

03072  
7  
29



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

Relación entre la glutamato deshidrogenasa  
y la producción de penicilina en  
Penicillium chrysogenum

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tesis que para obtener el grado de  
Maestra en Biotecnología, presenta:

G.F.B. María Teresa Lucas Jiménez

México, D.F.

1991



## **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.

# INDICE

	PAGINA
Introducción	1
Antecedentes	4
Material y Métodos	18
Resultados y Discusión	
1. Obtención de la cepa mutante de <u>P. chrysogenum gdhA1</u>	26
2. Cinética de crecimiento y producción de penicilina	27
3. Cinética de la actividad de glutamato deshidrogenasa y tasa de Acido glutámico	27
4. Cinética de crecimiento y producción de penicilina en nitrato de sodio como fuente de nitrógeno	30
5. Efecto del Acido glutámico en el crecimiento, producción de penicilina y actividad de GDH-NADPH de las cepas NRRL-1951 y gdhA1	31
6. Efecto de glutamina en el crecimiento y producción de penicilina en las cepas NRRL-1951 y gdhA1	36
7. Síntesis de penicilina en un medio de formación de antibiótico de células cultivadas previamente en diferentes fuentes de nitrógeno	37
8. Actividad de las enzimas involucradas en el proceso de asimilación de nitrógeno	43
Conclusiones	46
Bibliografía	

## INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
Figura 1. Estructura básica de penicilina	5
2. Vía biosintética de penicilina	6
3. Cinética de crecimiento y producción de penicilina en cloruro de amonio en la cepa NRRL-1951	8
4. Estructuras químicas de penicilina G, cefalosporina y cefamicina	11
5. Estructuras químicas de los dipéptidos y tripéptidos involucrados en la síntesis de penicilina y glutatión	12
6. Vía biosintética de los aminoácidos que forman la molécula de penicilina	14
7. Posibles interacciones de la biosíntesis de penicilina con el metabolismo nitrogenado	15
8. Cinética de crecimiento y producción de penicilina en amonio y adición de ácido glutámico a las 36 horas en la cepa NRRL-1951	17
9. Viabilidad celular en <i>P. chrysogenum</i> NRRL-1951 expuesto a diferentes concentraciones de NTG	24
10. Viabilidad celular y auxotrofia en <i>P. chrysogenum</i> NRRL-1951 expuesto a 50 µg/ml de NTG	25
11. Cinética de crecimiento, producción de penicilina y amonio extracelular en amonio. (a) cepa NRRL-1951 y (b) cepa <i>gdhA1</i>	28
12. Cinética de crecimiento, producción de penicilina, actividad de GDH-NADPH y poza de glutamato en amonio. (a) cepa NRRL-1951 y (b) cepa <i>gdhA1</i>	29
13. Cinética de crecimiento, producción de penicilina y amonio extracelular en cloruro de amonio y nitrato de sodio. (a) cepa NRRL-1951 y (b) cepa <i>gdhA1</i>	31

INDICE DE FIGURAS (cont.)

	PAGINA
14a. Cinética de crecimiento y producción de penicilina en amonio y ácido glutámico. Cepa NRRL-1951	34
14b. Cinética de crecimiento y actividad de GDH-NADPH en amonio y ácido glutámico. Cepa NRRL-1951	34
15a. Cinética de crecimiento y producción de penicilina en amonio y ácido glutámico. Cepa gdhA1	35
15b. Cinética de crecimiento y actividad de GDH-NADPH en amonio y ácido glutámico. Cepa gdhA1	35
16. Cinética de crecimiento, producción de penicilina y amonio extracelular en cloruro de amonio y glutamina. (a) cepa NRRL-1951 y (b) cepa gdhA1	38
17. Células de <i>F. chrysogenum</i> cultivadas en medio de producción con amonio y transferidas a las 36 horas a un medio de formación de antibiótico con diferentes fuentes de nitrógeno	40
18. Células de <i>F. chrysogenum</i> cultivadas en medio de producción con glutamato y transferidas a las 36 horas a un medio de formación de antibiótico con diferentes fuentes de nitrógeno	41
19. Células de <i>F. chrysogenum</i> cultivadas en medio de producción con glutamina y transferidas a las 36 horas a un medio de formación de antibiótico con diferentes fuentes de nitrógeno	42

## INDICE DE FIGURAS (cont.)

	PAGINA
20a. Enzimas involucradas en el proceso de asimilación de amonio. Actividad medida en células cultivadas en amonio. Cepa NRRL-1951 y cepa gdhA1	44
20b. Enzimas involucradas en el proceso de asimilación de amonio. Actividad medida en células cultivadas en glutamato. Cepa NRRL-1951 y cepa gdhA1	44
21. Relación entre el metabolismo nitrogenado y la síntesis de penicilina	45

## INTRODUCCION

La relación entre metabolismo nitrogenado y la biosíntesis de metabolitos secundarios que contienen dentro de su estructura átomos de nitrógeno se ha estudiado en diferentes especies microbianas. Los compuestos derivados del metabolismo nitrogenado que parecen estar involucrados en este fenómeno son glutamina y ácido glutámico por ser los que derivan directamente del proceso de asimilación de amonio.

Cuando se iniciaron los estudios sobre regulación nitrogenada en la síntesis de penicilina se observó que las pozas de glutamato y glutamina eran las más altas al final de la fase logarítmica de crecimiento, etapa en la cual comenzaba la síntesis de penicilina (15).

Mateos et al (17) estudiaron el efecto de glutamina a mayores concentraciones (2-10 mM) y observaron un efecto estimulador a bajas concentraciones, sin embargo a 10 mM obtuvieron un efecto negativo sobre la síntesis del antibiótico.

Lara et al (4) estudiaron el efecto de ácido glutámico y observaron que existía una fuerte estimulación sobre la síntesis de penicilina utilizando glutamato 10 mM como fuente de nitrógeno.

Además al utilizar análogos no metabolizables de ácido glutámico observaron el mismo efecto estimulador.

A nivel enzimático midieron la actividad de la primera enzima de la vía biosintética de penicilina y observaron que el ácido glutámico ejercía un incremento de 3.5 veces la actividad de la enzima con respecto al control utilizando 10 mM de cloruro de amonio.

Este efecto inductor por un aminoácido que no interviene en la reacción inicial directamente ( $\alpha$ -aminoadipato y cisteína) puede explicarse por la similitud de esta enzima con la primera enzima de la biosíntesis de glutatión que utiliza como sustratos glutamato y cisteína.

Debido a que estos estudios se realizaron en un medio de formación de antibiótico, decidimos reproducirlos en el medio de fermentación adicionando ácido glutámico 10 mM a las 36 horas de cultivo que es cuando se inicia la síntesis de antibiótico.

El efecto inductor de ácido glutámico se observó también en estas condiciones de fermentación apoyando así la importancia de este compuesto en la síntesis de penicilina.

Jacklitsch et al (18) midieron la poza de ácido glutámico en 3 cepas de *E. glycogenum* y encontraron que en todas ellas

aumentaba la poza de glutamato y que este fenómeno era más pronunciado en las cepas altamente productoras.

Ya que la enzima glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH (GDH-NADPH) ocupa una posición estratégica en el metabolismo nitrogenado por su capacidad de catalizar la reacción de síntesis de glutamato, el objetivo de este trabajo fue determinar si la actividad de esta enzima era la responsable del incremento de la poza intracelular de glutamato y que este incremento fuera la señal bioquímica para el inicio de la síntesis del antibiótico.

Para llevar a cabo este trabajo se utilizó la cepa original de *Penicillium chrysogenum* NRRL-1951 y una cepa obtenida en este mismo estudio cuya actividad de GDH-NADPH es diferente a la de la cepa original y a la que denominaremos *gdhA1*.

En diferentes condiciones de crecimiento para ambas cepas, estudiamos los niveles de actividad de la enzima GDH-NADPH, síntesis de penicilina, crecimiento y otros factores como poza intracelular de ácido glutámico y amonio residual en el medio de cultivo. En menor grado también se estudiaron las actividades de las enzimas glutamino sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) involucradas también en el fenómeno de asimilación de amonio.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes :

a) la cepa *gdhA1* sólo produce antibiótico cuando el medio de cultivo es suplementado con ácido glutámico. Ni en presencia de amonio o glutamina produce penicilina.

b) la actividad de GDH-NADPH en la cepa *gdhA1* es diferente a la de la cepa silvestre alcanzando la mitad de los valores de actividad de ésta en sus más altos niveles.

c) la cepa *gdhA1* es incapaz de asimilar el ión amonio como lo hace la cepa silvestre.

d) en la cepa silvestre se observa un efecto negativo sobre la síntesis de penicilina, cuando se adiciona al medio de cultivo ácido glutámico inicialmente; asimismo, la actividad de GDH-NADPH disminuye en estas condiciones.

e) con respecto a las actividades enzimáticas de GS y GOGAT encontramos lo siguiente:

e1. en ambas cepas GS se induce cuando el ácido glutámico es la fuente de nitrógeno.

e2. en ambas cepas GOGAT es afectada negativamente en las mismas condiciones que en el inciso anterior. Lo mismo sucede con la GDH-NADPH.

e3. GS en su actividad de transferasa y GOGAT alcanzan

niveles tres veces más altos en la cepa ydH1 que en la cepa silvestre cuando se utiliza amonio en el medio de cultivo como fuente de nitrógeno.

