

03062
1ej. 8

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

"PAPEL DEL TRIPEPTIDO PRECURSOR DE
PENICILINA EN EL TRANSPORTE DE AMINO-
ACIDOS NEUTROS EN Penicillium chrysogenum"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

ROSA DEL CARMEN MATEOS MARCOS

1 9 8 3

**TESIS CON
FALLA EN EL ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Página
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	I
ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	4
GENERALIDADES.....	6
ANTECEDENTES.....	16
OBJETIVO.....	25
MATERIALES Y METODOS.....	26
RESULTADOS Y DISCUSION.....	47
CONCLUSIONES.....	78
BIBLIOGRAFIA.....	81

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
<u>FIGURA 1.</u> Estructura fundamental de la penicilina.....	7
<u>FIGURA 2.</u> Mecanismos de regulación en la biosíntesis ramificada de lisina y bencil penicilina en <u>Penicillium chrysogenum</u> ...	10
<u>FIGURA 3.</u> Cinética de crecimiento y producción de penicilina por <u>P. chrysogenum</u>	13
<u>FIGURA 4.</u> Efecto de diversas concentraciones de NH_4Cl en el metabolismo de <u>P. chrysogenum</u>	17
<u>FIGURA 5.</u> Efecto de diversas concentraciones de NH_4Cl en la formación de glutamina sintetasa en <u>P. chrysogenum</u>	19
<u>FIGURA 6.</u> Producción de antibiótico en sistemas de células en reposo con cicloheximida (RCC) con diferentes fuentes de nitrógeno.....	21
<u>FIGURA 7.</u> Modelo del posible papel central de la glutamina como precursor de grupos amino para la síntesis de penicilina.....	22
<u>FIGURA 8.</u> Efecto de diversas concentraciones de glutamina en la síntesis de penicilina	23
<u>FIGURA 9.</u> Diagrama de elaboración de cromatografías.....	34

<u>FIGURA 10.</u> Identificación de manchas con marcadores radioactivos.....	36
<u>FIGURA 11.</u> Identificación de manchas con marcadores por concentración.....	38
<u>FIGURA 12.</u> Cromatograma de γ -glutamil-glutamina.	39
<u>FIGURA 13.</u> Cromatograma de γ -glutamil-glutamina y glutamato.....	40
<u>FIGURA 14.</u> Cromatograma de γ -glutamil glutamina, glutamato y α -aminoadipato.....	41
<u>FIGURA 15.</u> Cromatograma de γ -glutamil-glutamina, glutamato, α -aminoadipato y glutamina.	42
<u>FIGURA 16.</u> Cromatograma de γ -glutamil-glutamina, glutamato, α -aminoadipato, glutamina y valina.....	43
<u>FIGURA 17.</u> Cromatograma de γ -glutamil-glutamina, glutamato, α -aminoadipato, glutamina, valina y glicina.....	44
<u>FIGURA 18.</u> Cromatograma de γ -glutamil-glutamina, glutamato, α -aminoadipato, glutamina, valina, glicina y cisteína.....	45
<u>FIGURA 19.</u> Cromatograma de γ -glutamil-glutamina, glutamato, α -aminoadipato, glutamina, valina, glicina, cisteína y glutati3n.	46
<u>FIGURA 20.</u> Irreversibilidad del efecto de glutamina por los amino3cidos precursores de penicilina.....	48

III

<u>FIGURA 21.</u> Transporte de los aminoácidos precursores de penicilina.....	50
<u>FIGURA 22.</u> Actividad de α -aminoadipil-cisteína sintetasa con diversos sustratos.....	52
<u>FIGURA 23.</u> Ciclo del γ -glutamil y el transporte de aminoácidos neutros.....	54
<u>FIGURA 24.</u> Síntesis de penicilina y efecto de glutamina.....	58
<u>FIGURA 25.</u> Participación de precursores de penicilina en el transporte de glutamina.....	63
<u>FIGURA 26.</u> Efecto de diversas concentraciones de glutatión en la síntesis de penicilina	65
<u>FIGURA 27.</u> Prevención del efecto de glutamina por glutatión.....	66
<u>FIGURA 28.</u> Efecto de diferentes concentraciones de glutatión en el transporte de glutamina.....	67
<u>FIGURA 29.</u> Cromatograma de un extracto micelar de cultivo en medio de producción con NH_4Cl 8.5 mM y transferido a sistema RCC con L-(U- ^{14}C)-glutamina 10mM.....	70
<u>FIGURA 30.</u> Cromatograma de un extracto micelar de cultivo en medio de producción con lisina 50 mM y transferido a sistema RCC con L-(U- ^{14}C)-glutamina 10 mM.....	71
<u>FIGURA 31.</u> Cromatograma de extracto micelar de	

IV

	sistema RCC con L-(U- ¹⁴ C)-glutamina 10 mM, 1 h. de incubación.....	74
<u>FIGURA 32.</u>	Cromatograma de extracto miceliar de sistema RCC con L-(U- ¹⁴ C)-glutamina 10 mM, 3 h. de incubación.....	75
<u>FIGURA 33.</u>	Cromatograma de extracto miceliar de sistema RCC con L-(U- ¹⁴ C)-glutamina 10 mM, 6 h. de incubación.....	76
<u>TABLA 1.</u>	Diversas penicilinas con diferentes sustituyentes en la cadena lateral....	8
<u>TABLA 2.</u>	Efecto de algunos aminoácidos en la producción de penicilina.....	60

ABREVIATURAS

6-APA	ácido 6-aminopenicilánico
cis	cisteína
val	valina
lis	lisina
α -aaa	ácido α -aminoadípico
α -aaa-cis	L- α -aminoadipil-L-cisteína
α -aaa-cis-val	L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina
α -aaa-6-APA	ácido α -aminoadipil-6-aminopenicilánico o isopenicilina N
M.Ab.	medio para cuantificar antibiótico
J.-J.10X	mezcla de sales de Jarvis-Johnson, diez veces más concentrada
M.P.	medio de producción con NH_4Cl 8.5 mM
M.P.-L.	medio de producción con lisina 50 mM
M.S.	medio de suspensión con sulfatos
S.S.10X	mezcla de sales sin sulfatos, diez veces más concentrada
M.S.S.S.	medio de suspensión sin sulfatos
D.D. ₅₄₀	densidad óptica a 540 nm
RC	sistema de células en reposo con sulfatos
RCSS	sistema de células en reposo sin sulfatos
RCC	sistema de células en reposo con sulfatos y 100 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida

VI

RCSSC	sistema de células en reposo sin sulfatos y 100 µg/ml de cicloheximida
TCA	ácido tricloroacético
Pi	fósforo inorgánico
cpm	cuentas por minuto
gsh	glutatión, γ -glutamyl-cisteinil-glicina
glu	ácido glutámico
gln	glutamina
α -ab	α -aminobutirato
gli	glicina
aa	aminoácido
γ -glu-gln	γ -glutamyl-glutamina
α -aaa-gln	α -aminoadipil-glutamina

R E S U M E N

Al estudiar el posible papel de glutamina como precursor de grupos amino para la síntesis de penicilina, se encontró un doble efecto del aminoácido en la producción del antibiótico, dependiendo de las concentraciones añadidas al medio de cultivo.

Empleando bajas concentraciones de glutamina (entre 0 y 1 mM) se estimuló la formación de penicilina, probablemente por ser el precursor de los grupos amino de dicho antibiótico.

Sin embargo, al emplear concentraciones del aminoácido entre 1 y 10 mM se inhibió la síntesis de penicilina; la elucidación de este fenómeno inhibitorio constituyó el objetivo del trabajo y en cuya realización se hicieron varios experimentos, con los resultados que se enuncian a continuación.

El efecto inhibitorio no se logró revertir con los aminoácidos precursores de la molécula del antibiótico (α -aminoadipato, cisteína y valina), por lo que el efecto de glutamina parece no ser sobre la síntesis de éstos.

La especificidad del efecto inhibitorio no es exclusiva de glutamina; se probaron otros aminoácidos, neutros, ácidos y básicos, de los cuales únicamente los neutros presentan un efecto similar al de glutamina en la síntesis de

penicilina.

La posibilidad de que glutamina inhibe la actividad de una de las enzimas del sistema de "sintetasas de penicilina", se pudo eliminar únicamente sobre la primera enzima de la vía, la α -aminoadipil-cisteína sintetasa, ya que de las otras actividades no se conocen las características necesarias para su estudio.

Esta primera actividad enzimática parece encontrarse íntimamente relacionada con la síntesis de glutatión, tri péptido estructuralmente similar al también tripéptido precursor de penicilina, el α -aminoadipil-cisteinil-valina (α -aaa-cis-val). Bajo tales consideraciones se planteó la similitud entre el ciclo del γ -glutamil propuesto por Meister y Tate (Ann. Rev. Biochem. 45:559-604, 1976) para la síntesis y utilización del glutatión y la secuencia de síntesis de penicilina.

Por otra parte se observó la prevención del efecto inhibitorio de glutamina con la preincubación de las células con glutatión. Además, el transporte celular de ^{14}C -glutamina se incrementó al aumentar la concentración de glutatión.

La participación de los péptidos precursores del antibiótico en el transporte de ^{14}C -glutamina al interior de la célula fue vislumbrada. Células crecidas en presencia de lisina (retroregulador de la síntesis de α -aminoadipato),

incapaces de formar antibiótico, ni sus precursores, presentaron menor transporte de ^{14}C -glutamina, que células crecidas en condiciones adecuadas para la síntesis de penicilina.

En esta forma se postuló la hipótesis con la cual se explica el efecto inhibitorio de glutamina en la síntesis de penicilina, por la canalización del tripéptido α -aaa-cis-val, en el transporte del aminoácido, en la misma forma que es utilizado el glutatión en sistemas de células en reposo limitadas de carbono y nitrógeno, características que tienen los sistemas empleados en este trabajo.

I N T R O D U C C I O N

Desde que en 1929 fue descubierta la acción antibiótica de una sustancia denominada penicilina, producida por una colonia de Penicillium notatum, se han tratado de encontrar otros microorganismos productores de sustancias similares a la penicilina. A pesar de que, los antibióticos, como otros metabolitos secundarios no tienen función aparente para el crecimiento del microorganismo que los produce, el gran valor terapéutico de la penicilina en el tratamiento de enfermedades infecciosas, incrementó su importancia y condujo a la búsqueda en gran escala de nuevos antibióticos y a incrementar la producción de los existentes (1).

Un factor que ha contribuido a mejorar la producción de penicilina ha sido la selección sucesiva de cepas mutantes hiperproductoras de Penicillium chrysogenum y que han sido seleccionadas empíricamente, tomando en cuenta exclusivamente su elevada capacidad biosintética de antibiótico. Actualmente se ha enfatizado el estudio para el conocimiento más profundo de la estructura y ruta biosintética, con procedimientos que han servido de modelo para el desarrollo de otros antibióticos (2,3,4).

Son varios los grupos de trabajo que están haciendo estudios en los diversos mecanismos y factores que regulan la producción de penicilina. Entre los esfuerzos que se

realizan para el esclarecimiento de la regulación nitrogenada en la biosíntesis del antibiótico en Penicillium chrysogenum por nuestro grupo, este trabajo tiene como objetivo profundizar en el papel que juega glutamina en este mecanismo de control.

GENERALIDADES

ESTRUCTURA

Desde 1945 se determinó la estructura química de la penicilina por estudios cristalográficos y se demostró que se compone básicamente por un anillo bicíclico, tiazolidin- β -lactámico (ácido 6-amino-penicilánico o 6-APA) producto de la condensación de los aminoácidos cisteína (cys) y valina (val), en sus configuraciones L y D respectivamente. Además consta de una cadena lateral acílica, unida al resto de la molécula por un enlace amídico; los ácidos que pueden servir como precursores de esta cadena son diversos, con lo cual se obtienen penicilinas con diferentes características (Figura 1, Tabla 1) (3,5).

BIOSINTESIS

Las observaciones de Bonner en 1947 del hecho de que ciertos auxótrofos de lisina (lis) de P. chrysogenum producían más penicilina, sugirieron que la ruta biosintética del antibiótico y de lisina eran comunes o al menos tenían un precursor común (6).

En 1957 Demain et al. observaron que, en cultivos de P. chrysogenum crecidos en un medio mínimo suplementado

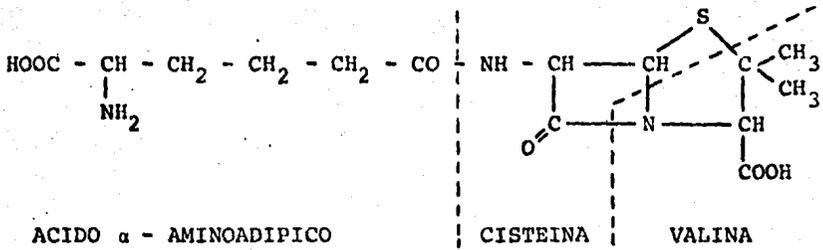


FIGURA 1. ESTRUCTURA FUNDAMENTAL DE LA PENICILINA (3).

ACIDO DE LA CADENA LATERAL	NOMBRE DE LA PENICILINA	
	QUIMICO	TRIVIAL
α -AMINOADIPICO	ISOPENICILINA	N
FENILACETICO	BENCILPENICILINA	G
β - λ -HEXENOICO	Δ^2 -PENTENILPENICILINA	F
HEXANOICO	n-AMILPENICILINA	DIHIDRO F
OCTANOICO	n-HEPTILPENICILINA	K
p-HIDROXIFENILACETICO	p-HIDROXIBENCILPENICILINA	X
FENOXLACETICO	FENOXIMETILPENICILINA	V

TABLA 1. Diversas penicilinas con diferentes sustituyentes en la cadena lateral (5).

con lisina se deprimía la síntesis de penicilina, este efecto es debido a la inhibición por retroalimentación de la enzima homocitrato sintetasa, afectando la formación del ácido α -aminoadípico (α -aaa) (7,8,9).

Posteriormente se demostró que el α -aminoadipato no solamente revierte la inhibición producida por lisina, sino que estimula la síntesis de penicilina en ausencia de ésta. Ahora ya está perfectamente demostrado que el α -aminoadipato es un precursor común a lisina y penicilina (10, 11).

Estos primeros estudios dieron lugar al establecimiento de la ruta biosintética de la penicilina, la cual tiene origen en el ácido α -aminoadípico, que en el primer paso biosintético se condensa con la cisteína, por acción de la enzima α -aminoadipil-cisteína sintetasa, formando el dipéptido L- α -aminoadipil-cisteína (α -aaa-cis) (Figura 2) (12).

El siguiente paso es la formación del tripéptido L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (α -aaa-cis-val), resultado de la actividad catalítica de la tripéptido sintetasa.

El isómero L de valina sufre la isomerización al unirse al dipéptido y no antes; esta unión es específica, ya que no se puede obtener α -aaa-cis-val empleando isómeros D o DL de valina (13,14,15,16).

