

# BIOTRANSFORMACION DE ANDROSTENODIONA POR CELULAS INMOVILIZADAS DE *ARTHROBACTER SIMPLEX* Y *MYCOBACTERIUM SP*

A. Falero, B.R. Hung, N. Llanes, M. Matos, B. Aguila, M. Fonseca, O. Pérez,\*  
M.C. Montes\* e I. Magaña.\*

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

\*Centro de Investigación y Estudios Avanzados, D.F., México.

Recibido: 7 de octubre de 1996.

**RESUMEN.** Se inmovilizaron dos cepas: *Arthrobacter simplex* ATCC-6946 y *Mycobacterium sp.* NRRL B-3683 empleando dos soportes: ácido poligalacturónico y pectina. Se obtuvieron resultados similares con ambos soportes. Se comparó además, la habilidad de conversión de ambos microorganismos inmovilizados en pectina. Se emplearon solventes orgánicos para aumentar la solubilidad del AD y mejorar la aplicación potencial de las células inmovilizadas en la biotransformación de esteroides. Se estudió el efecto del etanol sobre el crecimiento y la biotransformación de las células libres e inmovilizadas de *Arthrobacter simplex*.

**ABSTRACT.** Two strains were immobilized: *Arthrobacter simplex* ATCC-6946 and *Mycobacterium sp.* NRRL B-3683 employing two immobilization supports: polygalacturonic acid and pectin. Similar results were obtained in both cases. The conversion ability of two immobilized microorganisms in pectin was also compared. Organic solvents were tried to increase the solubility of AD, and to improve the potential application of the immobilized cells in the steroid biotransformation. The ethanol effect on the growth and biotransformation of free and immobilized cells of *Arthrobacter simplex* was studied.

## INTRODUCCION

La transformación microbiana de esteroides es una vía del metabolismo secundario frecuentemente empleada para la producción de medicamentos; siendo la  $\Delta^1$  deshidrogenación una de las reacciones de mayor interés para la industria farmacéutica, debido a que la presencia de este doble enlace facilita la aromatización del anillo, necesaria para la posterior síntesis de estos compuestos.

En los últimos 15 años la utilización de células inmovilizadas para la bioconversión de compuestos esteroideos ha recibido gran atención por parte de diferentes investigadores. Dentro de los microorganismos que se reportan como los más usados para la inmovilización se encuentra la especie *Arthrobacter simplex*, capaz de transformar por la acción de la 3-cetoesteroides 1,2-deshidrogenasa la hidrocortisona y el compuesto "S" de Reichstein en prednisolona y compuesto "S" deshidrogenado, respectivamente.<sup>1</sup>

Este trabajo se propuso analizar la posibilidad del uso de células bacterianas inmovilizadas para la formación de ADD a partir de AD; comparar la cepa *Arthrobacter simplex* ATCC 6946 con la *Mycobacterium sp.* NRRL B-3683; seleccionar el soporte más adecuado para la inmovilización de *A. simplex* ATCC 6946 y determinar el efecto del etanol en la biotransformación con células libres e inmovilizadas

## MATERIALES Y METODOS

Se emplearon las cepas *Mycobacterium sp.* NRRL B-3683 y *Arthrobacter simplex* ATCC-6946 donadas a Cuba por la Universidad de la Columbia Británica de Canadá y el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, D.F., México, respectivamente.

### Medios de crecimiento

Los medios de crecimiento empleados fueron (g/L):

Para *Arthrobacter simplex*: Caldo nutriente, 8; glucosa, 20ap H7,2.<sup>1</sup>

Para *Mycobacterium sp.*: Caldo nutriente, 8; extracto de levadura, 1; glicerol, 5; Tween8 0,7ap H7.<sup>2</sup>

### Medio de biotransformación

El medio de biotransformación empleado estuvo compuesto por (g/L): extracto de levadura, 1; glicerol, 2; cloruro de magnesio hexahidratado, 2; cloruro de calcio dihidratado, 5; a pH 8,5.<sup>1</sup>

### Condiciones de cultivo para la obtención de células (crecimiento)

A partir de colonias aisladas de *A. simplex* en cuñas de agar nutriente, enriquecidas con glicerol 20g /L se inoculó por asada en erlenmeyers de 500 mL que contenían 100 mL de medio correspondiente. Estos erlenmeyers se colocaron en zaranda orbital a 150r/ min y 30 °C durante 24 h. Este cultivo se empleó como inóculo y se mantuvo una relación del 10% (V/V) en erlenmeyers de 2 L que contenían 900 mL de caldo nutriente para la obtención de biomasa en zaranda orbital a 100r/ min y 30 °C durante 24 h.

