

EFFECTO DE LA GLUCOSA, LACTOSA Y SACAROSA SOBRE LA ACTIVIDAD ESTEROIDE 1,2-DESHIDROGENASA EN LA CEPA *MYCOBACTERIUM* sp. NRRL B-3683

A. Falero, B.R. Hung, N. LLa nes, C. Pérez y B. Aguila.

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

Recibido: 25 de abril de 1997.

RESUMEN. Se estudió la influencia de la glucosa, lactosa y sacarosa sobre la actividad esteroide 1,2-deshidrogenasa en extracto crudo de la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL-B3683. Los resultados demostraron que la sacarosa y la lactosa no poseen ningún efecto significativo sobre la actividad enzimática en las condiciones estudiadas, mientras que la glucosa, a concentraciones mayores de 0,5 %, la disminuye.

ABSTRACT. The influence of glucose, lactose and sucrose on the steroid 1,2-dehydrogenase activity was studied in crude extract of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 induced with sugar cane phytochemicals. The results showed that lactose and sucrose do not have a significant effect on enzymatic activity, whereas glucose concentrations higher than 0.5 % produce a decrease on this activity.

INTRODUCCION

La esteroide 1,2-deshidrogenasa es una enzima clave en la ruta metabólica de biotransformación de fitosteroles por microorganismos, pues realiza la deshidrogenación en posición 1-2 del anillo esteroidal, ejemplo de ello es el caso de la transformación de 4-androsten-3,17-diona (AD) en 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD).

La obtención de precursores esteroidales a partir de esteroides de fuentes naturales empleando cepas de microorganismos mutantes capaces de biotransformarlos, es un tema de creciente interés mundial en las últimas décadas por constituir una posibilidad real de obtención de materia prima para la síntesis de numerosas sustancias de gran aplicación en la industria farmacéutica.

A pesar de que no está totalmente definida la ruta metabólica del proceso de degradación de los esteroides, se han aislado dos enzimas que intervienen en reacciones fundamentales dentro de la vía, pues son las que inician la modificación y destrucción de la estructura cíclica de los compuestos esteroidales: la esteroide 1,2-deshidrogenasa y la 9 α -hidroxilasa¹ (Fig. 1).

Mycobacterium sp. B-3683 es una cepa mutante obtenida por Marscheck y col.,² deficiente en la enzima 9 α -hidroxilasa, que acumula ADD y AD en la biotransformación de los esteroides. Se ha estudiado el efecto que produce la adición de algunos azúcares en el medio de cultivo y se ha reportado que la sacarosa provoca una acción estabilizante y estimulante o una de las dos,³ mientras que al añadir glucosa se produce además de AD y ADD, testosterona.⁴⁻⁶ Teniendo en cuenta que estos resultados han sido obtenidos empleando para la biotransformación células enteras del microorganismo, el objetivo de este trabajo estuvo encaminado a estudiar el efecto que tiene la presencia de dichos azúcares en la actividad esteroide 1,2-deshidrogenasa cuando se emplean extractos crudos de dicha enzima.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo del microorganismo

Se empleó la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683, donada por el Departamento de Química de la Universidad de la Columbia Británica.

Para obtener la biomasa se partió de cultivo líquido en medio Marscheck,² y se añadió la mezcla de fitosteroides de la caña de azúcar a una concentración de 1 mg/mL como fuente de carbono para la inducción de la esteroide 1,2-deshidrogenasa.

Preparación del extracto enzimático

La biomasa obtenida se resuspendió en amortiguador TRIS 0,1 mol/L pH 8,2 en una proporción 1:2 (P/V). Posteriormente, se rompió por sonicación a intervalos de 30 s con un tiempo efectivo total de 15 min. Por centrifugación se separaron los restos de células del sobrenadante. Este extracto celular se sometió a diálisis en columnas PD-10. Todo este proceso se realizó a 4 °C. La actividad enzimática se determinó por triplicado según método reportado anteriormente.⁷

Las concentraciones estudiadas de los azúcares fueron las siguientes:

Glucosa: 0,2; 0,5; 2y8%.

Sacarosa: 2,6y10 g/L.

Lactosa: 0,2; 0,5; 2; 4y8%.

