective steroid hydroxylation by bacterial cytochrome P450 monooxygenases. Aachen University
- Brown FJ, Djerassi C (1980) Elucidation of the course of the electron impact induced fragmentation of α,β -unsaturated 3-keto steroids. *J Am Chem Soc* 102:807–817
- Brzostek A, Rumijowska-Galewicz A, Dziadek B, et al (2013) ChoD and HsdD can be dispensable for cholesterol degradation in mycobacteria. *J Steroid Biochem Mol Biol* 134:1–7. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.09.028
- Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT (2012) *Biocatalysts and enzyme technology*, Second.

- Carballeira JD, Quezada M a., Hoyos P, et al (2009) Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. *Biotechnol Adv* 27:686–714. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.05.001
- Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553–556
- Carvalho JFS, Cruz Silva MM, Moreira JN, et al (2009) Efficient chemoenzymatic synthesis, cytotoxic evaluation, and SAR of epoxysterols. *J Med Chem* 52:4007–4019. doi: 10.1021/jm9003973
- Carvalho JFS, Silva MMC, Moreira JN, et al (2010) Sterols as anticancer agents: Synthesis of ring-B oxygenated steroids, cytotoxic profile, and comprehensive SAR analysis. *J Med Chem* 53:7632–7638. doi: 10.1021/jm1007769
- Casabon I, Snieckus V, Crowe AM, et al (2017) Catabolism of the last two steroid rings in *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *MBio* 8:1–16. doi: 10.1128/mbio.00321-17
- Caspi R, Altman T, Billington R, et al (2014) The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res* 42:459–471. doi: 10.1093/nar/gkt1103
- Chang KH, Lee L, Chen J, Li WS (2006) Lithocholic acid analogues, new and potent α -2,3-sialyltransferase inhibitors. *Chem Commun* 6:629–631. doi: 10.1039/b514915k
- Chaudhari PN, Chaudhari BL, Chincholkar SB (2010) Cholesterol biotransformation to androsta-1,4-diene-3,17-dione by growing cells of *Chryseobacterium gleum*. *Biotechnol Lett* 32:695–699. doi: 10.1007/s10529-010-0206-z
- Chauhan AK, Survase SA, Kishenkumar J, Annapure US (2009) Medium optimization by orthogonal array and response surface methodology for cholesterol oxidase production by *Streptomyces lavendulae* NCIM 2499. *J Gen Appl Microbiol* 55:171–180. doi: 10.2323/jgam.55.171
- Chiciudean I, Nie Y, Tănase AM, et al (2018) Complete genome sequence of *Tsukamurella* sp. MH1: A wide-chain length alkane-degrading actinomycete. *J Biotechnol* 268:1–5. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.12.013
- Conville PS, Zelazny AM, Witebsky FG (2006) Analysis of *secA1* gene sequences for identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol* 44:2760–2766. doi: 10.1128/JCM.00155-06
- Cotillon AC, Morfin R (1999) Transformation of 3-hydroxy-steroids by *Fusarium moniliforme* 7 α -hydroxylase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 68:229–237
- Cresnar B, Zakelj-Mavric M (2009) Aspects of the steroid response in fungi. *Chem Biol Interact* 178:303–309. doi: 10.1016/j.cbi.2008.11.002
- Cronholm T, Makino I, Sjoval J (1972) Steroid metabolism in rats given ethanol. *Eur J Biochem* 24:507–519

- Da Cruz GF, Angolini CFF, De Oliveira LG, et al (2010) Searching for monooxygenases and hydrolases in bacteria from an extreme environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:319–329. doi: 10.1007/s00253-010-2485-7
- Dang Z, Jung K, Qian K, et al (2012) Synthesis of lithocholic acid derivatives as proteasome regulators. *ACS Med Chem Lett* 3:925–930. doi: 10.1021/ml3001962
- De Medina P, Paillasse MR, Payre B, et al (2009) Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities: Identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. *J Med Chem* 52:7765–7777. doi: 10.1021/jm901063e
- Demirjian D, Shah PC, Morís-Varas F (1999) Screening of novel enzymes. In: *Topics in Current Chemistry*. pp 1–29
- Denton JE, Yousef MK, Vegas L, et al (1974) Bile Acid Composition of Rainbow Trout , *Salmo gairdneri*. *Lipids* 9:945–951
- Department of Health and Human Services (1998) Toxicological profile for chromium,. Atlanta
- Deshcherevskaya NO, Lobastova TG, Kollerov VV, et al (2016) Search and discovery of actinobacteria capable of transforming deoxycholic and cholic acids. *J Mol Catal B Enzym* 133:S157–S165
- Do Nascimento PGG, Lemos TLG, Almeida MCS, et al (2015) Lithocholic acid and derivatives: Antibacterial activity. *Steroids* 104:8–15. doi: 10.1016/j.steroids.2015.07.007
- Dogra N, Qazi GN (2001) Steroid biotransformation by different strains of *Micrococcus* sp. *F Microbiol* 46:17–20. doi: 10.1007/BF02825877
- Donova M V. (2007) Transformation of steroids by actinobacteria : a review. *Appl Biochem Microbiol* 43:5–18. doi: 10.1134/S0003683807010012
- Donova M V. (2017) Steroids bioconversion. In: Barredo L, Herráiz I (eds) *Microbial Steroids*. Humana Press, New York, pp 1–13
- Donova M V., Egorova O V. (2012) Microbial steroid transformations : current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:1423–1447. doi: 10.1007/s00253-012-4078-0
- Doukyu N (2009) Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:825–837. doi: 10.1007/s00253-009-2059-8
- Doukyu N, Aono R (2001) Cloning, sequence analysis and expression of a gene encoding an organic solvent- and detergent-tolerant cholesterol oxidase of *Burkholderia cepacia* strain ST-200. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:146–152. doi: 10.1007/s002530100753
- Doukyu N, Shibata K, Ogino H, Sagermann M (2008) Purification and characterization of *Chromobacterium* sp . DS-1 cholesterol oxidase with thermal, organic solvent, and detergent tolerance. *Appl Biochem Biotechnol* 80:59–70. doi: 10.1007/s00253-008-1526-y
- Druzhinina IS, Kubicek CP, Kopchinskiy AG, et al (2005) An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet Biol* 42:813–828. doi: 10.1016/j.fgb.2005.06.007

- Du L, Huo Y, Ge F, et al (2010) Purification and characterization of novel extracellular cholesterol esterase from *Acinetobacter* sp. J Basic Microbiol 50:30–36. doi: 10.1002/jobm.200900292.
- Edenharder R, Pfützner A, Hammann R (1989) Characterization of NAD-dependent 3 α - and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and of NADP-dependent 7 β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Peptostreptococcus productus*. Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab 1004:230–238. doi: 10.1016/0005-2760(89)90272-5
- Eggert T, Bakonyi D, Hummel W (2014) Enzymatic routes for the synthesis of ursodeoxycholic acid. J Biotechnol 191:11–21. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.08.006
- El-Kadi I. A, Eman Mostafa M (2004) Hydroxylation of progesterone by some *Trichoderma* species. Folia Microbiol 49:285–290. doi: 10.1007/s102931044
- El-Naggar NE-A, El-Shweihy NM, El-Ewasy SM (2016) Identification and statistical optimization of fermentation conditions for a newly isolated extracellular cholesterol oxidase-producing *Streptomyces cavourensis* strain NEAE-42. BMC Microbiol 16:. doi: 10.1186/s12866-016-0830-4
- El-Naggar NEA, Deraz SF, Soliman HM, et al (2017) Purification, characterization and amino acid content of cholesterol oxidase produced by *Streptomyces aegyptia* NEAE 102. BMC Microbiol 17:1–12. doi: 10.1186/s12866-017-0988-4
- Faber K (2011) Biotransformations in Organic Chemistry: a Textbook, 6th. ed. Springer-Verlag, Berlin
- Fantin G, Ferrarini S, Medici A, et al (1998) Regioselective microbial oxidation of bile acids. Tetrahedron 54:1937–1942. doi: /10.1016/S0040-4020(97)10408-2
- Faramarzi MA, Badiie M, Yazdi MT, et al (2008) Formation of hydroxysteroid derivatives from androst-4-en-3,17-dione by the filamentous fungus *Mucor racemosus*. J Mol Catal B Enzym 50:7–12. doi: 10.1016/j.molcatb.2007.09.017
- Fenyvesi É, Puskás I, Szenté L (2018a) Chapter 2 Cyclodextrin-steroid interactions and applications to pharmaceuticals, food, biotechnology and environment. In: Fourmentin S., Crini G. LE (eds) (ed) Cyclodextrin Applications in Medicine, Food, Environment and Liquid Crystals. Environmental Chemistry for a Sustainable World. Springer, Cham, pp 19–57
- Fenyvesi É, Puskás I, Szenté L (2018b) Applications of steroid drugs entrapped in cyclodextrins. Environ Chem Lett. doi: 10.1007/s10311-018-0807-7
- Fernandes P, Cabral JMS (2010) Steroid bioconversion. In: Flickinger MC (ed) Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology. p 18
- Fernandes P, Cabral JMS (2007) Phytosterols: Applications and recovery methods. Bioresour Technol 98:2335–2350. doi: 10.1016/j.biortech.2006.10.006
- Fernandes P, Cruz A, Angelova B, et al (2003) Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. Enzyme Microb Technol 32:688–705. doi: 10.1016/S0141-0229(03)00029-2
- Fernández De Las Heras L, Perera J, Navarro Llorens JM (2014) Cholesterol to cholestenone

- oxidation by ChoG, the main extracellular cholesterol oxidase of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *J Steroid Biochem Mol Biol* 139:33–44. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.10.001
- Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K (2003) The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr* 88:587. doi: 10.1079/bjn2002725
- Fried J, Thoma R W, Gerke JR, et al (1952) Oxidation of steroids by microorganisms. II. Hydroxylation in position 11 and synthesis of cortisone from Reichsteins compound. *J Am Chem Soc* 74:3962–3963. doi: 10.1021/ja01135a528
- Gadda G, Wels G, Pollegioni L, et al (1997) Characterization of cholesterol oxidase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Brevibacterium sterolicum*. *Eur J Biochem* 250:369–376
- Galán B, García-fernández J, Felpeto-santero C, et al (2017) Bacterial metabolism of steroids. In: Rojo F. (ed) *Aerobic utilization of hydrocarbons, oils and lipids*. Springer, Cham, pp 1–22
- García C, Rodríguez P, Días E, et al (2009) Biooxidation of 1,8-cineole by *Aspergillus terreus*. *J Mol Catal B Enzym* 59:173–176. doi: 10.1016/j.molcatb.2009.02.013
- García JL, Uhía I, Galán B (2012) Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria. *Microb Biotechnol* 5:679–699. doi: 10.1111/j.1751-7915.2012.00331.x
- Gerber A, Kleser M, Biedendieck R, et al (2015) Functionalized PHB granules provide the basis for the efficient side-chain cleavage of cholesterol and analogs in recombinant *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Fact* 14:1–13. doi: 10.1186/s12934-015-0300-y
- Gherbawy Y, Kesselboth C, Elhariry H, Hoffmann K (2010) Molecular barcoding of microscopic fungi with emphasis on the mucoralean genera *Mucor* and *Rhizopus*. In: Gherbawy Y, Voigt K (eds) *Molecular Identification of Fungi*. Springer
- Ghosh S, Ahmad R, Gautam VK, Khare SK (2018) Cholesterol-oxidase-magnetic nanobioconjugates for the production of 4-cholesten-3-one and 4-cholesten-3, 7-dione. *Bioresour Technol* 254:91–96. doi: 10.1016/j.biortech.2018.01.030
- Giorgi V, Chaves M, Menéndez P, García Carnelli C (2019) Bioprospecting of whole-cell biocatalysts for cholesterol biotransformation. *World J Microbiol Biotechnol* 35:12. doi: 10.1007/s11274-018-2586-5
- Giovannini PP, Grandini A, Perrone D, et al (2008) 7 α - and 12 α - Hydroxysteroid dehydrogenases from *Acinetobacter calcoaceticus* *Iwoffii*: a new integrated chemo-enzymatic route to ursodeoxycholic acid. *Steroids* 3:1385–1390. doi: 10.1016/j.steroids.2008.06.013
- Griffin JE, Gawronski JD, DeJesus MA, et al (2011) High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog* 7:1–9. doi: 10.1371/journal.ppat.1002251
- Griffin W (1949) Classification of surface-active agents by 'HLB'. *J Soc Cosmet Chem* 5:311–326
- Gutiérrez S, Hernández A, Viñas M (1999) Mechanism of degradation of wool wax in the anaerobic treatment of woolscouring wastewater. *Water Sci Technol* 40:17–23. doi: 10.1016/S0273-1223(99)00604-6

- Hannich JT, Umebayashi K, Riezman H (2011) Distribution and functions of sterols. Cold Spring Harb Lab Press 3:47–62. doi: 10.1101/cshperspect.a004762
- Harder J, Probian C (1997) Anaerobic mineralization of cholesterol by a novel type of denitrifying bacterium. Arch Microbiol 167:269–274. doi: 10.1007/s002030050442
- Hayami M, Okabe A, Sasai K, et al (1979) Presence and synthesis of cholesterol in stable staphylococcal L-forms. J Bacteriol 140:859–863. doi: 10.1111/j.1348-0421.1979.tb00483.x
- Heidary M, Habibi Z (2016) Microbial transformation of androst-4-ene-3,17-dione by three fungal species <i>Absidia griseolla</i> var. *igachii*, *Circinella muscae* and *Trichoderma virens*. J Mol Catal B Enzym 126:32–36. doi: 10.1016/j.molcatb.2016.01.007
- Hesselink PGM, van Vliet S, de Vries H, Witholt B (1989) Optimization of steroid side chain cleavage by *Mycobacterium* sp. in the presence of cyclodextrins. Enzyme Microb Technol 11:398–404. doi: 10.1016/0141-0229(89)90133-6
- Hirano S, Masuda N, Oda H, Mukai H (1981) Transformation of bile acids by *Eubacterium lentum*. Appl Environ Microbiol 42:912–915
- Hisao I, Taku H (1995) Anti-keratinization effect of cholestanones. Japanese patent 95: 109, 216.
- Hogg JA (1992) Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation. Steroids 57:593–616. doi: 10.1016/0039-128X(92)90013-Y
- Horvath J, Kramli A (1947) Microbiological oxidation of cholesterol with *Azotobacter*. Nature 160:639. doi: 10.1038/160639b0
- Hossain M, Kim E, Kim Y, Kim D (2012) Application of *groEL* gene for the species-specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR. Lett Appl Microbiol 54:67–72. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03174.x
- Hotchkiss AK, Rider C V., Blystone CR, et al (2008) Fifteen years after ‘wingspread’ - environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. Toxicol Sci 105:235–259. doi: 10.1093/toxsci/kfn030
- Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH (2019) Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. J Food Drug Anal 27:404–414. doi: 10.1016/j.jfda.2019.01.001
- Hunter a. C, Coyle E, Morse F, et al (2009) Transformation of 5-ene steroids by the fungus *Aspergillus tamarii* KITA: Mixed molecular fate in lactonization and hydroxylation pathways with identification of a putative 3 β -hydroxy-steroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase pathway. Biochim Biophys Acta 1791:110–117. doi: 10.1016/j.bbalip.2008.12.005
- Ikgami T, Yasushi M (2008) Ursodeoxycholic acid: Mechanism of action and novel clinical applications. Hepatol Res 38:123–131. doi: 10.1111/j.1872-034X.2007.00297.x
- International Agency for Research in Cancer (IARC) (2012) Arsenic, metals, fibres, and dusts: a review of human carcinogens, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France

- Ivashina T V., Nikolayeva VM, Dovbnya D V., Donova M V. (2012) Cholesterol oxidase ChoD is not a critical enzyme accounting for oxidation of sterols to 3-keto-4-ene steroids in fast-growing *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1815D. *J Steroid Biochem Mol Biol* 129:47–53. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.09.008
- Jackson CJ, Lamb DC, Marczylo TH, et al (2002) A novel sterol 14 α -demethylase/ferredoxin fusion protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* represents a new class of the cytochrome P450 superfamily. *J Biol Chem* 277:46959–46965. doi: 10.1074/jbc.M203523200
- Jeske L, Placzek S, Schomburg I, et al (2019) BRENDA in 2019: A European ELIXIR core data resource. *Nucleic Acids Res* 47:D542–D549. doi: 10.1093/nar/gky1048
- Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution protein molecules. In: Munro HN (ed) *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York, pp 21–131
- Kannenbergh EL, Poralla K (1999) Hopanoid biosynthesis and function in bacteria hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften* 86:168–176. doi: 10.1007/s001140050592
- Kasal A (2010) Structure and nomenclature of steroids. In: B. MHGD (ed) *Steroid analysis*, Second edi. Springer, London, pp 1–25
- Kashima M, Kinoshita T, Inaoka Y (1995) Cholestanones for treatment of liver diseases. Japanese patent 95: 69, 898. 69
- Keller S, Jahreis G (2004) Determination of underivatised sterols and bile acid trimethyl silyl ether methyl esters by gas chromatography-mass spectrometry-single ion monitoring in faeces. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 813:199–207
- Kim D, Lee JS, Kim J, et al (2007) Biosynthesis of bile acids in a variety of marine bacterial taxa. *J Microbiol Biotechnol* 17:403–407
- Kim KP, Rhee CH, Park HD (2002) Degradation of cholesterol by *Bacillus subtilis* SFF34 isolated from Korean traditional fermented flatfish. *Lett Appl Microbiol* 35:468–472. doi: 10.1046/j.1472-765X.2002.01219.x
- Kimura H, Okamura A, Kawaide H (1994) Oxidation of 3-, 7-, and 12-hydroxyl groups of cholic acid by an alkalophilic *Bacillus* sp. *Biosci Biotechnol Biochem* 58:1002–1006. doi: 10.1080/bbb.58.1002
- Kolek T (1999) Biotransformation XLVII: Transformations of 5-ene steroids in *Fusarium culmorum* culture. *J Steroid Biochem Mol Biol* 71:83–90. doi: 10.1016/S0960-0760(99)00123-5
- Kolek T, Świzdor A (1998) Biotransformation XLV. Transformations of 4-ene-3-oxo steroids in *Fusarium culmorum* culture. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67:63–69. doi: 10.1016/S0960-0760(98)00073-9
- Kollerov V V., Lobastova TG, Monti D, et al (2016) Deoxycholic acid transformations catalyzed by selected filamentous fungi. *Steroids* 107:20–29. doi: 10.1016/j.steroids.2015.12.015.

- Kollerov VV, Monti D, Deshcherevskaya NO, et al (2013) Hydroxylation of lithocholic acid by selected actinobacteria and filamentous fungi. *Steroids* 78:370–378. doi: 10.1016/j.steroids.2012.12.010
- Koshimura M, Utsukihara T, Hara A, et al (2010) Enzymatic Hydroxylation of steroid compounds by *Gelasinospora retispora*. *J Mol Catal B Enzym* 67:72–77. doi: 10.1016/j.molcatb.2010.07.008
- Kreit J (2017) Microbial catabolism of sterols: Focus on the enzymes that transform the sterol 3 β -hydroxy-5-en into 3-keto-4-en. *FEMS Microbiol Lett* 364:1–9. doi: 10.1093/femsle/fnx007
- Kreit J, Sampson NS (2009) Cholesterol oxidase: Physiological functions. *FEBS J* 276:6844–6856. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07378.x
- Kumar D, Kumar L, Nagar S, et al (2012) Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Arch Appl Sci Res* 4:1763–1770
- Kumar R, Dahiya JS, Singh D, Nigam P (2001) Biotransformation of cholesterol using *Lactobacillus bulgaricus* in a glucose-controlled bioreactor. *Bioresour Technol* 78:209–11. doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00174-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00174-7)
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetic analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Bio Evol* 33:1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Kusnezowa A, Leichert LI (2017) In silico approach to designing rational metagenomic libraries for functional studies. *BMC Bioinformatics* 18:1–11. doi: 10.1186/s12859-017-1668-y
- Lamb DC, Jackson CJ, Warrilow AGS, et al (2007) Lanosterol biosynthesis in the prokaryote *Methylococcus Capsulatus*: Insight into the evolution of sterol biosynthesis. *Mol Biol Evol* 24:1714–1721. doi: 10.1093/molbev/msm090
- Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Kelly SL (1998) A sterol biosynthetic pathway in *Mycobacterium*. *FEBS Lett* 437:142–144. doi: 10.1016/S0014-5793(98)01218-6
- Lamm AS, Chen ARM, Reynolds WF, Reese PB (2007) Steroid hydroxylation by *Whetzelinia sclerotiorum*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Mucor plumbeus*. *Steroids*. doi: 10.1016/j.steroids.2007.05.008
- Lanisnik T, Zakelj-Mavric M (2000) Characterization of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Comp Biochem Physiol Part B* 127:53–63. doi: [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00234-0](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00234-0)
- Lednicer D (2011) *Steroid Chemistry at a Glance*. Wiley, Chichester
- Leresche JE, Meyer HP (2006) Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): Some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Org Process Res Dev* 10:572–580. doi: 10.1021/op0600308
- Li B, Wang W, Wang FQ, Wei DZ (2010) Cholesterol oxidase ChoL is a critical enzyme that catalyzes the conversion of diosgenin to 4-ene-3-keto steroids in *Streptomyces virginiae*

- IBL-14. Appl Microbiol Biotechnol 85:1831–1838 DOI. doi: 10.1007/s00253-009-2188-0
- Li H, Liu HM, Ge W, et al (2005) Synthesis of 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone and 7 β -hydroxy-dehydroepiandrosterone. Steroids 70:970–973. doi: 10.1016/j.steroids.2005.07.006
- Li H, Shinde PB, Lee HJ, et al (2009) Bile acid derivatives from a sponge-associated bacterium *Psychrobacter* sp. Arch Pharm Res 32:857–862. doi: 10.1007/s12272-009-1607-1
- Liu HH, Xu LQ, Yao K, et al (2018) Engineered 3-ketosteroid 9 α -hydroxylases in *Mycobacterium neoaurum*: An efficient platform for production of steroid drugs. Appl Environ Microbiol 84:. doi: 10.1128/AEM.02777-17
- Liu HM, Ge W, Li H, Wu J (2007) Microbial transformation of 5 α ,6 α -epoxy-3 β -hydroxy-16-pregnen-20-one by *Trichoderma viride*. Steroids 72:509–513. doi: 10.1016/j.steroids.2006.12.009
- Liu WH, Kuo CW, Wu KL, et al (1994) Transformation of cholesterol to testosterone by *Mycobacterium* sp. J Ind Microbiol 13:167–171. doi: 10.1007/BF01584002
- Liu Y, Chen G, Ge F, et al (2011) Efficient biotransformation of cholesterol to androsta-1,4-diene-3,17-dione by a newly isolated actinomycete *Gordonia neofelifaecis*. World J Microbiol Biotechnol 27:759–765. doi: 10.1007/s11274-010-0513-5
- Lolekha PH, Jantaveesirirat Y (1992) Streptomyces: a superior source for cholesterol oxidase used in serum cholesterol assay. J Clin Lab Anal 409:405–409
- Lordan S, Mackrill JJ, O'Brien NM (2008) Involvement of Fas signalling in 7 β -hydroxycholesterol- and cholesterol-5 β ,6 β -epoxide-induced apoptosis. Int J Toxicol 27:279–285. doi: 10.1080/10915810802208616
- Macdonald IA, Forrest TP, Costain GA, Rao BG (1978) Identification of 7 α -,12 α -dihydroxy-3-oxo cholanoic acid as the major degradation product from cholic by *C. perfringens*. J Steroid Biochem 9:353–358. doi: 10.1016/0022-4731(78)90630-1
- Macdonald IA, Jellett JF, Mahony DE, Holdeman L V. (1979) Bile salt 3 α - and 12 α -hydroxysteroid dehydrogenases from *Eubacterium lentum* and related organisms. Appl Environ Microbiol 37:992–1000
- Macdonald IA, Meier EC, Mahony DE, Costain GA (1976) 3 α -, 7 α - and 12 α -hydroxysteroid dehydrogenase activities from *Clostridium perfringens*. Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab 450:142–153. doi: 10.1016/0005-2760(76)90086-2
- Maclachlan J, Wotherspoon ATL, Ansell RO, Brooks CJW (2000) Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. J Steroid Biochem 72:169–195. doi: 10.1016/S0960-0760(00)00044-3
- Madhavan A, Sindhu R, Parameswaran B, et al (2017) Metagenome analysis: a powerful tool for enzyme bioprospecting. Appl Biochem Biotechnol 183:636–651. doi: 10.1007/s12010-017-2568-3
- Mahato SB, Banerjee S, Podder S (1989) Steroid transformations by microorganisms-III.

- Phytochemistry 28:7–40. doi: 10.1016/0031-9422(89)85002-2
- Malaviya A, Gomes J (2008) Androstenedione production by biotransformation of phytosterols. *Bioresour Technol* 99:6725–37. doi: 10.1016/j.biortech.2008.01.039
- Malaviya A, Gomes J (2009) Rapid screening and isolation of a fungus for sitosterol to androstenedione biotransformation. *Appl Biochem Biotechnol* 158:374–386. doi: 10.1007/s12010-008-8416-8
- Mallonee D, Lijewski M, Hylemon P (1995) Expression in *Escherichia coli* and characterization of a bile acid-inducible 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708. *Curr Microbiol* 5:259–63. doi: 10.1007/BF00295498
- Maneerat S, Nitoda T, Kanzaki H, Kawai F (2005) Bile acids are new products of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:679–683. doi: 10.1007/s00253-004-1777-1
- Marín M, Wong I, Mena J, et al (2013) Zea mays l. plant growth promotion by *Tsukamurella paurometabola* strain c-924. *Biotechnol Apl* 30:105–110
- Marques MPC, Carvalho F, de Carvalho CCCR, et al (2010) Steroid bioconversion: Towards green processes. *Food Bioprod Process* 88:12–20. doi: 10.1016/j.fbp.2010.01.009
- Marques MPC, Fernandes P, Cabral JMS (2012) Continuous steroid biotransformations in microchannel reactors. *N Biotechnol* 29:227–234. doi: 10.1016/j.nbt.2011.10.001
- Maser E, Xiong G, Grimm C, et al (2001) 3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*: biological significance, three-dimensional structure and gene regulation. *Chem Biol Interact* 132:707–722. doi: 10.1016/S0009-2797(00)00302-1
- Merino E, Barrientos A, Rodríguez J, et al (2013) Isolation of cholesterol- and deoxycholate-degrading bacteria from soil samples: Evidence of a common pathway. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:891–904. doi: 10.1007/s00253-012-3966-7
- Mitra S, S.R. Dungan (2001) Cholesterol solubilization in aqueous micellar solutions of Quillaja saponin, bile salts or nonionic surfactantes. *J Agric Food Chem* 49:384–394. doi: 10.1021/jf000568r
- Möbus E, Maser E (1998) Molecular cloning, overexpression, and characterization of steroid-inducible 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. *J Biol Chem* 273:30888–30896. doi: 10.1074/jbc.273.47.30888
- Molchanova M, Andryushina V, Savinova T, et al (2007) Preparation of Androsta-1,4-diene-3,17-dione from Sterols Using *Mycobacterium neoaurum* VKPM Ac-1656 Strain. *Russ J Org Chemistry* 33:379–384. doi: 10.1134/S1068162007030132
- Molinaro A, Wahlström A, Marschall HU (2018) Role of bile acids in metabolic control. *Trends Endocrinol Metab* 29:31–41. doi: 10.1016/j.tem.2017.11.002
- Moradpour Z, Ghasemian A (2016) Protein engineering of microbial cholesterol oxidases: a molecular approach toward development of new enzymes with new properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:4323–4336. doi: 10.1007/s00253-016-7497-5

- Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB (2002) Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* 41:457–500. doi: 10.1016/S0163-7827(02)00006-1S
- Munk C, Lapidus A, Lucas S, et al (2011) Complete genome sequence of *Tsukamurella paurometabola* type strain (no. 33 T). *Stand Genomic Sci* 4:342–351. doi: 10.4056/sigs.1894556
- Murooka Y, Yamashita M (2001) Genetic and protein engineering of diagnostic enzymes, cholesterol oxidase and xylitol oxidase. *J Biosci Bioeng* 91:433–441. doi: 10.1016/S1389-1723(01)80270-X
- Murray H, Peterson D (1952) Oxygenation of steroids by Mucorales fungi. Patent US 2602769. 602,769
- Muthukrishnan S, Merzendorfer H, Arakane Y, Kramer KJ (2012) Chitin metabolism in insects. *Insect Molecular Biology and Biochemistry*
- Nagasawa M, Bae M, Tamura G, Arima K (1969) Microbial transformation of sterols part I. descomposition of cholesterol by microorganisms. *Agric Biol Chem* 3311:1636–1650. doi: 10.1080/00021369.1969.10859516
- Naghibi F, Yazdi MT, Sahebgharani M, Daloui MRN (2002) Microbial transformation of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis*. *J Sci Islam Repub Iran* 13:103–106
- Nahar L, Turner AB (2004) Synthesis of dinorcholane and 5 β -cholane derivatives. *J Chem Res* 8:329–332
- Nahar L, Turner AB (2003) Synthesis of ester-linked lithocholic acid dimers. *Steroids* 68:1157–1161. doi: 10.1016/j.steroids.2003.08.015
- Nassiri-Koopaei N, Faramarzi MA (2015) Recent developments in the fungal transformation of steroids. *Biocatal Biotransformation* 33:1–28. doi: 10.3109/10242422.2015.1022533
- Nesbitt NM, Yang X, Fontán P, et al (2010) A thiolase of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence and production of androstenedione and androstadienedione from cholesterol. *Infect Immun* 78:275–282. doi: 10.1128/IAI.00893-09
- Niwas R, Singh V, Singh R, et al (2014) Cholesterol oxidase production from entrapped cells of *Streptomyces* sp. *J Basic Microbiol* 54:1233–1239. doi: 10.1002/jobm.201300847
- Niwas R, Singh V, Singh R, et al (2013) Production, purification and characterization of cholesterol oxidase from a newly isolated *Streptomyces* sp. *World J Microbiol Biotechnol* 29:2077–2085. doi: 10.1007/s11274-013-1371-8
- Nonappa, Maitra U (2008) Unlocking the potential of bile acids in synthesis, supramolecular/materials chemistry and nanoscience. *Org Biomol Chem* 6:657–669. doi: 10.1039/b714475j
- Nury T, Samadi M, Zarrouk A, et al (2013) Improved synthesis and in vitro evaluation of the cytotoxic profile of oxysterols oxidized at C4 (4 α - and 4 β -hydroxycholesterol) and C7 (7-ketcholesterol, 7 α - and 7 β -hydroxycholesterol) on cells of the central nervous system. *Eur*

- J Med Chem 70:558–567. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.09.028
- Ohashi K, Miyagawa Y, Nakamura Y, Shibuya H (2008) Bioproduction of bile acids and the glycine conjugates by *Penicillium* fungus. J Nat Med 62:83–86. doi: 10.1007/s11418-007-0190-3
- Olivares FL (2001) El origen de Syntex, una enseñanza histórica en el contexto de ciencia, tecnología y sociedad. Rev la Soc Química México 45:93–96
- Olkkonen VM, Béaslas O, Nissilä E (2012) Oxysterols and their cellular effectors. Biomolecules 2:76–103. doi: 10.3390/biom2010076
- Oppermann UCT, Maser E (1996) Characterization of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. Eur J Biochem 241:744–749. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.00744.x
- Organización de Naciones Unidas (1987) Nuestro futuro común
- Osawa K, Shigemura K, Shirai H, et al (2015) Bacterial identification using *ssrA* encoding transfer-messenger RNA. Southeast Asian J Trop Med Public Heal 46:720 –727
- Owen R, Bilton R (1983) The degradation of cholic acid by *Pseudomonas* sp. N.C.I.B. 10590 under anaerobic conditions. Biochem J 216:641–654. doi: 10.1007/1-4020-4494-1_14
- Pang C, Cao Y, Zhu X (2016) Biotransformation of cholesterol and 16,17- α epoxypregnenolone by novel *Cladosporium* sp. strain IS547. J Basic Microbiol 57:12–20. doi: 10.1002/jobm.201600191
- Patil S, Patil S, Gawali S, et al (2013) Novel self-assembled lithocholic acid nanoparticles for drug delivery in cancer. RSC Adv 3:19760–19764. doi: 10.1039/c3ra42994f
- Pearson A, Budin M, Brocks JJ (2003) Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. Proc Natl Acad Sci 100:15352–15357. doi: 10.1073/pnas.2536559100
- Perez C, Falero A, Llanes N, et al (2003) Resistance to androstanes as an approach for androstandienedione yield enhancement in industrial mycobacteria. J Ind Microbiol Biotechnol 30:623–626. doi: 10.1007/s10295-003-0079-4
- Peterson D, H. M, Eppstein S, et al (1952) Microbiological transformations of steroids. I. Introduction of oxygen at carbon 11 of progesterone. J Am Chem Sot 74:5933–5936. doi: 10.1021/ja01143a033
- Peterson D, Murray H (1952) Microbiological oxygenation of steroids at carbon 11. J Am Chem Sot 74:1871–1872. doi: 10.1021/ja01127a531
- Petrusma M, Van Der Geize R, Dijkhuizen L (2014) 3-Ketosteroid 9 α -hydroxylase enzymes: Rieske non-heme monooxygenases essential for bacterial steroid degradation. Antonie Van Leeuwenhoek 106:157–172. doi: 10.1007/s10482-014-0188-2
- Philipp B (2011) Bacterial degradation of bile salts. Appl Microbiol Biotechnol 89:903–915. doi: 10.1007/s00253-010-2998-0
- Pitt JI, Hocking A (1997) Fungi and food spoilage, 2nd ed. Blackie academic and professional,

London

- Pollegioni L, Piubelli L, Molla G (2009) Cholesterol oxidase: biotechnological applications. FEBS J 276:6857–6870. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07379.x
- Porto da Silva C (2012) “ Potencial enzimático da microbiota da pele humana e sua ação sobre insumos de fragrâncias ”. Universidade Estadual de Campinas
- Prabha V, Ohri M (2006) Review : Bacterial transformations of bile acids. 191–196. doi: 10.1007/s11274-005-9019-y
- Praveen V, Srivastava A (2011) Purification and characterization of the enzyme cholesterol oxidase from a new isolate of *Streptomyces* sp . Appl Biochem Biotechnol 165:1414–1426. doi: 10.1007/s12010-011-9360-6
- Putkaradze N, Litzenburger M, Hutter MC, Bernhardt R (2018) CYP109E1 from *Bacillus megaterium* acts as 24- and 25-hydroxylase for cholesterol. ChemBioChem 20:1–5. doi: 10.1002/cbic.201800595
- Ray Dias J, Gao H, Kolehmainen E (2000) ¹³C nuclear magnetic resonance data of bile acid derivatives. Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc 56:53–77. doi: 10.1016/S1386-1425(99)00135-3
- Reetz M (2006) High-throughput screening systems for assaying the enantioselectivity of enzyme. In: Reymond J (ed) Enzyme assays. High-throughput screening, Genetic Selection and fingerprinting. WILEY-VCH, pp 41–76
- Reiss R, Faccio G, Thöny-meyer L, Richter M (2014) Cloning , expression and biochemical characterization of the cholesterol oxidase CgChoA from *Chryseobacterium gleum*. BMC Biotechnol 14:1. doi: 10.1186/1472-6750-14-46
- Reymond JL (2009) Fluorescence assays for biotransformations. In: Fessner W, Thorleif A (eds) Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactio. WILEY-VCH, pp 1–20
- Riva S (2013) 1983-2013: The long wave of biocatalysis. Trends Biotechnol 31:120–121. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.10.013
- Robert V, Stegehuis G, Stalpers. J (2005) The MycoBank engine and related databases
- Rodríguez P, Sierra W, Rodríguez S, Menéndez P (2006) Biotransformation of 1,8-cineole, the main product of *Eucalyptus* oils. Electron J Biotechnol 9:232–236. doi: 10.2225/vol9-issue3-28
- Rosloniec KZ, Wilbrink MH, Capiyk JK, et al (2009) Cytochrome P450 125 (CYP125) catalyses C26-hydroxylation to initiate sterol side-chain degradation in *Rhodococcus jostii* RHA1. Mol Microbiol 74:1031–1043. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06915.x
- Rugor A, Tataruch M, Staro J, et al (2017) Regioselective hydroxylation of cholecalciferol, cholesterol and other sterol derivatives by steroid C25 dehydrogenase. Appl Microbiol Biotechnol 101:1163–1174. doi: 10.1007/s00253-016-7880-2