Por los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que el ácido glutámico juega un papel esencial en la síntesis de penicilina y que los eventos que afectan su presencia pueden afectar en menor o mayor grado la síntesis del antibiótico.

## ANTECEDENTES

La penicilina es un antibiótico muy utilizado en la práctica clínica que pertenece al grupo de los compuestos  $\beta$ -lactámicos. Es biosintetizado por diversas especies de *Aspergillus* y *Penicillium* e industrialmente el hongo *Penicillium chrysogenum* es el microorganismo utilizado en la producción de este antibiótico.

Su estructura química consta de un anillo de cuatro miembros llamado  $\beta$ -lactámico, un heterociclo con un átomo de azufre y una cadena lateral. Esta última es de naturaleza química variable, dependiendo del precursor que esté presente en el medio de cultivo y que se intercambia por el ácido  $\alpha$ -aminoadípico en la última reacción de la vía biosintética (FIG 1).

El primer paso de la biosíntesis de penicilina consiste en la condensación del ácido  $\alpha$ -aminoadípico con la cisteína, dando como resultado el dipéptido  $\beta$ - $\alpha$ -aminoadipil-cisteína (1,2) (FIG 2).

Hasta hace unos años no había sido posible demostrar la presencia de este dipéptido en el micelio de los microorganismos productores de penicilina (3), sin embargo Lara, et al (4) han medido la actividad de la  $\beta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteína sintetasa, primera enzima en la vía de síntesis de penicilina y recientemente Banko, et al, (25) detectaron esta actividad en extractos de *Cephalosporium acremonium* y establecieron que esta reacción depende del tiempo y de las concentraciones de L- $\alpha$ -aminoadipato, L-cisteína, ATP y  $Mn^{2+}$  ó  $Mg^{2+}$ . Así mismo, identificaron por medio de cromatografía de líquidos (HPLC) la presencia del dipéptido  $\beta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteína.

El tripéptido  $\beta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV) se forma por la condensación del dipéptido y el aminoácido valina por la acción de la enzima tripéptido sintetasa. López-Nieto, et al (5) han estudiado la formación del tripéptido ACV siguiendo la incorporación de ( $^{14}C$ ) valina y ac.  $\alpha$ -( $^{14}C$ ) aminoadípico en el ACV. La excelente incorporación de L-valina apoya la sugerencia de Adrians, et al (6) de que este aminoácido se incorpora al tripéptido en su forma isomérica L y se isomeriza a D-valina durante la biosíntesis.

El siguiente paso de la vía biosintética de penicilina se lleva a cabo por la presencia de la enzima isopenicilina N sintetasa que convierte el tripéptido ACV en isopenicilina N. Ramos, et al (7) han aislado y caracterizado esta enzima en *P. chrysogenum* AS-F-78.

En el último paso de la formación de penicilina, donde la cadena lateral de ácido  $\alpha$ -aminoadípico es intercambiada por el ácido fenilacético para la síntesis de penicilina G o bencilpenicilina,

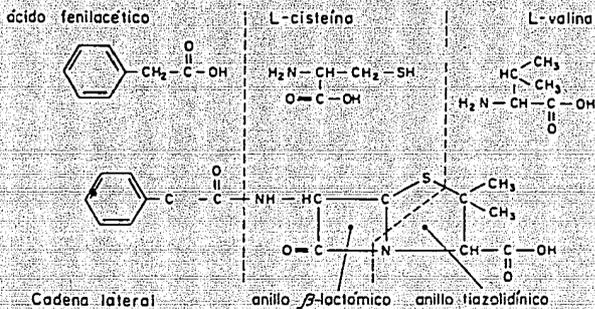


FIG. 1. Estructura básica de la penicilina (penicilina G).



interviene una aciltransferasa que se ha encontrado en extractos crudos de *F. chrysogenum* (8).

Se puede observar en la figura 2 que los eventos finales en la biosíntesis del antibiótico implican la formación de los anillos  $\beta$ -lactámico y tiazolidínico de la molécula.

Como sucede con otros metabolitos secundarios, este antibiótico se sintetiza en la fase tardía del crecimiento microbiano o idiofase y por esta razón a este grupo de compuestos se les conoce con el nombre de idiolitos (Fig 3).

Existen muchos factores que determinan la cantidad del producto que va a ser sintetizado en cualquier proceso microbiológico. Para determinar cuales son los componentes del medio de fermentación que pueden limitar potencialmente la síntesis de un metabolito es importante conocer los precursores a partir de los cuales se forma la molécula así como la forma en que éstos se ensamblan en la estructura final.

La biosíntesis de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos es más activa a bajas velocidades de crecimiento (9 y 26). La disminución de la velocidad específica de crecimiento en una fermentación puede obtenerse por limitación de la fuente de carbono, nitrógeno y en algunos casos de fósforo.

La importancia del metabolismo de carbono sobre la biosíntesis de penicilina se reconoció aun antes de que fuera viable un proceso de fermentación sumergida para la producción de este antibiótico. Moyer, et al (cit en 10) determinaron en un cultivo de superficie de *F. notatum* que la glucosa y la sacarosa no favorecían altos rendimientos de penicilina, como aquellos carbohidratos que se metabolizaban más despacio, como lactosa y almidón. Más tarde, en una fermentación sumergida a nivel de laboratorio se confirmó que la lactosa favorecía altos rendimientos del antibiótico al compararla con glucosa como fuente de carbono.

Posteriormente se observó que la glucosa podía favorecer altos títulos de penicilina pero solamente cuando se agregaban en bajas concentraciones al inicio o en adiciones consecutivas durante el curso de la fermentación (10). Estos resultados, iniciales y empíricos, sugerían con gran fuerza la existencia de un fenómeno regulador por fuente de carbono.

Los compuestos nitrogenados también juegan un papel importante sobre el crecimiento de los microorganismos y la producción de antibióticos.

Los esfuerzos para desarrollar un proceso de fermentación sumergida para la producción de penicilinas se centró en la búsqueda de las fuentes nitrogenadas apropiadas. Se evaluaron un gran número de materias primas y se concluyó que el licor de maíz (subproducto de la molienda del maíz) y la harina de soya favorecían los más altos títulos de penicilina. El licor de maíz

### *Penicillium chrysogenum* NRRL-1951

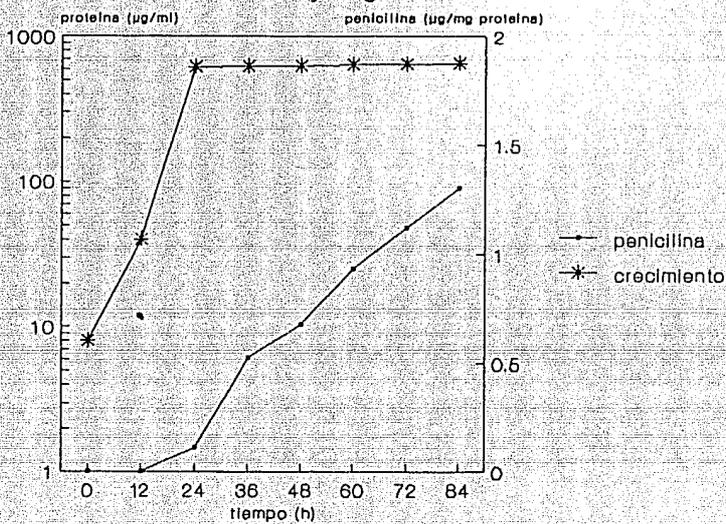


FIGURA 3. Cinética de crecimiento y producción de penicilina en *Penicillium chrysogenum* NRRL-1951 con cloruro de amonio 10 mM como fuente de nitrógeno.

contiene una gran variedad de péptidos solubles, sales minerales, ácido láctico y otros productos de bajo peso molecular, estos componentes proporcionan el nitrógeno orgánico mas fácilmente asimilable para ser utilizado durante el crecimiento de la cepa de Penicillium. La harina de soya es una materia prima proteica que es metabolizada lentamente durante la fermentación y contribuye así al abastecimiento lento de nitrógeno orgánico durante la síntesis del antibiótico.

Debido a problemas operacionales con estas materias primas se intentó reemplazarlas por materiales mas baratos y de composición constante que simularan el efecto de ambos productos.

