



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"**

**ESTUDIO BIOQUIMICO SOBRE SISTEMAS DE TRAN-
PORTE Y UTILIZACION DE L- GLUTAMICO Y L-
ASPARTICO COMO UNICAS FUENTES DE CARBONO Y
ENERGIA EN SALMONELLA TYPHIMURIUM LT-2.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

ROCIO LUCERO RIVERA GARCIA

Director de Tesis: QFI Andrea Becerril



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

I N D I C E

	Página
Introducción	1
Materiales y métodos	12
Resultados	17
Discusión	38
Conclusiones	45
Resumen	46
Bibliografía	49

INTRODUCCION

Muchos microorganismos, en particular las bacterias, pueden adquirir nuevas capacidades metabólicas, incluyendo el crecimiento en sustratos anteriormente no utilizados por la cepa parental, como resultado de una o varias mutaciones que conducen hacia la biosíntesis de enzimas o sistemas de transporte que actúan sobre el compuesto. En algunos casos, la adquisición metabólica puede consistir en la inactivación de una proteína represora como consecuencia de mutaciones en los genes reguladores, dando lugar a la pérdida del control del sistema y a la síntesis constitutiva de una enzima o a un cambio en la especificidad de la inducción, así que la presencia de un nuevo sustrato pueda inducir la síntesis de una enzima que actúe sobre él. (Riley y Anilionis, 18).

En la revisión sobre "La evolución de enzimas para la utilización de nuevos sustratos" Clarke (2), aparece un resumen de las principales condiciones que deben ser cumplidas para que un compuesto sea utilizado por la célula: en primer término, la existencia de los sistemas de permeación que hagan posible su entrada a la célula; en segundo, la existencia de enzimas que lo conviertan a intermediarios metabólicos aprovechables y que actúen a la velocidad suficiente para que el compuesto sea

utilizado en forma efectiva y, en tercer término, que las enzimas sean inducibles por el compuesto.

El estudio bioquímico de la utilización de los aminoácidos aspartato y glutamato como única fuente de carbono por un microorganismo es de especial interés, ya que nos permite seguir las diferentes vías degradativas de éstos y sobre todo su intervención en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El ciclo de Krebs, en conjunto con reacciones secundarias, juega un papel destacado en la síntesis de constituyentes celulares a partir de compuestos simples. Aspartato y glutamato son precursores de otros aminoácidos, así como de purinas y pirimidinas entre otros. En microorganismos que pueden utilizar acetato como única fuente de carbono, el ciclo de glioxilato es un eslabón esencial en la síntesis de constituyentes celulares. Todo lo anterior nos da una idea de la importancia que en el metabolismo celular tienen estos aminoácidos.

En el caso particular de Salmonella typhimurium LT-2, por estudios hechos anteriormente por Gutnick, Calvo, Klopotoski y Ames (4), se encontró que los aminoácidos L-aspartato y L-glutamato no eran utilizados como únicas fuentes de carbono y energía, pero sí como únicas fuentes de nitrógeno. Para que Salmonella typhimurium LT-2 utilizara estos aminoácidos como

fuentes de carbono es necesario de una o más mutaciones. Similarmente, la cepa nativa de Escherichia coli, no utiliza L-glutamato como única fuente de carbono y energía, pero se aislaron mutantes capaces de hacerlo y se mostraron evidencias de que las mutaciones involucraban cambios en los sistemas de permeación (Halpern y Umbarger, (7); Halpern y Lupo, (6), y que el sistema de permeación de glutamato en E. coli es debido a un transporte activo cuya formación es aumentada durante su crecimiento en glutamato (Halpern y Even-Shoshan, 1967, 5).

Se ha definido a un sistema de permeación o de transporte, como a un sistema formado de proteínas que efectúa la transferencia de un sustrato a través de la membrana celular. Es específico hacia su sustrato y posee una actividad cinética semejante a un sistema enzimático. Su formación es inducida por la presencia del sustrato (o de inductores estructuralmente análogos) y se requiere de energía para esta actividad (Rickenberg, Choen y Monod, 17).

En la pasada década se realizaron múltiples estudios acerca de los mecanismos de transporte de sustratos en bacterias gram negativas, sin embargo, no se sabe mucho acerca de los mecanismos moleculares por los cuales el sustrato es transportado a través de las cubiertas celulares. Se han propues

to dos clases principales de mecanismos moleculares para el proceso de transporte, el Modelo de Transportador Móvil y el Modelo del Canal Transportador. En el primero, el substrato se une a un sitio específico de la proteína transportadora y es transferido a través de la membrana por la oscilación del transportador. En el Modelo del Canal Transportador, se ha postulado que el substrato es trasladado a través de la membrana vía canales de transporte formados, probablemente, por subunidades oligoméricas de los componentes de transporte.

De las investigaciones realizadas de las propiedades cinéticas y energéticas de diferentes sistemas de transporte, no se ha podido distinguir por cuál de los mecanismos descritos se lleva a cabo el transporte, esto es debido a que la estructura y composición de la cubierta celular es muy compleja, y a que la naturaleza de la asociación de las proteínas de transporte con diferentes componentes de la cubierta bacteriana no se ha caracterizado completamente (Theodore, C.Y., 20).

Marcus y Halpern (13), reportaron las características genéticas del sistema de permeación para glutamato en E. coli, el cual consiste al menos de tres elementos: el gene estructural gltS, que determina la síntesis de la permeasa, el gene

regulador gltR y el operador gltC. El gene gltR codifica la formación de una proteína que reprime la síntesis de la permeasa en la cepa nativa. El locus gltR no está cercano al gene estructural, se encuentra hacia el minuto 81 en el cromosoma de E. coli, mientras que gltS y gltC se encuentran en el minuto 91, cercano al gene pyrE. Mutaciones en el operador producen una derrepresión de la síntesis de la permeasa y entonces la célula es capaz de captar el glutamato a una velocidad suficiente para su utilización, o bien pueden ocurrir mutaciones en el gene regulador, lo cual causará la producción de una molécula del represor modificada, de tal manera que no pueda unirse al operador y así dar lugar a la síntesis constitutiva de la permeasa. (Fig. 1).

Un sistema semejante al formado por gltR, C y S fue encontrado en Salmonella typhimurium LT-2 y además un nuevo sitio genético, gltF que codifica para un sistema de transporte activo específico para glutamato e independiente del sistema gltR, C y S, localizado aproximadamente en el minuto 0 del cromosoma bacteriano, entre los genes trpR y thr (Alvarez de la Cuadra, 1).

En E. coli se han descrito cinco sistemas para el transporte de glutamato y aspartato (Schellenberg y Furlong, 1977, 10) y son:

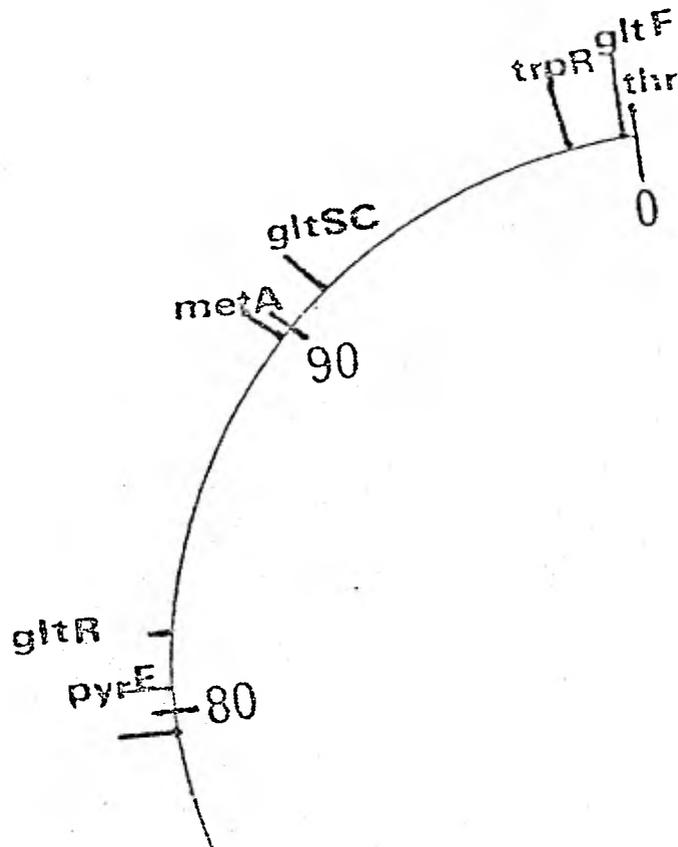


Fig. 1 Fracción del mapa cromosómico de *Salmonella typhimurium* LT-2 donde aparecen los sitios genéticos correspondientes al sistema de transporte y utilización de glutamato.

Sanderson y Hartman (19).

1. Un sistema específico para L-aspartato
2. Un sistema común para L-aspartato y L-glutamato inhibible por beta-hidroxiaspartato
3. Un sistema específico para L-glutamato, dependiente del Sodio e inhibible por α -metil glutamato
4. Un sistema para glutamato y aspartato dependiente de una proteína de unión
5. Un sistema dct común a ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos (Kay, 1971, 10) específico para D y L-aspartato, fumarato, D y L-malato y succinato, con una inhibición débil por parte de oxaloacetato.
(Fig. 2)

En S. typhimurium LT-2, Parada y Ortega (15), describieron las características bioquímicas y genéticas del sistema de transporte de los ácidos succínico, fumárico y málico donde no se encuentra una inhibición por aspartato, mientras que la causada por oxaloacetato fue muy fuerte. Pese a estas diferencias con el sistema equivalente de E. coli, la localización del locus genético dct fue en una región homóloga al de E. coli.

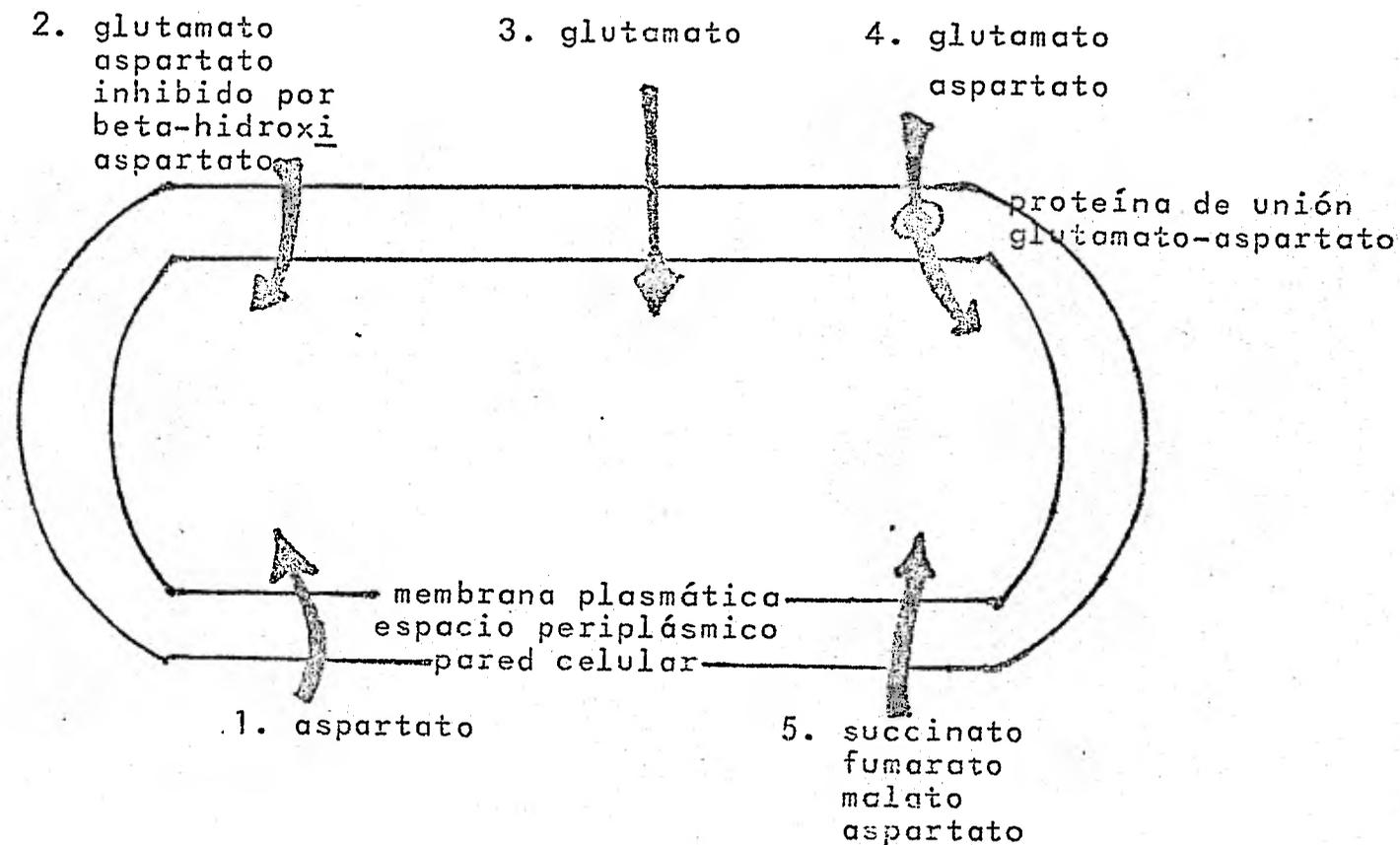


Figura 2. Sistemas para el transporte de glutamato y aspartato en *E. coli*. (Schellenberg y Furlong, 1977).

