

REQUERIMIENTO DE FOSFATO DE PIRIDOXAL PARA LA ACTIVIDAD ISOPENICILINA N EPIMERASA DE *Nocardia lactamdurans*

L. Láziz, P. Liras y J.F. Martín

Area de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de León.

Isopenicilina N epimerasa (IPNE), actividad enzimática encargada de isomerizar la cadena lateral de isopenicilina N de forma L a D en la ruta biosintética de cefamicina C en *Nocardia lactamdurans*, requiere fosfato de piridoxal (PP) como estabilizador. El efecto estabilizador de PP es bien conocido en el caso de las racemasas de aminoácidos que catalizan reacciones de síntesis de la pared celular (1,2). En nuestro caso, la actividad enzimática IPNE era indetectable después de tres días a -70°C en ausencia de PP, pero se mantenía constante incluso después de 30 días a -70°C en presencia de 0.05mM PP. Por ello se empleó rutinariamente PP para conseguir la purificación de la enzima. Con el fin de determinar si el PP es también necesario para la actividad IPNE, se incubó la enzima durante 30 min a 25°C con borohidruro sódico (BH₂Na), un compuesto inhibidor de la actividad de enzimas dependientes de PP (3), y con antagonistas de PP: hidroxilamina, D-cicloserina e isoniazida. Después del tratamiento con borohidruro (1mM) permanecía el 53.5% de la actividad enzimática y aumentó hasta el 75% de la inicial al añadir PP a la mezcla de reacción. Al aumentar la concentración de borohidruro (5mM) tuvo lugar una pérdida de actividad casi total que se restauró hasta el 44.2% al adicionar PP. Esta recuperación por PP no se consiguió cuando se emplearon concentraciones más altas de borohidruro (hasta 10mM) pues se perdía la actividad de modo irreversible. No se observó pérdida de actividad con otros antagonistas de PP. Los resultados indican que PP está fuertemente unido a la enzima puesto que ésta se inactiva por acción de borohidruro, pero ni isoniazida ni D-cicloserina antagonizan significativamente a dicho PP. Por otra parte, la recuperación parcial de la inhibición causada por borohidruro mediante adición de PP a la mezcla de reacción, sugiere que este último compuesto puede actuar como un cofactor de IPNE.

(1) Adams, E.(1976). Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. **44**:69 -138.

(2) Esaki, N. and Welsh, C.T.(1986). Biochemistry **25**:3261-3267.

(3) Snell, E.E. and Di Mari, S.J.(1970). The Enzymes, vol. Kinetics and Mechanisms, pp.335-337. Ed. P.D.Boyer, New York: Academic Press.