

# Biotransformación de colesterol empleando células libres de *Arthrobacter simplex* y *Mycobacterium* sp.

Celso Pérez, Adlín Chiong,\* Nury Llanes, Alina Falero, Emilia Hervé, Magdalena Fonseca y Elena Martí.

Departamento de Esteroides, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana.  
\*Grupo de Desarrollo, División de Producción de Biológicos, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, La Habana, Cuba.

Recibido: 17 de enero del 2000. Aceptado: 24 de noviembre del 2000.

Palabras clave: *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, biotransformación, colesterol.  
Key words: *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, biotransformation, cholesterol.

**RESUMEN.** La biotransformación de esteroides mediante microorganismos es una alternativa a la síntesis química total de este tipo de compuestos de reconocido interés en el tratamiento de diversas enfermedades que afectan al hombre y a los animales. Tales drogas incluyen corticosteroides, anticonceptivos, drogas geriátricas y hormonas sexuales, entre otros. Muchos microorganismos de diferentes géneros muestran la capacidad de degradar los esteroides naturales (colesterol,  $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol etc.), y esta capacidad ha sido explotada para obtener mutantes que degradan selectivamente la estructura química esteroidea, facilitando los pasos posteriores de síntesis. De todos los géneros microbianos, *Mycobacterium* y *Arthrobacter* han sido los más utilizados. La cepa *A. simplex* ATCC 6946 y el mutante *Mycobacterium* sp. NRRL B3683 fueron utilizados en un ensayo de biotransformación mixta, empleando el colesterol como sustrato. Ambos microorganismos mostraron similares características de crecimiento, tanto en medio mínimo como medio rico. El nitrato de níquel fue efectivo como inhibidor enzimático en los ensayos de biotransformación con células de *Arthrobacter*, ya que fue posible detectar androstadiendiona (ADD), androstendiona (AD) y testosterona (TES), a partir de colesterol. Por otra parte, los resultados de los ensayos de biotransformación mixta indican que los rendimientos se incrementan notablemente si el medio de fermentación se inocula inicialmente con células de *Arthrobacter*, se incuba durante las primeras 24 h para posteriormente finalizar con células de *Mycobacterium*.

**ABSTRACT.** Steroid biotransformation through microorganisms has been used as an alternative to the total chemical synthesis of various compounds of biochemical interest. They comprise sexual hormones, contraceptives, geriatric drugs, corticosteroids, etc., for the treatment of disorders affecting humans and animals. The capacity of metabolizing natural sterols i.e. cholesterol,  $\beta$ -sitosterol, campesterol, stigmasterol, etc., is widespread among different genera of microorganisms. This ability has been focused to obtain mutants, which degrade selectively, the steroidal structure, making easier further chemical synthesis of the final compounds. Of all genera, *Mycobacterium* and *Arthrobacter* have been the most employed, according to literature. The strain *A. simplex* ATCC 6946 and the mutant *Mycobacterium* sp. NRRL B3683 were used in a mixed biotransformation assay using cholesterol as a substrate. Both microorganisms showed similar growth parameters in rich and minimal media. Detection of androstadienedione (ADD), as well as androstenedione (AD) and testosterone (TES) in cholesterol biotransformation experiments indicated that enzyme inhibition by  $Ni^{2+}$  seems to be effective in *Arthrobacter* cells. Furthermore, ADD yield was higher if *Arthrobacter* cells were firstly added to the fermentation broth at the initial 24 h of incubation and following the *Mycobacterium* cells.

## INTRODUCCION

La biotransformación de esteroides naturales a precursores esteroideales avanzados mediante microorganismos ha representado en los últimos años una alternativa a la síntesis química total de esteroides de importancia biomédica y farmacológica. Tales drogas incluyen corticosteroides, anticonceptivos, drogas geriátricas y hormonas sexuales.<sup>1</sup>

En general, estos compuestos se pueden sintetizar de tres formas diferentes, a saber: por vía química, microbiológica o combinación de ambas. La vía microbiológica resulta más conveniente que la síntesis química total, debido a que es más selectiva y eficiente, ya que no da lugar a reacciones secundarias y los rendimientos finales son mayores.