Tanto para E. coli (Marcus y Halpern, 12), como para S. Typhimurium (Ortega y Aguilar, 14), las vías metabólicas para la utilización de glutamato son similares. Además de un sistema de transporte que permita la entrada de glutamato a la célula, es necesario de la acción de dos enzimas, la transaminasa glutámico-oxaloacético (TGO) y de la aspartasa (Aspartato amonio-liasa (E.C. 4,3,1,1). La transaminasa glutámico-oxaloacético es constitutiva, a partir de glutamato y oxaloacetato forma alfa-cetoglutarato y aspartato, éste es entonces deaminado para producir fumarato por la acción de la aspartasa. La aspartasa es una enzima inducible y muestra dos actividades, la primera aparece cuando las células son crecidas en hidrolizado ácido de caseína como fuente de carbono, tiene un pH óptimo de actividad de 7.2; la segunda, cuando es inducida en presencia de glutamato y tiene un pH óptimo de actividad de 6.4 (Alvarez de la Cuadra, 1). (Fig. 3).

Teniendo como antecedente que la cepa nativa de Salmonella typhimurium LT-2 no utiliza L-aspartato y L-glutamato como únicas fuentes de carbono y energía, en este trabajo se presentan los estudios realizados sobre el efecto que extracto de levadura causa en la utilización de estos aminoácidos

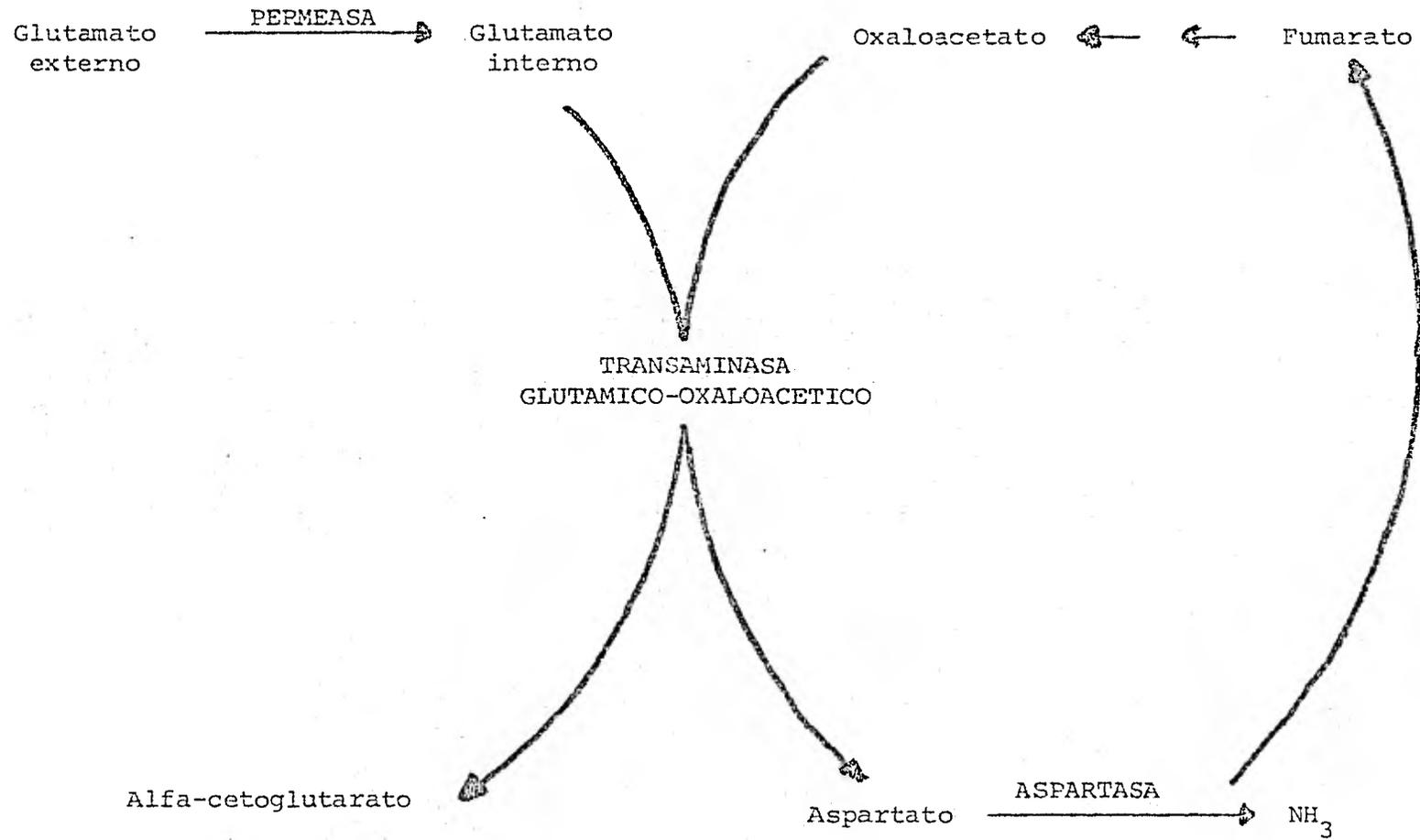


Fig. 3 Utilización de L-glutamato por Salmonella typhimurium y E. coli

como fuente de carbono. En segundo término se presentan los métodos de fraccionamiento de extracto de levadura con el fin de caracterizar el o los componentes que hacen posible dicha utilización, así como los estudios sobre los sustratos y condiciones de crecimiento a través de los cuales L-aspartato y L-glutamato pueden ser utilizados por la cepa parental sin requerir de un tratamiento mutagénico previo.

MATERIALES Y METODOS

Cepa bacteriana

La cepa usada durante este trabajo es Salmonella thphimurium LT-2, proveniente del laboratorio del finado Dr. M. Demerec.

Reactivos

Los aminoácidos, vitaminas, bases púricas y pirimídicas, citrato, succinato, acetato y glicerol fueron adquiridos de la casa Sigma, Chemical Co.; hidrolizado ácido de caseína, hidrolizado enzimático de caseína y extracto de levadura de Difco Laboratories; resinas de intercambio iónico Dowex 1-X-8 y Dowex 50-AG-W son de Bio Rad Laboratories; carbón activado de E. Merck.

Medios de cultivo

Como medio base de sales minerales se utilizó el de Davis y -
Mingioli (1950) sin citrato

Para un litro de medio:

Fosfato monobásico de potasio	3.0 g
Fostato dibásico de potasio	7.0 g
Sulfato de amonio	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.1 g
Agua destilada para aforar a un litro	

Para preparar medios enriquecidos (NCX):

Hidrolizado enzimático de caseína (NZcase)	2.0 g
Hidrolizado ácido de caseína (casa- minoácidos libre de vitaminas)	2.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
Medio Davis 10 x	100 ml
Agua destilada para aforar un litro de medio	

Las fuentes de carbono fueron utilizadas en una concentración de 0.4% p/v, a menos de que se especifique otra concentración. Para medios sólidos se agregó agar al medio líquido, a una concentración de 1.5% p/v.

Experimentos de crecimiento

Los experimentos para determinar la cinética de crecimiento de las cepas probadas se realizaron a partir de células crecidas durante la noche aerobicamente a 37° C en medio líquido mínimo con glicerol como fuente de carbono. Las células fueron colectadas por centrifugación, posteriormente, fueron lavadas dos veces con solución salina estéril (NaCl, 0.85% p/v) y se resuspendieron en un pequeño volumen de la misma solución. 0.25 ml de esta solución se usó para inocular 50 ml de medio de cultivo correspondiente contenido en matraces nefelométricos Bellco de 300 ml, de tal manera que la absorbancia inicial leída a 660 nm sea de de 0.060 a 0.080 nm en un espectrofotómetro Coleman Junior. Los matraces fueron incubados a 37° C en un agitador rotatorio orbital New Brunswick a 120 r.p.m., haciendo lecturas de crecimiento bacteriano cada hora.

Preparación de hidrolizados en extracto de levadura

La hidrólisis ácida fue obtenida a partir de una solución al 0.1% p/v de extracto de levadura, tratándose con ácido sulfú-

rico concentrado y posteriormente pasado a una ampolleta de vidrio. Se mantuvo en autoclave por espacio de tres horas a 20 lb de presión. Una vez pasado el tiempo, se neutralizó con una solución saturada de hidróxido de bario y el precipitado formado fue separado por filtración. El filtrato se ajustó a pH de 7.0. En el caso de hidrólisis alcalina, la solución inicial de extracto de levadura al 0.1% p/v fue tratada con una solución saturada de hidróxido de bario bajo las mismas condiciones de presión y tiempo que en el caso anterior, neutralizando con ácido sulfúrico concentrado, filtrando el precipitado y ajustándolo a el pH final de 7.0.

Tratamiento de extracto de levadura con carbón activado

Una solución de extracto de levadura al 0.1% p/v fue tratada con 25 g de carbón activado en agitación suave durante dos horas. Pasado este tiempo, fueron separados por filtración, tomando al filtrado como la fracción primera. Al carbón activado anterior fue agregado un pequeño volumen de agua destilada y llevado a un pH de 4.0 con ácido clorhídrico diluido, manteniéndose en agitación suave durante dos horas. Pasado este tiempo, fueron separados nuevamente por filtración. Al carbón activado resultante fue agregado hidróxido de sodio -

hasta llevar a un pH de 12.0 siguiendo el procedimiento anterior. Los filtrados obtenidos por el tratamiento a pH de 4 y de 12 fueron mezclados y se ajustó el pH a 7.0, ésta fue la fracción segunda.

Tratamiento de extracto de levadura con resinas de intercambio iónico

Se usaron dos resinas, una aniónica, Dowex 1-X-8 y otra catiónica, Dowex 50-AGW-X-8. En el tratamiento con la resina aniónica, se partió de una solución de extracto de levadura al 0.1% p/v a un pH de 12, manteniéndose en agitación lenta durante dos horas. Una vez pasado este tiempo, la resina fue separada por filtración y el filtrado neutralizado con ácido clorhídrico diluído a pH de 7.0. En el caso del empleo de la resina catiónica, la solución de extracto de levadura al 0.1% p/v fue llevada a pH de 4.0 y mantenida en agitación lenta por dos horas. La resina fue separada por filtración y el filtrado se neutralizó con hidróxido de potasio diluído.