A partir de colonias aisladas de *Mycobacterium sp.* conservadas en cuñas de agar nutriente enriquecido con glicerol 20 g/L, se inocularon por asada los erlenmeyers de 500 mL con 100 mL de caldo nutriente (CN), se adicionaron perlas de vidrio y se colocaron en zaranda orbital a 150 r/min, 30 °C durante una noche.

La biomasa se propagó en erlenmeyers de 2 L con 900 mL de CN (relación de inóculo 10%, V/V) y se incubó en zaranda orbital a 100r/ min, 30 °C durante 48 h.

En ambos casos, la inducción se realizó con AD a una concentración de 0,05 mg/mL disuelto en etanol, por 5 h. Para la separación de las células el cultivo se centrifugó a 6 000 r/min a una temperatura de 4 °C durante 20m in y se eliminó el sobrenadante. Las células (8,8 g de peso húmedo)

fueron resuspendidas en 50m L del medio de cultivo empleado en cada caso.

### Inmovilización de las células

El procedimiento empleado para la inmovilización fue el mismo para ambos microorganismos.<sup>1</sup> Los experimentos de biotransformación con células inmovilizadas se efectuaron en un reactor del tipo *Air-Lift* con 300 mL de volumen total. El volumen de operación fue de 250 mL de medio, en el cual se encontraban disueltos en etanol, el sustrato de la reacción y el aceptor electrónico (menadiona), a una concentración de 0,1 mg/mL y 0,057 mg/mL, respectivamente. La concentración final de alcohol dependió del ensayo realizado.

Durante la biotransformación se mantuvo la aereación constante del sistema con un flujo de aire aproximado de 300 mL/min. Para la identificación y la determinación de los productos obtenidos se utilizó la cromatografía en capa delgada (CCD) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), respectivamente.

Para la CCD se emplearon placas de gel de sílice 60 y mezcla de solventes compuesta por éter de petróleo:acetato de etilo en una relación 3:2. La detección por HPLC se realizó a 254 nm empleando una columna de fase reversa (Spherisorb 5 ODS 250-4 mm) y como fase móvil metanol:agua (70:30) a un flujo de 1,4 mL/min. El análisis se llevó a cabo por el método del estándar interno,<sup>3</sup> utilizando para ello 17 $\alpha$ -metilttestosterona. Las muestras se hicieron por triplicado.

Se analizó el comportamiento de las cepas de *Mycobacterium sp.* B-3683 y *A. simplex* ATCC 6946 en la biotransformación. Los tiempos de residencia fueron de cinco y dos horas respectivamente. Se compararon los resultados de la biotransformación de AD en ADD por la cepa *A. simplex* utilizando dos soportes, pectina y ácido poligalacturónico a una concentración final de 40g/L en la mezcla.

Con el propósito de estudiar el efecto del etanol en el medio, se analizó su acción sobre el crecimiento de células libres, así como sobre la biotransformación del AD en ADD en células libres e inmovilizadas de *A. simplex*. Las concentraciones estudiadas fueron las siguientes:

Para el crecimiento y la biotransformación en células libres: 2,4, 8, 12, 16 y 20%.

Para la biotransformación en células inmovilizadas: 12, 18, 24, 30 y 36%.

Para el análisis estadístico se empleó la prueba de comparación de medias t-student, el análisis de varianza ANOVA-1 y en caso de existir diferencias significativas, se realizó la de intervalos múltiples de Duncan.<sup>4</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se observó que cuando se emplea *Arthrobacter* se obtiene un 100 % de biotransformación en una hora, mientras

que con *Mycobacterium* en 5 horas se logran resultados considerables (Tabla I), lo cual se explica por la baja actividad esteroide 1,2-deshidrogenasa que presenta esta cepa según se ha reportado anteriormente.<sup>5</sup> Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó la cepa de *A. simplex* como la más adecuada para realizar la deshidrogenación del AD y se estableció una hora como tiempo de residencia en el reactor en las experiencias de biotransformación del AD en ADD por células inmovilizadas de *Arthrobacter*.

Existen amplios antecedentes del uso de esta especie y más específicamente de esta cepa tanto libre como inmovilizada para la reacción de 1,2-deshidrogenación, pero en casi todos los casos conocidos, se emplea como sustrato la hidrocortisona cuyo producto correspondiente es la prednisolona.