Una vez formado el tripéptido α -aaa-cis-val, ocu

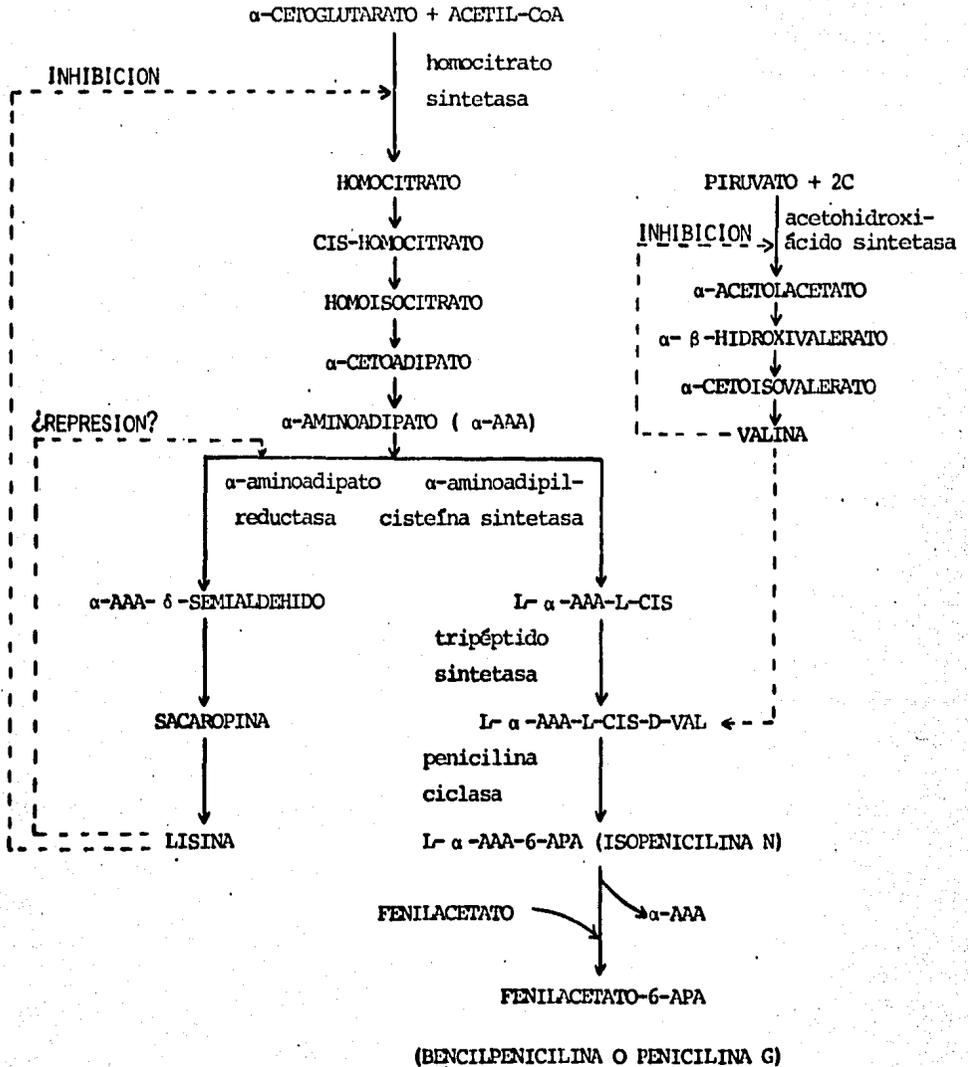


FIGURA 2. Mecanismos de regulación en la biosíntesis ramificada de lisina y bencilpenicilina en *P. chrysogenum* (5).

re la ciclización de los residuos correspondientes a cisteína y valina, para formar el anillo tiazolidín- β -lactámico, a través de un intermediario β -lactámico monocíclico; esta transformación se debe a la penicilina ciclasa. En esta forma se obtiene otro de los intermediarios de penicilina, la isopenicilina N, que no es otra cosa que un tipo de penicilina, cuya cadena lateral es el ácido α -aminoadípico y que se denomina también ácido α -aaa-6-APA (16, 17, 18, 19). El paso final en la biosíntesis de las penicilinas es el intercambio de la cadena acílica y que por la acción de una acil transferasa se pueden producir diversas penicilinas, como sería el caso de la bencil penicilina o penicilina G que se produce al intercambiar el α -aminoadipato por el ácido fenilacético (14, 20, 21, 22, 23, 24).

La secuencia de síntesis de penicilina se ha podido establecer por complementación entre diferentes cepas mutantes de microorganismos productores de este antibiótico como son Penicillium chrysogenum, Cephalosporium acremonium y Streptomyces clavuligerus. Algunas mutantes incapaces de sintetizar isopenicilina N, tampoco formaban α -aaa-cis-val; otras, a pesar de no sintetizar isopenicilina N, acumulaban el tripéptido. También el empleo de mutantes auxótrofas de lisina ha sido de gran ayuda en el esclarecimiento de la vía; la no producción de antibiótico de algunas de estas mutantes ha sido contrarrestada por adición de DL- α -aminoadi

pato o de tripéptido al medio de cultivo (25,26,27,28,29).

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PENICILINA

Las diferentes rutas metabólicas en los microorganismos están rigurosamente controladas y esto suele suceder modulando la síntesis de actividad enzimática. Por ser la penicilina un metabolito secundario, sintetizado en la fase tardía del crecimiento microbiano (Figura 3), son muchos los factores y mecanismos que regulan su producción y algunos empiezan a esclarecerse.

a) REGULACION POR LA FUENTE DE CARBONO

Jarvis y Johnson, han indicado que la glucosa es la mejor fuente de carbono para el crecimiento de P. chrysogenum, pero no para la producción de penicilina, para tal efecto la fuente preferencial es lactosa (31).

El mecanismo por el cual glucosa afecta la formación de penicilina no ha sido establecido, sin embargo, se sabe que es algún producto de su metabolismo y no la glucosa misma, el que ejerce el efecto, porque análogos no metabolizables de glucosa no son capaces de inhibir la síntesis del antibiótico. Por otra parte, Revilla y colaboradores han observado que otros azúcares, como polímeros de glucosa, provocan el mismo efecto y éste no es revertido por la adición de AMP cíclico, como ocurriría en la síntesis de enzimas ca

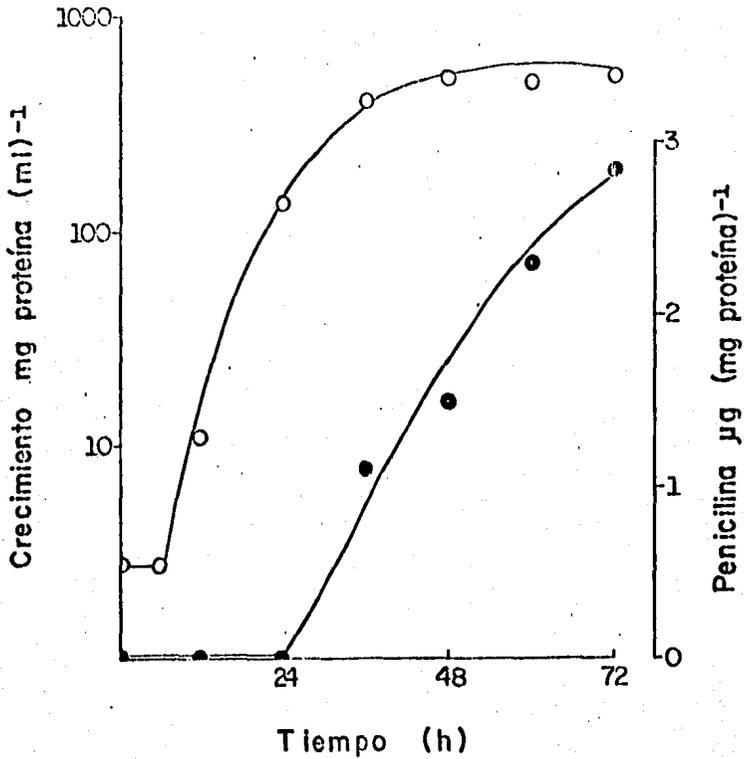


FIGURA 3. Cinética de crecimiento (○) y producción de penicilina (●) por Penicillium chrysogenum (30).

tabólicas (32).

b) REGULACION POR PRODUCTO FINAL

Se ha comprobado que la biosíntesis de penicilina está regulada por el producto final; es decir, que cuando la concentración de antibiótico llega a cierto límite, éste de tiene su propia síntesis. La concentración de producto que ejerce el efecto varía de acuerdo con la capacidad biosintética de las cepas, con lo cual se explica la mayor resistencia de los microorganismos hiperproductores a este mecanismo. Se desconoce la forma y nivel en que actúa la penicilina como agente regulador; no obstante, la enzima tripéptido sintetasa ha sido propuesta como el sitio clave de la regulación (33,34).

c) REGULACION POR METABOLITOS PRIMARIOS

Aunque ya se mencionó, cabe recalcar que otro de los efectores de la retroregulación es lisina que, como producto final de la otra ramificación de la vía biosintética, controla indirectamente la formación de penicilina por inhibición de la enzima homocitrato sintetasa y posiblemente también reprime a la enzima α -aminoadipato reductasa (Figura 2) (8,9,34).

Algunos metabolitos primarios pueden ser precursores de antibióticos y la regulación a la cual se encuentre sometida su síntesis puede afectar consecuentemente la for-

mación del metabolito secundario. En este caso valina parece inhibir por retroalimentación la primera enzima de su biosíntesis, la acetohidroxiácido sintetasa. Se ha encontrado que en cepas hiperproductoras esta enzima es menos sensible a valina que la misma enzima de cepas de baja producción de penicilina, sin embargo, este fenómeno puede ser circunstancial y no tener relación alguna (Figura 2) (5,35).

ANTECEDENTES

La penicilina es considerada un antibiótico peptídico ya que su molécula es el resultado de la condensación de tres aminoácidos, α -aminoadipato, cisteína y valina, por lo que es lógico pensar que su biosíntesis está sujeta a otro mecanismo, también importante como es la regulación por la fuente de nitrógeno.

En otros metabolitos secundarios y en especial ciertos antibióticos, como es la cefalosporina y cuya estructura es muy similar a la de penicilina, la regulación nitrogenada tiene gran importancia; esto ha sido reportado por Aharonowitz y Demain en sus estudios sobre la producción de cefalosporina en S. clavuligerus (36).

Sánchez y colaboradores encontraron cambios importantes, sobre todo en la concentración intracelular de glutamato y glutamina, durante la fase de producción del antibiótico, por P. chrysogenum, en diferentes condiciones de cultivo sugiriendo alguna interrelación entre la presencia de los dos aminoácidos y la formación de penicilina (Figura 4) (30).

Recientemente estos mismos autores han reportado que el glutamato añadido al medio de cultivo (10.0 mM) es capaz de estimular la síntesis de penicilina. Este efecto no es por disponibilidad de aminoácidos precursores, ya que análogos no metabolizables del glutamato provocan un efecto similar y

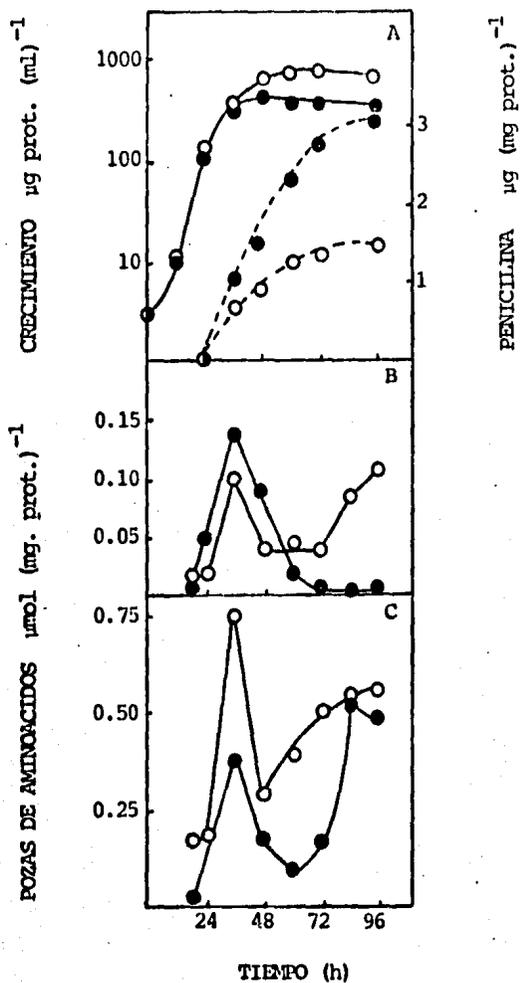


FIGURA 4. Efecto de bajas (●) y altas (○) concentraciones de NH_4Cl en : A, crecimiento (—) y producción de antibiótico (---); B, poza de glutamina; C, poza de glutamato (30).

han establecido que el papel del glutámico es como inductor de la primera enzima de la biosíntesis de penicilina, la α -aminoadipil-cisteína sintetasa (12).

Otro efecto que han estudiado es el que tiene el NH_4Cl en la producción de antibiótico, encontrando una relación inversamente proporcional entre la concentración de amonio en el medio de cultivo y la formación del metabolito secundario, sin alterar en gran medida los valores de crecimiento y manteniendo constante el pH. Se ha podido determinar que este efecto probablemente represivo, es en la enzima glutamina sintetasa, responsable de la síntesis de glutamina y como el aminoácido pudiera ser el donador de los grupos amino para la formación del antibiótico, en esta forma el amonio limitaría la síntesis del mismo (Figuras 4 y 5) (30).

También han encontrado que la poza intracelular de glutamina en baja concentración de NH_4Cl (8.5 mM) es superior a la que se encuentra cuando la concentración de NH_4Cl es elevada (85.0 mM); este comportamiento no lo tiene la poza de glutamato. Por otra parte, la producción de penicilina está aunada a la disminución paulatina de la cantidad de glutamina acumulada intracelularmente (Figura 4) (30).

Además, en un sistema de células en reposo con glutamina 0.5 mM como suplemento, hubo una estimulación en la producción de antibiótico, comparada con las que se obtuvieron en iguales sistemas suplementados con glutamato y NH_4Cl .

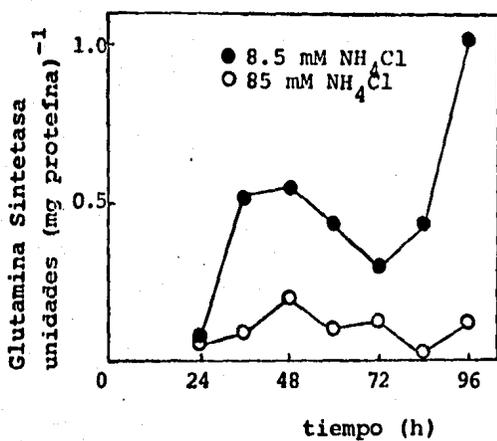


FIGURA 5. Efecto de bajas (●) y altas (○) concentraciones de amonio en la formación de glutamina sintetasa (30).

en igual concentración (Figura 6) (30).

Aunado a lo anterior se ha encontrado en Penicillium chrysogenum la actividad de una enzima glutamina transamidasa, la cual produce α -cetoglutaramato y determinados aminoácidos, a partir de glutamina y los respectivos α -cetoácidos, dando a glutamina un importante papel como donador de grupos amino. (37).

Basándose en las últimas observaciones, ha sido propuesta la participación de glutamina como fuente donadora de grupos amino para la síntesis de los aminoácidos precursores de la molécula de penicilina, α -aminoadipato, cisteína y valina (Figura 7) (30,38).

Considerando los reportes de Sánchez y colaboradores (30,38), se estudió el efecto de diversas concentraciones de glutamina (entre 0 y 10.0 mM) en la formación de penicilina en sistemas de células en reposo de P. chrysogenum adicionados de cicloheximida (RCC), con lo cual se inhibió la síntesis de proteínas. Como resultados se obtuvieron dos efectos (Figura 8) (39) :

a) utilizando bajas concentraciones de glutamina, hasta 1.0 mM, la síntesis de antibiótico se incrementó en un 50 %, sin observarse variaciones de pH.

b) a medida que aumentó la concentración de glutamina en el medio se presentó un efecto inhibitorio en la formación de penicilina, hasta llegar a una producción nula con

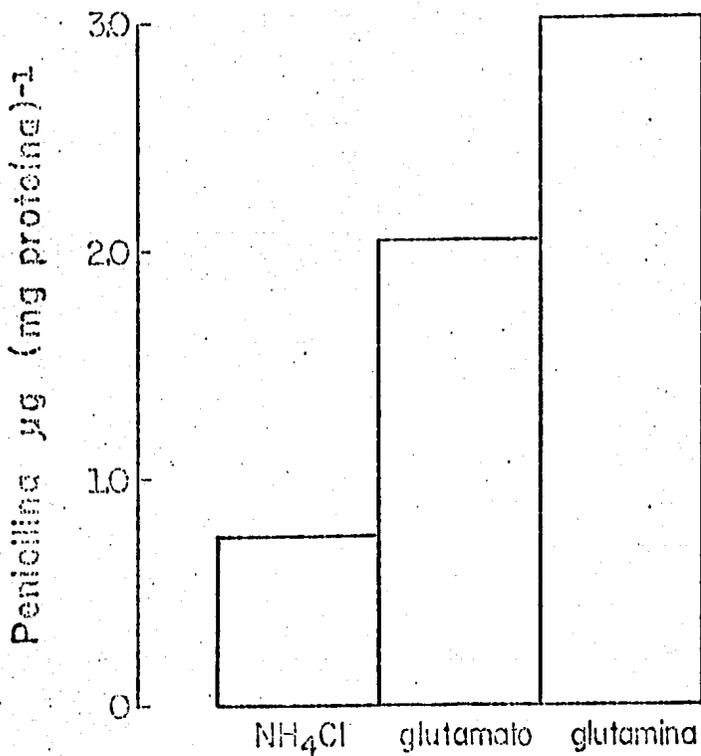


FIGURA 6.—SINTESIS DE PENICILINA A LAS 36 H EN SISTEMAS DE CELULAS EN REPOSO, SUPLEMENTADOS CON 0.5 mM DE NH_4Cl , GLUTAMATO O GLUTAMINA (30)

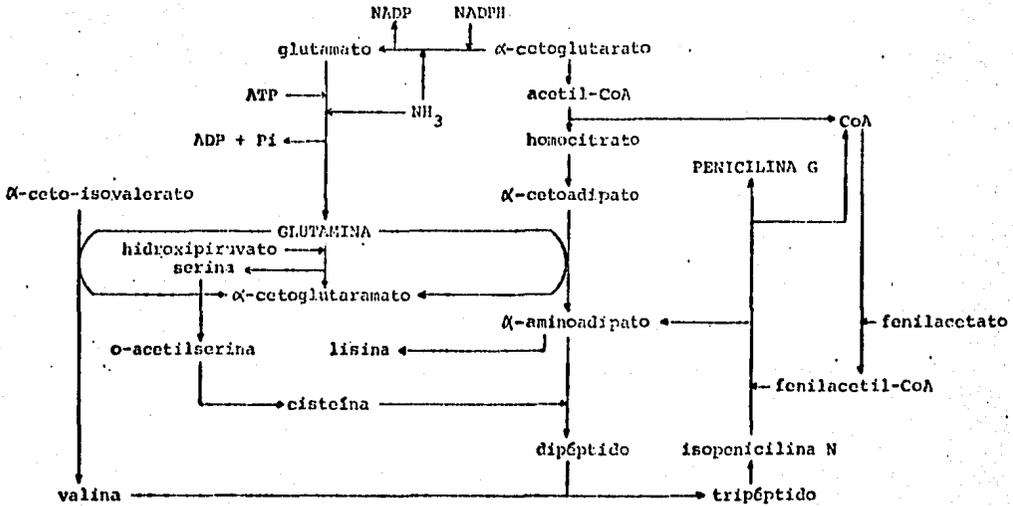


FIGURA 7. Modelo del posible papel central de la glutamina como precursor de grupos amino para la síntesis de penicilina (38).

