

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS
SUPERIORES DE MONTERREY
CAMPUS MONTERREY**

**DIVISION DE AGRICULTURA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE GRADUADOS EN AGRICULTURA**



**OBTENCION DE CEFALOSPORINA C A PARTIR DE
DIACETILCEFALOSPORINA C CATALIZADA POR LA
O-ACETILTRANSFERASA DE *Acremonium chrysogenum***

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

POR

MARCELA JUAREZ HERNANDEZ

JUNIO DE 1999

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

CAMPUS MONTERREY

DIVISIÓN DE AGRICULTURA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE GRADUADOS EN AGRICULTURA



OBTENCIÓN DE CEFALOSPORINA C A PARTIR DE DIACETILCEFALOSPORINA C
CATALIZADA POR LA O-ACETILTRANSFERASA DE *Acremonium chrysogenum*

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOTECNOLOGÍA

POR

MARCELA JUÁREZ HERNÁNDEZ

JUNIO 1999

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Lara y Parra[†] por ayudarme a comprender que nuestra presencia en ésta vida no es más que una fase transitoria en búsqueda de la perfección del universo y del individuo.

Al Dr. Marco Antonio Báez Vásquez por fungir como mi asesor y navegar conmigo en ésta travesía llamada tesis.

Al Professor Arnold L. Demain por el apoyo y confianza depositada.

Al Dr. Jorge Romero García por su participación en el desarrollo del proyecto y sus palabras de apoyo cuando los resultados no eran los esperados.

Al Dr. Juan Manuel de la Fuente Martínez por su amable disposición.

Al Dr. Eleazar Reyes Barraza por el apoyo brindado durante el desarrollo de la tesis.

A los doctores Rogelio Rodríguez Sotres, Saul Wolfe, Rosamaría López-Franco, Marco A. Rito Palomares, así como al Dr. Moreno (Antibióticos, S. A.) y a la Maestra Marta Morgado M. por su valiosa colaboración durante el desarrollo y conclusión del presente trabajo.

Al Dr. Enrique Aranda Herrera y a su esposa por todas sus atenciones.

A Miguel A. Méndez R. por encontrar la frase adecuada incitándome a continuar en esas largas noches de desvelo y desesperación que parecían interminables.

A los jóvenes científicos que depositaron en mi su confianza y amistad motivándome en la iniciación de ésta aventura: Miguel A. Méndez R., Argelia Olivos G., Omar D. Muñoz M., Gloria Aguilar C., Enrique García P., Guillermina Ríos C., Julio Hernández D., Sonia Sánchez, Orlando Avila P., Mónica Cerro, Gustavo Cruz, Hebe M. Vanegas F., Gabriel E. Cuevas, Mara Bello R., Jaime C. Sampedro, Luz Ma. Martínez A., Jesús Sandoval R.

A J. Alejandro Negrete V. por su valiosa labor como amigo e instructor.

A mis amigos por su incesante apoyo: Margarita Serrano T., Bonifacio Vásquez M., Rocío Martínez M., Octavio Padilla C., Silvia Rodríguez S., Bernard Manríquez C., Ledy S. Ramírez G., Francisco Aguilar Z., Rosalba Carrillo R., José Juan Hernández M., Clara Luz Lopezlena M., Carlos Santacruz O., Trinidad Pluma A., José de Jesús Carrasco C., A. Laura Germán P., Mario E. Padilla M., Tania Zárate, Jesús A. Rocha E., Lilian G. Valencia T., Manuel G. Alvarez C., Claudia E. Solano C., Bernardo Cárdenas S., Gilda L. Mena B., Antonio Avilés M., Diana A. Urias L., Eduardo Rabadán C., Tania M. González H., Fernando A. Bovio O., Arlette Audiffred H., Santiago E. Veytia P., Imilla I. Arias O., Pavel A. Albores B., Mónica S. Nárvaes R., Víctor H. Ruiz D., I. Analí Gámez E., J. Leonardo Carrasco A., Francisco J. Verdugo M., Rubén M. González I., Francisco Guevara C.

A los presentes y a los ausentes, a los vivos y a los que se adelantaron en el viaje[†], a los que me brindaron su ayuda y a los que no lo hicieron, a todos los que hé nombrado y a los que por traición de la memoria hé omitido, a mis profesores y a mis maestros, a mis amigos y a los que no lo son. Así como a todos los miembros del Centro de Biotecnología: profesores, personal administrativo, auxiliares y estudiantes de la Maestría.
Finalmente para todos

MIL GRACIAS POR ACOMPAÑARME EN TODO MOMENTO

MARCELA

DEDICATORIA

Al divino maestro por concederme la gracia de existir y compartirme sus sabias enseñanzas.

A mi mamá por todas las noches de desvelo y preocupación que ha pasado, por su infinita ternura y su inmensurable paciencia.

A mi papá por su incesante entusiasmo hacia la superación.

A mi hermano Urbano por forjar mi carácter y apoyarme en todo momento.

A mi hermano Pedro por transmitirme sus conocimientos y por las reminiscencias de la infancia.

A mis sobrinitos: Eder, Rosa Oliva, Aldhair e Hirvana por permitirme disfrutar a su lado de una segunda infancia.

A mis cuñadas: Rosalba y Mayra por todos los momentos compartidos.

A todos los caídos en defensa de sus ideales con la ilusión de vislumbrar un horizonte de libertad y respeto para todos los individuos, a los jóvenes idealistas y soñadores ansiosos por expresar sus inquietudes en la tribuna y constituir parte del cambio exigido por la sociedad.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|--|--------|
| Capítulo uno..... | 1 |
| Introducción..... | 1 |
| 1.1 Distribución de los antibióticos β -lactámicos..... | 1 |
| 1.1.2 Características químicas de los compuestos β -lactámicos..... | 1 |
| 1.2 Penicilinas..... | 1 |
| 1.3 Cefalosporinas..... | 2 |
| 1.3.1 Estructura y química de la cefalosporina..... | 2 |
| 1.4 Clasificación de los antibióticos β -lactámicos..... | 3 |
| 1.4.1 Tipo <i>Penicillium</i> | 4 |
| 1.4.2 Tipo <i>Cephalosporium</i> | 4 |
| 1.5 <i>Cephalosporium acremonium</i> | 4 |
| 1.5.1 Morfogénesis en <i>Acremonium chrysogenum</i> | 5 |
| 1.5.2 Biosíntesis de cefalosporina C..... | 6 |
| 1.5.3 Regulación de la biosíntesis..... | 7 |
| 1.5.3.1 Regulación por la fuente de carbono..... | 7 |
| 1.5.3.2 Regulación por la fuente de nitrógeno..... | 7 |
| 1.5.3.3 Regulación por la fuente de fosfato..... | 7 |
| 1.5.3.4 Regulación por metionina..... | 9 |
| 1.6 Conversión de DAC a CC..... | 9 |
| 1.6.1 Reacción..... | 9 |
| 1.6.1.2 Características de la ACT..... | 9 |
| 1.6.1.3 Características del gen <i>cef G</i> | 11 |
| 1.7 Biocatálisis..... | 11 |
| 1.7.1 Biocatálisis y finanzas..... | 12 |
| 1.7.1.1 Criterios para realizar la selección del sistema..... | 13 |
| 1.7.1.2 Aplicación de la biocatálisis a la manufactura industrial de moléculas quirales..... | 14 |
| 1.7.1.3 Enzimas inmovilizadas definición y clasificación..... | 15 |
| 1.7.1.3.1 Selección del acarreador..... | 15 |
| 1.7.1.3.2 Métodos de inmovilización..... | 16 |
| 1.7.1.4 Ventajas y desventajas de la inmovilización..... | 16 |
| 1.7.1.5 Aplicaciones prácticas de las enzimas inmovilizadas..... | 17 |
| 1.7.1.6 Factores que afectan su aplicación industrial..... | 17 |
| 1.7.1.7 Utilización de las enzimas en síntesis orgánica..... | 17 |
| CAPÍTULO DOS..... | 20 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 20 |
| 2.1 Reactivos..... | 20 |
| 2.1.2 Equipo..... | 20 |
| 2.1.3 Cultivo..... | 20 |
| 2.2 Parte experimental..... | 21 |
| 2.2.1 Propagación de <i>Acremonium chrysogenum</i> | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.1.1 Agar papa-dextrosa (PDA) | 21 |
| 2.2.1.2 Medio para crecimiento de hongos imperfectos (MCHI) | 21 |
| 2.2.1.3 Medio YM | 21 |
| 2.2.1.4 Agar de Sabouraud | 21 |
| 2.2.1.5 Agar para placas | 21 |
| 2.2.2 Preparación del medio semilla No. 1 | 21 |
| 2.2.3 Preparación del medio de fermentación definido | 22 |
| 2.2.3.1 Crecimiento | 22 |
| 2.2.4 Condiciones para el análisis por HPLC | 22 |
| 2.2.5 Niveles de cefalosporina C | 22 |
| 2.2.6 Preparación de extractos | 22 |
| 2.2.6.1 Concentración de proteína | 23 |
| 2.2.7 Inmovilización | 23 |
| 2.2.7.1 Inmovilización con alginato | 23 |
| 2.2.7.1.1 Ciclos de reutilización con alginato | 23 |
| 2.2.7.2 Inmovilización con agarosa | 24 |
| 2.2.7.3 Inmovilización con poliacrilamida | 24 |
| 2.2.8 Ensayo de actividad de la acetiltransferasa | 24 |
| 2.2.8.1 Caracterización del sistema libre | 24 |
| 2.2.8.2 Caracterización de los sistemas inmovilizados | 24 |
| 2.2.9 Análisis microscópico | 25 |
| CAPÍTULO TRES | 26 |
| RESULTADOS | 26 |
| 3.1 Propagación de <i>Acremonium chrysogenum</i> | 26 |
| 3.2 Fermentación | 29 |
| 3.2.1 Niveles de biomasa | 30 |
| 3.2.2 Niveles de cefalosporina C | 31 |
| 3.3 Ensayos enzimáticos | 32 |
| 3.3.1.1 Selección del nivel óptimo de proteína | 32 |
| 3.3.1.2 Selección de la concentración de sustrato | 35 |
| 3.3.1.3 Perfil de la ACT en el sistema libre | 38 |
| 3.3.2 Inmovilización: análisis preliminares | 39 |
| 3.3.2.1 Perfil de la actividad enzimática inmovilizada en alginato | 40 |
| 3.3.2.2 Perfil de la enzima inmovilizada en agarosa | 41 |
| 3.3.2.3 Perfil de la enzima inmovilizada en poliacrilamida | 42 |
| 3.3.4 Análisis del sistema inmovilizado | 43 |
| 3.3.5 Ciclos de reutilización del sistema inmovilizado | 44 |
| CAPÍTULO CUATRO | 46 |
| DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 46 |
| CAPÍTULO CINCO | 52 |
| CONCLUSIONES | 52 |
| CAPÍTULO SEIS | 53 |
| RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIÓN FUTURA | 53 |

REFERENCIAS.....54

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|------------|---|
| Figura 1. | Estructura química de la cefalosporina 3 |
| Figura 2. | Sistemas anulares de la penicilina y la cefalosporina 4 |
| Figura 3. | Hifas de <i>Acremonium chrysogenum</i> 5 |
| Figura 4. | Ruta de biosíntesis de la CC en <i>Acremonium chrysogenum</i> 8 |
| Figura 5. | Reacción catalizada por la diacetilcefalosporina C:O-acetiltransferasa 10 |
| Figura 6. | Representación de la acetiltransferasa 10 |
| Figura 7. | Árbol de decisión de la biocatálisis 12 |
| Figura 8. | Clasificación de las enzimas inmovilizadas 15 |
| Figura 9. | Clasificación de los métodos de inmovilización 16 |
| Figura 10. | Caja de <i>Acremonium chrysogenum</i> en agar para placas 27 |
| Figura 11. | Micrografía del micelio de <i>Acremonium chrysogenum</i> 28 |
| Figura 12. | Niveles de biomasa 30 |
| Figura 13. | Niveles de cefalosporina C 31 |
| Figura 14. | Niveles de cefalosporina C con diferentes concentraciones de proteína 33 |
| Figura 15. | Porcentajes de conversión de cefalosporina C con proteína variable 34 |
| Figura 16. | Niveles de CC con diferentes concentraciones de sustrato 35 |
| Figura 17. | Porcentajes de conversión de cefalosporina C con sustrato variable 36 |
| Figura 18. | Gráfica de Lineweaver-Burk 37 |
| Figura 19. | Perfil enzimático en el sistema libre 38 |
| Figura 20. | Perfil de la ACT en el sistema inmovilizado con alginato 40 |
| Figura 21. | Perfil de la ACT en el sistema inmovilizado con agarosa 41 |
| Figura 22. | Perfil de la ACT en el sistema inmovilizado con poliacrilamida 42 |
| Figura 23. | Perfil enzimático en los ciclos de utilización con alginato 44 |
| Figura 24. | Porcentaje de conversión en los ciclos de utilización del alginato 45 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | Página |
|----------|--|--------|
| Tabla 1. | Aplicación de las enzimas inmovilizadas a los procesos químicos | 18 |
| Tabla 2. | Medios de cultivo utilizados para la propagación y activación de <i>Acremonium chrysogenum</i> | 26 |
| Tabla 3. | Características morfológicas de <i>Acremonium chrysogenum</i> en agar para placas | 27 |
| Tabla 4. | Niveles de cefalosporina C y porcentajes de conversión con diferentes concentraciones de sustrato | 35 |
| Tabla 5. | Porcentajes de conversión y niveles de CC al realizar la inmovilización de extracto en tres variantes diferentes en alginato | 37 |
| Tabla 6. | Niveles de CC y porcentajes de conversión al realizar la inmovilización de extracto con tres variantes | 39 |
| Tabla 7. | Niveles de CC y porcentajes de conversión de los diferentes soportes utilizados para la inmovilización | 43 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | | Página |
|--------------|---|--------|
| Anexo uno | Curva de Calibración de Bradford | 58 |
| Anexo dos | Curva de Calibración para cefalosporina C | 59 |
| Anexo tres | Secuencia de la ACT | 60 |
| Anexo cuatro | Esfera de alginato | 61 |
| Anexo cinco | Esferas de agarosa | 62 |
| Anexo seis | Gel de poliacrilamida | 63 |
| Anexo siete | Medios de cultivo | 64 |
| Anexo ocho | Niveles de productividad | 65 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| LLD-ACV | LLD-acetilcisteinilvalina |
| ACVS | Acetilcisteinilvalinil sintetasa |
| AcCoA | Acetilcoenzima A |
| ACT | Acetiltransferasa |
| D-Aaa | D- α -aminoadipil |
| 7-ACA | Ácido 7-aminocefalosporánico |
| 7-ADCA | Ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico |
| 6-APA | Ácido 6-aminopenicilánico |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AMP | Adenosin monofosfato |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| atm | Atmósfera |
| BSA | Bovin serum albumine |
| CC | Cefalosporina C |
| Kcat | Constante de catálisis |
| Km | Constante de Michaelis |
| CSTR | Continuous stirred tank reactors |
| DAC | Diacetilcefalosporina C |
| DAOC | Diacetoxicefalosporina C |
| DTT | Ditiotreitol |
| L-DOPA | Dopamina |
| kDa | Kilodaltones |
| i.e | Ejemplo |
| PMSF | Fenilmetilsulfonil fluoruro |
| °C | Grados centígrados |
| g | Gramo |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| h | Horas |
| IUPAC | International Union Pure and Applied Chemistry |
| IPN | Isopenicilina N |
| lt | Litro |
| λ | Longitud de onda |
| MCHI | Medio de cultivo para hongos imperfectos |
| μ | Micras |
| μ L | Microlitro |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| min | Minutos |
| M | Molaridad |
| nm | Nanómetros |
| PDA | Papa-dextrosa agar |
| ppm | Partes por millón |
| Pen N | Penicilina N |
| r.p.m. | Revoluciones por minuto |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametiletildiamina |
| V _{máx} | Velocidad máxima |
| YM | Yeast media |

RESUMEN

La acetilcoenzima A-diacetilcefalosporina C:O-acetiltransferasa es la enzima que cataliza el paso final en la biosíntesis de cefalosporina C a partir de diacetilcefalosporina C en *Acremonium chrysogenum*. Al realizar la caracterización catalítica parcial de la enzima se observó un comportamiento típico de acuerdo al modelo Henry-Michaelis-Menten, con un valor de $V_{m\acute{a}x}=8.56 \text{ mol.lit}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $K_m=3.43 \times 10^{-3} \text{ mol.lit}^{-1}$ y $K_{cat}=2.21 \text{ min}^{-1}$. Para analizar su catálisis tanto en el sistema libre como inmovilizado, la enzima en forma de extracto fue inmovilizada por atrapamiento en tres diferentes soportes: alginato, agarosa y poliacrilamida, de los cuales se obtuvieron los siguientes niveles de actividad enzimática en comparación con los del sistema libre a) alginato 26-45%, b) agarosa 12-18%, y c) con poliacrilamida únicamente se detectó actividad después de haber duplicado la concentración de la proteína (116.8 μg), con ésta variante se obtuvieron niveles de actividad del 17.6-21.62%. El alginato fue el soporte que generó mayores niveles de actividad enzimática y fue el sistema elegido para estudiar la factibilidad de la reutilización de las biopartículas de alginato-enzima, obteniendo a lo largo de los ciclos una actividad enzimática del 44.5-61.0%. Factores tales como la influencia directa de los efectos difusionales, tamaño de poro, viscosidad y peso molecular del polímero, parecen encontrarse estrechamente relacionados con los niveles de actividad de la enzima observados, sin embargo estos deben ser caracterizados en detalle antes de poder inferir una dependencia estricta.

CAPÍTULO UNO

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos β -lactámicos continúan ocupando el primer lugar en utilización y ventas alrededor del mundo. Las ventas de antibióticos β -lactámicos en 1997 por parte de Zeneca ascendieron a \$1.8 billones de dólares en Estados Unidos, mientras que en el mundo superaron los \$4.2 billones de dólares. La amplia y continua utilización de estos fármacos radica en su amplio espectro y eficiencia para tratar afecciones causadas por organismos Gram positivos y Gram negativos. Las penicilinas y las cefalosporinas constituyen los grupos representativos más importantes de los antibióticos β -lactámicos, dado que pese a tener el mismo núcleo y actividad bactericida similar, las cefalosporinas pueden ser utilizadas como medicamentos alternativos cuando el tratamiento con penicilina es ineficiente o bien cuando el paciente presenta alergias a ésta. La obtención de antibióticos β -lactámicos se realizaba por métodos de fermentación seguido de transformaciones químicas. A la fecha poco se ha efectuado en el área de las bioconversiones, la utilización de enzimas en éste rubro es muy importante para obtener productos con mayor rendimiento, reduciendo las reacciones colaterales y la formación de subproductos, como resultado de la amplia estereoespecificidad de las enzimas.

1.1 DISTRIBUCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Los antibióticos β -lactámicos son sintetizados por un escaso número de microorganismos, principalmente por organismos filamentosos no relacionados taxonómicamente. Donde se incluyen desde hongos verdaderos (eucariotes) hasta estreptomicetos (procariotes) (Lemke *et al.*, 1972).

1.1.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS β -LACTÁMICOS

Las penicilinas y las cefalosporinas son moléculas que contienen en su estructura un sistema anular β -lactámico de cuatro miembros, que no se encuentra con frecuencia en los sistemas biológicos y es difícil de construir químicamente. A la fecha se ha reportado la síntesis orgánica completa tanto de la penicilina como de la cefalosporina (Sheehan *et al.*, 1959; Woodward *et al.*, 1966) pero los niveles alcanzados no compiten con los obtenidos por síntesis microbiana, dado que actualmente en el caso de la fermentación de *Penicillium chrysogenum* se alcanzan niveles de 70000 -100 000 unidades (una unidad de penicilina es equivalente a aproximadamente 0.6 μ g de ésta) (Peñalva *et al.*, 1998).

1.2 PENICILINAS

La era de los antibióticos se inició en 1929, cuando Alexander Fleming observó antibiosis entre un penicilio y cultivos bacterianos adyacentes (citado en Brakhage, 1998); años después se demostró que la inhibición del crecimiento se debía a la penicilina (citado en Brakhage, 1998). El contaminante fúngico del experimento original de Fleming fue *Penicillium notatum* y posteriormente se determinó que otras

especies de *Penicillium* también producen penicilina (Lemke *et al.*, 1972), siendo seleccionado para la producción comercial de la penicilina (Raper *et al.*, 1944) *Penicillium chrysogenum*, que produce en forma natural la cadena alifática lateral de la penicilina K, F, y dihidro F, además del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) y la isopenicilina N (IPN). La utilización de los antibióticos para su uso clínico inició con el descubrimiento de la eficiencia de éste compuesto β -lactámico, posiblemente el descubrimiento más importante en la historia de la Medicina. El empleo de antibióticos en el tratamiento de infecciones ha salvado más vidas que cualquier otro fármaco en el área médica (citado en Brakhage, 1998). La penicilina es el antibiótico con mayor historia en el tratamiento de malestares infecciosos y es reconocido como el progenitor de los agentes terapéuticos más importantes desarrollados durante los últimos treinta años, su estructura fue elucidada en 1945 por Hodgkin y Low, quienes demostraron por cristalografía de rayos X la presencia de una estructura β -lactámica (Woodward *et al.*, 1966).

1.3 CEFALOSPORINAS

Al finalizar la década de los 40s, Guiseppi Brotzu aisló el hongo *Cephalosporium acremonium* de una alcantarilla en Cagliari, Italia (citado en Brakhage, 1998). Estudios iniciales mostraron que éste hongo producía penicilina N (Pen N), y posteriormente se identificó otro compuesto en el caldo de fermentación, siendo la estructura de éste último ligeramente diferente a la de la Pen N (Woodward *et al.*, 1966), por lo cual se pensó que se trataba de un contaminante y fue nombrado cefalosporina. Abraham y Newton en 1961 establecieron su estructura y la confirmaron por cristalografía de rayos X (Woodward *et al.*, 1966; Sweet *et al.*, 1970). La estructura química difiere con respecto a la de la Pen N en la sustitución del anillo de tiazolidinio y en la presencia de un grupo acetoxi unido al carbono del grupo metilo en el carbono 3 del sistema anular de la cefalosporina, (Figura 1) (Woodward *et al.*, 1966). Éste compuesto posee gran actividad antibiótica contra bacterias Gram negativas, mientras que contra bacterias Gram positivas su actividad es débil, alrededor de un décimo de la actividad de la bencilpenicilina (Sweet *et al.*, 1970). La cefalosporina y compuestos análogos son producidos por especies de *Cephalosporium acremonium* (Woodward *et al.*, 1966) y por dos especies de *Streptomyces* (Nagarajan *et al.*, 1971): *S. lipmanii* y *S. clavuligerus*. Además de haber sido descrita la biosíntesis de compuestos β -lactámicos en hongos y bacterias también se ha encontrado en plantas superiores, como *Pachysandra terminalis*, donde se encontraron dos alcaloides esféricos (Lemke *et al.*, 1972).

1.3.1 ESTRUCTURA Y QUÍMICA DE LA CEFALOSPORINA

Todas las cefalosporinas poseen un residuo δ -D- α -aminoadipil o una cadena lateral derivada por transformación bioquímica de éste grupo. En contraste con la producción de Pen N, donde la cadena lateral puede ser inducida por la adición de derivados de ácidos carboxílicos al medio de fermentación, la producción de cefalosporina C (CC) no puede ser inducida ni por la adición de derivados de ácidos carboxílicos al medio de cultivo ni por el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) (Onions *et al.*, 1977).

Los estudios estructurales de la CC fueron facilitados por el conocimiento de las propiedades de la Pen N, puesto que la CC comparte propiedades químicas con ésta. Se encontró que la CC se comporta como un ácido monoamindicarboxílico y tiene un residuo δ -D- α -aminoadipil unido por su grupo δ -carboxilo al resto de la molécula. El espectro de infrarojo de la sal de sodio muestra una fuerte banda a 1782cm^{-1} característica del carbonilo β -lactámico, similar a la frecuencia de relajación del carbonilo de las penicilinas (Bycroft *et al.*, 1977).