- Russell DW (2003) The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 72:137–174. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712
- Ryan L, O’Callaghan YC, O’Brien NM (2005) The role of the mitochondria in apoptosis induced by 7 β -hydroxycholesterol and cholesterol-5 β ,6 β -epoxide. *Br J Nutr* 94:519. doi: 10.1079/bjn20051524
- Sáenz JP, Grosser D, Bradley AS, et al (2015) Hopanoids as functional analogues of cholesterol in bacterial membranes. *Proc Natl Acad Sci* 112:11971–11976. doi: 10.1073/pnas.1515607112
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Bio Evol* 4:406–425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Sallam LAR, El-Refai AM, El-Minofi HA (2005) Physiological and biochemical improvement of the enzyme side-chain degradation of cholesterol by *Fusarium solani*. *Process Biochem* 40:203–206. doi: 10.1016/j.procbio.2003.12.006
- Samuels GJ, Dodd SL, Gams W, et al (2002) *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94:146–170. doi: 10.1080/15572536.2003.11833257
- Samuels GJ, Suarez C, Solis K, et al (2006) *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. *Mycol Res* 110:381–392. doi: 10.1016/j.mycres.2006.01.009
- Santos IC, Hildenbrand ZL, Schug KA (2016) Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst* 141:2827–2837. doi: 10.1039/C6AN00131A
- Sasaki T, Nakamori R, Yamaguchi T, et al (2001) The application of dimethyldioxirane for the selective oxidation of polyfunctional steroids. *Chem Phys Lipids* 109:135–143. doi: 10.1016/S0009-3084(00)00209-7
- Schwarz P, Gantier J, Garcia-hermoso D, et al (2006) Molecular identification of *Zygomycetes* from culture and experimentally infected tissues. *J Clin Microbiol* 44:340–349. doi: 10.1128/JCM.44.2.340
- Shah K, Mehdi I, Khan A, Vora V (1980) Microbial transformation of sterols. *Appl Microbiol Biotechnol* 10:167–169. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00504739>
- Shao M, Rao Z, Zhang X, et al (2014) Bioconversion of cholesterol to 4-cholesten-3-one by recombinant *Bacillus subtilis* expressing *choM* gene encoding cholesterol oxidase from *Mycobacterium neoaurum* JC-12. *J Chem Technol Biotechnol* 90:1811–1820. doi: 10.1002/jctb.4491
- Shao M, Zhang X, Rao Z, et al (2019) Identification of steroid C27 monooxygenase isoenzymes involved in sterol catabolism and stepwise pathway engineering of *Mycobacterium neoaurum* for improved. *J Ind Microbiol Biotechnol* s10295-018-02135–5. doi: 10.1007/s10295-018-02135-5
- Shen YB, Wang M, Li HN, et al (2012) Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on phytosterol

- biotransformation by different strains of *Mycobacterium neoaurum*. J Ind Microbiol Biotechnol 39:1253–1259. doi: 10.1007/s10295-012-1130-0
- Sheng Z, Ye R, Ge S, et al (2017) A validated RP-HPLC method for quantitative determination of related impurities of cholic acid bulk drugs. Acta Chromatogr 30:114–118. doi: 10.1556/1326.2017.00250
- Shtratnikova VY, Schelkunov MI, Dovbnya D V., et al (2017) Effect of methyl- β -cyclodextrin on gene expression in microbial conversion of phytosterol. Appl Microbiol Biotechnol 101:4659–4667. doi: 10.1007/s00253-017-8288-3
- Shtratnikova VY, Schelkunov MI, Fokina V V., et al (2016) Genome-wide bioinformatics analysis of steroid metabolism-associated genes in *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D. Curr Genet 62:643–656. doi: 10.1007/s00294-016-0568-4
- Sicard R, Chen LS, Marsaioli AJ, Reymond JL (2005) A fluorescence-based assay for Baeyer-Villiger monooxygenases, hydroxylases and lactonases. Adv Synth Catal 347:1041–1050. doi: 10.1002/adsc.200505040
- Sievänen E, Nojonen V, Král V, et al (2008) ^1H , ^{13}C , ^{19}F NMR, and ESI mass spectral characterization of two geminal difluorosteroids. Magn Reson Chem 46:392–397. doi: 10.1002/mrc.2190
- Smith M, Zahnley J, Pfeifer D, Goff D (1993) Growth and cholesterol oxidation by *Mycobacterium* species in Tween 80 medium. 59:1425–1429
- Soto-Castro D, Lara Contreras RC, Pina-Canseco M, et al (2017) Solvent-free synthesis of 6 β -phenylamino-cholestan-3 β ,5 α -diol and (25R)-6 β -phenylaminospirostan-3 β ,5 α -diol as potential antiproliferative agents. Steroids 126:92–100. doi: 10.1016/j.steroids.2017.08.008
- Sripalakit P, Wichai U, Saraphanchotiwiththaya A (2006) Biotransformation of various natural sterols to androstenones by *Mycobacterium* sp. and some steroid-converting microbial strains. J Mol Catal B Enzym 41:49–54. doi: 10.1016/j.molcatb.2006.04.007
- Steele HL, Jaeger KE, Daniel R, Streit WR (2008) Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. J Mol Microbiol Biotechnol 16:25–37. doi: 10.1159/000142892
- Straathof AJJ, Panke S, Schmid A (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. Curr Opin Biotechnol 13:548–556. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00360-9
- Stytsenko TS, Novak MI, Voishvillo NE, et al (2007) A study of steroid hydroxylation activity of *Curvularia lunata* mycelium. Appl Biochem Microbiol 43:620–624. doi: 10.1134/s0003683807060099
- Sun H, Zhang H, Ang EL, Zhao H (2018) Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. Bioorganic Med Chem 26:1275–1284. doi: 10.1016/j.bmc.2017.06.043
- Suzuki K (1993) Anti-obesity effect of cholest-4-en-3-one, an intestinal catabolite of cholesterol, on mice. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 39:537–543

- Suzuki K, Shimizu T, Nakata T (1998) The cholesterol metabolite cholest-4-en-3-one and its 3-oxo derivatives suppress body weight gain, body fat accumulation and serum lipid concentration in mice. *Bioorganic Med Chem Lett* 8:2133–2138. doi: 10.1016/S0960-894X(98)00362-X
- Swizdor A, Kolek T, Panek A, Milecka N (2012) Selective modifications of steroids performed by oxidative enzymes. *Curr Org Chem* 16:2551–2582. doi: 10.2174/138527212804004625
- Szaleniec M, Wojtkiewicz A, Bernhardt R, et al (2018) Bacterial steroid hydroxylases : enzyme classes , their functions and comparison of their catalytic mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:8153–8171. doi: 10.1007/s00253-018-9239-3
- Tarlera S, Denner EBM (2003) *Sterolibacterium denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel cholesterol-oxidizing, denitrifying member of the β -Proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1085–1091. doi: 10.1099/ijs.0.02039-0
- Teng JLL, Tang Y, Chiu TH, et al (2017) The *groEL* gene is a promising target for species-level identification of *Tsukamurella*. *J Clin Microbiol* 55:649–653. doi: 10.1128/jcm.02260-16
- Teng JLL, Tang Y, Huang Y, et al (2016) Phylogenomic analyses and reclassification of species within the genus *Tsukamurella*: Insights to species definition in the post-genomic era. *Front Microbiol* 7:1–12. doi: 10.3389/fmicb.2016.01137
- Tong W-Y, Dong X (2009) Microbial biotransformation: recent developments on steroid drugs. *Recent Pat Biotechnol* 3:141–153. doi: 10.2174/187220809788700157
- Tong W (2013) Biotransformation of terpenoids and steroids. In: Ramawat K., Merillon J. (eds) *Natural Products*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 2733–2758
- Torshabi M, Badiie M, Faramarzi MA, et al (2011) Biotransformation of methyltestosterone by the filamentous fungus *Mucor racemosus*. *Chem Nat Compd* 47:59–63. doi: 10.1007/s10600-011-9830-7
- Tricarico PM, Caracciolo I, Gratton R, et al (2018) 25-hydroxycholesterol reduces inflammation, viral load and cell death in ZIKV-infected U-87 MG glial cell line. *Inflammopharmacology* 1–5. doi: 10.1007/s10787-018-0517-6
- Truppo MD (2017) Biocatalysis in the pharmaceutical industry: the need for speed. *ACS Med Chem Lett* 8:476–480. doi: 10.1021/acsmedchemlett.7b00114
- Tsuju M, Ichihara Y (1982) Microbial process for producing cholanic acid derivatives. Patent US 4359529
- Turfitt GE (1945) The microbiological degradation of steroids. *Biochem J* 40:79–81. doi: 10.1042/bj0370115
- Uhía I, Galán B, Morales V, García JL (2011) Initial step in the catabolism of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis* mc2155. *Environ Microbiol* 13:943–959. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02398.x
- US Environmental Protection Agency (1999) Integrated Risk Information System (IRIS) on Chromium VI. Washington DC.

- Van Hamme JD, Bergstrand LH, Mohn WW, et al (2016) Delineation of steroid-degrading microorganisms through comparative genomic analysis. *MBio* 7:1–13. doi: 10.1128/mbio.00166-16
- VanderVen BC, Fahey RJ, Lee W, et al (2015) Novel inhibitors of cholesterol degradation in *Mycobacterium tuberculosis* reveal how the bacterium's metabolism is constrained by the intracellular environment. *PLoS Pathog* 11:1–20. doi: 10.1371/journal.ppat.1004679
- Vaquero ME, Barriuso J, Martínez MJ, Prieto A (2016) Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:2047–2061. doi: 10.1007/s00253-015-7258-x
- Volkman JK (2003) Sterols in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:495–506. doi: 10.1007/s00253-002-1172-8
- Vyas JG, Pawar KS, Jethva JAYK, Shah JH (2012) Tracking the efficiency of cholesterol bioconversion by *Nocardia* sp. MTCC 1534 in presence of some ring cleavage inhibitors by gas chromatography. *Int J Pharma Bio Sci* 3:462–470
- Wang KC, You B, Yan J, Lee S (1995) Microbial transformation of lanosterol derivatives with *Mycobacterium* sp. (NRRL B-3805). *J Nat Prod* 70:1222–1227. doi: 10.1021/np50122a010
- Wang Y, Sun D, Chen Z, et al (2013) Biotransformation of 3 β -hydroxy-5-en-steroids by *Mucor silvaticus*. *Biocatal Biotransformation* 31:168–174. doi: 10.3109/10242422.2013.813490
- Wang ZF, Huang YL, Rathman JF, Yang S-T (2002) Lecithin-enhanced biotransformation of cholesterol to androsta-1,4-diene-3,17-dione and androsta-4-ene-3,17-dione. *J Chem Technol Biotechnol* 77:1349–1357. doi: 10.1002/jctb.728
- Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S (2012) MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* 93:965–974. doi: 10.1007/s00253-011-3783-4
- Wilbrink MH (2011) Microbial sterol side chain degradation in *Actinobacteria*. University of Groningen
- Wilbrink MH, Petrusma M, Dijkhuizen L, Van der Geize R (2011) FadD19 of *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269, a steroid-coenzyme A ligase essential for degradation of C-24 branched sterol side chains. *Appl Environ Microbiol* 77:4455–4464. doi: 10.1128/AEM.00380-11
- Williams CI, Shaffer EA (2008) Gallstone disease: Current therapeutic practice. *Curr Treat Options Gastroenterol* 11:71–77. doi: 10.1007/s11938-008-0018-6
- Williams J (2007) Handbook for cleaning/cecontamination of surfaces. Elsevier Science
- Wolfrum C, Carreira E, Meissburger B (2017) ROR gamma modulators. Patent US 9777036 B2
- Woo PCY, Ng KHL, Lau SKP, et al (2003) Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J Clin Microbiol* 41:1996–2001. doi: 10.1128/JCM.41.5.1996-2001.2003

- Wu Y, Li H, Zhang X-M, et al (2015) Efficient hydroxylation of functionalized steroids by *Colletotrichum lini* ST-1. J Mol Catal B Enzym 120:111–118. doi: 10.1016/j.molcatb.2015.07.003
- Xiangdong Z, Cuiping P, Yuting C, Dan F (2016) Biotransformation of cholesterol and 16 α , 17 α -epoxypregnenolone and isolation of hydroxylase in *Burkholderia cepacia* SE-1. Biomed Res Int 2016:8. doi: 10.1155/2016/5727631
- Xiong G, Hans-Jorg M, Maser E (2003) Identification and characterization of a novel translational repressor of the steroid-inducible 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase gene in *Comamonas testosteroni*. J Biol Chem 278:47400–47407. doi: 10.1074/jbc.M309210200
- Xiong G, Luo Y, Jin S, Maser E (2009) Cis- and trans-regulatory elements of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase as biosensor system for steroid determination in the environment. Chem Biol Interact 178:215–220. doi: 10.1016/j.cbi.2008.10.012
- Xiong G, Maser E (2001) Regulation of the steroid-inducible 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase gene in *Comamonas testosteroni*. J Biol Chem 276:9961–9970. doi: 10.1074/jbc.M010962200
- Yamaguchi T, Nakamori R, Iida T, Nambara T (2001) 1 β -hydroxylation in 5 β -steroids: An efficient synthesis of 1 β ,3 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid. Synth Commun 31:1213–1219. doi: 10.1081/SCC-100104006
- Yazdi MT, Malekzadeh F, Khatami H, Kamranpour N (2000) Cholesterol-degrading bacteria : isolation , characterization and bioconversion. World J Microbiol Biotechnol 16:103–105. doi: 88/10.1023/A:1008920105720
- Yeh CH, Kuo YS, Chang CM, et al (2014) Deletion of the gene encoding the reductase component of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in *Rhodococcus equi* USA-18 disrupts sterol catabolism, leading to the accumulation of 3-oxo-23,24-bisnorchole-1,4-dien-22-oic acid and 1,4-androstadiene-3,17-dione. Microb Cell Fact 13:1–10. doi: 10.1186/s12934-014-0130-3
- Yu W, Du B, Yang L, et al (2019) Occurrence, sorption, and transformation of free and conjugated natural steroid estrogens in the environment. Environ Sci Pollut Res. doi: 10.1007/s11356-019-04402-z
- Yue QK, Kass IJ, Sampson NS, Vrielink A (1999) Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants. Biochemistry. doi: 10.1021/bi982497j
- Zheng Y, Zheng M, Xuebing X (2015) Sugar fatty acid esters. In: Ahmad M, Xuebing X (eds) Polar lipids. Biology, Chemistry, and Technology. Elsevier, pp 215–243
- Zucoloto B (2011) “ Versatilidade Enzimática : Triagem , Promiscuidade e Inibição de Enzimas ”. Universidade Estadual de Campinas

6. Anexos

Anexo I- Medios de cultivo y soluciones

➤ Medio mínimo M9 (caldo)

Na ₂ HPO ₄	5.8 g
KH ₂ PO ₄	3.0 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1.0 g
MgSO ₄ 1 M	1.0 mL
CaCl ₂ 1M	100 µL
Vit B1 1%	500 µL
Agua destilada csp	1 L

➤ Medio mínimo M9 sólido

A 500 mL de caldo medio mínimo M9 se le agrega una solución de 15 g de agar en 500 mL de agua destilada previamente esterilizada.

➤ YNB (Yeast Nitrogen Base, DIFCO®)

YNB base	6,7 g
Agua destilada csp	1 L

➤ YNB (Yeast Nitrogen Base, DIFCO®) sólido

Al YNB caldo se le agrega agar para una concentración final de 20 g/L.

➤ TSB (Tryptona de soja caldo, DIFCO®)

TSB	30 g
Agua destilada csp	1 L

➤ TSA (Agar triptona de soja, Merck®)

TSA	40 g
Agua destilada csp	1 L

➤ PDB (Potato Dextrose Both, DIFCO®)

PDB	24 g
Agua destilada csp	1 L

➤ PDA (Potato Dextrose Agar, Merck®)

PDA	39 g
Agua destilada csp	1 L

➤ Buffer M9 con glucosa

Na ₂ HPO ₄	12 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.7 g
Agua destilada csp	1 L

Suplementar con 7.8 mL de una solución de glucosa de 0.7 g/L.

Anexo II- Certificados de depósito de cepas

COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT)



Parc Científic Universitat de València
Catedrático Agustín Escardino, 9
46980 Paterna (Valencia). España
Tel.: +34 96 354 46 12
<http://www.cept.org>



CERTIFICATE OF DEPOSIT

Paterna, July the 13th 2018

Mucor circinelloides
strain VGY2 was deposited in the CECT by

Victoria Giorgi

Universidad de la República - Uruguay. Facultad de Química

Uruguay

on 06-06-2018

and was accessioned CECT 21101



This strain has been checked for viability, purity and authenticity in the CECT facilities and it has been preserved using standard methods. It is publically available without restrictions for research and academic purposes.

COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT)



Parc Científic Universitat de València
Catedrático Agustín Escardino, 9
46980 Paterna (Valencia), España
Tel.: +34 96 354 46 12
<http://www.cept.org>



CERTIFICATE OF DEPOSIT

Paterna, July the 13th 2018

Mucor circinelloides
strain VGH4 was deposited in the CECT by

Victoria Giorgi

Universidad de la República - Uruguay. Facultad de Química

Uruguay

on 06-06-2018

and was accessioned CECT 21102



This strain has been checked for viability, purity and authenticity in the CECT facilities and it has been preserved using standard methods. It is publically available without restrictions for research and academic purposes.

COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO (CECT)



Parc Científic Universitat de València
Catedrático Agustín Escardino, 9
46980 Paterna (Valencia). España
Tel.: +34 96 354 46 12
<http://www.cect.org>



CERTIFICATE OF DEPOSIT

Paterna, February the 19th 2019

Trichoderma koningiopsis
strain VGH3 was deposited in the CECT by

Victoria Giorgi

Universidad de la República - Uruguay. Facultad de Química

Uruguay

on 28-01-2019

and was accessioned CECT 21104

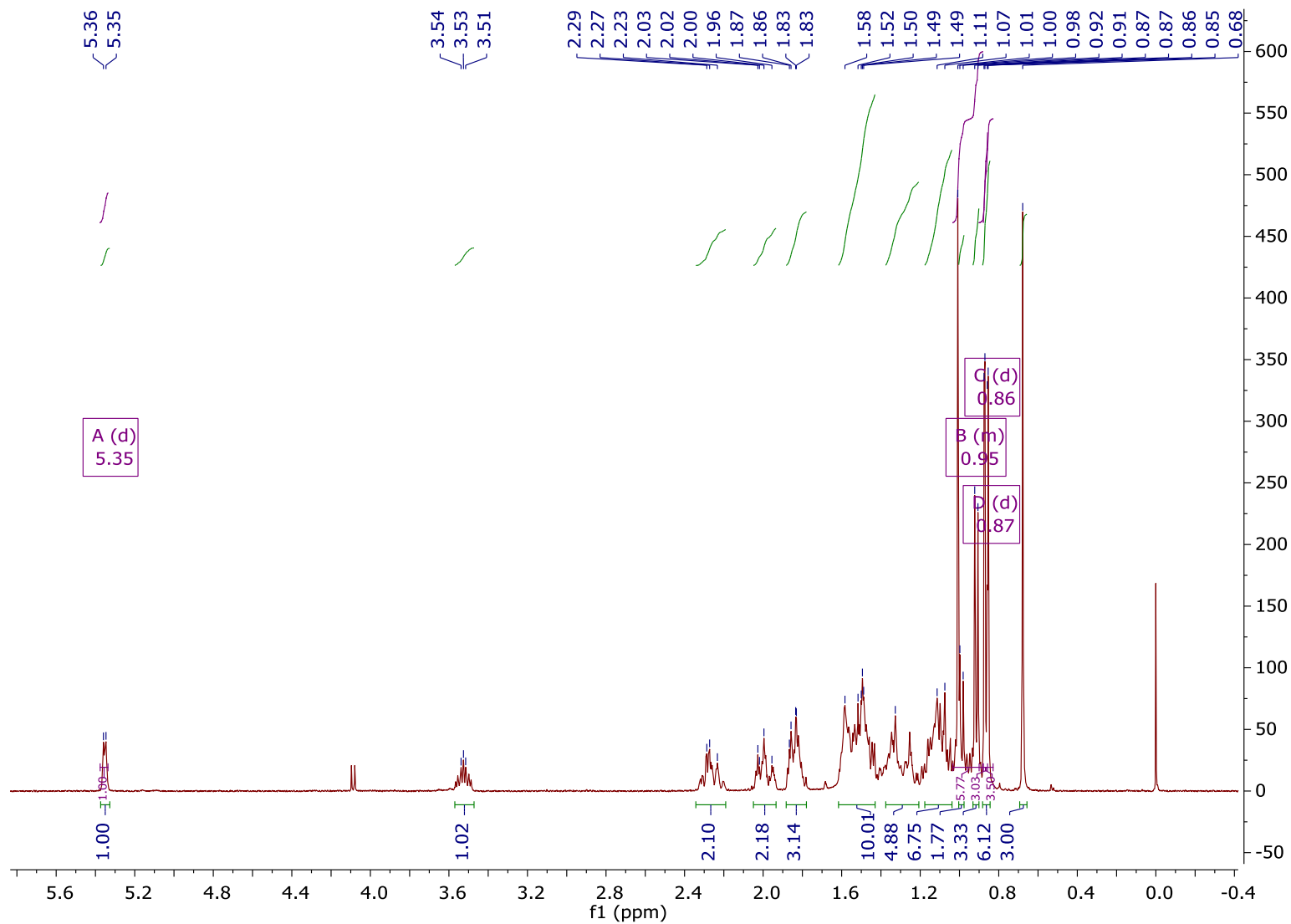


This strain has been checked for viability, purity and authenticity in the CECT facilities and it has been preserved using standard methods. It is publically available without restrictions for research and academic purposes.