Muchos géneros de microorganismos pueden utilizar los esteroides naturales de origen vegetal o animal, como fuentes de carbono y energía, degradando estos compuestos hasta  $CO_2$  y  $H_2O$ . Incluyen especies de *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, entre otros.<sup>1,2</sup>

Esta capacidad no tiene interés comercial. Sin embargo, la ruptura selectiva de la cadena lateral puede producir esteroides  $C_{19}$  o  $C_{22}$  con el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno intacto.<sup>3,4</sup> Tales compuestos son factibles de modificar químicamente para sintetizar esteroides de amplio uso en el tratamiento de diversas enfermedades.

La posibilidad de emplear conjuntamente células de *Arthrobacter simplex* y *Mycobacterium* sp. NRRL-B3683 pudiera favorecer los procesos de biotransformación, haciéndolos más eficientes. Otros autores<sup>9</sup> han reportado este tipo de fermentación mixta *Arthrobacter-Mycobacterium*, en dos pasos. La colesteno obtenida luego de un primer paso de degradación del colesterol mediante *A. simplex*, es extraída y utilizada posteriormente como sustrato en un segundo paso de fermentación con *Mycobacterium*. Esto favorece notablemente los rendimientos finales en ADD.

Este trabajo tuvo como objetivo ensayar una fermentación mixta *Arthrobacter-Mycobacterium*, de forma tal que la colesteno producida por las células de *Arthrobacter* vía oxidación del colesterol, fuera tomada directamente por las células de *Mycobacterium*, en el propio medio de fermentación, sin mediar ninguna purificación. Esta metodología de fermentación favorece igualmente un aumento en los rendimientos.

## MATERIALES Y METODOS

### Microorganismos

Se utilizó la cepa de colección *Mycobacterium* sp. NRRL-B3683, mutante bloqueado en la degradación de esteroides, que produce androstadiendiona como compuesto mayoritario. Se empleó además la cepa de *Arthrobacter simplex* ATCC6946, que degrada completamente los compuestos esteroideales.<sup>4,9</sup>

### Medios de cultivo

Medio rico NB, con la composición que se indica, por litro: 8 g caldo nutritivo (OXOID), 1 g extracto de levaduras, 0,5 g glicerol.<sup>10</sup> Medio mínimo MM, contiene las sales inorgánicas, por litro: 0,5 g  $K_2HPO_4$ , 0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , glucosa 10 g. Para evitar la formación de agregados celulares, en el caso de las células de micobacterias, se añade Tween 80 a los medios de cultivo.<sup>3</sup>

### Determinación de parámetros de crecimiento

Para la determinación de los parámetros de crecimiento, velocidad de multiplicación ( $\mu$ ) y tiempo de generación (Tg), se partió de cultivos frescos de ambos microorganismos, 18 a 20 h, en medio NB, con aproximadamente  $10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC)/mL. Fue inoculado 0,1 mL a 100 mL de me-

dios NB o MM, que contenían Tween 80, 0,1 % (p/v). En estas condiciones, los cultivos fueron incubados con agitación, 200 r/min, a 30 °C, y las muestras fueron tomadas a intervalos. La variación de las densidades ópticas (D.O.) de los cultivos fue tomada como una medida del crecimiento. Para el medio rico NB, las mediciones de D.O. se realizaron a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 540 nm, mientras que para el medio mínimo MM fue de 420 nm.

El cálculo de estos parámetros se realizó siguiendo los criterios clásicos para el crecimiento de microorganismos, tomando solo las densidades ópticas en la fase exponencial de crecimiento. Las curvas de crecimiento fueron realizadas por triplicado, tomando en cuenta sólo los valores promedio para los estimados estadísticos.<sup>11</sup>

### Sensibilidad al nitrato de níquel

Para estos fines, fueron preparadas placas de medio NB con diferentes concentraciones de nitrato de níquel. Posteriormente, se colocaron gotas de cultivos frescos NB sobre las placas. El crecimiento fue evaluado mediante apreciación visual de las placas luego de 48 h de incubación a 30 °C, contra una placa control sin el compuesto.