RESULTADOS

Crecimiento de la cepa parental de Salmonella typhimurium LT-2 en L-aspartato, L-glutamato y D-aspartato en presencia de extracto de levadura

Un inóculo de Salmonella thphimurium LT-2 crecido durante la noche en un medio mínimo con glicerol como fuente de carbono, fue transferido a medios conteniendo los aminoácidos L-glutamato, L-aspartato y D-aspartato como únicas fuentes de carbono y energía. No hubo crecimiento en un periodo de ocho a diez horas a 30° C con agitación. En cambio, cuando al medio de cultivo se agrega extracto de levadura, sí hay utilización de estos aminoácidos como fuentes de carbono. Cuando el extracto de levadura se usa como única fuente de carbono, el cultivo alcanza un crecimiento regular y el extracto de levadura es agotado hacia la cuarta hora del experimento (Fig. 4)

Variando la concentración de extracto de levadura de 0.05 a 0.1% p/v en medios mínimos con alguno de los aminoácidos en estudio, observamos siempre la utilización de éstos como fuente de carbono, siendo proporcional a la concentración de extracto de levadura presente en el medio. Como podemos observar en las figuras 4 y 5, L-aspartato y L-glutamato son utilizados con mayor rapidez en el D-aspartato, siendo notable el cam -

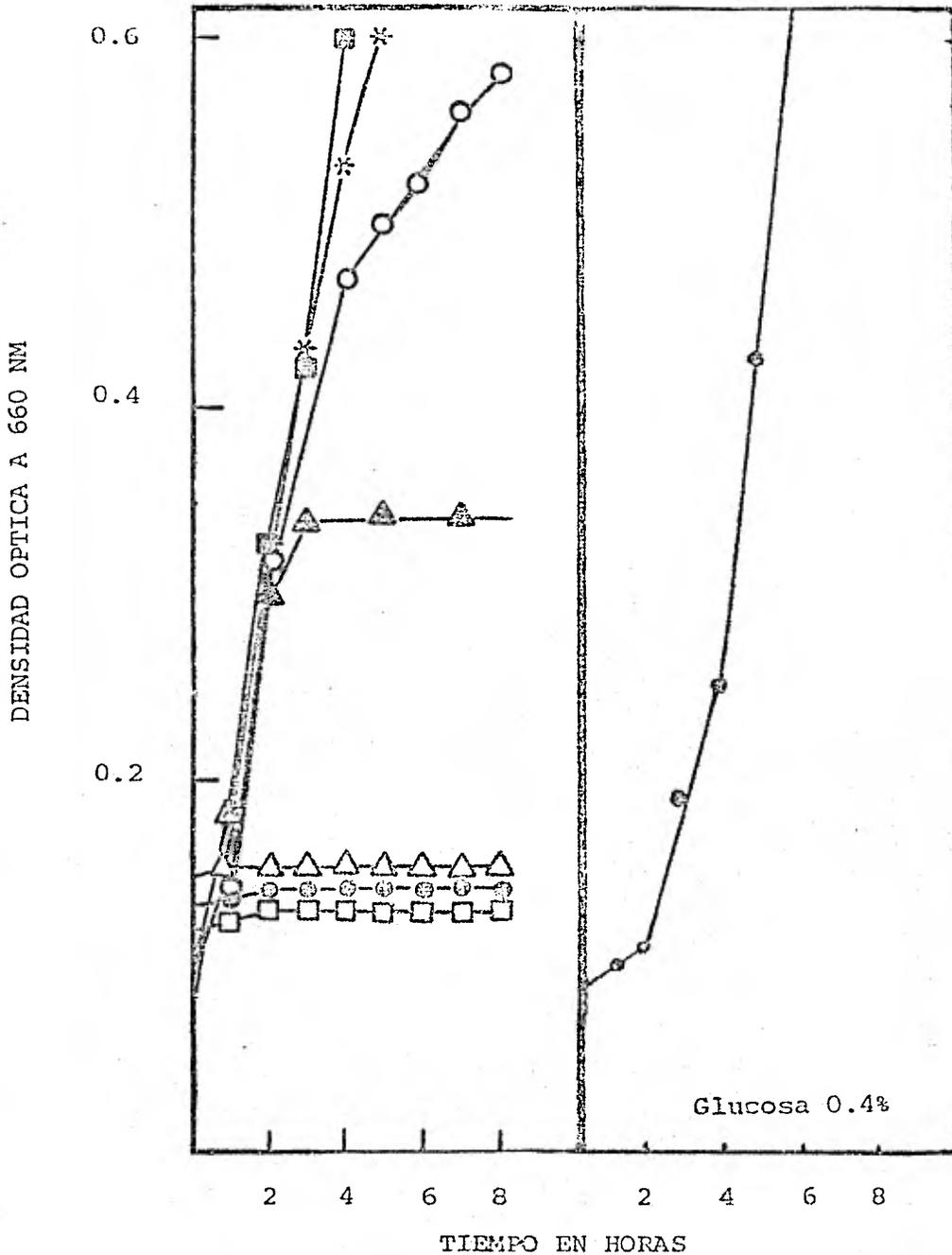


Fig. 4 Lecturas de crecimiento de *Salmonella typhimurium* LT-2 a 37° C en agitación, realizados cada hora - en un espectrofotómetro Coleman a 660 nm de absorción, a partir de inóculos crecidos en glicerol y transferidos a:

L-aspartato 0.4% □
 L-glutamato 0.4% △
 D-aspartato 0.4% ●

Extracto de levadura 0.1% + L-aspartato 0.4% ◻*
 Extracto de levadura 0.1% + L-glutamato 0.4% ◻*
 Extracto de levadura 0.1% + D-glutamato 0.4% ◻*
 Extracto de levadura 0.1% △

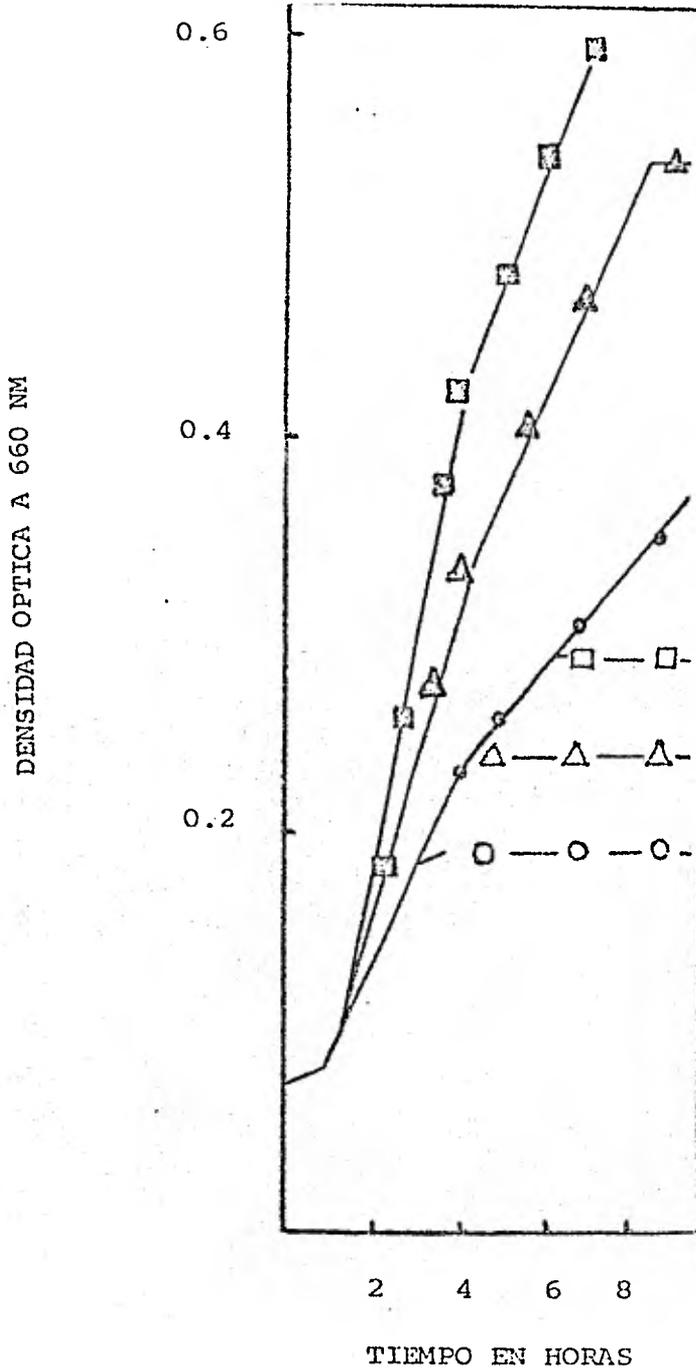


Fig. 5 Cinética de crecimiento de *Salmonella typhimurium* LT-2 en diferentes concentraciones de extracto de levadura realizados a partir de inóculos crecidos en glicerol

Extracto de levadura	0.05%	○
Extracto de levadura	0.075 %	△
Extracto de levadura	0.1%	□
L-aspartato	0.4% +	◼
L-aspartato	0.4% +	●
L-aspartato	0.4% +	▲
L-aspartato	0.4% +	◻

bio en la pendiente de la curva una vez que se utiliza el extracto de levadura. Obviamente algún componente de el extracto de levadura ha provocado que la utilización de L-aspartado, L-glutamato y D-aspartato sea posible.

El extracto de levadura esta formado principalmente de vitaminas, bases tanto púricas como pirimídicas y además contiene otros compuestos orgánicos en menor cantidad, tales como ácidos grasos, intermediarios del ciclo de Krebs y otras vías metabólicas. Para tratar de determinar cuál de sus componentes es responsable del efecto causado en la utilización de los aminoácidos por la cepa parental, fueron realizados experimentos de crecimiento en algunos de estos compuestos.

Añadiendo bases como adenina, guanina, citosina, timina y uracilo, -aproximadamente cinco microgramos por mililitro de medio-, y vitaminas como nicotinamida, rivo flavina, ácido fólico, piridoxamina, vitamina B₁₂, ácido para amino benzoico, biotina, pantotenato y tiamina, -2.5 microgramos por mililitro de medio-, y medios mínimos con L-glutamato, L-aspartato o D-aspartato, no se observó crecimiento alguno. Cuando fue usada una mezcla de 19 aminoácidos a una concentración de 20 microgramos por mililitro de medio, junto con los tres aminoácidos en estudio, como fuente de carbono, se observó un

efecto similar al causado por extracto de levadura, mientras no se agotaran los aminoácidos de la mezcla. (Fig. 6).

Cuando fueron realizadas cinéticas de crecimiento de aminoácidos agrupados por su estructura, no se observó un crecimiento importante en los grupos 2 (aspartato, treonina, isoleucina, valina y asparragina) y el 4 (glutamato, arginina, prolina, glutamina), cuando se les agregó L-aspartato, sí hubo utilización de éste, aunque no en una forma completa. Los grupos 1 (alanina, serina, histidina y glicina) y 5 (tirosina, triptofano y fenilalanina) como únicas fuentes de carbono no mostraron crecimiento, mientras que mezclados con L-aspartato sí se dio utilización de éste, aunque en forma regular para el grupo 1 y para el grupo 5 no fue significativa. En el caso del grupo 3 (metionina, lisina y leucina), tanto como con L-aspartato, no hubo crecimiento. (Fig.7).

Con el fin de obtener alguna fracción de extracto de levadura responsable de la utilización de los aminoácidos, éste fue tratado por diferentes métodos:

- a) Hidrólisis ácida y alcalina de extracto de levadura. El hidrolizado alcalino de extracto de levadura con L-aspartato y L-glutamato como fuentes de carbono muestra un efecto similar al del extracto

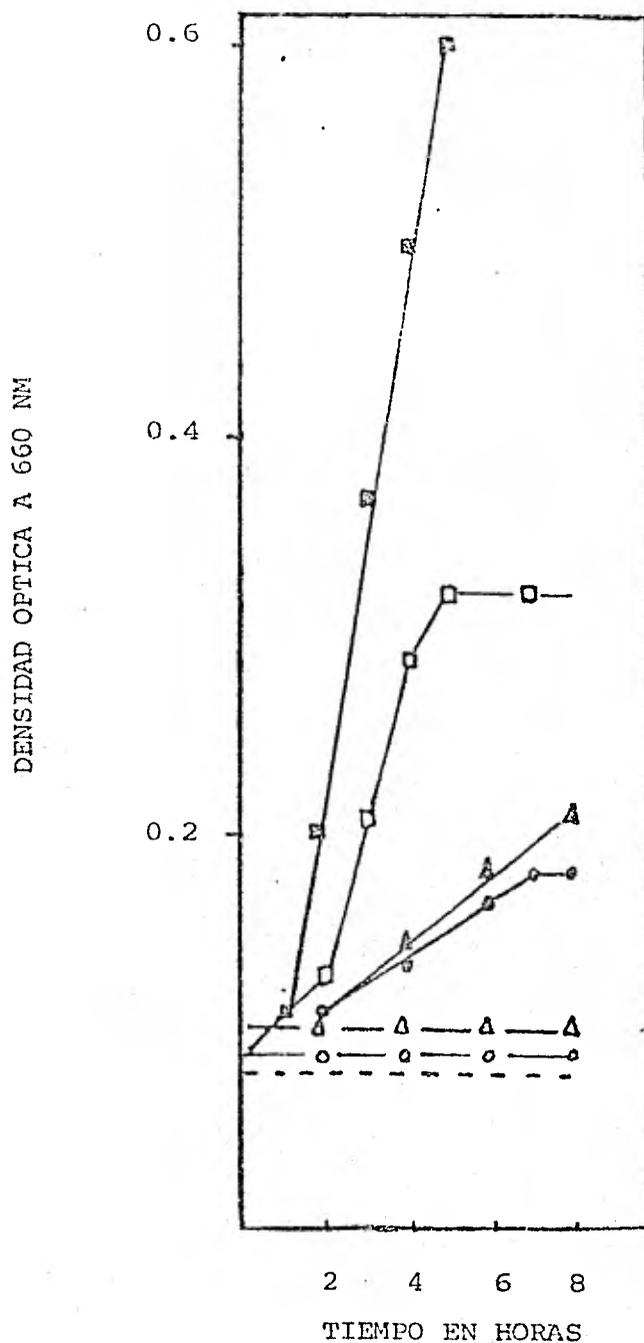


Fig. 6 Cinética de crecimiento de *Salmonella typhimurium* LT-2 en aminoácidos, bases púricas y pirimídicas y aminoácidos usando inóculos crecidos en glicerol