Se estudiaron sales inorgánicas de amonio que se metabolizan rápidamente durante la fase de crecimiento y se observó que podían utilizarse para obtener altos rendimientos de células pero que no favorecerían niveles aceptables de antibiótico cuando se utilizaban como única fuente de nitrógeno.

La regulación por amonio de la síntesis de antibióticos se ha observado no sólo en la producción de penicilina sino también en otros microorganismos productores de metabolitos secundarios (9 y 11).

Considerando la estructura química de la penicilina y que su producción se ve influenciada por las condiciones nutricionales es predecible que el control de su formación puede llevarse a cabo por la regulación bioquímica que afecta la biosíntesis de sus aminoácidos precursores.

Por otra parte, Martin, et al (9) han propuesto dos modelos para explicar el retraso en el inicio de la síntesis de antibióticos hasta que la fuente de carbono, nitrógeno o fósforo alcanza niveles que no afecten esta síntesis:

1) Un efector de bajo peso molecular actúa como un correpresor o inhibidor, reprimiendo la formación o inhibiendo la actividad de las sintetetasas del antibiótico. El correpresor o inhibidor debe degradarse antes que la síntesis comience.

2) un inductor o activador debe ser sintetizado por el organismo o adicionado al medio de cultivo para que la síntesis pueda iniciarse.

El estudio de estos mecanismos de control metabólico son interesantes y útiles ya que al adquirir un mayor conocimiento del metabolismo de los microorganismos productores de estos compuestos podemos obtener mejores rendimientos en la producción de los mismos.

En la síntesis de la penicilina intervienen moléculas nitrogenadas como son los aminoácidos ácido  $\alpha$ -aminoadípico, cisteína y valina; por esta razón es predecible que su biosíntesis esté sujeta a mecanismos de regulación que influyan su formación y la de los aminoácidos precursores.

Además, como en otros metabolitos secundarios y en especial ciertos antibióticos, la regulación por la fuente de nitrógeno tiene un papel importante en su biosíntesis.

Este fenómeno se ha estudiado en diferentes sistemas microbianos (4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18); entre otros, los microorganismos productores de antibióticos como cefalosporina y cefamicina cuyas estructuras químicas son muy similares a la de penicilina (FIG 4).

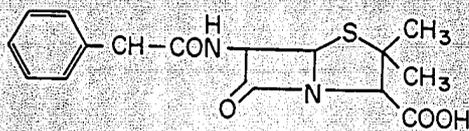
Los trabajos sobre este tema han sido realizados por Queener, et al. en *Cephalosporium acremonium* (12) y Aharonowitz, et al., en *Streptomyces clavuligerus* para cefalosporina (11). Recientemente Romero, et al y Castro, et al. han estudiado este fenómeno en cefamicina utilizando *S. clavuligerus* y *S. lactamdurans* (13 y 14).

La regulación nitrogenada de la síntesis de penicilina en *E. chrysogenum* también ha sido estudiada bajo diferentes condiciones experimentales (4, 15, 18 y 19). Sánchez, et al observaron que cuando el microorganismo crecía en altas concentraciones de amonio (85 mM) la formación de antibiótico disminuía a la mitad, a diferencia de cuando crecía en bajas concentraciones de amonio (8.5 mM). En esta máxima condición la concentración intracelular de los aminoácidos glutámico (glu) y glutamina (gln) aumentaban al final de la trofofase. Sin embargo cuando el medio de cultivo contenía 85 mM de amonio, se inhibía la síntesis de glutamina sintetasa (GS) disminuyendo la poza de gln y aumentando la de glu (15). Estos fenómenos sugerían una posible interrelación entre la presencia de estos aminoácidos y la formación de penicilina.

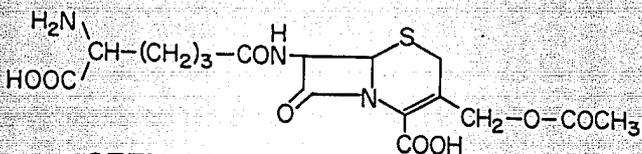
Los efectos fisiológicos de altas concentraciones de glutamina han sido explorados por Maleos, et al, quienes encontraron que una concentración de 10 mM de este aminoácido inhibe la formación de penicilina en un medio de células en reposo con adición de cicloheximida para prevenir la síntesis de proteínas. Estos autores estudiaron también el efecto de glutamina sobre la  $\delta$ -(L-aminoadipil)-L-cisteína sintetasa, que cataliza al primer paso de la biosíntesis de penicilina y no observaron ningún efecto sobre su actividad (19).

Por otro lado, Lara, et al, publicaron que el glutamato estimula la síntesis del antibiótico en micelio de *E. chrysogenum* que ha sido cosechado durante la idrofase y resuspendido en un medio de formación de antibiótico (4). Estos autores han demostrado también que el glutamato induce la enzima  $\delta$ -(L-aminoadipil)-L-cisteína sintetasa.

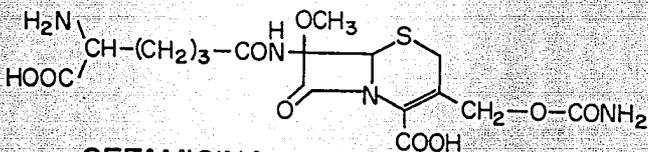
Debido a que existe una gran semejanza entre la estructura química del dipeptido  $\delta$ -(L-aminoadipil)-L-cisteína y el dipeptido  $\gamma$ -glutamil-cisteína, que es el intermediario en la síntesis del glutatión (FIG 5), se ha considerado la posibilidad de que ambos dipeptidos sean sintetizados por una misma enzima.



**PENICILINA G**



**CEFALOSPORINA**



**CEFAMICINA**

FIGURA 4. ESTRUCTURAS QUIMICAS DE PENICILINA G, CEFALOSPORINA Y CEFAMICINA



Meister, et al encontraron que la enzima  $\gamma$ -glutamyl-cisteina sintetasa extraída de tejido bovino usaba como sustrato L- $\alpha$ -aminoácido aunque la actividad era muy baja (alrededor del 1%) (20).

Kaszab et al pensaron que en *E. chrysogenum* la especificidad por este sustrato podría ser distinta y aislaron y purificaron la enzima de este organismo para estudiar sus propiedades (21). Desafortunadamente estos investigadores no publicaron formalmente los resultados que parecían apoyar esta suposición.

Castro, et al en sus estudios sobre regulación de las enzimas involucradas en la biosíntesis de cefamicina han observado que la concentración intracelular de ACV disminuye drásticamente en presencia de amonio al igual que la poza de glutatión, que es un análogo del ACV (14). Esto hace suponer que probablemente exista una relación entre ambos compuestos.

Por otra parte, Ramos, et al han demostrado que en *E. chrysogenum* está presente un fenómeno de inhibición competitiva por glutatión sobre la enzima isopenicilina N sintetasa, la responsable de formar el anillo  $\beta$ -lactámico a partir del tripeptido (7).

Debido a que el ácido glutámico puede ser el donador de grupos amino para la síntesis de los tres aminoácidos que forman la molécula de penicilina (33) (Fig 6) y considerando que este aminoácido induce la formación del antibiótico, es probable que cualquier evento que regule la síntesis del ácido glutámico incida en la formación de penicilina.

Por esta razón fué interesante para nosotros estudiar los niveles de la enzima glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH (GDH-NADPH) (EC:1.4.1.4.) ya que probablemente el aumento de la poza de ácido glutámico sea directamente proporcional a esta actividad enzimática.

La GDH-NADPH ocupa una posición estratégica en el metabolismo nitrogenado ya que cataliza la reacción de síntesis de glutamato asimilando así el ión amonio utilizado en el medio de cultivo como fuente de nitrógeno (Fig 7).

En otros microorganismos Queener, et al y Grafe, et al han estudiado este fenómeno interpretando que la causa de la elevación en la poza de glutamato en cepas hiperproductoras se debe a diferentes niveles de actividad de la enzima GDH-NADPH (12 y 16). Queener ha sugerido también que el incremento de actividad de esta enzima podría evitar el efecto negativo del amonio al eliminarlo del medio de cultivo a través de la formación de ácido glutámico (12).

