

Efecto de la glucosa en la producción de testosterona mediante cepas de *Mycobacterium* sp.

María A. Ramírez Garabal, María A. Díaz Pérez, Celso Pérez Bolaños y Magdalena Fonseca.

Departamento de Esteroides, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6880, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 5 de septiembre de 1997. Aceptado: 24 de marzo de 1998.

Palabras clave: Biotransformación, testosterona, *Mycobacterium*, colesterol.
Key words: Biotransformation, testosterone, *Mycobacterium*, cholesterol.

RESUMEN. La transformación de esteroides mediante microorganismos es un proceso bien conocido y aplicado en la producción de precursores esteroidales tales como el 4-androsten-3,17-diona (AD) y el 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD). Estos compuestos son transformados químicamente en diferentes fármacos. Las micobacterias constituyen un grupo importante en este sentido, particularmente, los mutantes bloqueados en la degradación del anillo central esteroide. La cepa NRRL B-3683, se emplea fundamentalmente en la producción de ADD a partir de sustratos como el colesterol. Sin embargo, estudios recientes indican la posibilidad de obtener testosterona en un medio enriquecido con dextrosa. Sobre la base de estos trabajos, el objetivo de este estudio fue evaluar la obtención de testosterona mediante la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 y una cepa derivada de la anterior (Ex-4) por mutagénesis química, en un medio salino que contenía diferentes concentraciones de glucosa y colesterol como sustrato biotransformante. Los resultados demostraron que la presencia de glucosa en las condiciones estudiadas, favorece la producción de ADD o testosterona. Las cantidades de esta última variaron con la concentración de glucosa y los mayores rendimientos se obtuvieron al 2 y 4 %.

ABSTRACT. The steroid transformation by microorganisms has been a well known and well established process for the production of suitable intermediates as the androstane series: androsta-4-ene-3,17-dione (AD) and androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD). These products were converted into clinically important drugs. Mycobacteria are an important group, especially the mutants biochemically blocked for not degrading the steroidal nucleus. The strain of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 is mainly used to produce ADD from cholesterol substrates. However recent reports describe the testosterone formation when the medium is supplemented with dextrose. Based on it, the purpose of this study was analyze the testosterone production by *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 and a new strain mutant of it (Ex-4), in a saline medium supplemented with glucose and cholesterol as a biotransforming substrate. The results showed that the glucose favors the ADD production of testosterone. The amounts of this product changed with the glucose increase in the medium. The higher values of testosterone were at 2 and 4 % of glucose.

INTRODUCCION

Actualmente, los fármacos esteroidales se encuentran entre los de mayor consumo y se emplean como antiinflamatorios, anticonceptivos, diuréticos, contra tumores malignos y en enfermedades cardiovasculares.^{1,2}

Estos fármacos se logran producir a partir de precursores esteroidales avanzados del tipo androstanos, que pueden ser obtenidos por vía química, microbiológica o por combinación de ambas,^{3,4} utilizando como materias primas esteroides de origen animal como el colesterol o vegetal como el sitosterol, campesterol y estigmasterol presentes entre otros, en la fracción insaponificable de la cera de la caña de azúcar.⁶

Arthrobacter simplex, *Nocardia corallina* y *Mycobacterium* sp. se encuentran dentro de los microorganismos que han sido estudiados para obtener precursores tan importantes como el 4-androsten-3,17-diona (AD) y el 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD).⁷⁻⁹

Las cepas de *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 y la Ex-4, obtenida de la anterior por mutagénesis química con nitrosoguanidina biotransforman el colesterol a ADD fundamentalmente. Sin embargo, en 1982 Wang y col.^{9,11} analizaron la capacidad que tenía la cepa B-3683 de producir testosterona y a testosterona a partir del colesterol, sitosterol y estigmasterol en presencia de dextrosa. Sobre la base de este trabajo,

se evaluó la influencia que ejerce la adición de glucosa en la producción de testosterona, a partir del colesterol en un medio salino propuesto por Karlsson y col.¹² mediante las cepas *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 y Ex-4.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Se emplearon las cepas *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 y Ex-4, obtenida en el laboratorio a partir de la primera.

Ambas cepas biotransforman el colesterol fundamentalmente a ADD.

Condiciones de cultivo y biotransformación

Colonias puras de las cepas cultivadas en agar nutriente (OXOID) se subcultivaron en 8 g/L de medio caldo nutriente enriquecido (CN+) con glicerol al 0,5 %, myoinositol al 0,1 %, extracto de levadura al 0,1 % y Tween 80 al 0,7 %, durante 48 h a 200 r/min y 30 °C. Transcurrido este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 9 000 r/min durante 10 min y se lavaron con disolución agua-Tween 80 al 0,7 % (p/v).

