

## Transformación microbiológica de esteroides. IV Biotransformación de fitosteroles de la caña de azúcar

J. MARTÍNEZ, O. COTO, R. REBOREDO Y M.E. CARBALLO

*Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba*

*Recibido: 5 de abril de 1985*

*Recibido: 22 de julio de 1985*

**ABSTRACT.** The obtainment of new raw material for steroidal drugs is a world problem. Plant sterols (phytosterols) are potential sources but has the difficulties of aliphatic side chain elimination. In the oily fraction obtained in the wax purification of cachaza could be recovered a mixture of phytosterols which could stands for 10 % (w/v) with an 80 % of stigmasterol, campesterol, sitosterol and other minor sterols. Microbiological conversion of sterols to C<sub>19</sub> steroids is a very actively studied filed and of high economic benefits. In the present work it is showed the preliminary results of biotransformation of a cuban mixture of phytosterols with free and alginate entrapped cells.

**RESUMEN.** La obtención de nuevas fuentes de materia prima para la fabricación de fármacos esteroidales es un problema mundial. Los esteroles de plantas (fitosteroles) son fuentes potenciales, pero existe la dificultad de la remoción de su cadena lateral alifática. De la fracción aceite obtenida en la purificación de la cera de la cachaza es posible recuperar una mezcla de fitosteroles que representa el 10 % (p/v) con un contenido del 80 % de estigmasterol, campesterol y sitosterol. La conversión microbiana de los esteroles a esteroides C<sub>19</sub> es un campo activamente estudiado y de rendimientos económicos altos. En el presente trabajo se muestran los resultados preliminares de la biotransformación de una mezcla cubana de fitosteroles mediante células libres e inmovilizadas en alginato de calcio.

### INTRODUCCION

La obtención de nuevas fuentes de materias primas para la preparación de fármacos esteroidales es un problema mundial<sup>1,2</sup>.

Las materias primas más utilizadas para la obtención de drogas esteroidales son la diosgenina y el estigmasterol de origen vegetal y el colesterol de fuentes animales. Los esteroles de plantas (fitosteroles) como el sitosterol y el campesterol son fuentes potenciales, pero su utilización se ve limitada por la dificultad de remover la cadena lateral alifática<sup>1</sup>.

Durante los últimos 16 años las posibilidades de utilización de los fitosteroles presentes en la fracción aceite de la cera de la caña de azúcar como fuente de materia prima esteroideal, ha sido objeto de estudio por varios grupos de investigadores<sup>3,4</sup>. A partir de la purificación de la cera contenida en la cachaza es posible obtener una mezcla de fitosteroles (10 % p/v en la fracción aceite) con un contenido del 80 % de campesterol, estigmasterol y sitosterol, según los resultados obtenidos por los autores.

Ha despertado gran interés por su potencialidad económica, la posibilidad de utilización de microorganismos que realicen la transformación de esa nueva mezcla de esteroides<sup>8</sup>. La conversión microbiana de los esteroides a importantes esteroides C<sub>19</sub> es un campo activamente estudiado y que ha llevado al desarrollo de procesos comerciales<sup>6-9</sup>.

La inmovilización celular, es una técnica prometedora para la utilización de los microorganismos, debido a las ventajas que presenta. Estas son entre otras, la eficiencia de transformación, la economía del proceso y la posibilidad de utilizar sustratos insolubles en agua como los fitosteroides<sup>10,11</sup>.

En el presente trabajo se muestran los resultados preliminares de la biotransformación de una mezcla de fitosteroides de la cera de la caña de azúcar mediante células libres e inmovilizadas en alginato de calcio.

## MATERIALES Y METODOS

*Microorganismos.* Se empleó una cepa de *Mycobacterium* sp. conservada liofilizada y recuperada en medio YPG (3 g/L extracto de levadura, 5 g/L peptona, 10 g/L glucosa, pH 7,2) y mantenida en YPG-agar.

*Esteroides.* Como sustratos se emplearon el  $\beta$ -sitosterol (crudo, Upjohn Co.) y una mezcla de fitosteroides obtenida de la cera de la caña.

