

# Efecto negativo de los ácidos grasos libres sobre la biotransformación de colesterol y el crecimiento de la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683

Mirsa S. Gutiérrez, Nidia Rojas,\* Ileana Pérez,\*\* Sofía Borrego\*\* y María E. Espinosa.\*\*

Laboratorio de Microbiología, Centro de Investigaciones del Ozono, Avenida 15 y Calle 230, Siboney, Playa, Apartado Postal 6880. \*Departamento de Microbiología y Virología Facultad de Biología, Universidad de la Habana, 25 y J. Vedado, Plaza de la Revolución. \*\*Departamento de Esteroides Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6880, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 3 de abril de 1997      Aceptado: 12 de diciembre de 1997

Palabras clave: biotransformación, *Mycobacterium*, androstadiendona, ácidos grasos, crecimiento, colesterol.  
Key words: biotransformation, *Mycobacterium*, androstadiendione, fatty acids, growth, cholesterol.

**RESUMEN.** Se analizó el efecto negativo que ejercen los ácidos palmítico, oleico y linoleico en un intervalo de concentración entre 0,1 y 15 mmol/L, sobre el crecimiento y la capacidad biotransformadora de la cepa mutante de *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683, capaz de producir androstadiendiona (ADD) fundamentalmente a partir de colesterol. El crecimiento se midió por la técnica de masa seca y las concentraciones producidas de ADD por cromatografía líquida de alta resolución. Se concluye que la adición de estos ácidos grasos afecta el crecimiento y la capacidad biotransformadora de la cepa en dependencia de sus concentraciones, sus insaturaciones y las condiciones de cultivo de la cepa.

**ABSTRACT.** The negative effect of different free fatty acids (palmitic, oleic and linoleic acids) on cholesterol biotransformation to produce androstadiendione (ADD) as well as the growth of the *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 strain was studied. The growth measurement was carried out by dry weight technique and the ADD concentration was measured by high performance liquid chromatography technique. These results suggest that the free fatty acids action on biotransformation and growth depend on the concentration and the unsaturation degree as well as the strain culture condition.

## INTRODUCCION

La transformación microbiológica de esteroides a 17-cetosteroides, resulta de gran interés, ya que permite utilizar materias primas baratas en la obtención de drogas esteroidales de elevado costo y amplio uso.<sup>1,2</sup>

Con el empleo de diversos microorganismos, entre ellos, algunas micobacterias,<sup>2,4</sup> se pueden obtener precursores esteroidales avanzados como la androstendiona (AD) y la androstadiendiona (ADD) a partir de colesterol.<sup>5</sup> La baja solubilidad del sustrato es uno de los inconvenientes que presenta a nivel industrial la biotransformación de estos compuestos hidrofóbicos cuando se em-

plean altas concentraciones. Para resolver esta situación, se han empleado diversos surfactantes no iónicos entre los que se encuentran: diferentes tipos de Tween [Polyoxyethylene (20) sorbitan mono-(un ácido graso)],<sup>6</sup> así como la disolución del sustrato en diferentes solventes orgánicos.<sup>5,7</sup>

Una variante que se ha empleado en la biotransformación de esteroides es adicionar diversos aceites vegetales en el medio de fermentación, que ayuda a la solubilización de aquellos y a su biotransformación.<sup>8,9</sup> La cantidad de aceite a emplear varía proporcionalmente según la cantidad de sustrato a bio-

transformar. Estos aceites comerciales contienen pequeños porcentajes de ácidos grasos libres, cuyo contenido varía según la naturaleza del aceite y el modo de su obtención. Estudios previos han demostrado que los ácidos grasos tienen efecto bactericida sobre diferentes microorganismos<sup>9</sup> y distintas cepas de micobacterias.<sup>10,11</sup>

Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de los principales ácidos grasos libres presentes en diversos aceites comerciales, sobre la capacidad biotransformadora y el crecimiento de la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683.

