

ESTUDIO DE LA ESTEROIDE 1,2-DESHIDROGENASA DE LA CEPA *MYCOBACTERIUM FORTUITUM* ATCC 6842

B. R. Hung Llamas, J. Benítez Robles y B. Aguila Alvarez.

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

Recibido: 8 de marzo de 1994.

RESUMEN. Se estudiaron algunas propiedades de la esteroide 1,2-deshidrogenasa de la cepa *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842. Se determinó la constante de Michaelis-Menten, así como la temperatura y el pH óptimo de la enzima, su estabilidad térmica, la protección a su degradación proteolítica y el efecto de varias sustancias sobre su actividad enzimática.

ABSTRACT. Some properties of steroid 1,2-dehydrogenase of *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842 strain were studied. Michaelis constant and optimum pH and temperature were determined. Temperature stability, protection against proteolytic degradation and the effect of several substances on enzyme activity were also studied.

INTRODUCCION

La biotransformación de compuestos naturales tales como los fitosteroles de la caña de azúcar, constituye una forma de obtención de precursores esteroideos de interés farmacéutico, entre los que se encuentran el 4-androsten-3,17-diona (AD) y el 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD).

A pesar de que no está definida la ruta metabólica de ese proceso, se conocen dos enzimas que intervienen en reacciones fundamentales que inician la modificación de la estructura cíclica de los esteroides: la esteroide 1,2-deshidrogenasa y la 9-hidroxilasa. La primera es la enzima que convierte el AD en ADD mediante la introducción de un doble enlace entre los carbonos 1 y 2 del anillo esteroide.

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar algunas propiedades de la esteroide 1,2-deshidrogenasa de *Mycobacterium fortuitum* y realizar un estudio cinético preliminar, que comprendió la determinación de la constante de Michaelis-Menten (Km), así como la temperatura y el pH óptimo de la enzima, su estabilidad térmica, su protección a degradación proteolítica y el efecto de varias sustancias sobre su actividad enzimática.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo

Se utilizó la cepa de *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842.¹

Condiciones de cultivo

Se emplearon erlenmeyers de 250 mL de capacidad que contenían 60 mL de medio con la composición siguiente:¹ caldo nutriente 8 g/L; glicerol 5,0 g/L; Tween 80 1,0 g/L; extracto de levadura 1,0 g/L; mezcla de fitosteroides 200,0 mg/L. La mezcla de fitosteroides fue añadida disuelta en dimetilformamida partiendo de una solución concentrada (40 mg/mL). Cada erlenmeyer fue inoculado con 60 mL de un precultivo incubado durante 72 h en el mismo medio.

Preparación del extracto enzimático

Las células fueron separadas por centrifugación a 9 000 r/min durante 15 min, lavadas con solución amortiguadora Tris 0,1 mol/L, pH 8,8 y resuspendidas en la solución amortiguadora en una proporción 1:2 (P/V). La ruptura de

las células se efectuó por sonicación durante 10 min, separando el extracto crudo del residuo sólido por centrifugación a 16 000 r/min durante 30 min. El extracto se dializó con la misma solución amortiguadora durante 24 h, después de ser concentrado con polietilenglicol 4000. Todo este proceso se realizó a 4 °C.

Análisis del contenido de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas en las muestras por el método de Lowry, empleando la albúmina de suero bovino (AB) como patrón.²

Actividad enzimática esteroide 1,2-deshidrogenasa

Se aplicó un método colorimétrico utilizando el 2,6-diclorofenolindofenol como aceptor electrónico, en el cual se mide la disminución de la absorbancia como consecuencia de la reducción del indicador.³

A pesar de que las muestras fueron dializadas, aún conservaban cierta actividad inespecífica, factor que se eliminó permitiendo la decoloración del reactivo después de añadida la muestra, hasta la estabilización de las mediciones de absorbancia (aproximadamente 2-3 min). A partir de ese momento, se añadió el AD disuelto en metanol, considerando como densidad óptica inicial el primer valor obtenido después de la adición del sustrato. El coeficiente de extinción molar del 2,6-diclorofenolindofenol fue de 21 000.⁴

Una unidad de actividad enzimática se define como la enzima necesaria para transformar un nanomole de sustrato por minuto.

El cálculo de la Km, se realizó mediante el programa de computación EZ-FIT, del Dpto de Productos Médicos, E.I. Du Pont de Nemours y Co., versión 1.1, 1988

Estabilidad térmica de la enzima

La estabilidad del extracto enzimático se estudió preincubando la muestra a diferentes temperaturas entre 25 y 67 °C durante intervalos de tiempo entre 0 y 60 min, después de los cuales era enfriada rápidamente a 0 °C para el análisis posterior de la actividad enzimática.

