



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

PENICILINA: REGULACION POR AMONIO  
DE LA BIOSINTESIS EN

Penicillium chrysogenum NRRL-1951

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

Fernando Lara Núñez

MEXICO, D. F.

1980

M-21698



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

Jurado asignado originalmente según el tema.

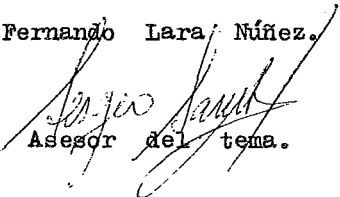
Presidente	Prof. Lilia Vierna García.
Vocal	Prof. Alfredo Echegaray Alemán.
Secretario	Prof. Sergio Sánchez Esquivel.
1er. Suplente	Prof. Jorge Soto Soria.
2o. Suplente	Prof. Biserka Sveshtarova Pekarkova.

Sitio donde se desarrolló el tema.

Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones  
Biomédicas U. N. A. M.

Sustentante.

Fernando Lara Núñez.



Asesor del tema.

Dr. Sergio Sánchez Esquivel.

AL SEÑOR NUESTRO DIOS  
A QUIEN DEBO TODO EN LA VIDA

A M I S P A D R E S  
POR EL GRAN AMOR QUE ME HAN DADO.

---

A M I S H E R M A N O S  
POR SU CARÍÑO Y EJEMPLO

A M I S A M I G O S  
POR SU AMISTAD

AL DR. SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL  
CON GRATITUD

## INDICE.

CAPITULO I	INTRODUCCION	1
CAPITULO II	OBJETIVO	3
CAPITULO III	GENERALIDADES	4
CAPITULO IV	BIOSINTESIS DE PENICILINA	10
CAPITULO V	REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PENICILINA EN <u>Penicillium chrysogenum</u>	14
CAPITULO VI	FUNDAMENTO DEL PROYECTO	23
CAPITULO VII	MATERIAL Y METODOS	27
CAPITULO VIII	RESULTADOS	35
CAPITULO IX	DISCUSION DE RESULTADOS	46
CAPITULO X	CONCLUSIONES	49
CAPITULO XI	BIBLIOGRAFIA	51

## CAPITULO I.

### INTRODUCCION.

Los antibióticos representan una variedad de metabolitos secundarios, de complejidad química variable que son sintetizados por algunos microorganismos, usualmente en su fase tardía de crecimiento. (Idiofase) (6,7,10)

Se les denomina secundarios debido a que no presentan ninguna función aparente para el crecimiento y reproducción del microorganismo que los produce. (6,7,24)

Su importancia práctica deriva de la gama de aplicaciones que se les ha dado. Así son utilizados en la medicina humana para el tratamiento de enfermedades infecciosas, en la agricultura en el control de patógenos de plantas y en la ganadería tanto en el tratamiento de enfermedades infecciosas como mejorando la velocidad de crecimiento de los animales. - Asimismo, se han utilizado en las ciencias básicas como herramientas en la elucidación de mecanismos biológicos a nivel molecular. (7,31)

Otro aspecto interesante de los antibióticos, es su continua necesidad, sobre todo para nuevos tipos de ellos. Esta necesidad es debida principalmente a que muchos microorganismos desarrollan mecanismos de resistencia a los antibióticos y por la particularidad que presentan algunos de ellos de producir efectos colaterales no deseables en los sujetos que los utilizan.

Un gran avance en este campo ha sido la producción de derivados semisintéticos producidos por modificaciones químicas o biológicas de los productos obtenidos por fermentación, lo cual les confiere nuevas propiedades. Tal es el caso



de la ampicilina que proviene de la penicilina G y de la clindamicina que a su vez proviene de la lincomicina, por citar algunos ejemplos. (77)

A pesar de la gran importancia de los antibióticos en nuestra sociedad, la producción fermentativa de ellos ha ocurrido en un momento en el cual poco se sabe acerca de sus respectivas vías de biosíntesis y regulación. Por este hecho no es sorprendente que su producción haya sido llevada a cabo en forma empírica. Ya que es evidente que a la fecha el mayor obstáculo para la aplicación de los principios regulatorios básicos en la producción de antibióticos (Inducción, retroregulación, regulación catabólica, etc.) sea nuestra ignorancia, ya que si bien conocemos poco sobre los intermediarios biosintéticos, prácticamente no se sabe nada acerca de las enzimas y mecanismos regulatorios que modulan la producción de antibióticos. (7,9,10)

Uno de los objetivos de trabajo del grupo de investigación donde se desarrolló esta tesis, es el de estudiar los mecanismos regulatorios que controlan la biosíntesis de metabolitos secundarios, en particular de los antibióticos.

## CAPITULO II

### OBJETIVO.

Recientemente ha sido reportado por diversos autores que la síntesis de metabolitos secundarios es regulada por la concentración de nitrógeno presente en el medio de cultivo. Estos reportes incluyen a nourseotrocina en Streptomyces noursi (38), ocratoxina en Aspergillus nidulans (14) y a cefalosporina en Streptomyces clavurigerus. (84)

Así Aharonowitz y Demain han reportado que en la producción de cefalosporina en Streptomyces clavurigerus la presencia de un exceso de nitrógeno en el medio de cultivo trae como consecuencia una disminución en la producción específica de este antibiótico. Asimismo, han encontrado una relación directa entre la actividad de la enzima glutamino sintetasa y la producción específica de cefalosporina. Estos autores encontraron que en bajas concentraciones de nitrógeno existe una alta actividad de la enzima glutamino sintetasa y una elevada producción específica de cefalosporina. Contrariamente cuando las células fueron crecidas en un exceso de nitrógeno se encontró una disminución en la actividad de esta enzima y en la producción específica de cefalosporina. (84)

En base a estos reportes, el grupo de trabajo donde se desarrolló esta tesis tuvo el interés de estudiar la regulación por amonio de la biosíntesis de penicilina en Penicillium chrysogenum NRRL-1951.

## CAPITULO III

### GENERALIDADES.

Entre los antibióticos producidos hoy en día la penicilina tiene un papel preponderante en la quimioterapia humana, ya que desde su descubrimiento en 1929 por Alexander - Fleming, quien encontró que filtrados de un hongo contaminante eran capaces de lisar estafilococos. Microbiólogos, genetistas, químicos y médicos han encontrado en la penicilina - una de las armas más poderosas frente a enfermedades infecciosas, por lo que hoy en día la penicilina es uno de los antibióticos más usados en nuestra sociedad.

#### Microorganismos productores de penicilina.

Las penicilinas pertenecen al grupo de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (1,6,34,51) los cuales pueden ser sintetizados por un número limitado de microorganismos, por ejemplo.

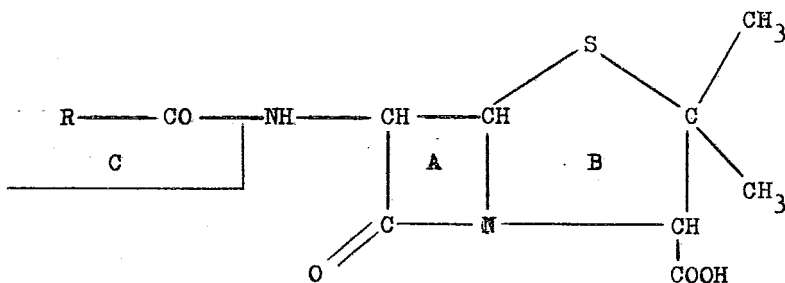
Hongos del género Penicillium (P. notatum y P. chrysogenum), Aspergillus (A. flavus, A. nidulans, A. achaceus), Trichophyton (T. mentagrophytes, T. gypseum, T. interdigitale) Micromonosporium y Epidermophyton (E. interdigitale, E. floccosum), Malbrencha, Thermoascus, Gymnoascus y Polypaecilum. Todos ellos producen penicilina.

Otros hongos como Cephalosporium acremonium, Emericellopsis, Paecilomyces, Diheterospora, Scopulariopsis, Arachnomyces, Anixiopsis y Spiroidium, producen penicilina N, cefalosporina C y otros metabolitos relacionados.

Más recientemente se han reportado ciertas especies de Streptomyces productoras de penicilina N y 7-metoxicefalosporina (cefamicinas). (34)

Clasificación y fórmula química de las penicilinas.

Químicamente las penicilinas presentan una fórmula estructural caracterizada por un núcleo central (Acido 6-aminopenicilánico), formado por un sistema bicíclico compuesto por un anillo  $\beta$ -lactámico de cuatro miembros y un anillo tiazóolido de cinco miembros. Y una cadena lateral fusionada al núcleo central que puede ser de naturaleza variable. (6,-34,51) Figura 1.





- A- Anillo  $\beta$ -lactámico.
- B- Anillo tiazóolido.
- C- Cadena lateral.
- A + B- Acido 6-aminopenicilánico.

Figura 1.- Fórmula estructural de las penicilinas.

De acuerdo a la naturaleza de la cadena lateral, se ha hecho una clasificación de las penicilinas naturales, la cual se muestra en la Tabla 1. (6)

Tabla 1.