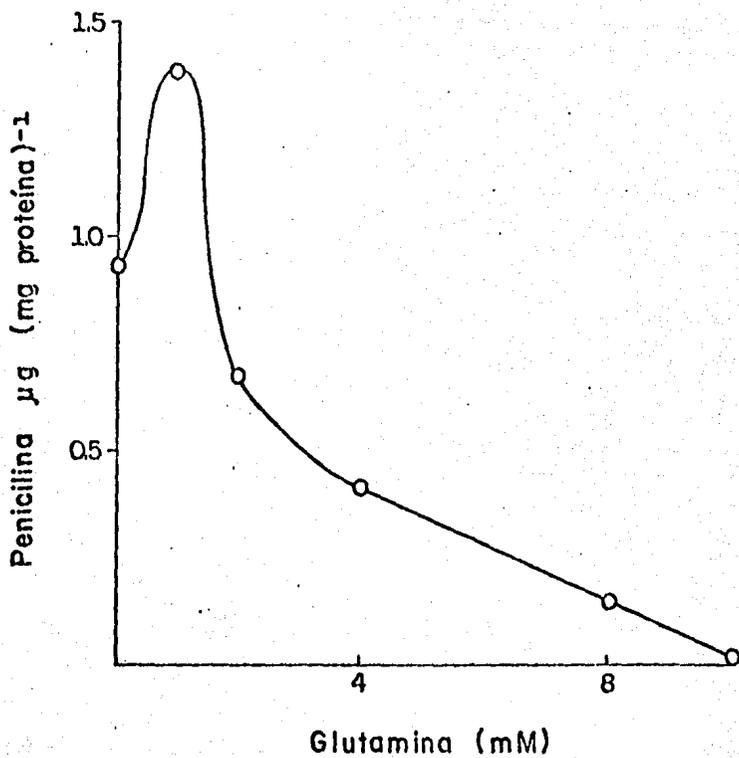


FIGURA 8. Efecto de diversas concentraciones de glutamina en la formación de penicilina en sistemas de RCC después de 12 horas de incubación.

10.0 mM del aminoácido; los valores de pH se mantuvieron constantes.

La explicación para el resultado con bajas concentraciones de glutamina (a) ya está planteada; se incrementa la disponibilidad de grupos amino precursores de penicilina en un sistema limitado en la síntesis de proteínas y se favorece la formación del antibiótico (Figura 7) (30,37,38).

Sin embargo, el efecto negativo de glutamina en la síntesis de penicilina (b) no se pudo explicar.

Cabe mencionar que la tendencia del efecto de diversas concentraciones de glutamina mostrado en la figura 8 corresponde a los resultados obtenidos a las 12 h. de incubación, no obstante, la tendencia es la misma a las 24 y 36 h. de incubación, datos no mostrados por simplificación.

O B J E T I V O

Al obtener una inhibición en la producción de penicilina, utilizando concentraciones de glutamina entre 1.0 y 10.0 mM en sistemas de células en reposo de Penicillium chrysogenum en presencia de cicloheximida y siendo este resultado inesperado según lo supuesto por Sánchez y colaboradores (30,38), el objetivo principal de este trabajo ha sido esclarecer este efecto inhibitorio en la biosíntesis de penicilina.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

MATERIAL BIOLÓGICO

Como microorganismo productor de penicilina se empleó Penicillium chrysogenum NRRL-1951 y en la cuantificación del antibiótico Sarcina lutea NRRL-B-1018, ambas cepas proporcionadas por el Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Ill., U.S.A.

REACTIVOS QUÍMICOS

Los aminoácidos y péptidos empleados fueron de Sigma Chemical Co. y Merck, S.A.; las soluciones radioactivas de New England Nuclear Co. y los demás reactivos de J.T. Baker, S.A.

MEDIOS DE CONSERVACION

Para P. chrysogenum se utilizaron placas con el medio cuya composición por litro es la siguiente: peptona 10.0 g, dextrosa 20.0 g, extracto de levadura 1.0 g, agar 15.0 g.

La cepa de S. lutea se conservó en placas de medio completo con 3.0 g/l de extracto de levadura, 5.0 g/l

de peptona, 8.0 g/l de NaCl, 0.1 g/l de $MgSO_4$, 5.0 g/l de dextrosa y 15.0 g/l de agar.

MEDIO PARA CUANTIFICAR ANTIBIOTICO (M.Ab.)

La composición del medio utilizado en la cuantificación de penicilina es la siguiente: peptona 6.0 g/l, extracto de levadura 3.0 g/l, extracto de carne 1.0 g/l y agar 15.0 g/l.

MEZCLA DE SALES DE JARVIS Y JOHNSON 10X (J.-J.10X)

La preparación de la mezcla de sales utilizada en los diversos medios de cultivo fue de acuerdo a la reportada por Jarvis y Johnson (31), pero diez veces más concentrada (10X).

MEDIO DE PRODUCCION (M.P.)

Este medio contiene: mezcla de sales J.-J.10X 100 ml/l, ácido fenilacético 0.5 g/l, acetato de sodio 3.2 g/l, cloruro de amonio NH_4Cl 0.45 g/l, lactosa* 30.0 g/l, glucosa* 10.0 g/l. El pH se debe ajustar a un valor de 6.8 - 6.9 con NaOH 10N.

NH_4Cl en un caso sustituido por lisina 7.31 g/l (M.P.-L.)

* esterilizadas por separado

MEDIO DE SUSPENSION (M.S.)

Preparado con 160.0 ml/l de mezcla de sales J.-J. 10X, 320.0 ml/l de solución amortiguadora de fosfatos 1M, pH 7.0, 0.5 g/l de ácido fenilacético y 30.0 g/l de lactosa (esterilizada por separado).

MEZCLA DE SALES SIN SULFATOS 10X (S.S.10X)

Contiene los mismos elementos traza que la mezcla de sales J.-J.10X, pero las sales utilizadas en lugar de ser sulfatos fueron cloruros, quedando la composición por litro de la siguiente manera: 30.0 g de KH_2PO_4 , 1.96 g de MgCl_2 , 0.818 g de FeCl_2 , 0.029 g de CuCl_2 , 1.688 g de ZnCl_2 , 4.11 g de NaCl , 0.16 g de MnCl_2 y 0.5 g de CaCl_2 .

MEDIO DE SUSPENSION SIN SULFATOS (M.S.S.S.)

La composición es la misma que el M.S. antes mencionado, pero empleando la mezcla de sales S.S.10X en lugar de la J.-J.10X.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C , durante 20 minutos; las soluciones de aminoácidos, péptidos y cicloheximida fueron esterilizadas por filtración a través de membranas Millipore tipo HA 0025

con diámetro de poro 0.45- μ m.

LIQUIDO DE CENTELLEO

Se utilizó el reactivo reportado por Bray (40).

CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE PENICILINA

El hongo P. chrysogenum fue cultivado en matraces Fernbach con 500 ml de M.P., empleando como inóculo 10 ml de una suspensión de esporas en agua bidestilada estéril, con densidad óptica a 540 nm (D.O.₅₄₀) de 1.5. La incubación fue a 29°C en agitación rotatoria a 150 rpm, durante 36 h ya que a este tiempo ya están formadas las "sintetasas de penicilina" y hay producción de antibiótico.

SISTEMAS DE CELULAS EN REPOSO (RC Y RCSS)

El micelio presente en 50 ml de cultivo de P. chrysogenum crecido durante 36 h (aproximadamente 250 μ g/ml), se colectó por filtración en sistema Millipore con filtro de papel Whatman-31 en condiciones estériles se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de M.S. (RC) o 25 ml de M.S.S.S. (RCSS) y la fuente de nitrógeno deseada. En cada uno de estos sistemas se incluyó la variable de la

adición de 100 μ g/ml de cicloheximida. Constituyendo los sistemas de células en reposo con cicloheximida, con sulfatos (RCC) o sin ellos (RCSSC), dependiendo del medio de suspensión empleado. Todos se mantuvieron a 29°C en agitación rotatoria a 150 rpm; el tiempo de incubación fue variable, tomándose muestras en períodos intermedios.

La utilización de estos sistemas permite medir in directamente la actividad enzimática de las "sintetasas de penicilina" ya formadas, por la producción del antibiótico y apreciar el efecto directo de diferentes sustancias y con centraciones de éstas en el sistema enzimático, sin que se afecten los resultados por cambios en la concentración de las enzimas debidas al efecto específico de la cicloheximida en la síntesis de proteínas (41).

TRANSPORTE DE AMINOACIDOS

Se emplearon sistemas de RC y RCC, manteniendo la agitación a 150 rpm a 29°C, una vez uniformizados los sistemas, aproximadamente 1 min. después de la transferencia del micelio, se añadió 1 ml de la solución del aminoácido radioactivo correspondiente (especificados en la sección de resultados), tras lo cual se tomaron muestras de 1 ml a diferentes tiempos; la correspondiente al tiempo 0 se tomó inmediatamente después de haber hecho la adición de la solución ra

radioactiva.

Cada muestra se filtró con vacío a través de membrana Millipore tipo HA 0025 de 0.45 μ m de diámetro de poro y se lavaron inmediatamente con agua bidestilada, tras lo cual se dejaron secar con el vacío, para entonces pasar las membranas y micelio retenido en ellas a viales y posteriormente hacer la cuantificación de radioactividad incorporada en cada muestra.

CUANTIFICACION DEL CRECIMIENTO

Esta se llevó a cabo midiendo la proteína micelar formada en las diferentes condiciones experimentales, mediante los siguientes pasos .

Se separó el micelio de 1 ml de cultivo por filtración y se lavó con agua bidestilada. Se resuspendió en 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % y se fragmentó durante 5 min. en un homogenizador mecánico Tri-R-Instruments, modelo K45 a la velocidad II.

Se agregó 1 ml más de TCA al 5 %, se centrifugó 15 min. a 6,000 rpm. El sedimento se resuspendió en 1 ml de NaOH 0.4 N, del cual se tomaron alícuotas de 200 μ l y se aforaron a 1 ml con agua bidestilada para cuantificar la proteína según el método de Lowry (42), utilizando como patrón una solución de albúmina sérica bovina.

CUANTIFICACION DE ANTIBIOTICO

En las muestras obtenidas a los diferentes tiempos se determinó la cantidad de penicilina, siguiendo el método de difusión en agar con S. lutea como microorganismo de prueba y utilizando diferentes concentraciones (0.1 a 1.0 $\mu\text{g/ml}$) de bencil penicilina para elaborar la curva patrón (43,44).

ACTIVIDAD DE δ (L- α -AMINOADIPIL)-L-CISTEINA SINTETASA

La medición de esta actividad enzimática fue realizada por la cuantificación de fósforo inorgánico (Pi) formado, según los reportes de Lara (12) y Tausky (45).

EXTRACTO ETANOLICO

El micelio de la condición deseada se colectó por filtración a través de membranas Millipore tipo HA 0025 de 0.45 μm de diámetro de poro, se lavó con agua bidestilada, se resuspendió en etanol al 80 % volúmen a volúmen y se fragmentó en un homogenizador mecánico Tris-R-Instruments, modelo K45, a la velocidad II.

El homogenizado se hirvió durante 10 min. a baño María y se filtró a través de membrana Millipore tipo HA 0025 de 0.45 μm de diámetro de poro. El filtrado se liofilizó y posteriormente se resuspendió en la décima parte del

volúmen original de la muestra, empleando agua bidestilada para ser utilizado en las cromatografías.

CROMATOGRAFIAS

Se aplicaron 100 μ l de cada extracto etanólico en cromatoplasas de sílica gel Merck 60-F254, de 0.25 mm de espesor, de 20 X 20 cm.

Las muestras se eluyeron en forma bidimensional, utilizando como primer sistema de solventes propanol: NH_4OH (85:37) y como segundo fenol: agua (80:20) (Figura 9) (46).

El revelado de los cromatogramas se hizo con una solución de ninhidrina al 0.2 % en acetona.

Cuando fue necesario conocer la radioactividad de las manchas, éstas fueron raspadas de la placa y la sílica de cada una se colocó en un vial para posteriormente hacer la cuantificación.

CUANTIFICACION DE RADIOACTIVIDAD

A cada muestra obtenida en un vial se agregaron 10 ml de líquido de centelleo. Los viales fueron introducidos en un contador de centelleo (Nuclear Chicago), con el cual se obtuvieron las cuentas por min. (cpm) de cada muestra.

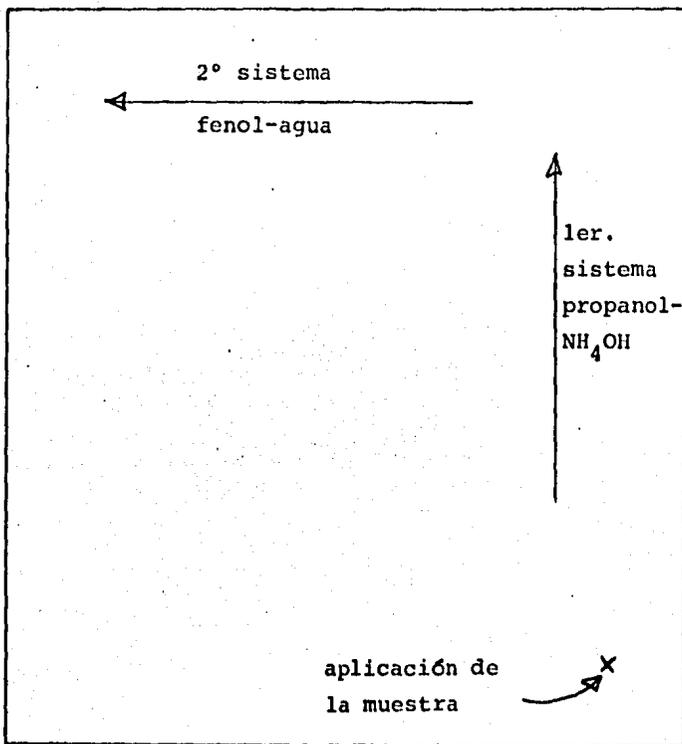


FIGURA 9. Diagrama de elaboración de cromatografías.

CONTROLES CROMATOGRÁFICOS RADIOACTIVOS

Para lograr ubicar en las cromatografías a los diferentes aminoácidos y péptidos se emplearon algunos marcadores radioactivos, para ello se añadieron directamente a cada placa 5 μ l de cada una de las soluciones de la sustancia radioactiva determinada, en el momento de correr las cromatografías del extracto etanólico del micelio de un sistema de RCC sin fuente de nitrógeno.

En esta forma se eliminó la dispersión de marca que hubiese aparecido al ser añadidas al sistema "in vivo" y ser metabolizadas. No fue necesario conocer la radioactividad específica añadida en cada caso, ya que la identificación fue cualitativa.