Jaklitsch, et al, han estudiado este fenómeno en tres cepas de *E. chrysogenum* con diferentes niveles de producción de antibiótico y están de acuerdo en que se necesita una poza elevada de glutamato para inducir las enzimas involucradas directamente en convertir los precursores de aminoácidos en penicilina pero también indican

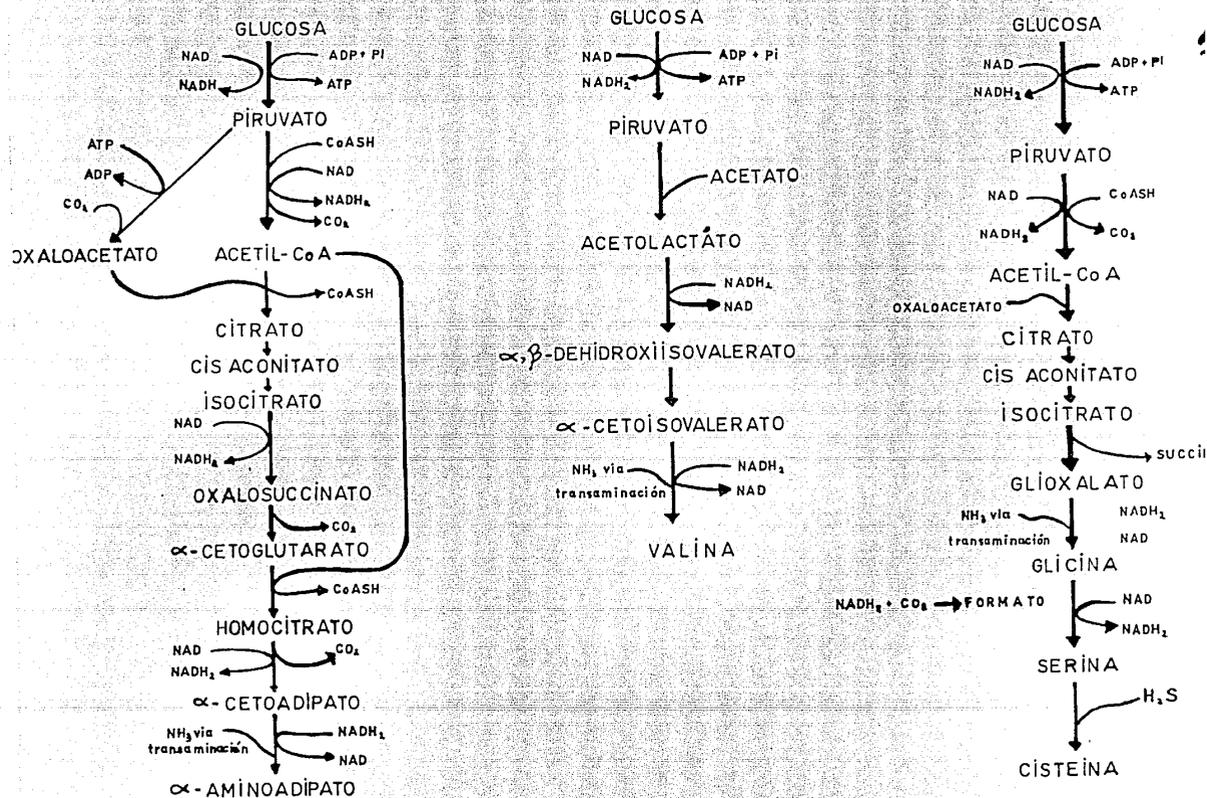


FIGURA 6. VIAS BIOSINTÉTICAS DE LOS AMINOÁCIDOS QUE FORMAN LA MOLECULA DE PENICILINA

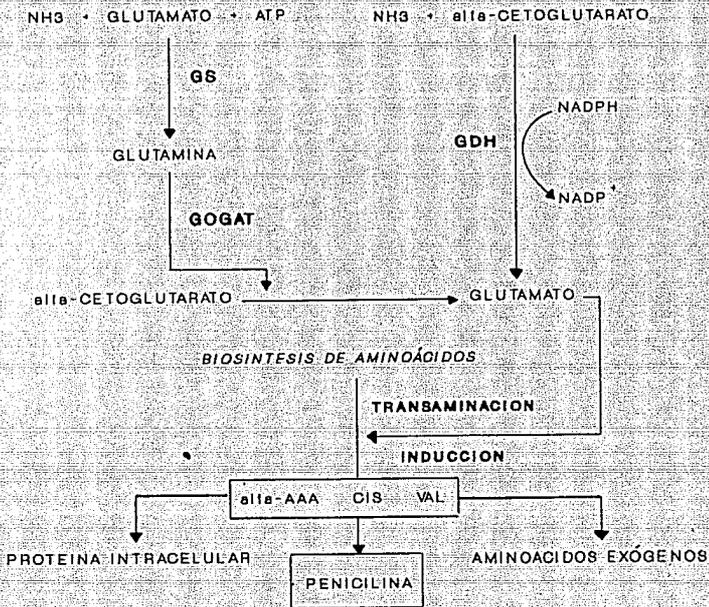


FIGURA 7. Posibles interacciones de la biosíntesis de penicilina con el metabolismo nitrogenado

que el aumento de esta poza no es suficiente para esta inducción en las tres cepas utilizadas en su estudio (18).

Como los estudios realizados por Lara et al, se hicieron utilizando cultivos cosechados durante la idiofase y resuspendidos en un medio de formación de antibiótico conteniendo las fuentes de nitrógeno correspondientes, nosotros estudiamos el efecto de glutamato utilizando cultivos en medio de producción a los que se les añadió a las 36 horas el aminoácido en una concentración de 10 mM con el fin de observar si el efecto de inducción se llevaba a cabo también en estas condiciones (FIG. 8).

Los resultados obtenidos fueron los mismos y por esta razón utilizamos ese medio para estudiar la relación entre la actividad de la GDH-NADPH, la presencia de ácido glutámico en el medio y la producción de penicilina (FIG 8).

# *Penicillium chrysogenum* NRRL-1951

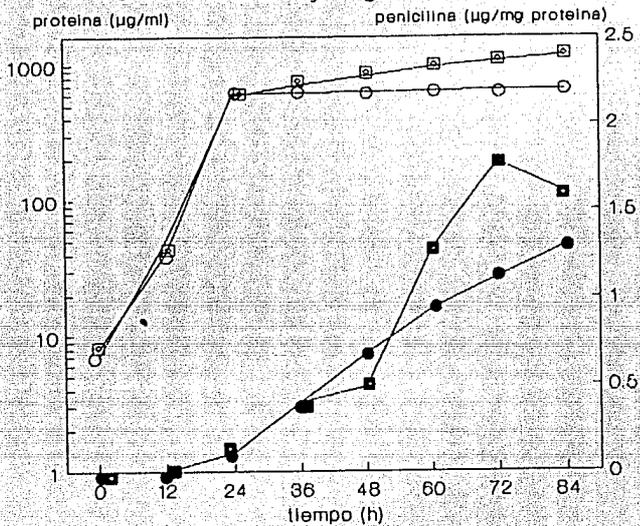


FIGURA 8. Cinética de crecimiento y producción de penicilina en amonio 10 mM (○, ●) y adición de ácido glutámico 10 mM a las 36 horas (□, ■).

## MATERIAL Y METODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

A. Penicillium chrysogenum NRRL-1951. La cepa productora de penicilina, fué proporcionada por el Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Ill. U.S.A.

B. Sarcina lutea NRRL-B-1018. La cepa sensible a penicilina utilizada para la medición del antibiótico, fué proporcionada por el Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Ill. U.S.A.

C. Penicillium chrysogenum gdh-A1. Cepa obtenida en este trabajo después de mutagenizar esporas de la cepa de P. chrysogenum NRRL-1951. (ver obtención de la cepa mutante de P. chrysogenum gdh-A1 en resultados).

### MEDIOS DE CONSERVACION DE LAS CEFAS.

A. Las cepas de P. chrysogenum utilizadas se conservaron en un medio de cultivo con la siguiente composición por 1 litro de agua destilada: Peptona 10.0 g, dextrosa 20.0 g, extracto de levadura 1.0 g y agar 15.0 g.

B. La cepa de Sarcina lutea se conservó en un medio con la siguiente composición por 1 litro de agua destilada: Peptona 6.0 g, extracto de levadura 3.0 g, extracto de carne 1.5 g y agar 15.0 g.

### MEDIO PARA EL ENSAYO MICROBIOLÓGICO

La composición de este medio es la misma que se utilizó para la conservación de S. lutea.

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

La mezcla de sales inorgánicas utilizada para los medios de cultivo y producción de P. chrysogenum se preparó según los estudios de Jarvis y Johnson (22) pero diez veces más concentrada (10X). Su composición es la siguiente:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.10 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.005 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.02 g,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.02 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05 g, y agua destilada c.b.p. 1000 ml.

## MEDIO DE PRODUCCION DE PENICILINA

La composición del medio para producción de penicilina es la siguiente:

Sales J. J. 10X	100.0 ml
Acido fenil acético	0.5 g
Cloruro de amonio*	0.53 g
Acetato de sodio	3.20 g
Lactosa**	30.0 g
Glucosa**	10.0 g
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml

El pH del medio se ajusta a un valor de 6.8 -6.9 con hidróxido de sodio 10 N.

- \* Representa una concentración de 10.0 mM
- \*\* Se esterilizan separadas del medio de cultivo.

## MEDIO DE FORMACION DE ANTIBIOTICO (MFA)

Este medio se prepara con la mezcla de sales de Jarvis y Johnson, suplementada con 83 mM de lactosa, 3.6 mM de ácido fenilacético y 10 mM de la fuente de nitrógeno que se desea estudiar (4).

## CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE PENICILINA

Los cultivos de producción se inocularon con una suspensión de esporas de *P. chrysogenum* con una densidad óptica de 1.5 a 540 nm. Esta suspensión se inoculó al 2% (v/v) a 50 ml de medio de producción contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 ml. (En algunas ocasiones la capacidad de los matraces era mayor pero siempre se mantuvo la misma relación entre el tamaño del matraz y el volumen del medio de cultivo). Los matraces se incubaron a 29°C con agitación rotatoria a 150 rpm.

Se tomaron muestras cada 12 horas durante el proceso fermentativo y se determinó crecimiento a través de la medición de proteína, antibiótico y otras variables según el objetivo de cada experimento.

## MEDICION DE CRECIMIENTO

Para medir el crecimiento se procedió de la siguiente forma:

De cada cultivo se tomó una muestra de 2 ml, se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 1 ml de ácido tricloroacético al 5% y se homogeneizó mecánicamente en un aparato modelo K45 de tri-R - Instruments a velocidad 2. Se adicionó 1 ml de ácido tricloroacético al tubo de homogeneización

con el fin de recuperar la proteína residual. El homogeneizado se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 1 ml de hidróxido de sodio 0.4 N y se midió la proteína por el método de Lowry (23), utilizando como patrón una solución de albúmina sérica bovina.

#### MEDICION DEL ANTIBIOTICO

En el caldo de cultivo de las muestras obtenidas se midió la concentración de penicilina por el método de difusión en agar con *Sarcina lutea* como microorganismo de prueba.

Se utilizó una curva patrón de bencil-penicilina en un rango analítico de concentración de 0.1 a 1 µg/ml de concentración.

#### MEDICION DE AMONIO RESIDUAL

En el sobrenadante de las muestras obtenidas se midió la concentración de amonio por el método de Weatherburn (24) utilizando cloruro de amonio como patrón.

#### MEDICION DE LA POZA DE ACIDO GLUTAMICO

El ácido glutámico se extrajo a partir de células cosechadas en las diferentes etapas de la fermentación, se separó en un analizador de aminoácidos (Aminco, Silver Springs, MD, 20852) y se cuantificó por radiofluorometría (Aminco) después de una reacción de acoplamiento con aldehído O-ftálico (36).

#### MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTAMATO DESHIDROGENASA DEPENDIENTE DE NADPH (GDH-NADPH) (EC 1.4.1.4).

a) Preparación del extracto enzimático: El micelio se cosechó por filtración, se lavó dos veces con agua destilada y se deshidrató con acetona. Los polvos obtenidos se congelaron y la medición de la actividad se llevó a cabo después de recolectar el micelio correspondiente a los tiempos planeados en el experimento. En la mayoría de los casos se tomaron muestras cada 12 horas aproximadamente durante 96 horas. Para estos cultivos se utilizaron matraces Fernbach con 500 ml de medio de producción.

Posteriormente los polvos se suspendieron en un volumen de solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 N, pH 8.0. La relación utilizada para las 12 y 24 horas fue de 1.5 g de micelio en 20 ml de solución amortiguadora. Para las siguientes muestras se utilizó una relación 1:20. Las células contenidas en esa suspensión se desintegraron en un homogeneizador Braun MSK tipo B53030. Las estructuras celulares se separaron por centrifugación a 15,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se separó y se midió la actividad enzimática inmediatamente.

La proteína de los extractos se midió por el método de Lowry (23).

b) Medición de la actividad enzimática: La actividad se determinó por medio de la oxidación del fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH) midiendo el cambio en absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman. La mezcla de reacción contiene: cloruro de amonio 28 mM, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico 6.7 mM, NADPH 0.28 mM y extracto enzimático correspondiente a 0.5-1.0 mg de proteína, en un volumen final de 1.0 ml de Tris-HCl 0.1 M pH 8.0. La actividad específica se expresó en  $\mu$ moles/mg de proteína/minuto.

#### MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTAMINO SINTETASA (EC 6.3.1.2.).

a) La preparación del extracto enzimático se llevó a cabo de la misma manera que para la enzima glutamato deshidrogenasa excepto que la solución amortiguadora utilizada es de fosfatos 0.1 M, pH 7.6.

La proteína de los extractos se midió por el método de Lowry (23).

b) Para la medición de la actividad enzimática se siguió el método de Ferguson y Sims (34).

#### MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUTAMATO SINTASA (EC 1.4.7.1.).

a) La preparación del extracto enzimático se llevó a cabo de la misma manera que para la enzima glutamino sintetasa.

La proteína de los extractos se midió por el método de Lowry (23).

b) Para la medición de la actividad enzimática se siguió el método de Meers, et al (35).

#### OBTENCION DE LA CEPA MUTANTE DE *E. chrysogenum* gdh-A1.

Para obtener una cepa mutante de *E. chrysogenum* con una actividad de GDH-NADPH nula o diferente a la de la cepa original se procedió de la siguiente forma:

a) Para llevar a cabo la mutagénesis se utilizó una suspensión de esporas de *E. chrysogenum* con 50  $\mu$ g/ml de N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina (NTG) durante 15 minutos.

La concentración del agente mutagénico fue elegida utilizando los resultados obtenidos para un trabajo anterior (R.C. Mateos, comunicación personal) en el que se realizó una curva de viabilidad celular con respecto al tiempo a diferentes concentraciones de NTG (FIG 9).

El tiempo de contacto con NTG se eligió utilizando la concentración de 50 µg/ml y analizando la auxotrofia y viabilidad celular a diferentes tiempos de contacto. Los resultados para este trabajo se muestran en la Figura 10.

b) El aislamiento de las colonias de interés se realizó en base a la sensibilidad de las células gdh- a altas concentraciones de amonio (36).

Con el fin de obtener un mayor número de células con alta probabilidad de carecer de la actividad de GDH-NADPH se utilizó un método de enriquecimiento basado en el hecho de que la asimilación de amonio en cultivos crecidos en 100 mM de este ión se lleva a cabo preferencialmente por esta enzima ya que la otra enzima involucrada, glutamino sintetasa (GS) tiene baja actividad en esas condiciones (15).

La suspensión de esporas mutagenizadas se cultivó en el medio de producción utilizando una concentración de amonio de 100 mM. El cultivo se filtró cada 12 horas a través de gasa con el fin de que las esporas germinadas quedaran atrapadas por su característica miceliar y las que no habían germinado probablemente por la carencia de la actividad de GDH-NADPH continuaran en el medio de cultivo. Este procedimiento se realizó 3 veces y después el cultivo se filtró por una membrana Millipore de 0.45 micras. Las esporas obtenidas se congelaron en una suspensión de glicerol al 20% para la posterior selección.

Selección de las mutantes: De la suspensión de esporas se hicieron diluciones hasta 10<sup>9</sup> y se platearon en el medio de conservación. Las colonias aisladas se transfirieron a los siguientes medios sólidos para su selección:

1. Medio de producción (MP) con 10.0 mM de cloruro de amonio.
2. MP con 100 mM de cloruro de amonio (M1).
3. MP con 100 mM de cloruro de amonio y 100 µg/ml de ácido glutámico (M2).
4. Medio completo (MC). Medio de conservación.

Las colonias seleccionadas fueron aquellas que crecieron en los medios MP y M2 y que no crecieron en el medio M1 debido al alto contenido de cloruro de amonio.

El medio M2 se utilizó porque probablemente las células que carecen de GDH-NADPH presentan una deficiencia de ácido glutámico aunque no sean estrictamente auxótrofas cuando son cultivadas en

altas concentraciones de amonio (100 mM) ya que la actividad de la enzima glutamino sintetasa es muy baja en esas condiciones.

El medio MC se utilizó para comprobar que en la técnica utilizada las esporas se inocularon en todos los medios y que la ausencia de crecimiento no se debe a un proceso de inoculación incompleta.

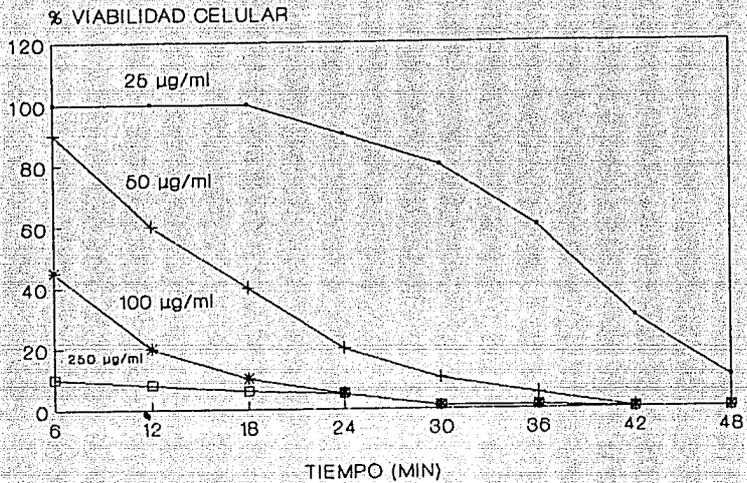


FIGURA 9: Cinética de viabilidad celular en suspensiones de células de *P. chrysogenum* expuestas a diferentes concentraciones de NTG.