Los espectros de resonancia magnética nuclear y de ultravioleta muestran que la estructura de la cefalosporina no es un sistema anular β -lactama-tiazolidinio, sino que es un sistema anular dihidrotiazina (Woodward *et al.*, 1966; Sweet *et al.*, 1970; Onions *et al.*, 1977). La estructura propuesta concuerda con las propiedades físicas y químicas determinadas por rayos X (Onions *et al.*, 1977).

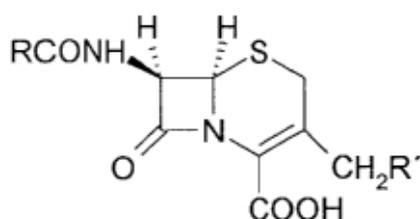


Figura 1. Estructura química de la cefalosporina

1.4 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS

Los antibióticos β -lactámicos son derivados de un sistema anular bicíclico, todos ellos excepto el 6-APA y el 7-ACA, tienen un grupo acilo unido en forma de cadena lateral al grupo amino del núcleo heterocíclico. El sistema anular de la penicilina contiene un anillo β -lactámico de cuatro miembros fusionado con un anillo de tiazolidinio de cinco miembros, mientras que en el sistema anular de la cefalosporina, el anillo β -lactámico está fusionado con un anillo insaturado de dihidrotiazina de 6 miembros (Lemke *et al.*, 1972). Las diferencias mencionadas anteriormente son útiles para distinguir químicamente a las penicilinas y las cefalosporinas y pueden observarse en la Figura 2.

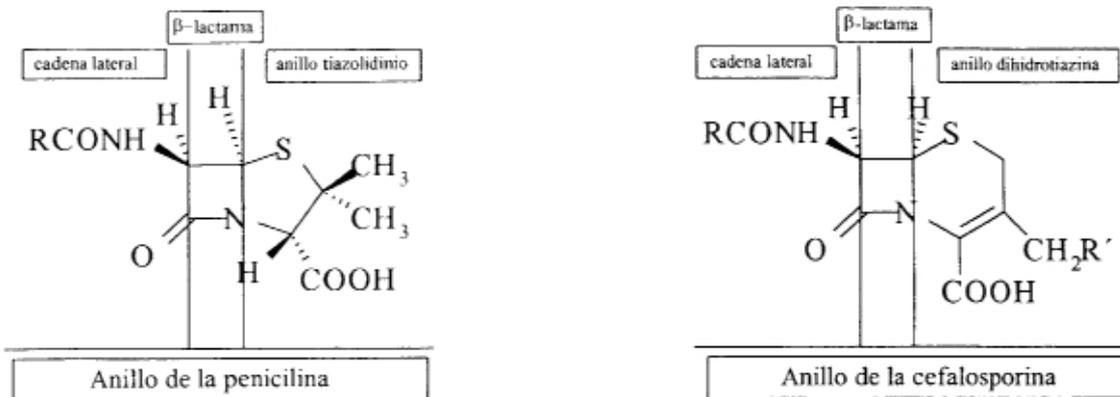


Figura 2. Sistemas anulares de la penicilina y la cefalosporina

1.4 1 TIPO *Penicillium*

El grupo de las penicilinas comprende una amplia gama de compuestos que difieren en la estructura dependiendo de la cadena lateral N-acilo unida al anillo β -lactámico, ésta cadena incluye desde ácido L- α -aminoadípico hasta algún derivado de un ácido carboxílico (Lemke *et al.*, 1972). La biosíntesis de penicilinas es sensible a la adición de precursores específicos de la cadena lateral al medio de cultivo, especialmente derivados de ácidos carboxílicos, como el ácido β - γ -hexenoico, el ácido caproico, el ácido octanoico, el ácido fenilacético, el ácido p-hidroxifenilacético y el ácido fenoxiacético (Lemke *et al.*, 1972). Todos los organismos productores de penicilinas son eucariotes y *Penicillium chrysogenum* se considera como el organismo representativo (Bycroft *et al.*, 1977).

1.4.2 TIPO *Cephalosporium*

Todas las cefalosporinas tienen una cadena lateral D- α -aminoadipil. En contraste con la fermentación de penicilina, la de cefalosporina es insensible a la adición de precursores de la cadena lateral. Las cefalosporinas son producidas tanto por organismos eucariotes (i.e. *Cephalosporium acremonium*, *Paecilomyces persinicus*) como procariones (i.e. *Streptomyces clavuligerus*, *Nocardia lactamdurans*) (citado en Brakhage, 1998) y se tiene a *Cephalosporium acremonium* como el organismo representativo de los productores de cefalosporinas.

1.5 *Cephalosporium acremonium*

El nombre *Cephalosporium acremonium* fue introducido por Corda en 1839 (Onions *et al.*, 1977) para designar mohos incoloros con conidióforos simples y sin ramificar, con células conidiógenas compartiendo en la punta un grupo o cabeza de conidias unicelulares, a partir de las cuales se deriva el nombre (Onions *et al.*, 1977). Gams en 1968 reexaminó especímenes del material original de *Cephalosporium Acremonium* y redescubrió el género a partir de cultivos vivos aislados recientemente de estas especies (Onions *et al.*, 1977). Él aplicó éste nombre a los hongos hialinos que forman numerosas conidias a partir de células conidiógenas erectas en

conidióforos ramificados e incluyen la mayoría de las especies a las que agrupaba *Cephalosporium*. *Acremonium chrysogenum* pertenece a la clase *Hyphomycetes* del género *deuteromicotina* u hongos imperfectos y se reproduce por estructuras vegetales asexuales, la forma vegetativa es conocida como la forma anamórfica, mientras que la forma ascospórica o sexual es constituye el teleomorfo (Onions *et al.*, 1977).

1.5.1 MORFOGÉNESIS EN *Acremonium chrysogenum*

Las células de *Acremonium chrysogenum* son morfológicamente heterogéneas en cultivo sumergido (Onions *et al.*, 1977). La máxima velocidad de la síntesis de antibióticos durante la fermentación está asociada con la diferenciación de los filamentos de las hifas en fragmentos altamente septados y ensanchados (artrósporas). En trabajos de investigación realizados por Bartoshevich *et al.*, (1990), se han encontrado cuatro tipos diferentes de células de *Acremonium chrysogenum*: hifas, artrósporas, conidias y conidias germinadas. Estas células fueron separadas por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa y las fracciones fueron evaluadas por su potencial para sintetizar antibióticos. Las fracciones que contenían artrósporas fueron 40% más eficientes para la síntesis que las fracciones que contenían cualquier otro tipo de células, de ésta manera, se ha implicado a las artrósporas como las células de *Acremonium chrysogenum* que participan más activamente en la síntesis de antibióticos (Bartoshevich *et al.*, 1990).

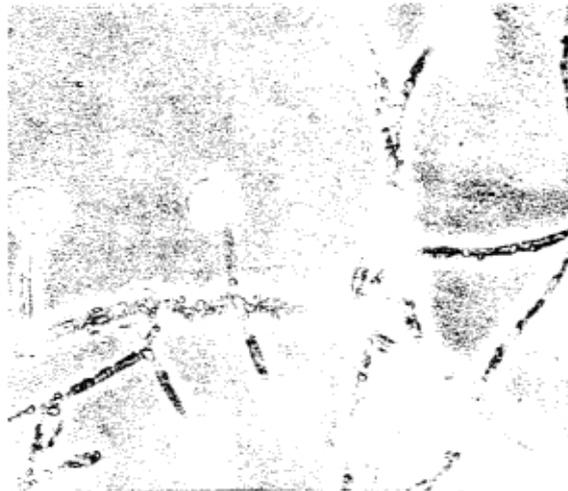


Figura 3. Hifas de *Acremonium chrysogenum* (Bycroft *et al.*, 1977).

1.5.2 BIOSÍNTESIS DE CEFALOSPORINA C

La cefalosporina C es un metabolito secundario, derivado de la condensación de los siguientes aminoácidos: ácido L- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina, todos ellos constituyentes del metabolismo celular. El ácido L- α -aminoadípico es un intermediario para la síntesis de la lisina en hongos verdaderos. La CC tiene un átomo de azufre derivado de la L-cisteína. En los hongos el metabolismo del azufre involucra ya sea la reducción de sulfato o la ruta de trans-sulfuración reversa, en *Acremonium chrysogenum* el azufre para la CC se deriva de la ruta de trans-sulfuración reversa (Bycroft *et al.*, 1977). Se ha establecido que la L-valina es el precursor directo para las penicilinas y las cefalosporinas. El primer paso en la biosíntesis de la cefalosporina en los hongos es la conversión de piruvato a acetolactato por la acetohidroxiácido sintetasa. Esta enzima es sensible a la inhibición por retroalimentación con L-valina, y la acumulación de valina endógena puede influenciar aparentemente el nivel de producción de β -lactamas (Bycroft *et al.*, 1977).

La ruta biosintética de la cefalosporina mostrada en la figura 4 involucra 6 etapas:

1.-Formación del tripéptido LLD-ACV por condensación del ácido δ -L-D- α -aminoadípico, L-cisteína y L-valina (la cual es epimerizada durante la reacción a la forma D). Esta condensación es catalizada por la ACV sintetasa, enzima codificada por el gen *pcbAB*. Compuestos como ATP, Mn^{+2} o Mg^{+2} facilitan ésta reacción (Aharonowitz *et al.*, 1993).

2.-Ciclización oxidativa del tripéptido LLD-ACV a isopenicilina N (IPN) por la isopenicilina N sintasa (ciclasa), enzima codificada por el gen *pcbC*. La actividad de la ciclasa es estimulada por el Fe^{+2} , ditioneitol (DTT) y ascorbato, así como también por oxígeno (Sawada *et al.*, 1980; Kupka *et al.*, 1983).

3.-La IPN es isomerizada a Pen N por la IPN epimerasa, que isomeriza la cadena lateral L- α -aminoadipil de la IPN a la configuración de la Pen N. La epimerasa de *Acremonium chrysogenum* es estabilizada en cierto grado por fosfato de piridoxal (Lübbe *et al.*, 1986; Konomi *et al.*, 1979; Jayatilake *et al.*, 1982; Baldwin, 1981); ésta enzima es codificada por el gen *cef D*.

4.-Expansión oxidativa del anillo de la Pen N a diacetoxicefalosporina C (DAOC) por la DAOC sintetasa (expandasa). La reacción de expansión del anillo requiere Fe^{+2} , ascorbato, oxígeno (Hook *et al.*, 1979; Sawada *et al.*, 1979), y α -cetoglutarato (Báez-Vásquez *et al.*, 1999; Espeso *et al.*, 1993; Kupka *et al.*, 1983; Kupka (a) *et al.*, 1983). La enzima es codificada por el gen *cef EF*.

5.-Hidroxilación de la DAOC a diacetilcefalosporina C (DAC) por la DAOC hidroxilasa. Las enzimas expandasa y la hidroxilasa están codificadas en el gen *cef EF*. Ambas actividades enzimáticas requieren oxígeno, α -cetoglutarato y Fe^{+2} , y son estimulados por DTT y ascorbato. La 3'-hidroxilación de DAOC a DAC (Kupka (a) *et al.*, 1983; Turner *et al.*, 1978; Fujisawa *et al.*, 1977; Scheiddeger *et al.*, 1984) es específica para DAOC.

6.-Acetilación de DAC en *Acremonium chrysogenum* por la acetil coenzima A-DAC-acetiltransferasa (ACT). la acetil coenzima A (AcCoA) actúa como donador del grupo acetilo ésta enzima es codificada por el gen *cef G* (Matsuyama *et al.*, 1992; Gutiérrez *et al.*, 1992; Matsuda *et al.*, 1992; Mathison *et al.*, 1993; Scheiddeger *et al.*, 1985).

1.5.3 REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS

La producción de antibióticos β -lactámicos opera con mayor potencial bajo condiciones de desbalance de nutrientes y a bajas velocidades de crecimiento (Martín *et al.*, 1987). Éste desbalance puede ser provocado por limitación de las fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo. En adición a estos factores, aminoácidos tales como la lisina y la metionina ejercen efectos drásticos en la producción de penicilinas y/o cefalosporinas en algunos microorganismos. En el caso específico de la CC, la metionina actúa como inductor de la fragmentación de las células de *Acremonium chrysogenum* (Martín *et al.*, 1987), aumentando los niveles producidos durante la fermentación de ésta.

1.5.3.1 REGULACIÓN POR LA FUENTE DE CARBONO.

Las fuentes de carbono que favorecen el crecimiento rápido (glucosa, glicerol y maltosa), ejercen un fuerte efecto negativo en la producción de β -lactamas, observándose que entre mayor sea la concentración de una fuente de carbono supresiva como la glucosa, menor será la producción de antibióticos (Martín *et al.*, 1987).

La formación de CC por *Acremonium chrysogenum* está sujeta a control metabólico por parte de la fuente de carbono (Zanca *et al.*, 1983). Zanca en 1983 desarrollo uno de los primeros medios de cultivo para éste proceso, y contenía 27 g/lit de glucosa para el crecimiento y 36 g/lit de sacarosa para la formación del antibiótico; el disacárido no se utilizaba hasta que la glucosa se consumía totalmente, apareciendo Pen N extracelular asociada al crecimiento, mientras que la CC sólo se acumulaba después de que el crecimiento había cesado (Behmer *et al.*, 1983).

1.5.3.2 REGULACIÓN POR LA FUENTE DE NITRÓGENO

Las concentraciones de amonio mayores a 100 mM interfieren con la producción de CC en *Acremonium chrysogenum*, mientras que la L-asparagina y la L-arginina son mejores fuentes de nitrógeno para la formación de antibióticos (Shen *et al.*, 1984). La adición de un agente quelante, como el fosfato de magnesio tribásico a las fermentaciones con alto nivel de amonio ocasiona la disminución del nivel de nitrógeno, induciendo la actividad de la expandasa y ocasionando un marcado incremento en la síntesis de β -lactamas, especialmente de cefalosporinas (Zanca *et al.*, 1983).

1.5.3.3 REGULACIÓN POR LA FUENTE DE FOSFATO

Küenzi en 1980 encontró la existencia de una relación directa entre las altas concentraciones de fosfato y la velocidad de consumo de glucosa, causando una disminución en la producción de CC, Martín *et al.*, (1984) reportó que el fosfato

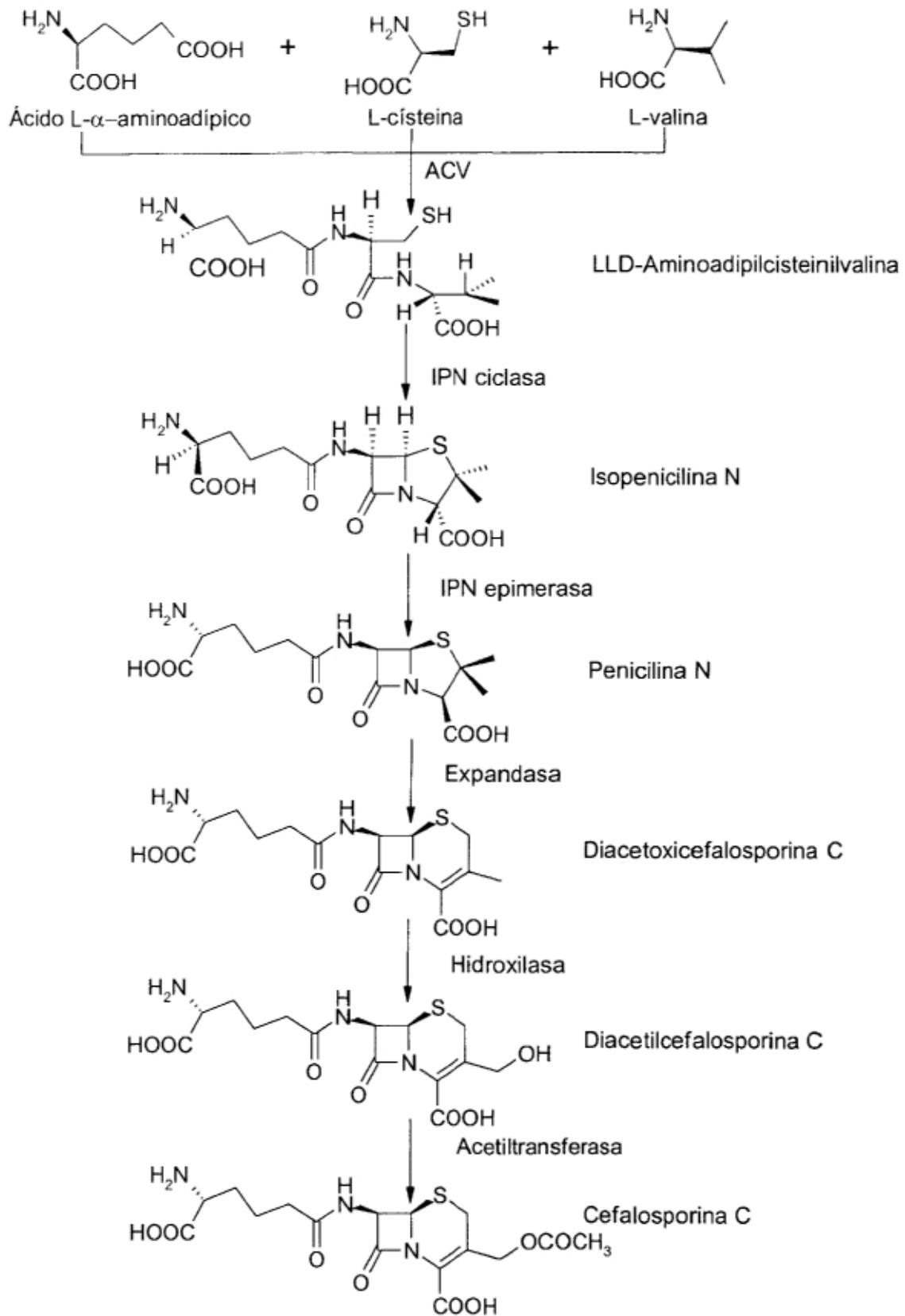


Figura 4. Ruta de biosíntesis de la cefalosporina C en *Acremonium chrysogenum*.

interfiere con la producción de CC y Pen N en ausencia de glucosa, disminuyendo el flujo total hacia la biosíntesis de CC (Revilla *et al.*, 1984; Komatsu *et al.*, 1977). Por otro lado Zhang *et al.*, (1988) reportó que altas concentraciones de fosfato no incrementan la velocidad de consumo de glucosa, pero suprimen fuertemente la producción de β -lactamas y la formación de las tres sintetetas examinadas –ACVS, ciclasa y expandasa- siendo la formación de la expandasa la más sensible a la represión.

1.5.3.4 REGULACIÓN POR METIONINA

La metionina ejerce una marcada estimulación en la formación de la Pen N y de la CC en *Acremonium chrysogenum* (Komatsu *et al.*, 1977). Drew *et al.*, (1976) encontró que la metionina no es un precursor de la cadena lateral D-Aaa de las β -lactamas ni un donador de azufre (Drew *et al.*, 1976), pero es un eficiente precursor del átomo de azufre de la CC, el cual es incorporado dentro del antibiótico por la ruta de trans-sulfuración reversa (Shen *et al.*, 1984). Uno de los hallazgos más interesantes sobre el impacto de la metionina en la biosíntesis de β -lactamas es el efecto morfológico que ocasiona (Drew *et al.*, 1976; Bartoshevich *et al.*, 1990; Queener *et al.*, 1975; Zanca *et al.*, 1983). Nüesch en 1973 encontró que la cisteína, homocisteína y cistationina producen micelios filamentosos, mientras que con metionina se obtienen hifas abultadas, septadas y fragmentadas (artrósporas) (Zanca *et al.*, 1983). Drew y Demain en 1975 sugirieron que la metionina actúa como un efector regulatorio de la biosíntesis de la CC, por inducción de una o más sintetetas β -lactámicas.

1.6 CONVERSIÓN DE DAC A CC

Esta reacción tiene lugar hacia el final de la ruta biosintética de CC en *Acremonium chrysogenum*, detalles tales como las características de la enzima y aspectos genéticos se discutirán en las secciones posteriores.

1.6.1 REACCIÓN

El paso final en la ruta de biosíntesis de la CC es la conversión de DAC a CC catalizado por la ACT (E.C. 2.3.1.-), la cual utiliza AcCoA como donadora del grupo acetilo (citado en Velasco *et al.*, 1999).

1.6.1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA ACT

Fujisawa en 1975 fue el primero en detectar la actividad de la ACT en el caldo de fermentación de *Acremonium chrysogenum*, la presencia de ésta en células permeadas fue detectada posteriormente. La enzima fue parcialmente purificada por Scheidegger y colaboradores en 1985, quienes propusieron una masa molecular de 70 ± 5 kDa. Matsuyama *et al.*, (1992) purificó la enzima estimando su peso molecular en 55 kDa por filtración en gel. Hasta ése momento la estructura de la enzima no había sido elucidada completamente, puesto que mientras Scheidegger y Matsuyama proponían que la enzima era un heterodímero de dos subunidades -27 y 14 kDa- no explicaban la composición de la enzima nativa, dado que un simple heterodímero (27 + 14 kDa) no era suficiente para explicar la masa molecular observada de 55 kDa.

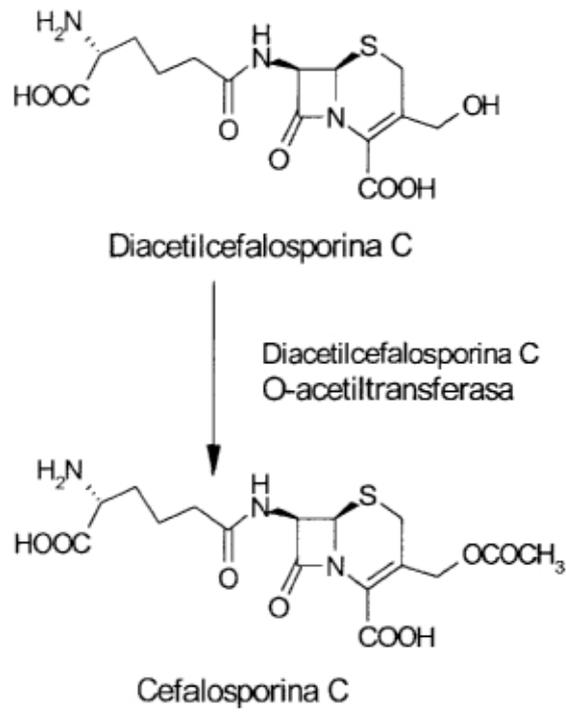


Figura 5. Reacción catalizada por la ACT.

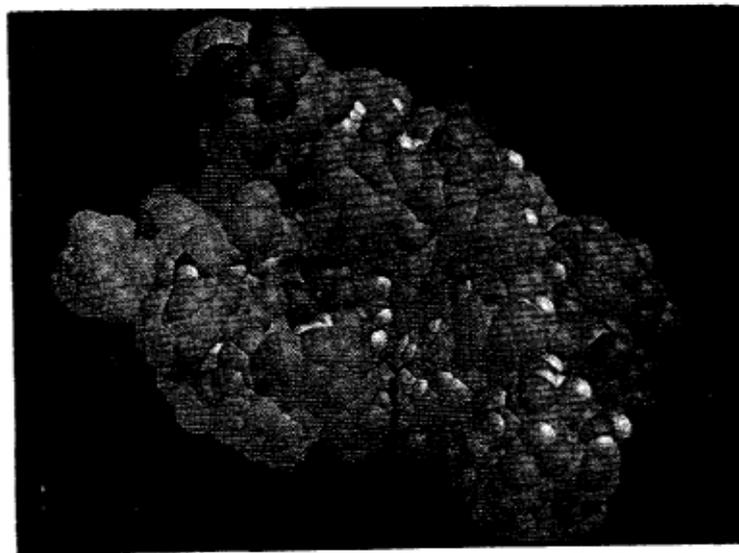


Figura 6. Representación globular tridimensional de la ACT de mitocondria humana.