Vitaminas	○		
Bases	Δ		
Aminoácidos	□		
L-aspartato	0.4%		---
L-aspartato	0.4%	+	Vitaminas ○
L-aspartato	0.4%	+	Bases Δ
L-aspartato	0.4%	+	Aminoácidos □

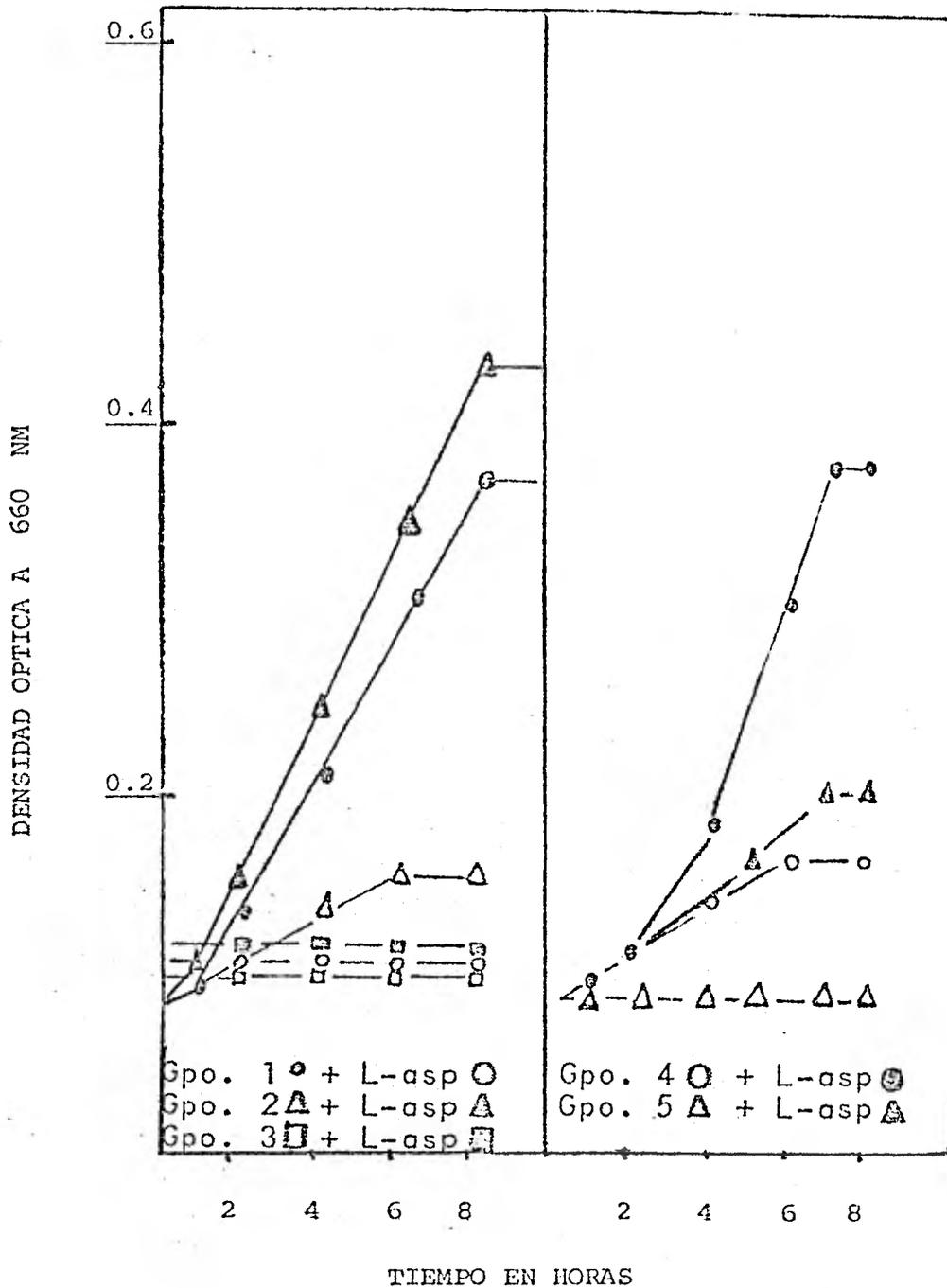


Fig. 7 Cinética de crecimiento de *Salmonella typhimurium* LT-2 en grupos de aminoácidos

- Grupo 1 - Alamina, serina, histidina y glicina
 Grupo 2 - Aspartato, treonina, isoleucina, valina y asparragina
 Grupo 3 - Metionina, lisina, leucina
 Grupo 4 - Glutamato, arginina, prolina y glutamina
 Grupo 5 - Tيروسina, triptofano y fenilalanina

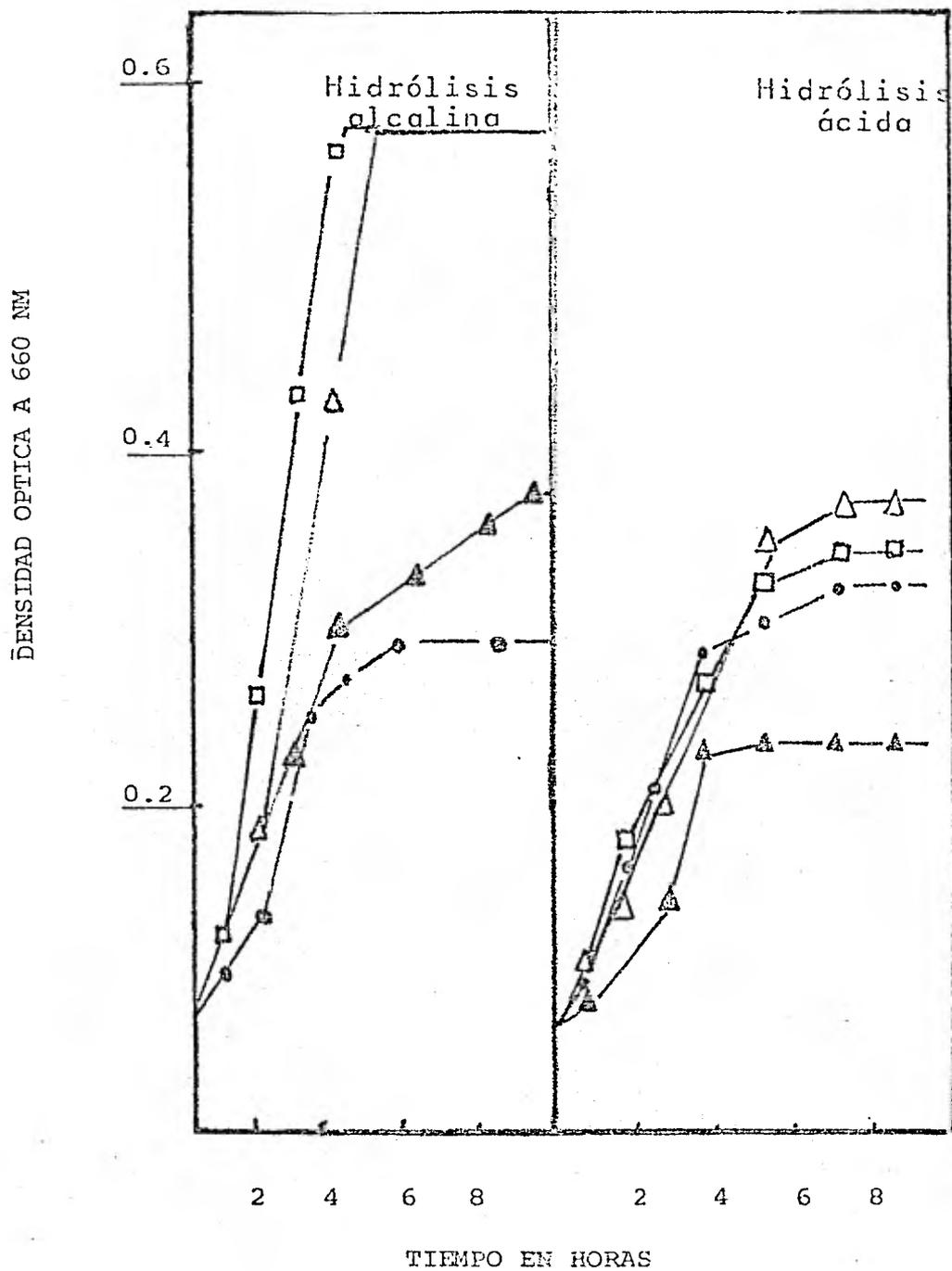


Fig. 8 Cinética de crecimiento de las hidrólisis ácida y -alcalina de extracto de levadura a partir de inóculos crecidos en glicerol

Hidrólisis ●
 L-aspartato + Hidrólisis △
 L-glutamato + Hidrólisis ◻
 D-aspartato + Hidrólisis ◻

de levadura sin hidrolizar. Un efecto menor se observa cuando se utiliza hidrólisis ácida de extracto de levadura como adición a los medios con los diferentes aminoácidos. (Fig. 8).

- b) El tratamiento con carbón activado fue realizado con el fin de separar compuestos aromáticos o heterocíclicos presentes en el extracto de levadura, de otros componentes. Cuando el extracto de levadura fue tratado a pH de 7 por espacio de dos horas, se obtuvo la fracción primera, es decir, la fracción que no es adsorbida por el carbón activado. Al adicionar esta fracción a medios con L-glutamato, L o D-aspartato, como fuentes de carbono, no se obtuvo un crecimiento importante. En el caso de la fracción segunda, la fracción de extracto de levadura adsorbida por el carbón activado, no se obtuvo un efecto de utilización importante de los aminoácidos al agregarse a los medios que los contenían. Pero cuando juntamos las dos fracciones, conjunto que implica algo similar al extracto de levadura sin tratar, tenemos como resultado un efecto igual al que se obtiene usando extracto de levadura con L-aspartato y L-glutamato. Sin embargo, no hubo -

DENSIDAD OPTICA A 660 NM

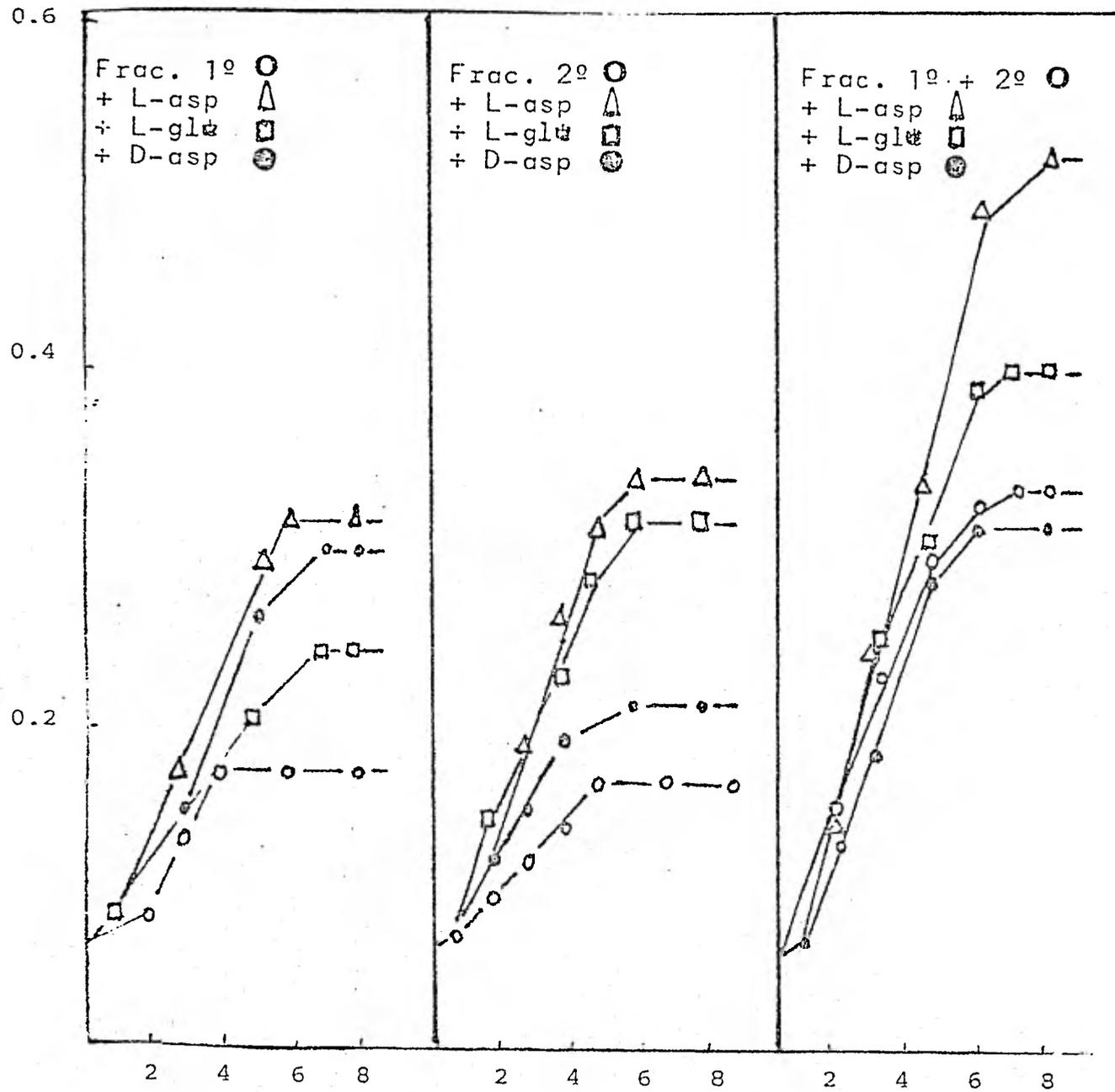


Fig. 9 Cinética de crecimiento de *Salmonella typhimurium* LT-2 en extracto de levadura tratado con carbón activado

utilización de D-aspartato. (Fig. 9)

