

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Producción de esteroides mediante ingeniería de citocromos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carmen Felpeto Santero

Directores

José Luis García López

Julián Perera González

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

**Producción de esteroides
mediante ingeniería de citocromos**

CARMEN FELPETO SANTERO

DIRECTORES:

DR. JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ

DR. JULIÁN PERERA GONZÁLEZ

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



MADRID, 2016

El trabajo descrito en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Departamento de Biología Medioambiental, del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC) (Madrid, España). La investigación ha sido financiada por el proyecto BIO2012-39695-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

*Si fuera fácil, lo haría cualquiera.
Si fuera tan sencillo, estaría lleno de gente haciéndolo antes que tú.
Y si no pareciese imposible, todo el mundo lo habría hecho ya.*

*Por eso te sientes tan solo.
Porque de aquí en adelante, tu única compañera realmente fiel se llama Soledad.
Porque nadie cree que pueda conseguirse.
Nadie, menos tú y alguno tan loco como tú.*

No te preocupes que los demás volverán, el día que ya no haya nada más que hacer.

*Si acaba bien, para apuntarse el tanto y explicarte el porqué de tu éxito.
Y si acaba mal, para decirte que todo esto ya lo veían venir.*

Por eso tú a lo tuyo, tira millas.

*Que si fuese fácil, lo haría cualquiera.
Si fuera tan sencillo, estaría lleno de gente haciéndolo antes que tú.
Y si no pareciese imposible, todo el mundo lo habría hecho ya*

Risto Mejide

*“En la lucha entre el arroyo y la roca, siempre triunfa el arroyo.
No porque sea más fuerte, sino porque persevera”*

H. Jackson Brown

*“Si estás ausente durante mi lucha,
no esperes estar presente en mi éxito”*

Will Smith

*A mis abuelos,
Angelita, Carmen, Pepe, Remedios y Victoriano*

A mi tío César

A mi hermana y ahijada, Lucía

A mis sobrinos

AGRADECIMIENTOS

La materialización de esta Tesis Doctoral ha dependido en gran medida de las aportaciones de multitud de personas, tanto en lo profesional como en lo personal. Sé que si estos agradecimientos fueran estrictos y le dedicase a cada una de esas personas las palabras que se merece, se alargarían tanto como la propia Tesis, por lo que me disculpo por ello de antemano

Primeramente me gustaría agradecerle a mi director, el Dr. D. José Luis García, por aceptarme para llevar a cabo esta empresa, pero sobre todo por dejarme aprender a trabajar autónomamente y a pensar por mí misma. Jose, lo conseguimos solamente porque nunca supimos que era imposible. Gracias por abrir mi mente a universos, ¡multiversos!, de posibilidades.

De igual manera me gustaría agradecer a mi otro director, el Dr. D. Julián Perera, por darme siempre un punto de vista diferente y transmitirme su buen hacer en lo académico y en lo profesional. Gracias Nano, por ser capaz de ver siempre a la persona que hay detrás de las manos que realizan los experimentos y transmitirme ánimo y optimismo

*La realización de esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin la colaboración de los excelentes profesionales a los que he recurrido cuando se requerían conocimientos o tecnologías más allá de los que disponíamos en el grupo de Biotecnología Medioambiental. Quisiera agradecer al servicio de Química de Proteínas por asistirme en el análisis de muestras, especialmente a Dña. Emilia Aporta, por recibirme siempre con la mejor de las sonrisas, por su dedicación y su infinita paciencia. Me gustaría agradecer al grupo de R.M.N y Reconocimiento Molecular, especialmente al Dr. D. Fco. Javier Cañada y a la Dra. Dña. Carmen Fernández por su ayuda en la identificación de compuestos. Al Dr. D. Fco. Javier Medrano por su colaboración en la predicción de la estructura tridimensional de proteínas. Igualmente quisiera agradecer al grupo de Genética Molecular de *Aspergillus*, particularmente al Dr. D. Eduardo A. Espeso por su inestimable ayuda en el manejo de hongos, por atenderme siempre diligentemente y dedicarme más tiempo del que disponía; también me gustaría agradecer a la Dra. Dña. María Villarino por instruirme con dedicación en las técnicas que he requerido.*

También es preciso mostrar mi gratitud a los grupos colaboradores del proyecto en el marco del cual se ha desarrollado esta Tesis Doctoral: al grupo de Genética Molecular liderado por el Dr. D. Julián Perera, al grupo de Bioquímica y Biología Molecular liderado por el Dr. D. José María Luengo y al grupo Biotecnología de Gadea Pharma, actualmente Bioraw, liderado por el Dr. D. José Luis Barredo.

Querría también agradecer a todos los profesionales que forman y han formado parte del grupo, por sus distintas aportaciones; pero especialmente a aquellos que han colaborado de manera directa conmigo.

Me gustaría mostrar mi más absoluta gratitud a mi familia y amigos, por su afecto y apoyo.

Índice

Abreviaturas

I. SUMMARY	1
II. RESUMEN	7
III. INTRODUCCIÓN	13
<u>1. LOS COMPUESTOS ESTEROIDEOS: ESTEROIDES Y ESTEROLES</u>	15
<u>2. PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE COMPUESTOS ESTEROIDEOS</u>	17
2.1. INTERÉS FARMACOLÓGICO Y BIOTECNOLÓGICO DE LOS COMPUESTOS ESTEROIDEOS	17
2.2. PRODUCCIÓN DE LOS COMPUESTOS ESTEROIDEOS. METODOLOGÍA ACTUAL	18
2.3. APLICACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA BLANCA A LA PRODUCCIÓN DE LOS COMPUESTOS ESTEROIDEOS. LA BIOTRANSFORMACIÓN COMO METODOLOGÍA ALTERNATIVA	19
2.3.1. Los citocromos P450	20
2.3.1.1. RELACIÓN CON LOS ESTEROIDES: IMPORTANCIA BIOLÓGICA E INDUSTRIAL	21
2.3.1.2. CARACTERÍSTICAS, PROPIEDADES Y FUNCIONES	25
2.3.1.3. SISTEMAS REDOX	26
2.4. BIOTRANSFORMACIÓN FÚNGICA DE COMPUESTOS ESTEROIDEOS	27
2.5. BIOTRANSFORMACIÓN BACTERIANA DE COMPUESTOS ESTEROIDEOS	33
2.5.1. Las actinobacterias como chasis para biotransformaciones esteroideas	35
2.5.2. Uso de bacterias recombinantes en la producción de compuestos esteroideos y expresión de citocromos	38
IV. OBJETIVOS	41
V. MATERIALES y MÉTODOS	45
<u>1. MICROORGANISMOS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS</u>	47
<u>2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO</u>	49
2.1. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO EMPLEADOS PARA <i>E. coli</i>	49
2.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO EMPLEADOS PARA <i>M. smegmatis</i>	50
2.3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO EMPLEADOS PARA <i>C. glutamicum</i>	50
2.4. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO EMPLEADOS PARA <i>C. lunatus</i> Y <i>R. oryzae</i>	50
2.5. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS Y FÚNGICAS	51
<u>3. EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA GENÉTICA</u>	51
3.1. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE <i>E. coli</i>	51
3.2. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE <i>M. smegmatis</i>	51
3.2.1. Preparación de células electrocompetentes de <i>M. smegmatis</i>	51
3.2.2. Transformación de células de <i>M. smegmatis</i> mediante electroporación	52

3.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE <i>C. glutamicum</i>	52
3.3.1. Preparación de células electrocompetentes de <i>C. glutamicum</i>	52
3.2.2. Transformación de células de <i>C. glutamicum</i> mediante electroporación	52
<u>4. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA</u>	53
4.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	53
4.2. EXTRACCIÓN DNA CROMOSÓMICO DE <i>M. smegmatis</i>	53
4.3. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO EN <i>E.coli</i> Y <i>M. smegmatis</i>	54
4.4. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN EN CADENA CON DNA POLIMERASA TERMORRESISTENTE (PCR)	54
4.4.1. PCR de colonia en <i>E. coli</i> , <i>M. smegmatis</i> y <i>C. glutamicum</i>	54
4.5. SECUENCIACIÓN DE DNA	55
<u>5. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE RNA</u>	55
5.1. EXTRACCIÓN DE RNA DE <i>C. lunatus</i>	55
5.2. RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDA DE PCR (RT-PCR)	55
5.3. PCR SEMICUANTITATIVA (sqRT-PCR)	55
5.4. PCR CUANTITATIVA (qRT-PCR)	56
<u>6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS</u>	56
6.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS (PAGE-SDS)	56
6.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE <i>M. smegmatis</i>	57
6.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE <i>C. glutamicum</i>	57
6.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE <i>E.coli</i>	57
<u>7. ENSAYOS <i>IN VIVO</i> DE BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES</u>	57
7.1 SOLUBILIZACIÓN DE ESTEROIDES	57
7.2 ENSAYOS DE BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES POR <i>C. glutamicum</i>	58
7.2.1 Ensayos de biotransformación de esteroides con células en crecimiento de <i>C. glutamicum</i>	58
7.2.2 Ensayos de biotransformación de esteroides con células en reposo (<i>resting cells</i>) de <i>C. glutamicum</i>	58
7.3 ENSAYOS DE BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES POR <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	59
7.3.1 Ensayos de biotransformación de esteroides con células en crecimiento de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	59
7.3.2 Ensayos de biotransformación de esteroides con células en reposo (<i>resting cells</i>) de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	59
7.3.3 Ensayos de biotransformación de esteroides con células en crecimiento a escala piloto (biorreactor 2l) de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	59
7.4 ENSAYOS DE BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES POR <i>C. lunatus</i> Y <i>R. oryzae</i>	60
<u>8. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS</u>	60
8.1 EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES EMPLEANDO ROTURA MECÁNICA DE LA CÉLULA	60
8.2 EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES DEL MEDIO DE CULTIVO	60
8.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)	61

8.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ACOPLADA A DETECTOR DE FOTODIODOS EN SERIE (HPLC-DAD) Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS)	61
8.4.1 Identificación y cuantificación de progesterona (PROG) y 11 α OH-progesterona (11 α OH-Prog)	61
8.4.2 Identificación y cuantificación de androstenediona (AD) y 11 α OH-androstenediona (11 α OH-AD)	62
8.4.3 Identificación y cuantificación de androstenediendiona (ADD) y 11 α OH-androstenediendiona (11 α OH-ADD)	63
8.4.4 Identificación y cuantificación de testosterona (TEST) y 11 α OH-testosterona (11 α OH-TEST)	63
8.4.5 Identificación y cuantificación de deoxicosticosterona (DOC) y 11 α OH-deoxicorticosterona (11 α OH-DOC)	64
8.4.6 Identificación y cuantificación de deshidroepiandrosterona (DHEA) y 11 α OH-deshidroepiandrosterona (11 α OH-DHEA)	65
8.4.7 Identificación y cuantificación de colesterol (CHO), androstenediona (AD), 11 α OH-androstenediona (11 α OH-AD), 11 β OH-androstenediona (11 β OH-AD), androstenediendiona (ADD), 11 α OH-androstenediendiona (11 α OH-ADD), 11 β OH-androstenediendiona (11 β OH-AD), 22-hidroxi-23,24-bisnorchol-4-en-3-ona (4-HBC) y 22-hidroxi-23,24-bisnorchol-1,4-dien-3-ona (1,4-HBC)	66
8.4.8 Identificación y cuantificación de fitosteroles (FITO), androstenediona (AD), 11 α OH-androstenediona (11 α OH-AD), 11 β OH-androstenediona (11 β OH-AD), androstenediendiona (ADD), 11 α OH-androstenediendiona (11 α OH-ADD), 11 β OH-androstenediendiona (11 β OH-AD), 22-hidroxi-23,24-bisnorchol-4-en-3-ona (4-HBC) y 22-hidroxi-23,24-bisnorchol-1,4-dien-3-ona (1,4-HBC)	67
8.4.9 Identificación y cuantificación de deoxicosticosterona (DOC), corticosterona (CORT) (11 β OH-deoxicorticosterona), cortexolona (RSS), hidrocortisona (HC) (11 β OH-RSS), androstenediona (AD), 11 β -hidroxiandrostenediona (11 β OH-AD).	69
<u>9. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS</u>	69
<u>VI. RESULTADOS</u>	71
<u>1. PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11α-HIDROXILADOS</u>	73
1.1 UTILIZACIÓN DE <i>Rhizopus oryzae</i> PARA LA PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11 α -HIDROXILADOS	73
1.2. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA 11 α -HIDROXILASA DE <i>R. oryzae</i>	74
1.2.1. Diseño y construcción del operon sintético FUN	74
1.2.2. Producción de esteroides 11 α -hidroxilados en <i>Mycobacterium smegmatis</i>	75
1.2.2.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN DEL OPERÓN FUN EN MICOBACTERIAS	75
1.2.2.2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DEL OPERÓN FUN EN MICOBACTERIAS	75
1.2.2.3. PRODUCCIÓN DE SINTONAS 11 α -HIDROXILADAS A PARTIR DE MATERIAS PRIMAS DE BAJO COSTE	76
1.2.2.3.1. Producción de 11 α OH-ADD en <i>M. smegmatis</i> Δ 6039	77
1.2.2.3.2. Producción de 11 α OH-AD en <i>M. smegmatis</i> Δ 6039 Δ 5941	89
1.2.2.4. PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11 α -HIDROXILADOS DE INTERÉS FARMACOLÓGICO E INDUSTRIAL	101

1.2.3. Producción de esteroides 11α-hidroxilados en <i>Corynebacterium glutamicum</i>	103
1.2.3.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN DEL OPERÓN FUN EN CORINEBACTERIAS	103
1.2.3.2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DEL OPERÓN FUN EN CORINEBACTERIAS	103
1.2.3.3. PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11 α -HIDROXILADOS A PARTIR DE SUS PRECURSORES	104
<u>2. PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11β-HIDROXILADOS</u>	120
2.1. UTILIZACIÓN DE <i>Cochliobolus lunatus</i> PARA LA PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11β-HIDROXILADOS	120
2.2. IDENTIFICACIÓN DEL CITOCROMO RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD 11β-HIDROXILASA EN <i>C. lunatus</i>	121
2.2.1. Extracción del CYPoma completo y curado manual de los datos	121
2.2.2. Identificación basada en homología de los candidatos más probables	123
2.2.3. Estudio de la inducción génica de los candidatos en presencia de esteroides	124
2.3. IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA CITOCROMO-REDUCTASA ACOMPAÑANTE DEL CITOCROMO RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD 11β-HIDROXILASA EN <i>C. lunatus</i>	126
2.3.1. Extracción del CP-REDUCToma completo y curado manual de los datos	126
2.3.2. Estudio de la inducción génica de los candidatos en presencia de esteroides	126
2.4. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ACTIVIDAD 11β-HIDROXILASA DE <i>C. lunatus</i>	127
2.4.1. Diseño de los operones FAN y FIN (CPR-CYP)	127
2.4.2. Expresión heteróloga de la actividad 11 β -hidroxilasa en <i>C. glutamicum</i>	131
2.4.2.1. CONSTRUCCIÓN	131
2.4.2.2. COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD 11 β -HIDROXILASA. BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES CON CÉLULAS EN REPOSO	132
2.4.2.3. MEJORA DE LA EXPRESIÓN: OPERÓN FAN.1	138
2.4.2.3.1. Diseño y construcción del Operón FAN.1	138
2.4.2.3.2. Comprobación de actividad. Biotransformación de esteroides	139
2.4.3. Producción de 11 β OH-ADD y 11 β OH-AD a partir de materias primas de bajo coste	142
2.4.3.1. CONSTRUCCIÓN	142
2.4.3.2. COMPROBACIÓN DE ACTIVIDAD. BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES	142
2.4.3.2.1. Producción de 11 β OH-ADD en <i>M. smegmatis</i> Δ 6039	142
2.4.3.2.2. Producción de 11 β OH-AD en <i>M. smegmatis</i> Δ 6039 Δ 5941	149
<u>VII. DISCUSIÓN</u>	157
<u>1. PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11α-HIDROXILADOS</u>	159
1.1. PRODUCCIÓN DE 11 α OH-ADD Y 11 α OH-AD A PARTIR DE ESTEROLES EN UN SOLO PASO.	159
1.2. OBTENCIÓN DE ESTEROIDES 11 α -HIDROXILADOS DE INTERÉS FARMACOLÓGICO E INDUSTRIAL A PARTIR DE SUS PRECURSORES DIRECTOS	166
<u>2. PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11β-HIDROXILADOS</u>	171
2.1. IDENTIFICACIÓN DEL SISTEMA CYP-CPR RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD 11 β -HIDROXILASA EN <i>C. lunatus</i>	172

2.1.1. Sistemas FAN y FIN (CPR-CYP)	176
2.1.1.1. OPERÓN FAN.1	183
2.2. PRODUCCIÓN DE 11 β OH-SINTONAS DE ESTEROIDES A PARTIR DE MATERIAS PRIMAS DE BAJO COSTE: PRODUCCIÓN DE 11 β OH-ADD Y 11 β OH-AD	185
VIII. CONCLUSIONES	187
IX. BIBLIOGRAFÍA	191

Abreviaturas

aa: Aminoácido

acCoA: Acetil-CoA

AcCol: Ácido cólico

AD: 4-Androsten-3,17-diona

ADC: *Middlebrook ADC Enrichment*, Albúmina/Dextrosa/Catalasa

ADD: 1,4-Androstadien-3,17-diona

ALA: ácido δ -aminolevulínico

APCI: *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, Ionización química a presión atmosférica

atm: Atmósfera

ATP: *Adenosine TriPhosphate*, Adenosina 5'-trifosfato

C: Citosina

CHO: Colesterol

CHONE: Colestenona

CoA: Coenzima A

CORT: Corticosterona

CPR: Proteína citocromo-reductasa

CPRs: Proteínas citocromo-reductasa

CYP: Citocromo

CYPs: Citocromos

Da: Dalton

DAD: *Dyode Array Detector*, Detector de fotodiodos en serie

DHEA: Deshidroepiandrosterona

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: *Deoxyribonucleic acid*, Ácido desoxirribonucleico

DNAc: DNA complementario

dNTPs: *Deoxyribonucleotide triphosphates*, Desoxinucleótidos trifosfato

DO₆₀₀: Densidad óptica medida a 600 nm

DOC: Deoxicorticosterona

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EST: Esteroide

FC: *Fold Change*, Veces de inducción

FAD: Flavín adenín dinucleótido, forma oxidada

FADH: Flavín adenín dinucleótido, forma reducida

FMN: Flavín mononucleótido, forma oxidada

FMNH: Flavín mononucleótido, forma reducida

FITO: Fitosteroles

G: Guanina

h: hora

HC: Hidrocortisona

HPLC: *High performance liquid chromatography*, Cromatografía líquida de alta eficiencia

IES: *IsoElectro Spray*, Isoelectro nebulizador

IPTG: Isopropil- β -D-Tiogalactopiranosido
ISTD: *Internal Standar*, Estándar interno
kDa: 1000 Da
Km^R: Resistencia a kanamicina
kV: 1000 V
LB: *Lysogenic Broth* (Medio Luria-Bertani)
LC-MS: Comatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
m/z: Relación masa/carga
mg: miligramo
min: minutos
ml: mililitro
mM: milimolar
NAD: Nicotinamida-adenina-dinucleótido, forma oxidada
NADH: Nicotinamida-adenina-dinucleótido, forma reducida
NADP: Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADPH: Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido, forma reducida
ng: nanogramo
nt: nucleótido
OBNC20CA: 3-oxo-23,24-bisnorchol-4-ene-20-carbaldehyde
OBNC20FA: 3-oxo-23,24-bisnorchol-4-ene-20-formic acid
OBNC22-CoA: 3-oxo-4-pregnen-20-carboxyl-CoA
OBNO22-CoA: 3-oxo-4,17-pregnadien-20-carboxyl-CoA
OBNOHC22-CoA: 17-hydroxy-3-oxo-4-pregnane-20-carboxyl-CoA
PAGE: *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb: Pares de bases
PCR: *Polymerase Chain Reaction*, Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa
PDA: *Potato Dextrose Agar*
ppCoA: propionil-CoA
PROG: Progesterona
qRT-PCR: RT-PCR cuantitativa
RBS: *Ribosome Binding Site*, Secuencia de unión al ribosoma
RNA: *Ribonucleic acid*, Ácido ribonucleico
RNAm: RNA mensajero
rpm: Revoluciones por minuto
RSS: *Reichstein's Substance S*, cortexolona
RT-PCR: *Reverse transcription* – PCR, Reacción de retrotranscripción acoplada a PCR
SDS: *Sodium dodecyl sulfate*, Dodecilsulfato de sodio
sqRT-PCR: RT-PCR semicuantitativa
T: Timina
TAE: Tampón Tris-Acetato-EDTA
TBE: Tampón Tris-Borato-EDTA
TE: Tampón Tris-EDTA
TEST: Testosterona

TLC: *Thin layer chromatography*, Cromatografía en capa fina

Tris: Tri(hidroximetil)aminometano

TSA: *Tryptic Soy Agar*

TSB: *Tryptic Soy Broth*

UV: Ultravioleta

V: Voltio

°C: Grado centígrado

β-SITO: β-Sitosterol

μg: Microgramo

μM: Micromolar

Ω: Ohmio

1,4-HBC: 22 OH-23,24-bisnorchol-1,4-dien-3 one

3-HSA: 3-hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona

4-HBC: 22OH-23,24-bisnorchol-4-en-3-one

11OH-: 11-Hidroxi

22HOBNC-Co-A: 22-hydroxy-3-oxochol-4-en-24-oyl-CoA

22OBNC-Co-A: 3,22-dioxochol-4-en-24-oyl-CoA

I. Summary

Introduction

The production of steroids is a very important target for the pharmaceutical sector because of the broad range of their therapeutic activities and their use to cure and prevent some kind of diseases in the important fields of endocrinology, oncology, rheumatology, gynaecology and others.

Nowadays, these compounds are produced using a chemical approach or by its combination with microbiological biotransformations. Although this biotechnological approach has several advantages it has still some disadvantages that remain to be solved.

Bacteria and specially fungi are used as biofactories to perform the biotransformations and deliver the products of interest, but these organisms might perform other modifications leading to undesired by-products, causing a dramatic reduction of production yields.

Currently, synthetic synthons or low cost raw materials, such as cholesterol or phytosterols are used as a substrate for these biotransformations.

Despite of the great knowledge acquired during the last 30 years on metabolic engineering of bacteria and fungi, it is surprising the few advances produced in the genetic improvement of steroid biocatalysts. This fact could be explained because performing *à la carte* genetic improvements in this kind of microorganisms is complicate in general.

Taking into account these premises, the development of steroid production processes using improved biocatalysts by genetic and metabolic engineering tools has been the major goal of this Doctoral Thesis.

Objectives

In accordance to the importance of the steroid production for the pharmaceutical sector and assuming that no (or little) genetically optimized biofactories are used in the industry nowadays, we consider a crucial objective to explore the use of the metabolic and synthetic engineering technologies in order to obtain more efficient biofactories for these purposes. In this Thesis we have focused our aim on the production of pharmacologically active $11\alpha/\beta$ -hydroxylated steroids.

In order to obtain this main goal, we defined the followed objectives:

1. Production of 11α -hydroxylated steroids of pharmaceutical and industrial interest from synthons and low cost raw materials such as cholesterol and phytosterols.
2. Production of 11β -hydroxylated steroids of pharmaceutical and industrial interest from synthons and low cost raw materials such as cholesterol and phytosterols.

Results and methodology

Production of 11 α -hydroxylated steroids

In this work we have been able to develop recombinant corynebacteria harbouring the 11 α -hydroxylase activity of *Rhizopus oryzae* by transferring its CYP-CPR 11 α -hydroxylase system to the bacteria. The recombinant bacteria are able to 11 α -hydroxylate different steroids to generate pharmaceutical products such as 11 α OH-androstenedione, 11 α OH-androstenediendione, 11 α OH-deoxycorticosterone, 11 α OH-progesterone, 11 α OH-testosterone and 11 α OH-dehydroepiandrosterone.

In addition, using as hosts mutant mycobacteria able to produce androstenedione or androstenediendione from sterols, we have been able to introduce the CYP-CPR 11 α -hydroxylase system in these bacteria to deliver 11 α OH-androstenedione and 11 α OH-androstenediendione in one step directly from phytosterols or cholesterol. As a proof of concept, we tested these processes in small bioreactors using industrial working conditions with successful results.

Production of 11 β -hydroxylated steroids

In order to achieve this goal, firstly, we have identified and isolated the CYP-CPR 11 β -hydroxylase system of the fungi *Cochliobolus lunatus*, using a combination of bioinformatics analysis of its genome and differential gene expression assays. In addition, we have identified a new cytochrome-protein-reductase (CPR).

Using this CYP-CPR 11 β -hydroxylase system we have developed recombinant corynebacteria harbouring this 11 β -hydroxylase activity which allowed us not only to confirm the activity of the cloned system but also to construct a biofactory for producing different 11 β -hydroxylated steroids. Thus, using recombinant corynebacteria, we have produced corticosterone from deoxycorticosterone, hydrocortisone from cortexolone and 11OH β -androstenedione from androstenedione.

On the other hand, as described above, using as hosts mutant mycobacteria able to produce androstenedione or androstenediendione from sterols, we have been able to introduce the CYP-CPR 11 β -hydroxylase system in these bacteria to deliver 11 β OH-androstenedione and 11 α OH-androstenediendione in one step directly from phytosterols or cholesterol.

Conclusions

1. We have identified the CYP-CPR 11 β -hydroxylase system of *C. lunatus* together with a new CPR.
2. We have demonstrated that corynebacteria are excellent chassis to express CYP-CPR systems of fungal origin. Two proofs of concept have been performed in this work using the 11 α -hydroxylase of *Rhizopus oryzae* and the 11 β -hydroxylase of *Cochliobolus lunatus*.
3. We have demonstrated that mycobacteria can be also alternative chassis to express CYP-CPR fungal systems. Two proofs of concept have been performed using the CYP-CPR systems belonging to *R. oryzae* and *C. lunatus*.
4. We have demonstrated that is possible to insert 11 α -hydroxylase and 11 β -hydroxylase activities of the fungi within the sterol degradation pathway in order to produce hydroxylated steroids in one simple step from cholesterol or phytosterols.

II. Resumen

Introducción

La producción de esteroides resulta de gran interés para el sector farmacéutico debido al amplio rango de actividades terapéuticas que poseen estas moléculas, que han sido utilizadas para tratar y prevenir enfermedades en distintos campos clínicos tan relevantes como los de la endocrinología, la oncología, la reumatología o la ginecología entre otros.

Actualmente, estos compuestos se producen por síntesis química o mediante su combinación con procesos de biotransformación microbiológicos, presentando estos últimos interesantes ventajas pero también algunos inconvenientes que han de ser reducidos.

Los biocatalizadores empleados en las biotransformaciones son bacterias y hongos capaces de realizar las modificaciones químicas oportunas en estas moléculas dando lugar al compuesto de interés. Pero también pueden realizar modificaciones colaterales dando lugar a otros subproductos que hacen descender los rendimientos de producción.

En general estas biotransformaciones se realizan partiendo de sintonas previamente sintetizadas o de materias primas de bajo coste como el colesterol o los fitosteroles.

A pesar del enorme conocimiento actual en las tecnologías de ingeniería genética y metabólica, apenas se han realizado aportaciones en este sentido para la mejora genética de los biocatalizadores empleados en la industria de los esteroides. Esto es en parte comprensible, ya que realizar mejoras genéticas dirigidas en estos microorganismos es complicado.

Por ello el desarrollo de nuevos procesos de producción de compuestos esteroideos de interés farmacológico e industrial utilizando biocatalizadores modificados mediante técnicas de ingeniería genética ha sido el objetivo principal de esta Tesis Doctoral.

Objetivos

Teniendo en cuenta la relevancia de la producción de los esteroides por biotransformación y asumiendo que los microorganismos empleados como biocatalizadores hasta la fecha están poco optimizados, resulta de gran interés la posibilidad de aplicar las modernas tecnologías de la ingeniería metabólica y la biología sintética para obtener microorganismos más eficientes que los actuales. Por este motivo el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se ha centrado en la mejora de la producción de esteroides 11α - y 11β -hidroxilados farmacológicamente activos.

Para cumplir este propósito se definieron dos objetivos principales:

1. Producción de esteroides 11 α -hidroxilados de interés farmacológico e industrial a partir de sintonas y de materias primas de bajo coste, como colesterol y fitosteroles.
2. Producción de esteroides 11 β -hidroxilados de interés farmacológico e industrial a partir de sintonas y de materias primas de bajo coste, como colesterol y fitosteroles

Resultados y Metodología

Producción de esteroides 11 α -hidroxilados

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado corinebacterias recombinantes que portan la actividad 11 α -hidroxilasa del hongo *Rhizopus oryzae* mediante la clonación del sistema citocromo-reductasa (CYP-CPR). Estas bacterias han sido capaces de hidroxilar diferentes esteroides y generar moléculas de interés farmacológico o industrial como la 11 α OH-androstenediona, la 11 α OH-androstadiendiona, la 11 α OH-deoxicorticosterona, la 11 α OH-progesterona, la 11 α OH-testoterona, y la 11 α OH-deshidroepiandrosterona.

Por otro lado se ha conseguido acoplar el sistema CYP-CPR de *R. oryzae* con la actividad 11 α -hidroxilasa a la cascada metabólica de micobacterias recombinantes productoras de androstenediona o androstadiendiona. De esta manera se ha conseguido producir 11 α OH-androstenediona o 11 α OH-androstadiendiona en un solo paso desde fitosteroles o colesterol.

Con estas últimas bacterias se han llevado a cabo, como prueba de concepto, biotransformaciones en biorreactores de 2 L utilizando condiciones de proceso similares a las industriales con resultados exitosos.

Producción de esteroides 11 β -hidroxilados

Para cumplir este objetivo se ha tenido que identificar y aislar primero el sistema CYP-CPR implicado en la 11 β -hidroxilación de esteroides del hongo *Cochliobolus lunatus*. Para ello se han combinado los análisis bioinformáticos de su genoma con estudios de expresión génica en este hongo.

Además de identificar el CYP responsable de la 11 β -hidroxilación de *C. lunatus* se ha identificado una nueva citocromo reductasa (CPR) no descrita hasta la fecha.

Una vez identificado el sistema CYP-CPR con actividad 11 β -hidroxilasa se han desarrollado corynebacterias recombinantes portadoras de dicha actividad, permitiendo no solo confirmar la actividad del mismo, sino también constituyendo un nuevo sistema alternativo al hongo para realizar la 11 β -hidroxilación de esteroides.

Mediante estas *Corynebacterias* recombinantes se ha obtenido corticosterona a partir de deoxicorticosterona, cortisol a partir de cortexolona y 11β OH-androstenediona a partir de androstenediona.

También se ha podido acoplar el sistema CYP-CPR de *C. lunatus* con actividad 11β -hidroxilasa a la cascada metabólica de micobacterias recombinantes productoras de androstenediona o androstadiendiona. De esta manera se obtenido en un solo paso 11β OH-androstenediona o 11β OH-androstadiendiona desde fitosteroles o colesterol.

Conclusiones

1. Se ha identificado el sistema CYP-CPR responsable de la actividad 11β -hidroxilasa de *Cochliobolus lunatus* junto con una nueva CPR no descrita previamente en *Cochliobolus lunatus*.
2. Se ha puesto de manifiesto que las corinebacterias pueden ser un chasis excelente para expresar sistemas CYP-CPR de hongos. Dicha prueba de concepto se ha realizado con la actividad 11α -hidroxilasa de *Rhizopus oryzae* y se ha ratificado con la actividad 11β -hidroxilasa de *Cochliobolus lunatus*.
3. Se ha puesto de manifiesto que las micobacterias también pueden ser buenos chasis para expresar sistemas CYP-CPR de hongos utilizando para realizar esta prueba de concepto los sistemas CYP-CRP de *R. oryzae* y de *C. lunatus*.
4. Se ha podido comprobar que en las micobacterias recombinantes portadoras de los sistemas CYP-CRP de los mencionados hongos es posible acoplar las actividades 11α -hidroxilasa y 11β -hidroxilasa a la ruta de degradación de esteroides para producir de manera directa esteroides hidroxilados a partir de fitoesteroides o colesterol.

III. Introducción

1. LOS COMPUESTOS ESTEROIDEOS: ESTEROIDES Y ESTEROLES

Los esteroides son compuestos orgánicos de gran interés biológico, medioambiental e industrial que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Su estructura está formada por un esqueleto ciclopentanoperhidrofenantreno constituido por 17 carbonos que presenta tres ciclohexanos (anillos A, B y C) y un ciclopentano (anillo D) (Fig. I1). Los derivados de esta estructura básica presentan multitud de modificaciones estructurales que consisten en la diferente saturación de los anillos, la presencia de grupos metilo en las posiciones C10 y C13, la presencia de un grupo hidroxilo o carbonilo en C3 y la presencia de una cadena alifática en la posición C17 (JCBN, 1989), lo cual origina una gran variabilidad de esteroides. La longitud de la cadena lateral, así como la presencia de diferentes grupos funcionales (en configuración α o β), determinan las características químicas y fisiológicas propias de cada esteroide.

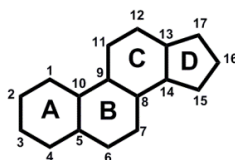


Figura I1 Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno.

Los esteroides son compuestos esteroideos que poseen un grupo hidroxilo en la posición C3 y que conservan la mayor parte del esqueleto del colestano, formado por el núcleo esteroideo y una cadena lateral de 8 átomos de carbono en posición C17. Entre los esteroides de origen natural destacan los fitosteroides en plantas (β -sitosterol, campesterol y estigmasterol), el ergosterol en hongos y el colesterol en células animales (Fig. I2).

En los organismos eucariotas, los esteroides son constituyentes fundamentales de las membranas celulares, a las cuales confieren estabilidad e impermeabilidad (Nelson *et al.*, 2008); además son precursores de una gran variedad de productos con actividades biológicas específicas que afectan a un gran número de procesos celulares, algunos de ellos tan esenciales como la proliferación celular, control del ciclo celular y mecanismos básicos de reconocimiento intercelular, entre otros (Majewska, 2007).

En lo referente a los organismos procariotas, se han descrito muy pocos casos en los que se encuentren evidencias de la síntesis de esteroides, como por ejemplo en algunas micobacterias (Lamb *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 2003), en *Methylococcus capsulatus* (Jackson *et al.*, 2002; Lamb *et al.*, 2007) y en *Gemmata obscuriglobus* (Pearson *et al.*, 2003), aunque la funcionalidad de estos esteroides sintetizados en bacterias todavía no se conoce. Sin embargo, los esteroides pueden ser degradados por algunas bacterias capaces de utilizarlos como fuente de carbono y energía para su crecimiento.

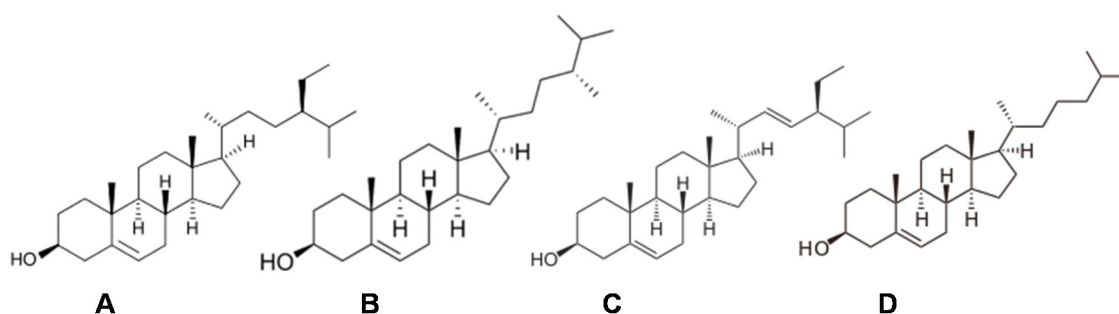


Figura I2 Estructura de β -sitosterol (A), campesterol (B), estigmasterol (C) y colesterol (D)

Fitosteroles es un término colectivo en el que se engloban los esteroides presentes en las plantas, siendo los principales β -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Fig. I2.A; I2.B; I2.C). Todos presentan un grupo hidroxilo en posición C3 en configuración β , diferenciándose en la longitud y composición de la cadena lateral y por ende, en el número de carbonos, presentado 29, 28 y 29 átomos de carbono, respectivamente. Se trata de moléculas muy presentes en la naturaleza, ya que forman parte de las membranas celulares de células vegetales, donde cumplen una función estructural semejante a la que tiene el colesterol en las membranas de las células animales (Nelson *et al.*, 2008).

Los fitosteroles y particularmente el β -sitosterol, son moléculas esenciales en plantas, no así para el ser humano. Son ingeridos en la dieta ya que están presentes en los vegetales. La absorción sistémica de los fitosteroles es muy baja y la mayoría son excretados en la bilis (Sudhop *et al.*, 2004; Sudhop *et al.*, 2005). Aunque no tienen la importancia metabólica de otros esteroides animales como el colesterol, se han descrito numerosos beneficios de su ingesta como la disminución del riesgo cardiovascular debido a una disminución sistémica del colesterol ya que inhiben competitivamente la absorción del mismo en el intestino (Berger *et al.*, 2004; Moruissi *et al.*, 2006; Ellegard *et al.*, 2007; Van Horn *et al.*, 2008); existen también numerosos estudios sobre células cancerígenas donde la presencia de fitosteroles se relaciona con apoptosis (Awad *et al.*, 2000; Awad *et al.*, 2001) y estudios poblacionales en los que se sugiere una relación directa entre el incremento de fitosteroles en la dieta y la prevención de cáncer de estómago e intestino (Mendilaharsu *et al.*, 1998; De Stefani *et al.*, 2000). Además de su relevancia fisiológica, son considerados compuestos de interés por ser una materia prima en la producción de otros compuestos esteroideos de interés farmacológico y/o industrial.

El colesterol (3-hidroxi-5,6-colesteno) (Fig. I2.D) es un esteroide de 27 átomos de carbono en el que el grupo hidroxilo del C3 adopta una configuración β . Este alcohol policíclico es una de las moléculas más abundantes en la naturaleza, donde se encuentra formando parte de las membranas de las células animales (Slaytor y Bloch, 1965). Aunque es una molécula esencial para muchos animales, incluido el ser humano, los mamíferos no requieren la ingesta de colesterol en la dieta ya que todas las células pueden sintetizarlo a partir de precursores simples. Debido a que los mamíferos carecen de las enzimas necesarias para degradar el núcleo del colesterol, el exceso de éste se excreta con pequeñas modificaciones estructurales o bien transformado en otros compuestos esteroideos (ácidos biliares u hormonas esteroideas) (Björkhem y Eggertsen, 2001).

El colesterol tiene una gran importancia metabólica, ya que es el precursor inmediato de un gran número de compuestos tales como vitaminas, hormonas esteroideas y ácidos biliares (Miller, 1988; Björkhem y Eggertsen, 2001). Todas las hormonas esteroideas humanas derivan del colesterol. Las hormonas sexuales se producen en las gónadas masculinas y femeninas y en la placenta. Entre ellas se encuentran la progesterona, que regula el ciclo reproductivo femenino, y los andrógenos (como la testosterona) y estrógenos (como el estradiol), que influyen en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios masculinos y femeninos, respectivamente. Los ácidos y sales biliares son derivados hidrofílicos del colesterol que tienen un papel importante en la digestión, donde participan en la emulsión de las grasas de la dieta. La vitamina D también deriva de la molécula de colesterol. La vitamina D₃ (colecalfiferol), se forma en la piel a partir del 7-deshidrocolesterol en una reacción fotoquímica catalizada por el componente ultravioleta de la luz solar. Posteriormente es convertida por enzimas en el hígado y los riñones a 1,25-dihidroxicolecalciferol o colecalcitriol, la hormona bioactiva, que regula la absorción de calcio en el intestino y los niveles de calcio en riñones y huesos (Nelson *et al.*, 2008). En la corteza de la glándula adrenal se sintetizan dos clases de hormonas esteroideas: los mineralocorticoides (aldosterona), que regulan la reabsorción de iones inorgánicos (Na⁺, Cl⁻, y HCO₃⁻) por el riñón, y los glucocorticoides, que regulan el metabolismo de proteínas y carbohidratos y reducen la respuesta inmune, la inflamación y las respuestas alérgicas.

2. PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE COMPUESTOS ESTEROIDEOS

2.1. INTERÉS FARMACOLÓGICO Y BIOTECNOLÓGICO DE LOS COMPUESTOS ESTEROIDEOS

Dada la importancia ya comentada de los esteroides resulta lógico que ocupen un lugar muy destacado entre los productos farmacéuticos, ya que se utilizan para tratar y prevenir un gran número de enfermedades en distintos campos clínicos tan relevantes como la endocrinología, la oncología, la reumatología, o la ginecología entre otros muchos (Fernandes *et al.*, 2003). De hecho, los esteroides se clasifican habitualmente según la función que desempeñan, así como los principales objetivos de la industria farmacéutica, nos encontramos cinco clases de moléculas esteroideas: andrógenos, progestanos y estrógenos (comúnmente denominados hormonas sexuales), glucocorticoides y mineralocorticoides (denominados corticosteroides). La extensa gama de fármacos esteroídicos está continuamente en expansión y hoy en día disponemos de esteroides sintéticos y naturales con diferentes actividades terapéuticas: anti-inflamatorios, inmunosupresores, progestacionales, diuréticos, agentes anabólicos y anticonceptivos. También se han aplicado con éxito para el tratamiento de algunas formas de cáncer de mama y de próstata, para combatir la osteoporosis, como agentes de sustitución en el tratamiento de la insuficiencia suprarrenal o hipofisaria, en la prevención de las enfermedades coronarias, como agentes antifúngicos, como ingredientes activos de los agentes contra la obesidad, y en la prevención y tratamiento de la infección por el VIH (Sedlaczek *et al.*, 1988; Demain, 1992).

Además del interés para la industria farmacéutica, el estudio de los microorganismos capaces de degradar o transformar colesterol y otros esteroides ha permitido el desarrollo de biosensores de colesterol, de gran utilidad en el diagnóstico clínico (Arya *et al.*, 2008; Jubete *et al.*, 2009) y en la industria alimentaria (Jubete *et al.*, 2009), y ha permitido descubrir la capacidad de algunas bacterias probióticas como los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* o *Bifidobacterium* (Pereira y Gibson, 2002) para reducir los niveles de colesterol en sangre (Ooi y Liong, 2010).

2.2. PRODUCCIÓN DE LOS COMPUESTOS ESTEROIDEOS. METODOLOGÍA ACTUAL

La fabricación actual de esteroides y hormonas se basa en la combinación de tecnologías microbianas y la síntesis química (Fernandes *et al.*, 2003; Donova, 2007). La producción de esteroides es uno de los mejores ejemplos de la aplicación exitosa de la biotecnología en los procesos industriales a gran escala. La investigación en este campo se inició con el anuncio en 1949 de la Clínica Mayo sobre los efectos extraordinarios de la cortisona para aliviar los síntomas de la artritis reumatoide, que activó una investigación competitiva a nivel mundial y un esfuerzo de desarrollo dirigido hacia un único objetivo, la síntesis de los corticosteroides. El descubrimiento que dio en ese momento a la compañía farmacéutica Upjohn una gran ventaja competitiva en el campo de la fabricación de esteroides, fue el hallazgo de un hongo perteneciente al género *Rhizopus* que era capaz de introducir enzimáticamente un grupo 11 α -hidroxi directamente en la progesterona, que acababa de ser sintetizada a partir del estigmasterol de la soja. Este hecho supuso un gran avance ya que la hidroxilación en la posición 11 se realizaba en un solo paso y no en los 31 pasos que hasta el momento requería su síntesis química a partir de deoxicolato, reduciendo más de 200 veces el coste de producción. Este hallazgo fue decisivo para explicar el desarrollo posterior de la síntesis biotecnológica de los esteroides con actividad biológica (Hogg, 1992).

La compleja estructura de los esteroides hace que para su síntesis química requiera procesos muy complejos en los que intervienen múltiples pasos de reacción y donde, teniendo en cuenta la sensibilidad de estos compuestos a la hidrólisis por una amplia variedad de productos químicos, las precauciones que deben tomarse son muy importantes ya que influyen decisivamente sobre el rendimiento final. A menudo la síntesis entraña la elaboración previa de intermediarios con grupos protegidos para su regeneración posterior una vez que la reacción esperada ha ocurrido, lo que en general limita los rendimientos de los procesos y los hace más costosos y lentos. La quiralidad de la estructura de muchos de estos compuestos añade complejidad al diseño del proceso. Más aún, la síntesis química también requiere el uso de reactivos tales como piridina, trióxido de azufre o dióxido de selenio que son peligrosos para la salud del personal implicado en los procesos de producción y constituyen un grave problema medioambiental y laboral.

Frente a estos inconvenientes, la biotransformación de los esteroides se lleva a cabo en condiciones medioambientales más suaves y proporcionan una alternativa eficaz a la síntesis química, una vez que las limitaciones a menudo encontradas en lo que concierne a los

rendimientos y a los niveles de pureza de los productos se superan; es por ello que el uso de las biotransformaciones en los procesos de producción de medicamentos esteroideos y hormonas se han multiplicado (Mahato y Garay, 1997).

La industria de esteroides por lo tanto utiliza conjuntamente la química y los métodos biológicos aprovechando los mejores aspectos de cada una, y así las biotransformaciones asociadas a la síntesis química han proporcionado las herramientas adecuadas para la producción de análogos de esteroides naturales o modificados a gran escala (Fernandes y Cabral, 2010).

El uso de materias primas más baratas también ha sido determinante para reducir los costes de estos procesos. Los fitoesteroles junto con las sapogeninas como la diosgenina, hecogenina y solasodina, son una de las materias primas más empleadas en la industria farmacéutica para la producción de los esteroides. El estigmasterol, el β -sitosterol y el campesterol son los fitoesteroles más comúnmente utilizados. Los fitoesteroles se extraen habitualmente de la soja pero también se pueden obtener del pino o de los residuos de la industria papelera (Fernandes *et al.*, 2003; Malaviya y Gomes, 2008).

El colesterol, es otro de los materiales de partida utilizados en las biotransformaciones de esteroides, y se obtiene a partir de las grasas y aceites animales, como la manteca de cerdo, el sebo vacuno, la grasa de la leche o el aceite de pescado (Fernandes *et al.*, 2003). Sin embargo, debido a los exhaustivos controles de calidad que deben realizarse sobre las materias primas de origen animal, actualmente los fitoesteroles son los más empleados.

En muchas otras ocasiones el material de partida es una hormona o un esteroide ya purificado (e. g., 4-androsteno-3,17-diona (AD), 1,4-androstadieno-3,17-diona (ADD), testosterona, pregnenolona, etc.) al que se le pretende introducir una o unas pocas modificaciones químicas para transformarlo en otro producto farmacéutico, siendo por tanto considerados como sintonas para la industria farmacéutica (Fernandes y Cabral, 2010). Los procesos de producción de estas sintonas a partir de fitosteroles constituye actualmente uno de los principales objetivos de la industria de esteroides (Fernandes y Cabral, 2010).

2.3. APLICACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA BLANCA A LA PRODUCCIÓN DE LOS COMPUESTOS ESTEROIDEOS. LA BIOTRANSFORMACIÓN COMO METODOLOGÍA ALTERNATIVA

La biotecnología blanca es la rama de la biotecnología dedicada a optimizar los procesos industriales, buscando reemplazar a las tecnologías contaminantes por otras limpias y más respetuosas con el medioambiente. Los avances más significativos en esta área son el uso de biocatalizadores, es decir, de enzimas u organismos, empleándolos como factorías para llevar a cabo bioprocesos.

En el caso de los procesos de producción de compuestos esteroideos, como ya se ha expuesto, el uso de las biotransformaciones se ha tornado más común en las últimas décadas

(Mahato y Garay, 1997) debido las ventajas que presenta frente a la síntesis química. Existen algunos esteroides que se producen exclusivamente mediante biotransformaciones, sin el empleo de estrategias conjuntas en las que se emplee la síntesis química. Los esteroides que más se producen mediante biotransformación son: cortisol (*Cochliobolus lunatus*), prednisolona (*Arthrobacter simplex*), 11 α -hidroxiprogesterona (*Rhizopus nigricans*), triendiol (*Septomyxa affinis*) androstenediendiona (*Mycobacterium* sp.) y 1-deshidrotetololactona (*Cylindrocarpon radícicola*).

Sin embargo, resulta extremadamente sorprendente que los procesos biotecnológicos que se vienen utilizando para la producción de esteroides sigan estando basados fundamentalmente en el uso de organismos salvajes o de mutantes obtenidos mediante tecnologías clásicas y, salvo algunas excepciones, los procesos basados en la tecnología recombinante no han sido aun suficientemente investigados e implementados en este importante sector. Una explicación plausible es que son muy pocos los trabajos que se han realizado en este campo hasta la fecha probablemente debido, según apuntan algunos autores (Fernandes y Cabral, 2010), a que el sector químico orgánico, dominante en este campo, es poco proclive a la introducción de procesos biológicos que requieran de una investigación compleja en tecnologías (DNA recombinante), que no suelen ser utilizadas por esos grupos; también debe tenerse en cuenta que el mercado de los esteroides está muy consolidado y se mueve en estrechos márgenes de costes/beneficios, por lo que cualquier nuevo desarrollo, antes de ser implantado a escala industrial, tiene que demostrar una clara ventaja sobre el proceso tradicional.

A pesar de las ventajas que presenta la síntesis de esteroides mediante biotransformación también presenta limitaciones en las que aún se debe trabajar, como son el rendimiento de transformación y la aparición de subproductos que dificultan la recuperación del producto de interés. Aunque algunas de estas biotransformaciones están bien definidas, en muchos casos no se conoce la enzima o la ruta que las lleva a cabo, resultando por tanto de vital importancia el conocimiento del organismo modelo para evitar biotransformaciones “en caja negra” y la identificación de nuevas reacciones que puedan ser potencialmente útiles (Fernandes *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2007).

Existen muchas enzimas capaces de llevar a cabo diversos tipos de modificaciones sobre los compuestos esteroideos: deshidrogenasas, reductasas, hidroxilasas, etc; sin embargo, cabe destacar los citocromos P450 debido a la gran variedad de modificaciones capaces de llevar a cabo y de su importancia biológica (Bernhardt, 2006).

2.3.1. Los citocromos P450

Los citocromos P450 (CYPs o P450s) representan una superfamilia de monooxigenasas que contienen un grupo hemo de tipo b. El grupo hemo es un grupo prostético constituido por un átomo de hierro coordinado con cuatro átomos de nitrógeno de la porfirina compuesta por un anillo tetrapirrólico con sustituyentes laterales (Fig. 13.A). Según los sustituyentes laterales que contenga las porfirinas se clasifican en mesoporfirinas, uroporfirinas, etioporfirinas y

protoporfirinas. Estas últimas son las más relevantes y presentan como sustituyentes 4 metilos, 2 vinilos y 2 grupos propiónicos. El grupo hemo de tipo b está constituido por la protoporfirina IX y un átomo de hierro unido a ésta mediante cuatro enlaces de coordinación establecidos con los cuatro átomos de nitrógeno de la misma (Fig. I3.B). Además de los citocromos, la hemoglobina y la mioglobina son ejemplos de proteínas transportadoras de oxígeno que contienen como grupo prostético un grupo hemo de tipo b. En este caso, el hierro del grupo hemo se encuentra coordinado con una histidina de la proteína, mientras que en el caso de los citocromos la coordinación se produce con el grupo tiol de una cisteína.

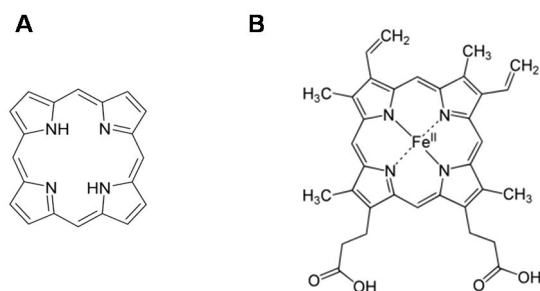


Figura I3 Estructura del núcleo de la porfirina (A) y del grupo hemo tipo b (B)

El primer citocromo se identificó en microsomas hepáticos (Omura y Sato, 1962), donde inicialmente fueron identificados como “pigmentos” (de ahí la letra “P” de P450) que se unían a monóxido de carbono (CO). Los citocromos están ampliamente distribuidos, estando presentes en procariontas, normalmente solubles, y eucariotas como hongos, plantas, insectos y mamíferos, donde normalmente se encuentran asociados a membrana. Existen 57 citocromos en el genoma humano, 272 en *Arabidopsis*, 457 en arroz, 119 en el hongo *Aspergillus nidulans* y sólo 3 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Urlacher y Girhard, 2012). Teniendo en cuenta las diferencias en el tamaño del genoma de todas ellas con respecto a las bacterias, en algunas de éstas los citocromos son bastante abundantes; siendo algunas actinobacterias destacables por presentar un número excepcionalmente elevado de citocromos (e.g. 20 CYPs en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, 29 CYPs en *Rhodococcus jostii* RHA1 y 43 CYPs en *Mycobacterium smegmatis*) en contraste con la ausencia de los mismos en *Escherichia coli* (Ouellet *et al.*, 2010; Hudson *et al.*, 2012). En las últimas décadas estos citocromos bacterianos han sido muy estudiados porque dotan a las bacterias que los portan de la capacidad de degradar una gran variedad de fuentes de carbono inusuales.

2.3.1.1. RELACIÓN CON LOS ESTEROIDES: IMPORTANCIA BIOLÓGICA E INDUSTRIAL

Los citocromos han sido objeto de estudio entre otras cosas debido a su extraordinaria capacidad de catalizar reacciones de monooxigenación de una manera regio- y estereo-selectiva. Algunas de las enzimas pertenecientes a esta familia se caracterizan por presentar un estrecho rango de sustrato, principalmente las que están implicadas en rutas anabólicas, como por ejemplo en la síntesis de esteroides en animales y plantas, mientras que otros P450s presentan un amplio rango de sustrato, como ocurre con aquellos implicados en la degradación de compuestos xenobióticos (Guengerich, 1991). El interés por el estudio y aplicación biotecnológica de los citocromos no se debe exclusivamente a su capacidad de transformación

de compuestos esteroideos, sino que también han adquirido una gran relevancia debido a su implicación en síntesis de antibióticos, fármacos como el taxol (anticancerígeno) y la pravastatina (tratamiento para disminuir los niveles de colesterol en sangre) y en diversos procesos de biorremediación (Urlacher y Eiben, 2006; Munro *et al.*, 2013; Sakaki *et al.*, 2013).

Los citocromos que mayor interés han suscitado y los más ampliamente estudiados han sido los citocromos humanos por su interés fisiológico y su implicación en importantes rutas metabólicas de síntesis de hormonas y vitaminas y de degradación de tóxicos. Los citocromos microsomales hepáticos humanos son los encargados de oxidar la mayoría de las drogas y compuestos xenobióticos que circulan por el cuerpo humano, como la cafeína, el taxol, el benzopireno, el etanol, las estatinas y el sildenafil (viagra) (Munro *et al.*, 2013). Las modificaciones que introducen en estos compuestos normalmente incrementan la solubilidad de los mismos, facilitando así su excreción a través de la orina o la bilis (Crettol *et al.*, 2010). Como se ha comentado anteriormente, existen numerosos citocromos que participan en procesos de síntesis de compuestos endógenos. Destacan los implicados en la síntesis y metabolismo del colesterol, biosíntesis de hormonas esteroideas y producción de ácidos biliares, ya que su alteración o deficiencia puede producir importantes enfermedades (Pikuleva y Waterman, 2013). El citocromo CYP51 es el único implicado en la síntesis de colesterol en humanos, proceso que requiere más de 30 reacciones diferentes. El CYP51 cataliza la 14 α -desmetilación del lanosterol y del 24,25-deshidrolanosterol, que constituyen los precursores del colesterol (Lepesheva y Waterman, 2007). Además, los productos generados por este citocromo constituyen compuestos intermediarios en las rutas de biosíntesis del ergosterol en hongos y de fitoesteroles en plantas (Lepesheva y Waterman, 2007). La síntesis de ácidos biliares se produce a partir de colesterol y tiene lugar a través de dos rutas. En la ruta clásica intervienen tres citocromos: CYP7A1, CYP8B1 y CYP27A1, donde se transforma el colesterol en ácido cólico y ácido quenodesoxicólico (Pikuleva y Waterman, 2013). Cabe destacar la función del CYP27A1, que se expresa en todas las células del cuerpo y además de participar en la vía clásica también actúa sobre el colesterol presente en el resto de tejidos extra hepáticos, permitiendo la eliminación de éstos e iniciando la denominada vía alternativa de síntesis de ácidos biliares (Cali y Russell, 1991). En esta vía alternativa se requiere además la acción del citocromo CYP7B1 para que puedan sintetizarse los ácidos biliares (Schwarz *et al.*, 1997; Setchell *et al.*, 1998; Schwarz *et al.*, 2001). Además de estas dos vías de síntesis existe una tercera iniciada por el citocromo CYP46A1 en el cerebro, que es el órgano con mayor contenido en colesterol de todo el cuerpo humano y prácticamente la totalidad del mismo se sintetiza localmente (Saher *et al.*, 2011). El colesterol es transformado para que pueda atravesar la barrera hematoencefálica y transportarse hasta el hígado donde es transformado en los ácidos biliares (Björkhem *et al.*, 1997; Lund *et al.*, 1999). Los ácidos biliares secundarios y terciarios se producen en el intestino a partir de los ácidos biliares primarios gracias a la actuación de las bacterias que componen la microbiota intestinal (Philipp, 2011). La síntesis de las hormonas esteroideas también se realiza a partir del colesterol. Entre los mamíferos existen seis citocromos esenciales para ello (Fig. 14).

Para la síntesis de hormonas sexuales (Fig. 14) la molécula de colesterol se transforma en pregnenolona por el citocromo mitocondrial CYP11A1 (denominado también P450_{scc}, *side chain cleavage*) (Tuckey y Cameron, 1993; Miller y Auchus, 2011), constituyéndose el precursor de todas las hormonas esteroideas. La pregnenolona se transforma en progesterona mediante la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa (3 β -HSD) (Lachance *et al.*, 1990). Esta enzima también cataliza la transformación de 17 α -hidroxipregnenolona en 17 α -hidroxiprogesterona, deshidroepiandrosterona (DHEA) en androstenediona (AD) y androstenediol en testosterona. El citocromo microsomal CYP17A1 se localiza tanto en la corteza adrenal como en las gónadas presentando diferentes propiedades: en la corteza adrenal cataliza la 17 α -hidroxilación de la progesterona, produciéndose la 17 α -hidroxiprogesterona que es utilizada en la síntesis de cortisol (glucocorticoides); mientras que en las gónadas, además de catalizar la conversión de pregnenolona y progesterona en 17 α -hidroxipregnenolona y 17 α -hidroxiprogesterona, genera como productos finales DHEA y AD a partir de estos intermediarios (Nakajin *et al.*, 1981; Liu *et al.*, 2005). Tanto la DHEA como el AD son sustratos de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) que catalizan su transformación en androstenediol y testosterona respectivamente (Moghrabi y Andersson, 1998). A partir de la testosterona y por acción del citocromo microsomal CYP19A1 (aromatasa) se produce la síntesis de estradiol (Simpson *et al.*, 1994). Este citocromo también puede actuar directamente sobre el AD para producir la estrona que es transformada finalmente en estradiol. También existen citocromos que participan en la síntesis de mineralocorticoides y glucocorticoides en la corteza de la glándula adrenal. En primer lugar, el citocromo CYP21A2 transforma la progesterona y la 17 α -hidroxiprogesterona en desoxicorticosterona (DOC) y cortexolona (también denominada desoxicortisol o *Reichstein's Substance S*, RSS), respectivamente (Kominami *et al.*, 1980). La DOC es sustrato del citocromo mitocondrial CYP11B2 (aldosterona sintasa) que sintetiza la aldosterona, hormona que controla la reabsorción de iones inorgánicos por el riñón. Por otro lado, la RSS se transforma en cortisol (hidrocortisona, HC) por la acción del citocromo CYP11B1 (Peter *et al.*, 1999; Bureik *et al.*, 2002). Existen además otros procesos esenciales para el cuerpo humano en el que están implicados los citocromos, como la síntesis de la vitamina D3 (colecalfiferol) y de su forma bioactiva (colecalfitriol) (Akiba *et al.*, 1980; Cheng *et al.*, 2004; Schuster, 2011).

Dada la importancia de los citocromos en la síntesis y modificación de esteroides en mamíferos, existe un gran interés por parte de la industria farmacéutica en utilizar estas enzimas para producir diferentes esteroides. De hecho son muchos los intentos que se han hecho hasta el momento tratando de trasladar citocromos a sistemas heterólogos (Dumas *et al.*, 1996; Duport *et al.*, 1998; Salamanca-Pinzón y Guengerich, 2011; Schiffer *et al.*, 2015) siendo el principal inconveniente que la mayoría se expresan mal en dichos sistemas. Los más empleados siguen siendo los eucariotas como las levaduras, más próximos que los sistemas heterólogos de referencia, los bacterianos, pero aun así la expresión y la biotransformación *in vivo* no se produce a niveles adecuados para procesos industriales.

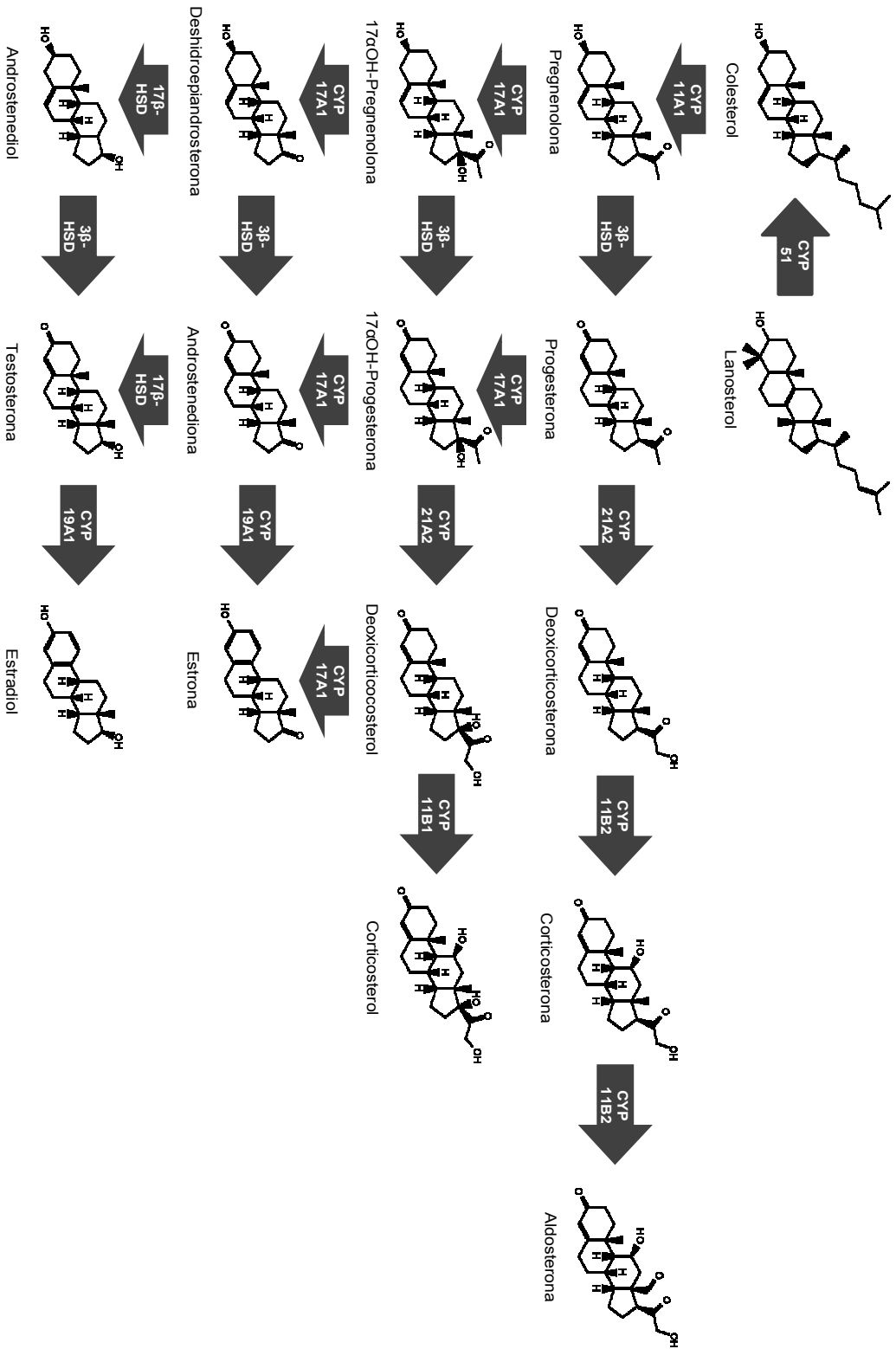


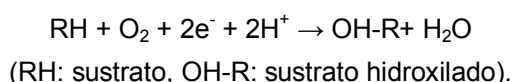
Figura 14 Citocromos P450 implicados en la síntesis de colesterol y hormonas esteroideas en humanos

Siendo difícilmente salvables las dificultades de la expresión de citocromos humanos en sistemas heterólogos se han empleado también citocromos bacterianos y fúngicos, en lugar de los citocromos de mamíferos, suponiendo una interesante alternativa para la producción de derivados esteroideos (Agematu *et al.*, 2006; Sugimoto *et al.*, 2008). Sin embargo en este caso, la dificultad para la expresión no radica solamente en el hecho -ya de por sí significativo- de ser un citocromo, sino en que además, en muchos casos, se conoce la capacidad de una bacteria u hongo para modificar el esteroide de interés, pero se desconoce el citocromo y la/s ferredoxina/ferredoxina reductasa que lleva/n a cabo dicha actividad.

2.3.1.2. CARACTERÍSTICAS, PROPIEDADES Y FUNCIONES

Los citocromos presentan unas propiedades espectroscópicas características debido al grupo hemo. Como se ha comentado, el grupo hemo se encuentra coordinado con los cuatro átomos de nitrógeno de la porfirina y el grupo tiolato de una cisteína altamente conservada evolutivamente (ligando proximal). La sexta posición de coordinación normalmente está ocupada por una molécula de agua (ligando distal) (Ortiz de Montellano, 2005), aunque algunos citocromos presentan dicha posición de coordinación libre (Rowland *et al.*, 2006). En su estado estacionario, el hierro del grupo hemo se encuentra en estado oxidado (Fe^{3+}). En presencia de un agente reductor, el hierro pasa del estado férrico (Fe^{3+}) al estado ferroso (Fe^{2+}), estado en el cual es capaz de unirse con el CO formando complejos Fe(II)-CO. Estos complejos presentan un espectro de absorción característico que presenta un máximo de absorción a 450 nm (por ello su designación como P450) (Klingenberg, 1958, Omura y Sato, 1962). Este pico de absorción denominado banda de Soret se debe a la naturaleza de su ligando proximal, la cisteína evolutivamente conservada con la que interacciona el hierro. Cuando se produce la protonación del tiolato de la cisteína y se transforma en un grupo tiol, los citocromos se inactivan y presentan un pico de absorción a 420 nm (Perera *et al.*, 2003, Dunford *et al.*, 2007).

La función clásica de los citocromos es catalizar la oxidación de compuestos orgánicos a través del grupo hemo, la cual consiste en la introducción de un átomo de oxígeno procedente del oxígeno molecular en el sustrato, que frecuentemente resulta en la hidroxilación del mismo, aunque existe gran diversidad de modificaciones posibles, mientras que el segundo átomo de oxígeno se reduce para formar una molécula de agua; siendo la estequiometría de la reacción:



Aunque las reacciones de hidroxilación son las más frecuentes, pueden catalizar un gran número de reacciones (*e.g.* epoxidaciones, desalquilaciones, desaminaciones, desmetilaciones, formación y ruptura de enlaces C-C) (Shyadehi *et al.*, 1996; Bernhardt, 2006; Isin y Guengerich, 2007; Ortiz de Montellano, 2010).

La mayoría de los sustratos de los P450s son compuestos hidrofóbicos, como por ejemplo ácidos grasos, terpenos, esteroides, prostaglandinas, compuestos aromáticos, y también gran número de drogas, solventes orgánicos, antibióticos, carcinógenos y toxinas (Urlacher y Girhard, 2012).

2.3.1.3. SISTEMAS REDOX

Para que se produzca la monooxigenación llevada a cabo por los citocromos es imprescindible la asistencia de proteínas redox que transfieran los dos electrones desde el NAD(P)H hasta el citocromo. Estas proteínas transportadoras de electrones constituyen los denominados sistemas redox de los citocromos, clasificados tradicionalmente en dos grupos: sistemas de dos y tres componentes y actualmente clasificados en tres debido al conocimiento de un tercer grupo: sistema monocomponente (Munro *et al.*, 2002; Munro *et al.*, 2007; Munro *et al.*, 2013).

a) Clase I (sistemas de tres componentes): constituidos por un ferredoxina (FdX) de unión a hierro y azufre, y una NAD(P)H ferredoxina reductasa (FdR) cuyo cofactor es FAD o FMN. La ferredoxina reductasa toma los electrones del NAD(P)H y los transporta a través de la coenzima FAD o FMN a la ferredoxina, que los transfiere directamente al citocromo P450 (Fig. I5.A). A esta clase pertenecen los citocromos bacterianos y los mitocondriales (adrenodoxina (AdX) y adrenodoxina reductasa (AdR)); siendo solubles los primeros, mientras que los segundos se encuentran anclados a membrana. La semejanza entre los sistemas bacterianos y mitocondriales es reflejo de la relación evolutiva entre las bacterias y las mitocondrias.

b) Clase II (sistemas de dos componentes): constituidos por una única proteína citocromo P450 reductasa (CRP) que presenta un dominio FAD y uno FMN y es la encargada de transferir los electrones desde el NAD(P)H hasta el citocromo (Fig. I5.B).

Los citocromos microsomales hepáticos son el ejemplo clásico de este grupo y se caracterizan porque ambas proteínas se encuentran ancladas a la membrana. También pertenecen a esta clase la mayoría de los citocromos fúngicos.

c) Sistemas monocomponente: constituidos por una proteína de fusión con dos dominios, un dominio citocromo P450 y un dominio citocromo P450 reductasa (CPR). El dominio CPR toma los electrones directamente del NAD(P)H y los transfiere al dominio P450 (Fig. I5.C). Son muy pocos los ejemplos conocidos de citocromos pertenecientes a esta clase.

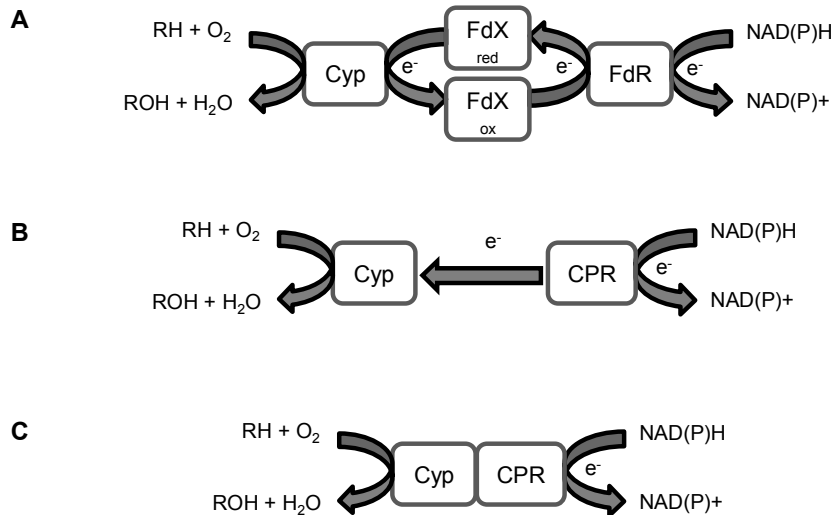


Figura I5 Sistemas de transporte de electrones desde el poder reductor hasta los citocromos P450.

A. Sistema de tres componentes. B. Sistema de dos componentes. C. Sistema monocompente.

Las flechas indican el sentido de la transferencia de electrones. FdR: ferredoxina reductasa; FdX: ferredoxina; Cyp: citocromo (P450); CPR: proteína citocromo reductasa.

2.4. BIOTRANSFORMACIÓN FÚNGICA DE COMPUESTOS ESTEROIDEOS

Desde el descubrimiento en 1952 de los efectos farmacológicos del cortisol y progesterona y la capacidad para producirlos por parte de varias cepas del género *Rhizopus* (Peterson *et al.*, 1952), son muchos los procesos de biotransformación de esteroides en los que los hongos han sido empleados como biocatalizadores (Liu *et al.*, 2006; Wuts *et al.*, 2008; Dewick, 2009; Faramarzi y Sadighi, 2013).

Con la finalidad de mejorar los rendimientos de producción, han sido muchas y muy valiosas las mejoras llevadas a cabo hasta nuestros días como por ejemplo mediante el empleo de medios acuosos con adición de facilitadores de la biotransformación, biocatalizadores inmovilizados, enzimas libres o inmovilizadas o de esporas como biocatalizadores; así como la mejora del propio sistema, empleando sistemas de dos fases, de nubes de puntos (*Cloud Point Systems*, CPS), con microemulsiones y liposomas, entre otras (Nassiri-Koopaei y Faramarzi, 2015). Sin embargo, las mejoras llevadas a cabo sobre el catalizador del proceso han sido muy limitadas.