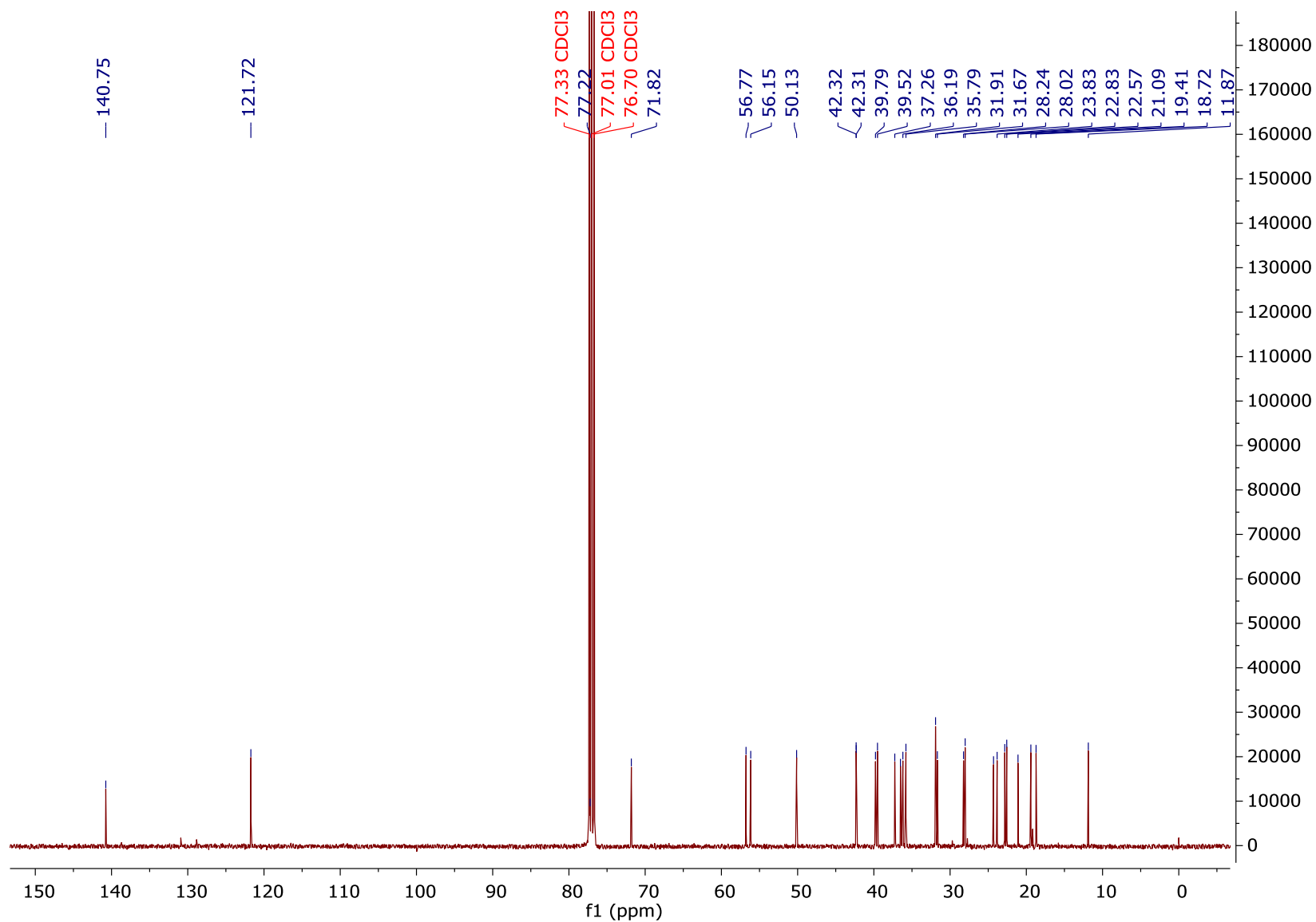
Anexo III- Espectros de RMN

SUSTRATOS

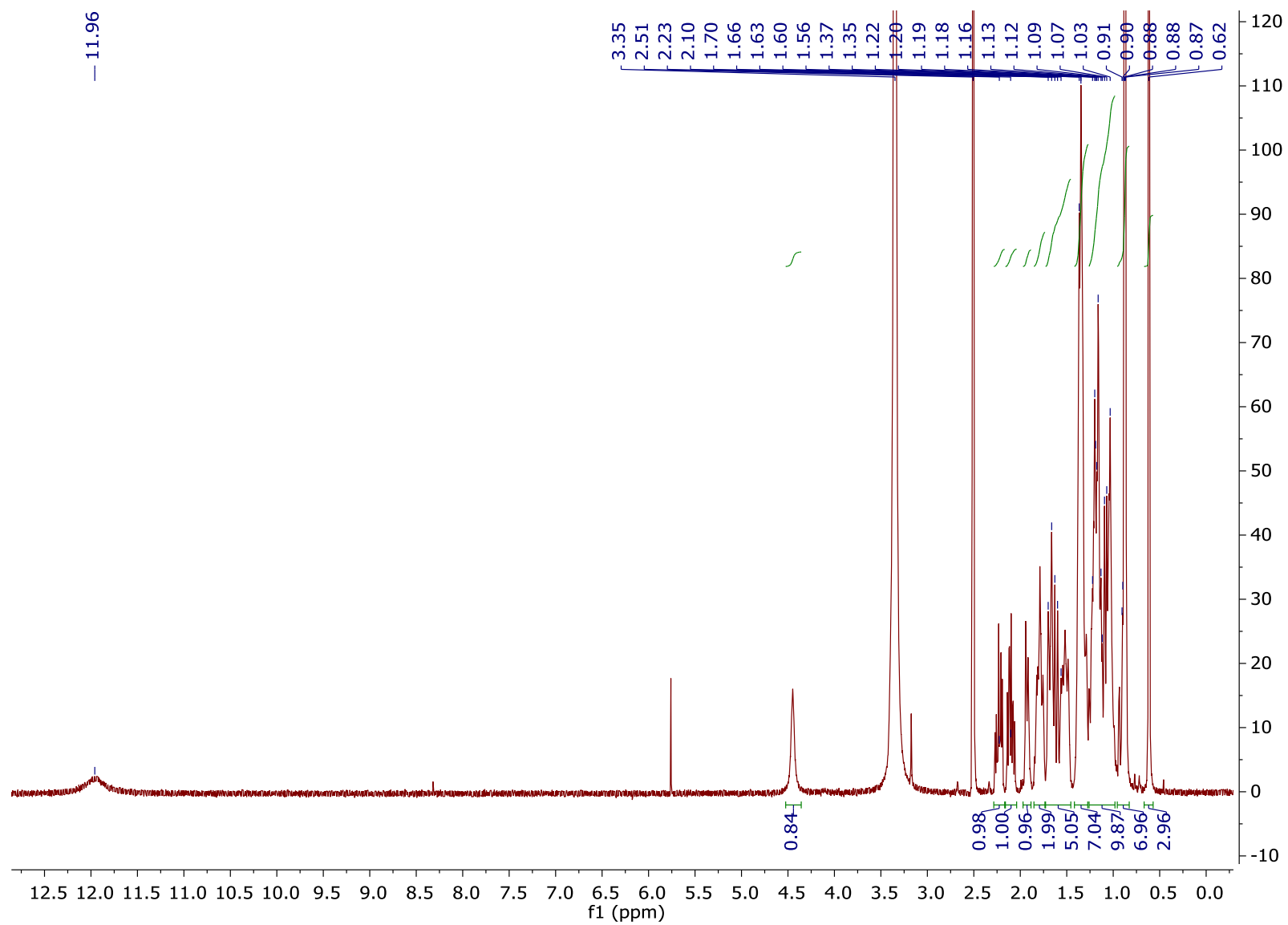
¹H Colesterol



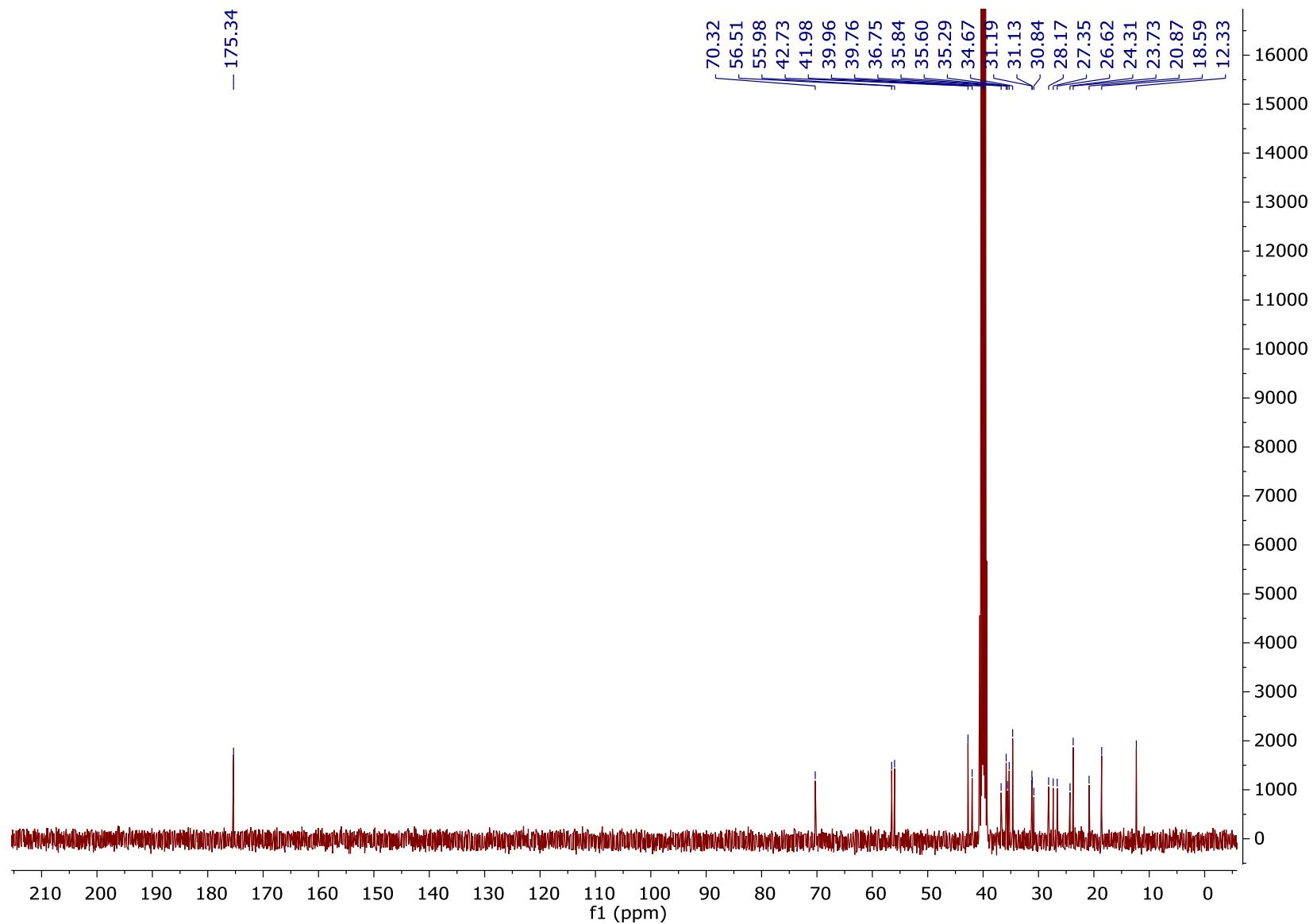
¹³C Colesterol



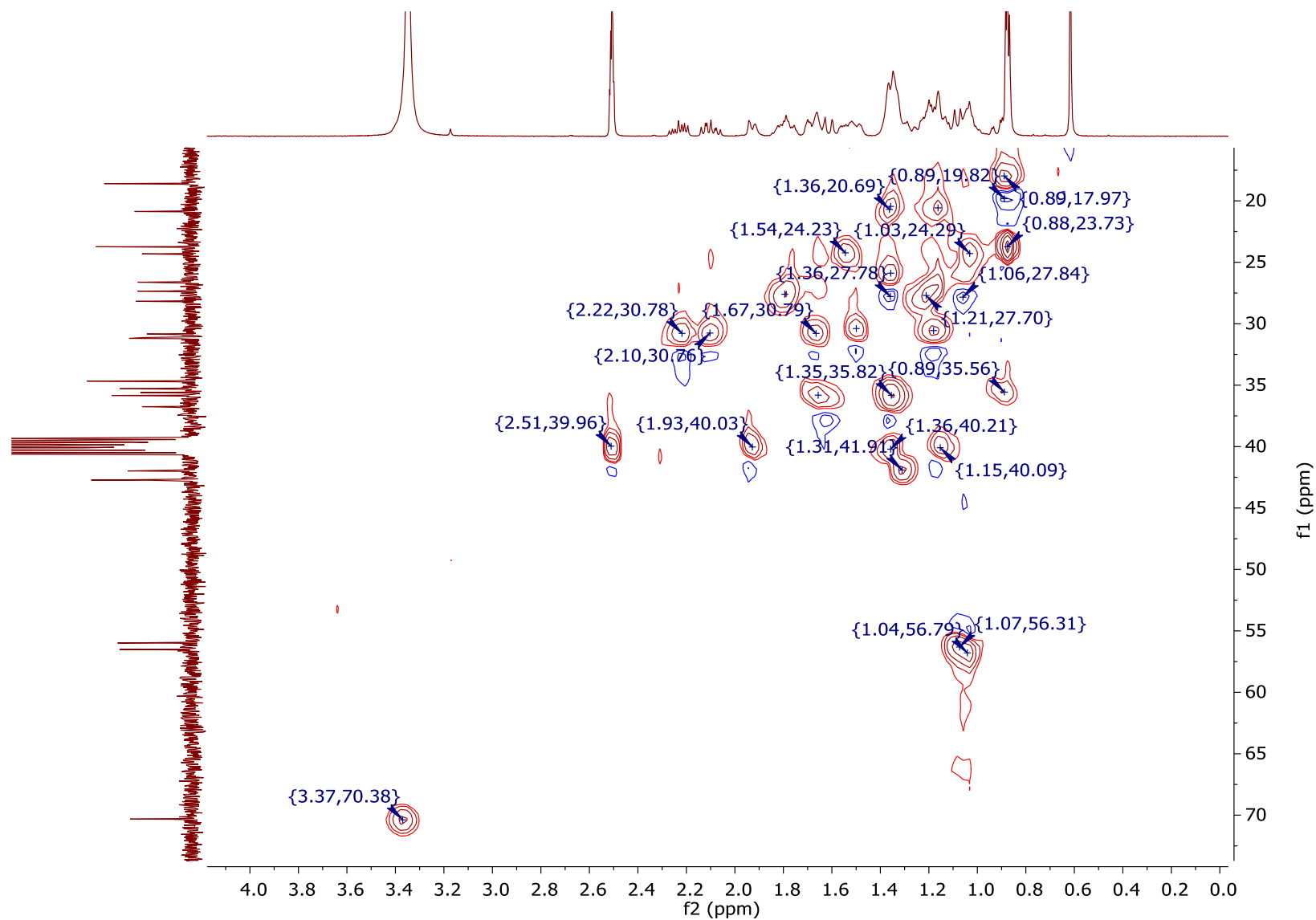
¹H Ácido litocólico



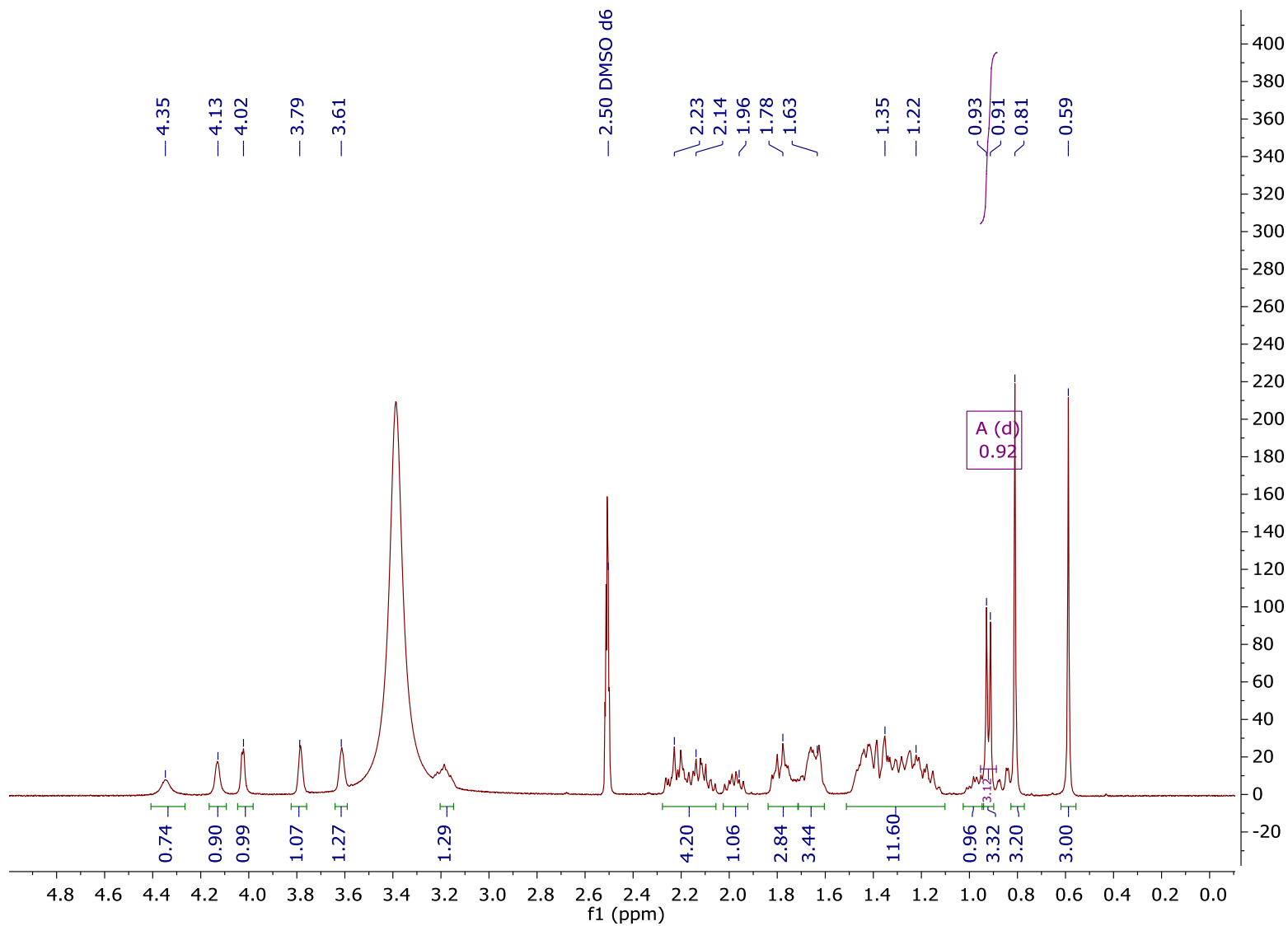
^{13}C Ácido litocólico



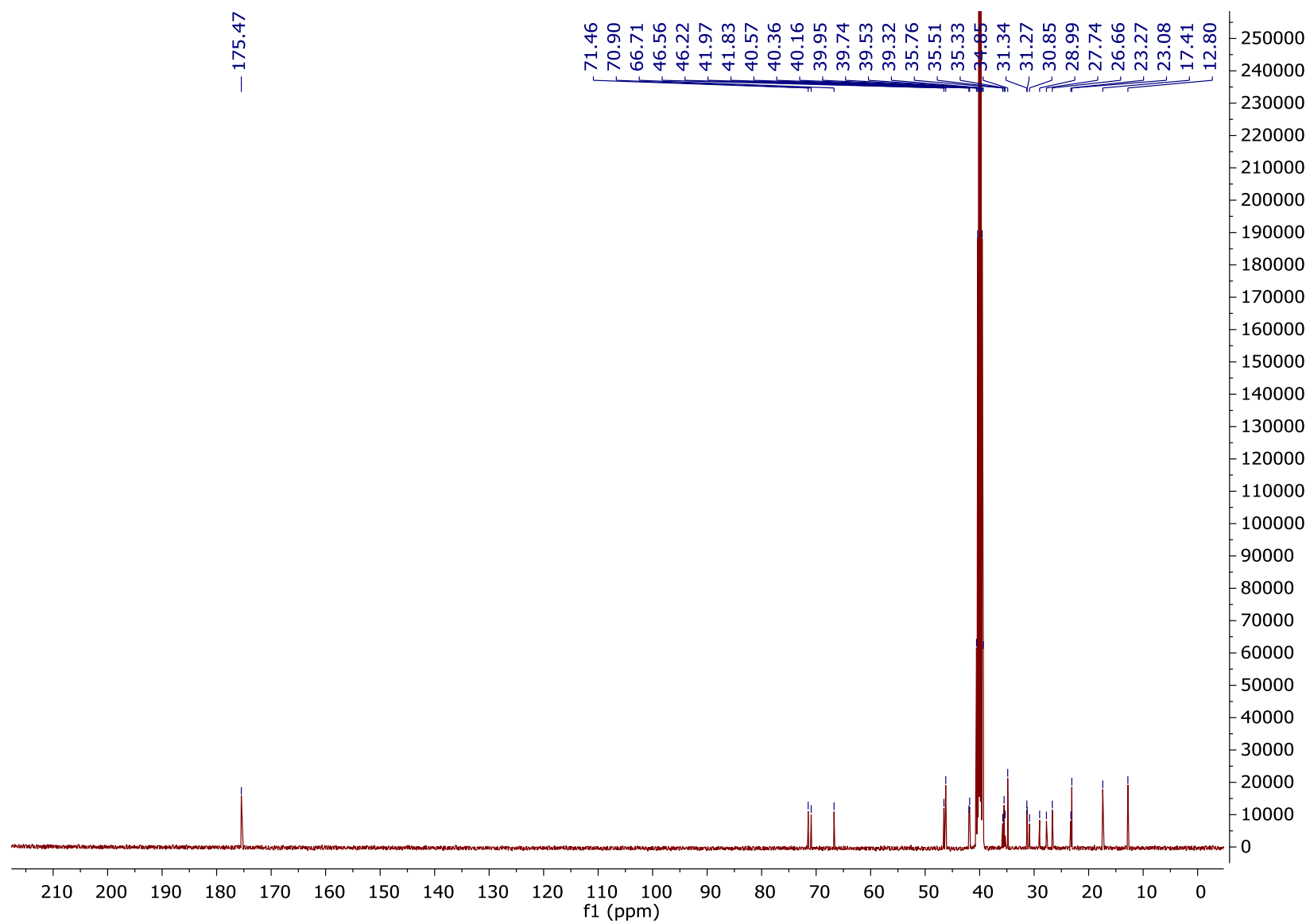
HSQC Ácido litocólico



¹H Ácido cólico

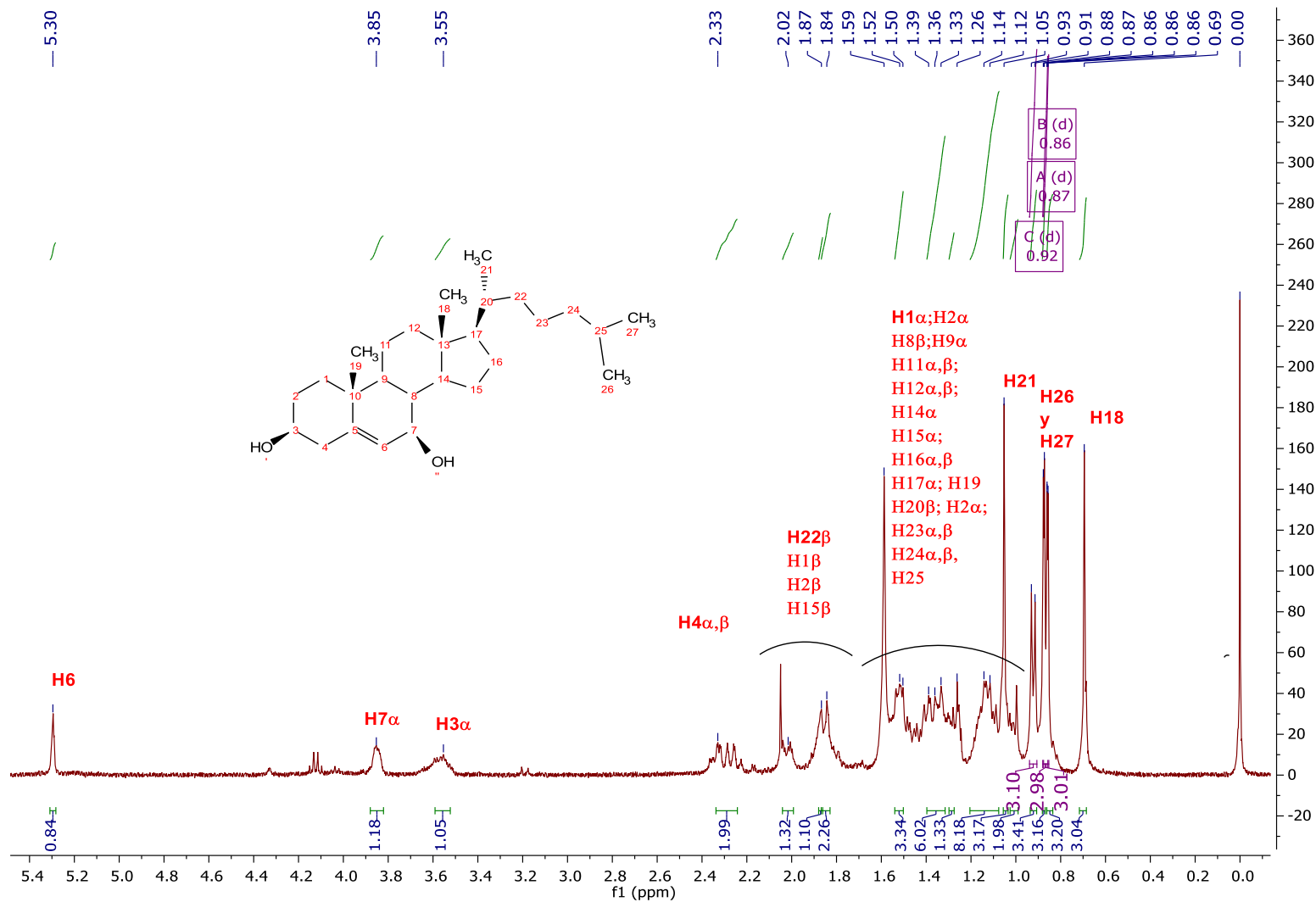


^{13}C Ácido cólico

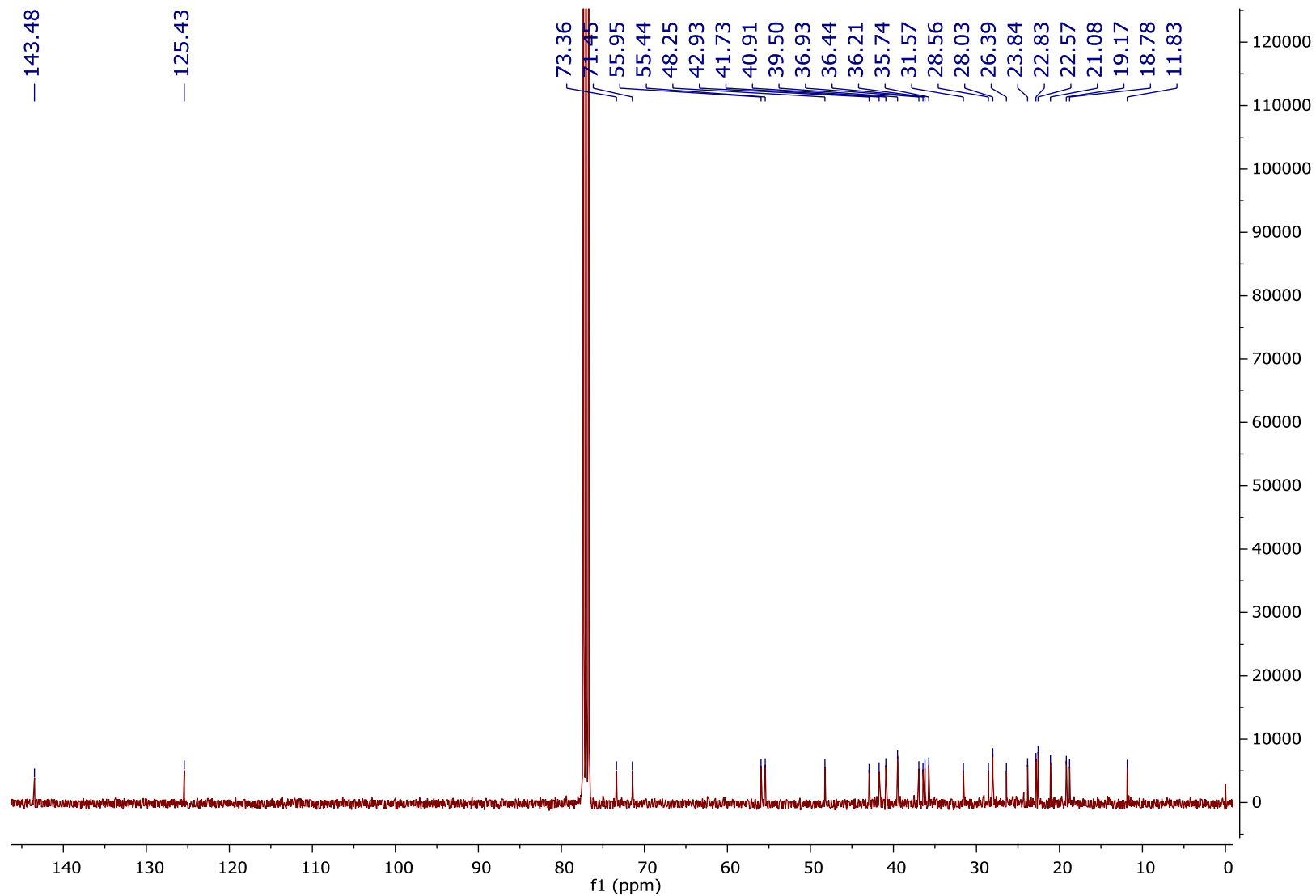


PRODUCTOS

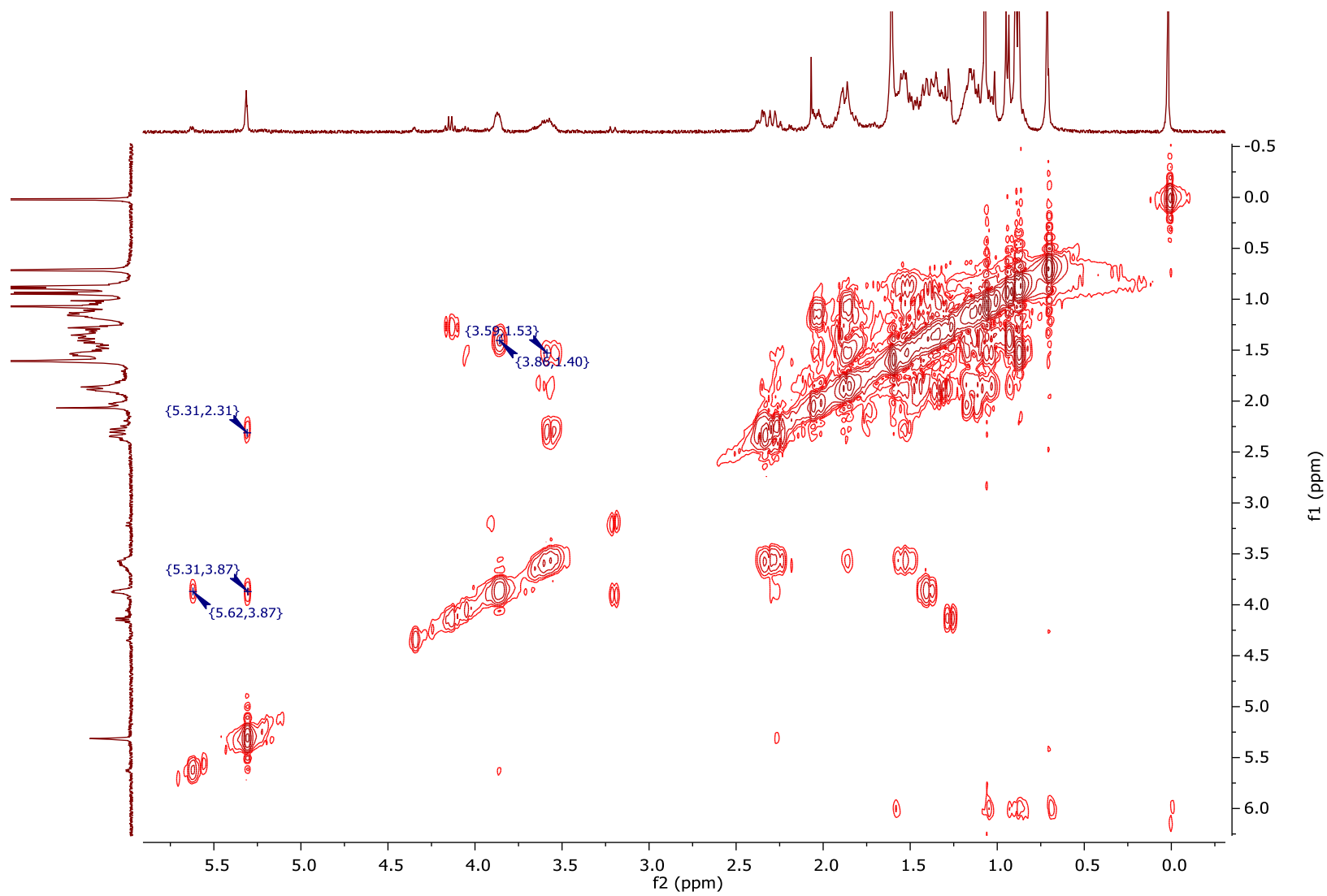
^1H 7 β -hidroxicolesterol



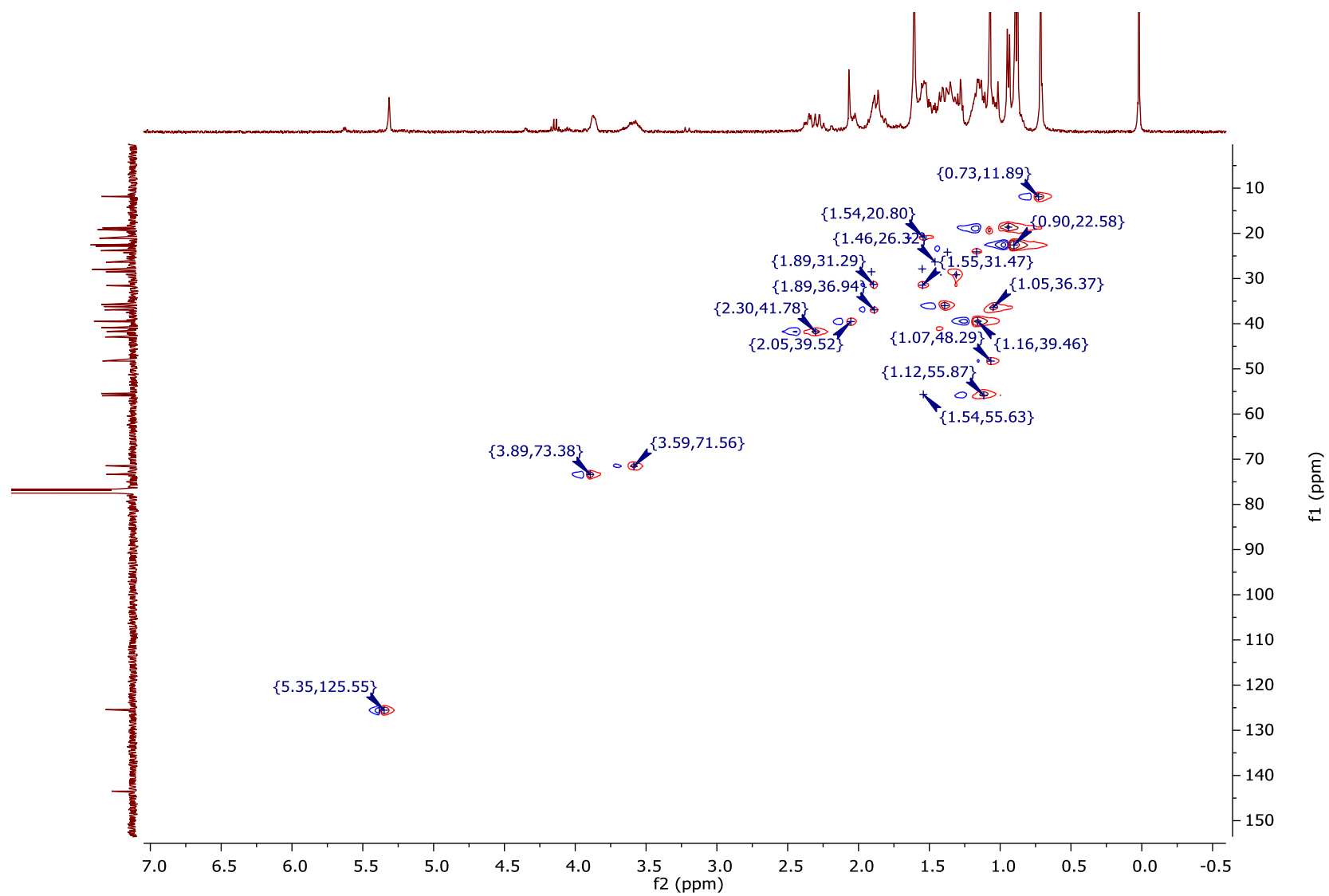
¹³C 7β-hidroxicolesterol



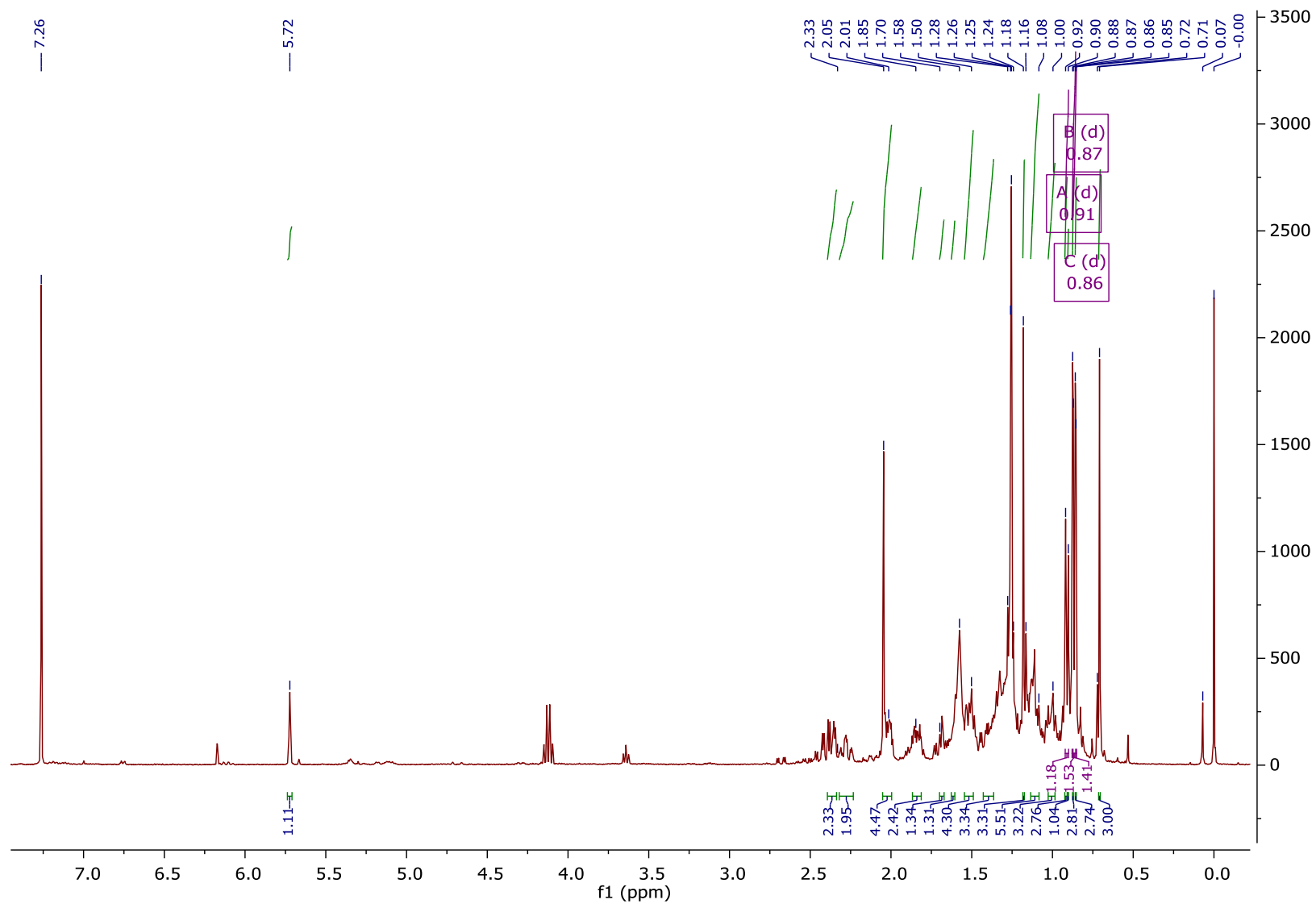
COSY 7 β -hidroxicolesterol



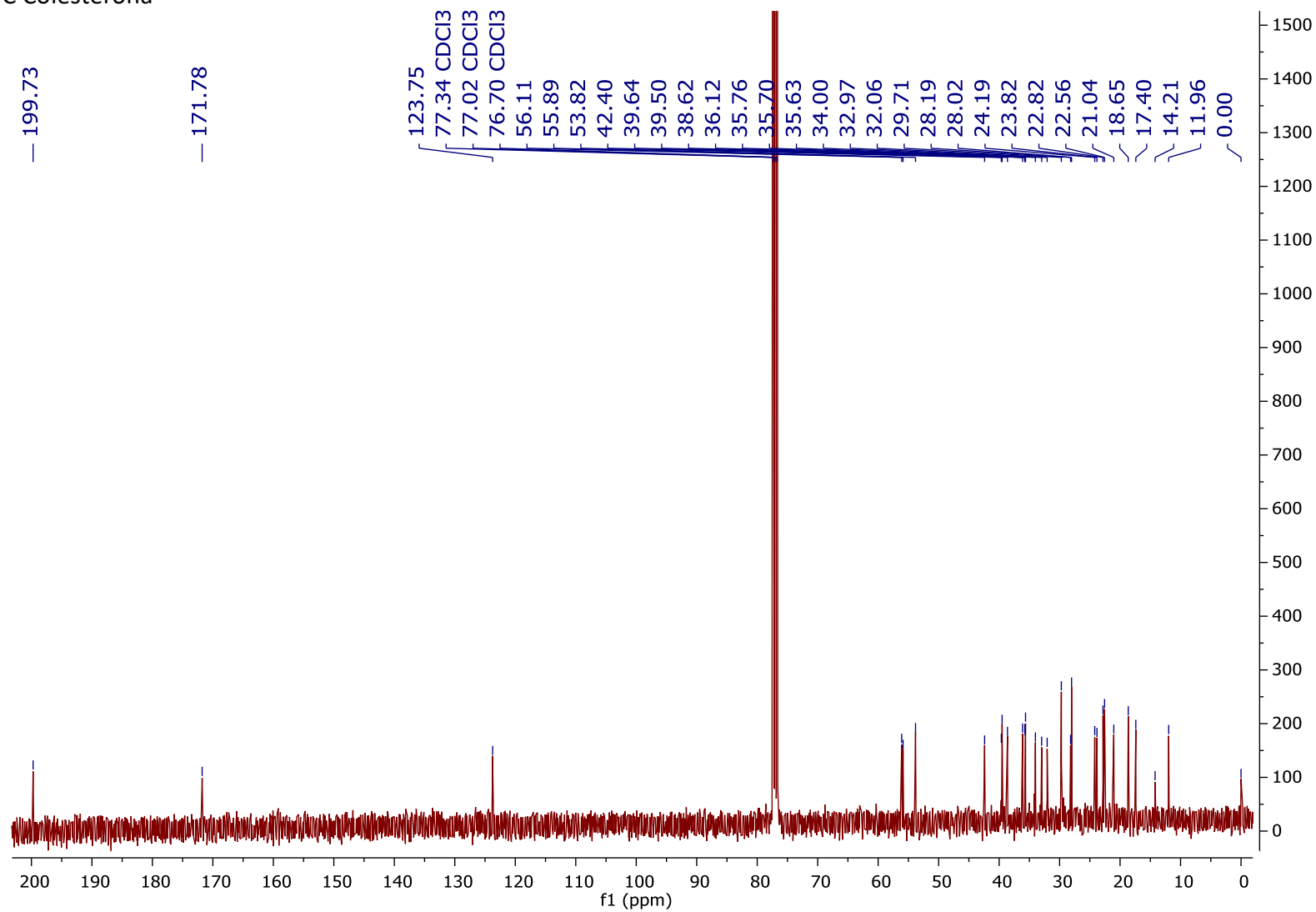
HSQC 7 β -hidroxicolesterol



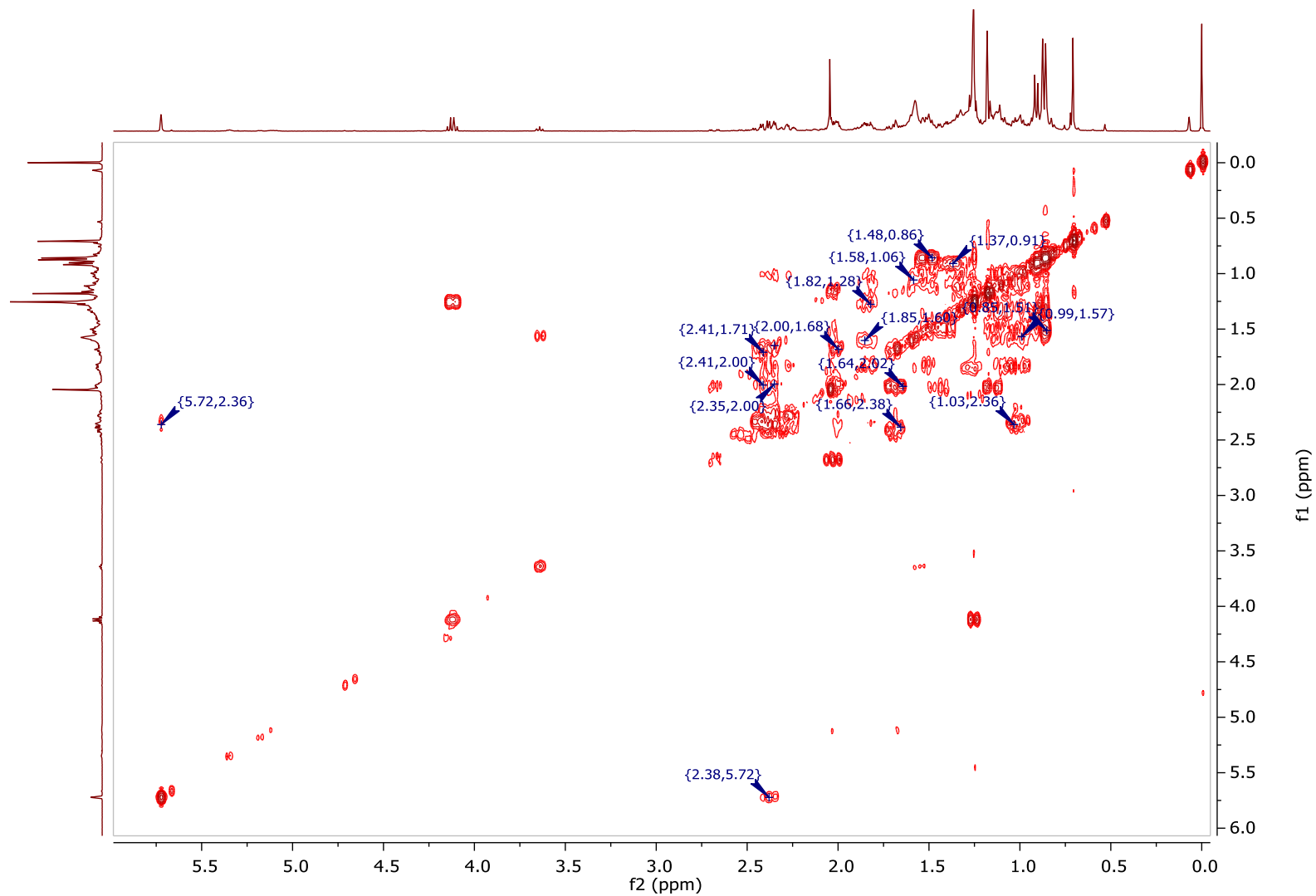
¹H Colesterona



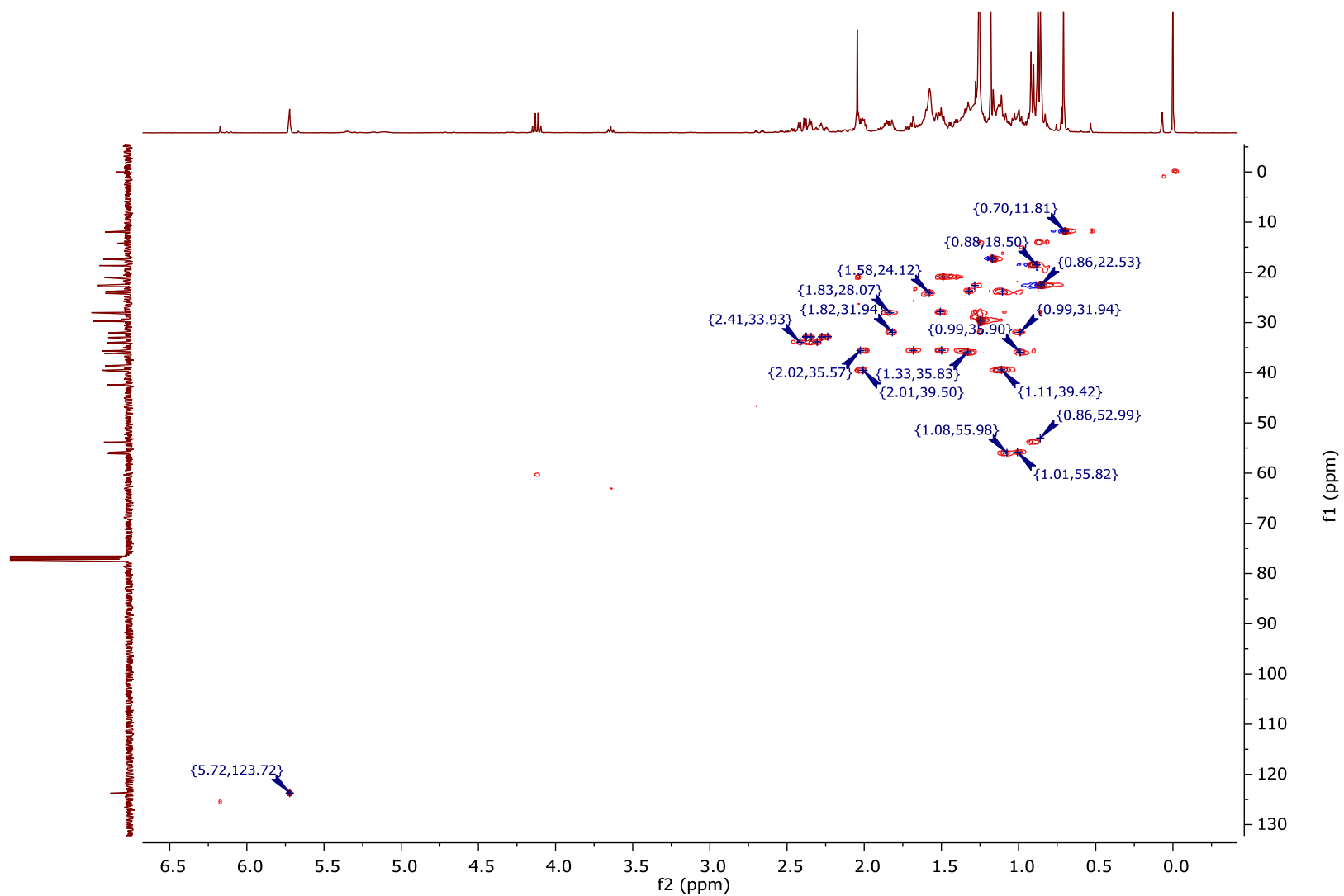
¹³C Colesterona



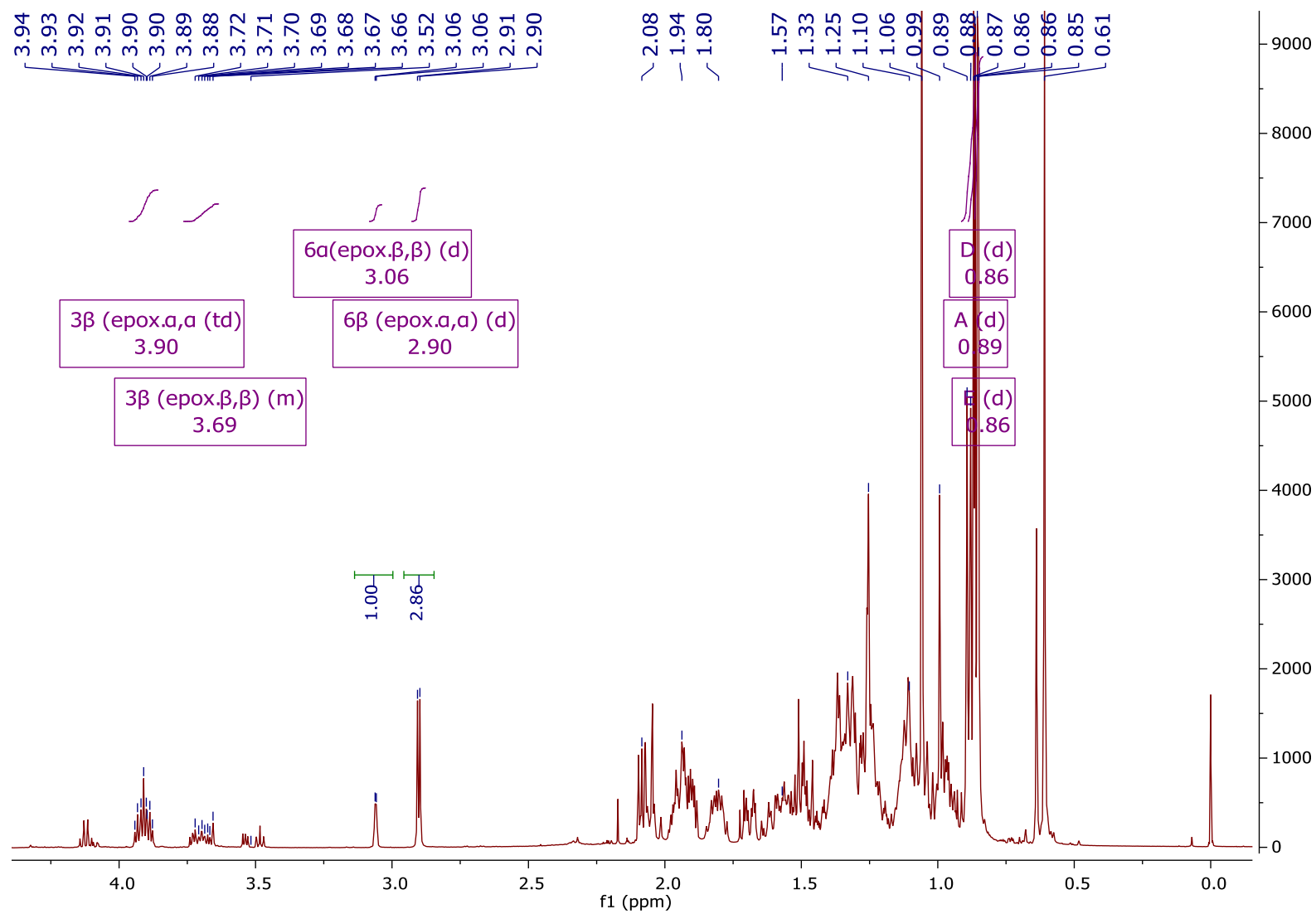
COSY Colesterona



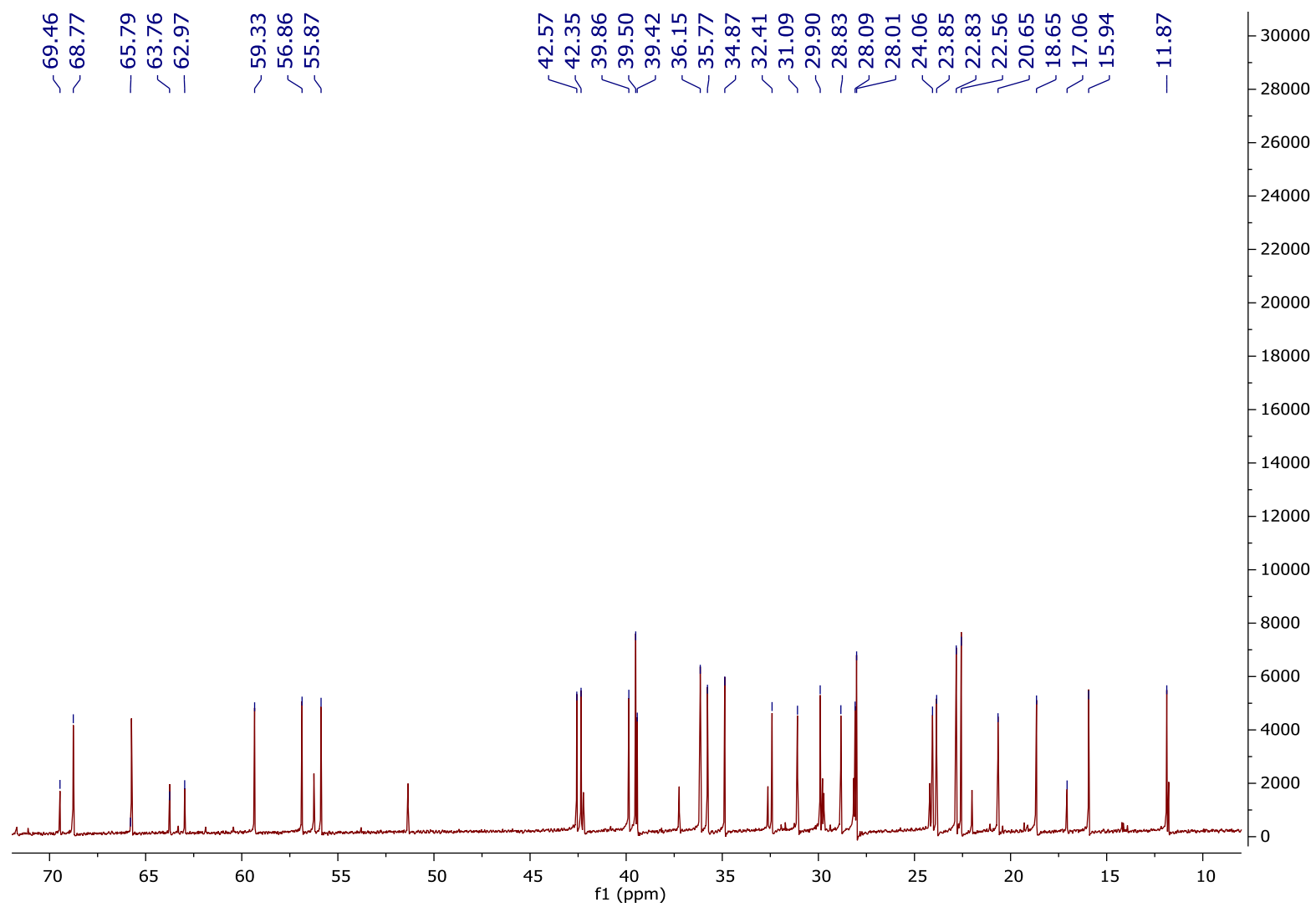
HSQC Colesterona



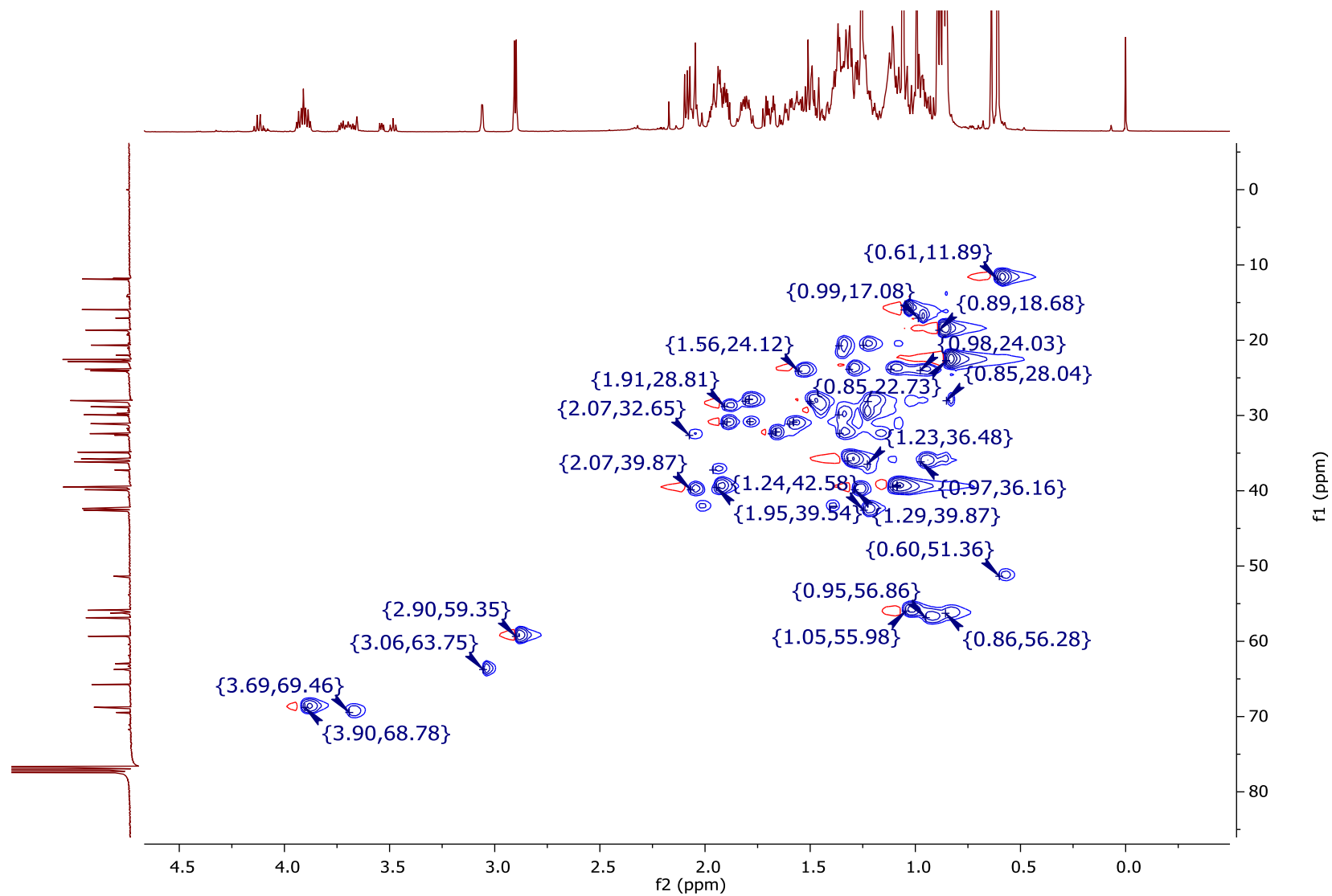
¹H 5,6-epoxicolesterol



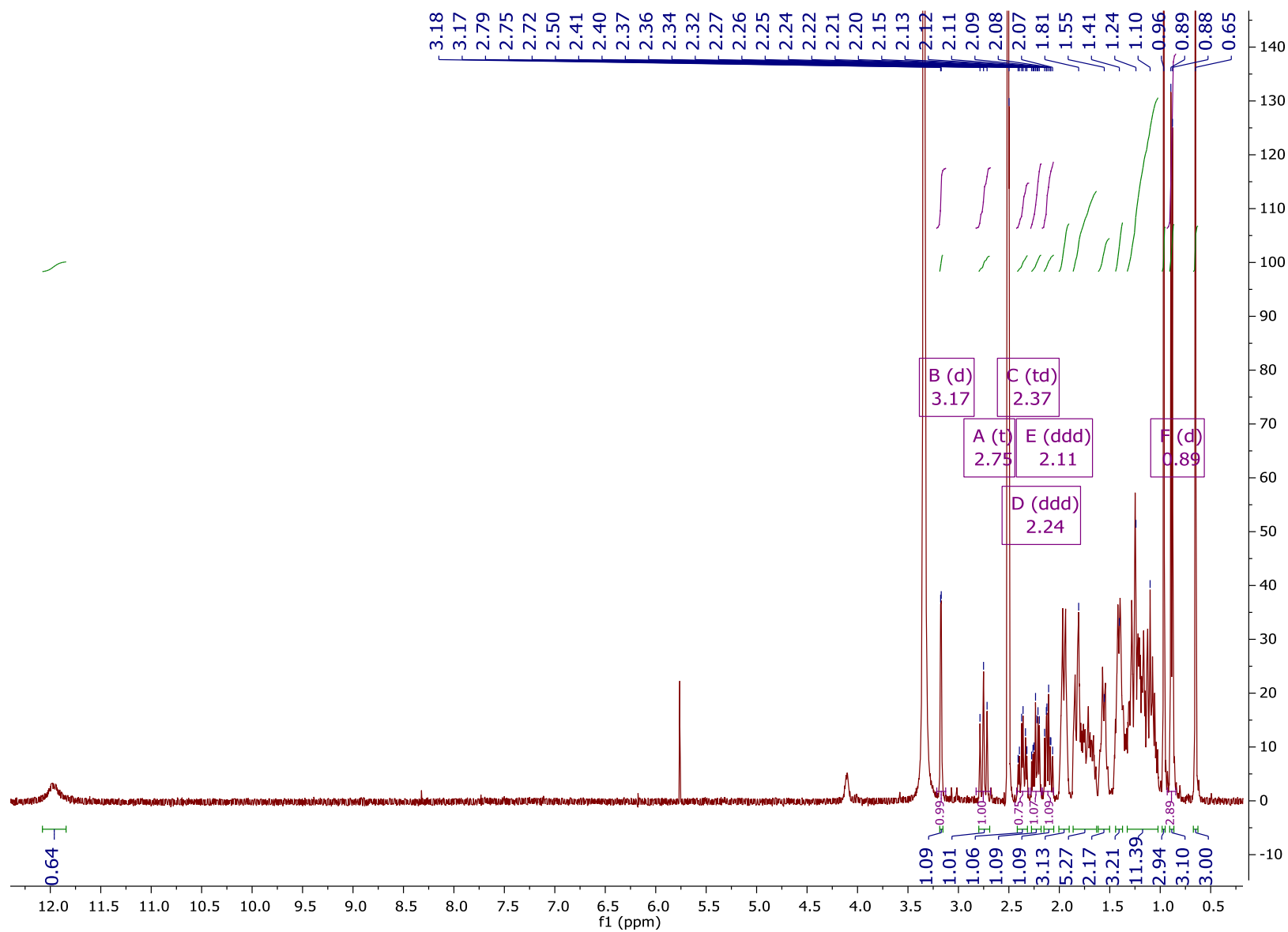
^{13}C 5,6-epoxicolesterol



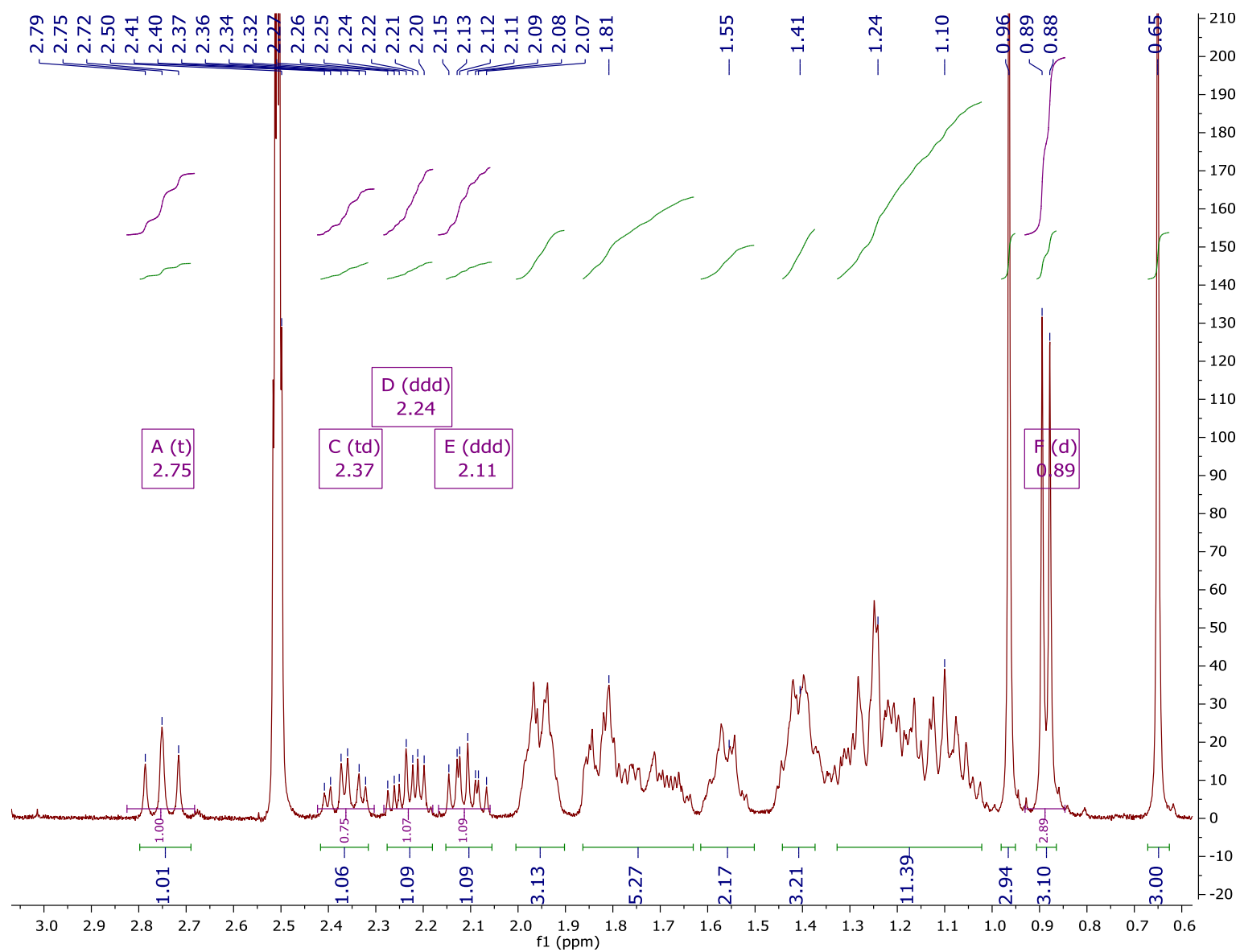
HSQC 5,6-epoxicolesterol



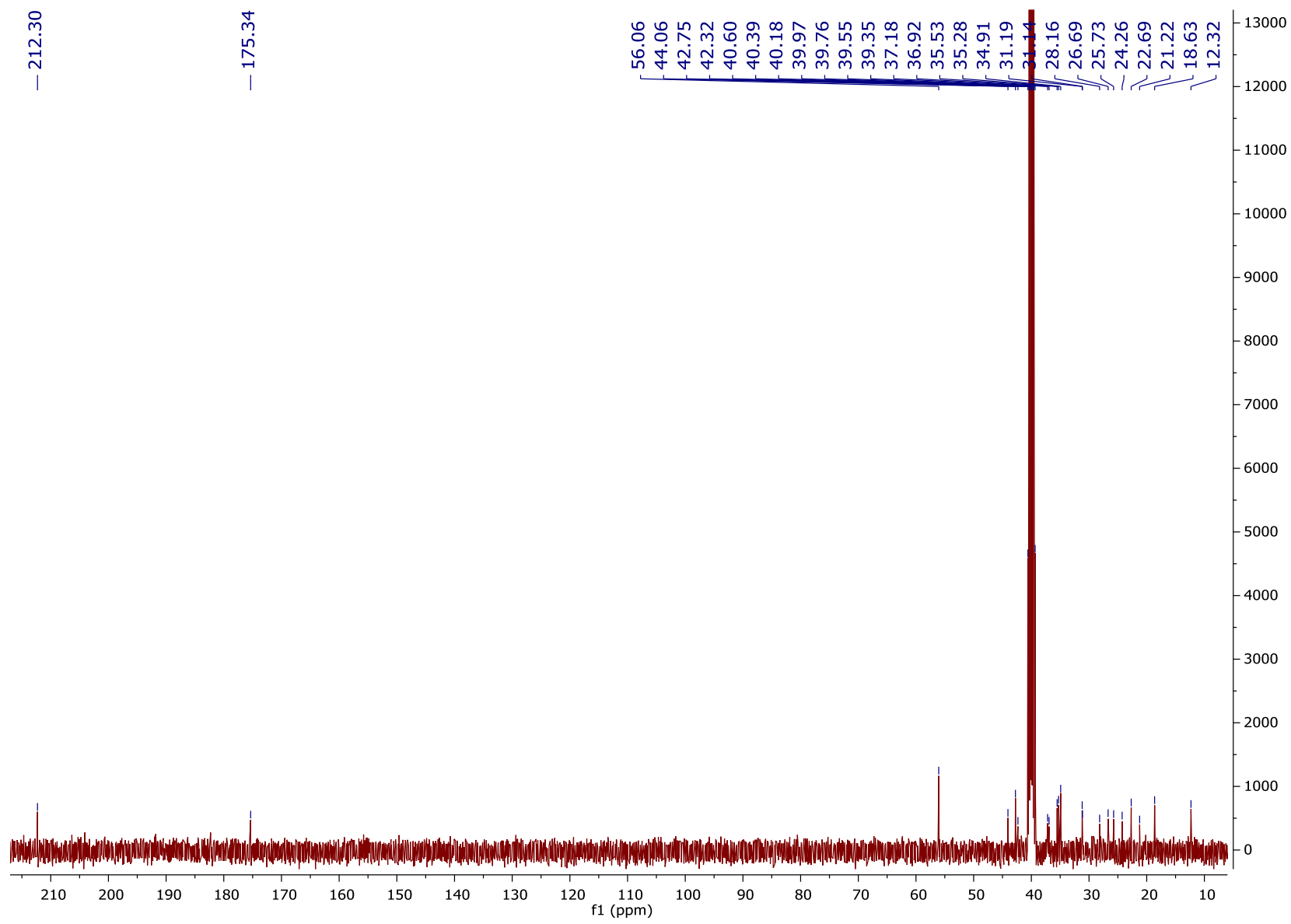
¹H ácido 3-cetolitocólico



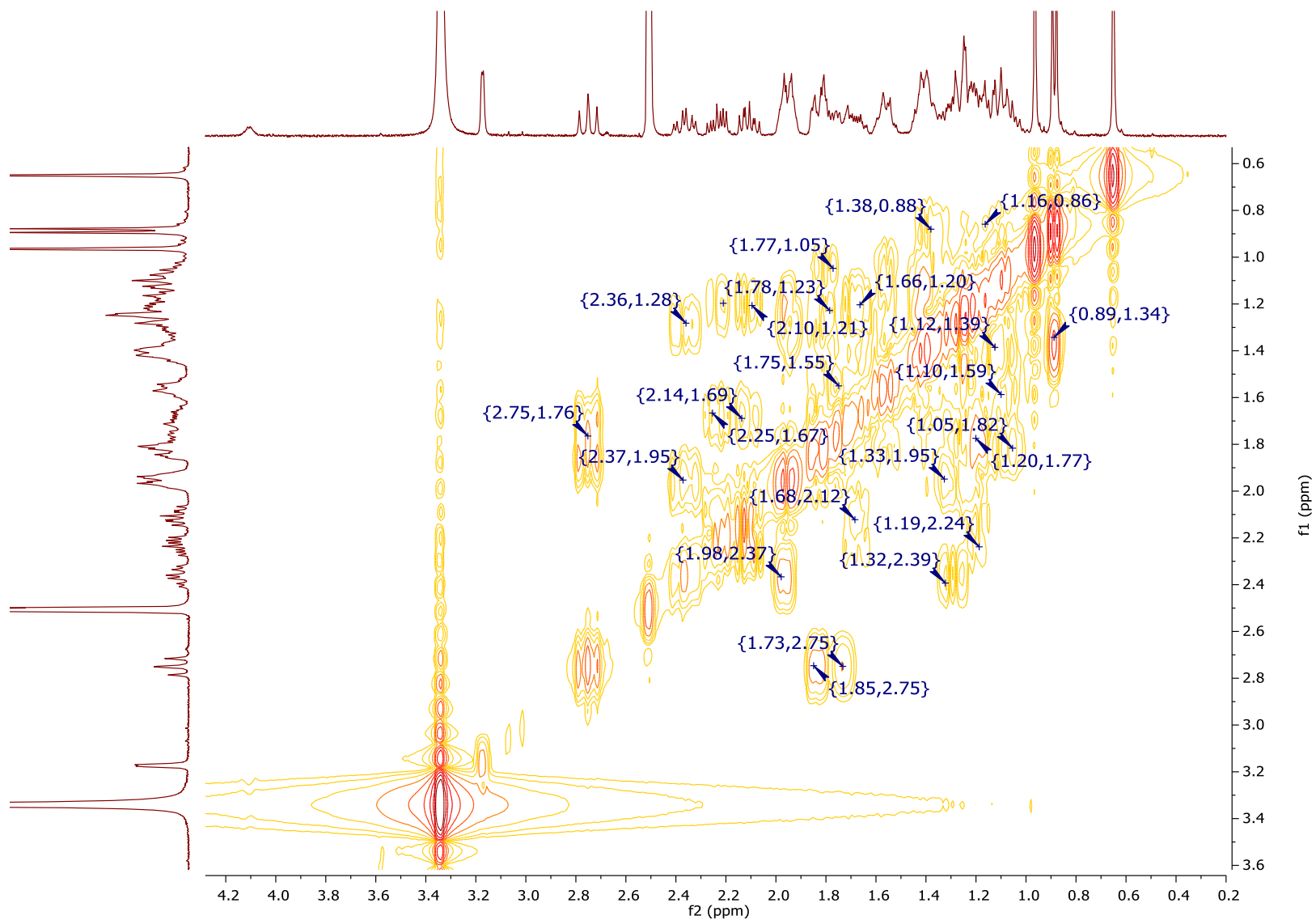
¹H- ampliado ácido 3-cetolítico



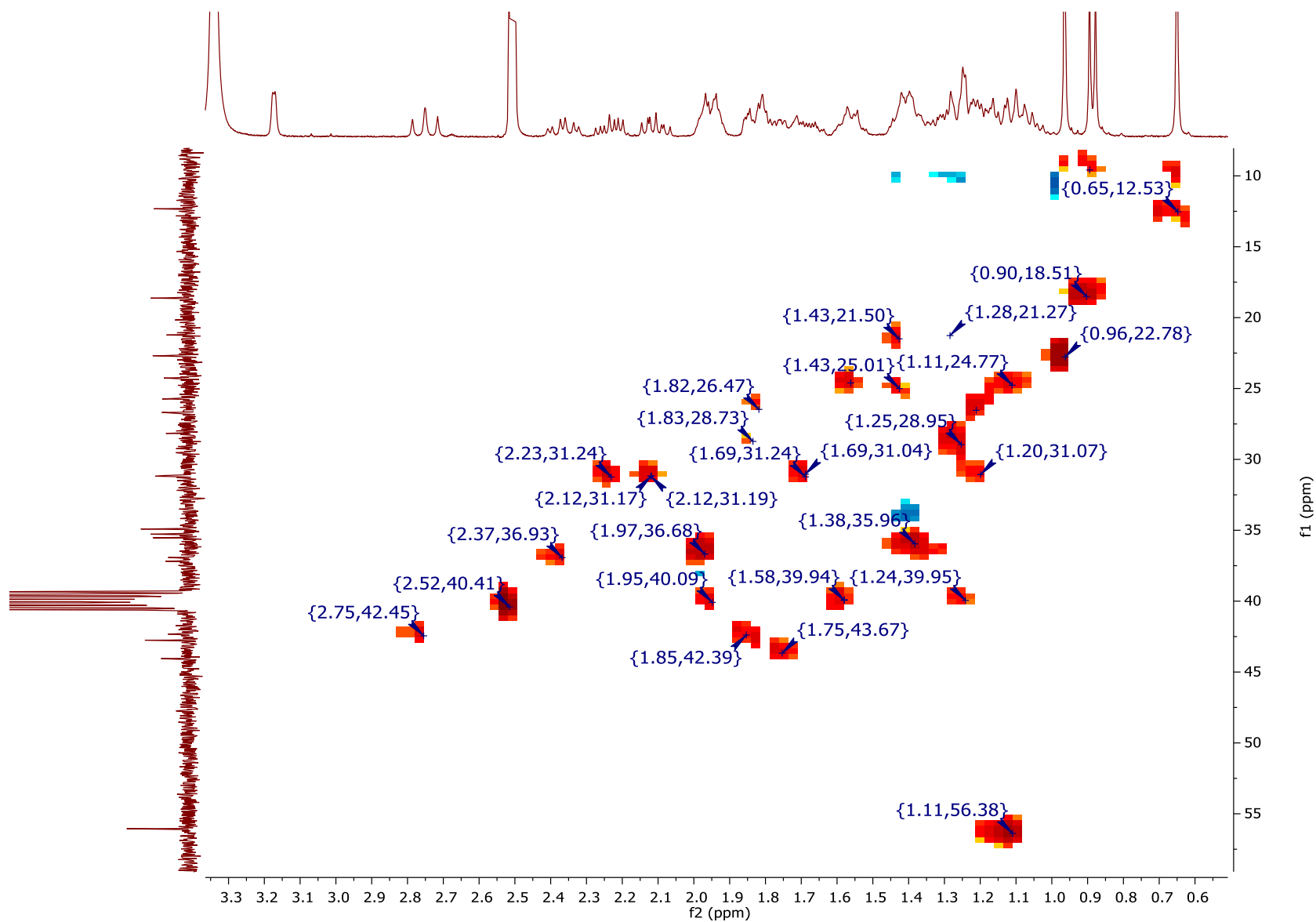
^{13}C ácido 3-cetolitocólico



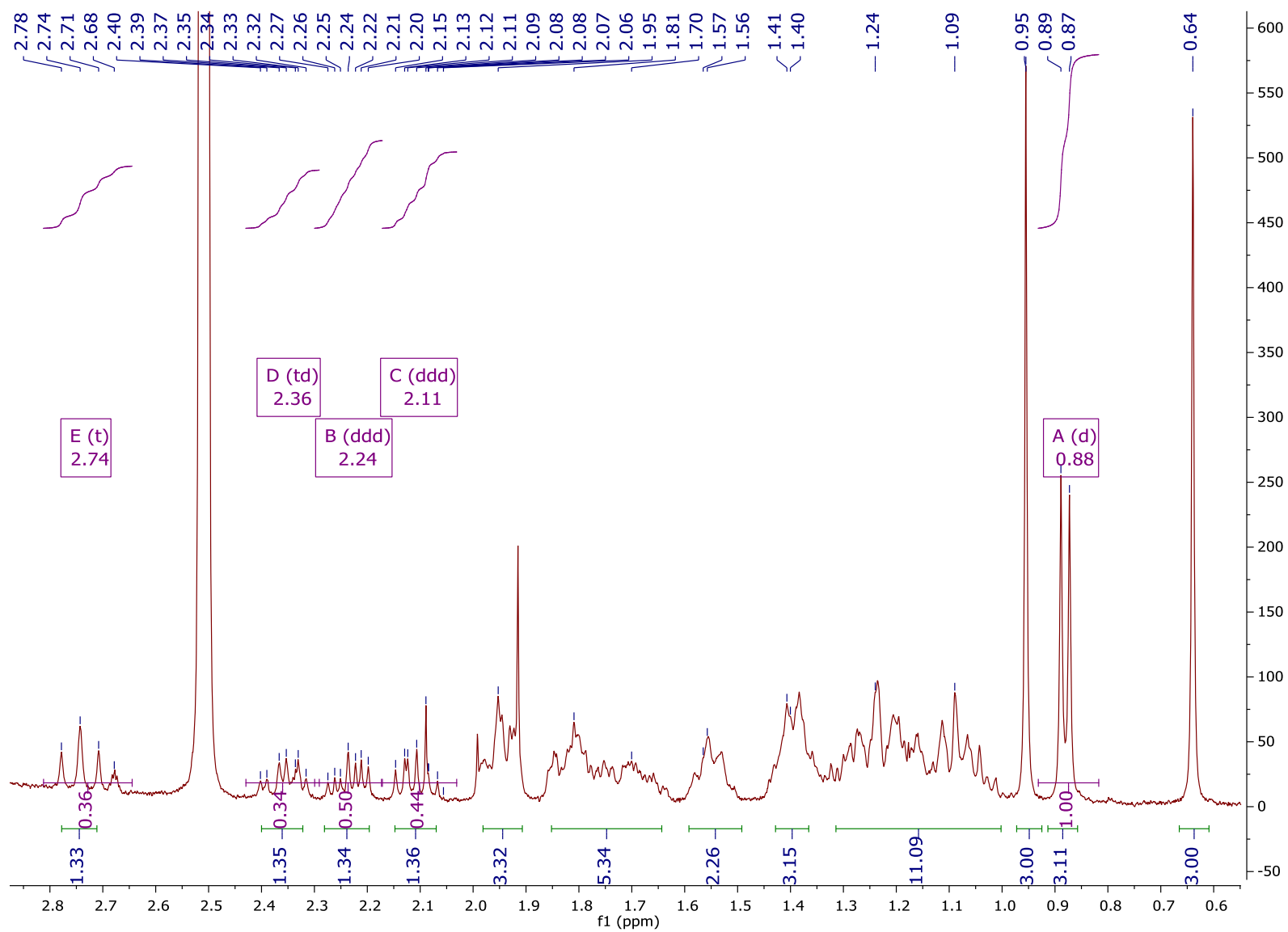
COSY ácido 3-cetolitocólico



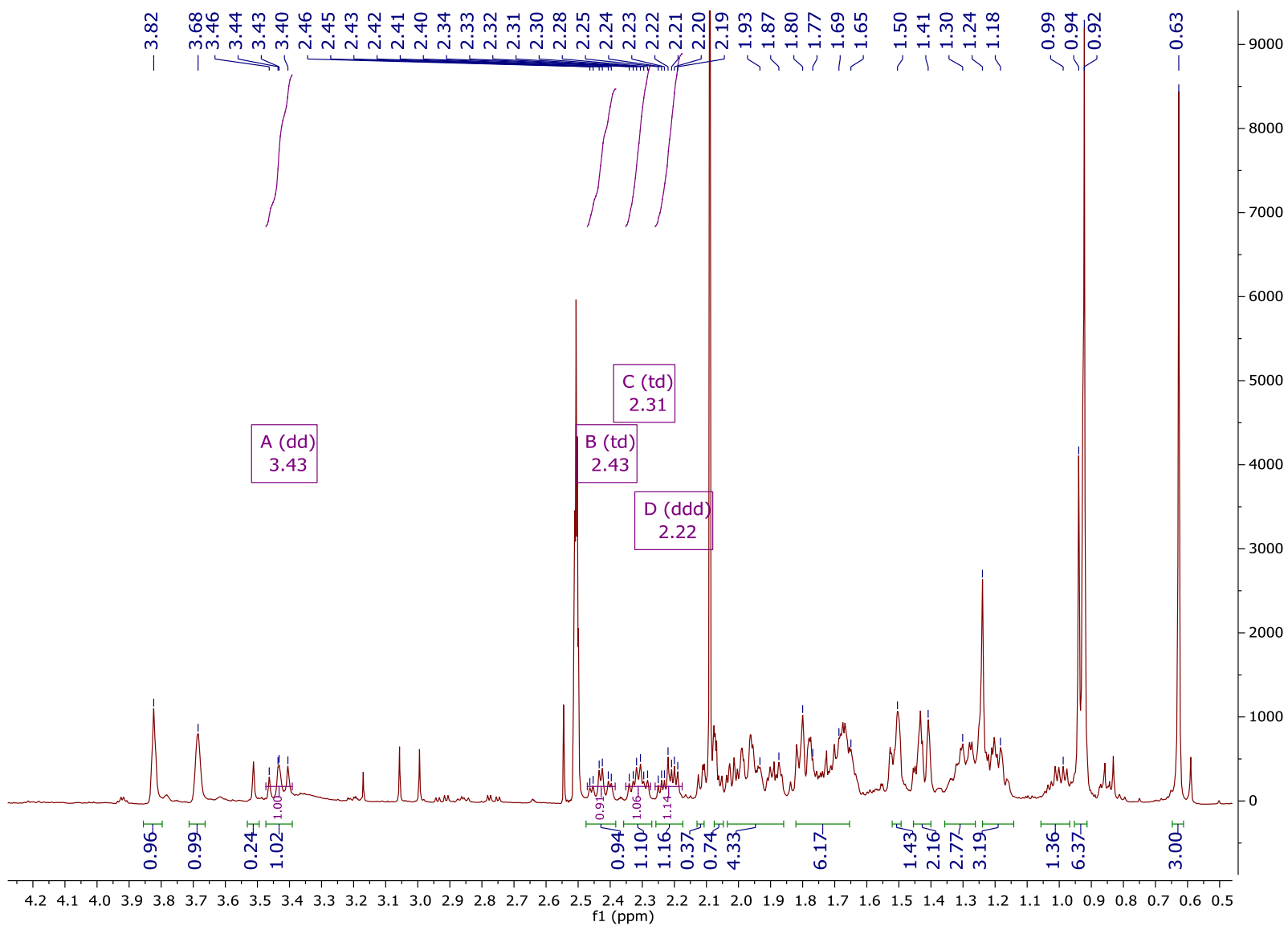
HSQC ácido 3-cetolitocólico



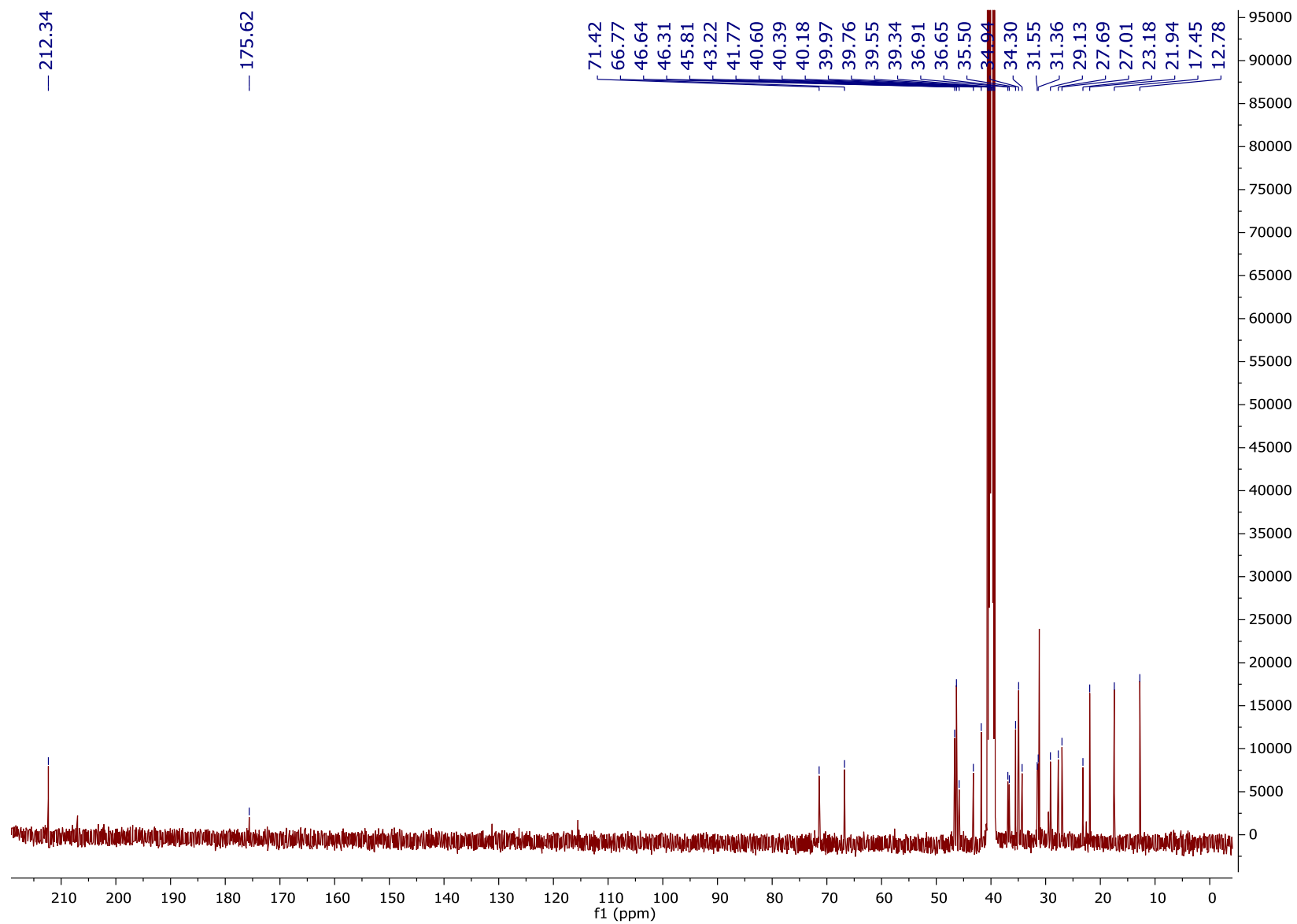
¹H del estándar del ácido 3-cetolítico



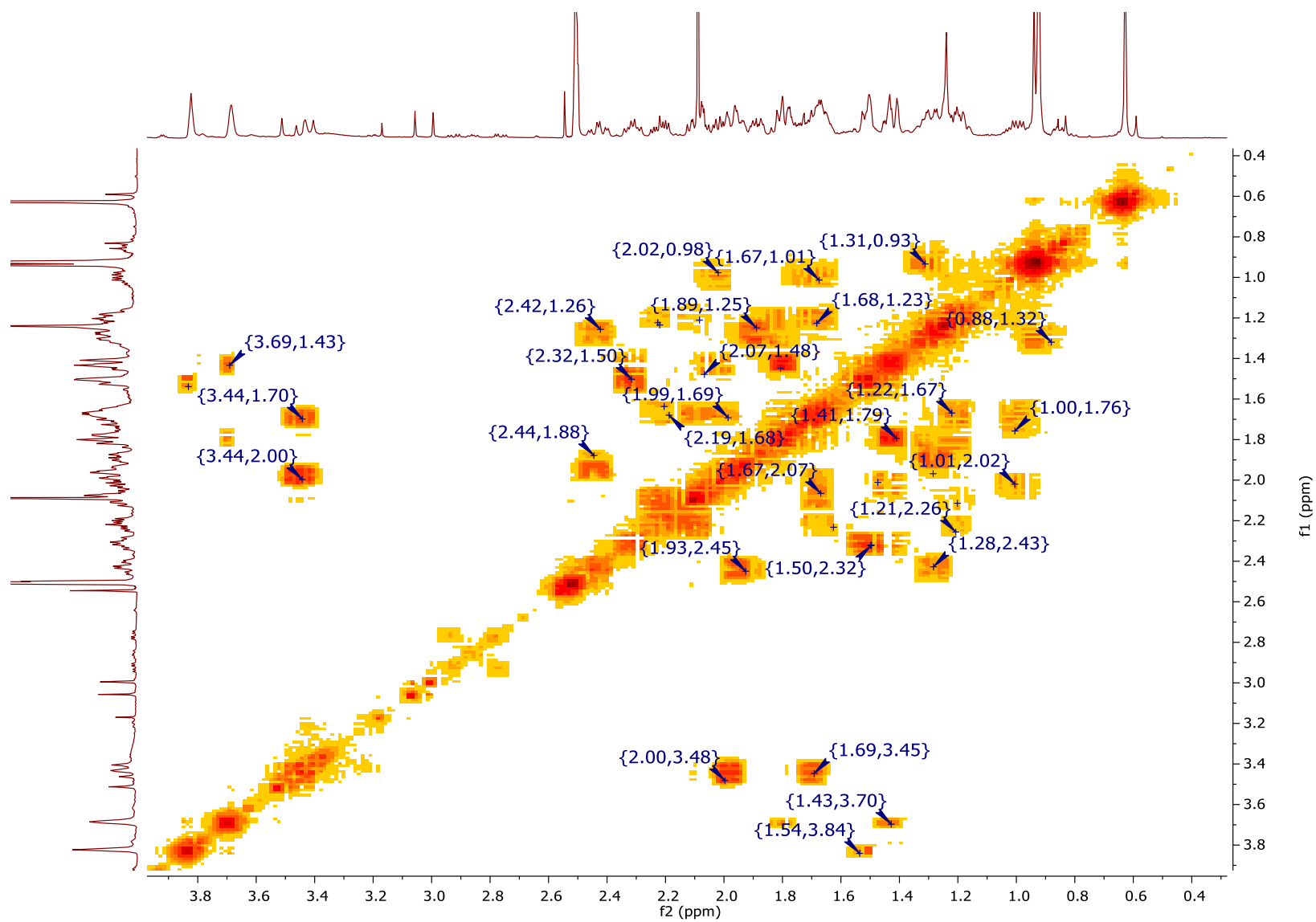
^1H ácido3-cetocólico (espectro con supresión de H_2O)



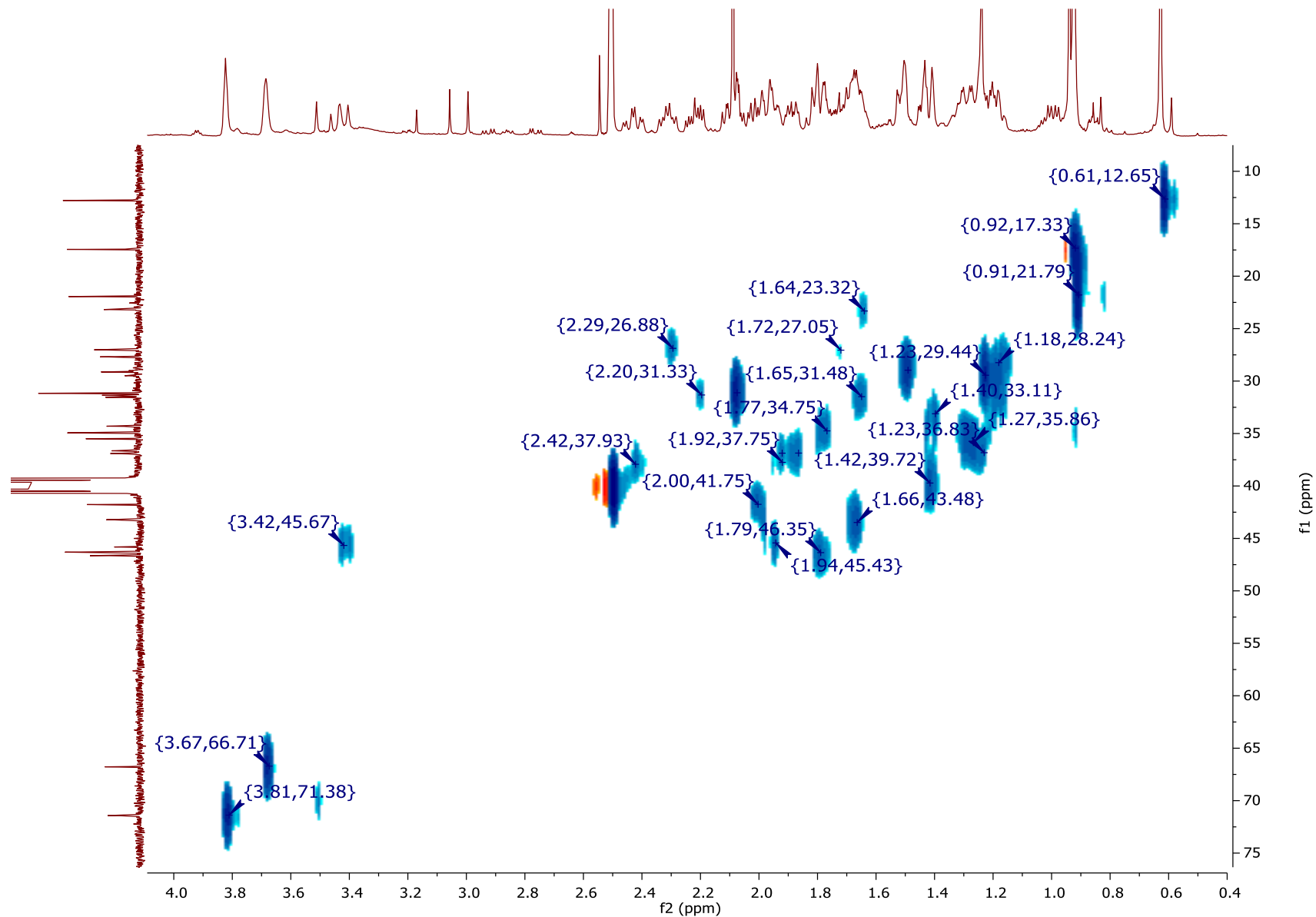
^{13}C ácido 3-cetocólico



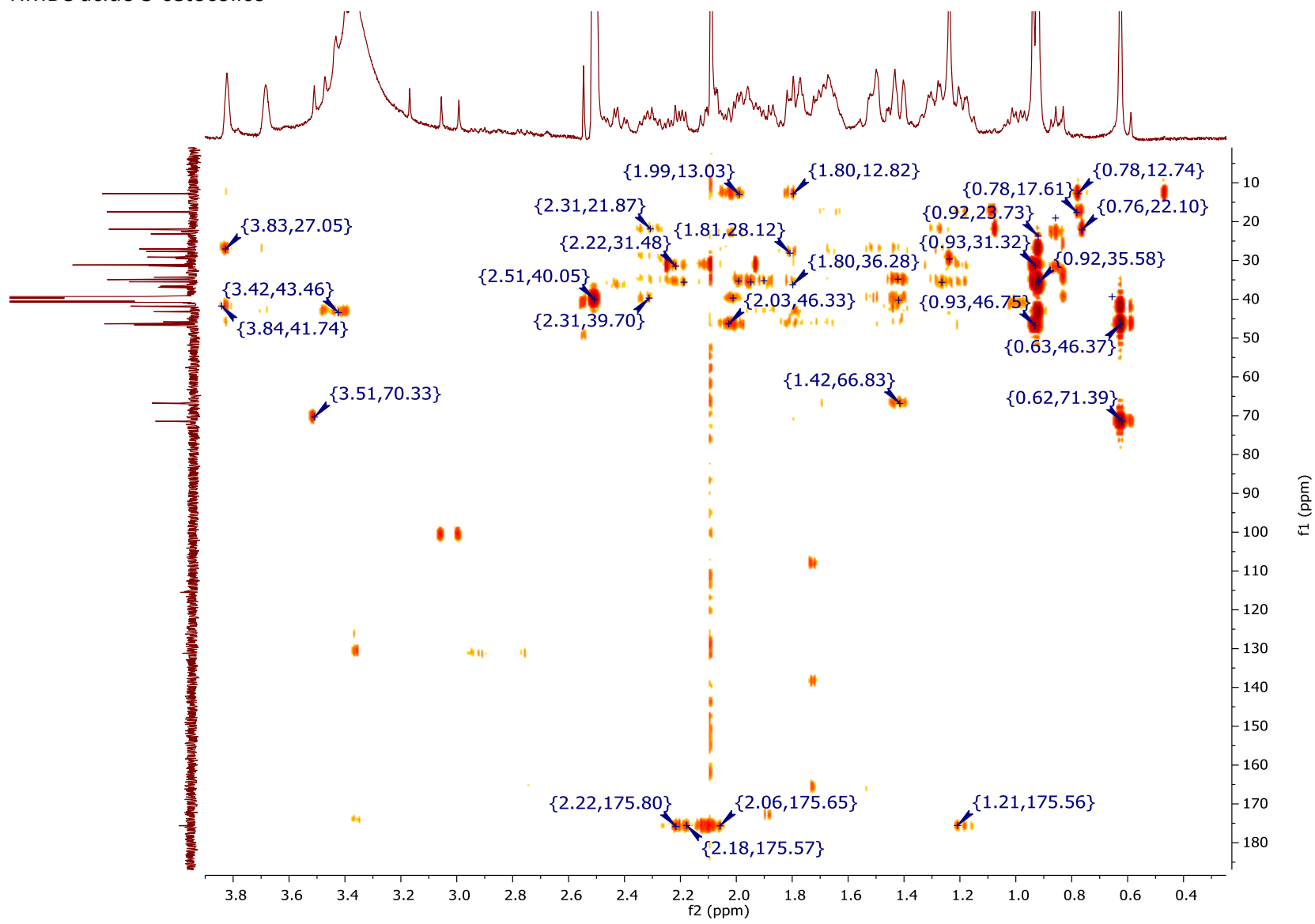
COSY ácido 3-cetocólico



HSQC ácido 3-cetocólico



HMBC ácido 3-cetocólico



Anexo IV- Publicaciones



Bioprospecting of whole-cell biocatalysts for cholesterol biotransformation

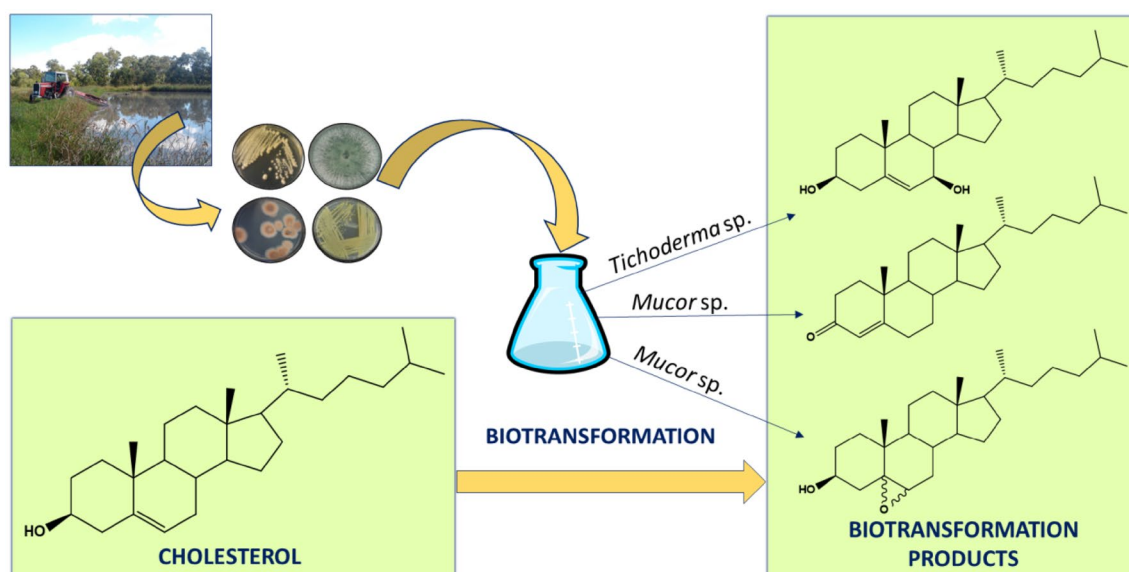
Victoria Giorgi¹ · Michel Chaves² · Pilar Menéndez^{1,3} · Carlos García Carnelli^{1,3}

Received: 30 July 2018 / Accepted: 22 December 2018
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Microorganisms were isolated from industrial wool scouring effluents and from the soil adjacent to the wastewater treatment lagoon, both sterols-rich environments, in order to search for novel biocatalysts able to transform cholesterol. The isolates were identified on the basis of morphological and biochemical characteristics and phylogenetic analysis. Furthermore, a rapid and accurate bacteria identification by matrix assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry was carried out. Bacteria and fungi including representatives of the genera *Fusarium*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Exiguobacterium*, *Acinetobacter*, *Tsukamurella*, *Bacillus*, and *Streptomyces* were found and evaluated for their ability to biotransform cholesterol by whole-cell treatment system. The results show that a *Trichoderma koningiopsis* strain, as well as two strains of *Mucor circinelloides* were able to transform cholesterol into value-added products. The major products were characterized as 7 β -hydroxycholesterol, 4-cholesten-3-one, 5 α ,6 α -epoxycholestan-3 β -ol and 5 β ,6 β -epoxycholestan-3 β -ol. To the best of our knowledge, the present study is the first report of cholesterol biotransformation by representatives of *Trichoderma* and *Mucor* genera.

Graphical abstract



Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11274-018-2586-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Extended author information available on the last page of the article

Keywords Biotransformation · Cholesterol · MALDI-TOF MS · *Mucor* · *Trichoderma* · Whole-cell biocatalyst

Introduction

Sterols, such as phytosterols, ergosterol and cholesterol play multiple physiological roles in eukaryotes. They are an important component of cell membranes, necessary for their integrity and structural features, such a fluidity and permeability (Fernandes and Cabral 2007). Cholesterol also regulates biological processes and is a precursor of vitamins, steroid hormones and bile acids (Bloch 1991).

Steroidal compounds are also widely used as active pharmaceutical ingredients for treating cardiovascular diseases, as anti-inflammatory, diuretics, immunosuppressive, contraceptive and anticancer drugs, as well as in other applications (Hogg 1992; Mahato and Garai 1997; Fernandes et al. 2003). The production of these drugs is accomplished by combining traditional organic synthesis and biocatalysis (Swizdor et al. 2012). Key intermediates for the commercial production of steroidal pharmaceutical preparations are obtained by microbial conversion of low-cost natural steroids, such as cholesterol (Dovbnya et al. 2017). They are usually microbologically transformed to 17-ketosterols, such as 4-androstene-3,17-dione (AD), 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) and 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione (9-OH-AD), which are the main starting materials for the synthesis of anabolic drugs and contraceptives (Malaviya and Gomes 2009; Al Jasem et al. 2014; Pendharkar et al. 2014).

Many microorganisms have been reported to biotransform cholesterol, including members of the genera *Micrococcus* (Dogra and Qazi 2001), *Arthrobacter* (Liu et al. 1996), *Chryseobacterium* (Chaudhari et al. 2010), *Lactobacillus* (Ahire et al. 2012), *Nocardia* (Sharma et al. 2012), *Gordonia* (Liu et al. 2011), *Cladosporium* (Pang et al. 2016), *Burkholderia* (Zhu et al. 2016), *Mycobacterium* (Liu et al. 1994; Donova 2007) and *Rhodococcus* (Ahmad et al. 1991). The latter two genera are the most efficient AD/ADD producers reported so far (Szentirmai 1990; Sripalakit et al. 2006; Donova 2007; Malaviya and Gomes 2008; Donova and Egorova 2012). Although some of the steroid bioconversions are well-established, the research continues focusing on discovering new potentially useful microorganisms for performing the desired bioconversions (Fernandes et al. 2003; Nassiri-Koopaei and Faramarzi 2015).

