

BIOSINTESIS DE PENICILINA POR *Penicillium chrysogenum*.

REGULACION POR LA FUENTE DE CARBONO.

Emilio Alvarez y Leonila Láiz

Introducción

La ruta de biosíntesis de la penicilina por *P. chrysogenum* es un proceso que consta de tres etapas claramente diferenciadas. La primera de ellas consiste en la unión secuencial de los aminoácidos L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina para formar el tripéptido lineal δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV). La biosíntesis "in vitro" del tripéptido ACV se lleva a cabo mediante la activación de cada aminoácido con el concurso de ATP e iones magnesio. La reacción está catalizada por la enzima ACV sintetasa, una proteína de alto peso molecular cuyas características enzimáticas aún no están completamente establecidas.

El siguiente paso de la ruta biosintética de la penicilina consiste en la ciclación del tripéptido ACV, proceso que origina la molécula de la isopenicilina N. La isopenicilina N es el primer compuesto de esta ruta biosintética que tiene actividad antibiótica. La ciclación del ACV es una reacción oxidativa durante la cual se produce la pérdida de cuatro átomos de hidrógeno por cada molécula de tripéptido. Como consecuencia de esta reacción se forman dos anillos característicos de las penicilinas: un anillo β -lactámico y un anillo tiazolidínico.

El proceso de ciclación del ACV está catalizado por la enzima isopenicilina N sintasa o ciclasa. Las características de esta enzima, a diferencia de lo que ocurre con la mencionada anteriormente, se conocen con bastante detalle. Hasta la fecha se han estudiado las ciclasas de bastantes especies de microorganismos productores de antibióticos β -lactámicos (*Penicillium*, *Cephalosporium*, *Streptomyces*) y se han clonado los genes que codifican para dichas proteínas (2).

La última de las etapas de la ruta de biosíntesis de la penicilina consiste en el intercambio de la cadena lateral de la isopenicilina N (ácido α -aminoadípico) por el ácido fenilacético, molécula que se añade al medio de cultivo en calidad de precursor de la penicilina. La reacción enzimática se lleva a cabo "in vitro" en presencia de isopenicilina N y de fenilacetil-coenzima A (una forma activada del ácido fenilacético). Esta reacción está catalizada por la enzima acil-coenzima A:isopenicilina N aciltransferasa (1). La penicilina puede ser sintetizada asimismo por acilación directa del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) mediante el concurso de la enzima aciltransferasa y del fenilacetil-coenzima A. La enzima aciltransferasa es capaz de hidrolizar la isopenicilina N, en ausencia de fenilacetil-coenzima A, y también muestra actividad hidrolítica frente a diversas penicilinas, liberando la cadena lateral y el núcleo de la penicilina (6-APA).

Desde hace bastante tiempo se conoce el efecto que ejerce la fuente de carbono presente en el medio de cultivo sobre la producción de distintos metabolitos secundarios, y concretamente de los antibióticos. Este efecto, conocido como regulación catabólica, está presente de una forma patente en el caso de la biosíntesis de la penicilina. La fuente de carbono utilizada habitualmente en los cultivos encaminados a la producción de penicilina es la lactosa, azúcar que no presenta el efecto antes descrito. Cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono se produce una drástica disminución de la biosíntesis de penicilina.

El mecanismo molecular de la regulación catabólica aún no está completamente dilucidado. Se ha observado que la presencia de glucosa en el medio de cultivo reprime la síntesis del tripéptido ACV y de la isopenicilina N sintasa, pero no de la enzima aciltransferasa (3).

Objetivo

El objetivo de esta práctica es el estudio del efecto de regulación catabólica de la producción de penicilina. Dicho efecto se hace patente mediante la comparación de la producción de penicilina que se obtiene en un medio de cultivo apropiado y en un medio de cultivo que contiene glucosa como fuente de carbono. Asimismo se pretende estudiar el efecto de la adición al medio de cultivo de un precursor de la cadena lateral de la penicilina (ácido fenilacético) sobre la producción de dicho antibiótico.

Protocolo

Día 1

Inóculo de matraces que contienen medio complejo de producción de penicilina (MCP), normal o con diversas modificaciones en su composición: medio con lactosa, medio con glucosa y medio con lactosa y sin ácido fenilacético. Toma de muestras a 0 horas de cultivo. Incubación a 25°C.

Día 2

Toma de muestras a las 24 horas de cultivo.

Día 3

Toma de muestras a las 48 horas de cultivo.

Día 4

Toma de muestras a las 72 horas de cultivo.

La concentración de penicilina en las muestras recogidas durante las primeras 72 horas de cultivo se determina mediante bioensayo de las mismas, utilizando *Bacillus subtilis* como microorganismo de referencia. El bioensayo se lleva a cabo depositando 60 µl de cada muestra en pocillos realizados en placas de medio sólido (TSA al 1 %) inoculadas con el microorganismo sensible.

Día 5

Análisis de los resultados obtenidos en el bioensayo del día precedente.

Apéndice

Medio de cultivo MCP

Pharmamedia, 20 g; Carbonato cálcico, 5 g; Sulfato amónico, 4 g; Lactosa, 50 g; Acido fenilacético, 4 g.

Preparación de las placas de bioensayo

100 ml de TSA al 1 % se funden y se dejan enfriar hasta una temperatura de 45°C. A continuación se inoculan con 100 μ l de una suspensión de esporas de *B. subtilis*. El medio se reparte en placas de Petri con 15 ml por placa y se deja solidificar. Una vez solidificado el agar se procede a la realización de los pocillos mediante un sacabocados.

Bibliografía

1. Alvarez E, Cantoral JM, Barredo JL, Díez B, Martín JF. Purification to homogeneity and characterization of acyl coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. *Antimicrob Agents Chemother* 31, 1675-1682. 1987.
2. Ramos FR, López-Nieto JM, Martín JF. Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valine to isopenicillin N. *Antimicrob Agents Chemother* 27, 380-387. 1985.
3. Revilla G, Ramos FR, López-Nieto JM, Alvarez E, Martín JF. Glucose represses formation of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valine and isopenicillin N synthase but not penicillin acyltransferase in *Penicillium chrysogenum*. *J Bacteriol* 168, 947-952. 1986.