El medio de cultivo utilizado para la biotransformación fue el propuesto por Karlsson y col. (medio MK) y tuvo la composición siguiente:

Fuente de carbono, 2 %; (NH₄)₂SO₄, 0,1 %; FeSO₄ · H₂O, 0,002 %; MgSO₄, 0,01 %; CaCl₂, 0,001 %; KH₂PO₄, 0,15 %; K₂HPO₄, 0,4 %.

Los ensayos de biotransformación se inocularon a una densidad óptica de 1,0 y los de crecimiento a otra de 0,1 a una λ = 420 nm en erlenmeyers de 250 mL con 50 mL respectivamente de medio. Después se agitaron a razón de 200 r/min, a 30 °C y durante 6 d. Se realizaron tres réplicas por experimento.

Como sustratos se emplearon, colesterol, AD y ADD purificados, a una concentración de 1 g/L, resuspendidos en Tween 40 al 15 % en relación 1:3, esterilizados y homogeneizados en baño ultrasónico.

Extracción y determinación cuantitativa del ADD, AD y la testosterona

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación, los cultivos se esterilizaron en autoclave. La ADD, AD y la testosterona se extrajeron dos veces con 2 mL de acetato de etilo. La determinación se realizó por cromatografía líquida de alta resolución según el método propuesto por Pérez y colaboradores.^{13,14}

El crecimiento de la cepa se analizó por el método de masa seca gravimétrica (MSG).¹⁵

RESULTADOS Y DISCUSION

Con el fin de estudiar el efecto que ejerce la glucosa en estas cepas, se analizó el crecimiento en ausencia de colesterol y glucosa al 2 % (Tabla 1).

En ambos casos, el crecimiento resultó muy pobre, lo que hizo pensar que aparentemente este azúcar no es una buena fuente de carbono para estas cepas.

Teniendo en cuenta este análisis, se estudió la biotransformación del colesterol por las cepas *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 y Ex-4 en un medio salino (MK) con diferentes concentraciones de glucosa.

Al emplear 0,2; 0,3 y 0,4 % de glucosa con la cepa B-3683, el producto mayoritario resultó el ADD, mientras que con 0,5; 2; 4 y 6 % se forma testosterona en cantidades considerables (Tabla 2). Al introducir mayores concentraciones del azúcar (8 y 10 %) aparentemente, su

exceso vuelve a favorecer la producción de ADD. Es por esto que se pensó en la posibilidad de un efecto regulatorio de la glucosa en la activación o inhibición de alguna vía no conocida por la cual se forma testosterona a partir del colesterol.

Tomando como referencia los resultados anteriores (cepa B-3683), se ensayaron las concentraciones de glucosa a partir de las cuales se forma la testosterona, en la cepa Ex-4.

Se observó que a 0,5; 2; 4 % de glucosa, se acumulan cantidades considerables de testosterona (Tabla 3). A concentraciones de 6 y 10 % no se forma ningún producto a diferencia de la cepa B-3683 (Tabla 2).

La respuesta diferente de esta cepa a las distintas concentraciones de glucosa empleadas con respecto a la cepa de origen parece haber estado asociada al fenotipo de la nueva mutación o mutaciones inducidas por la nitrosoguandina, no obstante, se corroboró la posibilidad del efecto bioquímico de la glucosa.

Para disminuir el período de incubación de estas cepas durante la biotransformación y lograr mejores

Tabla 1. Medición del crecimiento de las cepas *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 y Ex-4 en un medio de sales y glucosa al 2 % por el método de masa seca gravimétrica.

Cepa	Masa seca gravimétrica (g/L)	
	MK - Tween 80	MK + glucosa
B-3683	0,874 0	0,906 0
Ex-4	1,043 4	1,692 0

Tabla 2. Biotransformación del colesterol en medio MK por la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 con diferentes concentraciones de glucosa.

Variante	ADD	AD	Testosterona
Sin glucosa	39,50	5,02	
0,2	48,28	5,85	
0,3	48,55	9,90	
0,4	30,85	10,17	1,92
0,5	4,21	17,19	17,30
2,0	0,57	13,47	21,65
4,0	0,97	4,61	20,37
6,0	4,35	6,50	16,57
8,0	13,86	4,80	
10,0	39,50	5,02	

rendimientos, se determinó la producción diaria de testosterona. (Figuras 1 y 2).