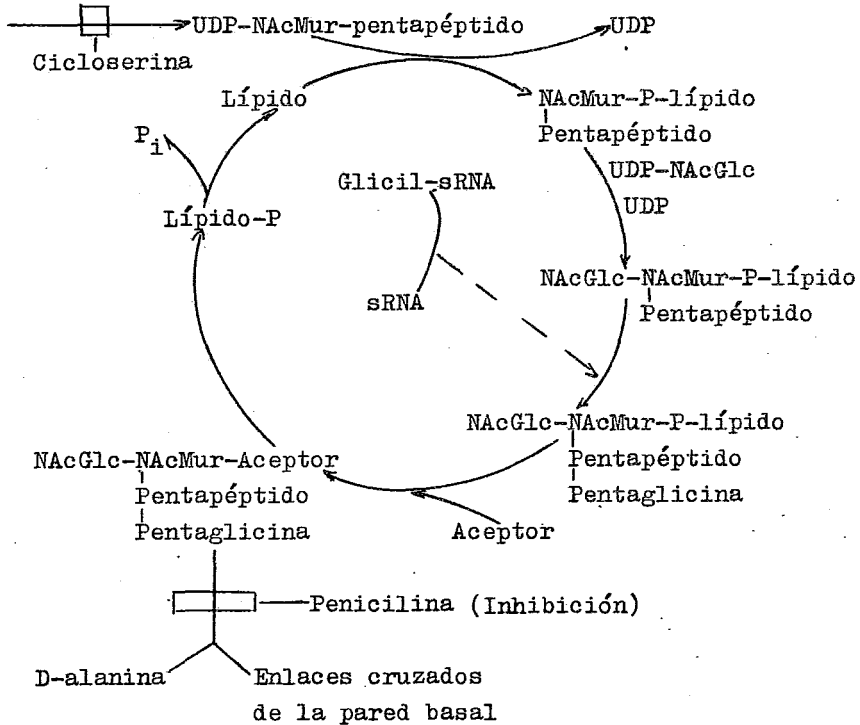
→ Clasificación de penicilinas naturales producidas por Penicillium sp.

Cadena lateral	Nombre.
H-	Acido 6-aminopenicilánico.
$\text{HOOCCH}(\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}_2})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$	Isopenicilina N
$\text{H}_3\text{CCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)\text{CH}_2\text{CO}-$	Penicilina F.
$\text{H}_3\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$	Ampicilina.
$\text{H}_3\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$	Penicilina K.
 -CH <sub>2</sub> CO-	Penicilina G.
 -OCH <sub>2</sub> CO-	Penicilina V.

Mecanismo de acción de las penicilinas.

Las penicilinas son antibióticos bactericidas, esto es, no solamente inhiben el crecimiento bacteriano sino que lisan la célula en crecimiento aunque no alteren la viabilidad de células en reposo. (28,52)

En 1965 Wise y Park al igual que Tripper y Strominger propusieron independientemente que la penicilina bloquea la biosíntesis de peptidoglucano de la pared celular bacteriana, mediante la inhibición de la reacción de transpeptidación como se muestra en el esquema 1. (28)

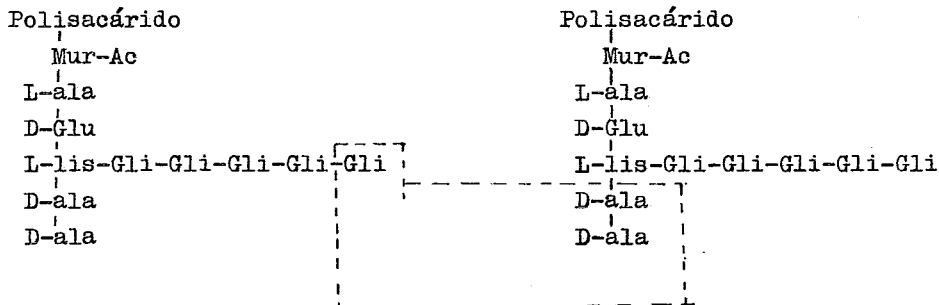


Reacciones enzimáticas en la biosíntesis de peptidogluano.

Primeramente el pentapéptido murámico es transferido de su portador nucleótido a un portador lípido, al cual se le añade un radical de acetilglucosamina al muramato y una rama pentaglicina al pentapéptido. Este bloque completo es transferido así a la membrana para dar la estructura fundamental-alternada de glucosamina-muramato de la pared. En esta etapa final, una reacción de transpeptidación forma enlaces cruzados entre las cadenas de los polipéptidos laterales por sustitución de los extremos libres de la cadena de glicina de un polipéptido por la terminal D-alanina de un polipéptido próximo.

La penicilina inhibe específicamente la reacción de formación de puentes. Como consecuencia, la célula sintetiza desorganizadamente el glucopéptido, lo cual se observa químicamente a través del exceso de glicina y D-alanina terminales -libres.

Detalle de la inhibición.



La acción inhibitoria de las penicilinas depende de su semejanza estructural con el sustrato de la reacción de - transpeptidación D-ala-D-ala, ya que la amida más reactiva del anillo  $\beta$ -lactámico de la penicilina podría corresponder a la unión peptídica del sustrato. La penicilina reacciona irrever~~s~~siblemente con la enzima transpeptidasa, produciendo la formación de un complejo enzima-penicilina inactivo.

El lugar de acción de la penicilina en la interfase entre la membrana y la capa mucopéptida, puede explicar el hecho de que la penicilina sea activa sólo en altas concentraciones para las bacterias Gram (-), ya que poseen una pared particularmente gruesa, alrededor de la capa mucopéptida basal.

Este mecanismo también explica la alta toxicidad - selectiva de las penicilinas, ya que actúa sobre una enzima que únicamente se encuentra en bacterias y por la naturaleza del enlace irreversible que forma. (28,52)



CAPITULO IV.

BIOSINTESIS DE PENICILINA.

La molécula de penicilina es ahora concebida como el producto de condensación del ácido  $\alpha$ -aminoadípico, L-cisteína y L-valina (1,6,25,34,58) los cuales son las moléculas precursoras del antibiótico a través de la formación de un tripéptido intermediario  $\rho$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil-)L-cisteinil-D-valina (3,4,6,20,21,54,58,71), el cual se muestra en la figura 2.

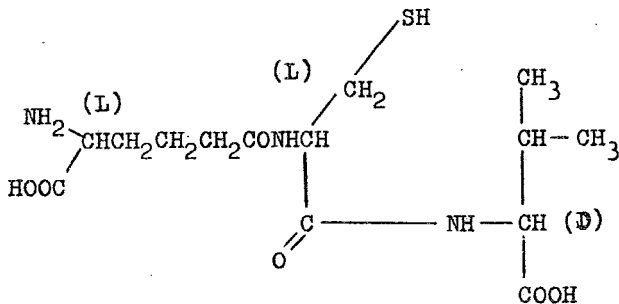


Figura 2.- Tripéptido intermediario.

La teoría para postular al tripéptido como un intermediario en la biosíntesis de penicilina, está basado en el aislamiento de un péptido no cíclico, conteniendo las subunidades básicas de penicilina N (ácido  $\alpha$ -aminoadípico, cisteína y valina) en Penicillium chrysogenum. (3,4,58)

Más tarde fue aislado un tripéptido en Cephalosporium acremonium el cual fue caracterizado como  $\rho$ -L- $\alpha$ -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (20,21). Este mismo péptido fue caracterizado también en Penicillium chrysogenum.

El mecanismo enzimático por el cual los aminoácidos son combinados y ciclizados no ha sido dilucidado completamente. A la fecha una enzima,  $\rho$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa ha demostrado catalizar la formación del tripéptido sólo a partir del dipéptido  $\rho$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteína y L-valina. (34,70)

Esta enzima fue aislada en Cephalosporium acremonium y ha mostrado una gran especificidad no catalizando la formación del tripéptido a partir de  $\rho$ -(D- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteína y L-valina, ni a partir de  $\rho$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteína y D-valina, ni tampoco a partir de L- $\alpha$ -aminoadípico y L-cisteinil-L-valina. (70).

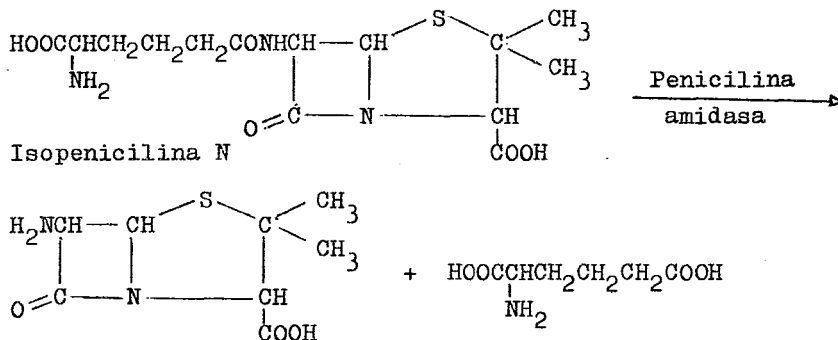
Para la ciclización del tripéptido se ha propuesto la existencia de una enzima, penicilina ciclasa, sin que ésta haya sido aún aislada, aunque existe evidencia genética que así lo indica ya que se han podido aislar mutantes que acumulan el tripéptido lineal pero que son incapaces de ciclizarlo. (46,57,72)

#### Reacciones terminales en la síntesis de penicilina en Penicillium chrysogenum.

Una vez ciclizado el tripéptido ocurre una hidrólisis enzimática de la isopenicilina N formada en la cual participa la enzima penicilina amidasa que ha sido aislada en -

especies de Penicillium. (26,27,34)

Reacción.



Acido 6-aminopenicilánico

Acido  $\alpha$ -aminoadípico.

Sin embargo el papel del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) producido por la hidrólisis enzimática no ha sido bien establecido como un precursor en la formación de penicilina (34,71). Ya que este producto (6-APA) únicamente se acumula en ausencia en el medio de cultivo de precursores de la cadena lateral del antibiótico, por lo que actualmente se piensa que es un producto derivado de la desacilación de isopenicilina N.

Si ello es cierto, la reacción terminal en la biosíntesis de penicilina debe de ser un intercambio de la cadena lateral de isopenicilina N, ácido  $\alpha$ -aminoadípico, por el ácido fenil acético o cualquier otro precursor de la cadena lateral presente en el medio de cultivo. Esta reacción es catalizada por la enzima penicilina acil transferasa que ha sido aislada en Penicillium chrysogenum. El ácido fenil acético previamente debe ser activado de acuerdo a la reacción

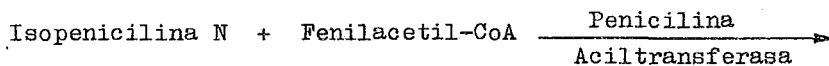
siguiente. (6,27,34)

Reacción.



Por lo tanto la reacción terminal en la biosíntesis de penicilina sería la siguiente.

Reacción.



Penicilina G + Acido  $\alpha$ -aminoadípico.

