

Agentes reductores en la formación de testosterona por *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 y *Saccharomyces cerevisiae* 196-2

Nury Llanes, Blanca Rosa Hung, Alina Falero, Celso Pérez, Belinda Aguila y Magdalena Fonseca.

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6990, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 30 de junio de 1999. Aceptado: 24 de diciembre de 1999.

Palabras clave: hidroquinona, ácido ascórbico, testosterona, *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683, *Saccharomyces cerevisiae* 196-2.
Key words: hydroquinone, ascorbic acid, testosterone, *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683, *Saccharomyces cerevisiae* 196-2.

RESUMEN. Muchos géneros de microorganismos, incluyendo *Mycobacterium*, *Arthobacter*, *Corynebacterium*, etc., son capaces de utilizar los esteroides como fuente de carbono. El empleo de varios mutantes degradadores de esteroides ha permitido la producción de androstanos de amplio interés tales como: 4-androsteno-3,17-diona (AD) y 1,4-androstadieno-3,17-diona (ADD). La reducción enzimática del AD y ADD ha sido encontrada no sólo en microorganismos, sino también, en células animales. La transformación de AD y ADD por *Saccharomyces cerevisiae* 196-2 y *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683, respectivamente rinde como producto final testosterona. Con el propósito de incrementar la formación de 17-hidroxiesteroides, se adicionó a la reacción hidroquinona y ácido ascórbico, como donantes externos de protones, a diferentes concentraciones: ácido ascórbico $4,83 \cdot 10^{-3}$ y $4,83 \cdot 10^{-4}$ mol/L e hidroquinona $5,0 \cdot 10^{-3}$ y $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Las reacciones fueron también realizadas en presencia de glucosa 2 %. El volumen total del sistema de reacción fue de 1 mL. Los tubos de ensayo fueron colocados en zaranda orbital a 115 r/min y 30 °C. Una vez transcurrida la reacción, cada muestra fue extraída con acetato de etilo y secada a temperatura ambiente. Finalmente, el residuo fue disuelto en metanol y analizado por cromatografía líquida de alta resolución a 254 nm. Tanto el ácido ascórbico como la hidroquinona ($5,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L) actuaron como activadores de las reacciones de reducción en ambas cepas. La glucosa tuvo un efecto sinérgico. Estos compuestos exógenos garantizaron el complejo activo enzima-cofactor asociado con una elevada concentración de NADH en la célula.

ABSTRACT. Many genera of microorganisms including *Mycobacterium*, *Arthobacter*, *Corynebacterium*, etc. are able to degrade steroids as sole carbon source. The use of various sterol degrading mutants has enabled the production of androstanes such as AD and ADD as intermediates widely employed for these purposes. The enzymatic reduction of AD and ADD to testosterone has been found not only in microorganisms but in animal cells. The transformation of 4-androstene-3,17-dione and 1,4-androstadiene-3,17-dione by *Saccharomyces cerevisiae* 196-2 and *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683, respectively renders testosterone as a final product. In order to raise the yield of 17-hydroxysteroids, hydroquinone and ascorbic acid were added as external proton donors at various concentrations: for ascorbic acid $4,83 \cdot 10^{-3}$ and $4,83 \cdot 10^{-4}$ mol/L and for hydroquinone $5,0 \cdot 10^{-3}$ and $5,0 \cdot 10^{-4}$ mol/L. The reactions were also carried out in the presence of glucose, 2 %. Reaction system total volume was 1 mL. Test tubes were placed in a rotatory shaker at 115 r/min and 30 °C. After the reaction time, each sample was extracted with ethyl acetate and dried at room temperature. Finally the residue was dissolved in methanol and analyzed by high performance liquid chromatography at 254 nm. Either ascorbic acid or hydroquinone ($5,0 \cdot 10^{-3}$ mol/L) performed as reduction reaction activators in both strains. These agents prevent oxidation reactions and increased the 17-oxidoreductase and 3-ketosteroid-1,2-dehydrogenase activities. Furthermore, glucose had a synergistic effect. These exogenous compounds promoted the enzyme-cofactor active complex associated with a high concentration of NADH in the cell.