**TABLA I**  
Selección de la cepa a utilizar  
[AD (0,1 mg/mL), medio mínimo, pH 8,5 y etanol 4 %]

<i>Mycobacterium sp.</i> NRRL-B3683			
Tiempo (h)	AD ( $\mu$ g/mL)	ADD ( $\mu$ g/mL)	Biotransformación (%)
011	7,99 $\pm$ 3,13	0,92 $\pm$ 0,06	—
1	94,77 $\pm$ 1,22	1,62 $\pm$ 0,07	1,47
2	93,80 $\pm$ 2,74	2,16 $\pm$ 0,37	1,94
3	89,28 $\pm$ 1,09	2,41 $\pm$ 0,43	2,19
4	89,51 $\pm$ 2,49	2,82 $\pm$ 0,05	2,56
5	90,07 $\pm$ 0,40	3,71 $\pm$ 0,11	3,37
<i>Arthrobacter simplex</i> ATCC 6946			
Tiempo (min)	AD ( $\mu$ g/mL)	ADD ( $\mu$ g/mL)	Biotransformación (%)
089	1,19 $\pm$ 4,42	5,62 $\pm$ 0,2	—
303	10 $\pm$ 0,95	88,36 $\pm$ 0,67	96,88
60—	—	91,49 $\pm$ 1,22	100,00
90—	—	89,22 $\pm$ 2,55	100,00
120	—	90,95 $\pm$ 0,39	100,00

Los resultados obtenidos al comparar el empleo de dos soportes (Tabla II) en la inmovilización de células de *A. simplex* para la conversión de AD en ADD fueron analizados estadísticamente según el análisis de varianza ANOVA-1 donde se aprecian diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,01$ ) y al aplicar la prueba de intervalos múltiples de Duncan se observa que sólo existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la pectina con 30min de biotransformación y el resto de las muestras.

**TABLA II**  
Comparación entre los soportes ácido poligalacturónico y pectina en medio mínimo  
[pH 8, AD (0,1mg/mL), tiempo (min), ácido poligalacturónico-pectina]

Tiempo (min)	Acido poligalacturónico			Pectina		
	AD ( $\mu$ g/mL)	ADD ( $\mu$ g/mL)	Biot. (%)	AD ( $\mu$ g/mL)	ADD ( $\mu$ g/mL)	Biot. (%)
087	6 $\pm$ 2,4	5,2 $\pm$ 1,7	—	86,1 $\pm$ 4,4	5,6 $\pm$ 0,2	—
30	1,7 $\pm$ 0,6	91,4 $\pm$ 0,1	99,10 a	3,1 $\pm$ 0,9	88,3 $\pm$ 0,6	96,88 b
60	—	92,3 $\pm$ 0,3	100 a	—	91,4 $\pm$ 1,2	100 a
90	—	92,6 $\pm$ 0,1	100 a	—	89,2 $\pm$ 2,5	100 a
120—	—	92,7 $\pm$ 0,3	100 a	—	90,9 $\pm$ 0,3	100 a

Nivel de significación = 0,05. Biot. Biotransformación.

Teniendo en cuenta estos resultados, se estableció una hora como tiempo de residencia en el reactor cuando se emplea la pectina como soporte para la inmovilización de *Arthro-bacter simplex* en la biotransformación de AD. Este resultado fue de gran importancia para el trabajo, ya que permite sustituir el ácido poligalacturónico, extremadamente caro, por la pectina, siendo su costo 2,5 veces menor que el del ácido.

Se ha descrito la utilización de ambos soportes en la inmovilización de células. Carballo y col., reportaron el estudio de la eficiencia en la biotransformación de la mezcla de fitosteroles por células de *Flavobacterium breve* inmovilizadas en pectina para la producción de ADD. Montes y Magaña, utilizaron el ácido poligalacturónico como matriz para la inmovilización, obteniendo resultados satisfactorios en la bioconversión del compuesto "S" de Reichstein e hidrocortisona por *A. simplex*. Gemeiner y col., estudiaron comparativamente la pectina y el alginato como soportes para la inmovilización y refirieron que la estabilidad de los geles de peptato de calcio es más alta que la de los geles de alginato de calcio, así como también que no existen diferencias apreciables en la viabilidad y la actividad metabólica de las células atrapadas en peptato de calcio y alginato de calcio.