## CAPITULO V.

### REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PENICILINA EN Penicillium chrysogenum.

La producción de metabolitos secundarios es afectada aparentemente por los mismos mecanismos regulatorios que controlan el metabolismo primario (Inducción, retroregulación, regulación catabólica por carbono, etc.).(6,7,9,10,45, 46).

Sin embargo el conocimiento en la regulación del metabolismo secundario aún es poco profundo, principalmente por la ignorancia existente de sus respectivas vías de biosíntesis.

En la biosíntesis de penicilina se han descrito algunos mecanismos regulatorios que a continuación se describen.

#### Retroregulación por producto final.

La regulación por producto final es un mecanismo regulatorio muy importante para el control en la economía celular y ocurre como resultado de la acumulación de un metabolito.(63) Este mecanismo es bien conocido en la biosíntesis de metabolitos primarios, sin embargo en metabolitos secundarios es obscuro debido en gran parte al desconocimiento de las enzimas involucradas en la biosíntesis de antibióticos. En los últimos años se ha hecho evidente que algunos antibióticos regulan su propia biosíntesis, como lo podemos ver en la Tabla. 2.

El primer reporte de retroregulación por penicilina misma fue reportado por Gordee y Day en 1972 y después confirmado por Revilla y Martín en 1977. (33,57)

Estos reportes establecen una inhibición de la síntesis de penicilina por penicilina exógena y describen que la concentración de antibiótico requerido para la completa inhibición de la síntesis "de novo" de penicilina dependía de la cepa productora. Esto es, que el nivel de antibiótico exógeno requerido para la completa inhibición de su propia biosíntesis es generalmente similar al nivel de producción de la cepa. (33,57)

Revilla y Martín en 1977 por medio de un sistema de células en reposo establecieron que el mecanismo regulatorio responsable de la inhibición "de novo" de la penicilina es una retroinhibición y no una retrorepresión. Sin embargo no se establece el nivel en el cual penicilina ejerce su acción reguladora. (57)

#### Regulación por metabolitos primarios.

Algunos metabolitos primarios pueden regular la síntesis de un metabolito secundario ya sea porque son precursores del metabolito secundario o porque son productos finales de una ruta ramificada. (45,46,80). Esto se debe a la capacidad de algunos metabolitos primarios de regular su propia biosíntesis limitando así su disponibilidad en el metabolismo secundario.

En la biosíntesis de penicilina se observan estos dos casos en su regulación

#### Regulación por metabolitos primarios que son precursores del metabolito secundario.

Uno de los aminoácidos involucrados en la biosínte-

Tabla 2.

Retroregulación en la síntesis de antibióticos.

---

Antibiótico.	Referencia.
Cloranfenicol	Jones y Westlake, 1974.
Cicloheximida	Kominek, 1975.
Acido micofenólico	Muth y Nash, 1975.
Aurodox	Liu y col., 1975.
Ristomicina	Egorov y col., 1971.
Virginamicina	Yanagimoto y Terui, 1971.
Penicilina	Martín, 1977.

---

sis de penicilina es L-valina cuya ruta biosintética es mostrada en la figura 3. (23)

En Penicillium chrysogenum es conocido que valina retroregula su propia biosíntesis a través de inhibir la enzima acetohidroxiácido sintetasa, primera enzima de la ruta biosintética como se muestra en la figura 3. (39,83)

Es importante destacar que en cepas altamente productoras de penicilina la demanda de los aminoácidos precursores es mayor, por lo cual en estas cepas debe de existir un relajamiento de los mecanismos regulatorios que controlan la síntesis de los aminoácidos precursores, necesarios para la biosíntesis del antibiótico. (79)

Así tenemos que en cepas altamente productoras de penicilina la enzima acetohidroxiácido sintetasa es mucho -- menos sensible a la inhibición por valina en comparación con las cepas silvestres o pobres productoras. Aunado a esto también se ha encontrado que la cantidad de enzima es superior. (39).

También se ha encontrado que existe una correlación directa entre la capacidad de incorporación de sulfato y el potencial de la cepa productora de penicilina, por lo que se piensa que éste pudiera ser un mecanismo para satisfacer los altos requerimientos del aminoácido cisteína para la biosíntesis de penicilina en las cepas altamente productoras. (43, 46)



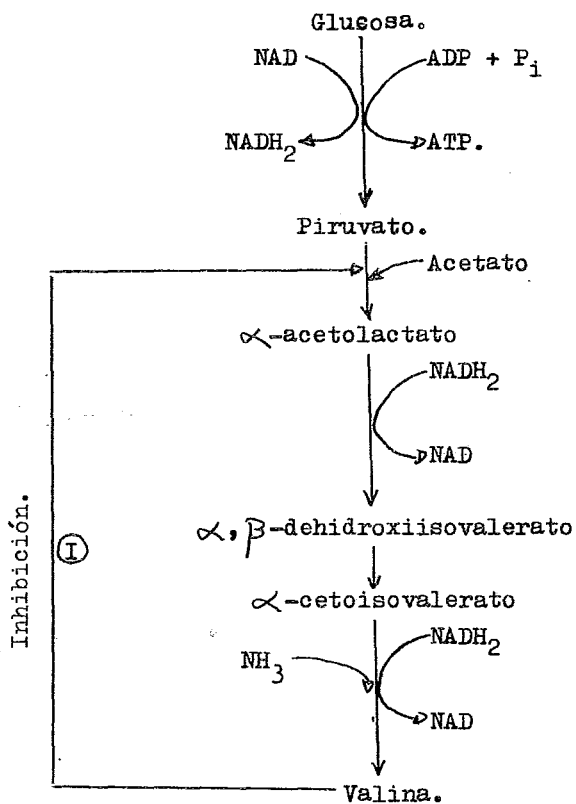


Figura 3. Ruta biosintética de L-valina en Penicillium chrysogenum.

Regulación de la biosíntesis de penicilina por el aminoácido L-lisina.

A pesar de que el aminoácido L-lisina por sí mismo no está involucrado en la síntesis de penicilina como precursor o intermediario, ha sido reportado como un potente inhibidor de la síntesis de penicilina (8,56,57,70,73), esta inhibición es revertida por el aminoácido  $\alpha$ -aminoadípico y otros intermediarios de la ruta biosintética de L-lisina. (7,8,40, 73,74).

Este hecho sugirió la existencia de un intermediario común entre la síntesis del aminoácido L-lisina y penicilina, demostrándose posteriormente que era el aminoácido  $\alpha$ -aminoadípico, por lo tanto, se estableció que L-lisina y penicilina son productos finales de una ruta biosintética ramificada como se muestra en la figura 4. (7,8,24,57)

Estudios de Demain y Masurekar demostraron que el efecto negativo de L-lisina sobre la biosíntesis de penicilina era debido a la inhibición de la enzima homocitrato sintetasa, (8,73,74) que es una enzima alostérica sensible a L-lisina. Por lo tanto, al inhibirse esta enzima, se limitaba la formación del aminoácido  $\alpha$ -aminoadípico disponible para la biosíntesis de penicilina.

Estos estudios fueron confirmados posteriormente por Martín y col., en 1977.

$\alpha$ -cetoglutárico + acetil-CoA.

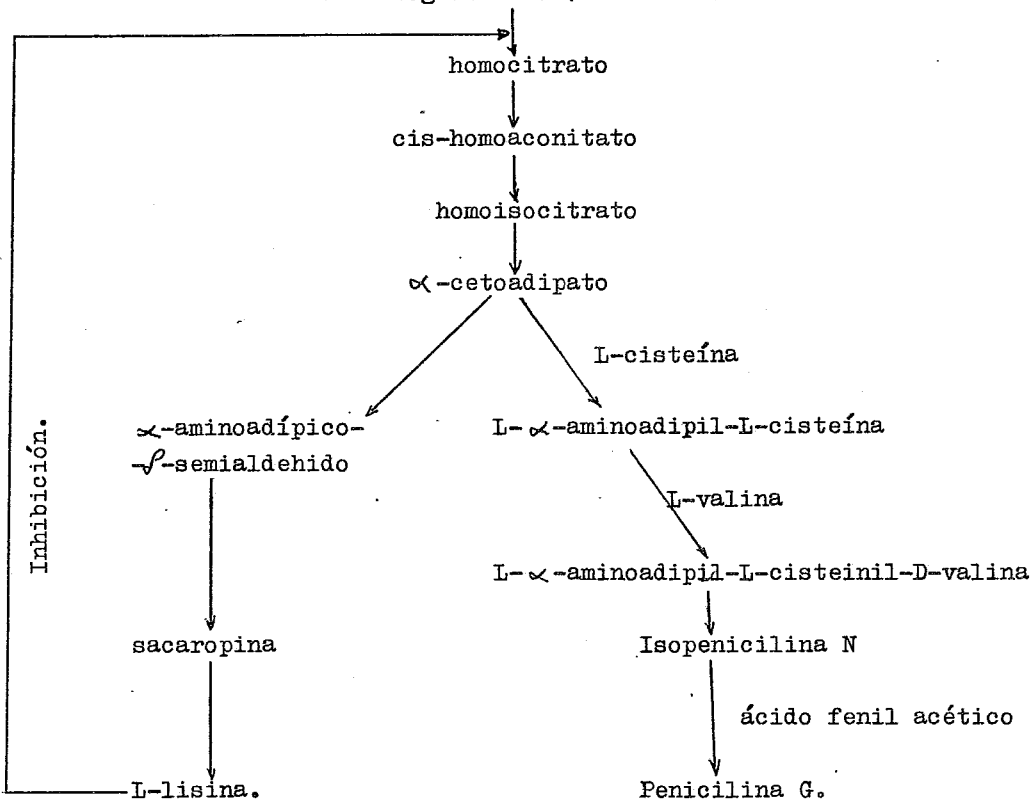


Figura 4. Ruta biosintética ramificada para L-lisina y penicilina en Penicillium chrysogenum.

Regulación catabólica por carbono.