En la figura 10 se muestra la localización por este método, de las manchas correspondientes a valina, glutatión, cisteína, glutamato y glutamina.

CONTROLES CROMATOGRÁFICOS POR CONCENTRACION

De igual manera que en el punto anterior, se localizaron las manchas correspondientes a glicina y α -amino-adipato, pero en esta ocasión las soluciones añadidas a las placas no eran radioactivas, únicamente se trató de incrementar la concentración de cada uno de estos aminoácidos en el extracto

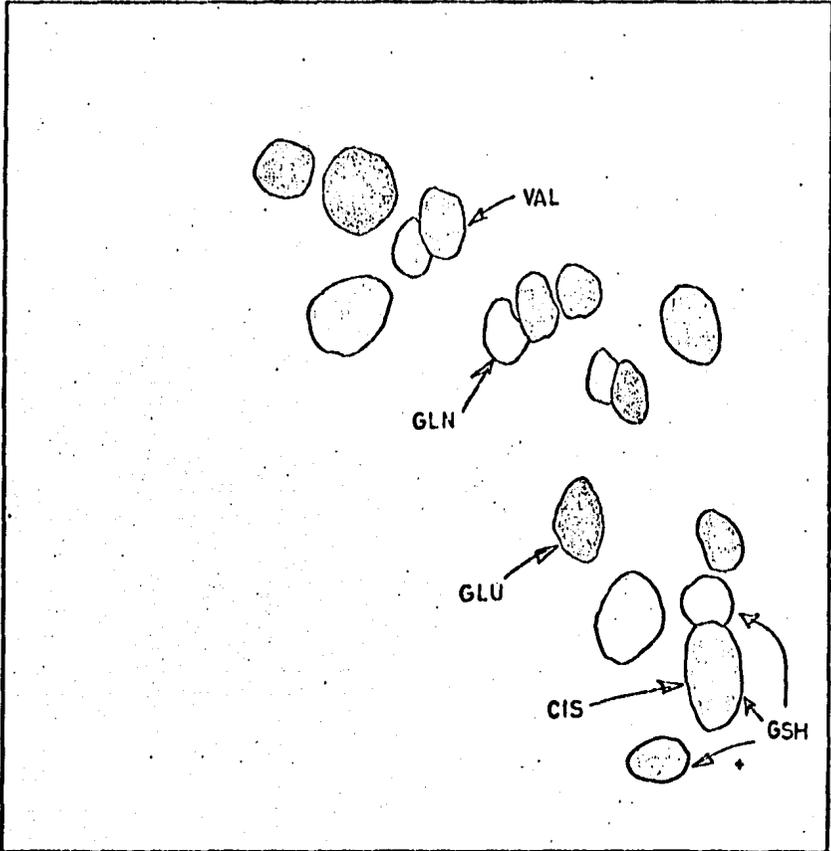


FIGURA 10. Identificación de manchas con marcadores radioactivos, por aplicación en cromatoplacas, combinaciones del extracto etanólico del micelio de un sistema de RCC control (sin fuente de nitrógeno), con diversas soluciones de aminoácidos radioactivos.

x punto de aplicación de las muestras

etanólico de un sistema de RCC control (Figura 11).

Tratando de reforzar los datos obtenidos con los métodos anteriores, se hicieron cromatografías de soluciones 1 mM de cada uno de los aminoácidos y péptidos puros, llevando una secuencia de adición de muestra y aparición de manchas (reveladas con ninhidrina). En estos casos no se aplicaron extractos miceliarés y el diagrama de aplicación fue el siguiente :

FIGURA NO.	SOLUCION NO.	CARCTERISTICAS DE LA MUESTRA
12	1	5 μ l solución γ -glu-gln
13	2	5 μ l solución 1 + 5 μ l glu
14	3	5 μ l solución 2 + 5 μ l α -aaa
15	4	5 μ l solución 3 + 5 μ l gln
16	5	5 μ l solución 4 + 5 μ l val
17	6	5 μ l solución 5 + 5 μ l gli
18	7	5 μ l solución 6 + 5 μ l cis
19	8	5 μ l solución 7 + 5 μ l gsh

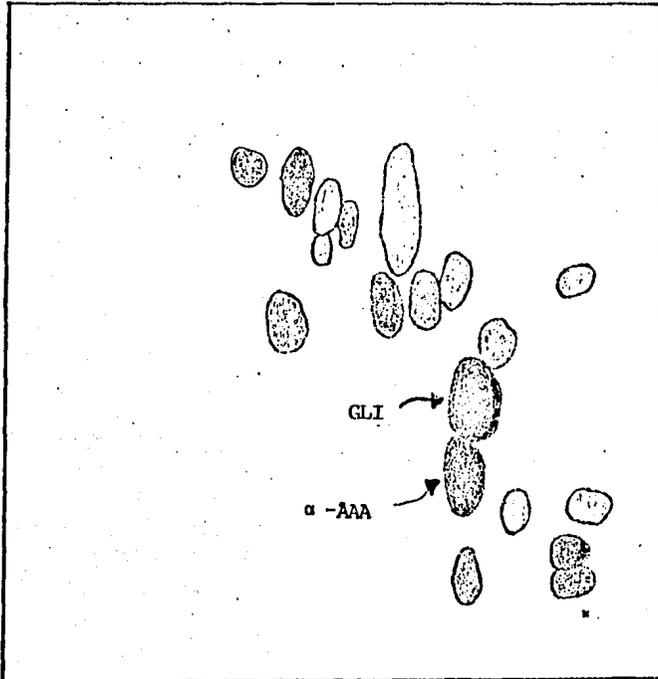


FIGURA 11. Identificación de manchas en las cromatografías del extracto etanólico del micelio de un sistema de RCC control (sin fuente de nitrógeno), por incremento en la concentración o sea, por aumento de la intensidad del color, en la mancha correspondiente al aminoácido añadido.
x punto de aplicación de las muestras

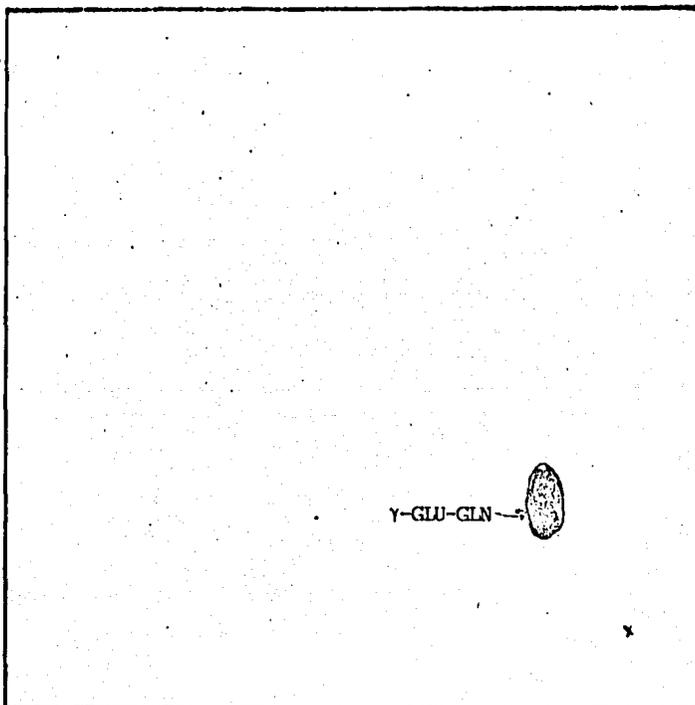


FIGURA 12. Cromatograma de γ -glutamyl-glutamina
(γ -glu-gln).

x punto de aplicación de la muestra

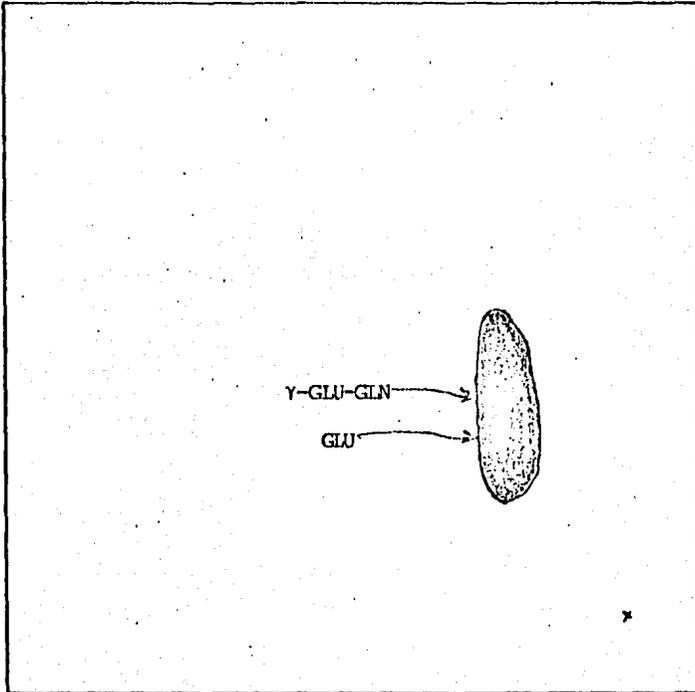


FIGURA 13. Cromatograma de γ -glu-gln y glutamato (glu).

x punto de aplicación de las muestras

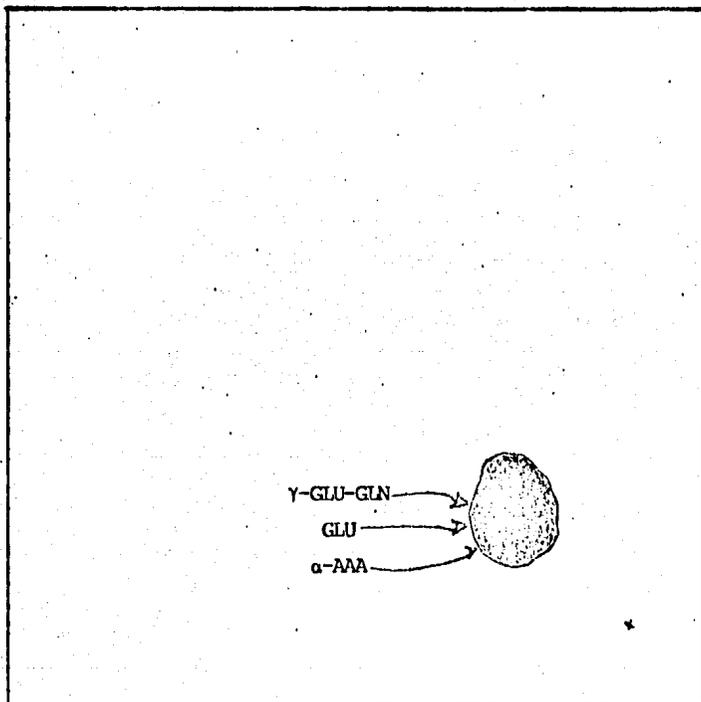


FIGURA 14. Cromatograma de γ -glu-gln, glu y α -aminoadipato (α -aaa).

x punto de aplicación de las muestras

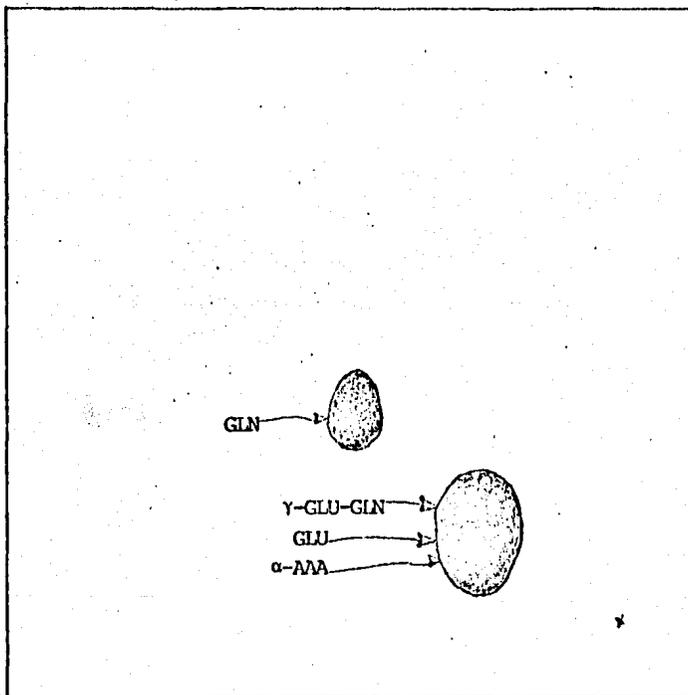


FIGURA 15. Cromatograma de γ -glu-gln, glu, α -aaa y glutamina (gln).
x punto de aplicación de las muestras

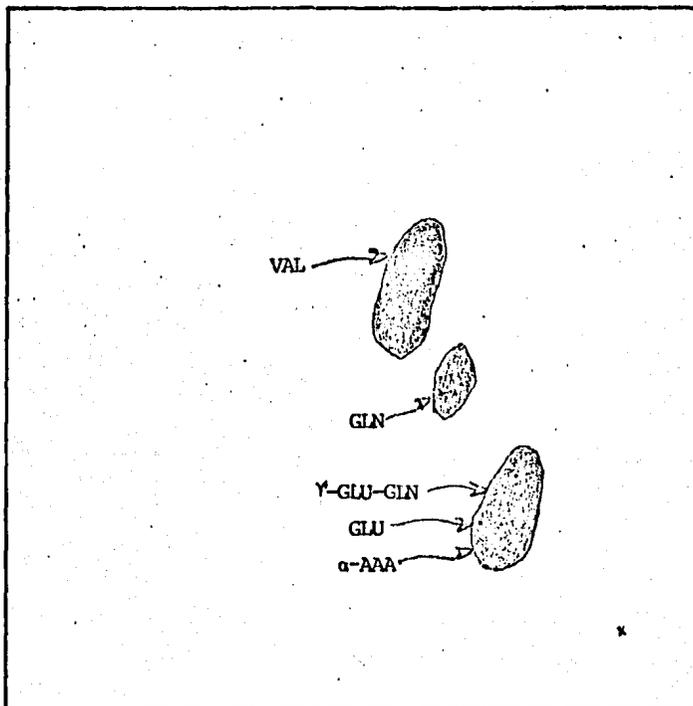


FIGURA 16. Cromatograma de γ -glu-gln, glu, α -aaa, gln y valina (val).

