



SELECTION OF FILAMENTOUS FUNGI CAPABLE OF BIOTRANSFORMING THE COMPOUND 2-PHENYLQUINOLINE

Carla Parra Lizarazu*, Gabriela Quiroga Selaez, Alberto Giménez Turba

Faculty of Pharmaceutical and Biochemical Sciences, Biochemical Drug Research Institute IIFB,
Pharmaceutical Chemistry Area, Universidad Mayor de San Andrés UMSA, P.O. Box 3239, Av. Saavedra
2224, Phone 5912229021, La Paz, Bolivia, farbio@farbio.edu.bo

Keywords: Biotransformation, 2-phenylquinoline, filamentous fungi.

ABSTRACT

Eighty strains, previously preserved by lyophilization, from the fungi collection of the Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquímicas-IIFB, part of the Major San Andres University, were activated. Ten strains were preselected based on its ability to show development in an Agar medium with 2-phenylquinoline as the only substrate. To evaluate the biotransformation process of the alkaloid, batch cultures were established in two different media; Sabouraud broth and Basal Medium for fungi. Analysis by thin layer chromatography allowed to select 6 strains which showed the formation of different products. Out of all the strains analyzed, strain 114QD was the one that showed products of interest in both media.

*Corresponding author: mgqs88.mgqs@gmail.com

RESUMEN

Spanish title: Selección de hongos filamentosos capaces de biotransformar el compuesto 2-fenilquinolina. Se activaron 80 cepas, procedentes del cepario del Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas – IIFB de la UMSA, en estado de conservación por la técnica de liofilizado, 10 de estas fueron preseleccionadas por su capacidad de desarrollar en un medio sólido de Agar Agar y 2-fenilquinolina como único sustrato. La evaluación del proceso de biotransformación del alcaloide se llevó a cabo mediante el establecimiento de cultivos Batch en dos medios de cultivo; Medio Sabouraud y Medio Basal para hongos, un análisis por cromatografía en capa fina permitió seleccionar a 6 cepas las cuales mostraron la formación de distintos productos siendo la cepa 114QD la única que mostro productos de interés en ambos medios.

INTRODUCCION

Los procesos de biotransformación o biodegradación se definen como la actividad de un sistema biológico sobre alguna sustancia y cuya consecuencia es la modificación de su estructura. La ventaja de estos procesos está relacionada con la preparación de compuestos ópticamente activos con elevada estereoselectividad, regioselectividad, quimioselectividad y enantioselectividad [1].

Estos procesos se caracterizan por su versatilidad y eficiencia. Dichos procesos son llevados a cabo por distintos microorganismos eficientes en degradar una gran gama de moléculas orgánicas lo que los ha hecho muy valiosos, no solo para procesos biotecnológicos e industriales, sino también, como una valiosa herramienta para comprender mejor los procesos de biodegradación de distintos fármacos en los seres humanos. Mediante el empleo de estos procesos, se ha logrado introducir y optimizar un gran número de reacciones para ser empleadas en la síntesis de moléculas quirales de importancia e interés comercial tales como: medicamentos, intermediarios farmacéuticos, aditivos para alimentos, agroquímicos, entre otros [2, 3, 4]

Entre las mejores maquinarias biotransformadoras se encuentran los hongos filamentosos que con aproximadamente 250.000 especies representan una gran parte de la biodiversidad microbiana universal. A partir de la capacidad de estos microorganismos para producir metabolitos secundarios de amplio interés biológico es que se conoce que alrededor del 50% de productos naturales son producidos por estos organismos a partir no solo del organismo como tal sino también por enzimas obtenidos de estos, de este porcentaje existen 12.000 antibióticos conocidos donde alrededor del 22 % pertenece a derivados de los hongos filamentosos [5]. Las células completas de



los hongos filamentosos se emplean frecuentemente debido a su habilidad para mediar en muchas reacciones diferentes, incluyendo transformaciones oxidativas, reductivas, e hidrolíticas sobre un amplio rango de sustratos. Debido a lo anterior, las biotransformaciones con esta clase de microorganismos permiten generar diversidad estructural en los productos metabólicos, de manera que puedan llevarse a cabo evaluaciones de estructura-actividad biológica sobre una quimioteca particular. [6]

El objetivo del presente estudio es el de seleccionar cepas fúngicas que posean la capacidad para modificar moléculas complejas, con sistemas aromáticos y/o los sustituyentes alquílicos, como es el caso de los alcaloides.

