

Comportamiento de tres mutantes de micobacterias productoras de precursores esteroides conservadas por liofilización durante 10 años

✉ Sofía Borrego,¹ María E Espinosa,¹ María E Carballo,² Tomás Moreira,¹ Elena Martí,¹ Ana Ramírez¹

¹Departamento de Procesos Biotecnológicos. Centro Nacional Investigaciones Científicas. Ave. 25 y 158. AP 6990, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: nury@biocnic.cneuro.edu.cu

²Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Calle 25 e/ I y J, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN

Se liofilizaron tres cepas mutantes de micobacterias biotransformadoras de esteroides para producir precursores esteroides de interés para la industria médico-farmacéutica (*Mycobacterium* sp. NRRL B-3683, NRRL B-3805 y MB-3805). Se utilizaron los medios de liofilización siguientes: leche descremada (10%) y leche descremada (5%) mezclada con glutamato de sodio (5%). La liofilización se realizó a una temperatura de congelación de -196 °C, se hizo el secado primario durante 18 h manteniendo la temperatura del producto por debajo de -20 °C y el secado secundario durante 5 h a 20 °C. Dos grupos de ampulas por cepa y por variante se mantuvieron por 10 años, unas en refrigeración (8 °C ± 2 °C) y otras a temperatura ambiente. Se evaluó la viabilidad de las cepas y la capacidad de producir androstendiona (AD) y/o androstadiendiona (ADD). Se observó que la supervivencia varió entre 14% y 55,2% en dependencia de la cepa y de las condiciones de liofilización y mantenimiento. Además, la capacidad biotransformadora no se afectó, lo que constituye el aspecto más importante de estas cepas.

Palabras claves: biotransformación de esteroides, liofilización, micobacterias

Biotecnología Aplicada 2001;18:85-87

ABSTRACT

Three Steroidal Precursor-producing Mutants of *Mycobacteria* Preserved by Freeze-drying During Ten Years. Three mutants of *Mycobacterium* sp. employed in biotransformation of sterols for the pharmaceutical industry (NRRL B-3683, NRRL B-3805 and MB-3805) were freeze-dried, vacuum-sealed and stored for 10 years at room and 8 °C ± 2 °C temperatures. The formulations for freeze-drying were skim milk 10% or skim milk 5% plus sodium glutamate 5%. The freezing temperature was -196 °C, the primary drying was carried out for 18 h at a product temperature of -20 °C and the secondary drying was carried out at 20 °C for 5 h. Two groups of ampoules were conserved 10 years, one of them at 8 °C ± 2 °C and the other at room temperature. The viability of the microorganisms varied from 14% to 55.2% depending on the formulation and the storage temperature. The ability of producing androstenedione (AD) and/or androstadienedione (ADD) during biotransformation of sterols, was not affected.

Keywords: biotransformation of sterols, freeze-drying, mycobacteria

Introducción

La liofilización es un método muy utilizado para conservar microorganismos. Sin embargo, algunas bacterias son sensibles a esta técnica porque los niveles de supervivencia disminuyen significativamente después de ser sometidas a este proceso, e incluso su mantenimiento prolongado hace que la viabilidad celular disminuya aún más. Tal es el caso de las especies del género *Mycobacterium* [1].

Se conoce que algunos factores pueden afectar la viabilidad de los microorganismos liofilizados, entre los que se citan la naturaleza de la cepa, las condiciones de cultivo, la fase de crecimiento, la concentración celular, la formulación de los medios protectores contra la liofilización, los parámetros de la liofilización y el modo de rehidratación [2].

Uno de los aspectos más importantes es la formulación adecuada para realizar la liofilización, lo cual determina las características termofísicas del sistema y minimiza la muerte celular, tanto durante la congelación como durante la sublimación, la desorción y el almacenamiento prolongado. Este aspecto no siempre se ha reportado en la literatura y, por tanto, es necesario

seleccionarlo teniendo en cuenta que cada cepa microbiana tiene sus propias características.