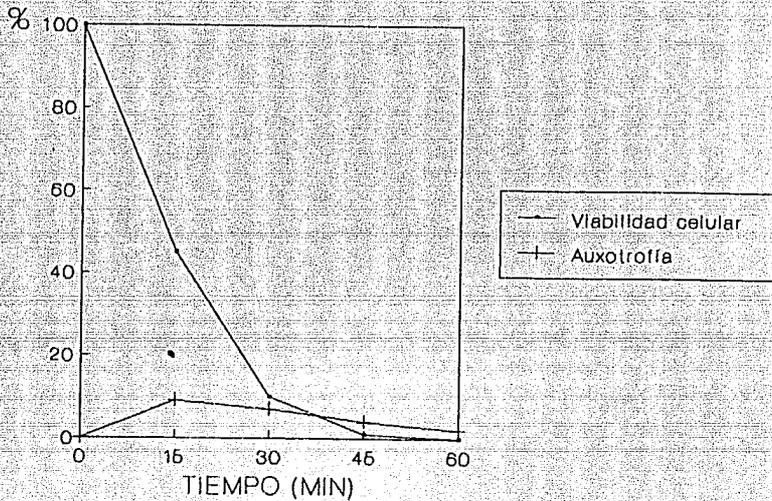


FIGURA 10. Cinética de viabilidad celular y auxotrofia en suspensiones de células de *P. chrysogenum* expuestas a 50  $\mu\text{g/ml}$  de NTG.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. OBTENCION DE LA CEPA MUTANTE DE *Penicillium chrysogenum* gdhA1.

Después de la selección de las cepas resultantes de la mutagénesis obtuvimos dos cepas que tuvieron el siguiente comportamiento:

Cepa	Crecimiento a las 48 horas			
	MP	M1	M2	MC
CM1	++	-	+	++
CM2	++	-	+	++
Silvestre	++	++	++	++

- significa ausencia de crecimiento.

+ significa que la cepa creció menos que la cepa silvestre y a menor velocidad.

++ significa que la cepa creció igual que la cepa silvestre.

Se obtuvo otro grupo de tres cepas que aún cuando crecieron en el medio M1 su crecimiento fue menor al de la cepa silvestre y éste se estimuló al estar presente en el medio de cultivo el ácido glutámico (CM3, CM4 y CM5).

Aunque estas cepas no debían presentar necesariamente alguna auxotrofia se hizo un análisis y ninguna de ellas requiere aminoácidos ni nucleótidos para su crecimiento.

Es interesante hacer notar que las cepas CM1 y CM2 que no crecieron en medio sólido con 100 mM de NH<sub>4</sub>Cl, si lo hicieron cuando se incubaron en este mismo medio en matraces Erlenmeyer con medio líquido y agitación constante. Aún así no alcanzaron el crecimiento de la cepa silvestre siendo menor su velocidad de crecimiento.

La cepa seleccionada para este estudio fue la CM1 a la que denominaremos gdhA1.

Esta cepa fue proporcionada al Doctor J.R. Kinghorn (Departamento de Genética, Universidad de Glasgow, Escocia), para su estudio genético. Estudios preliminares indican que esta cepa tiene una mutación estructural para la enzima GDH-NADPH. (S. Sánchez, comunicación personal).

## 2. CINETICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE PENICILINA

Las dos cepas de *P. chrysogenum* utilizadas en este estudio se cultivaron en el medio de producción de penicilina que contiene como fuente de nitrógeno cloruro de amonio en una concentración de 10.0 mM con el fin de comparar los niveles de producción del antibiótico.

La cepa silvestre utilizó el amonio entre las 0 y 36 horas de la fermentación, lo que coincidió con el inicio de la síntesis de la penicilina (Fig 11a). En la cepa *gdhA1* sin embargo, el amonio no fue consumido en su totalidad permaneciendo en el medio de cultivo durante toda la fermentación, notándose una disminución muy pequeña en la concentración de este compuesto después de las primeras 12 horas de cultivo (FIG 11b).

El punto más interesante es que la cepa *gdhA1* no produjo antibiótico en estas condiciones aún después de haber alcanzado la fase estacionaria.

El crecimiento de la mutante es lento y apenas alcanza su fase estacionaria a las 60 horas, 36 horas después que la cepa silvestre.

## 3. CINETICA DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA Y POZA DE ACIDO GLUTAMICO.

En la cepa silvestre, la actividad de GDH se incrementa hasta un valor de 3.5  $\mu$ moles/mg proteína/min a las 12 horas de cultivo, probablemente porque se encuentra la mayor concentración de cloruro de amonio. Posteriormente la actividad específica declina cuando el microorganismo entra en la idiofase, pero nunca llega a niveles bajos a pesar de que el microorganismo lleva 24 horas de estar en fase estacionaria, inclusive a las 60 horas se vuelve a incrementar ligeramente la actividad de GDH.

La poza de ácido glutámico correlaciona con el perfil de la enzima teniendo un máximo a las 12 horas y después disminuye gradualmente (FIG 12a).

La mutante presenta un perfil diferente al de la cepa silvestre, ya que tiene una máxima actividad de GDH-NADPH a las 36 horas, tiempo en el cuál el microorganismo está en plena fase exponencial, sin embargo, la actividad específica es aproximadamente la mitad de la de la cepa NRRL-1951.

La poza de glutámico no correlaciona en este caso con la actividad aunque corresponde a la mitad de la concentración de la cepa silvestre a las 12 horas (FIG 12 b).

Sin embargo a las 36 horas que es cuando se observa también la máxima actividad de la enzima GDH-NADPH para la cepa *gdhA1*, la

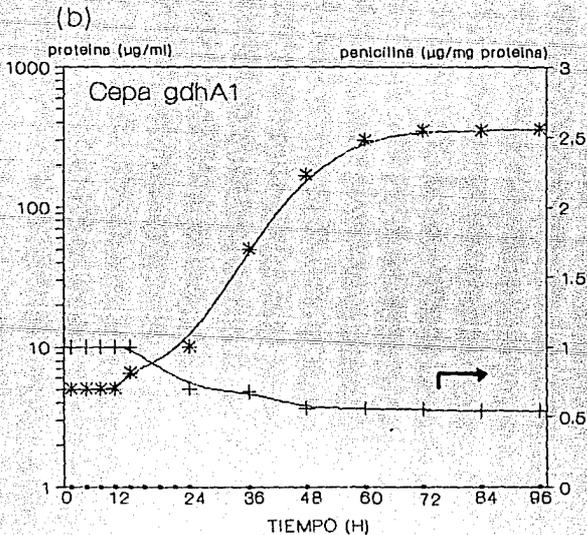
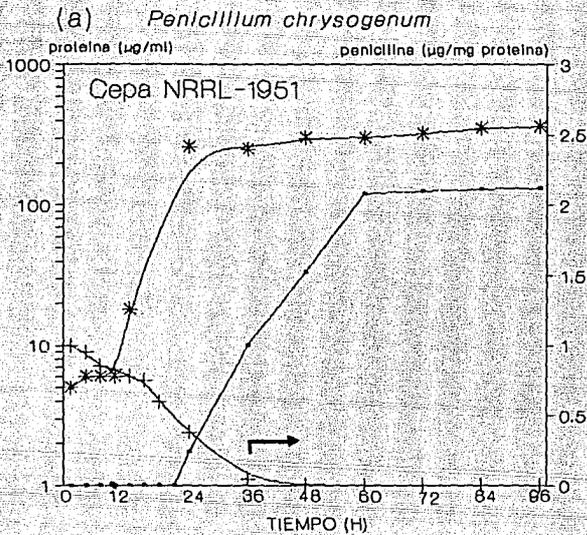


FIGURA 11. Cinética de crecimiento (X), producción de penicilina (•) y amonio extracelular ( $\times 10$  mM) (+).

Ambas cepas fueron crecidas en medio de producción con cloruro de amonio (10 mM) como fuente de nitrógeno.  
 (a) cepa NRRL-1951 y (b) cepa gdhA1.

