



DEFINICIÓN DEL MECANISMO DE REACCIÓN CATALIZADA POR LAS PENICILINA ACILASAS DE *Mucor griseocyanus* y *Aspergillus fumigatus*

Liliana Domínguez Malfavón, Anna Ilyiná, Orlando Reyna F., José Luis Martínez Hdz.

Depto. Biotecnología Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Blvd. V. Carranza e Ing, José C. Valdés, Col. Republica. Saltillo Coahuila. Fax: (844) 4-15-53-92. Email: martin@usquim.uadec.mx.

Palabras clave: penicilina acilasa, hongos, mecanismo.

Introducción. La penicilina G acilasa (PG acilasa, EC 3.5.1.11) cataliza la hidrólisis de la penicilina G o V, produciendo el núcleo betalactámico (6-APA) y la correspondiente cadena lateral del ácido (1). La PG acilasa es usada para la producción de penicilinas semisintéticas vía 6-APA, por lo que se han realizado muchos esfuerzos para aislar y caracterizar la PG acilasa de diferentes fuentes con fines de aplicación industrial, llegándose a convertir en la actualidad en un foco de interés desde el punto de vista de la enzimología fundamental.

El objetivo del presente trabajo, es proponer un mecanismo cinético de reacción catalizada por las enzimas penicilina acilasas, así como determinar los parámetros cinéticos correspondientes al mecanismo establecido para dos fuentes nuevas de PG acilasa *M. griseocyanus* y *A. fumigatus*.

Metodología. La PG acilasa fue producida a partir *M. griseocyanus* y *A. fumigatus* en un proceso fermentativo descrito por Martínez *et al.*(2). Las células fueron separadas por centrifugación a 4°C y el crudo enzimático dializado. Para el ensayo enzimático se empleó la técnica descrita por Balasingham (3). La concentración de la enzima se determinó mediante la titulación con *fenilmetilsulfonil fluoruro* (FMSF) (3). La cinética de la hidrólisis enzimática, se estudió bajo un régimen estacionario en presencia del sustrato a concentraciones mucho mayores que la de la enzima ($S_0 \gg E_0$).

Resultados y discusión. Se conoce que la reacción catalizada por la PG acilasas de las fuentes estudiadas hasta la fecha, se lleva a cabo con la formación de un intermediario, acil-enzima, donde en varios casos la serina representa un papel importante en el mecanismo del proceso de acetilación de la enzima(3). Los resultados obtenidos comprueban que la reacción catalizada por las PG acilasas de *A. fumigatus* y *M. griseocyanus* se realiza mediante un proceso de acetilación ya que ambas enzimas demostraron una fuerte inhibición por el FMSF, lo que demuestra también la presencia de la serina en sus sitios activos.

En este estudio se observó que la hidrólisis de la PG acilasa de las fuentes en cuestión, es inhibida por altas concentraciones de sustrato, se demostró una inhibición no competitiva con el 6-APA y competitiva con el ácido fenilacético (AFA), que son los productos de la reacción de hidrólisis. La figura 1 muestra el mecanismo propuesto en base a los resultados obtenidos. Los parámetros cinéticos correspondientes al mecanismo propuesto por las enzimas de interés se se presentan en la Tabla 1.

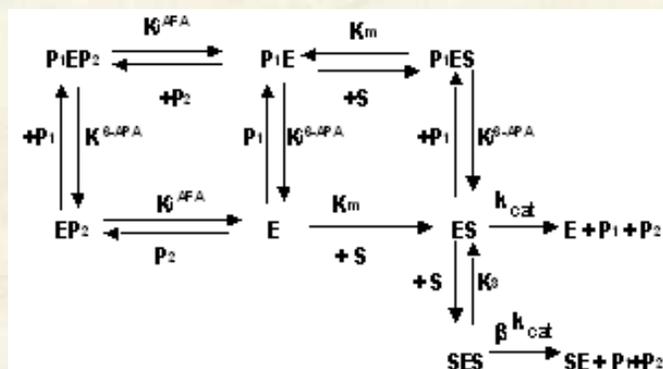


Fig. 1. Esquema cinético "mínimo" de la hidrólisis catalizada por la penicilina acilasa de fuentes fúngicas: E, penicilina acilasa; S, benzilpenicilina; SE, complejo enzima-sustrato; P₁ y P₂, productos de la hidrólisis enzimática (6-APA y ácido fenilacético). EP₁, EP₂, P₁EP₂, corresponden a complejos con los productos; SES, complejo (parcialmente activo) con dos moléculas del sustrato y enzima; P₁ES, complejo inactivo catalíticamente de la enzima con el sustrato y el ácido 6-aminopenicilánico.

Tabla 1. Parámetros cinéticos calculados para la reacción catalizadas por la penicilina acilasa de fuentes fúngicas.

| Fuente de la enzima | K _m mM | k _{cat} s ⁻¹ | K _s M | β | K _i ^{AFA} M | K _i ^{6-APA} M |
|-----------------------|----------------------|-------------------------------------|---------------------|-------|------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>A.fumigatus</i> | 5.94 | 0.094 | 1.94E-03 | 0.031 | -- | -- |
| <i>M.griseocyanus</i> | 2.80 | 0.247 | 0.018E-03 | 0.197 | 6.7E-09 | 5.0E-08 |

La comparación de estos parámetros con los reportados en la literatura para otras fuentes permite por lo tanto demostrar una buena perspectiva de su uso en procesos biotecnológicos para la síntesis de antibióticos β-lactámicos

Conclusiones. Se logró proponer el mecanismo de hidrólisis de penicilina G en la reacción catalizada por las enzimas de *A. fumigatus* y *M. griseocyanus*. Además, se determinaron los parámetros cinéticos correspondientes al mecanismo propuesto, los cuales se encuentran dentro del intervalo de los reportados para otras penicilina acilasas (3).

Bibliografía.

- Alvaro G., *et al* (1992). Penicillin G Acylase from *Kluyvera citrophila* New Choice As Industrial Enzyme. *Biotechnology Letters*. 14: 285-290
- Martínez H. J.L., Ilyiná A., *et al.* (2003) Partial characterization of penicillin acylase from fungi *Aspergillus fumigatus* and *Mucor griseocyanus*. *Moscu University Bolletín, chemical serie 1*: 53-56
- Svedas V., Guranda D. Langen L., Rantwijk F., Sheldon R. (1997) Kinetic study of penicillin acylase from *Alcaligenes faecalis*. *FEBS Letters*, 417: 414-18