Existen sustancias que se utilizan comúnmente con buenos resultados como protectores en la liofilización de bacterias. Estos compuestos son la leche descremada [2-4], las peptonas [2], el glutamato de sodio [2, 5, 6], los azúcares [5-9] y otros.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la conservación por liofilización a largo plazo de tres cepas mutantes de micobacterias capaces de biotransformar el colesterol y otros esteroides para producir precursores esteroides de interés farmacéutico; por ejemplo, la androstendiona (AD) y la androstadiendiona (ADD). Con ese fin, se utilizaron dos variantes de medio de liofilización y dos variantes de almacenamiento.

Materiales y Métodos

Microorganismos

Se utilizaron las cepas *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683, NRRL B-3805 y MB-3805 que fueron donadas por la Universidad de Columbia Británica, Canadá. Estos

1. Tsukamura M. Identification of mycobacteria. Japan Mycobacteriosis Research Laboratory of National Chubu Hospital; 1984. p.21.

2. Delgado H, Moreira T, Luis L, García H, Martino TK, Moreno A. Preservation of *Vibrio cholerae* by freeze-drying. *Cryo-Letters* 1995;16:91-109.

3. de Valdez GF, de Giori GS, de Ruiz Holgado AP, Oliver G. Effect of the rehydration medium on the recovery of freeze-dried lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1985;50:1339-41.

4. Kohsaka K, Matsuoka M, Hirata T, Nakamura M. Preservation of *Mycobacterium leprae* in vitro for four years by lyophilization. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1993;61:415-20.

5. Moreira T, Iglesias E, Delgado H. Preservation of *Neisseria meningitidis* group B by freeze-drying. *J Microbiol Met* 1995;23:343-6.

mutantes biotransforman el colesterol y otros esteroides y producen androstendiona (AD) y/o androstadiendiona (ADD) [10-12].

Condiciones de liofilización

Las bacterias se propagaron en el medio de Conner y colaboradores. [13] a 30 °C, 200 rpm (zaranda orbital Mod. Zot-1, CNIC, Cuba), y una concentración celular media de 10^{10} ufc/mL, durante 96 h. El cultivo se centrifugó a 5 000 xg por 10 min y se lavó dos veces con agua destilada estéril. La biomasa se resuspendió y homogeneizó en 10 mL de las siguientes variantes de medios protectores: leche descremada 10% (Merck, Alemania) y leche descremada 5% con glutamato de sodio 5% (Merck, Alemania). En ese momento se determinó la concentración celular inicial. De cada suspensión se tomaron alícuotas de 0,2 mL que se introdujeron en ampullas estériles provistas de una torunda de algodón estéril en su parte superior. Para la liofilización se utilizó una liofilizadora RP1,5 (SERAIL, Francia), una temperatura de congelación de -196 °C (N₂ líquido), secado primario durante 18 h a una temperatura del producto por debajo de -20 °C y secado secundario durante 5 h a 20 °C. Las ampullas se sellaron al vacío y se almacenaron durante 10 años en condiciones diferentes, unas a temperatura ambiente y otras en refrigeración (8 °C ± 2 °C).

Determinación de la viabilidad

Para determinar la concentración celular, se utilizaron tres ampullas en todos los casos inmediatamente después de la liofilización y al cabo de los 10 años de almacenamiento. Después de abrir las ampullas, el contenido se rehidrató con 0,2 mL de agua destilada estéril, se dejó en reposo por 15 min, y el crecimiento se determinó mediante diluciones seriadas y sembrado en placas Petri que contenían agar nutritivo.

Biotransformación

Una vez obtenidas las colonias separadas, se prepararon cultivos a partir de ellas en el medio de Conner y colaboradores [13] y se incubaron a 30 °C durante 16 a 18 h a 200 rpm. Posteriormente se realizó el inóculo en el mismo medio con una DO₅₉₀ inicial igual a 1 y se incubó a 30 °C y 200 rpm por 48 h. La biotransformación se produjo en el mismo medio de cultivo y se inculó a una DO₅₉₀ inicial igual a 1. El colesterol se preparó según Borrego y colaboradores [14] y se adicionó a los cultivos en condiciones asepticas. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 200 rpm durante 6 días y posteriormente se esterilizaron.