Cuando se estudió el efecto de la inmovilización de las células sobre la biotransformación (Tabla III) se pudo apreciar que en una hora las células inmovilizadas son capaces de

biotransformar todo el AD presente, mientras que las células libres en el mismo tiempo sólo alcanzan un 84,8 % de rendimiento en el proceso. Este resultado se corresponde con los reportados por Hilge-Rotman y Rhem, cuando comparan el comportamiento de células de *Saccharomyces cerevisiae*, inmovilizadas en alginato de calcio con las células libres, siguiendo el curso de la fermentación etanólica a partir de glucosa y evaluando la actividad de dos enzimas reguladoras de la glicolisis: hexoquinasa y fosfofructoquinasa. Ambas mostraron un aumento considerable en la actividad enzimática de las células inmovilizadas con respecto a las células libres.

A pesar de la escasa información reportada sobre las modificaciones bioquímicas y la regulación del metabolismo de las células inmovilizadas en comparación con las libres, las evidencias experimentales resaltan la importancia de la inmovilización para el trabajo con microorganismos, así como que garantiza mejores rendimientos en un tiempo menor. Debe señalarse que en algunos casos, se han presentado efectos adversos de la inmovilización sobre la actividad catalítica celular. Vlahov en 1990 describió una comparación entre células de *A. simplex* libres e inmovilizadas en varios soportes y reportó una disminución de la actividad enzimática de la  $\Delta^1$ -deshidrogenasa en las células inmovilizadas durante la conversión hidrocortisona-prednisolona.

**TABLA III**  
Biotransformación de AD en ADD por células libres e inmovilizadas de *A. simplex* [AD (0,1 mg/mL), pH 8,5 y etanol 4 %]

<i>A. simplex</i>	0h		1 h		Biotransformación (%)
	AD	ADD	AD	ADD	
	(µg/mL)				
C. libres	85,9 ± 0,8	12,8 ± 1,2	14,3 ± 0,4	83,7 ± 0,2	84,86
C. inmovilizadas	86,1 ± 4,4	5,6 ± 0,2	—	91,4 ± 1,2	100

La evaluación cualitativa del crecimiento en placas petri (Tabla IV) mostró un desarrollo normal después de someter las células a la presencia del solvente durante 24 h a concentraciones de etanol de 2 y 4 %, una disminución de 18 y 12 % y un crecimiento nulo frente a 16 y 20 % de etanol. Es decir, que a partir del 8 % comienzan a manifestarse los efectos tóxicos del solvente, teniendo un efecto irreversible sobre el crecimiento a partir de un 16 % en los valores de concentración estudiados.

**TABLA IV**  
Resultados cualitativos de la siembra en placas de células libres frente a diferentes concentraciones de etanol [pH7,2; C N8m L, glucosa 2 0g /L]

Etanol (%)	Crecimiento
0+++	
2	+++
4	+++
8+	+
12	+
16	— — —
20	— — —

Al analizar los resultados de la biotransformación de AD por las células libres (Tabla V) se aprecia cierta diferencia con los correspondientes al crecimiento. De acuerdo al análisis de varianza ANOVA-1 se observa que existen diferencias significativas entre muestras para un 99,99 % de confianza y al aplicar la prueba de Duncan, se aprecia que la presencia de etanol hasta el 12 % no tiene efecto negativo sobre la biotransformación del AD, pero por encima de dicha concentración comienza a disminuir significativamente la cantidad de ADD obtenido. Debe señalarse que a pesar de que concentraciones de etanol del 16 % resultan completamente tóxicas para el crecimiento (Tabla IV), no lo son para la biotransformación, aunque sí comienza a ser significativa la disminución en los rendimientos. Esto está determinado por el tiempo de incubación a que han estado sometidas las células a la acción del solvente, que durante la biotransformación es de una hora y en el experimento de crecimiento fue de 24 h bajo los efectos del etanol.

Según los resultados de la prueba de Duncan para los valores de biotransformación obtenidos con células de *Arthro-bacter* inmovilizadas en presencia de las concentraciones de etanol estudiadas (Tabla VI) se evidencia que hasta el 18 % de solvente no existen diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) en los rendimientos obtenidos. Por encima de esta concentración comienza a disminuir notablemente la cantidad de ADD producido. Es decir que el etanol comienza a manifestar su

efecto negativo a concentraciones mayores que en las células libres. Esto reafirma las ventajas que reporta la inmovilización celular, creando un microambiente capaz de protegerlas del ataque microbiano y de la acción tóxica que ejercen los solventes orgánicos. Kawabata y Nakagawa en 1991 reportaron un aumento en el rendimiento de prednisolona por la inmovilización de *A. simplex*, utilizando un 5 % de etanol, y demuestran el carácter tóxico de este alcohol sobre él a partir del 20%. Hasta el momento no se han encontrado en la literatura referencias acerca del efecto tóxico del etanol sobre este microorganismo.