Los hongos resultan de especial interés como biocatalizadores en procesos de biotransformación de compuestos esteroideos por la gran cantidad de modificaciones que son capaces de realizar sobre ellos y la promiscuidad en el rango de sustratos sobre el que son capaces de actuar. Se detallan a continuación algunas de las modificaciones que son capaces de realizar sobre compuestos de tipo esteroideo (Kristan y Rizner, 2012; Nassiri-Koopaei y Faramarzi, 2015):

a) 1,2-Esteroide deshidrogenasas: No se trata de una actividad ampliamente distribuida entre los hongos, sin embargo esta actividad oxidorreductasa está presente en algunas especies pertenecientes al género *Fusarium* y sólo es capaz de actuar sobre sustratos C19 (e.g., AD, testosterona, etc.) (Ahmed *et al.*, 1996).

b) 3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasas/ Δ^4 - Δ^5 isomerasas: Catalizan la oxidación e isomerización de precursores Δ^5 -3 β -hidroxiesteroides en Δ^4 -cetoesteroides. Se trata de una actividad presente en *Aspergillus tamarii*, capaz de actuar sobre multitud de sustratos y es una transformación de especial interés para la industria de esteroides ya que cataliza una reacción necesaria en la síntesis de todas las clases de hormonas esteroideas activas (Simard *et al.*, 2005; Hunter *et al.*, 2009).

c) 17 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasas: Se trata de una actividad ampliamente distribuida entre el reino de los hongos, presente en varios hongos filamentosos y en levaduras (Lanisnik *et al.*, 1992; Rizner *et al.*, 2001). Resulta de especial interés para la industria de esteroides ya que se emplea para la síntesis de andrógenos anabólicos (e.g., obtención de testosterona a partir de AD).

d) 3-Cetoesteroide reductasas. Se trata de una actividad ampliamente distribuida y esencial que restaura la hidroxilación en C3, implicada en la síntesis del ergosterol (Gachotte *et al.*, 1999).

e) 5 α -Esteroide reductasas: Catalizan la conversión de Δ^4 -3-cetoesteroides en 5 α -3-cetoesteroides. Presente en un amplio rango de especies pertenecientes al género *Penicillium* (Holland *et al.*, 1994). Resulta ser una transformación de especial interés para la industria de esteroides ya que cataliza la conversión de testosterona en 5 α -dihidrottestosterona (Cabeza *et al.*, 1999) y es empleado en la producción de esteroides anabólicos androgénicos (Kicman, 2008) y agonistas de los receptores GABA (Marx *et al.*, 2011).

f) 14-Esteroide reductasas: Se trata de oxidorreductasas capaces de catalizar la saturación en $\Delta^{14,15}$. Esta actividad está presente tanto en hongos filamentosos como en levaduras, participando en la síntesis del ergosterol (Prakash y Kasbekar, 2002).

g) 24-Esteroide reductasas: Se trata de una actividad descrita únicamente en levaduras, participando en el último paso de la síntesis del ergosterol (Zweytick *et al.*, 2000).

h) 4-Esteroide descarboxilasas: Catalizan la conversión del grupo metilo en ácido carboxílico, a su vez tiene actividad deshidrogenasa en C3. Son enzimas esenciales en *Saccharomyces cerevisiae* (Gachotte *et al.*, 1998) y *Candida albicans* (Aaron *et al.*, 2001) implicadas en la síntesis del ergosterol.

i) 4-Metilesteroide oxidasas: Catalizan la oxidación en C4, están implicadas en la síntesis del ergosterol. Presentes en *Penicillium chrysogenum* (Wang *et al.*, 2008), *Saccharomyces*

cerevisiae (Bard *et al.*, 1996) y *Candida albicans* (Kennedy *et al.*, 2000); se han identificado enzimas homólogas en especies de género *Aspergillus* y en *Neurospora crassa*.

j) 14 α -Esteroides desmetilasa: Se trata de un citocromo que lleva a cabo la primera reacción en la síntesis del ergosterol, catalizando primeramente la adición de un grupo metilo en C14, que pasa a alcohol y más tarde a aldehído (Bard *et al.*, 1993; Lees *et al.*, 1995). Se trata de una actividad descrita tanto en hongos (Warrilow *et al.*, 2008; Warrilow *et al.*, 2010) como en levaduras (Venkateswarlu *et al.*, 1997; Lamb *et al.*, 1998).

k) 24-Metilesteroides transferasa: Catalizan la adición de un grupo metilo en C24. Se han descrito en *S. cerevisiae* (Nes *et al.*, 1998) y en *Paracoccidioides brasiliensis* (Pereira *et al.*, 2010). Este tipo de enzimas están únicamente presentes en hongos y plantas.

l) 5-Esteroides desaturasas: Catalizan la formación de doble enlace en C5 de Δ^7 -esteroides, produciendo $\Delta^{5,7}$ -esteroides. Presentes en *S. cerevisiae* (Arthington *et al.*, 1991) *Schizosaccharomyces pombe* (Iwaki *et al.*, 2008) y *Candida glabrata* (Geber *et al.*, 1995), implicadas en la síntesis del ergosterol.

m) 22-Esteroides desaturasas: Se trata de un citocromo capaz de catalizar la desaturación Δ^{22} , con alta identidad con otros citocromos presentes en mamíferos (Skaggs *et al.*, 1996). Se ha descrito hasta el momento en *S. cerevisiae*, donde además de participar en la síntesis de ergosterol (Kelly *et al.*, 1995), se relaciona en la detoxificación de xenobióticos (Kelly *et al.*, 1997), y *C. glabrata* (Lamb *et al.*, 1999).

n) 8-Esteroides isomerasa: Catalizan el paso del doble enlace Δ^7 a Δ^8 . Ha sido descrita en *Magnaporthe grisea* (Keon *et al.*, 1994), *Ustilago maydis* (Keon *et al.*, 1994), *S. pombe* (Iwaki *et al.*, 2008) y *S. cerevisiae* (Ashman *et al.*, 1991), y es homóloga a la de humanos (Moebius *et al.*, 2003).

ñ) 17,20-Esteroides liasa: Cataliza la rotura del enlace C17-C20, descrita hasta el momento en *Nectria haematococca* (Ahmed *et al.*, 1996) lo que resulta de especial interés para la industria de esteroides ya que cataliza la conversión de 17 α -hidroxipregnenolona y 17 α -hidroxiprogesterona en DHEA y AD, respectivamente.

o) Hidroxilasas de esteroides: Se trata de la modificación más común en hongos que en la mayoría de los casos es llevada a cabo por citocromos capaces de catalizar la adición del grupo hidroxilo regio- y estereo-específicamente; además son enzimas de gran interés industrial ya que muchas de las formas activas de los compuestos esteroideos son formas hidroxiladas, siendo especialmente interesantes para la síntesis de corticosteroides, no sólo por la reducción del coste económico en la producción sino porque son capaces de llevar a cabo hidroxilaciones en posiciones en las que realizarlo químicamente resulta imposible o muy complicado (Mahato *et al.*, 1989; Fernandes *et al.*, 2003).

Hasta el momento se han descrito hidroxilasas capaces de llevar a cabo su función sobre las siguientes posiciones: 1 β , 2 β , 4, 5 α , 6 β , 7 α , 7 β , 9 α , 10 β , 11 α , 11 β , 12 α , 12 β , 14 α , 15 α , 15 β , 16 α , 17 α , 19, 22 y 26 (Kristan y Rižner, 2012; Nassiri-Koopaei y Famarzi, 2015); pudiendo hidroxilar una única posición, aunque no es común y normalmente se realizan varias de estas hidroxilaciones sobre el mismo sustrato.

Resultan de especial interés las hidroxilasas capaces de actuar sobre las posiciones 7 α , 11 α , 11 β y 14 α ; dada la importancia fisiológica de algunos esteroides hidroxilados en dichas posiciones.

a) La hidroxilación en posición 7 α es necesaria para la producción de los ácidos biliares (véase apartado 2.3.1.1) por lo que la producción de los mismos es necesaria para la terapia de reemplazo, pero también han sido demostradas las propiedades de compuestos 3 β -hidroxiesteroides hidroxilados en posición 7 α para la disolución de cálculos biliares de colesterol, como transportadores de medicamentos que deban ser procesados en el hígado o potenciadores de la absorción (Hofman, 1995; Enhnen *et al.*, 1998). Además de para la síntesis de esteroides fisiológicos también podría emplearse para la producción de moduladores inmunes (Cotillon y Morfin, 1999). La capacidad para hidroxilar en esta posición ha sido descrita en especies de los géneros *Acremonium*, *Gibberella*, *Fusarium* y *Nigrospora* (Lobastova *et al.*, 2009).

b) La hidroxilación en posición 11 α resulta necesaria para la obtención de glucocorticoides (véase apartado 2.3.1.1) que además de usarse en terapia sustitutiva poseen propiedades farmacológicas y son empleados como antiinflamatorios, inmunosupresores y anticonceptivos (Sambamurthy y Kar, 2006; Fernandes *et al.*, 2003). Esta actividad ha sido descrita en *N. haematococca* (Ahmed *et al.*, 1996) y en varias especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Rhizopus* (Fernandes *et al.*, 2003).

c) La hidroxilación en posición 11 β resulta necesaria para la transformación de DOC en corticosterona y de RSS en HC (véase apartado 2.3.1.1); así como para la obtención de otros corticoesteroides con importantes propiedades antiinflamatorias (Mahato y Garai, 1997). Esta actividad ha sido descrita en *C. lunatus* (Zuidweg *et al.*, 1962), *Absidia coerulea* (Chen *et al.*, 2007), *Cunninghamella blakesleeana* (Bhosale *et al.*, 2007), y varias especies pertenecientes al género *Trichoderma* (El-Kadi y Mostafa, 2004).

d) Los 14-hidroxi-5 β ,14 β -pregnano glucosilados en C3 son esteroides cardioactivos de gran interés farmacológico, es por tanto que la hidroxilación en posición 14 α resulta de especial interés. Esta actividad ha sido descrita en varias especies del orden *Mucorales* (Antoniou *et al.*, 1994; Genain y Azerad, 1995) y en *Cochliobolus lunatus* (Yaderets *et al.*, 2007).

A pesar del gran potencial de los hongos como biocatalizadores, de todas las modificaciones capaces de realizar sobre los esteroides y, en particular el gran número de hidroxilaciones descritas, en la actualidad sólo se emplean para la producción industrial los hongos con

capacidad hidroxilasa en las posiciones 11 α y 11 β ; siendo por tanto los procesos más estudiados.

Para la producción industrial de compuestos esteroideos hidroxilados en posición 11 α se emplean especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus* o *Rhizopus*; en particular *R. oryzae*, *A. ochraceus* y *R. nigricans*. Estos hongos son capaces de hidroxilar varios compuestos esteroideos en posición 11 α , aunque a su vez, los modifican o hidroxilan en otras posiciones, lo que hace descender drásticamente los rendimientos de producción. La optimización de los procesos ha sido ampliamente estudiada desde la década de los 70, habiendo conseguido mejorar los rendimientos notablemente.

La especie mayoritariamente empleada en los estudios ha sido *R. nigricans*, con la cual se han intentado producir diversos compuestos 11 α -hidroxilados: 17 α -etinilesteroides han sido testados concluyendo que no son sustratos que permitan dicha hidroxilación, ya que la etisterona es hidroxilada solamente en posición 7 β mientras que la noretisterona es hidroxilada en las posiciones 10 β y 6 β (Zakelj-Mavirc *et al.*, 1986); progesterona y derivados parecen ser los mejores sustratos obteniéndose, en diferente proporción según el compuesto, los correspondientes 11 α , 6 β y 7 β hidroxilados (Zakelj-Mavirc y Belic, 1987); testosterona y sus derivados, obteniéndose también los correspondientes 11 α , 6 β y 7 β hidroxilados (Zakelj-Mavirc y Belic, 1987); otros esteroides con cadena lateral han sido probados obteniéndose que sólo son sustrato aquellos con cadena lateral no polar con 2, 4 u 8 carbonos (Zakelj-Mavirc *et al.*, 1989).

Otra especie muy estudiada ha sido *Cochliobolus lunatus*, dado su potencial para la hidroxilación de esteroides en posición 11 β . Ha sido examinada la capacidad de *C. lunatus* para hidroxilar esteroides con cadena lateral obteniéndose que sólo son sustrato aquellos con cadena lateral no polar con 2, 4 u 8 carbonos (Zakelj-Mavirc *et al.*, 1990); también se ha estudiado detalladamente su capacidad para hidroxilar progesterona, obteniéndose que, además hidroxilarla en posición 11 β , es capaz de hacerlo en posición 14 α y 7 α , produciéndose los monohidroxilados correspondientes, así como el dihidroxilado en las posiciones 11 β y 14 α y las formas ceto de cada uno de los monohidroxilados y en posición 11 β en el dihidroxilado (Vitas *et al.*, 1994) y se ha tratado de mejorar la actividad empleando el propio esteroide que se pretende biotransformar u otro como inductor de la actividad 11 β -hidroxilasa con buenos resultados (Undisz *et al.*, 1992; Vitas *et al.*, 1995; Zakelj-Mavirc y Belic, 1991).

La gran versatilidad de estos biocatalizadores para las biotransformaciones esteroideas podría ser, sin embargo, la mayor debilidad de dicho sistema ya que, tal y como se ha detallado, las actividades de los hongos sobre los compuestos esteroideos son muy variadas, y tan solo una minoría de ellas resultan de interés en la producción de compuestos esteroideos de interés farmacológico y/o industrial; sin embargo estas actividades siguen estando presentes y son capaces de actuar sobre el sustrato de la biotransformación, sobre el producto de la misma o sobre ambos, lo cual deriva en pérdida de sustrato y/o de producto y la aparición de, en ocasiones, multitud de subproductos que además, pueden resultar difíciles de separar en la

recuperación del producto de interés por métodos convencionales; lo que podría explicar su limitado uso en la industria dado su amplísimo potencial.

Es por ello que, dada la imposibilidad de conseguir compuestos 11-hidroxiados sin la aparición de subproductos en los procesos de producción, han sido importantes los esfuerzos en identificar y expresar estas proteínas hidroxilasa de forma heteróloga en un hospedador incapaz de realizar modificaciones sobre estos esteroides.

Se ha tratado de aislar la enzima con capacidad 11 α -hidroxilasa *R. nigricans*, obteniéndose fracciones microsomales enriquecidas en la misma; con lo que se obtiene una preparación con mejor actividad específica (Bonnerjea *et al.*, 1988). Muy posteriormente, cuando ya se conocía que estas hidroxilasas eran citocromos la proteína CPR acompañante ha sido purificada y caracterizada (Makovec y Breskvar, 1998); pero la 11 α -hidroxilasa de *R. nigricans* nunca ha sido purificada.

El citocromo con actividad 11 α -hidroxilasa de *A. ochraceus* ha sido identificado mediante la expresión heteróloga en células de insecto de una genoteca de cDNA del mismo, y su actividad (medida en la fracción microsomal) ha sido obtenida en coexpresión con la CPR de *A. ochraceus* hallada por similitud con la ya identificada de *A. niger* o en coexpresión con una CPR humana (US7033807).

El citocromo con actividad 11 α -hidroxilasa y la CPR de *R. oryzae* han sido identificados mediante qRT-PCR y han sido expresadas heterológamente en *S. pombe*; su actividad ha sido medida *in vivo* en experimentos llevados a cabo con células en reposo identificándose los productos hidroxilados en posición 11 α y 6 β , así como otros no identificados, lo que permite concluir que un único citocromo es capaz de llevar a cabo las modificaciones mencionadas (Petric *et al.*, 2010; EP2308983; WO2011042143A1).

La enzima 11 β -hidroxilasa de *C. lunatus* ha sido ampliamente estudiada, realizándose purificaciones de la fracción microsomal mediante métodos clásicos obteniéndose la parte de la fracción microsomal que con actividad 11 β -hidroxilasa, no permitiendo concluir sin embargo, y debido a la metodología empleada, si las actividades hidroxilasas en las diferentes posiciones descritas en *C. lunatus* residen en un único citocromo o en varios (Zuidweg, 1968; Janig *et al.*, 1992). Se ha tratado de identificar el/los citocromo/s que portan dicha actividad empleando otras metodologías basadas en las diferencias en expresión génica en presencia de inductores (*suppression subtractive hybridization*, SSH) sin éxito (Berne *et al.*, 2008). Por tanto, a pesar de los trabajos llevados a cabo en este sentido y los esfuerzos realizados, hasta la fecha no se ha identificado el citocromo responsable de la actividad 11 β -hidroxilasa en *C. lunatus*.

Aunque la aproximación anteriormente mencionada no ha resultado exitosa, si se han llevado a cabo estrategias para mejorar los rendimientos de la producción con la ausencia o disminución de subproductos. En este sentido, existen mutantes conseguidos mediante exposición a N-metil-N-nitrosoguanidinio (NTG) con los que se consigue una mejora sustancial en la

producción de HC a partir de RSS, aumentándose la producción de la misma y, en algunos casos, reduciéndose la proporción en la que aparecen los subproductos (Paraszkiewicz y Długoński, 1998; Lu *et al.*, 2007).

De forma general y respecto a la mejora de estos biocatalizadores, se puede afirmar que apenas se han realizado aportaciones en la mejora genética de los organismos salvo las detalladas anteriormente, y la mayoría de las aproximaciones consisten en estrategias clásicas de mutación al azar y selección de mutantes con características mejoradas para la producción; lo que podría resultar sorprendente, sin embargo es comprensible ya que realizar mejora genética *ad hoc* en este tipo de microorganismos puede resultar complicado y acarrear largos procesos. Además, la estrategia de obtener organismos mejorados por mutación al azar, aunque culmine con la obtención de organismos mejores productores, no permite trabajar fuera del modelo clásico de “caja negra”, ya que no se sabe cuál ha sido la mutación responsable de dicha mejora o, como en la mayoría de estos casos suele ocurrir, existen multitud de mutaciones y se desconoce cuál es la que realmente es responsable de la mejora conseguida, lo que invalida cualquier posibilidad de realizar modelos metabólicos, diseños para la sobreexpresión de la ruta o control de determinadas condiciones del propio cultivo responsables de cambios metabólicos que alteren la formación del producto de interés.

2.5. BIOTRANSFORMACIÓN BACTERIANA DE COMPUESTOS ESTEROIDEOS

Las biotransformaciones *in vivo* de esteroides llevadas a cabo por bacterias representan un campo de investigación bien establecido en el área de la biotecnología blanca; probablemente debido a las ventajas que presentan las bacterias frente a otros posibles biocatalizadores, siendo una vez más el sistema por excelencia para la producción de compuestos de interés.

Desde la década de 1980, el uso de microorganismos para la síntesis de derivados de esteroides ha sido ampliamente estudiado, debido al gran número de modificaciones que son capaces de llevar a cabo sobre esteroides; aunque principalmente centrándose en las hidroxilaciones, la deshidrogenación en Δ^1 y la degradación de la cadena lateral (Mahato y Mukherjee, 1984; Mahato y Banerjee, 1985; Mahato *et al.*, 1989; Mahato y Majumdar, 1993; Mahato y Garai, 1997; Donova y Egorova, 2012).

A continuación se detallan algunas de las actividades enzimáticas capaces de realizar modificaciones sobre esteroides en bacterias (Donova, 2007; Donova y Egorova, 2012):

a) Degradación completa del esteroide: Algunas bacterias pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sterolibacterium*, entre otros son capaces de degradar total o parcialmente los esteroides ya que los usan como fuente de carbono y energía. En el caso de la degradación total son de interés para la destoxificación ambiental; pero en el caso de la degradación parcial, pueden resultar de especial interés industrial para la producción de sintonas C19 (e.g., AD, ADD, boldenona, testosterona, etc.) o C22 (metil- y carboxi-pregnanos).

b) 3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa y 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^4 - Δ^5 isomerasas: Catalizan la oxidación e isomerización de precursores Δ^5 -3 β -hidroxiesteroides en Δ^4 -cetoesteroides. Se trata de una actividad presente en multitud de especies pertenecientes a los géneros *Actinoplanes*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, etc. Se trata de una transformación de especial interés para la industria de esteroides ya que cataliza una reacción necesaria en la síntesis de todas las clases de hormonas esteroideas activas.

c) Hidrogenasas: Habitualmente se trata de las mismas enzimas con capacidad deshidrogenasas, que catalizan las reacciones en ambos sentidos. Destacan aquellas capaces de hidrogenar pregnanos en Δ^1 .

d) Epoxidasas. Algunas especies pertenecientes a los géneros *Nocardia* y *Corynebacterium* son capaces de epoxidar en posición 11 α .

e) Oxidasas: Además de las implicadas en la degradación del esteroide, se han descrito enzimas capaces de oxidar en posición 3 β (*Corynebacterium mediolani*) y 17 (*Mycobacterium*).

f) Hidroxilasas de ésteres: Son capaces de hidrolizar acetil-derivados. Se han descrito varias especies que poseen esta capacidad, pertenecientes a los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, etc.

g) Hidroxilasas: La hidroxilación, como ya se ha comentado, es una de las reacciones más importantes para la funcionalización de compuestos y es la modificación más común y ampliamente distribuida en bacterias. Al igual que en los hongos, en la mayoría de los casos es llevada a cabo por citocromos capaces de catalizar la adición del grupo hidroxilo regio- y estéreo-específicamente, con las ventajas anteriormente descritas.

Se han descrito hidroxilaciones en las posiciones: 1 α , 2 α , 6 β , 7 β , 9 α , 11 α , 11 β , 12 β , 15 α , 15 β , 16 α , 17 α y 19; así como en las posiciones 22, 23, 24 y 26, en estas últimas relacionadas con la degradación de la cadena lateral en actinobacterias.

Cabe destacar por su interés farmacológico e industrial las hidroxilaciones en las siguientes posiciones:

a) La hidroxilación en posición 7 de colesterol es llevada a cabo por *Proactinomyces* sp., desconociéndose hasta el momento la orientación de la misma; son varias las especies de bacterias que son capaces de hidroxilar en esta posición, son las pertenecientes a los géneros *Amycolatopsis*, *Glycomyces*, *Dactylosporangium*, *Nocardioopsis*, *Nonomurea*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora*, *Saccharothrix* y *Streptomyces*, hidroxilando tanto en α como en β , aunque mayoritariamente en esta última.

b) La enzima 9-cetoesteroide hidroxilasa es una de las más estudiadas en bacterias, y está ampliamente distribuida, estando presente en varias especies de los géneros *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium*.

c) Las hidroxilaciones en las posiciones 11 α y 11 β son poco frecuentes en bacterias y se trata de enzimas que catalizan dichas hidroxilaciones de forma muy poco eficiente. Se han descrito varias especies pertenecientes al género *Streptomyces* capaces de hidroxilar en posición 11 α , también se han descrito varias especies pertenecientes a las familias *Pseudonocardiaceae*, *Streptomycineae* y *Streptosporangineae* capaces de hidroxilar en posición 11 β .

Actualmente, como se ha detallado, casi todas las posiciones del núcleo esteroide se pueden funcionalizar mediante biotransformación bacteriana; sin embargo, las modificaciones más estudiadas, debido a su aplicabilidad industrial, son las llevadas a cabo por bacterias con capacidad hidroxilasa para las posiciones 7 α , 9 α , 11 α , 11 β , 16 α y 17 α , así como aquellas actividades implicadas en la degradación de la cadena lateral de esteroides para la producción de sintonas (Donova, 2007; Carballeira *et al.*, 2009; Donova y Egorova, 2012)

Al igual que ocurría con las biotransformaciones fúngicas, se conoce un gran número de bacterias con propiedades interesantes para la modificación de esteroides; sin embargo y en particular en el caso de las hidroxilaciones –no así en el caso de la degradación de la cadena lateral de esteroides- no son muchos los casos en que se conozcan las enzimas que las catalizan. Existen pocos ejemplos en la literatura en los que se estudien los citocromos que las llevan a cabo, aunque si se conocen algunos como el CYP106A2 de *Bacillus megaterium* capaz de hidroxilar la progesterona en posición 15 α (Zehentgruber *et al.*, 2010), el CYP110D1 de *Nostoc sp.* capaz de hidroxilar la testosterona en posición 15 β , los CYP200A1 de *Bradyrhizobium japonicum* y CYP127A3 de *Mesorhizobium loti* capaces de hidroxilar la testosterona en posición 11 β (Agematu *et al.*, 2006); aunque la producción ocurre con menores rendimientos que con enzimas de origen fúngico y con la aparición de subproductos resultan ser citocromos de gran interés que, a diferencia de los citocromos eucariotas, son solubles y pueden sobreexpresarse heterológicamente en bacterias modelos donde el estudio de los mismos sea más sencillo y donde sea posible llevar a cabo estrategias de evolución dirigida de proteínas con el fin de mejorar dichos rendimientos, así como la desaparición de subproductos.

El conocimiento de las bases genéticas y bioquímicas de las rutas de biotransformación de esteroides y de sus mecanismos de regulación en bacterias puede aportar a la industria enzimas con nuevas propiedades susceptibles de ser producidas, modificadas y mejoradas mediante técnicas de ingeniería de proteínas.

2.5.1. Las actinobacterias como chasis para biotransformaciones esteroideas

Actualmente se conoce un gran número de modificaciones llevadas a cabo por bacterias; sin embargo, como puede observarse en las actividades descritas anteriormente, no son muchos los géneros que poseen dichas actividades. Las actinobacterias son los biocatalizadores más

importantes y eficaces para la biotransformación de esteroides (Donova y Egorova, 2012), siendo capaces de llevar a cabo un gran número de las modificaciones anteriormente mencionadas: reacciones de deshidrogenación, oxidación de grupos hidroxilo (3β y 17β), isomerización del doble enlace (Δ^5 a Δ^4), hidrogenación (Δ^1 y Δ^4), reducción de grupos ceto a alcoholes (C17 y C20), desacetilación (C21) y la hidroxilación en varias posiciones (9α , 6β , 11α , 11β , 14α , 16α), así como la degradación completa o parcial de la cadena lateral (Donova, 2007).

La explicación al gran número de modificaciones capaces de realizar sobre compuestos esteroideos tiene su explicación en que muchas de estas actinobacterias son capaces de emplearlos como fuente de carbono y energía hasta su degradación total; de ahí la importancia de la caracterización de las rutas de degradación de esteroides en estas bacterias ya que facilitará el empleo de procedimientos de ingeniería metabólica para la modificación, el control y/o la ampliación de las capacidades degradativas de diversas cepas bacterianas. Este conocimiento ampliará el potencial biotecnológico de las diversas cepas en la producción industrial de compuestos esteroideos.

Dado que estas bacterias son empleadas actualmente como biocatalizadores en la industria para la producción de esteroides y el interés por la gran versatilidad metabólica de las mismas, han sido muchos los estudios para mejorar estos microorganismos siendo el primer ejemplo de aplicación de la ingeniería metabólica a la producción de esteroides la supresión de genes de la ruta catabólica del colesterol, en concreto los genes *kstD1* y *kstD2* que codifican la 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa de *Rhodococcus erythropolis* (Van der Geize *et al.*, 2000; WO2001031050A1; WO2003070925A2), y que se ha reivindicado como una herramienta genética para producir 9-OH-AD a partir de colesterol (Fig. I6)

Más recientemente, se han estudiado enzimas homólogas a las anteriores en cepas del género *Mycobacterium* (Brzostek *et al.*, 2005) y se han desarrollado mutantes para la producción de sintonas C19 (Andor *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2011). Se han desarrollado mutantes de *Mycobacterium smegmatis* mc²155, una bacteria de crecimiento rápido y modificable genéticamente, en los que se bloquea la ruta de degradación del colesterol o fitosteroles, para la producción de sintonas: ADD (*M. smegmatis* mc²155 Δ 6039) y AD (*M. smegmatis* mc²155 Δ 6039 Δ 5941) (ES P201430272, WO2015128534 A1; Galán *et al.*, artículo en preparación) (Fig. I6)

Por todo lo mencionado las actinobacterias pueden ser un chasis adecuado para la biotransformación de esteroides; pero la gran versatilidad para la modificación de esteroides resulta ser, una vez más, la mayor ventaja que es a su vez la mayor debilidad del chasis, ya que existen muchas enzimas capaces de llevar a cabo modificaciones no deseadas sobre los sustratos de la reacción, los productos o sobre ambos.

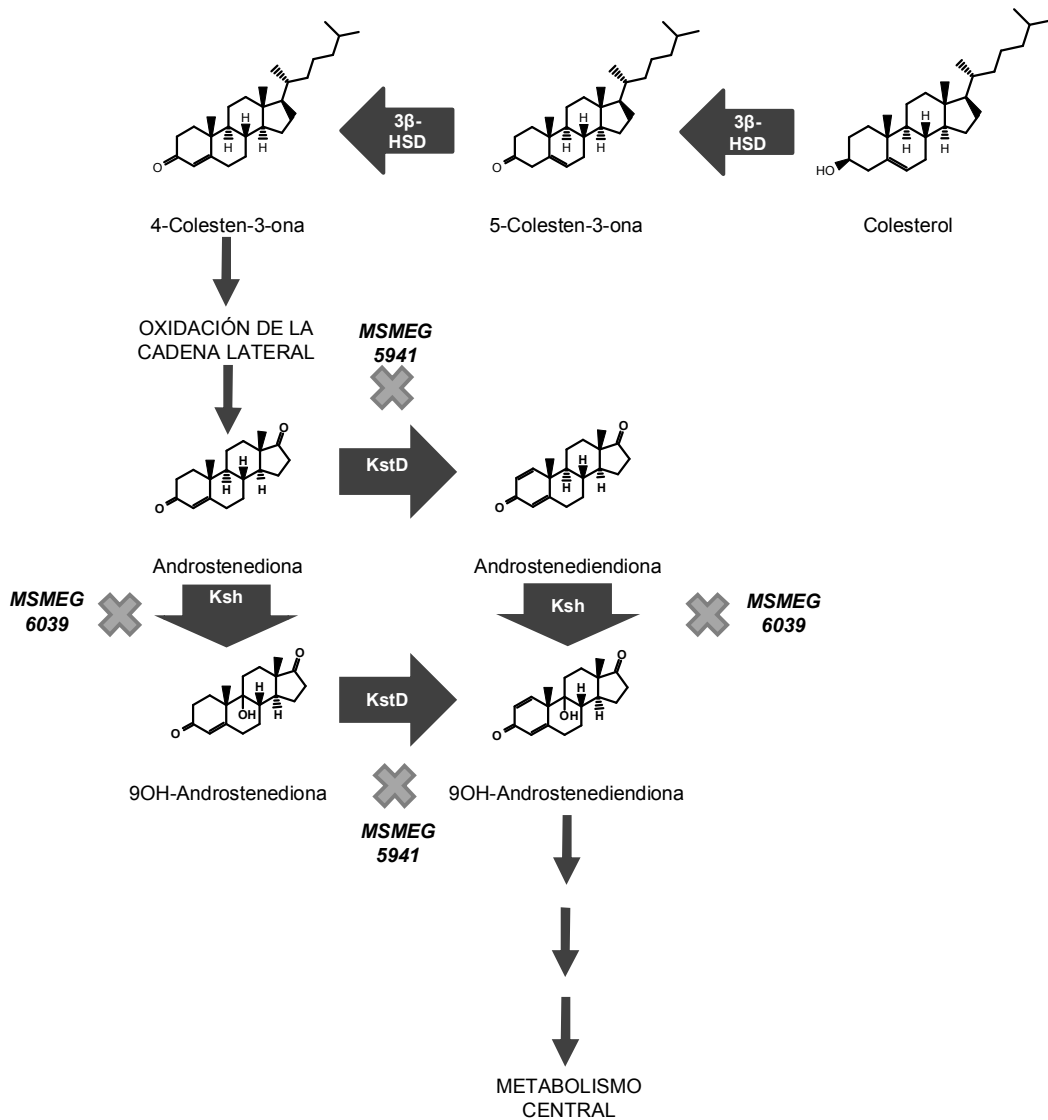


Figura I6 Ruta de degradación del esteroides. Se muestran las enzimas que codifican cada reacción y los mutantes que bloquean dicha ruta indicados con cruces. Las flechas consecutivas indican un proceso multienzimático.

En este sentido han sido estudiadas otras estrategias basadas en transferir dichas capacidades metabólicas a hospedadores incapaces de realizar modificaciones a los compuestos esteroideos de interés. Además, este hospedador debe ser lo más semejante posible para así garantizar la correcta expresión de las rutas transferidas y deben existir herramientas para su manipulación y modificación genética. El hospedador propuesto hasta la fecha para tal fin ha sido *Corynebacterium glutamicum* R31 (Tesis Doctoral García-Fernández, 2015; García-Fernández *et al.*, artículo en preparación).

C. glutamicum es una actinobacteria ampliamente estudiada por su uso como productor industrial de aminoácidos, motivo por el cual existen hoy en día numerosas herramientas moleculares para su modificación. De hecho a partir de su descubrimiento, el espectro de producción de *C. glutamicum* ha sido ampliado en las últimas décadas a diferentes químicos, materiales y fueles mediante múltiples estrategias de ingeniería metabólica (Becker *et al.*,

2012). Además cabe destacar que pese al gran parecido filogenético con *Mycobacterium*, esta bacteria es incapaz de utilizar colesterol como única fuente de carbono y energía, ya que carece de la mayoría de los genes relacionados con el catabolismo de esteroides pero es capaz de transportar esteroides sin cadena lateral (Tesis Doctoral García-Fernández, 2015; García-Fernández *et al.*, artículo en preparación). Su genoma está secuenciado y ha sido ampliamente estudiado, llegándose a convertir en un chasis para las biotransformaciones industriales, consiguiéndose mediante deleciones, una bacteria con un genoma mínimo (Unthan *et al.*, 2014) con características que la convierten en una plataforma ideal para este tipo de biotransformaciones como son la multitud de herramientas moleculares para su manipulación, la robustez y el vigor metabólico (de Lorenzo, 2015).

2.5.2. Uso de bacterias recombinantes en la producción de compuestos esteroideos y expresión de citocromos

Aunque la ingeniería genética es una herramienta muy utilizada desde hace más de 40 años para mejorar el rendimiento de los procesos de biotransformación, y aunque la biotransformación de esteroides se comenzó a desarrollar hace más de 60 años, es sorprendente los procesos para la biotransformación de esteroides se realicen actualmente a escala industrial con organismos no recombinantes. Sin embargo, a nivel académico si han sido numerosos los esfuerzos por conseguir cepas recombinantes que expresen las enzimas o rutas metabólicas de interés para la biotransformación de esteroides.

En lo que concierne a la clonación de genes para crear cepas bacterianas recombinantes para la biotransformación de esteroides, el primer ejemplo fue la clonación en *Escherichia coli* de la 17 α -hidroxilasa microsomal bovina (P450 17a) (Barnes *et al.*, 1991), seguida de la clonación del citocromo bovino P450C17 también en *E. coli* para hidroxilar la misma posición progesterona y pregnenolona, (Shet *et al.*, 1997).

Como ya se ha mencionado, el CYP106A2 de *B. megaterium* se ha expresado junto con la adrenodoxina, la adrenodoxina reductasa y la aldolasa de *Lactobacillus brevis* como sistema regenerador de NADPH en *E. coli* para la hidroxilación de la progesterona en posición 15 (Zehentgruber *et al.*, 2011). Este mismo citocromo había sido expresado unos años antes de manera similar en *E. coli* (Hannemann *et al.*, 2006) y en *Pseudomonas putida* S12, que es tolerante a solventes (Ruijssenaars *et al.*, 2007).

El gen *ksaD* de la 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa de *Arthrobacter simplex* ha sido expresado en *B. subtilis* para transformar el AD en ADD (Li *et al.*, 2007) han expresado. Así como la KsD soluble de *Aspergillus fumigatus* ha sido expresada en *E. coli* y en la levadura *Picchia pastoris*, si bien solo en esta última parece rentable para la producción de ADD (Chen *et al.*, 2012).

Se han desarrollado varios sistemas para la producción de 1,25-dihidroxitamina D₃ y análogos de la vitamina D expresando los citocromos CYP27B1 y CYP24 en *E. coli* junto con la

adrenodoxina reductasa y la adrenodoxina (Sakaki *et al.*, 1999) o expresando el CYP VDH de *Pseudonocardia autotrophica* junto con los genes *aciB* y *aciC* de la ferredoxina y la ferredoxina reductasa de *Acinetobacter sp* OC4, respectivamente, en un mutante *tolC* de *E. coli*, demostrando que este mutante facilita la biotransformación (Fujii *et al.*, 2009).

En levaduras también se han clonado y expresado distintos citocromos para la biotransformación de esteroides (Dumas *et al.*, 1996; Bureik *et al.*, 2002; Szczebara *et al.*, 2003; Dragan *et al.*, 2005; Dragan *et al.*, 2006; Hakki *et al.*, 2008; Petric *et al.*, 2010; Naumann *et al.*, 2010), entre ellos se ha expresado el CYP11B1 humano junto con la adrenodoxina y adrenodoxina reductasa bovina, obteniéndose compuestos hidroxilados en posición 11 β de interés farmacológico (Hakki *et al.*, 2008). En una línea de trabajo diferente, se ha obtenido una levadura capaz de producir esteroides a partir de galactosa (Duport *et al.*, 1998), potencialmente se podrían producir pregnenolona y progesterona mediante unas pocas modificaciones del metabolismo normal de esteroides del microorganismo. Sin embargo, esta opción de biosíntesis por levaduras aún no se utiliza industrialmente.

Una de las limitaciones de estas bacterias recombinantes es la baja expresión de las proteínas recombinantes, en su mayoría citocromos. Una posible explicación es que la mayoría de estas proteínas eucariotas son insolubles ya que se encuentran asociadas a membrana y la estructura adecuada nunca llega a conseguirse (Scott *et al.*, 2016). Aunque gracias a la ingeniería genética y de proteínas ha sido posible el desarrollo de sistemas de expresión bacterianos que permitieran la producción eficiente de P450s eucariotas mediante diversas estrategias consistentes en la modificación de los extremos N-terminal de la secuencia de las proteínas, la coexpresión de las chaperonas GroEL y GroES, o la fusión de los cDNAs de los P450s eucariotas a péptidos señal bacterianos (Urlacher *et al.*, 2012; Ichinoise y Wariishi, 2013; Schiffer *et al.*, 2015) la producción continúa siendo poco eficaz, por lo que se ha recurre al empleo de levaduras como sistemas de expresión, también con capacidad limitada para la expresión de citocromos o de sistemas citocromo y redox (Dumas *et al.*, 2006), o la búsqueda de nuevos citocromos solubles capaces de llevar a cabo la modificación de interés.

En general, aunque actualmente la productividad para la biotransformación de esteroides de interés industrial ha logrado incrementarse en las cepas recombinantes aún no se dispone de biocatalizadores eficientes para aplicaciones en la industria de esteroides, pero sin duda los estudios realizados al respecto suponen una prueba de concepto y un gran avance para su desarrollo en un futuro próximo (Donova y Egorova, 2012). La evolución esperable pasa no solo por la mejora genética de los biocatalizadores, que llegarán a ser más estables y más eficientes, sino que gracias a la expresión heteróloga eficaz y mediante evolución dirigida se podrá llegar al desarrollo de actividades enzimáticas capaces de realizar la bioconversión con una elevada selectividad, eliminando los subproductos.

IV. Objetivos

La producción de esteroides resulta de gran interés para el sector farmacéutico debido al amplio rango de actividades terapéuticas que poseen estas moléculas, utilizadas para tratar y prevenir enfermedades en distintos campos clínicos tan relevantes como los de la endocrinología, la oncología, la reumatología o la ginecología entre otros.

Actualmente, estos compuestos se producen por síntesis química o mediante su combinación con procesos de biotransformación microbiológicos, presentando estos últimos interesantes ventajas pero también algunos inconvenientes que han de ser reducidos.

Los biocatalizadores empleados en las biotransformaciones son bacterias y hongos capaces de realizar las modificaciones químicas oportunas en estas moléculas dando lugar al compuesto de interés; pero también pueden realizar modificaciones colaterales dando lugar a otros subproductos que hacen descender los rendimientos de producción.

En general estas biotransformaciones se realizan partiendo de sintonas previamente sintetizadas o de materias primas de bajo coste como el colesterol o los fitosteroles.

A pesar del enorme conocimiento actual en las tecnologías de ingeniería genética y metabólica, apenas se han realizado aportaciones en este sentido para la mejora genética de los biocatalizadores empleados en la industria de los esteroides. Esto es en parte comprensible, ya que realizar mejoras genéticas dirigidas en estos microorganismos es complicado.

Por ello el desarrollo de nuevos procesos de producción de compuestos esteroideos de interés farmacológico e industrial utilizando biocatalizadores modificados mediante técnicas de ingeniería genética ha sido el objetivo principal de esta Tesis Doctoral.

Teniendo en cuenta la relevancia de la producción de los esteroides por biotransformación y asumiendo que los microorganismos empleados como biocatalizadores hasta la fecha están poco optimizados, resulta de gran interés la posibilidad de aplicar las modernas tecnologías de la ingeniería metabólica y la biología sintética para obtener microorganismos más eficientes que los actuales. Por este motivo el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se ha centrado en la mejora de la producción de esteroides 11α - y 11β -hidroxilados farmacológicamente activos.

Para cumplir este propósito se definieron dos objetivos principales:

Objetivo 1. Producción de esteroides 11 α -hidroxilados de interés farmacológico e industrial a partir de sintonas y de materias primas de bajo coste, como colesterol y fitosteroles.

Para la producción de estos esteroides 11 α -hidroxilados se definieron los siguientes objetivos parciales:

1.1. Producción de sintonas 11 α -hidroxiladas a partir de materias primas de bajo coste: Producción de 11 α OH-ADD y 11 α OH-AD.

1.2. Producción de esteroides 11 α -hidroxilados de interés farmacológico.

Objetivo 2. Producción de esteroides 11 β -hidroxilados de interés farmacológico e industrial a partir de sintonas y de materias primas de bajo coste, como colesterol y fitosteroles.

Para la producción de estos esteroides 11 β -hidroxilados se definieron los siguientes objetivos parciales:

2.1. Identificación del sistema CYP-CPR responsable de la actividad 11 β -hidroxilasa en *Cochliobolus lunatus*.

2.2. Ensayos de biotransformación en bacterias: Producción de esteroides 11 β -hidroxilados de interés farmacológico.

2.3. Producción de sintonas 11 β -hidroxiladas a partir de materias primas de bajo coste: Producción de 11 β OH-ADD y 11 β OH-AD.

V. Materiales y Métodos

1. MICROORGANISMOS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

Las cepas bacterianas y fúngicas utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla MM1 junto con sus genotipos y características relevantes.

Los plásmidos empleados para clonaje, mutación y expresión génica, junto con sus características más relevantes se muestran en la Tabla MM2.

Todos los oligonucleótidos empleados fueron adquiridos en Sigma-Genosys y se muestran en la Tabla MM3, donde se indica su secuencia y la aplicación de los mismos en el presente trabajo.

Tabla MM1 Cepas

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	<i>epf</i> ¹ , mutante mc ² 6 eficiente para electroporación	Snapper <i>et al.</i> , 1990
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155 Δ6039	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_6039</i> delecionado	CECT8331
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155 Δ6039Δ5941	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con los genes <i>MSMEG_6039</i> y <i>MSMEG_5941</i> delecionados	CECT8332
<i>Corynebacterium glutamicum</i> R31	MeLis ^R , Aec ^R eficiente para electroporación	Santamaria <i>et al.</i> , 1985
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F, <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), <i>f80ΔlacZDM15</i> Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara, leu</i>) 7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> , λ	Invitrogen
<i>Cochliobolus lunatus</i>	Cepa tipo	CECT2130
<i>Rhizopus oryzae</i>	Cepa tipo	FGSC9543

Tabla MM2 Plásmidos

Plásmido	Descripción	Referencia
pMV261	Vector de expresión en micobacterias, bajo el control del promotor <i>P_{Hsp60}</i> , Km ^R	Stover <i>et al.</i> , 1991
pMVFUN	Vector pMV261 que contiene el operón FUN	Este trabajo
pMVFAN	Vector pMV261 que contiene el operón FAN	Este trabajo
pECXK-99E	Vector bifuncional <i>E. coli</i> / <i>C. glutamicum</i> , que contiene el gen <i>lacI^q</i> , Km ^R	Kirchner y Tauch, 2003
pXKFUN	Vector pECXK-99E que contiene el operón FUN	Este trabajo
pXKFAN	Vector pECXK-99E que contiene el operón FAN	Este trabajo
pXKFAN.1	Vector pECXK-99E que contiene el operón FAN.1	Este trabajo
pXKFIN	Vector pECXK-99E que contiene el operón FIN	Este trabajo
pXK64795	Vector pECXK-99E que contiene el transcrito CPR64795 de <i>C. lunatus</i>	Este trabajo

Tabla MM3 Oligonucleótidos

Oligonucleótido	Secuencia	Aplicación
pMV4260 F	TTGCCGTCACCCGGTGACC	Secuenciación plásmido pMV261
pMV4486 R	ATCACCGCGGCCATGATGG	Secuenciación plásmido pMV261
pXK6906 F	CGACATCATAACGGTTCTGG	Secuenciación plásmido pECXK-99E
pXK118 R	TTTATCAGACCGCTTCTGC	Secuenciación plásmido pECXK-99E
RoCPR1Int F1	TTCAAGATCGAAGAAGTACG	Secuenciación operón FUN
RoCPR1Int F2	CGGTGTGAACACCAACTACC	Secuenciación operón FUN
Cyp509C12 IntF1	CATCTTGAACATCTTCGGTCC	Secuenciación operón FUN
GAPDH F2	GACGGCAACAACCTGACT	RT-PCR, amplificación de gen control
GAPDH R2	CAGTGCTGCTGGGAATGA	RT-PCR, amplificación de gen control
116182 F	GAGACCTTGAAACCTTCAACTGG	RT-PCR, amplificación de gen 116182
116182 R	GCATTCACACAGCGTGATGG	RT-PCR, amplificación de gen 116182
116182 F2	GCATTCGGTTCCTCGTTCC	RT-PCR, amplificación de gen 116182
116182 R2	GCAATGAGGCAGGATCATAGC	RT-PCR, amplificación de gen 116182
116182 F3	CACTTTGATATTGCTTGCCACC	RT-PCR, amplificación de gen 116182
116182 R3	ACCTTCTTCGTTCCGGATAGC	RT-PCR, amplificación de gen 116182
51519 F	CAACTCAATCCCCATCTTCC	RT-PCR, amplificación de gen 51519
51519 R	AGTCCTCCATAGAGGATCTCTCG	RT-PCR, amplificación de gen 51519
51519 F2	GTCATCGATCCAATCGTACAGG	RT-PCR, amplificación de gen 51519
51519 R2	TTTCATGATCGCAGATATCAGC	RT-PCR, amplificación de gen 51519
51519 F3	TGATATGATTAGCTGGGTTGACG	RT-PCR, amplificación de gen 51519
51519 R3	CCTTCATCGCACTATCAAGTAGC	RT-PCR, amplificación de gen 51519
115117 F	ATCACTTATGGACGGCTCTAGC	RT-PCR, amplificación de gen 115117
115117 R	GAAATCTTGTCGAAGTAGCTCTCG	RT-PCR, amplificación de gen 115117
103168 F	GGACCGAAGTCAACATCAACG	RT-PCR, amplificación de gen 103168
103168 R	GTGCTTCTCGCGTGCACG	RT-PCR, amplificación de gen 103168
135200 F	CCAATTGTGAAGACTGGACACC	RT-PCR, amplificación de gen 135200
135200 R	CGTCTCTTCTCGCCTTGG	RT-PCR, amplificación de gen 135200
135200 F2	GTCATCGCTCAGATTATTCAAGC	RT-PCR, amplificación de gen 135200
135200 R2	CGTATCCTTACGATAGAGTGC	RT-PCR, amplificación de gen 135200
135200 F3	TGAATTGCTCACGACTATTGTGG	RT-PCR, amplificación de gen 135200
135200 R3	GGAGGCGAGCTTCTACAACC	RT-PCR, amplificación de gen 135200
34615 F	GTTGTCATACCGCCAAGTCCG	RT-PCR, amplificación de gen 34615
34615 R	GCTTAATCCAATTCTCTGTGTCTG	RT-PCR, amplificación de gen 34615
31052 F	CAACGCAGAGCGAGACTATCC	RT-PCR, amplificación de gen 31052
31052 R	CACAGAAGGCTCCATTAATTGTC	RT-PCR, amplificación de gen 31052
56034 F	GAGCGAGCTTCATCATCTTACC	RT-PCR, amplificación de gen 56034
56034 R	TTCGTTCAATGCGGAGAGC	RT-PCR, amplificación de gen 56034
64795 F	GCACAAGCTCGAAGAGAACG	RT-PCR, amplificación de gen 64795
64795 R	TTCTTGGTATTGGTTTCAAGC	RT-PCR, amplificación de gen 64795
128465 F	GAGGAATTGGAAATAGTGACAGC	RT-PCR, amplificación de gen 128465
128465 R	GACATCAGCCCTCCACTTCC	RT-PCR, amplificación de gen 128465
128465 F2	GCAAGAAAGTCGGTTCGCATT	RT-PCR, amplificación de gen 128465
128465 R2	CCAACATCTCCAATACTTGATCC	RT-PCR, amplificación de gen 128465

Oligonucleótido	Secuencia	Aplicación
128465 F3	CACTGTTACCGTTCTCGTGG	RT-PCR, amplificación de gen 128465
128465 R3	GCAGCAATGAGAATGAGTGG	RT-PCR, amplificación de gen 128465
59830 F	GTCCAAGATCTCCTTCGACAGC	RT-PCR, amplificación de gen 59830
59830 R	CCATGTTTCTTGTCTATACCGTCC	RT-PCR, amplificación de gen 59830
64795 EcoRIF	CCGGAATTCTGACCTGAGAGAAAGGG AGTGATAAATGGCACAACCTCGACACG C	Amplificación del gen 64795 para su posterior clonación
64795 XbaIR	GCTCTAGATTATCATGACCAGACGTC TTCCTG	Amplificación del gen 64795 para su posterior clonación
59830 EcoRIF	CCGGAATTCTGACCTGAGAGAAAGGG AGTGATAAATGTCTGCCCTGCAGCAG C	Amplificación del gen 59830 para su posterior clonación
59830 XbaIR	GCTCTAGATTACTACCATGTTTCTTGT CTATACCGTC	Amplificación del gen 59830 para su posterior clonación
103168 BglXbaMunF	GAAGATCTTCTAGACAATTGTGACCT GAGAGAAAGGGAGTGATAAATGGATC CCCAGACTGTCCG	Amplificación del gen 103168 para su posterior clonación
103168-1 BglXbaMunF	GAAGATCTTCTAGACAATTGTGACCT GAGAGAAAGGGAGTGATAAATGGTCC TCCTTGCGGTATGG	Amplificación de la versión truncada en 5' del gen 103168 para su posterior clonación
103168 XhoR	CCGCTCGAGTTACTACACTACCACTC TCTTGAAAGC	Amplificación del gen 103168 para su posterior clonación
64795 F2	AATCAGCATTGCTGGCTCC	Secuenciación de los operones FAN y FAN.1
64795 F3	CTCCAACCTCAAGCTTCCTTCG	Secuenciación de los operones FAN y FAN.1
64795 F4	AATACGTCGCTTTCGGTCTCG	Secuenciación de los operones FAN y FAN.1
59830 F2	GGTATTGATGGCTCGTTCCTCC	Secuenciación de los operones FAN y FAN.1
59830 F3	CTCTACGACTACACAACACGTCC	Secuenciación de los operones FAN y FAN.1

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121 °C y 1 atm de presión, o mediante filtración utilizando filtros estériles *Millipore* de 0.2 µm de diámetro.

2.1. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO EMPLEADOS PARA *E. coli*

Los medios ricos utilizados para cultivar las células de *E. coli* fue el medio *Lysogenic Broth* (LB) (Sambrook *et al.*, 2001). Los cultivos en medio sólido se realizaron con medio LB al que se añadió *Bacto Agar* (Pronadisa) al 1.5 % (p/v).

En caso de ser necesario se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones finales: ampicilina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$), kanamicina ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), cloranfenicol ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Las células de *E. coli* se cultivaron a 37°C . Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en un agitador orbital a 250 rpm. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm (DO_{600}) empleando un espectrofotómetro UVMini-1240 (Shimadzu).

2.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO EMPLEADOS PARA *M. smegmatis*

Para el cultivo de micobacterias se utilizaron los medios ricos *Bacto Middlebrook 7H10 Agar* (7H10) (Difco) como medio sólido, y *Middlebrook 7H9 Broth* (7H9) (Difco) como medio líquido.

Los medios 7H9 y 7H10 fueron suplidos con 0.2 % (v/v) de glicerol y 10 % (v/v) de *Middlebrook ADC Enrichment* (ADC) (Difco) (7H9/Gli/ADC y 7H10/Gli/ADC).

En todos los cultivos en medio líquido se añadió 0.05 % (v/v) de Tween80 (Sigma) previamente autoclavado para evitar la agregación de las células (7H9/Gli/ADC/Tween).

En caso de ser necesario se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones: kanamicina ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) y gentamicina ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Las células de *M. smegmatis* se cultivaron a 37°C . Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en un agitador orbital a 250 rpm. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm (DO_{600}) empleando un espectrofotómetro UVMini-1240 (Shimadzu).

2.3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO EMPLEADOS PARA *C. glutamicum*

Para el cultivo de corinebacterias se utilizaron los medios ricos *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Difco) como medio sólido y *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Difco) como medio líquido.

En caso de ser necesario se añadió kanamicina ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Las células de *C. glutamicum* se cultivaron a 30°C . Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en un agitador orbital a 250 rpm. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm (DO_{600}) empleando un espectrofotómetro UVMini-1240 (Shimadzu).

2.4. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO EMPLEADOS PARA *C. lunatus* Y *R. oryzae*

Para el cultivo de *C. lunatus* se utilizaron los medios ricos *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Difco) como medio sólido y medio 7 (M7) (glucosa (10 g l^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (2 g l^{-1}), (1 g l^{-1}), KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.50 g l^{-1}), KCl (0.50 g l^{-1}), extracto levadura (1 g l^{-1}) $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (0.10 mg l^{-1}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.01 mg l^{-1}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05 mg l^{-1}), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.01 mg l^{-1}), $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (0.07 mg l^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.01 mg l^{-1}); pH 5.1) como medio líquido.

Las células de *C. lunatus* se cultivaron a 28 °C. Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo mediante siembra de esporas en un agitador orbital a 250 rpm.

2.5. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS Y FÚNGICAS

Durante periodos inferiores a un mes las cepas se conservaron a 4 °C en placas de LB, 7H10/Gli/ADC, TSA o PDA.

Para su conservación a largo plazo las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en LB con los antibióticos correspondientes y congeladas a -80 °C con 20 % (v/v) de glicerol.

Las cepas de *C. glutamicum* fueron cultivadas en TSB con los antibióticos correspondientes y congeladas a -80 °C con 20 % (v/v) de glicerol.

Las cepas de *M. smegmatis* fueron cultivadas en medio 7H9/Gli/ADC/Tween con los antibióticos correspondientes y congeladas a -80 °C con 50 % (v/v) de glicerol.

Las cepas de *C. lunatus* y *R. oryzae* fueron cultivadas en PDA y las esporas fueron recogidas con 10 % (v/v) de glicerol congeladas a -80 °C.

3. EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA GENÉTICA

3.1. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *E. coli*

Las células de *E. coli* fueron modificadas genéticamente por transformación tras hacerlas competentes mediante el método de RbCl y choque térmico (Sambrook *et al.*, 2001).

3.2. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *M. smegmatis*

3.2.1. Preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis*

La preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis* se llevó a cabo según un protocolo previamente descrito (Parish y Stoker, 1998). Se parte de un preinóculo en fase estacionaria (aproximadamente 30 h) (10 ml en matraz de 100 ml) en medio 7H9/Gli/ADC/Tween. Se inocula medio fresco con DO₆₀₀ 0.01 (200 ml 7H9/Gli/ADC/Tween en matraz de 1l) y se incuba en agitación (200 rpm) a 30 °C hasta una DO₆₀₀ de 0.8 - 1 (18 h de cultivo aproximadamente). A continuación el cultivo se mantiene 1.5 h en hielo y se centrifuga en 4 tubos cónicos de 50 ml a 3000 x *g* a 4 °C durante 10 min. Una vez decantado el sobrenadante, se resuspenden las células volteando gentilmente en 200 ml de una solución 10 % (v/v) de glicerol y 0.05 % (v/v) de Tween-80 (Gli/Tween) enfriada en hielo. Seguidamente se centrifuga la suspensión de células, se retira el sobrenadante y se resuspenden de nuevo en 100 ml de la misma solución Gli/Tween. Tras un tercer paso de centrifugación se añaden 25 ml de Gli/Tween. Las células se resuspenden volteando y se dejan reposar para sedimentar los

agregados. Posteriormente se toma la suspensión sin los agregados con una pipeta estéril. La suspensión se lleva a un tubo cónico limpio enfriado en hielo y se centrifuga. Finalmente se retira el sobrenadante, las células se resuspenden en 1.5 ml de Gli/Tween frío y se reparten en alícuotas de 200 μ l que se guardan a -80 °C hasta su uso.

3.2.2. Transformación de células de *M. smegmatis* mediante electroporación

A una alícuota de 200 μ l de células electrocompetentes se le añade 1 μ g del DNA con el que se van a transformar. Esta mezcla se deposita en una cubeta de electroporación (*Cell Projects*, 50 x 2 mm) y se incuba durante 10 min en hielo. A continuación se electropora en un electroporador *Gene Pulser* (Biorad) a 2.5 kV, 25 μ F y 1000 Ω y se incuba la cubeta en hielo otros 10 min. Posteriormente se añade 1 ml de medio 7H9/Gli/ADC/Tween a la cubeta y el líquido se pasa a un tubo cónico de 15 ml. Las células se incuban 4 h a 37 °C en agitación (250 rpm) antes de sembrarlas en medio sólido 7H10/Gli/ADC con los antibióticos necesarios.

3.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *C. glutamicum*

3.3.1. Preparación de células electrocompetentes de *C. glutamicum*

Para la preparación de las células se parte de un preinóculo en fase estacionaria (aproximadamente 30 h) (10 ml de medio en un matraz de 100 ml) en medio TSB. Se inocula el medio fresco con una DO_{600} 0.01 (200 ml TSB en matraz de 1 l) y se incuba en agitación (200 rpm) a 30 °C hasta una DO_{600} de 1.2-1.5 (6 h de cultivo aproximadamente). A continuación el cultivo se mantiene 30 min en hielo y se centrifuga en 4 tubos cónicos de 50 ml a 3000 x g a 4 °C durante 10 min. Una vez decantado el sobrenadante, se resuspenden las células volteando gentilmente en 200 ml de una solución 10 % (v/v) de glicerol enfriada en hielo. Seguidamente se centrifuga la suspensión de células, se retira el sobrenadante y se resuspenden de nuevo en 100 ml de la misma solución. Tras un tercer paso de centrifugación se añaden 25 ml de 10 % (v/v) de glicerol. Las células se resuspenden volteándolas y se dejan reposar para sedimentar los agregados. Posteriormente se toma la suspensión sin los agregados con una pipeta estéril. La suspensión se lleva a un tubo cónico limpio enfriado en hielo y se centrifuga. Finalmente se retira el sobrenadante, las células se resuspenden en 2.0 ml de 10 % (v/v) de glicerol y se reparten en alícuotas de 50 μ l que se guardan a -80 °C hasta su uso.

3.3.2. Transformación de células de *C. glutamicum* mediante electroporación

A una alícuota de 50 μ l de células electrocompetentes se añade 1 μ g del DNA con que se va a transformar. Esta mezcla se pasa a una cubeta de electroporación (*Cell Projects*, 50 x 2 mm) y se incuba durante 10 min en hielo. A continuación se electropora en un electroporador *Gene Pulser* (Biorad) a 2.5 kV, 25 μ F y 200 Ω . Posteriormente se añade 1 ml de medio TSB a la cubeta y se pasa a un tubo cónico de 15 ml. Las células se incuban 1 h a 30 °C en agitación (200 rpm) antes de sembrarlas en medio sólido TSA con los antibióticos necesarios.

4. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA

La manipulación del DNA así como la mayor parte de las técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo fueron aplicadas esencialmente tal y como describen Sambrook y Rusell (2001). Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por New England Biolabs y Takara. La enzima T4 DNA ligasa y *Phusion Taq* fueron suministradas por New England Biolab. La DNA polimerasa I y la *Pfu* polimerasa fueron suministradas por Biotools B. M. Labs. Todas las enzimas se emplearon atendiendo a las especificaciones de las diferentes casas comerciales. Los fragmentos de DNA se purificaron mediante los kits *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) o *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

4.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Para visualizar los fragmentos de DNA se utilizaron geles 0.7 % o 1.5 % (p/v) de agarosa en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8.1), utilizando el mismo tampón como electrolito.

A las muestras se les añadió $\frac{1}{4}$ de su volumen de tampón de carga (30 % (p/v) de Ficoll 400, 0.2 % (p/v) de azul de bromofenol, 0.2 % (p/v) de xilencianol y EDTA 40 mM pH 8.0).

La electroforesis se realizó a 100 V durante 15-20 min y, una vez finalizada, los geles se tñeron con *Gel Red Nucleid Acid Gel Stain* (Biotium) y los fragmentos de DNA se visualizaron con radiación ultravioleta en un transiluminador.

Como marcadores de tamaño se utilizaron el DNA del fago λ digerido con la enzima de restricción *BstEII* (Amersham), y la forma replicativa del fago Φ X174 digerida con *HaeIII* (New England Biolabs).

4.2. EXTRACCIÓN DNA CROMOSÓMICO DE *M. smegmatis*

Para realizar la extracción de DNA cromosómico de *M. smegmatis* se emplea la biomasa procedente de un cultivo de 10 ml en medio 7H9/Gli/ADC/Tween. Las células se resuspenden en 400 μ l de TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) y se incuban a 80 °C durante 20 min. Se dejan enfriar a temperatura ambiente y se añade 50 μ l de lisozima (10 mg ml⁻¹), se mezcla con vórtex y se deja 1 h a 37 °C. A continuación se añaden 75 μ l de 10 % (p/v) de SDS conteniendo proteinasa K (10 mg ml⁻¹), se mezcla con vórtex y se incuba 10 min a 65 °C. Posteriormente se añaden 100 μ l de NaCl 5 M y 100 μ l de CTAB/NaCl precalentados a 65 °C y se incuba durante 10 min a 65 °C. Seguidamente se añaden 750 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcla con vórtex y se centrifuga 5 min a 14000 x g. Se toma la fracción acuosa, se transfiere a un tubo eppendorf y se añade un volumen equivalente de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se mezcla con vórtex y se centrifuga 5 min a 14000 x g. Se toma la fracción acuosa y se transfiere a un eppendorf donde el DNA se precipita con 0,6 volúmenes de isopropanol y se mantiene 30 min a 20 °C. Finalmente el DNA se centrifuga 15 min a 14000 x g a 4 °C, se lava

con 70 % (v/v) de etanol, se centrifuga 2 min a 14000 x g y se seca el precipitado que posteriormente se resuspende en 100 µl de TE.

4.3. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO EN *E.coli* Y *M. smegmatis*

La extracción de DNA plasmídico de células *E. coli* se llevó a cabo empleando el sistema *High Pure Plasmid Purification Kit* (Roche), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

El aislamiento de DNA plasmídico de *M. smegmatis* se realiza para comprobar si las células han adquirido el plásmido con el que fueron transformadas. Para ello se realiza una extracción de DNA de la cepa que se desea comprobar tal y como se explica en el apartado 4.2. El DNA total extraído, que contendrá tanto el DNA cromosómico como el DNA plasmídico, se emplea para transformar mediante choque térmico células de *E. coli*. Las células transformadas se seleccionan y se realiza la extracción de DNA plasmídico para comprobar que dicho plásmido es el que se había transformado previamente en *M. smegmatis*.

4.4. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN EN CADENA CON DNA POLIMERASA TERMORRESISTENTE (PCR)

La amplificación del DNA se realizó en un equipo *Mastercycler Gradient* de Eppendorf y las enzimas que se emplearon fueron la DNA polimerasa I y *Phusion Taq*, proporcionadas por Biotools B. M. Labs. Y New England Biolabs, respectivamente. Las mezclas de reacción contenían MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0.25 mM, 5 % (v/v) de DMSO y 0.5 µM de cada uno de los oligonucleótidos. Los productos amplificados se purificaron con el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

4.4.1. PCR de colonia en *E. coli*, *M. smegmatis* y *C. glutamicum*

Una de las maneras de comprobar si las células transformadas contienen la construcción de DNA con la que han sido transformadas consiste en la amplificación mediante PCR de una región de dicho DNA empleando directamente células enteras.

En el caso de *E. coli* se toma una pequeña cantidad de biomasa de la colonia que se desea chequear se resuspende en 30 µl de agua, se hierve durante 15 min y se centrifuga durante 5 min a 14000 x g; tomando el sobrenadante y empleándolo como DNA molde en la mezcla de reacción de PCR. A continuación se lleva a cabo el protocolo de amplificación habitual.

En el caso de *M. smegmatis* y *C. glutamicum* se toma una pequeña cantidad de biomasa de la colonia que se desea chequear y se resuspende en 30 µl de agua, adicionando 30 µl de cloroformo, se homogeniza en el vórtex durante 30 s y se centrifuga durante 5 min a 14000 x g; tomando la fase acuosa y empleándolo como DNA molde en la mezcla de reacción de PCR. A continuación se lleva a cabo el protocolo de amplificación habitual.

4.5. SECUENCIACIÓN DE DNA

La secuenciación de DNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA (SSAD) del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) (SECUGEN, SL) utilizando un secuenciador automático modelo ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). Para la reacción de secuenciación se utilizó el *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* de Applied Biosystems, y la DNA polimerasa *AmpliTaq FS*, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo mediante la técnica de PCR con un termociclador "Gene Amp PCR System 2400" de Perkin-Elmer.

5. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE RNA

5.1. EXTRACCIÓN DE RNA DE *C. lunatus*

El RNA para el análisis de la expresión génica en *C. lunatus* se extrajo a partir de cultivos en M7. Se recogió micelio total de un cultivo de 50 ml crecido durante 96 h a 200 rpm tras 40 min de inducción con 300 μ M de esteroide (deoxicorticosterona, androstenediona, progesterona, ácido cólico y β -sitosterol) solubilizado en 10 % (v/v) de Tyloxapol y se conservó a -80 °C hasta su uso.

Las células del micelio se homogenizaron por rotura mecánica tras congelación con nitrógeno líquido y se extrajo RNA empleando *TRIzol Reagent* (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. El DNA fue eliminado mediante digestión con DNasa en solución empleando *DNase and Removal treatment kit* (Ambion), siguiendo las especificaciones del fabricante. La cantidad de RNA extraído se midió utilizando un *NanoPhotometer®Pearl* (Implen, GmbH). Las muestras de RNA se conservaron a -80 °C.

5.2. RETROTRANSCRIPCIÓN SEGUIDA DE PCR (RT-PCR)

Una vez purificado el RNA se obtuvo el DNA complementario (cDNA) mediante una reacción de retrotranscripción empleando *Transcriptor first strand cDNA synthesis Kit* (Roche) según las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos poly-A se emplearon como cebadores. De forma paralela se realizaron controles sin retrotranscriptasa (RT-) para cada una de las muestras. El cDNA obtenido se empleó como molde para la PCR posterior. El objetivo de esta PCR es el de comprobar por un lado, que las reacciones de retrotranscripción han funcionado correctamente, y por otro, corroborar la ausencia de DNA contaminante en las muestras de RNA gracias a las reacciones de PCR realizadas con el producto de las reacciones RT-.

5.3. PCR SEMICUANTITATIVA (sqRT-PCR)

Para analizar los niveles de transcripción de diferentes genes en distintas condiciones de inducción se realizaron experimentos de PCR empleando como molde cDNA y en la que los oligonucleótidos requeridos en cada caso se utilizaron a una concentración final de 0.5 μ M y se

añadió 1 U de la DNA polimerasa I (Biotools), permitiendo observar diferencias en la cantidad de amplicón de PCR mediante su visualización en gel de 0.7 % (v/v) de agarosa.

5.4. PCR CUANTITATIVA (qRT-PCR)

Para analizar los niveles de transcripción de diferentes genes se realizaron experimentos de PCR a tiempo real empleando un termociclador *LightCycler®480 II Real-Time PCR Instrument* (Roche). El volumen de cada reacción fue de 20 µl, que contenían 1 µl de cDNA de la mezcla de la reacción de la retrotranscripción, 0.25 µM de los oligonucleótidos 5' y 3', 10 µl de *SYBR Green Master Mix* (Roche). Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo de la siguiente forma: un ciclo inicial de desnaturalización (95 °C, 5 min), seguido de 55 ciclos de amplificación (desnaturalización, 95 °C, 10 s; hibridación, 60 °C, 10 s; elongación y medida de la señal, 72 °C, 30 s) y un ciclo final de desnaturalización. Para la cuantificación relativa de los valores de fluorescencia obtenidos, se realizó una curva de calibrado con las mismas parejas de oligonucleótidos y con diluciones seriadas de DNA genómico. La cantidad relativa de RNAm para cada gen se determinó siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak *et al.*, 2001) usando los niveles del RNAm del gen gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de *C. lunatus* como control interno.

6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

6.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS (PAGE-SDS)

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS), en geles de 10 % o del 12.5 % (v/v) de poliacrilamida (PAGE), según la técnica descrita previamente (Laemmli, 1970).

Las muestras se hirvieron durante 5 min en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 250 mM a pH 6.8, 2 % (p/v) de SDS, 5 % (v/v) de β-mercaptoetanol, 10 % (v/v) de glicerol y 0.05 % (v/v) de azul de bromofenol).

Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente, empleando un electrolito de composición: Tris-HCl 25 mM (pH 8.0) conteniendo glicina 192 mM y 0.1 % (p/v) de SDS.

Las proteínas fueron teñidas con *Coomasie Brilliant Blue R250*, según se describe previamente (Swank *et al.*, 1971).

Como marcadores de tamaño molecular se empleó *BlueStar Prestained Protein marker* (Nippon Genetics, suministrado por CulteK) que contiene proteínas covalentemente unidas a fluoróforos como patrón, de los siguientes pesos moleculares: 180 kDa (azul), 130 kDa (azul), 100 kDa (azul), 75 kDa (rojo), 63 kDa (azul), 48 kDa (azul), 35 kDa (azul), 25 kDa (verde), 17 kDa (azul), 10 kDa (azul).

6.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE *M. smegmatis*

Para obtener extractos de *M. smegmatis* se centrifugó un volumen de los cultivos correspondientes, las células se lavaron 2 veces en solución salina (0.9 % (p/v) de NaCl en H₂O destilada) y se resuspendieron en 500 µl de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Las muestras se sonicaron en un sonicador Branson 150 enfriadas en hielo aplicando 6-8 pulsos de 1 min a intensidad 9 del equipo. Entre pulsos se incubaron los tubos 30 s en hielo. Después se centrifugaron durante 15 min a 14000 x *g* a 4 °C para separar la fracción celular soluble de la insoluble. La concentración total de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

6.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE *C. glutamicum*

Para obtener extractos de *C. glutamicum* se centrifugó un volumen de los cultivos correspondientes, las células se lavaron 2 veces en solución salina (0.9 % (p/v) de NaCl en H₂O destilada) y se resuspendieron en 500 µl de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.5). Las muestras se sonicaron en un sonicador Branson 150 enfriadas en hielo aplicando 6-8 pulsos de 25 s a intensidad 8 del equipo. Entre pulsos se incubaron los tubos 30 s en hielo. Después se centrifugaron durante 15 min a 14000 x *g* a 4 °C para separar la fracción celular soluble de la insoluble. La concentración total de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

6.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS DE *E.coli*

Para obtener extractos de *E.coli* se centrifugó un volumen de los cultivos correspondientes, las células se lavaron 2 veces en solución salina (0.9 % (p/v) de NaCl en H₂O destilada) y se resuspendieron en 500 µl de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Las muestras se sonicaron en un sonicador Branson 150 enfriadas en hielo aplicando 4 pulsos de 20 s a intensidad 6 del equipo. Entre pulsos se incubaron los tubos 30 s en hielo. Después se centrifugaron durante 15 min a 14000 x *g* a 4 °C para separar la fracción celular soluble de la insoluble. La concentración total de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

7. ENSAYOS *IN VIVO* DE BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES

7.1 SOLUBILIZACIÓN DE ESTEROIDES

Los esteroides son moléculas altamente hidrofóbicas, por lo que es necesario disolverlas de manera especial para poder seguir por turbidimetría el crecimiento de los cultivos en medio líquido así como la realización de otras técnicas llevadas a cabo en este trabajo.

Para los cultivos en los que se emplearon esteroides como objeto de biotransformación, fueron disueltos en 10 % (v/v) de Tyloxapol (Sigma) a una concentración de 5 mM y posteriormente fueron adicionados al medio de cultivo o bien, directamente fueron disueltos a la concentración

deseada en el medio de cultivo siendo la concentración máxima de Tyloxapol en dicho medio de 3.6 % (v/v). Para conseguir la disolución completa de los esteroides estas soluciones se sonicaron en un baño a 90 °C durante aproximadamente 30 min (o hasta conseguir la completa disolución) y posteriormente fueron autoclavadas.

7.2 ENSAYOS DE BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES POR *C. glutamicum*

7.2.1 Ensayos de biotransformación de esteroides con células en crecimiento de *C. glutamicum*

Para los ensayos de biotransformación de esteroides con células en crecimiento de *C. glutamicum* se empleó el medio TSB preparado 2X, al que se le añadieron los esteroides a una concentración final de 0.5 mM, desde una solución de esteroide preparada a 5 mM en 10 % (v/v) de Tyloxapol, siendo por tanto la concentración final del mismo de 1 % (v/v). En caso de ser necesario se añadieron kanamicina (25 µg ml⁻¹) y ácido δ-aminolevulínico 0.5 mM. Los cultivos fueron inducidos con IPTG 1 mM desde el momento de la inoculación

Un volumen total de 20 ml de cultivo de células de *C. glutamicum* fueron cultivadas a 30 °C y 250 rpm en matraz de 100 ml desde una DO₆₀₀ de 0.1, empleando un preinóculo de 48 h crecido en medio TSB a 30 °C y agitado a 250 rpm. Se tomaron muestras para analizar la biotransformación de esteroides y se monitorizó el crecimiento durante 72 h.

7.2.2 Ensayos de biotransformación de esteroides con células en reposo (*resting cells*) de *C. glutamicum*

Para los ensayos de biotransformación de esteroides con células en reposo de *C. glutamicum* se empleó tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), al que se le añadieron los esteroides a una concentración final de 0.5 mM, desde una solución de esteroide preparada a 5 mM en 10 % (v/v) de Tyloxapol, siendo por tanto la concentración final del mismo de 1 % (v/v). Se tomaron muestras para analizar la biotransformación de esteroides durante 72 h.

Para la obtención de la biomasa empleada en la biotransformación se cultivó un volumen total de 200 ml de células de *C. glutamicum* crecidas en medio TSB durante 30 h a 30 °C y 250 rpm en matraz de 1 l desde una DO₆₀₀ de 0.1, empleando un preinóculo de 48 h crecido en medio TSB, a 30 °C y agitado a 250 rpm. En caso de ser necesario se añadieron kanamicina (25 µg ml⁻¹) y ácido δ-aminolevulínico 0.5 mM. Los cultivos fueron inducidos con IPTG 1 mM cuando alcanzaban una DO₆₀₀ de 1.5. Dichas células fueron recogidas mediante centrifugación (10 min, 4000 x g) y lavadas dos veces con tampón fosfato 50 mM (pH 7.4).

7.3 ENSAYOS DE BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES POR *M. smegmatis* mc² 155

7.3.1 Ensayos de biotransformación de esteroides con células en crecimiento de *M. smegmatis* mc² 155

Para los ensayos de biotransformación de esteroides con células en crecimiento de *M. smegmatis* se empleó el medio 7H9 sin suplementos (sin glicerol y sin ADC) al que se le añadió glicerol 18 mM y los esteroides a la concentración final detallada en cada experimento, contenidos en 3.6 % (v/v) de Tyloxapol. En caso de ser necesario se añadió kanamicina (20 µg ml⁻¹) y ácido δ-aminolevulínico 0.5 mM desde el momento de la inoculación.

Un volumen total de 20 ml de cultivo de células de *M. smegmatis* fueron cultivadas a 37 °C y 250 rpm en matraz de 100 ml desde una DO₆₀₀ de 0.1 empleando un preinóculo de 48 h crecido en medio 7H9/Gli/ADC/Tween, a 37 °C y agitado a 250 rpm. Se tomaron muestras para analizar la biotransformación de esteroides y se monitorizó el crecimiento durante 96 h.