### Ensayos de biotransformación empleando nitrato de níquel

Cinco mililitros de cultivo MM fueron inoculados a partir de células de *Arthrobacter simplex*, crecidas previamente en medio NB, de 18 a 20 h con agitación a 30 °C. Luego de 48 h de incubación en las mismas condiciones, los cultivos fueron centrifugados a 6 000 r/min, 10 min, lavados con agua destilada y finalmente añadidos a 50 mL de MM + nitrato de níquel, 200 mg/L y 50 mg de colesterol resuspendido en 10 mL de Tween 40, 1 % (p/v).

Las muestras fueron tomadas y esterilizadas por autoclave, considerando diferentes tiempos de incubación, a 30 °C en zaranda, 200 r/min y finalmente, sometidas a análisis químico.

### Biotransformación mixta

Los cultivos de *Arthrobacter* fueron inoculados a una densidad celular inicial de 0,5 ( $\lambda$  540 nm), en 50 mL de medio de biotransformación que contenía 50 mg de colesterol. Luego de 24 h de incubación a 30 °C, las muestras fueron esterilizadas en autoclave. Todos los cultivos fueron entonces inoculados en iguales condi-

ciones con células de *Mycobacterium*. Las muestras fueron finalmente esterilizadas y sometidas al análisis químico correspondiente.

### Análisis químico

Los cultivos fueron acidificados a pH 2,0 con HCl 6 mol/L y extraídos con volúmenes iguales de acetato de etilo. Luego de lavar con agua hasta pH neutro, el disolvente orgánico fue secado sobre sulfato de magnesio y removido al vacío para obtener los residuos correspondientes. Para los análisis cuantitativos de los precursores esteroideales producidos fueron empleadas las condiciones siguientes: las muestras fueron eluidas sobre columna Merck Lichrosorb RP-8, 125 x 4 mm, utilizando mezcla metanol: agua 65:35 (v/v), mediante un flujo de 1,5 mL/min. La detección en cromatografía HPLC fue realizada a 254 nm. Las cantidades de los androstanos androstendiona (AD), androstadiendiona (ADD) y testosterona (TES) fueron evaluadas tomando como estándar interno la metiltestosterona.<sup>12,13</sup>

Un procedimiento similar fue seguido en la determinación de la colesteno. En este caso, la separación se realizó en una columna RP-8 y como fase móvil, metanol mediante un flujo de 1,5 mL/min, durante los primeros 2,5 min y luego se incrementó a 2,5 mL/min. Fue utilizado el benzoato de colesterol como estándar interno.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Características de crecimiento

La tabla 1 muestra los valores de las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) y los tiempos de duplicación (Td) correspondientes, en ambos medio NB y MM. Es notable la similitud de las cifras, tanto en *Arthrobacter* como en *Mycobacterium*.

Dado que tales parámetros revelan estados fisiológicos, que son a su vez el resultado del metabolismo celular, este hecho pudiera ser beneficioso en una biotransformación mixta que utilice ambos microorganismos, ya que condicionaría una continuidad en los procesos de biotransformación.

La cepa de micobacterias en estudio es considerada en el grupo de rápido crecimiento, los resultados apoyan este criterio.<sup>14</sup> Los tiempos de duplicación son cercanos a las cuatro horas en el medio rico, y alrededor de las ocho horas en el medio mínimo. No se tienen referencias de tales parámetros en el caso de *A. simplex*.

Por otra parte, la diferencia observada en ambos parámetros en los medios rico y mínimo es de esperar, si se considera que la célula bacteriana debe sintetizar todos sus componentes celulares a partir de componentes más sencillos en el caso del medio mínimo. Tal razonamiento es válido para ambos microorganismos.