Therefore, it is relevant to make efforts to search for novel biocatalysts capable of performing transformations with high specificity and efficiency. In this sense, it is important to discover novel microorganisms capable of modifying steroids at specific positions with few side reactions and developing cost-efficient biotechnologies to produce valuable steroids (Donova and Egorova 2012). In the present study, we isolated and identified microorganisms

from an industrial wool scouring effluent and the soil adjacent to the wastewater treatment lagoon, which are sterols-rich environments. In addition, fungi and bacteria were tested for whole-cell cholesterol biotransformation to determine the major transformation products and harvest their value-added compounds.

Materials and methods

Materials and reagents

Cholesterol was obtained from DishmanTM (purity 96%). Media used were obtained from DifcoTM. Thin layer chromatography (TLC) plates (Polygram[®] SIL G/UV 254 nm) were obtained from Macherey–NagelTM. All other chemicals were from commercial sources and analytical grade.

Isolation of microorganisms

Microorganisms were isolated from samples of wool scouring wastewater and soil adjacent to the wastewater treatment lagoon from Lanasur SA (34°48' S, 56°10' N), a wool washing and wool tops manufacturing factory in Montevideo, Uruguay. 10 mL of effluent or 10 g of soil samples were transferred to a 500 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of enrichment or minimum media supplemented with cholesterol (0.1%). The enrichment media were tryptic soy broth (TSB) and potato dextrose broth (PDB). The minimal media used were yeast nitrogen base and M9 minimal salts (M9) supplemented with 1 g/L of cholesterol as the sole carbon source. For dispersing cholesterol, 1 g of the sterol was dissolved in 100 mL of 1% Tween 80, and 10 mL of this solution were added to 100 mL of medium. The cultures were incubated at 28 °C and 150 rpm in an orbital shaker. After 24 h, 48 h, 72 h, 7 and 15 days of incubation period, the cultures were sampled and a 100 μ L aliquots were sprayed onto agar plates [same composition as the broth but supplemented with 1.5% (w/v) agar]. Plates were incubated at 28 °C for 24–120 h for recovering the isolates.

Isolated colonies were characterized as bacteria, yeasts, or filamentous fungi by macro and microscopic observation. Isolated bacteria and yeasts were stored as frozen cultures in 15% glycerol at –70 °C. Fungal strains were grown in potato dextrose agar (PDA) slants at 28 °C until sporulation, and then kept at –4 °C.

Identification of bacteria

Bacteria were identified by polyphasic taxonomy using biochemical tests (Barrow and Feltham 1993), matrix assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene.

Bacterial samples for MALDI-TOF MS analysis were prepared by picking colonies from fresh agar cultures and mixing them with 1.2 mL of a 70% ethanol solution (HPLC grade), resulting in a microbial suspension. After mixing and centrifuging the solution, the supernatant was discarded, and the resulting pellet was air dried. The pellet was then treated with formic acid (70%) and acetonitrile (ACN) in a 1:1 (v/v) ratio, centrifuged, and 1 µL of the supernatant was transferred to a 96-wells steel target plate. The sample spot was air dried and overlaid with 1 µL of 10 mg/mL of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA, Sigma-Aldrich™) matrix solution. The solvent used for the CHCA was ACN/water/2.5% trifluoroacetic acid (50:47.5:2.5), and was evaporated prior to performing the MS analysis. In some cases, a previous step of protein extraction was necessary, and it was performed by adding 1 µL of formic acid directly to the bacterium colony suspension before the addition of 1 µL matrix solution. All samples were performed in duplicate.

The MALDI-TOF MS analysis was carried out on a MALDI Biotyper Microflex® LT (Bruker Daltonics™), using a mass range from 2000 to 20,000 Da. Each spectrum had 240 reads from laser shots (laser frequency of 60 Hz) from different positions (automated mode) in positive linear mode.

Bacterial test standard or BTS (Bruker Daltonics™) was used to calibrate the equipment according to manufacturer's instructions. The Bruker Biotyper® 3.0 software, used for data acquisition and processing, compares the mass spectrum of each sample with a reference spectrum deposited in a database using multivariate analysis, considering the position and intensity of peaks using the following score value scale: ≥ 2.000 for species identification, $1.700 \leq \text{score value} < 1.999$ for genus identification. A score value < 1.699 indicates a not reliable identification.

Extraction of genomic DNAs was carried out using PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™). Amplification of almost full-length 16S rRNA gene fragments were performed using Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) with primers 27 forward (5'-AGA GTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492 reverse (5'-TAC GGYTACCTTGTTACGACTT-3'). The 50 µL reaction mixture contained 5 µL 10 × PCR buffer—Mg, 2 µL 10 mM dNTP mix, 1.5 µL MgCl₂ 50 mM, 2.5 µL of each primer 10 µM, 2 µL of DNA 100 ng/µL, 0.4 µL of Taq DNA polymerase and 34.1 µL of sterile Milli-Q water. The PCR conditions used for amplification were: initial

denaturation at 94 °C for 2 min followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and a final extension of 72 °C for 5 min. The resulting PCR products were sequenced at Macrogen Corp. (Seoul, South Korea). Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene was performed by comparison of the obtained sequence with other sequences deposited in the GenBank® database using BLAST® program (National Center for Biotechnology Information) (Altschul et al. 1990).

Identification of fungi