1.6.1.3 CARACTERÍSTICAS DEL gen *cef G*

La clonación del gen *cef G* responsable de la actividad de la ACT y la secuenciación del mismo, ha sido realizada por grupos independientes: Gutiérrez *et al.*, (1992), Matsuda *et al.*, (1992), Mathison *et al.*, (1993). Cada grupo propuso un tamaño diferente del gen basándose en la selección de tres diferentes codones de inicio (ATG) para la traducción en el marco de lectura abierta. De éste modo Gutiérrez *et al.*, (1992) propuso que el tamaño del gen es de 444 nucleótidos, situando el inicio de la transcripción en el primer ATG del marco de lectura abierta; por otro lado Matsuda *et al.*, (1992) propuso que el gen inicia en el tercer ATG del marco de lectura abierta, por tanto el tamaño del gen era de 385 nucleótidos; mientras que Mathison *et al.*, (1993) propuso que el gen iniciaba en el segundo ATG del marco de lectura abierta, originando una proteína de 399 nucleótidos (44 kDa). Trabajos posteriores realizados por Velasco *et al.*, (1999) demostraron que la proteína tiene un peso molecular de 55 kDa, resultado que concuerda con los obtenidos por Matsuyama *et al.*, (1992), pero no encontraron evidencias para demostrar que la proteína está formada por un heterodímero. No se tienen reportes sobre la estructura tridimensional de la enzima, por tanto no se conocen ni los residuos involucrados en el sitio activo ni aquellos que participan en la catálisis, así como tampoco el mecanismo de acción de la ACT. La realización de estudios cristalográficos de la enzima contribuirá a elucidar estas interrogantes.

1.7 BIOCATÁLISIS

Las técnicas convencionales de fermentación y síntesis orgánica para la producción de fármacos, están siendo reemplazadas actualmente por el área de la biocatálisis o bioconversiones, donde se conoce tanto al sustrato como al producto y a la entidad enzimática capaz de realizar esa transformación. En las bioconversiones el sustrato y la enzima se someten a reacción para obtener el producto deseado y dada la amplia especificidad de las enzimas el producto obtenido es de mayor grado de pureza comparado con el obtenido por síntesis orgánica. De ésta manera las reacciones colaterales así como la formación de subproductos se reducen, facilitando la remoción del producto y minimizando los factores de riesgo y contaminación al disminuir la utilización de solventes. En la Figura 7 se presenta el árbol de decisión de la biocatálisis, donde se observan las diferentes modalidades en las cuales puede ser explotada ésta área ya sea utilizando células completas o enzimas, las variantes de cada uno de estos casos contemplan dos sistemas generales: libre e inmovilizado.

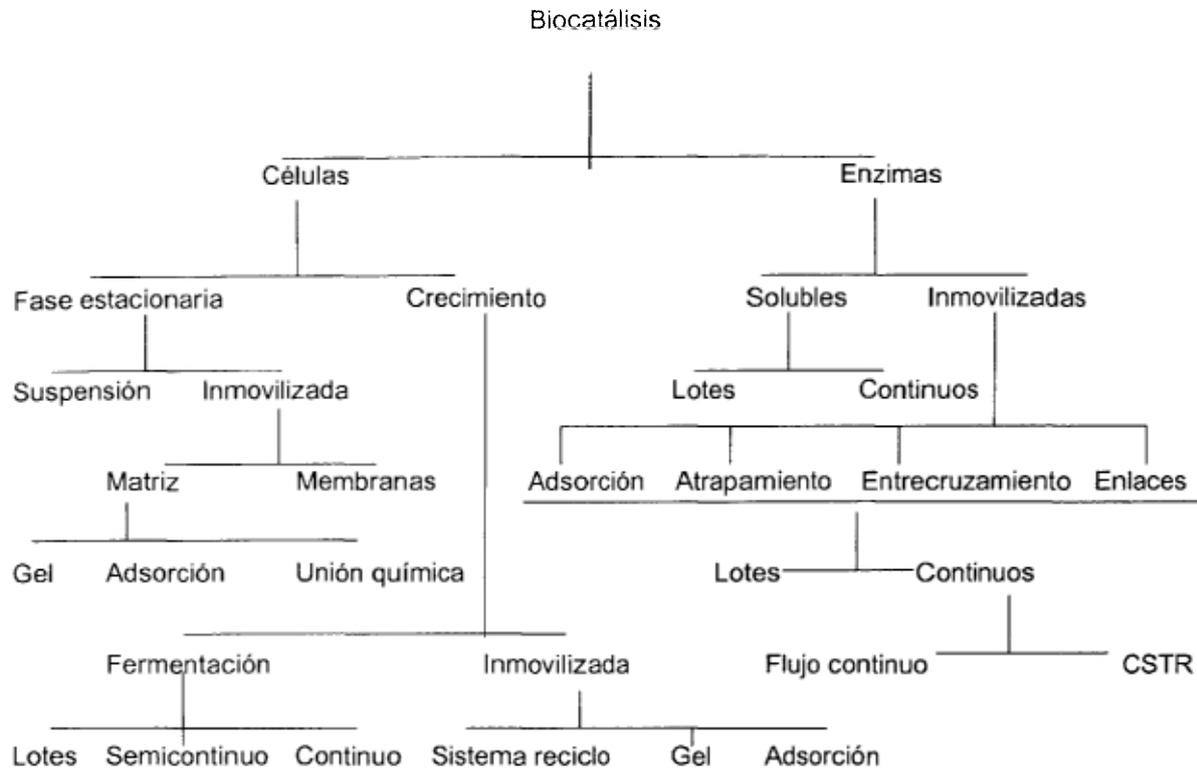


Figura 7. Árbol de decisión de la biocatálisis mostrando las opciones para realizar la selección del biocatalizador y las configuraciones del bioreactor.

1.7.1 BIOCÁTÁLISIS Y FINANZAS

Hacia el inicio de la década, los ejecutivos de las principales compañías productoras de penicilinas y antibióticos obtenidos por fermentación, consideraban a la síntesis biocatalítica como un área totalmente independiente a sus empresas. La obtención de CC se realizaba comúnmente por fermentación y después se modificaba químicamente para obtener el 7-ACA, precursor de las cefalosporinas semisintéticas como cefazolin[®], cefotaxime[®] y cefuroxime axetil[®]. Sin embargo, desde 1994 la compañía italiana ANTIBIÓTICOS realiza la conversión de CC a 7-ACA mediante una ruta enzimática, junto con la ruta tradicional de síntesis orgánica. Ésta compañía es la mayor productora de 7-ACA en el mundo y realiza investigaciones para reemplazar la planta de síntesis química por una planta de síntesis enzimática (McCoy, 1999).

Por otro lado, DSM invertirá \$130 millones de dólares para construir una planta productora de ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA) mediante fermentación, utilizando penicilina como material de partida para la obtención del 7-ADCA, el cual es un precursor para la síntesis de otras cefalosporinas como cephalexin[®] y cefadroxy[®]. Al igual que en el caso anterior, el objetivo es producir mediante biocatálisis un precursor de la cefalosporina hasta el momento obtenido por síntesis orgánica. En DSM el uso de la biocatálisis es un proceso cuesta abajo y

las cefalosporinas semisintéticas son producidas generalmente por reacción química del 7-ACA o 7-ADCA.

En DSM la producción de antibióticos y otros químicos constituían elementos independientes, hasta que el Presidente de Investigación observó la sinergia existente entre ambas áreas y planea utilizar recursos conjuntos para desarrollar rutas biocatalíticas para otros antibióticos producidos químicamente hasta ahora, así como para desarrollar otros productos químicos. En ANTIBIÓTICOS se están utilizando técnicas tales como la tecnología del ADN recombinante y la ingeniería metabólica para la optimización de la fermentación y de la catálisis enzimática.

1.7.1.1 CRITERIOS PARA REALIZAR LA SELECCIÓN DEL SISTEMA

Las enzimas utilizadas en las biotransformaciones son sintetizadas por células de organismos vivos. Dependiendo de su nivel de especialización, cada célula produce tipos específicos de enzimas, las cuales se encuentran en concentraciones grandes o pequeñas dependiendo de la naturaleza de la enzima, el tipo de célula, y la etapa de desarrollo. Cabe aclarar que dentro de la célula no solamente se produce una enzima única, sino que existe un complejo multienzimático encargado de realizar todas las reacciones necesarias para la supervivencia de la célula, y es dentro de éste complejo, donde se encuentra la (s) enzima(s) de interés académico y/o industrial (Roberts, 1995).

A simple vista pudiera parecer sencilla la selección del sistema a emplear durante la biotransformación. Habiendo establecido ya algunas de las bondades más notables de los sistemas enzimáticos, todo parecería indicar que la única alternativa para realizar las biotransformaciones la constituyen las enzimas, pero la elección del sistema dependerá de las características de la enzima *per se*, especialmente cuando la enzima de elección es intracelular. Bajo estas circunstancias los siguientes factores deben ser considerados antes de elegir un sistema enzimático sobre un sistema de células completas:

1. Varias enzimas potencialmente útiles son relativamente inestables fuera de su ambiente celular normal, por tanto, tienen poco valor como biocatalizadores si son extraídos de la célula. En términos moleculares, la enzima pierde su estructura tridimensional, ocasionando la pérdida de su actividad catalítica.
2. Muchas enzimas intracelulares potencialmente útiles son susceptibles a sufrir ataque hidrolítico por otras enzimas – especialmente proteasas – liberadas durante la ruptura celular.
3. Varias enzimas son dependientes de cofactor (i.e. mono-oxigenasas, oxidoreductasas, ligasas, etc). Tales cofactores son reciclados por complementariedad en las reacciones catalizadas por diferentes enzimas en las células vivas.
4. La preparación de extractos de enzimas intracelulares puede ser costosa en términos de tiempo y recursos, dado que los pasos necesarios en la extracción y purificación de las enzimas a partir de las células, frecuentemente son laboriosos y arrojan bajos rendimientos de la preparación de la enzima activa.

Tomando en cuenta estos factores, la elección de un sistema para la biotransformación dependerá de las características intrínsecas de la enzima, así

como de las herramientas y/o recursos disponibles para el proceso de purificación (Roberts, 1995).

1.7.1.2 APLICACIÓN DE LA BIOCATÁLISIS A LA MANUFACTURA INDUSTRIAL DE MOLÉCULAS QUIRALES

La utilización de catalizadores biológicos (i.e. enzimas o células completas) ha ido más allá de las fronteras de los tubos de ensayo en el laboratorio, para llevarse al nivel industrial. Ejemplos palpables se observan en la agricultura, en el área alimenticia para la manufactura de alimentos y bebidas, y en la preparación y limpieza de textiles. Por otro lado, los catalizadores biológicos juegan un papel muy importante en química analítica, donde las enzimas son utilizadas para estimar los niveles de metabolitos en el diagnóstico y terapia de las enfermedades (Weetall, 1973; Mazid, 1993; McCoy, 1999).

En la industria química la biocatálisis se concibe como el medio para obtener ya sea pequeñas moléculas ópticamente activas o quirales que sean productos farmacéuticos o intermediarios en la síntesis de fármacos. Grandes moléculas tales como antibióticos y proteínas terapéuticas también son producidas biológicamente (McCoy, 1999).

En la producción de moléculas pequeñas, dos tipos principales de biocatalizadores son utilizados: transformación de las moléculas dentro de células completas (las cuales pueden ser vivas o muertas) y conversión de moléculas con enzimas aisladas. Ambos procesos utilizan enzimas, en el primero las enzimas permanecen en el interior de las células, mientras que en el segundo, éstas son separadas y purificadas (McCoy, 1999).

Estas reacciones enzimáticas se agrupan en dos amplias categorías: aquellas que resuelven mezclas racémicas y las que dan derivados asimétricos a partir de precursores proquirales o racémicos. Generalmente las resoluciones enzimáticas son realizadas con enzimas aisladas, mientras que la síntesis asimétrica requiere la presencia de cofactores, haciendo que se tienda al uso de células completas. Las resoluciones de los racematos basadas en enzimas aisladas son simples y su curso es similar al de las reacciones con los catalizadores tradicionales. Entre las desventajas podemos citar el bajo rendimiento y el escaso avance de la síntesis total. Ejemplos de resolución en la industria farmacéutica incluyen la producción por DSM Andeno de intermediarios para diltiazem y captopril. ChiroTech produce un isómero del ibuprofen y la (-)lactama para el abacavir, mientras que BASF produce aminas ópticamente activas usando a la lipasa en solventes orgánicos (McCoy, 1999).

La utilización de células completas constituye un proceso más complejo, cuyo propósito dual es introducir quiralidad y realizar una síntesis de multietapas. La compañía Zeneca produce un intermediario quiral para que Merck produzca la droga dorzolamida contra el glaucoma, mientras que NSC Technologies realiza la producción de L-fenilalanina para productos diversos (McCoy, 1999).

La introducción de quiralidad es un factor que se encuentra asociado a las cualidades de las biotransformaciones, pero también existen casos en donde lo importante es producir moléculas aquirales porque su síntesis química sería muy difícil. Un ejemplo lo constituye la conversión de 2,5-dimetilpirazina a ácido 5-metil-2-pirazincarboxílico, intermediario de la glipizida, usando un microorganismo que crece

en p-xileno. En otro proceso se está produciendo ácido 5-hidroxipirazincarboxílico en un solo microorganismo que realiza dos pasos químicos, éste compuesto es un intermediario para la síntesis de una droga contra la tuberculosis que aun se encuentra en estudios clínicos (McCoy, 1999).

1.7.1.3 ENZIMAS INMOVILIZADAS DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

De acuerdo a lo establecido en la Primera Conferencia sobre Ingeniería Enzimática (1971), las enzimas inmovilizadas son enzimas que se encuentran físicamente confinadas o localizadas en un microambiente con retención de sus actividades catalíticas y que pueden ser utilizadas en forma repetida y continua (van Beybum, 1980; Kennedy *et al.*, 1988; Chibata, 1978). Por lo tanto las enzimas modificadas a una forma insoluble en agua bajo técnicas específicas satisfacen ésta definición.

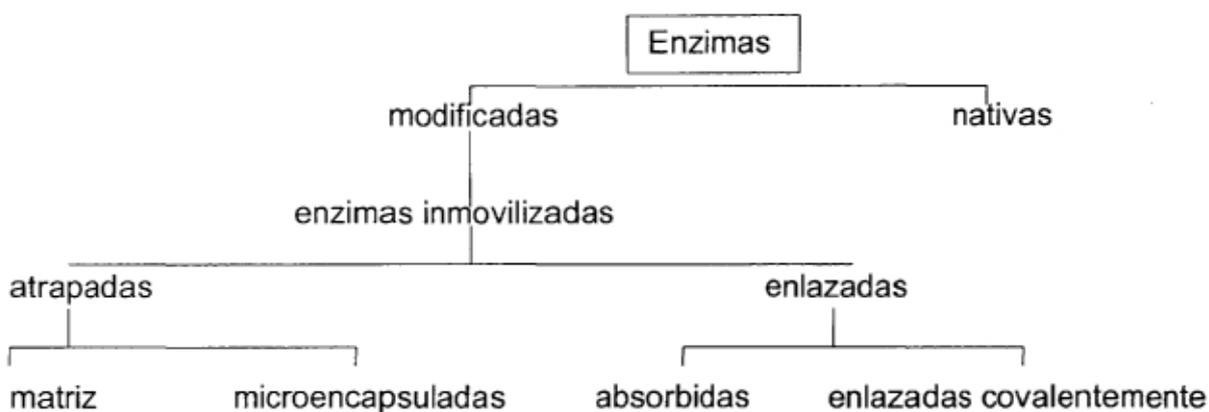


Figura 8. Clasificación de las enzimas inmovilizadas (Chibata, 1978).

En ésta reunión no solamente se estableció la definición de enzimas inmovilizadas, sino que también se propuso su clasificación, tal como se muestra en la Figura 8. Para que las enzimas sean consideradas en la práctica como catalizadores se deben considerar tres formas: 1) forma soluble, 2) forma soluble inmovilizada y 3) forma insoluble inmovilizada. Los últimos dos términos se agrupan en otro denominado enzima inmovilizada (Chibata, 1978).

1.7.1.3.1 SELECCIÓN DEL SOPORTE

Los componentes que integran un sistema enzimático inmovilizado son la enzima, el soporte y el método de unión, pero factores tales como pH, viscosidad, fuerza iónica, presión, agitación, cofactor, sustrato y remoción del producto, pueden afectar su eficiencia catalítica. La evaluación del sistema final deberá realizarse en función de la suma del costo de las contribuciones del componente individual contra el valor de la eficiencia del sistema. Al realizar la selección del soporte, propiedades tales como la morfología, contribuciones de superficie, composición y regeneración deben ser asignadas, puesto que todas ellas contribuyen de manera sinérgica en la actividad enzimática (Sharma *et al.*, 1982; Cao *et al.*, 1996).

1.7.1.3.2 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN

Se han utilizado una amplia variedad de materiales como soportes, principalmente sólidos en forma de esferas, así como también membranas y fibras. En algunos casos, también se han utilizado soportes solubles en agua como el dextrano (Sharma *et al.*, 1982; Cao *et al.*, 1996; Mosbach, 1980, Mazid, 1993; Chibata, 1978). Usualmente las enzimas se encuentran inmovilizadas en estos soportes por cualquiera de las cuatro formas siguientes:

- a) unión covalente;
- b) atrapamiento dentro de un gel o (micro)-encapsulación dentro de membranas semipermeables;
- c) adsorción, incluyendo enlazamiento hidrofóbico o de afinidad;
- d) enlaces a agregados insolubles.



Figura 9. Clasificación de los métodos de inmovilización (Chibata, 1978).

1.7.1.4 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA INMOVILIZACIÓN

Dentro de las ventajas de las enzimas inmovilizadas podemos mencionar el alto periodo de vida media, facilitando la posibilidad de utilizarlas repetidamente (debido en parte a su estabilidad creciente), ausencia de contaminación del producto final con el catalizador, posibilidad de aplicar procesos de flujo continuo, reducción de desechos y disminución de los costos de energía y mano de obra, factores que favorecen la adopción e implementación de ésta tecnología por parte de las empresas (Cao *et al.*, 1996). Dentro de las desventajas se encuentran la disminución de la actividad enzimática, cambios en la especificidad del sustrato, y baja transferencia de masa como resultado de los fenómenos de difusión causados por las características propias del polímero (Kennedy *et al.*, 1988).

1.7.1.5 APLICACIONES PRÁCTICAS DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS

A la fecha existen varios procesos industriales que utilizan la tecnología de enzimas inmovilizadas para la producción a gran escala de productos como la glucosa, jarabe fructosado, L-aminoácidos y el anillo penicilánico utilizado como base para la producción de penicilinas semisintéticas (Weetall, 1973; Chibata, 1978).

1.7.1.6 FACTORES QUE AFECTAN SU APLICACIÓN INDUSTRIAL

Antes de utilizar un sistema inmovilizado en la industria (enzimático o celular), deben considerarse los siguientes factores: 1) costo de los soportes o reactivos para la inmovilización de enzimas o células microbianas; 2) actividad de la enzima inmovilizada y rendimiento comparado con la enzima nativa o células intactas; 3) estabilidad de la enzima inmovilizada o células inmovilizadas durante la operación; 4) regeneración de la enzima inmovilizada deteriorada o de células microbianas después de largos periodos de operación; 5) coinmovilización de cofactores en caso necesario, 6) compatibilidad de la enzima o célula con el soporte, y el efecto hidrodinámico del medio de reacción sobre las partículas inmovilizadas (Chibata, 1978).

1.7.1.7 UTILIZACIÓN DE LAS ENZIMAS EN SÍNTESIS ORGÁNICA

Hacia el inicio de la década de los 70's, el empleo de reacciones catalizadas por enzimas (biotransformaciones) en síntesis orgánica había recibido poco interés, ya fuera a nivel de investigación o industrial. La tendencia cambió considerablemente hacia 1980, por factores tales como la creciente disponibilidad de una amplia gama de enzimas y el conocimiento de que varias familias de enzimas son capaces de transformar desde sustratos naturales hasta sustratos sintéticos (Kennedy *et al.*, 1988). Así, la utilización de enzimas en síntesis orgánica puede ser ventajosa por varias razones:

1.- Catalizan las reacciones bajo condiciones de reacción suaves (i.e. temperatura 37° C, presión 1 atm, pH 7.0). Las transformaciones son energéticamente eficientes al compararlas con los procesos químicos.

2.- Son promotoras de reacciones altamente quimioselectivas, regioselectivas y estereoselectivas, y por su naturaleza de catalizadores quirales, son capaces de generar compuestos ópticamente activos. Características que permiten satisfacer las demandas de los mercados farmacéutico y agroquímico por productos ópticamente activos (evitando toxicidad innecesaria y/o daño ecológico)

3.- Son capaces de realizar reacciones que son difíciles o imposibles de realizar bajo esquemas ordinarios de síntesis orgánica. De éste modo las reacciones enzimáticas pueden dar lugar a nuevos intermediarios quirales o acortar una ruta de síntesis en una secuencia sintética conocida.

4.- Catalizadores naturales.

5.- Versatilidad para trabajar en diferentes medios de reacción.

La síntesis orgánica es un área estrechamente relacionada con la tecnología enzimática, además de su utilización en la resolución de mezclas racémicas de aminoácidos y en transformaciones de esteroides, se espera que se desarrollen más procesos a pequeña y gran escala para la preparación de químicos.

En la tabla 1 se listan las aplicaciones de los sistemas enzimáticos inmovilizados basada en la clasificación de las reacciones enzimáticas, establecida por la comisión de enzimas de la IUPAC y de la Unión Internacional de Bioquímica en 1972 (Chibata, 1978).

| REACCIÓN CATALÍTICA | ENZIMA INMOVILIZADA | PROCESO QUÍMICO |
|-------------------------|---|--|
| Oxido-reducción | L-aminoácido oxidasa β-tirosinasa | Producción de D-aminoácidos Producción de L-DOPA Producción de L-tirosina |
| | Δ ¹ -hidrogenasa flavoprotein oxidasa | Producción de prednisolona N-oxidación de drogas |
| Transferencia de grupos | dextransucrasa | Producción de fructosa rica en dextrano |
| | fosforilasa polinucleótido fosforilasa carbamato cinasa | Polimerización de glucosa Producción de polinucleótidos Regeneración de ATP |
| | ribonucleasa α-amilasa glucoamilasa celulasa invertasa leucin aminopeptidasa | Síntesis de trinucleótidos Producción de glucosa Producción de glucosa Producción de glucosa Producción de azúcares invertidos |
| Hidrólisis | carboxipeptidasa | Resolución óptica de DL-aminoácidos |
| | papaina penicilin amidasa | Resolución óptica de DL-aminoácidos Hidrólisis de caseína Producción de 6-APA Síntesis de penicilinas y cefalosporinas |
| | aminoacilasa | Resolución óptica de DL-aminoácidos |
| | AMP deaminasa | Producción de ácido 5'-inosínico |
| | Liasas (reacciones en síntesis asimétrica) | aspartasa triptofanasa D-oxinitrilasa |
| Isomerización | glucosa isomerasa | Producción de fructosa |

Tabla 1. Aplicación de las enzimas inmovilizadas a los procesos químicos (Chibata, 1978).