* punto de aplicación de las muestras

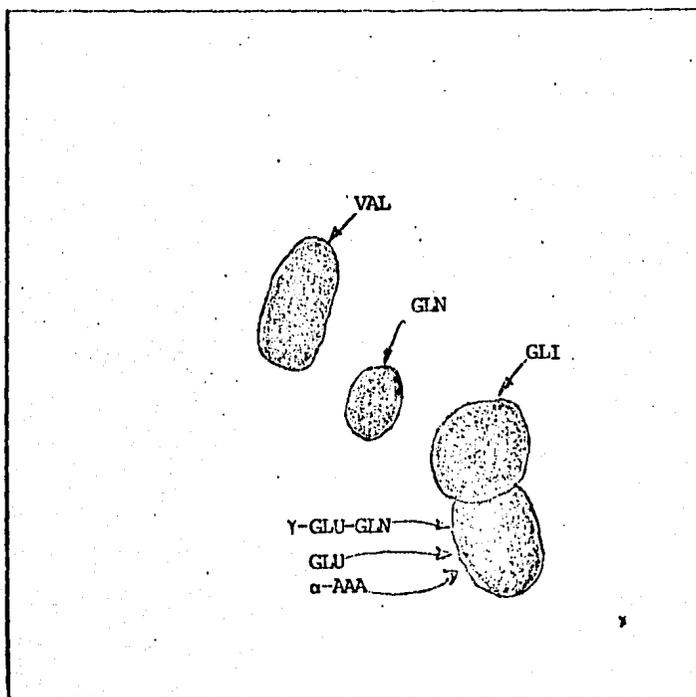


FIGURA 17. Cromatograma de γ -glu-gln, glu, α -aaa, gln, val y glicina (gli).

x punto de aplicación de las muestras

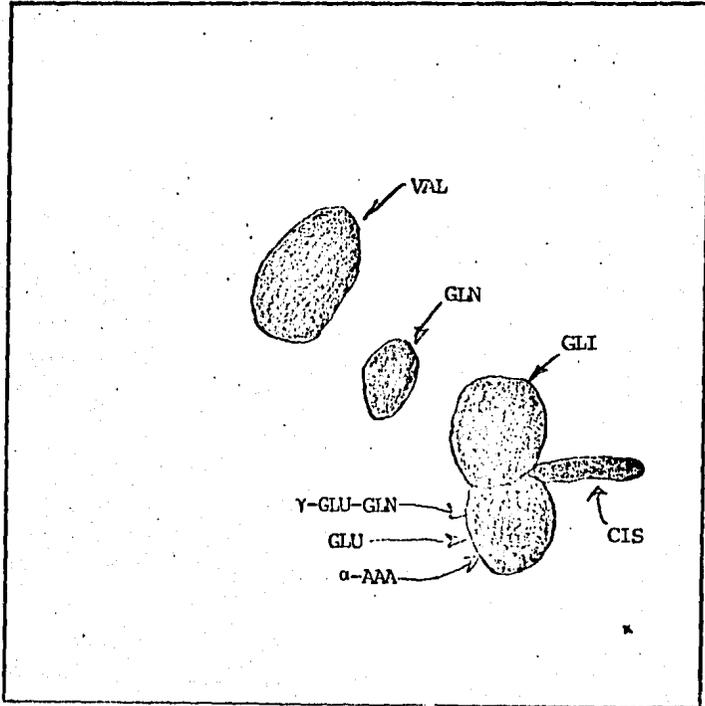


FIGURA 18. Cromatograma de γ -glu-gln, glu, α -aaa, gln, val, gli y cistefina (cis).
x punto de aplicación de las muestras

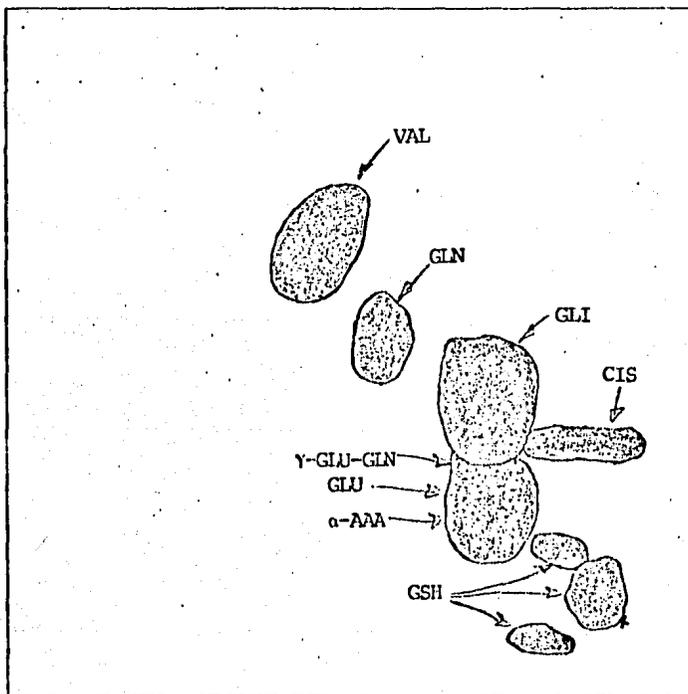


FIGURA 19. Cromatograma de γ -glu-gln, glu, α -aaa, gln, val, gli, cis y glutati3n (gsh).
x punto de aplicaci3n de las muestras

RESULTADOS Y DISCUSION

Para explicar el efecto inhibitorio de glutamina en la síntesis de penicilina (Figura 8) se plantearon dos posibilidades:

1) glutamina al estar en exceso podría estar regulando la formación de los aminoácidos precursores del antibiótico, reflejándose esta inhibición en la falta de producción de penicilina.

2) glutamina podría inhibir la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis del antibiótico ("síntesis de penicilina"), tomando como paso inicial la formación del dipéptido α -aaa-cis y finalmente la obtención de la penicilina G.

Si el problema fuera causado por la inhibición de la síntesis de precursores (primer caso), se podría revertir el efecto con la adición al medio de cultivo de α -aminoadipato, cisteína y valina; sin embargo, ésto no se logró. En la figura 20 se aprecia la cinética de producción en sistemas de RCC en diferentes condiciones de cultivo; la adición de los aminoácidos precursores provocó una ligera estimulación de la síntesis del antibiótico, comparada con la que presentó el control (sistema RCC sin fuente de nitrógeno). Ambos sistemas cuando fueron preincubados tres horas con glutamina 2 mM, no presentaron producción de antibiótico.

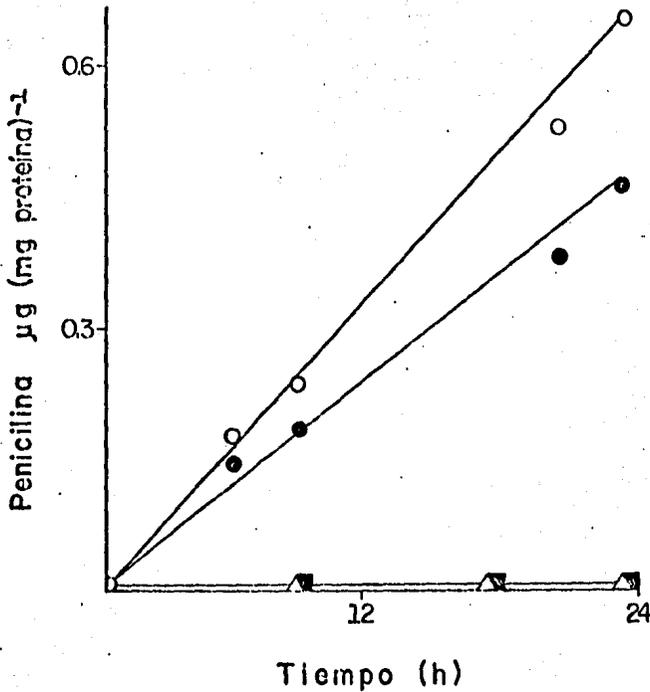


FIGURA 20. Irreversibilidad del efecto de glutamina por los aminoácidos precursores de la molécula de penicilina. Formación de penicilina en sistemas de RCC

- con precursores (α -aaa 1 mM, cis 1 mM, val 1 mM)
- sin precursores
- △ con precursores (preincubado 3 h. con gln 2 mM)
- sin precursores (preincubado 3 h. con gln 2 mM)

El no poder revertir el efecto de glutamina con la adición de α -aaa, cis y val, podía haberse debido a que éstos no se incorporaron por alguna interferencia que presentara el sistema de cultivo. A pesar de que se detectaron alteraciones en el transporte de los precursores, en las diferentes condiciones experimentales, no se observó impedimento total en la incorporación de ninguno de los aminoácidos constituyentes de la molécula de penicilina (Figura 21).

De acuerdo con estos resultados se estableció que el efecto inhibitorio provocado por glutamina no es a nivel de síntesis de precursores. En esta forma se reforzó la segunda posibilidad, en la que se contempla que el efecto de glutamina en la síntesis de penicilina, probablemente ocurre en la actividad de las "sintetasas de penicilina".

Considerando que la inhibición podría ejercerse en alguna de las actividades enzimáticas de la vía biosintética del antibiótico, midiendo la actividad de cada una de las enzimas involucradas en el proceso, sería posible conocer e qué nivel actúa glutamina.

Hasta ahora, solo se ha establecido la secuencia de formación de penicilina, pero muy poco se sabe de las características de las enzimas; sin embargo, recientemente Kaszab y Enfors (47) han obtenido evidencia experimental sugiriendo que la enzima γ -glutamil-cisteína sintetasa (primera enzima participante en la síntesis de glutatión)(48), puede ser la misma enzima que interviene en la síntesis del

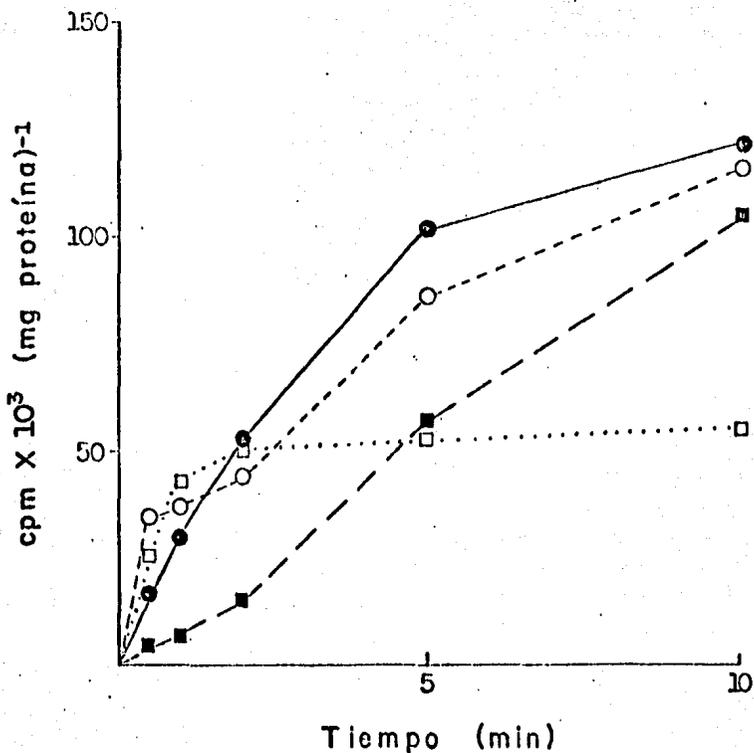


FIGURA 21. Transporte de aminoácidos precursores de penicilina. Incorporación de radioactividad en el micelio de sistemas de RCC.

- L-(U-¹⁴C)-val 1 mM [0.2 μ Ci(mmol)⁻¹]
- L-(U-¹⁴C)-val 1 mM + cis 1 mM + gln 1 mM
- L-(U-¹⁴C)-cis 1 mM [0.126 μ Ci(mmol)⁻¹]
- L-(U-¹⁴C)-cis 1 mM + val 1 mM + gln 1 mM

dipéptido α -aaa-cis, intermediario en la biosíntesis de penicilina (12).

La enzima γ -glutamyl-cisteína sintetasa ha sido ampliamente estudiada por Meister y colaboradores (48) y han caracterizado como sustratos de la misma al ácido glutámico y a la cisteína. Por otra parte, en la técnica de medición de esta actividad enzimática existe el problema de la rápida oxidación de la cisteína en condiciones ambientales normales por lo que usualmente es sustituida por el α -aminobutirato que puede ser utilizado en forma análoga por la enzima, tal y como lo reportan Mooz (49) y Nishimura (50).

En los estudios de Kaszab (47), el ácido glutámico fue sustituido por el ácido α -aminoadípico, para formar el precursor de penicilina (α -aaa-cis); desafortunadamente no se pudo establecer contacto con este grupo para obtener mayor información al respecto, por lo cual se decidió reproducir su reporte midiendo la actividad de la γ -glutamyl-cisteína sintetasa en presencia de los posibles sustratos.

Para evitar los problemas de oxidación antes mencionados se utilizó α -aminobutirato como análogo de cisteína y el otro sustrato, en un caso fue el ácido glutámico (Figura 22A) y en el otro el ácido α -aminoadípico (Figura 22B).

Los resultados mostrados en la figura 22 concuerdan con los obtenidos por Kaszab y colaboradores (47), en

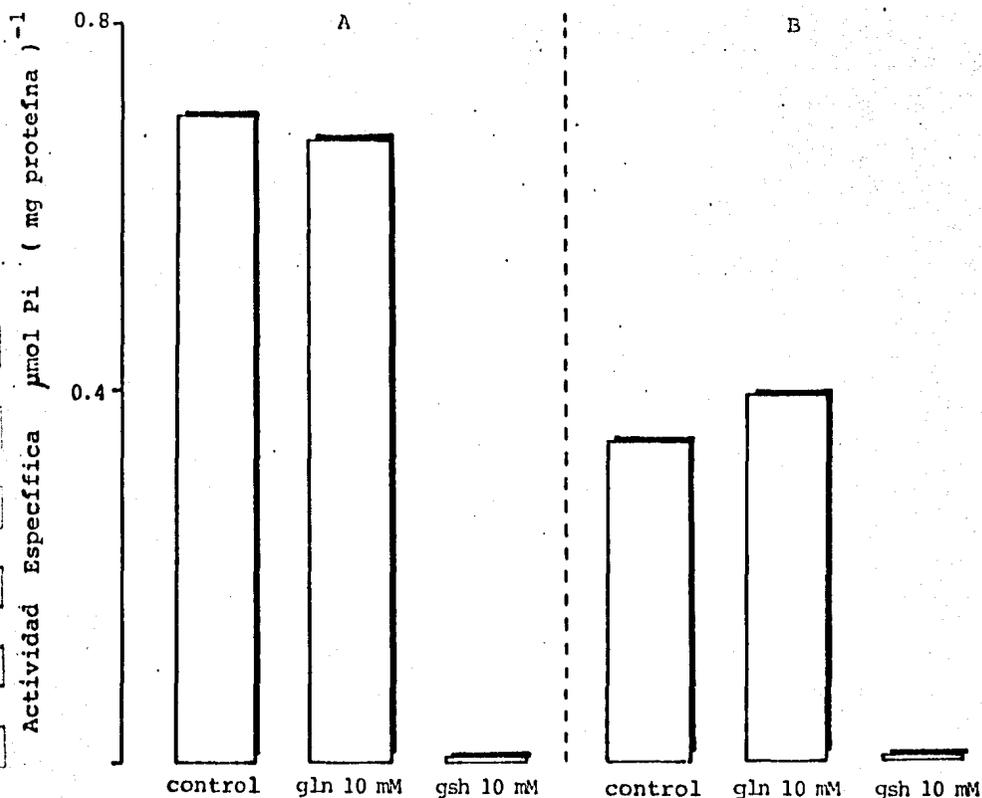


FIGURA 22. Actividad enzimática de la α -aminoadipil-cistefna sintetasa (γ -glutamyl-cistefna sintetasa), con diversos sustratos:

- A) α -aminobutirato + glutamato
- B) α -aminobutirato + α -aminoadipato

empleando como fuente de enzima micelio de P. chrysogenum de 48 h. de cultivo en M.P.; tiempo de reacción 40 min.

los cuales encontraron que la actividad de la α -aminoadipil-cisteína sintetasa o γ -glutamil-cisteína sintetasa empleando ácido α -aminoadípico es del 70%, considerando como 100% la obtenida con el ácido glutámico.

Cabe mencionar que glutatión retroinhibe la actividad de esta primera enzima de su biosíntesis (51) lo cual se pudo apreciar al añadir glutatión 10 mM al sistema de reacción, ya sea empleando glutamato (Figura 22A) o α -aminoadipato (Figura 22B) como sustratos.

Hay que destacar que bajo estas condiciones glutamina, en concentraciones hasta 10 mM, no afectó la actividad "in vitro" de la α -aminoadipil-cisteína sintetasa y que este efecto es similar empleando cualquiera de los dos posibles sustratos, glutámico (Figura 22A) o α -aminoadípico (Figura 22B).

Profundizando un poco más en las características regulatorias de la enzima se consultó la revisión de Meister y Tate (48) de glutatión y compuestos relacionados, en donde se propone el ciclo de γ -glutamil para la síntesis y utilización de glutatión (Figura 23).

Este tripéptido ha sido encontrado en la mayoría de los sistemas celulares, ya sean de origen animal, vegetal o microbiano, y, aunque los estudios realizados para proponerlo, fueron realizados empleando extractos celulares de mamíferos, ha sido posible extrapolar la hipótesis a especies

microbianas, debido a que en numerosos trabajos con estos organismos se han encontrado prácticamente todas las actividades enzimáticas involucradas en el ciclo (49,52,53,54).

En el metabolismo de glutatión pueden ser visualizadas dos etapas, una de síntesis por acciones sucesivas de la γ -glutamil cisteína sintetasa y de la glutatión sintetasa. La otra etapa sería la correspondiente a la utilización, que se lleva a cabo por las enzimas γ -glutamil transpeptidasa, la peptidasa de cisteinil-glicina, la glutamil ciclo transferasa y finalmente la 5-oxoprolinasa, con lo que se regeneraría el grupo γ -glutamil (48).

Los sustratos específicos de las enzimas solubles que catalizan la síntesis de glutatión, determinan el orden de los residuos de aminoácidos en este tripéptido.

1) el primer paso es catalizado por la γ -glutamil cisteína sintetasa, en presencia de ATP, Mn^{2+} o Mg^{2+} , L-glutamato y L-cisteína (48).

2) la segunda reacción en la biosíntesis de glutatión es catalizada por la enzima glutatión sintetasa. L- γ -glutamil- α -aminobutirato y γ -glutamil-alanina pueden servir como sustratos de esta enzima, de manera similar que γ -glutamil cisteína (49).