### Biotransformación en presencia de nitrato de níquel

Se conoce que el empleo de inhibidores enzimáticos que favorecen la acumulación de ciertos intermediarios de degradación de los esteroides en *Arthrobacter* y *Mycobacterium*.<sup>1</sup> De todos ellos, el  $\alpha$ ,  $\alpha$  dipiridil ha sido el más utilizado debido a las cantidades notables de ADD y AD que son producidas. Sin embargo, ciertos iones inorgánicos han resultado igualmente efectivos, tales como el ión  $Ni^{2+}$ , en la acumulación mayoritaria de AD.<sup>1</sup>

Un estudio de la sensibilidad de ambos microorganismos al nitrato de níquel indica (Tabla 2) que efecti-

vamente este compuesto es tóxico para la célula, posiblemente debido al efecto de sustitución del ión  $Fe^{2+}$  por el  $Ni^{2+}$  en el centro activo de la enzima 9- $\alpha$  hidroxilasa. Este mecanismo ha sido bien estudiado en casos análogos.<sup>1</sup>

La respuesta de crecimiento de ambas cepas de *A. simplex* y *Mycobacterium* spp. es similar para las concentraciones ensayadas. La dosis de 500 mg/L es letal para las células de *Arthrobacter*, sin embargo, no lo es para *Mycobacterium*. Aunque estos resultados pueden considerarse como aproximaciones, sirvieron para fijar las concentraciones de trabajo del nitrato de níquel en experimentos posteriores de biotransformación.

Puesto que la concentración de 500 mg/L de nitrato de níquel es letal para *Arthrobacter*, la biotransformación fue realizada en presencia de 200 mg/L de la sal (Fig. 1).

La cinética de biotransformación sugiere que debe ocurrir una inhibición creciente de la 9- $\alpha$  hidroxilasa,

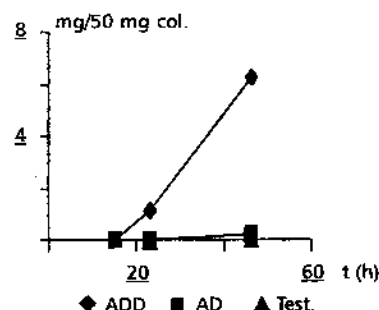


Fig. 1. Biotransformación de 50 mg de colesterol (col.) en presencia de nitrato de níquel, 200 mg/L. AD, ADD y Test. representan las cantidades de androstenediona, androstadienediona y testosterona, respectivamente.

enzima clave en la degradación del colesterol. Se observa una acumulación de ADD, que parece aumentar con el tiempo. Esto está de acuerdo con lo reportado por otros autores,<sup>1,13</sup> aunque las cantidades producidas para los períodos ensayados no son apreciables.

Teniendo en cuenta que en la degradación del colesterol ocurre en primer lugar una oxidación,<sup>15</sup> con la consiguiente formación de la colestenoona (Fig. 2), Chung et al.<sup>9</sup> lograron biotransformaciones mixtas combinando *Arthrobacter simplex* U-S-A-18 y *Mycobacterium* spp. NRRL-B3683. En este proceso, se partió de una suspensión de colestenoona obtenida por fermentación de colesterol, mediante células de *Arthrobacter*, que fue finalmente transformada a ADD a través de *Mycobacterium*. En estas condiciones, los autores fueron capaces de lograr una productividad diaria de hasta 0,91 g/L.

De modo que la preparación previa de colestenoona a partir del colesterol evidentemente favorece las fermentaciones a ADD. Tomando en cuenta estos resultados, se exploró la posibilidad de realizar fermentaciones mixtas *arthrobacter-micobacteria*, de forma tal que la colestenoona producida por las células de *Arthrobacter* fuera tomada *ipso facto* por las células de micobacteria como sustrato, favoreciendo esto un aumento de los rendimientos finales en androstanos.

En estas condiciones, se determinó la producción de colestenoona en un cultivo de *Arthrobacter*, considerando que sería más conveniente añadir las células de micobacteria cuando la formación de este compuesto fuera mayor.

La figura 3 ilustra los resultados. Se observó que al cabo de las 24 h la formación de colestenoona es máxima. Evidentemente, un estudio que

Tabla 1. Características de crecimiento de ATCC 6946 *Arthrobacter simplex* y NRRL-B3683 *Mycobacterium* spp.<sup>a</sup>

Cepa	Medio	m (h <sup>-1</sup> )	Td (h)
<i>Mycobacterium</i> sp.	MM	0,12	8,33
	NB	0,27	3,70
<i>A. simplex</i>	MM	0,10	10,00
	NB	0,28	3,57

<sup>a</sup>m Velocidad específica de crecimiento. Td Tiempo de duplicación. El crecimiento es determinado mediante determinaciones sucesivas de las densidades ópticas en los medios mínimo (MM) y rico (NB), a longitudes de onda ( $\lambda$ ) de 420 y 540 nm, respectivamente.