La regulación catabólica por carbono es un mecanismo regulatorio descrito por Magasanik en 1961, en el cual las enzimas catabólicas son reprimidas por catabolitos del metabolismo de fuentes de carbono rápidamente utilizables tales como glucosa o citratos. (18)

Este fenómeno es muy común en la biosíntesis de metabolitos secundarios en donde se observa una represión o inhibición de las enzimas por el catabolismo de fuentes de carbono rápidamente utilizables. Así, se ha observado que glucosa es una excelente fuente de carbono y energía para el crecimiento microbiano, pero infrecuentemente utilizada como la mejor fuente de carbono y energía en las fermentaciones del metabolismo secundario. (9,10,45,82,83)

Se ha descrito que glucosa y otras fuentes de carbono rápidamente utilizables suprimen la producción de antibióticos como es mostrado en la tabla 3, por lo cual no es extraño que en el medio definido de Jarvis y Johnson para la producción de penicilina estén presentes una mezcla de fuentes de carbono (glucosa y lactosa). Ya que se ha encontrado que glucosa es la mejor fuente de carbono y energía para el crecimiento de Penicillium chrysogenum y lactosa la mejor fuente de carbono y energía para la producción de penicilina. (37)

Actualmente se sabe que glucosa ejerce represión pero no inhibición de la biosíntesis de penicilina. (Comunicación personal con Juan F. Martín).

Tabla 3.

Regulación catabólica por carbono en la biosíntesis de antibióticos.

Antibiótico	Fuente inhibitoria	Fuente no inhibitoria	Referencia.
Penicilina	<u>glucosa</u>	<u>lactosa</u>	<u>Johnson, 1952.</u>
Actinomicina	glucosa	galactosa	Gallo, 1972.
Estreptomicina	glucosa	manosa	Demain, 1970.
Siomicina	glucosa	maltosa	Kimura, 1967.
Indolmicina	glucosa	fructosa	Hurley, 1974.
Bacitracina	glucosa	citratos	Haavik, 1974.
Cefalosporina C	glucosa	sacarosa	Demain, 1963.
Cloranfenicol	glucosa	glicerol	Smith, 1963.
Neomicina	glucosa	maltosa	Majumdar, 1971.
Kanamicina	glucosa	galactosa	Basak, 1973.
Puromicina	glucosa	glicerol	Sankaran, 1975.
Candidina	glucosa	glucosa*	Martín, 1974.
Novobiocina	citrato	glucosa	Kominek, 1972.
Cefamicina	glicerol	asparagina	Aharonowitz, 1976.

\* Cultivo alimentado con bajas concentraciones de glucosa.

## CAPITULO VI

### FUNDAMENTO DEL PROYECTO.

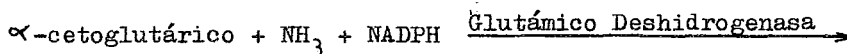
En base a que la molécula de penicilina es el producto de condensación de los aminoácidos  $\alpha$ -aminoadípico, L-cisteína y L-valina es predecible que cualquier evento regulatorio que afecte la síntesis de estos precursores afecte la producción de penicilina como ha sido descrito anteriormente. (23,33 39, 45,46,57,80,83).

Sabemos que para la producción de los aminoácidos se requiere la interacción del metabolismo de la fuente de carbono con el metabolismo de la fuente de nitrógeno. (28,63).

El metabolismo de la fuente de carbono nos da los esqueletos de carbono y la energía requerida para la síntesis de ácido glutámico y glutamina. Por medio de estos compuestos se fija el nitrógeno orgánico, además de ser los donadores de los grupos amino y amido respectivamente, para la síntesis de los aminoácidos.

El ácido glutámico es formado a partir de amonio y ácido  $\alpha$ -cetoglutárico por medio de la enzima glutámico deshidrogenasa (GDH) dependiente de NADPH, de acuerdo a la reacción siguiente. (63)

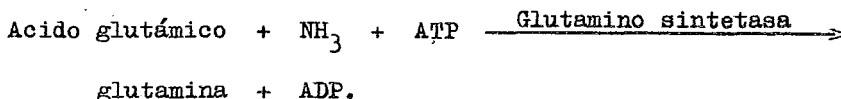
Reacción.



Acido glutámico + NADP.

La glutamina es sintetizada a partir de ácido glutámico, amonio y ATP por medio de la enzima glutamino sintetasa (GS) de acuerdo a la reacción siguiente. (63)

Reacción.



#### Regulación del metabolismo nitrogenado.

Numerosos reportes han establecido a la enzima glutamino sintetasa (E.C.6.3.1.2) como la enzima clave en la regulación del metabolismo nitrogenado. (16,22,41,42,85)

Esta enzima ha sido extensamente estudiada tanto en organismos procariontes como organismos eucariontes, encontrándose siempre que la actividad específica de la enzima varía de acuerdo a la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo. (22,41,42,50,85)

Recientemente se ha establecido su regulación en el hongo Neurospora crassa tanto en su fase logarítmica de crecimiento como en condiciones en las cuales la célula no está creciendo o está restringido su crecimiento. (42,50,85)

Para este estudio el enfoque que se ha utilizado es el de crecer al hongo Neurospora crassa en presencia de los sustratos y productos de la enzima glutamino sintetasa como fuente de nitrógeno. En estas condiciones se han medido --

los siguientes parámetros en función del tiempo: crecimiento, pozas de ácido glutámico, glutamina y amonio así como la actividad de la enzima glutamino sintetasa.

( Lo que se ha encontrado es que en la fase logarítmica de crecimiento existe una relación inversa entre la actividad de la enzima glutamino sintetasa y la concentración de amonio intracelular, cuando ácido glutámico y amonio son utilizados como fuente de nitrógeno.) Esto ha establecido que el amonio es el factor limitante para la actividad enzimática y que ambos sustratos están en exceso cuando amonio se encuentra en una elevada concentración en el medio de cultivo.

Por otra parte, cuando se ha utilizado a la glutamina como fuente de nitrógeno, se observa una elevación en la concentración intracelular de este aminoácido y una actividad muy baja de la enzima. (50,85)

Resumiendo podemos decir que la actividad específica de la enzima durante el crecimiento logarítmico es alta, cuando el hongo Neurospora crassa es crecido en presencia de ácido glutámico como única fuente de nitrógeno y es baja - en exceso de amonio o, en presencia de glutamina en el medio de cultivo. Estas diferencias encontradas en la actividad específica de la enzima se han correlacionado con diferencias en la concentración de la enzima observándose que son debidas a diferencias relativas en la velocidad de síntesis de la enzima. (22,35,50,85)

Por otra parte, en condiciones en las cuales la célula no está creciendo o está limitado su crecimiento, al incubar esporas en presencia de ácido glutámico, como única fuente



de nitrógeno, se provoca un aumento considerable de la actividad enzimática, lo que no sucede si se añade al medio de cultivo un inhibidor de síntesis de proteínas o si las esporas se incuban en presencia de glutamina. Por esto, se ha establecido que el aumento en la actividad enzimática corresponde a una síntesis "de novo" de la enzima. (41,42)

Por lo anteriormente expuesto se ha establecido que existe una regulación similar en la síntesis de la enzima cuando el microorganismo no está creciendo. (42)

La interrupción del crecimiento también puede ocurrir naturalmente, tal es el caso cuando la célula alcanza su fase estacionaria de crecimiento. En estas condiciones al igual que en el caso anterior, ha sido reportada la acumulación del aminoácido glutamina aún en presencia de amonio (41,42,85), posiblemente debido a que en estas condiciones bajen los requerimientos para este aminoácido en la síntesis de metabolitos celulares.

Estos hallazgos han determinado que se proponga que la enzima glutamino sintetasa posea una función específica aún en condiciones de crecimiento nulo. Dicha función sería la de sintetizar glutamina con la consiguiente acumulación de este aminoácido para la realización de otros fenómenos celulares tales como la diferenciación ya que glutamina podría servirle a la célula como reservorio de esqueletos de carbono y nitrógeno para la síntesis de aminoácidos en general. (41,42)

## CAPITULO VII

### MATERIAL Y METODOS.

#### Microorganismos. ✓

Los modelos biológicos utilizados en este estudio - fueron el hongo Penicillium chrysogenum NRRL-1951 y la bacteria Sarcina lutea NRRL-B-1018 los cuales fueron obtenidos del Agricultural Research Service Culture Collection y conservado por el Northern Regional Research Laboratory, en Peoria, Ill.

#### Preservación de las cepas. ✓

Penicillium chrysogenum NRRL-1951 fue preservado en tubos de cultivo de 16 x 150 mm. con tapón de algodón, conteniendo 5 ml. de medio sólido inclinado de Sabouraud enriquecido con 0.1 % de extracto de levadura a 4 °C. (25)

Sarcina lutea NRRL-B-1018 fue preservada en tubos de cultivo de 16 x 150 mm. con tapón de algodón, conteniendo 5 ml. de medio sólido de agar nutritivo a 4 °C. (17)

#### Medio de esporulación. ✓

Para la esporulación de Penicillium chrysogenum NRRL-1951 se utilizaron placas de medio sólido de Sabouraud enriquecido con 0.1 % de extracto de levadura. Las placas - fueron inoculadas por estría y se incubaron a 29 °C. por 7 días, al termino de los cuales se alcanza una esporulación - completa del hongo. (25)

✓ Medio de crecimiento y producción de penicilina. (I)

El medio de crecimiento y producción de penicilina está basado en el medio descrito por F. G. Jarvis y M. Johnson en 1947 y su composición es la siguiente. (37)

0.6	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 g.	
0.05	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g.	
0.02	$\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.10 g.	
0.001	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.005 g.	
0.04	$\text{ZnSO}_4$	0.2 g.	Mezcla de sales. de Jarvis y Johnson.
0.1	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0.5 g.	
0.004	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.02 g.	
0.01	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 g.	
0.64	$\text{CH}_3\text{COOH}$	3.2 g.	
1.0	Acido láctico	4.88 ml.	→ lactato de 1947 7
0.1	Acido fenil acético	0.5 ml.	→ 1. (2)
0.09	$\text{NH}_4\text{Cl}$	variable.	
2	Glucosa	10 g.	7.5
6	Lactosa	30 g.	22.5
200ml.	$\text{H}_2\text{O}$ bidestilada	c.b.p. 1 litro.	