El glutatión es quizás el más abundante de los componentes celulares con grupo tiol, por lo cual, en muchas de las funciones que se les han asignado, el grupo sulfhidrilo

tiene gran importancia, tal es el caso de la protección a la oxidación de dicho grupo funcional de las proteínas de las membranas celulares. Por otra parte, dado que la concentración intracelular de glutatión es mucho más elevada que la de γ -glutamil cisteína, cisteína y cistina, parece ser que glutatión sirve como almacén de cisteína, con lo cual el nivel de éste aminoácido se logra mantener bajo (55).

Hay sin embargo, otra función no relacionada con la estructura del glutatión y que ha sido establecida por numerosas observaciones; ésta es la participación en procesos de transporte de aminoácidos. Una de las razones que hizo pensar ésto, fue que la degradación de glutatión por la γ -glutamil transpeptidasa fue, marcadamente estimulada por ciertos aminoácidos, aunque no eran metabolizables. Además, fue notable que la γ -glutamil transpeptidasa estaba generalmente unida a membranas, sobre todo en mamíferos, en ciertos epitelios celulares, involucrados claramente en procesos de transporte (55).

Varias investigaciones sobre este último aspecto han llevado a la conclusión de que el transporte de aminoácidos con el "sistema de glutatión", consta de varios pasos, como son la unión de los aminoácidos a las membranas celulares; la translocación que se efectúa por medio de un "acarreador-aminoácido" y finalmente la liberación del aminoácido en el interior de la célula. En este caso, el 'acarrea

dor puede ser el glutatión o simplemente el grupo γ -glutamil (55,56).

Una de las más importantes características de la enzima γ -glutamil transpeptidasa es la especificidad por los sustratos. A este respecto se ha detectado que ciertos aminoácidos neutros, especialmente glutamina, son los mejores sustratos para el ciclo del γ -glutamil; esta actividad se ve incrementada por el aumento de la concentración de aminoácidos en el sistema. La idea de que glutamina juega un papel especial es porque, además de la gran afinidad con la γ -glutamil transpeptidasa, el péptido γ -glutamil-glutamina es el mejor sustrato para la γ -glutamil ciclotransferasa, dando en esta forma continuidad al ciclo (48,55).

Dada la similitud estructural entre glutatión y los intermediarios de penicilina, al igual que las reacciones involucradas en la síntesis de los dos metabolitos, se plantea que la síntesis del antibiótico se lleva a cabo en forma similar a la del glutatión (Figura 24). En este caso el grupo que se regeneraría sería el α -aminoadipil, sirviendo así como iniciador en la síntesis de los péptidos precursores de penicilina.

Uno de los procesos más importantes en donde se ha involucrado al glutatión es en el transporte de aminoácidos neutros que se encuentran en elevadas concentraciones extracelulares y carentes de sistemas de transporte inducibles

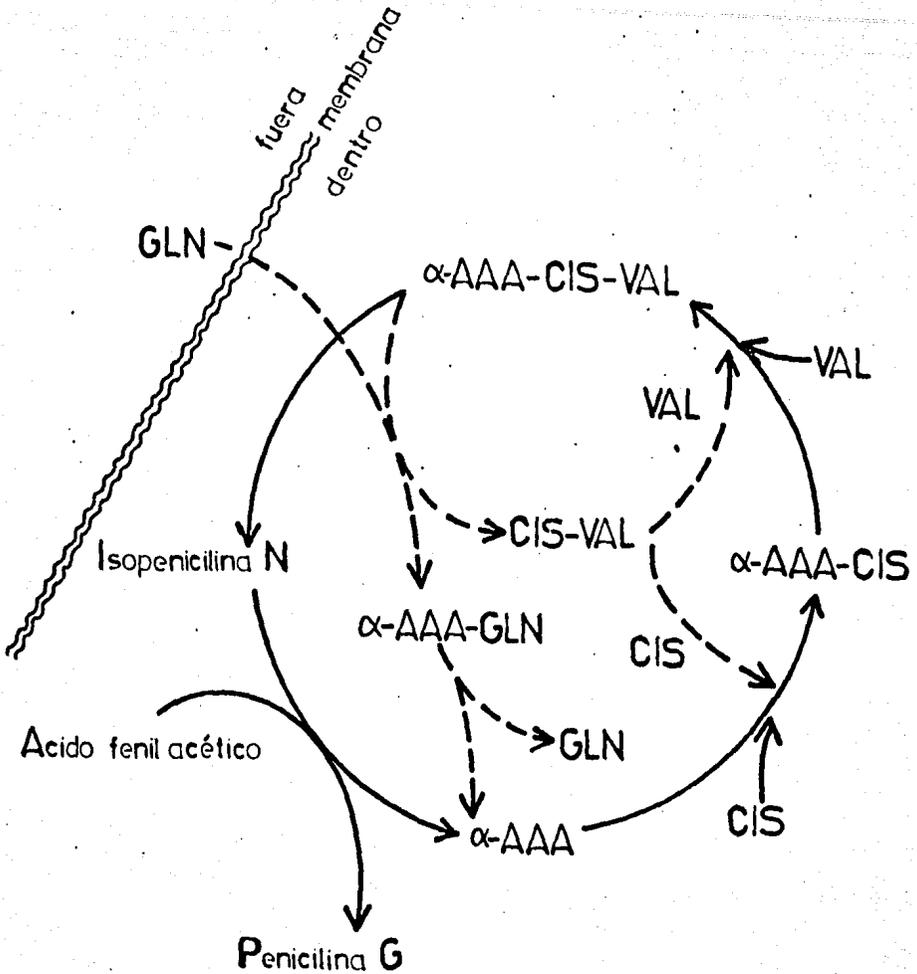


FIGURA 24.

MECANISMO PROPUESTO PARA EL TRANSPORTE DE GLUTAMINA (O AMINOACIDOS NEUTROS), INVOLUCRANDO A UN INTERMEDIARIO DE LA RUTA BIOSINTETICA DE PENICILLINA (MATEOS, R.C. ET AL. 1982).

(57), lo cual concuerda con las condiciones bajo las cuales glutamina afecta la síntesis del antibiótico.

Tomando en cuenta los datos anteriores, se ha hipotetizado la participación de glutatión en el transporte de glutamina en las condiciones experimentales de este trabajo, de tal forma que llega a ser insuficiente y entonces el tripéptido precursor de penicilina, α -aaa-cis-val, es utilizado para este mismo fin, siendo afectada notablemente la producción de antibiótico (Figura 24).

Hay ciertas condiciones que se deben cumplir para reforzar la hipótesis expuesta anteriormente, para comprobar la se hicieron varios experimentos que a continuación se tra terán.

Si glutatión y el tripéptido α -aaa-cis-val están siendo utilizados en el transporte de glutamina, bajo las mis mas condiciones experimentales, otros aminoácidos neutros deben presentar un efecto igual o similar al de glutamina en la biosíntesis de penicilina. En la tabla 2 se muestran los porcentajes de inhibición en la producción de penicilina, en sistemas de RCC en presencia de diversos aminoácidos, todos ellos añadidos en igual concentración, 10.0 mM, tomado como control el sistema sin fuente de nitrógeno. Los resultados expuestos en la tabla 2 parecen corresponder a un fenómeno de todo o nada, sin embargo son los datos obtenidos después de 36 h. de incubación en los sistemas de RCC y cabe mencio

TABLA 2
 EFECTO DE ALGUNOS AMINOACIDOS EN LA
 PRODUCCION* DE PENICILINA

AMINOACIDO (10 mM)	INHIBICION (%)
CONTROL	0
L-GLUTAMINA	100
L-GLUTAMATO	0
L-ARGININA	0
L-ASPARTATO	0
L-SERINA	100
L-CISTEINA	100
L-TRIPTOFANO	100
L-TIROSINA	100
GLICINA	100

* CUANTIFICADA EN SISTEMA DE CELULAS
 EN REPOSO INCUBADAS DURANTE 36 H.

nar que la cinética de inhibición que presenta cada aminoácido no es igual, a pesar de que a las 36 h. así lo parece.

Al analizar los datos de la misma tabla 2, se puede apreciar que glutamato, arginina y aspartato, aminoácidos que poseen sistemas de transporte constitutivos, no afectan la síntesis del antibiótico, a diferencia de lo que ocurre con diversos aminoácidos neutros que sí afectan en forma negativa la producción de penicilina cuando se encuentran en elevadas concentraciones en un sistema de RCC.

La participación del α -aaa-cis-val en el transporte de aminoácidos neutros es uno de los aspectos claves de la hipótesis planteada en este trabajo, por lo cual se investigó la importancia de los precursores de penicilina en el transporte de glutamina.

Para esto se emplearon dos cultivos de P. chrysogenum, en un caso se utilizó M.P.-L., con el propósito de tener en el micelio la mínima concentración de precursores de penicilina, incluyendo al tripéptido α -aaa-cis-val, por el efecto retrorregulador de lisina en la síntesis de penicilina (7). Así, la cantidad de L-(U-¹⁴C)-glutamina 10 mM incorporada se debía al glutatión intracelular.

En el otro cultivo se empleó M.P., cuya fuente de nitrógeno (NH₄Cl 8.5 mM) permite la síntesis normal de glutatión y precursores de penicilina; en esta forma los dos

péptidos podrían participar en el transporte de L-(U-¹⁴C)-glutamina 10 mM.

Los resultados del transporte se muestran en la figura 25, en donde es fácil notar la diferencia entre las cinéticas de incorporación de L-(U-¹⁴C)-glutamina 10 mM, en donde las células con α -aaa-cis-val y glutatión (cultivo en M.P.), presentaron mayor cantidad de marca específica, que las células carentes de α -aaa-cis-val (cultivo en M.P.-L.).

Estos datos coinciden con la supuesta participación del tripéptido α -aaa-cis-val en el transporte de glutamina, al ser insuficiente la poza de glutatión.

Otra predicción que resultaría de este modelo sería la siguiente; si la poza de glutatión es insuficiente para transportar elevadas cantidades de glutamina, al incrementar la concentración intracelular de glutatión se debería prevenir el efecto de glutamina en la síntesis de penicilina, pues ya no se utilizaría el α -aaa-cis-val para el transporte del aminoácido.

Sin embargo, se sabe que glutatión retroregula su biosíntesis, específicamente la síntesis de γ -glu-cis (5) y si está involucrada la primera enzima, tanto en la síntesis de glutatión como de penicilina (12,47), la adición de glutatión al sistema de RCC podría afectar la formación del antibiótico, por lo cual se buscó y estableció la concentración apropiada de glutatión, ésto es, que no afectara la biosín-

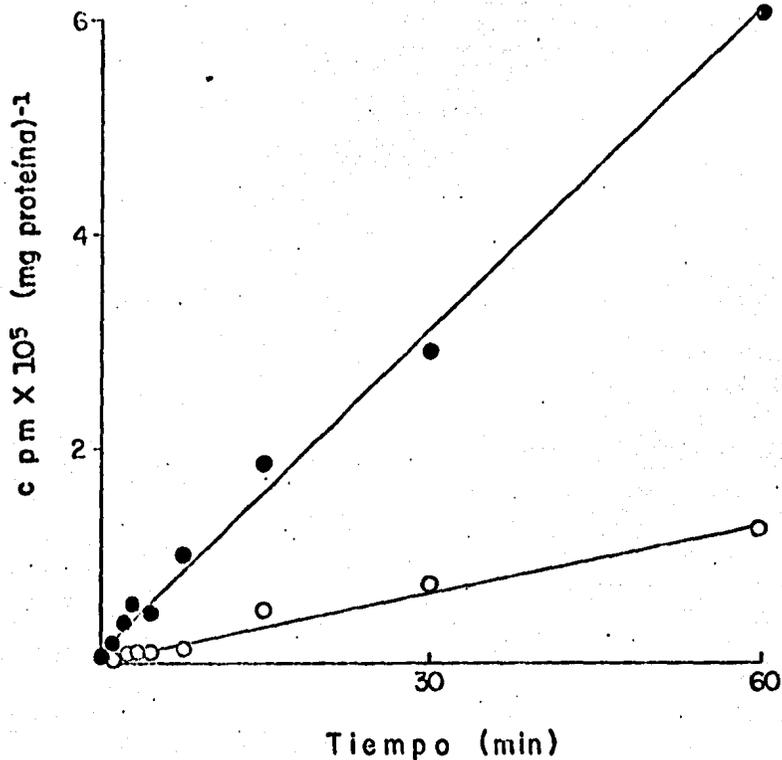


FIGURA 25. Participación de intermediarios de la ruta biosintética de penicilina (tripéptido) en el transporte de glutamina. Incorporación de L-(U-¹⁴C)-glutamina 10 mM [$1.68 \mu\text{Ci}(\text{mmol})^{-1}$] en sistemas de RCC. Células crecidas durante 36 h. utilizando NH_4Cl 8.5 mM (●) o lisina 50 mM (○) como fuente de nitrógeno.

tesis de antibiótico, encontrando la de 1 mM como la mejor (Figura 26).

Una vez establecida la concentración de glutatión adecuada, se trató de prevenir el efecto de glutamina en la síntesis de penicilina, preincubando los sistemas de RCC en un medio que favoreciera el transporte de glutatión, esto es, sin sulfatos. Después de 1 h. de preincubación, las células fueron transferidas al sistema de RCC ya descrito. Durante la preincubación en el sistema sin sulfatos no se añadió cicloheximida, para no impedir la posible formación del sistema inducible para el transporte de glutatión.

En la figura 27 es notoria la diferencia entre la producción del sistema de RCC con glutamina 10 mM y la que presentó un sistema similar preincubado 1 h. con glutatión; tal resultado favorece la hipótesis anteriormente planteada para explicar el efecto de glutamina en la síntesis de penicilina.

Este efecto preventivo va de acuerdo con la hipótesis, pero podría también ser originado por la interferencia de glutatión en la incorporación de glutamina, y ésta no podría ejercer el efecto intracelularmente, por lo cual se realizó la medición del transporte de L-(U-¹⁴C)-glutamina 5 mM en sistemas de RCC preincubados con diferentes concentraciones de glutatión. El resultado de esta prueba se puede observar en la figura 28, en donde se encontró una relación

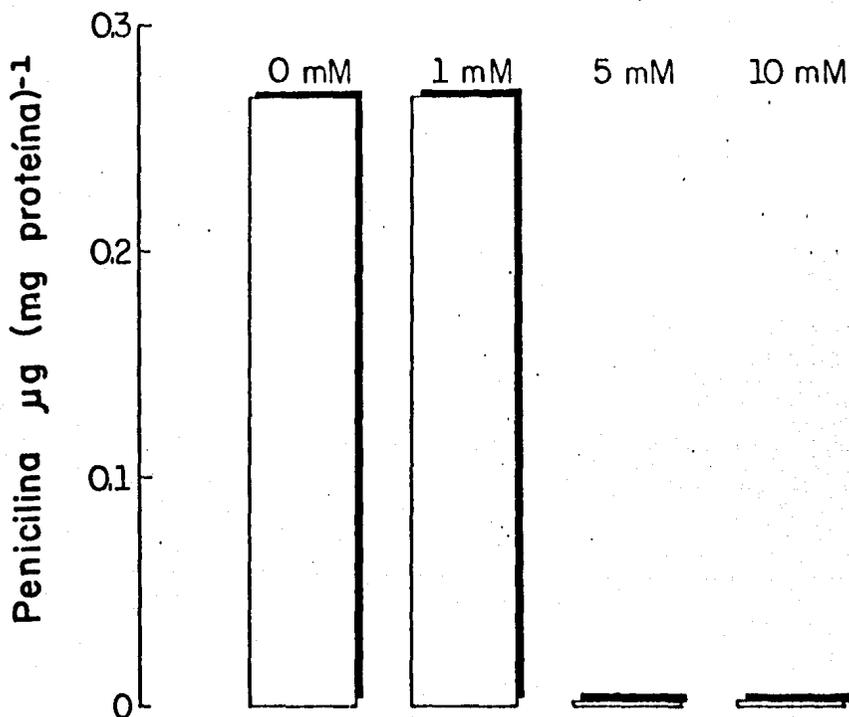


FIGURA 26 . EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUTATION EN LA PRODUCCION DE PENICILINA, DESPUES DE 36 H DE INCUBACION EN SISTEMAS DE CELULAS EN REPOSO CON CICLOHEXIMIDA

