

EFFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO EN LA PRODUCCION DE ADD A PARTIR DE LOS FITOSTEROLES DE LA CAÑA DE AZUCAR, UTILIZANDO UNA CEPA DE *MYCOBACTERIUM*

A. Herrera,* M.E. Espinosa, S. Borrego, F. Guillén y A. Falero.

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

Recibido: 9 de julio de 1995.

RESUMEN. Se estudió la influencia de la fuente de nitrógeno en el proceso de biotransformación de los fitosteroles de la caña de azúcar y en el crecimiento de la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683. De los aminoácidos ensayados, sólo la citrulina benefició la formación de androstadiendiona (ADD). La urea, la glicilglicina, el huevo en polvo y el nitrato de sodio, beneficiaron significativamente la producción de ADD.

ABSTRACT. The influence of nitrogen sources in cultures of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 was investigated by means of the bioconversion of sugar cane phytosterols to androstadienedione (ADD) and growth. The citrulin was the only aminoacid that enhanced the bioconversion to ADD. Also the urea, glicil-glicine, egg powder and sodium nitrate were good to produce ADD.

INTRODUCCION

Los medios de cultivo constituyen un aspecto importante en cualquier proceso de biotransformación,^{1,2} especialmente en la transformación de esteroides.³ La fuente de nitrógeno es de particular importancia para el crecimiento microbiano, así como para la producción de sustancias de naturaleza proteica, como las enzimas.¹ Se considera que una buena producción de biomasa microbiana y por consiguiente, de enzimas en general y las biotransformantes de esteroides en particular, contribuyen sobremanera al éxito de la producción de compuestos esteroidales.¹

Aunque se conocen múltiples medios de cultivo para biotransformar sustratos esteroidales con la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683,4-7 aún no se han dado a conocer las características nutricionales de esta cepa, de ahí que se desconozca la posible influencia de las fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento microbiano y la biotransformación de esteroides.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue el de estudiar la influencia de varias fuentes de nitrógeno en un medio sintético sobre la transformación microbiológica de los fitosteroides de la caña de azúcar, utilizando la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo

Se empleó la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683, la cual produce, preferentemente, androstadiendiona (ADD) con trazas de androstendiona (AD), que se conservó en agar nutritivo con glicerol al 2%.

Condiciones de cultivo

Colonias puras de la cepa se cultivaron en sendos tubos de agar nutritivo durante 3 días. Los azúcares se incubaron en el medio empleado por Conner y col.,⁸ suplementado con glicerol al 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 (1L): Fructosa 10g, NaCl 5 g, fuente de nitrógeno 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, extracto de levadura (Oxoid) 0,5 g, el pH se ajustó a 7. Como sustrato se utilizó mezcla de fitosteroides de caña de azúcar con un 80% de pureza y como tensioactivo, Tween 80a 1 g L⁻¹, respectivamente. Estas mezclas después de ser esterilizadas, se homogeneizaron mediante ultrasonido y se adicionaron asepticamente en el momento de inocular el cultivo. Se mantuvo la agitación a 200 r/min a 30 °C durante 6 días.

Determinación de ADD y AD

De los cultivos estériles se extrajo el AD y el ADD con acetato de etilo (4 x 100mL) y se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución, empleando un detector UV a 254 nm, una columna de fase reversa RP-18 de 5 mm (125 X 4) (Merck), el sistema de solventes que se usó fue 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 por triplicado y los resultados se compararon mediante el análisis de varianza simple y la prueba de Duncan.⁹

RESULTADOS

Los resultados demostraron que tres de los aminoácidos empleados (Tabla I) no contribuyen a la realización del proceso de bioconversión (triptófano, asparagina y prolina), sino que más bien, provocan algún tipo de inhibición o

represión de enzimas que impiden la producción de precursores esteroidales.

Es de señalar que en presencia de hidroxiprolina se produjeron pequeñas cantidades de ADD y AD, lo cual contrastó con los resultados negativos que se obtuvieron al emplear la prolina como única fuente de nitrógeno.

