

2ej
136



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PENICILINASAS

TRABAJO MONOGRAFICO

Que para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

P r e s e n t a :

Hirma Olivia Yañez Saavedra



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

Jurado Asignado según el Tema

Presidente Prof: LILIA VIERNA GARCIA
Vocal " : ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN
Secretario " : JORGE SOTO SORIA
1er. Suplente " : ROSA DEL CARMEN MATEOS MARCOS
2do. Suplente " : ADRIANA GUADALUPE MEJIA CHAVEZ

Sitio donde se desarrolló el Tema: BIBLIOTECA DE LA FACULTAD
DE QUIMICA
BIBLIOTECA DEL INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
BIBLIOTECA DEL C.I.E.A. DEL
I.P.N.

HIRMA OLIVIA YAÑEZ SAAVEDRA Hirma Olivia Yañez S.

Asesor Q. LILIA VIERNA GARCIA Lilia Vierna Garcia

INDICE GENERAL

CAPITULO I GENERALIDADES

1.1 Definición, caracterización, propiedades y clasificación de las penicilinasas.	
a) Definición.....	1
b) Caracterización y propiedades de las penicilinasas.....	1
c) Clasificación de las penicilinasas.....	3
d) Determinación de la estructura química de la penicilinasas.....	6
1.2 Actividad de la penicilinasas	
a) Reacción que cataliza.....	10
b) Potencia de la enzima.....	12
c) Cinética y especificidad de la reacción catalizada por la penicilinasas.....	12
1.3 Localización celular de las penicilinasas	
a) Control en la producción de la penicilinasas en la bacteria.....	13
b) Distribución de la penicilinasas después de su producción.....	15
1.4 Activadores e Inhibidores de las penicilinasas	
a) Activadores.....	18
b) Inhibidores.....	19

CAPITULO II BIOSINTESIS DE LA PENICILINASAS

2.1 Microorganismos productores de la penicilinasas.	26
--	----

2.2 Obtención de la penicilinasa	
a) Selección del microorganismo productor de la enzima.....	26
b) Medios de cultivo utilizados.....	27
c) Condiciones de fermentación y obtención de la enzima.....	27
2.3 Purificación de la penicilinasa.....	32
2.4 Determinación de la actividad de la penicilinasa.....	35
a) Cinética química.....	35
b) Método yodométrico.....	36
c) Otros métodos.....	37

CAPITULO III APLICACIONES DE LA PENICILINASA

3.1 Inmovilización de la penicilinasa.....	41
a) Definición y métodos de inmovilización.....	41
3.2 Aplicación de la penicilinasa en la industria farmacéutica.....	45
3.3 Utilidad de la penicilinasa en la industria alimenticia.....	45
3.4 Utilización de la penicilinasa en la clínica.....	52
3.5 Problemas en la producción, aplicación y comercialización de las penicilinasas.....	56
<u>CONCLUSIONES</u>	59
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	62

INTRODUCCION

El campo de estudio de las enzimas es un tema que ha despertado mucho interés químico y biológico debido a que se encuentra en el límite donde se unen las ciencias químicas con las biológicas.

La enzimología ha tenido un vasto y rápido desarrollo por la relación que tiene con varias ciencias como son la Bioquímica, Fisicoquímica, Bacteriología, Microbiología, Genética, Botánica, Agricultura, Farmacología, Toxicología, Patología, Fisiología y otras ciencias.

El mecanismo de acción de las enzimas, es por sí mismo, uno de los más fascinantes dentro de la investigación científica en la actualidad, convirtiéndose en una rama de las ciencias biológicas, todo lo referente a dichas enzimas.

Las enzimas son catalizadores biológicos que hacen posible infinidad de reacciones químicas y son específicas para cada reacción. La función, composición química y los aspectos genéticos que determinan su producción han recibido una gran atención por parte de los investigadores científicos. Ya que la vida depende de un complicado trabajo de reacciones químicas catalizado por enzimas específicas y cualquier alteración en su estructura o mecanismo de acción, puede ocasionar trastornos de gran importancia, es fundamental conocerlas más a fondo.

Uno de los objetivos del presente trabajo es el dar una contribución para el mejor conocimiento e importancia de las enzimas llamadas penicilinasas, las cuales se les conoce también con el nombre de beta-lactamasas I por ser un nombre más genérico que

indica predominantemente la hidrólisis de las penicilinas, que son antibióticos utilizados generalmente en la Medicina contra una gran variedad de microorganismos que causan serios trastornos al organismo humano y animal.

Por su importancia, en el presente trabajo se darán a conocer las propiedades físicas y químicas, reacción que catalizan, localización celular, e inhibidores y activadores de la enzima. Asimismo como los principales productores de dicha enzima son microorganismos, se expondrán los principales géneros productores, su biosíntesis, extracción y purificación de la enzima y la importancia que tiene en el campo industrial.

Las penicilinasas tienen un amplio campo de aplicaciones en la industria farmacéutica para la detección de la contaminación en los productos farmacéuticos que contienen penicilina, y esta detección es muy importante para evitar que lleguen al público productos que no reúnan las normas exigidas para este tipo de medicamentos.

Otra de las aplicaciones que posee la penicilinasasa es el de la detección de penicilinas ya sea naturales o semisintéticas en alimentos como la leche y productos lácteos.

En clínica humana es usada para eliminar de los diferentes fluidos del cuerpo a la penicilina, también es útil como medida terapéutica en pacientes que presentan alergia a este antibiótico, ya que la enzima modifica en forma muy favorable el curso de las reacciones alérgicas a la penicilina en el 80% de los casos, dichas reacciones pueden ir desde una simple urticaria, hasta la producción de un shock anafiláctico, siendo la enzima quien hidroliza la penicilina y ayuda a desaparecer los síntomas.

Por último se enumeraran la serie de problemas que existen en nuestro país para que se lleve a cabo la producción a gran escala de la penicilinasa, así como las medidas mas adecuadas a tomar para acelerar el desarrollo e investigación en este campo.

CAPITULO I
GENERALIDADES

1.1 DEFINICION, CARACTERIZACION, PROPIEDADES Y CLASIFICACION DE LAS PENICILINASAS.

a) Definición

Las penicilinasas son un conjunto de enzimas hidrolíticas producidas por una gran variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, pertenecen al grupo de las beta-lactamasas las cuales se encargan de catalizar la hidrólisis del enlace amida en el anillo beta-lactámico del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) o del ácido 7-amino cefalosporánico (7-ACA). De las beta-lactamasas las mas frecuentemente encontradas en los microorganismos productores son las penicilinasas y en ocasiones las cefalosporinasas, ambas se diferencian de otras enzimas que también atacan la penicilina como las amidasas y acil esterases, en la naturaleza del enlace hidrolizado.

b) Caracterización y propiedades de las penicilinasas

De acuerdo a los sustratos específicos sobre los que actúan, a sus propiedades físicas y químicas y a reacciones inmunológicas de precipitación y aglutinación con el antisuero correspondiente se ha podido determinar la existencia de varios tipos de penicilinasas.

Investigaciones recientes por Sato y colaboradores (73), indican que la gran mayoría de las penicilinasas producidas por bacterias Gram negativas son constitutivas (78), y muchas de las obtenidas a partir de microorganismos Gram positivos son enzimas inducibles.

Asimismo existe una clara diferencia en la localización celular de la enzima de acuerdo a la afinidad tintorial, pero este aspecto sera discutido en párrafos posteriores.

Por otra parte existen propiedades fisicoquímicas que también han podido ser determinadas en las penicilinasas (46,66), por ejemplo la curva de actividad típica de pH obtenida con penicilinasas de bacterias Gram positivas (74), muestran un máximo de acción en un rango entre 6 y 7 con una declinación aguda en la región alcalina, mientras que las producidas por microorganismos Gram negativos muestran un rango óptimo de pH entre 5.0 y 8.3. Una información mas completa sobre las propiedades de las penicilinasas la proporciona la tabla No. I en donde se encuentran algunos de los microorganismos mas importantes en cuanto a la producción de la enzima.

c) Clasificación de penicilinasas.

Ya que la clasificación de las enzimas en general se basa en los diversos sustratos sobre los que podían actuar las enzimas, por ejemplo, las que actuaban sobre las penicilinas eran denominadas penicilinasas, las que catalizaban la hidrólisis de cefalosporinas se les llamaba cefalosporinasas y así sucesivamente a las otras enzimas se les agregaba el prefijo asa al nombre del sustrato sobre el que actuaban. Posteriormente se encontró otra forma de agrupación (37), que considera la localización de la enzima: si esta es intracelular (como en muchas bacterias Gram negativas) o extracelular (presente en bacterias Gram positivas). Asimismo Richmond y Sykes (77), realizaron otra clasificación de acuerdo a si la penicilinasas es constitutiva, es decir, que

se encuentra en una concentración definida en el citoplasma bacteriano (como muchas bacterias Gram negativas) o es inducible pues requiere la presencia del sustrato específico para acelerar su síntesis; dentro de esta clasificación existen subdivisiones debidas a la producción en gran cantidad de la enzima (macro) o en poca proporción (micro).

La recombinación genética presente en muchas de las bacterias productoras de penicilinasa ha servido como un criterio para su clasificación, agrupándolas en las producidas después de una replicación genética como en el caso de penicilinasas de algunos estafilococos o por medio de plásmidos que intercalados en el cromosoma bacteriano son codificados para su producción.

En 1972, la Comisión de Enzimas (17), introdujo el término cefalosporinasa para denominar a la enzima que actúa sobre la cefalosporina, quedando como beta-lactamasa I la penicilinasa y como beta-lactamasa II la cefalosporinasa evitando así confusiones. Por otra parte esta comisión determinó que las penicilinasas de bacterias Gram positivas pueden ser divididas serologicamente en cuatro tipos, pero de acuerdo a su actividad sobre la penicilina son indistinguibles.

Otra clasificación realizada por Richmond y Sykes en 1973 (77), de beta-lactamasas es actualmente la mas completa pues toma en cuenta todas las características de las clasificaciones antes mencionadas, esta se divide en cinco clases:

- a) La clase I comprende las enzimas que son predominantemente activas contra cefalosporinas, los géneros productores son Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Proteus indol (+),

Pseudomonas y Serratia. La información genética de estas enzimas es mediada a través de cromosomas, y su producción puede ser del tipo constitutivo o inducible dependiendo de la especie.

- b) La clase II que comprende las enzimas que son predominantemente activas contra las penicilinas, las especies productoras son bacterias Gram negativas y codifican la síntesis de penicilinas a través de cromosomas.
- c) En la clase III se encuentran las enzimas que tienen la misma actividad contra penicilina y cefalosporina pero que son sensibles a la inhibición por cloxacilina y resistentes a la inhibición por p-cloromercuribenzoato, la información genética para la producción de la enzima se lleva a cabo a través de plásmidos.
- d) La clase IV incluye enzimas que actúan sobre los mismos sustratos que las enzimas de la clase III pero son resistentes a la inhibición por cloxacilina y sensibles a la inhibición por p-cloromercuribenzoato, principalmente son producidas por Klebsiella. Esta familia de enzimas exhibe propiedades bioquímicas similares y son invariablemente constitutivas.
- e) La clase V comprende las enzimas que actúan sobre la penicilina y la cloxacilina y son resistentes al p-cloromercuribenzoato, son producidas preferencialmente por especies de Pseudomonas a través de elementos genéticos extracromosomales.

d) Determinación de la estructura química de las penicilinasas

Las penicilinasas como todas las enzimas son de naturaleza proteica (62), entre las enzimas de este tipo producidas por Bacillus licheniformis, Bacillus cereus, y Staphylococcus aureus no existen diferencias apreciables en cuanto a sus propiedades químicas generales, exceptuando entre estas el punto isoeléctrico y la composición de aminoácidos los cuales marcan una diferencia palpable entre estas penicilinasas.

Ambler y Meadway (1), lograron determinar la secuencia de aminoácidos de las penicilinasas producidas por especies representativas de Staphylococcus aureus y Bacillus licheniformis. En primera instancia estas enzimas se purificaron por el método de adsorción-elución a pH= 7.5 con posterior filtración en gel obteniendo concentraciones de 20 mg de enzima/l de cultivo, más adelante se realizó la digestión de las enzimas con tripsina, quimotripsina y/o pepsina en donde se determinó la composición de aminoácidos de las penicilinasas (ver tablas II y III), y la secuencia de aminoácidos de la enzima de Staphylococcus aureus PC 1 (tabla IV) (9).