Descripción del cepario y descripción de las cepas.

Esta selección a su vez permitirá llevar a cabo futuros estudios de obtención de nuevos compuestos de bajo costo y obtener productos con alto valor agregado, los cuales en muchos casos son difíciles de obtener de fuentes naturales o por medios sintéticos.

Llegando a considerarse, en muchos casos, los procesos de biotransformación, como amigables con el ambiente y se pueden ubicar en el campo de la biotecnología blanca o la química verde [7].

RESULTADOS

Selección e identificación de cepas fúngicas biotransformadoras del alcaloide 2FQ

De 80 cepas fúngicas procedentes del cepario del IIFB, se logró exitosamente 57 cepas, tras un periodo de resuspensión de 24 horas en Caldo Papa Dextrosa. De estas cepas, 50 mostraron morfología característica y 7 presentaron desarrollo similar o contaminación. La primera selección de las cepas biotransformadoras se basó principalmente en la capacidad de algunos hongos de desarrollarse en un medio sólido compuesto solo por Agar-Agar y 2-fenilquinolina (2FQ) como fuente de carbono y nitrógeno. Esto permitió evaluar de manera cualitativa el proceso de biotransformación del alcaloide. Finalmente, solo 10 fueron elegidas como cepas de trabajo para el establecimiento de cultivos Batch, para una segunda etapa de selección.

Identificación macroscópica y microscópica de las cepas de trabajo

La identificación de las 10 cepas de trabajo se realizó mediante el examen macroscópico en placa y el examen microscópico por la técnica de la cinta pegante, las muestras para el examen microscópico se tomaron entre el tercer y cuarto día de crecimiento del frente hifal, lo cual permitió evaluar con mayor facilidad la morfología de cada colonia, las características de cada colonia se detallan en el siguiente cuadro 1.

Evaluación de los medios de cultivo con 2 – fenilquinolina

A los medios de cultivo Sabouraud y Medio Basal estériles se les añadió 25 µg/mL de 2-fenilquinolina ambos se incubaron durante 7 días junto con controles sin el alcaloide, pasado este tiempo se realizó una extracción líquido - líquido con Acetato de Etilo para evidenciar que efectivamente es posible extraer el sustrato, y que este no sufre modificaciones en ausencia de un microorganismo biotransformador. El Rf hallado para la 2FQ fue de 0.94.

Comparando la corridas cromatográficas de ambos medios de cultivo con y sin 2 – fenilquinolina podemos decir que es posible recuperar el sustrato añadido y además se observó que los componentes de los medios no interfieren y no pueden ser confundidos con productos de biotransformación de la 2- fenilquinolina (Fig. 1).

Selección del microorganismo biotransformador de 2-fenilquinolina

En la segunda etapa de selección; los cultivos Batch fueron establecidos principalmente como una herramienta para la evaluación de la capacidad biotransformadora de las cepas de trabajo, la habilidad de cada microorganismo de utilizar y modificar el sustrato 2-fenilquinolina, se determinó por el análisis cromatográfico de los productos obtenidos de dichos ensayos en medio líquido.