TABLA I
Efecto de la adición de aminoácidos como única fuente de nitrógeno en la biotransformación de fitosteroles por *Mycobacterium sp.* NRRL B-3683

Compuestos	AD	AD (mg · L ⁻¹)	Total
L-citrulina	133,1(a)	20,5	153,6
B-alanina	46,3(b)	16,7	63,0
L-histidina	43,8(b)	12,2	56,0
L-tirosina	37,0(bc)	14,2	51,2
L-hidroxiprolina	30,2(bc)	6,2	36,4
L-arginina	29,9(bc)	8,1	38,0
L-creatina	24,2(bc)	0,24	,2
L-valina	16,2(c)	5,2	21,4
L-leucina	14,5(c)	17,1	31,6
L-fenilalanina	13,3(c)	10,3	23,6
Glutamina	12,5(c)	7,9	20,4
L-cisteína	5,0(d)	2,8	7,8
L-cistina	1,7(d)	2,7	5,4
L-metionina	1,2(d)	1,1	2,3
L-asparagina	0	0,0	
L-prolina	0	0,0	
L-triptófano	0	0,0	

Letras diferentes indican que existen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).

El mejor aminoácido para la biotransformación, fue la citrulina que permitió la formación de 153 mg · L⁻¹ de producto total biotransformado. El resto de los aminoácidos estuvo muy por debajo, es decir, a menos de la mitad de la cantidad de ADD producida.

En presencia de cistina y leucina, se produjo más AD que ADD, aunque los valores resultaron bajos y próximos entre sí. Por otro lado, la creatina fue el único aminoácido que benefició sólo la producción de ADD.

La adición de fuentes orgánicas complejas utilizadas como únicas fuentes de nitrógeno (Tabla II), no beneficiaron el proceso de biotransformación para esta cepa microbiana.

Entre las que contribuyeron a la obtención de los mejores resultados, se encuentra el huevo en polvo, el cual favoreció en dos veces más la producción de ADD con relación a los extractos de carne y levadura, las peptonas proteosas, bacteriológica y cubana, así como la leche en polvo comercial y descremada.

El dipéptido glicil-glicina y la urea resultaron las mejores fuentes de nitrógeno para la producción de ADD.

De las sales inorgánicas, el nitrato de sodio resultó la mejor fuente de nitrógeno. Su empleo garantizó exclusivamente la producción de 174,4 mg · L⁻¹ promedio de ADD.

TABLA II
Efecto de la adición de fuentes de nitrógeno orgánicas en la biotransformación de fitosteroles por *Mycobacterium sp.* NRRL B- 3683

Compuesto	ADD	AD (mg · L ⁻¹)	Total
Urea	182,8(a)	0,18	2,8
Glicil-glicina	170,7(b)	0	170,7
Huevo en polvo	125,0(c)	6,2	130,9
Extracto levadura (Oxoid)	56,0(d)	15,0	71,0
Proteosa peptona (Oxoid)	28,3(e)	18,9	47,2
Peptona cubana	26,1(e)	8,5	34,6
Peptona bacteriológica (Oxoid)	24,1(e)	13,7	37,8
Extracto de carne (Oxoid)	23,4(e)	2,7	26,1
Leche descremada (Oxoid)	14,1(f)	8,6	22,7
Leche en polvo (comercial)	10,5(g)	4,3	14,8

Letras diferentes indican que existen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).

DISCUSION

En el proceso de biotransformación de esteroides se han empleado desde sales inorgánicas de amonio, como fosfato (mono y diamónico),¹⁰ sulfato,¹¹ cloruro¹² y acetato¹³ hasta fuentes orgánicas complejas, como licor de remojo del maíz y extracto de carne,¹⁴ proteína digerida enzimáticamente,⁴ peptona,¹⁵ extracto de carne y peptona¹⁶ y miel extractada de levadura.^{16,17} Sin embargo, los aminoácidos (Tabla I) no son fuentes de nitrógeno que beneficien significativamente el proceso de bioconversión de los fitosteroides en ADD.

Los aminoácidos se forman a partir de familias biosintéticas.¹⁸ La producción de ADD en presencia de glutamina, arginina y prolina que se forman del glutamato, no fue superior a los 30 mg · L⁻¹. Uno de ellos no favoreció la bioconversión. Con esto se puede suponer que su efecto fue negativo, teniendo en cuenta su sustitución por nitrato de sodio.

La metionina y la asparagina, que pertenecen a la familia del ácido aspártico, no contribuyeron a la biotransformación. Sin embargo, la asparagina se usa como fuente de nitrógeno para el crecimiento de las micobacterias,¹⁹ lo cual pudiera hacer pensar que sería una buena fuente para favorecer la bioconversión, pero no resultó lo que se esperaba.