TABLA IPropiedades relevantes de las penicilinasas (9)

Especie productora	P.M.	pH óptimo	T (°C)	Punto isoeléctrico	Cofactores requeridos
<i>B. cereus</i>					
569/ 4 I	28,000	6.0-6.6	36	9.2-9.7	---
4 II	22,500	---	---	8.4	Zn
4 III	18,000	---	---	8.4-9.0	Zn
<i>B. licheiformis</i>	28,000	6.0-7.0	40	---	---
<i>S. aureus</i> DC-1	29,600	5.9	55	8.9	---
<i>E. coli</i>	25,000	7.0	30	5.7	---
<i>E. coli</i> 1818	44,600	---	---	8.3	---
<i>Enterobacter cloacae</i> P99	39,000	8.2	---	7.9	---
<i>Yersinia enterocolitica</i>					
A	22,000	6.5	30	8.1	---
B	34,000	7.5	---	5.4	---
<i>P. aeruginosa</i>	48,000	8.0	---	7.5	---

TABLA II& Composición de aminoácidos en penicilinasas

Aminoácido	S. aureus PC 1	B. licheniformis
Glicina	12	16
Alanina	18	26
Valina	16	17
Leucina	22	27
Isoleucina	19	15
Serina	19	12
Treonina	13	21
Ac. aspártico	39	38
Ac. glutámico	18	30
Fenilalanina	7	7
Tirosina	13	6
Cisteína	—	—
Triptofano	—	3
Metionina	3	5
Prolina	9	12
Lisina	43	34
Histidina	2	1
Arginina	<u>1</u>	<u>15</u>
	Total 275	275

& = Número de moléculas de aminoácido en la penicilinasasa

TABLA III

* Composición de aminoácidos en penicilinasas

aminoácido	B. licheniformis		B. cereus		S. aureus	
	6346/C	749/C	5/B	569	Tipo A	Tipo B
Lys	19	22	31	23	44	43
Arg	12	12	13	11	5	5
His	1	1	6	6	2	2
Asp	28	31	33	25	42	42
Tre	18	16	9	12	13	12
Ser	10	8	2	4	19	17
Glu	24	21	25	22	17	22
Pro	9	10	6	10	10	11
Gli	12	11	19	21	13	16
Ala	19	21	30	29	20	21
Val	10	8	17	15	14	11
Met	5	4	5	1	2	2
Iso	9	9	20	22	18	15
Leu	21	22	17	19	23	22
Tir	5	6	7	5	12	9
Fen	5	5	7	8	7	7
Cis	0	-	0	0	0	0
aminoácido N-terminal.	Lis	Lis	Asp	-	Lis	-
NH ₃	-	-	-	-	29	28

* = Número de moléculas de aminoácido en la penicilinasas

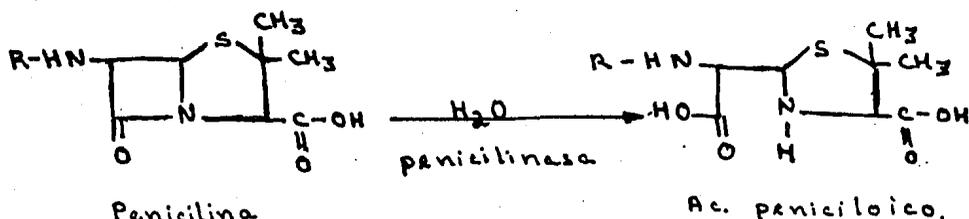
TABLA IVSecuencia de aminoácidos de la penicilinasasa de S. aureus PC 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
-	-	-	-	-	Lis	Glu	Leu	Asn	Asp	Leu	Glu	Lis
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Lis	Tir	Asn	Ala	His	Ile	Gli	Val	Tir	Ala	Leu	Asp	Tre
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Gli	Ser	Gli	Gli	Glu	Val	Gli	Pen	Asn	Ser	Asp	Lis	Arg
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Pen	Ala	Tir	Ala	Ser	Tre	Ser	Gli	Ala	Ala	Ile	Asn	Ser
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
Ala	Ile	Leu	Glu	Gln	Val	Pro	Tir	Asn	Lis	Leu	Asn	Lis
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
Lis	Val	His	Ile	Asn	Lis	Asp	Asn	Ile	Val	Ala	Tir	Ser
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91
Pro	Ile	Leu	Glu	Lis	Tir	Val	Gli	Lis	Asp	Ile	Tre	Leu
92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
Lis	Ala	Leu	Ile	Glu	Ala	Ser	Met	Tre	Val	Ser	Asp	Asn
105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117
Tre	Ala	Asn	Tre	Ala	Ile	Ile	Lis	Glu	Ile	Gli	Gli	Ile
118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
Lis	Val	Lis	Lis	Gln	Arg	Leu	Lis	Gli	Leu	Gli	Asp	Lis
131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143
Val	Treo	Asn	Pro	Val	Arg	Tre	Glu	Ile	Glu	Leu	Asn	Tir
144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156
Tir	Ser	Pro	Lis	Ser	Lis	Asp	Tre	Ser	Tre	Pro	Ala	Asn
157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169

1,2 ACTIVIDAD DE LA PENICILINASA

a) Reacción que cataliza

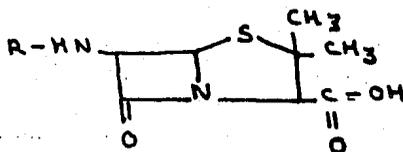
Desde el descubrimiento de las penicilinasas por Chain y Abraham hace 25 años (17) en un extracto de Escherichia coli se ha determinado la naturaleza hidrolítica de las mismas sobre el anillo beta-lactámico produciendo un compuesto inactivo contra las especies bacterianas. El producto de la hidrólisis fue identificado por ellos mismos cuatro años después como ácido peniciloico. La reacción involucrada se muestra a continuación:



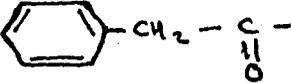
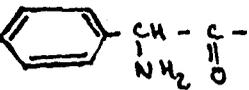
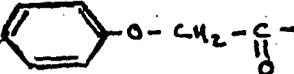
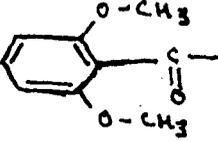
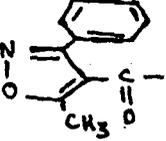
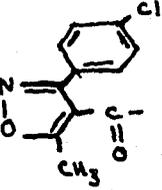
Newton y Abraham (57), observaron que la cefalosporina C pudo también ser inactivada en un camino comparable por enzimas hidrolíticas de Bacillus cereus, tales enzimas son similares a las penicilinasas y fueron llamadas cefalosporinasas. Pero en general estos dos grupos son mejores descritos como beta-lactamasas. Los tipos de penicilinas sobre los que actúan con mayor frecuencia se encuentran en la tabla V.

TABLA V

El ácido 6-aminopenicilánico y sus derivados



Estructura general de la penicilina.

(R)	Penicilina
1. H--	APA (ácido 6-amino penicilanico)
2. 	Bencil-penicilina
3. 	Ampicilina
4. 	Penoximetil penicilina
5. 	Meticilina
6. 	Oxacilina
7. 	Cloxacilina

b) Potencia de la enzima

La unidad mas aceptada para medir la actividad de la penicilinasas fue recomendada por Pollock y Torriani (73) en 1952, una unidad "pollock" de enzima puede destruir un micromol de bencilpenicilina por hora a 30°C y a un pH= 7. Posteriormente la unidad internacional (UI) fue expresada en términos de micromol/min a 25°C, una UI es equivalente a 60 unidades pollock.

Sin embargo para evitar confusiones en este sentido el Sistema Internacional de Unidades acordó expresar la potencia de la enzima en términos de "Catal" que es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de una mol de sustrato por segundo bajo condiciones específicas. Por ser el catal una unidad muy grande en la práctica se prefiere expresar la actividad de la penicilinasas en términos de microcatal. Quedando finalmente como que 60 unidades pollocks es equivalente a 1 Unidad Internacional y 60 (UI) es equivalente a 1 microcatal.

c) Cinética y especificidad de la reacción catalizada por la penicilinasas.

La penicilina tiene un grupo ácido de $pK= 2,9$ el correspondiente ácido peniciloico contiene dos grupos fuertemente ácidos y un átomo de N debilmente básico en el anillo de tiazolidina. Una reacción análoga es sugerida para la cefalosporina C y otras cefalosporinas aunque el producto puede ser modificado por reacciones secundarias. Así fue establecido que

la hidrólisis enzimática de la cefalosporina C o cefalotina es acompañada por la aparición de dos equivalentes de ácido, 1 equivalente es debido a la abertura del anillo beta-lactámico, el otro equivalente es atribuible a la expulsión espontánea del acetato del grupo cetoxi el cual acompaña la hidrólisis del anillo beta-lactámico. Una reacción análoga secundaria aparentemente ocurre en cefaloridina donde la abertura del anillo beta-lactámico se creyó acompañada por la expulsión de piridina.

La cinética de la reacción fue primero estudiada con la penicilinasas de Bacillus cereus. La reacción es de orden cero (17), en la presencia de concentraciones saturadas del sustrato. Roth (17), quien usó preparaciones de B. subtilis reportó que la cinética de orden cero es precedida por un período de seis minutos cuando la reacción es monomolecular. Esto no fue confirmado por Banfield (17), quien estableció que la enzima sigue estrictamente la cinética de Michaelis-Menten sobre un amplio rango de concentraciones.

1.3 Localización celular de las penicilinasas

a) Control en la producción de penicilinasas en la bacteria

Cuando una bacteria produce una gran cantidad de penicilinasas, otros aspectos del metabolismo de la célula bacteriana son afectados como es el retraso en el crecimiento del microorganismo en valores por arriba del 10% (55), pero esto únicamente sucede en algunas bacterias cuya producción de penicilinasas se presenta cuando son expuestas al sustrato específico (44).

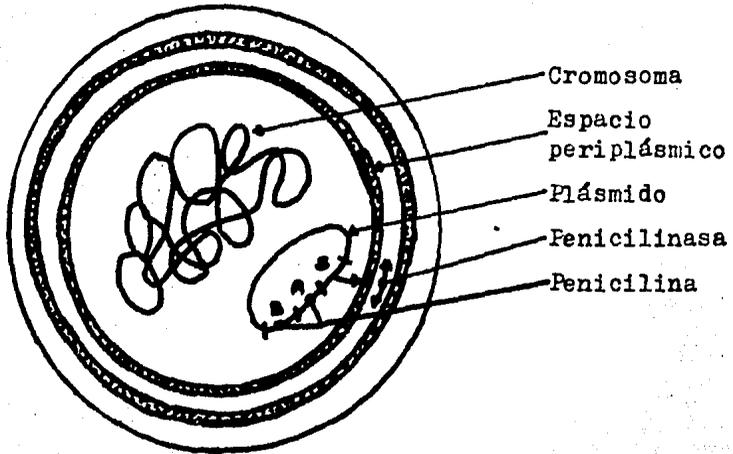
Izui y colaboradores (40) han reportado en B. licheniformis un incremento del 100% en la producción de penicilinasas cuando

este microorganismo es cultivado en presencia de la droga, ellos encontraron que la penicilinasasa es producida en gran cantidad cuando el organismo es expuesto al antibiótico, la interacción entre enzima-sustrato puede seguir dos caminos:

- 1) Que el antibiótico sufra el suficiente daño por la enzima y sea inefectivo contra el organismo productor.
- 2) Que el antibiótico resista la acción de la enzima e inhiba o destruya a la bacteria (dependiendo de la concentración de la droga).

Las penicilinasas inducibles generalmente son reguladas por plásmidos (6,10,20,38,52), en cuanto a su síntesis, esta involucra un proceso de modulación genética por medio del "operón", es decir, cuando existe en el medio una cantidad apreciable de sustrato la producción de la enzima es codificada por un grupo de genes presentes en el plásmido, pero cuando no existe el sustrato específico la penicilinasasa no se produce o sus niveles en la bacteria son muy bajos. Esta regulación genética se muestra en la figura No. 1

Ambler (35), encontró que las penicilinasas varían de acuerdo al microorganismo (Gram positivo o Gram negativo) que las produce; generalmente las penicilinasas de microorganismos Gram positivos son inducibles, los ejemplos mas claros son las penicilinasas codificadas por B. licheniformis y S. aureus (29), por el contrario muchas de las penicilinasas producidas por bacterias Gram negativas son constitutivas tal es el caso de las penicilinasas de E. coli que es codificada por el plásmido pBR 322 (43).