Determinación de AD y/o ADD

Se hicieron 4 extracciones con acetato de etilo (4 x 100 mL) a cada cultivo. Los cultivos productores

de AD se acidificaron previamente hasta pH 2 con HCL (3 mol/L). La determinación de AD y ADD se realizó mediante HPLC en una columna de fase reversa RP-18 de 5 mm (125 x 4) (Merck, Alemania) con el empleo de un detector UV a 254 nm. El sistema de solventes que se empleó fue una mezcla de agua-metanol 35:65 y se aplicó un flujo de 1,5 mL/min. Se utilizó 17 α -metiltestosterona como patrón interno [14, 15].

Análisis estadístico

Todas las determinaciones de viabilidad se realizaron a partir de tres ampullas por variante y la biotransformación se evaluó por triplicado. El análisis estadístico para cada cepa se realizó a través de la prueba *t* de Student o ANOVA-1, y la prueba de comparación de medias de Duncan [16].

Resultados y Discusión

Cuando se analizó la influencia del medio protector en la liofilización (Tabla 1), se pudo apreciar que la leche descremada junto con el glutamato de sodio protegieron adecuadamente a los mutantes estudiados. Este efecto es muy evidente en las cepas B-3683 y B-3805, para las cuales se obtuvieron diferencias significativas comparado con la leche descremada 10%, para una probabilidad de 95%. A pesar de este resultado, los niveles de viabilidad después de la liofilización permanecieron elevados, en un orden de 10^8 ufc/mL para todas las cepas.

Tanto la leche descremada [3, 4] como el glutamato de sodio [6] han sido utilizados con buenos resultados de forma independiente como medios protectores en la liofilización de especies de micobacterias. Sin embargo, la combinación de estas dos sustancias proporciona mejores resultados que la leche descremada solamente para las cepas estudiadas.

Al analizar el efecto de las dos formulaciones de medios protectores y de las formas de almacenamiento sobre la supervivencia (%) de las tres cepas mutantes de *Mycobacterium* liofilizadas que fueron almacenadas por 10 años (Tabla 2), se pudo observar una pérdida de la viabilidad después de liofilizadas con respecto a la hora cero. Esta variación depende más del tipo de almacenamiento a que fueron sometidas las cepas que de la formulación utilizada. Se observó que si bien la formulación no influyó notablemente en la supervivencia de las cepas conservadas en frío, su influencia fue determinante cuando se almacenaron a temperatura ambiente.

El empleo del glutamato de sodio con leche descremada proporcionó una buena protección celular, al igual que el uso de leche descremada, puesto que no se detectaron diferencias significativas en la supervivencia microbiana entre estas dos variantes para las mismas condiciones de almacenamiento. Este resultado

6. Mil'ko ES, Arkad'eva ZA, Pimenova MN, Stepanova RA, Egorov NS. Viability of R, S and M variants of *Mycobacterium lactico* under various preserving conditions. *Mikrobiologiya* 1984;53:113-6.

7. Nomura Y, Yamamoto M, Matsushita K, Kumagai H. Preparation and preservation of freeze-dried cells of acetic acid bacteria with aldehyde oxidase activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62:1134-7.

8. Kim TH. High-viability lyophilized Bacille Camette-Guerin vaccine produced by deep-culture technique. *Appl Environ Microbiol* 1997;34:495-9.

9. Klatser PR, Kuijper S, van Ingen CW, Kolk AHJ. Stabilized, freeze-dried PCR mix for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1998;36:1798-800.

10. Dias ACP, Cabral JMS, Pinheiro HM. Sterol side chain cleavage with immobilized *Mycobacterium* cells in water-immiscible organic solvents. *Enzyme Microb Technol* 1994;16:708-14.

11. Lee CY, Chen CD, Liu WH. Production of androsta-1,4-diene-3,17-dione from cholesterol using two-step microbial transformation. *Appl Microbiol Biotechnol* 1993;38:447-52.

12. Smith M, Zahnley J, Pfeifer D, Goff D. Growth and cholesterol oxidation by *Mycobacterium* species in Tween 80 medium. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:1425-9.

13. Conner AH, Nagaoka M, Rowe JW, Perlman D. Microbial conversion of Tall oil sterols to C₁₉ steroids. *Appl Environ Microbiol* 1976;32:310-1.