- c) Para determinar si el elemento causante de la utili zación de L-aspartato y L-glutamato como fuente de carbono puede ser separado a través de resinas de intercambio iónico, el hidrolizado alcalino de extracto de levadura así como el extracto de levadura sin hidrolizar, fueron tratados con la resina aniónica Dowex 1-X-8 y con la resina catiónica Dowex 50. Una vez tratados, fueron probados en experimentos de crecimiento y resultó que para ambos el tratamiento con resina aniónica Dowex 1, no tuvo efecto, puesto que en las gráficas de crecimiento (Fig.10), observamos resultados similares tanto para el extracto de levadura hidrolizado como para el extracto de levadura sin hidrolizar. Lo mismo ocurrió al añadir L-glutamato, L-aspartato o D-aspartato como fuentes de carbono a dicho medio. En el caso del tratamiento con la resina catiónica Dowex 50, se observa que no hay utilización completa de L-aspartato para la copa parental, ya que el creci miento con resina catiónica alcanza 0.3 nm de densidad óptica. (Fig. 10).

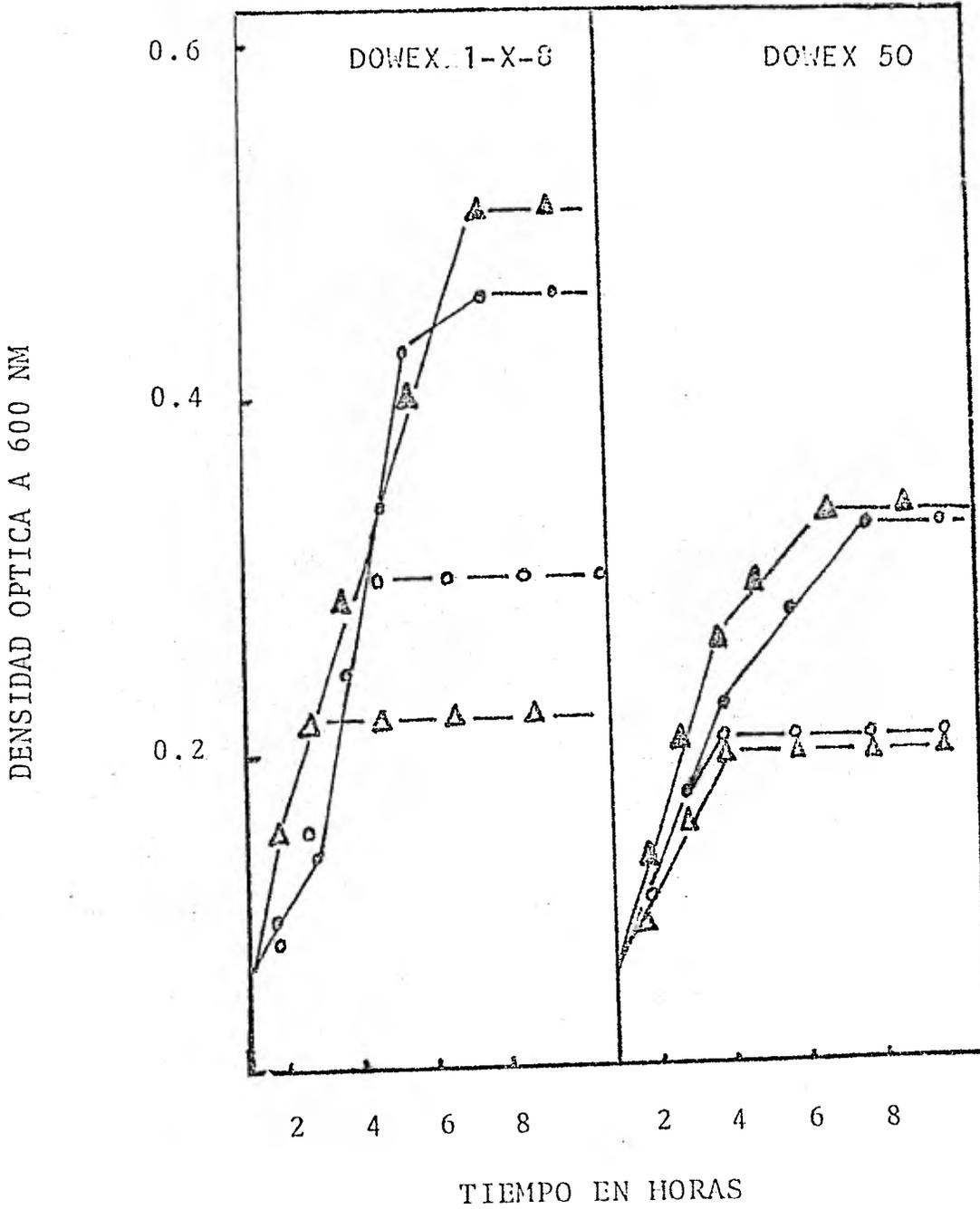


Fig. 10 Cinética de crecimiento de *Salmonella Typhimurim* LT-2 en extracto de levadura tratado con resinas de intercambio iónico

Extracto de levadura tratado en resina ○
 Extracto de levadura tratado en resina + L-aps ●
 Hidrolizado alcalino tratado en resina △
 Hidrolizado alcalino tratado en resina + L-asp ▲

Crecimiento de la cepa parental del Salmonella typhimurium -
LT-2 en succinato, citrato, acetato y propionato

De las figuras 11 y 12, podemos observar que la utilización de succinato, citrato, acetato y propionato por células crecidas en medio mínimo-glicerol es lenta en comparación a la gráfica de crecimiento en glucosa (Fig. 4). Cuando agregamos D-aspartato a una concentración de 0.4% p/v a cualquiera de los medios de cultivo, el crecimiento es casi el mismo. En cambio, hay utilización de L-aspartato y L-glutamato como fuente de carbono cuando estos aminoácidos se agregan a los medios anteriores.

En medios mínimos de Davis sin amonio con diferentes fuentes de carbono como glucosa, glicerol, succinato, acetato y citrato al 0.1% p/v, fue adicionada L-aspartato al 0.4% p/v. En las figuras 13 y 14 observamos que el L-aspartato es utilizado como fuente de nitrógeno cuando glucosa, glicerol y citrato son las fuentes de carbono. Sin embargo, el crecimiento es más lento en comparación a medios donde se ha agregado sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. En mezclas de acetato con L-aspartato, la cinética de crecimiento es similar a la correspondiente en medio de Davis normal. En mezclas de succinato y L-aspartato, la velocidad de crecimiento es aún mayor.

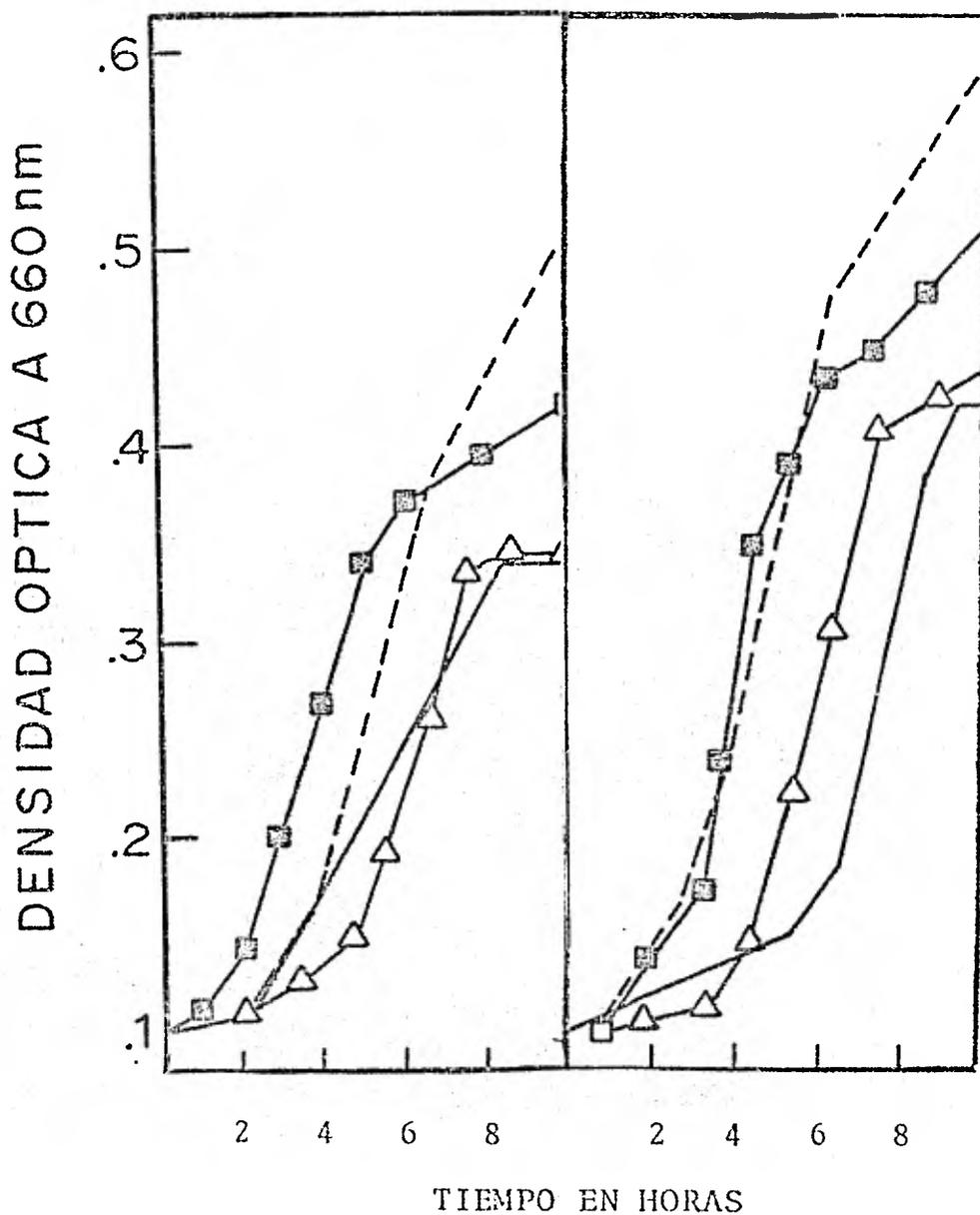


Fig. 11 Cinética de crecimiento de *Salmonella Thphimurium* LT-2 en succinato y citrato

Succinato 0.1%	—	Citrato 0.1%	—
Succinato 0.1% + L-asp	---	Citrato 0.1% + L-asp	---
Succinato 0.1% + D-asp	△	Citrato 0.1% + D-asp	△
Succinato 0.1% + L-glt	■	Citrato 0.1% + L-glt	■