Extraction of genomic DNAs was carried out with ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research™) kit and the amplification of almost full-length ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region was performed using primers ITS1F (5'-CTT GGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') and ITS4 (5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3'). The 50 µL reaction mixture contained 5 µL 10 × PCR buffer—Mg, 2 µL 10 mM dNTP mix, 2.0 µL MgCl₂ 50 mM, 5.0 µL of each primer 10 µM, 4.0 µL of DNA 100 ng/µL, 0.4 µL of Platinum® Taq DNA polymerase and 26.6 µL of sterile Milli-Q water. The PCR conditions used for amplification were: initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and a final extension of 72 °C for 5 min. The resulting PCR products were sequenced at Macrogen, Inc. (Seoul, South Korea). Phylogenetic analysis of the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region was performed by comparison of the obtained sequence with other sequences deposited in the GenBank® database using BLAST® program (National Center for Biotechnology Information) (Altschul et al. 1990). Fungi identification was also done according to Pitt and Hocking (1997).

Screening of cholesterol biotransformation by bacterial strains

Fourteen isolated strains were tested for their ability to biotransform cholesterol. Fresh plates of each strain from the frozen stock were streaked on tryptic soy agar. A single colony was used to inoculate 5 mL of TSB. Each culture was incubated at 28 °C in an orbital shaker at 150 rpm overnight, and 500 µL of this culture were used to inoculate 50 mL of fresh TSB, in a 250 mL Erlenmeyer flask. Cholesterol dissolved in 1% Tween 80 solution was added after 24 h of incubation in order to obtain a final cholesterol concentration of 1 g/L in the culture media. The experiments were carried out in duplicate at 28 °C and 150 rpm in an orbital shaker for 96 h. Negative controls without substrate and without bacteria were carried out for each experiment. The reactions were monitored by TLC as described below.

Screening of cholesterol biotransformation by fungi

Eight fungal strains were tested for their ability to biotransform cholesterol. A spore suspension in sterile physiological serum was prepared from 7 days of pure culture in PDA. The spore concentration was estimated using a Neubauer chamber and an aliquot of this solution was added to a 250 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL of PDB, leading to a final concentration of 1×10^5 spores/mL. Cholesterol dissolved in 1% Tween 80 was added after 48 h of incubation, in order to obtain a final cholesterol concentration of 1 g/L in the culture media. The experiments were carried out in duplicate at 28 °C and 150 rpm in an orbital shaker for 7 days. Negative controls without substrate and without fungi were carried out for each experiment. The reactions were monitored by TLC as described below.

Analysis of biotransformation products

The liquid medium was separated from the biomass by centrifugation at 5000 rpm, 20 min. The supernatant was then extracted with ethyl acetate. The biomass was washed three times with the same solvent. Organic phases were combined, dried over anhydrous Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure at 30 °C. Concentrated extracts were cleaned up on a silica gel 60 column eluted with ethyl acetate. The presence of biotransformation products was confirmed by comparing the TLC and gas chromatography (GC) profiles of the negative controls with those of the positive reactions.

The biotransformation products were detected by TLC using 7:3 and 4:6 (v/v) of hexane: ethyl acetate mixtures as mobile phase. The plates were visualized by spraying with anisaldehyde–sulfuric acid reagent followed by heating at 110 °C.

In order to obtain enough of each product to complete spectroscopic experiments, the biotransformation reactions were scaled up to 200 mL of culture media under the same conditions described above.

The major products obtained were purified by column chromatography on silica gel 60 eluted with hexane–ethyl acetate from, 50:50 to 80:20, and characterized by GC–MS, ^1H , ^{13}C , ^1H – ^1H COSY and HSQC NMR analyses.

GC analyses were performed on a Shimadzu™ GC-2014 equipped with FID detector and a SE52 capillary column (0.25 mm $\times$ 30 m, 0.25 μm ; film thickness) as stationary phase. Hydrogen (1 mL/min) was used as gas carrier; and samples were injected in splitless mode. The oven temperature was programmed from 150 °C (held for 1 min) to 300 °C at 25 °C/min and then held at 300 °C for 20 min. Injector and detector temperatures were maintained at 290 °C and 300 °C respectively.

GC–MS analyses were performed on a Shimadzu™ GCMS-QP 2010 Ultra single quadrupole mass spectrometer equipped with a HP5 column (0.25 mm $\times$ 30 m, 0.25 μm) as stationary phase. The analytical conditions were as follows: gas carrier was helium at 100 kPa; the oven temperature was programmed from 150 °C (held for 1 min) to 300 °C at 25 °C/min and then held at 300 °C for 30 min. The injector, interface and ion source temperatures were maintained at 290 °C, 300 °C and 200 °C respectively; injector mode was split (10:1), ionization potential 70 eV, scan range 50–500 m/z.

^1H NMR spectra were recorded on Bruker AVANCE™ III 500 MHz spectrometer. ^{13}C , ^1H – ^1H COSY and HSQC NMR spectra were recorded on Bruker AVANCE™ III 400 MHz spectrometer, using CDCl_3 as solvent with tetramethylsilane as internal standard.

Results

Isolation and identification of microorganisms that could transform cholesterol

A total of 22 isolates were obtained from the wool scouring effluent and the soil adjacent to the wastewater treatment lagoon. Of these, fourteen were bacteria and eight were fungi. Sixteen microorganisms (11 bacteria and 5 fungi) were isolated from a culture in rich medium supplemented with cholesterol. Furthermore, eight isolates (three bacteria and five fungi) were isolated from a minimal medium cultures with cholesterol as the sole carbon and energy source.