Se evaluaron dos medios de cultivo, caldo Sabouraud y medio basal para hongos. El primero es un medio bastante utilizado para el aislamiento de distintas especies de hongos filamentosos debido a la composición que presenta, los componentes de este medio proporcionan los macro y micronutrientes necesarios para activar la maquinaria enzimática de los hongos, permitiendo así que la utilización y modificación de sustratos tóxicos y difícilmente asimilables como lo son los alcaloides y otros compuestos aromáticos sustituidos.



Cuadro 1. Identificación macroscópica y microscópica de las colonias.

CEPA	ANALISIS MACROSCOPICO	ANALISIS MICROSCOPICO
114QD <i>Aspergillus spp.</i>	Colonias de color amarillo a amarillo verdusco oie permanecen verdes con el tiempo.	Vesículas redondas, esporulación en toda la superficie, conidióforos rugosos, cabezas conidiales radiales.
2C1c* <i>Aspergillus spp.</i>	Colonias café-canela arenosas a aterciopeladas.	Cabezas conidiales con disposición columnar compacta.
2C1 N.I	Colonia húmeda en un principio, polvorienta con el tiempo, de color amarillo claro y luego amarillo quemado, con granulaciones finas	Hifas hialinas, ramificadas, no septadas y lisas, presencia de escasos conidios ligeramente ovalados y con puntas en su estructura. No forman cabezas
315QD <i>Aspergillus spp.</i>	Colonias de color café negruzco de apariencia parecida a la pimienta.	Cabezas conidiales cafés o negras rugosas, vesículas biseriadas, metulas grandes y arialides mas pequeñas.
315QD-1 <i>Penicillium spp.</i>	Colonia de crecimiento lento y aspecto aterciopelado en un inicio, con el tiempo se torna polvorienta, de color verde oscuro a azul. Con pigmento amarillo en la base	Conidióforos ramificados con fiálides con forma alargada, de las que se producen cadenas de conidios rugosos ovoides.
4B4a <i>Trichoderma spp.</i>	Micelio blanco de rápido crecimiento. Asociada con la apariencia granular concéntrica de color verde. Con pigmento anaranjado en la base.	Al observar el conidióforo junto con las fialides y los conidios simulan la forma de un árbol.
4B4 <i>Penicillium spp.</i>	Colonia de crecimiento lento con micelio blanco. La producción de conidios le da la apariencia de pulverulenta verde que con el tiempo forma coloraciones cafés con un pigmento amarillo en la base.	Conidióforos ramificados con metulas y fialides en forma de botella.
2C2 <i>Trichoderma spp.</i>	La colonia muestra un micelio blanco de rápido crecimiento que se torna de apariencia granular de color verde.	Al observar el conidióforo junto con las fialides y los conidios simulan la forma de un árbol.
2C2a <i>Fusarium spp.</i>	Colonia con micelio blanco de rápido crecimiento y aspecto alodonoso.	Hifas hialinas septadas, conidóforos simples largos y delgados. Se observan conidios elípticos acumulados en los extremos, formando falsas cabezas.