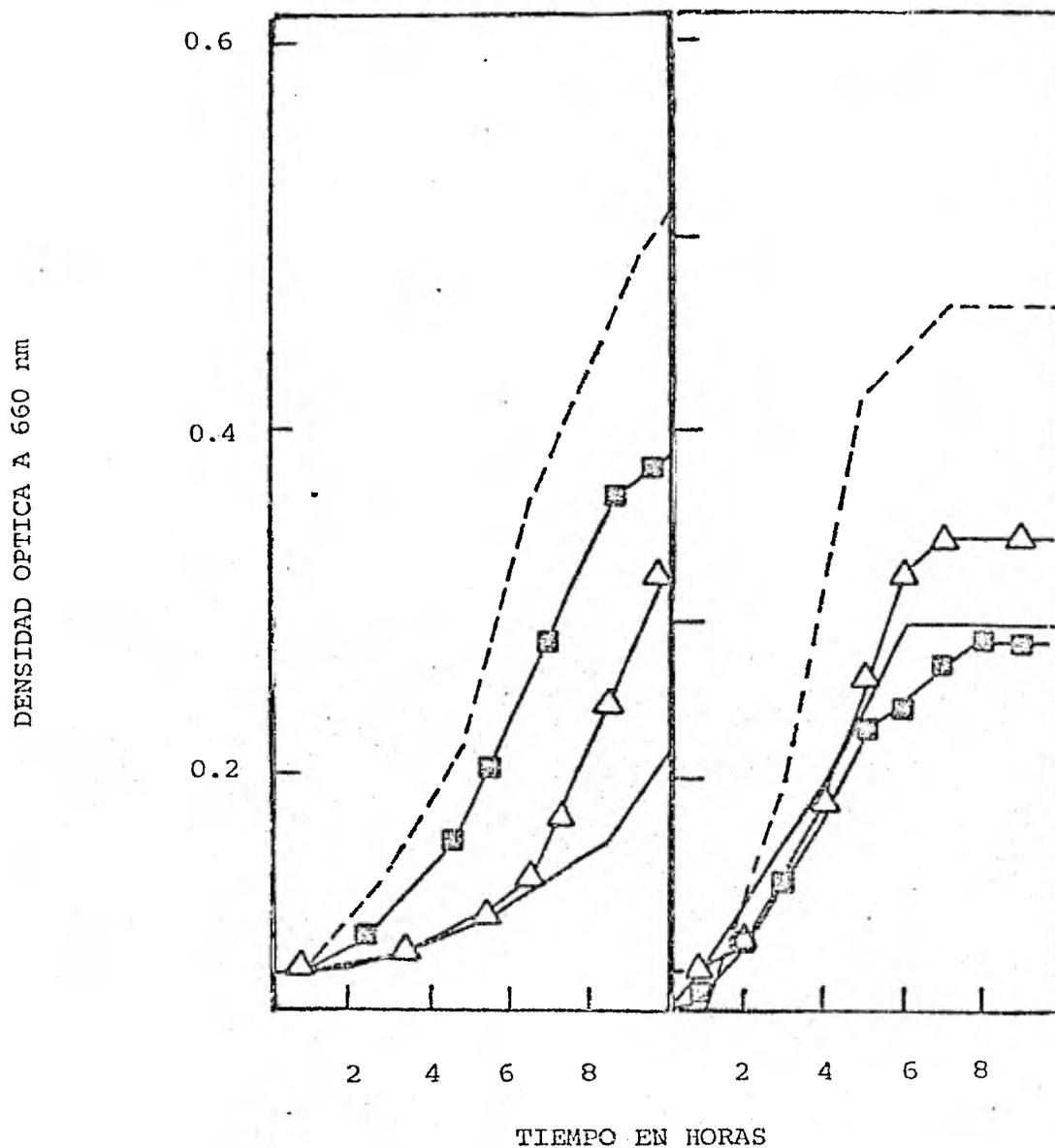


Fig. 12 Cinética de crecimiento de *Salmonella Thphimurium* LT-2 en propionatu y acetato

Acetato 0.1%	—	Propionato 0.1%	—
Acetato 0.1% + L-asp	---	Propionato 0.1% + L-asp	---
Acetato 0.1% + D-asp	△	Propionato 0.1% + D-asp	△
Acetato 0.1% + L-glv	■	Propionato 0.1% + L-glv	■

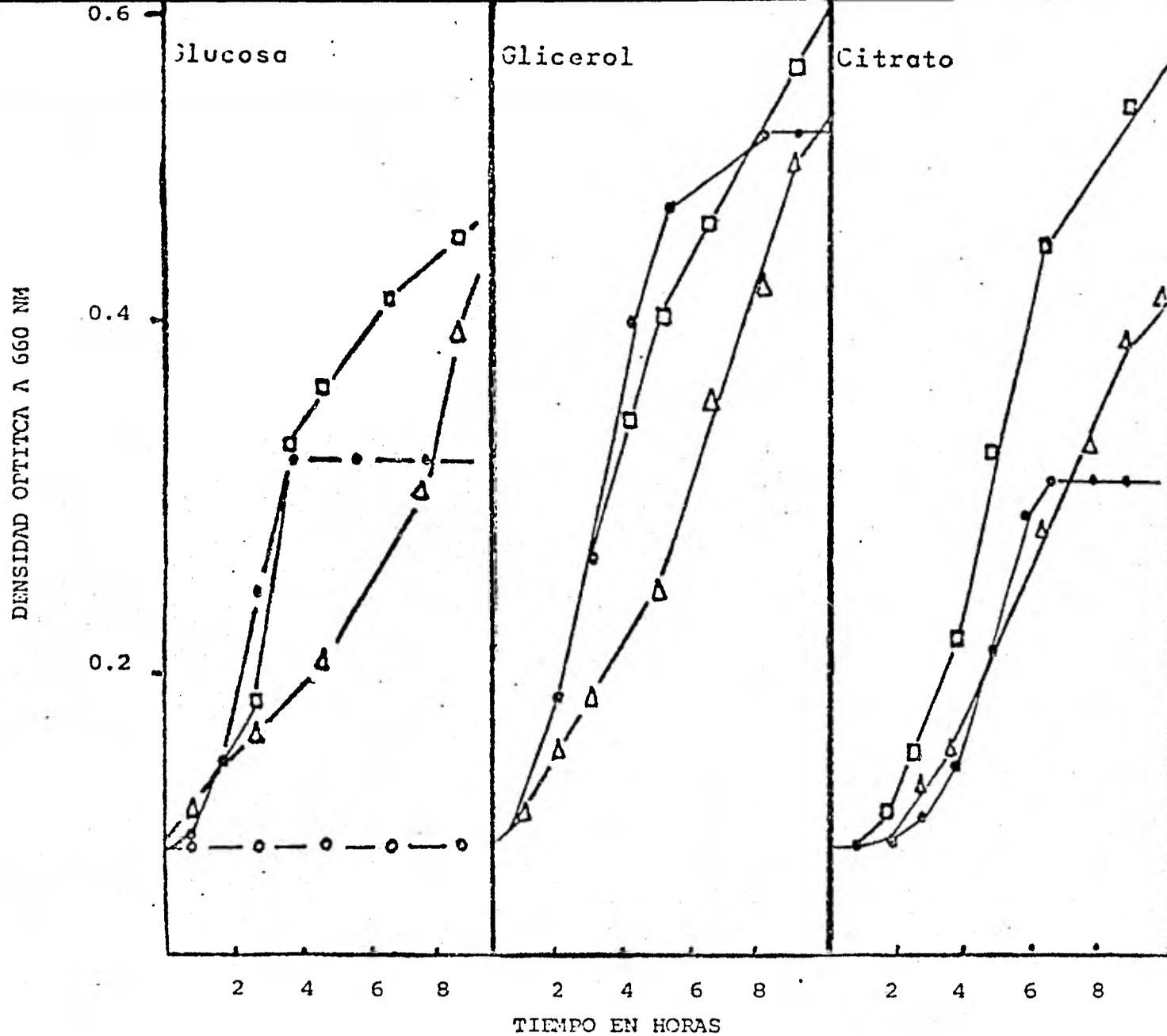


Fig. 13 L-aspartato ○ 2° fuente de carbono ●
 L-aspartato + 2° fuente de carbono ◻
 L-aspartato + 2° fuente de carbono en Medio Mínimo de Davis sin amonio △

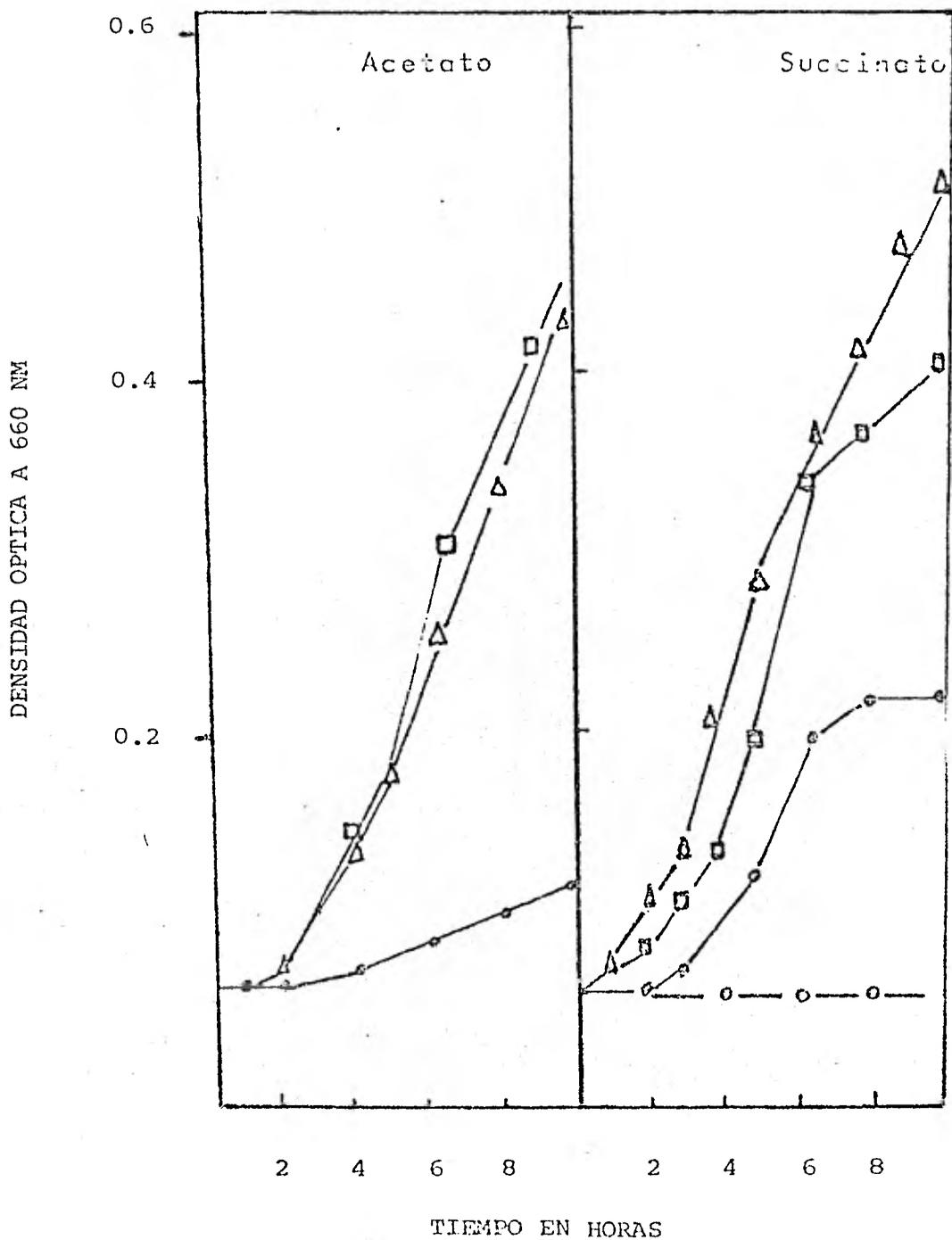


Fig. 14 L-asp ○
 2° fuente de carbono ●
 L-asp + 2° fuente de carbono ◻
 L-asp + 2° fuente de carbono en medio mínimo de Davis sin amonio △

Lo anterior nos demuestra que el L-aspartato presente en el medio es utilizado por la célula tanto como una fuente de carbono como fuente de nitrógeno.

Crecimiento de Salmonella thphimurium LT-2 en diferentes con-
centraciones de succinato, en presencia de concentraciones -
constantes de L-aspartato

Para observar si la variación de la concentración de succinato en el medio producía el mismo efecto de utilización de L-aspartato en particular, fueron realizadas cinéticas de crecimiento con mezclas de succinato de 0.1 a 0.05% p/v y L-aspartato al 0.4% p/v. Al igual que en el caso de extracto de levadura, la utilización de L-aspartato fue proporcional a la cantidad de succinato en el medio. (Fig. 15).