Durante el estudio de amonio sobre la biosíntesis

de penicilina se modificaron las concentraciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  desde 170 mM. hasta 8.5 mM.

Los azúcares (glucosa y lactosa) fueron esterilizados por separado disueltos en  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada.

El medio es ajustado a un pH de 6.8 - 6.9 con NaOH 10 N. antes de esterilizar.

Medio de cultivo para células en reposo. (II).

Mezcla de sales de Jarvis y Johnson	160 ml.
Solución reguladora de fosfatos 1 M, pH 7	320 ml.
Acido fenil acético	0.5 ml.
Cicloheximida	100 mg.
Lactosa	30 g.
$\text{H}_2\text{O}$ bidestilada	c.b.p. 1 litro.

Los medios fueron esterilizados en autoclave por 20 minutos a 121 °C.

Condiciones de crecimiento. ✓

Matraces Erlenmeyer de 500 ml. de capacidad con 100 ml. de medio de cultivo (I) se inocularon con 1 ml. de una suspensión de esporas con una D.O.<sub>540</sub> de 1.5 y se incubaron a 29 °C con agitación de 225 rpm. durante 96 horas.

El crecimiento fue determinado cuantificando la proteína del micelio y la producción de penicilina, por medio de bioensayos.

#### Producción de penicilina por células en reposo.

Penicillium chrysogenum NRRL-1951 fue crecido como previamente mencionamos durante 36 horas al término de las cuales el micelio fue filtrado y lavado con dos volúmenes de H<sub>2</sub>O bidestilada y el paquete celular transferido al medio de células en reposo y puesto en agitación a 225 rpm. y 29 °C. durante 36 horas.

#### Determinación de proteína.

Muestras del medio de cultivo fueron filtradas a través de membranas Millipore tipo HA 0025 de 0.25  $\mu$ m de diámetro de poro, lavadas con H<sub>2</sub>O bidestilada y el paquete celular -- resuspendido en 2 ml. de ácido tricloro acético al 5 % peso/volumen, homogeneizado por 5 minutos a 250 rpm. a 4 °C. en un homogenizador mecánico Tri-R Instruments modelo K 45.

El homogeneizado fue centrifugado por 10 minutos a 10,000 rpm. en una centrifuga Lourdes modelo AA-C. Y el paquete celular resuspendido en 1 ml. de NaOH 0.4 N. De aquí se tomaron alícuotas para la determinación de proteína siguiendo el método de Lowry y col., (64)

Usando Albúmina sérica bovina como estándar.

✓ Determinación de penicilina.

La penicilina fue determinada por medio de un método biológico usando la Técnica de Difusión en Agar teniendo a Sarcina lutea NRRL-B-1018 como microorganismo de prueba (15,36).

La Técnica de Difusión en Agar está basada en la medición relativa de la respuesta del microorganismo al antibiótico, comparada a la que presenta frente a un estándar. (36)

La respuesta es observada como una zona clara de crecimiento nulo en el cual el diámetro de la zona de inhibición es proporcional al logaritmo de la concentración del antibiótico. (15,36)

$$\phi \propto \text{Log} [\text{Un}]$$

✓ Preparación del microorganismo de prueba.

Sarcina lutea NRRL-B-1018 es crecida en medio líquido de antibiosis Difco # 5 por 12 horas a 37 °C. Al término de este tiempo se ajusta la D.O.<sub>540</sub> del cultivo a 2. De esta suspensión se toman 0.5 ml. y se agregan a 15 ml. de medio de antibiosis Difco # 5 a 40 °C., se vierten sobre cajas de Petri, dejando solidificar el medio, teniendo listas las placas se colocan discos de papel Whatman de 6 mm. de diámetro - tipo AA impregnados con 20  $\mu$ l. de caldo de fermentación libre de células. Se dejan difundir las muestras por 1 hora a 4 °C. y se incuban por 12 horas a 37 °C., al término de este tiempo se miden las zonas claras de crecimiento nulo en un medidor de Halos Craft. Paralelamente bajo las mismas condiciones se

corre una curva estándar con concentraciones de penicilina conocida.

Para la curva estándar se utilizó penicilina G en su sal potásica comercial de los laboratorios Lakeside.

#### Determinación de amonio.

Se colectaron 10 ml. de medio de cultivo por filtración a través de membranas Millipore tipo HA 0025 de 0.45  $\mu$ m de diámetro de poro y el amonio determinado inmediatamente después de la adición de 0.1 ml. de NaOH 10 N. en un Electrodo Orion con una membrana específica para amonio.

#### Determinación de las pozas de ácido glutámico, glutamina, ácido $\alpha$ -aminoadípico y valina.

Muestras del micelio fueron separadas del medio de cultivo por filtración a través de membranas Millipore tipo HA 0025 de 0.45  $\mu$ m de diámetro de poro, lavadas con H<sub>2</sub>O bidestilada y homogenizadas en un homogenizador mecánico Tris-R Instruments modelo K 25 en etanol 80 % volumen a volumen. El homogeneizado fue hervido por 10 minutos en Baño María y filtrado a través de membranas Millipore tipo HA 0025 de 0.45  $\mu$ m de diámetro de poro. Los filtrados fueron liofilizados y posteriormente resuspendidos en H<sub>2</sub>O bidestilada.

Los aminoácidos fueron separados usando un analizador de aminoácidos Aminco y cuantificados en un Radio Fluorómetro Aminco después de ser acoplados con ortoftaldehído, usando ácido cisteico y norleucina como estándar interno.

Determinación de cisteína como ácido cisteico.

Las muestras fueron tratadas como anteriormente se describió y antes de ser analizadas los liofilizados fueron oxidados de acuerdo a Stanford Moore. (79) La cisteína se determinó como ácido cisteico y éste fue separado en un autoanализador de aminoácidos Aminco y cuantificado en un Radio Fluorómetro Aminco después de ser acoplado con ortoftaldehído, usando ácido cisteico como estándar interno.

Determinación de la enzima glutamino sintetasa.

El micelio fue separado del cultivo por filtración a través de papel Whatman # 41, lavado con H<sub>2</sub>O bidestilada posteriormente con acetona fría y finalmente secado por vacío. Todas las etapas subsecuentes fueron realizadas a 4 °C.

El micelio una vez seco es fragmentado en un mortero con hielo seco y homogeneizado en un homogenizador mecánico - Tris-R Instruments modelo K 25 en solución de extracción ( fosfato de potasio 5 mM, sulfato de potasio 50 mM, la sal disódica del ácido etilen diamino tetraacético 0.5 mM, a un pH de 7.2.

El homogeneizado fue centrifugado por 20 minutos a 10,000 rpm. en una centrífuga Lourdes modelo AA-C y el sobrenadante fue utilizado como fuente de enzima sin posterior purificación.

La actividad de la enzima glutamino sintetasa fue medida por su actividad de transferasa por el método descrito



por Ferguson y Sims.(35)

La actividad específica fue calculada dividiendo - las unidades totales del sobrenadante entre la proteína del mismo.

La unidad de actividad fue expresada como la cantidad de enzima requerida para convertir  $1\mu\text{mol}$  de sustrato en - producto por minuto a 25 °C.

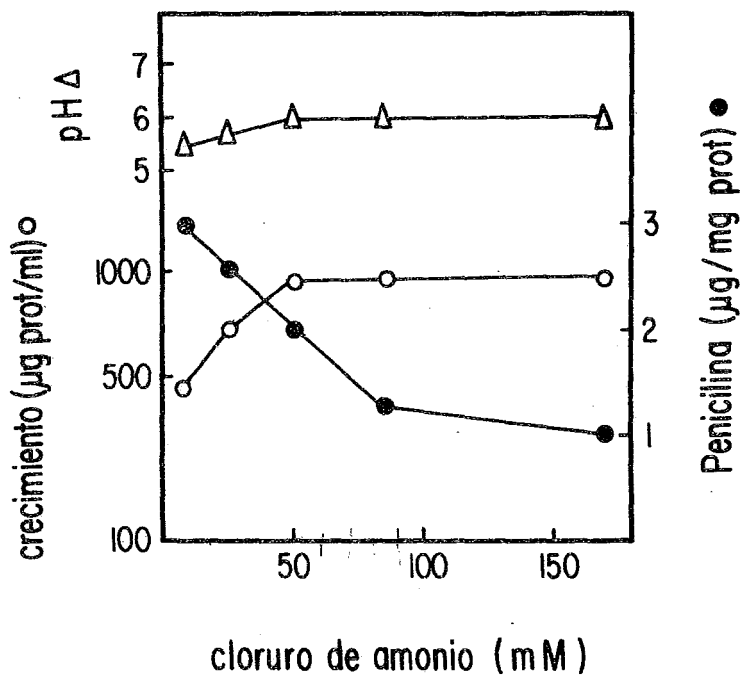
## CAPITULO VIII.

### RESULTADOS.

#### Efecto de la concentración de iones amonio presentes en el medio de cultivo sobre la producción específica de penicilina por *Penicillium chrysogenum* NRRL-1951.

*Penicillium chrysogenum* NRRL-1951 puede crecer y producir penicilina en un medio definido (I) en presencia de concentraciones bajas de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (8.5 mM) como única fuente de nitrógeno. Concentraciones crecientes de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en el medio definido (I) tienden a disminuir la producción específica de penicilina hasta en un 67 % sin cambios significativos en el crecimiento del microorganismo como puede observarse en la gráfica I. En ella encontramos una relación inversa entre la producción específica de penicilina y la concentración de iones amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) presentes en el medio de cultivo.

Este efecto negativo de los iones amonio sobre la biosíntesis de penicilina no es debido a un efecto colateral, como podría ser un cambio de pH en el curso de la fermentación ya que podemos observar en la gráfica I que no hay cambios significativos en el pH de la fermentación.