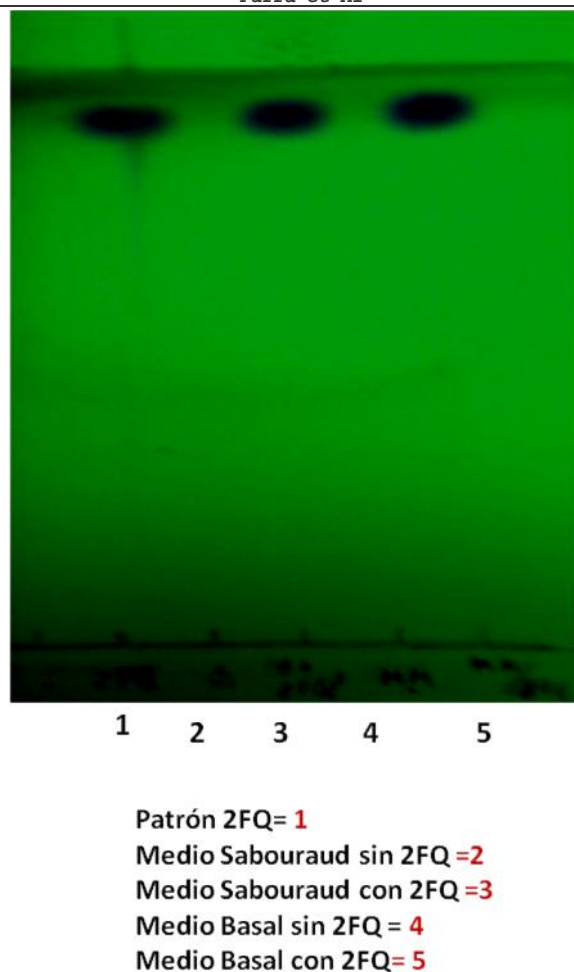


Figura 1. Evaluación de los medios de cultivo por cromatografía en capa fina

En el medio basal para hongos, la única fuente de carbono y nitrógeno disponible fue el alcaloide 2FQ, dejando a los microorganismos bajo una condición de estrés nutricional. Se conoce que microorganismos como los hongos filamentosos son capaces de desarrollar aún en los sustratos más tóxicos y sin los nutrientes necesarios, lo que podría indicar la activación de enzimas específicas o rutas alternas del metabolismo cuya información aun no es bien conocida.

Análisis de los productos obtenidos del proceso de biotransformación de 2FQ por cromatografía en capa fina

Finalizado el tiempo de incubación de 7 días, se procedió a realizar una extracción líquido-líquido con acetato de etilo, todos los extractos obtenidos se analizaron por cromatografía en capa fina contra un patrón de 2FQ.

Los resultados obtenidos mostraron que de las 10 cepas evaluadas solo 6 presentaban posibles productos de biotransformación del sustrato, los resultados de este análisis se detallan en la figura 2.

En la figura 2 se observan los perfiles cromatográficos de las cepas 2C1c*, 4B4, 2C2, 315QD y 2C1*. Para cada cepa se compararon las bandas correspondientes a los productos del medio Sabouraud y las del medio basal para hongos con la banda del patrón puro de 2FQ.

El análisis de los extractos del medio Sabouraud, reveló una banda mayoritaria que comparada con el patrón (Rf 0,94) evidenciaba la presencia del alcaloide 2 FQ en todas las muestras. Algunos extractos presentaban también la presencia de otros productos más polares.

En el caso del medio basal, (carril 5) los extractos de estas cinco cepas presentaron una única banda de 2FQ (Rf 0,94) pero ninguna banda de polaridad diferente que indicara una posible transformación o modificación del sustrato.