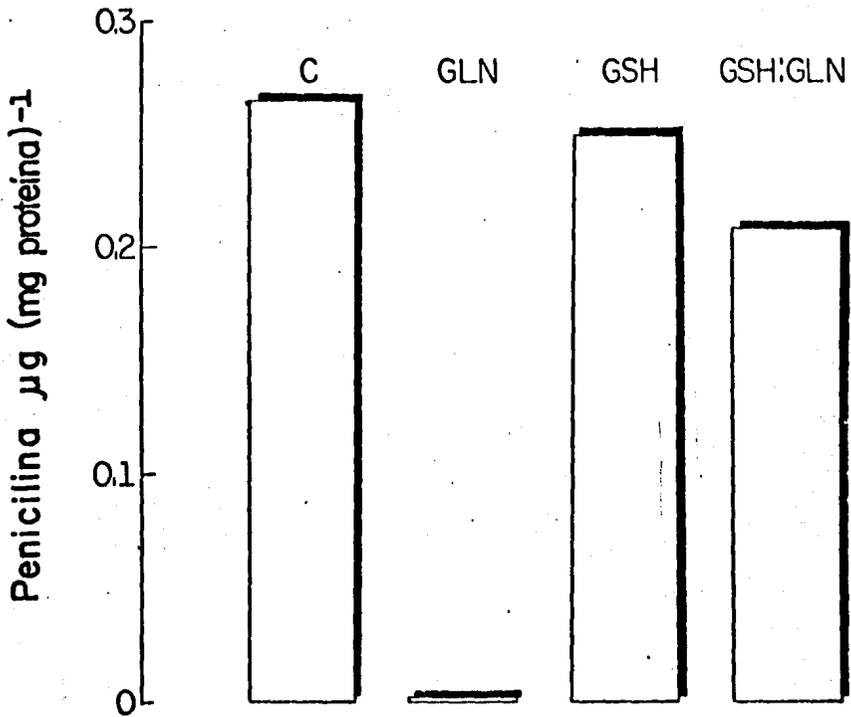


FIGURA 27. FORMACION DE PENICILINA DESPUES DE 12 H DE INCUBACION EN SISTEMAS DE CELULAS EN REPOSO, LA CICLOHEXIMIDA FUE AÑADIDA 1 H DESPUES DE LA TRANSFERENCIA. CONTROL (C), GLUTAMINA 10 mM (GLN), GLUTATION 1 mM (GSH), GLUTAMINA 10 mM PREINCUBADO CON GLUTATION 1 mM DURANTE 1 H (GSH:GLN)

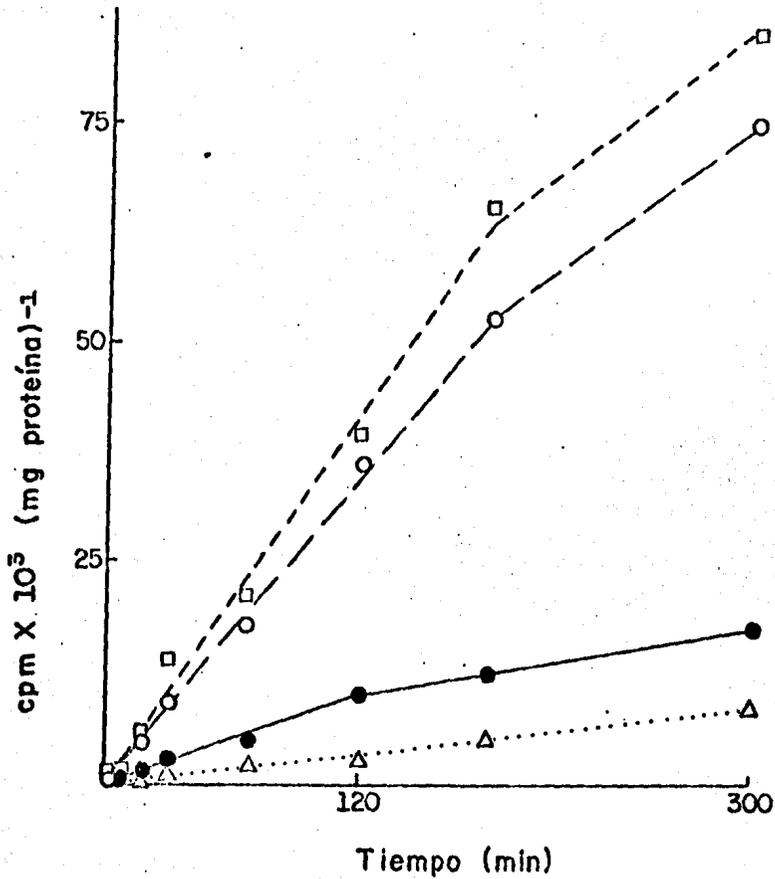


FIGURA 28. Efecto de diferentes concentraciones de glutati3n en la incorporaci3n de L-(U-¹⁴C)-glutamina 5 mM [0.6 μ Ci(mmol)⁻¹]. Control (Δ), glutati3n 1 mM (○), glutati3n 5 mM (●), glutati3n 10 mM (□).

directa entre la cantidad de glutatión añadida al medio y el incremento en la incorporación de L-(U-¹⁴C)-glutamina, fenómeno contrario al del efecto de glutatión en la producción de penicilina.

Los resultados de los experimentos descritos anteriormente, fundamentan la explicación del efecto de glutamina por la utilización del α -aaa-cis-val en su transporte, desviando la síntesis del antibiótico. Sin embargo, se consideró de gran interés, hacer estudios de los cambios de los componentes intracelulares que se deben originar en las diferentes condiciones experimentales.

Dado el objetivo de este trabajo, los estudios se abocaron principalmente al análisis de las modificaciones que presentaban las pozas de aminoácidos y péptidos, involucrados tanto en la síntesis de penicilina como en la de glutatión. Para ésto se recurrió a cromatografías bidimensionales en capa fina de los extractos etanólicos de P. chrysogenum, utilizando como revelador ninhidrina.

Para lograr ubicar en las cromatografías a los diferentes aminoácidos y péptidos se adicionaron soluciones de estos compuestos a extractos etanólicos, en algunos casos las sustancias estaban marcadas radioactivamente y esta característica ayudó a su identificación en los cromatogramas de los extractos (ver materiales y métodos) (Figura 10).

En otros casos, se carecía de compuestos radioac+

tivos y su identificación fue por intensificación del color o sea, de la concentración de la mancha que correspondía a la sustancia presente en los extractos etanólicos (ver materiales y métodos) (Figura 11).

Con los datos obtenidos en los experimentos anteriores, parecía haber problemas en la resolución de las manchas correspondientes a glutamato, α -aminoadipato y γ -glutamil-glutamina. Se decidió entonces hacer cromatografías de soluciones de cada uno de los aminoácidos y péptidos, llevando una secuencia de adición de muestras y aparición de manchas. En estos casos no se aplicaron extractos etanólicos de micelio (ver materiales y métodos) (Figuras 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19). Efectivamente, la resolución del sistema empleado no es suficiente para separar glu, α -aaa y γ -glu-gln, probablemente debido a la similitud entre sus características fisicoquímicas. Sin embargo, podría servir como un sistema orientador para el estudio de los cambios de los componentes intracelulares del micelio obtenido en diversas condiciones de cultivo.

Las figuras 29 y 30 muestran las cromatografías de los extractos etanólicos del micelio de los cultivos de los experimentos mencionados anteriormente, en donde se emplearon dos fuentes de nitrógeno para el crecimiento del hongo, NH_4Cl 8.5 mM y lisina 50 mM, además de haber añadido L-(^{14}C)-glutamina a los sistemas de RCC.

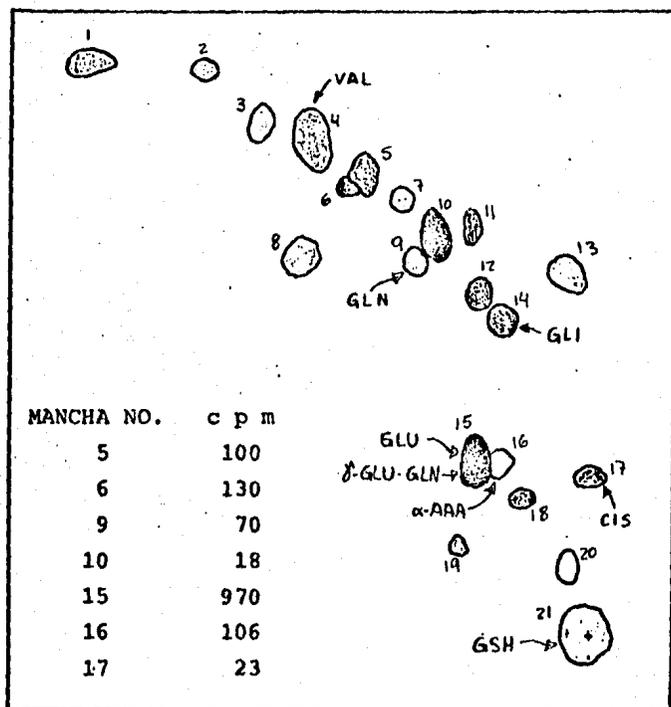


FIGURA 29. Cromatograma de extracto micelar de cultivo en M.P. y transferido a sistema de RCC con L-(U-¹⁴C)-gln 10 mM [1.68 $\mu\text{Ci}(\text{mmol})^{-1}$] e incubado durante 36 h.

x punto de aplicación de la muestra

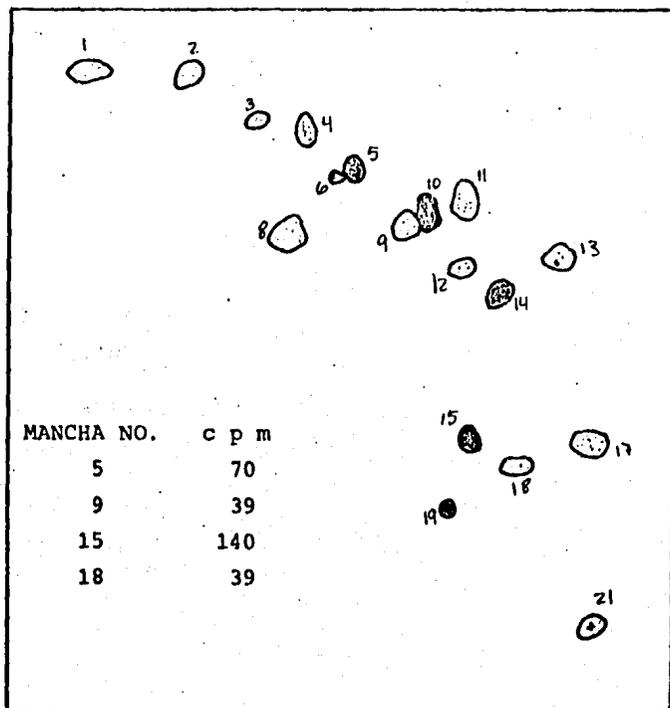


FIGURA 30. Cromatograma de extracto miceliar de cultivo en M.P.-L. y transferido a sistema de RCC con L-(U-¹⁴C)-gln 10 mM [1.68 μ Ci(mmol)⁻¹] e incubado durante 36 h.

x punto de aplicación de la muestra

Uno de los problemas que se presentaron en el análisis de estos resultados, fue el gran número de manchas radioactivas. Sin embargo, se pueden apreciar ciertas diferencias en el número e intensidad de manchas, entre una y otra cromatografía. Es notable que en el extracto del cultivo con NH_4Cl 8.5 mM (Figura 29), la radioactividad de las manchas es mucho mayor que en la del cultivo con lisina 50 mM (Figura 30); ésto corresponde al mejor transporte de L-(U- ^{14}C)-glutamina encontrada en células crecidas en M.P. que en M.P.-L. (Figura 25).

Tomando como control la figura 29, se puede apreciar la ausencia de las manchas 7, 16 y 20 en la figura 30. La ubicación de la mancha número 20, hace pensar que se trata de algún péptido pequeño, ya que migra en forma muy similar a una de las manchas que aparecieron cuando se aplicó glutatión en la placa (Figuras 10, 19).

Por otra parte, la mancha número 16 se localiza en una zona muy cercana a la de γ -glu-gln, glu y α -aaa, podría tratarse de alguno de estos compuestos, y que debido a la resolución en esa ocasión se pudiera haber separado. De ser así, cabría la posibilidad de ser la correspondiente al α -aminoadípico (aminoácido precursor de penicilina) y que en presencia de lisina 50 mM el hongo no fue capaz de sintetizar.

Si el transporte de glutamina, cuando se encuentra en elevadas concentraciones, es mediado por glutatión y el

tripéptido α -aaa-cis-val, tal y como se plantea en las figuras 23 y 24, entonces en los sistemas de RCC con L-(U-¹⁴C)-glutamina se formarían dos péptidos, el γ -glu-gln y el α -aaa-gln, los cuales por la radioactividad que presentarían podrían ser localizados en las cromatografías de los extractos etanólicos correspondientes.

Ya se mencionó que ha sido reportado que el transporte de aminoácidos por el "sistema de glutatión" consta de varios pasos (55,56). Para observar la secuencia de incorporación de glutamina, por este sistema, se hicieron cromatografías de extractos etanólicos del micelio de sistemas de RCC, que habían estado en presencia de L-(U-¹⁴C)-glutamina durante diferentes tiempos (1,3 y 6 h.) y a manera de cinética se observó la aparición de manchas radioactivas. Dicha secuencia se aprecia en las figuras 31,32 y 33.

En la cromatografía del extracto del micelio incubado durante 1 h. con L-(U-¹⁴C)-glutamina (Figura 31), se detectaron dos manchas radioactivas. La número 10 presenta el mismo patrón de migración que γ -glu-gln, glu y α -aaa, lo cual hace pensar que puede tratarse de algunos de los péptidos que se forman en la translocación de glutamina; si existe α -aaa-gln, es probable que comigre con γ -glu-gln, dadas las pequeñas diferencias estructurales.

La mancha número 4 adquiere una tonalidad amarillenta al revelar con ninhidrina y aparece radioactiva siempre que se utiliza L-(U-¹⁴C)-glutamina, sea en un sistema

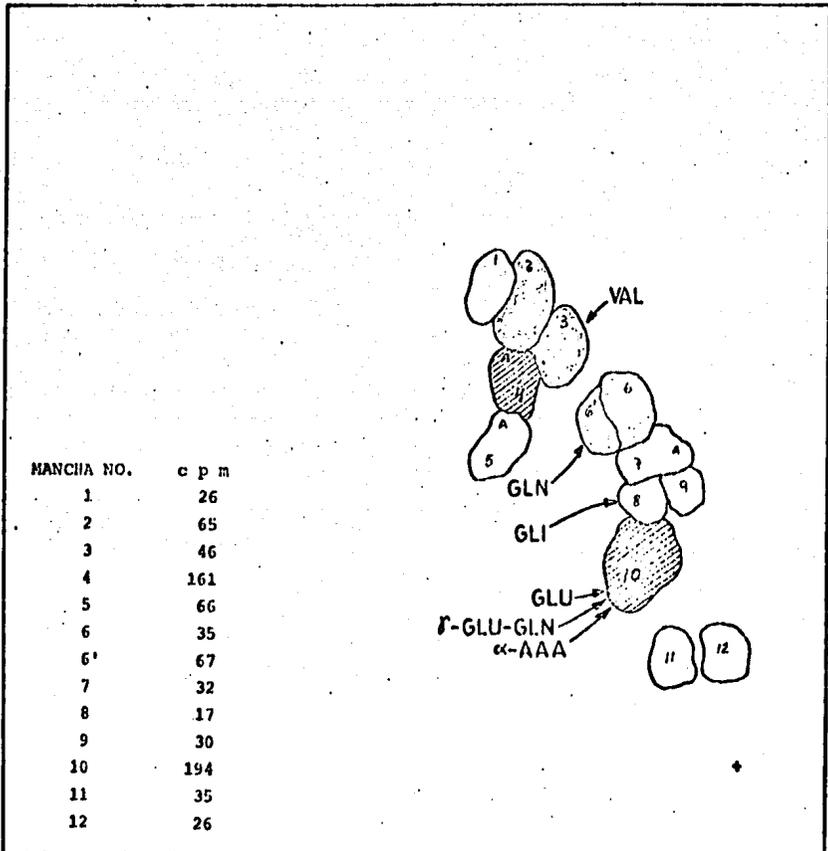


FIGURA 31. Cromatograma de extracto miceliar de sistema de RCC, después de 1 h. de incubación con L-(U-¹⁴C)-glutamina 10 mM [$1.68 \mu\text{Ci}(\text{mmol})^{-1}$].
x punto de aplicación de la muestra