**FIG. I PRODUCCION DE PENICILINASAS
A TRAVES DE PLASMIDOS.**

b) Distribución de la penicilinasasa después de su producción

La penicilinasasa es producida por la maquinaria metabólica encargada de la síntesis de proteínas de la célula por la vía clásica, es decir, el RNAm controla la producción de las proteínas en el ribosoma bacteriano. Después de producirse la penicilinasasa en la célula se dirige a la membrana celular, la cual está formada por una doble capa con un espacio entre ellas llamado "espacio periplásmico" en donde se sitúa específicamente la penicilinasasa. Sin embargo existen diferencias en este aspecto, pues las penicilinasas producidas por Staphylococcus aureus y otras bacterias Gram positivas solo temporalmente se alojan en el espacio periplásmico de la membrana celular y rápidamente se separan de la célula basal difundiéndose en el medio de cultivo,

por lo tanto en estafilococos la penicilinasas es esencialmente extracelular. Así cuando se aíslan células de S. aureus y son probadas por métodos de sensibilidad para los antibióticos como el CMI (concentración mínima inhibitoria), se encuentra que estas no contienen penicilinasas asociadas con la superficie celular y el grado de actividad de esta enzima no es evidente (19). Otras investigaciones (23,53), han demostrado que la gran mayoría de bacterias Gram negativas poseen penicilinasas que se asocian permanentemente en el espacio periplásmico y no son liberadas al medio de cultivo (enzimas intracelulares), su sensibilidad al CMI es mayor y su grado de actividad es detectable. En la tabla VI y VII se muestra la localización y actividad de penicilinasas de varias especies de Bacillus y Staphylococcus.

TABLA VI

Penicilinasas bacilares - Localización y Actividad

Especie	% Extracelular	& Actividad máxima
Bacillus cereus 569	80-90	2000-3000
B. cereus 569-H	80-90	2000-3000
B. cereus 5-B	84	2000
B. licheniformis 749-C	50	4000
B. licheniformis 6346	50	600
B. anthracis	85	2000

& = Micromoles de bencilpenicilina hidrolizada/hr/mg

(17)

TABLA VII

Penicilinasas estafilococcicas- Localización y actividad

Especie	%Extracelular	^R Actividad máxima
<u>Staphylococcus aureus</u>		
524-SC	40-50	120-150
PC1	45-50	500
PC2	30	15
E ₃	—	30
5974	—	34
6637	—	70
13137	--	34
60/1	62	--
<u>S. albus</u>		
J1	6	4
J3	7	120
J11	60	40

^R micromoles de bencilpenicilina hidrolizadas/hr/mg de penicilinasas.

1.4 ACTIVADORES E INHIBIDORES DE LAS PENICILINASAS

a) Activadores

Las enzimas son catalizadores orgánicos que disminuyen la barrera denominada energía de activación y por lo tanto facilitan el que se inicie la reacción. Este proceso implica el trabajo necesario para poner a dos moléculas en un contacto lo suficientemente estrecho para que reaccionen y formen otros compuestos. Las enzimas como reguladores de una reacción son capaces de atraer y captar diversas moléculas. Cualquier factor que permite atraer al sustrato al centro activo se puede considerar como un activador, así como también si permite la rápida salida de los productos. Como una regla general la actividad de las beta-lactamasas no dependen de activadores específicos o cofactores, la excepción a esta regla la constituyen las penicilinasas que requieren de iones Zn^{2+} para estabilizarse y activarse, pero existen casos donde este ión en el medio de cultivo no es necesario para activar la enzima (28). Estudios realizados por Sato y colaboradores (66), en las penicilinasas producidas por Flavobacterium odoratum, P. maltophilia GN 12873, Bacillus cereus 567, Bacteroides fragilis, Proteus vulgaris y P. cepacea, demostraron que la enzima cuando es inhibida por EDTA, p-cloromercuribenzoato, cloruro de mercurio y/o sulfato de cobre puede ser nuevamente activada por la adición de iones divalentes tales como Fe^{2+} y Zn^{2+} .

b) Inhibidores

Así como existen especies químicas capaces de activar una enzima, también otros compuestos pueden tener un efecto antagónico sobre las mismas, conociéndose como inhibidores de la actividad. La inhibición de penicilinas puede llevarse a cabo por sustratos análogos a la penicilina los cuales se unen irreversiblemente a la enzima y causan su labilización por estimulación específica e inhibición por anticuerpos homólogos, esta inhibición es competitiva (49), pues la penicilina y los sustratos análogos a ella compiten por el sitio activo de la enzima.

La inhibición de la penicilinas estafilocócica por ciertos aminoglucósidos fue reportada pero no se ha esclarecido si el sitio activo fue involucrado (76).

Por otra parte se determinó que los compuestos de tiol disminuyen la dependencia de las penicilinasas a los iones Zn^{2+} (31). Las penicilinasas que dependen del ion Zn^{2+} como activador son inhibidas por agentes quelantes (18). Los alcoholes pueden inhibir o estimular, y los efectos inhibitorios de algunos sulfatos dependen de la longitud de las cadenas alquílicas. La inactivación térmica ha sido estudiada principalmente en enzimas de Bacillus cereus observándose inactivación a $100^{\circ}C$ pero no a $70^{\circ}C$ (51).

Se han realizado estudios con penicilinas semisintéticas como son: metecilina, oxacilina y sus derivados encontrándose que son muy estables a muchos tipos de penicilinasas, pero muestran poca eficacia contra bacterias Gram negativas por ser incapaces de penetrar a la membrana de la célula bacteriana (69,70).

Recientemente se encontró que los antibióticos beta-lactámicos como son el ácido clavulánico (12,16,20,22,26), cefamicinas (24,60,81), ácido sulfonpenicilínico y ácido 6-beta bromo penicilínico son estables a varias penicilinasas y actúan como inhibidores para estas enzimas.

En fechas recientes Song y colaboradores (75) han demostrado que ácidos grasos producidos por bacterias Gram positivas inhiben a las penicilinasas producidas por S. aureus.

CAPITULO II

BIOSINTESIS DE LA PENICILINASA

Las células microbianas contienen o producen una gran variedad de enzimas que funcionan como catalizadores biológicos de las reacciones bioquímicas involucrada en el crecimiento y respiración de los microorganismos. En cierto modo algunas de estas enzimas fungen como productos del proceso fermentativo ya sea por un interés particular, por su alta producción o por el gran nivel de actividad que presenta en los procesos bioquímicos que se desarrollan en la célula.

Aunque la actividad de las enzimas microbianas se conoce desde hace tiempo, no ha sido hasta años recientes que su producción se ha hecho a gran escala y por lo tanto comercializado. Inicialmente algunas enzimas como amilasas y proteasas fueron obtenidas de plantas y animales, pero por su alto costo de extracción y producción han sido superadas por las enzimas obtenidas de microorganismos que son producidas a un costo mucho menor.

Para la producción comercial de enzimas microbianas se utilizan principalmente especies reconocidas de hongos, bacterias y levaduras que producen enzimas de un tipo determinado. La obtención de una cierta enzima es regulada y alterada por varios factores como son: el microorganismo utilizado, el medio de cultivo empleado, factores físicos y químicos de fermentación y la estabilidad genética de la especie microbiana utilizada. Los microorganismos son seleccionados por poseer una alta capacidad para producir la enzima en cuestión.

Las enzimas microbianas obtenidas comercialmente por fermentación incluyen amilasas, proteasas, invertasas, catalasas, penicilinasas, glucosa-oxidasa y estreptocuinasa.

En la tabla I estan representadas las enzimas producidas comercialmente y las aplicaciones de estas.

TABLA I

ENZIMAS PRODUCIDAS INDUSTRIALMENTE Y SUS APLICACIONES

Nombre de la enzima	Fuente de obtención	Aplicación	Importancia comercial
Diastasa	Malta	Auxiliar de la digestión	+++
Takadiastasa	<u>A. oryzae</u>	Auxiliar de la digestión	+++
Amilasa	<u>B. subtilis</u>	Textiles, fermentación industrial alcohólica, producción de glucosa	+++
Amilasa ácido resistente	<u>A. niger</u>	Auxiliar de la digestión	+++
Amiloglucosidasa	<u>Rhizopus niveus</u> <u>A. niger</u> <u>Endomycopsis fibuliger</u>	Producción de glucosa	+++

Continuación de la tabla I

Nombre de la enzima	Fuente de obtención	Aplicación	Importancia comercial
Invertasa	<u>S. cerevisiae</u>	Prevención de cristalización de azúcar	+++
Pectinasa	<u>Sclerotinia libertina</u> <u>A. oryzae</u> <u>A. niger</u> <u>A. flavus</u>	Remoción de pectina	+++
Tripsina	Páncreas de animal	Usos médicos	+++
Pepsina	Estómago de animal	Auxiliar de la digestión	+++
Alfa-quimotripsina	Estómago de animal	Usos médicos	+++
Papaina	Papaya	Auxiliar de la digestión Usos médicos	+++
Proteasa	<u>A. oryzae</u>	Antiespumante	+++
Proteasa	<u>A. niger</u>	Auxiliar de la digestión	++
Proteasa	<u>B. subtilis</u>	Ablandador de carnes	++
Proteasa	<u>S. griseus</u>	Auxiliar de la digestión	++

Continuación de la tabla I

Nombre de la enzima	Fuente de obtención	Aplicación	Importancia comercial
Varidasa	<u>Streptococcus sp.</u>	Auxiliar de la digestión	++
Estreptoquinasa	<u>Streptococcus sp.</u>	Fibrinolítico	++
<u>PENICILINASA</u>	<u>B. subtilis</u>	Remoción de penicilina	+
Glucosa oxidasa	<u>A. niger</u>	Oxidación de glucosa en alimentos	++
Glucosa oxidasa	<u>P. chrysogenum</u>	Determinación de glucosa en análisis clínicos	++
Hialuronidasa	Animal, bacteria	Usos médicos	+
Lipasa	Páncreas, Hongos	Auxiliar de la digestión	+
Catalasa	Hongos	Esterilización de leche	+
Queratinasa	<u>S. fradiae</u>	Remoción de cabello de piel curtida	+

Referencias: (2,13)

Actualmente se ha utilizado con frecuencia cada vez mayor la penicilinasas por sus aplicaciones en el área clínica, farmacéutica y de alimentos, por lo que la investigación en cuanto a su biosíntesis ha adquirido especial relevancia, y es el objetivo del presente capítulo tratar con detalle este aspecto.

2.1 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE LA PENICILINASAS

Existe una gran variedad de microorganismos productores de esta enzima destacando y utilizados por su importancia las especies de Bacillus subtilis (33), Escherichia coli (42,85), y Bacillus cereus. Asimismo existen otros microorganismos productores de penicilinasas que son utilizados opcionalmente como Bacillus cereus R-15, B. anthracis, Bacillus licheniformis 749-C, C-3, 46-C (56), Staphylococcus albus, Staphylococcus aureus, Micrococcus lysodeikticus, Streptomyces sp. (59), varios bacilos Gram negativos (68,71), como Pseudomonas cepacea (34,63), Proteus rettgeri (47) y Alcaligenes faecalis (25), varias especies del género Bacteroides (39,67,80,93), algunas especies de bacilos anaerobios Gram negativos (8), y Actinomadura especie R-39 (21).