## CONCLUSIONES

La cepa *Arthrobacter simplex* ATCC 6946 resultó la más adecuada entre las cepas estudiadas para llevar a cabo la biotransformación de AD en ADD.

Es posible la sustitución del ácido poligalacturónico por la pectina como soporte de inmovilización.

La inmovilización aumenta la capacidad catalítica y la retención de la actividad enzimática en presencia de solventes.

**TABLA V**  
Toxicidad de células libres de *A. simplex* frente a etanol en medio mínimo [pH 7,6 y AD (0,1mg/mL)]

Etanol (%)	$\bar{X}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ADD, n=3)
2	101,50 a
4	97,27 ab
8	107,88 ab
12	102,9 ab
16	93,19 b
2054	,01 c

Nivel de significación = 0,05.

**TABLA VI**  
Toxicidad de células inmovilizadas de *A. simplex* frente a etanol en medio mínimo [pH 8,5 y AD (0,1mg/mL)]

Etanol (%)	0h		1 h	
	AD	ADD	AD	ADD
	$(\mu\text{g/mL})$			
12	99,2 $\pm$ 0,3	12,5 $\pm$ 0,5	—	97,3 $\pm$ 2,7 a
18	93,1 $\pm$ 6,2	17,3 $\pm$ 1,0—		94,6 $\pm$ 6,8 a
24	98,0 $\pm$ 3,6	12,9 $\pm$ 0,1	20,3 $\pm$ 0,5	86,2 $\pm$ 2,6 b
30	110,5 $\pm$ 3,7	5,7 $\pm$ 3,8	67,1 $\pm$ 0,2	35,1 $\pm$ 0,5 c
36	90,5 $\pm$ 4,9	6,7 $\pm$ 2,5	86,1 $\pm$ 2,012	,4 $\pm$ 0,5 d

Nivel de significación = 0,05.

## BIBLIOGRAFIA

- Montes M. C. y Magaña I. Dehydrogenation of steroids by *Arthrobacter simplex* immobilized in calcium polygalacturonate beads. **Journal of Industrial Microbiology**, 8, 259, 1991.
- Wovcha G. M., Antosz F.J., Knight J.C., Kominek L.A. and Pyke T.R. Bioconversion of Sitosterol to Useful Steroidal Intermediates by Mutants of *Mycobacterium fortuitum*. **Biochem. Biophys. Acta**, 531, 308, 1978.
- Snyder L. R. and Kirkland, J. J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Second Edition. Wiley Interscience Publication. 1980.
- López R. Diseño estadístico de experimentos. Editorial Científico-Técnica, La Habana, Cuba. 1988.
- Falero A., Hung B.R., Pérez I., Fonseca M. y Luis L. Nuevo método analítico para la determinación de la actividad esteroide 1,2-deshidrogenasa. Primer Simposio Nacional de Cromatografía, La Habana, Cuba, 1993.
- Carballo M.E., Martínez, J., Villaverde M., Montalvo A., Alfonso M.P., Reboredo M.R. y Coto O. Transformación de fitosteroles mediante células de *Flavobacterium breve* inmovilizadas en pectina. **Ciencias Biológicas**, 23, 110, 1990.
- Gemeiner P., Kurilova L., Markovic O., Malovikova A., Uhrin D., Ilavsky M., Stefuca V., Polakovic M. and Bales V. Calcium Pectate Gel Beads for Cell Entrapment. 3. Physical Properties of Calcium Alginate Gel Beads. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 13, 335, 1991.
- Hilge-Rotman B. and Rhem H.J. Comparison of fermentation properties and specific enzyme activities of free and calcium-alginate-entrapped *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 33, 54, 1990.
- Vlahov R., Pramatarova V., Spassov G., Suchodolskaya G.V. and Koshceenko K.A. Transformation of microcrystalline hydrocortisone by free and immobilized cells of *Arthrobacter simplex*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 33, 172, 1990.
- Kawabata N. and Nakagawa K. Cortisol  $\Delta^1$ -Dehydrogenation by Cells of *Arthrobacter simplex* Immobilized by Capture on the Surface of Unwoven Cloth Coated with a Pyridinium-Type Polymer. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 71, 1, 19, 1991.