The bacterial isolates were identified as belonging to *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Exiguobacterium*, *Acinetobacter*, *Tsukamurella*, *Bacillus* and *Streptomyces* genus (Table 1). Most of the bacteria isolated were gram-negative bacilli belonging to the Enterobacteriaceae family (Table S1). The filamentous fungi isolates were identified as belonging to *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Mucor* and *Aspergillus* genus (Table 2).

Two strains of *Mucor circinelloides* and one strain of *Trichoderma koningiopsis* called Y2, H4 and H3 respectively (Supplementary Information, Table 3) were deposited in the Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) as *M. circinelloides* (CECT 21101), *M. circinelloides* (CECT 21102) and *T. koningiopsis* (CECT 21104).

The colonies of *T. koningiopsis* were white at early stage, later developing deep green, yellow coloration at reverse growing on PDA at 28 °C for 5–7 days of incubation. Colony radius 51–64 mm within 5 days of incubation at 28 °C on PDA. Conidiophores were highly branched structures, with long internodes between branches. Conidia were green,

Table 1 Strategy of isolation and identification by 16S rRNA gene and MALDI-TOF MS of bacteria isolated

Bacterial isolates	Strategy of isolation	Identification	16S rRNA Identity (%)	MALDI-TOF MS		
				Organisms (best match)	Score values ^a	Identifier ^b
M3W	R	<i>Citrobacter freundii</i>	99	<i>Citrobacter freundii</i> DSM 30039T DSM	2.256	546
M3U	R	<i>Citrobacter freundii</i>	100	<i>Citrobacter freundii</i> 22054_1 CHB	2.949	546
M2A	R	<i>Proteus</i> sp.	100	<i>Proteus vulgaris</i> DSM 30119 DSM	1.848	585
M1E	R	<i>Proteus vulgaris</i>	100	<i>Proteus vulgaris</i> DSM 13387_QC DSM	2.447	585
M12D	R	<i>Proteus</i> sp.	98	<i>Proteus vulgaris</i> LMG 5586 LMG	2.068	585
M3F	R	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i> DSM 16358T DSM	2.378	574
M3S	R	<i>Exiguobacterium</i> sp.	99	Not reliable identification	1.325	–
M3X1	R	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	99	<i>Acinetobacter johnsonii</i> V773 MCRF	2.415	40,214
M3Y	R	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006T HAM	2.054	471
M3T	R	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	100	<i>Acinetobacter johnsonii</i> LMG 1326 LMG	2.286	40,214
M3R	R	<i>Bacillus cereus</i>	100	Not reliable identification	1.538	–
M9B	M	<i>Bacillus</i> sp.	100	Not reliable identification	1.613	–
M9A	M	<i>Streptomyces</i> sp.	100	<i>Streptomyces badius</i>	1.986	1941
M9C	M	<i>Tsukamurella</i> sp.	100	<i>Tsukamurella</i> sp.	1.803	2060

M minimal medium supplemented with cholesterol, R rich medium supplemented with cholesterol

^aScore value ≥ 2.000 indicates species identification, $1.700 < \text{score value} < 2.000$ indicates genus identification, score value < 1.700 indicates not reliable identification

^bNational Center for Biotechnology Information identifier

Table 2 Strategy of isolation and identification by ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequence of fungal isolates

Isolates	Strategy of isolation	ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region	
		Identification	Identity (%)
H5	R	<i>Talaromyces purpurio-genus</i>	98
H6	M	<i>Fusarium</i> sp.	97
Y2	M	<i>Mucor circinelloides</i>	99
H4	R	<i>Mucor circinelloides</i>	99
Y3	M and R	<i>Fusarium</i> sp.	97
H3	R	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	98
Y5	M and R	<i>Trichoderma asperellum</i>	99
Y6	M	<i>Aspergillus</i> sp.	100

M minimal medium supplemented with cholesterol, R rich medium supplemented with cholesterol

ellipsoidal and smooth. Chlamydospores were typical of *Trichoderma*, being terminal and globose.

The colonies of the strains identified as *M. circinelloides* were fast-growing with raised mycelium, appearing pale greyish-brown, reverse uncolored growing on PDA at 28 °C for 5–7 days of incubation. Colony spreading across the whole Petri dish within 5 days of incubation at 28 °C on

PDA. Sporangiophores were long and branched sympodially, sporangia and columellae were spherical. Sporangiospores were hyaline, smooth-walled and ellipsoidal. Chlamydospores were absent.

Cholesterol biotransformation

The primary screening to test all the isolated microorganisms for cholesterol biotransformation led to the selection of nine whole-cell biocatalysts. From 14 bacteria isolates, *Exiguobacterium* sp., *Acinetobacter johnsonii*, *Streptomyces* sp. and *Tsukamurella* sp. strains showed the ability to transform the sterol.

Regarding the fungi, the isolated strains of *T. koningiopsis*, *Trichoderma asperellum*, *Fusarium* sp. and the two strains of *M. circinelloides* led to cholesterol biotransformation products. The biotransformation products were detected by TLC and GC, but only the major products obtained by the fungal strains *T. koningiopsis* and *M. circinelloides* could be isolated into sufficient quantity to perform NMR experiments.

Characterization of cholesterol biotransformation products

The products obtained from the cholesterol biotransformation were identified as 7 β -hydroxycholesterol (**II**),

Table 3 ^1H and ^{13}C chemical shifts (ppm) for biotransformation products 7 β -hydroxycholesterol and 4-cholesten-3-one in CDCl_3 solution

C	7 β -Hydroxycholesterol			4-Cholesten-3-one		
	H position	δH (ppm)	δC (ppm)	H position	δH (ppm)	δC (ppm)
1	α	1.13 (m)	39.4	α	2.0 (m)	35.7
	β	2.02 (m)	—	β	2.03 (m)	—
2	α	1.52 (m)	31.6	α	2.24 (m)	34.0
	β	1.85 (m)	—	β	2.28 (m)	—
3	β	3.57 (m)	71.5	—	—	199.7
4	α	2.32 (m)	41.7	—	5.72 (s)	123.7
	β	2.32 (m)	—	—	—	—
5	—	—	143.5	—	—	171.8
6	—	5.31 (m)	125.4	α	2.35 (m)	34.0
	—	—	—	β	2.40 (m)	—
7	α	3.87 (bs)	72.4	α	1.00 (m)	32.0
	—	—	—	β	1.80 (m)	—
8	β	1.39 (m)	40.9	β	1.35 (m)	35.8
9	α	1.03 (m)	48.3	α	0.91 (m)	53.8
10	—	—	35.8	—	—	38.6
11	α	1.51 (m)	21.1	α	1.50 (m)	21.0
	β	1.51 (m)	—	β	1.42 (m)	—
12	α	1.01 (m)	36.2	α	2.01 (m)	39.6
	β	1.01 (m)	—	β	2.01 (m)	—
13	—	—	42.9	—	—	42.4
14	α	1.14 (m)	56.0	α	1.11 (m)	56.1
15	α	1.43 (m)	26.4	α	1.32 (m)	24.2
	β	1.81 (m)	—	β	1.61 (m)	—
16	α	1.28 (m)	28.6	α	1.50 (m)	28.0
	β	1.31 (m)	—	β	1.86 (m)	—
17	α	1.40 (m)	55.4	α	1.01 (m)	55.9
18	—	0.69 (s)	11.8	—	0.71 (s)	11.9
19	—	1.07 (s)	19.2	—	1.18 (s)	17.4
20	β	1.35 (m)	35.7	β	1.00 (m)	36.1
21	—	0.92 (d, $J=6.5$ Hz)	18.8	—	0.91 (d, $J=6.7$ Hz)	18.6
22	α	1.05 (m)	36.5	α	1.51 (m)	35.6
	β	1.86 (m)	—	β	1.69 (m)	—
23	α	1.14 (m)	23.8	α	1.12 (m)	23.8
	β	1.33 (m)	—	β	1.12 (m)	—
24	α	1.13 (m)	39.5	α	1.11 (m)	39.6
	β	1.13 (m)	—	β	1.11 (m)	—
25	—	1.44 (m)	28.0	—	1.50 (m)	28.2
26	—	0.86 (d, $J=6.6$ Hz)	22.8	—	0.86 (d, $J=6.6$ Hz)	22.5
27	—	0.87 (d, $J=6.6$ Hz)	22.6	—	0.87 (d, $J=6.6$ Hz)	22.8

4-cholesten-3-one (**III**), and 5,6-epoxycholestan-3 β -ol (**IV**) based on MS and NMR spectroscopy data. The structures of these products are shown in Fig. 1.

Incubation of cholesterol with the fungus *T. koningiopsis* produced the hydroxylated derivate identified as 7 β -hydroxycholesterol (1.0%) as the major product. *Product II*; the ^1H and ^{13}C NMR signals are presented in Table 3. MS (EI, 70 eV) m/z (rel. inten.): 402(M^+ , 25), 384(14), 369(8), 273(4), 271(10), 247(11), 229(10), 213(5), 211(12),

175(15), 163(28), 159(21), 149(33), 147(27), 145(28), 135(69), 123(77), 121(59), 117(27), 107(99), 105(100). The mass spectra of the product **II** showed a molecular ion peak at m/z 402 which suggested that one oxygen atom was incorporated from the cholesterol structure. The ^1H NMR spectrum revealed a new signal ^1H -broad singlet at δ 3.87 ppm corresponding to H-7, indicating the hydroxylation of cholesterol. ^1H -multiplet at δ 3.57 ppm corresponding to H-3 and a 1-H-multiplet at δ 5.31 ppm assigned to

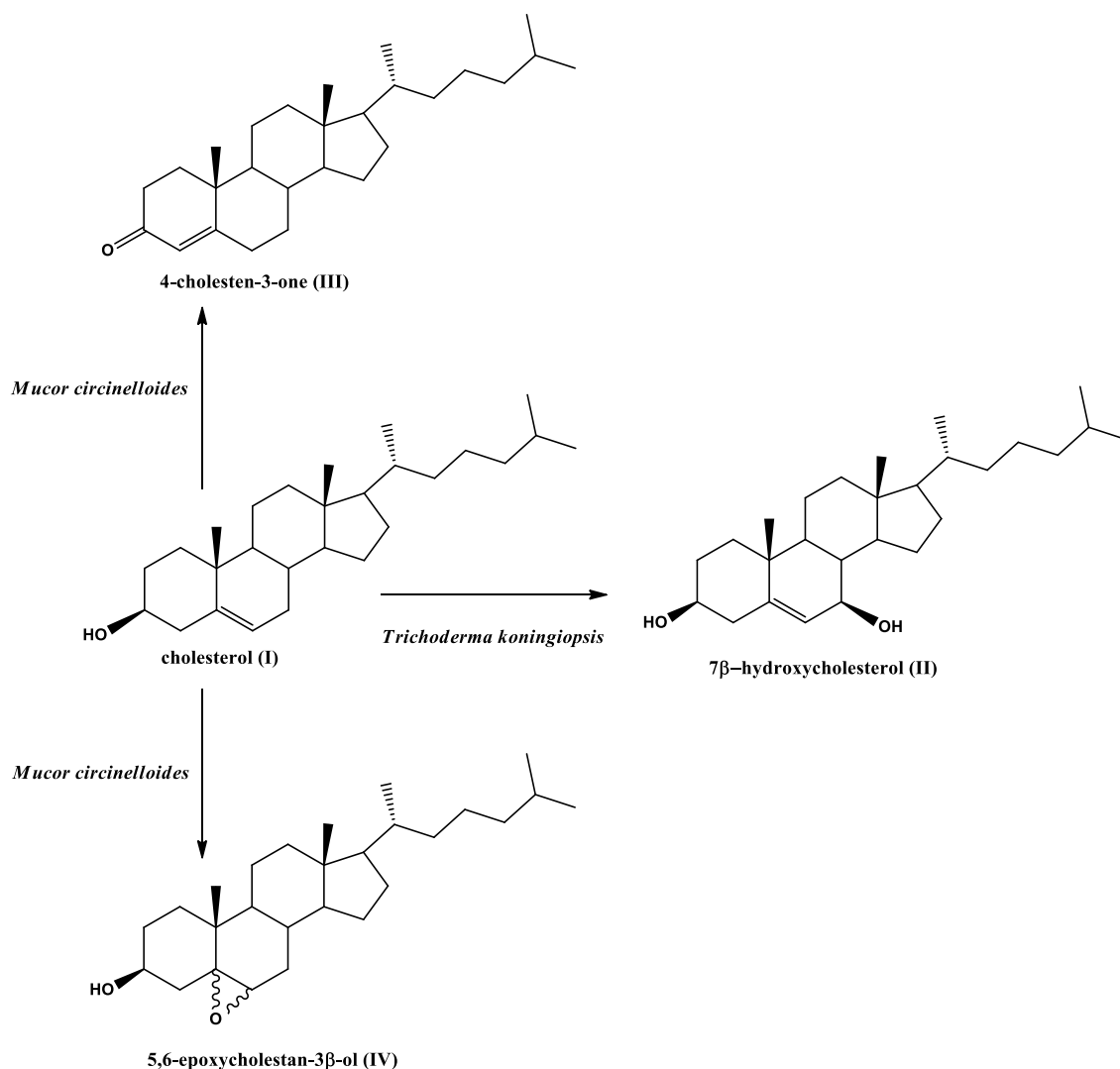


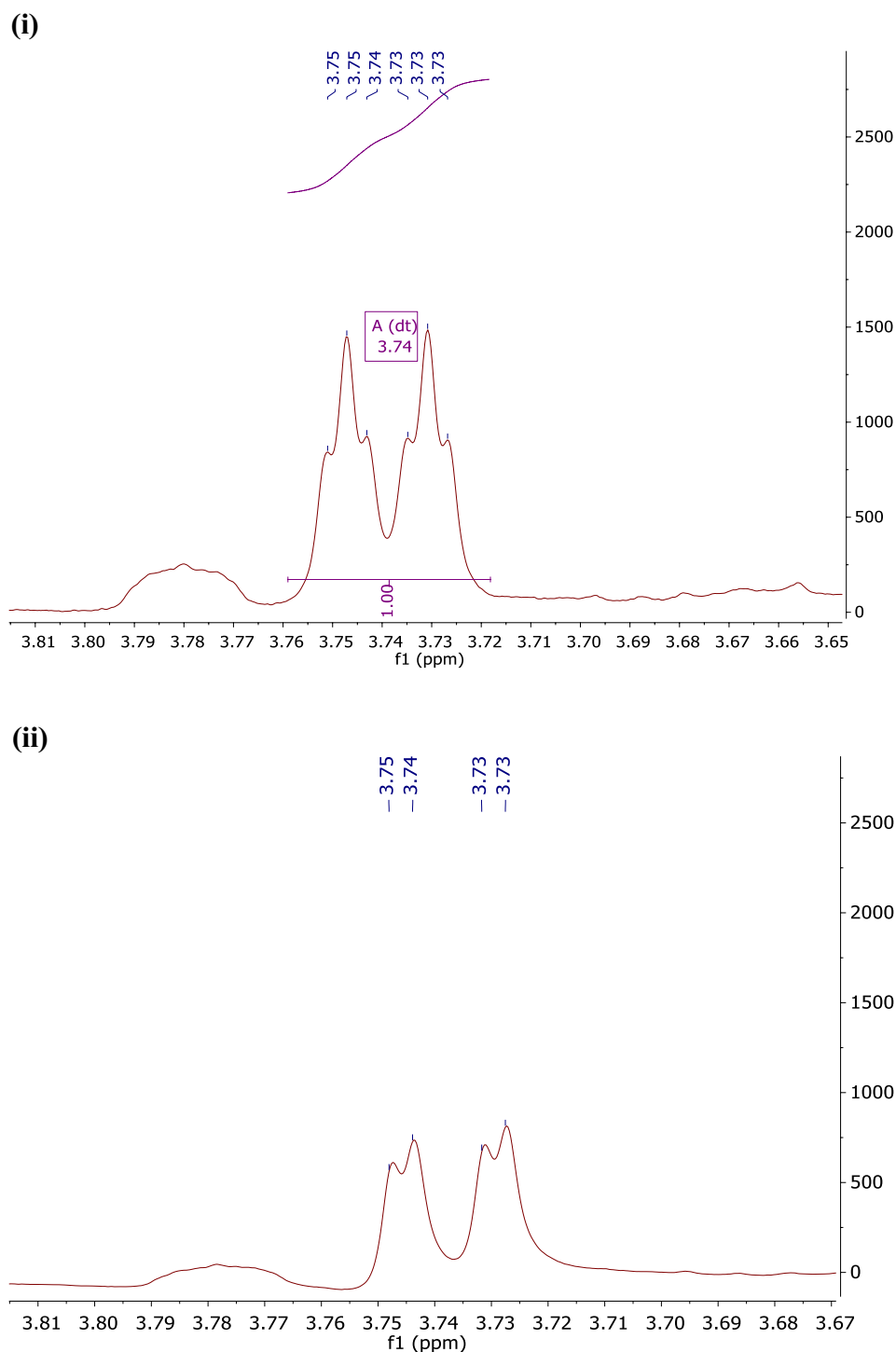
Fig. 1 Transformation of cholesterol (**I**) to 7β-hydroxycholesterol (**II**), 4-cholesten-3-one (**III**) and 5,6-epoxycholestan-3β-ol (**IV**) catalysed by *Trichoderma koningiopsis* and two strains of *Mucor circinelloides* respectively

the vinyl proton at C-6 were also observed. The presence of signals at δ 71.4 ppm and δ 73.4 ppm in the ^{13}C NMR spectrum confirmed that there are two hydroxyl groups. The COSY spectrum showed correlations between H-6 and H-7, which supported the position at C-7 of the new hydroxyl group. This was also in agreement with the NMR data of 7β-hydroxycholesterol which was reported in the literature (Zhu et al. 2016). ^1H homonuclear decoupling NMR spectra using MeOD as solvent was carried out to determine the stereochemical orientation of the new alcohol at C-7. Irradiation of the vinyl proton at 85.27 ppm (m, H-6); signal observed in ^1H NMR spectrum in MeOD; collapsed the doublet of triplets at δ 3.74 ppm (H-7) to a doublet of doublets, allowing determination of the coupling constant between H-7 and H-8β (Fig. 2). The large coupling constant observed for H-8β/H-7 was 8.2 Hz, showed that H-8β y H-7 had an

axial (*trans*) relationship to each other. This J value indicated that the H-7 is α configuration, confirming the β orientation of the hydroxyl group at C-7.

Another major metabolite was generated from cholesterol by a strain of *M. circinelloides* (strain Y2), which was characterized as 4-cholesten-3-one (2.5%). **Product III**, the ^1H and ^{13}C NMR signals are presented in Table 3. MS (EI, 70 eV) m/z (rel. inten.): 384(M^+ , 19), 370(7), 368(5), 257(3), 342(6), 261(14), 231(2), 229(18), 213(4), 187(8), 157(11), 147(29), 145(14), 133(26), 124(100), 119(21), 107(48), 105(43). Mass spectral data of this product showed a molecular ion peak at m/z 384, which suggested the loss of two hydrogen atoms from the cholesterol structure. Furthermore, characteristic ions of α,β -unsaturated 3-ketosteroids fragmentation were observed in the mass spectrum (Brown and Djerassi 1980). In the ^1H and ^{13}C NMR spectra the

Fig. 2 ^1H NMR of 7 β -hydroxycholesterol in MeOD (i) and the ^1H NMR decoupling frequency 5.27 ppm spectra of 7 β -hydroxycholesterol in MeOD (ii)



signals corresponding to the hydroxyl group of cholesterol (δ 3.53 and 71.8 ppm) disappeared. The ^{13}C NMR spectrum showed a carbon resonance at δ 199.7 ppm, which indicated the oxidation of the hydroxyl group at C-3 to a carbonyl group. Shape signal and chemical shift of the vinyl proton at C-4 (singlet, δ 5.72 ppm) in the product differed from the shape signal and chemical shift of the vinyl proton at C-6 in the corresponding substrate (triplet, δ 5.37 ppm), which

confirmed the isomerization of the C-5 double bond to the C-4 position. The MS, ^1H and ^{13}C NMR data of this product were in agreement with the cholest-4-en-3-one structure, which was previously reported in the literature (Brown and Djerassi 1980; Liu et al. 2011; Wu et al. 2015).

The other strain of *M. circinelloides* (strain H4) produced 5,6-epoxycholestan-3 β -ol (5.6%) from cholesterol. This product was obtained as a mixture of α : β epoxides

Table 4 ^1H and ^{13}C chemical shifts (ppm) for biotransformation products 5 β ,6 β -epoxycholestan-3 β -ol and 5 α ,6 α -epoxycholestan-3 β -ol in CDCl_3 solution

C	5 β ,6 β -Epoxycholestan-3 β -ol			5 α ,6 α -Epoxycholestan-3 β -ol		
	H position	δH (ppm)	δC (ppm)	H position	δH (ppm)	δC (ppm)
1	α	1.36 (m)	32.4	α	1.36 (m)	32.4
	β	1.68 (m)	—	β	1.68 (m)	—
2	α	1.50 (m)	28.8	α	1.50 (m)	28.8
	β	1.91 (m)	—	β	1.91 (m)	—
3	β	3.69 (m)	69.5	β	3.90 (m)	68.8
4	α	1.95 (m)	39.4	α	1.95 (m)	39.4
	β	1.95 (m)	—	β	1.95 (m)	—
5	—	—	63.0	—	—	65.7
6	α	3.06 (d, J = 2.0 Hz)	63.8	β	2.90 (d, J = 4.4 Hz)	59.3
7	α	1.60 (m)	31.1	α	1.60 (m)	31.1
	β	1.91 (m)	—	β	1.91 (m)	—
8	β	1.36 (m)	29.9	β	1.36 (m)	29.9
9	α	1.24 (m)	42.6	α	1.24 (m)	42.6
10	—	—	34.9	—	—	34.9
11	α	1.36 (m)	20.7	α	1.36 (m)	20.7
	β	1.25 (m)	—	β	1.25 (m)	—
12	α	2.07 (m)	39.9	α	2.07 (m)	39.9
	β	2.07 (m)	—	β	2.07 (m)	—
13	—	—	42.4	—	—	42.4
14	α	1.05 (m)	55.9	α	1.05 (m)	55.9
15	α	1.43 (m)	24.1	α	1.43 (m)	24.1
	β	1.81 (m)	—	β	1.81 (m)	—
16	α	1.23 (m)	28.1	α	1.23 (m)	28.1
	β	1.81 (m)	—	β	1.81 (m)	—
17	α	0.95 (m)	56.9	α	0.95 (m)	56.9
18	—	0.61 (s)	11.9	—	0.61 (s)	11.9
19	—	0.99 (s)	17.1	—	1.06 (s)	16.0
20	β	1.32 (m)	35.8	β	1.32 (m)	35.8
21	—	0.89 (d, J = 6.5 Hz)	18.7	—	0.89 (d, J = 6.5 Hz)	18.7
22	α	0.97 (m)	36.1	α	0.97 (m)	36.1
	β	1.32 (m)	—	β	1.32 (m)	—
23	α	1.12 (m)	23.9	α	1.12 (m)	23.9
	β	1.31 (m)	—	β	1.31 (m)	—
24	α	1.11 (m)	39.4	α	1.11 (m)	39.4
	β	1.11 (m)	—	β	1.11 (m)	—
25	—	1.50 (m)	28.0	—	1.50 (m)	28.0
26	—	0.86 (d, J = 6.6 Hz)	22.6	—	0.86 (d, J = 6.6 Hz)	22.6
27	—	0.86 (d, J = 6.6 Hz)	22.8	—	0.86 (d, J = 6.6 Hz)	22.8

in a 3:1 ratio. **Product IV** the ^1H and ^{13}C NMR signals are presented in Table 4. MS (EI, 70 eV) m/z (rel. inten.): 402(M^+ , 50), 384(47), 369(27), 358(20), 271(27), 247(30), 120(100), 105(93). The mass spectra of this product showed a molecular ion peak at m/z 402 which suggested that one oxygen atom was incorporated in the cholesterol structure. The diastereoisomeric epoxides showed different chemical shifts and coupling constants, which agrees with the NMR data previously reported in the literature

(Soto-Castro et al. 2017). The ^1H NMR spectrum showed new signals corresponding to the proton H-6 of both epoxides. The doublet signal at δ 3.06 ppm with $J = 2.0$ Hz is in accordance with the value reported for 5,6 β -epoxides, while the doublet signal at δ 2.90 ppm with $J = 4.4$ Hz is characteristic of 5,6 α -epoxides. Moreover, H-19 signal was observed at 0.99 ppm and 1.06 ppm, while H-3 signal appeared at 3.69 ppm and 3.90 ppm in

5 β ,6 β -epoxycholestan-3 β -ol and 5 α ,6 α -epoxycholestan-3 β -ol respectively.

Discussion

In order to search for novel biocatalysts for cholesterol biotransformation, 22 microorganisms were isolated from wool scouring wastewater samples by using selective media containing cholesterol (Tables 1, 2). Eight of these microorganisms were isolated based on their capability of growing in minimal medium using cholesterol as the sole carbon and energy source. Strains of the genera *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, and *Burkholderia* among others have been previously reported as capable of using sterols as carbon source (Swizdor et al. 2012). In our study, three strains of gram-positive bacteria identified as *Streptomyces*, *Tsukamurella* and *Bacillus* sp., showed the ability to degrade cholesterol. These genera have already been reported for their ability to grow using cholesterol (Nagasawa et al. 1969; Merino et al. 2013). In relation to filamentous fungi, many transformations of various steroids have been previously reported (Mahato et al. 1989; Fernandes et al. 2003; Bhatti and Khera 2012; Nassiri-Koopaei and Faramarzi 2015), although little is known about their ability to use sterols as carbon and energy source. Nagasawa et al. reported cholesterol degradation by strains of *Trichoderma*, *Mucor*, *Fusarium* and *Aspergillus* genera, which also showed that ability in the present study.

The bacterial isolates were identified based on morphological and biochemical characteristics (Table S1), phylogenetic analysis and MALDI-TOF MS (Table 1). This powerful tool has been mainly used in the clinical field; however, its application in other fields such as environmental microbiology has yet much to be explored (Santos et al. 2016). In our study, eight isolates were identified at the species level and six isolates at the genera level by the MALDI-TOF MS method. In the identification by 16S rRNA gene sequencing, half of all the isolates were identified at the species level (seven isolates). The identification by both methods was according to the outcome of biochemical test.

Two isolates belonging to the genus *Citrobacter* and one isolate belonging to the genus *Klebsiella* were identified at the species level by 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF MS. In the case of the isolates belonging to the genus *Acinetobacter*, two of them were identified at the species level as *A. johnsonii* by both methods, whereas one isolate (M3Y) belonging to the same genus was identified by MALDI-TOF MS as *A. calcoaceticus*. However, in this case it was not possible to corroborate

the specie-level identification by 16S rRNA gene sequencing. The three isolates belonging to the genus *Proteus* were identified at the genus level, but only one of them was identified at the specie level as *P. vulgaris* (M1E) by both methods. The second isolate was identified as *P. vulgaris* (M12D) by MALDI-TOF MS only, and the third one could not be identified at the specie level (M2A) by the abovementioned approaches. The isolates belonging to *Streptomyces* and *Tsukamurella* were only identified at the genera level by both methods, whereas isolates belonging to *Bacillus* and *Exiguobacterium* genera could not be identified by MALDI-TOF MS (Table 1). The agreement between the results of the different identification methods performed demonstrates that MALDI-TOF MS was an efficient method to identify the bacteria isolated, being rapid, sensitive and specific (Wieser et al. 2012).

Over 1500 species of microorganisms have been studied in the context of steroid conversion (Koshimura et al. 2010). In our study, nine strains showed the ability to biotransform cholesterol. These results support the notion that the strategy used to search for novel cholesterol biocatalysts was suitable. However, low bioconversion yields (0.5–6%) were observed, which did not allow us to characterize all the biotransformation products. It was possible to identify three products II–IV (Fig. 1) from the biotransformation by fungal strains, which turned out to be cholesterol oxidation products.

Transformation of a range of steroids into hydroxylated derivatives by strains belonging to *Trichoderma* and *Mucor* genera has been described in the literature (El-Kadi and Eman Mostafa 2004; Bartmaska and Dmochowska-Gladysz 2007; Nassiri-Koopaei and Faramarzi 2015; Heidary and Habibi 2016). However, there is no data on the usage of representatives of *Trichoderma* and *Mucor* genera for microbial transformation of cholesterol. It seems that hydroxylations are the common pattern of steroid bioconversion within members of the genus *Mucor* (Li et al. 2005; Lamm et al. 2007; Faramarzi et al. 2008; Torshabi et al. 2011). Nevertheless, the cholesterol metabolites produced by the *Mucor* strains isolated in this study were not hydroxylated derivatives. Microbiological hydroxylation of many steroids by *Trichoderma* species has been performed (El-Kadi and Eman Mostafa 2004; Bartmaska and Dmochowska-Gladysz 2007), but there is no data of hydroxylation at the C-7 position of the steroidal skeleton by fungi of the genus *Trichoderma*. Lastly, to the best of our knowledge, biotransformation of cholesterol by *M. circinelloides* and *T. koningiopsis* has never been reported before.

Conclusions

The isolation of 22 microorganisms from a wool scouring effluent and the soil adjacent to the wastewater treatment lagoon, both sterols-rich environments, made it possible to discover new strains able to convert the cholesterol by whole-cell biocatalysis in a rich media (TSB and PDB). These results showed that the selection of the environment based on the presence of cholesterol and other sterols was suitable for isolating microorganisms with the intended activity.

In addition, MALDI-TOF MS proved to be a rapid and efficient tool to identify the isolated bacteria, showing significant potential in the field of biocatalysis and biotransformation.

The screening of cholesterol biotransformation by the fungal strains isolated in this study showed that *T. konin-giopsis* led to the production of 7 β -hydroxycholesterol. Hydroxylation at C-7 has not been previously observed in steroid transformation by the members of this genus.

The cholesterol transformation performed by *M. circinelloides* strains led to 4-cholesten-3-one, 5 α ,6 α -epoxycholestan-3 β -ol and 5 β ,6 β -epoxycholestan-3 β -ol. To the best of our knowledge, this paper is the first report of cholesterol biotransformation catalysed by representatives of *Trichoderma* and *Mucor* genera. The discovery of these new strains able to transform cholesterol opens a door to futures studies in order to grasp their biotechnological potential for the production of steroidal drugs.

Acknowledgements The authors are grateful to Lanassur SA for allowing them to take samples from the wool scouring wastewater treatment system. The authors thank Professor Anita Marsaioli and Dr. María Lair Sabóia, of Institute of Chemistry, University of Campinas; and Dr. Paula Rodríguez, Dr. Sonia Rodríguez, and Dr. Guillermo Moyna of Facultad de Química, Universidad de la República, for their assistance with this Project. This study was funded by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Award POS_NAC_2013_1_11432), Comisión Académica de Posgrado (CAP), Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), and Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

Ahire JJ, Bhat AA, Thakare JM et al (2012) Cholesterol assimilation and biotransformation by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnol Lett* 34:103–107. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0733-2>

- Ahmad S, Roy PK, Khan AW et al (1991) Microbial transformation of sterols to C₁₉-steroids by *Rhodococcus equi*. *World J Microbiol Biotechnol* 7:557–561
- Al Jaseem Y, Khan M, Taha A, Thiemann T (2014) Preparation of steroidal hormones with an emphasis on transformations of phyto-sterols and cholesterol -a review. *Mediterr J Chem* 3:796–830. <https://doi.org/10.13171/mjc.3.2.2014.18.04.15>
- Altschul SF, Gish W, Miller W et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Barrow GI, Feltham RKA (1993) Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge
- Bartmaska A, Dmochowska-Gladysz J (2007) Transformation of steroids by *Trichoderma hamatum*. *Enzyme Microb Technol* 40:1615–1621. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.11.011>
- Bhatti HN, Khera RA (2012) Biological transformations of steroidal compounds: a review. *Steroids* 77:1267–1290. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.07.018>
- Bloch K (1991) Cholesterol: evolution of structure and function. In: Vance DE, Vance JE (eds) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier B.V., Amsterdam, pp 363–381
- Brown FJ, Djerassi C (1980) Elucidation of the course of the electron impact induced fragmentation of α,β -unsaturated 3-keto steroids. *J Am Chem Soc* 102:807–817
- Chaudhari PN, Chaudhari BL, Chincholkar SB (2010) Cholesterol biotransformation to androsta-1,4-diene-3,17-dione by growing cells of *Chryseobacterium gleum*. *Biotechnol Lett* 32:695–699. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0206-z>
- Dogra N, Qazi GN (2001) Steroid biotransformation by different strains of *Micrococcus* sp. *Folia Microbiol* 46:17–20
- Donova MV (2007) Transformation of steroids by actinobacteria: a review. *Appl Biochem Microbiol* 43:5–18. <https://doi.org/10.1134/S0003683807010012>
- Donova MV, Egorova OV (2012) Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:1423–1447. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4078-0>
- Dovbnya D, Khomutov S, Kollerov V, Donova M (2017) Obtaining of 11 α -hydroxyandrosta-4-ene-3,17-dione from natural sterols. *Methods Mol Biol*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7183-1_18
- El-Kadi IA, Eman Mostafa M (2004) Hydroxylation of progesterone by some *Trichoderma* species. *Folia Microbiol* 49:285–290. <https://doi.org/10.1007/2FBF02931044>
- Faramarzi MA, Badiie M, Yazdi MT et al (2008) Formation of hydroxysteroid derivatives from androst-4-en-3,17-dione by the filamentous fungus *Mucor racemosus*. *J Mol Catal B*. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.09.017>
- Fernandes P, Cabral JMS (2007) Phytosterols: applications and recovery methods. *Bioresour Technol* 98:2335–2350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.006>
- Fernandes P, Cruz A, Angelova B et al (2003) Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb Technol* 32:688–705. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00029-2)
- Heidary M, Habibi Z (2016) Microbial transformation of androst-4-ene-3,17-dione by three fungal species *Absidia griseola* var. *igachii*, *Circinella muscae* and *Trichoderma virens*. *J Mol Catal B* 126:32–36. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.01.007>
- Hogg JA (1992) Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation. *Steroids* 57:593–616. [https://doi.org/10.1016/0039-128X\(92\)90013-Y](https://doi.org/10.1016/0039-128X(92)90013-Y)
- Koshimura M, Utsukihara T, Hara A et al (2010) Enzymatic hydroxylation of steroid compounds by *Gelasinospora retispora*. *J Mol Catal B* 67:72–77. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.07.008>
- Lamm AS, Chen ARM, Reynolds WF, Reese PB (2007) Steroid hydroxylation by *Whetzelinia sclerotiorum*, *Phanerochaete*

- chrysosporium* and *Mucor plumbeus*. Steroids 72:713–722. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.05.008>
- Li H, Liu HM, Ge W et al (2005) Synthesis of 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone and 7 β -hydroxy-dehydroepiandrosterone. Steroids 70:970–973. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.07.006>
- Liu WH, Kuo CW, Wu KL et al (1994) Transformation of cholesterol to testosterone by *Mycobacterium* sp. J Ind Microbiol 13:167–171. <https://doi.org/10.1007/BF01584002>
- Liu WH, Horng WC, Tsai MS (1996) Bioconversion of cholesterol to cholest-4-en-3-one in aqueous/organic solvent two-phase reactors. Enzyme Microb Technol 18:184–189. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00091-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00091-7)
- Liu Y, Chen G, Ge F et al (2011) Efficient biotransformation of cholesterol to androsta-1,4-diene-3,17-dione by a newly isolated actinomycete *Gordonia neofelifaecis*. World J Microbiol Biotechnol 27:759–765. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0513-5>
- Mahato SB, Garai S (1997) Advances in microbial steroid biotransformation. Steroids 62:332–345. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(96\)00251-6](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(96)00251-6)
- Mahato SB, Banerjee S, Podder S (1989) Steroid transformations by microorganisms-III. Phytochemistry 28:7–40. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)85002-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)85002-2)
- Malaviya A, Gomes J (2008) Androstenedione production by biotransformation of phytosterols. Bioresour Technol 99:6725–6737. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.039>
- Malaviya A, Gomes J (2009) Rapid screening and isolation of a fungus for sitosterol to androstenedione biotransformation. Appl Biochem Biotechnol 158:374–386. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8416-8>
- Merino E, Barrientos A, Rodríguez J et al (2013) Isolation of cholesterol- and deoxycholate-degrading bacteria from soil samples: evidence of a common pathway. Appl Microbiol Biotechnol 97:891–904. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3966-7>
- Nagasawa M, Bae M, Tamura G, Arima K (1969) Microbial transformation of sterols. Part I. Decomposition of cholesterol by microorganisms. Agric Biol Chem 33:1163–1650. <https://doi.org/10.1080/00021369.1969.10859516>
- Nassiri-Koopaei N, Faramarzi MA (2015) Recent developments in the fungal transformation of steroids. Biocatal Biotransform 33:1–28. <https://doi.org/10.3109/10242422.2015.1022533>
- Pang C, Cao Y, Zhu X (2016) Biotransformation of cholesterol and 16,17- α -epoxypregnenolone by novel *Cladosporium* sp. strain IS547. J Basic Microbiol 57:12–20. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600191>
- Pendharkar G, Anjum S, Patil S (2014) Enhanced biotransformation of phytosterols, a byproduct of soybean refineries, to key intermediate used for synthesis of steroidal drugs. Asian J Pharm Clin Res 7:178–180
- Pitt JI, Hocking A (1997) Fungi and food spoilage, 2nd edn. Blackie Academic and Professional, London
- Santos IC, Hildenbrand ZL, Schug KA (2016) Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. Analyst 141:2827–2837. <https://doi.org/10.1039/C6AN00131A>
- Sharma P, Slathia PS, Somal P, Mehta P (2012) Biotransformation of cholesterol to 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) by *Nocardia* species. Ann Microbiol 62:1651–1659. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0422-y>
- Soto-Castro D, Lara Contreras RC, Pina-Canseco M et al (2017) Solvent-free synthesis of 6 β -phenylamino-cholestan-3 β ,5 α -diol and (25*R*)-6 β -phenylaminospirostan-3 β ,5 α -diol as potential antiproliferative agents. Steroids 126:92–100. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.08.008>
- Sripalakit P, Wichai U, Saraphanchotiwitthaya A (2006) Biotransformation of various natural sterols to androstenediones by *Mycobacterium* sp. and some steroid-converting microbial strains. J Mol Catal B 41:49–54. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.04.007>
- Swizdor A, Kolek T, Panek A, Milecka N (2012) Selective modifications of steroids performed by oxidative enzymes. Curr Org Chem 16:2551–2582. <https://doi.org/10.2174/138527212804004625>
- Szentirmai A (1990) Microbial side-chain degradation of sterols. J Ind Microbiol 6:101–116. <https://doi.org/10.1007/BF01576429>
- Torshabi M, Badiie M, Faramarzi MA et al (2011) Biotransformation of methyltestosterone by the filamentous fungus *Mucor racemosus*. Chem Nat Compd. <https://doi.org/10.1007/s10600-011-9830-7>
- Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S (2012) MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). Appl Microbiol Biotechnol 93:965–974. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4>
- Wu K, Li W, Song J, Li T (2015) Production, purification, and identification of cholest-4-en-3-one produced by cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp. in aqueous/organic biphasic system supplementary issue: ligand–receptor interactions and drug design. Biochem Insights 88:1–8. <https://doi.org/10.4137/BCI.S21580>
- Zhu X, Pang C, Cao Y, Fan D (2016) Biotransformation of cholesterol and 16 α , 17 α -epoxypregnenolone and isolation of hydroxylase in *Burkholderia cepacia* SE-1. Biomed Res Int. <https://doi.org/10.1155/2016/5727631>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Affiliations

Victoria Giorgi¹  · Michel Chaves² · Pilar Menéndez^{1,3} · Carlos García Carnelli^{1,3}

✉ Victoria Giorgi
vgiorgi@fq.edu.uy

¹ Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones, Departamento de Química Orgánica y, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelAR), CP 11800 Montevideo, Uruguay

² LaBioChem, Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas, SP 13084-971, Brazil

³ Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelAR), CP 11800 Montevideo, Uruguay



Microbial transformation of cholesterol: reactions and practical aspects—an update

Victoria Giorgi¹ · Pilar Menéndez^{1,2} · Carlos García-Carnelli^{1,2}

Received: 13 April 2019 / Accepted: 3 August 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Cholesterol is a C27-sterol employed as starting material for the synthesis of valuable pharmaceutical steroids and precursors. The microbial transformations of cholesterol have been widely studied, since they are performed with high regio- and stereoselectivity and allow the production of steroidal compounds which are difficult to synthesize by classical chemical methods. In recent years, ongoing research is being conducted to discover novel biocatalysts and to develop biotechnological processes to improve existing biocatalysts and biotransformation reactions. The main objective of this review is to present the most remarkable advances in fungal and bacterial transformation of cholesterol, focusing on the different types of microbial reactions and biocatalysts, biotransformation products, and practical aspects related to sterol dispersion improvement, covering literature since 2000. It reviews the conversion of cholesterol by whole-cell biocatalysts and by purified enzymes that lead to various structural modifications, including side chain cleavage, hydroxylation, dehydrogenation/reduction, isomerization and esterification. Finally, approaches used to improve the poor solubility of cholesterol in aqueous media, such as the use of different sterol-solubilizing agents or two-phase conversion system, are also discussed.