2.2 OBTENCION DE LA PENICILINASAS

a) Selección del microorganismo productor de la enzima

En la obtención de una enzima comercial el primer paso de la biosíntesis es la selección del (los) microorganismo(s) que produce en mayor cantidad la enzima. En el caso de la penicilinasas la selección se lleva a cabo creciendo al microorganismo en medios ricos como infusión cerebro-corazón, posteriormente se mide

la cinética de la penicilinasasa sobre el sustrato específico y a partir de esto se seleccionan los máximos productores de la penicilinasasa. Generalmente se ha encontrado como máximos productores a especies de B. subtilis, E. coli y B. cereus.

b) Medios de cultivo utilizados

Se utilizan medios ricos que permiten la mayor producción de enzimas, por ejemplo, la obtención de penicilinasasa a partir de E. coli (42), se obtiene en el caldo LB el cual contiene:

10 g de triptosa

5 g de extracto de levadura

1 g de glucosa

10 g de cloruro de sodio

0.2% de glicerol

Agua destilada 1 litro

Se ajusta el pH= 7.0

Existen otros medios de cultivo como el caldo infusión cerebro croazón y caldo manitol rojo de fenol que unicamente son utilizados si no existe el caldo LB pues se ha comprobado que es en este ultimo medio donde la producción de penicilinasasa es máxima.

c) Condiciones de fermentación y obtención de la enzima

Después de haber determinado el microorganismo productor de la enzima por una selección primaria (encontrar si el microorganismo produce la enzima) y por una selección secundaria (el microorganismo que produce la enzima en mayor cantidad), además de seleccionar el medio de cultivo adecuado para la fermentación se procede

a determinar las condiciones en que se llevara a cabo la biosíntesis, la cual presenta variantes de acuerdo al microorganismo elegido y el equipo de laboratorio con que cuenta:

- 1) En la obtención de penicilinas a partir de Alcaligenes faecalis (1, 25), se siguió el siguiente procedimiento:
 - a) Se indujo la producción de la enzima creciendo al microorganismo en caldo infusión cerebro-corazón e incubado a 37°C hasta que la densidad óptica del cultivo alcanzó 570 nm.
 - b) El Zn fue adicionado como inductor de la penicilinas hasta alcanzar una concentración de la enzima en el medio de cultivo de 25 microgramos/ml.
 - c) Después de tres horas de que se adicionó el inductor se centrifugó la muestra a una temperatura de 4°C y las células fueron lavadas con amortiguador de fosfato 50 mM a pH= 7 y resuspendidas en el mismo amortiguador.
 - d) Las células en suspensión fueron rotas por tratamiento ultrasónico a 75 watts por 3 minutos.
 - e) Las células rotas se centrifugaron a 3000 rpm por un tiempo de 40 minutos a 4°C.
 - f) Se adiciona sulfato de estreptomicina a el sobrenadante a una concentración final de 20% para la remoción del ácido nucleico.
 - g) Después de reposar 10 horas la solución el precipitado fue removido por centrifugación y el sobrenadante dializado contra 10 mM de amortiguador Tris-HCl a un pH= 8.8.

- h) El precipitado formado durante la diálisis se remueve por centrifugación y el sobrenadante resultante se usa como enzima cruda.

El método anteriormente descrito se refiere a la obtención de la penicilinasa extracelular e intracelular por lo que fue necesario el tratamiento ultrasónico para romper la integridad de la célula y liberar la enzima.

2) En la obtención de penicilinasa a partir de E. coli HB101 transportadora del plásmido pEAP₂ (42), se inoculó este microorganismo en el medio caldo LB y se siguió el siguiente procedimiento:

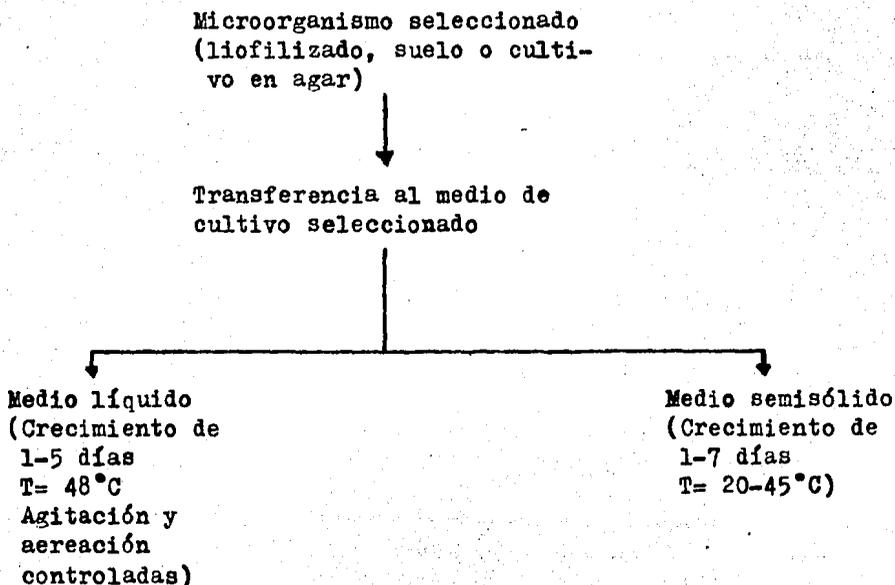
- a) Se incubó el microorganismo durante toda la noche a 37°C con agitación y aereación constante.
- b) Después de ese tiempo el cultivo fue centrifugado a 10,000 revoluciones por minuto.
- c) Posteriormente las células fueron lavadas en igual volumen del medio con 0.9% de NaCl y resuspendido el mismo volumen con 25% de sucrosa.
- d) La suspensión se deja reposar por 10 minutos a temperatura ambiente en la presencia de EDTA 0.001 M. Posteriormente se agita y se resuspende en el mismo volumen con agua fría.
- e) Después de 10 minutos de reposo a 4°C la suspensión fue centrifugada por 10 minutos a 15,000 rpm y el sobrenadante eliminado.

f) Las células fueron resuspendidas en el mismo volumen de amortiguador de fosfatos 0.005 M pH= 7.0 seguido de tratamiento ultrasónico (20 KHz, 3 minutos, 200 Watts), en el sobrenadante se obtiene el preparado de penicilinasa cruda.

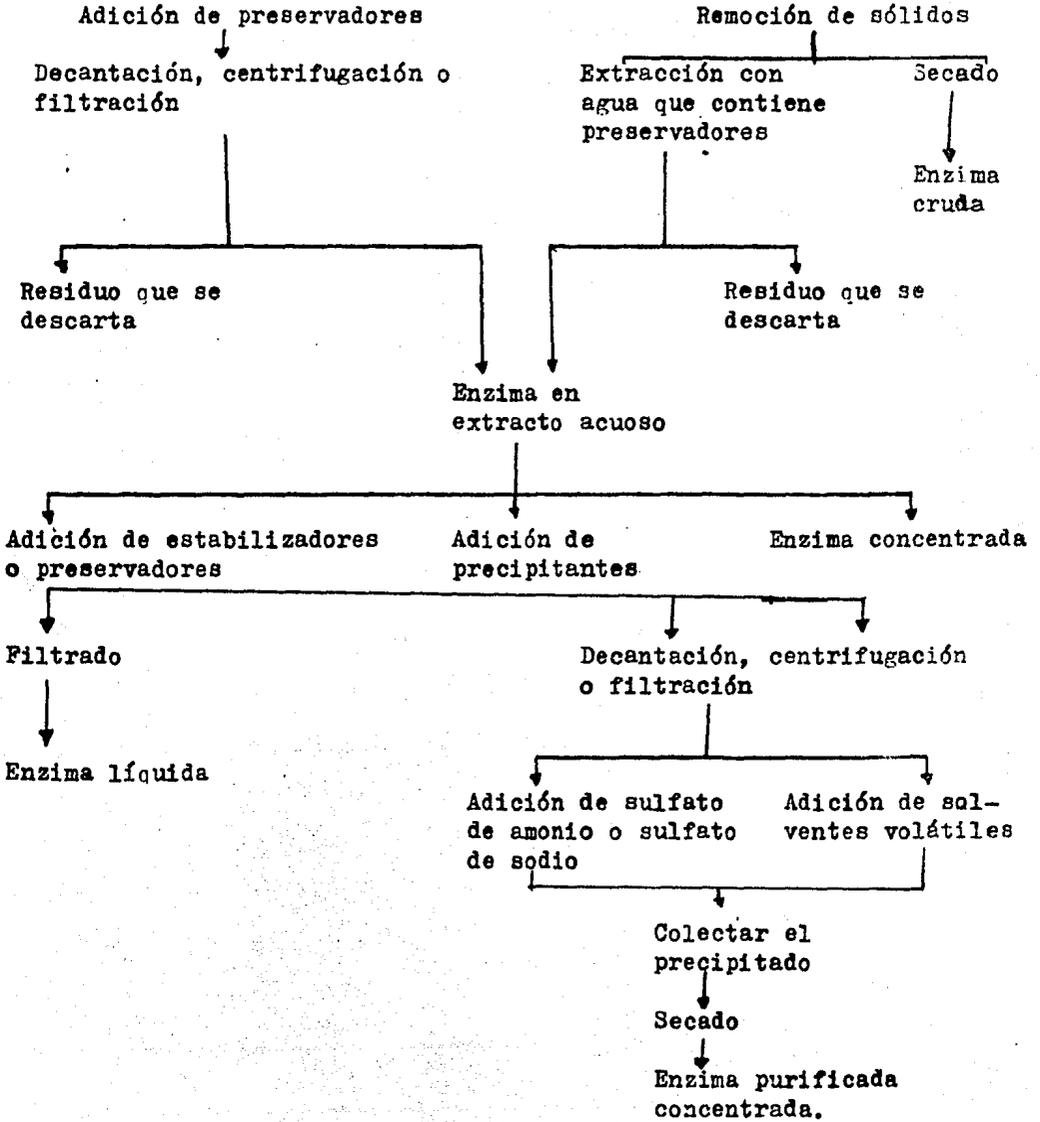
En términos generales la obtención de penicilinasa a escala comercial se realiza por cualquiera de los dos métodos antes descritos. En la tabla No. II se presenta un diagrama general de la obtención de enzimas comerciales.

TABLA II

PRODUCCION DE ENZIMAS MICROBIANAS



Continuación de la tabla II



Referencia: (4)

2.3 PURIFICACION DE LA PENICILINASA

Después de obtener la enzima cruda por los métodos ya descritos, es necesario purificar la enzima tomando en cuenta las propiedades físicas y químicas de la penicilinasas producida. Se han utilizado numerosos métodos para este proceso de acuerdo al tipo de penicilinasas obtenida, a continuación se enumeran varias técnicas de purificación:

- 1) La purificación de la enzima obtenida de E. coli HB101 (42), se realiza de la siguiente forma y puede ser extrapolada esta metodología a la purificación de otras penicilinasas similares en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas:
 - a) El cultivo fluido fue centrifugado a 10,000 rpm durante 10 minutos.
 - b) El sobrenadante fue tratado con sulfato de amonio a 80% de saturación y dejado a 5°C durante toda la noche.
 - c) El precipitado fue colectado por centrifugación 10,000 rpm durante 10 minutos y disuelto en 0.05 M de amortiguador de fosfato de pH= 7.5.
 - d) La solución fue dializada durante toda la noche contra el mismo amortiguador a 4°C.
 - e) La solución resultante es introducida por una columna de celulosa-DEAE, la enzima no es retenida y pasada a través de la columna.
 - f) La penicilinasas fue precipitada nuevamente con sulfato de amonio al 80% y dializada durante toda la noche contra amortiguador de fosfato a pH= 6.5 a 4°C.

- g) El dializado fue absorbido a una columna de celulosa equilibrada con 0.01 M de amortiguador de fosfato.
- h) La enzima fue eluida por aplicación de un gradiente lineal de NaCl de 25 ml/h con un concentrado de 5 ml y potencia de 16,000 UI.
- 2) La penicilinasas obtenida de un cultivo de Fusobacterium nucleatum y otras enzimas relacionadas son purificadas a través del siguiente proceso (86):
- a) La preparación no purificada se pasa a través de una columna de Sephacryl (5.0 X 4.1 cm) a 4°C con amortiguador de fosfato de sodio pH= 7.0 conteniendo 0.10 M de NaCl como eluyente. La fracción que contiene la penicilinasas fue colectada y concentrada a 7.5 ml por ultrafiltración.
- b) Se repite el mismo proceso del paso a) y se concentra a 6.5 ml por ultrafiltración.
- 3) La penicilinasas producida por Alcaligenes faecalis (25) y otros bacilos Gram negativos como P. aeruginosa (63) y Proteus rettgeri (47) se purifican de la siguiente forma:
- a) La solución de la enzima cruda se vierte a una columna de DEAE.
- b) La enzima se eluye a una velocidad de 80 ml/h con un gradiente de NaCl de 0.5 M en un volumen total de 400 ml.
- c) La fracción activa fue concentrada por la adición de polietilén glicol. Esta fracción fue eluida de una columna de Sephadex a una velocidad de 50 ml/h con amortiguador de fosfato 50 mM pH= 7.0.

- d) La fracción activa fue dializada contra agua destilada a $\text{pH} = 7.5$ con un gradiente de sacarosa a 4°C por un tiempo de 12 horas.
- 4) A últimas fechas se ha utilizado con frecuencia cada vez mayor la cromatografía de intercambio iónico con gradiente de pH , pues de acuerdo al punto isoeléctrico de la penicilinasasa (48,83), es capaz de purificar esta enzima eliminando las impurezas contenidas en el extracto crudo.

La ventaja de este método sobre los demás es que es capaz de purificar cualquier tipo de penicilinasasa conociendo su punto isoeléctrico. Werner y Erner (90), purificaron varios tipos de penicilinasas por este método y a continuación es descrito el mismo:

- a) El extracto de enzima cruda se pasa a través de una columna de Sephadex SF 10/50.
- b) Se agrega el poliamortiguador intercambiador de iones ajustando un gradiente de pH , hasta llegar al punto isoeléctrico de la enzima, recogiendo la fracción activa y concentrada por evaporación.