Análisis estadístico

En el procesamiento estadístico de los resultados se aplicó el análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA-1) y la prueba de Duncan cuando existían diferencias significativas.⁸

RESULTADOS Y DISCUSION

Se observó que la glucosa a concentraciones de 0,2 y 0,5 % no ejerce ningún efecto sobre la enzima (Tabla I), sin embargo, a medida que aumenta por encima de estos valores, disminuye la actividad diferenciándose significativamente con respecto a la muestra en ausencia de azúcares. A 2y8% de glucosa la actividad es menor y significativamente diferente del resto de los valores encontrados. Estos resultados pudieran explicarse teniendo en cuenta el mecanismo de regulación de las reacciones redox propuesto por Gachok y col.,⁹ para la 1,2-deshidrogenación de los esteroides en presencia de un sustrato endógeno en el medio de cultivo. Dichos au-

tores señalan que las reacciones de oxidación están determinadas en gran medida por el estado del cofactor que se encuentra unido a la enzima. Al ser los azúcares fuentes de carbono que proporcionan equivalentes de reducción en la célula, ya sea por vía glicolítica o por la vía de la hexosa-fosfato, esto provoca que se establezca una competencia entre la esteroide y el azúcar por el aceptor final de equivalentes de reducción, impidiendo de esta forma las reacciones de oxi-

dación de los esteroides. Estos resultados podrían explicar por qué en presencia de glucosa en el medio de cultivo el *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 produce testosterona además de AD y ADD,⁴⁻⁶ ya que al ocurrir una disminución de la actividad de la 1,2-deshidrogenasa, es menor la cantidad de AD que se transforma en ADD. La formación de testosterona se explica por un incremento de la actividad 17-óxido-reductasa, la cual se ve favorecida en presencia de glucosa.^{6,10}

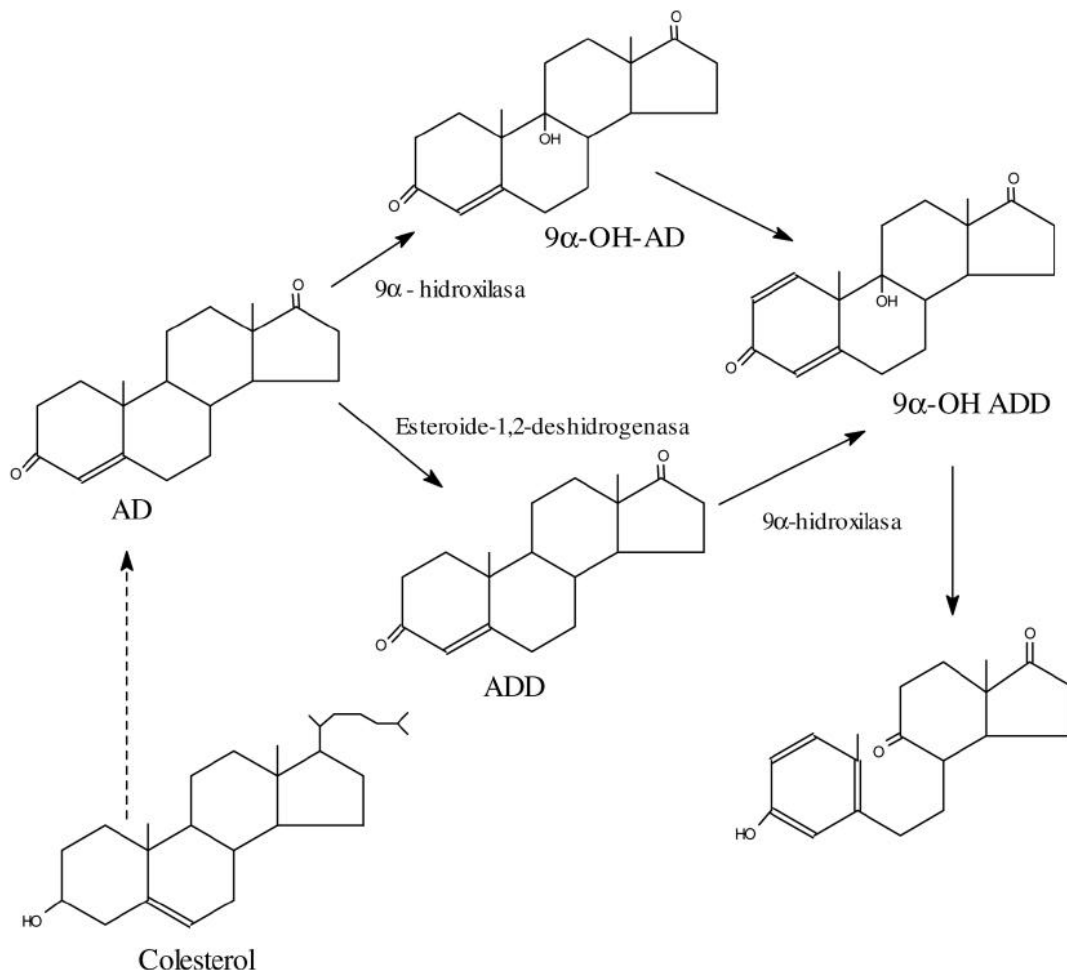


Fig. 1. Reacciones catalizadas por la esteroide 1,2-deshidrogenasa y la 9α-hidroxilasa.

