

# PRODUCCIÓN DE Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA PARCIAL DE PENICILINA ACILASA DE *Mucor griseocyanus* Y *Aspergillus fumigatus*

Martínez Hernández J.L., Iliyná A., Domínguez M. L., Dustet M. J. C\*.

Dpto. Biotecnología, Fac. de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.

\*Dpto. de Biotecnología. Fac. de Ingeniería Química. ISPJAE. Ciudad de la Habana, Cuba.

E-mail: hernan70@terra.com.mx

*Palabras clave:* penicilina acilasa, 6-APA, hongos filamentosos

**Introducción.** La penicilina G acilasa (PGA), es una de las enzimas industriales más importantes, usada para hidrolizar la penicilina G y obtener ácido 6-APA, clave en la manufactura de penicilinas semisintéticas. (1,2). Se ha demostrado que los hongos filamentosos, producen y secretan al medio PGA con actividad sobre las penicilinas naturales. Actualmente se han incrementado las investigaciones para aislar nuevos biocatalizadores de diferentes fuentes, con un marcado interés en la PGA de hongos filamentosos. Más del 60% del 6-APA producido en el mundo usa la ruta enzimática, de ahí la importancia.

Los objetivos del trabajo son: estudiar la influencia diferentes medios de cultivo en las cepas de hongos para la obtención de penicilina acilasa, así como, realizar el estudio cinético parcial.

**Metodología.** Las cepas de microorganismos fueron caracterizadas en el ICIDCA y crecidas aeróbicamente bajo condiciones sumergidas, empleando medios con diferentes fuentes de energía: medio con glucosa 2% (I) y leche descremada (II) a H 6.8 (2). La actividad penicilina se determinó por el método propuesto por Balasingham y col 1972(3). El inductor penicilina G se adicionó al medio de cultivo al 0.5 g/L a las 24 h de fermentación. La caracterización cinética, involucró el estudio de valores óptimos de pH y temperatura y la relación tiempo-actividad. Los valores de las constantes cinéticas fueron determinados ensayando la hidrólisis de penicilina G, bajo condiciones estándares de reacción.

**Resultados y discusión.** Las cepas de *M. griseocyanus* y *A. fumigatus*, presentaron niveles de actividad penicilina acilasa mayores cuando crecieron sobre leche descremada, una importante observación es la relación no muy clara entre el crecimiento celular y los niveles enzimáticos (3). Sin embargo, es claro que el medio de cultivo favorece la producción de enzima (2).

Tabla 1. Expresión de PA en medios con sacarosa (I) y leche descremada (II).

Microorganismo	Medio I	Medio II
<i>A. fumigatus</i>	0.039	0.110
<i>M.griseocyanus</i>	0.045	0.11

La enzima obtenida de *A. fumigatus* y *M. griseocyanus*, mostraron tener un pH máximo de actividad a 7.5 y de 8.0-8.5 respectivamente. La temperatura para la máxima actividad fue de 40 °C para la enzima de *A. fumigatus* y 35

°C, para *M. griseocyanus*. La preparación enzimática dializada de *A. fumigatus* y *M. griseocyanus* mostraron una relación lineal tiempo-actividad durante 20 minutos, y posteriormente alcanzando una meseta, que puede ser usado para calcular el valor inicial y la actividad de las preparaciones. En este trabajo, se demostró que PGA era la enzima responsable de la actividad hidrolítica. Se determinó por lo tanto, el efecto de diferentes concentraciones del inhibidor fenil metil sulfonil fluoruro (FMSF) observando una inactivación de la PGA que toma lugar en pocos minutos (8 min), a concentraciones equimolares de FMSF y la adición de FMSF inhibe la actividad acilasa a 25°C de temperatura y disminuye, aproximadamente un 50% a 12 y 18 µM respectivamente. La tabla 2 muestran los valores de  $K_m$ ,  $K_{cat}$  y  $V_{max}$ .

Tabla 2. Parámetros cinéticos determinados Para la hidrólisis de la penicilina G.

Microorganismo	$K_{cat}$ , S <sup>-1</sup>	$K_m$ , M	$V_{max}$ , Min
<i>A.fumigatus</i>	99	$1.45 \times 10^{-07}$	$3.66 \times 10^{-05}$
<i>M.griseocyanus</i>	54	$1.77 \times 10^{-07}$	$3.28 \times 10^{-05}$

**Conclusiones.** En nuestro conocimiento, el trabajo actual es el primer reporte de estos microorganismos que produce PGA empleando leche descremada como fuente de nutrientes y es importante continuar estudiando estos microorganismos que presenta grandes perspectivas en la biotecnología fúngica.

## Bibliografía.

- Torres R, Ramón F, de la Mata, Acebal C, Castellón MP. (1999). Enhanced production of penicillin V acylase from *Streptomyces lavandulae*. *Appl Microbiol Biotech.* 53:81-84
- Martínez JL, Hernández JO, Dustet JC, Sánchez O, Iliyná A. (2002). Determinación de la producción de penicilina acilasa en hongos filamentosos empleando diferentes medios de cultivo e inductores. *Revista ICIDCA sobre los derivados* 36 (3):21-26
- Balasingham K, Warburton D, Dunnill P, Lilly D. (1972) The isolation and kinetics of penicillin amidase from *E. Coli* *Biochim Biophys Acta.* 270:250-256