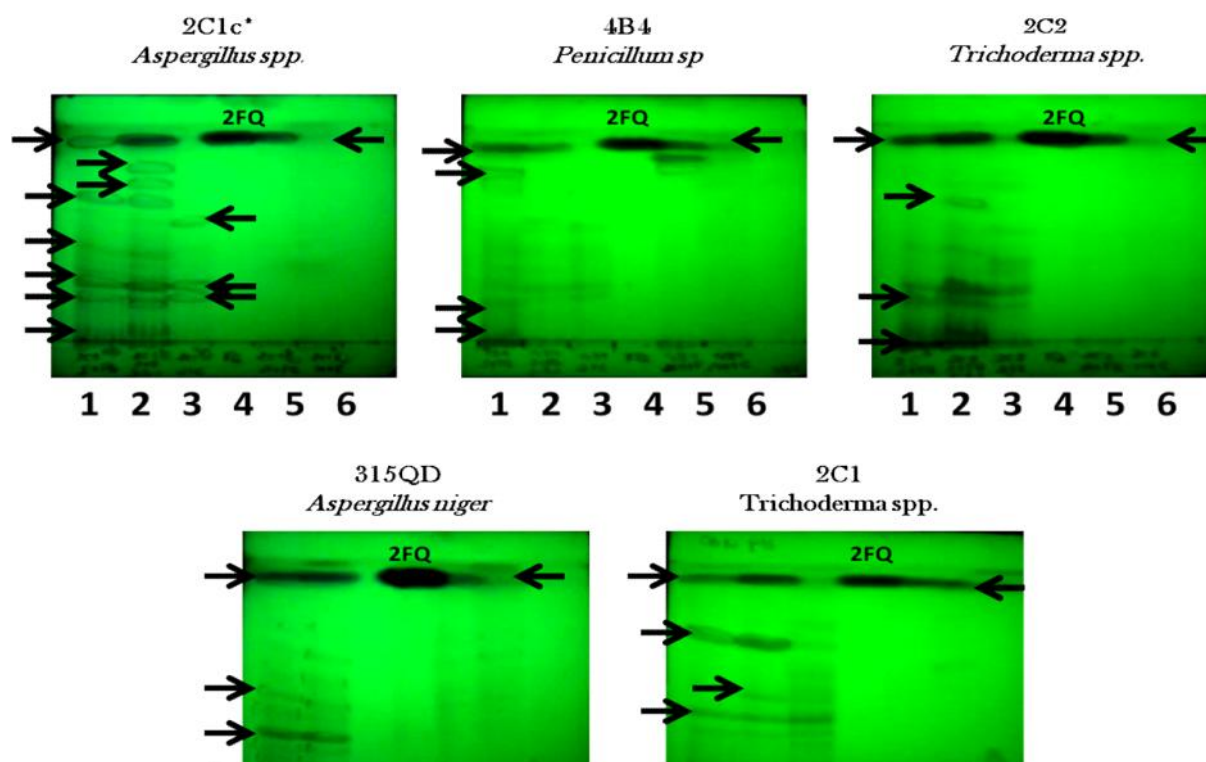


Figura 2. Evaluación de la capacidad biotransformadora de las cepas de trabajo por cromatografía en capa fina, Análisis de los productos obtenidos del proceso de biotransformación en los medios Sabouraud y Medio basal para hongos

En la figura 3 se detalla el perfil cromatográfico de la cepa 114QD (*Aspergillus spp.*) la cual mostro un perfil mucho más interesante comparado con el de las otras cinco cepas estudiadas. El análisis por cromatografía en capa fina reveló la capacidad de esta cepa de biotransformar todo el sustrato 2-fenilquinolina cuando esta se cultiva en un medio apto para su crecimiento, en la corrida se pudo observar que los extractos correspondientes al medio Sabouraud (carril 1 y 2) no mostraron la presencia de la banda de 2FQ comparado con el patrón (Rf 0,94), pero si se observó la presencia de otras bandas de productos más polares que presentaban Rfs de 0,66, 0,23 y 0,16. En la corrida de los extractos del medio basal (carril 5 y 6) se observó la banda correspondiente al alcaloide 2FQ (0,94) y también la presencia de otros 3 productos de distinta polaridad (Rfs 0,68, 0,64 y 0,30).

DISCUSION

El compuesto 2-fenilquinolina representa el alcaloide mayoritario de la especie medicinal *Galipea longiflora* (Evanta) la cual es ampliamente utilizada en el tratamiento de la leishmaniasis. Los hongos filamentosos poseen una gran capacidad de convertir sustratos de difícil asimilación como los alcaloides mediante diversas reacciones principalmente de reducción y oxidación, por lo que son altamente aprovechados

Los resultados obtenidos en el presente estudio permitieron seleccionar de entre 80 cepas de hongos filamentosos provenientes del cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas a la cepa 114 QD identificada como *Aspergillus spp* al ser esta la única capaz de desarrollar en presencia de un sustrato de difícil de asimilación como el alcaloide 2-fenilquinolina no solo en un medio óptimo para su crecimiento, sino también bajo una condición de estrés nutricional, mostrando en ambos medios distintos productos de diferente polaridad al

sustrato original, estos primeros estudios permitieron elegir a la cepa de trabajo para futuros estudios de caracterización química y biológica de dicho proceso.