7.3.2 Ensayos de biotransformación de esteroides con células en reposo (*resting cells*) de *M. smegmatis* mc² 155

Para los ensayos de biotransformación de esteroides con células en reposo de *M. smegmatis* se empleó tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), al que se le añadieron los esteroides a la concentración final detallada en cada experimento, desde una solución de esteroide preparada a 5 mM en 10 % de Tyloxapol. Se tomaron muestras para analizar la biotransformación de esteroides durante 72 h.

Para la obtención de la biomasa empleada en la biotransformación se cultivó un volumen total de 200 ml de células de *M. smegmatis* crecidas en medio 7H9/Gli/ADC/Tween, durante 30 h a 37 °C y agitado a 250 rpm en matraz de 1 l desde una DO₆₀₀ de 0.1, empleando un preinóculo de 48 h crecido en medio 7H9/Gli/ADC/Tween a 37 °C y agitado a 250 rpm. En caso de ser necesario se añadió kanamicina (20 µg ml⁻¹) y ácido δ-aminolevulínico 0.5 mM desde el momento de la inoculación. Dichas células fueron recogidas mediante centrifugación (10 min, 4000 x g) y lavadas dos veces con tampón fosfato 50 mM (pH 7.4).

7.3.3 Ensayos de biotransformación de esteroides con células en crecimiento a escala piloto (biorreactor 2l) de *M. smegmatis* mc² 155

Para los ensayos de biotransformación de esteroides con células en crecimiento de *M. smegmatis* se empleó 1.5 l del siguiente medio: licor de maíz fermentado (20 g l⁻¹), NaNO₃ (5.40 g l⁻¹), NH₄Cl (0.28 g l⁻¹) y NaH₂PO₄ *H₂O (0.72 g l⁻¹), al que se le añadió una solución de fitosteroles (15 g l⁻¹) disueltos en aceite de girasol (250:1250, aceite:agua). En caso de ser necesario se añadió kanamicina (20 µg ml⁻¹) y ácido δ-aminolevulínico 0.5 mM desde el momento de la inoculación.

Un volumen total de 1.5 l de cultivo de células de *M. smegmatis* fueron cultivadas en un biorreactor Braun Biostat MD (volumen máximo de operación de 2 l) desde una DO_{600} inicial de 0.1 empleando un preinóculo de 48 h crecido en medio 7H9/Gli/ADC/Tween. Las condiciones de crecimiento fueron: temperatura de 37 °C, pH inicial de 7.4 no controlado durante el proceso y agitación inicial de 600 rpm. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 20 % de saturación aumentando automáticamente la velocidad de agitación cuando se requirió. Se tomaron muestras para analizar la biotransformación de esteroides a las 96 h.

7.4 ENSAYOS DE BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES POR *C. lunatus* Y *R. oryzae*

Para los ensayos de biotransformación de esteroides por *C. lunatus*, un volumen total de 50 ml de cultivo de células de *C. lunatus* fueron cultivadas durante 96 h a 28 °C y agitadas a 200 rpm en matraz de 250 ml, empleando como preinóculo una fracción del hongo crecido en medio sólido PDA, a 30 °C durante 96 h. Se adicionaron los esteroides a una concentración final de 0.3 mM en 0.6 % (v/v) de Tyloxapol, desde una solución 5 mM de esteroide disuelto en 10 % (v/v) de Tyloxapol, empleándose como control la misma cantidad de detergente sin esteroide.

Se tomaron muestras para analizar la variación en la expresión génica a los 35 min y para chequear la correcta biotransformación de esteroides a las 3 h.

8. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

8.1 EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES EMPLEANDO ROTURA MECÁNICA DE LA CÉLULA

La extracción de esteroides a analizar por las diferentes técnicas cromatográficas se llevó a cabo recogiendo alícuotas (1 ml) de los diferentes cultivos a los que se le añadieron los correspondientes patrones internos a la concentración de interés antes de comenzar el proceso de extracción.

Las muestras con el patrón interno se extraen en 10 ml de cloroformo y se homogenizan empleando un homogeneizador *Bullet Blender 50-DX-CE* a velocidad 12, durante 3 min. Tras la ruptura, las células se centrifugan 10 min a 4000 x *g* a 4 °C y posteriormente los tubos se congelan a -80°C durante 10-15 min para separar correctamente las dos fases. La fase orgánica se recoge, se pasa a tubos cónicos de 50 ml y se evapora a totalidad a 70 °C.

8.2 EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES DEL MEDIO DE CULTIVO

La extracción de esteroides a analizar por las diferentes técnicas cromatográficas se llevó a cabo recogiendo alícuotas (0.2 ml) de los diferentes cultivos a los que se le añadieron los correspondientes patrones internos a la concentración de interés antes de comenzar el proceso de extracción.

Las muestras con el patrón interno se extraen en 0.5 ml de cloroformo y se homogenizan empleando un vórtex durante 30 s. Las muestras se congelan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10-15 min para separar correctamente las dos fases. La fase orgánica se recoge, se pasa a tubos eppendorf de 2 ml y se evapora a totalidad a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En el caso de las muestras de la biotransformación llevada a cabo en reactor, se toman alícuotas de 10 ml, separando la fase acuosa del aceite mediante centrifugación (15 min, 4000 x g), tomando 30 μl del aceite al que se le añaden 150 μl de acetonitrilo.

8.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

Las placas de TLC utilizadas (Silica gel 60 F₂₅₄ 20 x 20 cm, Merck) se recortan dejando 1 cm de margen en cada lado, 8 cm de carrera y 1 cm de separación entre muestra y muestra en el caso de ser empleadas para el análisis en ensayos a escala laboratorio; para el caso de los experimentos llevados a cabo en biorreactor se recortan dejando 1 cm de margen en cada lado, 13 cm de carrera y 1 cm de separación entre muestra y muestra. Las diferentes muestras extraídas se resuspenden en acetonitrilo en un volumen de entre 10-20 μl dependiendo de la concentración esperada en cada caso; para el caso de los experimentos llevados a cabo en biorreactor se emplea la mezcla aceite: acetonitrilo (30:150).

Para realizar la TLC, 10 μl de cada muestra se cargan sobre la placa de TLC y una mezcla de cloroformo:etanol (95:5) (Merck) se usa como fase móvil. Los diferentes esteroides de las biotransformaciones se revelan con una solución del 20 % (v/v) de H_2SO_4 .

8.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ACOPLADA A DETECTOR DE FOTODIODOS EN SERIE (HPLC-DAD) Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS)

La detección y cuantificación de los productos generados en las reacciones de biotransformación esteroideas se realizó mediante HPLC-DAD-MS usando un equipo de cromatografía líquida (Surveyor Plus LC) equipada con inyector automático acoplado en serie a un detector DAD que permitió monitorizar la elución a DO_{245} y con una trampa iónica (LXQ) equipada con una fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI) y una fuente de isoelectronebulización (IES), todo ello suministrado por Thermo Electron (San Jose, CA, EEUU). Los datos se procesaron con el software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EEUU). La separación se realiza mediante una columna de fase reversa C18 y a un gradiente determinado en cada caso.

8.4.1 Identificación y cuantificación de progesterona (PROG) y 11 α OH-progesterona (11 α OH-Prog)

La separación cromatográfica se realizó en una columna *Mediterranea Sea* C18 (150 mm x 4.6 mm de diámetro interno, 5 μm de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona). Las fases

móviles empleadas contenían agua y 0.1 % ácido fórmico (A), acetonitrilo y 0.1 % ácido fórmico (B). El flujo empleado fue de 1 ml min⁻¹ y el gradiente lineal utilizado se muestra en la tabla:

Tiempo (min)	% A	%B
0	50	50
5	50	50
35	20	80
40	20	80
45	50	50
60	50	50

Durante este gradiente, el eluyente se analizó por DAD y por el espectrómetro de masas desde el minuto 1 hasta el 50.

Las condiciones de trabajo del equipo fueron: fuente de ionización IES, temperatura del capilar (350 °C), cobertura de nebulización (60 °C), voltaje del capilar (9 V), amplificador (400 Vp), corriente de la fuente (100 µA). Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de las soluciones madre de PROG y 11αOH-PROG en concentraciones comprendidas entre 500 µM y 15.625 µM, a las que se añadió 250 µM de testosterona como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar (véase apartado 8.2 de materiales y métodos). Una vez realizada la extracción, los residuos se resuspendieron en 500 µl de acetonitrilo (LC-MaScan, LAB-SCAN) de los que se inyectaron 25 µl para su análisis cromatográfico.

8.4.2 Identificación y cuantificación de androstenediona (AD) y 11αOH- androstenediona (11αOH-AD)

La separación cromatográfica se realizó en una columna *Mediterranea Sea* C18 (150 mm × 4.6 mm de diámetro interno, 5 µm de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona). Las fases móviles empleadas contenían agua y 0.1 % ácido fórmico (A), acetonitrilo y 0.1 % ácido fórmico (B). El flujo empleado fue de 1 ml min⁻¹ en régimen isocrático al 45 % de la fase A y 55 % de B. Durante este gradiente, el eluyente se analizó por DAD y por el espectrómetro de masas desde el minuto 1 hasta el 20.

Las condiciones de trabajo del equipo fueron: fuente de ionización IES, temperatura del capilar (350 °C), cobertura de nebulización (60 °C), voltaje del capilar (41 V), amplificador (400 Vp), corriente de la fuente (100 µA). Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de la solución madre de AD, en concentraciones comprendidas entre 500 µM y 15.625 µM, a las que se añadió 250 µM de deoxicorticosterona como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar (véase apartado 8.2 de materiales y métodos). Una vez realizada la extracción, los residuos se resuspendieron en 700 µl de acetonitrilo (LC-MaScan, LAB-SCAN) de los que se inyectaron 25 µl para su análisis cromatográfico.

La cuantificación de 11 α OH-AD, se realiza mediante el cálculo de rendimiento de la reacción empleando las áreas corregidas, al no disponer de producto puro. Se calcula el rendimiento de la biotransformación como:

$$\Psi_{P/S} = \frac{A\left(\frac{11\alpha\text{OH-AD}}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{11\alpha\text{OH-AD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{AD}}{ISTD}\right)\right]}$$

8.4.3 Identificación y cuantificación de androstenediendiona (ADD) y 11 α OH- androstenediendiona (11 α OH-ADD)

La separación cromatográfica se realizó en una columna *Mediterranea Sea* C18 (150 mm \times 4.6 mm de diámetro interno, 5 μ m de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona). Las fases móviles empleadas contenían agua y 0.1 % ácido fórmico (A), acetonitrilo y 0.1 % ácido fórmico (B). El flujo empleado fue de 1 ml min⁻¹ en régimen isocrático al 45 % de la fase A y 55 % de B. Durante este gradiente, el eluyente se analizó por DAD y por el espectrómetro de masas desde el minuto 1 hasta el 20.

Las condiciones de trabajo del equipo fueron: fuente de ionización IES, temperatura del capilar (350 °C), cobertura de nebulización (60 °C), voltaje del capilar (41 V), amplificador (400 Vp), corriente de la fuente (100 μ A). Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de la solución madre de ADD, en concentraciones comprendidas entre 500 μ M y 15.625 μ M, a las que se añadió 250 μ M de deoxicorticosterona como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar (véase apartado 8.2 de materiales y métodos). Una vez realizada la extracción, los residuos se resuspendieron en 700 μ l de acetonitrilo (LC-MaScan, LAB-SCAN) de los que se inyectaron 25 μ l para su análisis cromatográfico.

La cuantificación de 11 α OH-ADD, se realiza mediante el cálculo de rendimiento de la reacción empleando las áreas corregidas, al no disponer de producto puro. Se calcula el rendimiento de la biotransformación como:

$$\Psi_{P/S} = \frac{A\left(\frac{11\alpha\text{OH-ADD}}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{11\alpha\text{OH-ADD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{ADD}}{ISTD}\right)\right]}$$

8.4.4 Identificación y cuantificación de testosterona (TEST) y 11 α OH-testosterona (11 α OH-TEST)

La separación cromatográfica se realizó en una columna *Mediterranea Sea* C18 (150 mm \times 4.6 mm de diámetro interno, 5 μ m de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona). Las fases móviles empleadas contenían agua y 0.1 % ácido fórmico (A), acetonitrilo y 0.1 % ácido fórmico (B). El flujo empleado fue de 1 ml min⁻¹ y el gradiente lineal utilizado se muestra en la tabla:

Tiempo (min)	% A	%B
0	55	45
5	55	45
35	20	80
40	20	80
45	55	45
60	55	45

Durante este gradiente, el eluyente se analizó por DAD y por el espectrómetro de masas desde el minuto 1 hasta el 60.

Las condiciones de trabajo del equipo fueron: fuente de ionización IES, temperatura del capilar (350 °C), cobertura de nebulización (60 °C), voltaje del capilar (9 V), amplificador (400 Vp), corriente de la fuente (100 µA). Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de la solución madre de TEST, en concentraciones comprendidas entre 500 µM y 15.625 µM, a las que se añadió 250 µM de progesterona como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar (véase apartado 8.2 de materiales y métodos). Una vez realizada la extracción, los residuos se resuspendieron en 700 µl de acetonitrilo (LC-MaScan, LAB-SCAN) de los que se inyectaron 25 µl para su análisis cromatográfico.

La cuantificación de 11αOH-TEST, se realiza mediante el cálculo de rendimiento de la reacción empleando las áreas corregidas, al no disponer de producto puro. Se calcula el rendimiento de la biotransformación como:

$$\Psi_{P/S} = \frac{A\left(\frac{11\alpha\text{OH-TEST}}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{11\alpha\text{OH-TEST}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{TEST}}{ISTD}\right)\right]}$$

8.4.5 Identificación y cuantificación de deoxicosticosterona (DOC) y 11αOH-deoxicorticosterona (11αOH-DOC)

La separación cromatográfica se realizó en una columna *Mediterranea Sea* C18 (150 mm × 4.6 mm de diámetro interno, 5 µm de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona). Las fases móviles empleadas contenían agua y 0.1 % ácido fórmico (A), acetonitrilo y 0.1 % ácido fórmico (B). El flujo empleado fue de 1 ml min⁻¹ en régimen isocrático al 45 % de la fase A y 55 % de B. Durante este gradiente, el eluyente se analizó por DAD y por el espectrómetro de masas desde el minuto 1 hasta el 20.

Las condiciones de trabajo del equipo fueron: fuente de ionización IES, temperatura del capilar (350 °C), cobertura de nebulización (60 °C), voltaje del capilar (41 V), amplificador (400 Vp), corriente de la fuente (100 µA). Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de la solución madre de DOC, en concentraciones comprendidas entre 500 µM y 15.625 µM, a las que se añadió 250 µM de ADD como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar (véase apartado 8.2 de materiales y métodos). Una vez realizada la extracción, los residuos se resuspendieron en 700 µl de

acetonitrilo (LC-MaScan, LAB-SCAN) de los que se inyectaron 25 µl para su análisis cromatográfico.

La cuantificación de 11αOH-DOC, se realiza mediante el cálculo de rendimiento de la reacción empleando las áreas corregidas, al no disponer de producto puro. Se calcula el rendimiento de la biotransformación como:

$$\Psi_{P/S} = \frac{A\left(\frac{11\alpha\text{OH-DOC}}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{11\alpha\text{OH-DOC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{DOC}}{ISTD}\right)\right]}$$

8.4.6 Identificación y cuantificación de deshidroepiandrosterona (DHEA) y 11αOH-deshidroepiandrosterona (11αOH-DHEA)

La separación cromatográfica se realizó en una columna *Mediterranea Sea* C18 (150 mm × 4.6 mm de diámetro interno, 5 µm de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona). Las fases móviles empleadas contenían agua y 0.1 % ácido fórmico (A), acetonitrilo y 0.1 % ácido fórmico (B). El flujo empleado fue de 1 ml min⁻¹ y el gradiente lineal utilizado se muestra en la tabla:

Tiempo (min)	% A	%B
0	50	50
5	50	50
35	20	80
40	20	80
45	50	50
60	50	50

Durante este gradiente, el eluyente se analizó por DAD y por el espectrómetro de masas desde el minuto 1 hasta el 60.

Las condiciones de trabajo del equipo fueron: fuente de ionización IES, temperatura del capilar (350 °C), cobertura de nebulización (60 °C), voltaje del capilar (9 V), amplificador (400 Vp), corriente de la fuente (100 µA). Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de la solución madre de DHEA, en concentraciones comprendidas entre 500 µM y 15.625 µM, a las que se añadió 250 µM de progesterona como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar (véase apartado 8.2 de materiales y métodos). Una vez realizada la extracción, los residuos se resuspendieron en 500 µl de acetonitrilo (LC-MaScan, LAB-SCAN) de los que se inyectaron 25 µl para su análisis cromatográfico.

La cuantificación de 11αOH-DHEA, se realiza mediante el cálculo de rendimiento de la reacción empleando las áreas corregidas, al no disponer de producto puro. Se calcula el rendimiento de la biotransformación como:

$$\Psi_{P/S} = \frac{A\left(\frac{11\alpha\text{OH-DHEA}}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{11\alpha\text{OH-DHEA}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{DHEA}}{ISTD}\right)\right]}$$

8.4.7 Identificación y cuantificación de colesterol (CHO), androstenediona (AD), 11 α OH-androstenediona (11 α OH-AD), 11 β OH-androstenediona (11 β OH-AD), androstenediendiona (ADD), 11 α OH-androstenediendiona (11 α OH-ADD), 11 β OH-androstenediendiona (11 β OH-AD), 22-hidroxi-23,24-bisnorchol-4-en-3-ona (4-HBC) y 22-hidroxi-23,24-bisnorchol-1,4-dien-3-ona (1,4-HBC)

La separación cromatográfica se realizó en una columna *Tracer Excel* 120 ODSB C18 (150 mm \times 4.6 mm de diámetro interno, 5 μ m de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona). Las fases móviles empleadas contenían agua y 0.1 % ácido fórmico (A), acetonitrilo y 0.1 % ácido fórmico (B), isopropanol y 0.1 % ácido fórmico (C). El flujo empleado fue de 1 ml min⁻¹ y el gradiente lineal utilizado se muestra en la tabla:

Tiempo (min)	% A	% B	% C
0	50	50	0
5	50	50	0
15	20	71	9
20	4	87	9
40	0	85	15
41	0	85	15
42	50	50	0
52	50	50	0

Durante este gradiente, el eluyente se analizó por DAD y por el espectrómetro de masas desde el minuto 1 hasta el 52.

Las condiciones de trabajo del equipo fueron: fuente de ionización APCI, temperatura del capilar 275 °C, temperatura de vaporización 425 °C, voltaje del capilar 39 V, voltaje de descarga de la corona 6.00 kV, corriente de la fuente 6.00 μ A y 15 eV para la energía de disociación por colisión. Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de la solución madre de CHO, en concentraciones comprendidas entre 1000 μ M y 15.625 μ M, a las que se añadió 500 μ M de testosterona como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar (véase apartado 11.2 de materiales y métodos). Una vez realizada la extracción, los residuos se resuspendieron en 1500 μ l de acetonitrilo (LC-MaScan, LAB-SCAN) de los que se inyectaron 25 μ l para su análisis cromatográfico.

Las cuantificaciones de AD, ADD, 11 α OH-AD, 11 β OH-AD, 11 α OH-ADD, 11 β OH-ADD, 4-HBC y 1,4-HBC se realizaron mediante el cálculo de rendimiento de la reacción empleando las áreas corregidas, al no disponer de producto puro. Se calcula el rendimiento con respecto al sustrato (colesterol) para cada producto de la biotransformación como:

$$\Psi_{AD/CHO} = \frac{A\left(\frac{AD}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta OH-AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta OH-ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{4-HBC}{ISTD}\right) + A\left(\frac{1,4-HBC}{ISTD}\right) + A\left(\frac{CHO}{ISTD}\right)\right]}$$

$$\Psi_{ADD/CHO} = \frac{A\left(\frac{ADD}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta OH-AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta OH-ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{4-HBC}{ISTD}\right) + A\left(\frac{1,4-HBC}{ISTD}\right) + A\left(\frac{CHO}{ISTD}\right)\right]}$$

$$\Psi_{11\alpha/\beta\text{OH-AD/CHO}} = \frac{A\left(\frac{11\alpha/\beta\text{OH-AD}}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{\text{AD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{ADD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta\text{OH-AD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta\text{OH-ADD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{1,4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{CHO}}{ISTD}\right)\right]}$$

$$\Psi_{11\alpha/\beta\text{OH-ADD/CHO}} = \frac{A\left(\frac{11\alpha/\beta\text{OH-ADD}}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{\text{AD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{ADD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta\text{OH-AD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta\text{OH-ADD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{1,4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{CHO}}{ISTD}\right)\right]}$$

$$\Psi_{4\text{-HBC/CHO}} = \frac{A\left(\frac{4\text{-HBC}}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{\text{AD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{ADD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta\text{OH-AD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta\text{OH-ADD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{1,4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{CHO}}{ISTD}\right)\right]}$$

$$\Psi_{1,4\text{-HBC/CHO}} = \frac{A\left(\frac{1,4\text{-HBC}}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{\text{AD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{ADD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta\text{OH-AD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta\text{OH-ADD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{1,4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{CHO}}{ISTD}\right)\right]}$$

8.4.8 Identificación y cuantificación de fitosteroles (FITO), androstenediona (AD), 11 α OH-androstenediona (11 α OH-AD), 11 β OH-androstenediona (11 β OH-AD), androstenediendiona (ADD), 11 α OH-androstenediendiona (11 α OH-ADD), 11 β OH-androstenediendiona (11 β OH-AD), 22-hidroxi-23,24-bisnorchol-4-en-3-ona (4-HBC) y 22-hidroxi-23,24-bisnorchol-1,4-dien-3-ona (1,4-HBC)

La separación cromatográfica se realizó en una columna *Tracer Excel* 120 ODSB C18 (150 mm \times 4.6 mm de diámetro interno, 5 μ m de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona). Las fases móviles empleadas contenían agua y 0.1 % ácido fórmico (A), acetonitrilo y 0.1 % ácido fórmico (B), isopropanol y 0.1 % ácido fórmico (C). El flujo empleado fue de 1 ml min⁻¹ y el gradiente lineal utilizado se muestra en la siguiente tabla:

Tiempo (min)	% A	% B	% C
0	50	50	0
5	50	50	0
15	20	71	9
20	0	91	9
40	0	70	30
41	0	85	15
42	50	50	0
52	50	50	0

Durante este gradiente, el eluyente se analizó por DAD y por el espectrómetro de masas desde el minuto 1 hasta el 52.

Las condiciones de trabajo del equipo fueron: fuente de ionización APCI, temperatura del capilar 275 °C, temperatura de vaporización 425 °C, voltaje del capilar 39 V, voltaje de descarga de la corona 6.00 kV, corriente de la fuente 6.00 μ A y 15 eV para la energía de disociación por colisión. Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de la solución madre de FITO, en concentraciones comprendidas entre 1000 μ M y 15.625 μ M, a las que se añadió 500 μ M de testosterona como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a

cabo de la misma manera que en las muestras a analizar (véase apartado 11.2 de materiales y métodos). Una vez realizada la extracción, los residuos se resuspendieron en 1500 μ l de acetonitrilo (LC-MaScan, LAB-SCAN) de los que se inyectaron 25 μ l para su análisis cromatográfico.

Para la preparación del medio de cultivo, como para la recta de calibrado se prepararon las soluciones de fitosteroles a una concentración de 1 mM empleando para el cálculo el peso molecular del β -sitosterol, el más abundante de los fitosteroles presentes en la mezcla. Sin embargo para la cuantificación se realizó una corrección basándose en la abundancia relativa de sus componentes: β -sitosterol (83.61 %), campesterol (7.59 %) y estigmasterol (8.79%) y teniendo en cuenta peso molecular de cada uno de ellos se calculó la concentración de los mismos, por lo que en la concentración real en las muestras preparadas a concentración 1 mM (medio inicial de cultivo) era la siguiente: 0.84 mM de β -sitosterol, 0.08 mM de campesterol y 0.09 mM de estigmasterol. En la cuantificación, tanto para el cálculo del consumo como para el cálculo de los rendimientos, se expresa la concentración de fitosteroles como el sumatorio de las concentraciones sus componentes, e.g. para el tiempo inicial la concentración de fitosteroles sería 0.84+ 0.08 + 0.08= 1 mM). Como puede observarse, aunque esta corrección se realizó, resulta despreciable.

Las cuantificaciones de de AD, ADD, 11 α OH-AD, 11 β OH-AD, 11 α OH-ADD, 11 β OH-ADD, 4-HBC y 1,4-HBC se realizaron mediante el cálculo de rendimiento de la reacción empleando las áreas corregidas, al no disponer de producto puro. Se calcula el rendimiento con respecto al sustrato (fitosteroles) para cada producto de la biotransformación como:

$$\Psi_{AD/FITO} = \frac{A\left(\frac{AD}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta OH-AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta OH-ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{4-HBC}{ISTD}\right) + A\left(\frac{1,4-HBC}{ISTD}\right) + A\left(\frac{FITO}{ISTD}\right)\right]}$$

$$\Psi_{ADD/FITO} = \frac{A\left(\frac{ADD}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta OH-AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta OH-ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{4-HBC}{ISTD}\right) + A\left(\frac{1,4-HBC}{ISTD}\right) + A\left(\frac{FITO}{ISTD}\right)\right]}$$

$$\Psi_{11\alpha OH-AD/FITO} = \frac{A\left(\frac{11\alpha/\beta OH-AD}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta OH-AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta OH-ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{4-HBC}{ISTD}\right) + A\left(\frac{1,4-HBC}{ISTD}\right) + A\left(\frac{FITO}{ISTD}\right)\right]}$$

$$\Psi_{11\alpha/\beta OH-ADD/FITO} = \frac{A\left(\frac{11\alpha/\beta OH-ADD}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta OH-AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta OH-ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{4-HBC}{ISTD}\right) + A\left(\frac{1,4-HBC}{ISTD}\right) + A\left(\frac{FITO}{ISTD}\right)\right]}$$

$$\Psi_{4\text{-HBC/ FITO}} = \frac{A\left(\frac{4\text{-HBC}}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta\text{OH-AD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta\text{OH-ADD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{1,4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{FITO}}{ISTD}\right)\right]}$$

$${}_{1,4\text{-HBC/ FITO}} = \frac{A\left(\frac{4\text{-HBC}}{ISTD}\right)}{\left[A\left(\frac{AD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{ADD}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta\text{OH-AD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{11\alpha/\beta\text{OH-ADD}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{1,4\text{-HBC}}{ISTD}\right) + A\left(\frac{\text{FITO}}{ISTD}\right)\right]}$$

8.4.9 Identificación y cuantificación de deoxicorticosterona (DOC), corticosterona (CORT) (11 β OH-deoxicorticosterona), cortexolona (RSS), hidrocortisona (HC) (11 β OH-RSS), androstenediona (AD), 11 β -hidroxiandrostenediona (11 β OH-AD).

La separación cromatográfica se realizó en una columna *Mediterranea Sea* C18 (150 mm \times 4.6 mm de diámetro interno, 5 μ m de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona). Las fases móviles empleadas contenían agua y 0.1 % ácido fórmico (A), acetonitrilo y 0.1 % ácido fórmico (B). El flujo empleado fue de 1 ml min⁻¹ y el gradiente lineal utilizado mostrado en la tabla:

Tiempo (min)	% A	% B
0	60	40
5	60	40
35	20	80
40	20	80
45	60	40
60	60	40

Durante este gradiente, el eluyente se analizó por DAD y por el espectrómetro de masas desde el minuto 1 hasta el 60.

Las condiciones de trabajo del equipo fueron: fuente de ionización IES, temperatura del capilar (350 °C), cobertura de nebulización (60 °C), voltaje del capilar (9 V), amplificador (400 Vp), corriente de la fuente (100 μ A). Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de las soluciones madre de DOC, CORT, RSS, HC, AD y 11 β OH-AD en concentraciones comprendidas entre 500 μ M y 15.625 μ M, a las que se añadió 250 μ M de testosterona como patrón interno. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar (véase apartado 11.2 de materiales y métodos). Una vez realizada la extracción, los residuos se resuspendieron en 500 μ l de acetonitrilo (LC-MaScan, LAB-SCAN) de los que se inyectaron 25 μ l para su análisis cromatográfico.

9. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

Los análisis de secuencias de ADN y proteínas se realizaron utilizando el paquete de programas LASERGENE así como los programas y bases de datos detallados a continuación.

La búsqueda de secuencias nucleotídicas y proteicas de *R. oryzae* fue realizado utilizando el servidor del *Broad Institute* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/rhizopus_oryzae/MultiHome.html) y en la base de datos de genes del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Para la búsqueda de secuencias de C.

lunatus utilizó el servidor *Genome Portal* del *Joint Genome Institute* (<http://genome.jgi.doe.gov/>) y la búsqueda de proteínas anotadas en la base de datos de *Joint Genome Institute* se realizó mediante la búsqueda de dominios comparados con los importados de la base de datos Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) o InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos fueron comparadas con las existentes en las bases de datos mediante el uso de los algoritmos BLAST, a través del servidor del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/genom_table.cgi) o empleando la herramienta LocalBLAST para alineamientos contra una base de datos local, del programa BioEdit y mediante los algoritmos HMMER, a través del servidor del *European Bioinformatics Institute* (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>).

Los alineamientos múltiples de proteínas se llevaron a cabo con el programa MUSCLE a través del servidor del *European Bioinformatics Institute* (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

Los estudios filogenéticos se realizaron empleando la herramienta Phylogeny (<http://www.phylogeny.fr/>), empleando MUSCLE para el alineamiento múltiple de secuencias y Gblocks para el curado de dichos alineamientos. Los filogramas se construyeron empleando un procedimiento *bootstrap* (100 replicados) y un modelo de sustitución WAG y la visualización de los distintos filogramas y los análisis posteriores se realizaron con los programas MEGA 5.2 y FigTree 1.4.2.

Las masas moleculares teóricas de las proteínas se calcularon con el programa Compute pI/Mw del servidor ExPASy (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html).

Las predicciones de estructura secundaria y la comparación de las mismas se realizaron con el programa HHPred, alojado en el servidor del Instituto Max Planck (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). Las predicciones de estructura tridimensional y la comparación de las mismas se realizaron con el programa SWISS-MODEL, también alojado en el servidor ExPASy (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) y la visualización de los distintos modelos y los análisis posteriores se realizaron con el programa PyMol. La búsqueda de dominios transmembrana se realizó empleando el algoritmo SOSUI (http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html).

VI. Resultados

1. PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11 α -HIDROXILADOS

1.1. UTILIZACIÓN DE *Rhizopus oryzae* PARA LA PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11 α -HIDROXILADOS

Como ya se ha comentado en la introducción, la forma convencional de producir esteroides 11 α -hidroxilados es mediante procesos de biotransformación utilizando hongos como por ejemplo *R. oryzae*. Sin embargo, las biotransformaciones fúngicas de esteroides, a pesar de presentar grandes ventajas frente a la síntesis química, tienen lugar con bajos rendimientos, en parte debidos a la aparición de un gran número de subproductos que además de disminuir la eficiencia del proceso complican las posteriores etapas de purificación del producto deseado.

Para comprobar estos aspectos y como punto de partida de este estudio se realizaron ensayos de hidroxilación con *R. oryzae* sobre diferentes sustratos esteroideos. Para llevar a cabo estos ensayos se cultivó *R. oryzae* en medio M7 durante 96 h a 30 °C, momento en el que se adicionó el esteroide a una concentración final de 300 μ M desde una solución 5 mM en 10 % (v/v) de Tyloxapol. La biotransformación se prolongó durante 16 h en el caso de la progesterona y durante 20 h para el resto de los esteroides. Los productos obtenidos en estos ensayos se analizaron mediante TLC (Fig. R1.1).

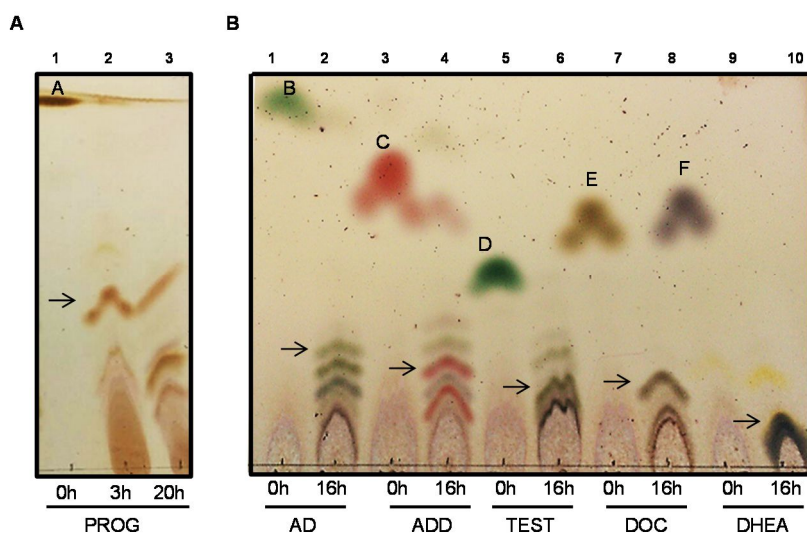


Figura R1.1 Análisis mediante TLC de la 11 α -hidroxilación de esteroides por *R. oryzae*. **A.-** 11 α -Hidroxilación de progesterona (PROG). Carril 1, 0 h; carril 2, 3 h; carril 3, 20 h. **B.-** 11 α -hidroxilación de androstenediona (AD), androstenediendiona (ADD), testosterona (TEST), deoxicorticosterona (DOC) y deshidroepiandrosterona (DHEA) a tiempo inicial (0 h) (carriles impares) y a tiempo final (16 h) (carriles pares). A. PROG; B. AD; C. ADD; D. TEST, E. DOC, F. DHEA. Los correspondientes productos 11 α -hidroxilados se marcan con una flecha.

Tal y como se muestra en la Fig. R1.1 *R. oryzae* es capaz de modificar todos los compuestos esteroideos empleados en este ensayo; no obstante, además de producirse el compuesto 11 α -hidroxilado de interés se observaron otros compuestos, en algunos casos en igual o mayor

abundancia, por lo que los rendimientos del producto con respecto al sustrato fueron bajos. La conversión de los esteroides resultó ser del 100 % salvo en el caso de AD.

A la vista de estos resultados se planteó la opción de transferir la actividad 11 α -hidroxilasa de *R. oryzae* a un organismo heterólogo que estuviese exento de estas actividades secundarias de transformación de los esteroides.

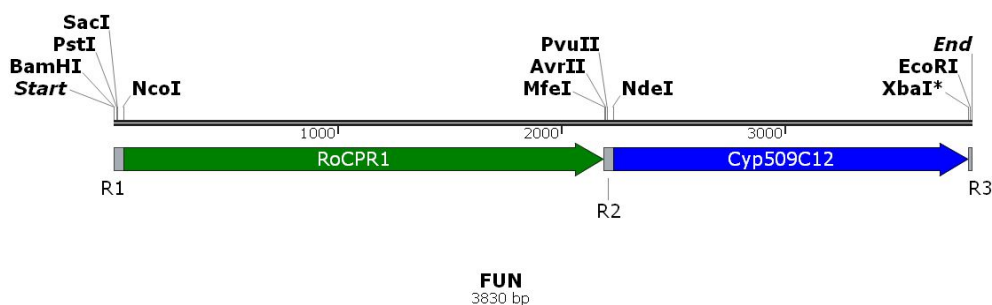
1.2. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA 11 α -HIDROXILASA DE *R. oryzae*

Como se ha comentado en la Introducción, el citocromo responsable de la actividad 11 α -hidroxilasa, Cyp509C12, así como su correspondiente proteína citocromo-reductasa (CPR), RoCPR1, ya han sido identificados y caracterizados en *R. oryzae* (Petric *et al.*, 2010). Con el fin de mejorar el proceso de producción de esteroides 11 α -hidroxilados de interés farmacológico y/o industrial se planteó la posibilidad de transferir la actividad 11 α -hidroxilasa a diferentes chasis bacterianos que deberían cumplir dos características fundamentales: por un lado, deberían ser capaces de transportar esteroides en ambos sentidos y por otro lado deberían carecer de actividades enzimáticas que pudieran modificar de manera diferente a la deseada bien el esteroide de partida o bien el producto de la reacción. De esta manera la bacteria hospedadora modificada portadora de la actividad 11 α -hidroxilasa permitiría por un lado obtener esteroides 11 α -hidroxilados sin la aparición de otros subproductos y por otro, la obtención de esteroides 11 α -hidroxilados a partir de compuestos como el colesterol o fitosteroles en caso de que la bacteria pudiese metabolizar estos esteroides naturales hasta el producto de partida de la biotransformación. Con esta última opción se abriría una nueva vía de síntesis a partir de materias primas más baratas que las habitualmente empleadas y esto supondría en sí mismo un cambio importante en la forma de producción de estos compuestos hidroxilados.

1.2.1. Diseño y construcción del operon sintético FUN

Para llevar a cabo la producción heteróloga de la actividad 11 α -hidroxilasa en bacterias se diseñó el operón sintético denominado FUN, el cual contiene los genes *cyp509C12* y *roCPR1* de *R. oryzae*, que codifican el citocromo CYP509C12 con actividad 11 α -hidroxilasa y la proteína citocromo reductasa RoCPR1 necesaria para la actividad del mismo, respectivamente. El uso de codones se optimizó de forma manual para las bacterias *Mycobacterium* y *Rhodococcus*, conservando un porcentaje de identidad en nucleótidos de 82.80 % para el caso del citocromo y de 83.24 % para el caso de la CPR. Para conseguir la traducción óptima del ARNm se añadió una secuencia *Shine Dalgarno/RBS* (AAAGGGAG) 6 pb aguas arriba a partir de los respectivos codones de inicio de cada gen. Se añadieron además diversos sitios de restricción para facilitar diferentes opciones de clonación (Fig. R1.2). Además se añadió una alanina como segundo aminoácido para aumentar la traducción de las proteínas. El operón diseñado se sintetizó mediante síntesis química y se clonó inicialmente en el plásmido pGH generando el plásmido recombinante pGH-FUN que se utilizó para transformar células

competentes de *E. coli* DH10B. El plásmido pGH-FUN se secuenció para verificar que la secuencia del operón clonado era correcta.



R1	<u>ggatccctgcaggagctc</u> TGAccTGAgaga aaaggagg TGAaccATG
R2	tcacaattgcctaggcagctgTGAccTGAgaga aaaggagg TGAcATG
R3	<u>tctagagaattc</u>

Figura R1.2 Representación esquemática de los genes contenidos en el operón sintético FUN. Las secuencias de las regiones intergénicas (R1- R3) se indican en la tabla. Se subrayan las secuencias de los sitios de restricción y se anotan en la figura. Las secuencias RBS (AAAGGGAG) se indican en negrita.

1.2.2. Producción de esteroides 11 α -hidroxilados en *Mycobacterium smegmatis*

M. smegmatis mc² 155 es una actinobacteria ampliamente empleada en el campo de la biotransformación de esteroides, debido a su capacidad para transportarlos y degradarlos. En el presente estudio se pretende analizar la capacidad de este chasis para la obtención de diversos esteroides 11 α -hidroxilados de interés farmacológico y/o industrial, empleando materias primas de bajo coste como el colesterol o los fitosteroides.

1.2.2.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN DEL OPERÓN FUN EN MICOBACTERIAS

El plásmido pGH-FUN se digirió con *Bam*HI y *Eco*RI para liberar el fragmento que contiene el operón FUN y éste fue subclonado en el plásmido pMV261, con doble origen de replicación para *E. coli* / *Mycobacterium*; resultando el vector pMVFUN que expresará los genes bajo control del promotor constitutivo *Phps*. El plásmido pMVFUN se clonó inicialmente en *E. coli* DH10B donde se secuenció para comprobar que la construcción era correcta. Los plásmidos pMV261 y pMVFUN fueron posteriormente aislados de las cepas de *E. coli* portadoras y transformados en *M. smegmatis* mediante electroporación (ver Materiales y Métodos Sección 3.2).

1.2.2.2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DEL OPERÓN FUN EN MICOBACTERIAS

Para comprobar la correcta producción de las proteínas del operón FUN se analizaron las fracciones soluble e insoluble de los extractos celulares. Se muestran los extractos proteicos de una muestra representativa de *M. smegmatis* (Fig. R1.3) en las condiciones de

biotransformación ensayadas, donde no se observa sobreproducción, aunque si se detecta RoCPR1 tanto en la fracción soluble como la insoluble y el citocromo CYP509C12 en la fracción insoluble.

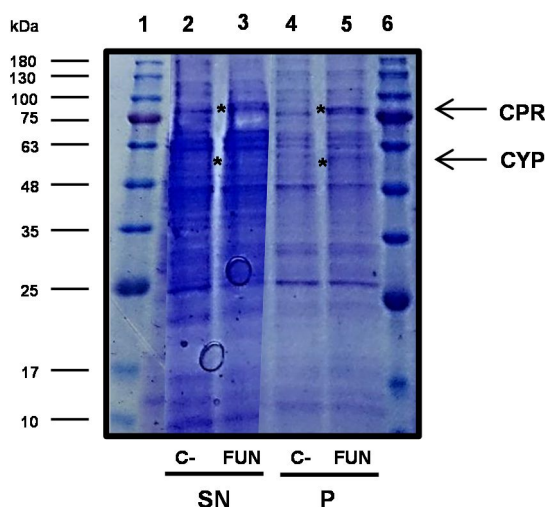


Figura R1.3 Análisis mediante SDS-PAGE de los extractos celulares de *M. smegmatis* Δ 6039 (pMV261) (C-, carriles 2 y 4) y *M. smegmatis* Δ 6039 (pMV261) (FUN, carriles 3 y 5) en las condiciones de biotransformación a las 24h. Carriles 1 y 6: marcador de peso molecular. Carriles 2 y 3: fracción soluble (SN). Carriles 4 y 5: fracción insoluble (P). Se indican con flechas y asteriscos las proteínas.

De forma habitual, cuando se sobreproducen citocromos, se sigue la producción de los mismos mediante la coloración rojiza de las células debido al grupo hemo; sin embargo, debido al gran número de citocromos que posee *M. smegmatis*, en las condiciones ensayadas no se observan importantes diferencias en la coloración. Esta característica se estudiará en cada caso en particular.

1.2.2.3. PRODUCCIÓN DE SINTONAS 11 α -HIDROXILADAS A PARTIR DE MATERIAS PRIMAS DE BAJO COSTE

Con el fin de obtener los 11 α OH-esteroides de interés industrial empleando esteroides de origen natural se realizaron los ensayos que se muestran a continuación, tal como se indica.

Todos los ensayos se realizaron con células en crecimiento de las cepas mutantes de *M. smegmatis* mc² 155 (pMV261) indicados en cada caso. Las cepas se cultivaron en medio 7H9 que contenía colesterol o fitosteroides a una concentración final 1 mM disueltos en 3.6 % (v/v) de Tyloxapol (empleado para la biotransformación) y 1.8 mM de glicerol (empleado como fuente de carbono y energía), 0.5 mM del precursor del grupo hemo: ácido δ - aminolevulínico (ALA) –salvo en los casos en que se indique lo contrario- y 20 μ g ml⁻¹ de kanamicina (Ver Materiales y Métodos, secciones 2.2 y 7.3). Los cultivos se inocularon a una DO₆₀₀ inicial de 0.1. Se tomaron alícuotas a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h, se midió la DO₆₀₀ y una vez extraídas se analizaron cualitativamente mediante TLC y cuantitativamente mediante HPLC-DAD-MS: por separación cromatográfica y mediante la relación masa-carga (m/z) del ion característico y la rotura del mismo. La identificación y cuantificación de los productos se realizó como se indica

en Materiales y Métodos, Secciones 8.4.7 y 8.4.8. En todos los casos se analizaron todos los productos que se indican: colesterol (CHO) o fitosteroles (FITO), androstenediona (AD), androstenediendiona (ADD), 11 α -hidroxi-androstenediona (11 α OH-AD), 11 α -hidroxi-androstenediendiona (11 α OH-ADD), 22-hidroxi-23,24-bisnorcholesterol-4-en-3-one (4-HBC) y 22-hidroxi-23,24-bisnorcholesterol-1,4-dien-3-one (1,4-HBC); no obstante en el texto y en las figuras no se muestran aquellos que no son relevantes en el análisis debido a la cantidad insignificante en la que aparecen. Resulta necesario aclarar que la cuantificación se realizó en base a los compuestos identificados ante dichos; por tanto, los rendimientos y cuantificaciones pueden ser sensiblemente menores a los hallados al no ser posible asegurar que existan otros compuestos, bien más apolares que el colesterol, bien más polares que los compuestos 11 α -hidroxilados descritos, que no se estén detectando mediante los métodos cromatográficos empleados.

Para comprobar que el producto no se forma de manera natural por la acción del microorganismo se emplearon como control negativo las cepas mutantes de *M. smegmatis* mc² 155 indicadas en cada caso portando el plásmido pMV261 (sin inserto). Además ello permitió comparar el crecimiento con la cepa que porta el plásmido que expresa el operón.

1.2.2.3.1. Producción de 11 α OH-ADD en *M. smegmatis* Δ 6039

Como ya se ha comentado en la Introducción, existen bacterias mutantes en algunos genes de la ruta de degradación de esteroides capaces de acumular productos de interés. *M. smegmatis* Δ 6039 es una cepa mutante por delección en el gen *MSMEG_6039* (*kshB*), capaz de llevar a cabo la degradación de colesterol -o fitosteroles- hasta la obtención de ADD, ya que no es capaz de continuar la ruta de degradación hasta 9OH-AD debido a la delección del gen *kshB* el cual permite la producción de la proteína KstH encargada de realizar la hidroxilación en dicha posición; quedando por tanto bloqueada la ruta de degradación de colesterol -y fitosteroles- en ADD (ES P201430272, WO2015128534 A1; Galán *et al.*, artículo en preparación).

Por tanto se empleó *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN) para obtener 11 α OH-ADD a partir de materias primas de bajo coste como colesterol o fitoesteroides ya que, una vez obtenido el compuesto ADD, fue posible realizar la hidroxilación en la posición 11 α del mismo, debido a las proteínas producidas mediante la expresión de los genes contenidos en el operón FUN.

a) Producción 11 α OH-ADD a partir de colesterol

La figura R1.4 muestra la curva de crecimiento de las cepas *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN) y *M. smegmatis* Δ 6039 (pMV261) donde se observa que la expresión de los genes contenidos en el operón FUN parece afectar al crecimiento en las condiciones ensayadas.

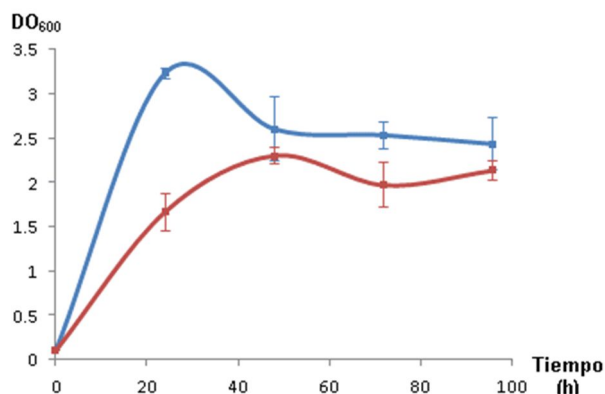


Figura R1.4 Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* Δ6039 (pMV261) (línea azul) y *M. smegmatis* Δ6039 (pMVFUN) (línea roja) en las condiciones de biotransformación.

La cepa *M. smegmatis* Δ6039 (pMVFUN) es capaz de biotransformar CHO en 11αOH-ADD. Se aprecia el consumo de CHO a partir de las 24 h, siendo la conversión del mismo a tiempo final (96 h) (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de 99.6 ± 0.3 %. También se aprecia la producción creciente a partir de las 48 h de 11αOH-ADD hasta el tiempo final (96 h), con un rendimiento de producción respecto a CHO (producto 11αOH-ADD producido respecto al sustrato CHO consumido, $\varphi_{11\alpha\text{OH-ADD/CHO}}$) de 65.8 ± 3.9 % (Fig. R1.5.A, Fig. R1.6 y Fig. R1.7).

Es notable la aparición de otros subproductos, identificados mediante TLC (Fig. R1.6) y HPLC-DAD-MS (Fig. R1.7), siendo el más importante ADD ($\varphi_{\text{ADD/CHO}} = 25.4 \pm 4.3$ %) y en menor medida 11αOH-AD ($\varphi_{11\alpha\text{OH-AD/CHO}} = 8.6 \pm 0.5$ %) (Fig. R1.5.B).

La cepa control *M. smegmatis* Δ6039 (pMV261) no tiene la capacidad de producir 11αOH-ADD (Fig. R1.7.A), pero si que se observó biotransformación de CHO en ADD, donde la conversión fue de 96.2 ± 5.9 % y el rendimiento del producto ADD producido con respecto al sustrato CHO consumido fue de $\varphi_{\text{ADD/CHO}} = 99.3 \pm 0.3$ %; observándose también una pequeña cantidad no significativa de 1,4-HBC.

A pesar de que la biotransformación se llevó a cabo durante 96 h, como puede observarse (Fig. R1.5), los mismos resultados habían sido alcanzados a las 72 h; por lo que el tiempo de biotransformación puede reducirse en, al menos, 24 h.

También se calculó el rendimiento del producto 11αOH-ADD con respecto a la biomasa (cantidad de producto 11αOH-ADD producido por cantidad de biomasa medida como peso seco presente en el cultivo, $\varphi_{11\alpha\text{OH-ADD/X}}$), siendo éste de 54.5 ± 3 (mg/mg), lo cual indica que por cada mg de biomasa se obtiene en torno a 54.5 mg del producto.

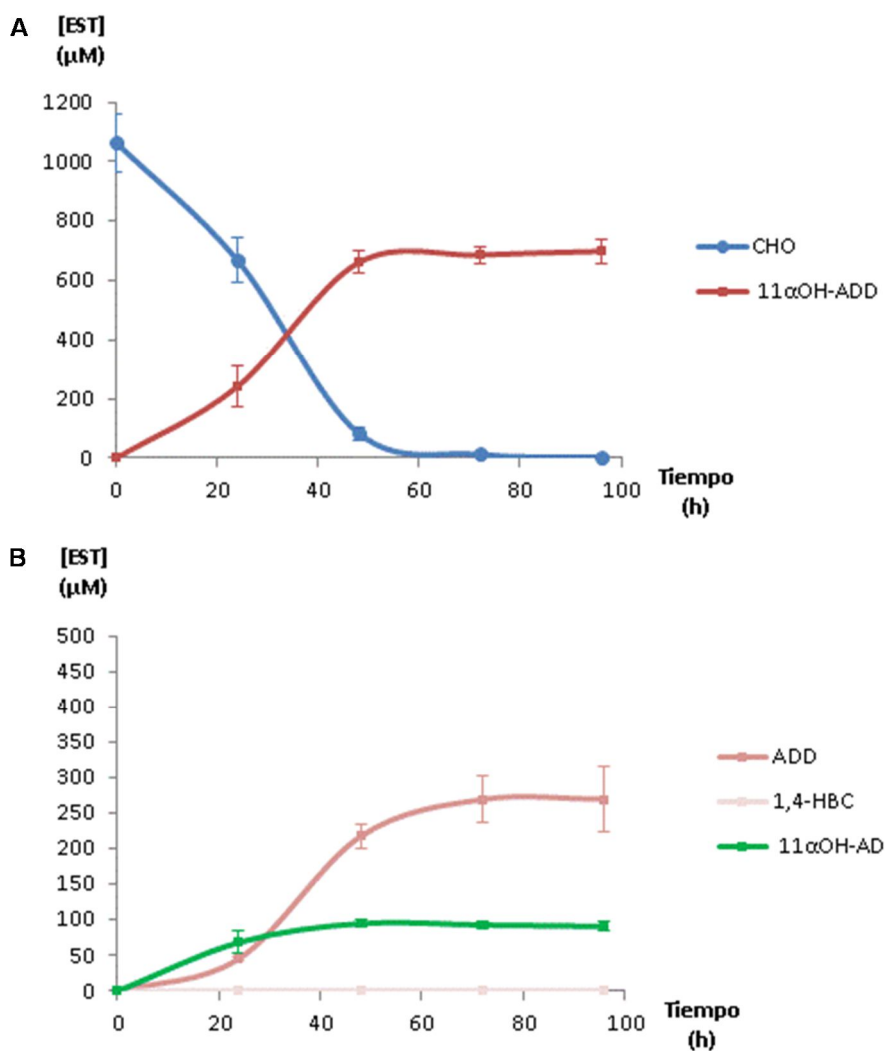


Figura R1.5 Seguimiento de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* Δ6039 (pMVFUN). A. Consumo de CHO y producción de 11αOH-ADD. B. Producción de subproductos relevantes.

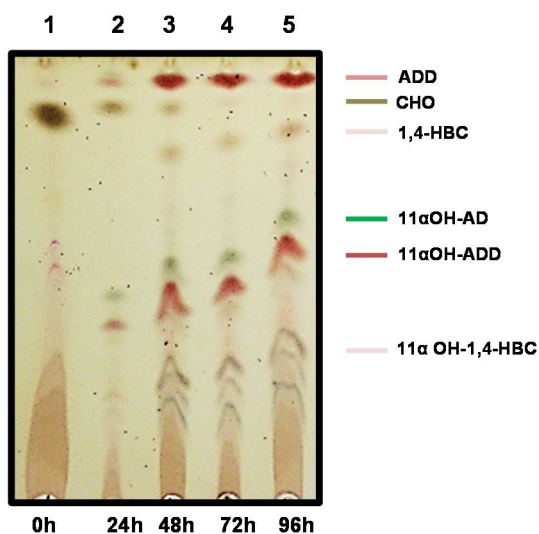


Figura R1.6 Análisis mediante TLC de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* Δ6039 (pMVFUN) a distintos tiempos (0 a 96 h).

Cabe destacar que la cuantificación de los compuestos identificados se realizó empleando los espectros de masas de los iones característicos de los mismos; en el caso de 11 α OH-ADD y 11 α OH-AD eluyen en el minuto 3.3 y 3.6, respectivamente, por lo que mediante HPLC-DAD los picos prácticamente solapan (Fig. R1.7.A) pero la relación masa/carga (m/z) del ion característico del 11 α OH-ADD es 301 y del 11 α OH-AD es 303; lo que permite la cuantificación empleando los espectros de masas de los mismos (Fig R1.7.B). En el caso del CHO no es posible visualizarlo mediante HPLC-DAD, sin embargo si mediante MS, donde su respuesta es baja, aunque perfectamente detectable y cuantificable mediante m/z de su ion característico 369.

Además de los compuestos mencionados, se observa también la aparición de otros compuestos no identificados hasta el momento más polares que el 11 α OH-ADD (por tanto migran más abajo en la TLC). No han sido tenidos en cuenta en la cuantificación los compuestos no observados mediante HPLC-DAD-MS, además resultan poco significativos por la pequeña proporción en la que aparecen. Nótese que el factor respuesta es diferente para cada compuesto: para algunos compuestos la respuesta puede ser alta pero encontrarse en pequeña cantidad, como es el caso de 1,4-HCB, cuya proporción total en la muestra es cercana al 1 % pero observable en TLC; mientras que el compuesto AD está presente en la misma cantidad y, debido a su menor respuesta, es apenas observable (Fig. R1.6). Teniendo en cuenta lo anterior y que el sumatorio de los rendimientos calculados para todos los productos identificados en la biotransformación es prácticamente del 100 % y por tanto el sumatorio de las concentraciones molares de todos los productos identificados coincide con la de CHO consumido; se estima que estos subproductos aparecen en una proporción muy baja (menor al 1%) y son considerados por tanto, irrelevantes en términos cuantitativos en la biotransformación.

Cabe destacar la observación mediante HPLC-DAD-MS de un compuesto no identificado que eluye en el minuto 4.92 y cuya m/z es 345. Resulta lógico pensar que se trate del compuesto 11 α OH-1,4-HBC, basándose en la polaridad –tiempo de elución- y porque m/z del mismo coincide con la de 1,4-HBC incrementada en 16, lo que podría corresponderse con la adición de un grupo OH; siendo además coincidente con el compuesto observado mediante TLC. Se ha podido confirmar que es 11 α OH-1,4-HBC y se ha podido comprobar donde migra en TLC gracias a que obtuvimos de Gadea-Pharma el producto 1,4-HBC y éste se biotransformó con una cepa recombinante de *Corynebacterium* para conseguir un “patrón” (ver más adelante).

Por todo lo anterior se puede concluir que es factible la producción de 11 α OH-ADD a partir de CHO con rendimientos cercanos al 66%.

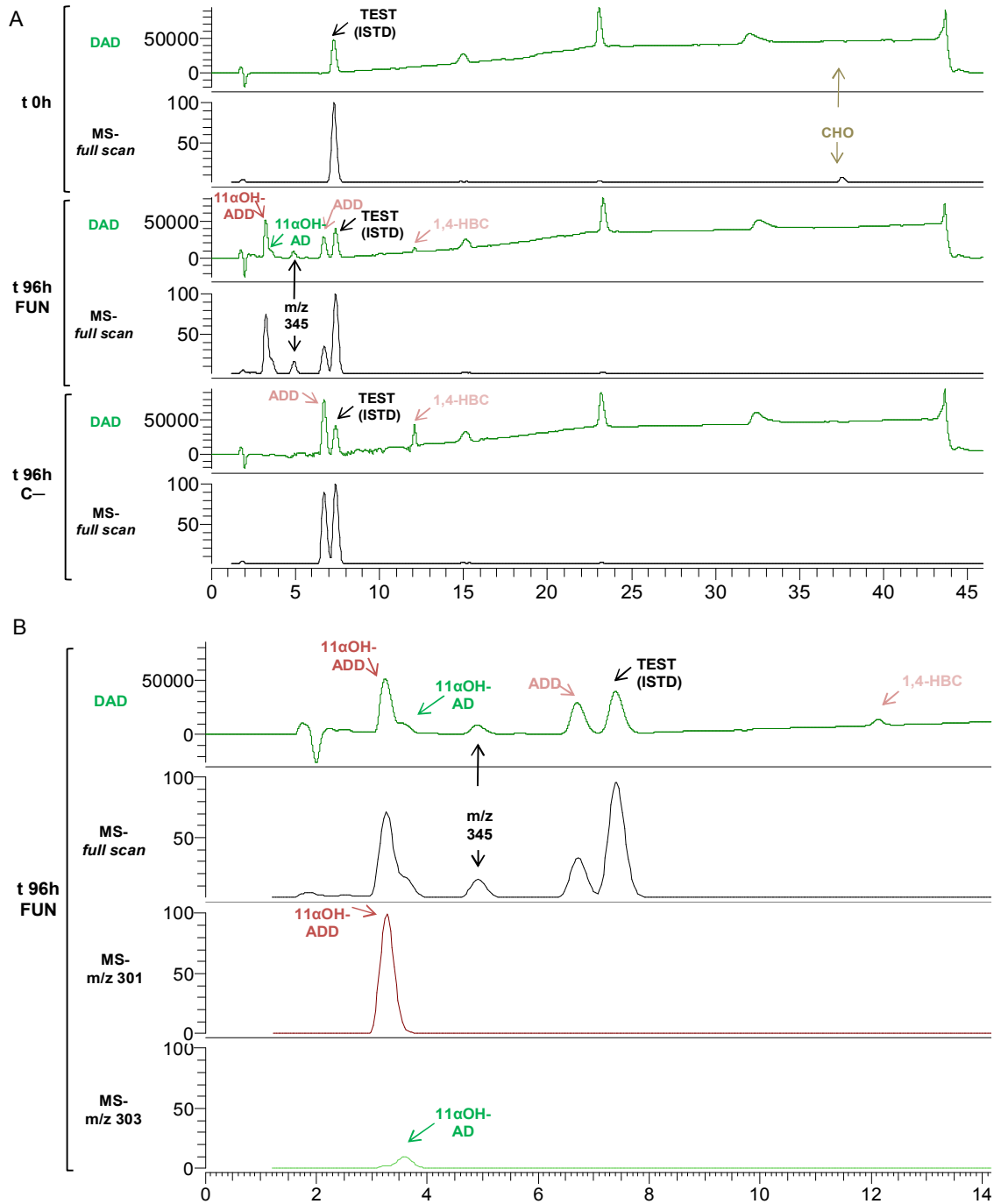


Figura R1.7. Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de las cepas *M. smegmatis* Δ6039 (pMVFUN) (FUN) y *M. smegmatis* Δ6039 (pMV261) (C-) a tiempo inicial (t 0h) y tiempo final (t 96h). **A.** Comparativa de la biotransformación de las cepas estudiadas. Cromatogramas HPLC registrados en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro) y espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (*full scan*) (línea negra) de muestras tomadas a tiempo inicial (t 0 h) y a tiempo final (t 96 h). **B.** Estudio de la biotransformación de *M. smegmatis* Δ6039 (pMVFUN) (FUN). Ampliación de los minutos 0 a 14 del cromatograma HPLC registrado en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro), espectro de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (*full scan*) (línea negra), espectro de masas del ion 301 (ion característico del compuesto 11αOH-ADD) (línea roja) y espectro de masas del ion 303 (ion característico del compuesto 11αOH-AD) (línea verde claro).

Tal como se ha expuesto, para favorecer la síntesis del citocromo CYP509C12 recombinante se añade al cultivo ácido δ -aminolevulínico (ALA) que es un precursor del grupo hemo, pero dado su alto precio se encarecería el coste del producto convirtiendo el proceso en inviable desde el punto de vista económico, por ello se propuso realizar el ensayo de biotransformación sin el uso del mismo.

Paralelamente se valoraron otras alternativas para favorecer la síntesis del citocromo y por tanto del grupo hemo sin la adición de ALA. *Mycobacterium tuberculosis* es capaz de usar hemo libre y el hemo de la hemoglobina como fuente de hierro ya que posee diferentes proteínas de membrana y un hemóforo para su transporte (Tullius *et al.*, 2011). En *M. smegmatis* no ha sido caracterizado hasta la fecha ningún sistema de transporte del grupo hemo libre o ruta alternativa; pero se asume que se trata de un sistema presente en micobacterias ya que el mutante de delección de *M. smegmatis* en la zona homóloga a la región en la que se encuentran los genes *Rv_0203* (hemóforo), *Rv_0202c* (*MmpL11*) y *Rv_0206c* (*MmpL3*) de *M. tuberculosis* pierde la capacidad de crecer en medio mínimo sin más aporte de hierro que el grupo hemo, siendo restaurada dicha capacidad al ser complementado en *trans* con los genes *Rv_0203*, *Rv_0202c* y *Rv_0206c* de *M. tuberculosis* (Tullius *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior se procedió a realizar los cultivos en las mismas condiciones que en el apartado anterior, pero en ausencia de ALA y en ausencia de ALA pero adicionando sangre ovina (sangre desfibrinada de oveja, Thermo Scientific) en proporción 1:10 (v:v) a los cultivos. Se empleó sangre ovina y no grupo hemo libre debido a que se trata de un compuesto más económico, factible para ser empleado en una fermentación industrial.

La figura R1.8 muestra las curvas de crecimiento de las cepas *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN) y *M. smegmatis* Δ 6039 (pMV261) donde se observa que la expresión de los genes contenidos en el operón FUN no parece afectar al crecimiento en ausencia de ALA (Fig. R1.8.A) ni en ausencia del mismo con adición de sangre (Fig. R1.8.B). Si se observa mejora en el crecimiento debido a la adición de sangre (Fig. R1.8.B), sin embargo no parece ser debido a la mejora en la producción del citocromo recombinante CYP509C12, ya que ocurre tanto en la cepa que lo contiene como en la cepa empleada como control; probablemente se deba a otros aportes. Se observa un comportamiento diáuxico en el caso del clon que porta el citocromo que no es fácil de explicar.

Cabe destacar como hecho significativo los cambios en la coloración de las células de cultivo; no se observan diferencias entre las cepas *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN) y *M. smegmatis* Δ 6039 (pMV261) debido probablemente al alto número de citocromos presente en *M. smegmatis*, como ya se ha explicado anteriormente; sin embargo si se observa esta diferencia entre añadir o no ALA o añadir sangre, en cada una de las cepas. (Fig. R1.9).

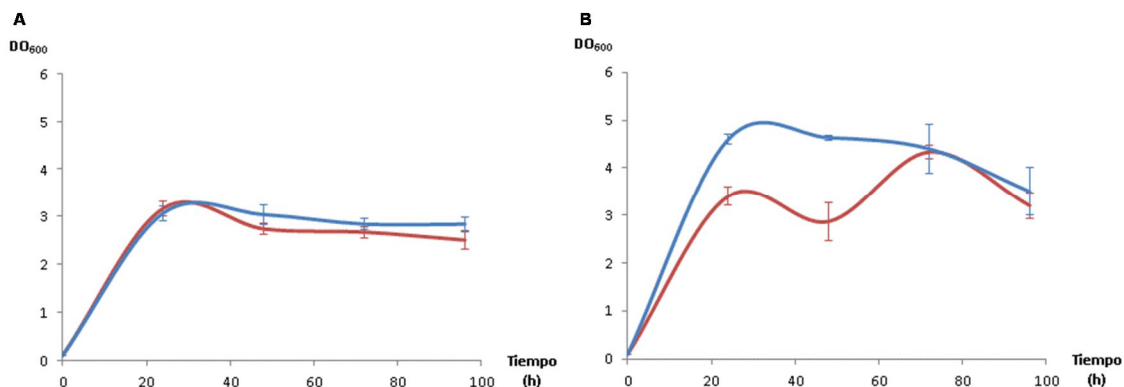


Figura R1.8 Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* Δ6039 (pMV261) (línea azul) y *M. smegmatis* Δ6039 (pMVFUN) (línea roja) en las condiciones de biotransformación en ausencia de ALA (A) y en ausencia de ALA y con adición de sangre (B).

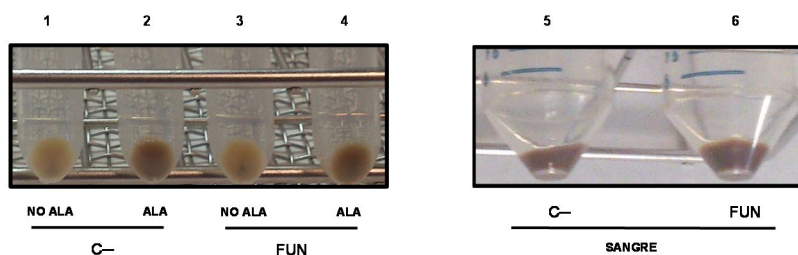


Figura R1.9 Sedimentos celulares de *M. smegmatis* Δ6039 (pMV261) (C-) y *M. smegmatis* Δ6039 (pMVFUN) (FUN) en las condiciones de biotransformación, en ausencia de ALA (NO ALA, carriles 1 y 3), con adición de ALA (ALA, carriles 2 y 4) y en ausencia de ALA pero con adición de sangre (SANGRE, carriles 5 y 6).

La cepa *M. smegmatis* Δ6039 (pMVFUN) es capaz de biotransformar CHO en 11 α OH-ADD, tanto en ausencia de ALA, como en ausencia de ALA y adición de sangre ovina. Se aprecia el consumo de CHO a partir de las 24 h, siendo la conversión del mismo a tiempo final (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de 99.9 ± 0.1 % en ausencia de ALA y de 98.8 ± 2.0 % en ausencia de ALA y adición de sangre; así como se aprecia también la producción creciente a partir de las 48 h de ADD y en menor medida de 11 α OH-ADD hasta el tiempo final (96 h), con un rendimiento de producción respecto a CHO (producto 11 α OH-ADD producido respecto al sustrato CHO consumido, $\phi_{11\alpha\text{OH-ADD}/\text{CHO}}$) de 11.6 ± 0.7 % en ausencia de ALA y de 13.6 ± 0.7 % en ausencia de ALA y adición de sangre (Fig. R1.10 y Fig. R1.11). Cabe destacar que la conversión hasta ADD resultó exitosa ($\phi_{\text{ADD}/\text{CHO}} = 85.8 \pm 0.7$ % en ausencia de ALA y de 84.6 ± 0.8 % en ausencia de ALA y adición de sangre), pero no se llevó a cabo la biotransformación hasta el producto de interés 11 α OH-ADD. La aparición de otros productos es poco significativa por la proporción en que aparecen, siendo el único compuesto destacable cuantitativamente a tiempo final el 11 α OH-AD ($\phi_{11\alpha\text{OH-AD}/\text{CHO}} = 2.0 \pm 0.1$ % en ausencia de ALA y $\phi_{11\alpha\text{OH-AD}/\text{CHO}} = 1.0 \pm 0.0$ % en ausencia de ALA y adición de sangre) (Fig. R1.10 y Fig. R1.11).

Como se esperaba, la cepa control *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMV261) no tuvo la capacidad de producir 11 α OH-ADD, pero si que se observó biotransformación de CHO en ADD, con valores muy semejantes a los alcanzados en presencia de ALA.

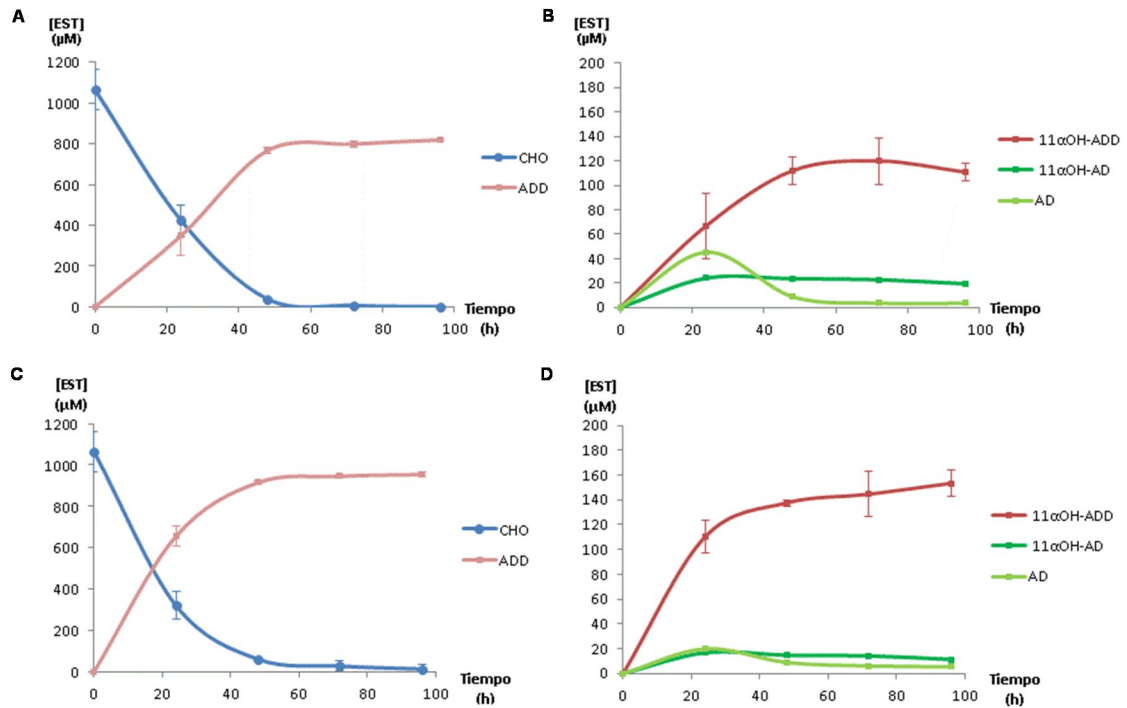


Figura R1.10 Seguimiento de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN). Consumo de CHO y producción de 11 α OH-ADD (A y C) y de subproductos relevantes (B y D) en ausencia de ALA (A y B) y en ausencia de ALA y con adición de sangre (C y D).

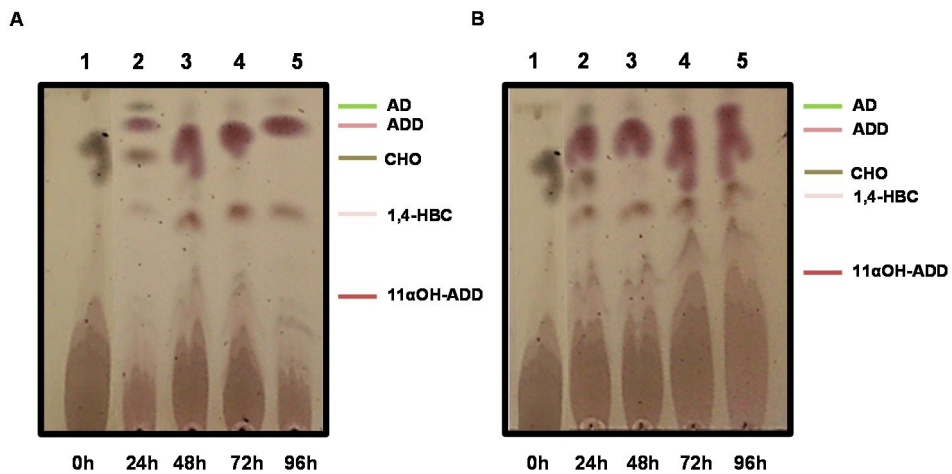


Figura R1.11 Análisis mediante TLC de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN) en ausencia de ALA (A) y en ausencia de ALA y con adición de sangre (B) a distintos tiempos (0 a 96 h).

También se calculó el rendimiento del producto 11 α OH-ADD con respecto a la biomasa (cantidad de producto 11 α OH-ADD producido por cantidad de biomasa medida como peso seco presente en el cultivo, $\phi_{11\alpha\text{OH-ADD}/X}$), siendo éste de 15.4 ± 0.1 (mg/mg) en ausencia de ALA y de 20.0 ± 0.1 (mg/mg) en ausencia de ALA y con adición de sangre; lo cual indica que por cada mg de biomasa se obtiene en torno a 15.4 mg y 20.0 mg del producto transformado, respectivamente.

También son detectados mediante HPLC-DAD-MS el compuesto 1,4-HBC y en una pequeña proporción el compuesto cuya m/z es 345 ya comentado anteriormente, 11 α OH-1,4-HBC. El compuesto 1,4-HBC, aunque sigue estando presente en una pequeña proporción (menor al 1%), puede observarse en una mayor proporción del mismo en el ensayo llevado a cabo en ausencia de ALA respecto a los otros 2 ensayos (Fig. R1.12).

No se observa acumulación de otros subproductos o intermediarios diferentes a los descritos anteriormente.