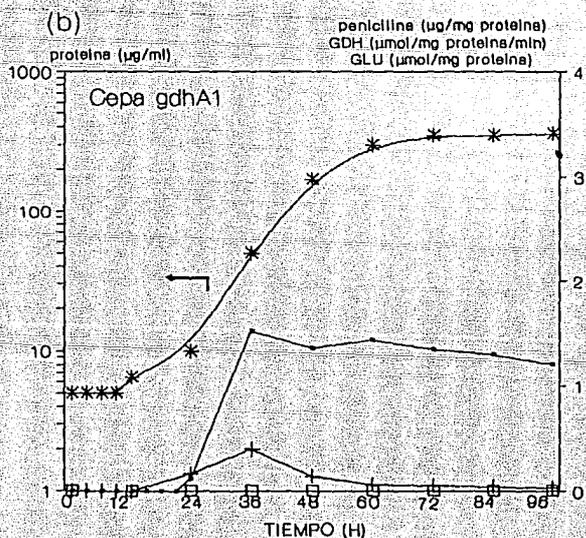
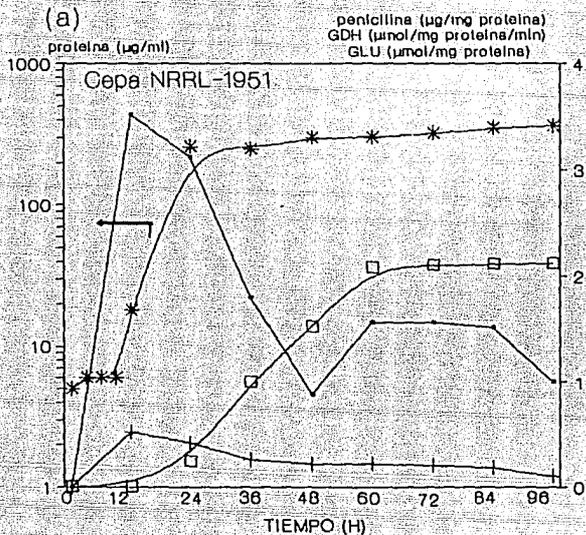


FIGURA 12. Cinética de crecimiento (X), actividad de GDH (•), poza de glutamato (+) y penicilina (□).  
 Ambas cepas fueron crecidas en medio de producción con cloruro de amonio (10 mM) como fuente de nitrógeno.  
 (a) cepa NRRL-1951 y (b) cepa gdhA1.

concentración de glutamato es de 77 % de la concentración de este aminoácido para la cepa silvestre en esas condiciones (0.52 vs 0.40  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteína).

Estos resultados sugieren que no sólo es importante la concentración de glutamato sino que ambos eventos parecen estar relacionados con la síntesis del antibiótico: una poza elevada de ácido glutámico y la presencia de actividad de la enzima GDH-NADPH.

Al observar que la cepa *gdhA1* no consumía la mayor parte del amonio adicionado al medio de cultivo cabía la posibilidad de que la cepa tuviera algún problema con el transporte de amonio al interior de la célula.

Para comprobar si podía crecer y producir antibiótico utilizando otra fuente de nitrógeno inorgánico, se cultivaron ambas cepas en el medio de producción sustituyendo el cloruro de amonio por nitrato de sodio a la misma concentración (10 mM).

#### 4. CINETICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE PENICILINA UTILIZANDO NITRATO DE SODIO COMO FUENTE DE NITROGENO.

En la cepa silvestre crecida utilizando nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, se observa un retraso en la producción de penicilina (FIG 13a) aunque el crecimiento no se altera en relación al obtenido en cloruro de amonio.

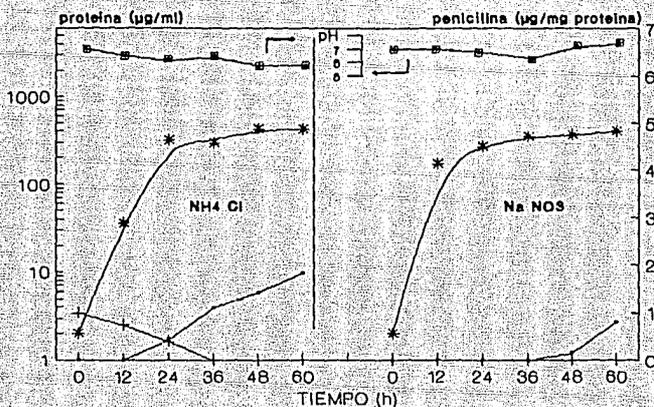
Esto sugiere que las enzimas nitrato y nitrito reductasas están funcionando para la producción intracelular de amonio y probablemente el retraso en la producción de penicilina en estas condiciones podría explicarse por una concentración de amonio intracelular alta que permita un buen crecimiento pero que afecte la síntesis del antibiótico como sucede al crecer *P. chrysogenum* en altas concentraciones de amonio.

La cepa *gdhA1* crece mejor que en el medio con cloruro de amonio cuando se utiliza nitrato de sodio, sin embargo, presenta una curva bifásica (FIG 13b).

Aún cuando el crecimiento es mejor no se observa la producción de penicilina.

A partir de las 24 horas de fermentación, esta cepa comienza a excretar amonio al medio de cultivo en concentraciones importantes que alcanzan hasta 5 mM aproximadamente a las 60 horas. Esto nos sugiere que la cepa *gdhA1* incorpora el nitrato de sodio pero que al no poder canalizar el amonio en altas concentraciones hacia la formación de aminoácidos como glutamato y glutamina comienza a excretarlo al medio de cultivo.

(a) *Cepa NRRL-1951*



(b) *Cepa gdhA1*

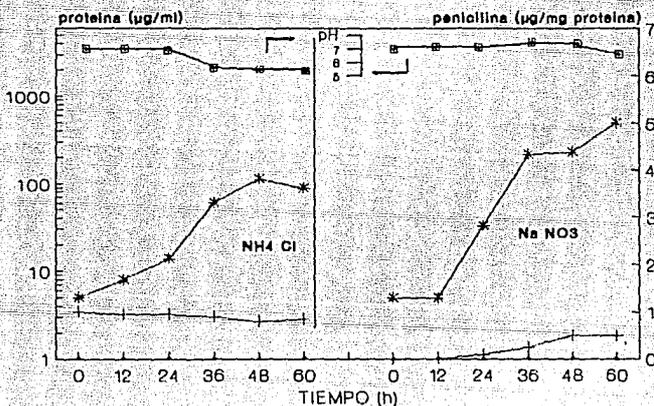


FIGURA 13. Cinética de crecimiento (×), producción de penicilina (•) y amonio extracelular (+) (10XmM).

Ambas cepas fueron crecidas en medio de producción con cloruro de amonio (10 mM) y nitrato de sodio (10mM) como fuentes de nitrógeno. (a) cepa NRRL-1951 y (b) cepa gdhA1.

## 5. EFECTO DEL ACIDO GLUTAMICO EN EL CRECIMIENTO, PRODUCCION DE PENICILINA Y ACTIVIDAD DE GDH-NADPH DE LAS CEPAS NRRL-1951 Y gdhA1.

Al inicio de este trabajo se presentaron los resultados obtenidos al adicionar ácido glutámico al inicio de la fase estacionaria de un cultivo de *P. chrysogenum* NRRL-1951 crecido utilizando 10 mM de cloruro de amonio en el medio de cultivo.

Con el fin de conocer el efecto del ácido glutámico sobre la síntesis de penicilina al inicio de la fermentación se sustituyó el cloruro de amonio del medio de cultivo por ácido glutámico en una concentración de 10 mM.

A partir de la observación de un efecto estimulador de la síntesis de penicilina en estas condiciones, era interesante conocer el comportamiento de esta cepa al sustituir desde el inicio la fuente de nitrógeno por ácido glutámico.

Para llevar a cabo este experimento utilizamos el medio de producción con 10 mM de ácido glutámico al inicio de la fermentación y utilizando adiciones cada 12 horas hasta 36 horas de este mismo aminoácido (FIG 14a y FIG 14b).

En presencia de este aminoácido adicionado como única fuente de nitrógeno la síntesis de penicilina se retrasa hasta las 60 horas aunque la velocidad de formación del antibiótico parece aumentar. Sin embargo, hasta las 84 horas no alcanza el nivel obtenido en el control (10.0 mM de cloruro de amonio) (FIG 14a). Así mismo, la actividad de GDH-NADPH fue mucho menor, recuperándose a partir de las 36 horas.

En presencia de ácido glutámico adicionado como única fuente de nitrógeno y adicionándolo a las 0, 12, 24 y 36 horas del cultivo, la síntesis de penicilina no sólo se retrasa hasta las 60 horas sino que se mantiene a un nivel muy bajo (diez veces menos que el control) (FIG 14a).

De la misma forma, la actividad de GDH-NADPH es mucho menor y a las 60 horas de fermentación ya no se detecta (FIG 14b).

En estos dos casos, no hay diferencias en el crecimiento ni tampoco en el pH del medio de cultivo en ninguna de las dos condiciones.

Estas observaciones sugieren que la actividad de GDH-NADPH es afectada por la concentración de ácido glutámico ya que este es el producto final de la reacción.