La familia de los aminoácidos aromáticos, integrados por tirosina, triptófano y fenilalanina, tampoco fueron buenas fuentes, ya que los resultados que se obtuvieron no llegaron a 40 mg · L⁻¹ de ADD, ni a más de 15 mg · L⁻¹ de AD; con la observación de que el triptófano no favoreció la formación de estos precursores. La cisteína, de la familia de la serina, tampoco fue buena fuente. La leucina y la valina, de la familia del piruvato, no arrojaron valores apreciables, aunque sí superiores a los aminoácidos anteriormente mencionados.

Por otra parte, la ornitina, citrulina y arginina forman parte del ciclo de la urea, iniciándose éste cuando la ornitina y el carbamil-fosfato se unen por la acción de la ornitina-carba-

mitransferasa para formar la citrulina, la que en presencia de aspartato y bajo la acción de la arginino-succinato-sintetasa forma el arginossuccinato que es escindido por la arginino-succinato-lyasa para producir fumarato y arginina, y esta última, mediante la acción de la arginasa forma ornitina que cierra el ciclo, y urea.²⁰

Este ciclo, se ha explicado a partir de las experiencias acumuladas con células de eucariontes, pero se desconoce si se comporta de igual forma en procariontes. Pudiera ocurrir, que mediante algún mecanismo bioquímico a partir de la citrulina se forme urea, siendo la responsable de provocar efectos beneficiosos en la biotransformación de los fitosteroles, ya que con la citrulina se mejoraron varias veces los resultados si se comparan con cualquier otro aminoácido de los ensayados.

Otras fuentes de nitrógeno orgánicas suelen emplearse en muchos medios de cultivo como se había mencionado anteriormente. Sin embargo, su influencia sobre la producción de ADD y AD, no fue la mejor para esta cepa (Tabla II). Entre las que beneficiaron la formación de estos precursores, se encuentra el huevo en polvo. Este, se usa mucho en la confección de medios de cultivo para el mantenimiento de las especies del género *Mycobacterium* formando parte de dos de los medios más usados Lowenstein-Jensen²¹ y UIT.²² No obstante, Imada y col.²³ emplearon la yema de huevo en la biotransformación de esteroides, con dos cepas diferentes de este género y obtuvieron muy buenos resultados.

La glicil-glicina y la urea resultaron las mejores fuentes orgánicas de nitrógeno para la producción de ADD. Es bueno destacar que en presencia de estos dos nutrientes no se forma AD; sin embargo, el resto de las fuentes facilitaron la formación de este compuesto con relaciones ADD:AD que fueron desde 1:0,05 hasta 1:0,5, lo cual puede indicar que en cierta medida estas fuentes no favorecen del todo el mecanismo de acción de la enzima 1,2-deshidrogenasa porque se acumulan ciertas cantidades de AD, que es el compuesto precursor inmediato del ADD.

Las sales inorgánicas empleadas como fuentes de nitrógeno presentan entre otras ventajas, que son mejores de conservar en comparación con las fuentes orgánicas de nitrógeno, garantizan una formulación más estable del medio de cultivo y además, son más baratas.²⁴ De ellas, el nitrato de sodio resultó la mejor fuente de nitrógeno y produjo exclusivamente, un promedio de 174,4 mg · L⁻¹ de ADD. Además, es conveniente destacar que ninguno de los nitratos favoreció la formación de AD (Tabla III), lo que indica, en cierta medida, el efecto positivo del ión nitrato en este sentido. Según Tsukamura,²⁵ este ión puede ser asimilado por algunas especies de micobacterias e Imada y col.²³ han utilizado el nitrato de sodio en las bioconversiones con este tipo de microorganismos.

TABLA III
Efecto de la adición de fuentes de nitrógeno inorgánicas en la biotransformación de fitosteroides por *Mycobacterium* sp. NRRL B- 6383

Compuesto	ADD	AD (mg · L ⁻¹)	Total
NH ₄ NO ₃	22,3(bc)	022	,3
(NH ₄) ₂ HPO ₄	29,3(b)	5,4	34,7
(NH ₄) ₂ SO ₄	10,4(cd)	5,5	15,9
NH ₄ Cl	8,1(d)	4,6	12,7
NaNO ₃	174,4(a)	017	4,4
KNO ₃	15,3(cd)	015	,3

Letras diferentes indican que existen diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan p ≤ 0,05).

Por otra parte, los resultados correspondientes al empleo de nitrato de sodio y de potasio, demuestran que la primera sal resulta diez veces superior en relación con la producción de ADD, lo que sugiere una influencia positiva del ión sodio en el proceso.