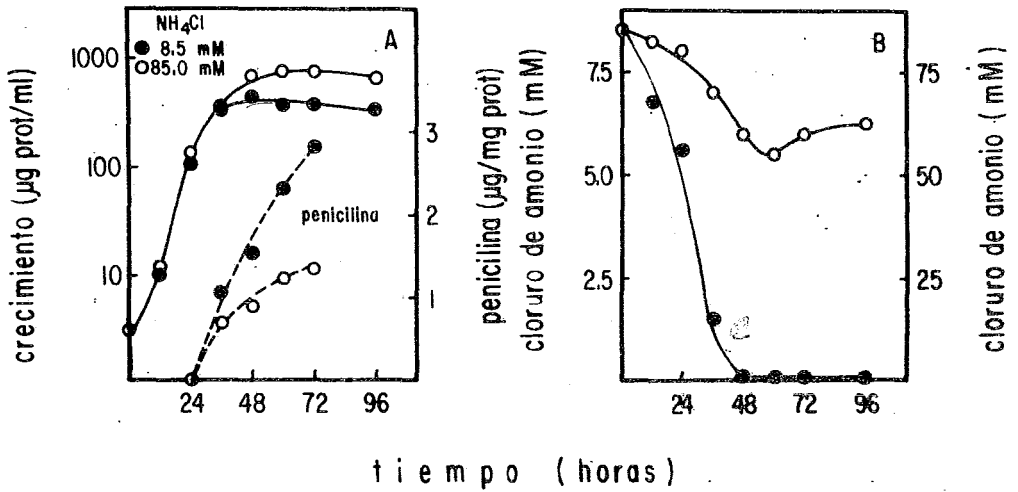
Gráfica I. Efecto de diferentes concentraciones de NH<sub>4</sub>Cl sobre el crecimiento máximo (o), pH final (Δ) y producción específica máxima de penicilina (•) de células crecidas durante 96 horas en medio mínimo (I) .

Para entender mejor este fenómeno se decidió estudiar diversos parámetros biológicos utilizando comparativamente una concentración baja y una alta de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (8.5 mM y - 85 mM) como única fuente de nitrógeno para el crecimiento del microorganismo y la producción de penicilina.

Los resultados se muestran en la gráfica II en la que se puede observar que  $\text{NH}_4\text{Cl}$  85 mM reduce en más de un 50 % la producción específica de penicilina sin afectar significativamente la cinética de crecimiento de Penicillium gráfica - IIA.

Este fenómeno negativo sobre la biosíntesis de penicilina tiene lugar a pesar de la presencia de nitrógeno disponible en el medio de cultivo. Gráfica IIB.

Contrariamente cuando se utilizó  $\text{NH}_4\text{Cl}$  8.5 mM para el crecimiento, se alcanzó la producción específica máxima de penicilina a pesar de que prácticamente todo el nitrógeno - del medio de cultivo se ha consumido. Gráficas IIA y IIB.



Gráfica II.- Efecto de una concentración baja (●) y alta (○) de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sobre la cinética de crecimiento y producción específica de penicilina (A). Amonio residual en el medio de cultivo de células crecidas en una concentración baja (●) y alta (○) de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (B).

Ha sido reportado por diversos autores que en hongos el nitrógeno inorgánico es fijado principalmente como -- ácido glutámico y glutamina a través de la actividad de las enzimas glutámico deshidrogenasa y glutamino sintetasa. (12, 13, 16, 19, 22, 35, 41, 50, 86)

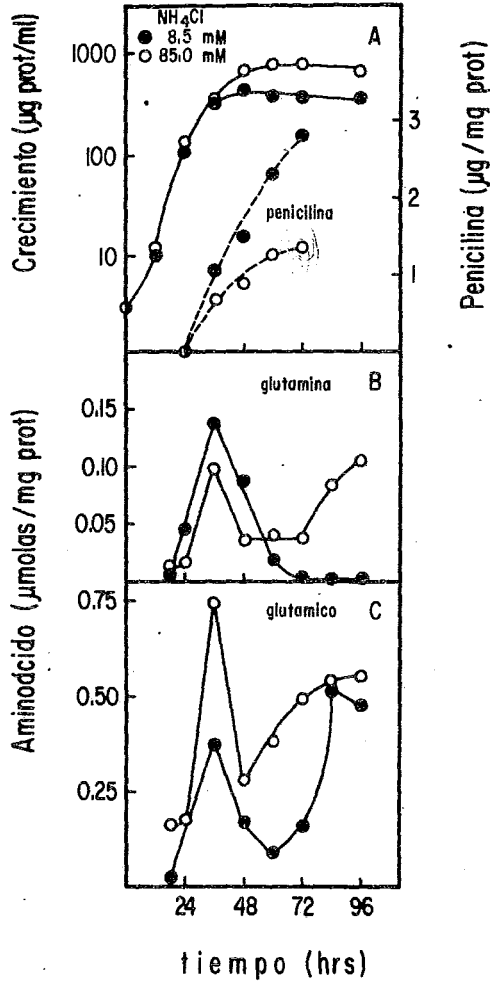
Por lo cual se decidió estudiar la evolución de las pozas intracelulares de estos aminoácidos en función del tiempo de fermentación y su relación a crecimiento y producción de penicilina.

Estos resultados son presentados en la gráfica IIIB donde podemos observar que la acumulación máxima de estos aminoácidos es alcanzada en la fase preestacionaria de crecimiento (36 horas) coincidiendo con el inicio de la síntesis de penicilina. Gráfica IIIA.

En las gráficas IIIA y IIIB podemos observar que la mayor producción específica de penicilina coincide con una acumulación elevada de glutamina cuando  $\text{NH}_4\text{Cl}$  8.5 mM es utilizado para el crecimiento del microorganismo.

Por lo contrario  $\text{NH}_4\text{Cl}$  85 mM redujo la producción específica de penicilina en un 38 % y la acumulación intracelular de glutamina en un 33 % a las 36 horas de iniciada la fermentación. (Gráficas IIIA y IIIB) Después de este tiempo la poza intracelular de glutamina tiende a ser consumida completamente en función de la síntesis de penicilina cuando  $\text{NH}_4\text{Cl}$  8.5 mM es utilizado como fuente de nitrógeno. Gráfica IIIB.

Por otra parte la poza intracelular de ácido glutámico tiende a mantenerse baja en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  8.5 mM. (Gráfica IIIC) Por el contrario, en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  85 mM existe una poza intracelular de ácido glutámico de casi dos veces más en comparación a -- 8.5 mM (gráfica IIIC), sin embargo la producción específica de penicilina es un 50 % menor en comparación con 8.5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . (Gráfica IIIA).



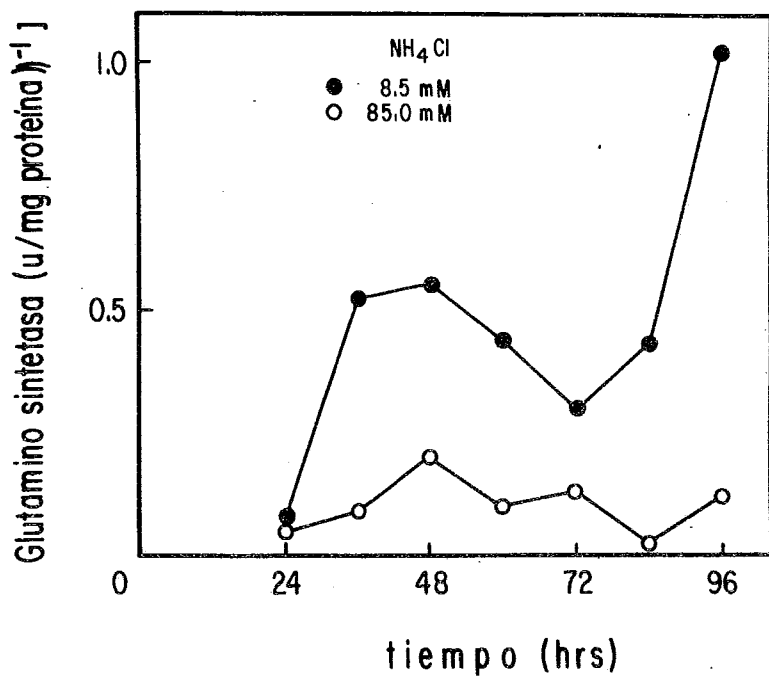
Gráfica III.- Efecto de una concentración baja (●) y alta (○) de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sobre: crecimiento y producción específica de penicilina (A). Poza de glutamina (B). Poza de ácido glutámico (C).



Actividad de la enzima glutamino sintetasa.

Dado que la síntesis de glutamina depende de la actividad de la enzima glutamino sintetasa, se decidió estudiar la actividad de esta enzima en función del tiempo de fermentación y su relación a crecimiento y producción de penicilina como un posible mecanismo para explicar los resultados hasta ahora obtenidos.

Los resultados obtenidos se pueden observar en la gráfica IV en la cual se puede ver que en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  85 mM la actividad de la enzima oscila entre un 18 y 36 % en relación a la actividad de la glutamino sintetasa obtenida en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  --- 8.5 mM entre las 36 y 60 horas de fermentación.

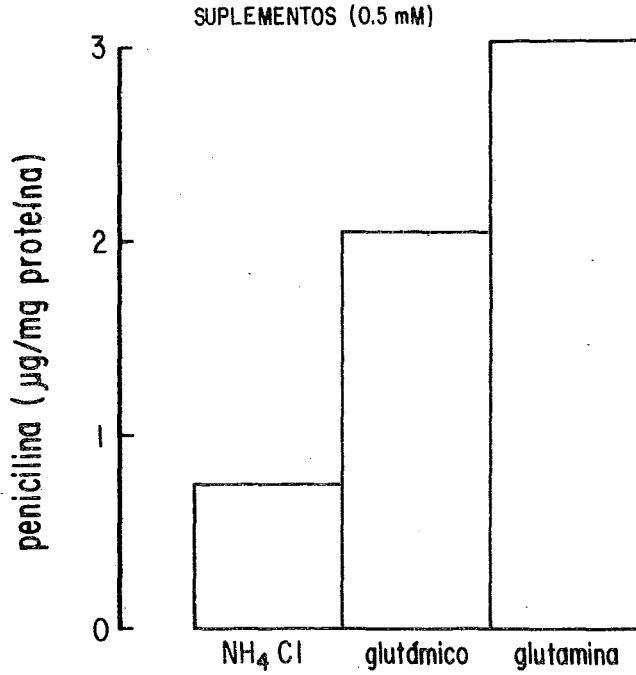


Gráfica IV.- Efecto de una concentración baja (●) y alta (○) de NH<sub>4</sub>Cl sobre la actividad de la enzima glutamino sintetasa.