## MATERIALES Y METODOS

### Microorganismo

Se empleó una cepa mutante de *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683, conservada en medio agar nutritivo enriquecido con glicerol al 2%.<sup>12</sup>

### Ácidos grasos

Se emplearon los ácidos palmítico, oleico y linoleico de calidad reactivo (Merck). El ácido palmítico por ser un sólido se disolvió previamente en dimetilformamida y luego, se incorporó al medio sin sobrepasar la concentración tóxica del disolvente (0,5%).

**Esteroles**

Se utilizó colesterol calidad reactivo (Merck).

**Condiciones de cultivo**

Los inóculos con volúmenes de 50 mL de caldo nutriente enriquecido<sup>12</sup> se prepararon a partir de colonias aisladas, y luego, fueron incubados a 30 °C a 200 r/min durante 48 h. La biomasa se separó por centrifugación, se lavó dos veces con una disolución de agua y Tween al 0,7 %, y se ajustó después a una densidad óptica igual a 1 con el empleo de una longitud de onda de 420 nm. Se tomó un volumen que representara una concentración final del 10 % v/v para la biotransformación y del 2,5 % v/v para el crecimiento.

**Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los ácidos grasos**

La sensibilidad de la cepa a los ácidos grasos se determinó por la técnica de dilución en agar<sup>13</sup> a partir del preinóculo en placas de agar nutriente enriquecido y agar salino con cada ácido a 0; 0,1; 1; 3; 6; 9; 12 y 15 mmol/L respectivamente. Luego, se incubaron a 30 °C durante 48 h. Se realizaron dos réplicas por cada punto experimental.

**Determinación del crecimiento**

La técnica empleada fue peso seco (ps). Los intervalos de tiempo fueron de 0, 8, 24, 48 y 72 h. Los cultivos que contenían los ácidos grasos a distintas concentraciones fueron esterilizados y centrifugados a 9 000 r/min por 10 min y las biomásas correspondientes, se lavaron dos veces con una disolución de agua-Tween 80 al 0,7 %. Posteriormente, se resuspendió cada una en 1 mL de esta disolución y se colocaron en un peso filtros (po). Se eliminó el agua en la estufa a 80 °C durante 24 h. Se realizaron tres réplicas por cada punto experimental.

**Biotransformación**

El estudio se realizó en caldo nutriente enriquecido y en caldo salino.<sup>12</sup> Se empleó una concentración de sustrato de 1 g/L y como tensoactivo se empleó Tween-40 al 0,7 % para ácido palmítico y Tween-80 al 0,7 % para ácido oleico y linoleico. Se emplearon porciones de 25 mL con una concentración final del inóculo de 10 % v/v. Después de 7 d en una zaranda orbital a 200 r/min y 30 °C, se determinó la concentración de ADD por cromatografía líquida de alta resolución.<sup>13</sup> Se realizaron tres réplicas por cada punto experimental.

**Análisis de los resultados**

Los resultados correspondientes a las técnicas de biotransformación aplicadas fueron evaluados estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple y una prueba de Duncan con un nivel de significación de  $\alpha = 0,01$ . Las diferencias significativas entre las distintas concentraciones de ADD producidos se señalan con las letras a, b, y c.

**RESULTADOS**

Se pudo apreciar la existencia de una diferencia notable a simple vista entre el crecimiento en el medio agar nutriente enriquecido y agar salino aún en ausencia de los ácidos grasos (Tabla 1), lo cual sin duda, se debió a la presencia de nutrimentos orgánicos en el primero que aceleran el crecimiento de la cepa.

