

BIOTRANSFORMACIONES

Pedro Miró Roig

Centro de Investigación de CEPESA

Picos de Europa, 7

Torrejón de Ardoz (Madrid)

En principio, entendemos por Biotransformación toda reacción química definida, o secuencia de ellas, en la que un reactivo ó sustrato se convierte en un producto por acción de un reactivo específico que es un catalizador biológico ó enzima, ó un conjunto de ellas. Aunque el empleo artesanal de los microorganismos por la humanidad se remonta a varios milenios, no fue hasta el siglo pasado que se estudiaron los primeros ejemplos de transformaciones biológicas definidas en cuanto a reactivo (s) y producto (s). Posteriormente hubo que esperar hasta la mitad de este siglo para que, gracias a la importancia de las biotransformaciones en el desarrollo de la industria - de los esteroides, aquéllos tuvieran una repercusión notable a nivel industrial. En esta conferencia quisieramos resaltar el carácter multidisciplinar de la biotecnología, en general, y el empirismo que rige las biotransformaciones industriales. Ante las pasiones que despiertan los temas biotecnológicos en la actualidad, ofrecemos una postura cautelosa. Las posibilidades de las biotransformaciones en la industria farmacéutica son múltiples, especialmente en síntesis y estudios metabólicos, pero el carácter multidisciplinar indicado exige unos re cursos notables tanto en I+D como en fabricación.

La producción de productos farmacéuticos constituye la principal aplicación de la Biotecnología, si exceptuamos los tratamientos de residuos, y representa un mercado considerable. Podemos decir que, para un mercado total mundial de aprox. 60.000 millones US \$, entre un 10-15% corresponde a productos obtenidos mediante procesos biotecnológicos. Bajo otro punto de vista observamos que la mayoría de empresas con actividades biotecnológicas (60% sobre un total de 600) están involucradas en el sector farmacéutico¹.

Desde el descubrimiento e industrialización de la producción de la penicilina, en 1941-42, se ha abierto una nueva vía para la obtención de drogas: la explotación de las capacidades sintéticas de los seres vivos. Estas permiten obtener: antibióticos, vitaminas, esteroides, alcaloides, aminoácidos, enzimas, factores sanguíneos, hormonas, vacunas y anticuerpos monoclonales.

En esta conferencia describiremos las actividades de Cepsa y otros grupos en este sector. Más concretamente el empleo de las Biotransformaciones para la obtención de productos o intermedios farmacéuticos.

Probablemente este objetivo necesite una aclaración. En primer lugar puede sorprender que una compañía como Cepsa, con clara vocación refinera, esté involucrada en este sector. Existen múltiples razones para ello: económicas, estratégicas y históricas. Ante todo hace falta tener una situación económica saneada para poder desarrollar actividades biotecnológicas que, como veremos, requieren inversiones importantes. Además Cepsa tiene como misión diversificar sus actividades hacia otros campos, p. ej. la obtención de intermedios y materias primas para la industria farmacéutica. Esta voluntad se ha plasmado en la adquisición de Esteroides, S.A. y Cesquisa. Finalmente, al igual que otras empresas petrolíferas, Cepsa adquirió un know-how biotecnológico en los años 70, al intentar desarrollar un proyecto de proteínas unicelulares (SCP).

En segundo lugar, conviene definir lo que entendemos por Biotransformaciones. Solo así podremos delimitar, con cierta precisión, nuestro alcance. En principio, entendemos por Biotransformación toda reacción química definida, o secuencia de éllas, en la que un sustrato químicamente homogéneo es modificado por medio de sistemas enzimáticos.

El uso de enzimas para la síntesis de moléculas con alto grado de estereoespecificidad ha adquirido un interés creciente²⁻⁹. A partir de diversas bases de datos hemos podido recoger más de 2000 referencias durante los últimos cinco años. Aunque la mayoría de referencias industriales corresponden a procesos simples, p.ej. hidrólisis e isomerizaciones, se observa una intensa actividad para desarrollar sistemas complejos, que requieran la regeneración de cofactores.

