

INFLUENCIA DE IONES INORGANICOS Y FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA BIOTRANSFORMACION DE LA MEZCLA DE FITOSTEROLES DE LA CAÑA DE AZUCAR

S. Borrego, A. Herrera,* M.E. Espinosa, E. Martí y M. Fonseca.

Grupo de Esteroides, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa y *Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Calle 25 entre J y K, Vedado, Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 14 de marzo de 1995.

RESUMEN. Se estudió la influencia de algunos iones inorgánicos y factores de crecimiento sobre la biotransformación de la mezcla de fitosteroles de la caña de azúcar para producir androstadiendiona, así como en el crecimiento de la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683. Los resultados demostraron que el magnesio es de vital importancia para la producción de este precursor y el crecimiento de la cepa. Igualmente, algunos factores de crecimiento perjudican la producción de ADD a la concentración estudiada.

ABSTRACT. The influence of various inorganic ions and growth factors on biotransformation of sugar cane phytosterols to produce androstadienedione as well as the growth of the strain *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 were studied. The results suggest that magnesium was indispensable for both phenomena. Furthermore, folic, pantothenic, ascorbic acids, PABA, biotin, choline, guanine and cytosine showed a remarkable influence on the biotransformation to ADD.

INTRODUCCION

La transformación microbiológica de esteroides a 17-cetosteroides, resulta de gran interés porque permite utilizar materias primas baratas en la obtención de drogas esteroidales de elevado costo y amplio uso por la población mundial.¹

Este proceso, se lleva a cabo mediante la acción de varias enzimas,² por ello, la composición de los nutrientes en los medios de cultivo juega un papel muy importante, ya que pueden o favorecer el crecimiento y al proceso como tal^{3,4} o ser perjudiciales para los fines que se persigan.^{5,6}

Muchos autores utilizan medios complejos con fuentes que le proporcionan al microorganismo una gran cantidad de nutrientes, encontrándose entre ellos, proteínas, aminoácidos, iones y factores de crecimiento.

Entre los múltiples medios de cultivo empleados, se citan las fuentes nutricionales naturales siguientes: caldo nutritivo,^{7,8} licor de maceración del maíz, extracto de malta, harina de soya y almidón de maíz,⁹ proteína hidrolizada y licor del remojo del maíz,¹⁰ entre muchos otros.

Sin embargo, se ha explicado ampliamente el efecto que ejercen muchos iones metálicos y factores de crecimiento, en el crecimiento de especies del género *Mycobacterium*,¹¹⁻¹³ pero aún no se han encontrado referencias acerca de su posible influencia en la biotransformación de esteroides empleando cepas de este género.

El objetivo del trabajo consistió en estudiar la influencia de varios iones y factores de crecimiento sobre la biotransformación y el crecimiento de la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 productora de androstadiendiona (ADD) a partir de la mezcla de fitosteroles del aceite de cera de caña de azúcar.¹⁴

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo

Se empleó la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 que se conservó en glicerol al 20%.

Condiciones de cultivo

Colonias puras de la cepa, se cultivaron en sendos tubos de agar nutritivo durante 3 días. Los azúcares de un día se subcultivaron en el medio reportado por Conner y col.,¹⁵ que se suplementó con glicerol, 0,5% y Tween 80 (0,7%). El cultivo se agitó a 200 r/min, 30 °C durante 48 h, luego, se centrifugó a 7 000 r/min durante 10 min, se lavó con una solución de Tween 80 (0,7%) y se volvió a centrifugar en iguales condiciones. Posteriormente, se agitó hasta su homogeneización total. Los frascos donde se llevó a cabo la biotransformación se inocularon con el 10% (V/V).

Biotransformación

Se utilizó el medio de cultivo salino siguiente (1 L): glicerol 10 g, NaCl 5 g, NaNO₃ 1 g, K₂HPO₄ 0,5 g, KH₂PO₄ 0,5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0,1 g, MgSO₄ · H₂O 0,1 g, CaCl₂ 0,1 g, MnSO₄ · H₂O 0,05 g. El pH se ajustó a 6.

Para estudiar el efecto de los factores de crecimiento, a este medio, se le adicionaron asepticamente 20 µg · mL⁻¹ de los distintos factores de crecimiento por separado, así como una mezcla de 11 de ellos.

Los factores de crecimiento que se utilizaron fueron: vitamina B₁₂, uracilo, adenina, β-alanina, inositol, timina, piridoxina, ácido nicotínico, tiamina, riboflavina, ácido fólico, ácido pantoténico, PABA, biotina, colina, guanina y citosina (Sigma, USA) y ácido ascórbico (Monterrey, Méjico).