CONCLUSIONES

De los aminoácidos ensayados, la citrulina fue capaz de beneficiar la producción de ADD y AD a partir de los fitosteroides de la caña de azúcar, el resto de ellos rindieron pocas cantidades de estos precursores. Casi todos los aminoácidos permitieron la formación de ADD y AD, en relaciones que variaron desde 1:0,15 hasta 1:1.

De las fuentes orgánicas ensayadas, la urea y la glicil-glicina resultaron las mejores, ya que permiten obtener exclusivamente, las mayores cantidades de ADD, seguidas por el huevo en polvo.

Las fuentes inorgánicas de nitrógeno presentaron también diferencias, siendo entre ellas la mejor, el nitrato de sodio, el que a su vez, produce diez veces más ADD que el de potasio. Las fuentes de nitrato producen exclusivamente sólo este precursor.

AGRADECIMIENTOS

A la organización canadiense CIID, Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Ottawa, Canadá. Proyecto 87-1024 por la ayuda financiera brindada.

BIBLIOGRAFIA

- Oginsky E.L. and Umbreit W.W. An Introduction to Bacterial Physiology. Ed. W.H Freeman and Comp., San Francisco. 218-224, 1959.
- Doelle H.W. Bacterial Metabolism. Academic Press, N. York, 518-630, 1969.
- Capek A., Hanc O. and Tadra M. Microbial Transformation of Steroids. Academia Publishing House of the Czechoslovak Acad. of Sciences, Prague, 81-90, 1966.
- Marshech W.J., Kraychy S. and Muir R.D. *Appl. Microbiol.*, **23**, 72, 1972.
- Weber A. y Kennecke M. WO 3521111, 1986.
- Flygare S. and Larsson P.O. *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 752, 1989.
- Orozco L.R., Borrego S., Pérez C., Pérez I., Espinosa M.E., Benítez F., Fonseca M. y Guillén F., Biotransformación del colesterol en androstadiendiona en un medio de fermentación con un alto contenido salino, empleando la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683. V Congreso de la Sociedad Cubana de Ciencias Farmacéuticas, La Habana, Cuba, 1993.
- Conner A.H., Nagaoka M., Rowe J.W. and Perlman D. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 310, 1976.
- López R. Diseño estadístico de experimentos, Editorial Científico-Técnica, La Habana, 103-111, 1988.
- Marcus P.I. and Talalay P. *J. Biol. Chem.*, **218**, 661, 1956.
- Kloosterman J. and Lilly M.D. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **6**, 113, 1984.
- Smith M., Zahnley J., Pfeifer D. y Goff D. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1425, 1993.
- Lee C.Y., Chen C.D. y Liu W.H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 447, 1993.
- Nagasawa M., Watanabe N., Hashiba H., Murakami M., Bae M., Tamura G. y Arima K. *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 838, 1970.
- Arima K., Nakamatsu T. y Beppu T. *Agr. Biol. Chem.*, **42**, 411, 1978.
- Saunders R., Cheetman P.S.J. y Hardman R. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 549, 1986.
- Borrego S., Lara L., Espinosa M.E., Pérez I., Orozco L.R., Herrera A. y Martí E. Evaluación de un medio de cultivo natural para micobacterias de rápido crecimiento. V Congreso de la Sociedad Cubana de Ciencias Farmacéuticas, La Habana, Cuba, 1993.

18. Stanier R.Y., Ingraham J.L., Weelis M.L. and Painter P.R. General Microbiology, Mac Millan Education Ltd., London, U.K, 197-204, 1986.
 19. Ratledge G. The Biology of the Mycobacteria. Vol. 1., Academic Press, London, N. York, 186-271, 1982.
 20. Lehninger A. Bioquímica. Edición Revolucionaria, La Habana, 591-597, 1981.
 21. Casal M. Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias. Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, España, 198-200, 1990.
 22. Mederos L.M. y Valdivia J.A. **Rev. Cub. Med. Trop.**, **38**, 25, 1986.
 23. Imada Y., Osozawa T., Morimoto Y. and Kinoshita M. US Patent 4397946, 1983.
 24. Miller T.L and Churchill B.W. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology., Ed. Demain A.L. y Salomon N.A., Washington, 122-136, 1986.
 25. Tsukamura M., Identification of Mycobacteria., Ed. by Mycobacteriosis Research Laboratory of the National Chubu Hospital, Japan, 1984.
-