El principal atractivo de las Biotransformaciones reside en su elevada especificidad, que permite elevar los rendimientos de los procesos al disminuir el número de subproductos. Esta especificidad abarca el tipo de reacción catalizada, regioselectividad y, lo que es más importante, enantioselectividad. Además los enzimas pueden ser flexibles en cuanto a los sustratos o condiciones de reacción, p.ej. la galactosa oxidasa de *Dactylium dendroides* puede oxidar diversos alcoholes aromáticos y alifáticos a sus correspondientes aldehidos¹⁰. Dicha versatilidad es, especialmente, interesante desde un punto de vista industrial, a tenor del coste que supone el desarrollo de una Biotransformación. Pero, asimismo, puede ser de gran utilidad en otros sectores donde se carezca de medios para obtener enzimas propios pero se puedan usar enzimas comerciales sobre sustratos no naturales. El empleo de sistemas enzimáticos sobre dichos sustratos, así como su utilización como alternativa a procesos químicos inviábiles, deberían ser las áreas de mayor impacto de las Biotransformaciones.

Sin embargo el desarrollo futuro de las Biotransformaciones se enfrenta con diversos problemas. Las condiciones suaves de las reacciones enzimáticas, a veces, son más perjudiciales que beneficiosas. Se trata de procesos de baja intensidad con las correspondientes consecuencias técnicas y económicas. A nivel de I+D las inver-

siones son costosas. El desarrollo de los programas es largo y, como luego veremos, se requieren grupos multidisciplinarios para alcanzar resultados satisfactorios. En cuanto a la fase productiva, existen importantes diferencias en el desglose analítico de costes de un proceso químico y otro biotecnológico. En un proceso químico los costes fijos son muy importantes pero los variables son poco sensibles a la escala. Contrariamente, en un proceso biotecnológico los costes fijos son bajos pero los variables son muy sensibles al volumen. Consecuentemente parece aconsejable que la Biotecnología se ocupe de productos de alto valor añadido y bajo tonelaje. No podemos olvidar que, normalmente, los procesos biotecnológicos compiten con procesos químicos, que se benefician de una economía de escala y un desarrollo notables.

El citado uso selectivo de las reacciones enzimáticas dentro de esquemas de síntesis químicos adquirió importancia en los años 50 para la obtención de esteroides. En Cepsa, durante los últimos 10 años, hemos desarrollado la mayoría de las biotransformaciones esteroideas empleadas industrialmente: 11α - y 11β -hidroxilación, 16α -hidroxilación, 3β -OH oxidación, $\Delta^{1,2}$ -deshidrogenación y degradación de la cadena lateral¹¹⁻¹⁴. Se trata de procesos altamente atractivos, tanto desde un punto de vista económico como científico. Por una parte, los esteroides constituyen un mercado maduro pero con un volumen considerable (1800 MM US \$). Por otra, se trata de biotransformaciones complejas, con sistemas multienzimáticos muy lábiles que precisan de sistemas de regeneración de cofactores y condicionan el empleo de células enteras en el proceso. Por todo lo expuesto podría parecer un caso ideal para el empleo de células inmovilizadas¹⁵. Sin embargo no conocemos ningún caso de utilización a escala industrial. La baja solubilidad de los esteroides en medio acuoso y la labilidad de los sistemas enzimáticos en medios orgánicos ha impedido el uso de los reactores con células inmovilizadas.

Ante esta problemática, la mayoría de biotransformaciones esteroideas se realizan según un esquema standard. El sustrato convenientemente preparado se añade sobre un cultivo, normalmente en fase estacionaria, para su conversión. Cuando se completa la transforma

ción, se extrae el cultivo y se purifica el producto. En este proceso existen una serie de factores críticos para conseguir explotar industrialmente una biotransformación. La característica más notable de estos factores es su diversidad, lo que exige el soporte de distintas disciplinas. En esta conferencia nos ocuparemos únicamente de tres etapas: preparación del sustrato, cultivo del microorganismo y extracción del caldo.

La preparación del sustrato incluye toda aquella serie de operaciones necesarias para conseguir que su forma física sea la que permita obtener una mayor productividad o velocidad de reacción, unido a elevadas conversiones. Además, a veces, pueden precisarse reacciones químicas específicas que, al introducir modificaciones estructurales en el sustrato, mejoren la selectividad de la reacción deseada. Veamos algunos ejemplos ilustrativos.