Como sustrato, se utilizó una mezcla de fitosteroles de caña de azúcar (50 mg) y como tensioactivo, se usó Tween 40 (1 mL de una solución acuosa al 15%). Estas mezclas después de ser esterilizadas, se homogeneizaron por ultrasonido y se adicionaron asepticamente en el momento de inocular el cultivo. Sus concentraciones finales respectivas resultaron: fitosteroles, 1 g · L⁻¹ y Tween 40, 3 g · L⁻¹. Los cultivos se mantuvieron a 200 r/min y 30 °C durante 6 días. Posteriormente, se les extrajeron 5 mL para la determinación del crecimiento mediante el contenido de proteínas.

Determinación del crecimiento

Los 5 mL de cultivo estéril, fueron centrifugados a 7 000 r/min⁻¹. La biomasa que se obtuvo con agua destilada y se volvió a centrifugar, luego, se resuspendió en 2 mL de agua destilada y se le adicionó 1 mL de NaOH 3 mol/L. Los tubos se calentaron a ebullición durante 10 min; después, se dejó decantar la biomasa y del sobrenadante se determinaron las proteínas de acuerdo con el método de Lowry.¹⁶

Determinación de ADD

De los cultivos estériles se extrajo cuatro veces el ADD con acetato de etilo (4 x 100 mL). La determinación de la concentración de los productos, se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución, empleando un detector UV a 254 nm, una columna de fase reversa RP-18 de 5 µm (125 X 4) (Merck), como sistema de solventes una mezcla agua-metanol 35:65 y un flujo de 1,5. Se utilizó 17 α-metiltestosterona como patrón interno.

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron con tres réplicas y los resultados se compararon mediante el análisis de varianza simple y apurados.¹⁷

RESULTADOS

Efecto de los constituyentes inorgánicos

Para conocer cómo influyen los iones sobre la producción de precursores esteroidales y el crecimiento de la cepa, se fueron eliminando o adicionando al medio de cultivo de forma independiente, las sales portadoras de los iones a las concentraciones de trabajo, pero se mantuvieron constantes las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. Se utilizó un control con todos los iones inorgánicos a las concentraciones descritas.

Al eliminar sodio, calcio o magnesio la alteración en los rendimientos es significativa (Tabla I), pero la ausencia del magnesio produce una alteración mucho mayor, ya que es muy probable que la función del sodio o del calcio, la supla el magnesio cuando éstos no están presentes en el medio de cultivo. Sin embargo, al eliminar hierro o manganeso, no se observa alteración alguna.

TABLA I
Efecto de la eliminación de las sales del medio de cultivo sobre la producción de ADD y el crecimiento de la cepa B-3683

Variantes	Y _{p/s} (%)	Proteínas (mg · mL ⁻¹)
Control	34,7 (a)	0,24
Sin NaCl	24,3 (bc)	0,21
Sin FeSO ₄	33,6 (a)	0,24
Sin CaCl ₂	28,1 (b)	0,24
Sin MgSO ₄	22,2 (c)	0,10
Sin MnSO ₄	33,6 (a)	0,22

Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con el método de Duncan (p < 0,05).

Y_{p/s}: Rendimiento *producto/sustrato añadido* (miligramos de ADD/miligramos de fitosteroles añadidos) x 100.

Atendiendo al contenido de proteínas, que es un índice del crecimiento microbiano, se pudo apreciar que no existen

diferencias significativas entre las variantes y el control a excepción del magnesio.

Teniendo en cuenta que podía existir solapamiento de las funciones de un ion con respecto a los otros, se decidió estudiar la influencia de su adición por separado al medio de cultivo sobre la producción de ADD.

Se pudo observar (Tabla II) que en presencia de NaCl y MnSO₄ no se obtiene ADD, mientras que con hierro y calcio sí, aunque los rendimientos (Y_{p/s}) que se obtuvieron son significativamente inferiores al control (contiene todos los iones), lo que indica que estos iones por sí solos pueden influir sobre la producción de este precursor aunque no son tan importantes como el magnesio, con el cual solamente, el rendimiento que se obtuvo fue similar al control, lo que evidencia su gran importancia en este proceso.

TABLA II
Influencia de la adición de iones en la producción de ADD

Variantes	Y _{p/s} (%)
Control	35,4
NaCl	0
FeSO ₄	22,7
CaCl ₂	19,7
MgSO ₄	34,9
MnSO ₄	0

Y_{p/s}: Rendimiento *producto/sustrato añadido* (miligramos de ADD/miligramos de fitosteroles añadidos) x 100.

Efecto de los factores de crecimiento

Se encontró que factores tales como la vitamina B₁₂, e I uracilo y la mezcla de 11 de ellos (*pool*), incrementan los rendimientos de ADD (Tabla III), sin embargo estadísticamente, este aumento no resulta significativo. Comparativamente, los rendimientos que se obtuvieron en presencia de los ácidos fólicos, pantoténico, ascórbico, p-aminobenzoico, así como de biotina, colina, guanina y citosina, presentaron diferencias significativamente inferiores al control.