El amortiguador utilizado, el poliamortiguador intercambiador de iones y el factor de dilución se establece de acuerdo al tipo de penicilinasasa a purificar. En la tabla III se encuentran algunos tipos de penicilinasasa y el correspondiente factor de dilución y la solución amortiguador utilizada.

TABLA III

Algunas características en la purificación de penicilinasas considerando el punto isoeléctrico

Microorganismo	Poliamortiguador intercambiador de iones	Solución amortiguadora	Elución Amortiguador	
			Tipo	F. de dilución
<u>E. cloacae</u> P-49	PBE 118	25mM trietil amina	Poli amortiguador pH= 7	1:45
<u>P. aeruginosa</u>	PBE 94	25mM etanol amina	Poli amortiguador PB96 pH= 4	1:20
<u>E. coli</u> ATCC 75	PBE 94	25mM imidazol pH= 7.4	Poli amortiguador pH= 4	1:8
<u>P. aeruginosa</u>	PBE 94	25mM Tris-ácido acético pH= 9.4	Poli amortiguador PB96 (30%) PB74 (70%)	1:10
<u>Klebsiella</u>	PBE 94	25mM Tris-ácido acético	Poli amortiguador pH= 7.4	1:10

2.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PENICILINASA

A) Cinética química

El último paso en la biosíntesis de enzimas de importancia comercial corresponde a la determinación de la cantidad producida y a su actividad. El método de elección utilizado para determinar la actividad de la penicilinasa es de acuerdo a su cinética química sobre el sustrato sobre el que actúan midiendo la cantidad de penicilina hidrolizada y convertida a ácido penicilínico debida a la acción de un miligramo de penicilinasa y esta actividad es expresada en unidades internacionales (65,84).

Existen varios métodos que también son utilizados para determinar la actividad de la penicilinasa como son el método yodométrico y el método espectrofotométrico.

b) Método yodométrico

El método yodométrico fue descrito en 1977 por Jorgensen y colaboradores (58), se basa en la preparación de tiras de papel impregnadas de una suspensión de penicilina en almidón. Las tiras de papel impregnadas de una suspensión de penicilina son colocadas en una solución de yodo por un tiempo de dos minutos, son dejadas escurrir y después son inoculadas con el microorganismo penicilinasa positivo a probar o bien con la penicilinasa ya purificada. Los mecanismos de esta prueba involucran la interacción química del almidón y el yodo para formar un complejo púrpura cuando la solución de yodo es adicionada a las tiras.

Cuando la penicilinasa es producida, la penicilina es convertida a ácido penicilínico el cual convierte el yodo en yoduro, este no es capaz de formar el complejo púrpura con el almidón,

2.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PENICILINASA

A) Cinética química

El último paso en la biosíntesis de enzimas de importancia comercial corresponde a la determinación de la cantidad producida y a su actividad. El método de elección utilizado para determinar la actividad de la penicilinasa es de acuerdo a su cinética química sobre el sustrato sobre el que actúan midiendo la cantidad de penicilina hidrolizada y convertida a ácido penicilínico debida a la acción de un miligramo de penicilinasa y esta actividad es expresada en unidades internacionales (65,84).

Existen varios métodos que también son utilizados para determinar la actividad de la penicilinasa como son el método yodométrico y el método espectrofotométrico.

b) Método yodométrico

El método yodométrico fue descrito en 1977 por Jorgensen y colaboradores (58), se basa en la preparación de tiras de papel impregnadas de una suspensión de penicilina en almidón. Las tiras de papel impregnadas de una suspensión de penicilina son colocadas en una solución de yodo por un tiempo de dos minutos, son dejadas escurrir y después son inoculadas con el microorganismo penicilinasa positivo a probar o bien con la penicilinasa ya purificada. Los mecanismos de esta prueba involucran la interacción química del almidón y el yodo para formar un complejo púrpura cuando la solución de yodo es adicionada a las tiras.

Cuando la penicilinasa es producida, la penicilina es convertida a ácido penicilínico el cual convierte el yodo en yoduro, este no es capaz de formar el complejo púrpura con el almidón,

por esto el color desaparece y el área de prueba se torna blanca, la concentración de la penicilinasas en este caso es directamente proporcional al yoduro producido que causa la desaparición del color púrpura.

A continuación aparece una tabla mostrando los diferentes métodos de detección y medición de la actividad de la penicilinasas.

TABLA IV

Detección y medición de la actividad de la penicilinasas

Principio	Aplicaciones	Sensibilidad
Pérdida de actividad del antibiótico	Selección de microorganismos productores de penicilinasas	Detecta cantidades menores de 10 U/ml
Marcando la concentración de penicilina residual contra un tiempo de incubación con penicilinasas	Ensayo semicuantitativo	Estima valores de 0.005 a 0.01 U/ml
Incremento del área de dermonecrosis en proporción a la cantidad o actividad de la penicilinasas en animales infectados tratados con penicilina	Ensayo semicuantitativo	30-100 U/ml
Penicilina residual formando hidroxamato el cual da un complejo colorido con el ión.	Ensayo colorimétrico	1 a 10 U/ml

Continuación de la tabla IV

Principio	Aplicaciones	Sensibilidad
<p><u>Aparición de un nuevo grupo carboxílico</u></p> <p>Valor de formación de ácido penicilóico determinado por alcalimetría o titulación gasométrica.</p> <p>Decremento en el pH causando un cambio en el color del indicador de pH.</p>	<p>Ensayo alcalimétrico</p> <p>Ensayo manométrico</p> <p>Selección de microorganismos productores de penicilinas</p> <p>Ensayo acidimétrico</p> <p>Prueba microfotométrica</p>	<p>100-300 U/ml</p> <p>5 a 10 U/ml</p> <p>10-100 U/ml</p> <p>0.1-1 U/ml</p> <p>Detecta menos de 100 moléculas de enzima.</p>
<p><u>Formación de un complejo colorido entre el yodo y el ácido penicilóico.</u></p> <p>Valor de formación de ácido penicilóico por decremento de yodo o absorción de yodo-almidón</p> <p>Cantidad de ácido penicilóico formado por unidad de tiempo medido por toma de yodo.</p>	<p>Microyodométrico</p> <p>Ensayo de titulación yodo</p>	<p>0.002-0.2 U/ml</p> <p>1-10 U/ml</p>

Continuación de la tabla IV

Principio	Aplicaciones	Sensibilidad
Cantidad de ácido peniciloico formado por unidad de tiempo .	Ensayo yodométrico de tiempo (yodo, constante, medición del tiempo)	1-10 U/ml
Decolorización del yodo-almidón en la presencia de sustrato indicando la actividad de la penicilinasas	Examinación de yodo Prueba de selección yodométrica	0.01 ₂ 0.1 U/cm ² 0.01-0.1 U/colonia
Cambio en la densidad óptica. Valor de formación de ácido peniciloico determinado por el cambio en la rotación óptica.	Ensayo polarimétrico	10-50 U/ml

CAPITULO III

APLICACIONES DE LA PENICILINASA

La decisión de obtener mediante un proceso químico o por medio de una biosíntesis microbiana a gran escala una sustancia determinada depende en la mayoría de los casos de la utilidad práctica que puede tener esta. Tal es el caso de la penicilinasa la cual se ha visto que en el presente tiene muchas aplicaciones por tal motivo, en los últimos años ha sido obtenida en gran escala situándose entre las principales enzimas comerciales.

El uso cada vez mas frecuente y en diversas áreas que se le ha dado a la penicilinasa permite confiar que su potencial práctico es muy grande. Actualmente podemos citar que la penicilinasa es utilizada en el campo médico, alimenticio y farmacéutico principalmente, por lo que es el objetivo del presente capítulo dar a conocer en que aspectos de estas áreas interviene la penicilinasa.

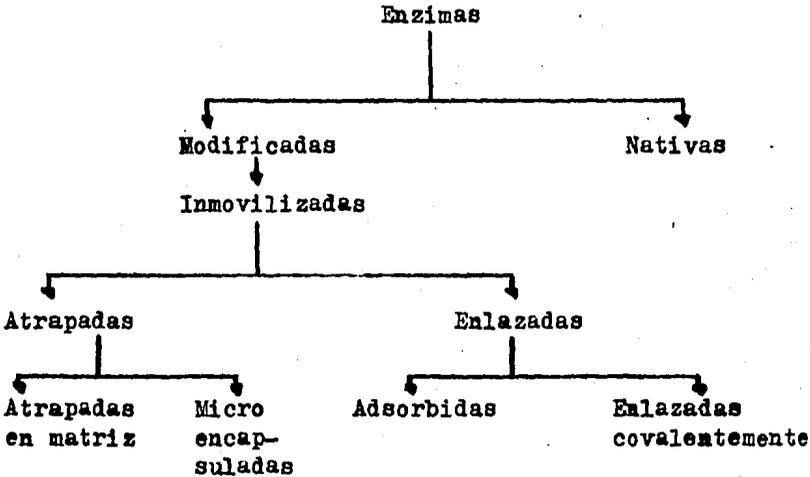
3.1 INMOVILIZACION DE LA PENICILINASA

La penicilinasa es frecuentemente utilizada como una enzima inmovilizada ya que de esta forma es retenida por mayor tiempo su actividad catalítica. Existen diversos métodos para inmovilizar esta enzima por lo que en este punto se describen los métodos de inmovilización de dicha enzima más frecuentemente utilizados.

a) Definición y métodos de inmovilización

Las enzimas inmovilizadas son definidas como enzimas físicamente confinadas o localizadas en una cierta región definida del espacio con retención de sus actividades catalíticas las cuales pueden ser usadas repetida y continuamente. Una clasificación

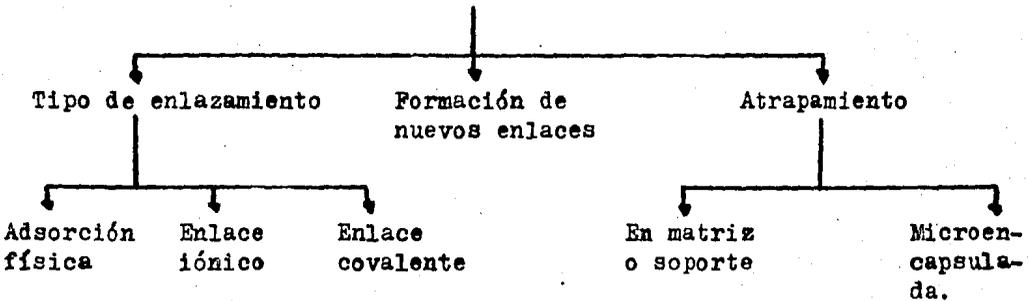
de enzimas inmovilizadas propuesta en la Ia. Conferencia de Enzimas realizada en 1971, se muestra en le cuadro No. 1 y 2.



CUADRO No. 1 Clasificación de enzimas inmovilizadas.

En la misma conferencia se propusó un cuadro de métodos de inmovilización de enzimas, que aquí se muestra:

Métodos de inmovilización de enzimas



CUADRO No. 2 MÉTODOS DE INMOVILIZACION DE ENZIMAS.

La inmovilización de la penicilinasasa se realiza por varios métodos, que a continuación se describen:

- 1) Wasserman y colaboradores (89), realizaron el siguiente procedimiento para inmovilizar la penicilinasasa, (método de atrapamiento en matriz o soporte), el cual tiene un alto grado de confiabilidad en donde es inmovilizada del 97-98% de la enzima.
 - a) La solución de la enzima (150 microlitros) es puesta en un amortiguador 50 mM de citrato-fosfato a pH= 7.5 con 100 mg de perlas de vidrio como soporte e incubadas de 30 a 60 minutos a 25°C.
 - b) Se adicionan 15 microlitros de una solución de glutaraldehído al 10% y un correspondiente volumen de amortiguador.
 - c) Las muestras fueron incubadas por un tiempo adicional de 30 a 60 minutos y el sobrenadante fue desechado quedando únicamente las perlas.
 - d) Las perlas son suspendidas nuevamente en amortiguador y agitadas. El sobrenadante fué removido por aspiración y las perlas fueron lavadas cinco veces con agua.
- 2) Gnanasekaram y Mottola (27), lograron inmovilizar la penicilinasasa por el método de atrapamiento en matriz o soporte que a continuación se desglosa:
 - a) Tratamiento al soporte: Puede realizarse por cualquiera de los dos métodos siguientes:
 - I) Tratamiento con solución alcoholica:
 - A) A un mililitro de una solución de silano se le agregan 9 mililitros de alcohol al 95 %.