Normalmente, tal como se indicó, el sustrato es escasamente soluble en medios acuosos a temperatura ambiente ($\ll 1$ g/l), lo que implica que la concentración del mismo en las proximidades del enzima es baja. Por otra parte, a menudo, no se emplean sustratos naturales sino análogos, lo que da lugar a altas K_m y, en consecuencia, conversiones poco eficientes. La literatura recoge numerosos intentos realizados para compensar estos problemas: adición de disolventes orgánicos¹⁶, uso de micelas reversas¹⁷, "pseudocristalofermentación"¹⁸, uso de células inmovilizadas en matrices hidrofóbicas¹⁹, coimmobilización del sustrato y el enzima²⁰, etc. En cualquier caso se trata de facilitar el contacto enzima-sustrato. En nuestro caso hemos escogido diversos métodos físicoquímicos por su simplicidad y bajo coste. La micronización del sustrato (TRIAC) permite obtener la Sustancia de Reichstein S, intermedio para la producción de hidrocortisona y prednisolona, con elevado rendimiento y velocidad de reacción. Dicho pretratamiento físicoquímico del sustrato reduce su tamaño de partícula hasta aprox. 5μ ; otros métodos, como la liofilización, son menos eficaces y su efecto menos pronunciado. Este efecto positivo del tamaño de partícula se pone también de manifiesto en la oxidación de la 17α -OH-pregnenolona.

Para la producción de hidrocortisona es precisa la introducción de un grupo 11β -hidroxilo en el esqueleto esteroidal. Normalmente se emplea el hongo *Curvularia lunata* que tiene el inconveniente de producir, al mismo tiempo, hidroxilaciones indeseables en 7α y 14α . Gist Brocades descubrió que estas reacciones secundarias se evitan empleando un 17-acetato de la Sustancia S en el que el éster protege estericamente del ataque no deseado por la cara α del sustrato sin perjudicar la 11β -hidroxilación²¹.

Resumiendo, la preparación del sustrato requiere de conocimientos de fisico-química y de química orgánica para remediar los problemas que plantean la baja solubilidad de los esteroides en medio acuoso y la escasa selectividad de algunas biotransformaciones.

El cultivo del microorganismo plantea, a su vez, varios interrogantes: hay que decidir qué microorganismo se utiliza y, posteriormente, en qué condiciones se cultiva. Normalmente se recurre a las colecciones oficiales para resolver los problemas que se plantean. Así, por ejemplo, *Flavobacterium dehydrogenans*, una bacteria estudiada por Schering Plough y Gist Brocades para la hidrólisis de ésteres de alcoholes primarios y secundarios, es especialmente apropiada para la obtención de prednisona y triamcinolona. La hidrólisis alcalina de los precursores, $11\beta,21$ -diacetatos, presenta diversos problemas: baja solubilidad del esteroide, baja conversión y selectividad, etc. En cambio, la hidrólisis microbiológica tiene un rendimiento superior al 98% para concentraciones superiores a 10 g/l. En otros casos, según las características del problema planteado puede llegar a plantearse un "screening" de microorganismos para seleccionar aquél que posea la actividad deseada. Así, en nuestro grupo hemos desarrollado un cultivo mixto, compuesto por *Arthro bacter* sp. y *Bacillus sphaericus*, para conseguir la dienización del anillo A. Esta deshidrogenación es necesaria para compensar la indeseable actividad mineralocorticoide que acompaña a las propiedades glucocorticoideas y antiinflamatoria de los fluorocorticoides. Dado el interés de esa reacción se han propuesto numerosas alternativas químicas: bromación-deshidrobromación en las posiciones α y α' de la cetona en C-3²², DDQ²³ y derivados del selenio²⁴. Sin embargo, ninguna de ellas permite lograr los mismos rendimientos que el cultivo mixto.