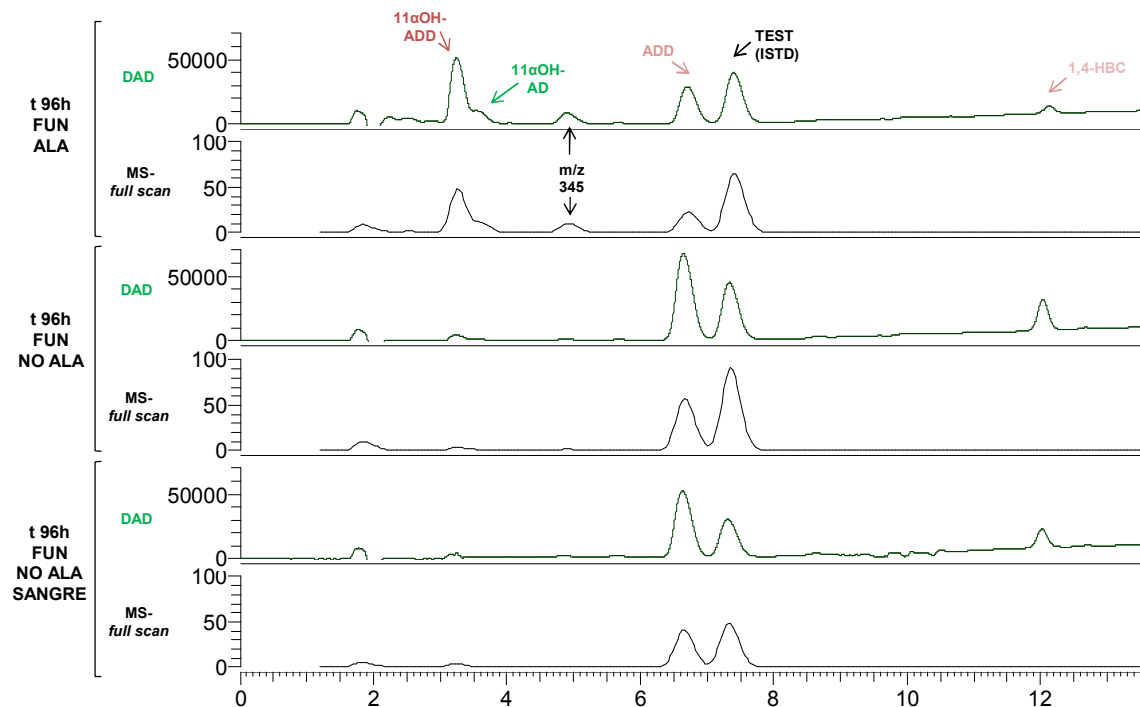


Figura R1.12 Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smagmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN) (FUN) en presencia de ALA (ALA), ausencia de ALA (NO ALA) y en ausencia de ALA y adición de sangre (NO ALA, SANGRE) a tiempo final (t 96 h). Cromatogramas de HPLC registrado en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro) y los espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (full scan) (línea negra).

b) Producción 11 α OH-ADD a partir de fitosteroles

Como ya se ha comentado en la introducción, los fitosteroles (término colectivo en el que se engloban los esteroides presentes en las plantas, siendo los principales β -sitosterol, campesterol y estigmasterol) son la materia prima de bajo coste de elección en la industria esteroides para

la producción de sintonas y productos de interés farmacológico y/o industrial. Es por ello que resulta de vital importancia comprobar la potencialidad de usarlos como sustrato de partida en las biotransformaciones que se han llevado a cabo.

Tal como se puede observar en las curvas de crecimiento de las cepas *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN) y *M. smegmatis* Δ 6039 (pMV261) la expresión de los genes contenidos en el operón FUN no parece afectar al crecimiento en las condiciones ensayadas (Fig. R1. 13).

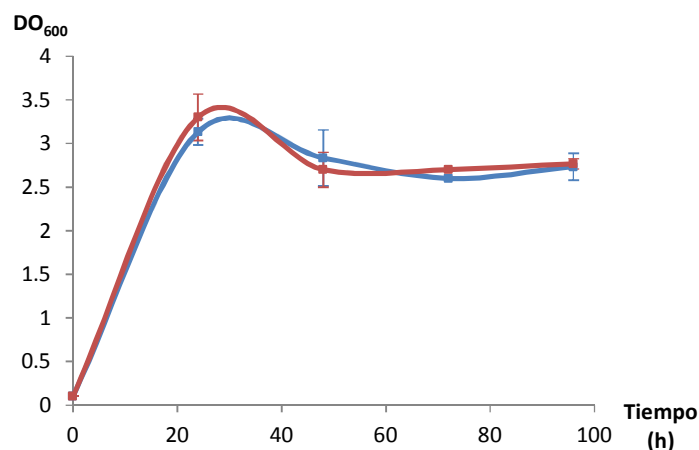


Figura R1.13 Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* Δ 6039 (pMV261) (línea azul) y *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN) (línea roja) en las condiciones de biotransformación.

La cepa *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN) es capaz de biotransformar FITO en 11 α OH-ADD. Se aprecia el consumo de FITO a partir de las 24 h, siendo la conversión del mismo a tiempo final (96 h) (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de 67.5 ± 0.3 %; así como se aprecia también la producción creciente a partir de las 48 h de ADD y 11 α OH-ADD hasta el tiempo final (96 h), con un rendimiento de producción respecto a FITO (producto 11 α OH-ADD producido respecto al sustrato FITO consumido, $\phi_{11\alpha\text{OH-ADD}/\text{FITO}}$) de 33.3 ± 0.2 % (Fig. R1.14, Fig. R1.15 y Fig. R1.16).

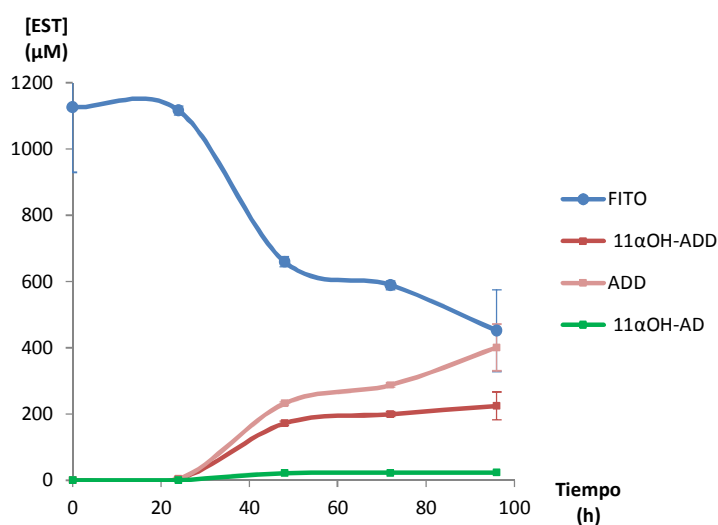


Figura R1.14 Seguimiento de la biotransformación de FITO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN). Consumo de FITO y producción de 11 α OH-ADD y subproductos relevantes.

Es notable la aparición de otros subproductos, identificados mediante TLC (Fig. R1.15) y HPLC-DAD-MS (Fig. R1.16), siendo el más representado ADD ($\varphi_{\text{ADD}/\text{CHO}} = 59.5 \pm 0.4 \%$) y en menor medida 11 α OH-AD ($\varphi_{11\alpha\text{OH-AD}/\text{CHO}} = 3.4 \pm 0.1 \%$) (Fig. R1.15 y Fig. R1.16).

La cepa control *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMV261) no tiene la capacidad de producir 11 α OH-ADD (Fig. R1.15), pero si que se observó biotransformación de FITO en ADD, donde la conversión fue de $67.5 \pm 0.3 \%$ y el rendimiento del producto ADD producido con respecto al sustrato FITO consumido fue de $\varphi_{\text{ADD}/\text{FITO}} = 95.7 \pm 0.9 \%$; observándose también una cantidad no significativa de 1,4-HBC (aproximadamente el doble que en la cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN), pero aun así muy pequeña por encontrarse en una proporción menor al 1 %).

El sumatorio de los rendimientos es de $96.9 \pm 0.2 \%$, por lo que no se cierra balance totalmente; así mismo la suma de las concentraciones molares de los productos es similar a la concentración molar empleada como sustrato, pero menor. La explicación más plausible es por errores de cuantificación debido a las dificultades propias del trabajo con fitosteroles y la cuantificación de los mismos debido a que se trata de una mezcla de esteroides (por lo tanto la concentración molar es una estimación basada en el peso molecular de sus componentes y de la proporción de los mismos) y bajísima solubilidad, aunque no hay que descartar la existencia de subproductos que no se estén considerando al no ser detectados con los métodos cromatográficos empleados.

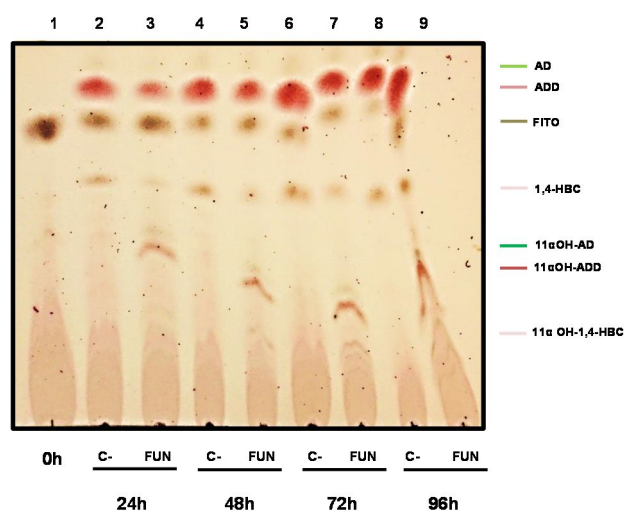


Figura R1.15 Análisis mediante TLC de la biotransformación de FITO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN) (FUN) y *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMV261) (C-) a distintos tiempos (0 a 96 h).

Al contrario que ocurre con la biotransformación empleando como sustrato CHO, la conversión de FITO no fue total a tiempos finales de 96 h (Fig. R1.14, Fig. R1.15 y Fig. R1.16); la producción del producto de interés parece ser creciente sin haber llegado a un máximo; por lo que quizás sería adecuado extender el tiempo del ensayo para conseguir mejores valores de conversión de los fitosteroles, así como mejores rendimientos. Teniendo en cuenta que el rendimiento para la producción de ADD empleando la cepa control *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMV261) es muy alto, lo que parece estar ocurriendo es que no se está biotransformado en

11 α -hidroxilado de manera eficiente el compuesto ADD, por lo que sería deseable encontrar unas condiciones de producción más adecuadas para la biotransformación.

También se calculó el rendimiento del producto 11 α OH-ADD con respecto a la biomasa (cantidad de producto 11 α OH-ADD producido por cantidad de biomasa medida como peso seco presente en el cultivo, $\phi_{11\alpha\text{OH-ADD}/X}$), siendo éste de 52 ± 12 (mg/mg), lo cual indica que por cada mg de biomasa se obtiene en torno a 52 mg del producto.

Además de los compuestos mencionados previamente, también son detectados mediante HPLC-DAD-MS, 1,4-HBC y el compuesto no identificado cuya m/z es 345 ya comentado, 11 α OH-1,4-HBC. Como ocurría en los experimentos anteriores, estos compuestos aparecen en una proporción irrelevante para la cuantificación (<1 %) (Fig. R1.15 y Fig. R1.16).

No se observa acumulación de otros subproductos o intermediarios diferentes a los descritos anteriormente.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores puede concluirse que es factible la obtención 11 α OH-androstenediendiona a partir de fitosteroles con rendimientos cercanos al 33 %.

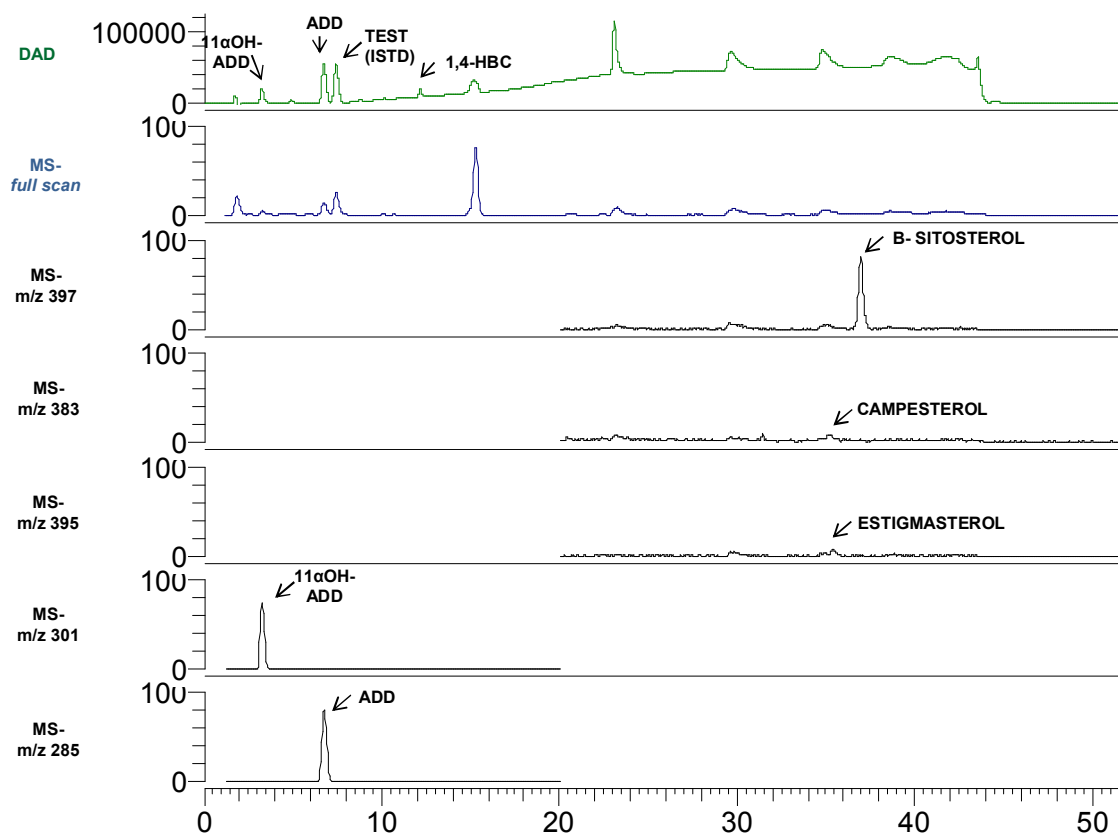


Figura R1.16 Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de FITO en cultivos en crecimiento de *M. smagmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN) a tiempo final. Cromatograma HPLC registrado en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro) y espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (full scan) (línea azul) y de los iones característicos de los compuestos significativos (línea negra).

1.2.2.3.2. Producción de 11 α OH-AD en *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941

Como ya se ha comentado en la Introducción, existen bacterias mutantes en algunos genes de la ruta de degradación de esteroides capaces de acumular sintonas de interés. *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 es una cepa mutante por delección en los genes *MSMEG_6039* (*kshB*) y *MSMEG_5941* (*kstD1*), capaz de llevar a cabo la degradación de colesterol -o fitosteroides- hasta la obtención de AD, ya que no es capaz de continuar la ruta de degradación hasta ADD debido a la delección del gen *kstD1* el cual permite la producción de la proteína KstD encargada de llevar a cabo la insaturación del segundo anillo; ni tampoco es capaz de continuar la ruta de degradación hasta 9OH-AD debido a la delección del gen *kshB* el cual permite la producción de la proteína KstH encargada de realizar la hidroxilación en dicha posición; quedando por tanto bloqueada la ruta de degradación de colesterol -y fitosteroides- en AD (ES P201430272, WO2015128534 A1; Galán *et al.*, artículo en preparación).

Por tanto se empleó *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN) para obtener 11 α OH-AD a partir de materias primas de bajo coste como colesterol o fitoesteroides ya que, una vez obtenido el compuesto AD, fue posible realizar la hidroxilación en la posición 11 α del mismo, debido a las proteínas producidas mediante la expresión de los genes contenidos en el operón FUN.

a) Producción 11 α OH-AD a partir de colesterol

La figura R1.17 muestra la curva de crecimiento de las cepas *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN) y *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMV261) donde se observa que la expresión de los genes contenidos en el operón FUN afecta al crecimiento en las condiciones ensayadas, quedando retrasado el crecimiento en 24 h y no llegando a alcanzar la densidad óptica de la cepa control *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN).

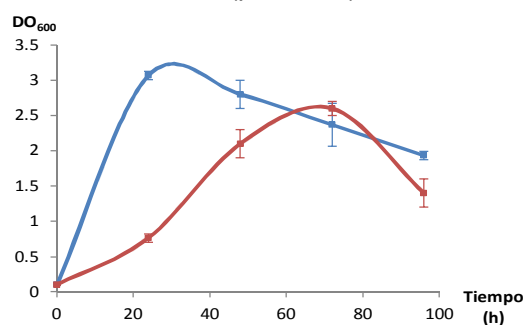


Figura R1.17 Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* Δ 6039 (pMV261) (línea azul) y *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN) (línea roja) en las condiciones de biotransformación.

La cepa *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN) es capaz de biotransformar CHO en 11 α OH-AD. Se aprecia el consumo de CHO a partir de las 24 h, siendo la conversión del mismo a tiempo final (96 h) (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de 99.6 ± 0.2 %; así como se aprecia también la producción creciente a partir de las 48 h de AD y 11 α OH-AD hasta el tiempo final (96 h), con un rendimiento de producción respecto a CHO (11 α OH-AD producido respecto al sustrato CHO consumido, $\phi_{11\alpha\text{OH-AD/CHO}}$) de 74.0 ± 0.2 % (Fig. R1.18.A, Fig. R1.19 y Fig. R1.20).

Es notable la aparición de otros subproductos, identificados mediante TLC (Fig. R1.19) y HPLC-DAD-MS (Fig. R1.20) como AD ($\phi_{AD/CHO} = 9.0 \pm 1.0 \%$), 4-HBC ($\phi_{4-HBC/CHO} = 8.3 \pm 0.4 \%$) y 11 α OH-ADD ($\phi_{11\alpha OH-ADD/CHO} = 7.9 \pm 0.4 \%$) (Fig. R1.18.B).

La cepa control *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMV261) no tiene la capacidad de producir 11 α OH-AD (Fig. R1.20.A), pero si que se observó biotransformación de CHO en AD, donde la conversión fue de $99.1 \pm 0.2 \%$ y el rendimiento del producto AD producido con respecto al sustrato CHO consumido fue de $\phi_{AD/CHO} = 76.7 \pm 3.7 \%$; observándose también una cantidad significativa de 4-HBC ($\phi_{4-HBC/CHO} = 18.3 \pm 2.9 \%$) y muy poco ADD ($\phi_{ADD/CHO} = 4.9 \pm 0.9 \%$).

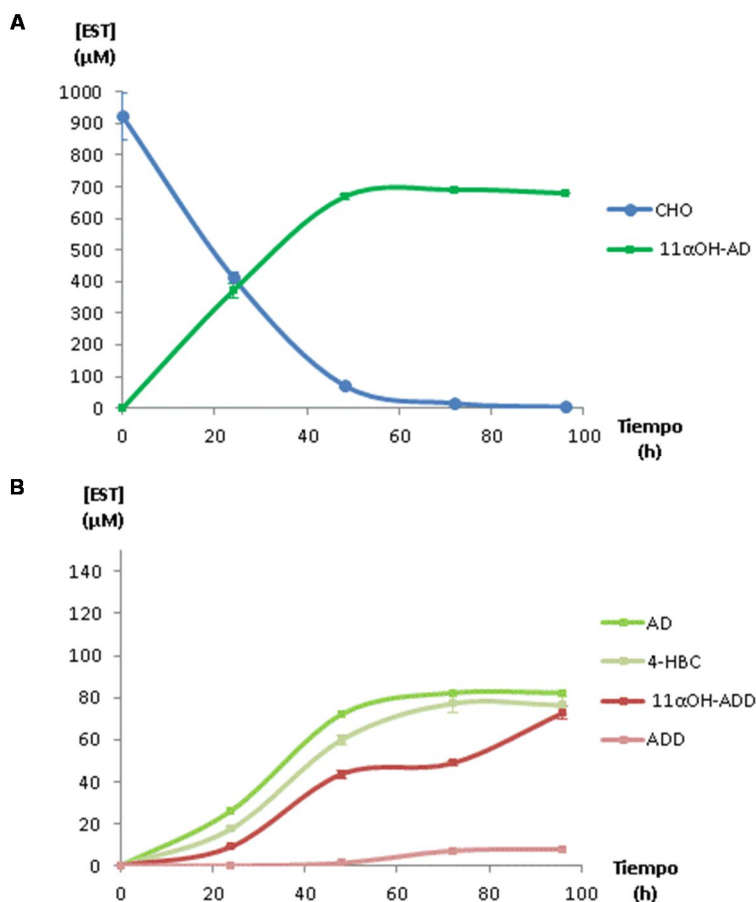


Figura R1.18 Seguimiento de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN). A. Consumo de CHO y producción de 11 α OH-AD. B. Producción de subproductos relevantes.

A pesar de que la biotransformación se llevó a cabo durante 96 h, como puede observarse (Fig. R1.18), los mismos resultados habían sido alcanzados a las 72 h al igual que ocurría con la transformación llevada a cabo por la cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN); por lo que el tiempo de biotransformación puede reducirse en, al menos, 24 h.

También se calculó el rendimiento del producto 11 α OH-AD con respecto a la biomasa (cantidad de producto 11 α OH-AD producido por cantidad de biomasa medida como peso seco presente en el cultivo, $\phi_{11\alpha OH-AD/X}$), siendo éste de 167.7 ± 14.3 (mg/mg), lo cual indica que por cada mg de biomasa se obtiene en torno a 168 mg del producto.

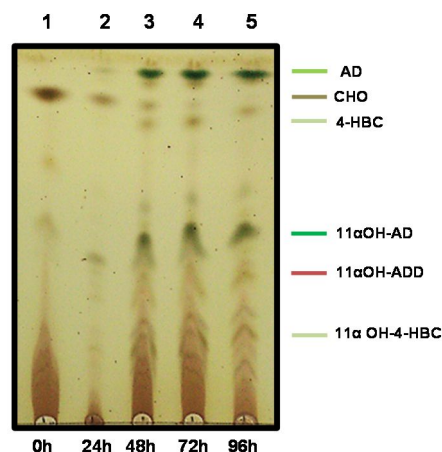


Figura R1.19 Análisis mediante TLC de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) a distintos tiempos (0 a 96 h).

Además de los compuestos mencionados, se observa también la aparición de otros compuestos no identificados hasta el momento, más polares que el 11 α OH-AD (por tanto migran menos en la TLC). No han sido tenidos en cuenta los compuestos no cuantificados mediante HPLC-DAD-MS, no obstante se detallan más adelante los identificados mediante HPLC-DAD-MS.

Al igual que se ha comentado en el caso anterior, en los experimentos llevados a cabo con la cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN) productora de ADD, existen compuestos cuyo factor respuesta puede ser superior al de otros, por lo que esto debe tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados.

Cabe destacar la observación mediante HPLC-DAD-MS de un compuesto no identificado que eluye en el minuto 5.7 y cuya m/z es 347. Resulta lógico pensar que se trate del compuesto 11 α OH-4-HBC, basándose en la polaridad –tiempo de elución- y porque la m/z del mismo coincide con la del 4-HBC incrementada en 16, lo que podría corresponderse con la adición de un grupo OH; siendo además coincidente con el compuesto observado mediante TLC.

Aunque en una proporción no significativa, se detecta en el minuto 2.2 un compuesto no identificado cuya m/z es 319. Parece lógico que se trate del compuesto 11 α OH-AD hidroxilado en otra posición, probablemente en 6 β ; basándose en la polaridad –tiempo de elución- y porque la m/z del mismo coincide con la del 11 α OH-AD incrementada en 16. No obstante no es posible confirmarlo al no disponer de un patrón.

Aparece también, en el minuto 4.4, otro compuesto no identificado de m/z 359, que también aparece en el experimento llevado a cabo por la cepa control *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMV261), pero no está presente en el tiempo inicial del cultivo.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se puede concluir que es factible la producción de 11 α OH-AD a partir de CHO con rendimientos cercanos al 74%.

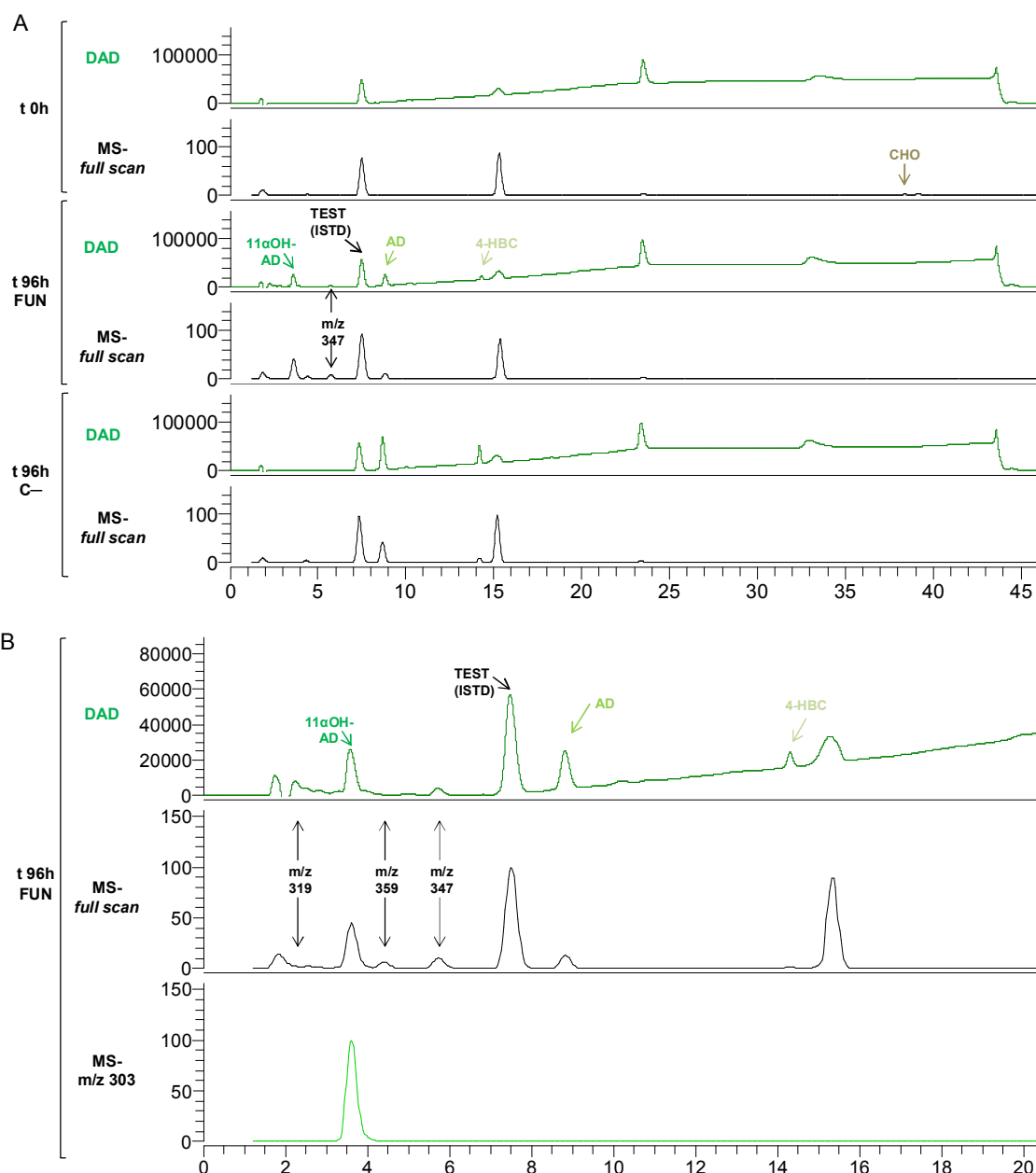


Figura R1.20 Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de las cepas *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) (FUN) y *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMV261) (C-) a tiempo inicial (t 0h) y tiempo final (t 96 h). **A.** Comparativa de la biotransformación de las cepas estudiadas. Cromatogramas HPLC registrados en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro) y espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (*full scan*) (línea negra). **B.** Estudio de la biotransformación de *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) (FUN). Cromatograma HPLC registrado en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro), espectro de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (*full scan*) (línea negra) y espectro de masas del ion 303 (ion característico del compuesto 11 α OH-AD) (línea verde claro).

Al igual que se ha realizado con la cepa productora de 11 α OH-ADD, *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN), y por los motivos previamente argumentados, se ha tratado de eliminar el ALA de la biotransformación para reducir los costes.

La figura R1.21 muestra las curvas de crecimiento de las cepas *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) y *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMV261) donde se observa que la expresión de los genes contenidos en el operón FUN afecta muy levemente al crecimiento en ausencia de ALA (Fig. R1.21.A) y en mayor medida en ausencia del mismo con adición de sangre (Fig. R1.21.B), aunque con una fase de latencia menor que cuando se adiciona ALA (Fig. R1.17). Se observa mejora en el crecimiento debido a la adición de sangre (Fig. R1.21.B), sin embargo no parece ser debido a la mejora en la producción del citocromo recombinante CYP509C12, ya que ocurre tanto en la cepa que lo contiene como en la cepa empleada como control; probablemente se deba a otros aportes nutritivos de la sangre. Se observa también un efecto diáuxico.

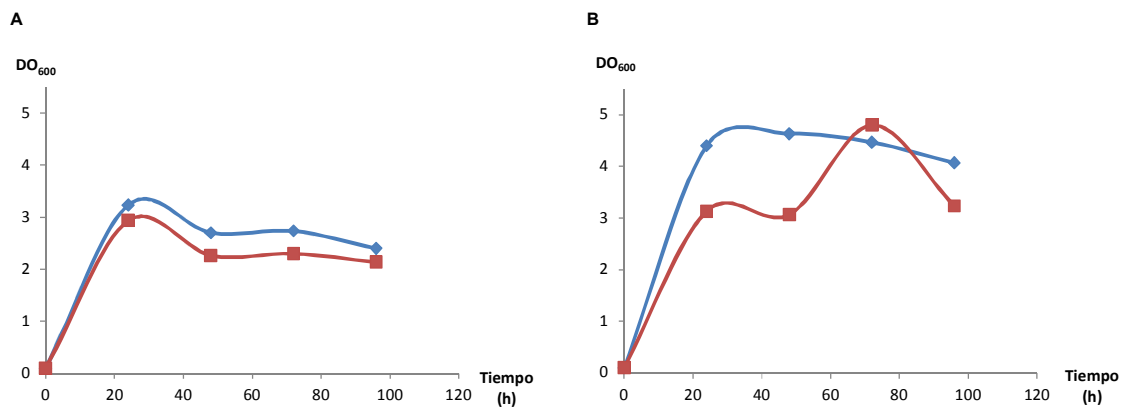


Figura R1.21. Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMV261) (línea azul) y *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) (línea roja) en las condiciones de biotransformación en ausencia de ALA (A) y en ausencia de ALA y con adición de sangre (B).

Igual que sucedía con las cepas *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN) y *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMV261) tampoco se observan diferencias entre las cepas *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) y *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMV261) debido probablemente al alto número de citocromos presentes en *M. smegmatis*, como ya se ha explicado anteriormente; sin embargo si se observa esta diferencia entre añadir o no ALA o añadir sangre, en cada una de las cepas (Fig. R1.22).

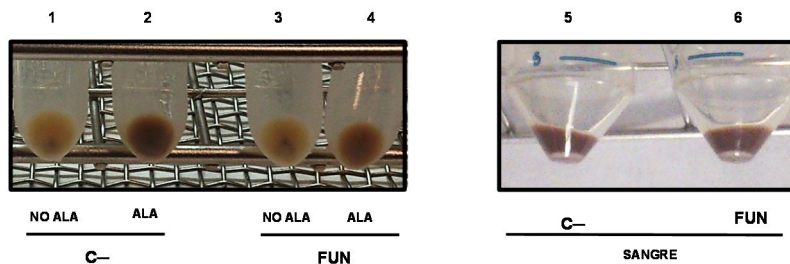


Figura R1.22 Sedimentos celulares de *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMV261) (C-) y *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) (FUN) en las condiciones de biotransformación, en ausencia de ALA (NO ALA, carriles 1 y 3), con adición de ALA (ALA, carriles 2 y 4) y en ausencia de ALA pero con adición de sangre (SANGRE, carriles 5 y 6).

Sin embargo al lisar la célula si se observan diferencias de coloración en la fracción soluble de los extractos celulares de las cepas *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN), no así en la fracción insoluble; lo que permite concluir que existe una mayor proporción de citocromos en la fracción soluble de la misma (Fig. R1.23)

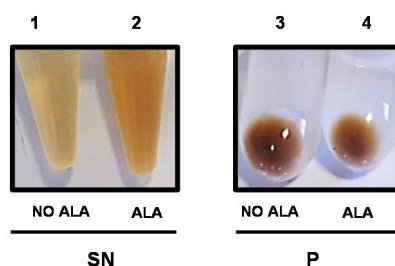


Figura R1.23 Fracciones solubles (SN) e insolubles (P) de los extractos celulares de *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) en las condiciones de biotransformación en ausencia de ALA (NO ALA) y con adición de ALA (ALA).

La cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) es capaz de biotransformar CHO en 11 α OH-AD, tanto en ausencia de ALA, como en ausencia de ALA y adición de sangre ovina. Se aprecia el consumo de CHO a partir de las 24 h, siendo la conversión del mismo a tiempo final (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de 99.7 \pm 0.3 % en ausencia de ALA y de 99.8 \pm 0.2 en ausencia de ALA y adición de sangre; así como se aprecia también la producción creciente a partir de las 48 h de AD y 11 α OH-AD hasta el tiempo final (96 h), con un rendimiento de producción respecto a CHO (producto 11 α OH-AD producido respecto al sustrato CHO consumido, $\phi_{11\alpha\text{OH-AD}/\text{CHO}}$) de 70.4 \pm 1.5 % en ausencia de ALA y de 69.2 \pm 2.4 % en ausencia de ALA y adición de sangre (Fig. R1.24 y Fig. R1.25).

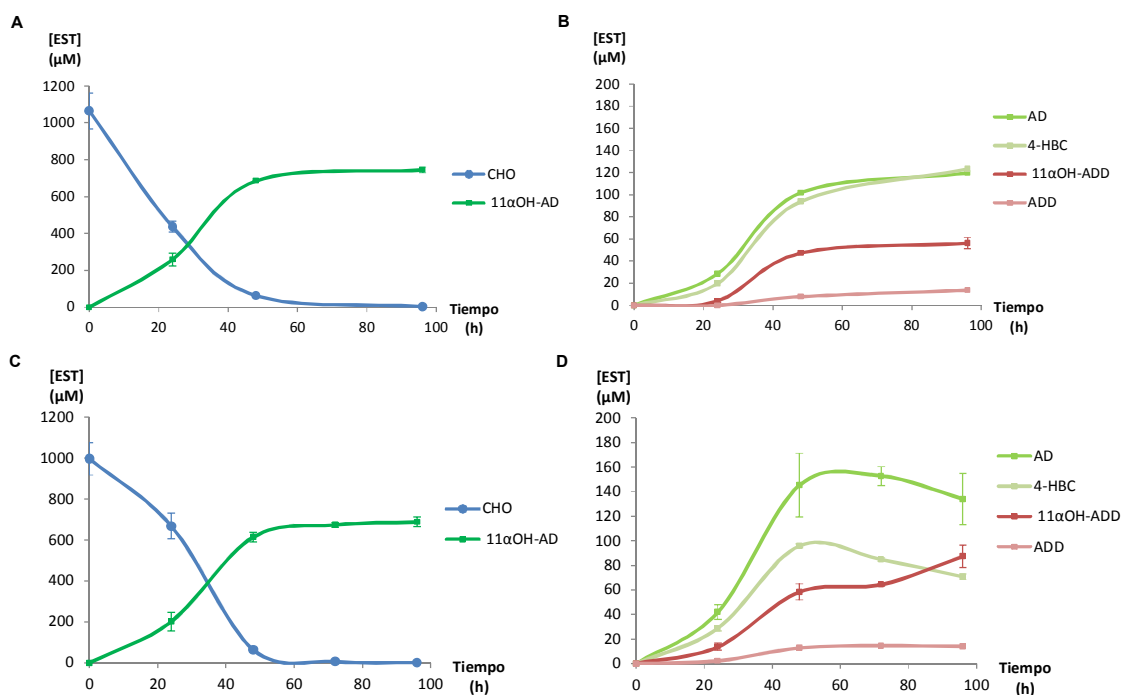


Figura R1.24 Seguimiento de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN). Consumo de CHO y producción de 11 α OH-ADD (A y C) y de subproductos relevantes (B y D) en ausencia de ALA (A y B) y en ausencia de ALA y con adición de sangre (C y D).

Aparecen también otros subproductos, siendo destacables cuantitativamente a tiempo final AD ($\phi_{AD/CHO} = 11.3 \pm 1.3$ % en ausencia de ALA y $\phi_{AD/CHO} = 13.5 \pm 2.1$ % en ausencia de ALA y adición de sangre), 4-HBC ($\phi_{4-HBC/CHO} = 11.7 \pm 0.5$ % en ausencia de ALA y $\phi_{4-HBC/CHO} = 7.1 \pm 0.3$ % en ausencia de ALA y adición de sangre) y 11 α OH-ADD ($\phi_{11\alpha OH-ADD/CHO} = 5.3 \pm 0.5$ % en ausencia de ALA y $\phi_{11\alpha OH-ADD/CHO} = 8.8 \pm 0.9$ % en ausencia de ALA y adición de sangre) (Fig. R1.24 y Fig. R1.25).

Como era de esperar, la cepa control *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMV261) no tuvo la capacidad de producir 11 α OH-AD, pero si que se observó biotransformación de CHO en AD, con valores semejantes a los alcanzados en presencia de ALA.

También se calculó el rendimiento del producto 11 α OH-AD con respecto a la biomasa (cantidad de producto 11 α OH-AD producido por cantidad de biomasa medida como peso seco presente en el cultivo, $\phi_{11\alpha OH-AD/X}$), siendo éste de 175.3 ± 21.4 (mg/mg) en ausencia de ALA y de 75.5 ± 7.2 (mg/mg) en ausencia de ALA y con adición de sangre; lo cual indica que por cada mg de biomasa se obtiene en torno a 175 mg y 76 mg del producto, respectivamente.

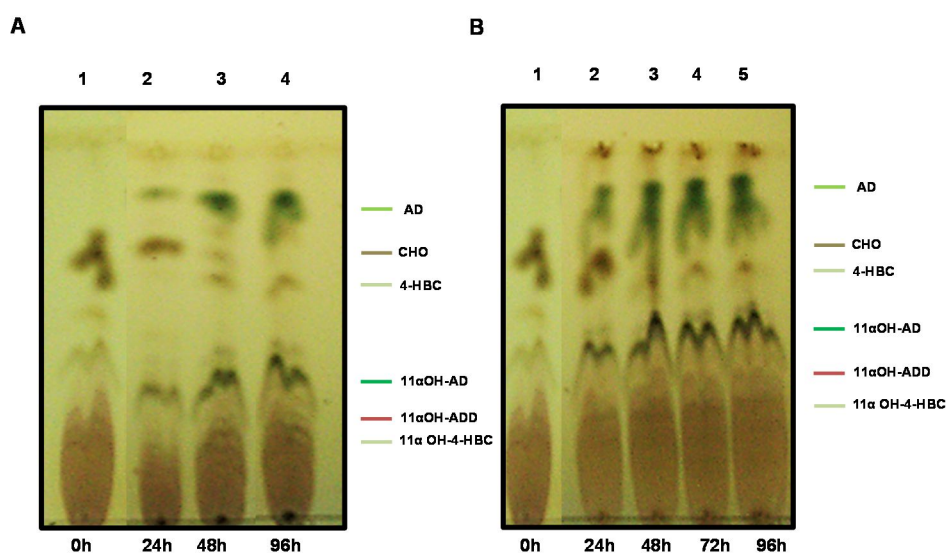


Figura R1.25 Análisis mediante TLC de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) en ausencia de ALA (A) y en ausencia de ALA y con adición de sangre (B) a distintos tiempos (0 a 96 h).

También es detectado mediante HPLC-DAD-MS el compuesto el compuesto cuya m/z es 347 ya comentado anteriormente que probablemente sea 11 α OH-4-HBC, tanto en ausencia de ALA como en ausencia de ALA pero con adición de sangre, en una proporción muy similar a la encontrada en los experimentos llevados a cabo anteriormente en presencia de ALA (Fig. R1.26). También es detectado el compuesto no identificado cuya m/z es 359, también en la misma proporción.

No se observa acumulación de otros subproductos o intermediarios diferentes a los descritos anteriormente.

Por todo lo anterior puede concluirse que es factible la obtención 11 α OH-androstenediona a partir de colesterol, en ausencia de ALA con rendimientos cercanos al 70 % y en ausencia de ALA pero con adición de sangre con rendimientos cercanos al 69%.

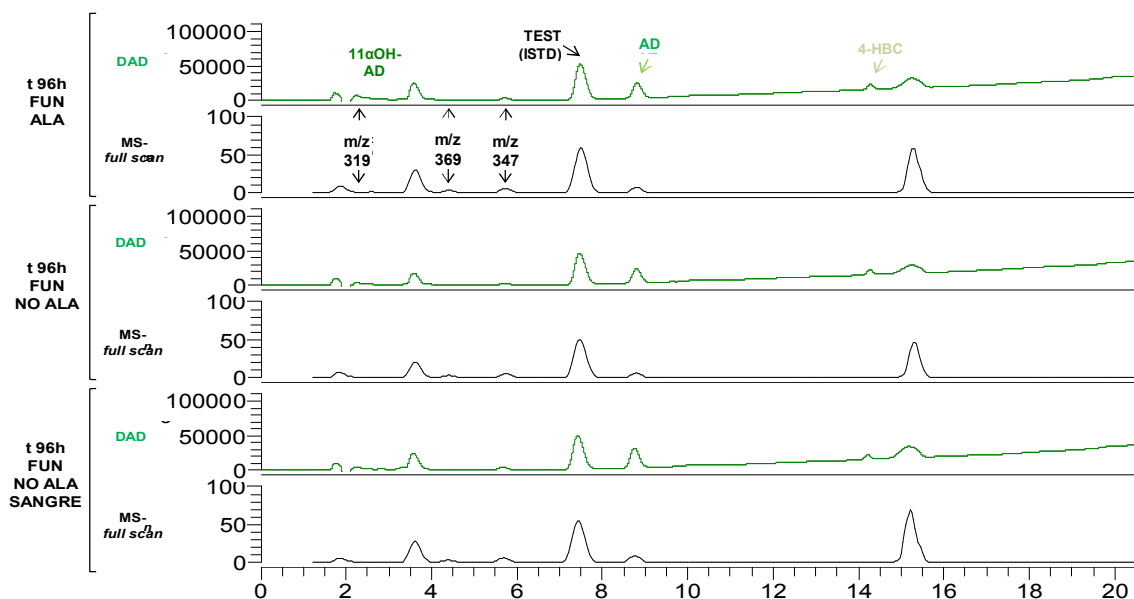


Figura R1.26 Análisis mediante HPLC-DAD-MA de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) (FUN) en presencia de ALA (ALA), en ausencia de ALA (NO ALA) y en ausencia de ALA y adición de sangre (NO ALA, SANGRE) a tiempo final. Cromatogramas de HPLC registrados en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro) y espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (full scan) (línea negra).

b) Producción 11 α OH-AD a partir de fitosteroles

De la misma manera que se estudió en el apartado anterior la producción a partir de fitoesteroles con la cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN) productora de 11 α OH-ADD, resultaba de especial interés comprobar la posibilidad de usar los fitosteroles como sustrato de partida en las biotransformaciones llevadas a cabo por la cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) para producir 11 α OH-AD.

Tal como se puede observar en las curvas de crecimiento de las cepas *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) y *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMV261) la expresión de los genes contenidos en el operón FUN parece afectar el crecimiento en las condiciones ensayadas (Fig. R1. 27).

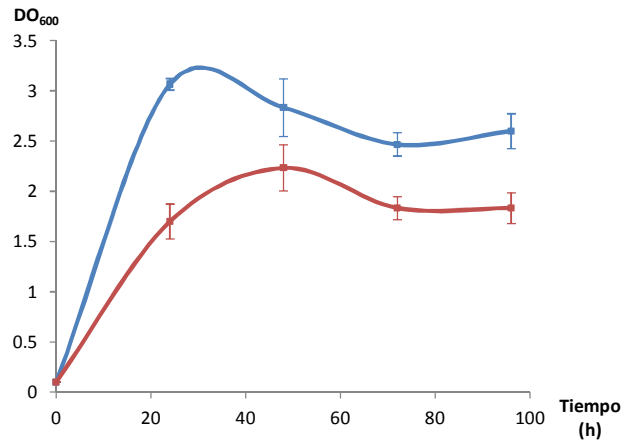


Figura R1.27 Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMV261) (línea azul) y *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) (línea roja) en las condiciones de biotransformación.

La cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) es capaz de biotransformar FITO en 11 α OH-AD. En esta cepa se aprecia el consumo de FITO a partir de las 24 h, siendo la conversión del mismo a tiempo final (96 h) (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de $73.0 \pm 1.7 \%$; así como se aprecia también la producción creciente a partir de las 48 h de AD y 11 α OH-AD hasta el tiempo final (96 h), con un rendimiento de producción respecto a FITO (producto 11 α OH-AD producido respecto al sustrato FITO consumido, $\phi_{11\alpha\text{OH-AD}/\text{FITO}}$) de $57.3 \pm 5.3 \%$ Fig. R1.28, Fig. R1.29 y Fig. R1.30).

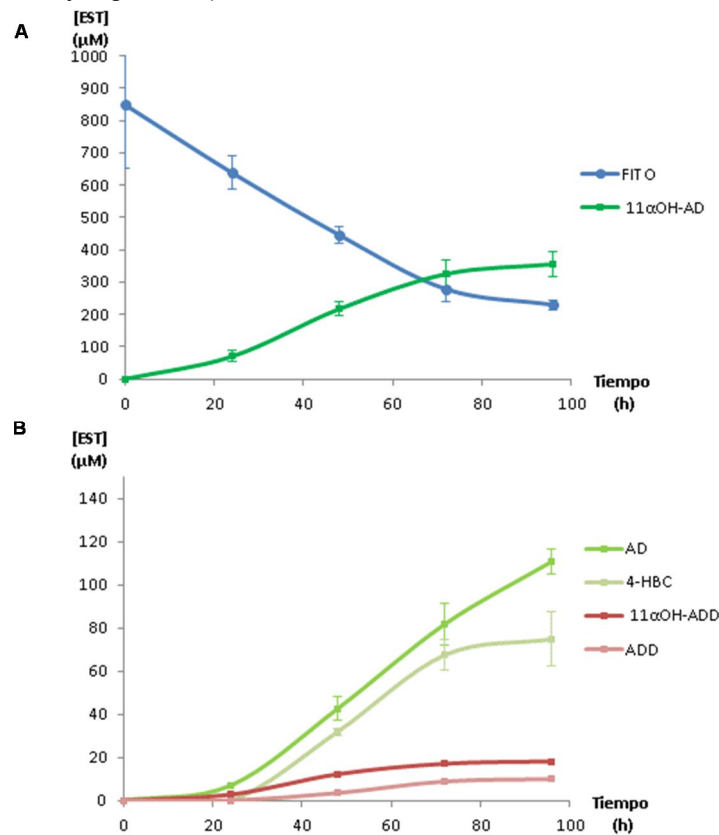


Figura R1.28 Seguimiento de la biotransformación de FITO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN). A. Consumo de CHO y producción de 11 α OH-ADD. B. Subproductos relevantes.

Es notable la aparición de otros subproductos, identificados mediante TLC (Fig. R1.29) y HPLC-DAD-MS (Fig. R1.30), siendo el más representado AD ($\varphi_{AD/CHO} = 17.9 \pm 1.3 \%$), 4-HBC ($\varphi_{AD/CHO} = 12.1 \pm 2.3 \%$) y en menor medida 11 α OH-ADD ($\varphi_{11\alpha OH-ADD/CHO} = 2.9 \pm 0.2 \%$) (Fig. R1.29 y Fig. R1.30).

La cepa control *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMV261) no tiene la capacidad de producir 11 α OH-AD (Fig. R1.29), pero si que se observó biotransformación de FITO en AD, donde la conversión fue de $52.7 \pm 12.9 \%$ y el rendimiento del producto AD producido con respecto al sustrato FITO consumido fue de $\varphi_{ADD/FITO} = 77.6 \pm 2.0 \%$; observándose también una cantidad significativa de 4-HBC (mucho mayor que en la cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN)).

El sumatorio de los rendimientos es de $91.8 \pm 1.4 \%$, por lo que no se cierra balance totalmente; así mismo la suma de las concentraciones molares de los productos es similar a la concentración molar empleada como sustrato, pero menor. Una posible explicación es por errores de cuantificación debido a las dificultades propias del trabajo con fitosteroles y la cuantificación de los mismos debido a que se trata de una mezcla de esteroides (por lo tanto la concentración molar es una estimación basada en el peso molecular de sus componentes y de la proporción de los mismos) y bajísima solubilidad; aunque no hay que descartar la existencia de subproductos, siendo en este caso significativa la cantidad de 11 α -4-HBC como se detalla más adelante, u otros que no se estén considerando al no ser detectados con los métodos cromatográficos empleados.

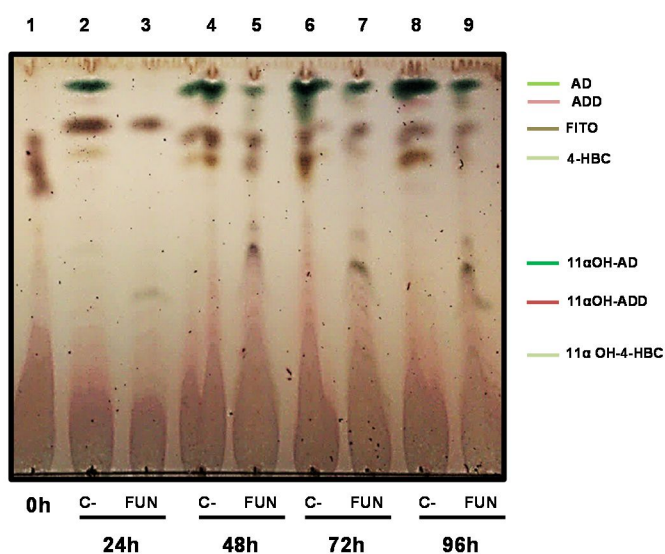


Figura R1.29 Análisis mediante TLC de la biotransformación de FITO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) (FUN) y *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMV261) (C-) a distintos tiempos (0 a 96 h).

Al contrario que ocurre con la biotransformación empleando como sustrato CHO, pero al igual que ocurre con la biotransformación empleando como sustrato FITO con la cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN), la conversión de FITO no fue total a tiempos finales (96 h) (Fig. R1.28, Fig. R1.29 y Fig. R1.30); la producción del producto de interés parece ser creciente aun, sin haber

llegado a un máximo; por lo que quizás sería adecuado extender el tiempo del ensayo para conseguir mejores valores de conversión de los fitosteroles, así como mejores rendimientos.

También se calculó el rendimiento del producto 11 α OH-AD con respecto a la biomasa (cantidad de producto 11 α OH-AD producido por cantidad de biomasa medida como peso seco presente en el cultivo, $\phi_{11\alpha\text{OH-AD}/X}$), siendo éste de 97.8 ± 11.0 (mg/mg), lo cual indica que por cada mg de biomasa se obtiene en torno a 98 mg del producto.

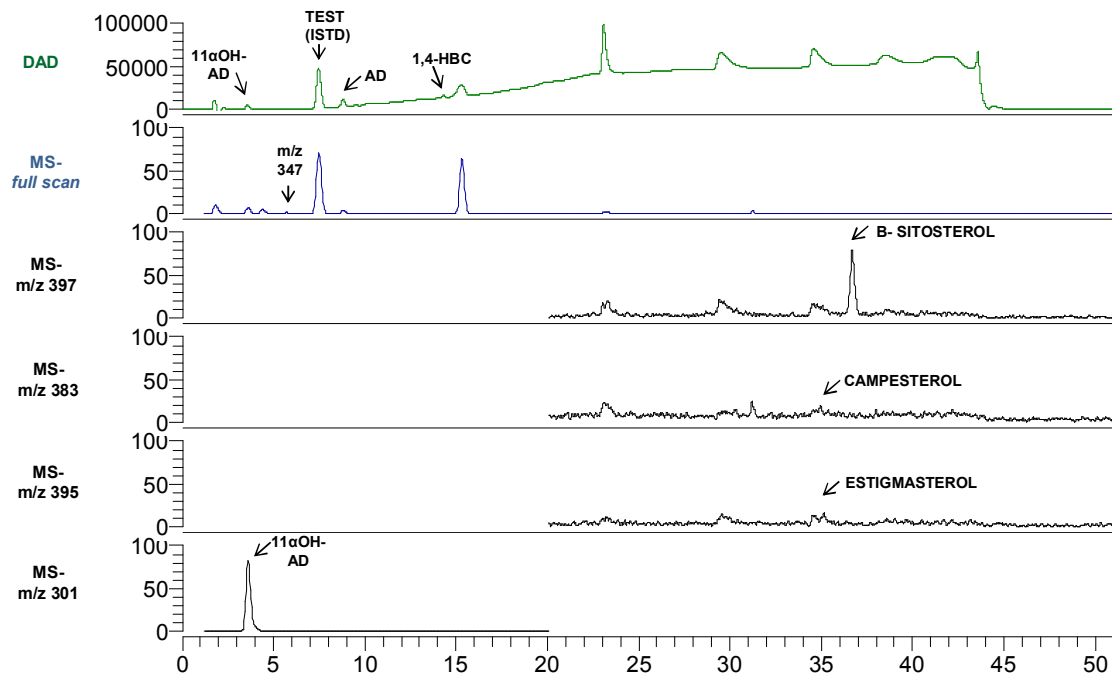


Figura R1.30 Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de FITO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) a tiempo final. Cromatograma HPLC registrado en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro) y espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (*full scan*) (línea azul) y de los iones característicos de los compuestos significativos (línea negra).

Además de los compuestos mencionados previamente, también son detectados mediante TLC y HPLC-DAD-MS el compuesto 4-HBC y el compuesto no identificado cuya m/z es 347 ya comentado, que probablemente sea 11 α OH-4-HBC, como ocurría en los experimentos anteriores. Cabe destacar la gran diferencia en producción de 4-HBC (más del doble) en la cepa control *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMV261) con respecto a la cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN); podría pensarse que es debido a que en esta última se transforma en 11 α OH-4-HBC, sin embargo, aunque es detectado mediante HPLC-DAD-MS, aparece en una proporción muy baja, casi despreciable y es prácticamente indetectable mediante TLC (Fig. R1.29 y Fig. R1.30).

No se observa acumulación de otros subproductos o intermediarios diferentes a los descritos anteriormente.

A partir de los resultados anteriores puede concluirse que es factible la obtención 11 α OH-AD a partir de fitosteroles con rendimientos cercanos al 57 %.

Teniendo en cuenta estos resultados, y como prueba de concepto, se realizaron experimentos para comprobar si podía usarse esta cepa para la producción industrial de 11 α OH-AD a partir de fitosteroles, empleando las condiciones habituales de la producción a escala piloto. Cabe destacar que aún no se había intentado optimizar el proceso en sí mismo, como tampoco se había intentado optimizar la producción de biomasa o la producción del compuesto de interés, ni en los experimentos explicados anteriormente, llevados a cabo a escala laboratorio, en matraz, ni en los experimentos realizados en biorreactor. Por ello, los fitosteroles fueron disueltos en aceite de girasol a una concentración final de 15 g l⁻¹ y este aceite fue añadido a una concentración final (v/v) 1/6 con respecto al volumen final del reactor, donde el resto es solución acuosa de sales y licor de macerado de maíz (*corn steep liquor*); quedando por tanto no soluble en el reactor (véase Materiales y Métodos, Sección 7.3.2). Para este experimento se empleó la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMV261) como control, no siendo necesario comprobar de nuevo que no tiene la capacidad de producir 11 α OH-AD, pero siendo interesante para comparar los subproductos que aparecen.

La cepa *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN) fue capaz de biotransformar fitosteroles en 11 α OH-AD (Fig.R1.31). Se aprecia que el consumo de fitosteroles no es total a tiempo final (96 h) en la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN), pero sí en la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMV261); así como se observa la producción de AD en ambas.

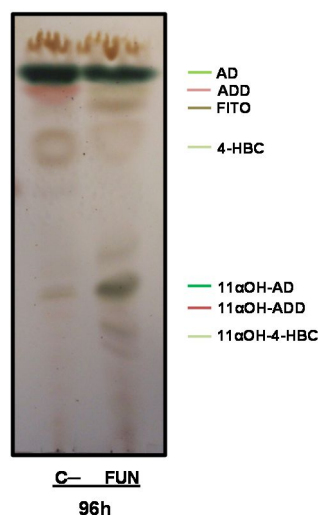


Figura R1.31 Análisis mediante TLC de la biotransformación en reactor de FITO a tiempo final (96 h) de *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMV261) (C-) y *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN) (FUN).

Es notable la aparición de otros subproductos, siendo el más representado 4-HBC, así como ADD, en el caso de la cepa control; no observables ninguno de ellos en la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN). Nótese que en la prueba realizada con esta cepa no se obtiene gran cantidad de subproductos, observándose sólo los fitosteroles sin consumir, AD y 11 α OH-AD;

probablemente la proporción AD/11 α OH-AD pueda mejorarse notablemente optimizando las condiciones de cultivo.

A la vista de estos resultados puede concluirse que es factible producir 11 α OH-AD a partir de fitosteroles en condiciones de escala piloto, con los medios y protocolos empleados industrialmente.

1.2.2.4. PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11 α -HIDROXILADOS DE INTERÉS FARMACOLÓGICO E INDUSTRIAL

Además de haber conseguido producir sintonas 11 α -hidroxiladas como el 11 α OH-AD y 11 α OH-ADD a partir de materias primas de bajo coste, resultaba también de gran interés obtener otros esteroides 11 α -hidroxilados de uso farmacológico, no ya a partir de estas sintonas, sino de sus propios precursores. Por ello con el objetivo de producir otros esteroides 11 α -hidroxilados de uso farmacológico se empleó la cepa silvestre de *M. smegmatis* mc² 155 portando el vector pMVFUN, para hidroxilar en posición 11 α compuestos como, por ejemplo, deoxicorticosterona (DOC). Para llevar a cabo el ensayo se emplearon células en reposo en fase exponencial cultivadas en medio 7H9/Gli/ADC/Tween al que se adicionó 0.5 mM ALA y 20 μ g ml⁻¹ de kanamicina; dichas células se suspendieron en tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) al que se le añadió DOC a una concentración final 2.5 mM desde una solución de DOC 5 mM disuelta en 10 % (v/v) de Tyloxapol (Ver Materiales y Métodos, secciones 2.2 y 7.3.2). Se tomaron alícuotas a las 3 h, 6 h, 24 h y 72 h. Una vez extraídas las muestras se analizaron cualitativamente mediante HPLC-DAD-MS como se indica en Materiales y Métodos, Sección 8.4.

En la Fig.R1.32.A se puede apreciar la desaparición de DOC, tanto en la cepa control *M. smegmatis* (pMV261), como en la cepa *M. smegmatis* (pMVFUN), observándose la aparición de compuestos intermediarios en ambos casos (Fig.R1.32.C). Aunque *M. smegmatis* no es capaz de usar DOC como única fuente de carbono y energía -es más, su presencia le afecta el crecimiento- (Fig.R1.32.B), sí es capaz de modificarlo (Fig.R1.32.C), produciendo dos compuestos más polares, que eluyen en los minutos 3.9 y 5.1 y cuyas m/z fueron 331 [295, 313] y 329 [293, 311], respectivamente (presentes tanto en el ensayo llevado a cabo la cepa control *M. smegmatis* (pMV261) como con la cepa *M. smegmatis* (pMVFUN)) y produciéndose también, en el caso de la cepa *M. smegmatis* (pMVFUN) otros dos compuestos que eluyeron en el minuto 2.8 y 4.1 y cuyas m/z fueron 345 [327, 291, 309] y 331 [295, 313], respectivamente (Fig.R1.32.C).

El compuesto producido por la cepa *M. smegmatis* (pMVFUN) que eluye en el minuto 2.8 y cuya m/z es 345, basándose en su m/z y en su fragmentación podría concluirse que se trata de un derivado de corticosterona (CORT) (m/z 347 [329, 311, 293]); probablemente con un doble enlace extra ya que no parece ser, debido a que es más polar, la forma ceto del alcohol de la posición 21. El resto de los compuestos identificados probablemente sean derivados de DOC (m/z 331 [295, 313, 211, 277]).

A la luz de estos resultados, *M. smegmatis* no puede considerarse un buen chasis para este tipo de biotransformaciones al tener la capacidad de modificar tanto el sustrato como el producto de la reacción.

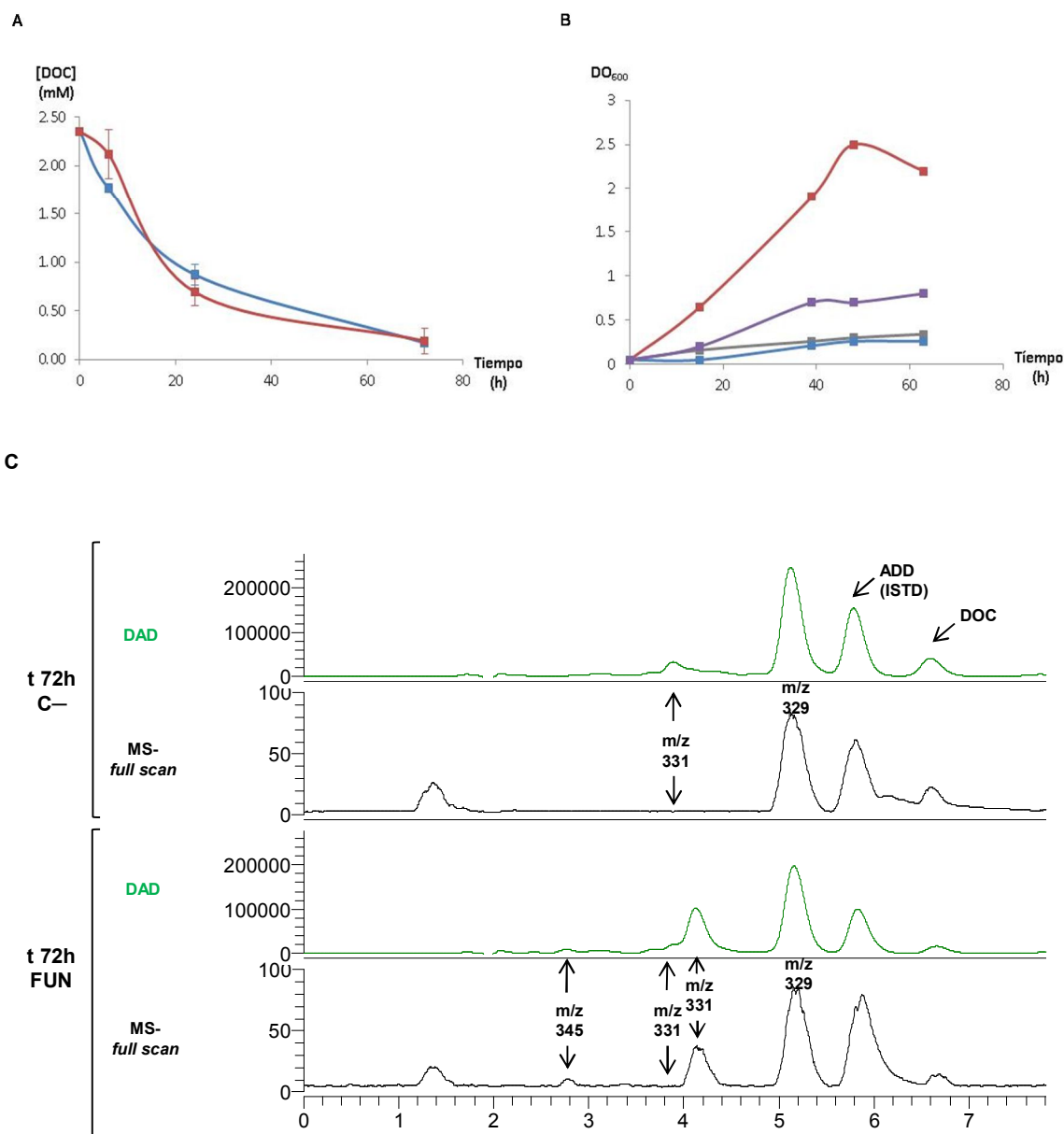


Figura R1.32 Biotransformación de DOC en 11 α OH-DOC por *M. smegmatis*. **A.** Consumo de DOC mediante células en reposo de *M. smegmatis* (pMV261) (línea azul) y *M. smegmatis* (pMVFUN) (línea roja). **B.** Curva de crecimiento *M. smegmatis* en medio 7H9/Tween en presencia de glicerol (18 mM) (línea roja), glicerol y DOC (18 y 2 mM, respectivamente) (línea morada), DOC (2 mM) (línea azul), y Tyloxapol (línea gris). **C.** Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de DOC en 11 α OH-DOC mediante células en reposo de *M. smegmatis* (pMV261)(C-) y *M. smegmatis* (pMVFUN) (FUN). Cromatograma HPLC registrado en DAD (50-600 nm) (línea verde) y espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 100-370 (full scan) (línea negra).

1.2.3. Producción de esteroides 11 α -hidroxilados en *Corynebacterium glutamicum*

Como ya se ha explicado ampliamente en la introducción, *C. glutamicum* es una actinobacteria empleada en la industria y considerada un chasis robusto para llevar a cabo diversos tipos de biocatálisis. Así mismo, en estudios recientes ha demostrado, debido a su capacidad para transportar esteroides sin cadena lateral y su incapacidad para degradarlos, ser un buen chasis para las biotransformaciones de diversos compuestos esteroideos (Tesis Doctoral García-Fernández, 2015; García-Fernández *et al.*, artículo en preparación).

Teniendo en cuenta estas características, se decidió emplear *C. glutamicum* como chasis para la transformación de compuestos esteroideos en sus correspondientes 11 α -hidroxilados.

1.2.3.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN DEL OPERÓN FUN EN CORINEBACTERIAS

El plásmido pGH-FUN se digirió con *SacI* y *XbaI* para liberar el fragmento que contiene el operón FUN y éste fue subclonado en el plásmido pECXK-99E, con doble origen de replicación para *E. coli* / *Corynebacterium*; resultando el vector pXKFUN que expresará los genes bajo control del promotor P_{trc} , inducible por IPTG. El plásmido pXKFUN se clonó inicialmente en *E. coli* DH10B donde se secuenció para comprobar que la construcción era correcta. Los plásmidos pECXK-99E y pXKFUN fueron posteriormente aislados de las cepas de *E. coli* portadoras y transformados en *C. glutamicum* mediante electroporación (ver Materiales y Métodos Sección 3.3)

1.2.3.2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DEL OPERÓN FUN EN CORINEBACTERIAS

Para comprobar la correcta producción de las proteínas del operón FUN se analizaron las fracciones soluble e insoluble de los extractos celulares. Se muestran los extractos proteicos de una muestra representativa de *C. glutamicum* (Fig. R1.33.A) en las condiciones de biotransformación ensayadas, donde no se observa sobreproducción, ni apenas se detecta RoCPR1 o CYP509C12 en ninguna de las fracciones. Sin embargo, se puede apreciar una coloración rojiza en la fracción soluble de la cepa *C. glutamicum* (pXKFUN).

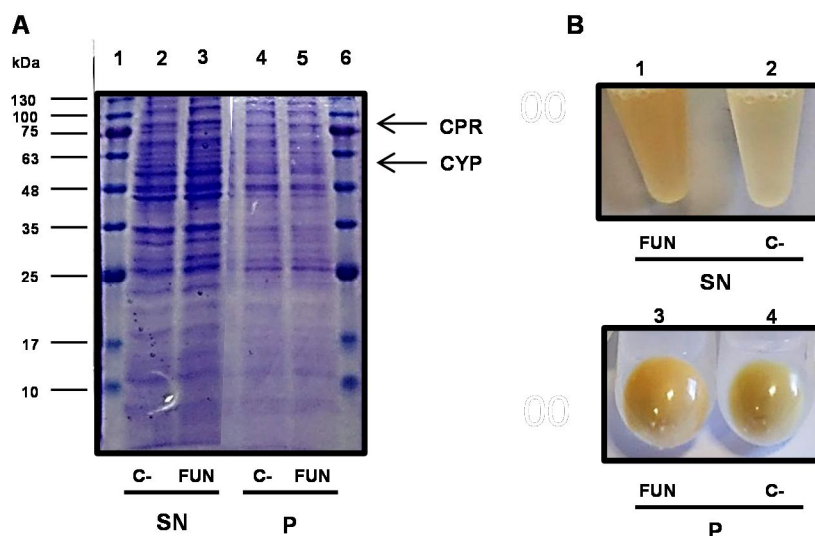


Figura R1.33 Análisis de las fracciones soluble (SN) e insoluble (P) de los extractos celulares de *C. glutamicum* (pXKFUN) (FUN) (carriles impares) y *C. glutamicum* (pECXK99E) (C-) (carriles pares) en las condiciones de biotransformación. A. Análisis de SDS-PAGE. Carriles 1 y 6: marcador de peso molecular. B. Imágenes de las fracciones soluble e insoluble de los extractos celulares.

1.2.3.3. PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11 α -HIDROXILADOS A PARTIR DE SUS PRECURSORES

Con el fin de obtener los 11 α OH-esteroides de interés farmacológico y/o industrial empleando sus precursores se realizaron los ensayos que se muestran a continuación, tal como se indica. Todos los ensayos se realizaron con células en crecimiento –salvo en los casos en que se indique lo contrario– de *C. glutamicum* (pXKFUN). Se cultivó en medio TSB que contenía el esteroide indicado en cada caso a concentración final 0.5 mM desde una solución 5 mM disuelta el 10 % (v/v) de Tyloxapol, 0.5 mM ALA –salvo en los casos en que se indique lo contrario– y 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de kanamicina (Ver Materiales y Métodos, secciones 2.3 y 7.2). Los cultivos se inocularon a una DO_{600} inicial de 0.1y se indujeron con 1 mM de IPTG. Se tomaron alícuotas a las 16 h, 24 h, 48 h y 72 h, se midió la DO_{600} y una vez extraídas las muestras se analizaron cualitativamente mediante TLC y cuantitativamente mediante HPLC-DAD-MS: por separación cromatográfica, por absorbancia característica y mediante la relación masa-carga (m/z) del ion característico y la rotura del mismo. La identificación y cuantificación de los productos se realizó como se indica en Materiales y Métodos, Secciones 8.3, 8.4.1, 8.4.2, 8.4.3, 8.4.4, 8.4.5 y 8.4.6. Resulta necesario aclarar que no es posible asegurar que no existan otros compuestos no detectados mediante los métodos cromatográficos empleados.

Para comprobar que el producto no se forma de manera natural por la acción del microorganismo y que el sustrato no es consumido ni modificado se empleó como control negativo la cepa *C. glutamicum* (pECXK-99E). Además ello permitió comparar el crecimiento con la cepa que expresa el operón FUN; así como evidenciar un posible efecto sobre el crecimiento debido a la presencia del esteroide.

Primeramente y como prueba de concepto se llevó a cabo un ensayo en presencia de progesterona (PROG), ya que era el compuesto descrito en literatura y sobre el que presumiblemente se obtendrían mejores rendimientos (Petric *et al.*, 2010). En la figura R1.34 se pueden observar las curvas de crecimiento de las cepas *C. glutamicum* (pXKFUN) y *C. glutamicum* (pECXK99E). En ellas puede apreciarse que la expresión de los genes contenidos en el operón FUN afecta al crecimiento en las condiciones ensayadas; además la variabilidad entre réplicas biológicas es mayor en el caso de la cepa *C. glutamicum* (pXKFUN).

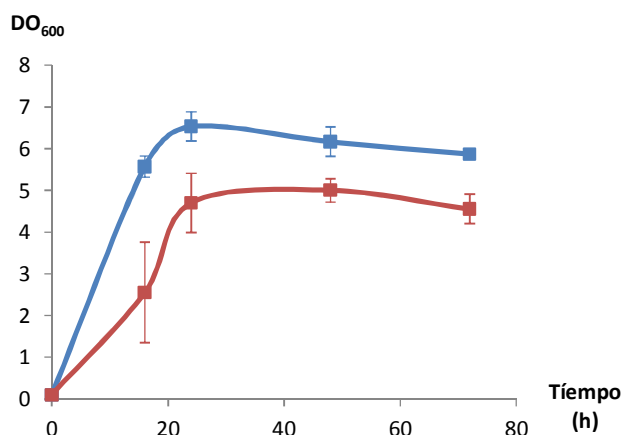


Figura R1.34. Curvas de crecimiento de *C. glutamicum* (pECXK-99E) (línea azul) y *C. glutamicum* (pXKFUN) (línea roja) en las condiciones de biotransformación

Una vez comprobado que *C. glutamicum* (pXKFUN) era capaz de biotransformar esteroides en crecimiento se llevaron a cabo experimentos homólogos sobre en presencia de los siguientes esteroides: deoxicorticosterona (DOC), androstenediona (AD), androstrenediendiona (ADD), testosterona (TEST), deshidroepiandrosterona (DHEA). En la figura R1.35 se pueden observar las curvas de crecimiento de las cepas *C. glutamicum* (pXKFUN) (Fig. R1.35.B) y *C. glutamicum* (pECXK99E) (Fig. R1.35.A) donde, de forma general puede apreciarse que la expresión de los genes contenidos en el operón FUN afecta al crecimiento en las condiciones ensayadas; cabe destacar el caso de la DHEA en el que el efecto es más marcado. Puede afirmarse además, que no se observan diferencias en la afectación al crecimiento entre los esteroides empleados en el ensayo, a excepción de la DHEA, que afecta gravemente al crecimiento.

Como puede observarse en las figuras R1.36, R1.37 y R1.38, la cepa *C. glutamicum* (pXKFUN) fue capaz de biotransformar todos los esteroides empleados en el ensayo. Mientras que en los ensayos llevados a cabo por la cepa *C. glutamicum* (pECXK-99E) no se detectaron los productos 11 α -hidroxilados ni fue capaz de realizar ninguna modificación sobre los sustratos correspondientes.