El último paso para la conversión de penicilinas y cefalosporinas a compuestos farmacológicamente activos se realizaba por la ruta tradicional de síntesis orgánica. A finales de 1994 algunas compañías productoras de antibióticos decidieron incorporar dentro de sus esquemas de producción a las biotransformaciones, i.e utilización de sistemas inmovilizados celulares (Báez-Vázquez y Demain, 1999) o enzimáticos para realizar la síntesis de un compuesto específico a partir de un sustrato determinado; incrementando los niveles de rendimiento del compuesto

deseado y eliminando las reacciones colaterales y formación de subproductos, elementos indeseables característicos de las síntesis orgánicas. La inmovilización del biocatalizador facilita la remoción del producto y permite su utilización en procesos continuos. La biocatálisis ha explorado diferentes áreas y al igual que los métodos de inmovilización sus aplicaciones son múltiples. Para el caso de la ACT se ha descrito la extrema labilidad de la enzima (Fujisawa *et al.*, 1977; Scheiddeger *et al.*, 1984; Matsuyama *et al.*, 1992; Gutiérrez *et al.*, 1992; Matsuda *et al.*, 1992; Mathison *et al.*, 1993; Scheiddeger *et al.*, 1985), pero no se ha estudiado su actividad al ser inmovilizada en soportes poliméricos con el objetivo de conferirle estabilidad y aumentar la vida media activa de la enzima, y menos aun se tienen referencias sobre el aumento o disminución de sensibilidad a factores intrínsecos y extrínsecos del medio de reacción.

En base a los antecedentes el presente trabajo propone investigar las características catalíticas de un sistema inmovilizado de ACT en diferentes soportes poliméricos, con los siguientes objetivos:

Objetivo general.- Obtención de cefalosporina C a partir de diacetilcefalosporina C catalizada por la O-acetiltransferasa de *Acremonium chrysogenum*.

Objetivos específicos

- 1.- Evaluación de la actividad enzimática en un sistema libre (*in vitro*).
- 2.- Evaluación de la actividad enzimática en sistemas inmovilizados.

CAPÍTULO DOS

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 REACTIVOS

Acetil coenzima A sal trilitada.3H₂O, ditioneitol (DTT), L-asparagina, DL-metionina, NaSO₄.10H₂O, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), almidón, albúmina sérica bovina (BSA), alginato, polietilenimina, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y BaCl₂ fueron adquiridos a Sigma-Aldrich Chemical Company (Missouri, USA), el fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) fue comprado a Boehringer, el CaCO₃ fue obtenido de Mallinckrodt Chemical Inc, (Kentucky, USA), CaCl₂.2H₂O fue de Merck Company (Germany). El reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate) fue adquirido de Bio-Rad Laboratories (CA, USA). El agar bacteriológico, extracto de levadura, peptona de caseína, agar de sabouraud y agar papa-dextrosa fueron de BIOXON (Estado de México, Méx); el medio YM broth fue adquirido de DIFCO Laboratories (Michigan, USA). La sacarosa y la dextrosa fueron adquiridas a CTR (Monterrey, Méx); K₂HPO₄, KH₂PO₄, KCl, MgSO₄.7H₂O, FeSO₄.7H₂O, NaNO₃, MnSO₄.H₂O, CaCO₃ y persulfato de amonio fueron adquiridos de PQM (Monterrey, Méx). A menos que otra cosa se especifique, todos los reactivos utilizados en éste trabajo fueron de grado analítico. El nitrógeno líquido se compró de Praxair (Monterrey, Méx). La agarosa de bajo punto de fusión y la poliacrilamida, al igual que el agua (grado HPLC) para los análisis cromatográficos fue adquirida a Fischer Chemical (New Jersey, USA). Los estándares de Diatilcefalosporina C y cefalosporina C fueron donados amablemente por Antibióticos, S. A. (León, España).

2.1.2 EQUIPO

Centrifuga GS-15R, Beckman (California, estados Unidos). Balanza electrónica TP4KD, OHAUS ± 0.01 g. Balanza analítica Mettler –Toledo. Potenciómetro 050, Beckman. Liofilizador Freeze dry system/freezone 4.5, Labconco. Microscopio estándar 25, Carl Zeiss. Bomba de vacío GP110-120, SAVANT Instruments Inc. Parrilla de calentamiento Cimarec 2, Thermolyne. Vortex Genie 2 G-560, Scientific Industries Inc. Incubadora-agitadora Innova 4000, New Brunswick Scientific Company Inc. Cromatógrafo de líquidos HP 1100 (Alemania). Columna C18 (Luna 2) 5 μ. Espectrofotómetro DU^{MR} series 600, Beckman (California, Estados Unidos). Microcentrifuga Eppendorf 5415 C. Congelador de -80°C "Ultima" 700, Revco Scientific Inc. Congelador de -20°C Isotemp, Fisher Scientific Co. Refrigerador de 4°C Isotemp, Fisher Scientific Co. Esterilizadora eléctrica 25X, all american sterilizers, Wisconsin Aluminium Foundry Company, Inc. Microscopio biológico Vanox AHBS3.

2.1.3 CULTIVO

La cepa de *Acremonium chrysogenum* ATCC 48272 (*Cephalosporium acremonium* C10) fue donada amablemente por el Profesor Arnold L Demain del Fermentation Research Laboratory, Department of Biology, MIT, Cambridge MA, USA.

2.2 PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1 PROPAGACIÓN DE *Acremonium chrysogenum*.

Con el objetivo de mantener viable la cepa de *Acremonium chrysogenum*, se realizó su propagación en diferentes medios de cultivo, la forma de preparación de los medios así como las condiciones de incubación se listan a continuación:

2.2.1.1 AGAR PAPA-DEXTROSA (PDA)

9.25 g de PDA disueltos en 250 mL de agua, esterilización a 15 psi durante 15 min y subsecuente vaciado de cajas en condiciones estériles. Las cajas se inocularon bajo condiciones estériles con 40 µL de la suspensión de *Acremonium chrysogenum* y se incubaron a 37°C por 5 días.

2.2.1.2 MEDIO PARA CRECIMIENTO DE HONGOS IMPERFECTOS (MCHI)

Dextrosa 0.1 g, extracto de levadura 0.1 g, agar 1.9 g disueltos en 100 mL de agua destilada, esterilización a 15 psi durante 15 min y subsecuente vaciado de cajas Petri en condiciones estériles. Las cajas se inocularon bajo condiciones asépticas con 40 µL de la suspensión de *Acremonium chrysogenum* y se incubaron a temperatura ambiente por 5 días.

2.2.1.3 MEDIO YM

2.1 g de medio YM disueltos en 100 mL de agua destilada, se esterilizaron a 15 psi durante 15 min. A matraces de 250 mL con 50 mL del medio se adicionaron 45 µL de la suspensión de *Acremonium chrysogenum* y se incubaron a 27°C y 180 r.p.m. durante 5 días.

2.2.1.4 AGAR DE SABOURAUD

6.5 g de medio disueltos en 100 mL de agua se esterilizaron a 15 psi durante 15 min y el vaciado de las cajas se realizó en condiciones estériles; bajo éstas condiciones las cajas Petri se inocularon con 40 µL de la suspensión de *Acremonium chrysogenum* y se incubaron a temperatura ambiente por 5 días.

2.2.1.5 AGAR PARA PLACAS

Se preparó acorde a las condiciones descritas por Shen *et al.*, (1986) (ANEXO SIETE), después de 10 días de incubación a 25°C los tubos y las cajas Petri mostraron un crecimiento apropiado. Se detuvo la incubación y fueron guardados a 4°C hasta ser empleados para el desarrollo del medio semilla.

2.2.2 PREPARACIÓN DEL MEDIO SEMILLA NO. 1

En el medio semilla No. 1 modificado de Shen *et al.*, (1986) (ANEXO SIETE) se redujo la concentración de almidón del 3% al 1% y fue utilizado para desarrollar el preinóculo para las fermentaciones en medio definido. El desarrollo del medio semilla se inició inoculando 70 mL de éste, en un matraz erlenmeyer de 500 mL con una colonia de *Acremonium chrysogenum* cultivada en el agar en placa. La incubación fue realizada a 25°C en una incubadora con agitación a 200 r.p.m. durante 72 horas.

2.2.3 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE FERMENTACIÓN DEFINIDO

Se utilizó la composición descrita por Shen *et al.*, (1986) (ANEXO SIETE) el desarrollo de éste medio se realizó por transferencia de 10 mL de medio vegetativo a 300 mL de medio de fermentación definido en un matraz erlenmeyer de 1000 mL. Los matraces fueron incubados a 25°C en una incubadora con agitación a 200 r.p.m. durante seis días

2.2.3.1 CRECIMIENTO

El crecimiento fue estimado por peso húmedo. Para ello se tararon previamente tubos eppendorf en balanza analítica, y se tomó una alícuota de 1 mL de los matraces de fermentación desde el inicio hasta el final de la etapa de producción a intervalos de 24 h, los tubos se centrifugaron a 14000 r.p.m. por 15 minutos, el sobrenadante se descartó y los tubos se pesaron nuevamente. Por diferencia de pesos se obtuvieron los valores que permitieron estimar el crecimiento de *Acremonium chrysogenum* a medida que transcurría la fermentación.

2.2.4 CONDICIONES PARA EL ANÁLISIS POR HPLC

Todos los análisis reportados en el presente trabajo fueron realizados en un sistema de Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) Hewlett Packard equipado con una columna Luna 5 μ C18 (2) (250 x 4.6 mm). Diacetilcefalosporina C y cefalosporina C fueron usados como estándares para construir una curva de calibración (ANEXO DOS), utilizando como fase móvil acetato de sodio 10 mM-ácido acético (pH 4.7), con un flujo constante de 1.3 mL/min a 25°C y λ_{254} . El volumen de inyección para todas las muestras fue de 20 μ L. Ambos compuestos fueron identificados por coelusión con muestras puras proporcionadas por Antibióticos, S.A. León, España.

2.2.5 NIVELES DE CEFALOSPORINA C

La producción de CC durante la fermentación fue monitoreada tomando una alícuota de 1 mL de los matraces de fermentación desde el inicio hasta el final de la etapa de producción a intervalos de 24 h. Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 r.p.m. por 20 minutos y analizadas por HPLC para determinar la cantidad de cefalosporina C producida durante la fermentación.

2.2.6 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Los cultivos de *Acremonium chrysogenum* fueron incubados durante 6 días en el medio de fermentación definido (Shen *et al.*, 1986), las células se colectaron por centrifugación a 10,000 r.p.m. por 20 minutos a 4°C, seguido de dos lavados con una solución de NaCl 0.9% (Gutiérrez *et al.*, 1992) y la biomasa obtenida se congeló a -80°C. El micelio fue liofilizado en un sistema de secado-congelado al vacío por 20 h, posteriormente fue macerado en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que fue disuelto en el menor volumen posible de buffer. El buffer fue una modificación del descrito por Matsuyama *et al.*, (1992) usando PMSF como inhibidor de proteasas en vez de p-amidinifenilmetanosulfonilfluoruro cloruro y omitiendo la adición de 7-ACA. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación a 21 000

r.p.m. a 2°C por 30 minutos, el sobrenadante fue dividido en alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf y almacenado a -80°C hasta su uso.

2.2.6.1 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteína en los extractos celulares fue medida por el método de Bradford (1976), utilizando como estándar para la construcción de la curva de calibración (ANEXO UNO) albúmina sérica bovina fracción V.

2.2.7 INMOVILIZACIÓN

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad del soporte y el extracto libre de células conteniendo a la ACT, se procedió a inmovilizar el extracto con actividad de la ACT en tres diferentes polímeros como se indica a continuación:

2.2.7.1 INMOVILIZACIÓN CON ALGINATO

La inmovilización con alginato se realizó en tres modalidades diferentes: 1) extracto crudo (58.4 µg) inmovilizado en alginato al 2%, 2) extracto crudo (58.4µg) y AcCoA inmovilizados en alginato al 2%, 3) extracto crudo (116.8 µg) y AcCoA inmovilizados en alginato al 2%. No obstante las variantes mencionadas anteriormente, se utilizó el mismo protocolo de inmovilización para todos los casos. Una solución de 400 µL de alginato 2% se mezcló con la solución formada por la mezcla de 150 µL de extracto y 50 µL de AcCoA 2.5 mM. La mezcla se cargó en una jeringa de insulina de 1 mL, con una aguja de 29 G y la formación de las esferas se realizó goteando la solución del polímero en una solución endurecedora en agitación que contenía BaCl₂ 2% con polietilimina 1% (aditivo utilizado para evitar que los poros se cierren durante el proceso de endurecimiento, su utilización asegura que por lo menos un porcentaje del 70-80% de los poros se mantenga abierto después de haber curado las partículas y de ésta forma haya una difusión adecuada de los componentes de la mezcla de reacción) (Park *et al.*, 1995). El tiempo de curado fue de 3 horas. Bajo las condiciones descritas anteriormente se obtuvieron en promedio 30 esferas de alginato, con un diámetro aproximado de 3-5 mm y un contenido de proteína de 1.95 µg/esfera.

2.2.7.1.1 CICLOS DE REUTILIZACIÓN CON ALGINATO

Se siguió el protocolo de inmovilización descrito en el apartado 2.2.7.1, la mezcla de extracto (58.4 µg) y AcCoA 2.5 mM (50 µL), se inmovilizó en 400 µL de alginato al 2% y las esferas se sometieron a reacción bajo condiciones estándares (2.2.8.2) deteniendo ésta después de 1 h de incubación (un ciclo de actividad = 1 hora de reacción). El producto fue retirado de la mezcla y las esferas se lavaron dos veces con agua destilada, antes de ser agregadas nuevamente a otro tubo eppendorf y realizar otro ciclo bajo las condiciones descritas previamente (2.2.8.2). El producto de reacción de cada corrida experimental se analizó por HPLC, hasta completar un número total de 8 ciclos.

2.2.7.2 INMOVILIZACIÓN CON AGAROSA

Una mezcla de 150 μL de extracto (58.4 μg) y 50 μL de AcCoA 2.5 mM, fue inmovilizada en 400 μL de agarosa de bajo punto de fusión, utilizando aceite de cártamo para facilitar la formación de las esferas; mismas que fueron separadas del aceite por centrifugación a 4°C y 800 r.p.m. y lavadas dos veces con agua destilada hasta eliminar el exceso de éste. Se obtuvieron en promedio 120 esferas de 1-2 mm de diámetro con un contenido de proteína de 0.48 μg /esfera.

2.2.7.3 INMOVILIZACIÓN CON POLIACRILAMIDA

Una mezcla de 150 μL (58.4 μg) de extracto y 50 μL de AcCoA 2.5 mM, fue inmovilizada en 1 mL de poliacrilamida. La mezcla se purgó con nitrógeno y posteriormente se le agregó persulfato de amonio y TEMED para iniciar la polimerización. Una vez obtenidos los geles (la concentración de poliacrilamida fue del 10%), estos se cortaron en cuadros pequeños de aproximadamente 3 mm por lado, obteniendo 106 cuadros de 3x3 mm en promedio con un contenido de proteína de 0.547 μg /cuadro.

2.2.8 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA O-ACETILTRANSFERASA

2.2.8.1 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA LIBRE

La actividad enzimática fue cuantificada modificando el ensayo descrito por Gutiérrez *et al.*, (1992), utilizando 58.4 μg de proteína, 50 μL de buffer de fosfatos 50 mM (pH 7.0), 25 μL de MgSO_4 5 mM, 50 μL de AcCoA 5 mM, 50 μL de DAC a dos niveles diferentes (2.5 mM=960 ppm y 5 mM=1920 ppm) según el caso, temperatura 37 °C y tiempo de reacción de 30 min. La mezcla de reacción fue enfriada a 4°C por 10 minutos y centrifugada a 14 000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se analizó por HPLC. El volumen total de la reacción fue de 325 μL .

2.2.8.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS INMOVILIZADOS

Se realizó modificando el ensayo descrito por Gutiérrez *et al.*, (1992), utilizando 200 μL de buffer de fosfatos 50 mM (pH 7.0), 50 μL de AcCoA 2.5 mM, 25 μL de MgSO_4 5 mM, 50 μL de DAC 2.5 mM, y 58.4 μg de concentración total de proteína en los respectivos sistemas inmovilizados, a una temperatura de 37 °C, el tiempo de reacción fue de 1-5 h. La mezcla de reacción fue enfriada a 4°C por 10 minutos y centrifugada a 14,000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se analizó por HPLC. El volumen total de la reacción fue de 325 μL . Para cada uno de los sistemas se corrió en paralelo un lote con el sistema libre.

2.2.9 ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Con el objetivo de analizar las características microscópicas del micelio y de los sistemas inmovilizados, se diseñó un análisis para observar las características de ambos sistemas. Para todos los casos, la muestra en cuestión (i.e. esfera de alginato, esferas de agarosa, cuadro de poliacrilamida o micelio de *Acremonium chrysogenum*) se puso en contacto con una gota de glicerol y se observó al microscopio utilizando la óptica de Nomarski, útil para analizar objetos translúcidos. Los análisis se realizaron utilizando un microscopio biológico Vanox AHBS3, con el objetivo de 40X.

CAPÍTULO TRES

RESULTADOS

3.1 PROPAGACIÓN DE *Acremonium chrysogenum*.

Con el objetivo de realizar la propagación y activación de la suspensión de *Acremonium chrysogenum*, la siembra del microorganismo se realizó en diferentes medios de cultivo, los resultados se muestran en la Tabla 2.

| MEDIO | CONDICIONES INCUBACIÓN | DESARROLLO |
|------------------------------------|----------------------------|------------|
| Agar papa-dextrosa ^a | 5 días a 37°C | + |
| Medio MCHI ^a | 3 días a 25°C | + |
| Medio YM (líquido) | 3 días a 25°C y 200 r.p.m. | + |
| Agar de Sabouraud ^b | 3 días a 25°C | +++ |
| Agar dextrosa-peptona ^b | 3 días a 25°C | +++ |
| Agar para placas ^b | 6 días a 25°C | +++ |

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados para evaluar la óptima propagación y activación de *Acremonium chrysogenum*.

· Desarrollo lento.

... Desarrollo alto.

^a El crecimiento de las colonias alcanzó en promedio 3-7 mm.

^b El crecimiento observado por las colonias fue de 13-15 mm.

Los resultados de la tabla anterior muestran que los medios que permiten una adecuada propagación del hongo son el agar dextrosa y peptona, el agar de Sabouraud y el agar para placas. En la tabla 2 se indican las características morfológicas del crecimiento del hongo en agar para placas, mientras que en la Figura 10 se aprecia la morfología del hongo en caja Petri previamente descrita. En la Figura 11 se muestra una micrografía de *Acremonium chrysogenum* tomada con un Microscopio Olympus Vanox AHBS3 utilizando la óptica de Nomarski. *Acremonium chrysogenum* presenta un crecimiento característico en los medios de cultivo suministrados con metionina, la cual favorece la formación de artrósporas mismas que han sido implicadas con los máximos niveles de producción de β -lactamas. En ésta fotografía puede apreciarse el engrosamiento e hinchamiento del micelio, fenómeno asociado a los cambios morfológicos desarrollados durante la producción de β -lactamas, la fotografía fue tomada al micelio cultivado en el medio de fermentación definido (ANEXO SIETE) durante seis días.

| | |
|------------------------|---------------------------|
| Forma | Circular irregular |
| Tamaño | Diámetro aproximado 15 mm |
| Color | Marfil |
| Borde | Dentado |
| Superficie | Rugosa |
| Aspecto | Seco |
| Luz transmitida | Opaca |
| Luz reflejada | Mate |
| Elevación | Convexa |
| Consistencia | Dura |

Tabla 3. Características morfológicas de *Acremonium chrysogenum* en agar para placas. Las cajas Petri con *Acremonium chrysogenum* fueron incubadas por 10 días a 25°C, después de éste periodo la colonia presenta forma circular e irregular, con superficie rugosa y elevación convexa.

Figura 10. Caja de *Acremonium chrysogenum* cultivada en agar para placas. La incubación se realizó por 10 días a 25°C, al cabo de los cuales se observa una colonia de superficie rugosa y convexa con diámetro aproximado de 15 mm.

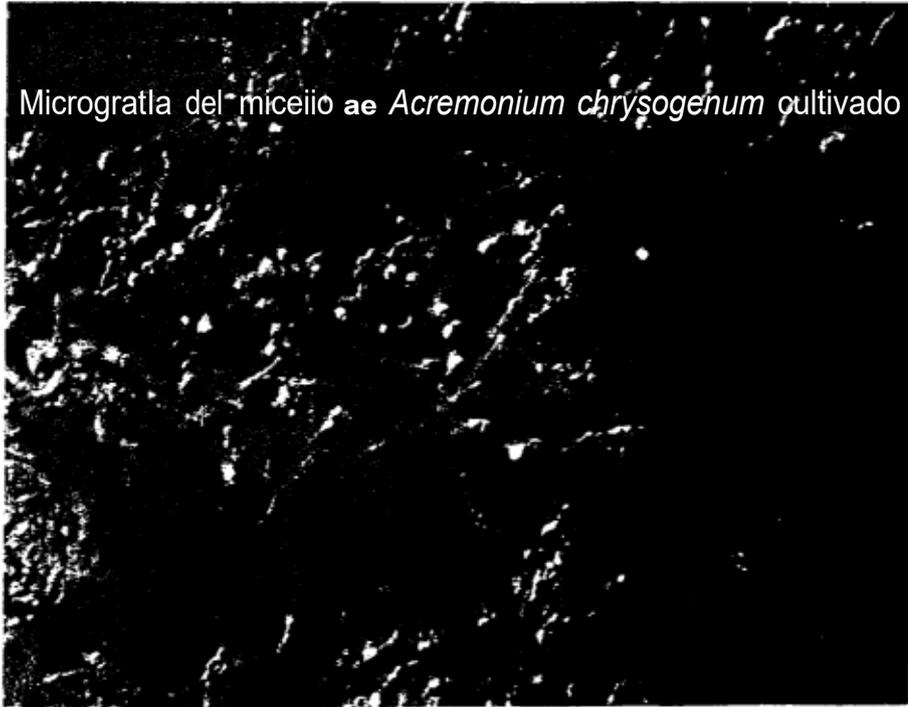


Figura 11. Micrografía del micelio de *Acremonium chrysogenum* cultivado por seis días en medio de fermentación definido a 25°C y 200 r.p.m. (Nomarski 40X).

3.2 FERMENTACIÓN

Desde su descubrimiento como productor de CC, *Acremonium chrysogenum* ha sido objeto de numerosos estudios en el desarrollo de medios de cultivo, que permitan incrementar los niveles de producción de CC, y en el caso de estudios enzimáticos, obtener los mayores niveles de la enzima en estudio. De éste modo, los avances realizados con herramientas de Biología Molecular como los hechos en el ámbito de fermentación, han permitido establecer el medio, condiciones de cultivo y el periodo de incubación óptimo en la fase de fermentación para encontrar los máximos niveles de la enzima deseada.

Los niveles de CC máximos detectados por Mathison *et al.*, (1993) al realizar la fermentación de *Acremonium chrysogenum* fueron de 0.625 mg/mL, mientras que los obtenidos en éste trabajo fueron de 0.153 mg/mL, con un tiempo de incubación de 144 h (6 días), siguiendo las condiciones descritas por Shen *et al.*, (1986) (ANEXO SIETE).

En el caso específico de la ACT, reportes previos (Matsuyama *et al.*, 1992; Gutiérrez, *et al.*, 1992) indican haber encontrado diferencias en la actividad catalítica de la ACT detectada a partir de las 96 h de fermentación. Los niveles de actividad reportados por Matsuyama fueron de 25.7 unidades totales, mientras que los reportados por Gutiérrez fueron de 1.85 unidades totales. El nivel máximo de actividad encontrado en el trabajo fue de 4.069×10^{-2} unidades totales, dichos valores podrían ser el resultado de la inestabilidad de la enzima así como de la impureza del extracto que contiene a la ACT.

3.2.1 NIVELES DE BIOMASA

La determinación de los niveles de biomasa se realizó acorde a la forma descrita en la sección de materiales y métodos (2.2.3.1), y los resultados se aprecian en la Figura 12.