*Cultivo.* Todas las experiencias fueron realizadas empleando una modificación al medio utilizado por Arima y col.<sup>5</sup> con la composición por litro siguiente:

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25 g; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,25 g; FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,001 g; extracto de levadura 2 g; glicerol 5 g. El pH ajustado a 7,2 y la esterilización a 121 °C por 15 min.

*Capacidad de biodegradación.* Esta cepa fue estudiada empleando tres variantes:

Adición de  $\beta$ -sitosterol disuelto en Tween 40 (0,01 % (p/v)) sonificado 30 min (20 kHz). El esteroide se añadió al medio fresco hasta una concentración de 1 mg · mL<sup>-1</sup>.

Adición de  $\beta$ -sitosterol preparado como el anterior pero añadido al cultivo en su fase logarítmica.

Adición de la mezcla de fitosteroides disuelta en Tween 40 (0,1 % (p/v)) sonificado 30 min (20 kHz) y añadido al cultivo en fase logarítmica.

Cada serie incluyendo una de control sin esteroides, fue cultivada por triplicado, en erlenmeyers de 250 mL con 60 mL de medio de cultivo, a 31 °C y 200 r/min. El crecimiento se siguió midiendo la turbidez en fotómetro a 610 nm.

*Inmovilización.* Las células fueron inducidas por cultivo durante 48 h con 0,2 mg · mL<sup>-1</sup> de  $\beta$ -sitosterol o 0,2 mg · mL<sup>-1</sup> de la mezcla de fitosteroides. Estas células fueron empleadas como inóculos de frascos Fernbach con 560 mL de medio de cultivo de igual composición que la anterior y cultivadas por 48 h. Las células fueron colectadas y lavadas con solución salina fisiológica y mezcladas con ácido algínico

al 3 % y pH 7,0 . Finalmente, fueron preparadas las esférulas por extrusión de esta mezcla sobre  $\text{CaCl}_2$  0,2 mol/L .

Las esférulas fueron divididas en lotes de 12 g (peso húmedo) e incubadas en erlenmeyers de 150 mL con 50 mL del medio descrito anteriormente, pero sin la adición del extracto de levadura.

Los esteroides fueron añadidos a diferentes concentraciones. La incubación siempre se realizó a 31 °C y 150 r/min .

*Análisis.* Cada muestra de caldo de cultivo fue extraída tres veces con acetato de etilo (1:1) durante 30 s cada vez, en agitador de tubos. Los tres extractos reunidos, después de evaporar el solvente fueron resuspendidos en acetato de etilo. Las muestras fueron aplicadas a un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5710 A con detector FID y columna de vidrio de 1,8 m . 3 mm empaçada con SP-2100 al 3 % sobre HP-Chrom 80 a 100 mallas. Los componentes de las mezclas de esteroides fueron separados e identificados según los tiempos de retención de los patrones y las tablas cromatográficas<sup>12</sup>.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

## RESULTADOS

En las figuras 1 y 2 se muestran los cromatogramas típicos obtenidos para el  $\beta$ -sitosterol y para la mezcla de fitosteroles respectivamente. El  $\beta$ -sitosterol presenta dos componentes mayores que representan el 81 % del producto, siendo los mismos el sitosterol y el estigmasterol. En la figura 2 correspondiente a la mezcla de fitosteroles se observan tres componentes mayores: campesterol, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol y dos componentes no resueltos completamente con tiempo de retención cercanos al estigmasterol y al  $\beta$ -sitosterol. Estos componentes representan un 85 % de la mezcla.

La adición de  $\beta$ -sitosterol al cultivo junto con el inóculo, produce una marcada inhibición o retardo del crecimiento con una fase logarítmica muy lenta (Fig. 3(b)). La figura 3 (a) muestra la curva de cultivo sin adición de esteroides.

De realizarse la adición en la fase logarítmica (Fig. 3(c)), se produce una rápida disminución de la actividad del cultivo en comparación con la curva normal.

Si el esteroide que se adiciona es la mezcla de fitosteroles, en la fase logarítmica, se produce también una gran pérdida de vitalidad en el cultivo como muestra la figura 3(d).