A los 3 d se formó ADD fundamentalmente, mientras que a los 4 y 5 d aumentaron bruscamente las cantidades de testosterona al mismo tiempo que descendían las de la primera. Esto hizo pensar que o la transformación de ADD en AD y de este en testosterona es tan rápida que no se aprecia o que la transformación de ADD en testosterona ocurre por una vía no conocida. A los 6 d disminuyeron un poco la concentración de testosterona. Se pudo notar que todo el tiempo las cantidades de AD se mantuvieron constantes.

Los mejores rendimientos de testosterona se obtuvieron a los 5 d.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió utilizar como sustratos biotransformantes a las ADD y AD purificadas,^{16,17} en presencia y ausencia de glucosa al 2%, con la cepa B-3683 por ser la parental.

Se comprobó que el colesterol sin glucosa produce ADD y con glucosa, testosterona en cantidades considerables (Tabla 4). La ADD como sustrato y la glucosa, forman AD y testosterona, mientras que sin la glucosa sólo se forma AD.

Aparentemente con AD como sustrato, no se favorece ninguna de las reacciones de biotransformación.

Estos resultados indican la posibilidad de que exista una vía no conocida para la formación de la testosterona a partir del colesterol y glucosa, o que en presencia de glucosa se manifieste un efecto de competencia de esta fuente de carbono con el sustrato esteroidal por el aceptor final de los equivalentes de reducción, la cadena respiratoria, impidiendo que se produzcan reacciones de oxidación (como la deshidrogenación) y se favorezcan las de reducción (formación de testosterona).¹⁹

CONCLUSIONES

La presencia de glucosa en las condiciones estudiadas, favorece la producción de ADD o testosterona por las cepas *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 y Ex-4.

La formación de testosterona en el medio de cultivo estudiado (MK), tiene lugar a partir de un 0,5% de glucosa.

Con las dos cepas los mayores rendimientos de testosterona se obtienen con 2 y 4% de glucosa.

Tabla 3. Biotransformación del colesterol por la cepa Ex-4 en medio MK y diferentes concentraciones de glucosa.

Variante	ADD	AD	Testosterona
	(%)		
Sin glucosa	34,60	2,01	-
0,5	0,91	6,22	25,49
2,0	0,67	5,63	27,73
4,0	0,47	4,57	24,55
6,0	-	-	-
10,0	-	-	-

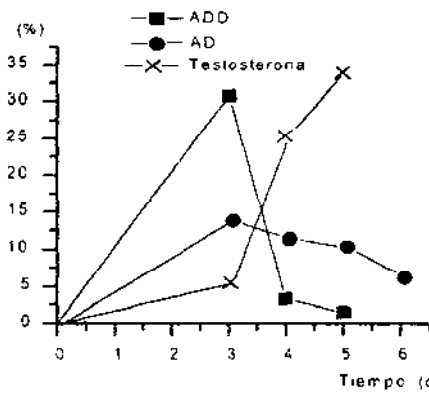


Fig. 1. Variación de la concentración de ADD y testosterona en el tiempo. Cepa B-3683.

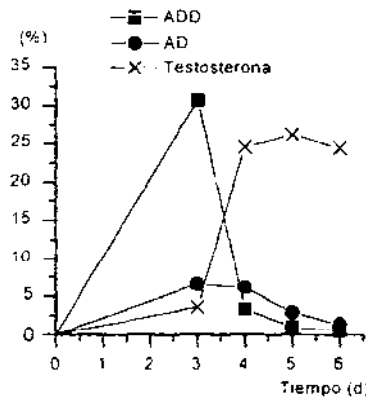


Fig. 2. Variación de la concentración de ADD y testosterona en el tiempo. Cepa Ex-4.

Tabla 4. Biotransformación del colesterol, AD y ADD mediante la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683.

Sustratos	ADD	AD	Testosterona
	(mg)		
Colesterol sin glucosa	15,40	1,53	-
ADD sin glucosa	15,40	15,11	-
AD sin glucosa	1,05	24,94	-
Colesterol + glucosa	2,35	7,02	11,52
ADD + glucosa	7,50	5,54	7,49
AD + glucosa	1,11	21,83	-

La mayor cantidad de testosterona se produce a los 5 d.

La ADD y el colesterol como sustratos biotransformantes en presencia de glucosa inducen la formación de testosterona y AD.

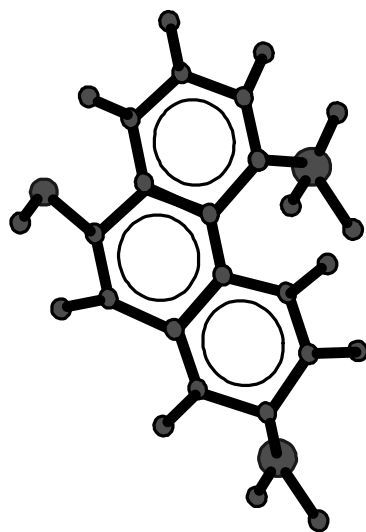
La AD como sustrato biotransformante en presencia y ausencia de glucosa no favorece ninguna de las reacciones de biotransformación de seadas.