14. Borrego S, Pérez I, Espinosa ME, Martí E, Fonseca M. Influence of organic ions and vitamins on the biotransformation of cholesterol to androstenedione by *Mycobacterium* sp. MB-3683. *Rev CENIC Ciencias Biológicas* 1997;28:59-61.

15. Borrego S, Espinosa ME, Martí E, Fonseca M. Optimización de un medio de cultivo salino para la producción de ADD a partir de los fitosteroides de la caña de azúcar. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas* 1998;29:61-3.

16. López R. Diseño estadístico de experimentos. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1984. p.33, 105.

Tabla 1. Efecto de la liofilización en la viabilidad de las cepas mutantes de *Mycobacterium* sp. en dos medios protectores.

Variante	NRRL			B-3683			NRRL			B-3805			MB-3805					
	ufc/mL antes	ufc/mL después	ΔS	ufc/mL antes	ufc/mL después	ΔS	ufc/mL antes	ufc/mL después	ΔS	ufc/mL antes	ufc/mL después	ΔS	ufc/mL antes	ufc/mL después	ΔS			
1	$1,0 \times 10^{10}$	$3,2 \times 10^8$	$1,50 \pm 0,5^*$	$1,2 \times 10^{10}$	$4,9 \times 10^8$	$1,38 \pm 0,2^{**}$	$3,0 \times 10^{10}$	$5,1 \times 10^8$	$1,78 \pm 0,7$	$1,6 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^8$	$1,81 \pm 0,7$	$2,2 \times 10^{10}$	$3,4 \times 10^8$	$1,81 \pm 0,6$	$3,4 \times 10^{10}$	$5,2 \times 10^8$	$1,82 \pm 0,8$

1, leche descremada (10%); 2, leche descremada (5%) + glutamato de sodio (5%); ΔS , $\log C_i - \log C_f$; C_i , ufc/mL antes de la liofilización; C_f , ufc/mL después de la liofilización; *, diferencias significativas, $t_{calculada} = 7,79$, $g_L = 10$ (prueba *t* de Student, probabilidad 95%); **, diferencias significativas, $t_{calculada} = 7,52$, $g_L = 10$ (prueba *t* de Student, probabilidad 95%).

Tabla 2. Influencia del almacenamiento en la viabilidad de las cepas mutantes de *Mycobacterium* sp. liofilizadas en dos medios protectores.

Variante	NRRL			B-3683			MB-3805		
	ufc/mL hora ^o 0	ufc/mL 10 años	Supervivencia (%)	ufc/mL hora ^o 0	ufc/mL 10 años	Supervivencia (%)	ufc/mL hora ^o 0	ufc/mL 10 años	Supervivencia (%)
1	1,5 x 10 ⁸	6,0 x 10 ⁷	40,0 ± 3,2 (a)	5,0 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸	30,0 ± 2,0 (a)	5,3 x 10 ⁸	2,5 x 10 ⁸	47,2 ± 2,5 (a)
2	4,9 x 10 ⁸	1,4 x 10 ⁸	28,6 ± 2,1 (b)	4,8 x 10 ⁸	3,9 x 10 ⁷	8,1 ± 1,8 (b)	4,9 x 10 ⁸	8,9 x 10 ⁷	42,6 ± 3,2 (a)
3	5,1 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁸	43,1 ± 1,5 (a)	3,4 x 10 ⁸	8,5 x 10 ⁷	25,0 ± 2,0 (a)	5,3 x 10 ⁸	2,9 x 10 ⁸	55,2 ± 2,3 (a)
4	1,0 x 10 ⁷	1,4 x 10 ⁶	14,0 ± 2,8 (c)	3,0 x 10 ⁸	2,3 x 10 ⁷	7,7 ± 1,7 (b)	5,0 x 10 ⁸	7,0 x 10 ⁷	14,0 ± 3,6 (b)

1, leche descremada (10%); refrigeradas; 2, leche descremada (10%); medio ambiente; 3, leche descremada (5%) + glutamato de sodio (5%), refrigeradas; 4, leche descremada (5%) + glutamato de sodio (5%), medio ambiente; °, hora cero después de liofilizadas las cepas. Nota: Distribución normal de datos. Letras diferentes a (a) indican diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).

corroborar lo que han citado otros autores en relación con el hecho de que el glutamato de sodio brinda buena protección a otras especies de micobacterias y a otros géneros bacterianos [1, 17, 18]. Es necesario señalar que si bien las cepas perdieron viabilidad durante el almacenamiento, ésta es elevada aún pues al cabo de 10 años osciló entre 10⁶ y 10⁸ ufc/mL.