INTRODUCCION

La testosterona es un compuesto que se forma como resultado de la reducción del grupo carbonilo ubicado en la posición 17 del anillo D del AD por la acción de la 17 β -hidroxiesteroide: NAD 17-óxido-reductasa (EC. 1.1.1.64) presente en microsomas de *Saccharomyces cerevisiae*.¹ Esta misma enzima en *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 garantiza la formación de testosterona a partir de colesterol y de una mezcla de fitosteroides de caña de azúcar.^{2,3} En este caso, el intermediario a partir del cual se forma el producto es el ADD, de manera tal que para la obtención de la testosterona no sólo es necesaria la reducción del grupo del C₁₇, sino también, la reducción de la insaturación en posición 1-2 del anillo A por la esteroide 1,2-desidrogenasa.

Los estudios cinéticos realizados a partir de estradiol-17 β -óxido-reductasa muestran que dicha enzima cataliza la formación del compuesto 17-OH mediante el mecanismo cinético de Theorell-Chance, conocido también como sistema Bi-Bi, en el cual, la enzima requiere de un cofactor, sin el cual, el sustrato manifiesta baja afinidad por la enzima.⁴

Estudios previos realizados en el laboratorio han demostrado el efecto positivo de los azúcares en la reducción tanto del AD como del ADD por ambas cepas. Estos azúcares participan como activadores según el mecanismo de regulación de las reacciones redox.⁵

El objetivo de este trabajo consistió en estudiar el papel de los agentes reductores tales como el ácido ascórbico, la hidroquinona y la glucosa en la reacción de formación de testosterona cuando se emplean células libres de *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 y *Saccharomyces cerevisiae* 196-2.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Se emplearon las cepas *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 y *Saccharomyces cerevisiae* 196-2.

Obtención de células libres

Las células de la bacteria y la levadura se obtuvieron según lo reportado por Llanes y col.⁶

Reacción de reducción

La reacción se realizó en disolución reguladora de fosfato de sodio 0.1 mol/L, pH 7. El volumen total de reacción fue 1 mL. Las concentraciones de células y sustrato añadidos fue (35 ± 3) mg/mL (peso seco) y 200 mg/mL, respectivamente. El sustrato empleado varió en dependencia del microorganismo biotransformante, siendo el AD para *Saccharomyces cerevisiae* 196-2 y el ADD para *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683. En todos los casos, el sustrato fue disuelto en metanol a una concentración final del disolvente del 1 %.

Los agentes reductores empleados fueron ácido ascórbico $4.83 \cdot 10^{-3}$ y $4.83 \cdot 10^{-4}$ mol/L e hidroquinona $5.09 \cdot 10^{-3}$ y $5.09 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Los casos en que se añadió glucosa fue al 2 %.

Todos los tubos de ensayos fueron colocados en una zaranda orbital a 115 r/min a 30 °C.

Los tiempos de reacción fueron 48 y 72 h para *Saccharomyces* y *Mycobacterium*, respectivamente. La reacción se detuvo por calor.

Extracción y determinación cuantitativa de los productos

A cada una de las muestras se le realizaron dos extracciones sucesivas de 2 mL de acetato de etilo. Posteriormente, se evaporaron a temperatura ambiente para su determinación cuantitativa por cromatografía de fase reversa. La detección se realizó por UV a una longitud de onda de 254 nm, empleando una mezcla de metanol-agua (65:35) a un flujo de 1.5 mL/min. La columna empleada fue RP-8 LiChroCART (125 x 4 mm). La calibración se realizó por factor de respuesta empleando disoluciones patrones de 0.1 mg/mL. El análisis se efectuó por el método del estándar interno, empleando 17 α -metil testosterona.

RESULTADOS Y DISCUSION

La presencia de agentes externos donantes de protones favorece las reacciones de reducción del AD y ADD formando como producto final AD y testosterona (Tabla 1). Tanto la hidroquinona a la mayor concentración estudiada como el ácido ascórbico en ambas concentraciones, incrementan la reducción del doble enlace Δ^1 (incremento de AD) como del grupo 17-ceto (incremento de testosterona). En todos los casos, se apreciaron diferencias significativas respecto al control.

En el caso de la hidroquinona $5.0 \cdot 10^{-4}$ mol/L, las reacciones de reducción no presentan diferencias significativas respecto al control, no ocurriendo así, con el ácido ascór-

bico. Estos dos agentes reductores a pequeñas concentraciones exhiben diferentes comportamientos. La hidroquinona ó 1,4-dihidroxibenceno, posee dos grupos hidroxilos libres mientras el ácido ascórbico posee cuatro de estos grupos, lo cual sugiere desigual capacidad reductora, traduciéndose, por lo tanto, en diferencias en cuanto a las concentraciones necesarias para que actúen activando las reacciones de reducción. Se evidencia la necesidad de mayores concentraciones de hidroquinona ($5.0 \cdot 10^{-3}$ mol/L) que de ácido ascórbico ($4.83 \cdot 10^{-4}$ mol/L) para alcanzar la mayor formación de sustrato reducido.