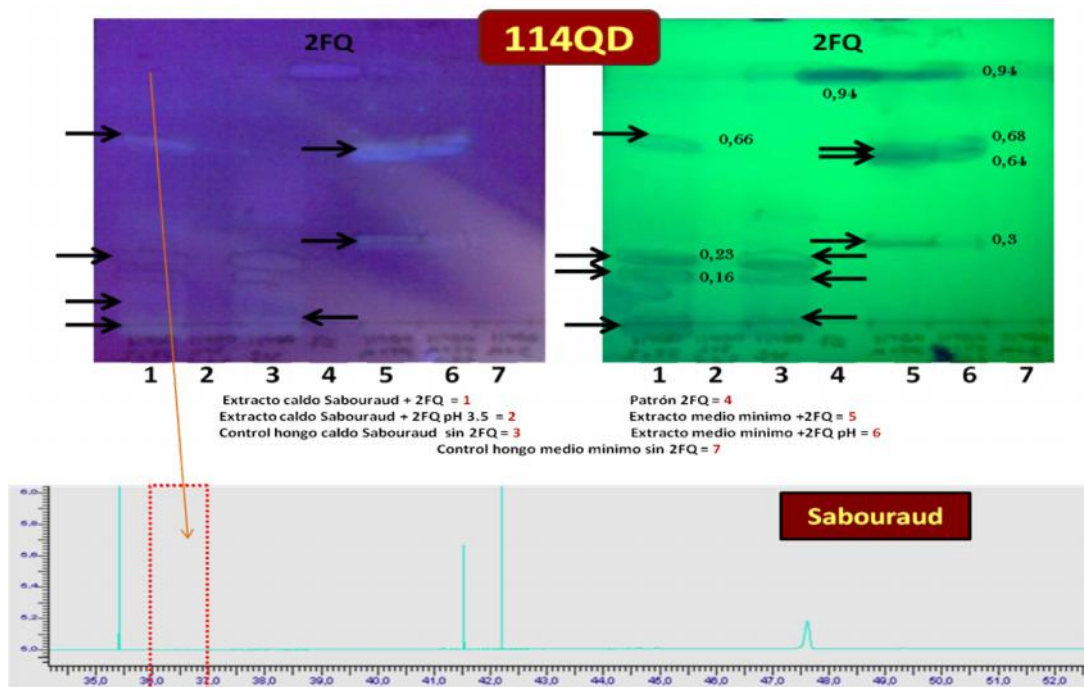


Figura 3. Perfil cromatográfico de la cepa 114QD

EXPERIMENTAL

Activación de las cepas de Hongos Filamentosos

Ochenta cepas de trabajo procedentes del cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B), preservadas por la técnica de liofilización, fueron reactivadas mediante precultivo en caldo papa dextrosa PDC incubadas a 28°C hasta desarrollo.

Obtención de colonias simples

Las colonias provenientes del caldo PDC fueron transferidas por la técnica de estriamiento a cajas petri (100 x 20mm) con 25 mL de Agar PDA (anexo) y cloranfenicol, una vez observado el crecimiento a partir de estos cultivos se realizaron las resiembras necesarias hasta la obtención de colonias simples, para lo cual se sembraron discos de micelio de 5mm de diámetro en la parte central de un medio de cultivo fresco. Todos los cultivos se incubaron por un periodo de 7 días a 28° C.

