

# ESTUDIO CINETICO DE LA ESTEROIDE 1,2-DESHIDROGENASA DE *ARTHROBACTER SIMPLEX* INMOVILIZADA EN PECTINA

A. Falero, B.R. Hung, N. Llanes, B. Aguila y M. Fonseca.

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

Recibido:

**RESUMEN.** Para la bioconversión de androstendiona en androstadiendiona por la acción de la enzima esteroide 1,2-deshidrogenasa fueron empleadas células de *Arthrobacter simplex* inmovilizadas en pectina. Esta enzima introduce un doble enlace entre el C1 y C2 del anillo A del núcleo esterooidal. El valor de KM encontrado fue  $5,36 \cdot 10^{-4}$  mol/L y Vmáx 31,85 nmol/min. La actividad de la esteroide 1-2 deshidrogenasa se incrementó cuando se adicionó menadiona (vitamina K3) como acceptor artificial de electrones. Por encima de  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/L la menadiona resultó tóxica para el microorganismo. Además se determinó la estabilidad operacional del sistema y el efecto del etanol sobre la actividad enzimática. La identificación de los compuestos se realizó por Cromatografía de fase inversa empleando un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución .

**ABSTRACT.** *Arthrobacter simplex* cells immobilized in pectin were used for bioconversion of androstenedione in androstadienone by means of the steroid 1-2 dehydrogenase enzyme. This enzyme introduces a double bond between C1 and C2 in the A ring of the steroid nucleus. The KM value found was  $5,36 \cdot 10^{-4}$  mol/L and Vmáx 31,85 nmol/L . The steroid 1-2 dehydrogenase activity was increased when menadione (K3 vitamin) was added as artificial electron acceptor. Over  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/L menadione was toxic to the microorganism. Also were determined the system operational stability and the ethanol effects on enzymatic activity. The compound's identification was carried out by reverse phase chromatography using a High Pressure Liquid Cromatography system.

## INTRODUCCION

La introducción de dobles enlaces en la molécula de algunos esteroides resulta de gran importancia para aumentar la actividad antinflamatoria de estos compuestos.<sup>1</sup> Este doble enlace puede lograrse a través de la fermentación microbiiana, que sin lugar a dudas, ofrece mayores ventajas que la síntesis química.

Gran número de microorganismos son conocidos por su capacidad de realizar la reacción de 1,2-deshidrogenación del núcleo esterooidal la cual es catalizada por la esteroide 1,2-deshidrogenasa (Fig. 1). Esta enzima es inducible y requiere además, la presencia de un cofactor o acceptor artificial de electrones.<sup>2</sup> Entre los aceptores más empleados se encuentran: metasulfato de fenacina, 2,6-diclorofenolindofenol y menadiona.<sup>3</sup>

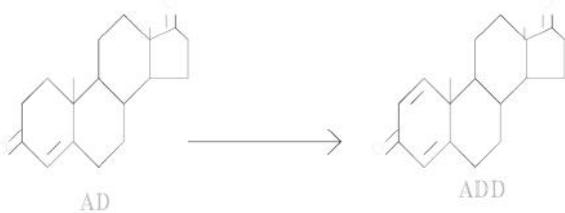


Fig. 1. Acción de la esteroide 1,2-deshidrogenasa.

Los microorganismos utilizados con mayor frecuencia para llevar a cabo esta reacción son: *Mycobacterium*,<sup>4</sup> *Corynebacterium*,<sup>5</sup> *Arthrobacter*,<sup>6</sup> *Nocardia*,<sup>7</sup> etcétera. En la mayoría de los casos, es *Arthrobacter simplex* la cepa más empleada debido a su eficiencia en la biotransformación de estas sustancias.

En los últimos años, teniendo en cuenta la habilidad que tiene esta cepa para convertir esteroides, se ha investigado sobre la posibilidad del empleo de células inmovilizadas por

diferentes métodos. En el presente trabajo se empleó el atrapamiento en geles y se estudiaron los parámetros cinéticos de la biotransformación en estas condiciones con el fin de obtener los mejores resultados.

Este trabajo tuvo como objetivos determinar los parámetros que caracterizan la reacción enzimática (KM, Vmáx y concentración óptima del acceptor electrónico) y estudiar la estabilidad operacional del sistema y la toxicidad de las células frente al etanol.

## MATERIALES Y METODOS

### Microorganismo

*Arthrobacter simplex* ATCC-6946 (donada por el Dpto. de Bioingeniería y Biotecnología del CINVESTAV, México).

### Obtención de la biomasa

Se inoculó un erlemeyer de 250 mL que contenía 50m L de caldo nutritivo (CN), 2 % de glucosa, pH 7,2. Se incubó a 28 °C durante 24 h a 150r /min . Este cultivo fue el inóculo para un erlemeyer de 2Lc on 900 mL delm edio CN durante 24 h . La biomasa se obtuvo por centrifugación a 6 000 r/min durante 20 min a 4 °C.

La inducción se realizó con una solución alcohólica de 4-androsten-3,17-diona (AD) 0,05 mg/mL por 5h.