Protección a degradación proteolítica

Se hicieron experiencias preincubando la muestra por períodos más largos a temperatura ambiente con y sin inhibi-

dores de proteasas. Los inhibidores usados fueron ácido ϵ -aminocaproico al 0,5 %, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,5 mmol/L (FFMS) y el INPROT 100 U/mL (inhibidor de amplio espectro de acción, que fue suministrado por el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología, Universidad de la Habana). Además, se estabilizó la enzima con albúmina de suero bovino (AB), al 0,2 %.

Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática

Se determinó la temperatura óptima de reacción entre 18 y 35 °C a pH 9,0 con solución amortiguadora de pirofosfato de sodio 0,1 mol/L. Para analizar la influencia de la concentración de iones H^+ , se emplearon las soluciones amortiguadoras siguientes: fosfato de potasio pH 5,8-7,6; Tris-HCl pH 7,2-8,8 y cloruro de amonio pH 8,4-10,7. La fuerza iónica de estas soluciones se mantuvo constante.⁵

Para realizar estas experiencias cambiando el pH de la reacción fue necesario aumentar la concentración del 2,6-diclorofenolindofenol, ya que al aumentar la acidez del medio ocurría un incremento de la degradación inespecífica del indicador redox.

Efecto protector de algunas sustancias sobre la actividad esteroide 1,2-deshidrogenasa

Se probó la acción de algunos agentes quelantes e inhibidores enzimáticos, así como de iones metálicos sobre la enzima. Estos fueron añadidos a una concentración final de 1 mmol/L.

RESULTADOS Y DISCUSION

Variación de la concentración inicial de sustrato (AD)

Al incrementar la concentración de AD desde $0,1 \cdot 10^4$ hasta $5,0 \cdot 10^4$ mol/L se encontró que la enzima presentaba un comportamiento acorde con la ecuación de Michaelis-Menten.

La figura 1 muestra la influencia de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de reacción

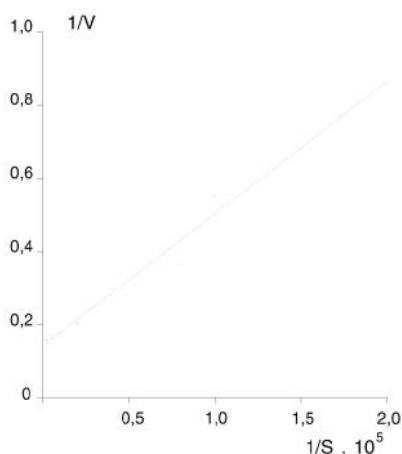


Fig. 1. Representación gráfica de la influencia de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de reacción según la ecuación de Lineweaver-Burk. Sustrato AD.

Se obtuvo un valor de V_m y K_m de $6,46$ y $1,96 \cdot 10^{-5}$ mol/L respectivamente. Este último, resultó ligeramente menor que el reportado por Wovcha y col. para esta misma cepa ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/L). Estos autores sugieren la existencia de múltiples esteroide 1,2-deshidrogenasas cuyas cantidades relativas pueden variar al cambiar las condiciones de cultivo y que difieren en sus propiedades físicas y cinéticas, lo que puede ser la causa de esta diferencia.

Termoestabilidad

Los ensayos de termoestabilidad realizados entre 25 y 67 °C, empleando como sustrato el AD demostraron que después de 5 min de incubación a 47 °C la enzima retiene el 60 % de la actividad enzimática inicial. Además, que a 25 y 30 °C, no hay pérdida de actividad después de 1 h de incubación y que a 37 °C sólo pierde el 20 % de ella. Estos resultados concuerdan con los de Wovcha y colaboradores.¹

La representación semilogarítmica correspondiente (Fig. 2) muestra que a 47 °C se produce un cambio de pendiente en la recta de inactivación térmica obtenida. A 56 y 67 °C, después de 10 min de incubación no se observa este efecto porque se produce una pérdida total de actividad en poco tiempo (10 min aproximadamente). Este cambio en la pendiente pudiera estar relacionado con la presencia de más de una forma enzimática, es decir, que se producen al menos dos formas diferentes de la enzima. La existencia de dos actividades esteroide 1,2-deshidrogenasa ha sido reportada anteriormente para esta misma cepa.¹

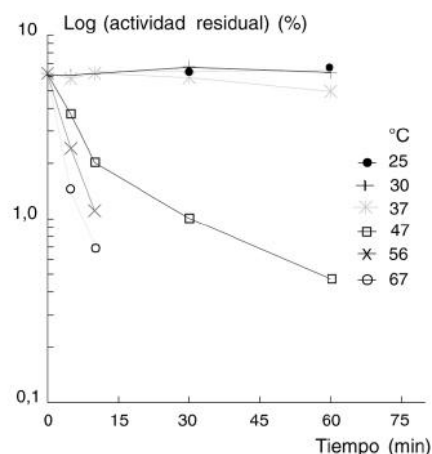


Fig. 2. Termoestabilidad de la esteroide 1,2-deshidrogenasa de *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842.