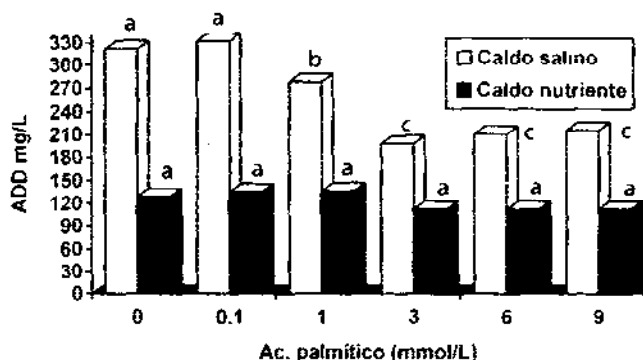
La presencia de los ácidos palmítico y oleico en los dos medios de cultivo, no inhibió el crecimiento microbiano hasta las concentraciones probadas. Sin embargo, el ácido linoleico es tóxico, por presentar una inhibición completa del crecimiento a partir de 12 mmol/L en agar nutriente enriquecido y de 9 mmol/L en agar salino. Por otra parte, los ácidos grasos en agar nutriente enriquecido son menos tóxicos que en agar salino, lo cual puede deberse a la presencia en el primero de sustancias proteicas que atenuan la acción de aquellos.

Sobre la base de estos resultados, se analizó la producción de ADD a diferentes concentraciones de ácido palmítico en caldo nutriente enriquecido y caldo salino (Fig. 1). Al analizar estadísticamente la producción de ADD en el primero, se obser-

**Tabla 1.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la cepa frente a los tres ácidos grasos.

(mmol/L)	Agar nutriente enriquecido			Agar salino		
	Palmítico	Oleico	Linoleico	Palmítico	Oleico	Linoleico
0	++	++	--	+	-	-
0,1	++	++	--	+	-	-
1	++	++	++	+	-	-
3	++	++	--	+	-	-
6	++	++	++	+	-	-
9	++	++	--	+	-	-
12	++	++	-	+	-	-
15	++	++	-	+	-	-
CMI	nd	nd	9-12 mmol/L	nd	nd	6,9 mmol/L

(++) Buen crecimiento. (+) Crecimiento moderado. (--) No crecimiento. (nd) No determinado.



**Fig. 1.** Biotransformación en presencia de ácido palmítico. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas, de acuerdo con la prueba de Duncan.

vó que no existían diferencias significativas entre las distintas concentraciones de ácido palmítico utilizadas y sin embargo, la producción de ADD en caldo salino no se comportó de igual forma, pues a partir de 1 mol/L del ácido comenzó a decaer significativamente hasta 3 mmol/L condición en que se mantuvo constante hasta la concentración final.

Para el ácido oleico, sólo se produjo ADD en el control (no tenía añadido el ácido), ya que las concentraciones estudiadas inhibieron la biotransformación en los dos medios de cultivo (Fig. 2).

En presencia de ácido linoleico en caldo nutriente enriquecido, sólo tuvo lugar producción de ADD en el control, ya que a 1 mmol/L del ácido se inhibe totalmente la biotransformación (Fig. 3). En caldo salino el efecto tóxico resultó menor, ya que existe producción a 1 mmol/L del ácido aunque significativamente menor con respecto al control. A 3 mmol/L del ácido se inhibe totalmente la producción de ADD.

Con relación al crecimiento con ácido palmítico a 1 mmol/L todavía a las 72 h no se había alcanzado la fase estacionaria y la concentración celular obtenida era mayor con respecto al control, mientras que a 3 mmol/L, se alcanzó esta fase a las 48 h al igual que el control, pero con una pendiente menor en su fase logarítmica lo que indica un retardo del crecimiento con una disminución de la concentración celular con respecto al control (Figuras 4 y 5). Por otra parte, para los ácidos oleico y linoleico existe una inhibición total del crecimiento desde 1 mmol/L con respecto al control.