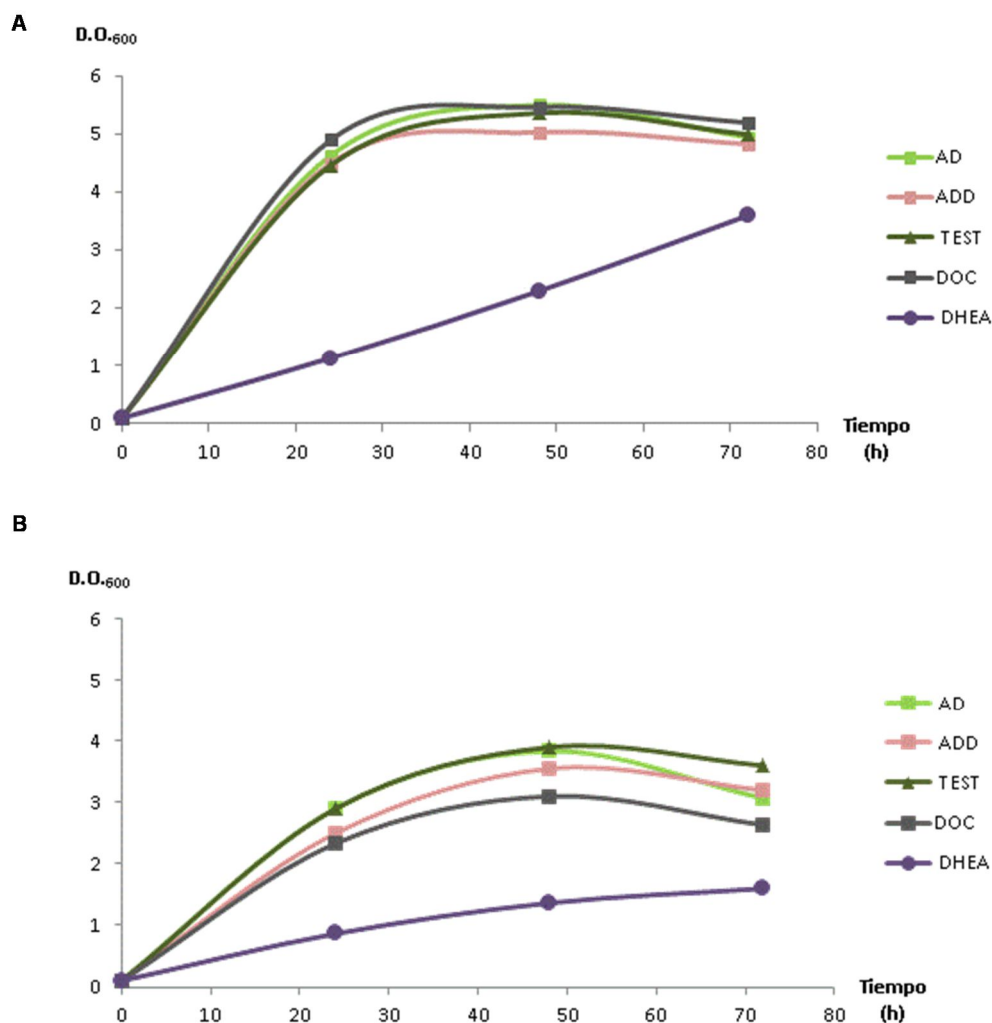


Figura R1.35 Curvas de crecimiento en medio TSB en presencia de 500 μM de AD, ADD, TEST, DOC, DHEA. A. *C. glutamicum* (pECXK-99E). B. *C. glutamicum* (pXKFUN).

La cepa *C. glutamicum* (pXKFUN) es capaz de biotransformar PROG en 11 α OH-PROG. Se aprecia el consumo de PROG desde las 16 h hasta aproximadamente las 48 h, tiempo en cual ya no se detecta un gran incremento del consumo, alcanzándose una conversión a tiempo final (72 h) (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de 48.0 ± 11.7 %; lo que se correlaciona con el aumento de la producción de 11 α OH-PROG hasta las 48 h momento tras el cual la producción aumenta muy levemente hasta el tiempo final con un rendimiento final (producto 11 α OH-PROG producido respecto al sustrato PROG consumido, $\phi_{11\alpha\text{OH-PROG/PROG}}$) de 59.1 ± 9.3 % (Fig R1.36.A y Fig. R1.37.A).

También se calculó el rendimiento del producto 11 α OH-PROG con respecto a la biomasa (cantidad de producto 11 α OH-PROG producido por cantidad de biomasa medida como peso seco presente en el cultivo, $\phi_{11\alpha\text{OH-PROG}(X)}$), siendo éste de 18.4 ± 2.9 (mg/mg), lo cual indica que por cada mg de biomasa se obtiene en torno a 18 mg del producto.

Además de los compuestos mencionados, se observa también la aparición de otros compuestos no identificados hasta el momento más polares que la 11 α OH-PROG. A pesar de que estos compuestos resultan irrelevantes en términos cuantitativos, se estudian ya que podrían tener relevancia para comprender las funciones que puede llevar a cabo el citocromo. El compuesto que eluye en el minuto 2.8 tiene una m/z de 347; tratándose del compuesto dihidroxilado en posición 11 α y en otra posición, probablemente 6 β (Petric *et al.*, 2010). También ha sido detectado en el minuto 3.9 otro compuesto cuya m/z es 345; basándose en la m/z y en que se trata de un compuesto más apolar, resulta lógico pensar que se trate de la forma ceto del compuesto cuya m/z es 347, bien sea en la posición 11 α o en la posición 6 β (Fig. R1.38.A).

La cepa *C. glutamicum* (pXKFUN) es capaz de biotransformar DOC en 11 α OH-DOC. Se aprecia el consumo de DOC desde las 24 h hasta el tiempo final 72 h alcanzándose una conversión (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de 33.0 ± 6.7 %; lo que se correlaciona con el aumento de la producción de 11 α OH-DOC hasta el tiempo final (72 h) con un rendimiento (producto 11 α OH-DOC producido respecto al sustrato DOC consumido, $\phi_{11\alpha\text{OH-DOC/DOC}}$) de 41.5 ± 3.6 % (Fig R1.36.B y Fig. R1.37.B).

También se calculó el rendimiento del producto 11 α OH-DOC con respecto a la biomasa (cantidad de producto 11 α OH-DOC producido por cantidad de biomasa medida como peso seco presente en el cultivo, $\phi_{11\alpha\text{OH-DOC}/X}$), siendo éste de 17.3 ± 4.9 (mg/mg), lo cual indica que por cada mg de biomasa se obtiene en torno a 17 mg del producto.

En este caso también se han detectado, aunque en una muy baja proporción, otros compuestos diferentes a los mencionados anteriormente. En el minuto 5.9 eluye un compuesto cuya m/z es 345; basándose en que es más apolar que 11 α OH-DOC y que coincide con su masa molecular disminuida en 2, resulta lógico pensar que se trate de la forma ceto en posición 11 α (este compuesto también se observa mediante TLC, Fig. R1.37.B). También se identifican otros dos compuestos, que eluyen en el minuto 2.2 y 2.9 cuyas m/z son 363 y 361, respectivamente; resulta lógico pensar y en concordancia con lo que ocurría con la progesterona, que se trate de la forma dihidroxilada de DOC (m/z 363) y la forma ceto en una de las posiciones de este compuesto dihidroxilado (m/z 361) (Fig. R1.38.B).

La cepa *C. glutamicum* (pXKFUN) es capaz de biotransformar AD en 11 α OH-AD. Se aprecia el consumo de AD desde las 24 h hasta el tiempo final 72 h alcanzándose una conversión (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de 29.0 ± 5.8 %; lo que se correlaciona con el aumento de la producción de 11 α OH-AD hasta el tiempo final (72 h) con un rendimiento (producto 11 α OH-AD producido respecto al sustrato AD consumido, $\phi_{11\alpha\text{OH-AD/AD}}$) de 38.0 ± 7.6 % (Fig R1.36.C y Fig. R1.37.C).

También se calculó el rendimiento del producto 11 α OH-AD con respecto a la biomasa (cantidad de producto 11 α OH-AD producido por cantidad de biomasa medida como peso seco presente

en el cultivo, $\phi_{11\alpha\text{OH-AD}/X}$), siendo éste de 6.1 ± 2.1 (mg/mg), lo cual indica que por cada mg de biomasa se obtiene en torno a 6 mg del producto.

Al contrario que ocurría con los casos anteriores no se observan otros compuestos diferentes a los identificados o, de existir, lo hacen en una cantidad tan pequeña que no es posible identificar su m/z (Fig. R1.38.C).

La cepa *C. glutamicum* (pXKFUN) es capaz de biotransformar ADD en 11 α OH-ADD. Sin embargo apenas se aprecia el consumo de ADD y debido a que la conversión fue muy baja no fue posible cuantificar el consumo, ya que la variabilidad entre replicas biológicas y el error en la cuantificación fueron mayores que la disminución del sustrato. Sin embargo se observó una tendencia creciente en la formación de 11 α OH-ADD desde las 24 h hasta el tiempo final (72 h) (Fig R1.36.D y Fig. R1.37.D).

Al igual que ocurría con el compuesto anteriormente mencionado, AD, tampoco se observan otros compuestos diferentes a los identificados. Es preciso tener en consideración que pueden existir compuestos que, debido a sus propiedades cromatográficas, no se observen mediante los métodos cromatográficos empleados (Fig. R1.38.D).

La cepa *C. glutamicum* (pXKFUN) es capaz de biotransformar TEST en 11 α OH-TEST. Se aprecia el consumo de TEST desde las 24 h hasta el tiempo final 72 h alcanzándose una conversión (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de 14.7 ± 6.4 %; lo que se correlaciona con el aumento de la producción de 11 α OH-TEST hasta el tiempo final (72 h) con un rendimiento (producto 11 α OH-TEST producido respecto al sustrato TEST consumido, $\phi_{11\alpha\text{OH-TEST}/\text{TEST}}$) de 49.3 ± 0.5 % (Fig R1.36.E y Fig. R1.37.E).

También se calculó el rendimiento del producto 11 α OH-TEST con respecto a la biomasa (cantidad de producto 11 α OH-TEST producido por cantidad de biomasa medida como peso seco presente en el cultivo, $\phi_{11\alpha\text{OH-TEST}/X}$), siendo éste de 9.0 ± 2.7 (mg/mg), lo cual indica que por cada mg de biomasa se obtiene en torno a 9 mg del producto.

Además de los compuestos identificados se detecta, ya mediante TLC (Fig. R1.37.E), un compuesto más apolar que 11 α OH-TEST; este compuesto eluye en el minuto 5.9 y su m/z es 303, de acuerdo a lo que ocurría con otros compuestos, probablemente sea la forma ceto del compuesto 11 α OH-TEST (Fig. R1.38.E).

La cepa *C. glutamicum* (pXKFUN) es capaz de biotransformar DHEA en 11 α OH-DHEA. Se aprecia el consumo de DHEA desde las 24 h hasta el tiempo final 72 h alcanzándose una conversión (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de 18.4 ± 5.2 %; lo que se correlaciona con el aumento de la producción de 11 α OH-DHEA hasta el tiempo final (72 h) con un rendimiento (producto 11 α OH-DHEA producido respecto al sustrato DHEA consumido, $\phi_{11\alpha\text{OH-DHEA}/\text{DHEA}}$) de 22.3 ± 8.7 % (Fig R1.36.F y Fig. R1.37.F).

También se calculó el rendimiento del producto 11 α OH-DHEA con respecto a la biomasa (cantidad de producto 11 α OH-DHEA producido por cantidad de biomasa medida como peso seco presente en el cultivo, $\varphi_{11\alpha\text{OH-DHEA}/X}$), siendo éste de 2.1 ± 1.2 (mg/mg), lo cual indica que por cada mg de biomasa se obtiene en torno a 2 mg del producto.

Además de los compuestos identificados, ya en TLC (Fig R1.37.F) se aprecia otro compuesto en una alta proporción, sin embargo no ha sido posible detectarlo con el método cromatográfico empleado. Teniendo en cuenta la polaridad del posible grupo ceto en la posición 11 α , cabría esperar que eluyese más tarde que 11 α OH-DHEA y por tanto observarse en cromatografía, sin embargo este compuesto no se encuentra (Fig R1.38.F). Es posible que se trate de un compuesto dihidroxilado y que haya eluído con el frente de la cromatografía.

Teniendo en cuenta los experimentos anteriores se puede concluir que *C. glutamicum* (pXKFUN) es capaz de hidroxilar en posición 11 α todos los compuestos esteroideos probados (PROG, DOC, AD, ADD, TEST, DHEA); sin embargo la capacidad de conversión, así como los rendimientos y subproductos encontrados en cada transformación difieren notablemente.

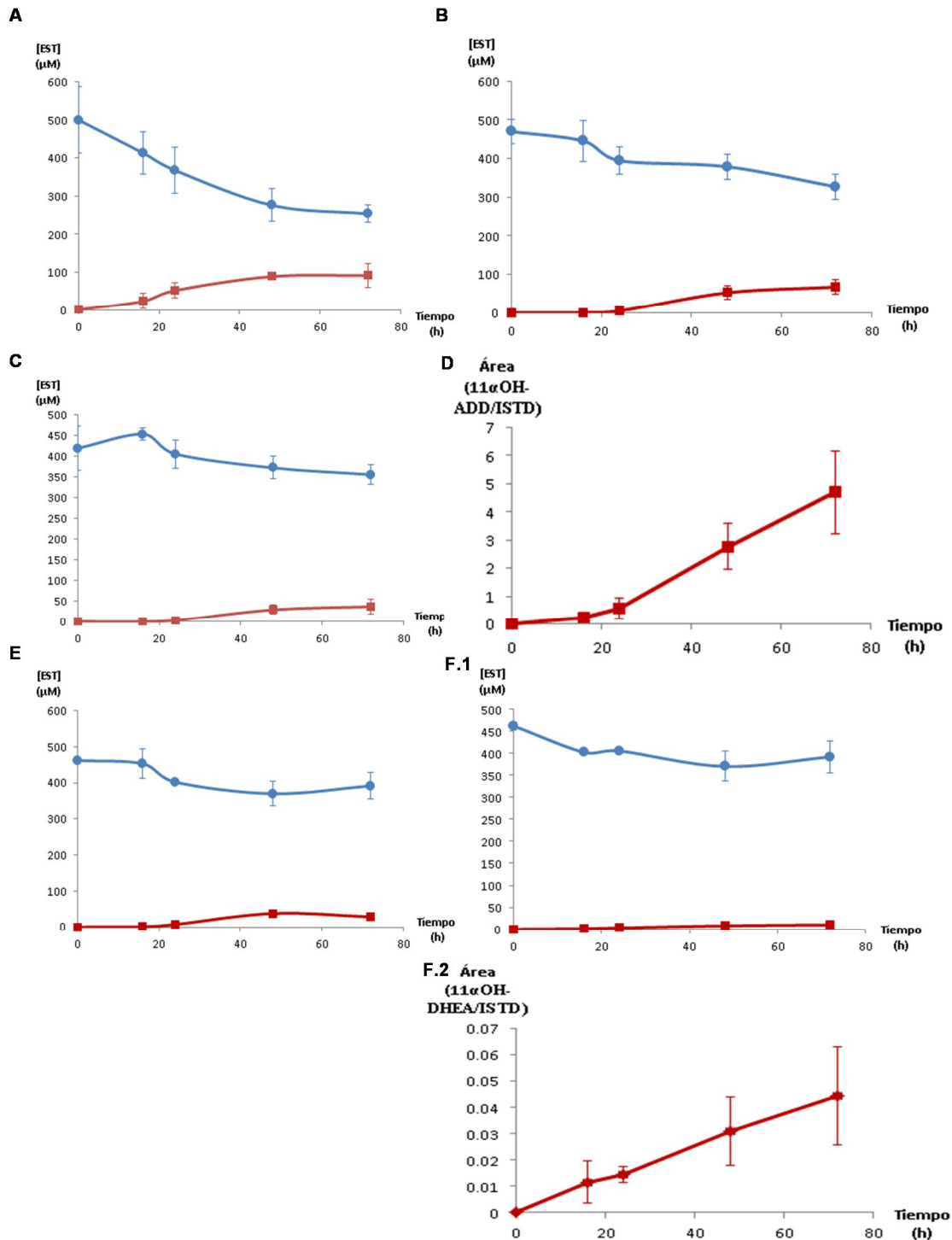


Figura R1.36 Seguimiento de la biotransformación de esteroides en 11αOH-esteroides en cultivos en crecimiento de *C. glutamicum* (pXKFUN). A. Biotransformación de PROG en 11αOH-PROG. B. Biotransformación de DOC en 11αOH-DOC. C. Biotransformación de AD en 11αOH-AD. D. Producción de 11αOH-ADD, se muestran las áreas corregidas frente al tiempo. E. Biotransformación de TEST en 11αOH-TEST. F.1. Biotransformación de DHEA en 11αOH-DHEA. F.2. Producción de 11αOH-DHEA, se muestran las áreas corregidas frente al tiempo. Se muestra el consumo de sustrato (línea azul) y la aparición de producto (línea roja).

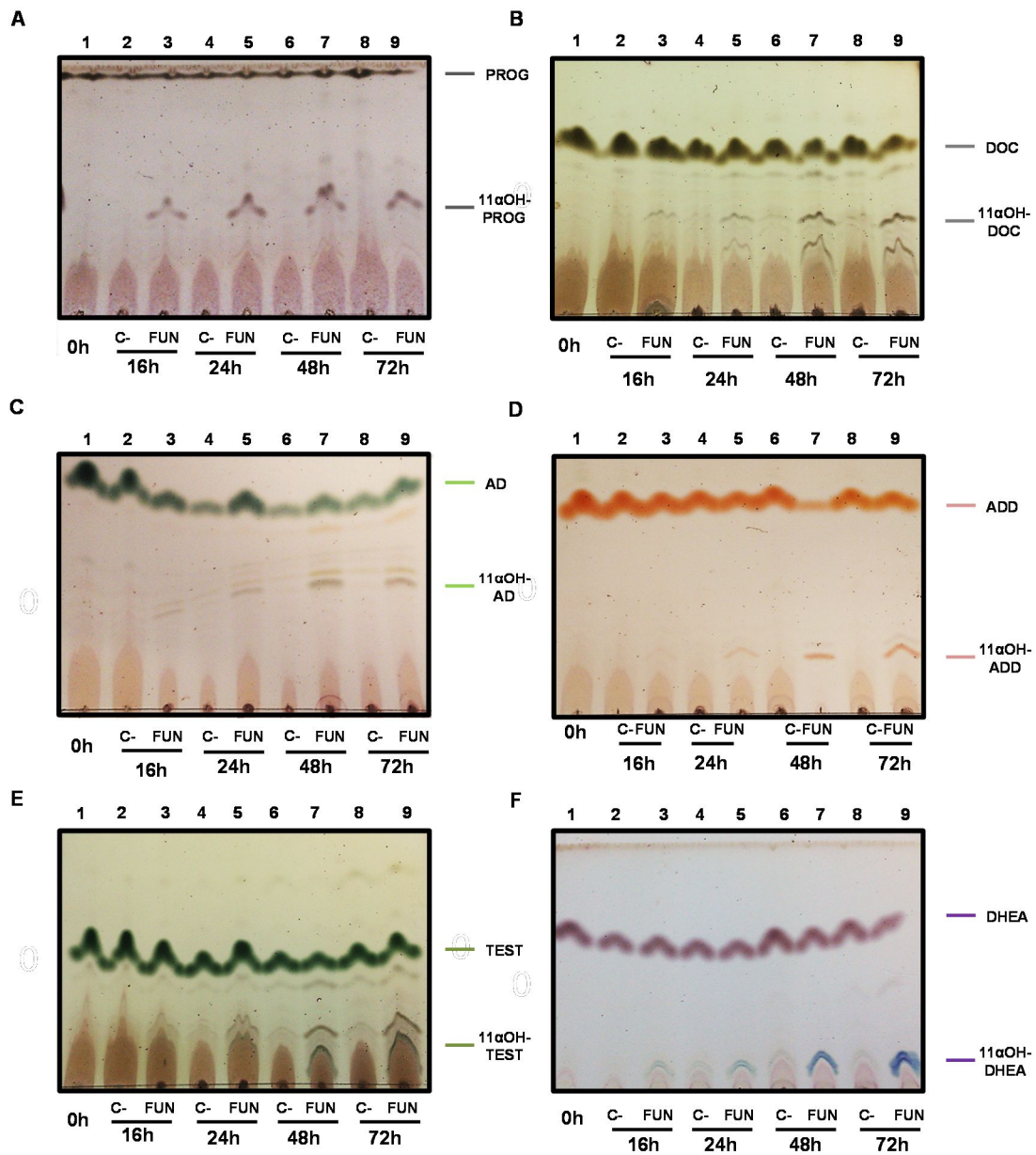


Figura R1.37 Análisis mediante TLC de la biotransformación de esteroides en 11 α OH-esteroides en cultivos en crecimiento de *C. glutamicum* (pECXK-99E) (C-) y *C. glutamicum* (pXKFUN) (FUN) a distintos tiempos (0 a 72 h). A. Biotransformación de PROG en 11 α OH-PROG. B. Biotransformación de DOC en 11 α OH-DOC. C. Biotransformación de AD en 11 α OH-AD. D. Biotransformación de ADD en 11 α OH-ADD. E. Biotransformación de TEST en 11 α OH-TEST. F. Biotransformación de DHEA en 11 α OH- DHEA.

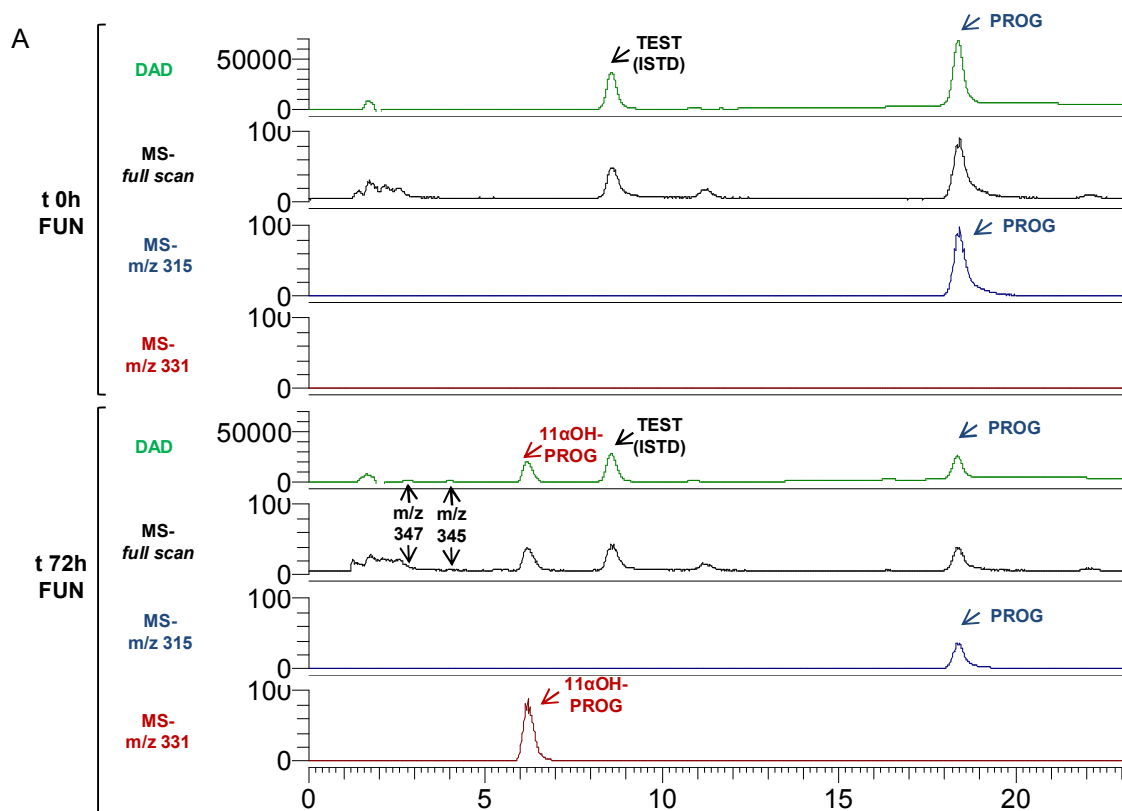


Figura R1.38 Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de esteroides en 11 α OH-esteroides en cultivos en crecimiento de *C. glutamicum* (pXKFUN) (FUN) a tiempo inicial (t 0h) y a tiempo final (t 96 h). Cromatogramas HPLC registrados en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro), espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (*full scan*) (línea negra), espectros de masas del ion característico -indicado en cada caso- del sustrato (línea azul) y espectros de masas del ion ion característico -indicado en cada caso- del producto (línea roja) A. Biotransformación de PROG en 11 α OH-PROG.

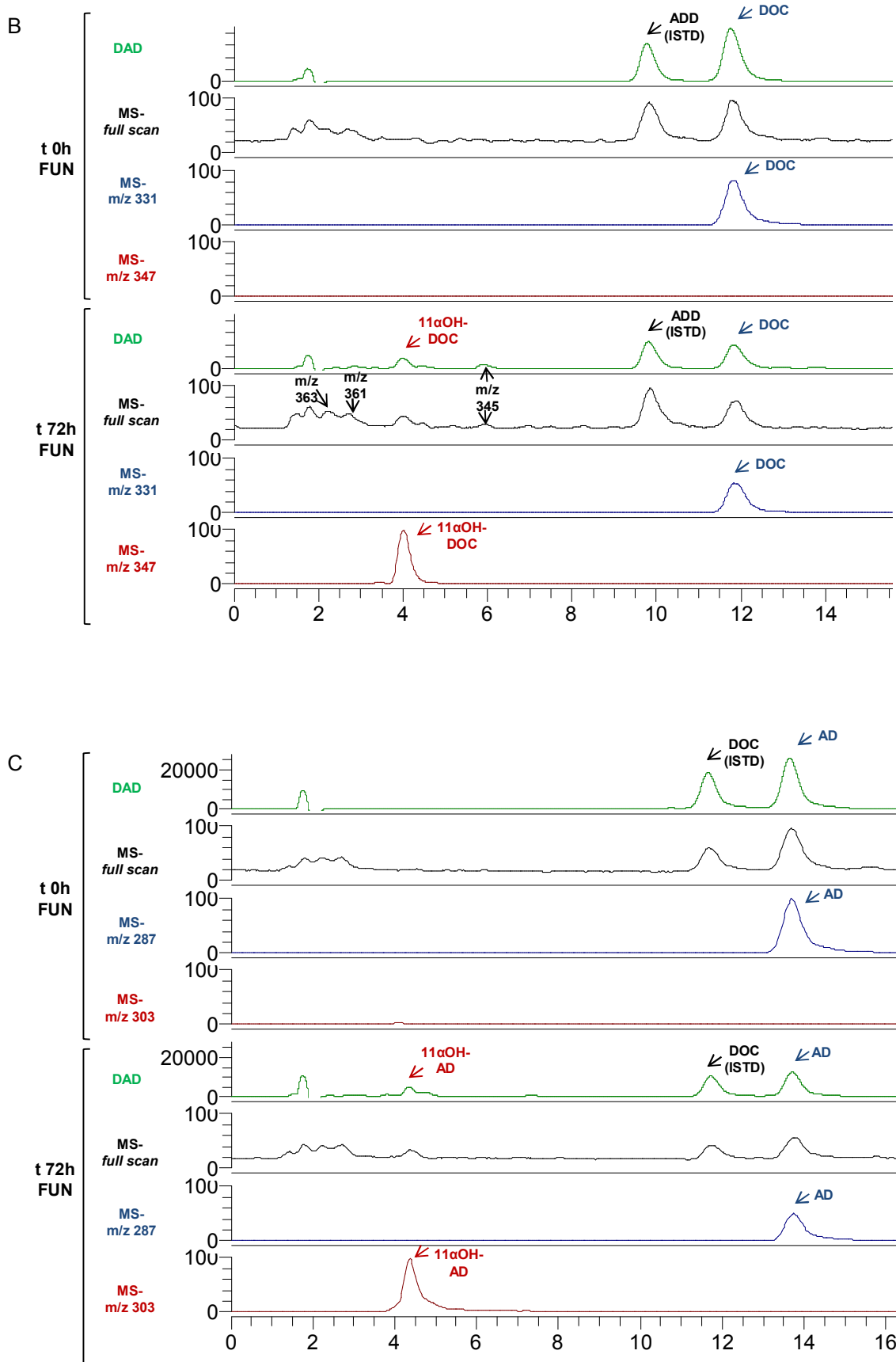


Figura R1.38 B. Biotransformación de DOC en 11 α OH-DOC. C. Biotransformación de AD en 11 α OH-AD.

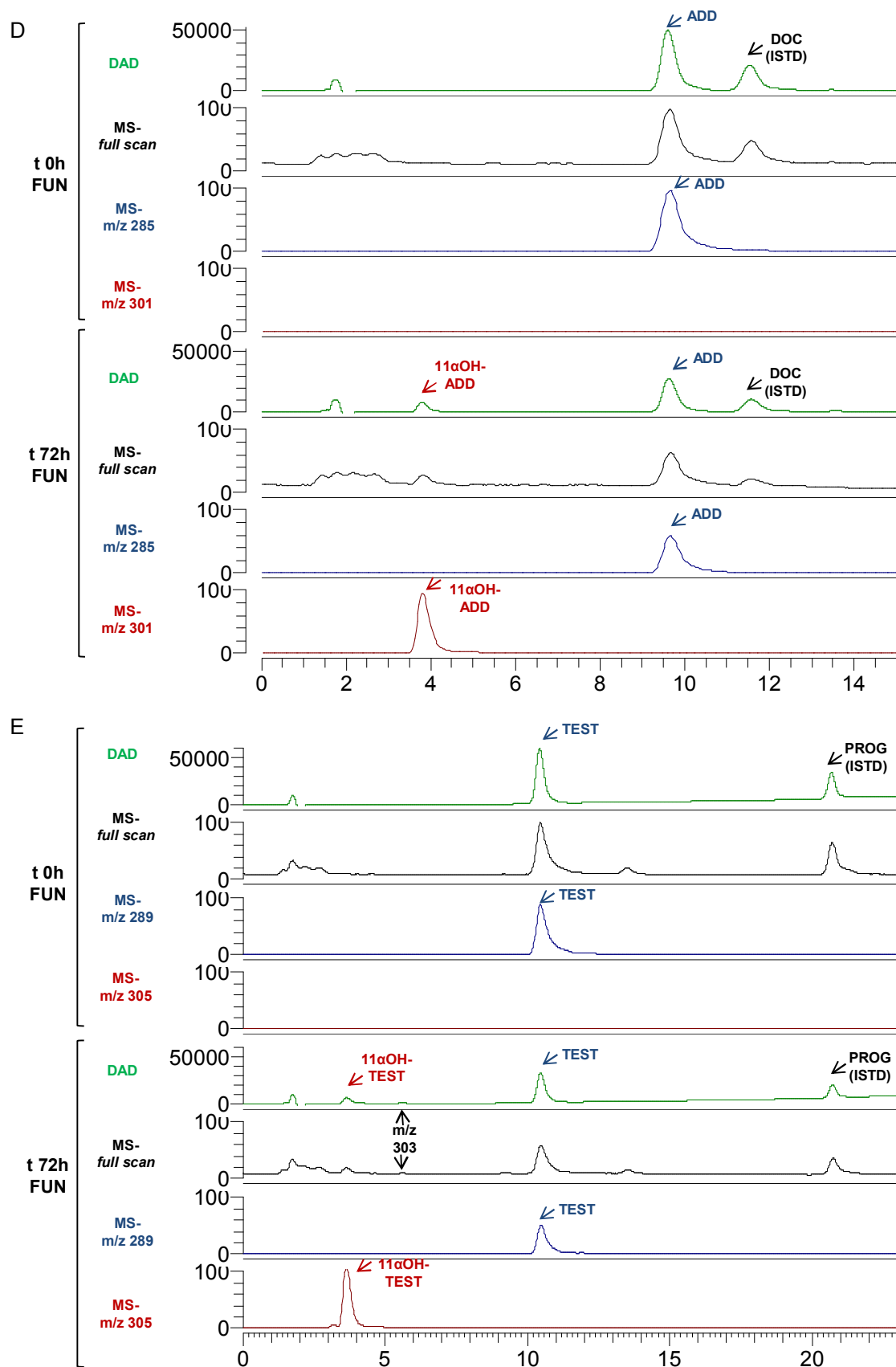


Figura R1.38 D. Biotransformación de ADD en 11αOH-ADD. E. Biotransformación de TEST en 11αTEST.

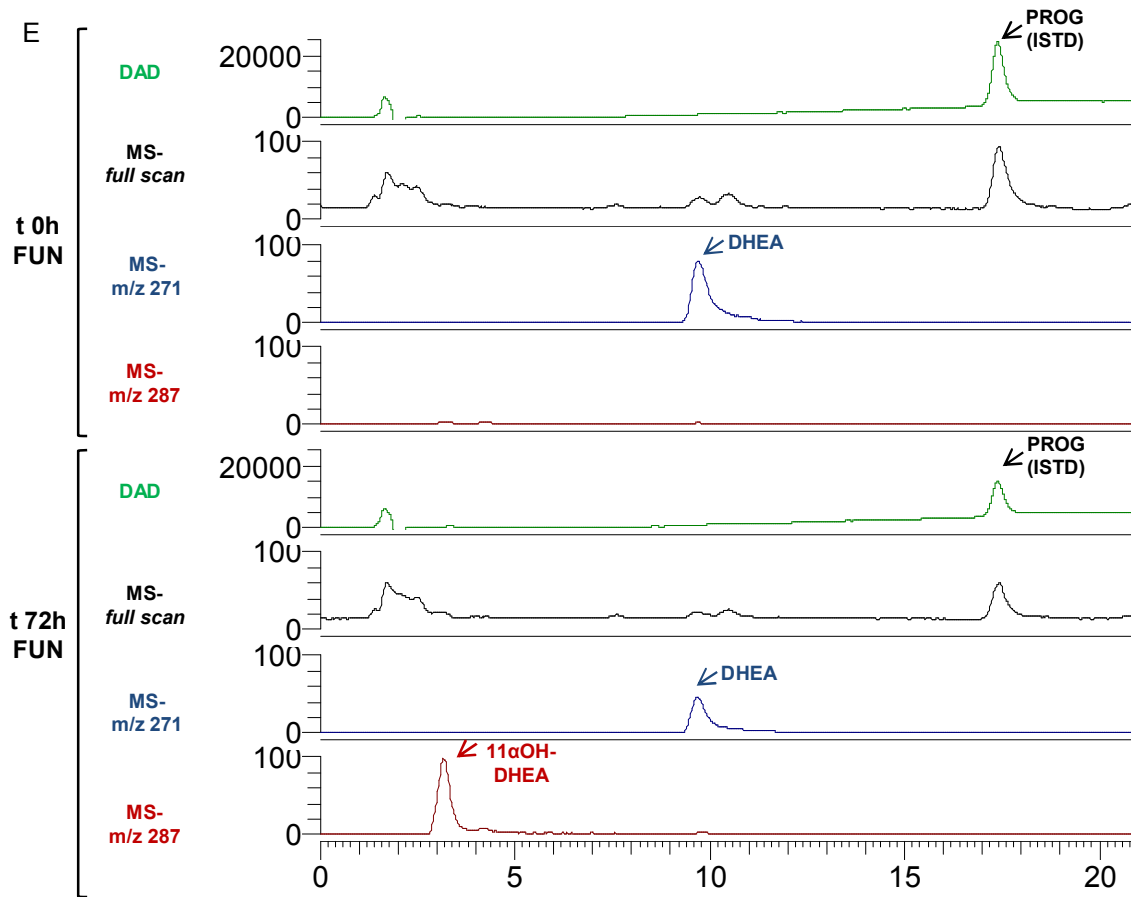


Figura R1.38.F. Biotransformación de DHEA en 11αOH-DHEA

Una vez comprobada la capacidad biotransformadora de la cepa *C. glutamicum* (pXKFUN), y al igual que en los casos anteriores, se estudió la eliminación del ALA del proceso para así conseguir un abaratamiento de costes. El ensayo se realizó en las mismas condiciones que los anteriormente descritos, pero en ausencia de ALA. Como prueba de concepto se eligió PROG como sustrato a biotransformar.

En la figura R1.39 se muestran las curvas de crecimiento de las cepas *C. glutamicum* (pXKFUN) y *C. glutamicum* (pECXK-99E) donde se observa que la expresión de los genes contenidos en el operón FUN no parece afectar al crecimiento en ausencia de ALA.

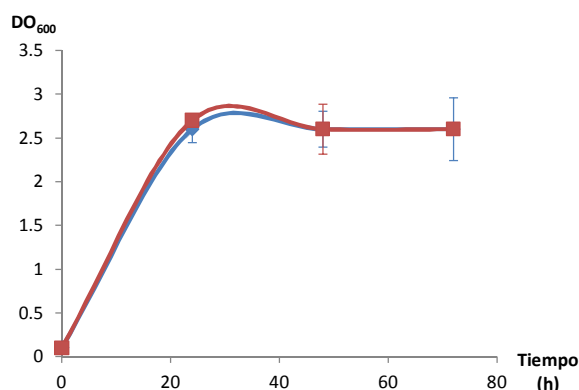


Figura R1.39 Curvas de crecimiento de *C. glutamicum* (pECXK-99E) (línea azul) y *C. glutamicum* (pXKFUN) (línea roja) en las condiciones de biotransformación, en ausencia de ALA.

La cepa *C. glutamicum* (pXKFUN) es capaz de biotransformar PROG en 11 α OH-PROG en ausencia de ALA. Se aprecia el consumo de PROG a partir de las 16 h, siendo la conversión del mismo a tiempo final (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de 41.5 ± 13.9 %; así como se aprecia también la producción creciente a partir de las 24 h de 11 α OH-PROG hasta el tiempo final (96 h), con un rendimiento de producción respecto a PROG (producto 11 α OH-PROG producido respecto al sustrato PROG consumido, $\phi_{11\alpha\text{OH-PROG/PROG}}$) de 26.7 ± 7.4 % (Fig. R1.40).

No se han identificados compuestos diferentes a los ya identificados anteriormente, cuya m/z es 345 y 347.

Por todo ello se puede concluir que, aunque con rendimientos bajos, *C. glutamicum* (pXKFUN) es capaz de producir productos esteroideos 11 α -hidroxilados en ausencia de ALA.

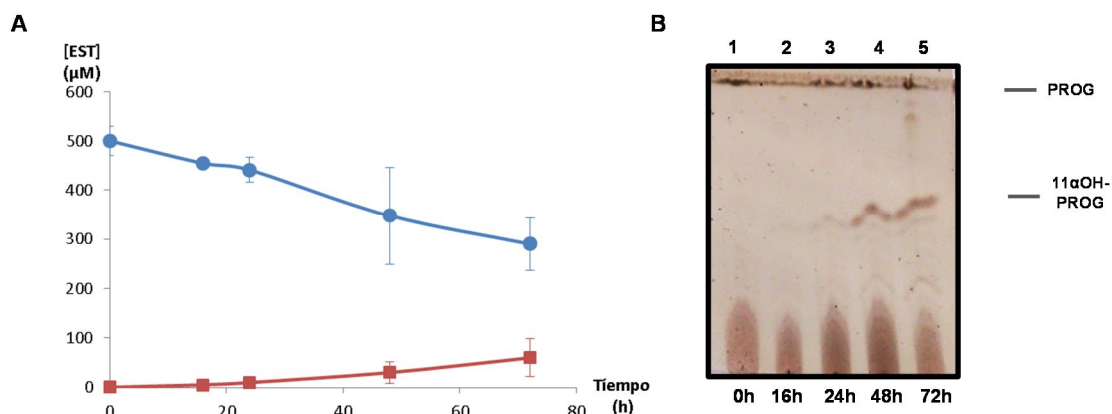


Figura R1.40. Seguimiento de la biotransformación de PROG en cultivos en crecimiento de *C. glutamicum* (pXKFUN) en ausencia de ALA a distintos tiempos. A. Consumo de PROG (línea azul) y producción de 11αOH-PROG (línea roja). B. Análisis mediante TLC.

Dado que en los experimentos de transformación en crecimiento la conversión (sustrato consumido) fue baja, se propuso cambiar la metodología del proceso empleando células en reposo para la biotransformación y como prueba de concepto se realizó la biotransformación empleando PROG como sustrato.

Para llevar a cabo estos ensayos se cultivó *C. glutamicum* (pXKFUN) en medio TSB durante 30 h a 30°C, momento en el cual se recogieron y concentraron las células mediante centrifugación. Las células se resuspendieron a una DO_{600} de 60 en tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) conteniendo progesterona (500 μM) y se incubaron con agitación (250 rpm) a 30 °C durante 72 h. Se tomaron muestras a las 16 h, 24 h, 48 h y 72 h y se analizaron mediante TLC y HPLC-DAD-MS.

Al igual que en los ensayos llevados a cabo con células en crecimiento, para comprobar que el producto no se forma de manera natural por la acción del microorganismo y que el sustrato no es consumido ni modificado se empleó como control negativo la cepa *C. glutamicum* (pECXK-99E).

La cepa *C. glutamicum* (pXKFUN) es capaz de biotransformar PROG en 11αOH-PROG empleando para ello células en reposo. Se aprecia el consumo prácticamente total de PROG desde las 16 h, alcanzándose una conversión a tiempo final (72 h) (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de $91.6 \pm 3.9 \%$; lo que se correlaciona con el aumento de la producción de 11αOH-PROG hasta las 48 h momento tras el cual la producción aumenta muy levemente hasta el tiempo final con un rendimiento final (producto 11αOH-PROG producido respecto al sustrato PROG consumido, $\phi_{11\alpha\text{OH-PROG/PROG}}$) de $51.2 \pm 3.6 \%$ (Fig R1.41.A y Fig. R1.41.B).

También se calculó el rendimiento del producto 11αOH-PROG con respecto a la biomasa (cantidad de producto 11αOH-PROG producido por cantidad de biomasa medida como peso

seco presente en el cultivo, $\phi_{11\alpha\text{OH-PROG}/X}$, siendo éste de 6.6 ± 0.6 (mg/mg), lo cual indica que por cada mg de biomasa se obtiene en torno a 7 mg del producto.

Además de los compuestos mencionados, se observa también la aparición del compuesto más polar que el 11 α OH-PROG, en esta ocasión visible en TLC (Fig. R1.41.B) y previamente identificado, que eluye en el minuto 2.8 tiene una m/z de 347; tratándose del compuesto dihidroxilado en posición 11 α y probablemente 6 β . También ha sido detectado, aunque en muy baja proporción, en el minuto 3.9 el otro compuesto previamente identificado cuya m/z es 345, probablemente la forma ceto de una de las grupos hidroxilo del compuesto cuya m/z es 347, bien sea en la posición 11 α o en la posición 6 β (Fig. R1.41.C).

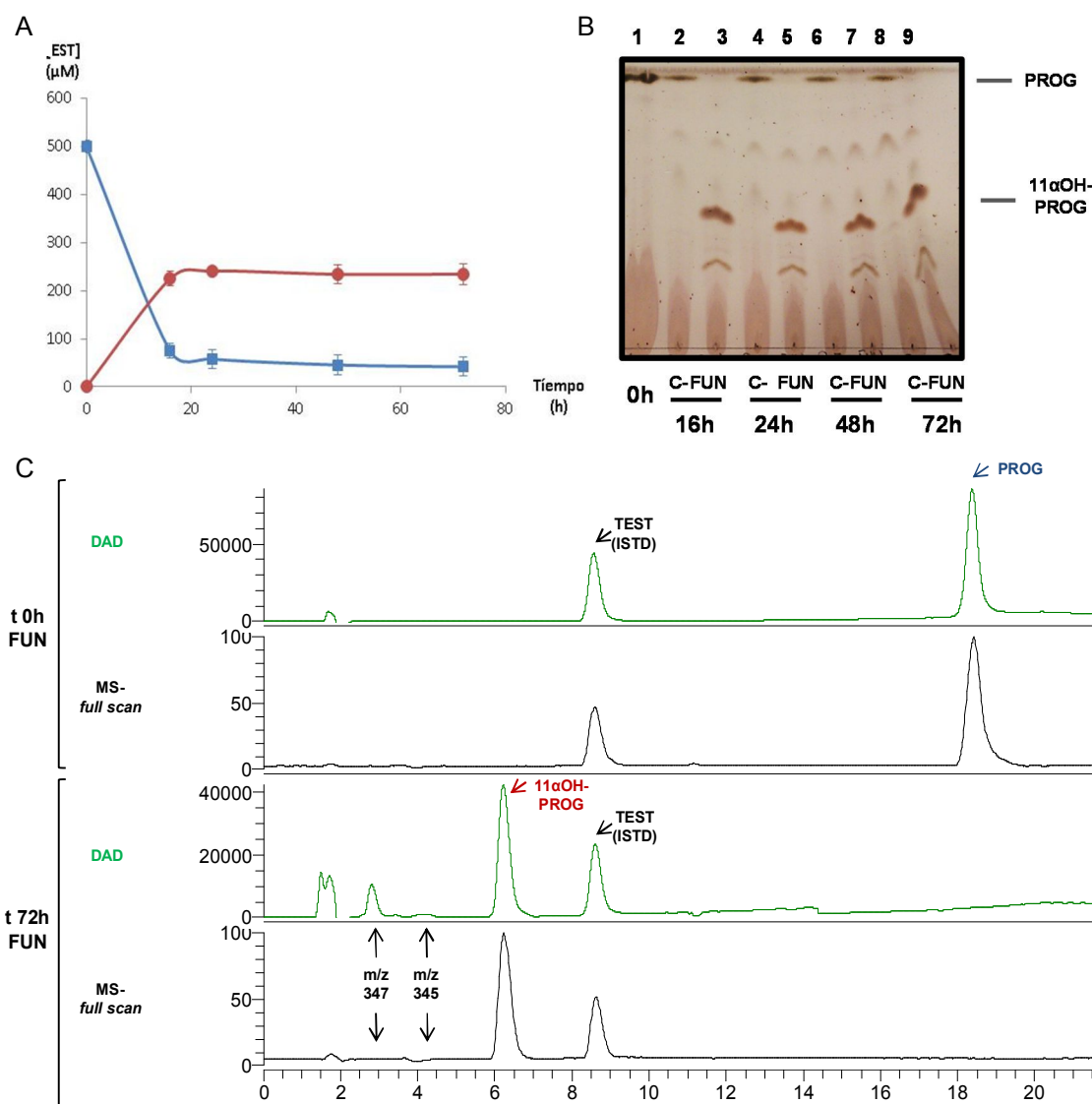


Figura R1.41 Seguimiento de la biotransformación de PROG en 11 α OH-PROG con células en reposo de *C. glutamicum* (pECXK-99E) (C-) y *C. glutamicum* (pXKFUN) (FUN) a distintos tiempos (0 a 96 h). **A.** Consumo de PROG (línea azul) y producción de 11 α OH-PROG (línea roja). **B.** Análisis mediante TLC. **C.** Análisis mediante HPLC-DAD-MS. Cromatograma HPLC registrado en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro) y espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (full scan) (línea negra).

Aun teniendo en cuenta todos los subproductos que puedan existir, al menos en TLC (Fig. R1.41.B) que ofrece una visión bastante general del proceso, no se aprecian otros productos cuantitativamente relevantes. Es por ello que no se explica que el rendimiento sea sólo del 51%, ya que el sustrato no es metabolizable por la bacteria *C. glutamicum* y los subproductos encontrados no parecen ser lo suficientemente abundantes. Esta diferencia podría ser atribuible a pérdidas en la extracción de los esteroides, al utilizar una alta concentración celular cabe pensar que podrían quedar embebidos en la membrana celular y suponer una diferencia significativa cuantitativamente.

Con la finalidad de comprobar esta hipótesis se aplicó un método de extracción que incluía rotura mecánica (ver Materiales y Métodos, Sección 8.1). En la Fig. R1.44 puede observarse como, mediante rotura mecánica se extrae una mayor cantidad de 11 α OH-PROG y sobre todo de PROG; por lo que es probable que los rendimientos estén menospreciados y sean sensiblemente mayores a los calculados.

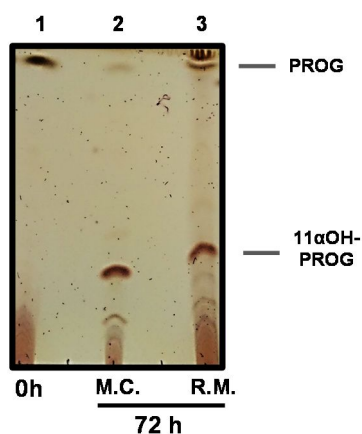


Figura R1.44. Análisis mediante TLC de la extracción de los esteroides mediante metodología convencional (M.C.) y rotura mecánica (R.M) de la biotransformación a de PROG en 11 α OH-PROG con células en reposo de *C. glutamicum* (pXKFUN).

A la vista de los resultados anteriores se puede concluir que *C. glutamicum* (pXKFUN) es capaz de biotransformar PROG en 11 α OH-PROG, empleando para ello células en reposo, con un rendimiento del 52 %, consiguiéndose con este cambio en la metodología de ensayo, una conversión casi total.

2. PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11 β -HIDROXILADOS

2.1. UTILIZACIÓN DE *Cochliobolus lunatus* PARA LA PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11 β -HIDROXILADOS

Como ya se ha comentado en la introducción, la forma convencional de producir esteroides 11 β -hidroxilados es mediante procesos de biotransformación utilizando hongos, principalmente *C. lunatus*. Sin embargo, además del producto de interés se forman otros subproductos que disminuyen la eficiencia del proceso y complican las posteriores etapas de purificación del producto deseado.

Para comprobar el comportamiento del hongo y como punto de partida de este estudio se realizaron ensayos de hidroxilación con *C. lunatus* (CECT 2130) sobre algunos sustratos esteroideos. Para llevar a cabo estos ensayos se cultivó *C. lunatus* en medio M7 durante 96 h a 30 °C, momento en el que se adicionó el esteroide a una concentración final de 300 μ M desde una solución 5 mM en 10 % (v/v) de Tyloxapol. La biotransformación se prolongó durante 20 h. Los productos obtenidos en estos ensayos se analizaron mediante TLC (Fig. R2.1).

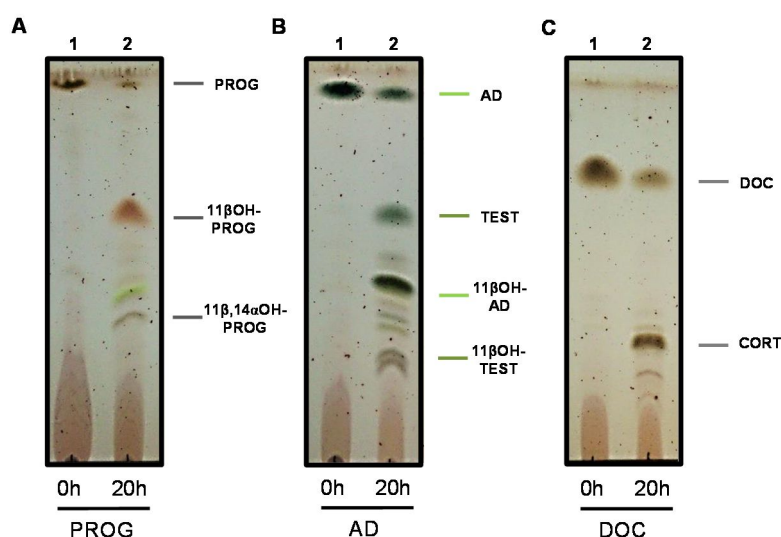


Figura R2.1 Análisis mediante TLC de la 11 β -hidroxilación de esteroides por *C. lunatus*. A. 11 β -Hidroxilación de PROG. B. 11 β -Hidroxilación de AD. C. 11 β -Hidroxilación de DOC.

Como se observa en la Fig. R2.1 *C. lunatus* es capaz de modificar todos los compuestos esteroideos empleados en este ensayo; no obstante, además de producirse el compuesto 11 β -hidroxilado de interés se observaron otros compuestos, en algunos casos en igual o mayor abundancia, por lo que los rendimientos del producto con respecto al sustrato fueron bajos. La conversión de los esteroides resultó no ser total, aunque fue mayor en el caso de la progesterona.

En el caso concreto del compuesto AD, además de formarse el compuesto 11 β -hidroxilado se forman otros compuestos mono y dihidroxilados del mismo, no identificados; basándose en

bibliografía podría tratarse del 14 α -OH-AD (Kollerov *et al.*, 2009); además se forma TEST a partir de AD, ello se debe a la actividad 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17-HSDH) ampliamente estudiada en *C. lunatus* (Plemenitas *et al.*, 1988), así como también se producen las correspondientes formas hidroxiladas de la misma.

A la vista de estos resultados y teniendo en cuenta resultados previos de esta Tesis Doctoral en los que se ha comprobado la capacidad de biotransformación de esteroides transfiriendo estos sistemas CYP-CPR fúngicos a actinobacterias exentas de estas actividades secundarias de transformación de los esteroides, se planteó como objetivo la identificación de este sistema CYP-CPR con capacidad 11 β -hidroxilasa en *C. lunatus*, hasta la fecha desconocido, así como su expresión heteróloga en *C. glutamicum*, tanto para comprobar de manera certera dicha actividad en las enzimas identificadas, como para obtener una plataforma para la biotransformación esteroides en sus formas 11 β -hidroxiladas.

2.2. IDENTIFICACIÓN DEL CITOCROMO RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD 11 β -HIDROXILASA EN *C. lunatus*

Como se ha expuesto en la introducción, el interés por encontrar el sistema CYP-CPR con capacidad 11 β -hidroxilasa no es una novedad y han sido varios los intentos mediante diferentes estrategias para llevarlo a cabo; hasta el momento todas ellas infructuosas. Teniendo en cuenta que, ni estrategias basadas en aislamiento de la proteína responsable de la actividad, ni estrategias basadas en comparación relativa de RNA inducido en presencia de esteroides (PROG), han tenido éxito, se plantea una nueva estrategia con la que se pretende extraer el CYPoma y el CP-REDUCToma completos de *C. lunatus* y estudiar la inducción génica de cada uno de los citocromos y proteínas citocromo-reductasas detectadas.

2.2.1. Extracción del CYPoma completo y curado manual de los datos

El CYPoma completo fue extraído empleando *MycoCosm Resource* de *Genome Portal* del *Joint Genome Institute* (JGI) tal como se explica en Materiales y Métodos, Sección 9. Para ello se empleó la anotación de los citocromos proporcionada por la base de datos JGI que contiene los correspondientes dominios Pfam e InterPro (PF00067 e IPR002238, respectivamente) del genoma de *C. lunatus* (cepa M118) (JGI Project ID: 403758). Mediante esta aproximación se anotaron un total de 112 citocromos putativos no redundantes (Tabla R1.1).

Hay que señalar aquí que la cepa utilizada para nuestros ensayos de biotransformación es la cepa *C. lunatus* CECT2130, que es la cepa de referencia para las 11 β -hidroxilaciones de esteroides descritas en la literatura (Sonomoto *et al.*, 1983; US4353985), en tanto que la cepa cuyo genoma está secuenciado es la cepa M118. Por lo tanto podrían esperarse pequeñas diferencias en los genomas.

En trabajos previos, una porción de fracción microsomal de *C. lunatus* enriquecida en 11 β -hidroxilasa había sido obtenida mediante métodos clásicos (centrifugación en gradiente,

purificación basada en carga, etc.) (Zuidweg, 1968; Janig *et al.*, 1992). Basándose en esta información no fue posible concluir, teniendo en cuenta la metodología empleada, si se trataba de un único citocromo o eran varios los que poseían dicha actividad; no obstante, fue posible concluir que el peso molecular del citocromo o los citocromos era aproximadamente 60 kDa. Por tanto, en el estudio se decidió excluir todos aquellos citocromos cuyo peso molecular fuera inferior a 50 kDa o mayor a 70 kDa, permitiendo eliminar 20 CYPs (marcados en gris en la Tabla R1.1), quedando por tanto 92 citocromos putativos.

Tabla R1.1 CYPoma putativo de *C. lunatus*

CYP	Número de aminoácidos	Peso molecular (kDa)	CYP	Número de aminoácidos	Peso molecular (kDa)
126469	51	6.02	52559	502	56.81
126939	99	10.92	51519	509	57.25
110062	222	24.88	47776	507	57.33
19014	260	29.30	52027	509	57.46
41035	340	38.62	31982	510	57.55
54191	350	39.69	123626	505	57.59
55618	377	41.97	55623	508	57.70
55383	388	42.74	20651	510	57.72
63509	424	47.26	22460	514	57.83
108801	429	48.22	21576	518	58.03
47057	456	51.31	51506	511	58.08
112196	460	51.47	140388	511	58.09
112789	460	52.16	23267	511	58.16
125862	469	53.08	103168	518	58.28
105208	480	53.67	152416	509	58.37
115117	487	54.04	106876	522	58.45
63419	480	54.05	33942	516	58.49
148971	485	54.07	58285	522	58.54
39929	481	54.28	53310	515	58.57
120161	500	54.38	36530	519	58.60
48997	492	54.51	43063	527	58.68
39666	492	55.00	55180	519	58.70
56286	494	55.39	123921	514	58.71
106779	495	55.63	121648	509	58.75
53281	496	55.73	53560	528	58.77
46585	495	55.91	34205	517	58.78
39245	494	55.96	60218	522	58.80
98326	497	56.25	149651	518	58.82
45637	496	56.56	135200	512	58.86
103239	498	56.57	114449	527	59.28
18976	508	56.68	65136	526	59.29
39414	496	56.81	56035	523	59.54

CYP	Número de aminoácidos	Peso molecular (kDa)
55015	528	59.55
116182	525	59.56
52354	521	59.57
51907	529	59.62
120242	526	59.67
47769	527	59.83
140443	532	59.87
53650	528	59.88
99310	518	59.88
46751	529	59.96
16522	526	60.03
51377	525	60.17
101680	537	60.28
46179	535	60.30
56034	539	60.37
25527	536	60.66
118692	539	60.79
48948	541	60.92
113943	540	60.93
143653	548	61.12
27925	536	61.20
106674	535	61.35
112971	542	61.48
105979	545	61.58

CYP	Número de aminoácidos	Peso molecular (kDa)
103474	551	61.79
31052	551	61.96
53640	552	61.97
108966	543	61.97
98945	540	62.04
34615	544	62.07
122571	544	62.09
103130	551	62.18
37613	543	62.71
34734	555	63.01
17883	575	64.20
100722	562	64.25
56036	570	64.77
62033	621	68.96
112955	624	70.55
115905	636	71.42
35957	666	74.28
52408	927	105.36
152579	1068	119.03
112637	1083	120.56
131553	1097	121.71
151722	1125	126.20
145449	1252	136.84
36573	4101	450.88

2.2.2. Identificación basada en homología de los candidatos más probables

A pesar del curado manual, el número de citocromos candidatos era muy alto, por lo que se decidió refinar la estrategia empleando la comparación con otros citocromos conocidos con actividad 11-hidroxilasa que permitiera elegir cuales citocromos emplear en los siguientes análisis o al menos, y dado que la semejanza no fue muy alta, elegir un orden lógico en el que proseguir con el análisis. De esta manera los 92 candidatos fueron comparados con la 11 α -hidroxilasa de *Aspergillus ochraceus* (US7033807) empleando BLAST-Local. Los candidatos con un score superior a 100 fueron seleccionados para realizar un análisis de inducción génica en el hongo en presencia de esteroides. De esta manera se seleccionaron los citocromos CYP116182, CYP51519, CYP115117, CYP103168, CYP135200, CYP34615, CYP31052 y CYP56034.

2.2.3. Estudio de la inducción génica de los candidatos en presencia de esteroides

Teniendo en cuenta trabajos previos, se sabía que determinados esteroides potenciaban la inducción del citocromo con actividad 11 β -hidroxilasa en *C. lunatus*, mientras que otros no tenían este efecto (Undisz *et al.*, 1992). Basándose en estos trabajos se escogió DOC, PROG y AD como inductores para analizar los perfiles de inducción génica de los citocromos candidatos. También se realizaron dichos estudios empleando ácido cólico (AcCol) y β -sitosterol (β -SITO) como controles negativos, ya que se conocía que no eran inductores y por tanto servirían para descartar una posible inducción general por estrés causado por la presencia de esteroides.

Para llevar a cabo estos ensayos se cultivó *C. lunatus* en medio M7 durante 96 h a 30 °C, momento en el que se adicionó el esteroide a una concentración final de 300 μ M desde una solución 5 mM en 10 % (v/v) de Tyloxapol. Tras 40 min de inducción, el micelio fue recogido en esterilidad mediante filtración, fue lavado con una solución que contenía 0.85 % (v/v) de cloruro de sodio y 0.05 % (v/v) de Tween 80 y fue congelado a -80°C hasta su uso.

El RNA de *C. lunatus* fue extraído partiendo de micelio congelado tal como se indica en Materiales y Métodos, Sección 5.1 y fue empleado como molde para la síntesis de DNA complementario (cDNA) (Materiales y Métodos, Sección 5.2). Este cDNA se empleó como molde para los ensayos de sqRT-PCR y qRT-PCR. Los ensayos de sqRT-PCR y qRT-PCR se realizaron tal como se indica en Materiales y Métodos, Sección 5.3 y Sección 5.4, respectivamente; empleando los oligonucleótidos listados en la Tabla MM3.

Los genes codificantes de tres de los citocromos seleccionados (CYP115117, CYP34615 y CYP56034) no mostraron expresión en ninguna de las condiciones ensayadas, no obstante si se obtuvo amplificación cuando se empleó DNA genómico (gDNA) como control de la sqRT-PCR (Fig. R2.2A). Para los candidatos CYP116182, CYP51519 y CYP135200 no se obtuvo amplificación, incluso empleando como molde gDNA y diferentes parejas de oligonucleótidos que hibridasen en diferentes dominios del citocromo lo que podría deberse a diferencias con el genoma de la cepa secuenciada o a errores de anotación y/o secuenciación.

En el caso de los candidatos CYP103168 y CYP31052 se observó una mayor expresión génica en presencia de DOC, PROG y AD con respecto a la condición no inducida expuesta sólo al detergente Tyloxapol en la misma cantidad que en el resto de las muestras con esteroides; así como tampoco se observó incremento en la expresión génica en presencia de AcCol ni β -SITO (Fig. R2.2A).

El incremento de expresión génica para el caso del CYP103168 se analizó cuantitativamente mediante qRT-PCR, observándose un incremento de la expresión en 157 en presencia de DOC, 9 veces en presencia de PROG y 7 veces en presencia de AD. No se observó incremento de expresión destacable en presencia de AcCol ni β -SITO (Fig. R2.2B).

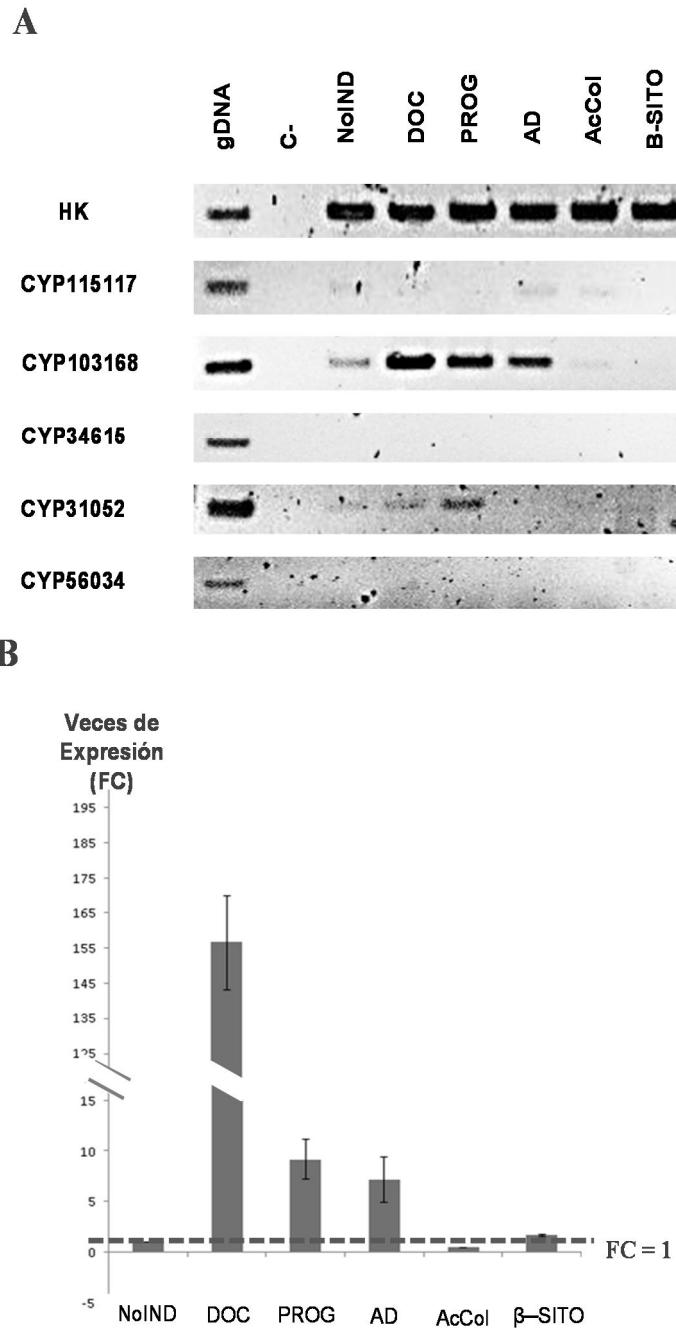


Figura R2.2 Expresión de citocromos de *C. lunatus* en presencia de diversos esteroides: DOC, AD, PROG, AcCol y β-SITO. C—, control negativo sin ADN; NoIND, condición no inducida (cultivos no expuesto a esteroides); gDNA corresponde al ADN genómico como un control positivo. El gen de la gliceraldehído gen 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se ha utilizado como control interno (HK). **A.** sqRT-PCR para la comprobación de la transcripción. **B.** qRT-PCR para comprobación de las veces de expresión (FC) del CYP103168.

Teniendo en cuenta estos resultados, se concluyó que el CYP103168 era un candidato ideal para expresarlo heterológamente y chequear su actividad para la biotransformación de esteroides. Sin embargo, como se ha expuesto ampliamente en la introducción, los citocromos tipo II requieren de una proteína citocromo-reductasa (CPR) que les transfiera poder reductor

para poder llevar a cabo su actividad; es por ello que era preciso identificar la CPR acompañante de dicho citocromo.

2.3. IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA CITOCROMO-REDUCTASA ACOMPAÑANTE DEL CITOCROMO RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD 11 β -HIDROXILASA EN *C. lunatus*

Para la identificación de la CPR de *C. lunatus* se empleó la misma estrategia que para la identificación del CYP, consistente en la extracción completa del CP-REDUCToma y el subsiguiente análisis de expresión génica de los candidatos en las mismas condiciones.

2.3.1. Extracción del CP-REDUCToma completo y curado manual de los datos

El CP-REDUCToma completo fue extraído empleando *MycCosm Resource* de *Genome Portal* del *Joint Genome Institute* (JGI) tal como se explica en Materiales y Métodos, Sección 9. Para ello se empleó la anotación de los dominios característicos de las CPR (dominio flavodoxina, dominio de unión a FAD y dominio de unión a NAD) proporcionada por la base de datos JGI que contiene los correspondientes dominios Pfam (PF00258, PF00667 y PF00175, respectivamente) del genoma de *C. lunatus* M118 (JGI Project ID: 403758).

Mediante estos análisis se encontraron 5 CPRs putativas: CPR59830, CPR64795, CPR128465, CPR112637 y CPR152579.

El curado manual de los datos mostró que CPR112637 y CPR152579 eran en realidad citocromos tipo III, que constituyen una proteína de fusión CYP-CPR. Las CPR64795 y CPR128465 habían sido previamente descritas como CPR1 y CPR2 de *C. lunatus* (Lah *et al.*, 2008). Por tanto, las proteínas citocromo-reductasa CPR59830, CPR64795 y CPR128465 fueron seleccionadas para estudios de inducción génica.

2.3.2. Estudio de la inducción génica de los candidatos en presencia de esteroides

Los estudios de los perfiles de expresión génica de las CPRs seleccionadas se realizaron de la misma manera que los estudios llevados a cabo con los CYPs seleccionados, explicados previamente en la Sección 2.2.3 de este apartado.

La CPR128465 no mostró expresión en ninguna de las condiciones ensayadas, no obstante si se obtuvo amplificación cuando se empleó gDNA como control de la sqRT-PCR. Las CPR59830 y CPR64795 no mostraron cambios relevantes en la expresión génica en ninguna de las condiciones ensayadas (Fig. R2.3).

Teniendo en cuenta estos resultados, se concluyó que existen tres CPRs en *C. lunatus* y que las CPR59830 y CPR64795, aunque no eran inducibles de manera selectiva, su expresión constitutiva las convertía en posibles candidatas para su expresión heteróloga conjuntamente con el CYP103168 y poder así analizar la actividad 11 β -hidroxilasa de dichas parejas.

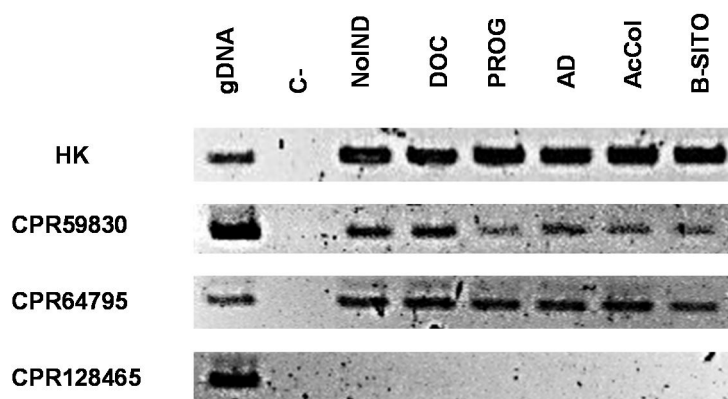


Figura R2.3 Expresión de las CPRs de *C. lunatus* en presencia de diversos esteroides: DOC, AD, PROG, AcCol y β -SITO. C—, control negativo sin ADN; NoIND, condición no inducida (cultivos no expuesto a esteroides); gDNA corresponde al ADN genómico como un control positivo. El gen de la gliceraldehído gen 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se ha utilizado como control interno (HK).

2.4. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ACTIVIDAD 11 β -HIDROXILASA DE *C. lunatus*

Basándose en resultados previos de esta Tesis Doctoral, y con la finalidad de identificar el CYP y su CPR acompañante con actividad 11 β -hidroxilasa, se propuso construir operones para su expresión en actinobacterias.

2.4.1. Diseño de los operones FAN y FIN (CPR-CYP)

Los operones FAN (CPR64795-CYP103168) y FIN (CPR59830-CYP103168) fueron diseñados exactamente como el operón FUN (Resultados 1, Sección 1.2.1) ya que se había conseguido actividad de biotransformación con este diseño. Así, se añadió una secuencia *Shine Dalgarno/RBS* (AAAGGGAG) 6 pb aguas arriba a partir de los respectivos codones de inicio de cada gen para conseguir la traducción óptima del ARNm, así como las dianas de restricción adecuadas para ser clonados en un vector de expresión adecuado. Sin embargo, al contrario de como se hizo con el operón FUN en este caso no se utilizaron genes sintéticos y por lo tanto el uso de codones no fue optimizado para su expresión.

Los genes *CPR59830*, *CPR64795* y *CYP103168* necesarios para construir los operones FAN y FIN fueron amplificados mediante PCR usando como molde el cDNA obtenido como se explica en los apartados anteriores a partir de un micelio de *C. lunatus* expuesto a DOC y los oligonucleótidos listados en la Tabla MM3.

Hay que señalar que cuando los amplicones de PCR de los genes *CPR59830*, *CPR64795* y *CYP103168* fueron secuenciados, se observaron algunas discrepancias conforme a la secuencia anotada en JGI, tanto en nucleótidos como en aminoácidos (Fig. R2.4). Estas diferencias probablemente se deban a que la cepa secuenciada y la cepa empleada en este estudio son diferentes. Sin embargo, en el caso del *CYP103168* se identificó, además de estos cambios puntuales, un nuevo intrón (Fig. R2.4A). Estas diferencias no pueden atribuirse a

errores de la PCR ya que se secuenciaron varios clones y en ningún caso los errores de la PCR podrían explicar el nuevo intrón. Este resultado es muy relevante porque de haber utilizado la anotación original para la síntesis posiblemente no se habría obtenido un citocromo activo.

A

```

CYP103168 secuenciado MDPQTVGLVVRALQTTAIAAVLLAVWTVVPKLQLNAQLRKLPSLTPEGTTKARDKFMASA
CYP103168 JGI MDPQTVGLVVRALQTTAIAAVLLAVWTVVPKLQLNAQLRKLPSLTPEGTTKARDKFMASA
*****

CYP103168 secuenciado RKLYQDGYHKFRDSAYTLINENGNANVIVPPQFLPELRQLPDDVLSFPEALTE-----
CYP103168 JGI RKLYQDGYHKFRDSAYTLINENGNANVIVPPQFLPELRQLSDDVLSFPEALTEASLKEKN
*****

CYP103168 secuenciado ---DLEIKYTHLSIENPTAAGLIKKKLTPALPRLNPSICQDVDRAVKTYMPPCDDWTEV
CYP103168 JGI LSHSDLEIKYTHLSIENPTAALVKKLTPALPRLNPSICQDVDRAVKTYMPPCDDWTEV
*****

CYP103168 secuenciado NINEKLLRIVAKVSGTIFVGP ELASDSDYLDAACFYTVDLMNAV TAMKKIRPWLKPF LAS
CYP103168 JGI NINEKLLRIVAKVSGTIFVGP ELASDSDYLDAACFYTVDLMNAV TAMKKIRPWLKPF LAS
*****

CYP103168 secuenciado RTPEIIALRAREKHTERVLPIVEQRIAAKANDPNWQEPD DFLQWMLDMREGTESIQELA
CYP103168 JGI RTPEIIALRAREKHTERVLPIVEQRIAAKANDPNWQEPD DFLQWMLDMREGTESIQDLA
*****

CYP103168 secuenciado KTQLSLIFAAIHITTTMTVNTMYTLAAMPEYLEPLREEIRNVMLDEGGVITSRALQRMEK
CYP103168 JGI KTQLLALIFAAIHITTTMTVNTMYTLAAMPEYLEPLREEIRNVMLDEGGVITSRALQRMEK
*****

CYP103168 secuenciado LDSYMKEVLRFTGPTMTSFTRRARKGITLSNGQYIPAGVIEVPSAAIYQDNAFYSSDS
CYP103168 JGI LDSYMKEVLRFTGPTMTSFTRRARKGITLSNGQYIPAGVIEVPSAAIYQDNAFYSSDS
*****

CYP103168 secuenciado FDGFRAYKARSTGKAADIARNQFVTSNEENLTFGYGRHACGRFFAANEIKMMITRLILD
CYP103168 JGI FDGFRAYKARSTGKAADIARNQFVTSNEENLTFGYGRHACGRFFAANEIKMMITRLILD
*****

CYP103168 secuenciado YDIKMPNGEKERYPQIEIGKMSIPDPTKTLAFKRVVV
CYP103168 JGI YDIKMPNDEKERYPQIEIGKMSIPDPTKTLAFKRVVV
*****
    
```

Figura R2.4 Alineamiento de las proteínas predichas y anotadas en JGI y las secuenciadas. A. CYP1031468.