Al observar la relación entre la transformación de los esteroides y la forma de adición al cultivo se constató que:

Si se añade  $\beta$ -sitosterol junto con el inóculo se alcanza un 7,4 % de androstadiendiona (ADD) entre las 48 y las 72 h . Esta desaparece a las 96 h de cultivo con el 100 % de consumo del esteroide (Figura 3(b) y 4) a las 168 h .

La adición del  $\beta$ -sitosterol en fase logarítmica (39 h) produce un 33,5 % de acumulación de ADD a las 168 h, con un 68 % de utilización del esteroide (Figura 3(c) y 5).

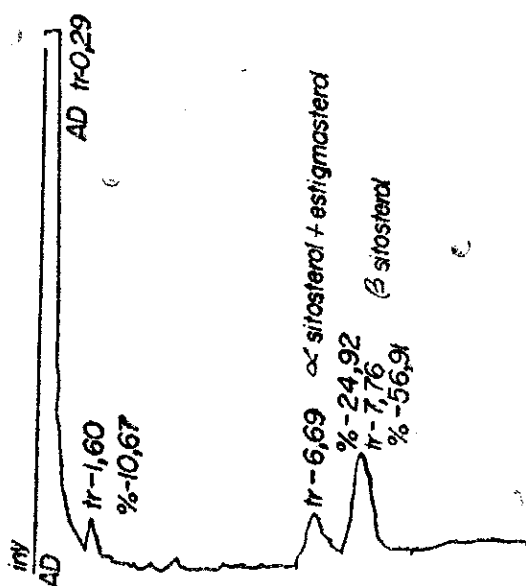


Fig. 1. Cromatograma típico del  $\beta$ -sitosterol en OV-17 3 %/Gas Chrom Q 1,62 m  $\cdot$  2 mm  $N_2$ : 25 mL/min 290  $^\circ C$   $\cdot$  2 min/2  $^\circ C$   $\cdot$  min/305  $^\circ C$   $\cdot$  2 min . iny inyección; AD área desecheda;  $t_r$  tiempo de retención

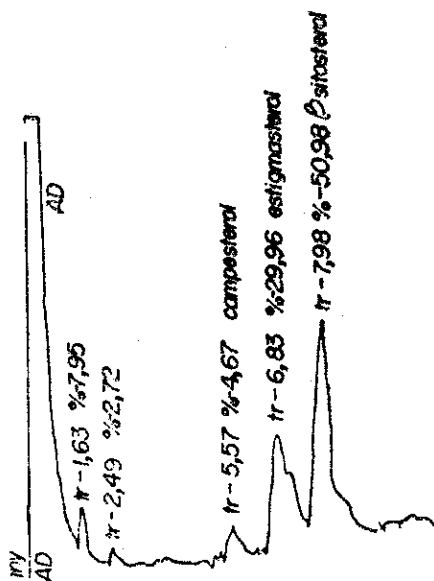


Fig. 2. Cromatograma típico de la mezcla de fitosteroles en OV-17 3 %/Gas Chrom Q 1,62 m  $\cdot$  2 mm  $N_2$ : 25 mL/min 290  $^\circ C$   $\cdot$  2 min/2  $^\circ C$   $\cdot$  min/305  $^\circ C$   $\cdot$  2 min . iny inyección; AD área desecheda;  $t_r$  tiempo de retención