Tanto la esteroide 1,2 deshidrogenasa como la 17- β -óxido-reductasa son enzimas que precisan de un cofactor unido a ellas en estado reducido, capaz de donar electrones que finalmente son transferidos al sustrato oxidado. De manera tal que en la medida que se alcance con mayor rapidez el estado inicial enzima-cofactor, mas rápido transcurrirá también la reacción. En este caso, la regeneración del cofactor depende del agente exógeno añadido (Fig. 1).

Tanto el ácido ascórbico como la hidroquinona actúan como donantes naturales de electrones que pudieran estar acoplados a otro sistema que garantice su propia regeneración.

Al estudiar el efecto conjunto de la glucosa y los agentes reductores citados anteriormente, se pudo apreciar un efecto sinérgico entre la glucosa y cada uno de dichos agentes, lo cual se manifiesta en el incremento de las reacciones de reducción (Tabla 2).

En el caso de *Mycobacterium*, los mejores resultados se obtienen cuando se emplea como agente reductor

Tabla 1. Efecto de agentes reductores exógenos en las reacciones de formación de AD y testosterona por *Mycobacterium* B-3683 y *Saccharomyces cerevisiae* 196-2.

Agente reductor (mol/L)	AD		Testosterona		Total	
			(mg/mL)			
	Cepa					
	I	II	I	II	I	II
Control	40.4 $\pm$ 0.8	—	1.5 $\pm$ 0.2	19.3 $\pm$ 0.2	41.9 $\pm$ 0.3	19.3 $\pm$ 0.2
Acido ascórbico ($4.83 \cdot 10^{-3}$)	51.9 $\pm$ 1.7	—	6.1 $\pm$ 0.2	27.8 $\pm$ 0.9	58.0 $\pm$ 0.2	27.8 $\pm$ 0.9
Acido ascórbico ($4.83 \cdot 10^{-4}$)	58.4 $\pm$ 0.3	—	6.6 $\pm$ 0.2	39.3 $\pm$ 0.3	65.0 $\pm$ 0.3	39.3 $\pm$ 0.3
Hidroquinona ($5.0 \cdot 10^{-3}$)	52.7 $\pm$ 0.9	—	8.8 $\pm$ 0.3	62.2 $\pm$ 0.3	61.5 $\pm$ 0.4	62.2 $\pm$ 0.3
Hidroquinona ($5.0 \cdot 10^{-4}$)	36.7 $\pm$ 0.8	—	4.7 $\pm$ 0.3	15.5 $\pm$ 0.4	41.4 $\pm$ 0.2	15.5 $\pm$ 0.4

Cepa I: *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683.
Cepa II: *Saccharomyces cerevisiae* 196-2.