Tabla 2. Sensibilidad al nitrato de níquel, a diferentes concentraciones.<sup>a</sup>

Cepa	Nitrato de níquel (mg/L)				
	0	50	100	200	500
<i>Mycobacterium</i> sp.	+	+	+	+	-
<i>A. simplex</i>	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> Las diferentes concentraciones de nitrato de níquel (mg/L), se añaden al medio NB sólido. Los cultivos de ambos microorganismos se adicionan en gotas sobre medio NB s, mediante asa de platino y las placas se ponen a incubar durante 48 h a 30 °C (+) y (-) significa crecimiento y no crecimiento, respectivamente.

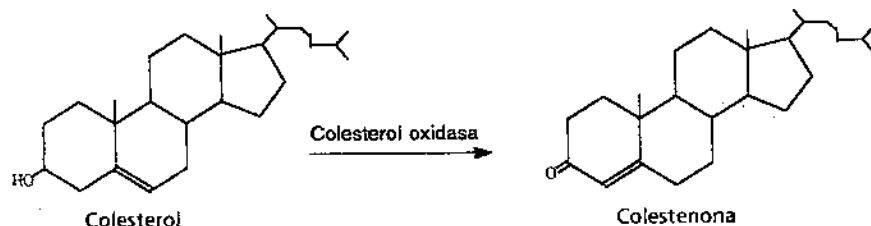
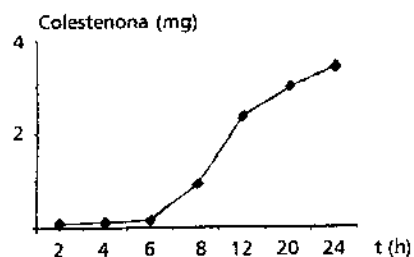


Fig. 2. Formación de colestenoona.

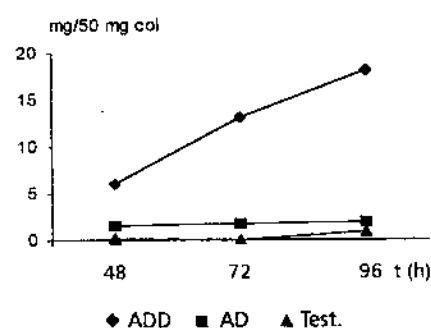
considere mayores períodos de incubación pudiera brindar una información adicional acerca del fenómeno. Sin embargo, este resultado debe tenerse en cuenta en experimentos de biotransformación mixta *Arthrobacter-mycobacteria*.



**Fig. 3.** Formación de colesteno mediante células de *Arthrobacter*. Cultivos de MM + Colesterol, 1 mg/mL fueron inoculados y esterilizados a diferentes intervalos para la determinación de la colesteno.

De modo que se puede concebir tales experimentos, comenzando con una fermentación de 24 h con células de *Arthrobacter*, seguido de la adición de células de *Mycobacterium*.

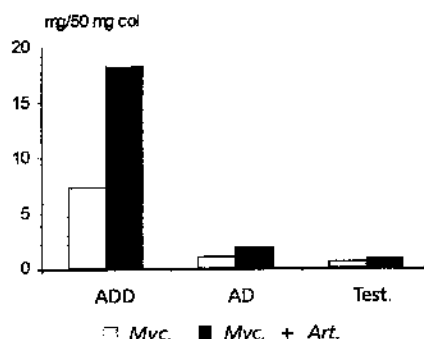
Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se ensayó un experimento de bioconversión mixta. Los resultados se muestran en la figura 4.



**Fig. 4.** Biotransformación mixta *Arthrobacter-Mycobacterium*. AD, ADD y Test, representan las cantidades de androstendiona, androstadiendiona y testosterona, respectivamente.

Las cantidades de ADD producidas son crecientes, siendo mayores a las 96 h de incubación. Respecto al AD y la testosterona, se mantienen bajos y prácticamente no varían en los períodos considerados.