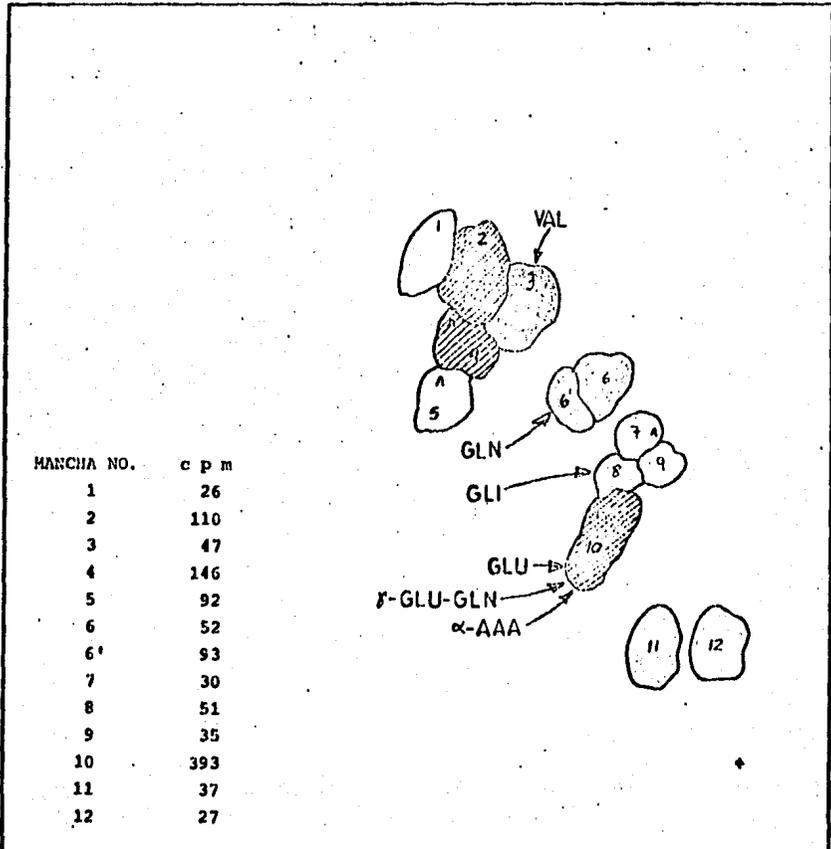


FIGURA 32. Cromatograma de extracto micelar de sistema de RCC, después de 3 h. de incubación con L-(U-¹⁴C)-glutamina 10 mM [$1.68 \mu\text{Ci}(\text{mmol})^{-1}$].
x punto de aplicación de la muestra

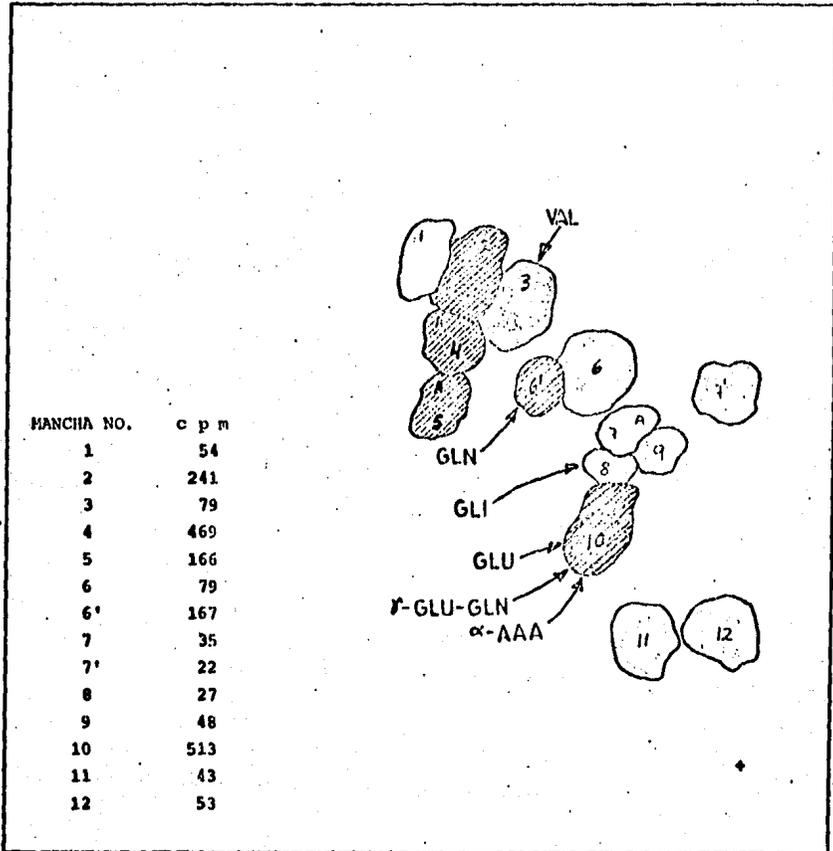


FIGURA 33. Cromatograma de extracto miceliar de sistema de RCC, después de 6 h. de incubación con L-(U-¹⁴C)-glutamina 10 mM [$1.68 \mu\text{Ci}(\text{mmol})^{-1}$].

x punto de aplicación de la muestra

"in vivo" o bien cuando es adicionada a la placa cromatográfica en presencia de algún extracto etanólico de micelio. Su naturaleza es desconocida, pero se piensa puede ser un producto metabólico o bien algún derivado de los extractos etanólicos originado por los sistemas de solventes y que actúa como "acarreador" de la marca. No es un producto de descomposición de glutamina, ya que se hicieron los controles correspondientes, tanto del procesamiento etanólico del micelio, como de los efectos del sistema de eluyentes cromatográficos en la molécula de este aminoácido.

Es notable que la mancha número 10, además de ser una de las primeras en adquirir la radioactividad de la L-(U-¹⁴C)-glutamina añadida al medio de RCC, es también la que mayor número de cpm presenta.

Aparentemente y en concordancia con los reportes de Meister (55) y Operkarová (56), se requieren varias etapas para el transporte de aminoácidos neutros por el "sistema de glutatión", ya que como en este caso, al observar la incorporación de radioactividad de L-(U-¹⁴C)-glutamina, se siguen varios pasos antes de que la mancha correspondiente a glutamina (número 6¹) adquiera radioactividad.

C O N C L U S I O N E S

Empleando sistemas de células en reposo de Penicillium chrysogenum con cicloheximida, concentraciones superiores a 1mM de glutamina ejercen un efecto inhibitorio en la síntesis del antibiótico.

Este efecto no es revertido por los aminoácidos precursores de la molécula de penicilina (α -aaa-cis-val).

La actividad "in vitro" de la primera enzima de la ruta biosintética de penicilina (α -aminoadipil cisteína sintetasa) (24,27) no es afectada por elevadas concentraciones de glutamina (hasta 20 mM).

El efecto no es específico de glutamina, otros aminoácidos neutros causan una inhibición similar; esto no se obtiene empleando concentraciones iguales de aminoácidos básicos o ácidos.

Se establece cierta analogía entre el ciclo del γ -glutamil (33) y la síntesis de penicilina, en donde se plantea la explicación de que el efecto inhibitorio de glutamina es debido al desvío del tripéptido precursor del antibiótico (α -aaa-cis-val), utilizado en el transporte del aminoácido, en la misma forma que participa glutatión en el transporte de aminoácidos neutros (55).

Los siguientes resultados obtenidos concuerdan con la hipótesis anterior.

El transporte de L-(U-¹⁴C)-glutamina es mayor en

células capaces de sintetizar α -aaa-cis-val y glutatión (crecidas en NH_4Cl 8.5 mM) que las carentes de α -aaa-cis-val (crecidas en lisina 50 mM).

Como se esperaba, la adición de lisina al medio de cultivo provocó cambios en los componentes intracelulares del hongo, que se encuentran relacionados, con la síntesis del antibiótico.

Por medio de marcadores radioactivos y de concentración, se lograron ubicar en los cromatogramas algunos de los precursores de penicilina y glutatión.

A pesar de no haber podido separar y cuantificar a los péptidos γ -glu-gln y α -aaa-gln, ya que se carecía de dichos compuestos para ser utilizados como controles, resultó evidente que la incorporación de L-(U- ^{14}C)-glutamina al interior de la célula consta de varios pasos y al menos uno de los primeros involucra la unión de L-(U- ^{14}C)-glutamina con glu o α -aaa, ya que comigran en las cromatografías bi-dimensionales y la radioactividad se concentra inicialmente en esa zona. Con estos resultados se reforzó el postulado.

Es de esperarse que al utilizar algún otro aminoácido neutro en los experimentos realizados empleando glutamina, los resultados sean similares.

El planteamiento del papel del tripéptido precursor de penicilina (el α -aaa-cis-val), en el transporte de aminoácidos neutros, en sistemas celulares incapaces de inducir algún mecanismo de transporte, es la aportación más

importante de este trabajo al conocimiento del metabolismo nitrogenado en Penicillium chrysogenum, además abre la posibilidad de profundizar en la interrelación entre la biosíntesis de glutatión y la producción de penicilina, campo en el cual no se ha reportado ningún estudio.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Demain, A. L. (1974). *Lloydia*, 37: 147-167.
- 2) Backus, M.P. and J.F. Stauffer (1955). *Mycologia* 47: 429-463.
- 3) Elander, R.P. and L.T. Chang (1979). En: *Microbial Technology*. 2a. Edición. Vol. II, capítulo 12. Academic Press, Inc., New York. pp. 243-303.
- 4) Queener, S.W., O.K. Savek and C. Vézina (1978). *Ann. Rev. Microbiol.* 32: 593-636.
- 5) Elander, R.P. and H. Aohi (1982). En: *Chemistry and Biology of β -Lactam Antibiotics*. Vol. 3, capítulo 2. pp. 83-153.
- 6) Bonner, D. (1947). *Arch. Biochem.* 13: 1-9.
- 7) Demain, A.L. (1957). *Arch. Biochem. Biophys.* 67: 244-245.
- 8) Masurekar, P.S. and A.L. Demain (1974a). *Appl. Microbiol.* 28: 265-270.
- 9) Masurekar, P.S. and A.L. Demain (1974b). *Antimicrob. Agents Chemother.* 6: 366-368.
- 10) Somerson, N.L., A.L. Demain and T.D. Nunheimer (1961). *Arch. Biochem. Biophys.* 93: 238.
- 11) Goulden, S.A. and F.W. Chattaway (1968). *Biochem. J.* 110: 55p.
- 12) Lara, F., R.C. Mateos, G. Vázquez and S. Sánchez (1982). *Biochem. Biophys Res. Commun.* 105: 172-178.
- 13) Arnstein, H.R.V., D. Morris and E.J. Toms (1959).

- Biochim. Biophys. Acta 35: 561-562.
- 14) Warren, S.C. G.G.F. Newton and E.P. Abraham (1967).
Biochem J. 103: 891-901.
 - 15) Queener, S.W. and N. Neuss (1982). En: Chemistry and
Biology of β -Lactam Antibiotics. Vol 3, capítulo 1.
Morin, R.B. and M. Gorman (Eds.). Academic Press Inc.,
New York., pp. 1-81.
 - 16) Fawcett, P.A., J.J. Usher, J.A. Huddleston, R.C. Bleany,
J.J. Nisbet and E.P. Abraham (1976). Biochem. J. 157:
651-660.
 - 17) Meesschaert, B., P. Adriaens and H. Eyssen (1980). J.
Antibiot. 33: 722-730.
 - 18) Abraham, E.P. (1978). En: Antibiotics and Other Secondary
Metabolites. Academic Press, London. pp. 141-164.
 - 19) Flynn, E.H., M.H. McCormick, M.C. Stamper, H. DeValeria
and C.W. Gadzeski (1962). J. Am. Chem. Soc. 81: 4594.
 - 20) Loder, P.B. and E.P. Abraham (1971a). Biochem. J. 123:
471-476.
 - 21) Loder, P.B. and E.P. Abraham (1971b). Biochem. J. 123:
477-482.
 - 22) Adriaens, P., H. Vanderhaeghe, B. Meesschaert and H.
Eyssen (1975a). Antimicrob. Agents. Chemother. 8: 15-
17.
 - 23) Adriaens, P., B. Meesschaert, W. Wunyts, H. Vanderhaeghe
and H. Eyssen (1975b). Antimicrob. Agents Chemother. 8:
638-642.

- 24) Arnstein, H.R.V. and D. Morris (1960). *Biochem. J.* 76: 357-361.
- 25) Lemke, P.A. and C.H. Nash (1972). *Can. J. Microbiol.* 18: 255-259.
- 26) Luengo, J.M., G. Revilla, J.R. Villanueva and J.F. Martín (1979). *J. Gen. Microbiol.* 115: 207-211.
- 27) Demain, A.L. and P.S. Masurekar (1974). *J. Gen. Microbiol.* 82: 143-151.
- 28) Friedrich, C.G. and A.L. Demain (1977). *J. Antibiot.* 30: 760-761.
- 29) Hopwood, D.A. and M.J. Merrick (1977). *Bacteriol. Rev.* 41: 595-635.
- 30) Sánchez, S., L. Paniagua, R.C. Mateos, F. Lara and J. Mora (1980). En: *Advances in Biotechnology*, Vol. III, Vézina, C. and K. Singh (Eds.), Pergamon Press, Toronto, Canada. pp. 147-154.
- 31) Jarvis, F.G. and M.J. Johnson (1947). *Am. Chem. Sci.* 69: 3010-3017.
- 32) Revilla, G., J.M. Luengo, J.R. Villanueva and J.F. Martín (1980). En: *Advances in Biotechnology*, Vol. III, Vézina, C. and K. Singh (Eds.), Pergamon Press, Toronto, Canada. pp. 155-160.
- 33) Gordee, E.Z. and L.E. Day (1972). *Antimicrob. Agents and Chemother.* 1: 315-322.
- 34) Martín, J.F. J.A. Gil, G. Naharro, P. Liras and J.R. Villanueva (1979). En: *Genetics of Industrial Microorga-*

- nisms. Sebek, O.K. and A.J. Laskin (Eds.). Am. Soc. for Microbiol., Washington, D.C., U.S.A.. pp. 205-209.
- 35) Goulden, S.A. and F.W. Chattaway (1969). J. Gen. Microbiol. 59: 111-118.
- 36) Aharonowitz, Y. and A.L. Demain (1979). Can. J. Microbiol. 25: 61-67.
- 37) Mora, J. et al. (1983). Comunicación personal.
- 38) Sánchez, S., M.E. Flores y R.C. Mateos (1983). Publicación Especial de la UNAM. En prensa.
- 39) Mateos, R.C., F. Lara and S. Sánchez (1982). Resúmenes del XIII International Congress of Microbiology, Boston, Mass., U.S.A.. pp. 152.
- 40) Bray, G. (1960). Anal. Biochem. 1: 279-285.
- 41) Demain, A.L. and Y. Kennel (1978). J. Ferment. Technol. 56: 323-328.
- 42) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951). J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- 43) Liu, C.M., T. Henmann and P.A. Miller (1977). J. Antibiot. 30: 244-251.
- 44) Anné, J. (1982). Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15: 41-46.
- 45) Taussky, H. and E. Sharr (1953). J. Biol. Chem. 202: 675-685.
- 46) Shih, V.E. (1973). C.R.C. Press, Cleveland, Ohio, U.S.A.. pp. 11-76.
- 47) Kaszab, I. and S.O. Enfors (1981). Abstracts of the

- Second European Congress of Biotechnology. Eastbourne, England. pp.179.
- 48) Meister, A. and S.S. Tate (1976). Ann. Rev. Biochem. 45: 559-604.
- 49) Mooz, E.D. and A. Meister (1967). Biochemistry 6: 1722-1734.
- 50) Nishimura, J.S., E.A. Dodd and A. Meister (1964). J. Biol. Chem. 239: 2553-2558.
- 51) Griffith, D.W., R.J. Bridges and A. Meister (1981). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.. 78: 2777-2781.
- 52) Snake, J.E. (1955). J. Biol. Chem. 213: 813-824.
- 53) Mooz, E.D. and L. Wigglesworth (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 68: 1066-1072.
- 54) Milbauer, R. and N. Grossowicz (1965). J. Gen. Microbiol. 41: 185-194.
- 55) Meister, A. (1980). En: Microorganisms and Nitrogen Sources. Payne, J.W. (Ed.). John Wiley and Sons, Ltd.. pp. 493-509.
- 56) Operkarová, M., A. Kotyk, J. Horák and V.P. Kholodenko (1975). Eur. J. Biochem. 59: 373-376.
- 57) Hunter, D.R. and I.H. Segel (1971). Arch. Biochem. Biophys. 144: 168-183.