Keywords Biocatalysis · Cholesterol · Bioavailability · Biotransformation · Hydroxylation · Oxidation · Side chain cleavage

Introduction

Cholesterol is a 27-carbon molecule with a structure formed by a polycyclic ring skeleton, named gonane, with two methyl groups at C10 and C13, a double bond at C5, a β -hydroxyl group at C3 and a side chain at C17 (Fig. 1). This sterol is an essential structural component of animal cell membranes. It plays a key role in membrane fluidity, cell growth and proliferation and it is precursor of bile acids, hormones and other steroids (Bhatti and Khera 2012). Steroidal compounds are widely used in pharmaceutical preparations as anti-inflammatory, diuretics, immunosuppressive,

contraceptive and anticancer drugs, as well as in other applications (Hogg 1992; Mahato and Garai 1997; Fernandes et al. 2003). Microbial transformation is an effective tool for producing these compounds and their precursors, which may be difficult to prepare by conventional synthetic methods. In addition, bioconversions are usually performed in mild conditions and they are more environmentally friendly than their chemical synthesis counterparts (Fernandes et al. 2003). Cholesterol, obtained from wool grease and animal fats and oils, is a starting material to produce steroid drugs and hormones owing to its low cost and ease of transformation (Yam et al. 2010).

The first cholesterol transformations were performed by *Proactinomyces* spp. and *Azotobacter* spp. to obtain cholestenone, 7-dehydrocholesterol and an unknown product formed by splitting off the sterol side chain (Turfitt 1945; Horvath and Kramli 1947). Since then, the biotransformation of steroids including cholesterol has been extensively studied and has been the object of many reviews in the last two decades (Fernandes et al. 2003; Donova 2007; Carbal-leira et al. 2009; Tong and Dong 2009; Bhatti and Khera 2012; Donova and Egorova 2012; Kristan and Lanisnik 2012; Al Jasem et al. 2014; Nassiri-Koopaei and Faramarzi

✉ Victoria Giorgi
vgiorgi@fq.edu.uy

¹ Laboratorio de Biocatálisis Y Biotransformaciones, Departamento de Química Orgánica y Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de La República (UdelaR), CP 11800 Montevideo, Uruguay

² Laboratorio de Farmacognosia Y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de La República (UdelaR), CP 11800 Montevideo, Uruguay

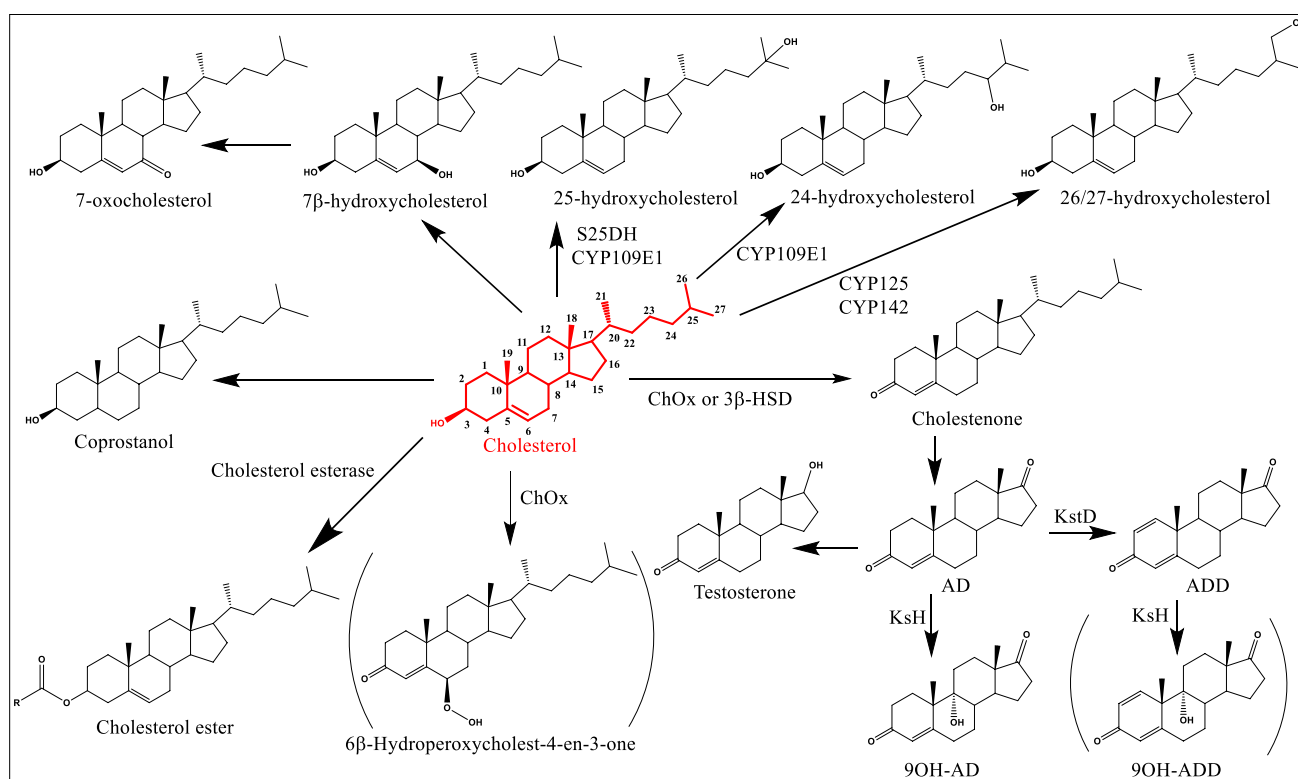


Fig. 1 Main products obtained by cholesterol biotransformation. Unstable products are indicated between brackets

2015). However, the microbial conversion of cholesterol has not been reviewed specifically. This review attempts to present an overview of the advances in the field, focusing on reactions and metabolites structures that were obtained by biotransformation of cholesterol in the period 2000–2019. Emphasis is laid on the reactions including side chain cleavage, hydroxylation, dehydrogenation/reduction, isomerization and esterification. The relevance of the products and the strategies to overcome the solubility limitations of cholesterol in aqueous media are highlighted.

Oxidation of 3 β -alcohol group and Δ^5 – Δ^4 isomerization

The oxidation and isomerization of cholesterol to 4-cholesten-3-one (cholestenone) is thought to be the first step in the cholesterol catabolism in most microorganisms (Fig. 1). This conversion can be catalyzed for two different enzymes: 3 β -hydroxysteroid oxidase (EC 1.1.3.6), commonly known as cholesterol oxidase (ChOx); and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD, EC 1.1.1.145) (Fig. 2). Both ChOx and 3 β -HSD were shown to have dual functions: they catalyze both the oxidation of 3 β -hydroxyl group and $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ isomerization. However, in some proteobacteria different enzymes were reported to be responsible for the isomerization reaction (Shtratnikova et al. 2016). Detailed information on

microbial catabolism of sterols focusing on both enzymes ChOx and 3 β -HSD can be found in a recently published review (Kreit 2017). The 3 β -HSD is a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) or NAD-phosphate (NADP⁺)-dependent enzyme that has been identified in a range of different species including amphibians, birds, bacteria, fungi and mammals (Hunter et al. 2009; Donova and Egorova 2012; Nassiri-Koopaei and Faramarzi 2015). The ChOx is a flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent enzyme exclusive to bacteria and fungi. These enzymes have been isolated from various bacteria including members of the genera *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, and *Pseudomonas* (MacLachlan et al. 2000; Doukyu 2009). A ChOx from a eukaryotic microorganism identified as *Schizophyllum commune* has also been reported (Fukuyama and Miyake 1979). All ChOxs isolated to date are extracellular, either secreted or cell-surface associated, depending on the producer microorganism and growth conditions (Kreit and Sampson 2009). In most of the cases ChOxs catalyze the oxidation of cholesterol to cholestenone using oxygen as acceptor to form hydrogen peroxide, and the conversion can be performed by whole-cell biocatalyst or by using free or immobilized ChOx (Table 1). However, some ChOxs oxidize the cholesterol to 6 β -hydroperoxycholesterol-4-en-3-one but not to cholestenone, as the recently reported ChOxs from *Burkholderia*

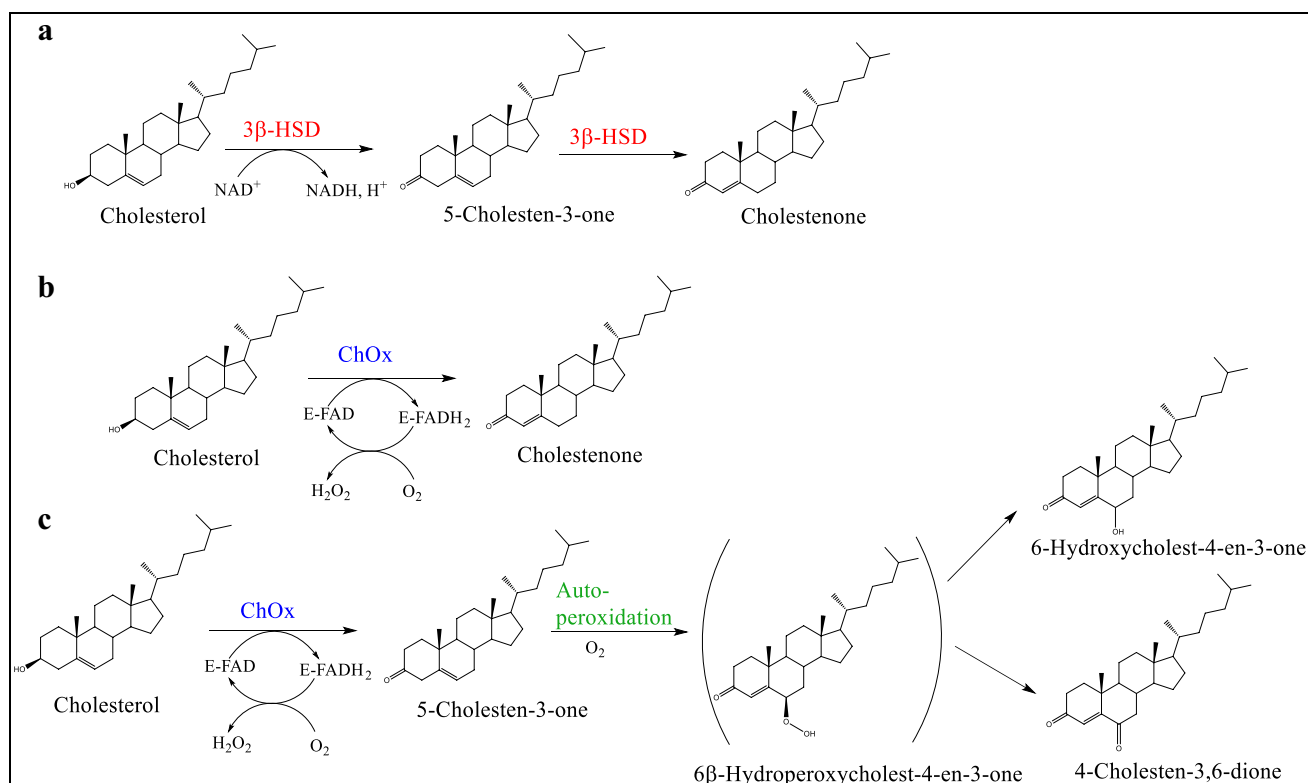


Fig. 2 Scheme of oxidation of 3β-alcohol group and Δ^5 – Δ^4 isomerization of the cholesterol. **a** Oxidation of cholesterol to cholestenone catalyzed by 3β-HSD. **b** Oxidation of cholesterol to cholestenone catalyzed by ChOx. **c** Oxidation of cholesterol to

6β-hydroxyperoxycholest-4-en-3-one catalyzed by ChOx from *Burkholderia cepacia* ST-200 and *Chromobacterium* sp. DS-1. Unstable products are indicated between brackets

cepacia strain ST-200 and *Chromobacterium* sp. strain DS-1 (Table 1) (Doukyu and Aono 2001; Doukyu et al. 2008). It is possible that these cholesterol oxidases might naturally lack the isomerization activity and that the auto-peroxidation of the product 5-cholesten-3-one lead to the formation of 6β-hydroperoxycholest-4-en-3-one (Doukyu 2009). This is an unstable compound that is transformed to 4-cholesten-3,6-dione and 6-hydroxycholest-4-en-3-one (Fig. 2) (Doukyu 2009).

The maximal percentages of cholesterol conversion to cholestenone reported so far are close to 80%, being the highest values achieved by using cholesterol oxidase immobilized on chitosan beads or nanoparticles (Table 1) (Ahmad and Goswami 2014; Ghosh et al. 2018). The authors of these works suggested that the enzyme immobilized offers economic advantages because it may reduce the downstream processing cost as compared to the biotransformation using whole cells, while allowing easy biocatalyst recovery for reusability. The maximal enzyme activities obtained in the cholesterol oxidase production are showed in Table 1, but it is necessary to highlight that the enzyme unit is defined differently in most of the articles which hinders the comparison of the data.

Cholestenone can be used to control obesity, treat liver diseases and to prevent the keratinization of the skin (Suzuki 1993; Hisao and Taku 1995; Kashima et al. 1995; Suzuki et al. 1998). Moreover, it can serve as the precursor for some other steroid drug intermediates, such as 4-Androsten-3,17-dione (AD) and 1,4-Androstadiene-3,17-dione (ADD) generating a wide range of classes of steroids such as androgens, estrogens, glucocorticoids, progestogens and mineralocorticoids (Shao et al. 2014). The biotransformation reactions to obtain AD and ADD from cholesterol are presented below.

Side chain cleavage and steroid nucleus oxidation

The microbial catabolism of cholesterol involves oxidative processes that leads to the degradation of the C17-side chain and the steroid rings (Kreit 2017). These processes were confirmed to be independent from each other, at least in actinobacteria, and their order can vary even in one genus (Donova and Egorova 2012). Generally, once cholestenone is formed, the C17- alkyl side chain is removed leading to the formation of 17- ketosteroids AD and ADD (Fig. 1). The

Table 1 Microbial transformation of cholesterol. Production of cholestenone, 5-cholesten-3-one, 6 β -hydroperoxy-4-cholesten-3-one, 1,4-cholestadiene-3-one and 4,6-cholestadiene-3-ol by whole-cell and purified ChOx enzyme

Product	Microorganism	Biocatalyst	Biotransformation conditions ^a	Cholesterol solubilizing agent ^b	Quantitative information ^c	References
4-Cholesten-3-one	<i>Agrobacterium</i> sp. M4	Whole-cell	GC, SF, 150 rpm, 30 °C	0.2% Isopropanol and 0.1% Tween 80	NA	(Yazdi et al. 2000)
4-Cholesten-3-one	<i>Bacillus subtilis</i> SFF34	Two purified cholesterol oxidases	60 °C and 40 °C	–	Maximal level of cholesterol oxidase production: 3.12 U/mL of culture supernatant fluid with 0.2% cholesterol	(Kim et al. 2002)
4-Cholesten-3-one	<i>Mycobacterium smegmatis</i> PTCC 1307	Whole-cell	GC, SF, 150 rpm, 30 °C; I	–	NA	(Naghbi et al. 2002)
4-Cholesten-3-one	<i>Fusarium solani</i>	Whole-cell	Resting cells, SF, 200 rpm, 30 °C; I	–	Maximum yield of product: 42.7%	(Sallam et al. 2005)
5-Cholesten-3-one					25.3%	
1,4-cholestadiene-3-one					16.5%	
4-Cholesten-3-one	<i>Chryseobacterium gleum</i>	Whole-cell	GC, SF, 120 rpm, 30 °C	0.1% Tween 80	NA	(Chaudhari et al. 2010)
4-Cholesten-3-one	<i>Gordonia neofelfi</i> NRRL B-59395	Whole-cell	GC, SF, 200 rpm, 30 °C	0.2% Tween 80	Initial concentration of cholesterol: 0.5 g/L Highest concentration or yield of product: 4-cholesten-3-one 0.029 g/L or 5.8% at 72 h 1,4-cholestadiene-3-one 0.036 g/L or 7.2% at 48 h	(Liu et al. 2011)
1,4-cholestadiene-3-one					Initial concentration of cholesterol: 1 g/L Cholesterol conversion 67%	(Marques et al. 2012)
4-Cholesten-3-one	–	Commercial cholesterol oxidase	Glass microchannel reactors	Biphasic system 1:1 buffer: n-heptane or single organic phase n-heptane		
4,6-Cholestadiene-3-ol	<i>Lactobacillus helveticus</i> CD6	Whole-cell	GC, 37 °C	0.2% Tween 80	NA	(Ahire et al. 2014)
4-Cholesten-3-one	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIM 2891	Purified cholesterol oxidase immobilized on chitosan beads	Stirring, 260 rpm, room temperature	–	Initial concentration of cholesterol: 3.75 mM (1.4 g/L) Cholesterol conversion 88% at 9 h	(Ahmad and Goswami 2014)
4-Cholesten-3-one	<i>Rhodococcus ruber</i> Chol-4	Cholesterol oxidase	SF, 250 rpm, 30 °C	16.5 mM Cyclodextrin	NA	(De Las Heras et al. 2014)
4-Cholesten-3-one	<i>Chryseobacterium gleum</i> DSM 1677	Purified cholesterol oxidase expressing in <i>E. coli</i> JM109	25 °C	5% Triton X-100	Highest specific activity achieved: 15.5 U/mg protein	(Reiss et al. 2014)
4-Cholesten-3-one	<i>Micobacterium neoaurum</i> JC-12	Whole-cell of <i>Bacillus subtilis</i> expressing cholesterol oxidase genes from <i>M. neoaurum</i>	Resting cells, SF	0.3% (w/v) Hydroxypropyl- β -cyclodextrin	Highest specific activity achieved: 7.44 U/mg protein Cholesterol conversion 83% at 21 h	(Shao et al. 2014)
4-Cholesten-3-one	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PseA, <i>Rhodococcus erythropolis</i> MTCC 3951 <i>Streptomyces</i> sp.	Cholesterol oxidase immobilized on nanoparticles and free enzyme	SF, 30 °C	–	Initial cholesterol amount: 1 mg Cholesterol conversion 86% at 3 h	(Ghosh et al. 2018)
4-Cholesten-3-one	<i>Mucor circinelloides</i> VGY2	Whole-cell	GC, SF, 150 rpm, 28 °C	0.1% Tween 80	Cholesterol conversion 2.5%	(Giorgi et al. 2019)

Table 1 (continued)

Product	Microorganism	Biocatalyst	Biotransformation conditions ^a	Cholesterol solubilizing agent ^b	Quantitative information ^c	References
6 β -Hydroperoxy-4-cholesten-3-one	<i>Burkholderia cepacia</i> ST-200	Purified cholesterol oxidase expressing in <i>E. coli</i>	30 °C	Different detergents	Highest specific activity achieved: 16.9 U/mg protein Cholesterol oxidation rate: 13.4 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$	(Doukyu and Aono 2001)
6 β -Hydroperoxy-4-cholesten-3-one	<i>Chromobacterium</i> sp. DS-1	Purified cholesterol oxidase	30 °C	0.34% Triton X-100	NA	(Doukyu et al. 2008)

^aGC growing cells, SF shaking flask, I addition of nucleus degradation inhibitors or 9 α -hydroxylase inhibitors^b(-): No cholesterol solubilizing agent/additive was used or unavailable data^cNA not available data

products and intermediate metabolites obtained via cholesterol side chain degradation are described in Table 2.

Cholesterol side chain degradation is a process similar to the β -oxidation of fatty acids, initiated by C26 hydroxylation, that led to the formation of 3-oxo-23,24-bisnor-chola-1,4-dien-22-oic acid ($\Delta^{1,4}$ -BNC) (García et al. 2012) (Fig. 3). This intermediate was identified in the conversion by *Gordonia neofelifaecis* and mutant strain RG32 of *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269 (devoid of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase activity) (Liu et al. 2011; Wilbrink et al. 2011). The biochemical and genetic basis of the side chain degradation pathway have been studied in details in *Actinobacteria*, particularly in strains of *Rhodococcus*, *Nocardia* and *Mycobacterium* (Szentirmai 1990; Van der Geize et al. 2007; Rosloniec et al. 2009; Yam et al. 2010; García et al. 2012; Shtratnikova et al. 2016; Van Hamme et al. 2016).

Before or after the side chain cleavage, depending on the strain; the Δ^1 -dehydrogenation catalyzed by 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase (KstD, EC 1.3.99.4) and 9 α -hydroxylation catalyzed by 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase (KsH, EC 1.14.15.30) occur on the steroid nucleus (Fig. 4). If AD is the substrate, these enzymes led to the formation of either 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) or 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione (9 α OH-AD) respectively. The product of the combined reactions is 9 α -hydroxy-1,4-androstadiene-3,17-dione (9 α OH-ADD), a unstable metabolite which is spontaneously rearranged into 3-hydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)triene-9,17-dione, which undergoes further degradation (Donova 2007; Wilbrink 2011). A deep revision of the current knowledge about the key-enzyme in steroid degradation 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase can be found in the literature (Petrusma et al. 2014).

When the selective cleavage of cholesterol 17-alkyl side chain is the goal, an inhibitor compound or improved bacterial strains may be used to avoid the action of KstD and/or KsH (Table 2). This may lead to the accumulation of AD, 9 α -OH-AD or ADD depending on which enzyme is inhibited. Various inhibitor agents of these enzymes have been reported such as chelating agents, redox dyes or metals (Sallam et al. 2005). The cholesterol conversion to AD and ADD has been investigated in presence of different additives, being demonstrated that the inhibition with 8-hydroxyquinoline and methanol lead to the production of the highest yield of AD and ADD, respectively.

The construction of mutant bacterial strains in which the biosynthesis of 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase is inhibited has been conducted mostly in bacteria belonging to *Mycobacterium* genus, such as *Mycobacterium fortuitum*, *M. vaccae* and *M. neoaurum* (Wovcha et al. 1982; Gottschaldt et al. 1993; Molchanova et al. 2007). The most recent patents in microbial cholesterol transformation are related to the use of modified strains to produce AD, ADD, 9 α -OH-AD and

Table 2 Products and intermediates obtained by side chain cleavage and steroid nucleus oxidation of cholesterol by whole cells

Product	Microorganism	Biotransformation conditions ^a	Cholesterol solubilizing agent ^b	Initial cholesterol concentration (g/L)	Maximal product yield or concentration/quantity achieved ^c	References
AD	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	GC, aerated fermentor, 250 rpm, 30 °C	0.1% Cyclodextrin	5	0.40 mmol/L of AD	(Kumar et al. 2001)
TS					1.56 mmol/L of ADD	
AD	<i>Micrococcus roseus</i>	GC, SF, 174 rpm, 30 °C	0.1% Tween 80	1	63% of ADD	(Dogra and Qazi 2001)
ADD					AD yield is not available	
AD	<i>Mycobacterium</i> sp.	GC, SF, 160 rpm, 30 °C	1 g/L Lecithin from soybean or 3 g/L Tween 80	1	59% of ADD	(Wang et al. 2002)
ADD		Resting cells, SF, 150 rpm, 30 °C			AD yield is not available	
AD	<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B3683 and mutant strains	GC, SF, 200 rpm, 30 °C	0.5% Tween 80	1	2.97 mg of AD	(Perez et al. 2003)
ADD	<i>Mycobacterium</i> sp. EX4; M2 and M10				18.81 mg of ADD	
AD	<i>Fusarium solani</i>	Resting cells, SF, 200 rpm, 30 °C; I	–	0.2	33.9% of AD	(Sallam et al. 2005)
ADD					24.5% of ADD	
AD	<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B-3683 and NRRL B-3805	GC, SF, 200 rpm, 25 °C	8% Tween 80	0.2	Strain NRRL B-3683: 31.25% of AD 1.29% of ADD Strain NRRL B-3805: 21.67% of AD 18.01% of ADD	(Sripalakit et al. 2006)
ADD	<i>Mycobacterium neoaurum</i> VKPM Ac-1656	GC, SF, 220 rpm, 30 °C	0.3% Tween 80	10	55% of ADD	(Molchanova et al. 2007)
ADD	<i>Chryseobacterium gleum</i>	GC, SF, 120 rpm, 30 °C	0.1% Tween 80	1	10% of ADD	(Chaudhari et al. 2010)
AD	<i>Gordonia neofelificis</i> NRRL B-59395	GC, SF, 200 rpm, 30 °C	0.2% Tween 80	0.5	8.6% of AD 87.2% of ADD	(Liu et al. 2011)
ADD					7.4% of 3-oxo-23,24-bisnorchole-1,4-dien-22-oic-acid	
3-oxo-23,24-bisnorchole-1,4-dien-22-oic-acid						
17-Ketosteroids (no identified)	<i>Nocardia</i> sp. MTCC 1534	GC, SF, 100 rpm, 37 °C*	1% Acetone	0.1	NA	(Vyas et al. 2012)
AD	<i>Lactobacillus helveticus</i>	GC, 37 °C; I	0.2% Tween 80	1	0.4 g of AD	(Ahire et al. 2012)
ADD					0.05 g of ADD	

Table 2 (continued)

Product	Microorganism	Biotransformation conditions ^a	Cholesterol solubilizing agent ^b	Initial cholesterol concentration (g/L)	Maximal product yield or concentration/quantity achieved ^c	References
AD 9αOH-AD	<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155, <i>M. tuberculosis</i> H37RV and mutants	GC, SF, 130 rpm, 37 °C	50:50 96% Ethanol: water	0.3	NA	(Brzostek et al. 2013)
ADD 3-oxo-23,24-bisnorchola-1,4-dien-22-oic-acid	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> DSM43269 mutant strain RG32	GC; SF, 220 rpm, 30 °C	Acetone	0.193	3% of ADD 73% of 3-oxo-23,24-bisnorchola-1,4-dien-22-oic-acid	(Wilbrink et al. 2011)
AD ADD	<i>Mycobacterium smegmatis</i> PTCC 1307	GC, SF, 150 rpm, 30 °C; 1	-	2	NA	(Naghibi et al. 2002)
AD ADD TS	<i>Mycobacterium</i> sp. MB-3683	GC; SF	1% Methanol	1	24.7% of AD 45.1% of ADD 37.6% of TS	(Borrego et al. 2000)
AD	<i>Mycobacterium</i> sp. MB-3683	Resting cells, SF, 200 rpm, 30 °C	0.1% Tween 80	1	38.1% of AD	(Borrego et al. 2004)
AD ADD	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	GC, SF, 37 °C	Tyloxapol and Tween 80	1	NA	(Nesbitt et al. 2010)
Pregnenolone	<i>Bacillus megaterium</i> recombinant producing bovine CYP11A1	GC, SF, 150 rpm, 30 °C	Hydroxypropyl-β-cyclodextrin and <i>Quillaja</i> saponin	0.116	82% of pregnenolone	(Gerber et al. 2015)

^aGC growing cells, SF shaking flask, 1 addition of nucleus degradation inhibitors or 9α-hydroxylase inhibitors^b(-): No cholesterol solubilizing agent/additive was used or unavailable data^cNA not available data

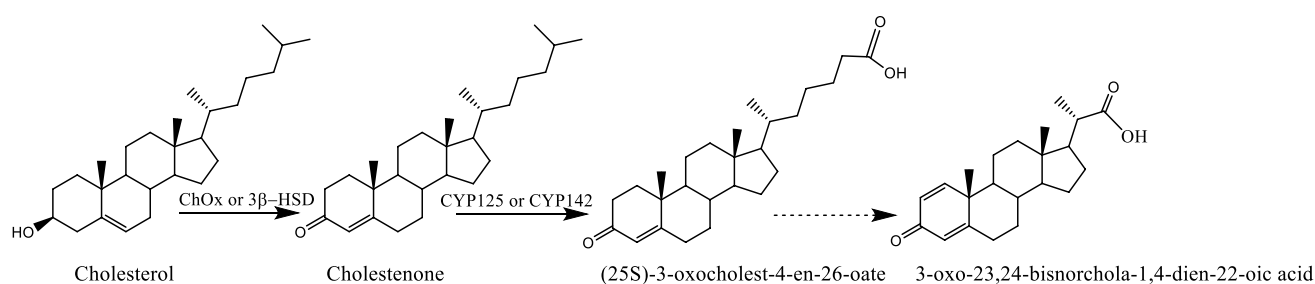


Fig. 3 Schematic representation of cholesterol transformation leading to the intermediate 3-oxo-23,24-bisnorcholesta-1,4-dien-22-oic acid in *Actinobacteria*. Arrow with dashed line represents multiple enzymatic steps

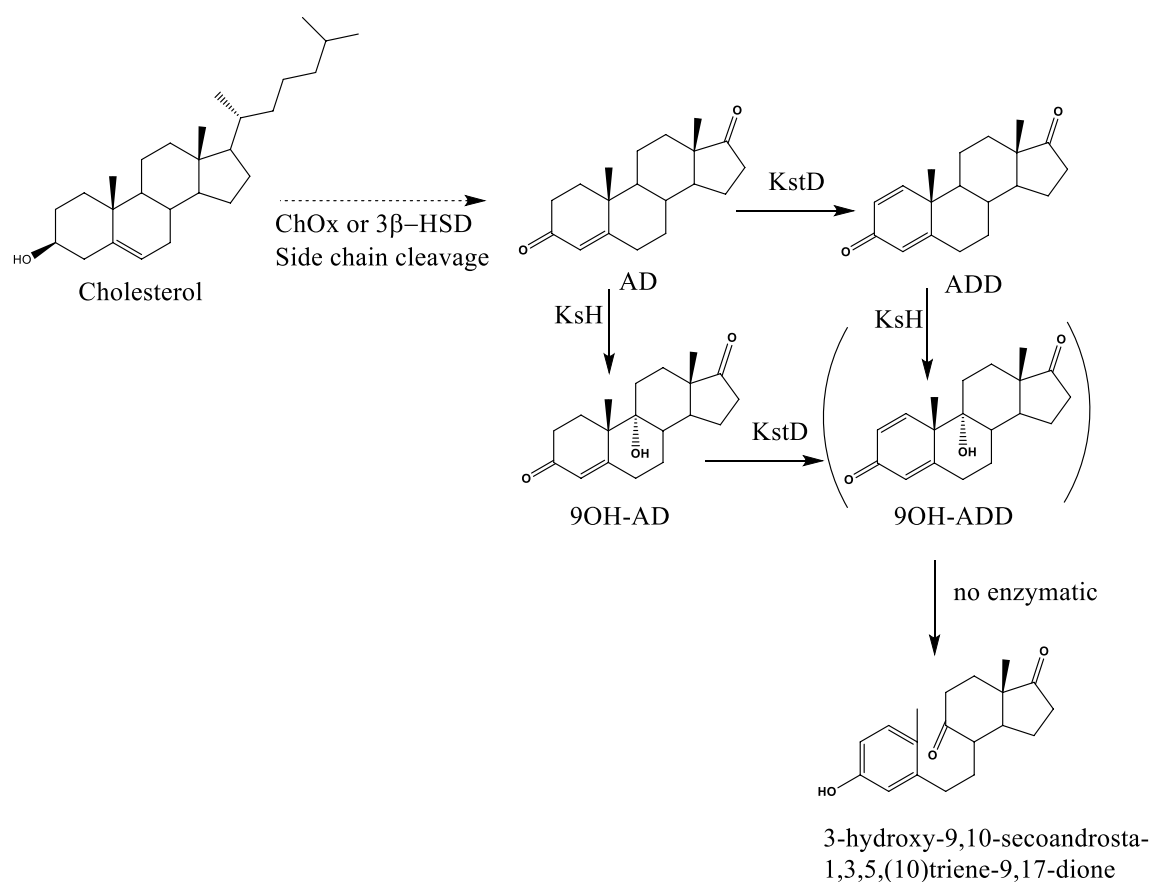


Fig. 4 Schematic representation of steroid nucleus oxidation by *Actinobacteria*. Arrow with dashed line represents multiple enzymatic steps. Unstable products are indicated between brackets

related pathway compounds from natural sterols. In this sense, the identification of genes involved in cholesterol catabolism, including the 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase genes, and the construction of genetically modified microorganisms with genes inactivated functionally or wholly or partially deleted have been patented (Van Der Geize et al. 2003, 2008; Nunn et al. 2009; García López et al. 2015).