### Sustrato

El sustrato estuvo constituido por AD.

Por tratarse de un compuesto apolar, fue necesario emplear solventes orgánicos para aumentar su solubilidad. En este caso se utilizó el etanol.

### Toxicidad del etanol

Se estudió el efecto del etanol, empleando concentraciones desde 5 hasta 20% en el medio de biotransformación.

## Inmovilización de células

La inmovilización se realizó según lo reportado por Montes y Magaña, 1991.

## Biotransformación

Los ensayos de biotransformación se realizaron en un reactor Air-Lift con 10g de peso húmedo de esférulas en un volumen de 300 mL de una solución que contenía cloruros de calcio 0,5 % y de magnesio 0,2 %; pH 8,5. La concentración final de etanol empleada fue del 10 % y de la AD 0,1 mg/mL. La concentración de menadiona fue de 0,36 mmol/L. El tiempo de reacción fue de 15 min .

La extracción de las muestras se realizó con acetato de etilo y la determinación por cromatografía de fase reversa mediante HPLC, empleando una columna Spherisorb 5 ODS Pye Unicam Ltd. de (250 x 4,6) mm y como fase móvil metanol:agua (80:20) a un flujo de 1,4 mL/min . La detección se realizó por UV a 254 nm .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para estudiar el comportamiento cinético de esta enzima fue necesario hacer modificaciones al medio de biotransformación empleado en trabajos anteriores,<sup>1,8</sup> así como disminuir el peso de las esférulas a emplear para trabajar en condiciones de velocidad inicial. El medio anteriormente empleado contenía extracto de levadura, peptona y glicerol como fuentes energéticas para las células, pero cuando se suministró aire al reactor se formó espuma lo que ocasionó pérdida de la cantidad de sustrato a reaccionar con la enzima. Esto se debe a que alrededor de la espuma se forma un anillo donde se acumula todo el sustrato insoluble en medio acuoso, perdiéndose por tanto el contacto de éste con la enzima, lo cual imposibilita el estudio de altas concentraciones de sustrato.

Con el propósito de eliminar este problema se realizaron biotransformaciones empleando el medio reportado anteriormente y un nuevo medio que no contenía peptona, extracto de levadura ni glicerol, obteniendo 100 % de conversión en ambos casos. Estos resultados permitieron realizar el estudio cinético en presencia de concentraciones de sustrato saturantes y determinar los parámetros cinéticos que rigen esta reacción.

### Efecto del etanol

Al estudiar la toxicidad del etanol para esta cepa inmovilizada se encontró que es posible emplear hasta 10% de etanol en el medio de biotransformación, ya que por encima de este valor el mismo resulta tóxico para el microorganismo (Tabla I) . Sin embargo, cuando el medio de biotransformación está suplementado con extracto de levadura , peptona y glicerol es posible aumentar la concentración de etanol hasta el 18 % sin pérdida significativa de la actividad enzimática.<sup>8</sup>

**TABLA I**

### Efecto del etanol sobre las células inmovilizadas de A. SIMPLEX en la conversión de AD a ADD

Etanol (%)	Velocidad inicial ( $\mu\text{g}/\text{min}$ )
5	3,51
103,	55
15	2,52
201,	30

El conocimiento de este dato es muy importante en esta reacción, ya que el sustrato empleado es insoluble en agua y la máxima concentración a emplear de él en las determinaciones enzimáticas esta determinada por su solubilidad en el medio.

### Efecto de la concentración de sustrato

Al aumentar la concentración de sustrato desde  $1,7 \cdot 10^{-4}$  hasta  $2,79 \cdot 10^{-3}$  mol/L, se encontraron valores de  $5,36 \cdot 10^{-4}$  mol/L y 31,85 nmol/min para  $K_m$  y  $V_{\max}$ , respectivamente, aplicando el método de Lineweaver-Burk (Fig. 2).

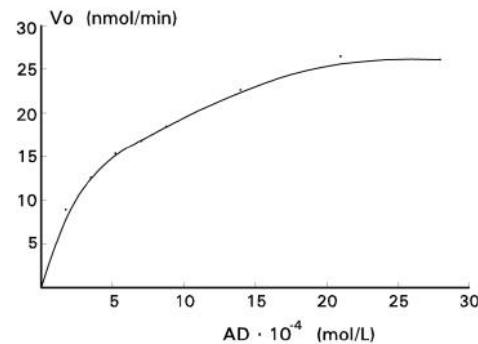


Fig. 2. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de reacción (Vo).

Teniendo en cuenta estos resultados se estableció la concentración de sustrato a emplear en los próximos ensayos ( $10,47 \cdot 10^{-4}$  mol/L), que a pesar de no ser  $100 K_m$ , resultó saturante, así como la máxima concentración posible debido a limitaciones de solubilidad del sustrato.

### Efecto de la concentración de menadiona

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos para la reacción de 1,2-deshidrogenación del AD en presencia de diferentes concentraciones de menadiona donde se corroboró la necesidad de un aceptor electrónico exógeno que garantice la reoxidación del cofactor para que éste quede disponible nuevamente de modo que la enzima pueda reaccionar con el próximo sustrato.