TABLA I
Resultados de la prueba de Duncan
en el estudio de la influencia de la glucosa
sobre la actividad esteroide 1,2-deshidrogenasa
en la cepa B-3683

Glucosa (%)	Actividad enzimática (nmol · min ⁻¹ · mL ⁻¹)
0,10	,27 ^a
0,2	9,97 ^a
0,5	9,43 ^{ab}
2,06,	63 ^c
8,05,	82 ^c

p < 0,05.

Según los resultados del procesamiento estadístico aplicado, no se observaron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de lactosa y sacarosa estudiadas y la muestra control (Tablas II y III), ya que en ambos casos el valor de F calculado resultó menor que el valor crítico, lo que a su vez, permitió afirmar que en las condiciones estudiadas estos azúcares no ejercen ningún efecto sobre la actividad esteroide 1,2-deshidrogenasa en la cepa B-3683, resultado que coincide con los obtenidos anteriormente, pues se producen los mismos rendimientos en la biotransformación en presencia o ausencia de lactosa y sacarosa en el medio de cultivo.¹¹

Sin embargo, se debe señalar que Pinheiro y Cabral encontraron que altas concentraciones de sacarosa no aumentan la actividad Δ¹-deshidrogenasa inicial, aunque sí incrementan la estabilidad de la enzima de *Arthrobacter simplex* en solventes orgánicos.

TABLA II
Resultados del ANOVA-1 en el estudio de la influencia de la sacarosa sobre la actividad esteroide 1,2-deshidrogenasa en la cepa B-3683

Glucosa (%)	Actividad enzimática (nmol · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F(95 %)	
		Calculado	Crítico
07,	87	0,126	8,84
0,2	7,34		
0,6	7,72		
1,07,	42		

p < 0,05.

TABLA III
Efecto de la lactosa sobre la actividad esteroide 1,2-deshidrogenasa en la cepa B-3683

Glucosa (%)	Actividad enzimática (nmol · min ⁻¹ · mL ⁻¹)	F(95 %)	
		Calculado	Crítico
06,	94	1,495	4,68
0,2	6,76		
0,5	6,82		
2,06,	59		
8,06,	98		

p < 0,05.

CONCLUSIONES

La presencia de glucosa a concentraciones mayores del 0,5 % disminuye la actividad esteroide 1,2-deshidrogenasa de *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683.

No se detectó efecto alguno de la sacarosa y la lactosa sobre dicha actividad enzimática a las concentraciones estudiadas.

BIBLIOGRAFIA

1. Martin C.K. Microbial cleavage of sterol side chain. **Adv. in Applied Microb.**, **22**, 29, 1977.
2. Marsheck W.J., Kraychy S. and Mir R. D. Microbial degradation of Sterols. **Appl. Microbiol.**, **23**, 72, 1972.
3. Pinheiro H.M. and Cabral J.M.S. Effects of solvent molecular toxicity and microenvironment composition on the Δ^1 -dehydrogenation activity of *Arthrobacter simplex* cells. **Biotechn. Bioeng.**, **37**, 97, 1991.
4. Wang K.C., Gau C. and Rhei-Long Chen R. Microbial oxidation of sterols. I. Conversion of cholesterol and sitosterol to 17-hydroxy steroids. **J. Taiwan Pharm. Assoc.**, **34**, 129, 1982.
5. Ramírez M.A., Díaz M.A. y Pérez C. Evaluación de las condiciones de producción de testosterona utilizando las cepas *Mycobacterium* sp. B-3683 y Ex-4. V Congreso de la Sociedad Cubana de Ciencias Farmacéuticas, Ciudad de La Habana, 1993.
6. Llanes N., Hung B. Falero A., Pérez C. and Aguila B. Glucose and lactose effect on AD and ADD bioconversion by *Mycobacterium* sp. **Biotechnology Letters**, **17**, 1237, 1995.
7. Falero A., Hung B.R., Pérez I., Llanes N. y Fonseca M. Estudio cinético de la esteroide 1,2-deshidrogenasa en *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683. **Revista CENIC Ciencias Biológicas.**, **26**, 1995.
8. López Planes, R. Diseño estadístico de experimentos. Editorial Científico-Técnica, La Habana, 1988.
9. Gachov V.P. and Grytsay. Kinetic Model of Hydrocortisone 1-en-Dehydrogenation by *Arthrobacter globiformis*. **Biotech. and Bioeng.**, **33**, 661, 1989.
10. Wen-Hsiung L., Chih-Wei K. Kuo-Liang W., Chung-Yi L. and Wen-Yih H. Transformation of cholesterol to testosterone by *Mycobacterium* sp. **J. Ind. Microbiol.**, **13**, 167, 1994
11. Herrera A., Espinosa M.E., Borrego S., Falero A., Guillén F., Martí E. y Ramírez A. Influencia de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en la biotransformación de mezcla de fitosteroles de la caña de azúcar. XI Seminario Científico, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, 1990.