**DISCUSION**

Kanetsuna y col.<sup>10</sup> plantearon la existencia de una correspondencia entre el grado de insaturación de los ácidos grasos y su nivel de toxicidad, de ahí que los ácidos grasos saturados son menos tóxicos que los insaturados y que esto varía de una especie a otra. Estos autores plantearon que en algunos casos (9 mmol/L) se puede acelerar el crecimiento de algunas cepas de colección. Aunque esto anterior se refiere solamente al crecimiento microbiano y no al proceso de biotransformación, al comparar los resultados se observó una aceleración del crecimiento a 1mmol/L del ácido palmítico en caldo nutriente enriquecido, aunque esto no se correspondió con un aumento significativo en la biotransformación en las mismas condiciones. Este aumento

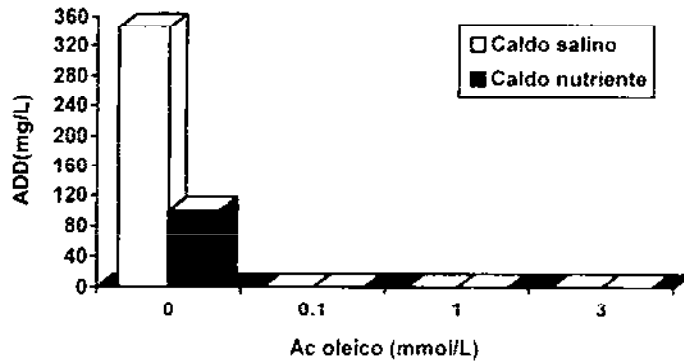


Fig. 2. Biotransformación en presencia de ácido oleico.

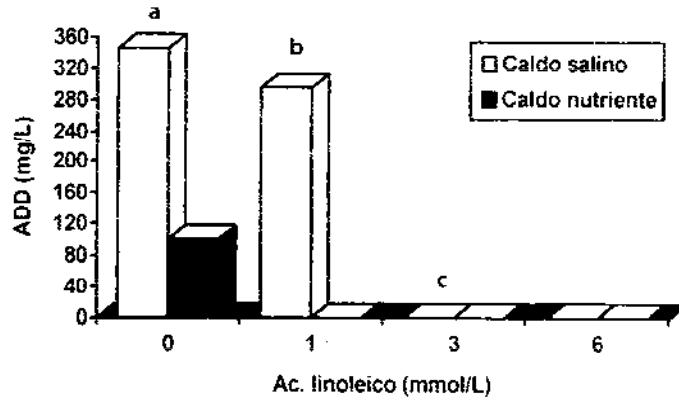


Fig. 3. Biotransformación en presencia de ácido linoleico

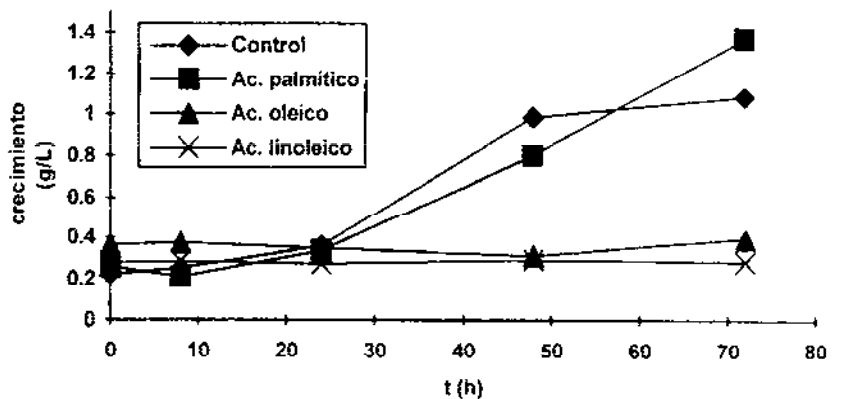


Fig. 4. Curvas de crecimiento en caldo nutriente con ácido palmítico, oleico y linoleico a 1 mmol/L.