Anteriormente hemos mencionado que la mayoría de los cultivos se utilizan en su fase estacionaria. Sin embargo, cuando se optimizan las condiciones de una biotransformación podemos observar notables excepciones. En cualquier cultivo se pretende maximizar la expresión de la actividad enzimática deseada. La mayoría de estos procesos redox requieren, según se indicó, sistemas multienzimáticos muy lábiles, lo que limita su productividad. Consecuentemente, para optimizar su explotación hace falta un estudio detallado de las condiciones de -cultivo. Así Gedeon Richter observó que la velocidad específica de síntesis de la $\Delta^{1,2}$ -DHasa de *Arthrobacter simplex* es máxima a las doce horas de cultivo, cuando el mismo se halla en fase exponencial²⁵. Este hallazgo tiene especial relevancia en la obtención de predniderivados ya que estos productos cocrystalizan con sus sustratos impidiendo una conversión total. En estas circunstancias es recomendable emplear una relación concentración de enzima a concentración de sustrato máxima. En otros casos la composición del medio de cultivo puede ser crítica para la selectividad de la biotransformación. Así la oxidación del acetato de pregnenolona con *Flavobacterium dehydro*genans es selectiva si se emplea extracto de levadura como fuente de nitrógeno, pero da lugar a una mezcla de sustancias polares si se usa harina de soja.

Por consiguiente, la optimización del cultivo del microorganismo requerirá de una serie de estudios independientes, que se inician con la selección o "screening" de la cepa adecuada y terminan con el análisis de su fisiología.

Por último, un factor limitante para el desarrollo de las Biotransformaciones y, de la Biotecnología, en general, es la purificación y recuperación de productos (P&R) ó "downstream processing". Si comparamos las mezclas de reacción típicas de una biotransformación y de una reacción química detectamos importantes diferencias. En una biotransformación el producto se halla menos concentrado, el disolvente es agua, los productos son lábiles y, normalmente, van acompañados de múltiples compuestos resultantes del cultivo. Por todo ello resulta imposible aplicar los sistemas de P&R standards de la industria química. En nuestro caso nos han resultado especialmente útiles los extractores de columna con platos vibratorios tipo Karr²⁶. Estos sistemas se caracterizan por su elevada eficacia, bajo consumo de disolvente, inversión moderada y mantenimiento mínimo. Así por ejem-

plo el P.VIII se extrae con un rendimiento superior al 98% con una relación MIBK/caldo de 1/1 (v/v). Pero a pesar de estos buenos resultados puntuales hace falta una mayor atención a los temas de P&R. Desde un punto de vista económico es una fase crítica, que puede representar hasta el 60% de la inversión total de una planta industrial. Además, desde un punto de vista técnico hace falta que los bioingenieros desarrollen nuevos sistemas multipropósito pero, a la vez, eficaces.

Aunque los esteroides constituyen el ejemplo clásico de utilización de las biotransformaciones y, probablemente, el único tipo de productos en los que su empleo resulta imprescindible, su aplicación para la obtención de otros productos farmacéuticos es cada día más importante. Aunque la experiencia de Cepsa es muy limitada en otros sectores, la literatura nos ofrece numerosos ejemplos.

Dentro de los antibióticos existe un interés creciente por los β -lactámicos semisintéticos. Estos productos se obtienen, respectivamente, a partir del 6-APA y del 7-ACA, y distintos restos acilo. De esta forma se incrementa su estabilidad frente las β -lactamasas, se amplía su espectro de actividad y se posibilita la administración oral²⁷. Dado que la producción de cefalospirana C es mucho menor y que diversas cefalosporinas semisintéticas se pueden obtener por reagrupamiento del anillo tiazolidínico de la estructura penicilínica, la penicilina G ha pasado a ser un intermedio estratégico. Esta se hidroliza industrialmente a 6-APA mediante células o enzimas inmovilizados^{28,29}. Estas amidasas han sido utilizadas con fines sintéticos para obtener β -lactamas semisintéticas. Sin embargo el principal uso industrial de las amidasas con esos fines ha sido la transformación de insulina porcina en humana por parte de Novo³⁰. La tripsina cataliza la reacción de transpeptidación entre la insulina porcina y el éster metílico de la treonina.