- B) La solución es adicionada a 1 g de vidrio y es desgasificada por agitación con aplicación de vacío.
- C) La mezcla resultante fue agitada por dos minutos y el sólido fue aislado por filtración.
- D) El sólido es lavado con etanol al 95% y secado por calentamiento a 110°C durante 10 minutos.

II) Tratamiento con tolueno

- A) A un mililitro de una solución de silano se le agregan 9 mililitros de tolueno anhidro.
- B) 1 g de vidrio es adicionado a la solución desgasificada por agitación y con aplicación de vacío.
- C) La mezcla es reflujaada por 4 horas, y el sólido es aislado por filtración, lavando con metanol.
- D) El producto final es secado por calentamiento a 80°C durante 12 horas.

b) Acoplamiento con glutaraldehído

- A) A 0.5 g de vidrio silanado se le adicionan 20 ml de una solución de glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.05 M a pH= 7.
 - B) La mezcla sólido-solución es agitada por 60 minutos.
 - C) El sólido es lavado con agua destilada para remover el exceso de glutaraldehído.
- c) Inmovilización de la enzima
- A) A 0.5 g de vidrio activado con glutaraldehído se le agregan 10 mililitros de amortiguador de fosfatos 0.05 M a pH= 7.

- B) La mezcla sólido-amortiguador es enfriada a 4°C.
- C) A esta mezcla se le agrega un vial de penicilinas (1695 U).
- D) Se agita por 4 horas a 4°C.
- E) Se lava sucesivamente con agua destilada, KCl 1M y amortiguador de fosfatos 0.05 M a pH = 7.
- F) Se refrigera a 4°C para su posterior utilización.

3.2 APLICACION DE LA PENICILINASA EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

Es importante destacar que la inmovilización de la penicilinas permite retener la actividad catalítica de la enzima lo que ha hecho posible utilizarla principalmente para detectar o determinar la concentración de penicilina en un producto farmacéutico determinado. La penicilinas inmovilizada es usada con suma frecuencia en la industria farmacéutica valorando la cantidad de penicilina en tabletas, inyectables y caldos de fermentación, funcionando así como una técnica que permite el control de calidad en producto terminado (27). Además la enzima inmovilizada es aplicada para detectar posible contaminación de productos farmacéuticos con penicilina (27).

3.3 UTILIDAD DE LA PENICILINASA EN LA INDUSTRIA ALIMENTICIA

El empleo de la penicilinas como un parámetro capaz de detectar cantidades muy pequeñas de penicilina en alimentos es aplicable en la identificación de penicilinas naturales y semisintéticas en leche ya que es importante por diversos factores relacionados con la salud pública y con aspectos técnicos y económicos. Para la determinación rutinaria de antibióticos

se prefiere recurrir en general a métodos microbiológicos dada su sencillez, rapidez y economía, por no necesitarse personal altamente calificado. La determinación rutinaria de antibióticos se basa en la incubación de una muestra de leche en presencia del microorganismo de prueba productor de ácido y un indicador. Si la muestra de leche contiene una concentración de antibiótico mayor a aquel para la cual el método está calibrado el microorganismo es inhibido. De lo contrario, el recuento de microorganismos permanece estable y este no es inhibido, esto se hace aparente mediante la producción de ácido y el consecuente viraje en el color del indicador. Cuando en una muestra de leche se ha identificado el antibiótico por alguno de los métodos microbiológicos, un mecanismo seguido comunmente para determinar el antibiótico presente en una penicilina natural consiste en incubar una parte de la leche en presencia de penicilinas, la desaparición en este caso del efecto antibiótico, permite asumir que el contaminante es una penicilina natural. Sin embargo, la falta de estandarización en los procedimientos de incubación de la muestra con la enzima, así como la falta de precaución en la interpretación de resultados, puede conducir a interpretaciones erróneas en cuanto a la presencia o ausencia de penicilina, así como en cuanto a la certeza de si la penicilina es natural o sintética. Thomé (82), realizó una investigación con el fin de conocer si era posible identificar tanto penicilinas naturales como semisintéticas en leche utilizando una preparación comercial de penicilinas y un método microbiológico de uso rutinario, la investigación presentó algunos problemas pues las

técnicas microbiológicas en cuestión no son capaces de seguir la cinética enzimática, es decir, determinar cuantitativamente la cantidad de penicilina no hidrolizada o remanente en un tiempo dado, si no que son semicuantitativos ya que identifican solamente si el antibiótico presente tiene una concentración mayor o menor que aquella para la cual son calibrados. Sin embargo una solución aparente se vislumbró utilizando el siguiente procedimiento:

- 1) Se incubó la muestra de leche con la penicilina en presencia de penicilinasas.
- 2) Se retiraron muestras a intervalos adecuados de tiempo para ser analizadas por el método microbiológico.
- 3) Mientras la concentración de sustrato remanente (penicilina) fueron mayores al rango de detección para lo cual el método fue calibrado, los resultados mostraron presencia de antibiótico.
- 4) En un momento dado, la concentración de sustrato remanente es menor al rango de detección del método, entonces los resultados indican ausencia de antibiótico.

De esta forma fue posible valorar el tiempo necesario para alcanzar una concentración de antibiótico remanente tal que no sea detectada, considerándose entonces desactivado el antibiótico. Como las cinéticas de actividad son distintas para cada prueba, se relacionó el tiempo de desactivación con la concentración de la enzima y la del sustrato original, lográndose de esta forma su identificación.

En la investigación se utilizaron los siguientes reactivos: una ampollita de penicilinasas liofilizada de B. cereus conteniendo 100000 U que se utilizó para preparar soluciones en agua destilada con 30 % de solución amortiguadora de fosfatos a pH= 7 de 10,000 y 1000 U/ml. Soluciones de trabajo a diferentes concentraciones fueron preparadas a partir de las soluciones anteriormente descritas con agua destilada. Entre los antibióticos utilizados se encuentran la sal sódica de bencilpenicilina, sal procaínica de bencilpenicilina, sal de sodio de fenoximetilpenicilina, metecilina sódica, trihidrato de amoxicilina, cloxacilina sódica. Fueron preparadas soluciones de 0.6 microgramos/ml de cada penicilina con agua destilada, y subsecuentes diluciones con agua destilada fueron hechas. La leche en polvo libre de antibiótico fue reconstituida en una relación 1:10 con agua destilada y se prepararon estándares de leche con antibiótico a diferentes concentraciones. En todos los casos las soluciones de antibióticos y enzimas fueron almacenadas por 5 días a 5°C.

Determinación del antibiótico

Dos métodos microbiológicos fueron usados. El primer método es el Delvotest P que consiste en una ampollita con un medio sólido en el cual se encuentra el microorganismo de prueba (P. stearothermophilus var. calidolactis), y a la que se le agrega una tableta con el indicador de ácido y con nutrientes, adicionando también 0.1 ml de leche; la incubación se realiza a 65°C en un baño de agua y los resultados pueden observarse después de 2.5 horas. El segundo método conocido como Intertest Acuespheres consiste en usar una tableta que contiene el indicador, los nutrientes y el

microorganismo de prueba (S. thermophilus) esta tableta se agrega a un tubo de ensayo con 2.5 ml de leche, la incubación se realiza a 45°C en un baño de agua y los resultados pueden obtenerse después de 4 horas.

Incubación de la enzima

Los tubos de ensayo con las cantidades adecuadas de dilución de la enzima y de leche con antibiótico, ambos a una temperatura de 5°C fueron precalentados por separado, en un baño de agua a 30°C por 10 minutos. Después de ese tiempo volúmenes determinados de la dilución de enzima se transfieren a los tubos conteniendo la leche con antibiótico, el tubo se mezcla por agitación. A determinados intervalos de tiempo las muestras de leche fueron retiradas (0.1 ml para el Devoltest P y 2.5 ml para el Intertest Accuespheres) y ensayadas inmediatamente por el método microbiológico.

Resultados

Para determinar la concentración de sustrato (penicilina) no hidrolizado, Thomé utilizó los siguientes criterios:

Usar:

- 1) La máxima concentración de enzima (penicilinasa) necesaria para hidrolizar el antibiótico en su totalidad, en ese caso habrá crecimiento del microorganismo prueba (+) pues todo el antibiótico es hidrolizado.
- 2) La concentración promedio de la enzima necesaria para hidrolizar parcialmente el sustrato originando una inhibición parcial del microorganismo prueba (+/-).

3) La mínima concentración de sustrato necesaria para inhibir por completo el crecimiento del microorganismo prueba (-). En la tabla I se muestran los rangos de detección para los dos métodos microbiológicos utilizados.

Tabla I

Rango de detección del antibiótico utilizando la enzima penicilinasas.

Sustrato	Resultado.	Conc. de antibiótico (microgramos/ml).	
		<u>Delvotest P</u>	<u>Intertest Accuespheres</u>
Penicilina bencilica	+	0.0012	0.005
	+/-	0.0024	0.01
	-	0.0036	0.02
Ampicilina	+	0.0015	0.003
	+/-	0.003	0.006
	-	0.006	0.012
Amoxicilina	+	0.0015	0.006
	+/-	0.003	0.006
	-	0.006	0.024
Meticilina	+	0.003	(positivo hasta 6 mcg/ml)
	+/-	0.006	
	-	0.012	
Cloxacilina	+	0.02	0.3
	+/-	0.03	0.4
	-	0.04	0.6

Asimismo fueron determinados los valores de V_{max} y K_m aparentes para la enzima, en la tabla II y III se muestran las velocidades máximas y K_m encontrados para los diferentes antibióticos al ser hidrolizados por una cantidad determinada de penicilinas.

TABLA II

Valores de V_{max} encontrados para diferentes antibióticos hidrolizados por la penicilinas.

Tipo de penicilina	V. máxima original	V. máxima corregida	Conc. de penicilinas (U/ml)
Bencilpenicilina	3.333×10^{-6}	3.333×10^{-6}	12.5
Ampicilina	1.999×10^{-6}	2.798×10^{-6}	50.0
Amoxicilina	1.999×10^{-6}	3.599×10^{-5}	50.0
Meticilina	1.666×10^{-7}	5.797×10^{-5}	500
Cloxacilina	6.666×10^{-8}	1.999×10^{-5}	2500

TABLA III

Valores de Km encontrados para diferentes antibióticos hidrolizados por la penicilinasa

Tipo de penicilina	Km (mM/ml)
Bencilpenicilina	5.3808×10^{-6}
Ampicilina	5.3808×10^{-5}
Amoxicilina	5.3808×10^{-5}
Meticilina	1.076×10^{-4}
Cloxacilina	1.614×10^{-4}

3.4 UTILIZACION DE LA PENICILINASA EN LA CLINICA

Las primeras preparaciones de enzima cruda fueron adecuadas en el tratamiento de pacientes alérgicos a la penicilina, hasta la introducción de la meticilina y después de las isoxasol-penicilinas las cuales presentaron problemas para ser hidrolizadas por la penicilinasa por lo que esta tuvo que ser purificada para acelerar su actividad.

En 1973 el problema pareció haberse resuelto mediante el uso de preparaciones comerciales disponibles de la enzima obtenida

a partir de B. cereus que contenía a los dos componentes, el tipo I (penicilinasas) y el tipo II (cefalosporinasa), la mezcla de enzimas fue capaz de inactivar a todas las penicilinas y cefalosporinas (73).

Las preparaciones de penicilinasas han sido aplicadas en el laboratorio clínico para inactivar a las penicilinas de los fluidos del cuerpo, en pacientes que presenten un tipo de alergia contra la penicilina.

Antes de llevar a cabo la administración de la penicilinasasa se hace una buena purificación de la enzima seguida de una serie de ensayos clínicos en animales de laboratorio para poder comprobar la eficacia y los efectos que produce: siendo los resultados satisfactorios se procede a la utilización de la penicilinasasa (92).

Las penicilinasas obtenidas de B. cereus son las más utilizadas y se administran por vía intramuscular para destruir en la circulación a la penicilina residual, en pacientes hipersensibles (7,57). Aunque la inyección de estas proteínas bacterianas no es solamente efectiva, sino que además esta asociada con una sorprendente baja en los efectos adversos (91).

El procedimiento es muy interesante como un tratamiento alérgico porque lleva a cabo la destrucción de alérgenos que en este caso es la penicilina (14, 94).

Otra de las aplicaciones que tiene la penicilinasasa en la clínica es la comprobación a que tipo de antibióticos afecta la enzima y cuales son resistentes al efecto de esta, haciendo que el paciente no responda al tratamiento con antibióticos betalactámicos.