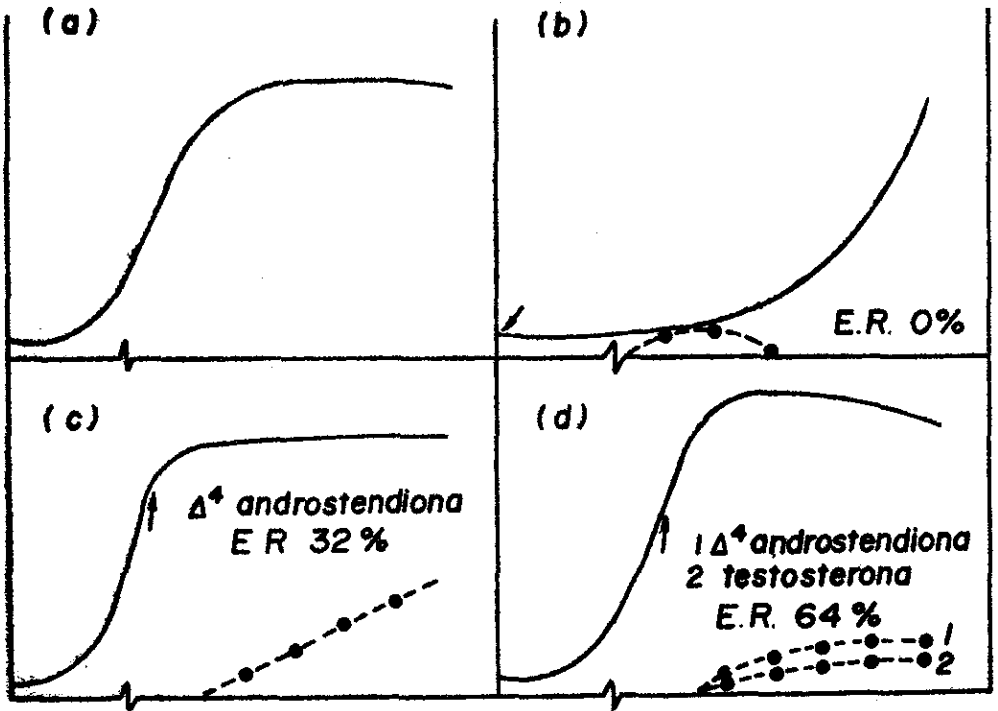


Fig. 3. Relación entre el crecimiento microbiano, el esteroles y los productos de transformación. (a) control sin esteroles (b) y (c) adición de  $\beta$ -sitosterol (flecha) (d) mezcla de fitosteroles. Cultivo líquido, 31 °C, 2000 r/min . Er esteroides residuales

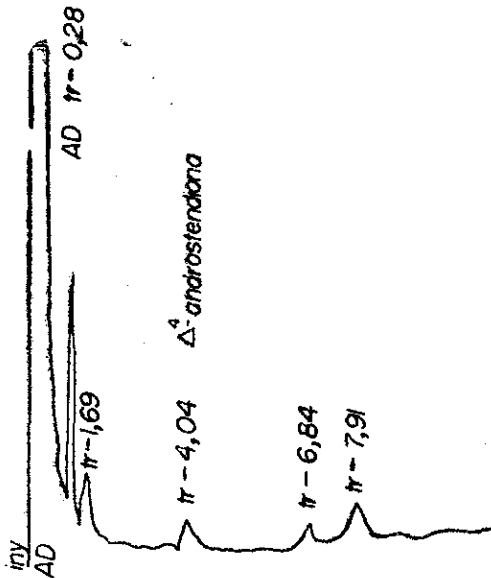


Fig. 4. Cromatograma de los extractos de cultivo con  $\beta$ -sitosterol a 48 h de la adición. Cultivo en medio líquido 31 °C, 200 r/min . Cromatografía en Gas Chrom Q 1,62 m • 2 mm  $N_2$ ; 25 mL/min 290 °C • 2 min/2 °C • min/305 °C • 2 min . iny inyección; AD área desechada;  $t_r$  tiempo de retención