Las biotransformaciones se han empleado intensamente para la producción de aminoácidos. Tanto la hidrólisis enantioselectiva de mezclas racémicas N-aciladas de aminoácidos³¹ como la adición de amoniaco a fumarato para obtener L-aspartato³² son biotransformaciones clásicas. Recientemente se ha empleado otros enzimas, amidasas y las hidantoinasas para la resolución de racematos. Así DSM³³ ha desarrollado un

proceso enzimático basado en la hidrólisis estereoespecífica de amidas de aminoácidos racémicos mediante el uso de una L-aminopeptidasa de *Pseudomonas putida*. Por su parte, Degussa y el Instituto de Biotecnología de Jülich³⁴ ha puesto a punto un procedimiento para la producción en continuo de L-Phe a partir del ácido acetamidocinámico (ACA). En la primera reacción se hidroliza el ACA empleando una acilasa de *Brevibacterium* sp. La imina resultante es inestable y se descompone a fenilpiruvato. Este intermedio proquiral se transforma en L-Phe usando un sistema multienzimático. El cofactor necesario, NAD/NADH, se regenera hasta 200000 veces empleando el enzima formiato deshidrogenasa. Este caso constituye la primera biotransformación industrial en la que se regenera un cofactor. A parte de la novedad tecnológica que suponen estas biotransformaciones merece destacarse el hecho de haberse desarrollado en Europa. Este hecho supone una importante novedad, si tenemos en cuenta el papel predominante jugado por Japón en este campo.

Si consideramos el mercado de las vitaminas, la vitamina C constituye el principal producto con unas ventas mundiales de 40.000 Tm y un valor de 400 MM US \$. Su producción a partir de glucosa es un proceso clásico que contempla la oxidación microbiológica del sorbitol a sorbosa. Esta biotransformación se efectúa con elevado rendimiento y concentraciones de sustrato. En los años 70 ya se propusieron varias biotransformaciones^{35,36} para acortar el esquema clásico³⁷, pero ninguna de ellas fué utilizada industrialmente. Sin embargo, recientemente, se ha puesto en marcha un nuevo proceso en China que emplea un cultivo mixto³⁸. Este cultivo se compone de un *Gluconobacter* y un *Bacillus*, y permite transformar la L-sorbosa a ácido 2-ceto-L-gulónico con un rendimiento superior al 90% y usando una concentración de 10 g sustrato/l. Aunque no se trate de una Biotransformación, según la definición inicial, merece citarse el proceso desarrollado por Genentech y Genencor usando la tecnología del ADN recombinante³⁹. El gen que codifica la producción del enzima que reduce el grupo 5-ceto ha sido aislado a partir de un *Corynebacterium* y clonado en una levadura. Dicho huésped, *Erwinia herbicola*, produce, en una sola etapa, el ácido 2,5-diceto-D-glucónico a partir de glucosa. Otro ejemplo de la utilidad de las biotransformaciones lo encontramos en la obtención del ácido D-pantoténico. La síntesis de esta vitamina

requiere la obtención de la correspondiente γ -lactona como intermedio. Se han descrito varios microorganismos que permiten obtener ese intermedio quiral: *Byssoschlamys fulva*⁴⁰, *Rhodotorula* sp., *Candida* sp., *Aspergillus* sp.⁴¹, etc. De nuevo se trata de una conversión factible a elevadas concentraciones de sustrato (30 g/l) y con buen rendimiento (>90%).

Resumiendo, hemos intentado demostrar con diversos ejemplos el carácter multidisciplinar de las biotransformaciones y sus amplias posibilidades. Una vez más diríamos que el futuro de las Biotransformaciones, al menos a nivel industrial, depende tanto de la destreza con que elijamos los objetivos como de nuestra capacidad para apoyarnos en otras tecnologías. Si esta cooperación se produce vislumbramos una utilización creciente de las Biotransformaciones, especialmente, a base de emplear condiciones de reacción no convencionales⁴²⁻⁴⁶.