Comportamiento de células crecidas en succinato y pasados a
medios mínimos con L-glutamato, L-aspartato y D-asparta-
to como únicas fuentes de carbono

Células crecidas en medio mínimo-succinato durante la noche, fueron transferidas a nuevos medios de succinato, siguiendo

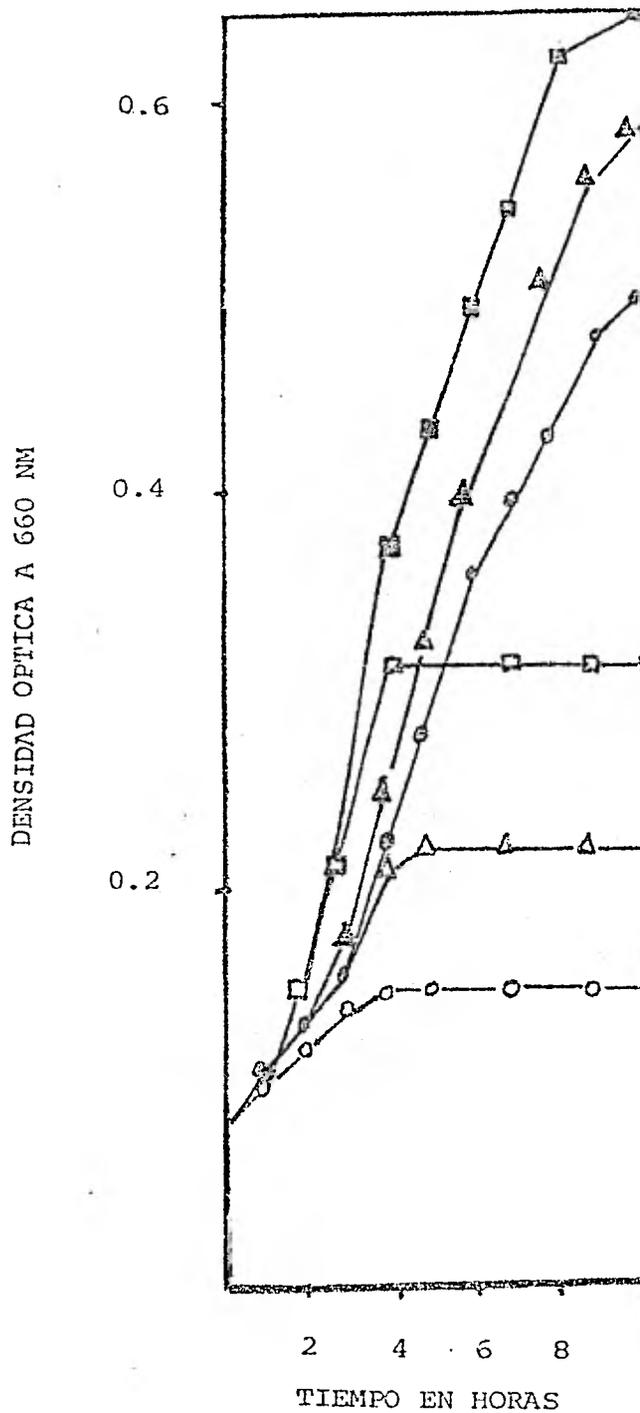


Fig. Cinética de crecimiento de *Salmonella typhimurium* LT-2 en diferentes concentraciones de succinato realizadas a partir de inóculos crecidos en glicerol

Succinato	0.05%	○			
Succinato	0.075%	△			
Succinato	0.1%	◻			
L-aspartato	0.4%	+	Succinato	0.5%	◉
L-aspartato	0.4%		Succinato	0.075%	◄
L-aspartato	0.4%		Succinato	0.1%	◻

el crecimiento de lecturas a intervalos de una hora. En la fase logarítmica fue separada una porción del cultivo, el resto del medio siguió en incubación hasta llegar a la fase estacionaria. Las células de ambos cultivos fueron cosechadas por centrifugación e inoculadas en los medios siguientes:

1. Succinato 0.05%
2. Succinato 0.05% con L-aspartato, D-aspartato e L-glutamato 0.4%
3. L-aspartato, D-aspartato o L-glutamato 0.4%

El crecimiento en succinato fue regular y el sustrato fue agotado rápidamente, aproximadamente en dos horas, lo cual corresponde a la baja concentración de succinato presente en el medio. La mezcla de succinato y L-aspartato tuvo un crecimiento bastante notable, tanto en velocidad como en cantidad, como había ocurrido en experimentos anteriores.

Con D-aspartato y succinato casi no hubo variación con respecto a succinato solo y en L-glutamato y succinato, el crecimiento es poco. Así podemos decir que se tiene utilización de L-aspartato como única fuente de carbono cuando la cepa parental de Salmonella typhimurium LT-2 es cultivada previamen-

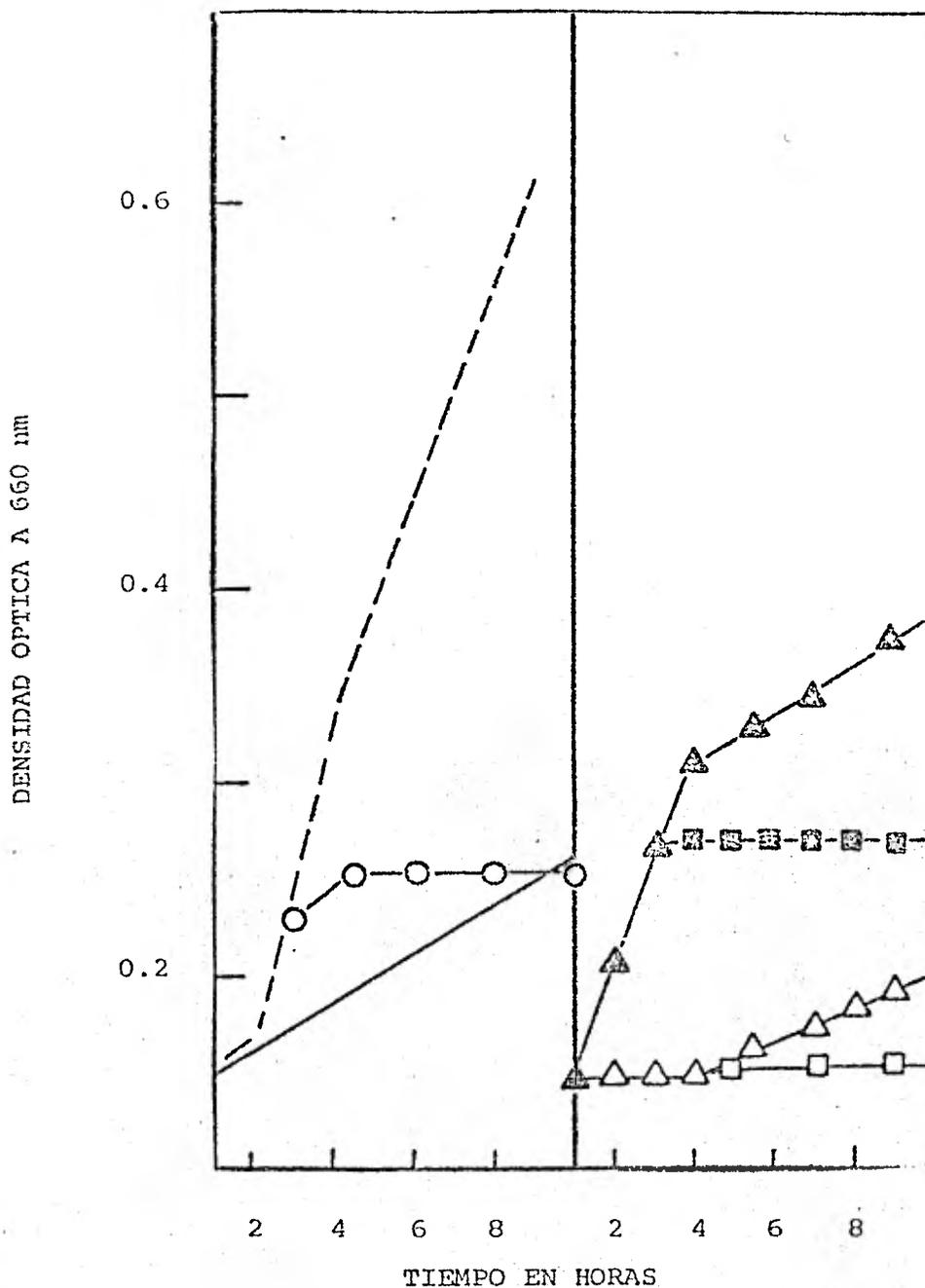


Fig. 16 Cinética de crecimiento de *Salmonella typhimurium* LT-2 partiendo de inóculos crecidos en succinato

Succinato	0.05%	○		
L-aspartato	0.4%	—	L-asp + Succinato	—
L-glutamato	0.4%	△	L-glv + Succinato	△
D-aspartato	0.4%	◻	D-asp + Succinato	◻

te en succinato; en el caso de L-glutamato, el resultado no es tan marcado y con D-aspartato no hay utilización. (Fig.16).

DISCUSION

Como probaron Gutnick, Calvo, Klopotosky y Ames (4) en Salmonella typhimurium LT-2, L-aspartato y L-glutamato no son usados como únicas fuentes de carbono y energía, pero sí como únicas fuentes de nitrógeno, debido a que la formación del sistema de permeación o de transporte se encuentra reprimido y, por tanto, los aminoácidos no pueden entrar a la célula a una velocidad suficiente para cubrir todos sus requerimientos. Sin embargo, en el caso de L-glutamato, Marcus y Halpern (12) han demostrado que por medio de una mutación inducida o espontánea, estos aminoácidos pueden ser utilizados como únicas fuentes de carbono.

Para el caso específico de L-glutamato, el sistema de transporte se encuentra genéticamente formado al menos de tres componentes: el gene regulador gltR, el operador gltC y el gene estructural gltS (Marcus y Halpern, 13). Cuando ocurre una mutación, ya sea en el operador o en el regulador,

se provoca una derrepresión de la síntesis de la permeasa y entonces el glutamato es capaz de penetrar en la célula en cantidad y velocidad suficiente para su utilización como fuentes de carbono.

En el caso de L-aspartato, en E.coli se han encontrado dos sistemas de transporte principales, en el primero es el dct, es de baja especificidad y es necesario para el crecimiento en ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos (cuando son usados como únicas fuentes de carbono). El segundo, de alta afinidad, codificado por el gene ast, sirve para facilitar la entrada de L-aspartato como fuente de nitrógeno y tiene una función anaplerótica. Es decir, en cepas que tienen lesiones en la enzima fosfoenolpirúvico carboxilisa ppc o cuando el gene dct está lesionado, el aspartato actúa como fuente de ácidos dicarboxílicos (Kay y Kornberg, 10 y 11).

En la primera parte de este trabajo se realizaron experimentos de crecimiento -usando inóculos crecidos en glicerol-, en medios mínimos con mezclas de aspartato o glutamato con extracto de levadura a diferentes concentraciones, observándose que en todos ellos había una utilización de aspartato y glutamato como fuentes de carbono una vez que el extracto de levadura había sido agotado. También observamos que extracto

de levadura como tal no actúa como una fuente importante ya que es agotado hacia las cuatro horas del experimento con un crecimiento bastante regular.

En microbiología, el extracto de levadura es usado para proporcionar una fuente de enriquecimiento a los medios de cultivo, entre sus principales componentes están vitaminas, bases púricas y pirimídicas, pequeños péptidos, y otros compuestos orgánicos en menor cantidad como intermediarios de la vía ciclo de Krebs y otras vías metabólicas. La pregunta era ¿qué componente (s) de extracto de levadura producía (n) tal efecto?.

Al usar compuestos como vitaminas, bases púricas y pirimídicas, que se sabe son abundantes en extracto de levadura y mezclas de aminoácidos añadidos a medios de cultivo mínimo-glutamato y mínimo-aspartato, no había crecimiento, o si éste se daba, era mucho menor al comparado con una fuente de carbono como glucosa (Fig. 4). Por tanto, podría pensarse que ninguno de estos compuestos, solos o en diversas combinaciones, eran los responsables de la utilización de aspartato y glutamato.