Efecto de ácido glutámico y glutamina sobre la producción específica de penicilina en células en reposo de *Penicillium chrysogenum* NRRL-1951.

Para comprender mejor el papel del ácido glutámico y glutamina sobre la síntesis de penicilina, se incubaron células en reposo en presencia de ácido glutámico y glutamina y se determinó la producción específica de penicilina.

Los resultados son presentados en la gráfica V, en la cual puede verse que la producción específica de penicilina fue 4.06 y 1.5 veces mayor en presencia de glutamina en comparación a  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y ácido glutámico. Mientras que la producción específica de penicilina fue 2.73 veces mayor en ácido glutámico en relación a  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .



36 horas de producción en sistema  
de células en reposo

Gráfica V.- Producción específica de penicilina en células en reposo alimentadas con  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , ácido glutámico y - glutamina 0.5 mM como única fuente de nitrógeno.

## CAPITULO IX.

### DISCUSION DE RESULTADOS.

Los resultados del presente trabajo demuestran que la capacidad de Penicillium chrysogenum NRRL-1951 para producir penicilina es fuertemente disminuída cuando se crece al hongo en un exceso de iones amonio, sin afectar significativamente el crecimiento ni el pH de la fermentación, como se muestra en la gráfica I. Estos resultados nos dicen que el efecto negativo ejercido por los iones amonio sobre la síntesis de penicilina es debido a un evento regulatorio más que a un efecto colateral producido en el curso de la fermentación.

El exceso de iones amonio presentes en el medio de cultivo trae como consecuencia una disminución en la actividad de la enzima glutamino sintetasa, como se muestra en la gráfica IV, lo cual no es extraño ya que se ha reportado en diversos modelos biológicos este comportamiento. (12,16,19,41,50, 86).

Esta baja en la actividad enzimática, se traduce en una disminución de la poza intracelular de glutamina y en un aumento en la poza de ácido glutámico en comparación a células crecidas en concentraciones bajas de iones amonio. (Gráficas IIB y IIC). En las cuales también se observa que la síntesis de penicilina está en función de la desaparición de glutamina (Gráficas IIA y IIB).

La utilización preferente de glutamina en la síntesis de penicilina como se observa en la gráfica V, junto con los demás resultados, nos plantea la formulación de un nuevo mecanismo para la formación de precursores de penicilina (ácido  $\alpha$ -aminoadípico, L-cisteína y L-valina) en el cual la glu-

tamina más que el ácido glutámico, contribuiría con su grupo amino para la transaminación respectiva con los  $\alpha$ -cetoácidos,  $\alpha$ -aminoadípato, glioxalato y  $\alpha$ -cetoisovalerato.

Recientemente Mora y colaboradores a través de una serie de trabajos en el hongo Neurospora crassa, han proporcionado evidencia genética y regulatoria que sugiere que durante la fase estacionaria de crecimiento de este hongo la glutamina actúa como donadora de los grupos amino para la síntesis de aminoácidos, a través de la actividad de la enzima glutamino transaminasa (42), enzima que ha sido descrita y caracterizada por Meister y colaboradores en diversos sistemas biológicos. (12,13)

La participación de la enzima glutamino transaminasa en la biosíntesis de penicilina traería como resultado la síntesis de los precursores  $\alpha$ -aminoadípico, L-cisteína y L-valina. Si ello es cierto, es predecible que la concentración intracelular de estos aminoácidos se incremente en la fase estacionaria. Dicha predicción puede ser observada en la Tabla 4, donde se pueden ver incrementos de 6.5, 9.5 y 9.6 veces en las pozas intracelulares de  $\alpha$ -aminoadípico, L-cisteína y L-valina en la fase estacionaria de crecimiento de Penicillium chrysogenum NRRL-1951.

Tabla 4.

Concentración intracelular de los aminoácidos precursores de penicilina.

Aminoácido	Fase de crecimiento exponencial	Fase de crecimiento estacionario
	nmolas (mg de proteína) <sup>-1</sup>	nmolas (mg de proteína) <sup>-1</sup>
L- $\alpha$ -aminoadípico	3.5	23
L-cisteína	20	170
L-valina	1.5	14.5

- 1) Las células fueron cosechadas a las 18 horas de crecimiento .
- 2) Las células fueron cosechadas a las 36 horas de crecimiento.

## CAPITULO X.

### CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos y de la discusión de este trabajo podemos concluir lo siguiente.

1.- La síntesis de penicilina en Penicillium chrysogenum NRRL-1951 es regulada por la concentración de iones amonio presentes en el medio de cultivo, encontrándose una <sup>relación inversa</sup> ~~relación~~ <sup>que no existe de una</sup> ~~relación directa~~ entre la capacidad de síntesis de penicilina y la concentración de iones amonio presentes en el medio de cultivo.

2.- El efecto de la concentración de iones amonio sobre la síntesis de penicilina no es debida a cambios en los parámetros de fermentación, tales como pH, sino a un evento regulatorio ejercido por los iones amonio.

3.- El nivel regulatorio ejercido por los iones amonio sobre la síntesis de penicilina queda aún por ser aclarado.

4.- Los resultados obtenidos sugieren que la concentración de iones amonio podría estar limitando la síntesis de precursores de penicilina al regular la actividad de la enzima glutamino sintetasa, lo cual trae como consecuencia la limitación de glutamina disponible para la formación de los precursores. Esto sería cierto si operara el ciclo de glutamina propuesto por Mora y colaboradores para el hongo Neurospora crassa en el hongo Penicillium chrysogenum. Figura 5.

5.- Experimentos futuros deben de estar encaminados a dilucidar el papel de la enzima glutamino transaminasa en Penicillium chrysogenum.



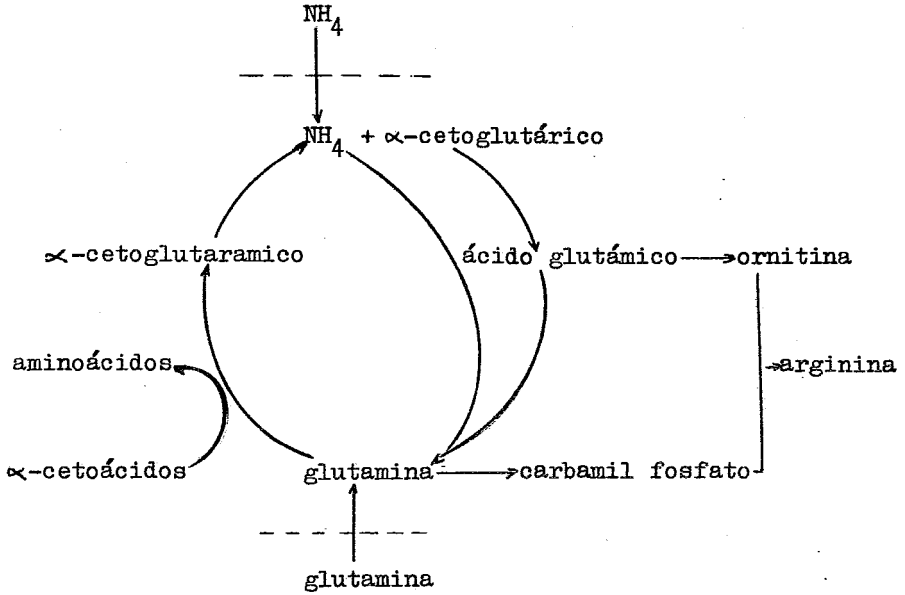


Figura 5. Metabolismo de glutamina en Neurospora crassa.

## CAPITULO XI

### BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Abraham. E. P. (1977). *J. Antibiotics*. Vol. XXX, 1-26.
- 2.- Adriens, P., U. VanderHaeghe, B. Meesschert and U. Eyssen. (1975). *Antimicrob. Agents. Chemother.* Vol. 8, N° 1, 15-17.
- 3.- Adriens, P., B. Meesschaert, W. Wuyts, U. VanderHaeghe and H. Eyssen. (1975). *Antimicrob. Agents. Chemother.* Vol. 8, N° 9, 638-643.
- 4.- Arnstein, R. V. and D. Morris. (1960). *Biochem. J.* Vol. 76, 357-361.
- 5.- Arnold L. Demain. (1963). *Clin. Med.*, Vol. 70, 2045-2051.
- 6.- Arnold L. Demain. (1973). *Adv. Appl. Microbiol.*, Vol. 18 177-202.
- 7.- Arnold L. Demain. (1974). *J. Gen. Microbiol.*, Vol. 82, - 143-151.
- 8.- Arnold L. Demain. (1974). *Lloydia.*, Vol. 37, N° 2, 147-167.
- 9.- Arnold L. Demain. (1976). *Stadler Symposium. University of Missouri, Columbia.*, Vol. 8, 41-55.
- 10.- Arnold L. Demain. (1976). *Adv. Biochem. Enginner.*, Vol. 1 113-139.
- 11.- Arnold L. Demain. (1978). *J. Ferment. Technol.*, Vol. 56, N° 4, 323-328.
- 12.- Arthur J. L. Cooper and Alton Meister. (1977). *Crit. - Rev. Biochem.* 281-303.
- 13.- Arthur J. L. Cooper and Alton Meister. (1977). *Methods Enzymol.*, Vol. XLIII, 1016-1023.
- 14.- Bacon, C. W., J. D. Robbins, and D. Burdick. (1975). - *Appl. Microbiol.*, Vol. 29, 317-322.