Selección de posibles cepas fúngicas transformadoras por evaluación en cultivo sólido

A partir de las colonias simples, cada cepa fue evaluada por su capacidad de crecer en un medio sólido con agar agar (Oxoid) y el alcaloide 2-fenilquinolina (2FQ) como fuente de carbono, para lo cual se prepararon tubos de cultivo (16x 160mm) en pico de flauta conteniendo 15 mL del mismo al 1.5% y 25 µg/mL del alcaloide, una vez agarizado se procedió a inocular discos de micelio de 5mm, los tubos fueron incubados por un periodo de 15 días a 28°C. La capacidad de utilizar el alcaloide 2FQ por cada cepa fue determinada por su desarrollo en este medio.

Identificación Macroscópica y Microscópica de las cepas del cultivo sólido con 2FQ

Examen macroscópico en placa



La identificación de las cepas fúngicas se realizó por el examen macroscópico en placa mediante la observación las características morfológicas y de pigmentación de la colonia (micelio) a ambos lados de la caja petri.

Examen Microscópico en portaobjetos

Para la identificación microscópica se apoyó el lado engomado de un trozo de cinta adhesiva transparente sobre la superficie del micelio, luego se observó en el microscopio utilizando el aumento 40X para una observación detallada de las sus características:

Evaluación de la biotransformación del sustrato 2-fenil-quinolina mediante el establecimiento de cultivos Batch

Cepas de trabajo:

315QD, 315QD-1, 2C1*,2C1, 4B4, 4B4-1, 2C2, 2C2a 114QD y 2C1c*

Establecimientos de Cultivos Batch:

La capacidad de cada cepa de modificar el sustrato 2-fenilquinolina se evaluó mediante cultivos Batch bajo dos condiciones de trabajo: Para la primera se utilizó 20 mL de caldo Sabouraud y para la segunda 20 mL de Medio Basal para hongos, a ambos medios se le añadió 25 ug/mL de 2FQ y se inoculo con 200uL de una solución de esporas de 1×10^6 esporas/mL, todos los matraces se incubaron por 7 días a 30°C y 100 RPM.

Obtención de extractos

Finalizado el tiempo de incubación la biomasa (micelio) formada se separó de los medios de cultivo mediante filtración con gasa, los filtrados obtenidos se extrajeron en un sistema continuo líquido- líquido con 20mL de acetato de etilo por 3 veces, el extracto orgánico obtenido se secó con NaCl, se filtró y concentró por evaporación del solvente en rotavapor (Janke&Kunkel), el extracto obtenido se transfirió a viales adecuadamente marcados y pesados y se almacenaron hasta su procesamiento.

Análisis de los extractos obtenidos por cromatografía en capa fina

Los extractos obtenidos fueron sometidos a un análisis por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando placas de silicagel 60 F254 (Merck) con base de aluminio, se empleó un sistema de elusión compuesto por CH₂Cl₂: MeOH (95:5), las placas fueron reveladas bajo luz UV a 254 nm y 365 nm. La corrida de los extractos se realizó junto a un patrón de 2FQ para la comparación de Rf's.

REFERENCIAS

1. Shaw, N.M., Robins, K.T., Kiener, A. Lonza. **2003**, 20 years of biotransformations. *Adv. Synth. Catal.* 345, 425-435.
2. Burton, S.G., Cowan, D.A., Woodley, J.M. **2002**, The search for the ideal biocatalyst. *Nature Biotechnology.* 20, 37-45.
3. Luna, H. **2004**, Biocatalysis application for preparing intermediates for drug synthesis. *Revista de la Sociedad de Química Mexicana.* 48, 211-219.
4. Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. **2001**, Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature.* 409, 258-268.
5. Demain, A. **1999**, Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 52, 455-463.
6. Daoubi, M., Hernandez, R., Benharref, A. and Collado, I. **2005**, Screening Study of Lead Compounds for Natural Product-Based Fungicides: Antifungal Activity and Biotransformation of 6,7-Dihydroxy-7-himachalene by *Botrytis cinerea*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 53, 6673-6677.
7. Davies, J. **2007**, Small molecules: The lexicon of biodiversity. *Journal of Biotechnology.* 129, 3-5.