BIBLIOGRAFIA

1. Laurent M.X., U.S. Patent 8, 210, 1982.
2. Phineiro H.M. y Cabral J.M.S. Screening of whole cell immobilization procedures for the Δ^1 dehydrogenation of steroids in organic medium. **Enzyme Microbiol. Technol.**, **14**, 619, 1992.
3. Kieslich K. Microbial side-chain degradation of sterols. J. Basik. **Microbiol.**, **257**, 461, 1985.
4. Capek A., Hanc O. and Tadra, M., Microbial transformation of sterols. Publishing House of Czschoslovak. Academy of Sciences, 1966.
5. Silbiger E. and Freeman A. Continuous D^1 hydrocortisone dehydrogenation with in situ product recovery. **Enzyme Microbiol. Technol.**, **13**, 869, 1991.
6. Martin C.K.A., Microbial cleavage of sterols side chains. Advances in Applied Microbiology. Academy Press. New York. Vol. 22, 29-58, 1977.
7. Marsheck W.J., Krauchy S. And Muir R.D., Microbial degradation of steroids. **Applied. Microbiol.**, **23**, 72, 1972.
8. Zabaneh M. and Bar R. Ultrasound-enhanced bioprocess II: Dehydrogenation of hydrocortisone by *Arthrobacter simplex*. **Biotechn. Bioeng.**, **37**, 998, 1991.
9. Wang K.C., Chum-Shiouh Gau, Russel Rhei-Long Chen. Oxidation of sterols. I.-Conversion of cholesterol and sitosterol to 17 hydroxy Steroids; **Journal of the Taiwan Pharmaceutical Association**, **34N**, 2, 1982.
10. Wen-Hsiung Liu, Chi-Wei Kuo, Kuo-Liang Wu, Chieng-Yi Lee and Wen-Yih Hsu. Transformation of cholesterol to testosterone by *Mycobacterium* sp. **J. of Ind. Microbiology**, **13**, 167, 1994.
11. Angelova B., Mustafafov S., Avramova T., Dimova I., Boyadjieva L. 9a-Hydroxylation of 4-androstene-3,17-dione by resting *Rhodococcus* sp cells. **Proc. Biochemistry**, **31**, 179, 1996.
12. Karlsson J.L. Induced metabolic mutants of *Mycobacterium Tuberculosis*. **J. Bacteriol.**, **68**, 592, 1954.
13. Pérez I., Timor C., Falero A. y Orozco R. L. Primer Simposio Nacional de Cromatografía, Cuba, 1993.
14. Falero A., Timor C.E. y Pérez I. Cuantificación por HPLC de los productos de fermentación a partir de los esteroides. Determinación de Δ^1 -testosterona. I Simposio Nacional de Cromatografía, 1993.
15. Herbert D., Phipps P.J., Stange R.E., Chemicals analysis of microbial cells. **Methods in Microbiology**. Chapter III; 210, 344. (cd 210), 1964.
16. Singer Y.M., Shity H. and Bar R. Microbial transformation in a ciclodextrin medium. Part 2 Reduction of androsten dione to testosterone by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol. Bioeng.**, **35**, 731, 1991.
17. Smolders A.J.J., Phineiro H.M., Cabral J.M.S. Steroid bioconversion in microemulsion system. **Biotechnol. Bioeng.**, **38**, 1210, 1991.
18. Gachok V.P. and Grytsay V.I., Kinetic Model for the Regulation of Redox Reaction in steroid transformation by *Arthrobacter globiformis* cells. **Biotechnol. and Bioeng.**, **33**, 668, 1989.
19. Llanes N. Testosterona como producto de biotransformación en bacterias y levaduras. Trabajo presentado en opción al grado de Maestro en Ciencias, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba, 1997.

ANALISIS ELEMENTAL SERVICIO ANALITICO

La Dirección de Química del Centro Nacional de Investigaciones Científicas le brinda su servicio de Análisis Elemental Orgánico.



Composición cuantitativa de C, H, N, S y halógenos en moléculas orgánicas.

Calidad garantizada en los análisis.

Precios moderados:

	US\$
C/H (duplicado)	30,00
C/N (duplicado)	30,00
S (duplicado)	17,00
Cl, Br (duplicado)	17,00