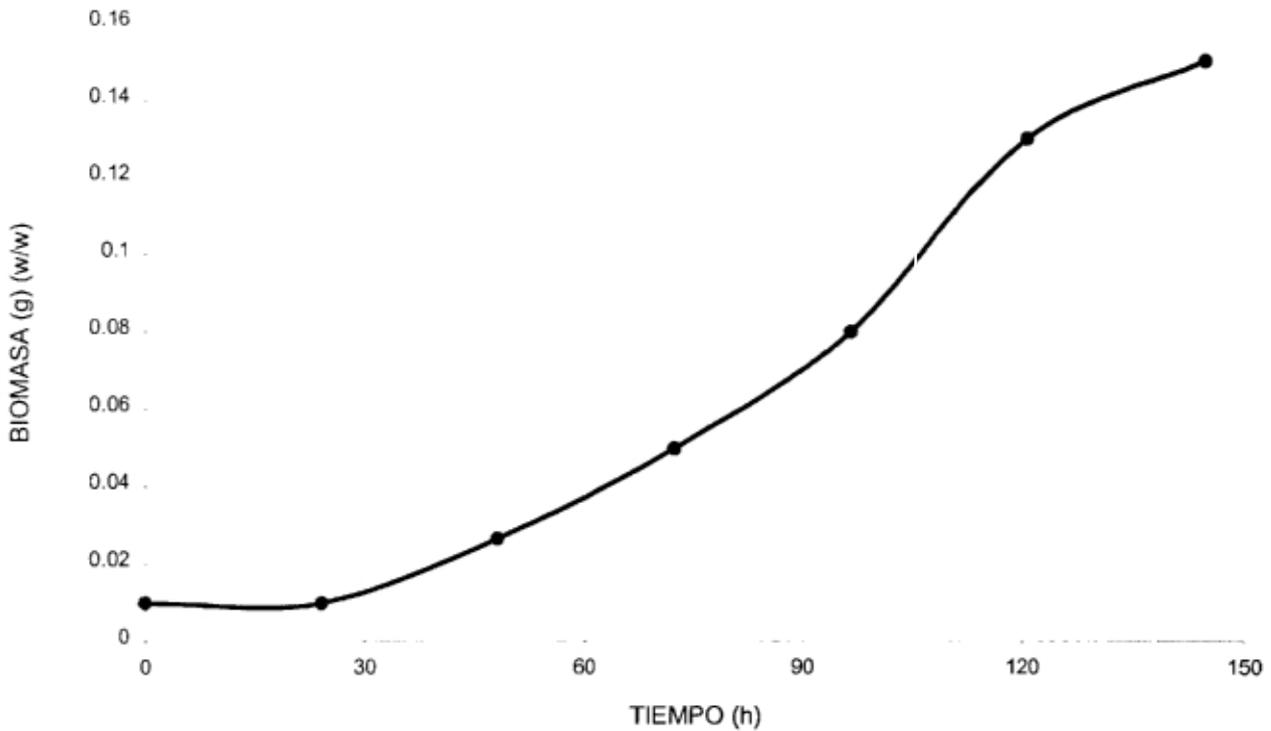


Figura 12. Niveles de biomasa producidos durante la fermentación de *Acremonium chrysogenum*.

3.2.2 NIVELES DE CC

Con el objetivo de analizar la correlación entre el crecimiento (μ) y los niveles de CC producidos durante la fermentación de *Acremonium chrysogenum*, ambas determinaciones se evaluaron de manera paralela, la cuantificación de los niveles de CC se realizó por HPLC¹. En la Figura 13 puede apreciarse el aumento en los niveles de CC conforme transcurría el tiempo de fermentación, obteniendo un nivel máximo de CC de 153.12 ppm a 144 h de cultivo. Este incremento coincide perfectamente con la fase estacionaria del cultivo (idiofase), la cual indica una productividad mayor de CC como resultado de la presencia de la ACT en la ruta de biosíntesis correspondiente; quedando manifiesta la naturaleza de metabolito secundario o idiolito por parte de ésta al ser producida durante la fase estacionaria de crecimiento del hongo.

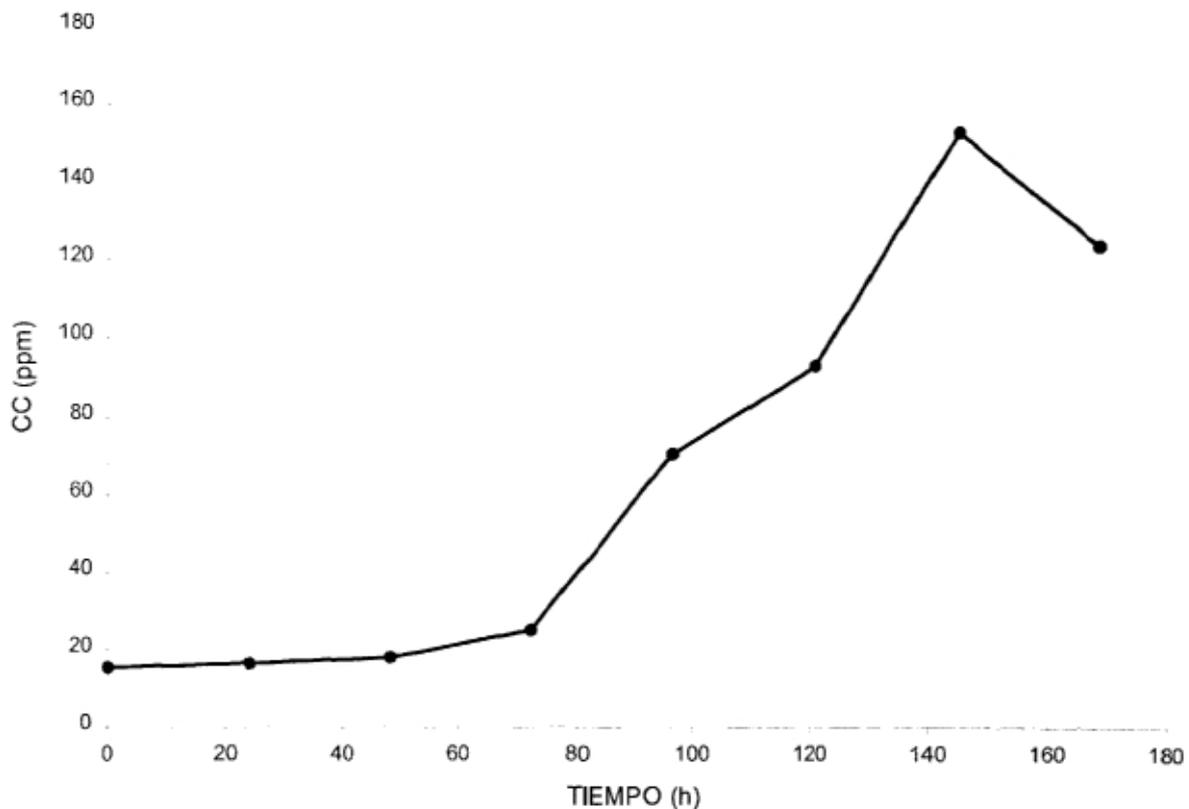


Figura 13. Niveles de CC producidos durante la fermentación de *Acremonium chrysogenum*.

¹ En todos los casos, las muestras de CC se identificaron por coelusión con un estándar y la cantidad producida se calculó utilizando la curva de calibración (ANEXO DOS) correspondiente.

3.3 ENSAYOS ENZIMÁTICOS

De manera tradicional los procesos para la producción de antibióticos β -lactámicos continúan realizándose por fermentación, seguidos de transformación química ulterior. En las secciones siguientes se describen las formas bajo las cuales se realizó la determinación de la actividad de la ACT.

3.3.1.1 SELECCIÓN DEL NIVEL ÓPTIMO DE PROTEÍNA

Por ser la ACT una enzima limitante en la conversión de DAC a CC, su actividad ha sido estudiada desde múltiples enfoques y se tienen descritas diferentes condiciones para la realización de los ensayos de actividad de ésta. El análisis se inició siguiendo las condiciones reportadas por Gutiérrez *et al.*, (1992), pero antes de proceder a la realización de los ensayos como tal, se determinó la concentración de proteína presente en el extracto (2.2.6.1), y se realizó la selección de la concentración de proteína bajo la cual se alcanzaban los niveles más altos de producción de CC.

Para realizar la selección de la concentración de proteína óptima, se realizaron ensayos enzimáticos utilizando las siguientes condiciones de reacción: buffer de fosfatos 50 mM (pH 7.0), sulfato de magnesio 5 mM, AcCoA 5 mM, DAC 5 mM y una concentración de proteína variable desde 0 hasta 58.6 μ g.

En la Figura 14 se observa el perfil de producción de CC con diferentes concentraciones de proteína, bajo las condiciones descritas en el párrafo anterior los máximos niveles de CC fueron producidos al utilizar una concentración de proteína total de 58.412 μ g, misma que se utilizó en los experimentos posteriores, incluyendo los de inmovilización. En la Figura 15 se observan los porcentajes de conversión para las diferentes concentraciones de proteína. Los niveles máximos de CC y de porcentajes de conversión fueron obtenidos al utilizar una concentración total de proteína de 58.4 μ g.

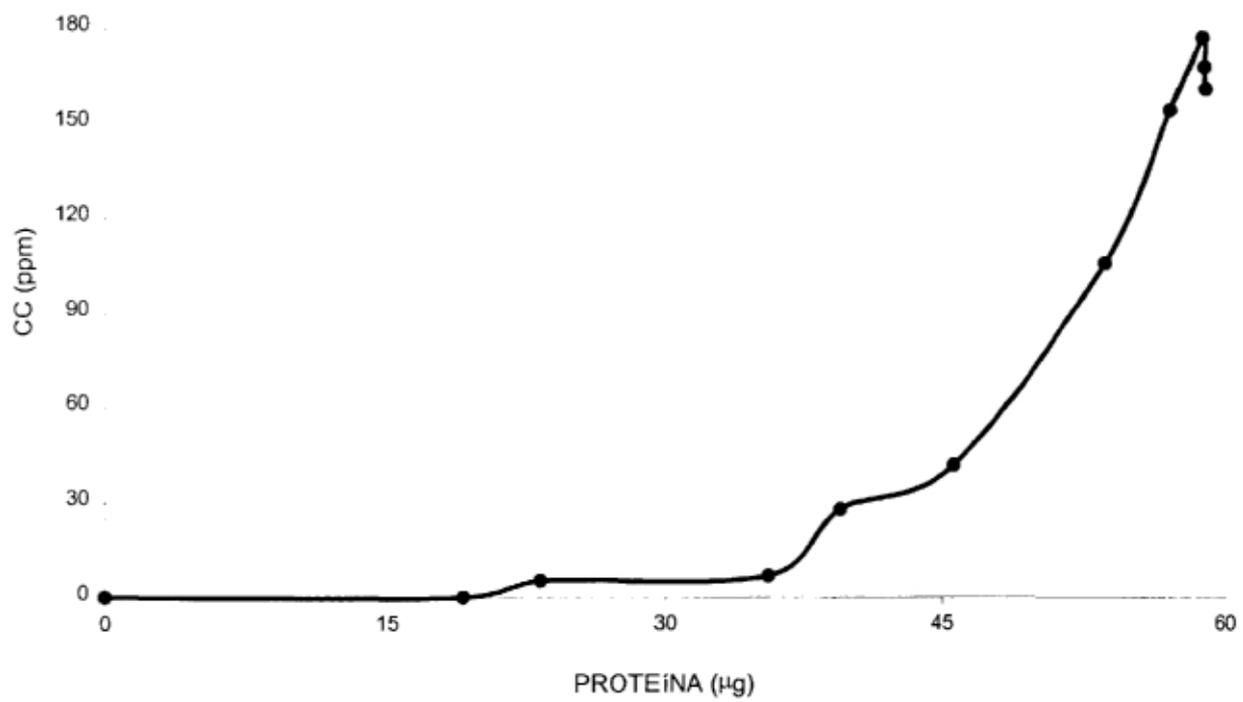


Figura 14. Niveles producidos de CC a diferentes concentraciones de proteína (ACT en el extracto).

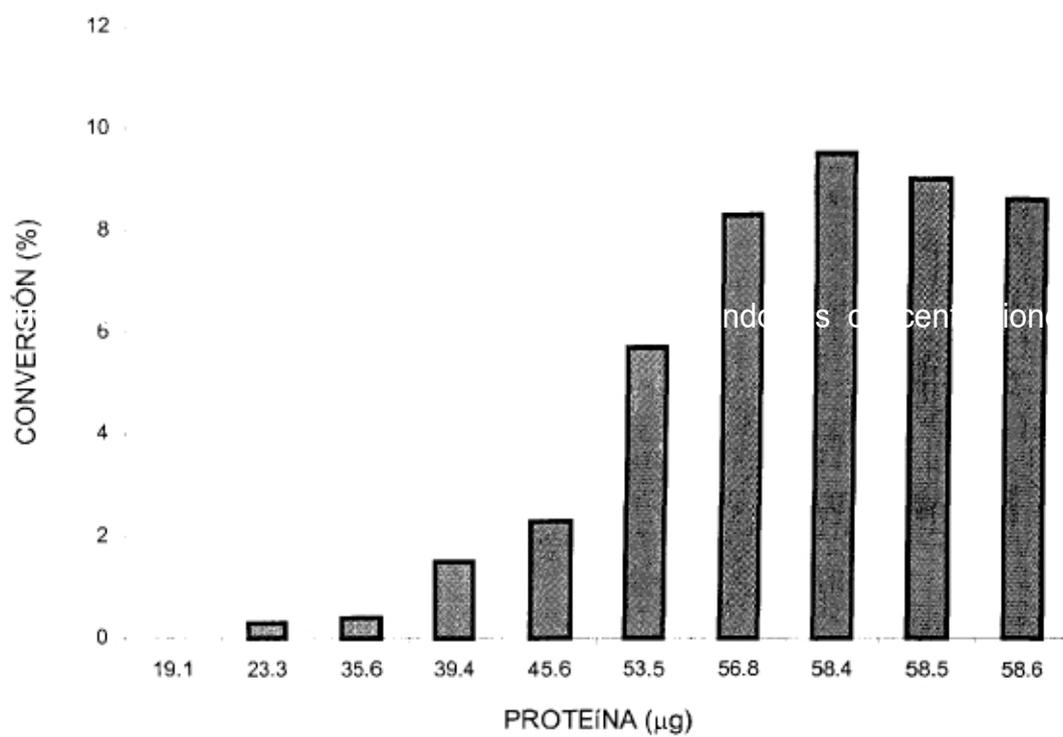


Figura 15. Porcentajes de conversión de CC variando las concentraciones de proteína (ACT en el extracto).

3.3.1.2 SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO

La selección de la concentración óptima de sustrato (Tabla 4) se realizó tomando como base los resultados obtenidos sobre los niveles de actividad enzimática. Definiendo como unidad enzimática la cantidad de enzima necesaria para realizar la conversión de 1 μmol de DAC a CC por minuto en las condiciones estándares de reacción (2.2.8.1). Los resultados se analizaron en función de los niveles de CC producida y de los porcentajes de conversión.

| SUSTRATO (mM) | CC (ppm) | CONVERSIÓN (%) |
|---------------|----------|----------------|
| 2.5 | 110.92 | 11.92 |
| 5.0 | 141.78 | 7.62 |
| 7.5 | 171.57 | 6.14 |
| 10.0 | 195.63 | 5.258 |
| 12.5 | 215.17 | 4.626 |

Tabla 4. Niveles de CC y porcentajes de conversión con diferentes concentraciones de sustrato.

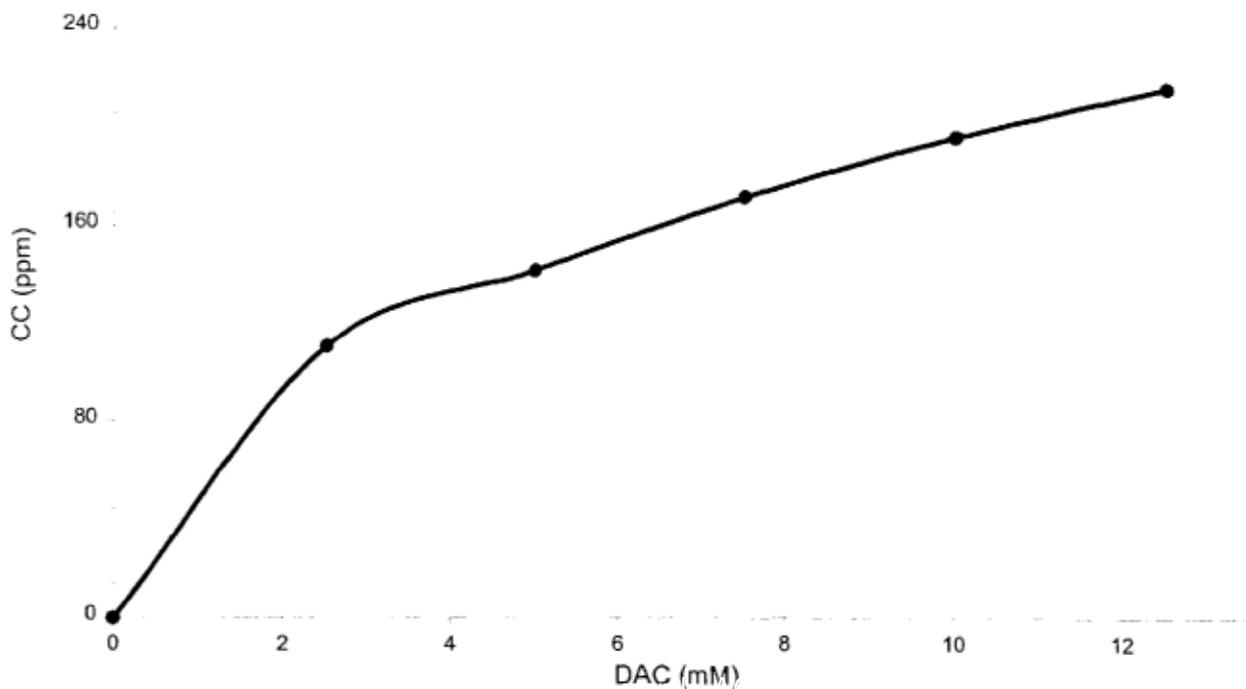


Figura 16. Niveles de CC producidos por la ACT con diferentes concentraciones de sustrato.

Como puede observarse en la Figura 16, la actividad catalítica de la ACT es dependiente de la concentración de sustrato (DAC 0-12.5 mM) y los niveles de CC ascienden gradualmente conforme se incrementa la concentración de sustrato. No obstante los máximos niveles de CC se alcanzan con la concentración más alta de sustrato utilizada (DAC 12.5 mM), como puede verse en la Figura 17, el mayor porcentaje de conversión se obtiene con la concentración más baja de sustrato (DAC 2.5 mM) (Figura 18 y Tabla 4), y decrece conforme aumenta la concentración de sustrato, presentando un perfil totalmente opuesto al de los niveles de CC. A lo largo del trabajo, la concentración de sustrato utilizada fue de 2.5 mM, concentración responsable de los niveles más altos de conversión de DAC a CC.

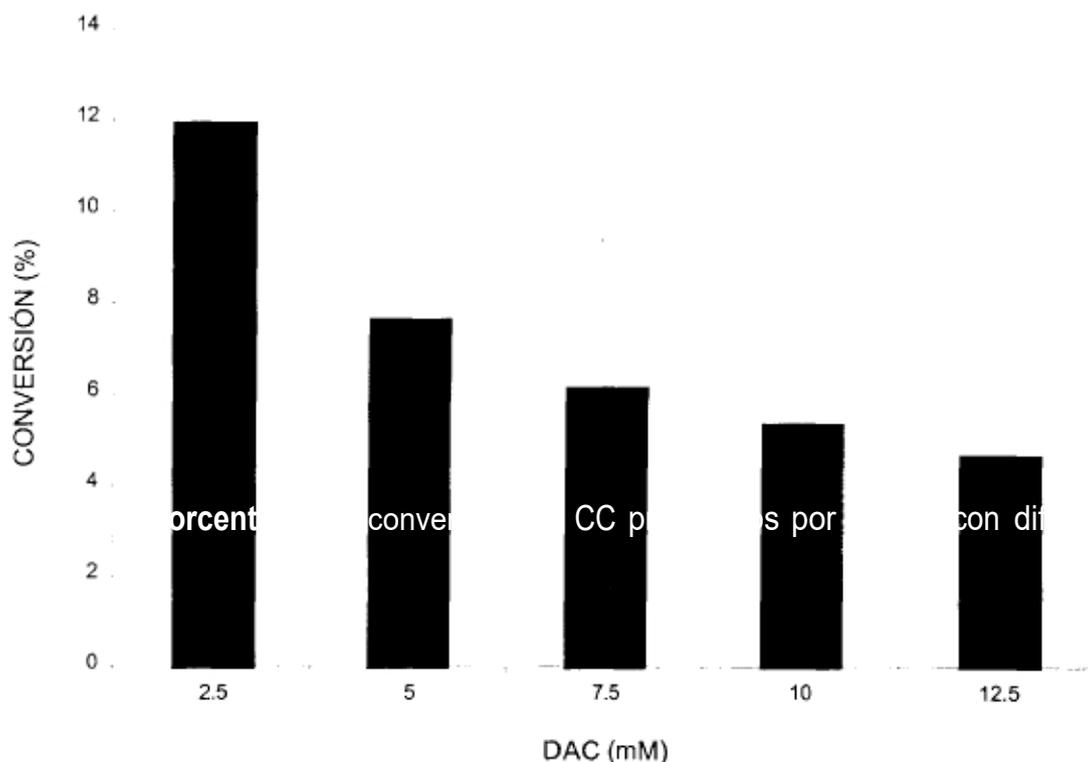


Figura 17. Porcentajes de conversión de CC producidos por la ACT con diferentes concentraciones de sustrato.

En la Tabla 5 se muestran los datos de los recíprocos de las velocidades y de las concentraciones de sustrato, para calcular los parámetros cinéticos del sistema libre con variación en la concentración de sustrato. En la Figura 18 se presenta la gráfica de Lineweaver-Burk para el mismo sistema. Los datos experimentales generaron los siguientes parámetros cinéticos: $V_{\text{máx}}=8.56 \text{ mol.lit}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $K_m=3.43 \times 10^{-3} \text{ mol.lit}^{-1}$, $K_{\text{cat}}=2.21 \text{ min}^{-1}$ y especificidad de 643.23 min^{-1} .

| 1/S | 1/V |
|-------|-------|
| 0.4 | 0.271 |
| 0.2 | 0.212 |
| 0.133 | 0.175 |
| 0.1 | 0.153 |
| 0.08 | 0.139 |

Tabla 5. Recíprocos de la concentración de sustrato y velocidad para calcular la velocidad máxima y la K_m utilizando la ecuación de Lineweaver-Burk.

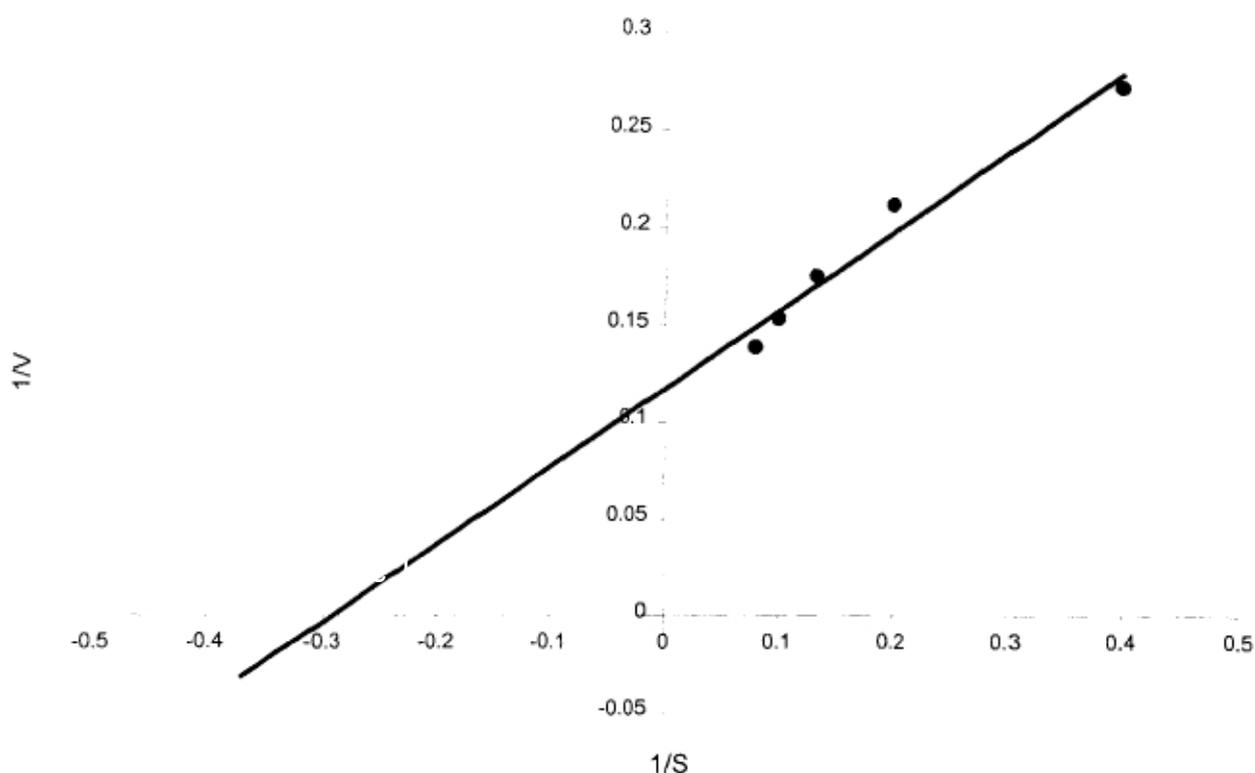


Figura 18. Gráfica de Lineweaver-Burk con sustrato variable y concentración de proteína constante.