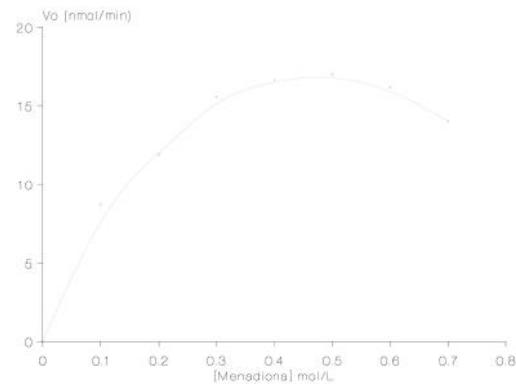


Fig. 3. Efecto de la concentración del co-sustrato en la velocidad inicial de la reacción (Vo).

Como puede apreciarse, en la medida que aumenta la concentración de menadiona hasta  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/L, aumenta la velocidad de la reacción. A partir de esta concentración comienza a disminuir la velocidad debido a supuestos efectos tóxicos. Esto ha sido reportado anteriormente por Montes y Magaña,<sup>1</sup> para esta cepa con hidrocortisona y compuesto S de Reichstein como sustratos. Por lo tanto, la concentración

de menadiona de  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/L es el máximo valor permisible y resulta superior al reportado por dichos autores para los sustratos ya citados.

#### Estabilidad operacional del sistema

Se realizaron 12 biotransformaciones en total para determinar el número de veces que es posible usar las esferulas sin pérdida de su actividad. Se evidenció que a partir de su tercer empleo comienza a disminuir la actividad aunque el 50 % de biotransformación (tiempo de vida media) se alcanza en el décimo segundo. Es de señalar que debido a la insolubilidad del sustrato, se hizo necesario emplear un medio salino para evitar la formación de espuma anteriormente explicada lo cual disminuyó sensiblemente la estabilidad operacional debido a que la viabilidad de las células estuvo afectada por la deficiencia de nutrientes (Fig. 4).

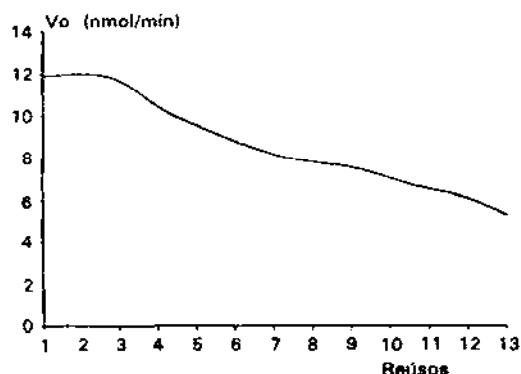


Fig. 4. Estabilidad operacional del sistema de *A. simplex* inmovilizado.

En trabajos anteriores realizados por el grupo de trabajo de los autores con esta misma cepa,<sup>8</sup> empleando el medio reportado anteriormente con extracto de levadura, peptona y glicerol se han obtenido valores mucho más altos del número de reusos; desde el punto de vista práctico esto ofrece grandes ventajas puesto que permite una mayor utilización de las células.

#### CONCLUSIONES

La esteroide 1,2-deshidrogenasa alcanza la mitad de la velocidad máxima a una concentración de AD de  $5,36 \cdot 10^{-4}$  mol/L y la velocidad máxima de la reacción es de 31,85 nmol/min.

La menadiona se debe añadir hasta una concentración de  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/L, por encima de esta concentración se supone que la menadiona tiene un efecto tóxico sobre la célula.

Las células inmovilizadas pueden usarse hasta tres veces sin pérdida de su actividad.

La toxicidad del etanol aparece a partir del 10 %.

La sustitución del medio de biotransformación permitió hacer el estudio cinético, pero disminuyó sensiblemente la estabilidad operacional del sistema, así como la concentración de etanol a emplear en la biotransformación.

#### RECOMENDACIONES

Continuar los experimentos de biotransformación con el medio original para aumentar la estabilidad operacional del sistema y elevar la concentración de sustrato, teniendo en cuenta los parámetros cinéticos obtenidos para esta reacción.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Montes M. C. and Magaña J. *Indust. Microbiol.*, 8, 259, 1991.
2. Tadayuki H., Teruko W. and Eiji I. J. *Biochem.*, 109, 581, 1991.
3. Itagaki E., Hatta T., Wakabayashi T. and Suzuki K. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1040, 281, 1990.
4. Chung-Yi L. and Wen-Hsiung L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 598, 1992.
5. Constantinides A. *Biotech. and Bioengineering*, XXII, 119, 1980.
6. Pinheiro H. M. and Cabral M. S. *Enzyme Micob. Technol.*, 40, 1123, 1992.
7. Medentsev A.G., Arinbasarova A. Y., Koshcheyenko K.A., Akimenko V.K. and Skryabin G.K. *J. Steroid Biochem.*, 23, 365, 1985.
8. Hung B., Falero A. and Matos M. Inmovilización de *A. simplex* para la biotransformación de esteroides, Trabajo de Diploma, 13, 21, 25, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, junio de 1995.