B

```

CPR64795 JGI      MAQLDTLDIIVLAVLLVGTVAYFTKGTYWAVSADPYGSSSLATANGAAKAGKSRNIIIEKMD
CPR64795 secuenciada MAQLDTLDIIVLAVLLVGTVAYFTKGTYWAVSADPYGSSSLATANGAAKAGKSRNIIIEKMD
*****

CPR64795 JGI      ETDKNCVVFYGSQTGTAEDYASRISKEGHSRFGFKTMVADLEEYDYDNLDTFFPEDKLAVF
CPR64795 secuenciada ETDKNCVVFYGSQTGTAEDYASRISKEGHSRFGFKTMVADLEEYDYDNLDAFPEDKLAVF
*****;*****

CPR64795 JGI      VLATYGEPEPTDNAVEFYEFIGSEDISFSQGGGIDDKPLSNLKYVAFGLGNNTYEHYNSM
CPR64795 secuenciada VLATYGEPEPTDNAVEFYEFIGSEDISFSQGGGIDDKPLSNLNYVTFGLGNNTYEHYNSM
*****;*:*****

CPR64795 JGI      VRNVDKYLTRLGATRLGAAGEGDDGAGTMEEDFLAWKEPMWAAVAEKMGLEEREAMYEPV
CPR64795 secuenciada VRNVDKYLTRLGAKRLGAAGEGDDGAGTMEEDFLAWKEPMWAAVAEKMGLEEREAMYEPV
*****

CPR64795 JGI      FEVTEKPELSPEDDTVYLGEPNKNHLEGNQKGFNANNPFIAPIVEAEELFKDSDRNCLH
CPR64795 secuenciada FEVTEKPELSPEDDTVYLGEPNKNHLEGNQKGFNANNPFIAPIVEAEELFKDSDRNCLH
*****

CPR64795 JGI      MEISLAGSNLSYTTGDHIAIWPTNAGKEVDRLFVKLGKEDKRHTVISVRGLDPTAKVPFP
CPR64795 secuenciada MEISLAGSNLSYTTGDHIAIWPTNAGKEVDRLFVKLGKEDKRHTVISVRGLDPTAKVPFP
*****

CPR64795 JGI      SPTTYDAALRYHIEINAAVSRQLVSVVAQFAPNEDIKAEIVKLGDKDYFKEQVTRNLN
CPR64795 secuenciada SPTTYDAALRYHIEINAAVSRQLVSVVAQFAPNEDIKAEIVKLGDKDYFKEQVTRNLN
*****

CPR64795 JGI      LGQLEITCKGATWDKIPFSLFETIMVKIQPRYYSISSSSLVQDKKISITAVVESIEKPG
CPR64795 secuenciada LGQLEITCKGATWDKIPFSLFETIMVKIQPRYYSISSSSLVQDKKISITAVVESIEKPG
*****

CPR64795 JGI      APYALKGVTITNYLLALKQKQHGDPNPDPHGLSYSITGPRNKYDGIHVPVHVRHSNFKLPS
CPR64795 secuenciada APYALKGVTITNYLLALKQKQHGDPNPDPHGLSYSITGPRNKYDGIHVPVHVRHSNFKLPS
*****

CPR64795 JGI      DPSKPIIMVGPGTGVAPFRGFVQERAAQAKAGQNVGKTVLFFGCRKQSED FMYADEWKQY
CPR64795 secuenciada DPSKPIIMVGPGTGVAPFRGFVQERAAQAKAGQNVGKTVLFFGCRKQSED FMYADEWKQY
*****

CPR64795 JGI      QQDLGDKFEMHTAFSRDGPQKVYVQHKLEENGEEVNRLLLEQKAYFYVCDAAHMAREVNT
CPR64795 secuenciada QQDLGDKFEMHTAFSRDGPQKVYVQHKLEENGEEVNRLLLEQKAYFYVCDAAHMAREVNT
*****

CPR64795 JGI      LLGKIIAKYRNVSETKGEEIVKAMRASNQYQEDVWS
CPR64795 secuenciada LLGKIIAKYRNVSETKGEEIVKAMRASNQYQEDVWS
*****
    
```

Figura R2.4 B. CPR64795.

C

```

CPR59830 JGI      MSALQQPRRALVVYGSSETGNAQDVAAEEMGRVAERLRFDTTVAELNAIKLKE LLQYQLVLV
CPR59830 secuenciada MSALQQPRRALVVYGSSETGNAQDVAAEEMGRVAERLRFDTTVAELNAIKLKE LLQYQLVLV
*****:*****

CPR59830 JGI      AISTTGQGDLPNNSQAFWKAIRSARLRPGCLQPVRFASFGLGDSYPKYNWAHRKLYNRL
CPR59830 secuenciada AISTTGQGDLPNNSQAFWKAIRSARLRPGCLQPVRFASFGLGDSYPKYNWAHRKLYNRL
*****

CPR59830 JGI      VQLGAQAICDRGESDEQHPEGIDGSFLPWSTKLRQHLL EAYPLPEGVDPIPDNVLLDPKW
CPR59830 secuenciada VQLGAQAICDRGESDEQHPEGIDGSFLPWSTKLRQHLL EAYPLPEGVDPIPDNVLLDPKW
*****

CPR59830 JGI      LLEIADEASTTPDNQETNGQSSDVPPDLLNVPGG LTAKITSNERVTPSTHWQDVRHVQF
CPR59830 secuenciada LLEITDEASTTPDNQETNGQSSDVPPDLLNVPGG LTAKITSNERVTPSTHWQDVRHVQF
***:*****

CPR59830 JGI      EIPQVQPYAPGDVLTIIYPKNFSDVSQFLECMDW TSMADVPLRFTPSSSSTSSTENLPIR
CPR59830 secuenciada EIPQVQPYAPGDVLTIIYPKNFSDVSQFLECMDW TSMADVPLRFTPSSSSTSSTENLPIR
*****

CPR59830 JGI      TLGAGSTITLRQLLTHLDIISIPRRSFFAQLAHY TEDQFHKDRLLEFTDPQYIDELYDY
CPR59830 secuenciada TLDAGSTITLRQLLTHLDIISIPRRSFFAQLAHY TEDQFHKDRLLEFTDPQYIDELYDY
** *****

CPR59830 JGI      TTRPRRSILEVLQEFESVKIPWQRVCSII PMMRGRQFSIASAMNPTAEVEKNTKIELLIA
CPR59830 secuenciada TTRPRRSILEVLQEFESVKIPWQRVCSII PMMRGRQFSIASAMNPTAEVEKNTKIELLIA
*****:*****

CPR59830 JGI      IVKYKTVIKRTRQGVATRYIASLTPGQEITV TLSKGGGVRKEELVNP IVMVGPGTGVAP
CPR59830 secuenciada IVKYKTVIKRIRQGVATRYIASLTPGQEITV TLSKGGGVRKEELVNP IVMVGPGTGVAP
***** *****:*****

CPR59830 JGI      MRSLIYQRM LWREELQKQNGHAQEKDEVKDL LFFGCRNAESDYFFRDEWAHLQSNQVPL
CPR59830 secuenciada MRSLIYQRM LWREELQKQNGHAQEKDEVKDL LFFGCRNAESDYFFRDEWAHLQSNQVPL
*****

CPR59830 JGI      DVFAAFSRDQRQKVYVQDLLRQQSALIFSHLH HKS GIMYVCGASCKMPQAVREALIEAFQ
CPR59830 secuenciada DVFAAFSRDQRQKVYVQDLLRQQSALIFSHLH HKS GIMYVCGASCKMPQAVREALIEAFQ
*****:*****

CPR59830 JGI      EHCKMERDAAEAYLVSM EKAGRYRQETW
CPR59830 secuenciada EHCKMERDAAEAYLVSI EKAGRYRQETW
*****:*****
    
```

Figura R2.4. Alineamiento de las proteínas predichas y anotadas en JGI y las secuenciadas. C. CPR59830.

Los amplicones fueron diseñados de forma tal que, una vez clonados en el vector de expresión adecuado, resultaran en un operón funcional, FAN o FIN (Fig. R2.5).

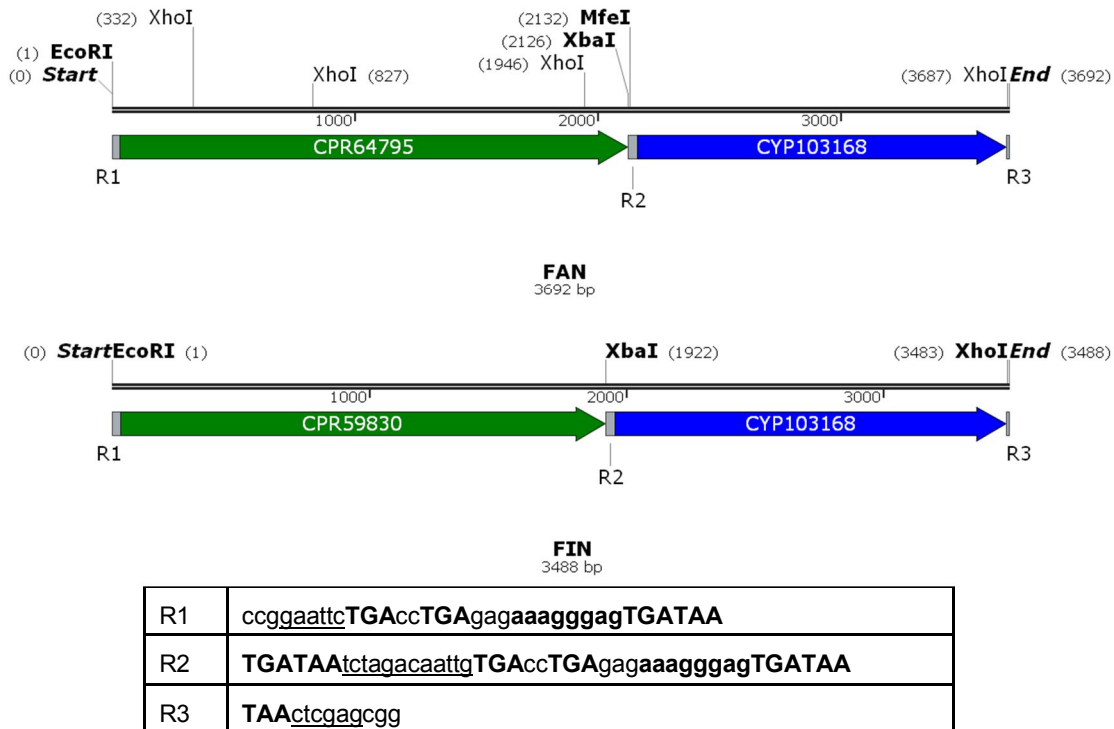


Figura R2.5. Representación esquemática de los genes contenidos en los operones FAN y FIN. Las secuencias de las regiones intergénicas (R1- R3) se indican en la tabla. Se muestran en cursiva las secuencias de los sitios de restricción y se anotan en la figura. Las secuencias RBS (AAAGGGAG) se indican en negrita.

2.4.2. Expresión heteróloga de la actividad 11 β -hidroxilasa en *C. glutamicum*

2.4.2.1. CONSTRUCCIÓN

Los amplicones que contenían CPR64795 y CPR59830 fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*. El amplicón que contenía CYP103168 se digirió con las enzimas de restricción *XbaI* y *XhoI*. El vector pECXK-99E se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *Sall* (*XhoI* compatible).

El amplicón que codificaba la CPR64795 (digerido con *EcoRI* y *XbaI*) y el amplicón que codificaba el CYP103168 (digerido con *XbaI* y *XhoI*) se clonaron en el plásmido pECXK-99E (digerido con *EcoRI* y *Sall*) resultando el vector pXKFAN.

El amplicón que codificaba la CPR59830 (digerido con *EcoRI* y *XbaI*) y el amplicón que codificaba el CYP103168 (digerido con *XbaI* y *XhoI*) se clonaron en el plásmido pECXK-99E (digerido con *EcoRI* y *Sall*) resultando el vector pXKFAN.

Los plásmido pXKFAN y pXKFIN se clonaron inicialmente en *E. coli* DH10B donde se secuenciaron para comprobar que las construcciones eran correctas. Los plásmidos pECXK-99E, pXKFAN y pXKFIN fueron posteriormente aislados de las cepas de *E. coli* portadoras y transformados en *C. glutamicum* mediante electroporación (ver Materiales y Métodos Sección 3.3).

2.4.2.2. COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD 11 β -HIDROXILASA. BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES CON CÉLULAS EN REPOSO

Con el objetivo de comprobar la actividad 11 β -hidroxilasa de las construcciones realizadas se llevaron a cabo los ensayos que se muestran a continuación. Para ello se cultivó *C. glutamicum* (pXKFAN) y *C. glutamicum* (pXKFIN) en medio TSB durante 24 h tras la inducción con 1 mM de IPTG, a 30°C y 250 rpm; momento en el cual se recogieron y concentraron las células mediante centrifugación. Las células se resuspendieron a una DO₆₀₀ de 60 en tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) conteniendo DOC (500 μ M) y se incubaron con agitación (250 rpm) a 30 °C durante 96 h. Se tomaron muestras a tiempo final y se analizaron mediante HPLC-DAD-MS.

Al igual que en ensayos de biotransformación anteriores, para comprobar que el producto no se forma de manera natural por la acción del microorganismo sin citocromo y que el sustrato no es consumido ni modificado se empleó como control negativo la cepa *C. glutamicum* (pECXK-99E) (sin inserto).

La cepa *C. glutamicum* (pXKFAN) fue capaz de biotransformar DOC en CORT, mientras que la cepa *C. glutamicum* (pXKFIN) no fue capaz de biotransformar DOC en CORT. La cepa control *C. glutamicum* (pECXK-99E) no fue capaz de biotransformar el sustrato de la reacción (Fig. R2.6).

En la biotransformación llevada a cabo por cepa *C. glutamicum* (pXKFAN), además de CORT, se detectó otro compuesto hidroxilado más polar y más abundante que CORT que eluyó en el minuto 5.

Cabe destacar que para el producto CORT, así como en todos los casos en los que se disponía de patrón o de muestra con una proporción alta del compuesto para ser usada como tal, la identificación se realizó mediante la m/z del ion característico así como por el patrón de fragmentación de dicho ion característico. Por ejemplo, en el caso del compuesto CORT el ion característico tiene una m/z de 347 y la fragmentación característica del mismo es 329, 311 y 293. Para la identificación de un compuesto se extrae un espectro de masas del ion característico de m/z 347 sí y sólo sí en la fragmentación de éste, el fragmento mayoritario coincide con el fragmento mayoritario de la fragmentación característica, en este caso 329. Por tanto, en el caso de la biotransformación de DOC, se detecta CORT y otro compuesto que eluye en el minuto 5 y que tiene el mismo ion característico m/z 347 y el mismo patrón característico de fragmentación.

En la biotransformación llevada a cabo por la cepa *C. glutamicum* (pXKFIN) no se produce CORT; sin embargo se observa descenso del sustrato y aparición de otro producto más apolar que el compuesto CORT, que eluye en el minuto 11.2 (marcado con una flecha en la Fig. R2.6). Resulta necesario precisar que al extraerse un espectro de masas del ion característico de m/z 347 empleando el espectro masas obtenido de los iones de m/z entre 150-400 (*full scan*); es decir, manteniendo la extracción del ion característico m/z 347 pero evitando el criterio de patrón característico de fragmentación de dicho ion; se obtiene un pico mayor cuyo patrón de fragmentación es 283, 311, 329, 301, 265 -siendo 283 el más abundante y 265 el menos abundante-, permitiendo concluir que se trata de un compuesto de igual peso molecular que el compuesto CORT pero lo suficientemente diferente para tener otro patrón de fragmentación característico, probablemente un compuesto hidroxilado en otra posición.

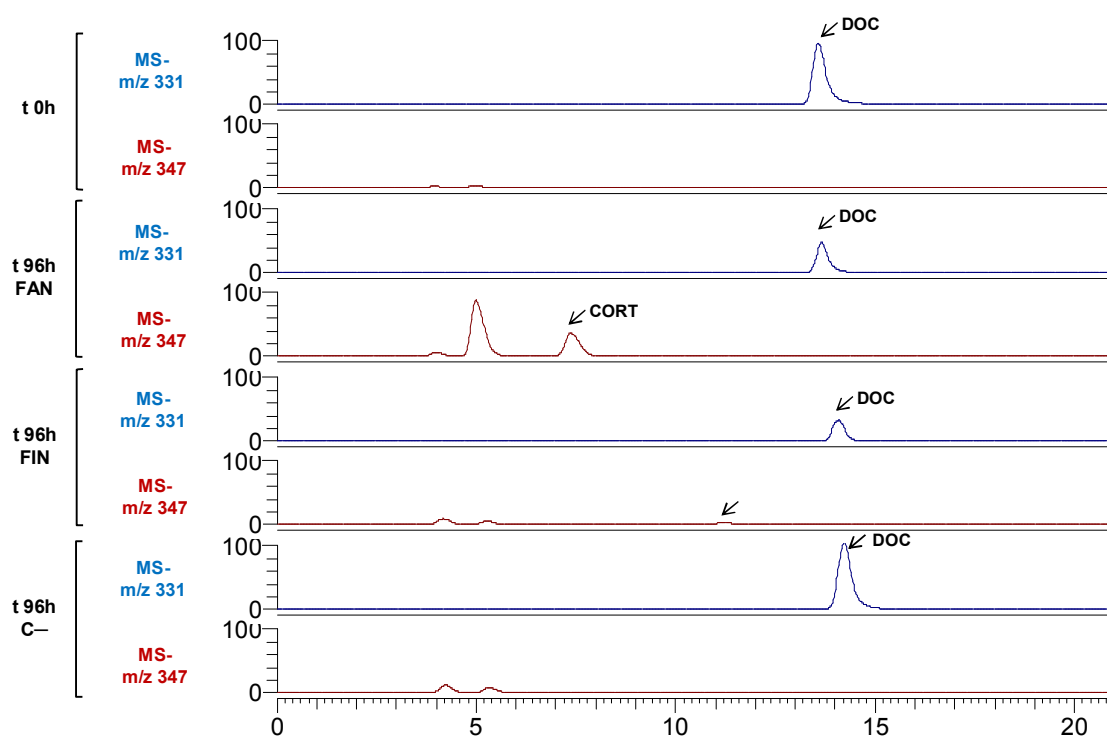


Figura R2.6 Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de DOC en CORT concélulas en reposo de *C. glutamicum* (pXKFAN) (FAN), *C. glutamicum* (pXKFIN) (FIN) y *C. glutamicum* (pECXK-99E) (C-). Espectros de masas del ion característico de DOC (línea azul) y del ion característico de CORT (línea roja).

De todo lo anterior se puede concluir que, tanto el operón FAN como el operón FIN fueron funcionales en *C. glutamicum*, pero sólo el operón FAN (formado por la CPR64795 y el CYP103168) fue capaz de producir CORT a partir de DOC.

El CYP103168 es funcional empleando como CPR acompañante, tanto CPR64795 como CPR59830; siendo capaz de cambiar la especificidad de sustrato y produciendo diferentes productos a partir del mismo sustrato DOC dependiendo de la CPR acompañante.

Además se puede concluir que *C. lunatus* posee tres CPRs funcionales: CPR64795 y CPR128465, identificadas previamente como CPR1 y CPR2 (Lah *et al.*, 2008) y CPR59830, identificada por primera vez en esta Tesis Doctoral.

A la vista de los resultados obtenidos con DOC, se realizaron ensayos empleando la cepa *C. glutamicum* (pXKFAN) con otros esteroides cuyo producto 11 β -hidroxilado fuese, o bien de interés industrial como la sintona 11 β OH-AD o bien de interés farmacológico, como el compuesto hidrocortisona (HC). Los ensayos fueron realizados tal como se ha indicado anteriormente pero empleando AD (500 μ M) y cortexolona (también denominada *Reichstein's Substance S*, RSS) (500 μ M) como sustratos. De igual manera se comprobó que la cepa control *C. glutamicum* (pECXK-99E) tampoco fue capaz de modificar el sustrato de la reacción.

Para realizar una comparativa con las biotransformaciones que tienen lugar utilizando el hongo, se realizaron ensayos de biotransformación con *C. lunatus* tal como se ha indicado en la Sección 2.1 de este apartado, pero empleando DOC o AD (500 μ M) como sustratos, ya que en las biotransformaciones llevadas a cabo con *C. glutamicum* (pXKFAN) empleando DOC como sustrato se detectan otros compuestos además del compuesto de interés 11 β -hidroxilado y en el caso de AD, se quiere comparar por existir otras actividades sobre este compuesto presentes en *C. lunatus*.

La cepa *C. glutamicum* (pXKFAN) fue capaz de producir 11 β OH-AD empleando AD como sustrato (Fig. R2.7A). Esta cepa también fue capaz de producir HC empleando RSS como sustrato (Fig. R2.7B).

En la biotransformación llevada a cabo por la cepa *C. glutamicum* (pXKFAN) empleando AD como sustrato, puede observarse que existen otros dos compuestos minoritarios que eluyen en el minuto 4.4 –en muy baja proporción– y 8.3, ambos con el mismo ion característico del compuesto 11 β OH-AD (m/z 303) y el mismo patrón de fragmentación de dicho ion (Fig. R2.7A).

En la biotransformación llevada a cabo por la cepa *C. glutamicum* (pXKFAN) empleando RSS como sustrato, puede observarse que existe otro compuesto minoritario que eluye en el minuto 3.3 con el mismo ion característico del compuesto HC (m/z 363) y el mismo patrón de fragmentación de dicho ion (Fig. R2.7B).

Con independencia de los compuestos ya mencionados, no se encontró ningún otro subproducto en las biotransformaciones mediante los métodos cromatográficos empleados.

En las biotransformaciones llevadas a cabo con el hongo *C. lunatus* empleando como sustratos DOC y AD, además de los compuestos 11 β -hidroxilados de interés, se producen otros compuestos.

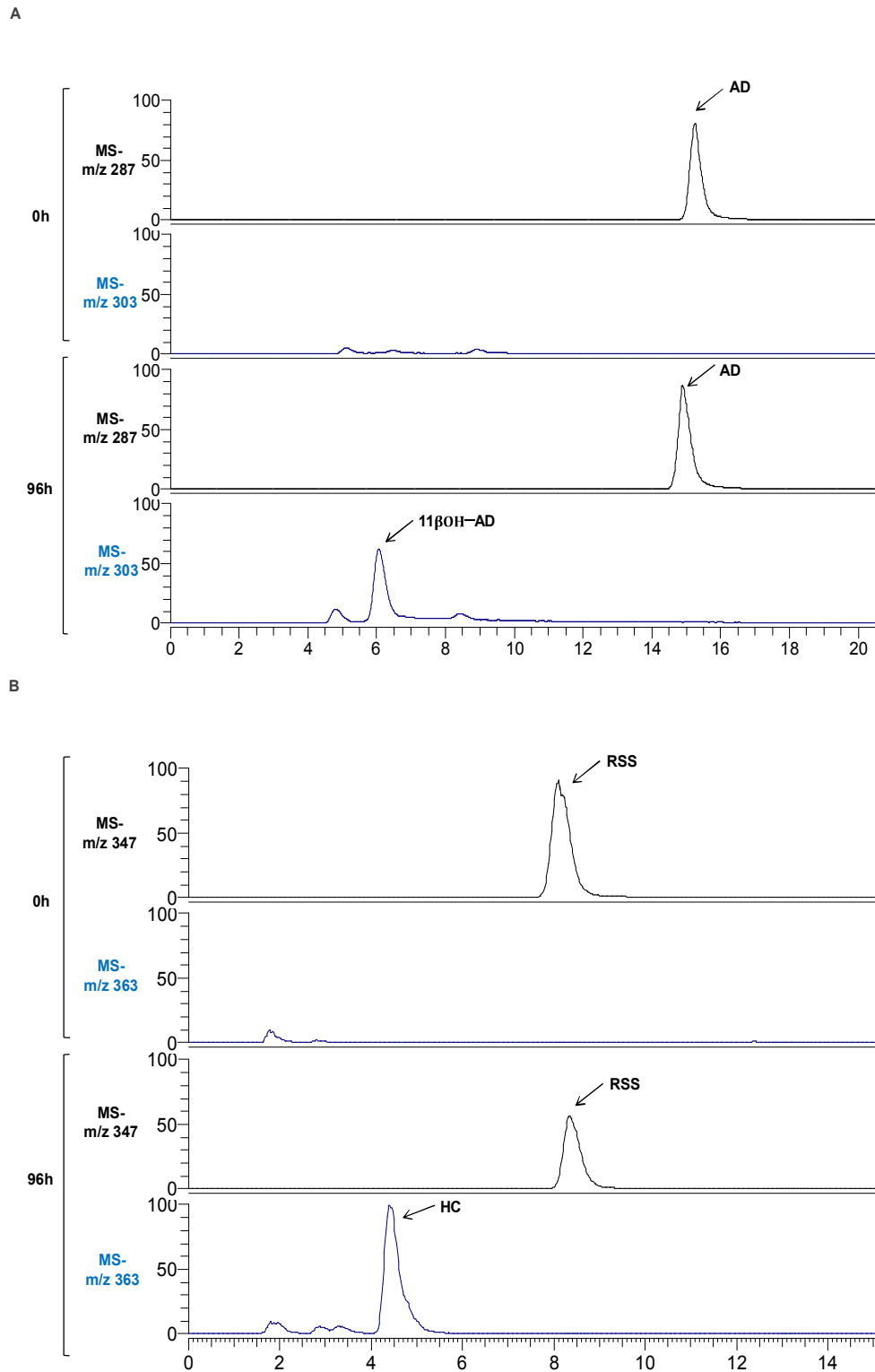


Figura R2.7 Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de esteroides en 11β OH-esteroides con células en reposo de *C. glutamicum* (pXKFAN). Espectros de masas del ion característico -indicado en cada caso- del sustrato (línea negra) y del producto (línea azul). A. Biotransformación de AD en 11β OH-AD. B. Biotransformación de RSS en HC.

En el caso de la biotransformación de DOC llevada a cabo por el hongo *C. lunatus*, los productos encontrados, así como la proporción en la que aparecen, resultaron ser los mismos que los obtenidos en la biotransformación llevada a cabo por *C. glutamicum* (pXKFAN), de lo que se deduce que en el caso del compuesto DOC, no parece estar actuando otro citocromo o enzima; además se puede concluir que el sistema CPR64795-CYP103168 es el responsable en el hongo *C. lunatus* de hidroxilar DOC en posición 11 β , así como en otra posición no identificada (Fig. R2.8A).

Cabe destacar que en esta biotransformación no se observó el compuesto de m/z 347 [283, 311, 329, 301, 265] que eluía en el minuto 11.2 en la biotransformación llevada a cabo por la cepa *C. glutamicum* (pXKFIN), por lo que parece probable que la CPR fisiológica acompañante del CYP103168 en *C. lunatus* sea la CPR64795.

En el caso de la biotransformación de AD llevada a cabo por el hongo *C. lunatus* se encuentran otros productos diferentes a los identificados en la biotransformación llevada a cabo por *C. glutamicum* (pXKFAN). Tal como ya se ha estudiado en la Sección 2.1 de este apartado, *C. lunatus* es capaz de producir TEST a partir de AD, debido a la actividad 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17-HSDH) previamente descrita (Plemenitas *et al.*, 1988); es por ello que se detecta TEST (minuto 12.7), así como derivados monohidroxilados de la misma (minutos 4.3 y 5.9). Una vez excluidos los compuestos derivados de testosterona, el perfil de biotransformación es muy similar al obtenido en la biotransformación llevada a cabo por la cepa *C. glutamicum* (pXKFAN); lo que permite concluir que el sistema CPR64795-CYP103168 es el responsable en el hongo *C. lunatus* de hidroxilar AD en posición 11 β , así como en otra posición no identificada (Fig. R2.8B).

Teniendo en cuenta los experimentos anteriores es posible afirmar que el CYP103168 es el responsable de la hidroxilación en posición 11 β en *C. lunatus* de los compuestos DOC, AD y RSS; así como de otras monohidroxilaciones en otras posiciones de los mismos. Además puede afirmarse, basándose en los perfiles de hidroxilación de estos compuestos, que CPR64795 es el acompañante fisiológico del CYP103168.

Gracias a los experimentos anteriores se ha podido identificar el citocromo que porta la actividad 11 β -hidroxilasa, además suponen una prueba de concepto para emplear *C. glutamicum* como chasis para la expresión heteróloga de actividades modificadoras de esteroides para la producción de esteroides de interés farmacológico y/o industrial; no obstante en el caso que nos ocupa, la conversión ha sido muy baja y los rendimientos variables según el sustrato de partida. No hay que olvidar que, al contrario que lo realizado con el sistema RoCPR1-CYP509C12 de *R. oryzae* denominado FUN (Resultados 1, Sección 1.2.1), los genes CPR64795 y CYP103168 han sido amplificados mediante PRC empleando como molde cDNA y por tanto no han sido optimizados, así como tampoco se ha añadido en la región N-terminal ningún aminoácido para mejorar la expresión.

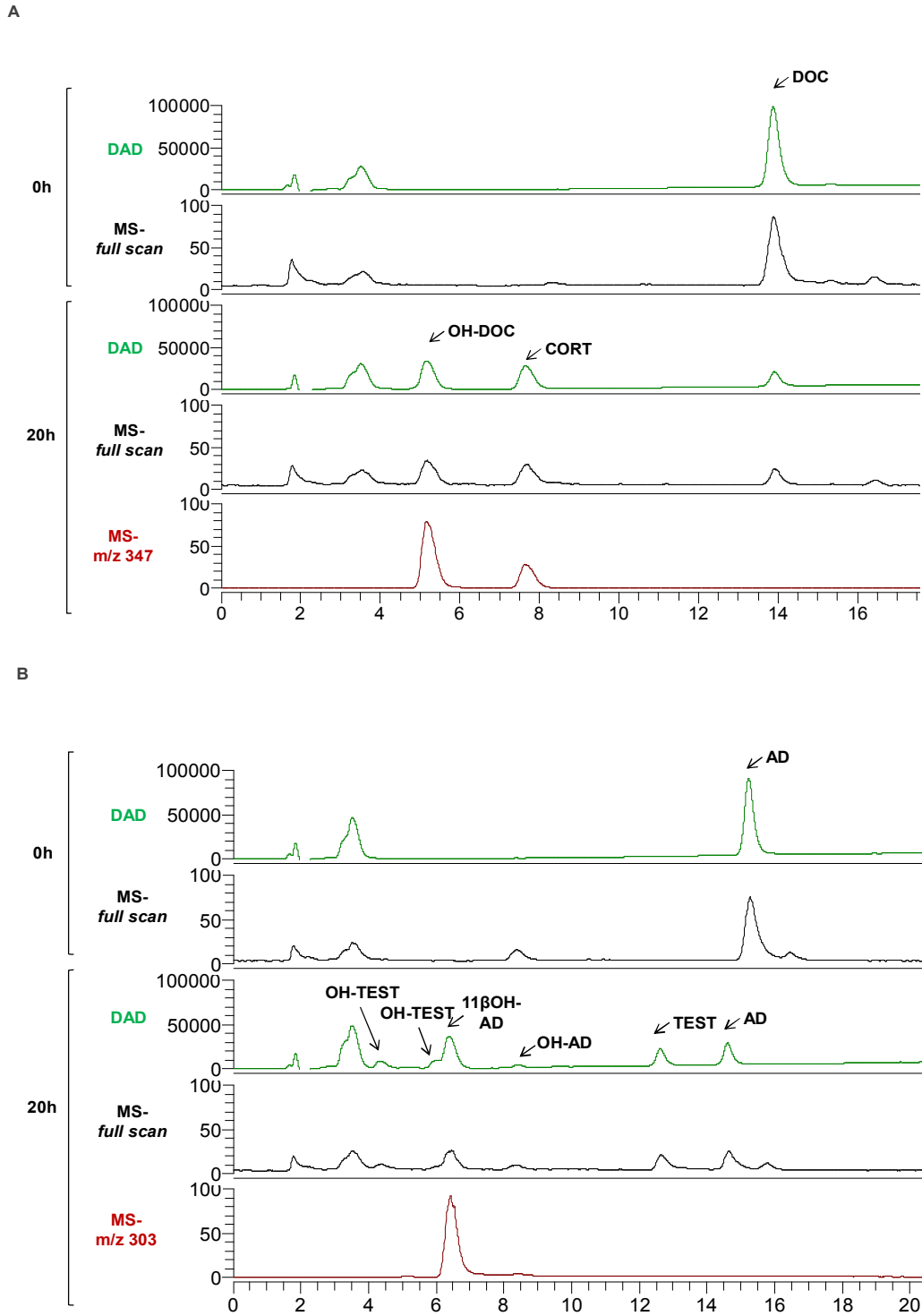


Figura R2.8 Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de esteroides en 11β OH-esteroides de *C. lunatus*. Cromatograma de HPLC registrados en DAD (50-600 nm) (línea verde oscura), espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (*full scan*) (línea negra) y espectro de masas del ion característico -indicado en cada caso- del producto (línea roja). **A.** Biotransformación de DOC en CORT. **B.** Biotransformación de AD en 11β OH-AD.

2.4.2.3. MEJORA DE LA EXPRESIÓN: OPERÓN FAN.1

Los citocromos eucariotas, tal como se ha explicado ampliamente en la introducción, habitualmente están anclados a membrana. En el caso del CYP103168 y basándose en estudios previos (Zuidwek, 1968; Janig *et al.*, 1992) se sabía que aparecía en la fracción microsomal. Con el objetivo de mejorar la solubilidad de la proteína CYP103168 se estudió la estructura de la misma, observándose mediante el programa SOSUI de predicción de dominios transmembrana (Materiales y Métodos, Sección 9) que efectivamente presentaba una región transmembrana en N-terminal (Fig. R2.9).

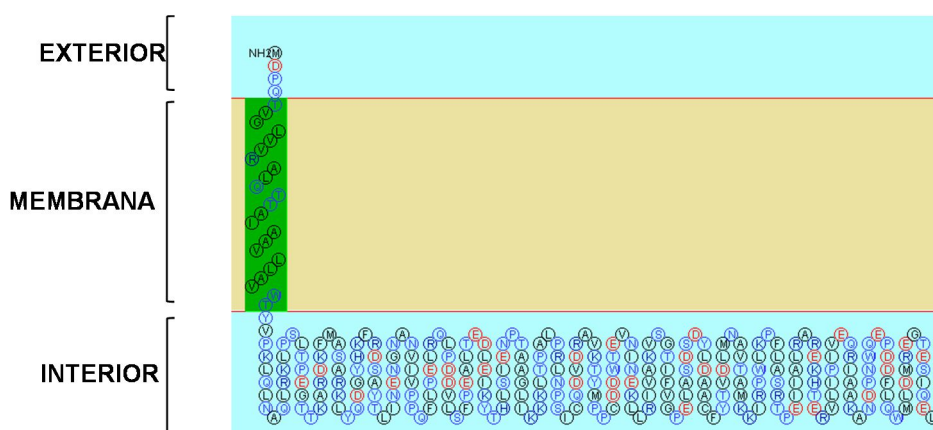


Figura R2.9 Análisis de estructura y dominios transmembrana de CYP103168

2.4.2.3.1. Diseño y construcción del Operón FAN.1

Teniendo en cuenta existía un dominio transmembrana y amplia bibliografía previa en la mejora de la solubilidad de proteínas eucariotas mediante el truncamiento o cambio de la región N-terminal (Urlacher *et al.*, 2012; Ichinose y Wariishi, 2013; Scott *et al.*, 2016) se decidió emplear esta aproximación para la mejora de la solubilidad del CYP103168.

Basándose concretamente en los casos previos en los que se mejora la solubilidad de citocromos fúngicos mediante truncamiento de la región N-terminal cuando son expresados heterológamente en bacterias (Ichinose y Wariishi, 2013) se decidió que aminoácidos trincar. Para ello se recopilaron 21 casos en los que esta estrategia había funcionado con éxito y se alinearon sus secuencias con el fin de dilucidar un posible patrón o criterio de truncamiento. Tal como Ichinose y Wariishi (2013) describen en su artículo, se detectó la región rica en prolina (azul), que es la región de unión entre el N-terminal y el dominio catalítico (Fig. R2.10). Teniendo en cuenta la región transmembrana se decidió trincar los primeros 20 aminoácidos del CYP103168, basándose en la carga y polaridad de los mismos.

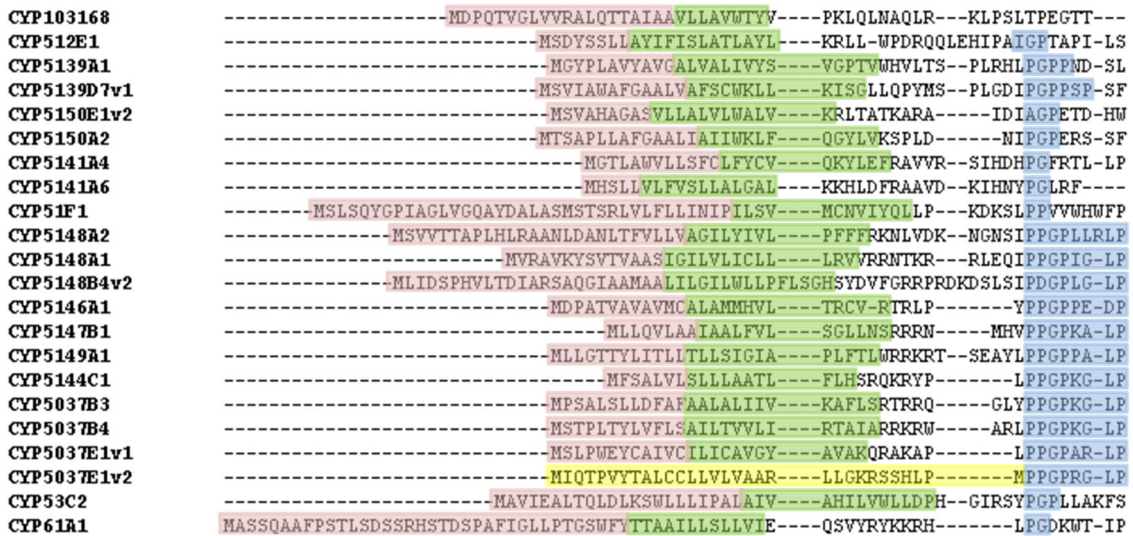


Figura R2.10 Alineamiento de las regiones N-terminal de los citocromos fúngicos empleados en este estudio. Se marca en azul la región rica en prolina (P) de unión entre N-terminal y el dominio catalítico; en verde la región transmembrana conservada y en rosa la región truncada; se marca en amarillo una sustitución en la región transmembrana.

Para la construcción de un operón que contuviese CPR64795 y la versión truncada del citocromo CYP103168 se procedió exactamente de la misma manera que se ha detallado para la construcción del operón FAN (Sección 2.4.1 de este apartado), a excepción de que el oligonucleótido 5' empleado para la amplificación del CYP103168 fue diferente (Tabla MM2), de tal manera que la proteína comenzaba en una metionina, seguida del aminoácido valina 21 del CYP103168; este citocromo truncado se denominó CYP103168.1 y el operón formado por CPR64795-CYP103168.1 se denominó FAN.1.

2.4.2.3.2. Comprobación de actividad. Biotransformación de esteroides

Para comprobar la actividad *in vivo*, se realizaron ensayos de biotransformación de DOC tal y como se ha detallado en la Sección 2.4.2.2 de este mismo apartado.

La cepa *C. glutamicum* (pXKFAN.1) no fue capaz de biotransformar DOC en CORT –y sólo se detectaron trazas incuantificables-; sin embargo, tal como se aprecia en la Fig. R2.11.A, descendió el sustrato DOC, formándose una gran cantidad de un producto más polar que eluyó en el minuto 11 cuya m/z fue 333. Probablemente se tratase de un compuesto derivado de DOC ya que corresponde con su m/z incrementada en 2; además el patrón característico de fragmentación (m/z 333 [297, 279, 315, 255]), aunque en diferente proporción relativa, también coincide con el patrón de fragmentación característico de DOC (m/z 331 [295, 313, 277, 253]).

Aunque aquí no se muestran los datos este experimento también se llevó a cabo con el operón FIN.1 (CRP59830-CYP103168.1) construido con la otra CPR, obteniéndose resultados similares.

Estos resultados sugerían que el compuesto encontrado que se correspondía con DOC presentando una reducción en $\Delta^{4,5}$, sería el compuesto dihidrodeoxicorticosterona. Aunque también podría tratarse de un compuesto en el que el grupo ceto de la posición 3 o de la posición 20 se redujese a alcohol.

Estos datos unidos a la falta del producto CORT, sugerían la hipótesis de que el CYP103168.1 habría cambiado su función o que el CYP103168.1 era inactivo y el nuevo producto encontrado se formase solamente por la acción de la CPR64795.

Con el objetivo de comprobar si la CPR era responsable de la transformación se construyó la cepa *C. glutamicum* (pXK64795). La construcción del vector pXK64795 se llevó a cabo tal como se detalló en la Sección 2.4.2.1 de este apartado. El amplicón que contenía la CPR64795 (digerido con *EcoRI* y *XbaI*) se clonó en el plásmido pECXK-99E (digerido con *EcoRI* y *XbaI*) resultando el vector pXK64795, que se clonó inicialmente en *E. coli* DH10B donde se secuenció para comprobar que la construcción era correcta. El plásmido pXK64795 fue posteriormente aislado de las cepa de *E. coli* portadora y transformado en *C. glutamicum* mediante electroporación (ver Materiales y Métodos Sección 3.3).

La cepa *C. glutamicum* (pXK64795) no fue capaz de biotransformar DOC en CORT; tampoco se observó disminución alguna del sustrato DOC, no encontrándose diferencia alguna con lo sucedido al realizar el experimento con la cepa control *C. glutamicum* (pECXK-99E) (Fig. R2.11.B).

Basándose en los resultados obtenidos puede concluirse que el compuesto de m/z 333 que eluía en el minuto 11 no se forma por la acción exclusiva de la CPR64795. A partir de esta conclusión, resulta lógico pensar que el sistema CPR64795-CYP103168.1 ha modificado su actividad principal por una actividad secundaria, ya descrita en otros citocromos.

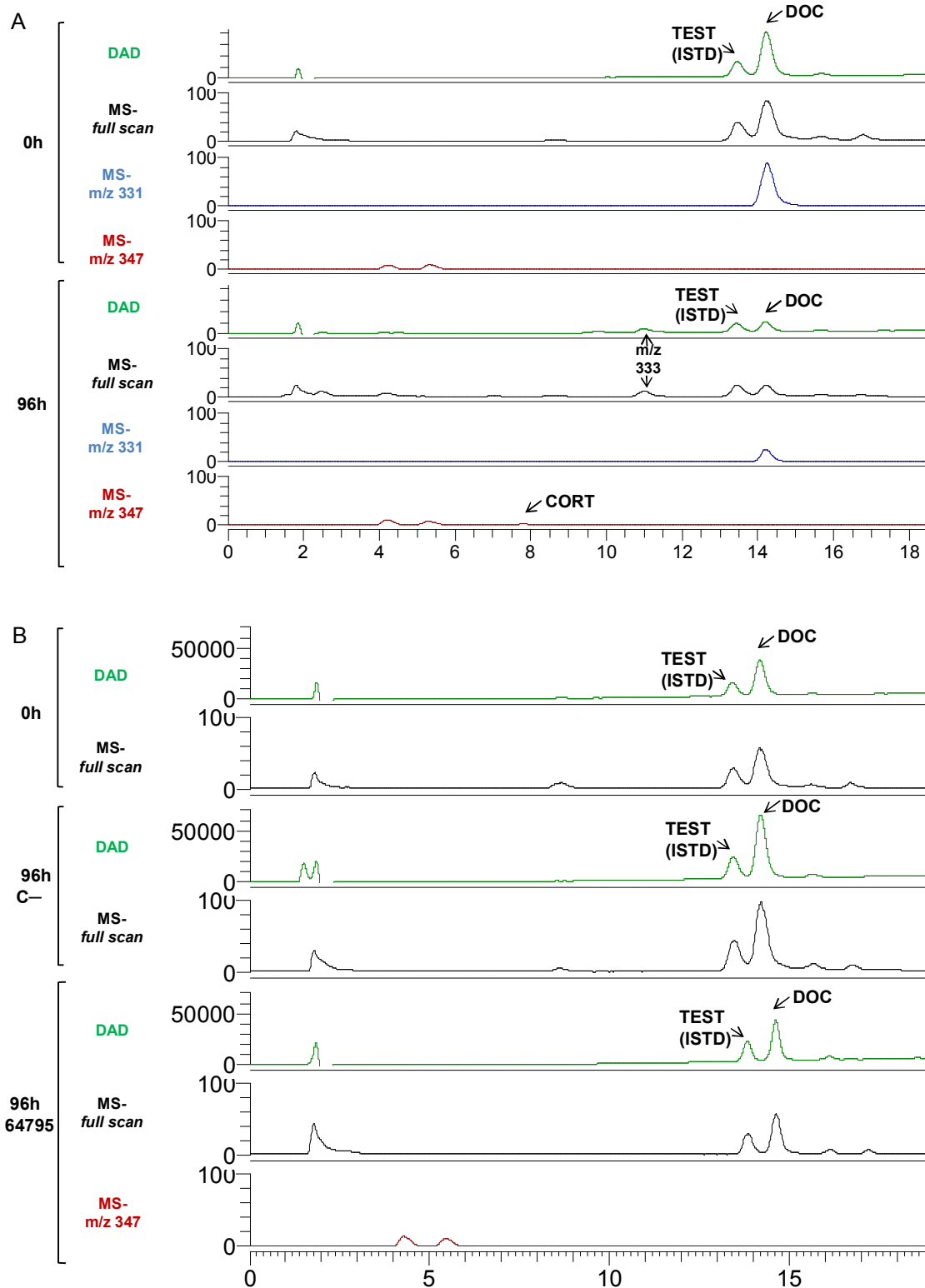


Figura R2.11 Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de DOC en CORT. A. Con células en reposo de *C. glutamicum* (pXKFAN.1). B. Con células en reposo de *C. glutamicum* (pECXK-99E) (C-) y *C. glutamicum* (pXK64795) (64795). Cromatograma HPLC registrado en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro), espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (full scan) (línea negra), espectro de masas del ion característico de DOC (línea azul) y del ion característico de CORT (línea roja).

2.4.3. Producción de 11 β OH-ADD y 11 β OH-AD a partir de materias primas de bajo coste

Teniendo en cuenta resultados previos de esta Tesis Doctoral, se sabía que era posible producir compuestos 11-hidroxilados a partir de materias primas de bajo coste empleando para ello cepas mutantes de *M. smegmatis* capaces de acumular las sintonas AD y ADD a las que se les había transferido la capacidad 11-hidroxilasa. Con el fin de obtener la prueba de concepto de que es posible la producción de 11 β OH-ADD y 11 β OH-AD a partir de CHO y FITO se llevaron a cabo los siguientes experimentos.

2.4.3.1. CONSTRUCCIÓN

El amplicón que contenía CPR64795 (digerido con *EcoRI* y *XbaI*) y el amplicón que contenía CYP103168 (digerido con *XbaI* y *XhoI*) se clonaron en el plásmido pMV261 (digerido con *EcoRI* y *Sall*) resultando el vector pMVFAN, que se clonó inicialmente en *E. coli* DH10B donde se secuenció para comprobar que la construcción era correcta. Los plásmidos pMV261 y pMVFAN fueron posteriormente aislados de las cepas de *E. coli* portadoras y transformados en *M. smegmatis* mediante electroporación (ver Materiales y Métodos Sección 3.2).

2.4.3.2. COMPROBACIÓN DE ACTIVIDAD. BIOTRANSFORMACIÓN DE ESTEROIDES

Todos los experimentos de producción se llevaron a cabo tal como se detalló en la Sección 1.2.2.3 del Apartado 1 de Resultados.

2.4.3.2.1. Producción de 11 β OH-ADD en *M. smegmatis* Δ 6039

Tal y como ya se ha comentado en la Introducción y en la Sección 1.2.2.3.1 del Apartado 1 de Resultados, se empleó la cepa *M. smegmatis* Δ 6039, capaz de acumular ADD a partir de CHO y FITO.

En los experimentos se empleó *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFAN) para obtener 11 β OH-ADD a partir de materias primas de bajo coste como CHO o FITO ya que, una vez obtenido el compuesto ADD, fue posible realizar la hidroxilación en la posición 11 β del mismo, debido a las proteínas producidas mediante la expresión de los genes contenidos en el operón FAN.

a) Producción 11 β OH-ADD a partir de colesterol

La figura R2.12 muestra la curva de crecimiento de las cepas *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFAN) y *M. smegmatis* Δ 6039 (pMV261) donde se observa que la expresión de los genes contenidos en el operón FAN parece afectar solamente a la fase de lisis de la bacteria en las condiciones ensayadas.

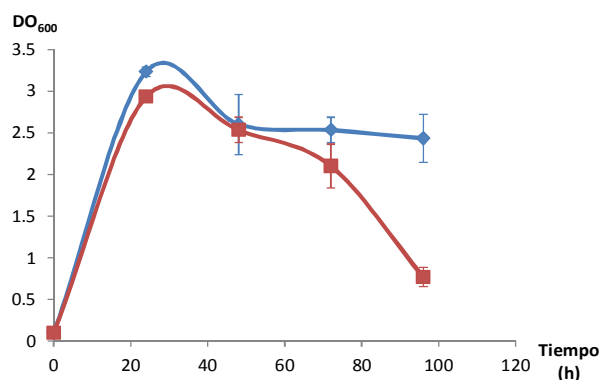


Figura R2.12 Curvas de crecimiento de la cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMV261) (línea azul) y *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFAN) (línea roja) en las condiciones de biotransformación.

La cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFAN) fue capaz de biotransformar CHO en $11\beta\text{OH-ADD}$. Se aprecia el consumo de CHO a partir de las 24 h, siendo la conversión del mismo a tiempo final (96 h) (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de $99.9 \pm 0.1 \%$; así como se aprecia también la producción creciente a partir de las 24 h de $11\beta\text{OH-ADD}$ hasta el tiempo final (96 h), con un rendimiento de producción respecto a CHO (producto $11\beta\text{OH-ADD}$ producido respecto al sustrato CHO consumido, $\phi_{11\beta\text{OH-ADD/CHO}}$) de $31.3 \pm 0.1 \%$ (Fig. R2.13.A, Fig. R2.14 y Fig. R2.15).

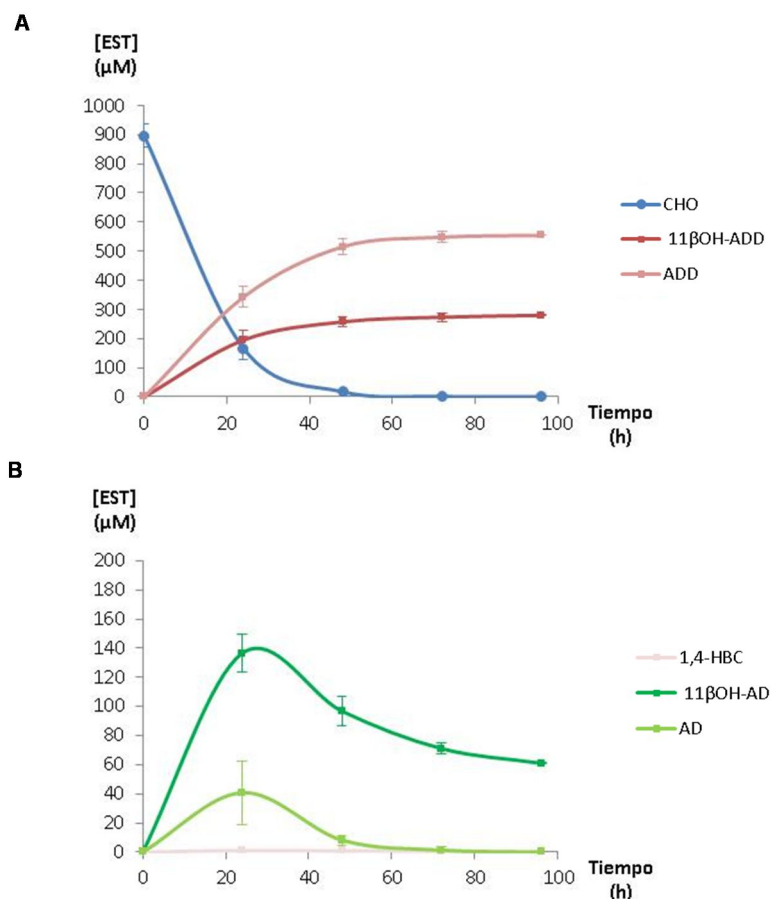


Figura R2.13 Seguimiento de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFAN). A. Consumo de CHO y producción de $11\beta\text{OH-ADD}$ y ADD. B. Producción de subproductos relevantes.

Es notable la aparición de otros subproductos, identificados mediante TLC (Fig. R2.14) y HPLC-DAD-MS (Fig. R2.15), siendo el más representado ADD ($\phi_{\text{ADD}/\text{CHO}} = 61.9 \pm 0.1 \%$) y en menor medida $11\beta\text{OH-AD}$ ($\phi_{11\beta\text{OH-AD}/\text{CHO}} = 6.8 \pm 0.1 \%$) (Fig. R2.13.B).

La cepa control *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMV261) no tiene la capacidad de producir $11\beta\text{OH-ADD}$ (Fig. R1.7.A), pero sí que se observó biotransformación de CHO en ADD, donde la conversión fue de $96.2 \pm 5.9 \%$ y el rendimiento del producto ADD producido con respecto al sustrato CHO consumido fue de $\phi_{\text{ADD}/\text{CHO}} = 99.3 \pm 0.3 \%$; observándose también una cantidad no significativa de 1,4-HBC.

A pesar de que la biotransformación se llevó a cabo durante 96 h, como puede observarse (Fig. R2.13), los mismos resultados habían sido alcanzados a las 72 h; por lo que el tiempo de biotransformación puede reducirse en, al menos, 24 h.

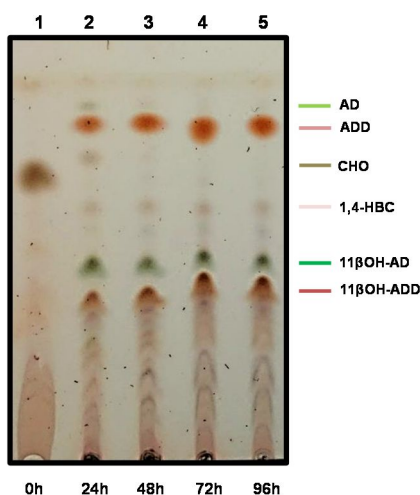


Figura R2.14 Análisis mediante TLC de la biotransformación en cultivos en crecimiento de CHO en $11\beta\text{OH-ADD}$ de *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFAN) a distintos tiempos (0 a 96 h).

Lo que parece estar ocurriendo es que la cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFAN) está biotransformando CHO en ADD de manera correcta; sin embargo no todo el ADD se está biotransformando en $11\beta\text{OH-ADD}$.

Al igual que ocurría en la cuantificación de $11\alpha\text{OH-ADD}$ y $11\alpha\text{OH-AD}$, la cuantificación de los compuestos identificados se realizó empleando los espectros de masas de los iones característicos de los mismos; en el caso de $11\beta\text{OH-ADD}$ y $11\beta\text{OH-AD}$ eluyen en el minuto 3.5 y 3.9, respectivamente, por lo que mediante HPLC-DAD los picos prácticamente solapan pero m/z del ion característico del $11\beta\text{OH-ADD}$ es 301 y del $11\beta\text{OH-AD}$ es 303; lo que permite la cuantificación empleando los espectros de masas de los mismos (Fig. R2.15.B).

Además de los compuestos mencionados, se observa también la aparición de otros compuestos no identificados más polares que el $11\beta\text{OH-ADD}$ (por tanto migran más abajo en la TLC) (Fig. R2.14). No han sido tenidos en cuenta en la cuantificación los compuestos no observados mediante HPLC-DAD-MS; se estima que estos subproductos aparecen en una

proporción muy baja (menor al 1%) y son considerados por tanto, irrelevantes en términos cuantitativos en la biotransformación.

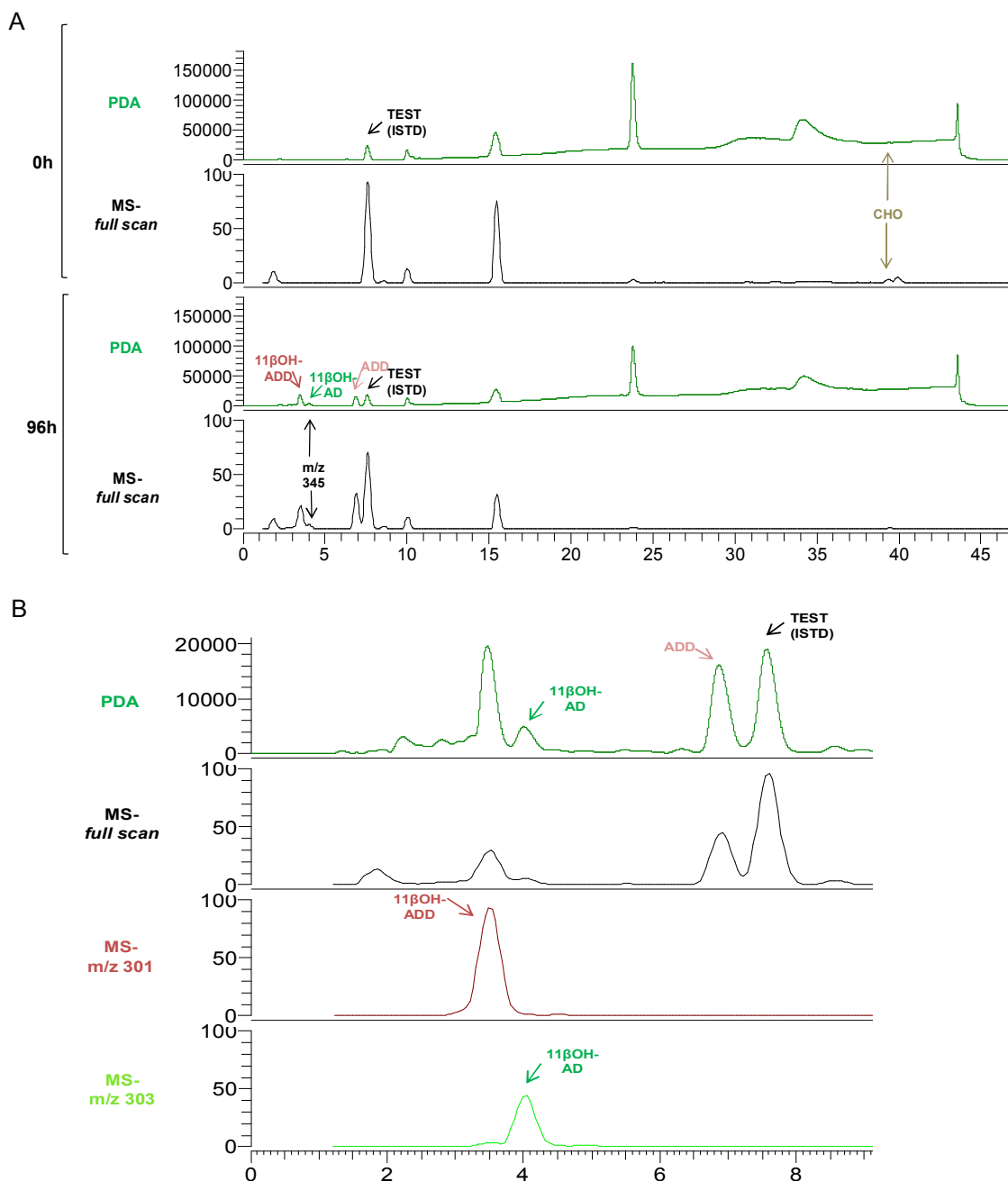


Figura R2.15 Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smagmatis* Δ 6039 (pMVFAN). **A.** Visión general. **B.** Ampliación de los minutos 0 a 9. Cromatogramas HPLC registrados en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro), espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (*full scan*) (línea negra), espectro de masas del ion característico del 11 β OH-ADD (línea roja) y espectro de masas del ion característico del 11 β OH-AD (línea verde claro).

Además de los compuestos mencionados también se detectó, aunque de forma cuantitativamente despreciable, un compuesto de m/z 345 que coeluye con $11\beta\text{OH-AD}$ en el minuto 4, probablemente se trate trazas del compuesto $11\beta\text{OH-1,4-HBC}$; aunque basándose en la polaridad de los hidroxilados en posición 11β , se esperaría de fuese más apolar que el $11\alpha\text{OH-1,4-HBC}$ y por tanto eluyese más tarde que éste, quizás pudiese tratarse de $1,4\text{-HBC}$ hidroxilado en otra posición.

A la vista de estos resultados se puede concluir que es factible la producción de $11\beta\text{OH-ADD}$ a partir de CHO con rendimientos cercanos al 31 %.

b) Producción $11\alpha\text{OH-ADD}$ a partir de fitosteroles

Tal como se puede observar en las curvas de crecimiento de las cepas *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFAN) y *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMV261) la expresión de los genes contenidos en el operón FAN parece afectar al crecimiento en las condiciones ensayadas y además lo que se observa es una mayor lisis en estas células a tiempo final (Fig. R2. 16).

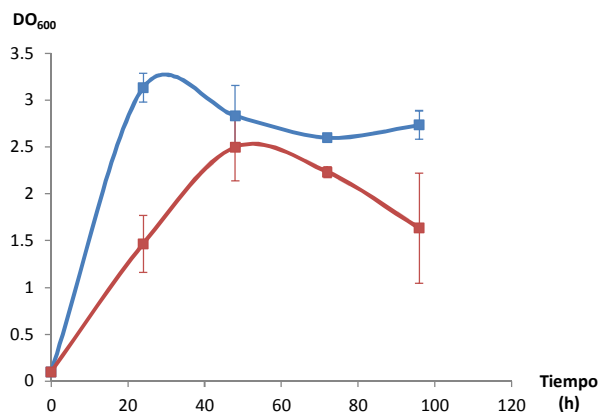


Figura R2.16 Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMV261) (línea azul) y *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFAN) (línea roja) en las condiciones de biotransformación.

La cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFAN) fue capaz de biotransformar FITO en $11\beta\text{OH-ADD}$. Se aprecia el consumo de FITO a partir de las 24 h, siendo la conversión del mismo a tiempo final (96 h) (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de 70.9 ± 1.4 %; así como se aprecia también la producción creciente a partir de las 24 h de $11\beta\text{OH-ADD}$ hasta el tiempo final (96 h), con un rendimiento de producción respecto a FITO (producto $11\beta\text{OH-ADD}$ producido respecto al sustrato FITO consumido, $\phi_{11\beta\text{OH-ADD}/\text{FITO}}$) de 31.1 ± 5.5 % Fig. R2.17, Fig. R2.18 y Fig. R2.19).

Es notable la aparición de otros subproductos, identificados mediante TLC (Fig. R2.18) y HPLC-DAD-MS (Fig. R2.19), siendo el más representado ADD ($\phi_{\text{ADD}/\text{CHO}} = 62.0 \pm 8.4$ %) y en menor medida $11\beta\text{OH-AD}$ ($\phi_{11\beta\text{OH-AD}/\text{CHO}} = 4.3 \pm 81.3$ %) (Fig. R2.17 y Fig. R2.18).

La cepa control *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMV261) no tiene la capacidad de producir $11\alpha\text{OH-ADD}$ (Fig. R1.15), pero si que se observó biotransformación de FITO en ADD, donde la conversión

fue de $67.5 \pm 0.3 \%$ y el rendimiento del producto ADD producido con respecto al sustrato FITO consumido fue de $\phi_{ADD/FITO} = 95.7 \pm 0.9 \%$; observándose también una cantidad no significativa de 1,4-HBC, despreciable por encontrarse en una proporción menor al 1 %.

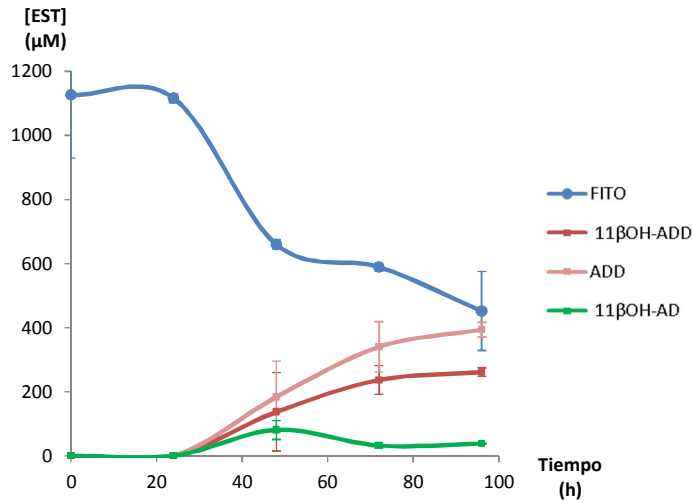


Figura R2.17 Seguimiento de la biotransformación de FITO en cultivos en de *M. smegmatis* Δ6039 (pMVFAN). Consumo de FITO y producción de 11βOH-ADD y subproductos relevantes.

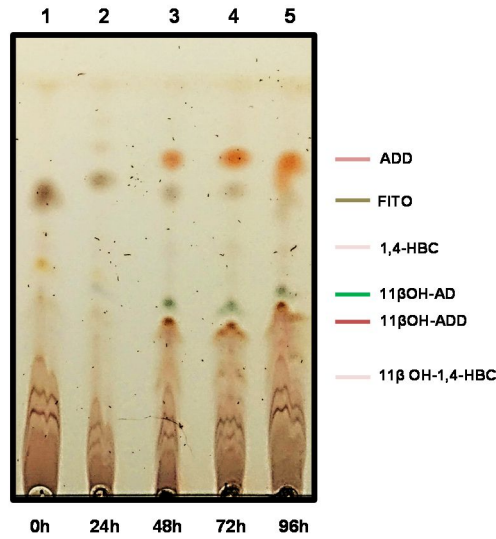


Figura R2.18 Análisis mediante TLC de la biotransformación en cultivos en crecimiento de FITO de *M. smegmatis* Δ6039 (pMVFAN) a distintos tiempos (0 a 96 h).

El sumatorio de los rendimientos es de $98.7 \pm 0.19 \%$, por lo que no se cierra balance totalmente; así mismo la suma de las concentraciones molares de los productos es similar a la concentración molar empleada como sustrato, pero levemente menor. La explicación más plausible es, como ya se ha explicado anteriormente, por errores de cuantificación debido a las dificultades propias del trabajo con fitosteroides y la cuantificación de los mismos debido a que se trata de una mezcla de esteroides (por lo tanto la concentración molar es una estimación basada en el peso molecular de sus componentes y de la proporción de los mismos) y bajísima solubilidad, aunque no hay que descartar la existencia de subproductos que no se estén considerando al no ser detectados con los métodos cromatográficos empleados.

Al igual que en las biotransformaciones realizadas anteriormente y, al contrario de lo que ocurre con la biotransformación empleando como sustrato CHO, la conversión de FITO no fue total a tiempos finales (96 h) (Fig. R2.17, Fig. R2.18 y Fig. R2.19); la producción del producto de interés parece ser creciente aun, sin haber llegado a un máximo; por lo que quizás sería adecuado extender el tiempo del ensayo para conseguir mejores valores de conversión de los fitosteroles, así como mejores rendimientos.

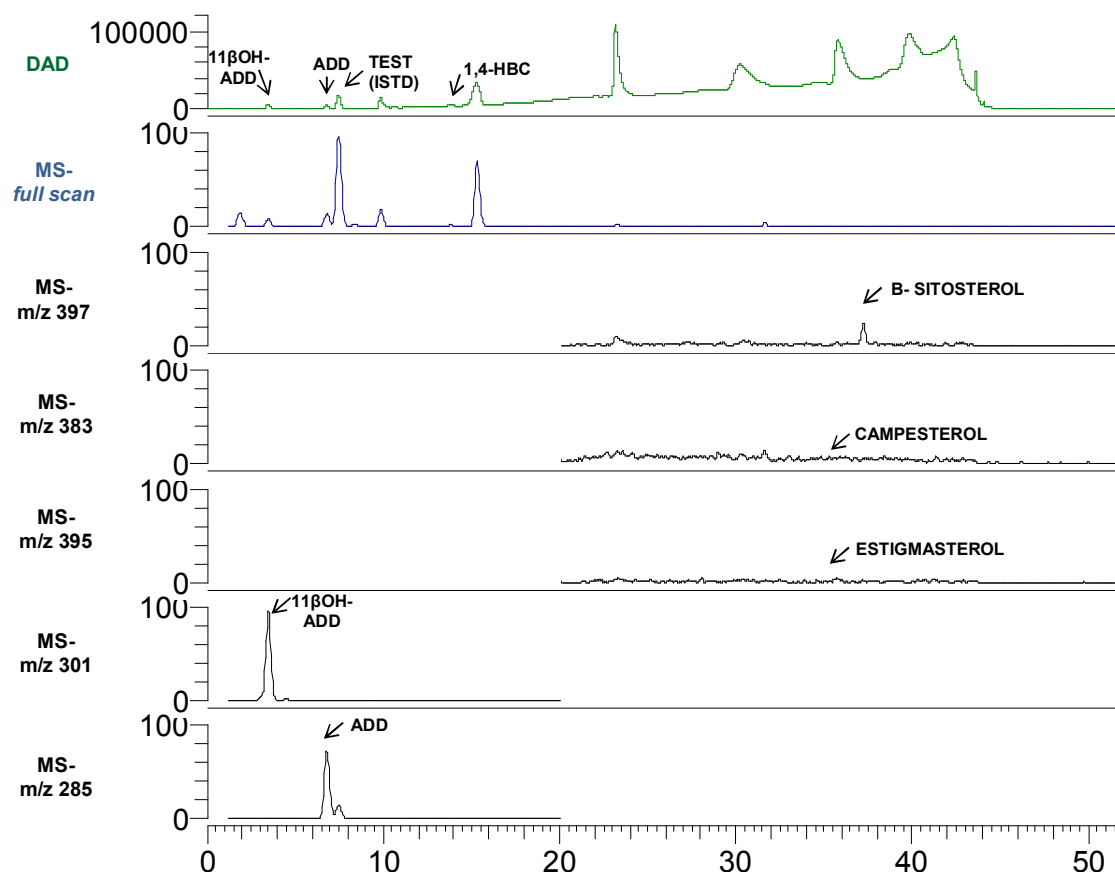


Figura R2.19 Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de FITO en cultivo en crecimiento de *M. smagmatis* Δ 6039 (pMVFAN). Cromatograma de HPLC registrado en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro) y espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (*full scan*) (línea azul) y de los iones característicos –indicados en cada caso– de los compuestos significativos (líneas negras).

Al igual que ha ocurrido en la biotransformación llevada a cabo por la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN), lo que parece estar ocurriendo es que no se está biotransformado en 11 β -hidroxilado de forma suficientemente eficiente el ADD, por lo que sería interesante encontrar unas condiciones de producción más adecuadas para la biotransformación.

Además de los compuestos mencionados previamente, también son detectados mediante HPLC-DAD-MS, 1,4-HBC y el compuesto no identificado cuya m/z es 345 ya comentado, que probablemente sea 11 β OH-1,4-HBC. Como ocurría en los experimentos anteriores, estos

compuestos aparecen en una proporción baja para su cuantificación (<1 %) (Fig. R2.18 y Fig. R2.19)

No se observa acumulación de otros subproductos o intermediarios diferentes a los descritos anteriormente.

A la vista de los resultados anteriores puede concluirse que es factible la obtención 11 β OH-ADD a partir de fitosteroles con rendimientos cercanos al 31 %.

2.4.3.2.2. Producción de 11 β OH-AD en *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941

Tal como se ha comentado en la Introducción y ampliamente en la Sección 1.2.2.3.2. del Apartado 1 de Resultados, se empleó la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941, capaz de acumular AD a partir de CHO y FITO.

En los experimentos se empleó *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFAN) para obtener 11 β OH-AD a partir de materias primas de bajo coste como CHO o FITO ya que, una vez obtenido el compuesto AD, fue posible realizar la hidroxilación en la posición 11 β del mismo, debido a las proteínas producidas mediante la expresión de los genes contenidos en el operón FAN.

a) Producción 11 β OH-AD a partir de colesterol

La figura R2.20 muestra la curva de crecimiento de las cepas *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFAN) y *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMV261) donde se observa que la expresión de los genes contenidos en el operón FAN afecta al crecimiento en las condiciones ensayadas.

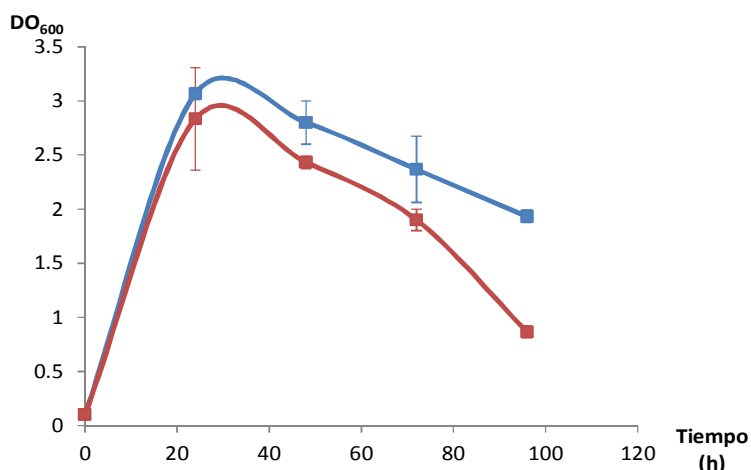


Figura R2.20 Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMV261) (línea azul) y *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFAN) (línea roja) en las condiciones de biotransformación.

La cepa *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFAN) fue capaz de biotransformar CHO en 11 β OH-AD. Se aprecia el consumo de CHO a partir de las 24 h, siendo la conversión del mismo a tiempo final (96 h) (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de 99.8 ± 0.3 %; así como se aprecia también la producción creciente a partir de las 24 h 11 β OH-AD hasta el tiempo final

(96 h), con un rendimiento de producción respecto a CHO (producto 11 β OH-AD producido respecto al sustrato CHO consumido, $\phi_{11\beta\text{OH-AD/CHO}}$) de $61.4 \pm 1.2 \%$ (Fig. R2.21.A, Fig. R2.22 y Fig. R2.23).

Es notable la aparición de otros subproductos, identificados mediante TLC (Fig. R2.22) y HPLC-DAD-MS (Fig. R2.23) como AD ($\phi_{\text{AD/CHO}} = 28.2 \pm 1.0 \%$), 4-HBC ($\phi_{4\text{-HBC/CHO}} = 4.5 \pm 0.6 \%$) y 11 β OH-ADD ($\phi_{11\beta\text{OH-ADD/CHO}} = 5.9 \pm 0.4 \%$) (Fig. R2.21.B).

La cepa control *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMV261) no tiene la capacidad de producir 11 β OH-AD (Fig. R1.20A), pero sí que se observó biotransformación de CHO en AD, donde la conversión fue de $99.1 \pm 0.2 \%$ y el rendimiento del producto AD producido con respecto al sustrato CHO consumido fue de $\phi_{\text{AD/CHO}} = 76.7 \pm 3.7 \%$; observándose también una cantidad significativa de 4-HBC ($\phi_{4\text{-HBC/CHO}} = 18.3 \pm 2.9 \%$) y muy poco ADD ($\phi_{\text{ADD/CHO}} = 4.9 \pm 0.9 \%$).