3.3.1.3 PERFIL DE LA ACT EN EL SISTEMA LIBRE

La caracterización de la ACT con el sistema libre se realizó bajo condiciones estándares de reacción (2.2.8.1), obteniendo los siguientes parámetros cinéticos: velocidad máxima aparente $V_{m\acute{a}x(ap)}=5.89 \times 10^{-6} \text{ mol.lit}^{-1}.\text{min}^{-1}$ y $K_{cat}=0.757 \text{ min}^{-1}$, al analizar la Figura 19 observamos el perfil enzimático de la ACT en el sistema libre, mismo que sigue el clásico comportamiento descrito por el modelo de Michaelis-Menten, alcanzando la velocidad máxima al cabo de las tres horas de reacción.

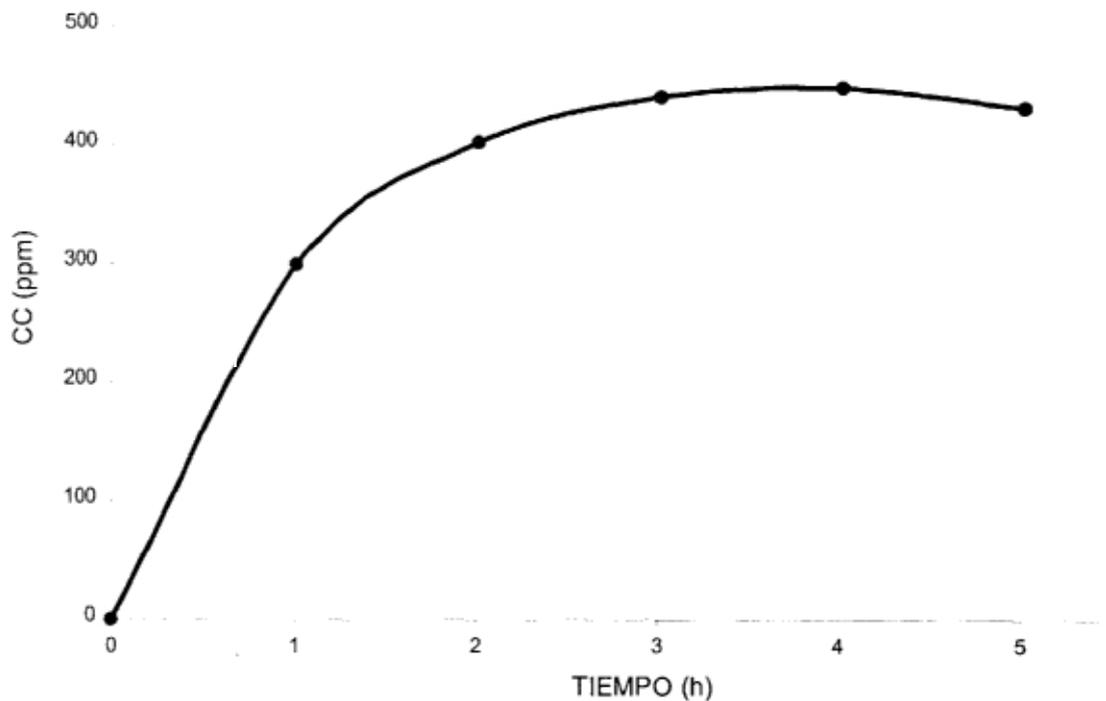


Figura 19. Perfil de la actividad enzimática de la ACT en el sistema libre a diferentes periodos de incubación.

3.3.2 INMOVILIZACIÓN: ANÁLISIS PRELIMINARES

Para evaluar la funcionalidad y compatibilidad del soporte y el extracto libre de células conteniendo a la ACT, se procedió a inmovilizar el extracto con actividad enzimática en tres diferentes polímeros como se indica (2.2.7.1, 2.2.7.2, 2.2.7.3).

En forma preliminar se procedió a evaluar el efecto de la coinmovilización del extracto conteniendo a la ACT en presencia de AcCoA sobre los niveles de actividad catalítica de ésta, empleando alginato como soporte polimérico. La inmovilización se realizó en tres modalidades diferentes: 1) extracto crudo inmovilizado en alginato al 2%, 2) extracto crudo y AcCoA (2.5 mM) inmovilizados en alginato al 2%, 3) extracto crudo (proteína 116.8 µg) y AcCoA (2.5 mM) inmovilizados en alginato al 2%. Los resultados se observan en la Tabla 6, los mayores niveles de CC se obtuvieron al coinmovilizar el extracto con una concentración de proteína de 116.8 µg con la AcCoA, produciendo 105.96 ppm y un porcentaje de conversión de 11.39%, superando apreciablemente los resultados obtenidos al inmovilizar únicamente el extracto.

| SISTEMA | CC (ppm) | CONVERSIÓN (%) |
|----------------------|----------|----------------|
| Extracto (A) | 73.45 | 7.89 |
| Extracto (B) AcCoA | 81.77 | 8.79 |
| Extracto (C) + AcCoA | 105.96 | 11.39 |

Tabla 6. Niveles de CC y porcentajes de conversión al realizar la inmovilización de extracto con tres variantes diferentes en alginato como soporte. Donde A y B=58.4 µg, C=116.8 µg.

3.3.2.1 PERFIL DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA INMOVILIZADA EN ALGINATO

El alginato fue el primer polímero analizado durante el presente estudio. Los parámetros cinéticos obtenidos para éste sistema son $V=5.359 \times 10^{-6} \text{ mol.lit}^{-1}.\text{min}^{-1}$ y $K_{cat}=0.687 \text{ min}^{-1}$. Se observa un perfil descendente al transcurrir el tiempo de reacción en la Figura 20, donde se aprecia como los niveles de CC tienden a mantenerse constantes a lo largo de la reacción, no obstante la disminución presentada en algunos puntos.

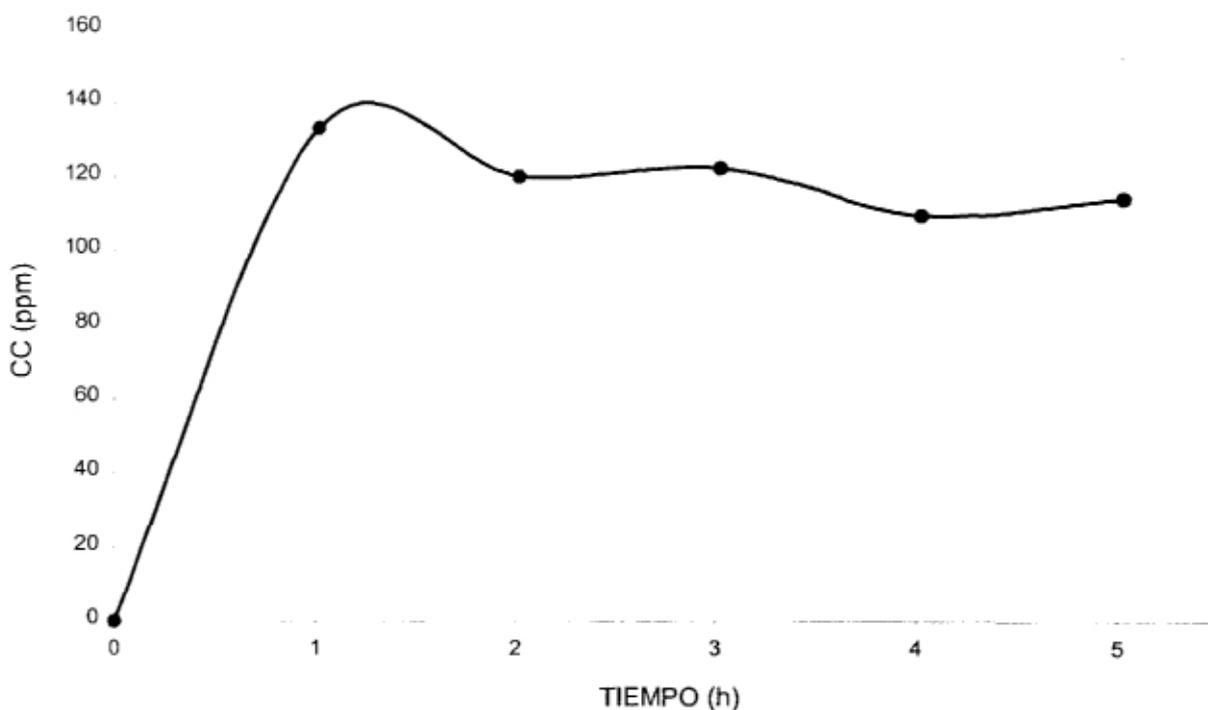


Figura 20. Perfil de la ACT en el sistema inmovilizado con alginato.

3.3.2.2 PERFIL DE LA ENZIMA INMOVILIZADA EN AGAROSA

La agarosa fue otro de los polímeros utilizados durante el presente estudio, la reacción se realizó bajo condiciones estándares, los parámetros cinéticos obtenidos para éste sistema son $V=2.18 \times 10^{-6} \text{ mol.lit}^{-1}.\text{min}^{-1}$ y $K_{cat}=0.28 \text{ min}^{-1}$. En la Figura 21 se observa el perfil enzimático para el extracto inmovilizado en agarosa a pesar de que existen fluctuaciones en los niveles de CC a lo largo de la reacción, el perfil de la enzima se estabiliza conforme transcurre el tiempo de reacción.

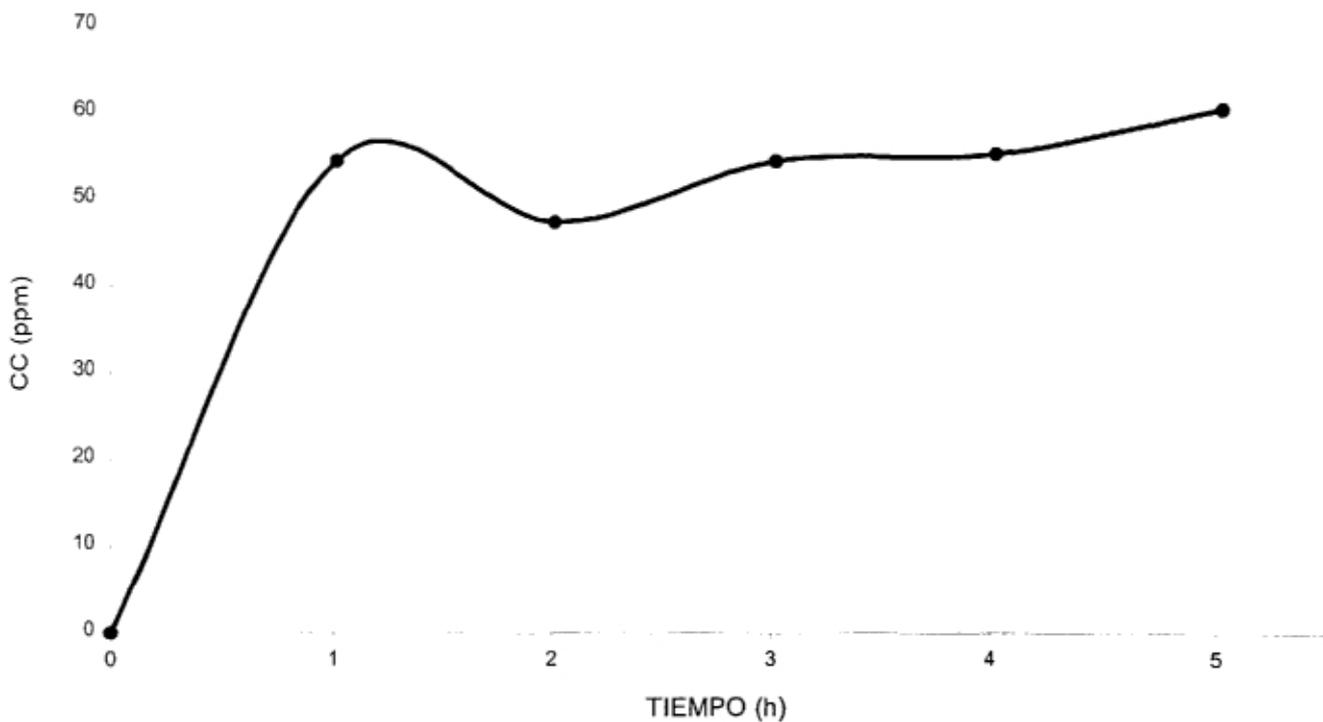


Figura 21. Perfil de la ACT en el sistema inmovilizado con agarosa.

3.3.2.3 PERFIL DE LA ENZIMA INMOVILIZADA EN POLIACRILAMIDA

A diferencia de los otros sistemas, en reacciones efectuadas con micropartículas de poliacrilamida no se detectó CC immobilizando 58.4 μg de proteína, por lo cual los niveles de proteína se tuvieron que duplicar (116.8 μg). En la Figura 22 se aprecia como ésta dosis de proteína muestra una actividad muy notoria que incrementa linealmente a partir de la segunda hora de incubación y continúa aumentando más allá de las cinco horas de incubación. Los parámetros cinéticos obtenidos fueron $V=3.68 \times 10^{-6} \text{mol.lit}^{-1}.\text{min}^{-1}$ y $K_{\text{cat}}= 0.473 \text{min}^{-1}$.

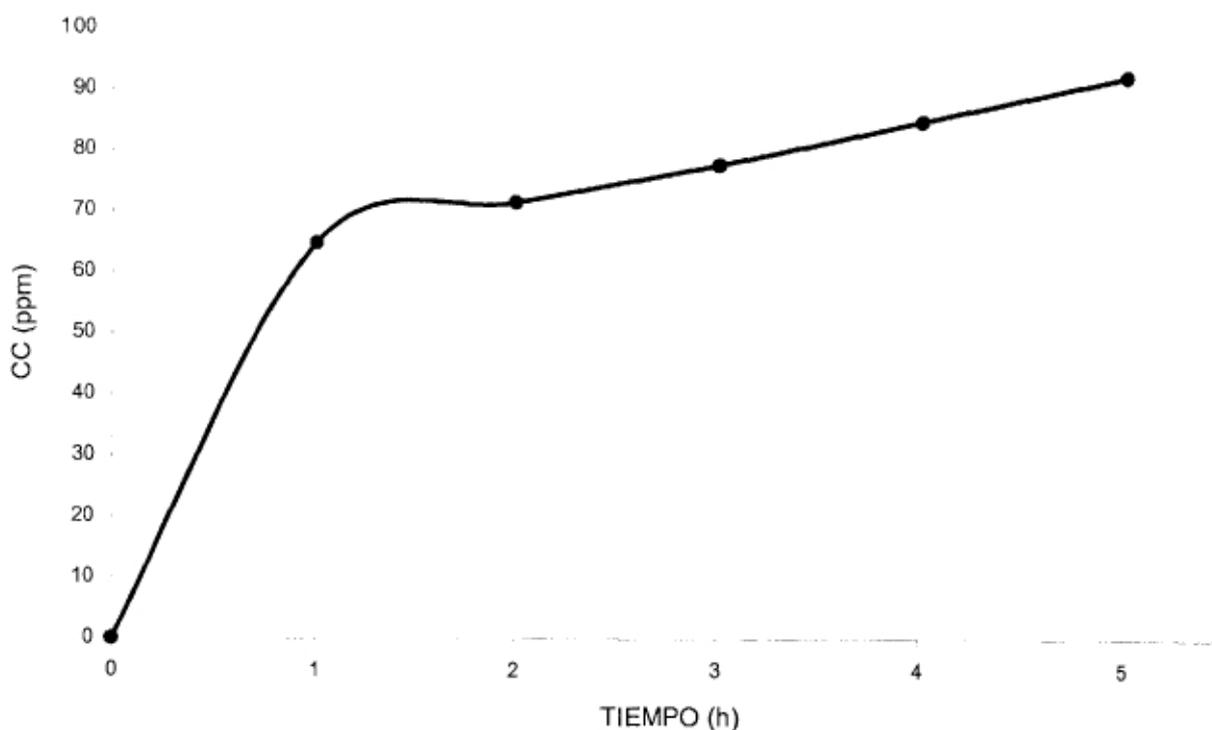


Figura 22. Perfil de la ACT en el sistema inmovilizado con poliacrilamida.

3.3.4 ANÁLISIS DEL SISTEMA INMOVILIZADO

Al analizar los niveles de CC obtenidos con los diferentes soportes utilizados para la inmovilización, se seleccionó al alginato como el polímero a emplear para la realización de experimentos de reutilización. Puesto que fue en éste donde se detectaron los mayores niveles de CC a lo largo de la reacción (133.46 ppm valor máximo), en contraste con los obtenidos con agarosa (60.32 ppm valor máximo) y poliacrilamida (91.78 ppm valor máximo).

| Tiempo (h) | CC (ppm) | | | Conversión (%) | | |
|------------|----------|-------|-------|----------------|------|------|
| | L | G | P* | L | G | P* |
| 1 | 133.46 | 54.49 | 64.79 | 14.35 | 5.85 | 6.96 |
| 2 | 120.29 | 47.37 | 71.35 | 12.93 | 5.09 | 7.67 |
| 3 | 122.46 | 54.46 | 77.48 | 13.16 | 5.85 | 8.33 |
| 4 | 109.60 | 55.26 | 84.56 | 11.78 | 5.94 | 9.09 |
| 5 | 114.04 | 60.32 | 91.78 | 12.26 | 6.48 | 9.86 |

Tabla 7. Niveles de CC y porcentajes de conversión de los diferentes soportes utilizados para la inmovilización; donde L=Alginato, G=Agarosa y P*=Poliacrilamida (proteína 116.8 µg).

3.3.5 CICLOS DE UTILIZACIÓN DEL SISTEMA INMOVILIZADO EN ALGINATO AL 2%

El alginato fue el sistema seleccionado para realizar estudios sobre el perfil de la enzima realizando ciclos de reutilización² (2.2.7.1.1). El perfil enzimático para el sistema se muestra en la Figura 23, mientras que en la Figura 24 se observan los porcentajes de conversión. Al finalizar el experimento se detectaron porcentajes de actividad del 44.5-61 %.

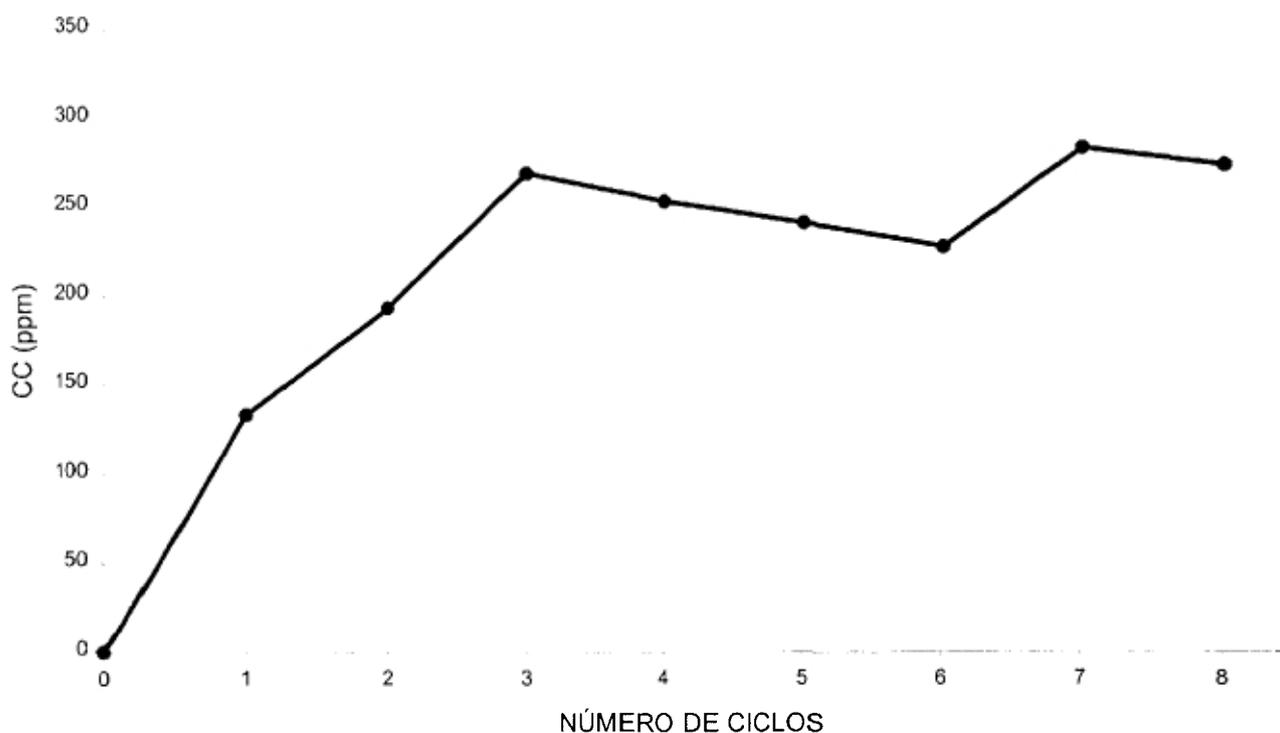


Figura 23. Ciclos de utilización del sistema inmovilizado en alginato.

² Se siguió el protocolo de inmovilización descrito en el apartado 2.2.7.1, la mezcla de extracto (58.4 μ g) y AcCoA 2.5 mM (50 μ L), se inmovilizó en 400 μ L de alginato al 2% y las esferas se sometieron a reacción bajo condiciones estándares (2.2.8.2) deteniendo ésta después de 1 h de incubación (un ciclo de actividad = 1 hora de reacción). El producto fue retirado de la mezcla y las esferas se lavaron dos veces con agua destilada, antes de ser agregadas nuevamente a otro tubo eppendorf y realizar otro ciclo bajo las condiciones descritas previamente (2.2.8.2). El producto de reacción de cada corrida experimental se analizó por HPLC, hasta completar un número total de 8 ciclos.