Sin embargo, el contenido de proteínas no presentó diferencias significativas entre las variantes estudiadas y el control.

DISCUSION

Se observó que el magnesio es indispensable no sólo para el proceso, sino también, para el crecimiento microbiano. Esto pudo deberse al efecto que este ion ejerce sobre alguna de las enzimas del complejo enzimático, ya que el magnesio y el calcio favorecen la actividad Δ^1 -dehidrogenasa en *Arthro-bacter simplex*.¹⁸ Por otro lado, resultados similares han sido referidos para la 11 α -hidroxilación de la progesterona usando a *Rhizopus nigricans*⁵ y al α 6 β -hidroxilación de los esteroides con *Aspergillus niger*.¹⁹

Este ion, también afecta significativamente el crecimiento de la cepa, resultado que era esperado y que concuerda con lo referido por Raltdge,¹³ en relación con la necesidad del magnesio, entre otros elementos, para el crecimiento de las micobacterias, pues su ausencia puede provocar elongación celular, inhibición de la síntesis de pared y proteínas y por tanto, cese de la división celular. Además, es de vital importancia para la degradación del glicerol en este género microbi-

ano, pues la enzima glicerol-quinasa, que es la primera de la vía degradativa, requiere de este ion para activarse.

TABLA III
Influencia de la adición de factores de crecimiento en la producción de ADD a partir de fitosteroles de caña de azúcar y en el crecimiento de la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683

Variantes	Y _{p/s} (%)	Proteínas (mg · mL ⁻¹)
Control ^a	33,9 (abc)	0,68
Vitamina B ₁₂	37,1 (a)	0,64
Poo [*]	35,4 (ab)	0,60
Uracilo	35,2 (ab)	0,65
Adenina	33,1 (abcd)	0,65
β-alanina	32,2 (abcde)	0,66
Inositol	30,1 (bcdef)	0,65
Timina	30,0 (bcdef)	0,62
Piridoxina	29,5 (cdef)	0,61
Acido nicotínico	29,2 (cdefg)	0,62
Tiamina	28,9 (cdefg)	0,60
Riboflavina	28,5 (cdefg)	0,67
Acido fólico	27,9 (defg)	0,62
Acido pantoténico	27,8 (defg)	0,68
Acido ascórbico	27,5 (defg)	0,63
PABA	27,5 (defg)	0,60
Biotina	27,0 (efg)	0,64
Colina	24,8 (fg)	0,63
Guanina	24,5 (fg)	0,60
Citosina	23,5 (g)	0,65

^a No contiene vitaminas.

^{*} Contiene ácidos fólico, nicotínico y pantoténico, además PABA, piridoxina, biotina, tiamina, riboflavina, inositol, colina y vitamina B₁₂, todos a 20 µg · mL⁻¹.

Medias con letras diferentes, difieren significativamente según dódima de Duncan (p < 0,05).

Y_{p/s}: Rendimiento *producto/sustrato añadido* (miligramos de ADD/miligramos de fitosteroles añadidos) x 100.

La importancia del magnesio en relación con la síntesis de la pared, también se observó en otro microorganismo perteneciente a *Lactobacillus* que no es afín con las micobacterias.²⁰

Por su parte, el calcio también es importante para el proceso y esto puede estar dado por la influencia de este ion sobre alguna(s) enzima(s) involucrada(s) en aquel.

Con relación al hierro, si bien su ausencia no afecta significativamente el proceso, se observó que su adición al medio, favorece la producción de ADD, por ello, debe estar entre los componentes del medio de cultivo. Independientemente de que su ausencia no afectó el crecimiento, no se debe soslayar la importancia que se le ha atribuido a su presencia con relación al crecimiento de las micobacterias.¹³

Teniendo en cuenta que la degradación de los esteroides a precursores avanzados, es un proceso aeróbico que requiere de la reducción de los cofactores NAD⁺ y FAD^{2,21} y

que los factores de crecimiento pueden ser precursores de estos cofactores, se decidió estudiar su efecto sobre la producción de ADD.

Los resultados (Tabla III) permiten apreciar que los factores de crecimiento ensayados no influyen en el crecimiento microbiano, independientemente de que la biotransformación sea o no, similar al control. Este comportamiento del crecimiento era de esperar, pues Ratledge,¹³ planteó que las especies del género *Mycobacterium*, a excepción de aquellas no cultivables como *M. leprae* y *M. lepramurium*, no requieren de ningún factor de crecimiento o vitamina para crecer.

Por otro lado, si en presencia de los factores de crecimiento el rendimiento de ADD que se obtiene es significativamente menor al control, esto indica, primero, que pueden haberse formado otros productos intermediarios tales como ácidos, ésteres, etc., que no se determinaron por no ser de interés y segundo, que esos factores pudieran inhibir alguna(s) enzima(s) importante(s) involucrada(s) en el proceso.