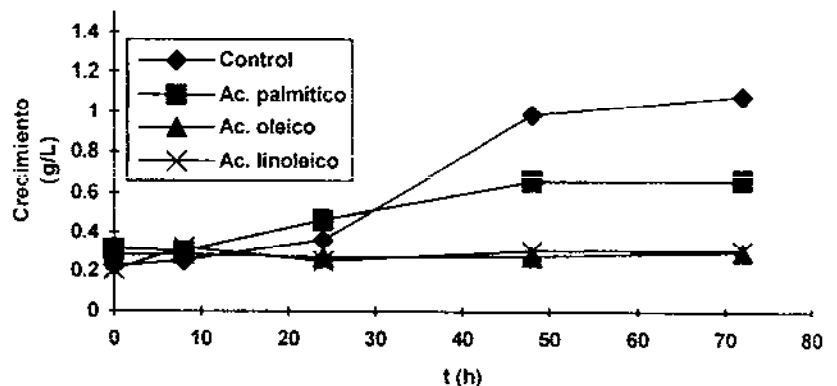


Fig. 5. Curvas de crecimiento en caldo nutriente con ácido palmítico, oleico y linoleico a 3 mmol/L.

de crecimiento pudiera deberse a que en uno de los pasos en la formación del ácido micólico, estructura fundamental de la pared de micobacteria, ocurre una condensación de dos moléculas de ácido palmítico.<sup>14</sup> Con relación a la biotransformación, Sedlaczek<sup>15,16</sup> trabajando con una cepa de micobacteria observó que la estructura del micolilarabinogalactano interviene de forma esencial en la vía de penetración lipídica de los esteroides, por lo tanto, una inhibición en la formación del péptido glucano produce un debilitamiento de la pared celular y esto provoca un incremento en su permeabilidad, facilitándose la penetración del sustrato esteroide. Sin embargo, el hecho de que la producción de ADD no aumente, pudiera deberse a que ocurre un efecto opuesto a lo reportado por Sedlaczek, debido a que la presencia del ácido palmítico puede ayudar a la formación de la pared celular y por tanto, frena la penetración del sustrato esteroide.

A partir de 3 mmol/L del ácido palmítico, se observa un retardo del crecimiento alcanzándose a las 48 h la fase estacionaria con una concentración celular mucho menor que el control. Sin embargo, esta disminución en el crecimiento no produce una disminución significativa en la biotransformación en caldo nutriente enriquecido, debido a que esta biotransformación es parcialmente asociada al crecimiento, ocurriendo el pico de producción de ADD al final de la fase logarítmica e inicio de la fase estacionaria.<sup>17</sup> Por lo que una prolongación de esta interfase pudiera mantener la biotransformación. Por otra parte, el comportamiento en el crecimiento de micobacterias frente a la acción de este ácido, varía dependiendo del tipo de especie e incluso de cepas.<sup>18</sup>

En presencia del ácido oleico la biotransformación en ambos medios se ve inhibida totalmente con respecto al control, a consecuencia de la ausencia del crecimiento microbiano. Esto se corresponde con lo planteado por Ratledge y col.,<sup>11</sup> y Smith y col.,<sup>4</sup> quienes al trabajar con diferentes Tween (compuestos por ácidos grasos diferentes) como surfactante, observaron que el comportamiento de otras cepas en la biotransformación no siempre es igual al del crecimiento microbiano, debido a que los microorganismos pueden utilizar el ácido graso como fuente de carbono y energía.

La presencia de ácido linoleico en caldo nutriente enriquecido inhibió el crecimiento y la biotransformación. Sin embargo, en caldo salino con 1 mmol/L del ácido se produce ADD, aunque significativamente menor con respecto al control. Es conveniente señalar que contrario a lo esperado, la acción de este ácido sobre la biotransformación es más drástica en caldo nutriente enriquecido que en caldo salino, debido posiblemente a que las condiciones de cultivo y otras que no se estudiaron influyen sobre la biotransformación y el crecimiento.