La serie de pruebas realizadas para determinar esto son parecidas al antibiograma y la metodología a seguir es como sigue:

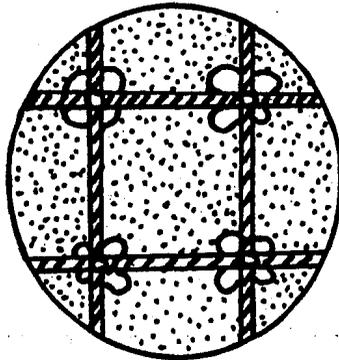
- 1) Se aísla el microorganismo problema a partir de muestras tomadas del paciente.
- 2) Para realizar la prueba se incuba el microorganismo en un medio de cultivo adecuado ya sea sólido o líquido.
- 3) Se le agrega al medio de cultivo discos impregnados con diferentes antibióticos y a distintas concentraciones.
- 4) Después de un período de incubación de 18 a 24 horas y a una temperatura de 37°C se procede a medir el tamaño de los halos de inhibición producidos por la acción del antibiótico que no ha sido hidrolizado por la penicilinasasa producida por el microorganismo; si no se forman los halos de inhibición indica que la penicilinasasa hidrolizó el antibiótico y el tamaño del halo es proporcional a la cantidad de penicilinasasa presente. Ya que a mayor producción de penicilinasasa es menor el halo de inhibición.

Así es como se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) para diferentes antibióticos siendo de gran utilidad para dar un tratamiento efectivo contra una gran cantidad de microorganismos patógenos que producen penicilinasasa.

Se tienen reportes de una variedad muy grande de microorganismo como son: Staphylococcus aureus (32), Escherichia coli (30), Branhamella catarrhalis (61), Klebsiella sp. (13,45), Proteus mirabilis, Proteus morgani (64, 88), Salmonella sp. (30), Acinetobacter sp. (13), Citrobacter sp., Serratia marcescens (79), P. aeruginosa (30), Enterococcus sp., Eritrococcus, Pseudomonas cepacea (64), Haemophilus influenzae (3,5,50), Klebsiella

pneumoniae (11), que son usados como microorganismos de prueba para antibióticos como son: ampicilina, piperacilina, amoxicilina, temocilina, moxolactam, determinando la concentración mínima inhibitoria para cada uno y a diferentes concentraciones de antibiótico.

Además del método mencionado existe otro el cual es llamado hoja de trébol, en el que se utiliza un microorganismo indicador que no debe de presentar actividad de la penicilinasasa, la especie de prueba, y discos impregnados de antibióticos a diferentes concentraciones y sembrar en agar sangre como se muestra en la siguiente figura, es llamado hoja de trébol porque los halos de inhibición parecen un trébol de cuatro hojas (41).



especie de prueba



especie indicadora



disco de antibiótico



zona de inhibición



3.5 PROBLEMAS EN LA PRODUCCION, APLICACION Y COMERCIALIZACION DE LA PENICILINASA

Los principales problemas en la producción de la penicilinasas que existen en nuestro país (36), se resumen en los siguientes puntos:

- 1) Uno de los principales problemas es la incipiente producción y que la adquisición está basada en mercados extranjeros de manera que el desarrollo de tecnologías basadas en este producto implica el riesgo de una dependencia externa cada vez mayor.
- 2) Se deberían de formular alternativas para la producción que esten dentro del aprovechamiento de los recursos naturales y a la generación de tecnología propias para la producción de acuerdo a nuestras condiciones
- 3) Que las Universidades, Institutos y Centros de Investigación de nuestro país tengan mayor cuidado con respecto a las investigaciones sobre producción de enzimas, ya que deberían sus investigaciones canalizadas a apoyar el desarrollo industrial.
- 4) Otro problema que existe es que no hay una estrecha relación entre las Universidades y la Industria ya que es muy difícil que una Compañía privada o estatal inicie conjuntamente proyectos que culminen en procesos industriales, por lo general, los industriales piensan que es más sencillo comprar tecnología en el exterior que recurrir a las universidades.

- 5) El costo de las inversiones hace difícil que las investigaciones sobre producción de enzimas que se realizan en las universidades se haga una realidad comercial, ya que las inversiones son grandes.
- 6) Uno de los problemas que con más frecuencia se presenta es con respecto a la purificación y extracción de la enzima, ya que aunque los procesos de producción de las primeras etapas sea altamente eficiente los pasos limitantes son precisamente los de recuperación ya que no se cuenta con la estructura tecnológica adecuada ni con el conocimiento básico para poder optimizar estas operaciones.

Estos son los principales problemas que se han presentado para poder producir en gran escala toda la cantidad de penicilinas que es requerida por la industria ya que en nuestro país no se produce y toda la que se utiliza es de importación. Creando así grandes problemas de su uso con respecto al costo y al tiempo que se lleva para la importación.&

& Aunque ya existe una tentativa de producción de enzimas hidrolíticas de las penicilinas en México. El reporte más reciente sobre producción y aplicación, indica que algunas industrias empiezan a interesarse en la investigación de las mismas; tal es el caso de la Cía. de Fermentaciones y Síntesis S. A. quienes proporcionaron reactivos e información para la realización de una tesis efectuada en el Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología.

CONCLUSIONES

Como se ha visto en el desarrollo del presente trabajo, es muy importante la producción de la penicilinasasa, ya que es una enzima de tipo comercial, con una infinidad de aplicaciones en la industria farmacéutica, de alimentos, en la clínica y es usada también en terapia. Por todas estas razones se ha incrementado su producción y el mejoramiento de la tecnología sobre su obtención en los últimos años. Siendo utilizado el método de biosíntesis microbiana para la elaboración de la enzima a gran escala utilizando para ello a los principales microorganismos productores, resultando un método en cierta forma barato y rápido.

Aunque en nuestro país no se ha podido realizar una producción a gran escala, debido a que no se posee la tecnología necesaria para ello, así como que es requerida una gran inversión para la implementación y funcionamiento de la planta; porque el problema no sólo trasciende en una inversión inicial en equipo, terreno, construcción, personal que laborara, sino que también es necesario la adaptación de la tecnología y la comercialización de la enzima.

Y en el país no existe una institución que quiera realizar este proyecto debido a la necesidad de grandes inversiones y que las utilidades son obtenidas por lo menos después de dos años de iniciado el proceso.

Otro de los puntos importantes que hay que considerar es la de tecnología apropiada y los centros de investigación del país necesitan de bastantes recursos económicos para llevar a cabo el desarrollo de técnicas sobre producción de enzimas a nivel industrial. Algo que podría ayudar a dichos centros de

investigación es el respaldo que les dieran algunas compañías o el gobierno mismo, facilitando así la probabilidad de realizar este proyecto.

Porque no nada más se disminuiría el costo de la enzima ya que es muy elevado debido a que la penicilinasasa usada en el país es de importación, sino también por el tiempo que se necesita para su importancia sería menor y el suyo se vería aumentado.

La penicilinasasa usada en el sector clínico es importada de Estados Unidos, Europa, y Japón por ser los principales productores, siendo por lo tanto extremadamente cara y su uso es limitado.

Además en este trabajo se enumeraron técnicas para la producción, extracción, purificación e inmovilización de la penicilinasasa, haciendo uso de métodos microbiológicos ya que como se dijo anteriormente son los que resultan más baratos y de donde se obtiene mayor rendimiento. Esperando que en el futuro este trabajo sea una contribución para el desarrollo de un proceso de obtención de la penicilinasasa a gran escala.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Ambler R. P., Meadway R. J. Chemical Structure of Bacterial Penicillinases. Nature 1969; Vol. 222: págs. (24-26).
- 2) Arima H. J. Global impacts of applied microbiology. Microbiology 1979 ; 45/4: págs. (277-294).
- 3) Baker C. N., Thornsberry C., Jones R. N. In Vitro Antimicrobial Activity of Cefoperazone, Cefotaxime, Moxolactam, Azlocillin, Mezlocillin, and Other B-Lactam Antibiotics Against Neisseria gonorrhoeae and Haemophilus influenzae, Including B-Lactamase-Producing Strains. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1980; 17/4: págs(757-761).
- 4) Beckhorn J. E. Production of Microbial Enzymes. Microbial Technology 1982; 75/2: págs. (366-380).
- 5) Bergeron M. G., Claveau S., Simard P. Limited In Vitro Activity of Cefamandole Against 100 Beta-Lactamase and Non-Beta-Lactamase-Producing Haemophilus influenzae Strains: Comparison of Moxalactam, Chloramphenicol, and Ampicillin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 19/1: págs. (101-105).
- 6) Berks M., Redhead K., Abraham P. E. Isolation and Properties of an Inducible and a Constitutive B-Lactamase from Pseudomonas aeruginosa. J. Gen. Microbiol. 1982; Vol. 128: págs. (155-159).
- 7) Biggs W. H., Wunderlich C. A., Corbeil L.C. Effects of Penicillinase on Bactericidal and Complement Activities in Normal Human Serum. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1983; 23/5: págs. (738-741).
- 8) Bourgault A. M., Rosenblatt J. E. Characterization of Anaerobic Gram-Negative Bacilli by Using Rapid Slide Tests for B-Lactamase Production. J. Gen. Microbiol. 1979; 9/5: págs. (654-656).
- 9) Boyer P.D. The Enzymes. Vol. IV. Ed. Academic Press, New York and London 1971; 3a. Edición: 756 págs.

- 10) Brunton J., Ehrman N., Maclean I. Molecular Epidemiology of Beta-Lactamase-Specifying Plasmids of Haemophilus ducreyi. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1982; 21/6: págs. (857-863).
- 11) Bush K., Freudenberger J. S. Interaction of Aztheonam and Related Monobactam with B-Lactamases from Gram-Negative Bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1982; 22/3: págs. (414-420).
- 12) Calderwood S. B., Gardella A. Effects of Azlocillin in Combination with Clavulanic Acid, Sulbactam, and N-Formimidoyl Thienamycin Against B-Lactamase-Producing, Carbenicillin-Resistant Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1982; 22/2: págs (266-271).
- 13) Casida L. E. Enzymes as Fermentation Products. Industrial Microbiology, Edit. John Wiley and Sons 1974: págs (390-401).
- 14) Chain F., Abraham E. P. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature 1940; Vol. 146: págs (837-842).
- 15) Chibata I., Tosa T. Immobilized Enzymes, Edit. John Wiley and Sons 1978; 284 págs.
- 16) Ching-Pong M., Prasad K., Turnowsky F. Synthesis and B-Lactamase inhibitory activities of Some clavulanic acid analogues. The Journal of Antibiotics 1983; 36/4: págs (398-406).
- 17) Citri N., Pelleck R. The Biochemistry and Function of B-Lactamase (Penicillinase). Advances in Enzymology 1966; Vol. 28: págs. (237-323).
- 18) Crosby M. A., Gump D. W. Activity of Cefoperazone and Two B-Lactamase Inhibitors, Sulbactam and Clavulanic Acid, Against Bacteroides sp. Correlated with B-Lactamase Production. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1982; 22/3: págs (398-405).