Bibliografía

- (1) Kieslich, K. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 36, 774 (1986)
- (2) Kieslich, K. *Microbial Transf. of Non-Steroid Cyclic Compounds*. G.Thieme. Stuttgart (1976).
- (3) Rosazza, J.P. *Microbial Transformations of Bioactive Compounds*. CRC Press. Boca Raton. Florida (1982)
- (4) Ciba Foundation Symposium 111. *Enzymes in Organic Synthesis* (ed. R. Porter y S. Clarck). Pitman. Londres (1984)
- (5) Rehrn, H.J. y Reed, G. *Biotechnology*. Vol. 6A. (Biotransformations; ed. K.Kieslich). Verlag Chemie. Weinheim (1986)
- (6) Wong C.H. y Whitesides, G.M. *Aldrichimica Acta*, 16,27 (1984)
- (7) Whitesides, G.M. y Wong, C.H. *Angew.Chem.Intl.Ed.Engl.* 24,617 (1985)
- (8) Jones, J.B. *Tetrahedron*. 42,531 (1986)
- (9) Capek, A., Hanc, O. y Tadra, M. *Microbial Transformations of Steroids*. Academia. Praga (1966)
- (10) Klivanov, A.M. , Alberti, B.N. y Marletta, M.A. *Biochem. Biophys. Res.Comm.* 108,804 (1982)
- (11) Charney, W. y Herzog, H.L. *Microbial Transformations of Steroids*. Academic Press. New York (1967)
- (12) Smith, L.L. *A Specialist Periodical Report-Terpenoids and Steroids*, Vol. 4, pp. 394-530. The Chemical Society. Londres (1974)
- (13) Rose, A.H. *Economic Microbiology*. Vol. 5 (Microbial Enzymes and Bioconversions, pp. 369-465).Academic Press. New York (1980).

- (14) Iizuka, H. y Naito, A. Microbial Transformations of Steroids and Alkaloids. University of Tokyo Press. Tokyo (1981)
- (15) Kolot, F.B. Process Biochem. 18 Jan./Feb. p. 19 (1983)
- (16) Bhasin, D.P., Gryte, C.G., Studebaker, J.F. Biotechnol. Bioeng. 18, 1777 (1976)
- (17) Hilhorst, R. y col. Eur. J. Biochem. 144, 459 (1984)
- (18) Kondo, E. y Masuo, E. J.Gen.Appl.Microbiol. 7,113 (1961)
- (19) Mazumdar, T.K. y col. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21,154 (1985)
- (20) Kaul R., Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. Biotechnol. Bioeng. 28, 1432 (1986)
- (21) de Flines, J. y v.d. Waard, F. Pat. Holandesa 6605514 (1966).
- (22) Oliveto, E.P. y col. J. Am. Chem. Soc. 80,4431 (1958)
- (23) Zredic, J.A., Carpio, H., Limon, D.C. J. Org. Chem. 27, 1125 (1962)
- (24) Barton, D.H.R. y col. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1947 (1982)
- (25) Udvardy, E.N. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 21,237 (1974)
- (26) Karr, A.E. Separation Science and Technology 15, 877 (1980)
- (27) Demain, A.L. Science 214,987 (1981)
- (28) Brodelius, P. Adv. Biochem. Eng. 10,75 (1978)
- (29) Sevidge, T.A. Drugs Pharm. Sci. 22,171 (1984)
- (30) Markussen, J. Pat. Británica 2069502 (1980)
- (31) Izumi, Y., Chibata, I. y Itoh, T. Angew. Chem. Intl. Ed. Engl. 17,176 (1976)
- (32) Chibata, I., Tosa, T. y Sato, T. Method. Enzymol. 44,739 (1976)
- (33) Boesten, W.H.J. Pat. Americana 4172846 (1979)
- (34) Schmidt, E., Hummel, W. y Wandrey, C. 4º Congreso Europeo de Biotecnología. Amsterdam (1987)
- (35) Martin, C.K.A. y Perlman, D. Biotechnol. Bioeng. 17,1473 (1975)
- (36) Makover, S. y Preuss, D.L. Pat. Americana 3907639 (1975)
- (37) Liebster, J. y col. Chem. 50,395 (1956)
- (38) Kieslich, K. Comunicación personal.
- (39) Anderson, S. y col. Sci. 230,144 (1985)
- (40) Lanzilotta, R.P. y col. Appl. Microbiol. 27,130 (1974)
- (41) Shimizu, S., Hata, H. y Yamada, H. Agri.Biol.Chem. 48,2285 (1984)
- (42) Zaks, A., Klivanov, A.M. Science 224,1249 (1984)
- (43) Cambou, B., Klivanov, A.M. J.Am.Chem.Soc. 106,2687 (1984)
- (44) Zaks, A., Klivanov, A.M. Proc.Natl.Acad.Sci. 82,3192 (1985)
- (45) Kazandjian, R.Z., Dordick, J.S., Klivanov, A.M. Biotechnol. 28,417 (1986)
- (46) Laane, C., Boeren, S. y Vos, K. Trends in Biotechnol. 3,251(1985)