Como es conocido, los aceites vegetales pueden utilizarse en la biotransformación de los esteroides<sup>8,19</sup> y el contenido de ácidos grasos que forman sus triglicéridos varía siendo los ácidos grasos insaturados los predominantes, de ahí que el contenido de ácido oleico oscile entre un 20 y un 85 % del contenido de los ácidos grasos totales y para el ácido linoleico entre un 4 y un 65 %.<sup>20</sup> Por lo tanto, cuando se trabaja con grandes volúmenes de sustrato que requieren de abundantes cantidades de aceites vegetales como disolvente, es necesario tener en cuenta el efecto tóxico de estos ácidos grasos insaturados, que aunque no están de forma libre en grandes cantidades en los aceites vegetales comerciales, se pueden liberar y afectar el proceso de fermentación.

En el caso estudiado, en que el medio de fermentación principal es el caldo salino, se pudo apreciar que el ácido palmítico resulta tóxico al proceso fermentativo en un intervalo que oscila de 0,1 a 1 mmol/L y para el linoleico la toxicidad es a 1 mmol/L y para el oleico, ya a 0,1 mmol/L es tóxico. Por lo tanto, la presencia de concentraciones límites de los ácidos grasos provenientes de los aceites vegetales en el proceso de fermentación traería como consecuencia la inhibición de la biotransformación.

## CONCLUSIONES

Los ácidos grasos no influyen de forma similar sobre el crecimiento de *Mycobacterium* sp. NRRL B3683 y el proceso de biotransformación de colesterol, independientemente del medio de cultivo que se utilice.

La inhibición del crecimiento provocado por la presencia de los ácidos oleicos y linoleicos en caldo nutriente enriquecido, dió lugar a que no se produjera ADD. Sin embargo, el ácido palmítico inhibió el crecimiento y no la capacidad biotransformadora de la cepa.

La producción de ADD en medio salino se inhibió totalmente en presencia de ácido oleico. Sin embargo, con ácido linoleico se produce ADD a 1 mmol/L y con palmítico la producción se mantiene hasta 9 mmol/L pero significativamente menor al control.

El hecho de que se conozcan las concentraciones en que estos ácidos grasos ejercen un efecto negativo sobre la producción de ADD, garantiza la selección de los aceites vegetales a utilizar en las fermentaciones cuando se trabaja a mayor escala.

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Ottawa, Canadá (Proyecto 87-1024) por la ayuda financiera brindada.

## BIBLIOGRAFIA

1. K. J. Basik. Microbial side-chain degradation of sterols. *Microbiol.*, 25, 461, 1985
2. Kieslich K. Biotransformation of industrial use. *Acta Biotechnol.*, 11, 559, 1991.
3. Lee C.Y., Chen C.D. and Lau W.H. Production of androsta-1,4-diene-3,17-dione from cholesterol using two-step microbial transformation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 447, 1993
4. Smith M., Zahndley J., Pfeifer D. and Goff D., Growth and cholesterol oxidation by *Mycobacterium* species in Tween 80 Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, May, 1425, 1993.
5. Schlosser D., Irrgang S., and Schmauder H.F. Hydroxylation with free and immobilized cells of *Penicillium raistrickii*, in the presence of  $\beta$ -cyclodextrin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 16, 1993.
6. Schöemer V. and Wagner F. Production of steroid-ring  $\beta$  keto acid from  $\beta$ -sitosterol and influence of surfactants on sterol uptake in *Nocardia* sp. M-29-40. *J. Appl. Microb. Biotech.*, 10, 99, 1980.
7. Flygare S. Part I: Steroid transformation using immobilized whole cell. Part. II: Affinity precipitation and magnetic aqueous two-phase separation. Ph.D. Thesis, University of Lodi Sweden.
8. Nishikawa D., Imada Y. Y., Kinoshita M., Takahashi K., Machida H., and Nagasawa M., Process for the microbiology oxidation of steroids. Japanese Patent, No 1055862, 1975.
9. Ceen E.G., Herrmann J.P.R. and Dumill P., Solvent damage during free cell catalysis and its avoidance. Studies of 11 $\alpha$ -hydroxylation of progesterone by *Aspergillus ochraceus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 1987.
10. Kanetsuna F. Bactericidal effect of fatty acids on *Mycobacteria* with particular reference to the suggested. *Mechanism Immunol.*, 29, 127, 1985