- 19) Cullmann W. The Interaction of Beta-Lactam Compounds with Chromosomally Mediated Enzymes: Relations to the Molecular Structure. *Chemotherapy* 1985; Vol. 31: págs. (272-278)
- 20) Cullman W., Opferkuch W., Stieglitz M. Influence of Spontaneous and Inducible B-Lactamase Production on the Antimicrobial Activity of Recently Developed B-Lactam Compounds. *Chemotherapy* 1984; Vol. 30: págs. (175-181)
- 21) Duez C., Ghysen J. M. Purification and properties of the exocellular B-Lactamase of *Actinomadura* strain R39. *Biochimica et Biophysica Acta* 1982; Vol. 700: págs. (24-32)
- 22) Farmer T., Reading C. B-Lactamases of *Branhamella catarrhalis* and Their Inhibition by Clavulanic Acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1982; 21/3: págs (506-508)
- 23) Fayet O., Froment Y. Analysis of the plasmid content of three B-lactamase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains. *FEMS Microbiology Letters* 1982; Vol. 14: págs (271-275)
- 24) Fu K. P., Gregory F. J. Inhibitory Activity of Cefpiramide on B-Lactamase. *Chemotherapy* 1985; Vol. 31: págs (200-203)
- 25) Fujii T., Sato K., Inoue M. Purification and Properties of Inducible Penicillin B-Lactamase Isolated from *Alcaligenes faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1985; 27/4: págs. (608-611)
- 26) Girouard Y. C., Maclean J. W. Synergistic Antibacterial Activity of Clavulanic Acid and Amoxicillin Against B-Lactamase-Producing Strains of *Haemophilus ducreyi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1981; 20/1: págs (144-145).
- 27) Gnanasekaran R., Mottola H. A. Flow Injection Determination of Penicillins Using Immobilized Penicillinase in a Single Bead String Reactor. *Anal. Chem.* 1985; Vol. 52: págs. (1005-1009)

- 28) Grappel P. S., Giovenella A. J. B-Lactamase induction by N-Formimidoylthienamycin. *The Journal of Antibiotics* 1984; 37/9: págs (1101-1102)
- 29) Greenway L. A., Dyke G. H. The Effect of Membrane-bound B-Lactamase on Linoleic Acid Sensitivity in S. aureus. *J. Gen. Microbiol.* 1983; Vol. 129: págs (2457-2465).
- 30) Greenwood D., Cowlshaw A. In Vitro Activity of Temocillin, a New B-Lactamase-Stable Penicillin Active Against Enterobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1983; 22/2: págs. (198-200)
- 31) Gunda T. E., Puniyczki M. B-Lactamase Inhibition by 6 alfa-Thiocyanatopenicillanic Acids. *The Journal of Antibiotics* 1982; 35/3: págs (367-368)
- 32) Haller I. Importance of Extracellular and Cell-Bound B-Lactamase in Mediating Resistance of S. aureus to Mezlocillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1984; 25/1: págs (125-127)
- 33) Hayashi S., Wu C. H. Biosynthesis of Bacillus licheniformis Penicillinase in Escherichia coli and in Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology* 1983; 156/2: págs(773-777)
- 34) Hirai K., Iyobe S. Purification and Properties of a New B-Lactamase from Pseudomonas cepacia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1980; 17/3: págs (355-358)
- 35) Hoffman T. A., Cleary T. J. Effects of inducible B-Lactamase and antimicrobial resistance upon the activity of newer beta-lactam antibiotics against Pseudomonas aeruginosa. *The Journal of Antibiotics* 1981; 34/10: págs (1334-1340)
- 36) Huitrón C. *Biología de enzimas U.N.A.M.* 1980; 395 págs.

- 37) Imanaka T., Oshibata W. Comparative Studies on Extracellular Penicillinases of the Same Structural Gene, pen P, Expressed in B. licheniformis and B. subtilis. J. Gen Microbiol. 1983 Vol 129: págs (2621-2629).
- 38) Imanaka T., Tanaka T. Cloning of the Genes for Penicillinase, pen P and pen I, of B. licheniformis in Some Vector Plasmids and Their Expression in E. coli, B. subtilis, and B. licheniformis. Journal of Bacteriology 1981; 147/9: págs. (776-786).
- 39) Ingham H. R. B-Lactamase, producing anaerobes. The Lancet 1980; No. 4: págs (748).
- 40) Izui K., Nielsen B. K. Large Exopenicillinase, Initial Extracellular form detected in cultures of B. licheniformis. Biochemistry 1980; Vol. 19: págs (1882-1886).
- 41) Jorgensen E. P. The Clover-Leaf Test and Inactivation of B-Lactam Antibiotics by Gram-Negative Rods. Microbiology 1985; Vol. 31: págs (95-101).
- 42) Kato C., Kudo T. Extracellular Production of Bacillus Penicillinase by Escherichia coli carrying pEAP₂. Eur. J. Appl. Microbiol Biotechnol. 1983; Vol. 18: págs (339-343).
- 43) Kudo T., Kato C. Excretion of the Penicillinase of an Alkaliphilic Bacillus sp. Through the E. coli Outer Membrane Journal of Bacteriology 1983; 156/2: págs (949-951).
- 44) Leadin A. Control of penicillinase-producing gonococci. Br. Med. J. 1977; No. 1618: págs (354-367).
- 45) Maddock J. L., May J. R. Indirect pathogenicity of penicillinase producing enterobacteria in chronic bronchial infections. Lancet 1985; No. 793: págs (456-466).
- 46) Magot M. Some Properties of the Cl. butyricum group B-Lactamase. J. Gen Microbiol. 1981; Vol. 127: págs (113-119).

- 47) Matsuura M. Nakazawa H. Purification and Biochemical Properties of B-Lactamase produced by P. rettgeri. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1980; 18/5: págs (687-690).
- 48) Matthews A. E. Identification of B-Lactamases by analytical isoelectric focusing. Journal of Gen. Microbiol. 1976; Vol. 94; págs (789-793).
- 49) Mehta J. R., Newman D. J. Cefonicid: A Stable B-Lactamase Inhibitor. The Journal of Antibiotics 1981; 34/2: págs (235-244).
- 50) Mendelman P. K., Chaffin D. O. Characterization of Non-B-Lactamase-Mediated Ampicillin Resistance in H. influenzae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1984; 26/2: págs (202-203).
- 51) Mezest S. F., Blacher R. W. Processing of B. cereus in E. coli and B. subtilis. The Journal of Biological Chemistry 1985; 260/2: págs (1218-1223).
- 52) Nakazawa H. Michiko M. Induction of B-Lactamase and penicillin binding proteins in E. coli by introduction of Streptomyces DNA. The Journal of Antibiotics 1983; 36/11: págs (1434-1438).
- 53) Neu H. C., Labthavikul P. Comparative in Vitro Activity of N-Formimidoyl Thienamycin Against Gram-Positive and Gram-Negative aerobic and Anaerobic Species and Its B-Lactamase Stability. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1983; 21/1: págs (180-187).
- 54) Neu H. C., Labthavikul P. In Vitro Activity and B-Lactamase Stability of Cefmenoxime. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1982; 22/2: págs (316-322).
- 55) Nielsen J. B. Penicillinase Secretion in Vivo and in Vitro. Methods in Enzymology; Vol. 97: págs (153-158).
- 56) Nielsen J. B., Izui K. Secretion and processing of a precursor to the usual exopenicillinase of B. licheniformis. 749-C Microbiology 1983; Vol. 55: págs (457).

- 57) Nudelman A. Semisynthetic Cephalosporins. *The Journal of Antibiotics* 1981; 34/10: págs (1311-1317)
- 58) Oberhofer T. R., Towle D. W. Evaluation of the Rapid Penicillinase Paper Strip Test for Detection of Beta-Lactamase. *J. Clin. Microbiol.* 1983; 151/3: págs (196-199)
- 59) Ogawara H., Torikawa S. Purification of B-Lactamase from S. celulosae by affinity chromatography on blue sepharose. *The Journal of Antibiotics* 1979; 32/12: págs (1329-1335)
- 60) Okamura K., Sakamoto M. PS-5 Inhibition of a B-Lactamase from Proteus vulgaris. *The Journal of Antibiotics*; 33/3: págs (293-302)
- 61) Percival A., Curkill J. E. Pathogenicity of and B-lactamase production by Branhamella (Neisseria) catarrhalis. *Lancet* 1977; No. 2: págs (1175)
- 62) Roggenkamp R., Dargatz H. Precursor of B-Lactamase is Enzymatically Inactive. *The Journal of Biological Chemistry* 1985; 260/3: págs (1508-1512)
- 63) Saino Y., Kobayashi F. Purification and Properties of Inducible Penicillin B-Lactamase Isolated from Pseudomonas maltophilia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1982; 22/4: págs (564-570)
- 64) Sander S., Bergan T. Piperacillin in the Treatment of Urinary Tract Infections. *Chemotherapy* 1980; Vol. 26 : págs (141-144)
- 65) Sargent M. G. Rapid Fixed-Time Assay for Penicillinase. *Journal of Bacteriology* 1968; 95/4: págs (1493-1494)
- 66) Sato K., Fujii T. Biochemical Properties of B-Lactamase produced by Flavobacterium odotarium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1985; 27/4: págs (612-614)

- 67) Sato K., Matsuura Y. Properties of a New Penicillinase Type Produced by *B. fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1982; 22/4: págs (579-584).
- 68) Sawai T. Kanno K. Characterization of High B-Lactamases of Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology* 1982; 152/2: págs (567-571).
- 69) Sawai T., Tsukamoto K. Cefoxitin, and penicillanic acid sulfone as suicide inhibitor for different types of B-Lactamases produced by Gram-Negative bacteria. *The Journal of Antibiotics* 1982; 35/11: págs (1318-1326).
- 70) Sawai T., Yoshida T. A set of bacterial strains for evaluation of B-Lactamase-stability of B-Lactam Antibiotics. *The Journal of Antibiotics* 1981; 34/10: págs (1594-1602).
- 71) Sawai T., Yoshida T. A simple method for testing the efficacy of a B-lactamase inhibitor against B-Lactamase-producing Gram-Negative bacteria. *The Journal of Antibiotics* 1982; 35/8: págs (1072-1077).
- 72) Selwyn S. Cefamandole and B-lactamases. *Br. Med. J.* 1973; No. 1: pág (1548).
- 73) Selwyn S. *The Beta-Lactam Antibiotics*. Edit. Hodder and Stoughton 1980; 363 págs.
- 74) Smith J. T., Hamilton M. T. Differences between penicillinases from Gram-Positive and Gram-Negative bacteria. *Nature* 1963; Vol. 197: págs (976-978).
- 75) Song Y., Sawa T. The Screening of B-Lactamase Inhibitor: Inhibition by Fatty Acids produced by bacteria. *The Journal of Antibiotic* 1981; 34/8: págs (980-983).
- 76) Stessman J., Michel J. Effects of Subminimal Inhibitory Concentrations of Aminoglycosides on the Penicillinase Productions of *S. aureus*. *Chemotherapy* 1983; Vol. 29: págs (116-120).

- 77) Sykes S. B. The classification and terminology of Enzymes that hydrolyze of B-lactam antibiotics. The Journal of Infectious Diseases 1982; 145/5: págs (762-765).
- 78) Sykes S. B., Matthews M. The B-lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to B-lactam antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 1976; Vol 3: págs (133-136).
- 79) Tajima M., Masuyoshi S. Purification and Properties of B-Lactamases from S. marcescens. J. Gen Microbiol. 1981; Vol. 126: págs (179-184).
- 80) Tajima M., Sawa K. The B-Lactamases of Genus Bacteroides. The Journal of Antibiotics; 36/4: págs (423-428).
- 81) Toda M., Ikeuchi T. Comparative inhibition of B-lactamase by cephamycin antibiotics. The Journal of Antibiotics 1981; 34/1 págs. (114-117).
- 82) Thomé J. Utilización de Beta-Lactamasa y el método Intertest en la identificación de penicilinas. Biotecnología de Enzimas; Ed. C. Huitrón UNAM 1983; págs (345-360)
- 83) Toth-Martinez B. L., Gal S. Use for chromatofocusing for separation of B-lactamases. Experimental 1983; Vol. 25: págs (254-267).
- 84) Tsuji H. A novel method for determination of B-lactamase using the agar dilution method. Chemotherapy 1983; Vol. 29 págs (401-407).
- 85) Tsuji H., Ohashi Y. Quantitative Analysis of B-lactamase production and multiple resistance to B-lactam antibiotics in clinical isolate of E. coli. Chemotherapy 1982; Vol. 28 págs (26-39).
- 86) Tuner K., Lindovist L. Purification and Properties of a Novel B-Lactamase from Fusobacterium nucleatum. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1985; 27/6: págs (943-947).

- 87) Unger A. M., Nemuth L. Penicillinase and treatment of acute renal insufficiency due to penicillin hypersensitivity. J. Am. Med. 1978; 167/1237: págs. (314-319)
- 88) Verbis L. Comparison of In Vitro Activities of Eight B-Lactamase-Stable Cephalosporins Against B-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1981; 19/3: págs (407-413)
- 89) Wasserman B.P., Hultin H. O. High-Yield Method for Immobilization of Enzymes. Nature 1984: 14/3: págs (98-109)
- 90) Werner R. G., Erne A. M. Purification of B-lactamases by chromatofocusing. FEMS Microbiology Letters 1983; Vol. 17 págs (211-216)
- 91) Wiseman A. Biochemical Basis of Free and Immobilised enzyme Applications in Industry, Analysis, Synthesis and Therapy. J. Chem. Tech. Biotechnol 1980 ; Vol. 30: págs 521-529
- 92) Kerri L., Orsolini P. Experimental infections for the evaluation of B-lactamase resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1982; 21/2: págs (201-203)
- 93) Yotsuji A., Minami S. Properties of Novel B-Lactamase produced by B. fragilis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1983; 24/6: págs 925-929.
- 94) Zimmerman M. C. The profilaxis and treatment of penicillin reactions. Clin. Med. 1978; 5/305: págs (876-879)