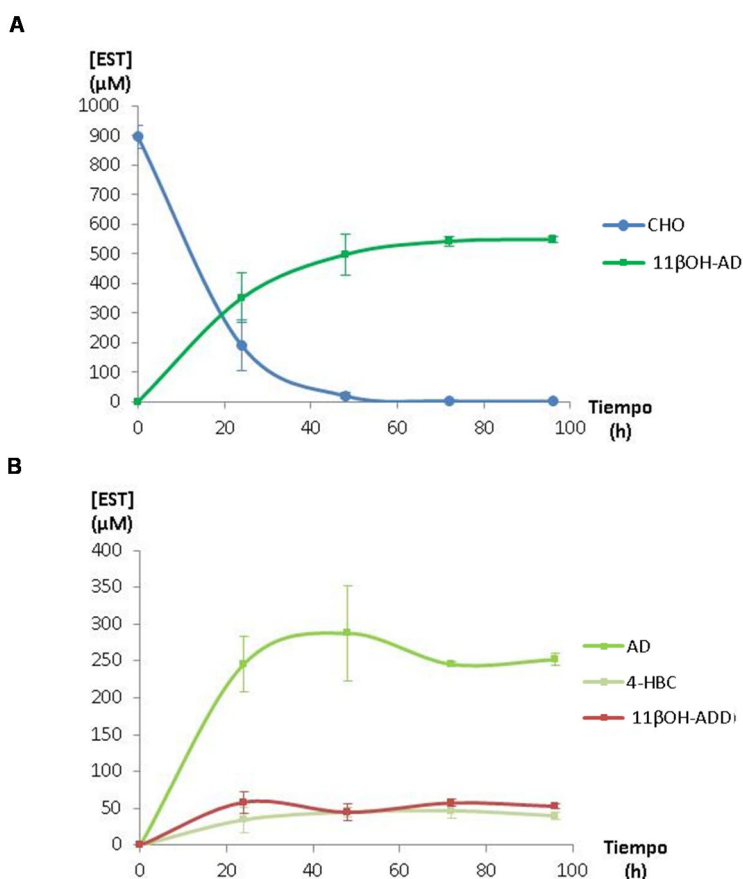


Figura R2.21 Seguimiento de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFAN). A. Consumo de CHO y producción de 11 β OH-AD. B. Producción de subproductos relevantes.

A pesar de que la biotransformación se llevó a cabo durante 96 h, como puede observarse (Fig. R2.21), los mismos resultados habían sido alcanzados a las 72 h al igual que ocurría con la transformación homóloga llevada a cabo por la cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFAN) y las llevadas a cabo por las cepas *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN) y *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN); por lo que el tiempo de biotransformación puede reducirse en, al menos, 24 h.

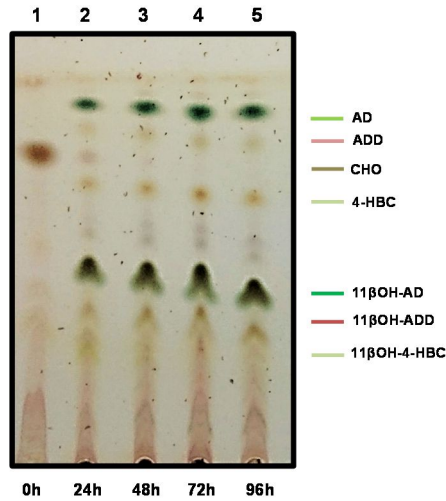


Figura R2.22 Análisis mediante TLC de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* Δ6039Δ5941 (pMVFAN) a diferentes tiempos.

Resulta importante destacar que no han sido tenidos en cuenta en la cuantificación los compuestos no identificados mediante HPLC-DAD-MS, no obstante se detallan más adelante aquellos compuestos identificados mediante HPLC-DAD-MS, identificados pero no relevantes en términos cuantitativos.

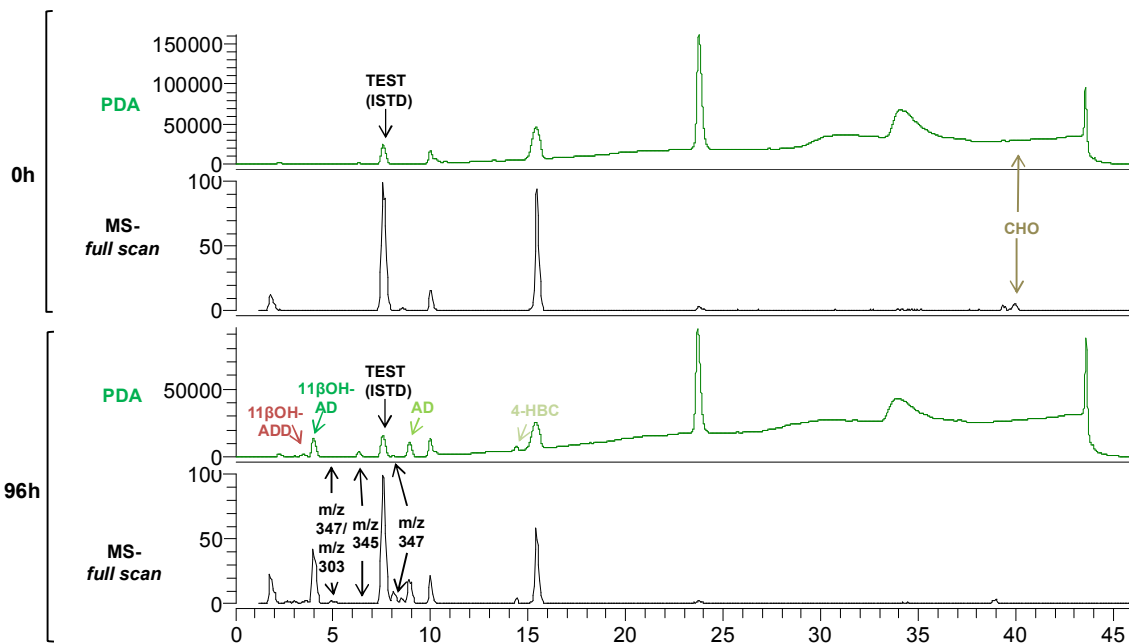


Figura R2.23 Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de CHO en cultivos en crecimiento de *M. smagmatis* Δ6039Δ5941 (pMVFAN). Cromatogramas HPLC registrados en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro) y espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (*full scan*) (línea negra).

Cabe destacar la observación mediante HPLC-DAD-MS de otros compuestos no identificados hasta el momento (Fig. R2.23).

El compuesto no identificado que eluye en el minuto 8.1 y cuya m/z es 347 probablemente sea 11 β OH-4-HBC, basándose en polaridad, m/z característico y el patrón de fragmentación del mismo.

También se identifica otro compuesto de m/z 347 que coeluye a su vez con otro de m/z 303 en el minuto 5.0; el compuesto de m/z 347 probablemente sea 4-HBC hidroxilado en otra posición mientras que el compuesto de m/z 303 probablemente sea AD hidroxilado en otra posición.

También se detecta en el minuto 6.2 un compuesto cuya m/z es 345, probablemente el compuesto 4-HBC hidroxilado en alguna posición diferente a 11 β (ya que el 11 β OH-4-HBC eluiría en el minuto 4); cabe destacar que el pico que se observa en PDA no corresponde únicamente a este compuesto sino que ya está presente en el tiempo inicial y sólo corresponde a este compuesto la diferencia de área de los mismos.

Resulta relevante mencionar que ninguno de éstos compuestos identificados contribuye cuantitativamente en la biotransformación.

A la vista de estos resultados se puede concluir que es factible la producción de 11 β OH-AD a partir de CHO con rendimientos cercanos al 61 %.

b) Producción 11 β OH-AD a partir de fitosteroles

Igual que se comprobó en el apartado anterior que la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFAN) podía producir 11 β OH-ADD, resultaba de especial interés comprobar la potencialidad de usar los fitosteroles como sustrato de partida en las biotransformaciones llevadas a cabo por la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFAN) para producir 11 β OH-AD.

Tal como se puede observar en las curvas de crecimiento de las cepas *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFAN) y *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMV261) la expresión de los genes contenidos en el operón FAN parece levemente afectar al crecimiento en las condiciones ensayadas y al igual que ocurría en los experimentos anteriores se observa una mayor lisis a tiempos finales (Fig. R2.24).

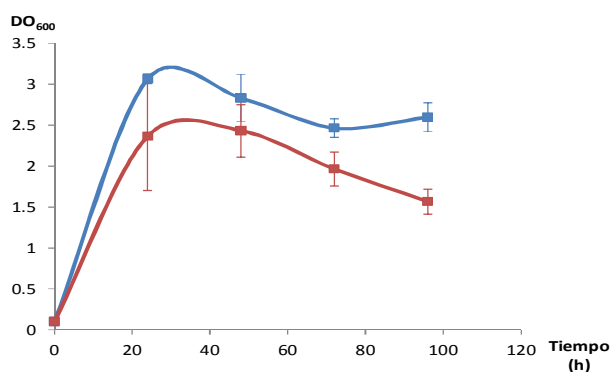


Figura R2.24 Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMV261) (línea azul) y *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFAN) (línea roja) en las condiciones de biotransformación.

La cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFAN) fue capaz de biotransformar FITO en $11\beta\text{OH-AD}$. Se aprecia el consumo de FITO a partir de las 24 h, siendo la conversión del mismo a tiempo final (96 h) (sustrato consumido respecto al sustrato inicial) de $69.3 \pm 2.9 \%$; así como se aprecia también la producción creciente a partir de las 48 h $11\beta\text{OH-AD}$ hasta el tiempo final (96 h), con un rendimiento de producción respecto a FITO (producto $11\beta\text{OH-AD}$ producido respecto al sustrato FITO consumido, $\phi_{11\beta\text{OH-AD}/\text{FITO}}$) de $65.1 \pm 2.2 \%$ Fig. R2.25, Fig. R2.26 y Fig. R2.27).

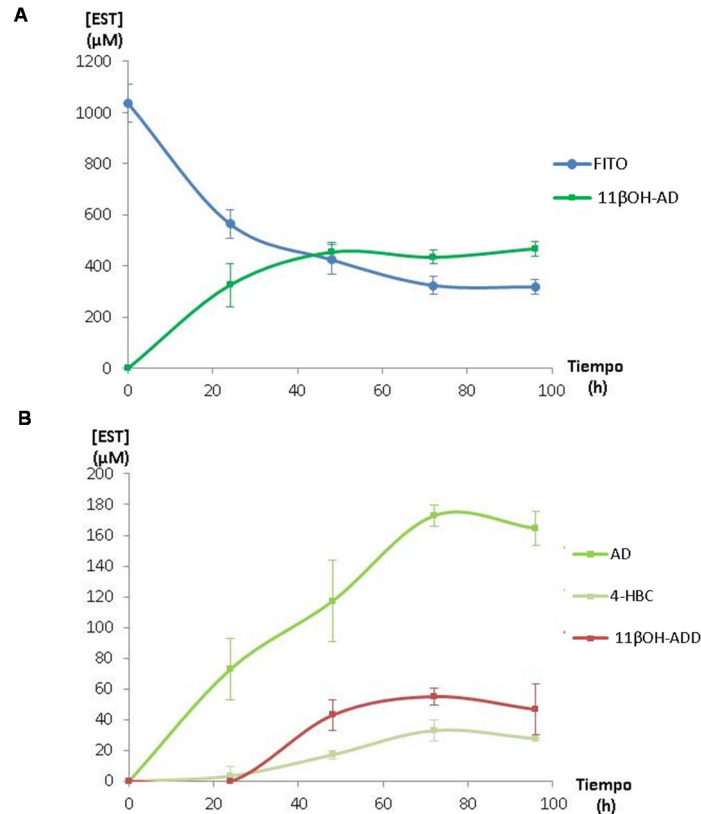


Figura R2.25 Seguimiento de la biotransformación de FITO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFAN). A. Consumo de FITO y producción de $11\beta\text{OH-AD}$. B. Producción de subproductos relevantes.

Es notable la aparición de otros subproductos, identificados mediante TLC (Fig. R2.26) y HPLC-DAD-MS (Fig. R2.27), siendo el más representado AD ($\phi_{\text{AD}/\text{CHO}} = 23.0 \pm 2.5 \%$, $11\beta\text{OH-ADD}$ ($\phi_{11\beta\text{OH-ADD}/\text{CHO}} = 6.5 \pm 2.0 \%$) y 4-HBC ($\phi_{\text{AD}/\text{CHO}} = 3.9 \pm 0.1 \%$) (Fig. R2.26 y Fig. R2.27).

La cepa control *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMV261) no tiene la capacidad de producir $11\beta\text{OH-AD}$ (Fig. R1.29), pero si que se observó biotransformación de FITO en AD, donde la conversión fue de $52.7 \pm 12.9 \%$ y el rendimiento del producto AD producido con respecto al sustrato FITO consumido fue de $\phi_{\text{AD}/\text{FITO}} = 77.6 \pm 0.2 \%$; observándose también una cantidad significativa de 4-HBC.

El sumatorio de los rendimientos es de $98.4 \pm 0.2 \%$, por lo que no se cierra balance totalmente; así mismo la suma de las concentraciones molares de los productos es similar a la concentración molar empleada como sustrato, pero menor. Tal como se ha explicado en cada

ocasión, podría deberse a errores de cuantificación debido a las dificultades propias del trabajo con fitosteroles y la cuantificación de los mismos debido a que se trata de una mezcla de esteroides (por lo tanto la concentración molar es una estimación basada en el peso molecular de sus componentes y de la proporción de los mismos) y bajísima solubilidad; aunque no hay que descartar la existencia de subproductos que no se estén considerando al no ser detectados con los métodos cromatográficos empleados.

Al contrario de lo que ocurre con la biotransformación empleando como sustrato CHO, pero al igual que ocurre con la biotransformación empleando como sustrato FITO con la cepa *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFAN), la conversión de FITO no fue total a tiempos finales (96 h) (Fig. R2.25, Fig. R2.26 y Fig. R2.27); la producción del producto de interés parece ser creciente aun, sin haber llegado a un máximo; por lo que quizás sería adecuado extender el tiempo del ensayo para conseguir mejores valores de conversión de los fitosteroles, así como mejores rendimientos.

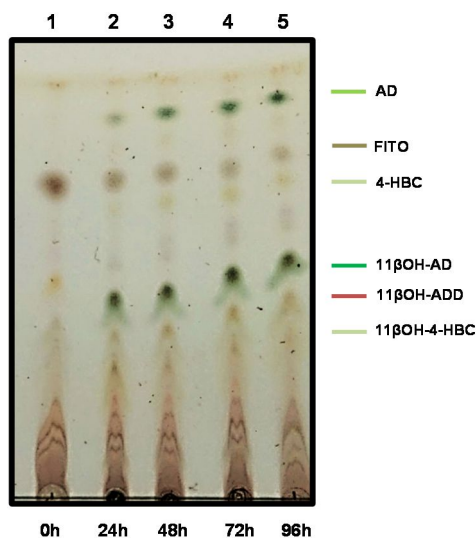


Figura R2.26 Análisis mediante TLC de la biotransformación de FITO en cultivos en crecimiento de *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFAN) a distintos tiempos (0 a 96 h).

Además de los compuestos mencionados previamente en ese apartado, también son detectados mediante HPLC-DAD-MS los compuestos ya identificados en el ensayo homólogo empleando CHO como sustrato; hallándose los compuestos de m/z 347 que eluyen en el minuto 5 y 8.1.

No se observa acumulación de otros subproductos o intermediarios diferentes a los descritos anteriormente.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores puede concluirse que es factible la obtención 11 β OH-AD a partir de fitosteroles con rendimientos cercanos al 65 %.

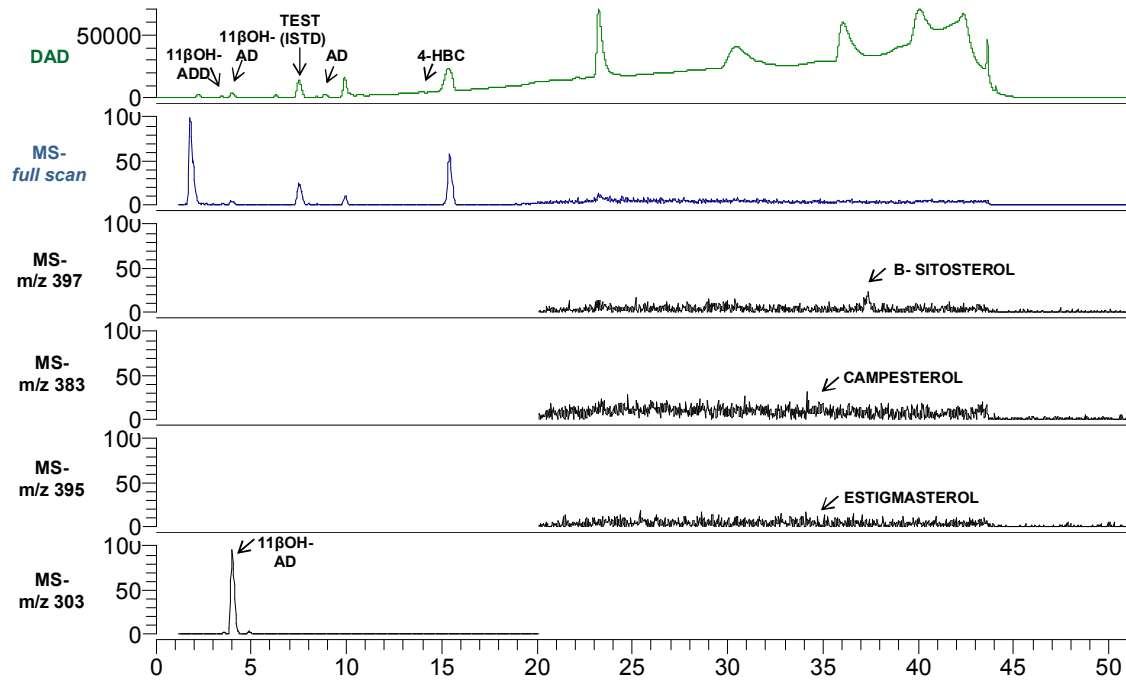


Figura R2.27 Análisis mediante HPLC-DAD-MS de la biotransformación de FITO en cultivos en crecimiento de *M. smagmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFAN) a tiempo final. Cromatograma HPLC registrado en DAD (50-600 nm) (línea verde oscuro) y espectros de masas obtenidos de los iones de m/z entre 150-400 (*full scan*) (línea azul) y de los iones característicos –indicados en cada caso– de los compuestos significativos (líneas negras).

VII. Discusión

Tal como se ha detallado en la Introducción (Sección 2.4), actualmente la producción de esteroides hidroxilados mediante biotransformación se lleva a cabo utilizando distinto tipo de microorganismos, fundamentalmente diferentes hongos. En el caso concreto de la 11 α -hidroxilación se utilizan *A. nigricans* o *R. oryzae* y para la 11 β -hidroxilación *C. lunatus*. Aunque estas biotransformaciones son bastante eficientes, ahora sabemos tanto por lo que ya se conocía, como por los resultados de los experimentos realizados en esta Tesis (Resultados, Apartado 1, Sección 1; Resultados, Apartado 2, Sección 1), que en dichas biotransformaciones, además del producto de interés se producen en alta proporción otros subproductos. Teniendo en cuenta la relevancia de este problema, resulta sorprendente el hecho de que existan muy pocos trabajos para la mejora genética de estos biocatalizadores. Una de las razones que explica esta carencia de trabajos de mejora es que solo en unos pocos casos se conoce el sistema enzimático responsable de estos procesos. Este es el caso del sistema de 11 α -hidroxilación CYP509C12-RoCPR1 de *R. oryzae* (Petric *et al.*, 2010). Sin embargo en otros, como es el caso de *C. lunatus* que nos ocupa en esta Tesis, no se conocía el sistema de 11 β -hidroxilación.

Teniendo en consideración la dificultad y la utilidad de producir esteroides 11-hidroxilados sin la aparición de subproductos que hacen descender los rendimientos de producción y dificultan la recuperación del producto, en esta Tesis nos propusimos explorar la posibilidad de transferir los sistemas responsables de este tipo de hidroxilación a hospedadores heterólogos bioquímicamente más limpios en el sentido de que no puedan llevar a cabo modificaciones indeseadas del esteroide durante el proceso de biotransformación.

1. PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11 α -HIDROXILADOS

1.1. PRODUCCIÓN DE 11 α OH-ADD Y 11 α OH-AD A PARTIR DE ESTEROLES EN UN SOLO PASO.

Como ya se ha comentado en la Introducción, existen bacterias mutantes en algunos genes de la ruta de degradación de esteroides capaces de acumular sintonas esteroídicas de interés industrial como el AD o el ADD.

Una de estas bacterias es el mutante *M. smegmatis* Δ 6039, una cepa generada por delección del gen *MSMEG_6039* (*kshB*), capaz de llevar a cabo la degradación parcial de colesterol -o fitosteroides- hasta la producción de ADD, ya que no puede continuar la ruta de degradación debido a que la delección de este gen elimina la actividad hidroxilasa en posición C9 necesaria para producir 9OH-ADD o 9OH-AD (ES P201430272, WO2015128534A1; Galán *et al.*, artículo en preparación).

Por otro lado, la cepa doble mutante *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 generada por delección de los genes *MSMEG_6039* (*kshB*) y *MSMEG_5941* (*kstD1*), es capaz de llevar a cabo la degradación parcial de colesterol -o fitosteroides- hasta la producción de AD, ya que la delección del gen *kstD1* no le permite transformar el AD en ADD y la delección del gen *kshB* no le

permite producir 9OH-AD a partir de AD (ES P201430272; WO2015128534A1; Galán *et al.*, artículo en preparación).

Tal como se ha comentado al principio de este apartado, ya se conocía el sistema CYP509C12-RoCPR1 responsable de la actividad 11 α -hidroxilasa en *R. oryzae* (Petric *et al.*, 2010; EP2308983; WO2011042143A1).

Con todas estas premisas se planteó una hipótesis de trabajo que asumía que transfiriendo este sistema de hidroxilación del hongo a las cepas mutantes *M. smegmatis* Δ 6039 (productora de ADD) y *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (productora de AD) se podría desviar la ruta de degradación de los esteroides para producir directamente en cultivo 11 α OH-ADD y 11 α OH-AD, respectivamente.

Aunque ya se había realizado antes el clonaje del sistema de hidroxilación de *R. oryzae* en levaduras (Petric *et al.*, 2010) no era evidente que el sistema de hidroxilación del hongo pudiese funcionar en un organismo procariota. Incluso en caso de que lo hiciese, era poco probable que se pudieran producir actividades y rendimientos más altos que en un sistema eucariota como la levadura. Más aún era difícil que pudiese encajar el sistema CYP-CPR en la ruta de degradación bacteriana de los esteroides, ya que se podrían producir muchas interferencias en la ruta -en forma de intermediarios no deseados- que ocasionaran su bloqueo.

A pesar de todos estos posibles inconvenientes, en este trabajo se ha conseguido demostrar que el sistema CYP-CPR de *R. oryzae* es funcional *in vivo* en *M. smegmatis* permitiendo producir derivados hidroxilados esteroideos como 11 α OH-ADD y 11 α OH-AD a partir de materias primas de bajo coste como colesterol y fitosteroides.

Para conseguir acoplar en la bacteria la expresión del citocromo y la proteína citocromo-reductasa del sistema de hidroxilación de *R. oryzae* se ha construido un operón sintético al que hemos denominado FUN (RoCPR1-CYP509C12). Aunque el sistema funciona se ha observado que la expresión del operón FUN afecta el crecimiento de la célula en las condiciones de biotransformación. Las cepas *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN) y *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN) presentan una tasa de crecimiento menor con respecto a las cepas control sin el operón pero con el plásmido vacío (Apartado 1 de Resultados, Secciones 1.2.2.3.1 y 1.2.2.3.2). En cualquier caso estas cepas recombinantes llegan a alcanzar densidades ópticas muy semejantes a las del control pero con mucho retraso. Cabe destacar que el efecto negativo sobre el crecimiento disminuye hasta casi desaparecer cuando se suprime el ALA (ácido δ -aminolevulínico, precursor de grupo hemo) en el medio de cultivo. Esta observación sugiere que el operón FUN resulta tóxico cuando se expresa y el citocromo se carga de grupo hemo correctamente, es decir cuando es funcional.

Esta toxicidad podría deberse: i) a la hiperproducción de las proteínas en sí mismas, aunque esto no parece muy probable, ya que todo indica que aun expresando las proteínas cuando el citocromo no es funcional por la carencia de hemo (sin adición de ALA), no resulta tóxico; ii) a

la acumulación de los productos hidroxilados que se forman en la biotransformación; iii) a la producción de especies reactivas de oxígeno por acción del sistema redox acoplado a la citocromo reductasa; iv) a un desequilibrio del sistema redox por consumo excesivo de agentes reductores.

Es importante destacar también que la cepa productora de 11 α OH-AD, *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN), presenta mayor afectación en el crecimiento, lo que podría relacionarse con una mayor producción de 11 α OH-AD frente a la producción de 11 α OH-ADD por la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN)-, y por lo tanto por un mayor estrés metabólico, aun en ausencia de ALA, como se detallará más adelante. De todas formas no se puede descartar que el 11 α OH-AD sea más tóxico que el 11 α OH-ADD. Tampoco se puede descartar que el mutante productor de ADD sea menos sensible a los cambios redox, ya que tiene una enzima redox funcional más (KstD1) con respecto al mutante productor de AD.

Resulta de interés destacar comparativamente las diferencias en producción, tanto del producto hidroxilado de interés, como de otros subproductos, en ambas cepas y en las condiciones ensayadas.

De los datos de producción pueden extraerse varias conclusiones, una de ellas es que en las biotransformaciones realizadas por la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN) se obtiene un 8 % más de producto 11 α -hidroxilado que en las llevadas a cabo por la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN); además el rendimiento del producto 11 α -hidroxilado con respecto a la biomasa en el caso de las biotransformaciones realizadas por la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN) productora de 11 α OH-AD es del doble que en las biotransformaciones realizadas por la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN) productora de 11 α OH-ADD. Las razones que podrían explicar esta diferencia de rendimientos no son evidentes y pueden estar relacionadas tanto con el metabolismo del AD y ADD en estas cepas, como con la especificidad del citocromo sobre estos compuestos. También se puede concluir que el hecho de añadir sangre al cultivo como fuente de hemo en sustitución del precursor ALA no parece mejorar la producción del derivado hidroxilado. Sorprendentemente el hecho de eliminar el ALA no afecta a la producción de 11 α OH-AD, pero sí a la de 11 α OH-ADD. Esto podría indicar que el AD es mejor sustrato que el ADD para el CYP509C12 y que por lo tanto se necesita un citocromo más activo (en mayor cantidad) para la hidroxilación del ADD. Esto se conseguiría gracias al suplemento en la producción del grupo hemo. Este fenómeno también se observó en la producción de 11 α OH-AD y 11 α OH-ADD a partir de sus precursores AD y ADD empleando *C. glutamicum* (pXKFUN).

Parece evidente que el grupo hemo presente en la sangre adicionada al cultivo durante el proceso de producción no es capaz de sustituir completamente al ALA. Aunque en la producción de 11 α OH-ADD se observa una mejora del 2 % de la hidroxilación con respecto al cultivo control sin ALA, para la correcta interpretación de los resultados debe considerarse que la sangre aporta nutrientes que favorecen el crecimiento y por lo tanto aumentan la biomasa final obtenida –por lo que los cálculos de los rendimientos de producto con respecto a la

biomasa aparecen disminuidos- y alteran las condiciones fisiológicas de la célula durante la producción. Por lo tanto, aunque la mejora en producción sea sólo del 2 % es significativa y más notable cuando se tiene en cuenta la diferencia del rendimiento de producto con respecto a la biomasa, es de 5 mg/mg. Aun con ser positivos estos datos, teniendo en cuenta la complejidad de la sangre y la gran cantidad de productos que contiene, no se puede concluir que la mejora proceda del aporte del grupo hemo a menos que se pudiese realizar un ensayo con sangre desprovista de hemo.

Aunque estas diferencias son pequeñas, teniendo en cuenta que la adición de ALA si representa una mejora –al menos en la producción de 11 α OH-ADD- podría pensarse que la adición de sangre no produce el efecto deseado porque el grupo hemo no se transporta adecuadamente. Sin embargo, esta presunción parece poco probable según los estudios llevados a cabo por Tullius y colaboradores (2011) en los que se describen las proteínas de membrana y el hemóforo que capacitan a *M. tuberculosis* para el uso del hemo libre y del hemo de la hemoglobina como fuente de hierro. Es cierto que en *M. smegmatis* no ha sido caracterizado hasta la fecha ningún sistema de transporte del grupo hemo libre o ruta alternativa, pero se asume que se trata de un sistema presente en micobacterias, ya que el mutante de delección de *M. smegmatis* en la zona homóloga a la región en la que se encuentran los genes *Rv_0203* (hemóforo), *Rv_0202c* (MmpL11) y *Rv_0206c* (MmpL3) de *M. tuberculosis* pierde la capacidad de crecer en medio mínimo sin más aporte de hierro que el grupo hemo, siendo restaurada dicha capacidad al ser complementado en *trans* con los genes *Rv_0203*, *Rv_0202c* y *Rv_0206c* de *M. tuberculosis* (Tullius *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta esta observación podría pensarse que la sangre debería aportar el hemo equivalente al que aporta el ALA, y por tanto en estos momentos se desconoce el motivo por el cual el aporte de sangre no sea capaz de sustituir al ALA.

Por otro lado resulta de especial relevancia comentar que la presencia del sistema de hidroxilación parece afectar la acumulación de los intermediarios 1,4-HBC y 4-HBC de la ruta de degradación de los esteroides. Se ha demostrado que, tanto empleando CHO como FITO como sustrato, la cantidad de los subproductos 1,4-HBC (en el caso de la producción de 11 α OH-ADD) y 4-HBC (en el caso de la producción de 11 α OH-AD) observados en las cepas recombinantes *M. smegmatis* Δ 6039 y *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 portadoras del plásmido pXKFUN, son notablemente menores que en las cepas empleadas como control, *i.e.*, *M. smegmatis* Δ 6039 (pMV261) y *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMV261).

Una explicación de este resultado podría ser que la menor presencia de estos compuestos sea debida a que dichos compuestos han sido hidroxilados en posición 11 α en estas cepas. Si bien es cierto que esto ocurre y se hidroxilan, la suma de las cantidades de 11 α OH-1,4-HBC y 1,4-HBC (en el caso de la producción de 11 α OH-ADD), como las de 11 α OH-4-HBC y 4-HBC (en el caso de la producción de 11 α OH-AD) son notablemente menores a las de 1,4-HBC y 4-HBC de las correspondientes cepas control.

Los subproductos 1,4-HBC y 4-HBC se generan como consecuencia de una ruta alternativa a partir de los intermediarios 22HOB-CN-CoA y OBNC22-CoA (Fig. D1) (Xu *et al.*, 2016). Para comprender por qué el flujo metabólico se desvía hacia la producción de estos compuestos y no sigue la ruta habitual de degradación de CHO, es preciso tener en cuenta que en las cepas mutantes *M. smegmatis* $\Delta 6039$ (pMVFUN) y *M. smegmatis* $\Delta 6039\Delta 5941$ (pMVFUN) se produce una acumulación de los productos intermedios ADD y AD, respectivamente. Esta acumulación de intermediarios podría causar una retroinhibición de las enzimas Ltp2, ChsH o ChsE. En este sentido lo más probable es que se inhiba la enzima Ltp2 (liasa), lo que impide la liberación del último propionil-CoA de la cadena lateral del esteroil. El reciclaje del CoA utilizado en estas reacciones de degradación de la cadena lateral del esteroil resulta de vital importancia para la célula, ya que la síntesis de CoA es energéticamente muy costosa. Esto unido a la más que posible inducción de tioesterasas inespecíficas (como las que catalizan la producción de OBNC20CA), explicaría que finalmente se liberen 4-HBC y 1,4-HBC, ya que de esta manera se libera el CoA. Cuando las cepas portan la ruta FUN, que transforma el AD en su derivado 11 α -hidroxilado podría disminuir el efecto de retroinhibición sobre Ltp2 y por tanto disminuir la formación de 4-HBC y 1,4-HBC.

Tal como se ha comentado, los fitosteroles son el sustrato de más bajo coste empleado en la industria de esteroides, ya que en estos momentos por razones regulatorias no se contempla el uso del colesterol. En el presente trabajo también se han conseguido producir las sintonas 11 α OH-ADD y 11 α OH-AD empleando FITO como sustrato. Es cierto que los rendimientos son menores que con CHO pero también es verdad que las condiciones de biotransformación de los FITO son más complejas que las del CHO por tratarse de una mezcla de sustratos más insolubles y porque no son todos ellos degradados con la misma eficacia por *M. smegmatis*. Las mejoras del metabolismo de degradación de fitosteroles en esta bacteria sin duda contribuirían a mejorar los rendimientos de producción de los compuestos hidroxilados a partir de este sustrato natural.

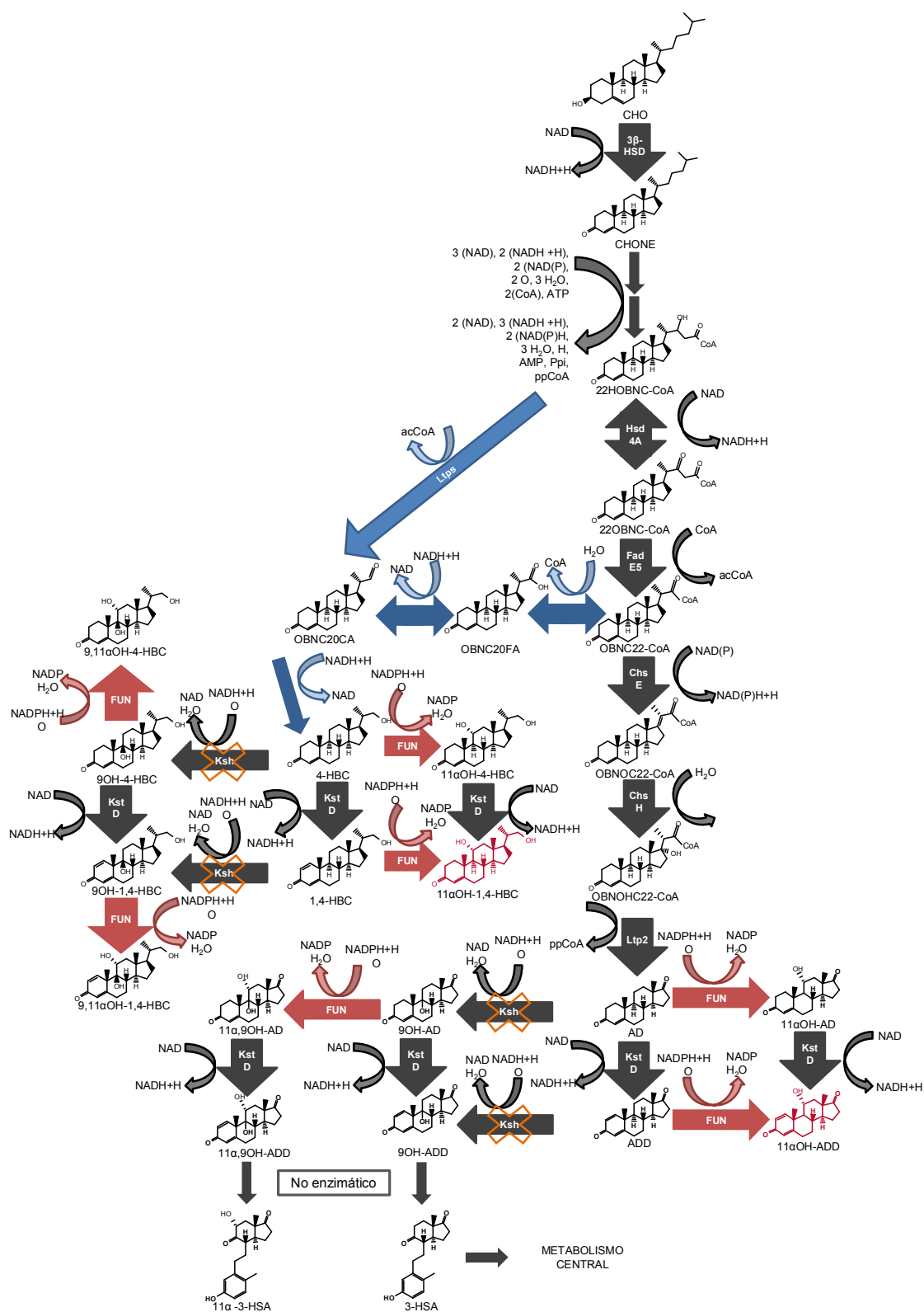
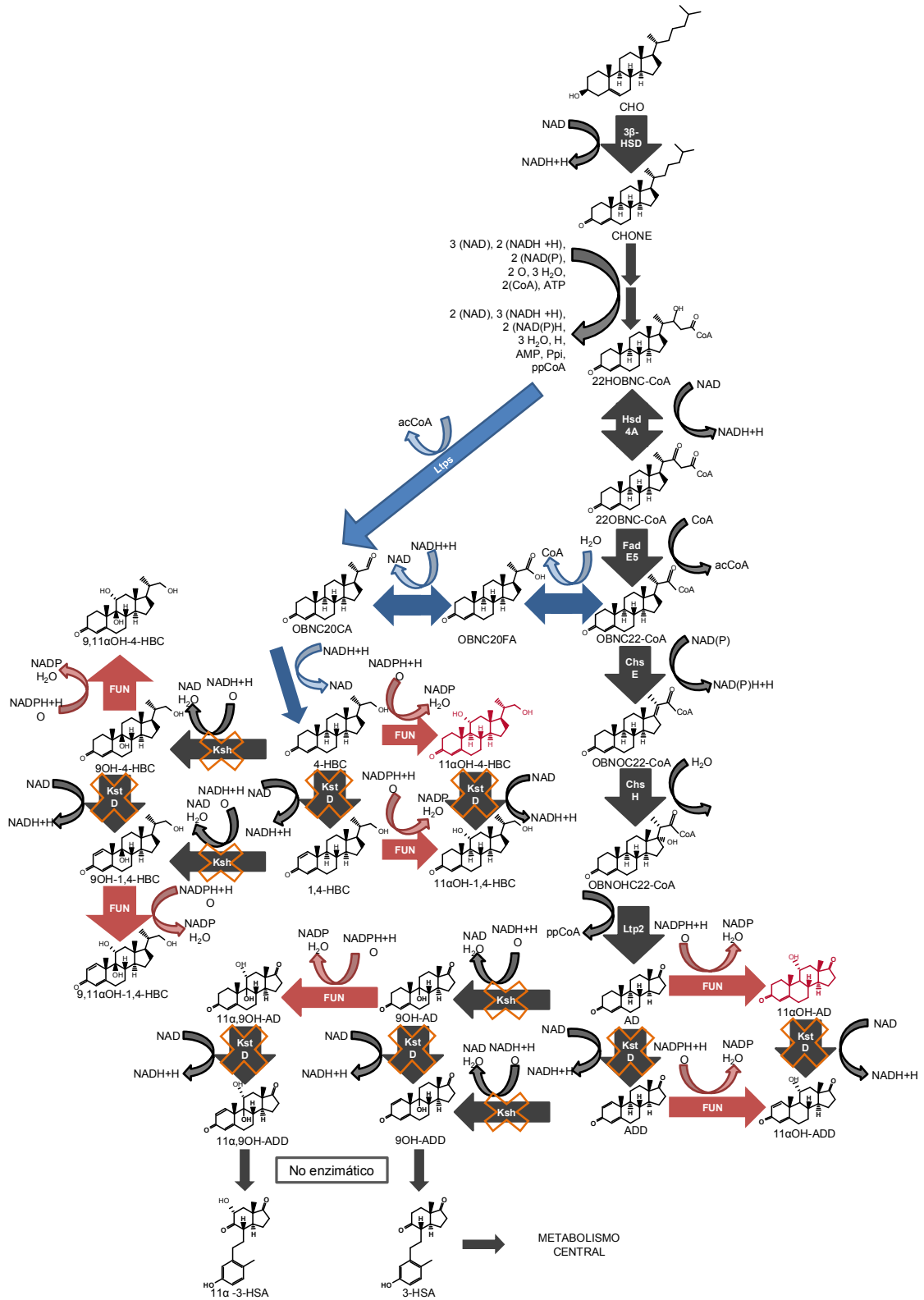


Figura D1 Ruta de producción de 11 α OH-AD(D) desde CHO. Las flechas consecutivas indican un proceso multienzimático. Las aspas naranjas sobre las enzimas KstD y Ksh indican la eliminación de las mismas por deletación de los genes *kstD1* (*MSMEG_5941*) y *kshB* (*MSMEG_6039*). Se marca en azul la ruta propuesta por la que se acumulan los intermediarios 4-HBC y 1,4-HBC. Se marca en rojo la ruta heteróloga FUN y sus productos. **A. 11 α OH-ADD.**

Discusión



Discusión

Figura D1 B. 11αOH-AD

1.2. OBTENCIÓN DE ESTEROIDES 11 α -HIDROXILADOS DE INTERÉS FARMACOLÓGICO E INDUSTRIAL A PARTIR DE SUS PRECURSORES DIRECTOS

La producción de sintonas 11 α -hidroxiladas como el 11 α OH-AD y 11 α OH-ADD a partir de materias primas de bajo coste resulta de un gran interés para la industria esteroidea; sin embargo resulta también de gran interés obtener otros esteroides 11 α -hidroxilados de uso farmacológico a partir de sus precursores directos.

De acuerdo con los experimentos realizados de biotransformación que parten del sustrato que se quiere hidroxilar con las cepas *M. smegmatis* (pMVFUN) y *M. smegmatis* (pMV261) (Resultados, Apartado 1, Sección 1.2.2.4), se puede concluir que *M. smegmatis* no es un buen chasis para este tipo de biotransformaciones, ya que, aunque esta bacteria no es capaz de utilizar como fuente de carbono algunos de estos compuestos esteroideos como pregnanos, progestanos y androstanos, si es capaz de llevar a cabo modificaciones indeseadas sobre ellos, haciendo descender drásticamente los rendimientos del proceso de hidroxilación. De hecho, con estos recombinantes se obtienen peores resultados que cuando se emplea el hongo *R. oryzae* para llevar a cabo la hidroxilación. Es evidente que si se quiere mejorar *Mycobacterium* como chasis será necesario identificar y eliminar todas estas actividades secundarias, lo cual es factible pero probablemente será tedioso y complejo debido a la redundancia de actividades observada en este organismo (Uhía *et al.*, 2012).

Una vez descartado *M. smegmatis* como chasis, se decidió emplear *C. glutamicum*, ya que se trata de un microorganismo sin metabolismo endógeno de degradación de esteroides y con un gran potencial biotecnológico como chasis para la expresión de genes heterólogos útiles para la biotransformación de esteroides (Tesis Doctoral García-Fernández, 2015; García-Fernández *et al.*, artículo en preparación). *C. glutamicum* (pXKFUN), es decir, el recombinante portador del operón FUN de *R. oryzae*, ha sido capaz de llevar a cabo la hidroxilación sobre todos los sustratos probados, i.e., progesterona (PROG), deoxicorticosterona (DOC), testosterona (TEST), deshidroepiandrosterona (DHEA), AD y ADD, aunque con diferente éxito. Realizando una comparativa de las conversiones de los sustratos empleados en este estudio (Fig. D2.A), se puede observar que existe mucha variabilidad. Es preciso destacar que estos ensayos fueron realizados con células en crecimiento y por lo tanto es probable que las diferencias en conversión se deban, al menos en gran medida, a las diferencias en los crecimientos, así como probablemente también se deban a las diferencias en el transporte de los esteroides empleados.

Según se ha podido observar en los experimentos realizados, diferentes esteroides pueden afectar de diferente manera al crecimiento. Esto podría explicarse teniendo en cuenta la polaridad de los esteroides, ya que podrían afectar de manera diferente a la membrana de la bacteria. Es destacable la toxicidad debida a la presencia de DHEA. En principio la diferencia más notable de este compuesto con respecto al resto de los esteroides empleados es que se trata de un esteroide, esto es, tiene un grupo alcohol en posición 3 β , aunque se desconoce cómo podría afectar esto a la célula.

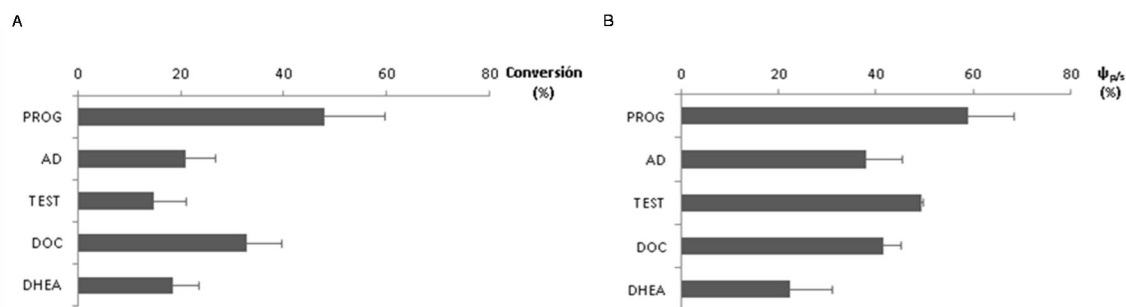


Figura D2 Conversiones (A) y rendimientos (B) de las biotransformaciones realizadas por *C. glutamicum* (pXKFUN).

De forma general, con todos los esteroides ensayados y como prueba de concepto, se ha conseguido demostrar que es posible emplear *C. glutamicum* como chasis para la expresión del operón FUN, sin embargo los valores de conversión aún son bajos.

En este sentido es preciso recordar que el uso de codones no estaba optimizado para *Corynebacterium* y que además el RBS empleado en la construcción es adecuado para *M. smegmatis*, pero no así para *C. glutamicum*. Teniendo esto en consideración se podría explicar que exista una producción baja de las proteínas recombinantes (no se observan bandas mediante SDS-PAGE). Por este motivo resultarían lógicos los bajos valores de conversión y podría esperarse que actuando sobre la mejora de la expresión podrían lograrse mejores resultados.

En cualquier caso, con la intención de mejorar los valores de conversión, se llevaron a cabo experimentos con células en reposo en lugar de células en cultivo, empleándose por tanto cantidades de células mucho mayores. De esta manera se consiguieron unos valores de conversión cercanos al 100 % (Apartado 1 de Resultados, Sección 1.2.3.3).

Realizando una comparación de los rendimientos de producto con respecto a los sustratos consumidos (Fig. D2.B) se puede observar que se mantienen estables en los diferentes esteroides, a excepción del DHEA, cuyo rendimiento es menor.

Tal como ya se ha explicado en el Apartado 1 de Resultados, Sección 1.2.3.3 es posible que estos rendimientos estén infravalorados y sean sensiblemente mayores a los calculados debido al proceso de extracción. Los experimentos en los que se realizó una extracción del esteroide incluyendo una rotura mecánica de las células permitieron comprobar que parte del sustrato permanecía en el interior celular, así como una pequeña cantidad del producto, alterando los cálculos del rendimiento. En realidad se consumió menos PROG de la calculada, ya que estaba en el interior celular, pero se observa prácticamente la misma cantidad de producto, por lo que el rendimiento es mayor que el inicialmente calculado.

Los rendimientos alcanzados, aun con esta corrección serían menores a los esperados, lo que se podría explicar por la aparición de subproductos. Los subproductos encontrados no se forman por la acción de ninguna actividad enzimática presente en *C. glutamicum*, sino que es

el propio CYP el que posee la capacidad de hidroxilar en varias posiciones (Petric *et al.*, 2010) y además es capaz de convertir el grupo alcohol a grupo ceto, nada raro en citocromos.

En los casos estudiados se observa producción de otros subproductos, además del 11 α -hidroxilado de interés, salvo en los casos de AD, ADD y en el caso de TEST, (donde sólo se observa la forma ceto del mismo, pero ningún producto hidroxilado). Si bien es cierto que podrían no observarse por defectos de identificación y/o separación en los métodos cromatográficos empleados, así como por encontrarse en muy baja concentración; es curioso que el AD y el ADD, junto con TEST, sean los únicos sustratos empleados que no tienen cadena lateral.

En el caso de TEST solo han sido detectados el producto 11 α -hidroxilado (al igual que ocurre con el AD y ADD, pero no con el resto de los sustratos ensayados) y la forma ceto del mismo. Sin embargo, teniendo en cuenta el método cromatográfico es posible que los compuestos dihidroxilados, así como las formas ceto de los mismos, hayan eluido con el frente cromatográfico.

El que los citocromos hidroxilen esteroides regio y estereo-específicamente dependiendo de la cadena lateral del sustrato es un hecho establecido hace tiempo (Jones, 1973); por lo que podría pensarse que, en el caso del CYP509C12, el hecho de no tener cadena lateral favorece de alguna manera la hidroxilación única en posición 11 α .

En el caso de PROG y DOC se observan los productos 11 α -hidroxilados, pero también otro producto dihidroxilado. Como ya se ha mencionado en el Apartado 1 de Resultados, Sección 1.2.3.3, teniendo en cuenta datos previos (Petric *et al.*, 2010), es lógico pensar que se trate de los productos 6 β ,11 α -dihidroxilado, siendo la primera vez que se describe la capacidad de obtener compuestos dihidroxilados empleando este sistema RoCPR1-CYP509C12. Es preciso matizar que no se detecta el producto 6 β -hidroxilado (más polar que el producto 11 α -hidroxilado), por lo que además se puede deducir que se trata de una reacción secuencial.

También se han identificado las formas ceto de los compuestos dihidroxilados, así como del 11 α OH-DOC; actividad común en los citocromos, pero nunca antes descrita en el sistema RoCPR1-CYP509C12.

En el caso del DHEA sólo ha sido detectado el producto 11 α -hidroxilado, sin embargo, ya en TLC, se diferencian 2 productos, por lo que también se puede afirmar que lleva a cabo hidroxilaciones en otras posiciones, ya sea un producto hidroxilado en otra posición o dihidroxilado.

A la luz de los resultados obtenidos, y a pesar de encontrarse algunos subproductos no deseados, el procedimiento descrito con *Corynebacterium* presenta una mejora sustancial frente al empleo del hongo, ya que éste, además de presentar las mismas actividades múltiples

del citocromo en cuestión, posee otras actividades de modificación de esteroides capaces de actuar sobre el sustrato, el producto o sobre ambos.

Como ya se ha explicado, el procedimiento descrito con *Mycobacterium* permite la producción de 11 α -hidroxisintonas a partir de materias primas de bajo coste, como los fitosteroles; sin embargo transferir estas capacidades a otros hospedadores sin metabolismo endógeno de degradación de esteroides -como *Corynebacterium*- para evitar así la acumulación de subproductos, supondría un gran hito para la producción de esteroides. Sin duda, la mayor limitación se encuentra en transferir el sistema de transporte de esteroides, por lo que una aproximación factible, aunque tediosa, es eliminar las actividades enzimáticas que afectan a la modificación de productos o intermediarios. Aun con estas limitaciones, los rendimientos obtenidos son aceptables y demuestran por primera vez que es posible la producción directa de 11 α -hidroxisintonas a partir de fitosteroles.

Son muchas las cosas que se pueden y deben mejorar en el procedimiento pero sin duda constituye una ventaja sustancial el hecho de que la expresión en bacterias del sistema CYP-CPR permita el empleo de múltiples técnicas para la mejora genética y enzimática mediante, por ejemplo, mutagénesis o evolución dirigida más difíciles de realizar en el hongo productor.

Aunque el sistema CYP509C12-RoCPR1 de *R. oryzae* ya había sido expresado en levaduras (Petric *et al.*, 2010) nada se había descrito sobre su expresión en bacterias. En biotecnología, las bacterias son sistemas normalmente elegibles para la producción de proteínas y metabolitos por: i) permitir biotransformaciones más rápidas y económicas; ii) el amplio conocimiento sobre su cultivo; iii) las numerosas herramientas para su manipulación genética. Pero no es menos cierto que existe un amplio conocimiento sobre el crecimiento de levaduras, así como bastantes herramientas genéticas para su manipulación. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae* es incluso posible expresar heterológamente proteínas o rutas metabólicas empleando plásmidos. Por todo ello podría pensarse que transferir este sistema a bacterias no reporta ventajas, sin embargo deben tenerse en cuenta otras consideraciones.

En el caso concreto de la producción de esteroides por biotransformación, los organismos empleados por excelencia son las actinobacterias (Donova y Egorova, 2012). Son muy pocos los estudios en los que se han empleado levaduras para la expresión heteróloga de rutas (citocromos) para la biotransformación de esteroides, no así para otros usos como el estudio de degradación de xenobióticos (Dumas *et al.*, 2006). Existen trabajos de gran relevancia en la biotransformación de esteroides empleando levaduras, como el realizado por Szczebara y colaboradores (2003), sin embargo como los propios autores indican, la expresión heteróloga de rutas para la biotransformación de esteroides resulta muy complicada por varios factores: i) la dificultad de equilibrar el flujo metabólico de las rutas heterólogas, ii) la formación inesperada de subproductos que bloquean la ruta, iii) la modificación de intermediarios por actividades no previstas de la levadura, iv) toxicidad de muchos de los esteroides (pregnanos, progestanos y androstanos) para este tipo de organismos.

Tal como destacan Dumas y colaboradores (2006), las levaduras constituyen un excelente sistema para el estudio de rutas eucariotas y resulta posible implementar rutas para la producción de esteroides de alto valor comercial. Sin embargo esto requeriría extensos estudios y por tanto, la limitación para la producción industrial de esteroides empleando levaduras, sería fundamentalmente económica. Además hay que tener en cuenta otras dificultades inherentes al sistema, y en este sentido, se sabe que las levaduras se adaptan con dificultad a los bioprocesos heterólogos de bioconversión (Wang *et al.*, 2011). Más complicado resulta aun cuando hay que eliminar genes para evitar modificaciones indeseadas de los esteroides, lo que debilita a las levaduras y las hace inestables para su uso industrial.

Una de las limitaciones más destacables en las levaduras es que no son capaces de transportar esteroides en aerobiosis (Dumas *et al.*, 2006) y hay que tener en cuenta que los citocromos requieren oxígeno para su funcionamiento. Por eso para la modificación de esteroides no resulta muy útil y hay que recurrir a su síntesis *de novo*. Este es el caso de la solución aportada por Lecain y colaboradores (1996), que utiliza la ruta de biosíntesis del ergosterol y deriva dicha ruta hacia la formación de otros compuestos de interés (Duport *et al.*, 1998), si bien parece que todo ello afecta algunos parámetros fisiológicos de la levadura.

Otra limitación importante en la levadura es que, aunque se conoce muy bien su genoma, es muy difícil predecir las enzimas que podrían actuar modificando los esteroides y por lo tanto es difícil saber que enzima hay que eliminar (Dumas *et al.* 2006; Szczebara *et al.*, 2003). Tampoco es posible predecir con certeza la ubicación de una proteína heteróloga de membrana en los distintos orgánulos subcelulares. Más aún es muy complicado saber cuál es la permeabilidad a los esteroides de estos orgánulos. Podría darse la paradoja de tener una enzima o una ruta enzimática activa dentro de un orgánulo al cual no pudiese acceder el esteroide. Por último está muy poco estudiado el papel y la regulación de los transportadores (tipo ABC) que transportarían los esteroides entre los distintos orgánulos (Dumas *et al.*, 2006).

Frente a estas ventajas y limitaciones del empleo de levaduras recombinantes para la biotransformación de esteroides, resulta interesante contraponer las ventajas de las bacterias. Según Wang y colaboradores (2011), las actinobacterias son plataformas excelentes para la biotransformación de esteroides debido a sus especiales características: i) poseen membranas celulares lipofílicas y han sufrido cambios adaptativos que les permiten la unión a sustratos hidrofóbicos como los esteroides; ii) algunas poseen sistemas de transporte activo para el transporte eficiente de esteroides al interior celular; iii) los esteroides no resultan tóxicos, probablemente debido a bombas de exclusión, lo que además supone una ventaja para la recuperación del producto final; iv) son resistentes a los surfactantes o emulsionantes empleados para el aumento de la biodisponibilidad de esteroides, de hecho algunas bacterias pertenecientes a los géneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium* y *Nocardia* son capaces de excretar biosurfactantes (Perfumo *et al.*, 2010). Sin embargo, su uso también incluye dificultades, ya que en general, las actinobacterias son un poco más difíciles de cultivar que otras bacterias y no se dispone de tantas herramientas para su manipulación genética.

2. PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES 11 β -HIDROXILADOS

Tal como se ha mencionado al principio de este apartado y en Introducción (Sección 2.4), para producir esteroides 11 β -hidroxilados mediante biotransformaciones se ha empleado el hongo *C. lunatus*. Al inicio de esta Tesis Doctoral no se conocía la enzima o enzimas responsables de esta actividad, ni se conocía si las múltiples actividades modificadoras –ya sean de hidroxilación u otras- sobre los esteroides presentes en este hongo, se debían a un único citocromo o a varios. Sin embargo, el interés en localizar esta actividad 11 β -hidroxilasa era claro por la industria esteroidea, ya que la forma 11 β -hidroxilada de muchos corticoides es la forma bioactiva, con importantes propiedades farmacológicas, tal como se ha mencionado ampliamente en la Introducción. Por ello ya había habido algunos intentos para localizar esta enzima, como los trabajos realizados por Berne y colaboradores (2008) utilizando una estrategia basada en la expresión génica diferencial en células del hongo inducidas con esteroide y sin inducir, lo que constituye la aproximación más cercana al trabajo realizado en esta Tesis Doctoral; sin embargo, estos autores no pudieron identificar el gen ya que los genes identificados con mayor expresión después de la inducción no mostraban esta actividad. Otras estrategias basadas en métodos clásicos de aislamiento de proteínas fueron algo más fructíferos ya que consiguieron preparaciones de la fracción microsomal con actividad 11 β -hidroxilasa y consiguieron aislar un citocromo o una mezcla de citocromos con dicha actividad, así como su CPR acompañante (Zuidweg, 1968; Janig *et al.*, 1992). Estos trabajos no tuvieron continuidad y tal como destaca Zuidweg (1968), las actividades hidroxilasa podrían ser debidas a un único citocromo o a varios ya que éstos serían muy semejantes y difícilmente separables mediante metodologías de purificación de proteínas convencionales. A pesar de no haber sido identificado el sistema CYP-CPR con actividad 11 β -hidroxilasa en *C. lunatus*, gracias a los trabajos mencionados anteriormente, se sabía que era un citocromo cuyo peso molecular era aproximadamente 60 kDa.

Aunque sin relación aparente también habían sido descritas dos CPRs en *C. lunatus*: CPR1 y CPR2 (Lah *et al.*, 2008), pero se desconocía si alguna de ellas era el acompañante fisiológico del citocromo con actividad 11 β -hidroxilasa.

Por otro lado, recientemente había sido depositada en las bases de datos la secuenciación del genoma completo de una especie de *C. lunatus* (Gao *et al.*, 2014), de interés no tanto por su implicación en la producción de esteroides sino por ser un importante patógeno de plantas (Camangi, 1989; Lakshmanan, 1993; Louis *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2014), así como un patógeno oportunista de humanos (MacMillan *et al.*, 1987; Yau *et al.*, 1994; Carter y Boudreaux, 2004; Cavanna *et al.*, 2014) pero que también poseía actividad 11 β -hidroxilasa de esteroides (Janig *et al.*, 1992; Vitas *et al.*, 1994).

2.1. IDENTIFICACIÓN DEL SISTEMA CYP-CPR RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD 11 β -HIDROXILASA EN *C. lunatus*

A la vista de estos datos en el presente trabajo, mediante la combinación de análisis bioinformáticos con estudios de expresión génica, ha sido posible identificar el sistema CYP-CPR con actividad 11 β -hidroxilasa de esteroides en *C. lunatus*.

Tal como se ha detallado en el Apartado 2 de resultados, Secciones 2.2.1 y 2.3.1, mediante un análisis bioinformático seguido de un curado manual de los datos, se identificaron en el hongo secuenciado 92 CYPs putativos y 3 posibles CPRs.

Es preciso destacar que hasta la fecha sólo habían sido descritas en *C. lunatus* dos CPRs: CPR1 (CPR64795) y CPR2 (CPR128465) (Lah *et al.*, 2008; Lah *et al.*, 2011), por lo que la tercera enzima, CPR59830 (CPR3), podría no ser activa o no tener actividad reductasa a pesar de tener la estructura característica de las mismas, si bien también podría tratarse de una CPR no descrita hasta la fecha.

La mayoría de los hongos poseen una única CPR, sin embargo han sido varios los ejemplos descritos en los que hongos filamentosos poseen más de una (Kunic *et al.*, 2001; Malonek *et al.*, 2004). La teoría más aceptada es que los hongos filamentosos que poseen una amplia variedad de citocromos, poseen también más de una proteína citocromo-reductasa (Lah *et al.*, 2008); siendo una de estas CPRs esencial y la/s otra/s relacionada/s con metabolismo secundario, ya esté relacionado con estrés biótico, detoxificación, etc (Malonek *et al.*, 2004; Siewers *et al.*, 2004).

Tal como puede observarse en la Fig. D3.A, la CPR1 (CPR64795) posee un alto porcentaje de identidad con otras CPRs de hongos filamentosos (mayor del 70 % en todos los casos, con una cobertura del 97-100 %), por lo que podría afirmarse que se trata de proteínas ortólogas que probablemente deriven de una única CPR ancestral, como ya postularon Lah y colaboradores (2008). Con el tiempo han aparecido otras CPRs parálogas, como la CPR2 (CPR128465) (Lah *et al.*, 2008) que pueden actuar como acompañantes de los citocromos con funciones concretas en situaciones especiales. Tras realizar una comparativa de la CPR3 (CPR59830) con todas aquellas proteínas fúngicas descritas en la base de datos NCBI con identidades entre 45-85 % (cobertura 98-100 %) (Fig. D3.B), teniendo en cuenta la identidad y que en todos los casos se trata de proteínas tipo CPR, se puede concluir que muy probablemente se trate también de una proteína paróloga.

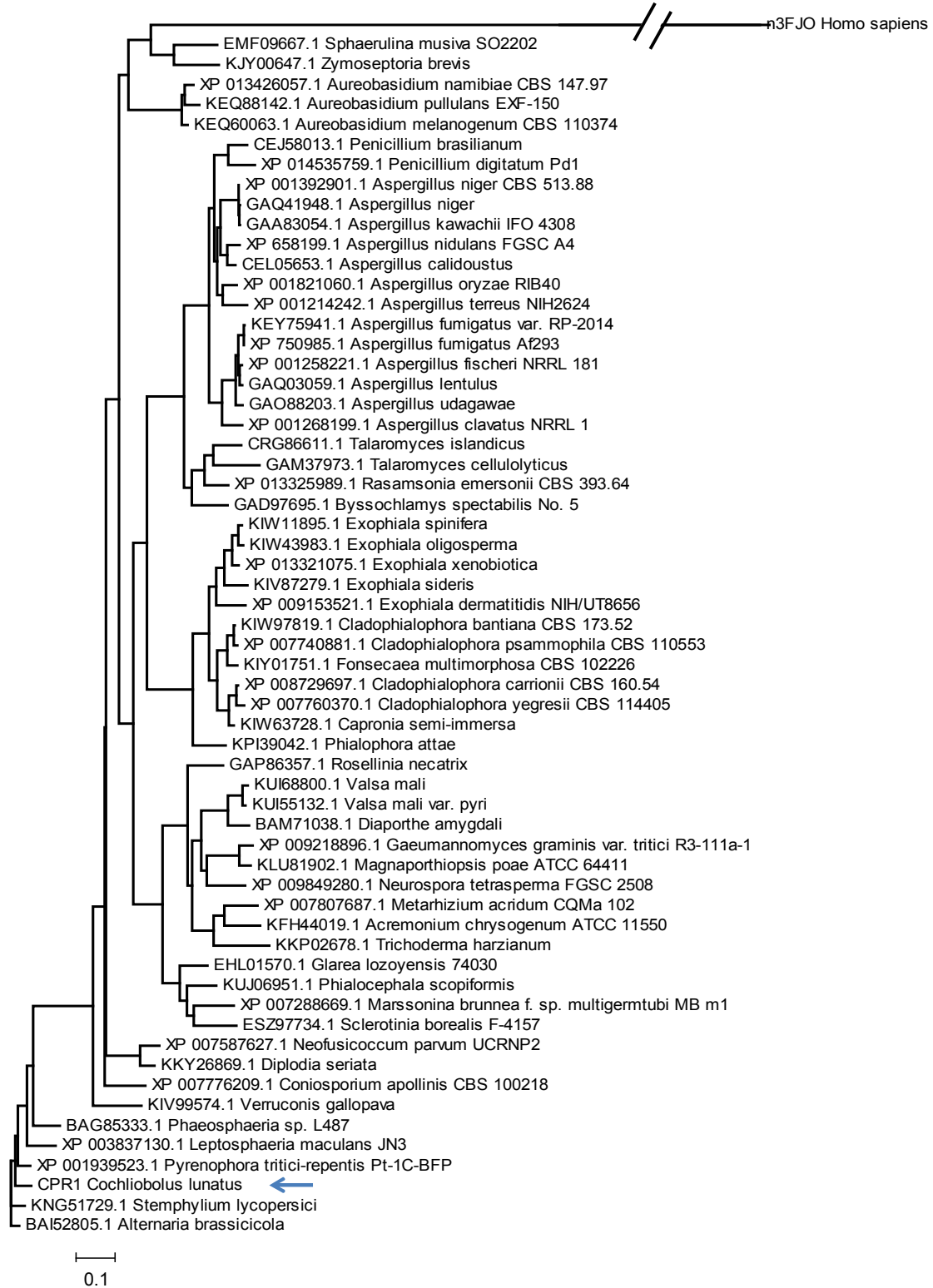


Figura D3 A. Filograma de CPR1.

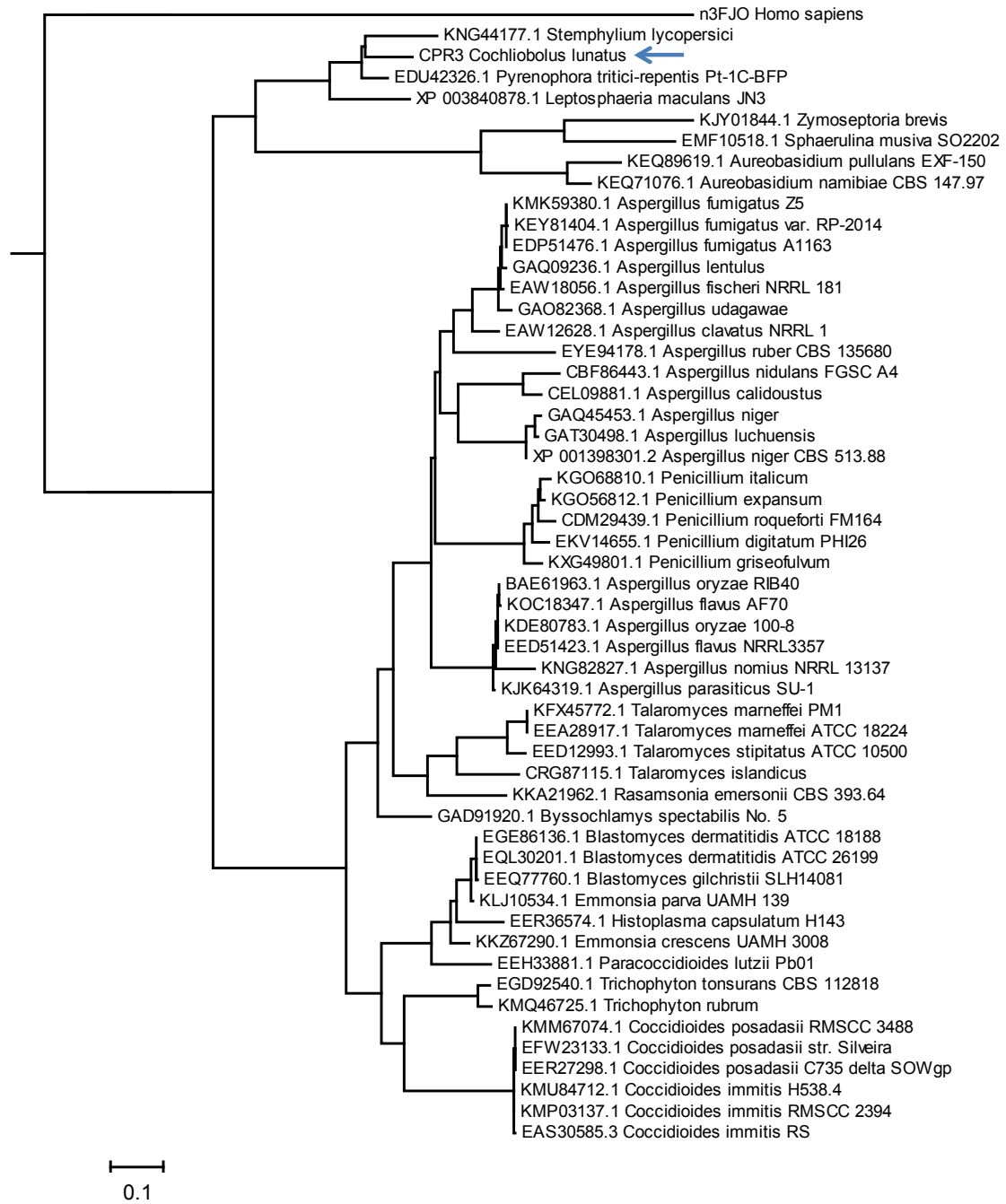


Figura D3 B. Filograma de CPR3

Discusión

En cualquier caso, trabajar con tres posibles CPRs parecía una tarea abordable y se decidió estudiar las tres enzimas. La expresión diferencial permitió descartar a la CPR128465 (CPR2) como candidato, al no expresarse en ninguna de las condiciones estudiadas. También se ha comprobado que, tanto la CPR64795 (CPR1) como la CPR59830 (CPR3), no aumentaban su expresión. Teniendo en cuenta esta expresión diferencial y asumiendo que su tamaño sería semejante a 79 kDa (Janig *et al.*, 1992) postulamos a la CPR64795 (CPR1), como el más probable acompañante fisiológico del citocromo. Según las teorías expuestas en los trabajos de Lah y colaboradores (2008 y 2011) la CPR1 estaría implicada en metabolismo primario, mientras que la CPR2 estaría implicada en detoxificación y pertenecería al metabolismo secundario. El hecho de que la CPR2 no se exprese en presencia del inductor, así como que no se observe un patrón de inducción en CPR3, parece contradecir esta afirmación, pero no es menos cierto que estas discusiones sobre el papel del metabolismo primario y secundario suelen ser en general bastante estériles.

En lo que se refiere a los citocromos la hipótesis de trabajo que se planteó fue abordar la identificación diferencial de los citocromos inducidos por esteroides en el hongo mediante PCR cuantitativa, gen a gen. Abordar este trabajo con 112 citocromos parecía una tarea ardua, por ello se decidió acotar el número de citocromos a ensayar utilizando varias aproximaciones. La primera fue asumir que su tamaño sería 60 kDa, como se había predicho por su purificación (Janig *et al.*, 1992), permitiendo descartar 20 CYPs. Por otra parte se asumió que podría tener cierta similitud con la 11 α -hidroxilasa de *A. ochraceus* (US7033807). Sobre la base de estas premisas se eligieron inicialmente los 8 CYPs candidatos más probables para realizar la prueba de concepto. El problema de esta hipótesis es que como consecuencia de la presencia del esteroide inductor en el medio de cultivo se podrían activar muchos otros citocromos y por lo tanto habría que aislarlos y analizarlos uno por uno. La ventaja, sin embargo, es que siendo una aproximación laboriosa es una aproximación muy segura.

Gracias al estudio de los perfiles de expresión de los 8 candidatos seleccionados (Apartado 2 de resultados, Sección 2.2.3) se pudo identificar el CYP103168 como mejor candidato debido al aumento de su expresión génica en presencia de los esteroides sustratos de la 11 β -hidroxilación, sin existir aumento por una posible inducción general ante respuesta a estrés por presencia de esteroides que no eran sustratos. En los otros citocromos ensayados o bien no se observó expresión en presencia de los esteroides (CYP115117, CYP34615, CYP56034) o en los que se detectó expresión (CYP31052) no se pudo correlacionar con el patrón de expresión esperado.

El CYP103168 no parece ser homólogo a ninguna de las 11-hidroxilasas descritas hasta la fecha, compartiendo una identidad del 28 % (cobertura del 96 %) con la 11 α -hidroxilasa de *A. ochraceus*, 24 % (cobertura del 54 %) con la 11 α -hidroxilasa de *R. oryzae* y 25 % (cobertura del 21 %) con la 11 α -hidroxilasa humana. De estos datos se puede concluir que aunque comparten la misma función no se parece más de lo que se parecerían varios citocromos entre sí. Sin embargo es cierto que esta comparación no puede ser muy exhaustiva ya que son muy pocas las proteínas con actividad 11-hidroxilasa descritas.

Con el fin de encontrar otras proteínas homólogas con actividad 11-hidroxilasa se realizó una comparación con el resto de proteínas fúngicas -todas las proteínas descritas en la base de datos NCBI, excluyendo las redundantes- que permitió construir un filograma (Fig. D4). El clado principal (α), que contiene el CYP103168, muestra un total de 20 secuencias homólogas, 13 de las cuales pertenecen al género *Bipolaris* (anamorfo de *Cochliobolus*). En algunos casos varias proteínas homólogas han sido detectadas en una sola especie, como es el caso de las 4 proteínas homólogas de *Bipolaris zeicola* 26-R-13. Esto implica un origen parálogo, más que una convergencia evolutiva, por lo que se realizó la comparación del CYP103168 de *C. lunatus* contra su CYPoma completo, siendo el citocromo CYP135200 el que posee una identidad mayor con el 45 % (cobertura del 65%), seguido del CYP51519 con una identidad del 29 % (cobertura del 48%), por lo que, aunque el CYP135200 se considera homólogo al CYP103168, no se puede concluir un origen parálogo.

Una vez identificados los posibles candidatos, CYP y CRP, se procedió a aislar los genes codificantes mediante la clonación de los cDNAs correspondientes. Esta estrategia parecía más lógica que la síntesis directa, ya que a veces las anotaciones de los genomas presentan errores y se pueden sintetizar genes inactivos. De hecho es preciso destacar que tras la secuenciación del CYP candidato (CYP103168) y las CPRs candidatas (CPR64795 y CYP59830), se encontraron no solo diferencias puntuales con las proteínas anotadas, lo que podría ser debido a que la cepa empleada en este estudio (*C. lunatus* CECT2130) no es la misma que la secuenciada (*C. lunatus* m118) (Apartado 2 de Resultados, Sección 2.4.1), sino que también se detectó un intrón no anotado como tal. Este intrón no se debe a errores en la PCR o en la secuenciación y es muy poco probable que se deba a diferencias en el procesamiento entre las diferentes cepas. Es de destacar que de haberse empleado la secuencia depositada y no haberse detectado este error muy probablemente se hubiese obtenido un citocromo inactivo.

2.1.1. Sistemas FAN y FIN (CPR-CYP)

Para poder demostrar que los genes identificados eran funcionales existían dos posibilidades: i) hacer mutantes del hongo eliminando el gen identificado y comprobando la ausencia de la actividad hidroxilasa; ii) clonar y expresar los genes en un organismo heterólogo, en nuestro caso bacterias, para determinar su actividad, lo cual era una apuesta arriesgada dada la dificultad de este tipo de aproximaciones experimentales.