- 15.- Bauner, A. W., W. M. M. Kirby, M. D., J. C. Scherris, M. D., and M. Turck, M. D. (1966). *Am. J. Pathol.*, Vol. 45, 493-496.
- 16.- Bonni Tyler. (1978). *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 47, 1127-1167.
- 17.- Booth, C. (1971). *Methods in Microbiology.*, Vol. 4. Ed. Academic Press.
- 18.- Boris Magasanick. (1961). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, Vol. 26, 249-256.
- 19.- Boris Magasanick. (1979). *Curr. Top. Cell. Regul.*, Vol. 6, 99-114.
- 20.- Brounwen, P. Loder, E. P. Abraham and G. G. F. Newton. (1969). *Biochem. J.*, Vol. 112, 389-396.
- 21.- Brounwen, P. Loder and E. P. Abraham. (1971). *Biochem. J.*, Vol. 123, 477-482.
- 22.- Carmen Quinto, Jaime Mora and Rafael Palacios. (1977) *J. Biol. Chem.*, Vol. 252, Nº 23, 8724-8727.
- 23.- Cooney, C. L. and F. Acevedo. (1977). *Biotechnol. Bioeng.* Vol. XIX, 1449-1462.
- 24.- Cornelius G. Friedrich and Arnold L. Demain. (1978). *Arch. Microbiol.*, Vol. 119, 43-47.
- 25.- Cornelius G. Friedrich and Arnold L. Demain. (1977). - *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 34, Nº 6, 706-709.
- 26.- David L. Pruess and Marvin J. Johnson. (1965). *J. Bacteriol.*, Vol. 90, Nº 2, 380-383.
- 27.- David L. Pruess and Marvin Johnson. (1967). *J. Bacteriol.*, Vol. 95, Nº5, 1502-1508.
- 28.- Davis. B. D., R. Dulbecco., H. N. Eisen., H. S. Ginsberg and W. B. Wood. (1977). *Tratado de Microbiología*, Ed. Salvat.
- 29.- DeMoss, R. D. (1967). In *Antibiotics.*, Vol. II. *Biosynthesis.*, (D. Gottlieb and P. S. Shaw, Eds. ) 77-81. Springer Verlag, New York.

- 30.- Demain, A. L. and Inamine, E. (1970). *Bacteriol. Rev.* Vol. 34, 1-19.
- 31.- Dree, S. W. and Demain, A. L. (1975). *Eur. J. Appl. Microbiol.*, Vol. 1, 121-128.
- 32.- Egorov, N. S., Toropova, E. G., and Suchkova, L. A. (1971) *Mikrobiologiya.*, Vol. 40, 475-480.
- 33.- Elizabeth Z. Gordee and L. E. Day. (1972). *Antimicrob. Agents. Chemother.*, Vol. 1, N° 4, 315-322.
- 34.- Erick J. Vandamme. (1977). *Adv. Appl. Microbiol.*, Vol. 22, 89-119.
- 35.- Ferguson, A. R., and Sims, A. P. (1974). *J. Gen. Microbiol.*, Vol. 80, 159-171.
- 36.- Frederick Kavanagh. (1975). *Methods. Enzymology*, Vol. XLIII 55-69.
- 37.- F. G. Jarvis and Marvin J. Johnson. (1947). *Am. Chem. Sci.*, Vol. 69, 3010-3017.
- 38.- Grafe, U., H. Bocker, and H. Thrum. (1977). *Z. Allg. - Mikrobiol.*, Vol. 17, 201-209.
- 39.- Goulden, S. A., and Chattaway, F. W. (1969). *J. Gen. - Microbiol.*, Vol. 59, 111-118.
- 40.- Goulden, S. A., and Chattaway, F. W. (1973). *Proc. Biochem. Sci.*, 55p.
- 41.- Guadalupe Espín and Jaime Mora. (1978). *J. Gen. Microbiol.* Vol. 104, 233-240.
- 42.- Guadalupe Espín, Rafael Palacios and Jaime Mora. (1979) *J. Gen. Microbiol.*, Vol. 115, 59-68.
- 43.- Haavik, H. I. (1974). *J. Gen. Microbiol.*, Vol. 81, 383-390.
- 44.- Haavik, H. I. (1974). *J. Gen. Microbiol.*, Vol. 84, 321-326.

- 45.- Hopwood, D. A. (1974). Post. Hig. I. Med. Dosw., Vol. 28, 427-439.
- 46.- Hopwood, D. A., and M. J. Merrick. (1977). Bacteriol. Rev., Vol. 41, N° 3, 595-635.
- 47.- Howells, J. D., Anderson, L. E., Coffey, G. L., Senos, G. D., Underhill, M. A., Vogler, D. L. and Erlich, J. (1972). Antimicrob. Agents. Chemother., Vol. 2, 79-82.
- 48.- Hurley, L. H. and Bialek, A. (1974). J. Antibiotics., - Vol. 27, 49-56.
- 49.- Inamine, E., Iago, B. D. and Demain, A. L. (1969). In Fermentation Advances., D. Perlman, Ed. 199-221. Academic Press, New York and London.
- 50.- Irma Vichido, Yolanda Mora, Carmen Quinto, Rafael Palacios and Jaime Mora. (1978). J. Gen. Microbiol., Vol. 106, 251-259.
- 51.- János Bérdy. (1974). Adv. Appl. Microbiol., Vol. 18, - 309-406.
- 52.- John J. Usher., Brnwen Loder and Edward P. Abraham. - (1975). Biochem. J., Vol. 151, 729-739.
- 53.- Jean-Marie Ghuyssen. (1977). J. Gen. Microbiol., Vol. - 107, 13-33.
- 54.- Johnson, M. J. (1952). Bull. Wld. Hlth. Org., Vol. 6, 99-121.
- 55.- Jones, A. and Westlake, D. W. S. (1974). Can. J. Microbiol., Vol. 20, 1599-1611.
- 56.- José María Luengo, Gloria Revilla, Julio. R. Villanueva and Juan F. Martín. (1979). J. Gen. Microbiol., Vol. 115 207-211.
- 57.- Juan F. Martín, José María Luengo, Gloria Revilla and Julio R. Villanueva. (1978). Antibiotics and other Secondary metabolites. Biosynthesis and Production. 19-34. Ed. Academic Press.

- 58.- Karl Bauner. (1970). Z. Naturforsch. 25b., 1125-1129.
- 59.- Kimura, A. R. (1967). Agr. Biol. Chem., Vol. 31, 845-852.
- 60.- Kirsch, E. J. (1967). In Antibiotics, Vol. II. Biosynthesis (Gotlieb, D. and P. D. Shaw, Eds. 66-76. Springer Verlag, Berlin.
- 61.- Komineck, A.L. (1972). Antimicrob. Agents. Chemother., Vol. 1, 123-134.
- 62.- Komineck, A. L. (1975). Antimicrob. Agents. Chemother., Vol. 7, 856-860.
- 63.- Lehninger, A. L. (1972). Bioquímica. Ediciones Omega, S. A.
- 64.- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough., A. L. Farr and R.J. Randall.(1971). J. Biol. Biochem., Vol. 193, 265-275.
- 65.- Liu, C. M., McDaniel, L. E. and Schanfer, C. P. (1972) J. Antibiotics., Vol. 25, 116-121.
- 66.- Majundar, M. K. and Majundar, S. R. (1971). Folia Microbiol., Vol. 16, 285-292.
- 67.- Martín. J. F. (1977).--Ann. Rev. Microbiol., Vol. 31, 13-38.
- 68.- Martín, J. F. and McDaniel, L. E. (1974). Dev. Ind. Microbiol., Vol. 15, 324-327.
- 69.- Muth, W. L. and Nash, C. H. (1975). Antimicrob. Agents Chemother., Vol. 8, 321-327.
- 70.- Patricia Fawcett and E.P. Abraham. (1974). Methods Enzymol., Vol. XLIII, 471-473.
- 71.- Patricia Fawcett, John J. Usher and Edward P. Abraham. (1975). Biochem. J., Vol. 151, 741-746.

- 72.- Paul A. Lemke and Claude H. Nash. (1972). *Can. J. Microbiol.*, Vol. 18, 255-259.
- 73.- Prakash S. Masurekar and Arnold L. Demain. (1972). *Can. J. Microbiol.*, Vol. 18, 1045-1048.
- 74.- Prakash S. Masurekar and Arnold L. Demain. (1974). *Antimicrob. Agents. Chemother.*, Vol. 6, N° 3, 366-368.
- 75.- Queener, S. W., J. McDermott, and A. B. Radue. (1975). *Antimicrob. Agents. Chemother.*, Vol. 7, 646-651.
- 76.- Sankaran, L. and Pogell, B. H. (1975). *Antimicrob. Agents. Chemother.*, Vol. 8, 721-732.
- 77.- Sergio Sánchez y Fernando Lara. (1978). *Rev. mex. de ciencias farm.*, Vol. 9, 11-16.
- 78.- Smith, G. C. and Hinman, J. W. (1963). *Prog. Ind. Microbiol.*, Vol. 4, 137-163.
- 79.- Stanford Moore. (1963). *J. Biol. Chem.*, Vol. 238, N° 1 235-237.
- 80.- Stephen W. Drew and Arnold L. Demain. (1977). *Ann. Rev. Microbiol.*, Vol. 31, 343-356.
- 81.- W. S. Hu and Arnol L. Demain. (1979). *Proc. Biochem.*, September, 2-6.
- 82.- Warren, S. C., G. C. F. Newton and E. P. Abraham. (1967) *Biochem. J.*, Vol. 103, 891-901.
- 83.- Yair Aharonowitz and Arnol L. Demain. (1978). *Antimicrob. Agents. Chemother.*, Vol. 14, N°2, 159-164.
- 84.- Yair Aharonowitz and Arnol L. Demain. (1979). *Can. J. Microbiol.*, Vol. 25, 61-67.
- 85.- Yolanda Mora, Guadalupe Espín, Kaethe Willms and Jaime Mora. (1978). *J. Gen. Microbiol.*, Vol. 104, 241-250.