Es interesante notar que los rendimientos en ADD obtenidos en experimentos análogos empleando solo células de micobacteria, son sensiblemente menores (Fig. 5). De acuerdo con estos resultados, el empleo de las fermentaciones mixtas, comenzando con células de *Arthrobacter* y finalizando con células de micobacterias puede ser una opción importante para la obtención de ADD mediante biotransformación a partir del colesterol.



**Fig. 5.** Rendimientos comparativos en ADD, AD y testosterona en biotransformaciones sencillas y mixtas.

Los experimentos de biotransformación con células de *Mycobacterium* se realizaron según protocolo descrito en *Materiales y Métodos*, durante 96 h. Las biotransformaciones mixtas se comenzaron con células de *Arthrobacter*, 24 h, esterilizadas por autoclave y luego inoculadas con células de *Mycobacterium* y mantenidas durante 72 h adicionales.

## CONCLUSIONES

Las velocidades específicas de multiplicación de *Arthrobacter* y *Mycobacterium* son similares, lo que puede ser útil en biotransformaciones mixtas.

El aumento en los rendimientos en las biotransformaciones mixtas *Arthrobacter-Mycobacterium* es favorecido por la colesteno, formada por oxidación previa del colesterol mediante las células de *Arthrobacter*, en el mismo medio de fermentación.

## BIBLIOGRAFIA

- Ahmad S., Garg S.K., Johri B.N. Biotransformation of sterols: selective cleavage of the side chain. *Biotech. Adv.*, 10, 1, 1992.
- Phaff H.J. Microorganismos industriales. *Investigación y Ciencia* (Barcelona), 62, 22, 1981.

- Smith M., Zahnley J., Goff D. Growth and cholesterol oxidation by *Mycobacterium* sp. in tween 80 medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1425, 1993.
- Lee C.Y., Liu W.H. Production of androsta-1,4-diene-3,14-dione from cholesterol using immobilized growing cells of *Mycobacterium* sp. NRRL-B3683 adsorbed on solid carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 598, 1992.
- Flygare S., Larsson P.O. Steroids transformation in aqueous two-phase systems side chain degradation of cholesterol by *Mycobacterium* sp. *Pure Appl. Biochem.*, 5, 10, 1989.
- Ambrus G., Ilkoy E., Horvath G., Podanyi B., Boeskei Z., Gyurky S., Jekkel A. Novel intermediates of microbial side chain degradation of sitosterol. *Tetrahedron. Letters*, 33/36, 5267, 1992.
- Wang K.C., Gau C.S. Microbial oxidation of sterols II-transformation of 19-oxygenated sterols. *Journal of Taiwan Pharmaceutical Association*, 35, 16, 1983.
- Hesslink P.G.G., Van Vliet S., de Vries H., Whithold B. Optimization of sterol side chain cleavage by *Mycobacterium* sp. in presence of cyclodextrins. *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 398, 1989.
- Chung L.Y., Chen D.C., Liu H.W. Production of androsta-1,4-diene-3,17-dione from cholesterol using two-step microbial transformation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 447, 1992.
- Wovcha M.G., Antosz E.J. Bioconversion of sitosterol to useful steroidal intermediates by mutants of *Mycobacterium* sp. *Biochemical Biophysical Acta*, 53, 308, 1978.
- Joklik W.K., Willot H.P., Amos D.B. *Microbiología de Zinsser*. VI. Ed. Rev. 1984.
- Llanes N., Hung B., Falero A., Pérez C., Aguila B. Glucose and lactose effect on AD and ADD bioconversion by *Mycobacterium* sp. *Biot. Letters*, 17, 1237, 1995.
- Pérez C., Pérez I., Hervé E. Isolation and partial characterization of a new mutant for sterol biotransformation in *Mycobacterium* sp. *Biot. Letters*, 17, 1241, 1995.
- Hanson, E. *Clinical Microbiology and Infection Control*. Blackwood Sci. Pub., Inc. Boston, 1984.
- Liu W.-H., Horng, W.-C., Tsai, M.-S. Bioconversion of cholesterol to cholest-4-en-3-one in aqueous/organic solvent two-phase reactors. *Enzyme Microbial Technol.*, 18, 184, 1996.