11. Ratledge C. and Stanford J. The Biology of the Mycobacteria., Vol. 1. Academic Press., 1982.
12. Borrego S., Herrera A., Espinosa M.E., Martí E. y Fonseca M. Influencia de los iones inorgánicos y factores de crecimiento sobre la biotransformación de la mezcla de fitosteroles de la caña de azúcar., **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, 26, 40, 1995.
13. NCCLS Document M7-A3, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Third Edition. Approved Standard., Vol. 13, No. 25, 8, 1993.
14. Lacave Ch., Lan,elle M.A. and Lan,elle G. Mycolic acid synthesis by *Mycobacterium aurum* cell-free extracts., **Biochim. et Biophys. Acta**, 1042, 315, 1990.
15. Sedlaczek L., Gorminski R.M., and Lisowska K. Effect of inhibitory of cell envelope synthesis on  $\beta$ -sitosterol side chain degradation by *Mycobacterium sp.* MB 3683., **J. Basic Microbiol.**, 34,387,1994.
16. Sedlaczek L, Doczkal K., Zemelco I., and Kaca W. Glycine induced enhancement of  $\beta$ -sitosterol side chain degradation by *Mycobacterium sp.* MB 3683. Symposium: Biotechnology in central European Initiative Countries., Graz, Austria-13-15 April,79,1992.
17. Borrego S. Biotransformación de fitosteroles de la caña de azúcar en precursores esteroidales avanzados utilizando un mutante de *Mycobacterium*. Tesis de Doctorado. Ciudad de La Habana, Cuba. 1997.
18. Stahl D.A. and Urbance J.W., The division between fast- and slow-Growing species corresponds to natural relationships among the Mycobacteria., **J. Bact.** Jan., 116, 1990.
19. Phase N. and Patil S., Natural oils are better than organic solvents for the conversion of soybean sterols to 17-ketosteroids by *Mycobacterium fortuitum*., **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 10: 228-229, 1994.

---

# SEGUNDO TALLER INTERNACIONAL DE PRODUCCION DE ALCOHOLES

## Universidad de Matanzas, Cuba.

### 29 de marzo al 1 ro de abril de 1999.

#### OBJETIVOS

Promover el intercambio científico-técnico internacional sobre los problemas más actuales en el campo de la producción de alcoholes y levaduras.

Fomentar el desarrollo de vías biotecnológicas alternativas en la producción de alcohol y en el tratamiento y utilización de aguas residuales de esta industria.

Contribuir al establecimiento de estrategias que favorezcan la colaboración internacional en este campo.

#### TEMATICAS

Producción de alcohol y levaduras. Variantes tecnológicas o biotecnológicas de obtención.

Bioquímica de la fermentación alcohólica. Mejora de cepas alcoholeras por vías naturales o procesos biotecnológicos.

Propuestas para el tratamiento de aguas residuales. Evaluación y utilización de residuales de la industria del alcohol y producción de bebidas alcohólicas.

Etanol combustible. Presente y perspectiva de su utilización.

Aplicación de la electricidad y el magnetismo en estudios de procesos fermentativos en general y su extensión al campo de las levaduras en particular.

Producción de bebidas alcohólicas en general.

Alcohol y salud. Alcoholismo.

#### Informaciones:

Prof. Dr. Marcelo Marcet  
Presidente

COMITE ORGANIZADOR

SEGUNDO TALLER INTERNACIONAL DE PRODUCCION DE ALCOHOLES

Facultad de Ingeniería Química, Universidad de Matanzas. Autopista a Varadero km 3, Matanzas, Cuba. Código Postal 44740.

Teléfono: (53)(52) 6 1432. Fax: (53)(53) 5 3101. Correo electrónico: umcc@reduniv.edu.cu.