En segundo término, se ensayaron varios métodos de fraccionamiento de extracto de levadura con el fin de poder separar algún grupo de compuestos que causen dicho efecto, como hidró

lisis de extracto de levadura, donde observamos que el compuesto responsable de la utilización de aspartato y glutamato es estable a la hidrólisis alcalina. Tratamiento de extracto de levadura intacto y de hidrolizados de extracto de levadura con carbón activado para separar los compuestos aromáticos o heterocíclicos, y por último, tratamiento de los anteriores con resinas de intercambio iónico, sin encontrar un resultado definitivo, excepto que se encontró que el o los compuestos que producían el crecimiento tenían una carga negativa.

Estos resultados no son concluyentes ya que el crecimiento no es abatido por completo, a pesar de que el extracto de levadura fue tratado con un exceso de resina al pH y por el tiempo recomendados.

Cuando aspartato se encuentra como única fuente de nitrógeno junto con glicerol como fuente de carbono, se observó un crecimiento semejante al ocurrido cuando se usa sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Lo anterior nos demuestra que existe una entrada de aspartato a la célula y que éste es usado como fuente de nitrógeno. Cuando son usados otros substratos como acetato, citrato o succinato bajo las mismas condiciones, aparece un aumento en el crecimiento total. Por lo tanto, el aspartato además puede ser una fuente

de carbono dependiendo del segundo sustrato presente.

Cuando son mezclados medios de cultivo mínimo-glutamato o aspartato con succinato, citrato, acetato y propionato, también hay una utilización de estos aminoácidos como fuentes de carbono, obteniéndose un efecto similar al causado por la adición de extracto de levadura. Esto se manifiesta al observarse cambios en las pendientes de las curvas de crecimiento a partir del tiempo de agotamiento de succinato, acetato y citrato. Sin embargo, L-aspartato es utilizado más rápidamente que L-glutamato.

De las figuras 13 y 14 observamos que succinato en combinación con L-aspartato tienen un mayor crecimiento en comparación a los otros compuestos. Cuando se probaron diferentes concentraciones de succinato con una concentración constante de L-aspartato, en semejanza al experimento realizado con extracto de levadura, hay utilización de L-aspartato y ésta es proporcional a la cantidad de succinato presente en el medio. Hay diauxias, es decir, al principio las mezclas de aminoácidos y succinato tienen una pendiente similar a la de succinato solo, en el momento en que el succinato es agotado, hay un cambio en la pendiente en la curva de crecimiento. Lo anterior podría indicar que a partir del agotamiento de succinato el aspartato es utilizado como fuente

de carbono. En la última parte observamos que la utilización de L-aspartato y L-glutamato, como únicas fuentes de carbono, es posible si se usan inóculos crecidos en succinato, independientemente de la fase de crecimiento en la cual las células sean cosechadas, tanto para la fase exponencial o la estacionaria.

Es sabido que ciertas enzimas de los microorganismos son formadas solamente en presencia de su inductor correspondiente y se ha demostrado que los sistemas enzimáticos son controlados en las bacterias por determinantes genéticos específicos. En E. coli, Kahane, Marcus, Metzger y Halpern (9), realizaron trabajos donde se demostró que en la cepa nativa el sistema de transporte para glutamato se encuentra controlado por un operón. Además, el gene regulador gltR, es responsable de la producción de una proteína represora que impide al sistema expresarse. Por lo tanto, este sistema de transporte se encuentra reprimido en condiciones normales y se desconocen los metabolitos que sirven como reguladores fisiológicos (inductores) de este sistema.

Para que glutamato sea utilizado como fuente de carbono, además de la presencia de un sistema de permeación adecuado para que se introduzca a la célula, son necesarias las actividades de dos enzimas: la primera es la transaminasa glutá-

mico-oxaloacético (TGO) que es constitutiva y la segunda es la aspartasa, que es una enzima inducible. La TGO forma parte de las enzimas básicas de la célula y su producción es constante, independientemente del estado nutricional de la bacteria (Aguilar y Ortega, 14). En cambio, la aspartasa muestra su actividad sólo cuando se usan medios de cultivo con glutamato o hidrolizado ácido de caseína (Alvarez de la Cuadra, 1).

En este trabajo hemos demostrado que la cepa nativa de Salmonella typhimurium LT-2 utiliza L-aspartato (en mayor medida) y L-glutamato, como fuentes de carbono, cuando se añaden a los medios de cultivo extracto de levadura, citrato, acetato, propionato o succinato. En el caso de propionato el efecto no es tan marcado. Sin embargo, L-aspartato o L-glutamato son utilizados como únicas fuentes de carbono cuando las células han crecido en succinato.

Así puede pensarse que alguno de los compuestos que forman parte del ciclo de Krebs, o que su metabolismo está relacionado estrechamente con este ciclo, podrían actuar como inductores del sistema de utilización de glutamato y aspartato, ya que tanto éstos como sus productos de transaminación, alfa-cetoglutarato y oxaloacetato, por sí mismos no actúan como inductores.

CONCLUSIONES

Para que L-aspartato o L-glutamato puedan ser utilizados como fuentes de carbono sin mutación previa, fue necesario - agregar extracto de levadura. El extracto de levadura tiene una composición compleja y, por tanto, no fue posible separar definitivamente la fracción responsable de la utilización de los aminoácidos.

Succinato, citrato, acetato y propionato, que se encuentran presentes en concentraciones bajas en el extracto de levadura, ejercen el mismo efecto que el extracto de levadura en la utilización de glutamato y aspartato por la cepa parental.

Oxaleocetato y alfa-cetaglutarato no facilitan la utilización de L-aspartato y L-glutamato.

L-aspartato y L-glutamato, pero no D-aspartato, pueden ser utilizados como únicas fuentes de carbono cuando se usan - inóculos crecidos en succinato.

Succinato, citrato, acetato o algún compuesto relacionado, posiblemente podrían actuar como inductores del sistema y - en consecuencia, conducir a la síntesis de la permeasa y/o el sistema de utilización. De las gráficas de crecimiento

se puede observar que extracto de levadura, succinato, citrato o acetato, son utilizados en primer término y, probablemente, una vez que el sistema se encuentra inducido, sigue la utilización de los aminoácidos.

R E S U M E N

Tanto en E. coli como en Salmonella typhimurium, L-glutamato y L-aspartato no son utilizados como únicas fuentes de carbono y energía. En estudios anteriores efectuados en E. coli, fue encontrado un sistema de transporte exclusivo para L-glutamato formado al menos de tres componentes: gltR, gltC y gltS los cuales forman un sistema de operación donde gltS es el gene estructural para la permeasa, gltC es el operador y gltR es el regulador del sistema. En Salmonella typhimurium fue encontrado un sistema de transporte para glutamato similar al de E. coli y además un nuevo sitio genético, gltF, situado aproximadamente en el minuto 0 del cromosoma bacteriano.

Para el caso particular de glutamato, probablemente no es utilizado como única fuente de carbono debido a que su sistema de transporte específico se encuentra reprimido y han

sido mostradas evidencias donde por medio de mutaciones ocurridas ya sea en el operador, o en el regulador, provocan la derrepresión del sistema y en consecuencia la síntesis de la permeasa. En el caso de aspartato se han descrito dos sistemas de transporte principales. Sin embargo, no se conocen los mecanismos de su utilización como única fuente de carbono.

Una vez en el interior de la célula, el glutamato junto con el oxaloacetato, por la acción de la transaminasa glutámico-oxaloacético, forma alfa-cetoglutarato y aspartato. El aspartato a su vez, sufre una desaminación no oxidativa por medio de la aspartasa para dar lugar a la formación de fumarato y amonio.

En los estudios presentados en este trabajo, se encontró que la cepa parental de Salmonella typhimurium LT-2 utiliza L-aspartato y L-glutamato como fuentes de carbono, cuando se agrega extracto de levadura a los medios de cultivo, en forma similar a las cepas mutantes que los utilizan como únicas fuentes de carbono y energía. El mismo efecto fue provocado por otros compuestos que pertenecen al ciclo de Krebs como succinato, citrato y acetato, o que su metabolismo los conduce a dicho ciclo, como propionato.

L-aspartato y L-glutamato son utilizados como únicas fuentes de carbono y energía cuando se usan inóculos crecidos en medio mínimo-succinato. Por lo tanto, podría ser que aspartato y glutamato, tanto como sus productos de transaminación, oxaloacetato y alta-cetoglutarato, no son usados como fuentes de carbono debido a que no inducen el sistema de transporte o de utilización. Tal vez succinato, citrato o acetato, o algún compuesto relacionado, es el inductor del sistema de transporte o de utilización y, por tanto, no es requerido un tratamiento mutagénico previo para que se sintetice la permeasa correspondiente o se induzca el sistema de utilización.

BIBLIOGRAFIA

1. ALVAREZ DE LA CUADRA, J.
Estudio Bioquímico y Genético sobre Sistemas de Utilización y Transporte de L-glutamato como única fuente de carbono y energía en Salmonella typhimurium
Tesis de Maestría, Departamento de Bioquímica
C.I.E.A. (1979)
2. CLARKE, P.H.
The Evolution of Enzymes for the Utilization of Novel Substrates
Symp. Soc. Microbiology 24:183-217 (1974)
3. DAVIS, B.D., Mingioli, E.S.
Mutants of E. coli Requiring Methionine or Vitamin B₁₂
Journal of Bacteriology 60:17-28 (1950)
4. GUTNICK, B., CALVO, J.M., KLOPOTOWSKI, T., AMES, B.N.
Compounds Which Serve as the Sole Source of Carbon or Nitrogen for Salmonella typhimurium LT-2
Journal of Bacteriology 100:215-219 (1969)
5. HALPERN, Y. S., EVEN-SHOSHAN, A.
Properties of the Glutamate Transport System in E. coli
Journal of Bacteriology 93:1009-1016 (1967)
6. HALPERN, Y.S., LUPO, M.
Glutamate Transport in Wild Type and Mutant Strains of E. coli
Journal of Bacteriology 90:1288-1295 (1965)

7. HALPERN, Y.S., UMBARGER H.E.
Utilization of L-glutamic and 2-Oxoglutaric Acid as a
Sole Sources of Carbon by E. coli
J. Gen. Microbiology 26:175-183 (1961)
8. JOBE. A., BORUGEOIS, S.
Lac Represor Operator Interaction. VI The Natural
Inducer of the Lac Operon
J. Mol. Biol. 69:397-408 (1972)
9. KAHANE, S., MARCUS, M., METZER, E., HALPERN, Y.S.
Effect of Growth Conditions on Glutamate Transport in
the Wild-Type Strains and Glutamate-Utilizing Mutants
of E. coli
Journal of Bacteriology 125:762-769 (1976)
10. KAY, W.W.
Two Aspartate Transport Systems in E. coli
The Journal of Biological Chemistry 246:7373-7382
(1971)
11. KAY, W.W., KORNBERG, H.L.
The uptake of C4-dicarboxylic Acids by E. coli
Eur. J. Biochem 18:274-281 (1971)
12. MARCUR, M., HALPERN, Y.S.
The Metabolic Pathway of Glutamate in E. coli K-12
Biochemica Et Biophysica Acta 177:313-320 (1969 a
13. MARCUS, M., HALPERN, Y.S.
Genetic Analysis of the Glutamate Permease in E. coli
K-12
Journal of Bacteriology 97:1118-1128 (1969) b

14. ORTEGA, M.V., AGUILAR C.
Biochemical and Genetic Characterization of a Mutant of Salmonella typhimurium Defective in a Locus for Glutamate deshydrogenase Activity
Molec. Gen. Genet. 125:351-358 (1973)
15. PARADA, J.L., ORTEGA, M.V., CASTAÑEDA, G.C.
Biochemical and Genetic Characteristics of the C₄ Di-carboxylic Acids Transport System of Salmonella typhimurium
Arch. Microbiol 10-1-12 (1973)
16. RICKENBERG, H.V., COHEN, C.N., MONOD, J.
La Galactoside-Perméase d' E. coli
Ann. Inst. Pasteur 91:829-857 (1956)
17. RILEY, M., AND ANILIONIS, A.
Evolution of the Bacterial Genome
Ann. Rev. Microbiol 31:519-60 (1978)
18. SANDERSON, K.E., HARTMAN, P.E.
Linkage Map of Salmonella typhimurium. Edition V
Microbiological Reviews 42:471-519 (1978)
19. SCHELLENBERG, G.D., FURLONG, C.E.
Resolution of the Multiplicity of the Glutamate and Aspartate Transport Systems of E. coli
Journal of Biological Chemistry 252:9055-9064 (1977)
20. THEODORE, C.Y. LO.
The Molecular Mecanisms of Substrate Transport in Gram-Negative Bacteria
Canadian Journal of Biochemistry 57:289-301 (1979)