En la biotransformación de esteroides intervienen múltiples enzimas² que son conocidas en su totalidad, pero la más estudiada ha sido la esteroide 1,2-deshidrogenasa,^{18,22,23} que se encarga de la formación de un doble enlace entre los carbonos 1 y 2 del núcleo esteroide para formar el ADD. A pesar de ello, no se refiere ningún aspecto relacionado con la influencia de estos nutrientes sobre esta enzima o cualquier otra, aunque su efecto no necesariamente tiene que ser directamente sobre una enzima, sino que puede ser de forma indirecta, es decir, relacionado con la formación de los aceptores de electrones, del grupo prostético u otros elementos.

No obstante, los resultados indican que los factores de crecimiento no son necesarios en el medio de cultivo para el objetivo que se persigue.

CONCLUSIONES

Se demostró que el magnesio es indispensable para biotransformar la mezcla de fitosteroles y además, vital para la cepa porque su ausencia afecta también el crecimiento de esta.

El hierro y el calcio no son imprescindibles para el crecimiento de la cepa estudiada, pero se recomienda su adición al medio de cultivo, ya que intervienen en la biotransformación de los fitosteroles para producir ADD.

El manganeso no influye ni en la producción de ADD, ni en el crecimiento de la cepa, de ahí que no sea necesario en el medio de cultivo.

Se demostró que la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 no necesita factores de crecimiento ni para producir ADD a partir de la mezcla de fitosteroles, ni para crecer, de ahí que no sea necesaria su presencia en la composición del medio de cultivo.

BIBLIOGRAFIA

- Lee C.Y., Chen C.D. y Liu W.H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 447, 1993.
- Szentirmai A. *J. Ind. Microbiol.*, **6**, 101, 1990.
- Kieslich K. *Economic Microbiology*, Vol. 5, Ed. Rose A.H., Academic Press Inc. London, LTD, 370-413, 1980.
- Miller T.L. and Churchill B.W. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Ed. Demain A.L and Salomond N.A., A.S.M. Washington, 122-136, 1986.
- El-Rafei A.M, Sallam L. and El-Kady I. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **43**, 2878, 1970.

6. Liu W.H., Kuo C.W., Wu K.L., Lee C.Y. and Hsu W.Y. **J. Industrial Microbiol.**, **13**, 167, 1994.
 7. Marsheck W.J., Kraychy S. and Muir D.R. **Appl. Microbiol.**, **23**, 72, 1972.
 8. Smith M., Zahnley J., Pfeifer D. and Goff D. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**, 1425, 1993.
 9. Udvardy E., Pechany C., Bartho I., Hantos G., Trinn M., Vida Z., Szejthi J., Stadler A., Habon I. and Balazs M. US Patent 4528271, 1985.
 10. Weber A., Kennecke M. and Muller R., US Patent 4431732, 1984.
 11. Sauton B. *Compte rendu hebdomadiare des seances de l'Academie des Sciences*, 155, 860, 1912.
 12. Chapman J.S. and Speight M. **Am. Rev. Respiratory Disease**, **103**, 372, 1971.
 13. Rattledge G. *The Biology of the Mycobacteria*, Vol. 1. Academic Press, London, N. York, 186-271, 1982.
 14. Sierra P., Patrón M.A., Pérez I., Villant J., Orozco L.R., Borrego S. y Fajardo M. Utilización biotecnológica de los fitosteroles de la caña de azúcar. II Seminario Científico sobre Interferón y I Seminario Cubano sobre Biotecnología, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba, 1986.
 15. Conner A.H., Nagaoka M., Rowe J.W. and Perlman D. **Appl. Environ. Microbiol.**, **32**, 310, 1976.
 16. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. **J. Biol. Chem.**, **193**, 265, 1951.
 17. López R. *Diseño Estadístico de Experimentos*. Editorial Científico-Técnica, La Habana, 103-111, 1988.
 18. Pinheiro H.M. and Cabral J.M.S. **Biotechnol. Bioeng.**, **37**, 97, 1991.
 19. El-Kady I.A. **Journal of General Microbiology**, **128**, 2511, 1982.
 20. Pavlova S.I., Miteva V.I., Mihailova L.I., Radoevska S.A. y Stefanova T.Tz. **Arch. Microbiol.**, **160**, 132, 1993.
 21. Abul-Hajj Y.J. **J. Biol. Chem.**, **253**, 2356, 1978.
 22. Wovcha M.G., Brooks K.E. and Kominek L.A. **Biochim. Biophys. Acta**, **574**, 471, 1979.
 23. Medentsev A.G., Arinbasarova A.Y., Koshcheyenko K.A., Akimeko V.K and Skryabin G.K. **J. Steroid Biochem.**, **23**, 365 1985.
-