Para períodos de incubación más largos a temperaturas bajas (Fig. 3) se apreció una pérdida de 50 a 60 % de actividad en sólo 24 h más del 70 % a las 48 h a 3 °C. En general, al aumentar la temperatura, la actividad disminuye aún en condiciones de refrigeración, lo que dificulta la manipulación de la enzima en procesos que consuman más de 1-2 h.

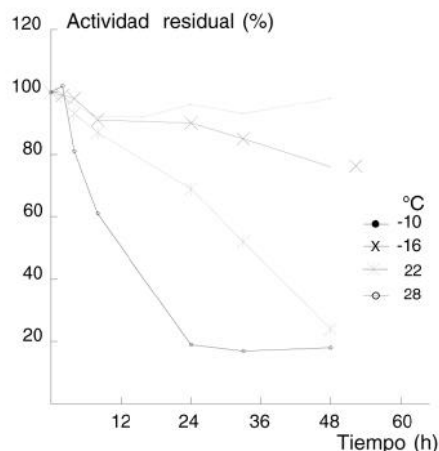


Fig. 3. Inactivación térmica de la esteroide 1,2-deshidrogenasa de *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842.

En presencia de agentes estabilizantes sólo se obtuvieron resultados positivos parciales con la AB, al retener la

muestra, un 20 % más de la actividad enzimática al cabo de 24 h de incubación a 23 °C (Fig. 4).

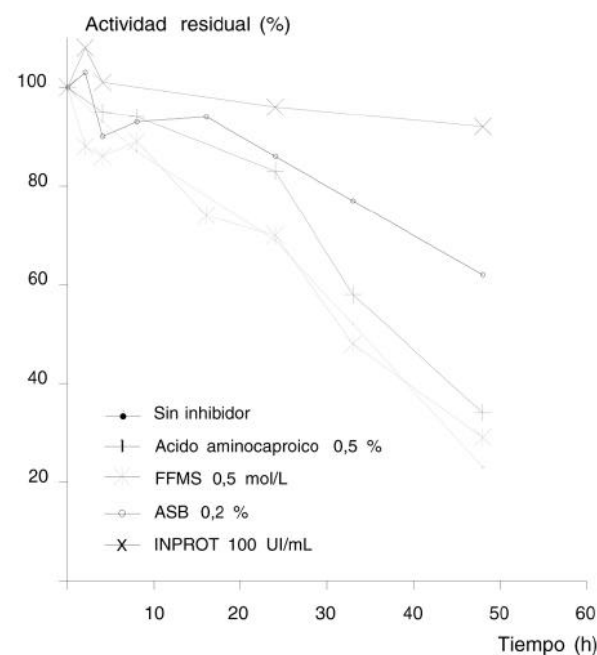


Fig. 4. Protección de la enzima a la actividad proteolítica por la adición de inhibidores de proteasas y agentes estabilizantes la esteroida 1,2-deshidrogenasa. Sustrato AD.

De los inhibidores de proteasas ensayados el único que resultó efectivo fue el INPROT, pues retuvo aproximadamente, el 90 % de la actividad después de 48 h de incubación (Fig. 4).

Este hecho indica que la disminución producida de la actividad enzimática durante el proceso de incubación, es consecuencia de una degradación proteolítica de la enzima.

Influencia de la temperatura sobre la velocidad de la reacción

La temperatura óptima para la reacción de la esteroida 1,2-deshidrogenasa con el AD fue de 23 °C (Fig. 5).

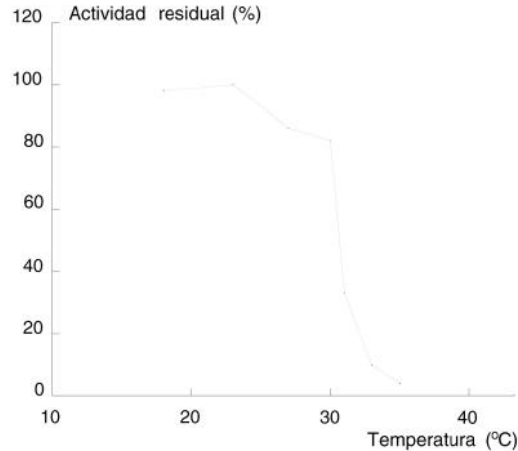


Fig. 5. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción enzimática de la esteroida 1,2-deshidrogenasa. Sustrato AD.