The production of ADD by microbial transformation may be limited by the toxicity of this compound at concentration

above 1.0 g/L in the extracellular medium (Molchanova et al. 2007). It is known that ADD inhibits microbial growth and respiration, it might contribute to cell death and lysis and it suppresses the sterol transforming ability of mycobacteria (Smith et al. 1993; Donova 2007; Malaviya and Gomes 2008). To overcome this limitation, the biotransformation can be performed with a resin adsorbing 3-ketosteroids, which exclude the contact of ADD with microorganism cells. A macroporous styrene-divinylbenzene copolymer,

and modified copolymers of ethylstyrene and divinylbenzene were used as such sorbent for the microbial production of ADD (Molchanova et al. 2007). Another approach to overcome the toxicity problem is the construction of mycobacteria strains that tolerate the toxic concentrations of ADD (Perez et al. 2003).

On the other hand, the production of testosterone (TS) from cholesterol is another interesting biocatalytic process that has been investigated. Kumar et al. (2001) performed a single-step cholesterol transformation into TS by *Lactobacillus bulgaricus* in an aerated fermenter controlled by glucose supplementation leading to the accumulation of TS (Kumar et al. 2001).

AD and ADD production from cholesterol is unusual amongst fungal biocatalysts. Sallam et al. (2005) reported the fungal transformation of cholesterol to AD and ADD by *Fusarium solani* (Sallam et al. 2005). The steroid C1/C2 dehydrogenases production by this fungus is an exception because these enzymes are not so prevalent in fungi (Nassiri-Koopaei and Faramarzi 2015). The steroid modifications by fungal strains were suggested to represent detoxification of xenobiotics since these compounds cannot be completely degraded by eukaryotic microorganisms (Cresnar and Zakelj-Mavric 2009).

Hydroxylations

The hydroxylation of inactivated carbons is one of the most difficult steps in classical synthetic organic chemistry, and biocatalysis was established to be the most efficient way to solve it performing regio- and stereospecific hydroxylations (Donova and Egorova 2012). Hydroxylated derivatives have higher polarity than their steroid non-hydroxylated analogs, which affects their toxicity, translocation through the cell membrane and influencing their biological activity (Szaleniec et al. 2018). There are three distinct enzyme classes responsible for aerobic and anaerobic hydroxylation of steroids in bacteria: cytochrome P450, Rieske-type monooxygenase-3-ketosteroid-9 α -hydroxylase (EC 1.14.15.30), and molybdenum-containing steroid C25 dehydrogenases. An exhaustive analysis and description of the reactivity, mechanistic hypotheses, regioselectivity and potential application of these enzymes was recently published (Szaleniec et al. 2018).

The main metabolites obtained from cholesterol hydroxylation reported in the last two decades are 25-hydroxycholesterol, 24(S)-hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol and its oxidized derivative 7-oxocholesterol (Figs. 1, 5; Table 3). 25-hydroxycholesterol is a valuable biologically active molecule known to perform a complex regulatory function in the immunological system, possessing a significant antiviral activity and it was recently investigated for its potential use as anti-zika virus agent (Tricarico et al. 2018). The

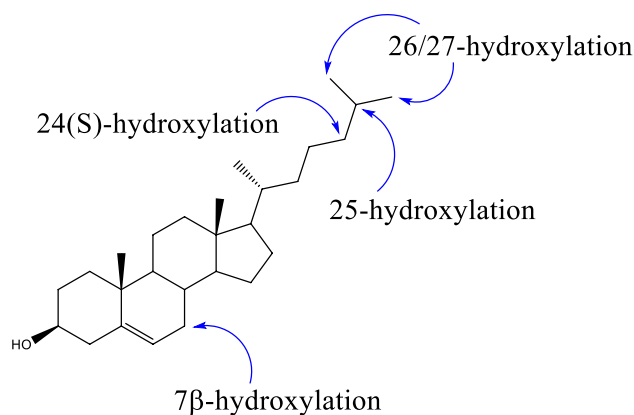


Fig. 5 Sites of cholesterol hydroxylation by microbial transformation

production of 25-hydroxycholesterol by traditional organic synthesis is complex, which limits the research on its potential medical applications (Rugor et al. 2017). This is due to time-consuming and labor-intensive multi-step protocols that involve expensive starting materials and lead to low product yields (6–25%) (Rugor et al. 2017). Biocatalysis is an alternative to the multi-step chemical synthesis of this compound. An approach to obtain 25-hydroxycholesterol was the use of purified molybdenum-containing steroid C25 dehydrogenase (S25DH) from *Sterolibacterium denitrificans* strain Chol-1S carrying out the biotransformation in a fed-batch reactor (Rugor et al. 2017). Another recent result characterized a bacterial P450 monooxygenase, identified as CYP109E1 (EC 1.14.14.1), capable of oxidizing the C24 and C25 positions in the cholesterol side chain (Putkaradze et al. 2018). This hydroxylase from *Bacillus megaterium* DSM319 was overexpressing in a xylose-inducible *B. megaterium* system.

Cholesterol transformation by cytochrome P450s (CYP) enzymes is an attractive way to produce valuable oxysterols. However, only few bacterial P450s have been identified of being capable of performing cholesterol hydroxylations. The terminal methyl groups of the cholesterol side chain C26/C27 can be hydroxylated by 26-hydroxylases identified as CYP125 (EC 1.14.15.29) and CYP142 (EC 1.14.15.28) family enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. smegmatis* and *Rhodococcus jostii* RHA1 (Fig. 1) (Capyk et al. 2009; McLean et al. 2009; Rosloniec et al. 2009; Szaleniec et al. 2018).

The production of steroid 11 α -hydroxylated by biotransformation with recombinant bacteria has been recently patented. In this invention, recombinant bacteria were constructed, such as *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 and *Corynebacterium glutamicum* R31, carrying a plasmid comprising a synthetic operon which contains the necessary genes that encodes the enzymes involved in the 11 α -hydroxylase activity (Felpeto-Santero et al. 2018).

Table 3 Cholesterol hydroxylation

Product	Microorganism	Biocatalyst	Bioreformation conditions ^a	Cholesterol solubilizing agent ^b	Initial cholesterol concentration (g/L)	Maximal product yield ^c	References
7 β -Hydroxycholesterol	<i>Cladiosporium</i> sp. IS547	Whole-cell	GC, SF, 180 rpm, 28–30 °C	0.2% Tween 80	10	NA	(Pang et al. 2016)
7 β -Hydroxycholesterol	<i>Burkholderia cepacia</i> SE-1	Whole-cell/cholesterol hydroxylase purified	Resting cells, SF, 220 rpm, 30 °C	–	1	42.6% of 7 β -Hydroxycholesterol 10.6% of 7-Oxo-cholesterol	(Xiangdong et al. 2016)
25-hydroxycholesterol	<i>Sterolibacterium denitrificans</i> Chol-1S	Purified enzyme steroid C25 dehydrogenase	Anaerobic reactor, 25 °C	8% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and 1.25–3.75% 2-methoxyethanol	0.34	67% of 25-hydroxycholesterol	(Rugor et al. 2017)
24(S)-hydroxycholesterol	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 319	Whole-cell of <i>B. megaterium</i> overexpressing hydroxylase CYP109E1 or <i>E. coli</i> expressing CYP109E1	GC	0.2% <i>Quillaja</i> saponin or 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin	0.077	<i>B. megaterium</i> : 17.6% of products <i>E. coli</i> : 57.9% of products	(Putkaradze et al. 2018)
7 β -Hydroxycholesterol	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Whole-cell	GC; SF, 150 rpm, 28 °C	0.1% Tween 80	1	1.0% of 7 β -Hydroxycholesterol 5.6% of 5,6-epoxycholestan-3-ol	(Giorgi et al. 2019)
5,6-epoxycholestan-3-ol	<i>Mucor circinelloides</i> VGH4						

^aGC growing cells, SF shaking flask, I addition of nucleus degradation inhibitors or 9 α -hydroxylase inhibitors^b(–): No cholesterol solubilizing agent/additive was used or unavailable data^cNA not available data

These enzymes are the cytochrome P450 CYP509C12 and its corresponding NADPH-dependent cytochrome reductase (RoCPR1) from *Rhizopus oryzae*. By the method described in the invention, 11 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione (11 α OH-AD) and 11 α -hydroxy-1,4-androstadiene-3,17-dione (11 α OH-ADD) can be produced in a single fermentation processes from natural sterols, such as cholesterol or phytosterols (Fig. 6) (Felpeto-Santero et al. 2018).

On the other hand, fungal cytochrome P450 hydroxylases are mainly inducible by exogenous steroid, they are responsible for detoxification and are often localized on the endoplasmic reticulum membrane (Stytsenko et al. 2007; Donova and Egorova 2012). The steroid transforming-enzymes in fungi have been previously reviewed, hydroxylations being the most widespread type of steroid conversion carried out by fungi (Kristan and Lanisnik 2012; Nassiri-Koopaei and Faramarzi 2015). The 7 β -hydroxylation of cholesterol was performed by whole-cell biocatalysis using *Trichoderma koningiopsis* isolated from wool scouring wastewater samples (Giorgi et al. 2019). The product obtained is the 7 β -hydroxycholesterol. This product and its oxidized form, 7-oxocholesterol (Fig. 1), have demonstrated cytotoxic effects on normal and tumor cells (Carvalho et al. 2010; Olkkonen et al. 2012; Nury et al. 2013). In the last two decades, novel physiological activities of these compounds have emerged, bringing up the idea that these oxysterols or their synthetic analogues could offer therapeutic benefits (Olkkonen et al. 2012).

Hydrogenation and esterification

The hydrogenation and esterification of cholesterol have been little studied, possibly because the applications and the products obtained through these biotransformations are

less attractive for pharmaceutical synthetic purposes in comparison with oxidation reactions described above.

Hydrogenation at the C4-C5 double bond of cholesterol to obtain coprostanol was performed by various strains of *Lactobacillus* sp. (Lye et al. 2010). This was studied to investigate the possible mechanism of reduction of cholesterol serum level by probiotics.

A cholesterol esterase (EC. 3.1.1.13) from *Trichoderma* sp. AS59 is produced extracellularly (Morinaga et al. 2011). It was characterized and employed to synthesize cholesterol esters from cholesterol and free fatty acids of medium- and long-chain. The special interest to investigate this is based on the discovery that both plant sterols/stanols and stearic acid have cholesterol-lowering properties, which is significantly enhanced when they are esterified. Thus, the enzyme could be applied as biocatalyst to produce useful plant sterol esters for the food industry.

Approaches to improve the bioavailability of cholesterol

The major limitation on microbial transformation of cholesterol is due to its low solubility in aqueous media. The conversion yields can be improved by adding surface active agents to the transformation media, as Tween 80 or Triton X-100, and other sterol-solubilizing agents like cyclodextrins or organic solvent like methanol, acetone, isopropanol or 2-methoxyethanol. The solubilizing agents used to improve cholesterol solubility are presented in Tables 1, 2 and 3.

Surfactants have some drawbacks when they are used in a transformation process, as they may cause serious foaming problems during aerobic fermentation or can be toxic to some microorganisms even at a low concentrations (Wang et al. 2002). The conversion of cholesterol to AD and ADD

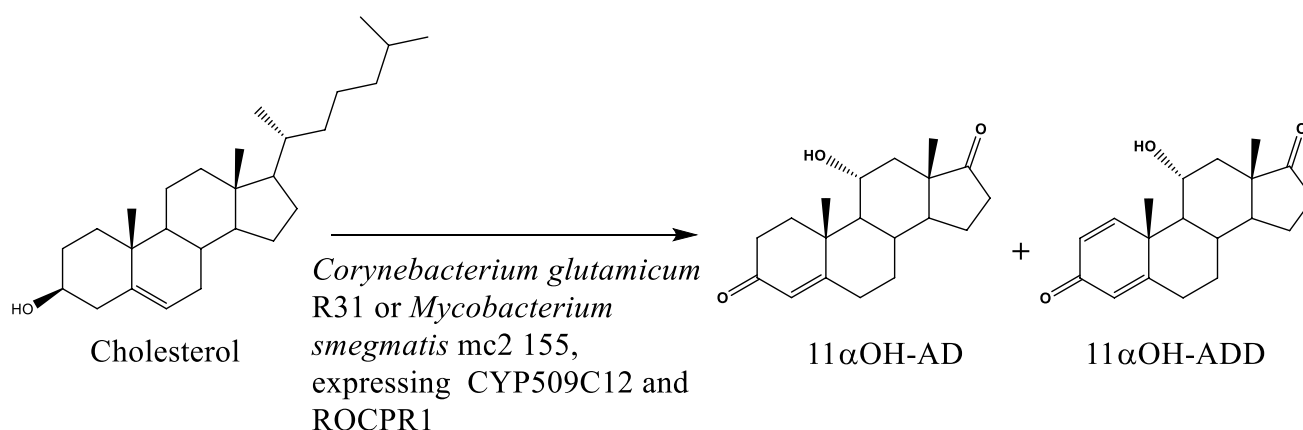


Fig. 6 One step production of 11 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione (11 α OH-AD) and 11 α -hydroxy-1,4-androstadiene-3,17-dione (11 α OH-ADD) from cholesterol by mutant strains *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 or *Corynebacterium glutamicum* R31 (Felpeto-Santero et al. 2018)

carried out by whole-cell using lecithin for enhanced biotransformation was reported, and showed that lecithin did not cause any significant foaming problem (Wang et al. 2002). Biotransformation using lecithin improved both the productivity and product yield. The biotransformation with lecithin led to a maximum productivity of 0.127 g/L/day and maximum product yield of 59% (w/w), both higher than the productivity of 0.084 g/L/day and the product yield of 38% (w/w) obtained using Tween 80 as surfactant (Wang et al. 2002). Compared with Tween 80, lecithin was much more efficient in dispersing cholesterol in water by forming micelles with the sterol. Furthermore, the biotransformation with Tween 80 was compromised by its toxic effects on cells. Tween 80 reduced the specific growth cell of *Mycobacterium* sp., whereas lecithin did not show any significant effect on the specific growth rate (Wang et al. 2002).

Another widely used strategy is the addition of cyclodextrins to form a complex with the sterol, improving the cholesterol dispersion. The effect of α -, β - and γ -cyclodextrins was studied, and it was shown that all three cyclodextrins could enhance the rate of bioconversion, with certain differences according to the cavity size (Hesselink et al. 1989). Moreover, it was also found that they interact with the mycobacterial cell surface disorganizing the lipid bilayer of the cell envelope and increasing the cell wall permeability for both steroid and nutrients (Shtratnikova et al. 2017; Fenyvesi et al. 2018).

A combination of different approaches is applied nowadays. Gerber et al. (2015) investigated the cholesterol side chain cleaving dissolving the substrate in an aqueous solution of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and a mixture of surface-active glycosides known as *Quillaja* saponin (Gerber et al. 2015). The addition of these glycosides to the culture with a final concentration of 0.2% drastically increased the cholesterol conversion rate by 250%, demonstrating a new application of these compounds for the permeabilization of bacterial membranes (Gerber et al. 2015). Considering this finding, recent researches have used the mixture for the permeabilization of *B. megaterium* membrane, achieving cholesterol hydroxylation (Putkaradze et al. 2018). Another example is the combination of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and an organic co-solvent 2-methoxyethanol to perform the cholesterol transformation catalyzed by purified C25 dehydrogenase (Rugor et al. 2017).

Conclusions

Valuable key intermediates and pharmaceutically valuable steroids have been produced by cholesterol biotransformation. Overall, most conversions studied include oxidation of the 3 β -alcohol group, $\Delta 5$ – $\Delta 4$ isomerization and hydroxylations, in which most of the enzymes involved have been

described. Furthermore, the side chain degradation of cholesterol has been performed using many bacterial strains, the catalysis of this reaction by fungi being unusual. Over the past two decades several strategies have been applied in order to improve bioconversion, focusing on overcoming the problems of low cholesterol solubility in aqueous media and insufficient substrate availability. In summary, cholesterol is an economically attractive starting material to biotransform, considering the high value of the products that can be obtained. Despite the significant advances in the field of cholesterol biotransformation, greater efforts are necessary to optimize many of the known processes that use cholesterol as a starting material and to improve product yields. Research should continue focusing on find novel biocatalysts and improving the existing biocatalysts to obtain high enzyme activities, and to perform the cholesterol biotransformation with high selectivity and greater productivity.

Acknowledgements The authors thank Prof. Patrick Moyna for critical reading of the manuscript and helpful suggestions. This work was supported by grants from the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Award POS_NAC_2013_1_11432), Comisión Académica de Posgrado (CAP) and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ahire JJ, Bhat AA, Thakare JM et al (2012) Cholesterol assimilation and biotransformation by *Lactobacillus helveticus*. Biotechnol Lett 34:103–107. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0733-2>
- Ahire JJ, Mokashe NU, Chaudhari BL (2014) Cholesterol biotransformation to cholesta-4, 6-dien-3-ol and effect of assimilation on adhesion properties of *Lactobacillus helveticus* CD6. J Microbiol Biotechnol Food Sci 3:398
- Ahmad S, Goswami P (2014) Application of chitosan beads immobilized *Rhodococcus* sp. NCIM 2891 cholesterol oxidase for cholesterol production. Process Biochem 49:2149–2157. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.004>
- Al Jasem Y, Khan M, Taha A, Thiemann T (2014) Preparation of steroidal hormones with an emphasis on transformations of phytosterols and cholesterol -a review. Mediterr J Chem 3:796–830. <https://doi.org/10.13171/mjc.3.2.2014.18.04.15>
- Bhatti HN, Khara RA (2012) Biological transformations of steroidal compounds: a review. Steroids 77:1267–1290. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.07.018>
- Borrego S, Espinosa ME, Martí E, Fonseca M (2000) Conversion of cholesterol to testosterone by *Mycobacterium* sp. MB-3638. Rev CENIC Ciencias Biológicas 31:17–20
- Borrego S, Espinosa ME, Martí E, Fonseca M (2004) Optimization of synthetic culture medium for androstenedione production from cholesterol by *Mycobacterium* sp. MB-3683. Biotechnol Appl 21:21–24

- Brzostek A, Rumijowska-Galewicz A, Dziadek B et al (2013) ChoD and HsdD can be dispensable for cholesterol degradation in mycobacteria. *J Steroid Biochem Mol Biol* 134:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2012.09.028>
- Capyk JK, Kalscheuer R, Stewart GR et al (2009) Mycobacterial cytochrome P450 125 (Cyp125) catalyzes the terminal hydroxylation of C27 steroids. *J Biol Chem* 284:35534–35542. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.072132>
- Carballeira JD, Quezada MA, Hoyos P et al (2009) Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. *Biotechnol Adv* 27:686–714. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.001>
- Carvalho JFS, Silva MMC, Moreira JN et al (2010) Sterols as anticancer agents: synthesis of ring-B oxygenated steroids, cytotoxic profile, and comprehensive SAR analysis. *J Med Chem* 53:7632–7638. <https://doi.org/10.1021/jm1007769>
- Chaudhari PN, Chaudhari BL, Chincholkar SB (2010) Cholesterol biotransformation to androsta-1,4-diene-3,17-dione by growing cells of *Chryseobacterium gleum*. *Biotechnol Lett* 32:695–699. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0206-z>
- Cresnar B, Zakelj-Mavric M (2009) Aspects of the steroid response in fungi. *Chem Biol Interact* 178:303–309. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.11.002>
- De Las Heras LF, Perera J, Llorens JMN (2014) Cholesterol to cholesterol oxidation by ChoG, the main extracellular cholesterol oxidase of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *J Steroid Biochem Mol Biol* 139:33–44. <https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2013.10.001>
- Dogra N, Qazi GN (2001) Steroid biotransformation by different strains of *Micrococcus* sp. *Folia Microbiol* 46:17–20. <https://doi.org/10.1007/BF02825877>
- Donova MV (2007) Transformation of steroids by actinobacteria: a review. *Appl Biochem Microbiol* 43:5–18. <https://doi.org/10.1134/S0003683807010012>
- Donova MV, Egorova OV (2012) Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:1423–1447. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4078-0>
- Doukyu N (2009) Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:825–837. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2059-8>
- Doukyu N, Aono R (2001) Cloning, sequence analysis and expression of a gene encoding an organic solvent- and detergent-tolerant cholesterol oxidase of *Burkholderia cepacia* strain ST-200. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:146–152. <https://doi.org/10.1007/s00253-0100753>
- Doukyu N, Shibata K, Ogino H, Sagermann M (2008) Purification and characterization of *Chromobacterium* sp. DS-1 cholesterol oxidase with thermal, organic solvent, and detergent tolerance. *Appl Biochem Biotechnol* 80:59–70. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1526-y>
- Felpeto-Santero C, Galán-Sicilia B, García-López JL (2018) Patent ES2648614B1
- Fenyvesi É, Puskás I, Sente L (2018) Applications of steroid drugs entrapped in cyclodextrins. *Environ Chem Lett*. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0807-7>
- Fernandes P, Cruz A, Angelova B et al (2003) Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb Technol* 32:688–705. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00029-2)
- Fukuyama M, Miyake Y (1979) Purification and some commune properties of cholesterol oxidase from *Schizophyllum commune* with covalently bound flavin. *J Biochem* 85:1183–1193
- García JL, Uhía I, Galán B (2012) Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria. *Microb Biotechnol* 5:679–699. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00331.x>
- García López L, Uhía-Castro I, Galán-Sicilia B (2015) WIPO Patent WO2015128534A1
- Gerber A, Kleser M, Biedendieck R et al (2015) Functionalized PHB granules provide the basis for the efficient side-chain cleavage of cholesterol and analogs in recombinant *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Fact* 14:1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0300-y>
- Ghosh S, Ahmad R, Gautam VK, Khare SK (2018) Cholesterol-oxidase-magnetic nanobiocojugates for the production of 4-cholesten-3-one and 4-cholesten-3, 7-dione. *Bioresour Technol* 254:91–96. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.030>
- Giorgi V, Chaves M, Menéndez P, García Carnelli C (2019) Bioprospecting of whole-cell biocatalysts for cholesterol biotransformation. *World J Microbiol Biotechnol* 35:12. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2586-5>
- Gottschaldt B, Grosse HH, Horhold C, et al (1993) Conversion of sterol(s) to 1,4-androstadiene-3,17-dione—by fermentation with *Mycobacterium vaccae* using carbon- and nitrogen-limited inoculum. Patent DD 301740-A7
- Hesslink PGM, van Vliet S, de Vries H, Witholt B (1989) Optimization of steroid side chain cleavage by *Mycobacterium* sp. in the presence of cyclodextrins. *Enzyme Microb Technol* 11:398–404. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90133-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(89)90133-6)
- Hisao I, Taku H (1995) Anti-keratinization effect of cholestanones. Japanese patent 95(109):216
- Hogg JA (1992) Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation. *Steroids* 57:593–616. [https://doi.org/10.1016/0039-128X\(92\)90013-Y](https://doi.org/10.1016/0039-128X(92)90013-Y)
- Horvath J, Kramli A (1947) Microbiological oxidation of cholesterol with *Azotobacter*. *Nature* 160:639. <https://doi.org/10.1038/160639b0>
- Hunter AC, Coyle E, Morse F et al (2009) Transformation of 5-ene steroids by the fungus *Aspergillus tamarii* KITA: mixed molecular fate in lactonization and hydroxylation pathways with identification of a putative 3 β -hydroxy-steroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase pathway. *Biochim Biophys Acta* 1791:110–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.12.005>
- Kashima M, Kinoshita T, Inaoka Y (1995) Cholestanones for treatment of liver diseases. Japanese patent 95: 69,898.69
- Kim KP, Rhee CH, Park HD (2002) Degradation of cholesterol by *Bacillus subtilis* SFF34 isolated from Korean traditional fermented flatfish. *Lett Appl Microbiol* 35:468–472. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01219.x>
- Kreit J (2017) Microbial catabolism of sterols: focus on the enzymes that transform the sterol 3 β -hydroxy-5-en into 3-keto-4-en. *FEMS Microbiol Lett* 364:1–9. <https://doi.org/10.1093/femsl/fnx007>
- Kreit J, Sampson NS (2009) Cholesterol oxidase: physiological functions. *FEBS J* 276:6844–6856. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07378.x>
- Kristan K, Lanisnik T (2012) Steroid-transforming enzymes in fungi. *J Steroid Biochem Mol Biol* 129:79–91. <https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2011.08.012>
- Kumar R, Dahiya JS, Singh D, Nigam P (2001) Biotransformation of cholesterol using *Lactobacillus bulgaricus* in a glucose-controlled bioreactor. *Bioresour Technol* 78:209–211. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00174-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00174-7)
- Liu Y, Chen G, Ge F et al (2011) Efficient biotransformation of cholesterol to androsta-1,4-diene-3,17-dione by a newly isolated actinomycete *Gordonia neofelifaecis*. *World J Microbiol Biotechnol* 27:759–765. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0513-5>
- Lye H-S, Rusul G, Liong M-T (2010) Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *J Dairy Sci* 93:1383–1392. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(85\)90082-3](https://doi.org/10.1016/0165-3806(85)90082-3)
- MacLachlan J, Wotherspoon ATL, Ansell RO, Brooks CJW (2000) Cholesterol oxidase: sources, physical properties and

- analytical applications. *J Steroid Biochem* 72:169–195. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(00\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00044-3)
- Mahato SB, Garai S (1997) Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids* 62:332–345. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(96\)00251-6](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(96)00251-6)
- Malaviya A, Gomes J (2008) Androstenedione production by biotransformation of phytosterols. *Bioresour Technol* 99:6725–6737. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.039>
- Marques MPC, Fernandes P, Cabral JMS (2012) Continuous steroid biotransformations in microchannel reactors. *N Biotechnol* 29:227–234. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.10.001>
- McLean KJ, Lafite P, Levy C et al (2009) The structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP125: molecular basis for cholesterol binding in a P450 needed for host infection. *J Biol Chem* 284:35524–35533. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.032706>
- Molchanova M, Andryushina V, Savinova T et al (2007) Preparation of Androsta-1,4-diene-3,17-dione from sterols using *Mycobacterium neoaurum* VKPM Ac-1656 Strain. *Russ J Org Chem* 33:379–384. <https://doi.org/10.1134/S1068162007030132>
- Morinaga N, Maeda A, Mizuno T et al (2011) Synthesis of fatty acid sterol esters using cholesterol esterase from *Trichoderma* sp. AS59. *Enzyme Microb Technol* 48:498–504. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.02.007>
- Naghbi F, Yazdi MT, Sahebgharani M, Dalooi MRN (2002) Microbial transformation of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis*. *J Sci Islam Repub Iran* 13:103–106
- Nassiri-Koopaei N, Faramarzi MA (2015) Recent developments in the fungal transformation of steroids. *Biocatal Biotransform* 33:1–28. <https://doi.org/10.3109/10242422.2015.1022533>
- Nesbitt NM, Yang X, Fontán P et al (2010) A thiolase of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence and production of androstenedione and androstadienedione from cholesterol. *Infect Immun* 78:275–282. <https://doi.org/10.1128/IAI.00893-09>
- Nunn D, Pujol C, Chatman K (2009) WIPO Patent WO2009064924A1
- Nury T, Samadi M, Zarrouk A et al (2013) Improved synthesis and in vitro evaluation of the cytotoxic profile of oxysterols oxidized at C4 (4 α - and 4 β -hydroxycholesterol) and C7 (7-ketocholesterol, 7 α - and 7 β -hydroxycholesterol) on cells of the central nervous system. *Eur J Med Chem* 70:558–567. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.028>
- Olkonen VM, Béaslas O, Nissilä E (2012) Oxysterols and their cellular effectors. *Biomolecules* 2:76–103. <https://doi.org/10.3390/biom2010076>
- Pang C, Cao Y, Zhu X (2016) Biotransformation of cholesterol and 16,17- α -epoxyprogesterone by novel *Cladosporium* sp. strain IS547. *J Basic Microbiol* 57:12–20. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600191>
- Perez C, Falero A, Llanes N et al (2003) Resistance to androstanes as an approach for androstadienedione yield enhancement in industrial mycobacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:623–626. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0079-4>
- Petrusma M, Van Der Geize R, Dijkhuizen L (2014) 3-Ketosteroid 9 α -hydroxylase enzymes: rieske non-heme monooxygenases essential for bacterial steroid degradation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106:157–172. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0188-2>
- Putkaradze N, Litzenburger M, Hutter MC, Bernhardt R (2018) CYP109E1 from *Bacillus megaterium* acts as 24- and 25-hydroxylase for cholesterol. *ChemBioChem* 20:1–5. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800595>
- Reiss R, Faccio G, Thöny-meyer L, Richter M (2014) Cloning, expression and biochemical characterization of the cholesterol oxidase CgChoA from *Chryseobacterium gleum*. *BMC Biotechnol* 14:1. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-46>
- Rosloniec KZ, Wilbrink MH, Capyk JK et al (2009) Cytochrome P450 125 (CYP125) catalyses C26-hydroxylation to initiate sterol side-chain degradation in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Mol Microbiol* 74:1031–1043. <https://doi.org/10.1111/1/j.1365-2958.2009.06915.x>
- Rugor A, Tataruch M, Staro J et al (2017) Regioselective hydroxylation of cholecalciferol, cholesterol and other sterol derivatives by steroid C25 dehydrogenase. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:1163–1174. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7880-2>
- Sallam LAR, El-Refai AM, El-Minofi HA (2005) Physiological and biochemical improvement of the enzyme side-chain degradation of cholesterol by *Fusarium solani*. *Process Biochem* 40:203–206. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.12.006>
- Shao M, Rao Z, Zhang X et al (2014) Bioconversion of cholesterol to 4-cholesten-3-one by recombinant *Bacillus subtilis* expressing *choM* gene encoding cholesterol oxidase from *Mycobacterium neoaurum* JC-12. *J Chem Technol Biotechnol* 90:1811–1820. <https://doi.org/10.1002/jctb.4491>
- Shtratnikova VY, Schelkunov MI, Fokina VV et al (2016) Genome-wide bioinformatics analysis of steroid metabolism-associated genes in *Nocardioideis simplex* VKM Ac-2033D. *Curr Genet* 62:643–656. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0568-4>
- Shtratnikova VY, Schelkunov MI, Dovbnya DV et al (2017) Effect of methyl- β -cyclodextrin on gene expression in microbial conversion of phytosterol. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:4659–4667. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8288-3>
- Smith M, Zahnley J, Pfeifer D, Goff D (1993) Growth and cholesterol oxidation by *Mycobacterium* species in Tween 80 medium. *Appl Environ Microbiol* 59:1425–1429
- Sripalakit P, Wichai U, Saraphanchotiwitthaya A (2006) Biotransformation of various natural sterols to androstenones by *Mycobacterium* sp. and some steroid-converting microbial strains. *J Mol Catal B* 41:49–54. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.04.007>
- Stytsenko TS, Novak MI, Voishvillo NE et al (2007) A study of steroid hydroxylation activity of *Curvularia lunata* mycelium. *Appl Biochem Microbiol* 43:620–624. <https://doi.org/10.1134/s0003683807060099>
- Suzuki K (1993) Anti-obesity effect of cholest-4-en-3-one, an intestinal catabolite of cholesterol, on mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 39:537–543
- Suzuki K, Shimizu T, Nakata T (1998) The cholesterol metabolite cholest-4-en-3-one and its 3-oxo derivatives suppress body weight gain, body fat accumulation and serum lipid concentration in mice. *Bioorganic Med Chem Lett* 8:2133–2138. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(98\)00362-X](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(98)00362-X)
- Szaleniec M, Wojtkiewicz A, Bernhardt R et al (2018) Bacterial steroid hydroxylases: enzyme classes, their functions and comparison of their catalytic mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:8153–8171. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9239-3>
- Szentirmai A (1990) Microbial side-chain degradation of sterols. *J Ind Microbiol* 6:101–116. <https://doi.org/10.1007/BF01576429>
- Tong W-Y, Dong X (2009) Microbial biotransformation: recent developments on steroid drugs. *Recent Pat Biotechnol* 3:141–153. <https://doi.org/10.2174/187220809788700157>
- Tricarico PM, Caracciolo I, Gratton R, et al (2018) 25-hydroxycholesterol reduces inflammation, viral load and cell death in ZIKV-infected U-87 MG glial cell line. *Inflammopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s10787-018-0517-6>
- Turfitt GE (1945) The microbiological degradation of steroids. *Biochem J* 40:79–81. <https://doi.org/10.1042/bj0370115>
- Van Der Geize R, Van Der Meijden P, Hessels G, Dijkhuizen L (2003) WIPO Patent WO2003070925A2
- Van der Geize R, Yam K, Wilbrink MH et al (2007) A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages.

- Proc Natl Acad Sci USA 104:1947–1952. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605728104>
- Van Der Geize R, Van Der Meijden P, Hessels G, Dijkhuizen L (2008) US Patent 7432075B2
- Van Hamme JD, Bergstrand LH, Mohn WW et al (2016) Delineation of steroid-degrading microorganisms through comparative genomic analysis. *MBio* 7:1–13. <https://doi.org/10.1128/mbio.00166-16>
- Vyas JG, Pawar KS, Jethva JAYK, Shah JH (2012) Tracking the efficiency of cholesterol bioconversion by *Nocardia* sp. MTCC 1534 in presence of some ring cleavage inhibitors by gas chromatography. *Int J Pharma Bio Sci* 3:462–470
- Wang ZF, Huang YL, Rathman JF, Yang S-T (2002) Lecithin-enhanced biotransformation of cholesterol to androsta-1,4-diene-3,17-dione and androsta-4-ene-3,17-dione. *J Chem Technol Biotechnol* 77:1349–1357. <https://doi.org/10.1002/jctb.728>
- Wilbrink MH (2011) Microbial sterol side chain degradation in Actinobacteria. University of Groningen, Groningen
- Wilbrink MH, Petrusma M, Dijkhuizen L, Van der Geize R (2011) FadD19 of *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269, a steroid-coenzyme a ligase essential for degradation of C-24 branched sterol side chains. *Appl Environ Microbiol* 77:4455–4464. <https://doi.org/10.1128/AEM.00380-11>
- Wovcha MG, Biggs CB, Pyke TR (1982) US Patent 4345033
- Xiangdong Z, Cuiping P, Yuting C, Dan F (2016) Biotransformation of cholesterol and 16 α , 17 α -epoxypregnenolone and isolation of hydroxylase in *Burkholderia cepacia* SE-1. *Biomed Res Int* 2016:8. <https://doi.org/10.1155/2016/5727631>
- Yam KC, Van Der Geize R, Eltis LD (2010) Catabolism of aromatic compounds and steroids by *Rhodococcus*. In: Alvarez HM (ed) *Biology of Rhodococcus*. Springer, New York, pp 133–170
- Yazdi MT, Malekzadeh F, Khatami H, Kamranpour N (2000) Cholesterol-degrading bacteria: isolation, characterization and bioconversion. *World J Microbiol Biotechnol* 16:103–105. <https://doi.org/10.1023/A:1008920105720>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.