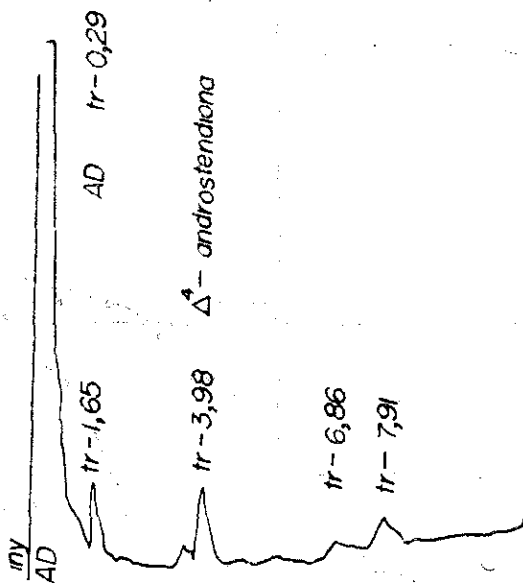


Fig. 5. Cromatograma de los extractos de cultivo con  $\beta$ -sitosterol a 120 h de la adición. Cultivo en medio líquido; 31 °C, 200 r/min. Cromatografía en Gas Chrom Q 1,62 m  $\cdot$  2 mm  $N_2$ ; 25 mL/min 290 °C  $\cdot$  2 min/2 °C  $\cdot$  min/305 °C  $\cdot$  2 min. iny inyección; AD área desechada;  $t_r$  tiempo de retención

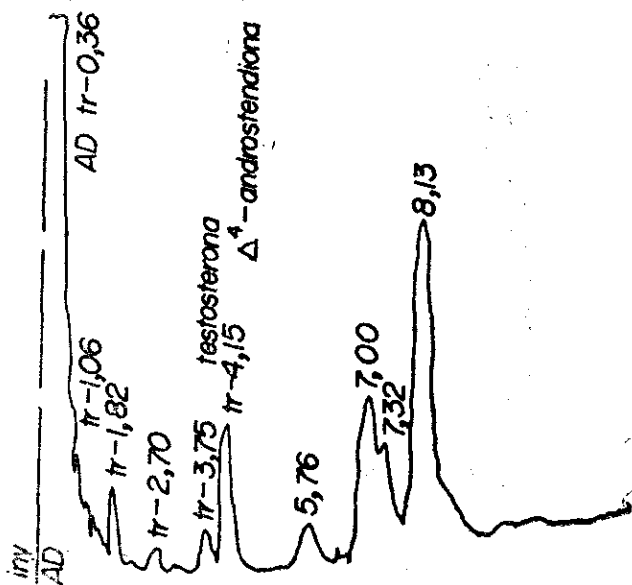


Fig. 6. Cromatograma de los extractos de cultivo con mezcla de fitosteroles a 120 h de la adición. Cultivo en medio líquido; 31 °C, 200 r/min. Cromatografía en Gas Chrom Q 1,62  $\cdot$  2 mm  $N_2$ ; 25 mL/min 290 °C  $\cdot$  2 min/2 °C  $\cdot$  min/305 °C  $\cdot$  2 min. iny inyección; AD área desechada;  $t_r$  tiempo de retención

De la mezcla de fitosteroles se alcanza un 3 % de testosterona y un 9 % de ADD a las 168 h con un 36 % de consumo de la mezcla, si ésta se adiciona en la fase logarítmica del cultivo (Figuras 3 (d) y 6).

Se estudió la biotransformación de los esteroides empleando células inmovilizadas en alginato de calcio. No se logró transformación a ninguna de las concentraciones estudiadas (desde 0,25 hasta 2 mg · mL<sup>-1</sup>) incubando 48 h. Las células libres cultivadas como control produjeron en 24 h, 2,7 % de testosterona y 0,2 % de androstendiona (AD).

En otra serie experimental se emplearon como solventes de la mezcla de fitosteroles: etanol al 4 %, dimetilsulfóxido al 0,5 % o Tween 40 al 0,1 % sonificado. Las células libres produjeron un 5,6 % de transformación a las 48 h; las inmovilizadas con el esteroide disuelto en etanol no produjeron transformación. Con el esteroide disuelto en dimetilsulfóxido o en Tween 40 lo transformaron hasta un 3,8 % en cada caso.

### DISCUSION

En la figura 2 se puede observar que las condiciones empleadas para desarrollar la cromatografía permiten la separación de los componentes de la mezcla de fitosteroles, identificándose los componentes principales. Si se compara la composición de la mezcla con el  $\beta$ -sitosterol se ve que tienen aproximadamente la misma composición de productos esteroideos.