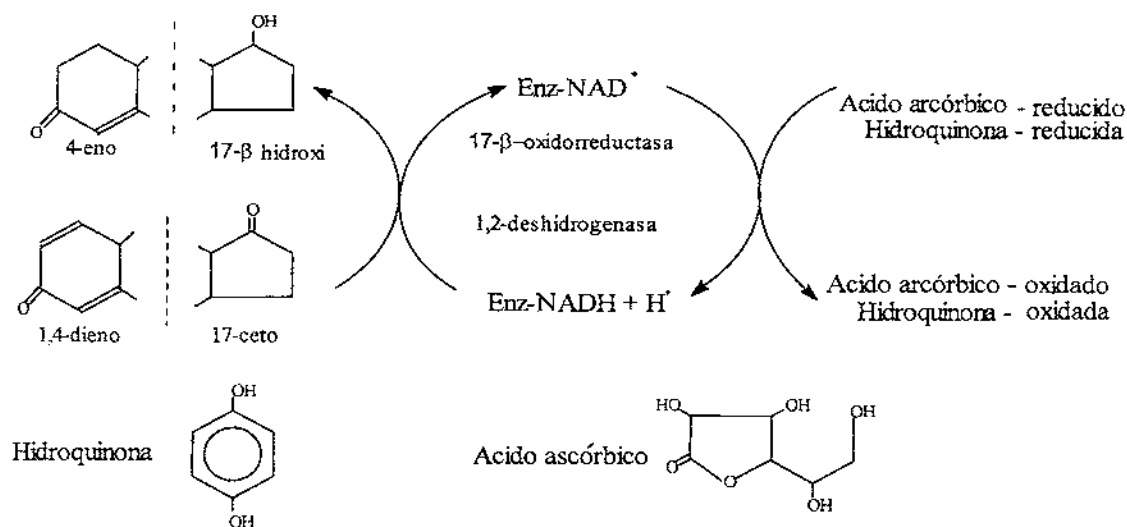


Fig 1. Mecanismo propuesto para la regeneración del complejo enzima-cofactor en las reacción de formación de testosterona.

Tabla 2. Efecto conjunto de los agentes exógenos (glucosa y agentes reductores) en las reacciones de reducción del AD y el ADD.

Cepas	Producto	Control				Glucosa	
		Agentes reductores		Glucosa			
		Acido ascórbico	Hidroquinona	Acido ascórbico	Hidroquinona	Acido ascórbico	Hidroquinona
<i>Mycobacterium</i> - NRRL B-3683	AD	27,8 ± 0,1	41,4 ± 0,5	38,9 ± 0,1	40,5 ± 0,2	47,9 ± 1,0	65,5 ± 0,7
	Testosterona	14,3 ± 0,2	30,0 ± 0,4	52,2 ± 0,3	39,2 ± 0,1	69,6 ± 0,2	76,1 ± 0,2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Testosterona	35,4 ± 0,1	47,2 ± 0,1	48,5 ± 0,2	45,7 ± 0,2	67,3 ± 0,3	

hidroquinona, lo que provoca una activación, tanto de la reacción de reducción 1-2 del anillo A como del grupo carbonilo del C₁₇. Para *Saccharomyces cerevisiae* 196-2, se aprecia similar efecto en la reacción de formación de testosterona, siendo superiores los resultados al compararlos con el control.

En las condiciones estudiadas los mejores resultados se obtienen al utilizar hidroquinona 5,0 · 10⁻³ mol/L en presencia de glucosa con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* 196-2. Precisamente, la glucosa potencia el efecto del agente reductor, lo cual hace pensar que este azúcar forma parte del sistema que garantiza la regeneración del cofactor oxidado. Al catabolizarse garantiza la concentración de NADH necesaria en la célula para que transcurran las reacciones de reducción de modo que aporta tanto el cofactor reducido directamente como garantiza a su vez,

los equivalentes necesarios por el ácido ascórbico oxidado e hidroquinona oxidada para su reducción.

CONCLUSIONES

En presencia de sustratos exógenos donantes de electrones, se produce un incremento en la formación de testosterona, como consecuencia de la activación de las reacciones de reducción, tanto del ADD como del AD por *Mycobacterium* sp. y *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente.

La presencia adicional de glucosa y agentes donantes de electrones, tales como ácido ascórbico o hidroquinona, garantiza el estado reducido del complejo enzima-sustrato.

BIBLIOGRAFIA

1. Singer Y.H., Shity H. and Bar R. Microbial transformation in a ciclodextrin medium. Part. 2. reduction of androstenedione to testosterone by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl.

Microbiol. Biotechnol., 35, 731, 1991.

2. Hung B.R., Falero A., Llanes N., y Pérez I. Testosterone as biotransformation product in steroid conversion by *Mycobacterium* sp. *Biotechnol. Lett.* 16, 497, 1994.
3. Ramírez M.A., Díaz M. y Pérez C. V Congreso de la Sociedad Cubana de Ciencias Farmacéuticas, Centro de Eventos Ortop, Frank Pais, 1993.
4. Llanes N., Falero A., Hung B., Pérez C., Aguila B. y Fong O. Efecto de los azúcares sobre la actividad 17-β hidroxisteroide deshidrogenasa de la cepa de levadura YSD196-2 inmovilizada en pectato de calcio. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 30, 87, 1999.
5. Gachock V.P. and Grytsay V.I. Kinetics model for the regulation of redox reactions in steroid transformation by *Arthrobacter globiformis* cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 668, 1989.
6. Llanes N., Hung B., Falero A., Pérez C. y Aguila B. Obtención de testosterona a partir de precursores esteroidales. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 28, 63, 1997.