En general, las cepas que se almacenaron a temperatura ambiente tuvieron una pérdida considerable de la viabilidad en relación con aquellas que se conservaron en refrigeración. Estos resultados se han reportado para otros microorganismos [19, 20]. Para el género *Mycobacterium* se ha reportado que este tipo de almacenamiento puede causar pérdidas considerables de la viabilidad después de un mes, por lo que se recomienda el empleo la refrigeración en este proceso [1]. Contrario a lo planteado en la literatura, el presente trabajo demostró que para un período tan prolongado como 10 años, la afectación a temperatura ambiente fue inferior a un orden logarítmico en todos los casos. Es posible que estas cepas sean más resistentes que otras especies de micobacterias, principalmente especies patógenas, pues son mutantes que se obtuvieron de cepas salvajes aisladas del suelo que deben poseer mayor resistencia a temperaturas ambientales más altas.

En relación con la capacidad biotransformadora de los mutantes (Tabla 3), se puede apreciar que a pesar de que todas no produjeron el mismo precursor esteroide como producto mayoritario, no existieron diferencias significativas entre los rendimientos de las

Recibido en julio del 2000. Aprobado en enero del 2001.

Tabla 3. Capacidad de las cepas mutantes de *Mycobacterium* para biotransformar el colesterol después de 10 años de liofilizadas.

Variante	NRRL	B-3683	NRRL	B-3805	M	B-3805
	Y _{AD} (%)	Y _{ADD} (%)	Y _{AD} (%)	Y _{ADD} (%)	Y _{AD} (%)	Y _{ADD} (%)
1	0,4	17,4	15,5	0,3	14,3	0,5
2	0,6	16,1	14,5	0,4	14,8	0,3
3	nd	15,4	15,2	0,5	15,1	0,3
4	nd	15,6	14,8	0,2	15,4	0,4
Control*	0,3	17,6	15,0	0,4	15,2	0,4

Y_{AD} o Y_{ADD} (mg de AD o ADD obtenido/mg de colesterol adicionado) x 100; 1, leche descremada (10%), refrigerada; 2, leche descremada (10%), medio ambiente; 3, leche descremada (5%), + glutamato de sodio (5%), refrigerada; 4, leche descremada (5%) + glutamato de sodio (5%), medio ambiente. nd, no se detectó el compuesto; *, se utilizó un cultivo fresco.

variantes liofilizadas y los controles, lo que demuestra que la actividad fundamental de los mutantes no se perdió a pesar de las variaciones que se detectaron en la supervivencia celular.

Conclusiones

- La leche descremada 5% con glutamato de sodio (5%) resultó ser el mejor medio protector para todas las cepas de micobacterias estudiadas.
- A pesar de que las cepas liofilizadas conservadas a temperatura ambiente mantuvieron una viabilidad elevada ($\geq 10^6$ ufc/mL), su conservación en refrigeración garantizó una supervivencia mayor.
- No se afectó la capacidad de las cepas de biotransformar esteroides, independientemente del medio protector utilizado y de la temperatura de conservación empleada durante los 10 años de almacenamiento.

17. Greaves RIN. La lyophilisation des bactéries et le problème des agents protecteurs. In: Rey L (editor). *Traité de lyophilisation*. Paris: Nermann; 1960. p. 25-33.

18. Morichi T, Irie R, Yano N, Kembo H. Protective effect of glutamic acid and related compounds of bacterial cells subjected to freeze-drying. *J Gen Appl Microbiol* 1963;9:149-61.

19. Griffin CW, Cook EC, Mehaffey MA. Predicting the stability of freeze-dried *Fusobacterium mortiferum* proficiency testing samples by accelerated storage. *Cryobiology* 1988;18:420-5.

20. Koshelev AV, Nesterov IA. Accelerated test for predicting survival of lyophilized cultures of Methanotrophic bacteria. *Mikrobiologiya* 1987;56:399-403.