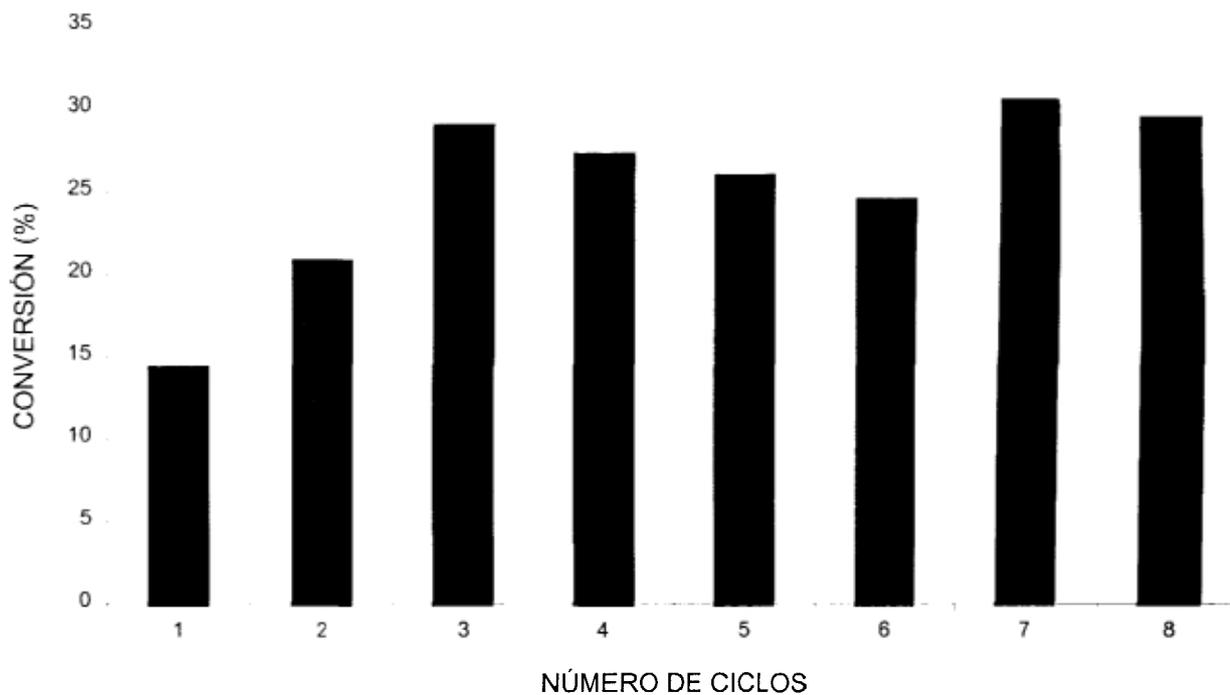


Figura 24. Porcentajes de conversión en el sistema inmovilizado en alginato.

No obstante la labilidad descrita para la acetiltransferasa, se detectó actividad enzimática en los dos sistemas utilizados en la investigación. Para el caso de la inmovilización de la enzima en diferentes soportes poliméricos, existen algunas explicaciones postuladas sobre las causas de los altos o bajos niveles de actividad enzimática en dichos sistemas.

CAPÍTULO CUATRO

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La bioconversión de DAC a CC es la última reacción en la biosíntesis de CC en *Acremonium chrysogenum* y ésta reacción es catalizada por la ACT. Fujisawa en 1975 fue el primero que detectó su actividad en extractos de *Acremonium chrysogenum* mientras que los primeros estudios bioquímicos sobre la purificación y caracterización parcial de la enzima fueron reportados por Scheiddeger *et al.*, (1985) y posteriormente Matsuyama *et al.*, (1992) purificó la enzima de una cepa de utilización industrial realizando también algunos ensayos enzimáticos.

Tomando en cuenta estos antecedentes y la escasa investigación realizada para describir su comportamiento a nivel de extracto en diferentes sistemas de reacción, en el presente trabajo se ha investigado y contrastado el comportamiento catalítico de la enzima en un sistema libre y en un sistema inmovilizado empleando diferentes soportes poliméricos para el atrapamiento de la enzima.

A lo largo de la investigación se trabajó con extracto y en la reacción se mantuvo constante la concentración de proteína (58.4 μg) y la concentración de sustrato (2.5 mM) para ambos sistemas. Para realizar la selección del nivel óptimo de proteína, la reacción se efectuó variando la concentración de proteína desde 19.126 μg hasta 58.6 μg manteniendo constante la concentración de sustrato (DAC 5.0 mM) y seleccionando como valor óptimo una concentración de proteína de 58.412 μg , concentración que produjo los mayores niveles de CC (176.63 ppm) y porcentajes de conversión (9.5%).

La caracterización parcial de la enzima (Figura 16) y la selección de la concentración de sustrato se realizaron de manera paralela, en éste experimento se utilizaron concentraciones de DAC de 2.5-12.5 mM y los volúmenes de la mezcla de reacción se mantuvieron constantes a lo largo de la reacción: buffer de fosfatos (50 mM, 50 μL y pH 7.0), MgSO_4 5 mM (25 μL) y concentración de proteína (58.4 μg), las muestras se incubaron a 37°C por 30 minutos. El nivel de sustrato productor de los mayores niveles de conversión fue DAC 2.5 mM (930 ppm), concentración utilizada para el resto de los experimentos incluyendo los de inmovilización. Bajo éstas condiciones se obtuvieron los siguientes parámetros cinéticos: $V_{\text{máx}}=8.56 \text{ mol.lit}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $K_m=3.437 \times 10^{-3} \text{ mol.lit}^{-1}$, $K_{\text{cat}}=2.21 \text{ min}^{-1}$ y especificidad $K_{\text{cat}}/K_m=668.57 \text{ mol.lit}^{-1}.\text{min}^{-1}$, estos parámetros sugieren que la enzima sigue el comportamiento clásico descrito por la ecuación de Michaelis-Menten, comportamiento que coincide con el descrito previamente por Matsuyama *et al.*, (1992).

El valor de la constante de Michaelis es pequeño, parámetro indicativo de la afinidad de la ACT por el sustrato (DAC), los valores obtenidos para la constante de catálisis no fueron de la magnitud esperada (i.e arriba de 10^3 o mayores), factor que puede encontrarse en asociación con un bajo número de colisiones entre el sitio activo de la enzima y el sustrato, haciendo que la formación de los complejos enzima-sustrato sea esporádica y no con la frecuencia y rapidez que pudiera esperarse. Factores determinantes en los valores de las constantes cinéticas de la enzima fueron: su extrema labilidad fuera del ambiente celular y el propio sistema *in vitro* ya que se está tratando de simular el microambiente en el cual se encuentra inmersa la enzima en condiciones naturales.

Partiendo estrictamente del objetivo de la investigación, la conversión de DAC a CC es una reacción unimolecular porque únicamente se involucra una especie dentro de los reactantes (DAC) para llegar a la obtención del producto (CC), siendo una reacción de primer orden con respecto a la concentración de DAC. Sin embargo, tomando en cuenta las características de la reacción, la AcCoA es la entidad química donadora del grupo acetilo y por tanto la velocidad de reacción también se encuentra asociada a la velocidad de formación primero del complejo enzima-AcCoA y después del complejo enzima-AcCoA-DAC durante el cual se debe realizar la reacción de transferencia del grupo acetilo de la AcCoA hacia el sustrato (DAC). De éste modo la reacción podría ser de segundo orden considerando que las dos especies (DAC y AcCoA) tienen influencia directa en la velocidad de reacción.

El mecanismo de acción de la ACT así como los aminoácidos que conforman los sitios activos involucrados en catálisis no se han reportado hasta la fecha, existen estudios sobre las características de la acetilcolinesterasa, enzima que realiza una función de transferencia del grupo acetilo (similar al de la ACT) de la AcCoA a la colina. Estableciendo una analogía basados en lo anterior, la histidina podría encontrarse en el sitio activo de la enzima y ser la responsable de una catálisis del tipo ácido-base de la siguiente manera: la ACT realiza la transferencia del grupo acetilo proveniente de la AcCoA a la DAC en presencia de un cofactor como el magnesio, cuya función es estabilizar la estructura terciaria de la enzima, facilitándole la adopción de la conformación adecuada para realizar ésta función y de un buffer de fosfatos 50 mM (pH 7.0) para mantener constante la fuerza iónica del medio de reacción, evitando cambios conformacionales de la proteína durante el transcurso de la reacción. El grupo acetilo con carga negativa proveniente de la AcCoA realiza un ataque electrofílico sobre el grupo metileno de la DAC, desplazando al grupo hidroxilo con carga negativa, ésta carga negativa es estabilizada al unirse a uno de los nitrógenos del grupo imidazol de la histidina. Iones metálicos presentes en el medio de reacción tales como el magnesio, estabilizan las cargas negativas como la del hidroxilato, fenómeno que se conoce como catálisis electrofílica.

La inmovilización de enzimas forma parte del desarrollo de una nueva tecnología en la producción de diversos compuestos de interés farmacéutico, sin embargo no

existen trabajos de investigación previos donde se haya descrito el comportamiento de la ACT en sistemas inmovilizados. La selección del soporte polimérico se realizó tomando como base las características de cada método de inmovilización, decidiendo inmovilizar por el método de atrapamiento con alginato, agarosa y poliacrilamida como soportes. En éste método la enzima se encuentra confinada en una matriz polimérica que se entrecruza formando redes y canales, a través de los cuales se realiza la difusión del sustrato hacia el interior de la partícula.

El primer polímero utilizado para éste estudio fue el alginato y se realizaron experimentos preliminares al inmovilizar extracto crudo en tres diferentes modalidades (sección 2.2.7.1). Resultados positivos fueron obtenidos al detectar diferentes niveles de CC en cada uno de los tres sistemas analizados: el sistema extracto-alginato generó 73.45 ppm y un porcentaje de conversión de 7.89%, el sistema extracto-AcCoA generó 81.77 ppm y un porcentaje de conversión de 8.79%, mientras que el tercer sistema (extracto con proteína 116.8 μg) generó 105.96 ppm y un porcentaje de conversión de 11.39%. Un hecho interesante fue la observación de que los niveles de CC producida fueron mayores en el sistema extracto + acetilcoenzima A inmovilizado en alginato y también en él sistema extracto (proteína 116.8 μg) + acetilcoenzima A inmovilizado en alginato con relación al sistema extracto-alginato. Matsuyama *et al.*, estableció en 1992 que el grupo acetilo proveniente del ácido 7-aminocefalosporánico ejerce efectos estabilizantes sobre la enzima mediante la donación del grupo acetilo. Un fenómeno similar puede presentarse en éste caso, donde la AcCoA puede donar el grupo acetilo a la enzima y estabilizarla, explicando de ésta manera los mayores niveles de actividad en dichos sistemas. A lo anterior puede aunarse la mayor homogeneidad existente en los sistemas, donde la coinmovilización del extracto crudo con actividad de la ACT y la AcCoA se realizó mezclando previamente estos componentes antes de realizar la inmovilización en alginato. El procedimiento anterior podría facilitar la reducción de problemas difusionales por parte de la AcCoA que generan bajos niveles de actividad. Sin embargo éste mecanismo aún no ha sido comprobado y necesitan realizarse más estudios al respecto. No obstante la labilidad descrita para ésta enzima, se detectó actividad enzimática con el sistema inmovilizado en alginato por atrapamiento, para cada una de las variantes analizadas.

La selección de la variante utilizada para los experimentos de inmovilización posteriores se realizó tomando como base los niveles de cefalosporina producidos, si bien fueron obtenidos mayores niveles con el tercer sistema (sección 2.2.7.1), la optimización de reactantes llevó a la selección del segundo sistema como modelo para los experimentos subsecuentes. Bajo condiciones estándares de reacción, se efectuaron las reacciones con extracto-AcCoA inmovilizado en alginato (2%) variando el tiempo de reacción de 1-5 h. Al analizar el perfil de la enzima en éste sistema, se detectó actividad enzimática del 26-45%, obteniendo mayores niveles de CC durante los primeros 60 min de la reacción (Figura 20). Los niveles de producción presentan variaciones mínimas a lo largo

de los diferentes tiempos de reacción, tendiendo a mantenerse constantes durante el transcurso de la misma. Éste fenómeno puede ser indicador de la estabilidad del sistema, tal como puede apreciarse al analizar los resultados de productividad del sistema libre e inmovilizado (ANEXO OCHO), donde los sistemas inmovilizados generaron mayores niveles de productividad (alginato 13.27 ppm/min, agarosa 14.59 ppm/min y acrilamida 14.42 ppm/min) que el sistema libre (10.506 ppm/min), demostrando que la estabilidad de la enzima es mayor en sistemas inmovilizados que en el sistema libre; donde el tiempo de reacción constituye un factor determinante sobre los niveles de producción, como lo podría constituir la disponibilidad del sustrato y de cofactores en el medio de reacción. Explicando así los altos niveles de actividad enzimática detectados al inicio de la reacción donde tanto el sustrato como los cofactores se encuentran en exceso; contrastando con los niveles inferiores detectados conforme transcurría la reacción causados por la asociación del sustrato y cofactores a la enzima, para realizar la formación de producto mediante la formación de complejos del tipo enzima-sustrato-cofactor.

En el anexo cuatro se encuentra la micrografía de una esfera de alginato donde se observa la morfología externa de ésta, su análisis permite apreciar el contorno circular de la partícula así como la presencia de una membrana externa que la circunda en forma total, esta barrera puede ser resultado de la unión de los iones Ba^{+2} con el alginato durante el proceso de endurecimiento y curado de la partícula; detalles sobre las características de la red y el tamaño de poro (el promedio general de los poros de alginato es de 15 nm) y la existencia o ausencia de canales que permitan una difusión adecuada del sustrato no pueden apreciarse en ésta fotografía, por tanto estudios de microscopía posteriores serán necesarios para permitir el análisis de las características de la red. La estabilidad mostrada por el sistema crea expectativas para la utilización de procesos biocatalíticos inmovilizados con alginato para la producción de CC.

Acorde a lo descrito por Seifert *et al.*, (1997), factores tales como la viscosidad, peso molecular y contenido de ácido poligulurónico contribuyen a incrementar o disminuir los niveles de actividad enzimática al utilizar alginato como soporte; dado que un polímero de alta viscosidad y elevado contenido de ácido poligulurónico forma geles rígidos y densos en presencia de cationes divalentes como el Ca^{+2} y el Ba^{+2} , causando un incremento en la resistencia difusional de sustrato y cofactores, generando la detección de bajos niveles de actividad enzimática. La viscosidad juega un papel importante en cuanto a la formación de la esfera se refiere, dado que a mayor viscosidad es más difícil obtener esferas de diámetro pequeño (1-2 mm), incrementando las barreras difusionales para el sustrato y los cofactores. Como parte del primer estudio realizado bajo ésta modalidad, la caracterización de la ACT en el sistema inmovilizado en alginato se realizó con un polímero de alta viscosidad (14000cps). Es necesario efectuar estudios subsecuentes donde el objetivo sea analizar el efecto de un solo soporte con diferentes características al inmovilizar a la ACT.

Continuando con los estudios sobre inmovilización de la ACT con diferentes soportes, el siguiente polímero en estudio fue la agarosa de bajo punto de fusión.

El extracto en éste sistema permitió detectar actividad enzimática en porcentajes del 12-18%, en relación con el sistema libre. Al igual que en el sistema inmovilizado con alginato, los niveles de producción presentan una variación ligera a lo largo de la reacción, factor indicativo de la estabilidad de la enzima inmovilizada en éste sistema (Figura 21). En contraste con el alginato, los niveles de producción en agarosa son menores y estos tienden a incrementar mínimamente conforme transcurre el tiempo de reacción, la presencia de mayores barreras difusionales en contraste con el alginato podría proporcionar una explicación al respecto. En el anexo cinco se observa una micrografía de la morfología externa de las esferas de agarosa, las cuales tienen forma elipsoidal, sin embargo, detalles tales como la red formada por el polímero no pudieron ser observados, para ello se necesitará la realización de estudios de microscopía posteriores que analicen a detalle tanto el tipo de red formada como la presencia o ausencia de canales, para optimizar la difusión del sustrato y cofactores hacia el interior de la esfera. Al igual que el alginato, éste sistema es muy estable a lo largo de los diferentes tiempos de reacción.

No se detectaron niveles de CC al inmovilizar una concentración total de 58.4 μg de proteína en poliacrilamida, éste hecho pudo haber sido causado por la ausencia de disponibilidad de la enzima o del sustrato. En un experimento subsecuente, se inmovilizó el doble de la concentración de proteína (116.8 μg), detectando niveles de actividad del 17.6-21.62% con relación al sistema libre. A diferencia de los otros sistemas, el perfil enzimático de la poliacrilamida (Figura 22) es ascendente conforme transcurre el tiempo de reacción, lo cual indica que la velocidad de formación de los complejos enzima-sustrato es muy activa reflejándose en los altos niveles de actividad. En el anexo seis se observa una micrografía de la apariencia externa de una partícula inmovilizada en poliacrilamida, un corte sagital de ésta permite distinguir en la superficie central de la partícula la presencia de zonas verticales tipo canal. Sin embargo se requiere la realización de mayores estudios de microscopía para caracterizar la red formada por la poliacrilamida, tamaño de poro y presencia o ausencia de canales.

Idealmente todas las reacciones son equimolares, una molécula de sustrato reacciona para dar lugar a la formación de una molécula de producto; en la práctica raras veces se cumple ésta relación, fenómeno que podemos apreciar al analizar los datos sobre velocidad máxima y número de recambio obtenidos para la ACT en el sistema libre e inmovilizado. Los resultados obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos se obtuvieron bajo las condiciones estándares de reacción: buffer de fosfatos 50 mM (pH 7.0) 200 μL , MgSO_4 5 mM (25 μL), AcCoA 2.5 mM (50 μL), DAC 2.5 mM (50 μL) y una concentración de proteína de 58.4 μg , con un tiempo de incubación de 1-5 h y temperatura de incubación de 37°C. Las velocidades máximas aparentes obtenidas fueron para el sistema libre de $5.89 \times 10^{-6} \text{ mol.lit}^{-1}.\text{min}^{-1}$, con alginato $5.35 \times 10^{-6} \text{ mol.lit}^{-1}.\text{min}^{-1}$, agarosa $2.18 \times 10^{-6} \text{ mol.lit}^{-1}.\text{min}^{-1}$, poliacrilamida $3.68 \times 10^{-6} \text{ mol.lit}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (el valor fue obtenido doblando la cantidad de proteína inmovilizada 116.8 μg). La K_{cat} de la enzima para cada uno

de los sistemas fue la siguiente: sistema libre 0.757 min^{-1} , alginato 0.687 min^{-1} , agarosa 0.28 min^{-1} , acrilamida 0.473 min^{-1} (obtenido con $116.8 \mu\text{g}$ de proteína). Estos resultados permiten apreciar que la mayor velocidad se alcanza al trabajar con el sistema libre, donde la enzima realiza con mayor rapidez la conversión de sustrato en producto dada la ausencia de barreras físicas como las causadas por la inmovilización. En el caso de los sistemas inmovilizados, la mayor velocidad se obtiene en el sistema inmovilizado con alginato y en orden descendente agarosa y poliacrilamida.

Se realizó el análisis de actividad del sistema inmovilizado mediante ciclos de reutilización, para ello se seleccionó al soporte que generó los niveles máximos de actividad durante los experimentos anteriores. El alginato fue el sistema elegido para realizar estos experimentos, ofreciendo un mayor nivel de actividad enzimática (26-45%) comparado con el 12-18% generado por la agarosa y el 17.6-21.62% obtenido con la poliacrilamida. El sistema inmovilizado se sometió a ciclos continuos de reacción bajo condiciones estándares (sección 2.2.8.1), variando el tiempo de reacción de 1-8 h. Los niveles de actividad detectados en el sistema produjeron niveles de CC del 44.5-61%, con tendencia creciente conforme transcurría el tiempo de reacción (Figura 23), pero con inflexiones a lo largo de los diferentes tiempos de reacción, asociado a una posible saturación del sistema.

Es importante aclarar que la dependencia estricta entre los fenómenos de difusión causados por las características intrínsecas (viscosidad, peso molecular, composición química) y extrínsecas (pH, fuerza iónica, temperatura, concentración) del polímero, que afectan a la enzima no han sido estudiados, por tanto estas interacciones deberían ser sujeto de mayor investigación antes de poder correlacionar dichos efectos.

CAPÍTULO CINCO

CONCLUSIONES

Se realizó el diseño y estudio de un sistema con actividad para la acetiltransferasa a base de extracto en dos sistemas diferentes libre e inmovilizado, por atrapamiento en alginato, agarosa y acrilamida. En ambos sistemas se identificó la actividad de la acetiltransferasa mediante la conversión de DAC a CC, realizando la detección de los niveles de CC mediante cromatografía de líquidos de alta resolución y corroborando la identidad del compuesto por coelusión con estándares.

Los ensayos enzimáticos realizados con el sistema libre permitieron detectar la actividad de la ACT en el medio de reacción y establecer que la enzima sigue el comportamiento descrito por la ecuación de Michaelis-Menten.

Diferentes niveles de actividad enzimática se detectaron al inmovilizar a la acetiltransferasa en tres polímeros diferentes, donde los mayores niveles de actividad en el sistema inmovilizado se obtuvieron al trabajar con alginato. Estos, son bajos comparados con los del sistema libre, sin embargo, en términos de productividad los sistemas inmovilizados generaron mayores niveles que el sistema libre, mostrando la enzima mayor estabilidad al encontrarse inmovilizada que al estar libre. Al parecer en los bajos niveles de actividad del sistema inmovilizado se encuentran implicadas características intrínsecas del polímero utilizado como el tipo de red, tamaño de poro y presencia de canales, pero no se tienen evidencias que permitan aseverar estas afirmaciones.

No obstante los diferentes niveles de actividad obtenidos en los sistemas inmovilizados, la enzima muestra un perfil estable a lo largo de la reacción, éste factor podría ser aprovechado para realizar el escalamiento y posterior implementación de los procesos enzimáticos en sistemas inmovilizados para la producción de CC a nivel industrial.

La actividad de la acetiltransferasa fue evaluada en un sistema catalítico *in vitro*, mediante la utilización de dos sistemas de reacción, la detección de diferentes niveles de actividad en cada uno de los soportes poliméricos utilizados para la inmovilización, permite establecer un método alternativo a la fermentación y transformación química para la obtención de CC haciendo uso de la biocatálisis enzimática.

CAPÍTULO SEIS

RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIÓN FUTURA

- ◆ Sería de gran utilidad investigar el perfil catalítico de la enzima con transferasas de diferentes organismos eucariotes y procariotes.
- ◆ El análisis de las características de la partícula en los niveles de actividad debe ser evaluado en función de las características del polímero, factores tales como tamaño de poro, grado de entrecruzamiento y características intrínsecas de la red deberán estudiarse para correlacionar como éstas características afectan los niveles de actividad enzimática.
- ◆ En el caso particular del alginato es necesario realizar estudios de actividad catalítica con varios tipos de alginato, con diferente contenido de cadenas de ácido poligulurónico, baja viscosidad y grado de porosidad del gel formado.
- ◆ Se sugiere investigar las características morfológicas del soporte polimérico, así como la realización de estudios complementarios apoyados en técnicas de microscopía y videomicroscopía.
- ◆ Continuando con la caracterización de la enzima es necesario realizar estudios bioquímicos de inhibición, variando la concentración de sustrato y reactantes, y analizando el tipo de inhibición dependiendo de los análogos de sustrato utilizados.
- ◆ Es muy importante continuar con la caracterización de los sistemas inmovilizados dado que constituye un punto de amplio interés en el área de biocatálisis, y también lo es conocer el grado de variación catalítica de la enzima al encontrarse libre e inmovilizada que permita describir las condiciones más favorables para realizar un escalamiento a nivel industrial.