En enzimas procedentes de otros géneros y especies de bacterias, también se han encontrado temperaturas óptimas, las cuales han resultado más bien bajas: para *Nocardia rhodocrous* y *Nocardia opaca* IMET 7030 se reporta 30 °C y 28 °C respectivamente.³

Efecto de la concentración de iones H⁺ sobre la actividad enzimática

Manteniendo la temperatura constante (25 °C) se encontró que el pH óptimo aparente para esa reacción está entre 8,0 y 9,0 (Fig. 6). Este valor se encuentra en el mismo rango que el reportado para la esteroida 1,2-deshidrogenasa de *Pseudomonas testosteroni*⁷, es decir, en condiciones francamente alcalinas.

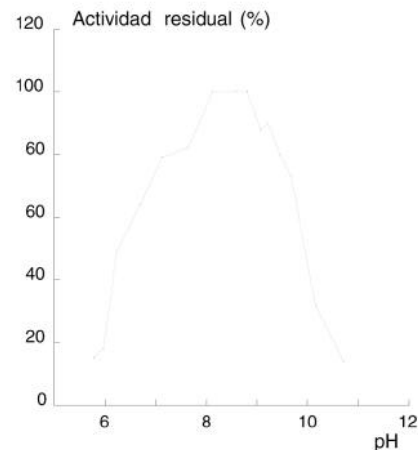


Fig. 6. Determinación del pH óptimo de la esteroida 1,2-deshidrogenasa. Sustrato AD.

Actividad esteroida 1,2-deshidrogenasa en presencia de inhibidores enzimáticos

La actividad resultó totalmente inhibida por Co²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Hg²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ y casi totalmente por Zn²⁺ (Tabla I).

TABLA I
Efecto de algunos iones e inhibidores sobre la actividad de la esteroida 1,2-deshidrogenasa

Compuesto	Inhibición (%)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	100
NiSO ₄ ·7H ₂ O	0
PbSO ₄	0
MgSO ₄	0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	100
MnSO ₄ ·H ₂ O	100
FeSO ₄ ·7H ₂ O	100
Fe ₂ (SO ₄) ₃	100
ZnSO ₄ ·H ₂ O	80
KCl	79
NaCl	0
HgCl ₂	100
αα-dipiridil	31
EDTA	0
KCN	0

El resto de los iones o sustancias probadas tuvo poco o ningún efecto sobre la enzima, entre ellos, algunos inhibidores enzimáticos universales como el cianuro de potasio y otras sustancias de alta afinidad por metales. El αα-dipiridil y el EDTA (agentes quelantes) no actuaron sobre la esteroida 1,2-deshidrogenasa.

El Hg²⁺, un ión con una alta afinidad por el azufre inactivó totalmente la enzima, lo que permite suponer que en la

estructura molecular de la proteína existen grupos SH o puentes disulfuros esenciales para su actividad enzimática.

CONCLUSIONES

Fue convenientemente caracterizada la esteroide 1,2-deshidrogenasa correspondiente a la cepa *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842

Se demostró que la albúmina de suero bovina actúa como un agente estabilizador de la actividad de esta enzima.

La pérdida de su actividad enzimática durante la incubación resulta una consecuencia directa de la degradación proteolítica que experimenta en esas condiciones.

Los iones Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} y Zn^{2+} , tienen un marcado efecto inhibidor de la actividad esteroide 1,2- deshidrogenasa.

Esta enzima presenta en su estructura molecular grupos SH o puentes disulfuros los cuales resultan esenciales para su actividad enzimática.

BIBLIOGRAFIA

1. Wovcha M., Brooks K.E. and nek L.A. **Biochim. Biophys. Acta**, **574**, 471, 1979.
 2. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farrand A.L. and dall R.J. **J. Biol. Chem.**, **193**, 265, 1951.
 3. Horhold C., Huller E. and Rose G. **Zeitsch. Allgem. Mikrobiol.**, **19**, 10, 731, 1979.
 4. Dixon M. and Webb E. **Enzymes**. Third Edition. Academic Press, New York, San Francisco. Chapter II, 18, 1979.
 5. Cyril-Long Ed. **Biochemist 's Handbook** Cap. I, D. Van Nostrand Company Inc., Princenton, 9-42, 1961.
 6. Yamane T., Nakatani H. and Sada E. **Biotechnol. Bioeng.**, **21**, 2133, 1979.
 7. Levy H.R. and Talalay P. **J. Biol. Chem.**, **234**, 2014, 1959.
-