La adición del esteroide al cultivo producirá diferentes efectos en dependencia de la edad fisiológica del cultivo que se añada. Sin embargo, en todos los casos influye sobre el crecimiento. Estos resultados surgieron una acción tóxica de los esteroides sobre el metabolismo de la bacteria, considerándose la transformación como un proceso de detoxificación.

La propia transformación de los esteroides se halla afectada también por la época de adición de los mismos al cultivo. De realizarse ésta en la fase logarítmica, se produce una mayor eficiencia en la transformación. Se puede considerar que esto se debe a que los sistemas de oxidoreductasas se hallan en su máxima capacidad y el "pool" de NADH puede ser empleado en la degradación de los esteroides, como fue sugerido por Sedlacek y col.<sup>13</sup>.

Las diferencias entre la acción con  $\beta$ -sitosterol y la mezcla de fitosteroles se considera que se deben a la acción inhibidora de alguno de los componentes de la mezcla o alguno de sus metabolitos. Esto debe ser estudiado más profundamente.

Los resultados preliminares obtenidos con células inmovilizadas, muestran la factibilidad de la transformación con este sistema, ya que se obtuvieron resultados comparables con los obtenidos con células libres. También es evidente la influencia del solvente sobre la capacidad transformadora de dicho sistema. Tanto la aplicación de la sonicación como el empleo del dimetilsulfóxido lograron suspensiones más finas del esteroide, pudiendo ser ésta la razón que contribuyó a su transformación por las células.

## CONCLUSIONES

La adición del esteroles al cultivo bacteriano produjo diferentes efectos, en dependencia de la edad fisiológica a la que se añadió.

Las diferencias entre la acción con  $\beta$ -sitosterol y la mezcla de fitosteroles se deben a la acción inhibidora de alguno de los componentes de la mezcla de alguno de sus metabolitos.

Con células inmovilizadas es posible la transformación de fitosteroles.

El solvente tiene efecto sobre la transformación de la mezcla de fitosteroles, siendo el Tween 40 con sonicación y el dimetilsulfóxido los mejores solventes a emplear.

## RECONOCIMIENTOS

Se agradece al Dr. I. Magaña por su asesoría en la preparación de las células inmovilizadas, al Dr. F. Esparza por el suministro de patrones puros y a la M. C. E. Herrera por su asesoría en las técnicas cromatográficas, todos ellos del CINVESTAV, Instituto Politécnico Nacional de México.

## REFERENCIAS

1. CONNER A.H., NAGAOKA M., ROWE J.W. AND PERLMAN D. *Appl. Environm. Microbiol.* 32, 310, 1976.
2. Kirk-Othmer (Editors) "Encyclopedia of chemical technology". Vol. 21, 1983.
3. CARBALLO M.E. Tesis de Diploma. Universidad de La Habana, 1983.
4. NAVIA M.D. *Cuba-Azúcar*, 3, 12 y 52, 1968.
5. ARIMA K., NAGASAWA M., BAE M. AND TAMURA G. *Agr. Biol. Chem.* 33, 1636, 1969.
6. GOSWAMI P.C., SINGH H.D., BHAGET S.D. AND BARUAH J.N. *Biotechnol. Bioeng.* XXV, 2929, 1983.
7. HEFTMAN E. *Llodia* 38, 195, 1975.
8. MARSHECK W.J., KRAYCHY S. AND MUIR R.D. *Appl. Microbiol. Jan.* 72, 1972.
9. SCHOEMER V. AND MARTIN C.K.A. *Biotechnol. Bioeng.* XXII (Sup. 1), 1980.
10. KIERSTAN M. AND BUCKE C. *Biotechnol. Bioeng.* XIX, 387, 1977.
11. MAKIGUCHI N., ARITA M. AND ASAI Y. *J. Ferment. Technol.* 58, 17, 1980.
12. AOAC Gas Chromatographic Data Compilation 2da. Ed. 1971.
13. SEDLACZECK L., JAWORSKI A., PAJKOSKA H., ZYCH B. AND CZERNIAWSKI E. *Acta Microb. Pol. Ser. B* 5, 163, 1973.