REFERENCIAS

- 1.- Aharonowitz Y., Bergmeyer J., Cantoral J. M. δ -(L- α -amino adipil-L-cysteinil-D-valine synthetase, the multienzyme integrating the four primary reactions in β -lactam biosynthesis, as a model peptide synthetase. *Bio/Tech*, **11**:807-10, 1993.
- 2.- Báez-Vásquez M. A., Adrio J. L., Piret J. M., Demain A. L. Further studies on the bioconversion of penicillin G into deacetoxycephalosporin G by resting cells of *Streptomyces clavuligerus* NP-1 (en prensa).
- 3.- Báez-Vásquez M. A., Demain A. L. Immobilized *Streptomyces clavuligerus* NP-1 cells for biotransformation of penicillin G into deacetoxycephalosporin G (en prensa).
- 4.- Baldwin J. E. Recent advances in penicillin biosynthesis. *Biochem J*, **194**:649-51, 1981.
- 5.- Bartoshevich YuE, Zaslavskaya P. L., Novak M. J. *Acremonium chrysogenum* differentiation and biosynthesis of cephalosporin C. *J Basic Microbiol*, **30**(5):313-20, 1990.
- 6.- Behmer C. J., Demain A. L. Further studies on carbon catabolite regulation of beta-lactam antibiotic synthesis in *Acremonium chrysogenum*. *Curr Microbiol*, **8**:107-14, 1983.
- 7.- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem*, **12**:248-54, 1976.
- 8.- Brakhage A. A. Molecular regulation in the regulation of β -lactam biosynthesis in fungi. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**(3):547-585, 1998.
- 9.- Bycroft B. W., Shute R. E. Chemistry and Biology of Penicillins and Cephalosporins. In *Biotechnology Handbooks 1: Penicillium and Acremonium*, by Pederby JF (ed). Plenum Press, New York and London, 1977. Capítulo 5, páginas 113-159.
- 10.- Cao S. G., Yang H., Ma. L., Guo S. Q. Enhancing enzymatic properties by the immobilization method. *Appl Biochem Biotechnol*, **59**: 7-14, 1996.
- 11.- Chibata I., (editor). *Immobilized Enzymes: Research and Development*. HALSTED PRESS, USA 1978. Página 5.
- 12.- Drew S. W., Winstanley D. J., Demain A. L.. Effect of norleucine on mycelial fragments in *Acremonium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol*, **31**:143-5, 1976.
- 13.- Drew S. W., Demain A. L.. Stimulation of cephalosporin C production by methionine peptides in a mutant blocked in reverse trans-sulfuration. *J Antibiotics*, **28**:889-95, 1975.
- 14.- Espeso E. A., Tilburn J., Arst H. N. pH determination is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J*, **12**:3947-56, 1993.
- 15.- Felix H. R., Nüesch J., Wehrli W. Microbiological ring expansion of penicillin N. *FEMS Microbiol Lett*, **8**:55-58, 1980.
- 16.- Fujisawa Y., Kikuchi M., Kanzaki T. Deacetylcephalosporin C synthesis by cell-free extracts of *Acremonium chrysogenum*. *J Antibiotics*, **30**:775-7, 1977.
- 17.- Gutierrez S., Velasco J., Hernandez F. The cef G gene of *Acremonium chrysogenum* is linked to the cef Ef gene and encodes a deacetylcephalosporin C

acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase. *J Bacteriol*, **174**(9):3056-3064, 1992.

18.- Heim J., Shen Y-Q., Wolfe S. Regulation of isopenicillin N synthetase and deacetoxycephalosporin C synthetase by carbon source during the fermentation of *Acremonium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **19**:232-36, 1984.

19.- Hook D. J., Chang L. T., Elander R. P. Stimulation of the conversion of penicillin N to cephalosporin by ascorbic acid, α -ketoglutarate and ferrous ions in cell-free extracts of strains of *Acremonium chrysogenum*. *Biochem Biophys Res Commun*, **87**:258-65, 1979.

20.- Jayatilake G. S., Huddleston J. A. Conversion of isopenicillin N into penicillin N in cell-free extracts of *Acremonium chrysogenum*. *Biochem J*, **194**:645-47, 1981.

21.- Kennedy J.F., White C. A., Melo E. H. M. The immobilization of enzymes and cells. *Chimicaoggi*, **21**-29, 1988.

22.- Konomi T., Herchen S. Cell-free conversion of δ -L- α -L-cisteinyl-D-valine into an antibiotic with the properties of isopenicillin N in *Acremonium chrysogenum*. *Biochem J*, **184**:427-430, 1979.

23.- Küenzi M.T. Regulation of cephalosporin C synthesis in *Acremonium chrysogenum* by phosphate and glucose control. *Arch Microbiol*, **128**:78-81, 1980.

24.- Kupka J., Shen Y-Q., Wolfe S. Studies on the ring-ciclization and ring expansion enzymes of β -lactam biosynthesis of *Acremonium chrysogenum*. *Can J Microbiol*, **29**:488-96, 1983.

24a.- Kupka J., Shen Y-Q., Wolfe S. Partial purification and properties of the α -ketoglutarate-linked ring expansion enzyme of β -lactam biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett*, **16**:1-6, 1983.

25.- Laskin A. I., Lechevalier H. A. (eds). Handbook of Microbiology, Volume II; Fungi, Algae, Protozoa and Virus. 2nd edition. CRC PRESS. Páginas 302-303. 1974.

26.- Lemke P. A., Brannon D.R. Microbial Synthesis of Cephalosporin and Penicillin Compounds. In Flynn E. H. (ed), Cephalosporins and Penicillins: Chemistry and Biology. New York Academic Press, 1972. Capítulo 9, páginas 370-437.

27.- Lübbe C., Wolfe S., Demain A. L.. Isopenicillin N epimerase activity in a high cephalosporin-producing strain of *Acremonium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **23**:367-8, 1986.

28.- Martin J. F., Gutierrez S., Demain A. L.. Antibiotics (β -Lactams). In Fungal Biotechnology by Anke T. (ed), Chapman & Hall, Weinheim, 1997. Capítulo 5, páginas 91-127.

29.- Mathison L., Soliday C. Cloning, characterization, and use in strain improvement of the *Acremonium chrysogenum* gen *cefG* encoding acetyl transferase. *Curr Genet*, **23**:33-41, 1993.

30.- Matsuda A., Sugiura H., Matsuyama K. Molecular cloning of ACT cDNA from *Acremonium chrysogenum*: sequence and expression of catalytic activity in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, **182**:995-1001, 1992.

31.- Matsuyama K., Matsuda A. Purification of acetyl coenzyme A:deacetylcephalosporin C O-acetyltransferase from *Acremonium chrysogenum*. *Biosc Biotech Biochem*, **56**(9):1410- 1412, 1992.

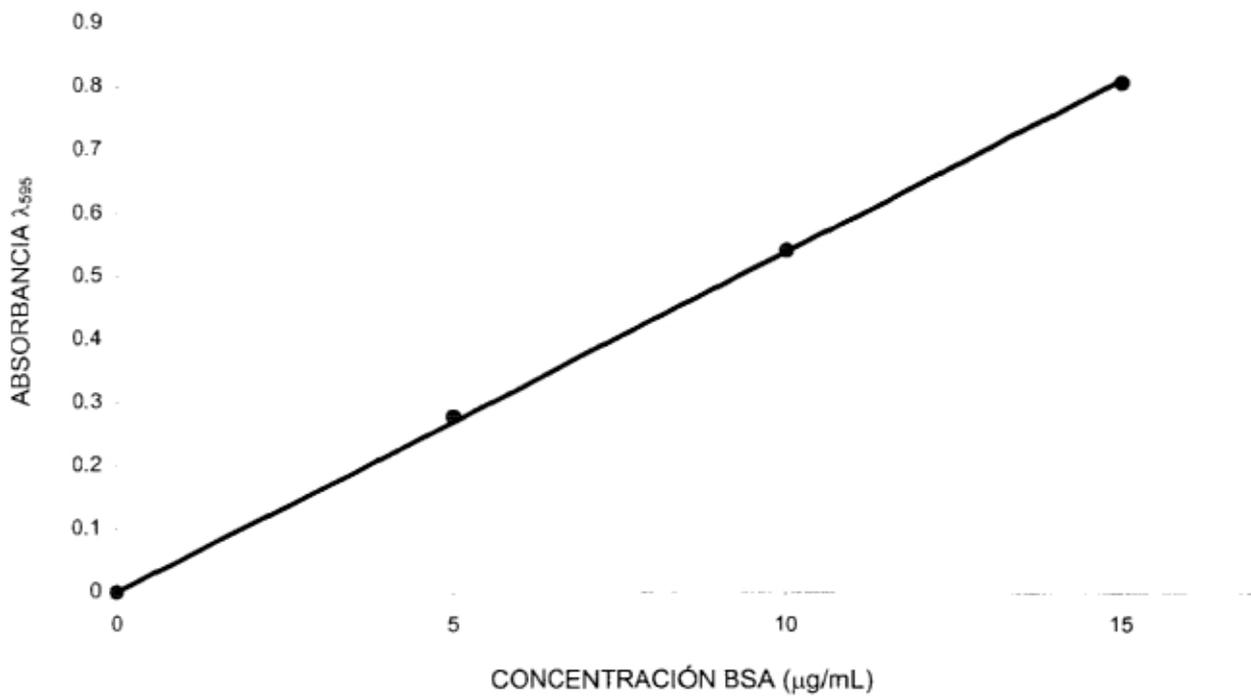
- 32.- Mazid M. A.. Biocatalysis and immobilized enzyme cell bioreactors. *Biotechnol*, **11**:690-695, 1993.
- 33.- McCoy M. Biocatalysis grows for drug synthesis. *C&EN*, 10-14, 1999.
- 34.- Mosbach K. Immobilized enzymes. *TiBS*, 1-3, 1980.
- 35.- Nagarajan R, Boeck L. D., Gorman M. β -lactam antibiotics from *Streptomyces*. *J Amer Chem Soc*, **93**, 2308, 1971.
- 36.- Nash C. H., Huber F. M. Antibiotic synthesis and morphological differentiation of *Acremonium chrysogenum*. *Appl Microbiol*, **22**:6-10, 1971.
- 37.- Onions A. H. S., Brady B. L. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In *Biotechnology Handbooks 1: Penicillium and Acremonium*, by Pederby JF (ed). Plenum Press, New York and London, 1977. Capitulo 1, páginas 1-37.
- 38.- Park H. Y., Khang Y. H. Production of cephalosporin C by immobilized *Acremonium chrysogenum* in polyethylenimine-modified barium alginate. *Enzyme Microb Technol*, **17**:408-412, 1995.
- 39.- Peñalva M. A., Rowlands R. T., Turner G. The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. *Trends Biotechnol*, **16**(9):369-373, 1998.
- 40.- Queener S. W, Ellis L. F. Differentiation of mutants of *Acremonium chrysogenum* in complex medium: the formation of unicellular arthrospores and their germination. *Can J Microbiol*, **21**:1981-96, 1975.
- 41.- Revilla G., Ramos F. R., Lopez-Nieto M. J. Glucose represses formation of ACVS and IPNS but not IPN in *Penicillium chrysogenum*. *J Bacteriol*; **168**(2):947-52, 1986.
- 42.- Revilla G., Lopez-Nieto M. J., Luengo J. M. Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *J Antibiot*; **37**(7):781-9, 1984.
- 43.- Roberts S. M. Introduction to biocatalysis using enzymes and microorganisms. Cambridge University, USA 1995. Página xii
- 44.- Sawada Y., Baldwin J. E., Singh P. D. Cell-free cyclization of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. *Antimicrob Agents Chemother*, **18**:465-70, 1980.
- 45.- Sawada Y., Hunt N. A., Demain A. L.. Further studies on microbiological ring expansion of penicillin N. *J Antibiot*, **32**:1303-10, 1979.
- 46.- Scheiddegger A., Küenzi M. T., Nüesch J. Partial purification and catalytic properties of a bifunctional enzyme in the biosynthetic pathway of β -lactams in *Acremonium chrysogenum*. *J Antibiotics*, **37**:522-31, 1984.
- 47.- Scheiddegger A., Gutzwiller A., Küenzi M. T. Investigation of acetylcoenzyme A: deacetylcephalosporin C O-acetyltransferase of *Acremonium chrysogenum*. *J Biotech*, **3**:109-117, 1985.
- 48.- Seifert D. B., Phillips J. A. Production of small monodispersed alginate beads for cell-immobilization. *Biotechnol Prog*, **13**:562-568, 1997.
- 49.- Sharma B. P., Bailey F., Messing R. Immobilized biomaterials- Techniques and applications. *Angew Chem Int De Engl*, **21**:837-854, 1982.
- 50.- Sheehan J. C., Henery-Logan K. R. The chemical conversion of penicillin G into a biologically active synthetic penicillin series. *J Am Chem Soc*, **81**:5838, 1959.
- 51.- Shen Y-Q., Heim J., Salomon N. A. Repression of β -lactam production in *Acremonium chrysogenum* by nitrogen sources. *J Antibiotics*, **37**:503-11, 1984.

- 52.- Shen Y-Q, Wolfe S., Demain A. L. Levels of isopenicillin N synthetase and deacetoxycephalosporin C synthetase in *Acremonium chrysogenum* strains producing high and low levels of cephalosporin C. *Bio/Tech*, **4**:61-64, 1986.
- 53.- Sweet R. M., Dahl L. F. Molecular architecture of the cephalosporins –insights into biological activity based on structural investigations. *J Amer Chem Soc*, **92**(18):5489-506, 1970.
- 54.- Turner M. K., Farthing J. E., Brewer S. J. The oxygenation of [3-methyl-3H] desacetoxycephalosporin C [7-β-(5-D-aminoadipamido)-3-methylceph-3-em-4-carboxylic acid] to [3-hidroxyethyl-3H] desacetoxycephalosporin C by 2-oxoglutarate-linked dioxygenases from *Acremonium chrysogenum* and *Streptomyces clavuligerus*. *Biochem J*, **173**(3):839-50, 1978.
- 55.- Velasco J., Gutierrez S., Fernandez F. J. Exogenous methionine increases levels of mRNAs transcribed from pcbAB, pcbC, and cefEF genes, encoding enzymes of the cephalosporin biosynthetic pathway in *Acremonium chrysogenum*. *J Bacteriol*, **176**:985-91, 1994.
- 56.- Velasco J., Gutierrez S., Campoy S., Martin J. F. Molecular characterization of the *Acremonium chrysogenum* cefG gene product: the native deaceylcephalosporin C acetyltransferase is not processed into subunits. *Biochem J*, **337**:379-385, 1999.
- 57.- van Beynum G. M. A. Immobilized biocatalyst. *Biotechnol Letters*, **2**(4): 185-189, 1980.
- 58.- Weetall H. H. Food Product Development. Immobilized Enzymes: some applications in foods and beverages. Part II applications. Research and Development Laboratories Corning Glass Works/ Corning N.Y. 1973.
- 59.- Wolfe S., Demain A. L.. The use of enzymes in the synthesis of β-lactam antibiotics. *Biotechnol Trends*; **11**:5, 1987.
- 60.- Woodward R. B., Heusler K. The total synthesis of cephalosporin C. *J Am Chem Soc*, **88**:852, 1966.
- 61.- Zanca D. M., Martin J. F. Carbon catabolite regulation of the conversion of penicillin N into cephalosporin C. *J Antibiotics*, **36**:700-8, 1983.
- 62.- Zhang J., Wolfe S., Demain A. L. Phosphate repressible and inhibitable β-lactam synthetases in *Acremonium chrysogenum* strain C-10. *Appl Microbiol Biotechnol*, **29**:242-7, 1988.
- 63.- Zhang J., Wolfe S., Demain A. L. Carbon source regulation of the ACV synthetase in *Acremonium chrysogenum*. *Curr Microbiol*, **18**: 361-67, 1989.

ANEXO UNO

CURVA DE CALIBRACIÓN DE BRADFORD

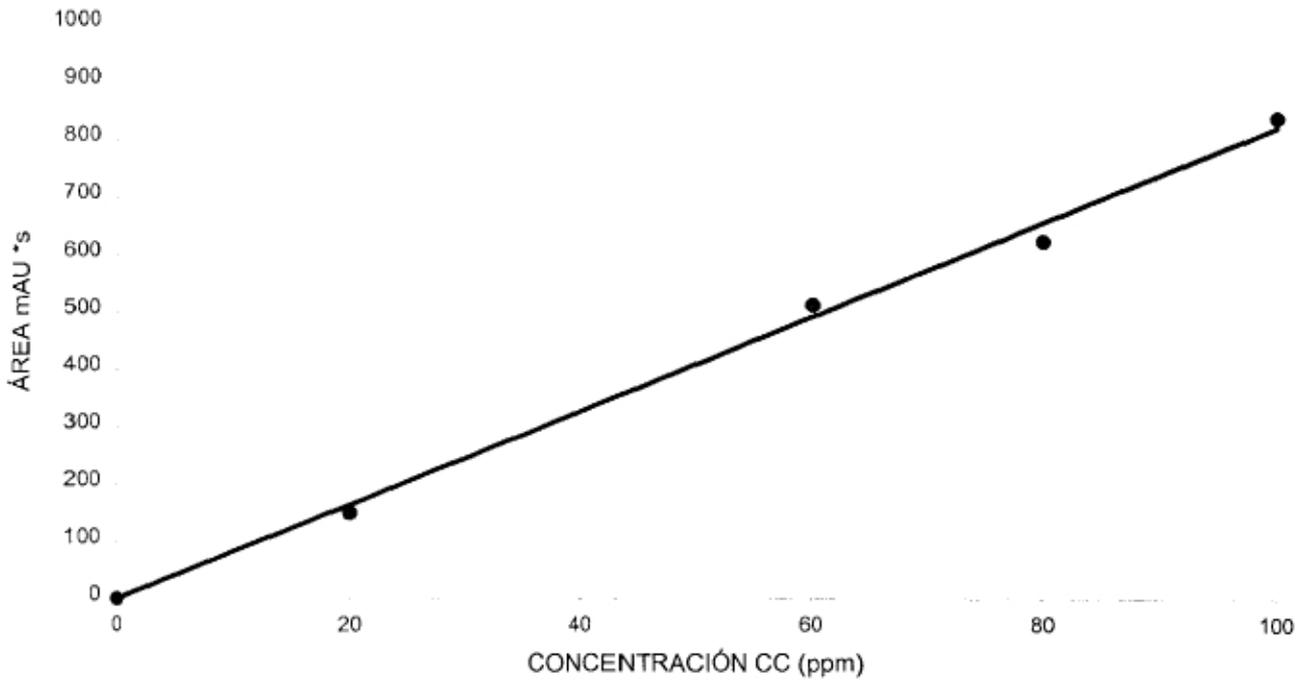
| BSA (μg) | A ₅₉₅ (Promedio de triplicado) |
|-----------------------|---|
| 0 | 0 |
| 5 | 0.3203 |
| 10 | 0.5261 |
| 15 | 0.8062 |
| 20 | 0.9817 |



ANEXO DOS

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CC

| Concentración CC (ppm) | Área mAU *s (Promedio de duplicado) |
|------------------------|-------------------------------------|
| 0.00 | 0.0 |
| 20.00 | 149.7793 |
| 60.00 | 511.8778 |
| 80.00 | 623.2192 |
| 99.86 | 897.6411 |



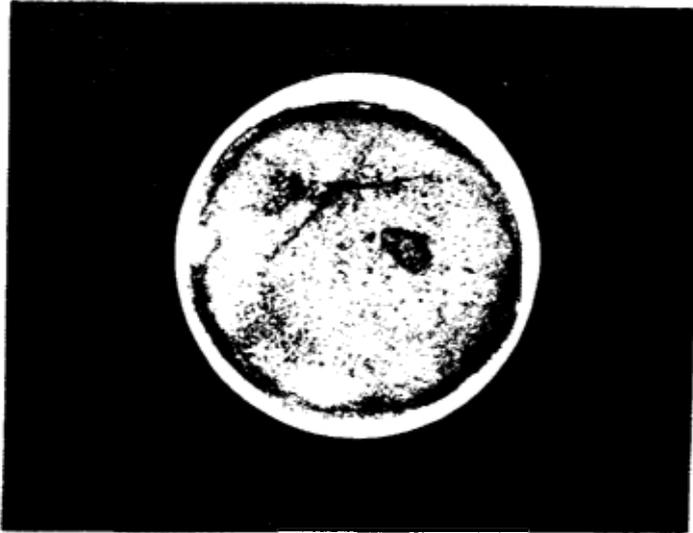
ANEXO TRES

SECUENCIA DE LA ACT REPORTADA POR Mathison *et al.*, 1993.

MLPSAQVARLKPDPFPPSLSPIPHGAVTFAALAPCHNLPIFSSRQMLRDSLTYSH
SPTMSPQIANRFEASLDAQDIARISLFTLESGVILRDVPVAYKSWGRMNVSRDNC
VIVCHTLTSSAHVTSWWPTLFGQGAFDTSRYFIIICLNLYLGSPFGSAGPCSPDPD
AEGQRPYGAKFPRTTIRDDVRIHRQVLDRLGVRQIAAVVGASMGGMHTLEWAFF
GPEYVRKIVPIATSCRQSGWCAAWFETQRQCIYDDPKYLDGEYDVDDQPVRGLE
TARKIANLTYKSKPAMDERFHMAPGVQAGRNISQDAKKEINGTDSGNSHRAGQ
PIEAVSSYLRYQAQKFAASFDANCYIAMTLKFDTHDISRGRAGSIPEALAMITQPAL
IICARSDGLYSFDEHVEMGRSIPNSRLCVVDTNEGHDFVMEADKVNDVAVRGFLD
QSLM

ANEXO CUATRO

ESFERA DE ALGINATO TOMADA CON EL MICROSCOPIO VANOX AHBS3
UTILIZANDO LA ÓPTICA DE NOMARSKI 40 X



ANEXO CINCO

ESFERAS DE AGAROSA TOMADA CON EL MICROSCOPIO VANOX AHBS3
UTILIZANDO LA ÓPTICA DE NOMARSKI 40X



ANEXO SEIS

GEL DE POLIACRILAMIDA TOMADO CON EL MICROSCOPIO VANOX AHBS3
UTILIZANDO LA ÓPTICA DE NOMARSKI 40X



ANEXO SIETE

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA PROPAGACIÓN Y FERMENTACIÓN DE *Acremonium chrysogenum*.

| Componente | Agar para placas (%) ¹ | Medio semilla No.1 (%) ² | Medio de fermentación definido (%) ³ |
|--------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---|
| Sacarosa | 2.0 | | 3.6 |
| Glucosa | | 1.0 | 2.7 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.05 | | |
| KH ₂ PO ₄ | 0.05 | | |
| KCl | 0.05 | | |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0.001 | | |
| NaNO ₃ | 0.3 | | |
| CaCO ₃ | | 0.5 | |
| Hidrolizado de maiz | | 3.0 | |
| Extracto de levadura | 0.4 | | |
| Peptona | 0.4 | | |
| Almidón | | 3.0 | |
| DL-metionina | | | 0.32 |
| L-asparagina | | | 1.2 |
| Agar | 2.0 | | |
| Sales No. 1* | | | 8 mL/lt |
| Sales No. 2* | | | 144 mL/lt |

¹ Tiempo de esterilización 20 minutos.

² pH inicial 7.0, tiempo de esterilización 20 minutos.

³ pH inicial 7.4, tiempo de esterilización 20 minutos.

*Sales No. 1: sulfato de amonio ferroso.6H₂O, 2g/100 mL.

*Sales No. 2: K₂HPO₄ 104 g, KH₂PO₄ 102 g, NaSO₄.10 H₂O 11.5 g, MgSO₄.7H₂O 2.4 g, ZnSO₄.7H₂O 200 mg, MnSO₄.H₂O 200 mg, CaSO₄.5H₂O 50 mg, CaCl₂.2H₂O 500 mg disueltos en 900 mL de agua destilada.

Tomados de Shen *et al.*, (1986).

ANEXO OCHO

PRODUCTIVIDAD DE LOS SISTEMAS UTILIZADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA ACT

| Tiempo | Sistema libre | Alginato | Agarosa | Acrilamida |
|--------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| 1h | 10.506 ppm/min | 13.27 ppm/min | 14.59 ppm/min | 14.42 ppm/min |
| 2h | 4.39 ppm/min | 6.74 ppm/min | 7.35 ppm/min | 7.15 ppm/min |
| 3h | 2.72 ppm/min | 4.48 ppm/min | 4.86 ppm/min | 4.73 ppm/min |
| 4h | 2.00 ppm/min | 3.41 ppm/min | 3.64 ppm/min | 3.52 ppm/min |
| 5h | 1.66 ppm/min | 2.71 ppm/min | 2.89 ppm/min | 2.79 ppm/min |