En este trabajo no sólo se ha conseguido identificar el sistema CYP-CPR de *C. lunatus* responsable de llevar a cabo la 11 β -hidroxilación de esteroides, sino que además se ha demostrado que este sistema puede ser funcional *in vivo* en actinobacterias empleando las construcciones adecuadas, permitiendo no solo obtener derivados esteroideos de interés farmacológico a partir de sus precursores, sino acoplándolos a rutas de degradación bacterianas para obtener sintonas de interés industrial como 11 β OH-ADD y 11 β OH-AD a partir de materias primas de bajo coste como CHO y FITO.



Figura D4 Filograma de CPR103168.

Para estudiar la expresión de los genes identificados se ha empleado la misma aproximación que se empleó en la construcción del operón FUN, a excepción de que en este caso, al tratarse de una clonación directa a partir de cDNA, el uso de codones no está optimizado para las bacterias. Tampoco se incluyó ningún aminoácido en posición N-terminal con la finalidad de aumentar la expresión, ya que en el dominio N-terminal se encuentra una región transmembrana y temíamos que cualquier modificación pudiera hacer inactiva a la proteína. Los bajos valores de bioconversión que de momento se han obtenido (Apartado 2 de resultados, Sección 2.4.2.2) se achacan a problemas de expresión por estos motivos. Además hay que destacar que el RBS es el más óptimo para *M. smegmatis*, pero no así para *C. glutamicum*, por lo que habría que optimizar más los genes para cada bacteria.

Gracias a los experimentos realizados (Apartado 2 de resultados, Sección 2.4.2.2) se ha podido comprobar que el sistema CPR64795-CYP103168 (FAN) es muy probablemente el sistema empleado en *C. lunatus*, ya que se ha obtenido en la biotransformación llevada a cabo por *C. glutamicum* (pXKFAN) el mismo perfil de bioconversión de sustratos que en la biotransformación llevada a cabo por *C. lunatus*.

Por otro lado también se ha podido comprobar que el sistema CPR59830-CYP103168 (FIN) era funcional en la bacteria, pero se producía un compuesto monohidroxilado no identificado (diferente al 11 β -hidroxilado) no presente en la biotransformación llevada a cabo por el sistema FAN en *C. glutamicum* (pXKFAN) o en *C. lunatus* (Apartado 2 de resultados, Sección 2.4.2.2), lo que permitiría descartarlo, en principio, como su acompañante fisiológico.

Tal como se detalla más adelante, el hecho de que el hongo posea varias CPRs podría tener una importancia fisiológica vital, ya que dotaría al hongo de la capacidad para modular las modificaciones a realizar sobre un sustrato concreto, lo que supondría una importante ventaja en cuestiones tan importantes como la síntesis de un compuesto específico en carencia del mismo o la modificación de un compuesto para facilitar su excreción, en labores de detoxificación.

Nuestros datos permiten además concluir que CPR59830 (CPR3) es una proteína con actividad CPR por lo que *C. lunatus* posee tres CPRs funcionales: CPR64795 (CPR1) y CPR128465 (CPR2), identificadas previamente (Lah *et al.*, 2008) y CPR59830 (CPR3), identificada por primera vez en esta Tesis Doctoral.

Teniendo en cuenta las teorías sobre el papel metabólico de las CPRs extraídas de los trabajos de Lah y colaboradores (2008 y 2011), descritas sucintamente en esta Discusión, se puede deducir que la biotransformación de esteroides pertenece al metabolismo primario del hongo, lo cual no es de extrañar teniendo en cuenta que muchas de estas transformaciones se emplean para la síntesis del ergosterol u otros esteroides de la pared. La existencia de varias CPRs estaría relacionada con mecanismos de adaptación del hongo ya que éste no sólo es capaz de modular la expresión del citocromo en función de que exista o no esteroide en el medio, sino que sería capaz de modular la naturaleza del producto en la biotransformación de dicho

su unión con el mismo, ya que la transferencia electrónica puede ser diferente, dando lugar tras la catálisis a la aparición de productos diferentes a partir del mismo sustrato (Lah *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se han analizado las biotransformaciones de deosixicorticosterona (DOC) y cortexolona (RSS), por ser sus productos 11 β -hidroxilados (corticosterona, CORT e hidrocortisona, HC; respectivamente) de gran interés farmacológico; así como la biotransformación de AD, por ser su producto 11 β -hidroxilado una sintona de gran interés industrial. Respecto a estas biotransformaciones llevadas a cabo por la cepa *C. glutamicum* (pXKFAN) (que porta el CYP103168 con su acompañante redox fisiológico más probable, CPR64795 (CPR1)), es preciso matizar que los productos 11 β -hidroxilados aparecían acompañados de otros subproductos, también monohidroxilados, en mayor o menor proporción relativa dependiendo del sustrato de partida.

Previamente habían sido descritos, tanto en las biotransformaciones llevadas a cabo por el hongo *C. lunatus* (Undisz, 1992; Vitas *et al.*, 1994; Paraszkiwicz y Długonski, 1998) como en ensayos *in vitro* con fracciones microsomales purificadas o semipurificadas con actividad 11 β -hidroxilasa (Zuidweg, 1968; Janig *et al.*, 1992) otros subproductos monohidroxilados y dihidroxilados. Teniendo en cuenta estos datos y los resultados del presente trabajo se puede afirmar que el citocromo con actividad 11 β -hidroxilasa es capaz de llevar a cabo también hidroxilaciones en otras posiciones.

Con anterioridad a nuestros estudios, no se podía afirmar que un único citocromo fuese capaz de llevar a cabo las hidroxilaciones sobre varias posiciones y, aunque esta hipótesis pareciese probable, se necesitaba una conformación experimental directa, lograda en este trabajo con la identificación del citocromo con actividad 11 β -hidroxilasa. La hidroxilación múltiple por un mismo citocromo parece adecuarse a la teoría de Jones sobre la hidroxilación de esteroides (Jones, 1973) donde se asume que las hidroxilasas de esteroides tienen tres dominios de unión con un doble papel, en la unión del sustrato y en la hidroxilación del mismo. El ajuste del sustrato al sitio activo de la enzima determina la estéreo-especificidad de ésta, que depende en gran medida de la estructura de la molécula. Así el número de productos monohidroxilados y las posiciones de inserción del grupo hidroxilo depende de la geometría de la molécula esteroidea y generalmente ocurre en las 4 posiciones posibles (normal, inversa, normal invertida e inversa invertida). Esta teoría fue experimentalmente confirmada años más tarde por Hunter y colaboradores (2006, 2007, 2008 y 2011) mediante el estudio de esteroide-hidroxilasas fúngicas demostrando que es posible que los esteroides puedan unirse en las 4 posiciones posibles, aunque no lo hacen con la misma afinidad por cada una de ellas. Como se observa en los resultados mostrados en este trabajo (Apartado 2 de Resultados, Sección 2.4.2.2), esto probablemente ocurra con el CYP103168 de *C. lunatus* con actividad 11 β -hidroxilasa; es decir, hidroxila preferentemente la posición 11 β , pero también es capaz de hidroxilar otras posiciones.

Con la ayuda del Dr. D. Fco. Javier Medrano (CIB-CSIC) se ha realizado una predicción tridimensional de la estructura de la proteína CYP103168 con objeto de intentar comprender el

funcionamiento de este citocromo. El modelo se ha fundamentado en su comparación con la estructura tridimensional del citocromo 14 α -lanosterol desmetilasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Monk *et al.*, 2013). Si bien ambas proteínas difieren mucho en su secuencia son muy semejantes en estructura secundaria, permitiendo realizar el modelo. Como puede observarse en la Fig. D6, existe un paso de hélice transmembrana (Fig. D6.B) que mantiene al citocromo anclado a la misma y que es bastante diferente en ambas proteínas, motivo por el cual no aparece correctamente modelado en el CYP103168 (Fig. D6.A). Tal como Monk y colaboradores (2013) apuntan, la entrada al sitio activo posee una conformación en L, formando una entrada (vestíbulo primario) y una extensión de la misma en un ángulo de 90° (vestíbulo secundario) cuya orientación depende del anclaje a membrana. Esto podría explicar la escasa especificidad de sustrato. La enzima tiene un bolsillo amplio por lo que probablemente no existe una gran discriminación para la entrada de sustratos. Teniendo en cuenta la baja especificidad de sustrato y, las dificultades para modelar la estructura en la entrada del sitio activo y el anclaje a membrana, con este modelo no se pueden predecir las posibles posiciones de hidroxilación para un sustrato determinado y por lo tanto será necesario cristalizar el citocromo para correlacionar los aspectos estructurales y cinéticos.

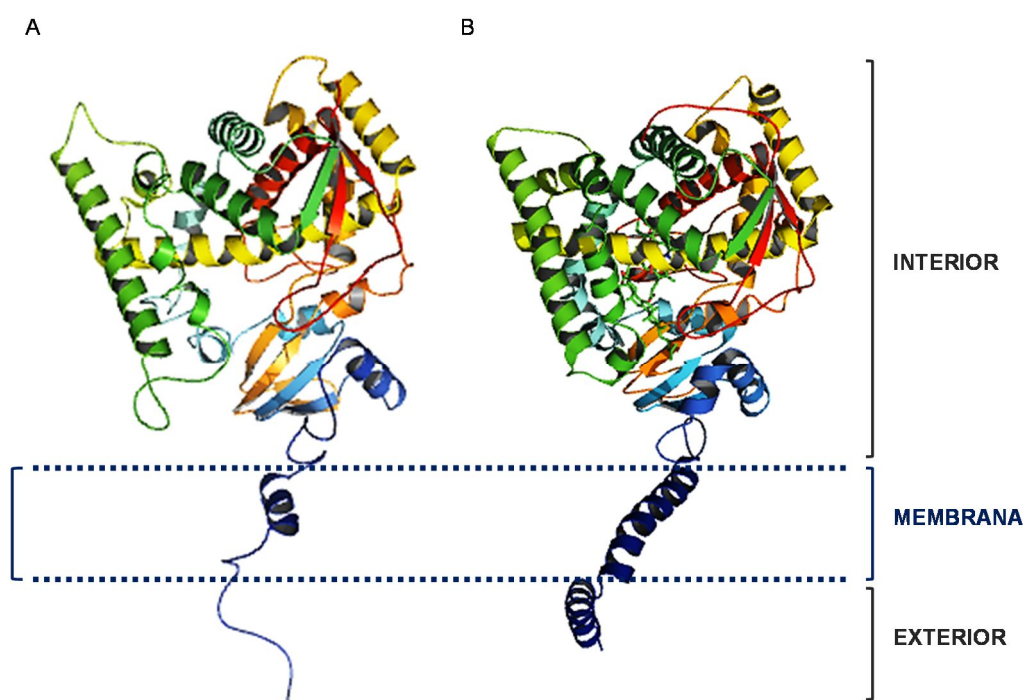


Figura D6 Predicción de la estructura tridimensional CYP103168 (A) tomando como modelo la 14 α -lanosterol desmetilasa de *Saccharomyces cerevisiae* (B).

El perfil de productos en las biotransformaciones llevadas a cabo por *C. glutamicum* (pXKFAN) empleando los progestanos (C21) como sustrato, DOC y RSS, es semejante a los descritos previamente en literatura en las biotransformaciones llevadas a cabo por el hongo *C. lunatus*.

En el caso de DOC (21OH-progesterona) se produce además otro compuesto monohidroxilado más polar que CORT (11 β ,21OH-progesterona); siguiendo exactamente el mismo perfil de producción que en las biotransformaciones realizadas por el hongo en el presente trabajo. Es

probable, teniendo en cuenta lo descrito en la bibliografía (Vitas *et al.*, 1994; Andryushina *et al.*, 2013), que se trate de 14 α OH-DOC; así como también es probable que se esté produciendo el compuesto dihidroxilado 11 β ,14 α OH-DOC, pero que no se observe por el método cromatográfico empleado o por estar en muy baja proporción.

En el caso de RSS (17 α ,21OH-progesterona) se produce casi principalmente HC (11 β ,17 α ,21OH-progesterona), aunque también se produce otro compuesto monohidroxilado más polar que HC, lo que puede correlacionarse con lo descrito en parte de la bibliografía específica (Zuidweg, 1968; Kollerov *et al.*, 2010; Andryushina *et al.*, 2013). Si bien en otros artículos aparecen como resultado de la biotransformación con el hongo *C. lunatus* otros productos monohidroxilados en las posiciones 6 β , 11 α , 14 α y otros no identificados, en una proporción considerable (Lu *et al.*, 2007); es importante destacar que en el estudio de Lu y colaboradores (2007) se empleó otra cepa (*C. lunatus* CL-144). En este sentido, es importante destacar que en los distintos estudios sobre las biotransformaciones reflejados en la bibliografía –entre ellos algunos de los citados– se emplean multitud de cepas, distintas de *C. lunatus* CECT2130 y *C. lunatus* m118, las más comunes y las empleadas en este trabajo. Además resulta difícil la comprobación y comparación de resultados por pertenecer a colecciones inaccesibles o porque en otros casos ni siquiera se hace referencia a la cepa.

El perfil de productos en las biotransformaciones llevadas a cabo por *C. glutamicum* (pXKFAN) empleando el androstano (C19) AD como sustrato difiere del producido en las biotransformaciones llevadas a cabo por el hongo *C. lunatus*, donde además de producirse 11 β OH-AD se produjo también testosterona (17 α OH-4-androsten-3-ona) y los derivados hidroxilados de la misma. Se trata de una actividad ya descrita, tal como se ha explicado en el Apartado 2 de Resultados, Sección 2.1, que además resulta de gran interés industrial ya que se emplea para la producción de testosterona a partir de AD; por lo que la identificación del citocromo con actividad 11 β -hidroxilasa podría tener importancia también en este tipo de biotransformaciones, ya que permitiría realizar mutantes dirigidos que eliminaran dicha actividad para la obtención de testosterona sin la acumulación de subproductos.

En la escasa literatura que existe de la biotransformación de androstanos por *C. lunatus* se describe que, en general los androstanos, y en particular AD, son hidroxilados preferentemente en posición 14 α por el hongo *C. lunatus* (Shuvalova *et al.*, 2001; Kollerov *et al.*, 2010; Andryushina *et al.*, 2013); si bien hay que tener en cuenta las siguientes consideraciones al analizar esta información: i) las cepas empleadas en los artículos citados son diferentes a las empleadas en este estudio (*C. lunatus* obtenida de la colección del Centro de Bioingeniería de la Academia Rusa de Ciencias –no se especifica cepa–, *C. lunatus* VKM F-644 de la Colección Rusa de Microorganismos y *C. lunatus* VKM F-981 de la Colección Rusa de Microorganismos, respectivamente); ii) el objetivo en dichos artículos es describir y explicar la diferencia en las posiciones de hidroxilación al emplear como sustratos progestanos y androstanos (Kollerov *et al.*, 2010; Andryushina *et al.*, 2013) o la producción en sí misma de 14 α OH-AD, sintona de gran interés industrial (Shuvalova *et al.*, 2001); iii) en todos los artículos se describe la producción de 14 α OH-AD, 11 β OH-AD y otros mono y dihidroxilados, pero sólo en el trabajo de Kollerov y

colaboradores (2010) se describe la producción de testosterona o derivados de la misma, lo que puede hacer pensar que los organismos se comportan de manera muy diferente al empleado en este trabajo; sin embargo resulta importante destacar otro trabajo en el que se emplea la cepa *C. lunatus* m118 (ampliamente usada para la producción de 11 β -hidroxilados) con el objetivo de producir 17 α -hidroxilados (Plemenitas *et al.*, 1987), no observándose ningún producto diferente a la testosterona cuando se emplea AD como sustrato de la biotransformación.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se puede deducir que los productos obtenidos, así como la proporción de los mismos dependerían en gran medida de las condiciones en las que se llevase a cabo la biotransformación, la cantidad de sustrato (Andryushina *et al.*, 2013; Kollerov *et al.*, 2010), el tiempo de fermentación o el estado del micelio (Shuvalova *et al.*, 2001), entre otros factores. Podría pensarse que existe otro citocromo con actividad 14 α -hidroxilasa y, en presencia del sustrato AD, compitiese con el citocromo con actividad 11 β -hidroxilasa; sin embargo no parece probable, ya que se observarían diferencias en la biotransformación llevada a cabo por el hongo en el presente trabajo.

Es preciso destacar que la identificación del producto 11 β OH-AD se realizó mediante comparación con el patrón de 11 β OH-AD (Sigma) por tiempo de retención en la cromatografía, espectro de absorción ultravioleta, m/z del ion característico y patrón de fragmentación del ion característico. Teniendo en cuenta todo esto, podría tratarse de otro producto (14 α OH-AD) en el caso de que éste: i) tuviese las mismas propiedades cromatográficas que le hiciesen coeluir con 11 β OH-AD, si bien es cierto que la estructura tridimensional de ambas moléculas es muy semejante y por tanto sus propiedades cromatográficas también; ii) tuviese las mismas propiedades espectroscópicas por lo que tuviese el mismo espectro de absorción, lo cual sería posible ya que se trata de moléculas muy semejantes; iii) tuviese la misma m/z de ion característico, lo cual es lógico al tratarse de un hidroxilado en otra posición, ya que tienen el mismo peso molecular; iv) compartiera el mismo patrón de fragmentación con los mismos iones y en la misma proporción, lo que podría suceder ya que el ion mayoritario de la primera fragmentación coincide con la m/z del AD disminuido en 18, lo que es compatible con una ionización del grupo alcohol y la consecuente liberación de una molécula de H₂O, dificultando la identificación. Teniendo en cuenta todo lo anterior, con la metodología empleada hasta la fecha resulta imposible confirmar con absoluta certeza que se trate de 11 β OH-AD, requiriéndose otro tipo de metodologías para tal confirmación. Es necesario precisar que, de ser errada esta identificación, la sintona que se estaría produciendo, tanto en este caso como en las biotransformaciones llevadas a cabo por las cepas recombinantes de *Mycobacterium* a partir de esteroides, sería 14 α OH-AD o 14 α OH-ADD; que por otro lado se trata de una sintona que es también de gran interés industrial.

2.1.1.1. OPERÓN FAN.1

Tal como se ha mencionado en reiteradas ocasiones, el rendimiento en las biotransformaciones es muy bajo, pero debe tenerse en cuenta que el operón FAN no está

optimizado para la expresión y por tanto la producción de las proteínas será mínima; además el CYP103168 es una proteína anclada a membrana (se ha encontrado anclada en la fracción microsomal y contiene un dominio transmembrana), por lo que se desconoce cómo podría ser su comportamiento en una bacteria. Con la finalidad de solubilizar la proteína y aumentar su expresión se llevó a cabo un truncamiento de la región N-terminal de la proteína (Apartado 2 de Resultados, Sección 2.4.2.3.1), basándose en datos previos en que había resultado exitoso en la expresión de citocromos fúngicos en bacterias (Ichinose y Wariishi, 2013). Tal como se explicó en el Apartado 2 de Resultados, Sección 2.4.2.3.2, esta aproximación no resultó exitosa, ya que no fue detectada actividad 11 β -hidroxilasa; achacándose al truncamiento realizado esta falta de actividad. Sin embargo resultó sorprendente, tal como se explicó en el Apartado 2 de Resultados, Sección 2.4.2.3.2, la aparición de una nueva actividad que no ha sido detectada en ninguno de los ensayos llevados a cabo anteriormente; generándose un producto derivado de DOC, con alta potencialidad como compuesto de interés industrial.

Como también se explicó en el Apartado 2 de Resultados, Sección 2.4.2.3.2, se descartó que esta nueva actividad pudiese deberse a acción de la CPR y no del conjunto CYP-CPR (en realidad cuando se habla del citocromo nos deberíamos referir al sistema formado por el conjunto CYP-CPR ya que el CYP requiere de la CPR para llevar a cabo su función), ya que al emplearse ésta sola no mostró actividad alguna. Podría pensarse que la CPR no es activa por sí misma y requiere de la estructura del CYP para realizar su función, por lo que la prueba de que la CPR no era la responsable de la actividad hubiera incluido el operón FAN con el CYP103168 inactivo, por ejemplo mediante una mutación puntual en el sitio activo, sin embargo las CPR resultan perfectamente activas por sí solas en los ensayos con ferricianuro de potasio, una de las pruebas colorimétricas más habituales para medir actividad reductasa.

El compuesto encontrado poseía una m/z de 333 que se corresponde con la m/z de DOC incrementada en 2. Esta diferencia podría radicar en que el grupo ceto de la posición 3 pasase a alcohol, ya que la actividad 3-cetoesteroide reductasa está presente en los hongos, implicada en la síntesis del ergosterol; o más probablemente actuase sobre el grupo ceto de la posición 20 gracias a una actividad 20 hidroxio-esteroide deshidrogenasa (aldo/ceto reductasa), previamente descrita en el hongo *C. lunatus* empleando como sustrato progesterona (nótese que DOC es 21OH-progesterona) (Horhold *et al.*, 1986; Plemenitas *et al.*; 1987) y AD (Shuvalova *et al.*, 2001). También podría tratarse de una actividad 5-alfa reductasa, en el que se perdiera el doble enlace del anillo A, actividad descrita previamente en algunos hongos pertenecientes al género *Penicillium* (Holland *et al.*, 1994). También ha sido descrita, en la fracción microsomal con actividad 11 β -hidroxilasa de *C. lunatus*, una actividad contraria a la anterior, que daría lugar a la formación de un segundo enlace en el anillo A cuando se emplea RSS acetilado en posición 17 α como sustrato, actividad que se desconoce si es reversible (Janig *et al.*, 1992).

Aunque estas actividades hayan sido descritas en hongos, incluso en *C. lunatus*, probablemente no son llevadas a cabo por el mismo citocromo que lleva a cabo la 11 β -

hidroxilación de esteroides; sin embargo, al delecionar el anclaje de éste a la membrana parece haber cambiado su actividad, quizá por modificación de la estructura de la proteína.

2.2. PRODUCCIÓN DE 11 β OH-SINTONAS DE ESTEROIDES A PARTIR DE MATERIAS PRIMAS DE BAJO COSTE: PRODUCCIÓN DE 11 α OH-ADD Y 11 α OH-AD

Siguiendo la misma hipótesis utilizada para la producción de las sintonas 11 α OH-AD y 11 α OH-ADD a partir de esteroides, ya explicada en el Apartado 1, Sección 1.1 de esta Discusión, se quiso realizar una prueba de concepto para estudiar si también era posible producir 11 β OH-ADD y 11 β OH-AD a partir de esteroides. En principio y con los datos obtenidos expresando el operón FUN en *M. smegmatis*, resultaba lógico pensar que pudiesen producirse, quizás con menores rendimientos, ya que el uso de codones de los genes no era el adecuado para *M. smegmatis* ni se había modificado de manera alguna la región N-terminal de la proteína para mejorar la producción de la misma.

La problemática de la expresión de los genes contenidos en el operón FAN era semejante a la ya explicada cuando se empleó el operón FUN. La expresión de los genes contenidos en el operón FAN (CPR64795-CYP103168, de *C. lunatus*) afecta el crecimiento de una manera semejante, aunque afectando más a la lisis celular al final de la fase exponencial. Las cepas *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFAN) y *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFAN) presentan una tasa de crecimiento menor con respecto a las cepas control sin el operón (Apartado 2 de Resultados, Secciones 2.4.3.2.1 y 2.4.3.2.2), afectando en mayor medida a la cepa productora de 11 β OH-AD, *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFAN), al igual que ocurría con la expresión de los genes contenidos en el operón FUN; en este caso también podría relacionarse con una mayor producción de 11 β OH-AD. Además es preciso destacar que la afectación es más notable cuando se emplean fitosteroides como sustrato.

De los datos de producción pueden extraerse varias conclusiones, una de ellas es que en las biotransformaciones realizadas por la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFAN) se obtiene un 30 % más de producto 11 α -hidroxilado que en las llevadas a cabo por la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFAN), lo que podría correlacionarse con una mayor afinidad del citocromo por el sustrato. Resulta interesante compararlo con los resultados obtenidos empleando las cepas productoras de sintonas 11 α -hidroxiladas, donde los rendimientos fueron un 35 % mayores en las biotransformaciones llevadas a cabo por la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN) y un 13 % en las biotransformaciones llevadas a cabo por la cepa *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN). Nótese que la diferencia en rendimiento es mucho mayor para el caso de la producción de 11 β OH-ADD, hecho que apoya la hipótesis anterior sobre la diferente afinidad por los sustratos AD y ADD.

Al contrario de lo que se observó en las biotransformaciones llevadas a cabo por las cepas productoras de sintonas 11 α -hidroxiladas que expresaban el operón FUN, en las biotransformaciones realizadas por las cepas *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFAN) y *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFAN) en las que se empleó FITO como sustrato, los rendimientos fueron

muy semejantes a los calculados cuando se empleó CHO como sustrato. Probablemente se deba a que se hayan alcanzado los valores máximos de producción de los compuestos 11 β -hidroxilados a las 72 h, aunque la conversión de FITO no haya sido total, pero si similar a la alcanzada por las cepas *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN) y *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN); por lo que podría suponerse que las biotransformaciones, tanto empleando CHO como FITO como sustrato de partida, se pararon a las 72 h, cuando aún quedaba sustrato por biotransformar.

Resulta interesante destacar que, al igual que ocurría con los experimentos llevados a cabo con las cepas *M. smegmatis* Δ 6039 (pMVFUN) y *M. smegmatis* Δ 6039 Δ 5941 (pMVFUN) la cantidad de subproducto 1,4-HBC (en el caso de la producción de 11 β OH-ADD) y 4-HBC (en el caso de la producción de 11 β OH-AD) observados en las cepas recombinantes portadoras del plásmido pXKFAN, son notablemente menores que en las cepas empleadas como control y, al igual que los casos anteriores, este resultado no es explicable aun teniendo en cuenta que hayan sido hidroxilados. Probablemente esto sea debido a las mismas razones, ya que en ambos casos se trata de sistemas CYP-CPR, y por tanto, las especulaciones que se puedan hacer al respecto sean también las mismas que se han explicado anteriormente (Apartado 1 de Discusión; Sección 1.1).

A pesar de que los rendimientos para la producción de sintonas hidroxiladas empleando la enzima 11 β -hidroxilasa no hayan sido muy altos, son incluso mejores a los esperados y constituyen una prueba de que es posible producir, por primera vez, sintonas hidroxiladas (11 β OH-AD(D) -o 14 α OH-AD(D) en caso de ser errada la identificación-) a partir de materias primas de bajo coste como CHO o FITO. Habiendo demostrado ya en la primera parte de este trabajo que además es posible realizar una serie de modificaciones en las construcciones y en las condiciones de trabajo, que conduzcan a mejoras en el proceso productivo, así como a un abaratamiento de los costes.

Teniendo en cuenta los logros conseguidos en los últimos años en ingeniería genética y metabólica, y el incremento en el número de trabajos de mejora en la producción de esteroides, algunos de ellos en los biocatalizadores de las biotransformaciones entre los que se incluyen los obtenidos en esta Tesis Doctoral -aunque no en sí mismos revolucionarios o impactantes para la industria esteroidea-, hacen que sea posible prever grandes avances basados en la mejora de biofactorias microbianas recombinantes; ya que, si bien el camino por recorrer a este respecto es largo, los primeros pasos en esta dirección ya han sido dados.

VIII. Conclusiones

El trabajo descrito en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes conclusiones principales:

1. Se ha identificado el sistema CYP-CPR responsable de la actividad 11 β -hidroxilasa de *Cochliobolus lunatus* junto con una nueva CPR no descrita previamente en *C. lunatus*.
2. Se ha puesto de manifiesto que las corinebacterias pueden ser un chasis excelente para expresar sistemas CYP-CPR de hongos. Dicha prueba de concepto se ha realizado con la actividad 11 α -hidroxilasa de *Rhizopus oryzae* y se ha ratificado con la actividad 11 β -hidroxilasa de *Cochliobolus lunatus*.
3. Se ha puesto de manifiesto que las micobacterias también pueden ser buenos chasis para expresar sistemas CYP-CPR de hongos utilizando para realizar esta prueba de concepto los sistemas CYP-CRP de *R. oryzae* y de *C. lunatus*.
4. Se ha podido comprobar que en las micobacterias recombinantes portadoras de los sistemas CYP-CRP de los mencionados hongos es posible acoplar las actividades 11 α -hidroxilasa y 11 β -hidroxilasa a la ruta de degradación de esteroides para producir de manera directa esteroides hidroxilados a partir de fitoesteroides o colesterol.

IX. Bibliografía

- Aaron KE, Pierson CA, Lees ND, Bard M (2001).** The *Candida albicans* ERG26 gene encoding the C-3 sterol dehydrogenase (C-4 decarboxylase) is essential for growth. *FEMS Yeast Res.* 1(2):93-101.
- Agematu H, Matsumoto N, Fujii Y, Kabumoto H, Doi S, Machida K, Ishikawa J, Arisawa A (2006).** Hydroxylation of testosterone by bacterial cytochromes P450 using the *Escherichia coli* expression system. *Biosci Biotechnol Biochem.* 70(1):307-311.
- Ahmed F, Williams RA, Smith KE (1996).** Microbial transformations of steroids. X. Cytochromes P-450 11 α -hydroxylase and C17-C20 lyase and a 1-ene dehydrogenase transform steroids in *Nectria haematococca*. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 58(3):337-349.
- Aigrain L, Pompon D, Moréra S, Truan G (2009).** Structure of the open conformation of a functional chimeric NADPH cytochrome P450 reductase. *EMBO Rep.* 10(7):742-747.
- Akiba T, Endou H, Koseki C, Sakai F, Horiuchi N, Suda T (1980).** Localization of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase activity in the mammalian kidney. *Biochem Biophys Res Commun.* 94(1):313-318.
- Akzo Nobel N (Holanda) (2000).** Microbial 9 α -hydroxylation of steroids. Van der Geize R (Holanda), Hessels G (Holanda), Dijkhuizen L (Holanda). WO2001031050A1
- Akzo Nobel N (Holanda) (2003).** Identification of 3-ketosteroid 9- α -hydroxylase genes and microorganisms blocked in 3-ketosteroid 9- α -hydroxylase activity. Van der Geize R (Holanda), Hessels G (Holanda), Dijkhuizen L (Holanda), Van Der Meijden P (Holanda). WO2003070925A2
- Andor A, Jekkel A, Hopwood DA, Jeanplong F, Ilkoy E, Kónya A, Kurucz I, Ambrus G (2006).** Generation of useful insertionally blocked sterol degradation pathway mutants of fast-growing mycobacteria and cloning, characterization, and expression of the terminal oxygenase of the 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in *Mycobacterium smegmatis* mc²155. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:6554-6559.
- Andryushina VA, Yaderets VV, Stytsenko TS, Druzhinina AV, Voishvillo NE (2013).** Effect of the steroid molecule structure on the direction of its hydroxylation by the fungus *Curvularia lunata*. *Appl Biochem Microbiol* 49(4):386-394.
- Antoniou TNH, Curran BPG, Smith KE (1994).** Is mRNA sequestration involved in the regulation of progesterone 14-hydroxylase cytochrome P-450 expression in *Mucor hiemalis*? *Microbiol.* 140: 1633-1640.
- Arthington BA, Bennett LG, Skatrud PL, Guynn CJ, Barbuch RJ, Ulbright CE, Bard M (1991).** Cloning, disruption and sequence of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. *Gene.* 102(1):39-44.
- Arya SK, Datta M, Malhotra BD (2008).** Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosens Bioelectron.* 23(7):1083-1100.
- Ashman WH, Barbuch RJ, Ulbright CE, Jarrett HW, Bard M (1991).** Cloning and disruption of the yeast C-8 sterol isomerase gene. *Lipids.* 26(8):628-32.
- Awad AB, Downie A, Fink CS, Kim U (2000).** Dietary phytosterol inhibits the growth and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells grown in SCID mice. *Anticancer Res.* 20(2A):821-824.
- Awad AB, Fink CS, Williams H, Kim U (2001).** *In vitro* and *in vivo* (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. *Eur J Cancer Prev.* 10(6):507-513.
- Bard M, Bruner DA, Pierson CA, Lees ND, Biermann B, Frye L, Koegel C, Barbuch R (1996).** Cloning and characterization of ERG25, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding C-4 sterol methyl oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(1):186-190.
- Bard M, Lees ND, Turi T, Craft D, Cofrin L, Barbuch R, Koegel C, Loper JC (1993).** Sterol synthesis and viability of erg11 (cytochrome P450 lanosterol demethylase) mutations in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Lipids.* 28(11):963-967.

- Barnes HJ, Arlotto MP, Waterman MR (1991).** Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 α -hydroxylase in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA. 88:5597-5601.
- Becker J, Wittmann C (2012).** Bio-based production of chemicals, materials and fuels *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. Curr Opin Biotechnol. 23(4):631-640.
- Berne S, Lah L, Korosec B, Kravec N, Komel R (2008).** Progesterone-induced gene expression profile of the filamentous fungus *Cochliobolus lunatus*. Acta Chim Slov. 55(1):93-100.
- Bernhardt R (2006).** Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. J Biotechnol. 124(1):128-145.
- Bhosale S, Saratale G, Govindwar S (2006).** Biotransformation enzymes in *Cunninghamella blakesleeana* (NCIM-687). J Basic Microbiol. 46(6):444-448.
- Björkhem I, Eggertsen G (2001).** Genes involved in initial steps of bile acid synthesis. Curr Opin Lipidol. 12(2):97-103.
- Bjorkhem I, Lutjohann D, Breuer O, Sakinis A, Wennmalm A (1997).** Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with ¹⁸O₂ techniques *in vivo* and *in vitro*. J Biol Chem. 272(48):30178-30184.
- Bonnerjea J, Pontin S, Hoare M, Dunnill P (1988).** Poly(ethylene glycol) precipitation and two aqueous-phase separation of progesterone 11- α -hydroxylase from *Rhizopus nigricans*. Appl Microbiol Biotechnol. 27(4):362-(365).
- Bradford, MM (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.
- Brzostek A, Sliwiński T, Rumijowska-Galewicz A, Korycka-Machała M, Dziadek J (2005).** Identification and targeted disruption of the gene encoding the main 3-ketosteroid dehydrogenase in *Mycobacterium smegmatis*. Microbiology 151:23393-23402.
- Bureik M, Lisurek M, Bernhardt R (2002).** The human steroid hydroxylases CYP11B1 and CYP11B2. Biol Chem. 383(10):1537-1551.
- Bureik M, Schiffler B, Hiraoka Y, Vogel F, Bernhardt R (2002).** Functional expression of human mitochondrial CYP11B2 in fission yeast and identification of a new internal electron transfer protein, etp1. Biochem 41:2311-2321.
- Cabeza MS, Gutiérrez EB, García GA, Avalos AH, Hernández MA (1999).** Microbial transformations of testosterone to 5 α -dihydrotestosterone by two species of *Penicillium*: *P. chrysogenum* and *P. crustosum*. Steroids. 64(6):379-384.
- Cali JJ, Russell DW (1991).** Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis. J Biol Chem. 266(12):7774-7778.
- Camangi PC (1989).** Diseases of officinal plants: *Curvularia lunata*, foliar pathogen of *Origanum vulgare*. Inf Fitopatol. 39(5):63-64.
- Carballeira JD, Quezada MA, Hoyos P, Simeó Y, Hernaiz MJ, Alcantara AR, Sinisterra JV (2009).** Microbial cells as catalysts for stereoselective redox reactions. Biotechnol Adv. 27:686-714.
- Carter E, Boudreaux C (2004).** Fatal cerebral phaeohyphomycosis due to *Curvularia lunata* in an immunocompetent patient. J Clin Microbiol. 42(11):5419-5423.
- Cavanna C, Seminari E, Pusateri A, Mangione F, Lallitto F, Esposito MC, Pagella F (2014).** Allergic fungal rhinosinusitis due to *Curvularia lunata*. New Microbiol. 37(2):241-245.
- Chen K, Tong WY, Wei DZ, Jiang X (2007).** The 11 β -hydroxylation of 16,17 α -epoxyprogesterone and the purification of the 11 β -hydroxylase from *Absidia coerulea*. Enzyme Microb Technol 41:71-79.

- Chen MM, Wang FQ, Lin LC, Yao K, Wei DZ (2012).** Characterization and application of fusidane antibiotic biosynthesis enzyme 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase in steroid transformation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 96(1):133-142.
- Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW (2004).** Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(20):7711-7715.
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (España) (2015).** Selective recombinant mutants of *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 and use thereof for producing 1,4-androstadiene-3,17-dione or 4-androstene-3,17-dione from natural sterols. García JL (España), Uhía I (España), Galán B (España). ES P201430272 / WO2015128534A1.
- Cotillon AC, Morfin R (1999).** Transformation of 3-hydroxy-steroids by *Fusarium moniliforme* 7 α -hydroxylase. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 68(5-6):229-327.
- Crettol S, Petrovic N, Murray M (2010).** Pharmacogenetics of phase I and phase II drug metabolism. *Curr Pharm Des.* 16(2):204-219.
- De Lorenzo V (2015).** Chassis organism from *Corynebacterium glutamicum*: the way towards biotechnological domestication of Corynebacteria. *Biotechnol J.* 10(2):244-245.
- De Stefani E, Boffetta P, Ronco AL, Brennan P, Deneo-Pellegrini H, Carzoglio JC, Mendilaharsu M (2000).** Plant sterols and risk of stomach cancer: a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer.* 37(2):140-144.
- Demain AL (1992).** Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. *Ciba Found Symp.* 171:3-16; discussion 16-23.
- Dewick P (2009).** Medicinal natural products: a biosynthetic approach. West Sussex: John Wiley & Sons.
- Donova MV (2007).** Transformation of steroids by actinobacteria: A review. *Appl Biochem Microbiol.* 43:1-14.
- Donova MV, Egorova OV (2012).** Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 94(6):1423-1447.
- Dragan CA, Blank LM, Bureik M (2006).** Increased TCA cycle activity and reduced oxygen consumption during cytochrome P450-dependent biotransformation in fission yeast. *Yeast* 23:779-794.
- Dragan CA, Zearo S, Hannemann F, Bernhardt R, Bureik M (2005).** Efficient conversion of 11-deoxycortisol to cortisol (hydrocortisone) by recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res.* 5:621-625.
- Dumas B, Cauet G, Lacour T, Degryse E, Laruelle L, Ledoux C, Spagnoli R, Achstetter T (1996).** 11 beta-hydroxylase activity in recombinant yeast mitochondria. *In vivo* conversion of 11-deoxycortisol to hydrocortisone. *Eur J Biochem.* 238(2):495-504.
- Dumas B, Brocard-Masson C, Assemat-Lebrun K, Achstetter T (2006).** Hydrocortisone made in yeast: metabolic engineering turns a unicellular microorganism into a drug-synthesizing factory. *Biotechnol J.* 1(3):299-307.
- Dunford AJ, McLean KJ, Sabri M, Seward HE, Heyes DJ, Scrutton NS, Munro AW (2007).** Rapid P450 heme iron reduction by laser photoexcitation of *Mycobacterium tuberculosis* CYP121 and CYP51B1. Analysis of CO complexation reactions and reversibility of the P450/P420 equilibrium. *J Biol Chem.* 282(34):24816-24824.
- Duport C, Spagnoli R, Degryse E, Pompon D (1998).** Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nat Biotechnol.* 16(2):186-189.
- Ei-Kadi IA, Mostafa ME (2004).** Hydroxylation of progesterone by some *Trichoderma* species. *Folia Microbiol (Praha).* 49(3):285-290.
- Ellegard LH, Andersson SW, Normén AL, Andersson HA (2007).** Dietary plant sterols and cholesterol metabolism. *Nutr Rev.* 65(1):39-45.

- Ellis J, Gutierrez A, Barsukov IL, Huang WC, Grossmann JG, Roberts GC (2009).** Domain motion in cytochrome P450 reductase: conformational equilibria revealed by NMR and small-angle x-ray scattering. *J Biol Chem.* 284(52):36628-36637.
- Enhsen A, Kramer W, Wess G (1998).** Bile acid and drug discovery, *Drug Discov Today.* 3:409–418.
- Faramarzi MA, Sadighi A (2013).** Insights into biogenic and chemical production of inorganic nanomaterials and nanostructures. *Adv Colloid Interface Sci.* 189-190:1-20.
- Fernandes P, Cabral JM (2010).** Steroid bioconversion. *Enciclop Ind Biotech* 4610-4628.
- Fernandes P, Cruz A, Angelova B, Pinheiro HM, Cabral JMS (2003).** Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb Technol.* 32: 688–705.
- Fujii T, Fujii Y, Machida K, Ochiai A, Ito M (2009).** Efficient biotransformations using *Escherichia coli* with tolC acrAB mutations expressing cytochrome P450 genes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 73:805-810.
- Gachotte D, Barbuch R, Gaylor J, Nickel E, Bard M (1998).** Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG26 gene encoding the C-3 sterol dehydrogenase (C-4 decarboxylase) involved in sterol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(23):13794-13799.
- Gachotte D, Sen SE, Eckstein J, Barbuch R, Krieger M, Ray BD, Bard M (1999).** Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG27 gene encoding the 3-keto reductase involved in C-4 sterol demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(22):12655-12660.
- Gao S, Li Y, Gao J, Suo Y, Fu K, Li Y, Chen J (2014).** Genome sequence and virulence variation-related transcriptome profiles of *Curvularia lunata*, an important maize pathogenic fungus. *BMC Genomics.* 15:627.
- García-Fernández J (2015).** Estudio del transporte de esteroides en *Mycobacterium smegmatis* mc²155 y sus aplicaciones biotecnológicas. Tesis Doctoral
- Geber A, Hitchcock CA, Swartz JE, Pullen FS, Marsden KE, Kwon-Chung KJ, Bennett JE (1995).** Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(12):2708-2717.
- Guengerich FP (1991).** Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J Biol Chem.* 266(16):10019-10022.
- Hakki T, Zearo S, Drăgan CA, Bureik M, Bernhardt R (2008).** Coexpression of redox partners increases the hydrocortisone (cortisol) production efficiency in CYP11B1 expressing fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biotechnol.* 133:351-359.
- Hamdane D, Xia C, Im SC, Zhang H, Kim JJ, Waskell L (2009).** Structure and function of an NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in an open conformation capable of reducing cytochrome P450. *J Biol Chem.* 284(17):11374-11384.
- Hannemann F, Virus C, Bernhardt R (2006).** Design of an *Escherichia coli* system for whole cell mediated steroid synthesis and molecular evolution of steroid hydroxylases. *J Biotechnol.* 124:172-181.
- Hofmann AF (1995).** Bile acids as drugs: principles, mechanisms of action and formulations. *Ital J Gastroenterol.* 27(2):106-13.
- Hogg JA (1992).** Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation. *Steroids.* 57(12):593-616.
- Holland HL, Dore S, Xu W, Brown FM (1994).** Formation of 5 alpha steroids by biotransformation involving the 5 alpha-reductase activity of *Penicillium decumbens*. *Steroids.* 59(11):642-647.
- Horhold C, Undisz K, Groh H, Sahn R, Shade W, Komel R (1986).** Bioconversion of steroids by *Cochliobolus lunatus*. *J Basic Microbiol.* 26(1):335-339

- Hu S, Genain G, Azerad R (1995).** Microbial transformation of steroids: contribution to 14 alpha-hydroxylations. *Steroids*. 60(4):337-352.
- Hudson SA, McLean KJ, Munro AW, Abell C (2012).** *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome P450 enzymes: a cohort of novel TB drug targets. *Biochem Soc Trans*. 40(3):573-579.
- Hunter AC, Bergin-Simpson H (2007).** Distinct metabolic handling of 3beta-hydroxy-17a-oxa-D-homo-5alpha-androstan-17-one by the filamentous fungus *Aspergillus tamarii* KITA: Evidence in support of steroid/hydroxylase binding hypothesis. *Biochim Biophys Acta*. 1771(9):1254-1261.
- Hunter AC, Coyle E, Morse F, Dedi C, Dodd HT, Koussoroplis SJ (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 3beta-hydroxy-steroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase pathway. *Biochim Biophys Acta*. 1791(2):110-117.
- Hunter AC, Elsom J, Ross L, Barrett R (2006).** Ring-B functionalized androst-4-en-3-ones and ring-C substituted pregn-4-en-3-ones undergo differential transformation in *Aspergillus tamarii* KITA: ring-A transformation with all C-6 substituted steroids and ring-D transformation with C-11 substituents. *Biochim Biophys Acta*. 1761(3):360-366.
- Hunter AC, Mills PW, Dedi C, Dodd HT (2008).** Predominant allylic hydroxylation at carbons 6 and 7 of 4 and 5-ene functionalized steroids by the thermophilic fungus *Rhizomucor tauricus* IMI23312. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 108(1-2):155-163.
- Hunter AC, Priest SM (2006).** An efficient one-pot synthesis generating 4-ene-3,6-dione functionalised steroids from steroidal 5-en-3beta-ols using a modified Jones oxidation methodology. *Steroids*. 71(1):30-3.
- Hunter AC, Rymer SJ, Dedi C, Dodd HT, Nwozor QC, Moghimi SM (2011).** Transformation of structurally diverse steroidal analogues by the fungus *Corynespora cassicola* CBS 161.60 results in generation of 8β-monohydroxylated metabolites with evidence in favour of 8β-hydroxylation through inverted binding in the 9α-hydroxylase. *Biochim Biophys Acta*. 1811(12):1054-1061.
- Ichinose H, Wariishi H (2013).** High-level heterologous expression of fungal cytochrome P450s in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 438(2):289-294.
- Iwaki T, Iefuji H, Hiraga Y, Hosomi A, Morita T, Giga-Hama Y, Takegawa K (2008).** Multiple functions of ergosterol in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology*. 154(3):830-841.
- Jackson CJ, Lamb DC, Marczylo TH, Warrilow AG, Manning NJ, Lowe DJ, Kelly DE, Kelly SL (2002).** A novel sterol 14alpha-demethylase/ferredoxin fusion protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* represents a new class of the cytochrome P450 superfamily. *J Biol Chem*. 277(49):46959-46965.
- Jackson CJ, Lamb DC, Marczylo TH, Parker JE, Manning NL, Kelly DE, Kelly SL (2003).** Conservation and cloning of CYP51: a sterol 14 alpha-demethylase from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 301(2):558-563.
- Jang HH, Jamakhandi AP, Sullivan SZ, Yun CH, Hollenberg PF, Miller GP (2010).** Beta sheet 2-alpha helix C loop of cytochrome P450 reductase serves as a docking site for redox partners. *Biochim Biophys Acta*. 1804(6):1285-1293.
- Janig GR, Pfeil D, Müller-Frohne M, Riemer H, Henning M, Schwarze W, Ruckpaul K (1992).** Steroid 11β-hydroxylation by a fungal microsomal cytochrome P450. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 43(8):1117-1123.
- JCBN (1989).** Nomenclature of steroids. *Pure Appl Chem*. 61:1783-1822.
- Jones ER (1973).** The microbiological hydroxylation of steroids and related compounds. *Pure Appl Chem*. 33(1):39-52.
- Jubete E, Loaiza OA, Ochoteco E, Pomposo JA, Grande H, Rodríguez J (2009).** Nanotechnology: A tool for improved performance on electrochemical screen-printed (Bio)Sensors. *J of Sensors* 2009: 842575-842588.

- Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ, Baldwin BC, Parks LW, Kelly DE (1995).** Purification and reconstitution of activity of *Saccharomyces cerevisiae* P450 61, a sterol delta 22-desaturase. *FEBS Lett.* 377(2):217-220.
- Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE (1997).** Sterol 22-desaturase, cytochrome P45061, possesses activity in xenobiotic metabolism. *FEBS Lett.* 412(1):233-235.
- Kennedy MA, Johnson TA, Lees ND, Barbuch R, Eckstein JA, Bard M (2000).** Cloning and sequencing of the *Candida albicans* C-4 sterol methyl oxidase gene (ERG25) and expression of an ERG25 conditional lethal mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids.* 35(3):257-262.
- Keon JP, James CS, Court S, Baden-Daintree C, Bailey AM, Burden RS, Bard M, Hargreaves JA (1994).** Isolation of the ERG2 gene, encoding sterol delta 8-->delta 7 isomerase, from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* and its expression in the maize smut pathogen *Ustilago maydis*. *Curr Genet.* 25(6):531-537.
- Kicman AT (2008).** Pharmacology of anabolic steroids. *Br J Pharmacol.* 154(3):502-521.
- Kirchner O, Tauch A (2003).** Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol.* 104(1-3):287-299.
- Klingenberg M (1958).** Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 75(2):376-386.
- Kollerov VV, Shutov AA, Fokina VV, Sukhodol'skaia GV, Gulevskaia SA, Donova MV (2010).** Bioconversion of C19- and C21-steroids with parent and mutant strains of *Curvularia lunata*. *Appl Biochem Microbiol.* 46(2):198-205.
- Kominami S, Ochi H, Kobayashi Y, Takemori S (1980).** Studies on the steroid hydroxylation system in adrenal cortex microsomes. Purification and characterization of cytochrome P-450 specific for steroid C-21 hydroxylation. *J Biol Chem.* 255(8):3386-3394.
- Kristan K, Rižner TL (2012).** Steroid-transforming enzymes in fungi. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 129(1-2):79-91.
- Kunic B, Truan G, Breskvar K, Pompon D (2001).** Functional cloning, based on azole resistance in *Saccharomyces cerevisiae*, and characterization of *Rhizopus nigricans* redox carriers that are differentially involved in the P450-dependent response to progesterone stress. *Mol Genet Genomics.* 265(5):930-940.
- Lachance Y, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Dumont M, de Launoit Y, Guérin S, Leblanc G, Labrie F (1990).** Characterization of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells. *J Biol Chem.* 265(33):20469-20475.
- Laemmli, UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lah L, Krasevec N, Trontelj P, Komel R (2008).** High diversity and complex evolution of fungal cytochrome P450 reductase: cytochrome P450 systems. *Fungal Genet Biol.* 45(4):446-458.
- Lah L, Podobnik B, Novak M, Korosec B, Berne S, Vogelsang M, Krasevec N, Zupanec N, Stojan J, Bohlmann J, Komel R (2011).** The versatility of the fungal cytochrome P450 monooxygenase system is instrumental in xenobiotic detoxification. *Mol Microbiol.* 81(5):1374-1389.
- Lakshmanan P (1993).** Evaluation of genetic resistance from *Oryza sativa* and *Oryza officinalis* against *Cochliobolus lunatus* in Tamil Nadu, India. *Phytoparasitica* 21(1):63-68.
- Lamb DC, Kelly DE, Kelly SL (1998).** Molecular diversity of sterol 14alpha-demethylase substrates in plants, fungi and humans. *FEBS Lett.* 425(2):263-265.
- Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Kelly SL (1998).** A sterol biosynthetic pathway in *Mycobacterium*. *FEBS Lett.* 437(1-2):142-144.
- Lamb DC, Maspahy S, Kelly DE, Manning NJ, Geber A, Bennett JE, Kelly SL (1999).** Purification, reconstitution, and inhibition of cytochrome P-450 sterol delta22-desaturase from the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(7):1725-1728.

- Lamb DC, Jackson CJ, Warrilow AG, Manning NJ, Kelly DE, Kelly SL (2007). Lanosterol biosynthesis in the prokaryote *Methyloboccus capsulatus*: insight into the evolution of sterol biosynthesis. *Mol Biol Evol.* 24(8):1714-1721.
- Lanisnik T, Zakelj-Mavric M, Belic I (1992). Fungal 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett.* 78(1):49-52.
- Lecain E, Chenivresse X, Spagnoli R, Pompon D (1996). Cloning by metabolic interference in yeast and enzymatic characterization of *Arabidopsis thaliana* sterol delta 7-reductase. *J Biol Chem.* 271(18):10866-10873.
- Lees ND, Skaggs B, Kirsch DR, Bard M (1995). Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Lipids.* 30(3):221-226.
- Lepesheva GI, Waterman MR (2007). Sterol 14alpha-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochim Biophys Acta.* 1770(3):467-477.
- Liu HM, Li H, Shan L, Wu J (2006). Synthesis of steroidal lactone by *Penicillium citreo-viride*. *Steroids.* 71(11-12):931-934.
- Liu Y, Yao ZX, Bendavid C, Borgmeyer C, Han Z, Cavalli LR, Chan WY, Folmer J, Zirkin BR, Haddad BR, Gallicano GI, Papadopoulos V (2005). Haploinsufficiency of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase/17,20 lyase (CYP17) causes infertility in male mice. *Mol Endocrinol.* 19(9):2380-2389.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25(4):402-408.
- LOBASTOVA TG, GULEVSKAIA SA, SUKHODOL'SKAIA GV, DONOVA MV (2009). Dihydroxylation of dehydroepiandrosterone in positions 7alpha and 15alpha by mycelial fungi. *Appl Biochem Microbiol.* 45(6):684-689.
- Louis B, Waikhom SD, Roy P, Bhardwaj PK, Sharma CK, Singh MW, Talukdar NC (2014). Host-range dynamics of *Cochliobolus lunatus*: from a biocontrol agent to a severe environmental threat. *Biomed Res Int.* 2014:378372.
- Lu W, Du L, Wang M, Jia X, Wen J, Huang Y, Guo Y, Gong W, Bao H, Yang J, Sun B (2007). Optimisation of hydrocortisone production by *Curvularia lunata*. *Appl Biochem Biotechnol.* 142(1):17-28.
- Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW (1999). cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(13):7238-7243.
- MacMillan RH 3rd, Cooper PH, Body BA, Mills AS (1987). Allergic fungal sinusitis due to *Curvularia lunata*. *Hum Pathol.* 18(9):960-964.
- Mahato SB, Mukherjee A (1984). Steroid transformations by microorganisms. *Phytochemistry.* 23:2131-2154.
- Mahato SB, Banerjee S (1985). Steroid transformations by microorganisms-II. *Phytochemistry.* 24:1403-1421.
- Mahato SB, Banerjee S, Podder S (1989). Steroid transformations by microorganisms – III. *Phytochemistry* 28:7-40.
- Mahato SB, Majumdar I (1993). Current trends in microbial steroid biotransformation. *Phytochemistry.* 34:883-898.
- Mahato SB, Garai S (1997). Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids.* 62(4):332-345.
- Majewska MD (2007). Steroids and ion channels in evolution: from bacteria to synapses and mind. Evolutionary role of steroid regulation of GABA(A) receptors. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 67(3):219-233.
- Makovec T, Breskvar K (1998). Purification and characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase from filamentous fungus *Rhizopus nigricans*. *Arch Biochem Biophys.* 357(2):310-316.
- Malaviya A, Gomes J (2008). Androstenedione production by biotransformation of phytosterols. *Bioresour Technol.* 99(15):6725-6737.
- Malonek S, Rojas MC, Hedden P, Gaskin P, Hopkins P, Tudzynski B (2004). The NADPH-cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis. *J Biol Chem.* 279(24):25075-25084.

- Marx CE, Bradford DW, Hamer RM, Naylor JC, Allen TB, Lieberman JA, Strauss JL, Kilts JD (2011).** Pregnenolone as a novel therapeutic candidate in schizophrenia: emerging preclinical and clinical evidence. *Neuroscience*. 191:78-90.
- Mendilaharsu M, De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Carzoglio J, Ronco A (1998).** Phytosterols and risk of lung cancer: a case-control study in Uruguay. *Lung Cancer*. 21(1):37-45.
- Miller WL (1988).** Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev*. 9(3):295-318.
- Miller WL, Auchus RJ (2011).** The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev*. 32(1):81-151.
- Moebius FF, Fitzky BU, Wietzorrek G, Haidekker A, Eder A, Glossmann H (2003).** Cloning of an emopamil-binding protein (EBP)-like protein that lacks sterol delta8-delta7 isomerase activity. *Biochem J*. 374(1):229-237.
- Moghrabi N, Andersson S (1998).** 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases: physiological roles in health and disease. *Trends Endocrinol Metab*. 9(7):265-270.
- Monk BC, Tomasiak TM, Keniya MV, Huschmann FU, Tyndall JD, O'Connell JD 3rd, Cannon RD, McDonald JG, Rodriguez A, Finer-Moore JS, Stroud RM (2014).** Architecture of a single membrane spanning cytochrome P450 suggests constraints that orient the catalytic domain relative to a bilayer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(10):3865-3870.
- Moruisi KG, Oosthuizen W, Opperman AM (2006).** Phytosterols/stanols lower cholesterol concentrations in familial hypercholesterolemic subjects: a systematic review with meta-analysis. *J Am Coll Nutr*. 25(1):41-48.
- Munro AW, Leys DG, McLean KJ, Marshall KR, Ost TW, Daff S, Miles CS, Chapman SK, Lysek DA, Moser CC, Page CC, Dutton PL (2002).** P450 BM3: the very model of a modern flavocytochrome. *Trends Biochem Sci*. 27(5):250-257.
- Munro AW, Girvan HM, McLean KJ (2007).** Variations on a (t)heme-novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Nat Prod Rep*. 24(3):585-609.
- Munro AW, Girvan HM, Mason AE, Dunford AJ, McLean KJ (2013).** What makes a P450 tick? *Trends Biochem Sci*. 38(3):140-150.
- Nakajin S, Shively JE, Yuan PM, Hall PF (1981).** Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis: two enzymatic activities (17 alpha-hydroxylase and c17,20-lyase) associated with one protein. *Biochemistry*. 20(14):4037-4042.
- Nassiri-Koopaei N, Faramarzi MA (2015).** Recent developments in the fungal transformation of steroids, Biocatal Biotransformation. 33(1):1-18.
- Naumann JM, Messinger J, Bureik M (2010).** Human 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1)-dependent biotransformation with recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biotechnol*. 150:161-170.
- Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM (2008).** Lehninger principles of biochemistry. 5th edition. New York, WH Freeman.
- Nes WD, McCourt BS, Zhou WX, Ma J, Marshall JA, Peek LA, Brennan M (1998).** Overexpression, purification, and stereochemical studies of the recombinant (S)-adenosyl-L-methionine: delta 24(25)- to delta 24(28)-sterol methyl transferase enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys*. 353(2):297-311.
- Omura T, Sato R (1962).** A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem*. 237:1375-1376.
- Ooi LG, Liong MT (2010).** Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings. *Int J Mol Sci*. 11(6):2499-2522.
- Ortiz de Montellano PR (2005).** Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Ortiz de Montellano PR (2010).** Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. *Chem Rev*. 110(2):932-948.

- Ouellet H, Johnston JB, Ortiz de Montellano PR (2010).** The *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome P450 system. Arch Biochem Biophys. 493(1):82-95.
- Paine MJI, Scrutton NS, Munro AW, Gutierrez A, Roberts GCK, Wolf CR (2005).** Electron transfer partners of cytochrome P450. In Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Paraszkiewicz K, Długonski J (1998).** Cortisolone 11 β -hydroxylation in protoplasts of *Curvularia lunata*. J Biotechnol. 65(2-3): 217-224.
- Parish T, Stoker NG (1998).** Mycobacteria Protocols. Totowa, N.J., Humana Press.
- Pearson A, Budin M, Brocks JJ (2003).** Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(26):15352-15357.
- Pereira DI, Gibson GR (2002).** Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. Appl Environ Microbiol. 68(9):4689-4693.
- Pereira M, Song Z, Santos-Silva LK, Richards MH, Nguyen TT, Liu J, de Almeida -Soares CM, da Silva-Cruz AH, Ganapathy K, Nes WD (2010).** Cloning, mechanistic and functional analysis of a fungal sterol C24-methyltransferase implicated in brassicasterol biosynthesis. Biochim Biophys Acta. 1801(10):1163-1174.
- Perera R, Sono M, Sigman JA, Pfister TD, Lu Y, Dawson JH (2003).** Neutral thiol as a proximal ligand to ferrous heme iron: implications for heme proteins that lose cysteine thiolate ligation on reduction. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(7):3641-3646.
- Peter M, Dubuis JM, Sippell WG (1999).** Disorders of the aldosterone synthase and steroid 11 β -hydroxylase deficiencies. Horm Res. 51(5):211-222.
- Peterson DH, Murray HC, Eppstein SH, Reineke LM, Weintraub A, Meister PD, Leigh HM (1952).** Microbiological transformations of steroids. I. Introduction of oxygen at Carbon-11 of progesterone. J Am Chem Soc 74(23), 5933-5936.
- Petric S, Hakki T, Bernhardt R, Zigon D, Cresnar B (2010).** Discovery of a steroid 11 α -hydroxylase from *Rhizopus oryzae* and its biotechnological application. J Biotechnol 150(3):428-437.
- Perfumo A, Smyth TJP, Marchant R, Banat IM (2010).** Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. 1479-1490.
- Pharmacia Corporation (US) (2006).** *Aspergillus ochraceus* 11 α -hydroxylase an oxidoreductase. Suzanne BL (US), Clayton RA (US), Easton AM (US), Engel LC (US), Messing DM (US), Ng JS (US), Reltz B (US), Walker MC (US), Wang PT (US). C12N 9/02, C12N 15/53. US7033807.
- Philipp B (2011).** Bacterial degradation of bile salts. Appl Microbiol Biotechnol. 89(4):903-915.
- Pikuleva IA, Waterman MR (2013).** Cytochromes p450: roles in diseases. J Biol Chem. 288(24):17091-17098.
- Plemenitas A, Zakelj-Mavric M, Komel R (1988).** Hydroxysteroid dehydrogenase of *Cochliobolus lunatus*. J Steroid Biochem. 29(3):371-372.
- Prakash A, Kasbekar DP (2002).** The sterol C-14 reductase encoded by the *Neurospora crassa* erg-3 gene: essential charged and polar residues identified by site-specific mutagenesis. Mol Genet Genomics. 266(5):787-795.
- Rehm JH, Reed G (1984).** Biotechnology, Biotransformations, Klambt- Druck GmbH, Speyer, Germany, 6a:31-79.
- Rizner TL, Adamski J, Zakelj-Mavric M (2001).** Expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in mesophilic and extremophilic yeast. Steroids. 66(1):49-54.
- Rowland P, Blaney FE, Smyth MG, Jones JJ, Leydon VR, Oxbrow AK, Lewis CJ, Tennant MG, Modi S, Eggleston DS, Chenery RJ, Bridges AM (2006).** Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. J Biol Chem. 281(11):7614-7622.

Ruijsenaars HJ, Sperling EM, Wiegerinck PH, Brands FT, Wery J, de Bont JA (2007). Testosterone 15 β -hydroxylation by solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12. J. Biotechnol. 131:205-208.

Saher G, Quintes S, Nave KA (2011). Cholesterol: a novel regulatory role in myelin formation. Neuroscientist. 17(1):79-93.

Sakaki T, Sawada N, Nonaka Y, Ohyama Y, Inouye K (1999). Metabolic studies using recombinant *Escherichia coli* cells producing rat mitochondrial CYP24. CYP24 can convert 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ to calcitric acid. Eur J Biochem. 262:43-48.

Sakaki T, Yamamoto K, Ikushiro S (2013). Possibility of application of cytochrome P450 to bioremediation of dioxins. Biotechnol Appl Biochem. 60(1):65-70.

Salamanca-Pinzón SG, Guengerich FP (2011). A tricistronic human adrenodoxin reductase-adrenodoxin-cytochrome P450 27A1 vector system for substrate hydroxylation in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif. 79(2):231-236.

Sambamurthy K, Kar A (2006). Biotransformation process and its improvement with the special reference to steroids, in Pharmaceutical Biotechnology, Published by New Age International, Daryaganj, New Delhi.

Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.

Santamaria RI, Gil JA, Martin JF (1985). High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. J Bacteriol. 162(1):463-467.

Schering Aktiengesellschaft (Alemania) (1982). Process for the preparation of 11 β -hydroxysteroids. Petzoldt K (Alemania), Annen K (Alemania), Laurent H (Alemania), Wiechert R (Alemania). C12P 33/08. US4353985

Schiffer L, Anderko S, Hobler A, Hannemann F, Kagawa N, Bernhardt R (2015). A recombinant CYP11B1 dependent *Escherichia coli* biocatalyst for selective cortisol production and optimization towards a preparative scale. Microb Cell Fact. 14:25.

Schuster I (2011). Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. Biochim Biophys Acta. 1814(1):186-199.

Schwarz M, Lund EG, Lathe R, Björkhem I, Russell DW (1997). Identification and characterization of a mouse oxysterol 7 α -hydroxylase cDNA. J Biol Chem. 272(38):23995-24001.

Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM, Turley SD (2001). Alternate pathways of bile acid synthesis in the cholesterol 7 α -hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or cholestyramine feeding. J Lipid Res. 42(10):1594-1603.

Scott EE, Wolf CR, Otyepka M, Humphreys SC, Reed JR, Henderson CJ, McLaughlin LA, Paloncova M, Navratilova V, Berka K, Anzenbacher P, Dahal UP, Barnaba C, Brozik JA, Jones JP, Estrada F, Laurence JS, Park JW, Backes WL (2016). The Role of Protein-Protein and Protein-Membrane Interactions on P450 Function. Drug Metab Dispos.

Sedlaczek L (1988). Biotransformations of steroids. Crit Rev Biotechnol. 7(3):187-236.

Setchell KD, Schwarz M, O'Connell NC, Lund EG, Davis DL, Lathe R, Thompson HR, Weslie Tyson R, Sokol RJ, Russell DW (1998). Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. J Clin Invest. 102(9):1690-1703.

Shuvalova SD, Gabinskaya KN, Popova EV, Savinova TS, Andryushina VA (2001). Hydroxylation of androst-4-ene-3,17-dione with the aid of *Curvularia lunata* fungus. Pharm Chem J. 35(5):279-281.

Shyadehi AZ, Lamb DC, Kelly SL, Kelly DE, Schunck WH, Wright JN, Corina D, Akhtar M (1996). The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* (other names are: lanosterol 14 α -demethylase, P-45014DM, and CYP51). J Biol Chem. 271(21):12445-12450.

- Siewers V, Smedsgaard J, Tudzynski P (2004).** The P450 monooxygenase BcABA1 is essential for abscisic acid biosynthesis in *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol.* 70(7):3868-3876.
- Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH (2005).** Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev.* 26(4):525-582.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR, Bulun SE (1994).** Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev.* 15(3):342-355.
- Skaggs BA, Alexander JF, Pierson CA, Schweitzer KS, Chun KT, Koegel C, Barbuch R, Bard M (1996).** Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis. *Gene.* 169(1):105-109.
- Slaytor M, Bloch K (1965).** Metabolic transformation of cholestenediols. *J Biol Chem.* 240(12):4598-4602.
- Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, Kieser T, Jacobs WR Jr (1990).** Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol.* 4(11):1911-1919.
- Sonomoto K, Hoq MM, Tanaka A, Fukui S (1983).** 11beta-Hydroxylation of Cortisol (Reichstein Compound S) to Hydrocortisone by *Curvularia lunata* Entrapped in Photo-Cross-Linked Resin Gels. *Appl Environ Microbiol.* 45(2):436-443.
- Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, et al (1991).** New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature.* 351(6326):456-460.
- Sudhop T, Sahin Y, Lindenthal B, Hahn C, Lüers C, Berthold HK, Von Bergmann K (2002).** Comparison of the hepatic clearances of campesterol, sitosterol, and cholesterol in healthy subjects suggests that efflux transporters controlling intestinal sterol absorption also regulate biliary secretion. *Gut.* 51(6):860-863.
- Sudhop T, Sahin Y, Lindenthal B, Hahn C, Lüers C, Berthold HK, von Bergmann K (2004).** Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis.* 3(1):5.
- Sudhop T, Lutjohann D, von Bergmann K (2005).** Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs. *Pharmacol Ther.* 105(3):333-341.
- Sugimoto H, Shinkyo R, Hayashi K, Yoneda S, Yamada M, Kamakura M, Ikushiro S, Shiro Y, Sakaki T (2008).** Crystal structure of CYP105A1 (P450SU-1) in complex with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochemistry.* 47(13):4017-4027.
- Swank RT, Munkres KD (1971).** Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem.* 39(2):462-477.
- Szcebara FM, Chandelier C, Villeret C, Masurel A, Bourot S, Duport C, Blanchard S, Groisillier A, Testet E, Costaglioli P, Cauet G, Degryse E, Balbuena D, Winter J, Achstetter T, Spagnoli R, Pompon D, Dumas B (2003).** Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat Biotechnol.* 21(2):143-149.
- Tuckey RC, Cameron KJ (1993).** Catalytic properties of cytochrome P-450scc purified from the human placenta: comparison to bovine cytochrome P-450scc. *Biochim Biophys Acta.* 1163(2):185-194.
- Tullius MV, Harmston CA, Owens CP, Chim N, Morse RP, McMath LM, Iniguez A, Kimmey JM, Sawaya MR, Whitelegge JP, Horwitz MA, Goulding CW (2011).** Discovery and characterization of a unique mycobacterial heme acquisition system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(12):5051-5056.
- Uhía I, Galán B, Kendall SL, Stoker NG, García JL (2012).** Cholesterol metabolism in *Mycobacterium smegmatis*. *Environ Microbiol Rep.* 4(2):168-82.

Undisz K, Groh H, Stopsack H, Horhold-Schubert C (1992). Bioconversion of steroids by *Cochliobolus lunatus*. 11 beta-hydroxylation of 17 alpha, 21-dihydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione 17-acetate in dependence of the inducer structure. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 43(6):543-547.

Univerza v Ljubljani (Eslovenia) (2009). Cytochrome P450 from *Rhizopus oryzae* and uses thereof. Bernhardt R (Alemania), Cresnar B (Eslovenia), Hakki T (Alemania), Petric S (Eslovenia). *C12N 15/81, C12N 5/00, C07K 14/00.* EP2308983; WO2011042143A1

Unthan S, Baumgart M, Radek A, Herbst M, Siebert D, Brühl N, Bartsch A, Bott M, Wiechert W, Marin K, Hans S, Krämer R, Seibold G, Frunzke J, Kalinowski J, Rückert C, Wendisch VF, Noack S (2015). Chassis organism from *Corynebacterium glutamicum*--a top-down approach to identify and delete irrelevant gene clusters. *Biotechnol J.* 10(2):290-301.

Urlacher VB, Eiben S (2006). Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* 24(7):324-330.

Urlacher VB, Girhard M (2012). Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol* 30:26-36.

Van der Geize R, Hessels GI, Van Gerwen R, Vrijbloed JW, Van der Meijden P, Dijkhuizen L (2000). Targeted Disruption of the *kstD* Gene Encoding a 3-Ketosteroid D1-Dehydrogenase Isoenzyme of *Rhodococcus erythropolis* Strain SQ1. *Appl Environ Microbiol.* 66:2029-2036.

Van Horn L, McCoin M, Kris-Etherton PM, Burke F, Carson JA, Champagne CM, Karmally W, Sikand G (2008). The evidence for dietary prevention and treatment of cardiovascular disease. *J Am Diet Assoc.* 108(2):287-331.

Venkateswarlu K, Kelly DE, Kelly SL (1997). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP51 and a CYP51 fusion protein with NADPH cytochrome P-450 oxidoreductase expressed in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(4):776-780.

Vitas M, Smith K, Rozman D, Komel R (1994). Progesterone metabolism by the filamentous fungus *Cochliobolus lunatus*. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 49(1):87-92.

Vitas M, Rozman D, Komel R, Kelly SL (1995). P450-mediated progesterone hydroxylation in *Cochliobolus lunatus*. *J Biotechnol.* 42(2):145-150.

Wang FQ, Zhao Y, Dai M, Liu J, Zheng GZ, Ren ZH, He JG (2008). Cloning and functional identification of C-4 methyl sterol oxidase genes from the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*. *FEMS Microbiol Lett.* 287(1):91-99.

Wang FQ, Yao K and Wei DZ (2011). From soybean phytosterols to steroid hormones. *Soybean and health.* 11:231-252.

Warrilow A, Ugochukwu C, Lamb D, Kelly D, Kelly S (2008). Expression and characterization of CYP51, the ancient sterol 14-demethylase activity for cytochromes P450 (CYP), in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Lipids.* 43(12):1143-1153.

Warrilow AG, Martel CM, Parker JE, Melo N, Lamb DC, Nes WD, Kelly DE, Kelly SL (2010). Azole binding properties of *Candida albicans* sterol 14-alpha demethylase (CaCYP51). *Antimicrob Agents Chemother.* 54(10):4235-4245.

Wei W, Wang FQ, Fan SY, Wei DZ (2010). Inactivation and augmentation of the primary 3-ketosteroid-Δ1-dehydrogenase in *Mycobacterium neoaurum* NwLB-01: biotransformation of soybean phytosterols to 4-androstene-3,17-dione or 1,4-androstadiene-3,17-dione. *Appl Environ Microbiol.* 76:4578-4582.

Xu LQ, Liu YJ, Yao K, Liu HH, Tao XY, Wang FQ, Wei DZ (2016). Unraveling and engineering the production of 23,24-bisnorcholelic steroids in sterol metabolism. *Sci Rep* 22(6):21928-21941.

Wuts PG, Anderson AM, Ashford SW, Goble MP, White MJ, Beck D, Gilbert I, Hrab RE (2008). A chemobiological synthesis of eplerenone. *Synlett.* 3:418-422.

- Yaderets VV, Andriushina VA, Bartoshevich YE, Domracheva AG, Novak MI, Stytsenko TS, Voishvillo NE (2007).** A study of steroid hydroxylation activity of *Curvularia lunata* mycelium. *Appl Biochem Microbiol.* 43(6):620–624.
- Yau YC, de Nanassy J, Summerbell RC, Matlow AG, Richardson SE (1994).** Fungal sternal wound infection due to *Curvularia lunata* in a neonate with congenital heart disease: case report and review. *Clin Infect Dis.* 19(4):735-740.
- Zakelj-Mavric M, Belic I, Gottlieb HE (1986).** The bioconversion of 17 α -ethynyl steroids with 11 α -hydroxylase of *Rhizopus nigricans*. *FEMS Microbiology Letters.* 33:117-120.
- Zakelj-Mavric M, Belic I (1987).** Hydroxylation of steroids with 11 α -hydroxylase of *Rhizopus nigricans*. *J Steroid Biochem.* 28(2):197-201.
- Zakelj-Mavric M, Kastelic-Suhadolc T, Gottlieb HE, Belic I (1989).** Hydroxylation of steroids with nonpolar side chains with 11 α -hydroxylase of *Rhizopus nigricans*. *J Steroid Biochem.* 33(2):287-288.
- Zakelj-Mavric M, Plemenitas A, Komel R, Belic I (1990).** 11 β -hydroxylation of steroids by *Cochliobolus lunatus*. *J Steroid Biochem.* 35(5):627-629.
- Zakelj-Mavric M, Belic I (1991).** Induction of steroidal 11 β -hydroxylase of *Cochliobolus lunatus*. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 38(1):117-118.
- Zehentgruber D, Hannemann F, Bleif S, Bernhardt R, Lütz S (2010).** Towards preparative scale steroid hydroxylation with cytochrome P450 monooxygenase CYP106A2. *ChemBioChem.* 11:713-721.
- Zuidweg MH, Van Derwaard WF, DeFlines J (1962).** Formation of hydrocortisone by hydroxylation of Reichstein's compound S with an enzyme preparation from *Curvularia lunata*, *Biochim Biophys Acta.* 58:131–133.
- Zuidweg MH (1968).** Hydroxylation of Reichstein's compound S with cell-free preparations from *Curvularia lunata*. *Biochim Biophys Acta.* 152(1):144-158.
- Zweytick D, Hrastnik C, Kohlwein SD, Daum G (2000).** Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, erg4p, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 470(1):83-87.