Sin embargo, sabemos que el ácido glutámico tiene un efecto estimulador sobre la síntesis de penicilina, cuando se añade al inicio de la fase estacionaria. Analizando los resultados obtenidos podríamos pensar que la presencia de este aminoácido no es un evento único para ejercer el efecto estimulador.

Una posibilidad es que al ser adicionado al inicio de la fermentación el aminoácido se utilice para la formación de las

proteínas necesarias para el crecimiento y que sea necesario que la célula esté en las condiciones que se presentan en el inicio de la fase estacionaria.

Otra posibilidad que debemos tener en mente es que cuando adicionamos ácido glutámico como fuente de nitrógeno, no podemos olvidar la relación que este compuesto tiene con el metabolismo de carbono y la interrelación de ambos metabolismos.

Existen evidencias en estudios realizados con *Aspergillus nidulans* (38) de que la presencia o ausencia de glucosa en el medio de cultivo tiene efecto en las actividades de las enzimas GDH-NADPH y GDH-NAD. En este estudio la actividad de GDH-NADPH se pierde en un medio que carece de glucosa y esta pérdida es más rápida cuando el glutamato está presente. Por otra parte, la actividad de GDH-NAD se incrementa de 5 a 8 veces durante el crecimiento del cultivo utilizando glutamato como única fuente de nitrógeno.

Para poder comparar el comportamiento en estas condiciones entre las dos cepas, la NRRL-1951 y la *gdhA1* realizamos este mismo experimento con la cepa mutante.

Los resultados se muestran en las Figuras 15a y 15b.

El hecho más interesante es que en todas las condiciones en que se adicionó ácido glutámico al medio de cultivo la cepa *gdhA1* produjo penicilina. Estos resultados sugieren que el ácido glutámico está involucrado en la síntesis del antibiótico.

Cuando el ácido glutámico se adicionó a las 0, 12, 24 y 36 horas se observó el mayor crecimiento aunque la producción de antibiótico fue tardía y el nivel más bajo de todas las condiciones.

Cuando se añadió al inicio del cultivo la producción de penicilina fue mayor aunque el nivel de producción es 3 veces menor al de la cepa silvestre y se observa un desfaseamiento con respecto a la fase de crecimiento.

Para conocer si en esta cepa se presentaba el efecto estimulador que se observa en la cepa silvestre al adicionar glutámico a las 36 horas (inicio de la fase estacionaria), se realizó un experimento con la cepa *gdhA1* adicionando el aminoácido a las 60 horas (inicio de la fase estacionaria), sin embargo aunque se analizaron muestras hasta las 132 horas no se observó la producción del antibiótico. El crecimiento fue similar al control hasta las 96 horas pero después declinó rápidamente.

En esta cepa no se detectó actividad de GDH-NADPH cuando se cultivó en medio al que se le adicionó ácido glutámico en múltiples adiciones (0, 12, 24 y 36 horas).

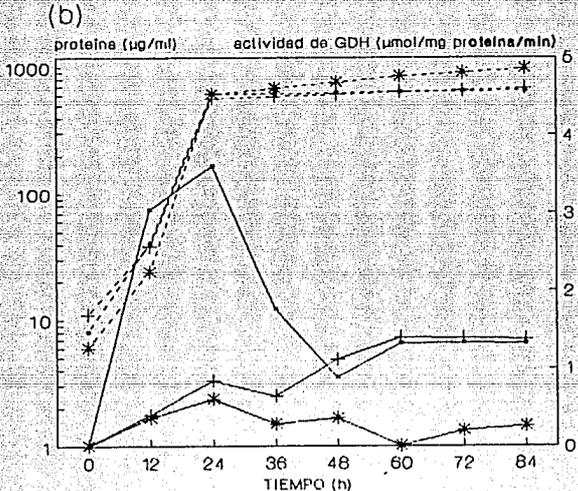
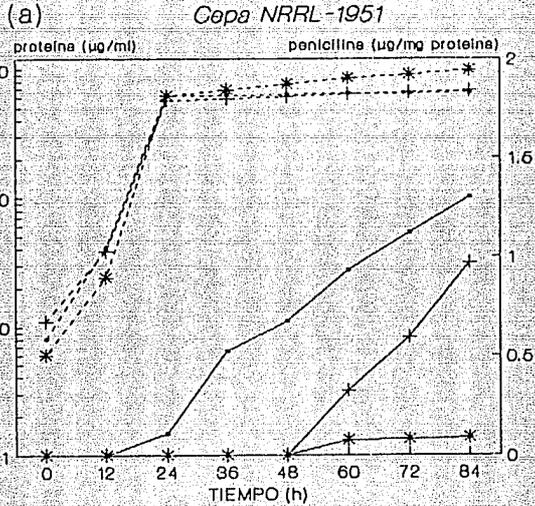


Figura 14a. Cinética de crecimiento (---) y producción de penicilina (—). La cepa NRRL-1951 fue crecida en medio de producción con cloruro de amonio 10 mM (\*), con glutamato 10 mM (X) y adicionando glutamato 10 mM a las 0, 12, 24 y 36 horas (X).

Figura 14b. Cinética de crecimiento (---) y actividad de GDH-NADPH (—). La cepa NRRL-1951 fue crecida en medio de producción con cloruro de amonio 10 mM (\*), con glutamato 10 mM (X) y adicionando glutamato 10 mM a las 0, 12, 24 y 36 horas (X).

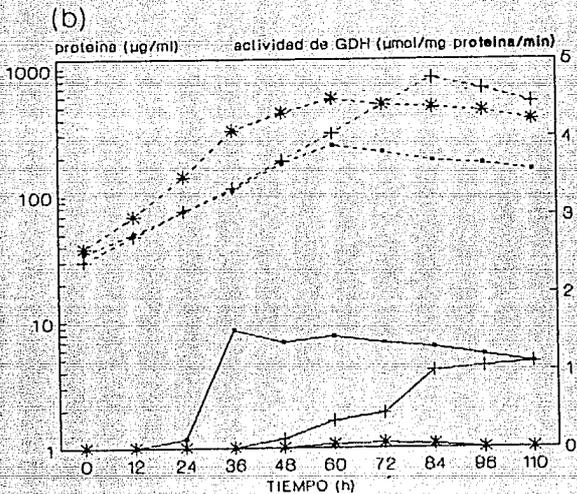
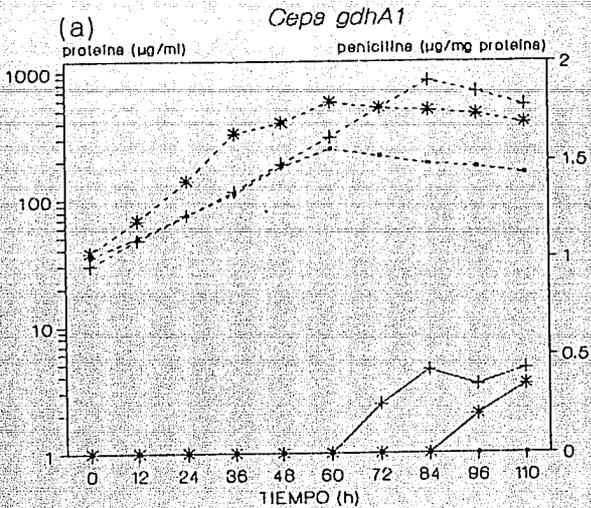


Figura 15a. Cinética de crecimiento (---) y producción de penicilina (—). La cepa *gdhA1* fue crecida en medio de producción con cloruro de amonio 10 mM (\*), con glutamato 10 mM (•) y adicionando glutamato 10 mM a las 0, 12, 24 y 36 horas (X).

Figura 15b. Cinética de crecimiento (---) y actividad de GDH-NADPH (—). La cepa *gdhA1* fue crecida en medio de producción con cloruro de amonio 10 mM (\*), con glutamato 10 mM (•) y adicionando glutamato 10 mM a las 0, 12, 24 y 36 horas (X).

Sin embargo, cuando se le adicionó el aminoácido a las 0 horas los niveles de actividad fueron diferentes a los del control durante las primeras 72 horas. A partir de ese momento se detectó la actividad a niveles similares a los del control. Esto sugiere que la actividad de la GDH-NADPH en la mutante sigue el patrón de comportamiento de la cepa silvestre con respecto al ácido glutámico aunque los niveles enzimáticos sean menores (Figura 15b).

Observando las figuras 14 y 15 podemos concluir que en las cepas estudiadas se requiere no solamente de altas concentraciones de ácido glutámico sino también de ciertos niveles de actividad de la enzima GDH-NADPH para que exista una estimulación de la producción del antibiótico.

Sin embargo, también existe la posibilidad de que esta enzima tenga un papel indirecto al afectar la concentración de amonio y permitir que se lleve o no a cabo la represión por amonio que existe en la producción de algunos metabolitos secundarios.

#### 6. EFECTO DE LA GLUTAMINA EN EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCION DE PENICILINA EN LAS CEPAS NRRL-1951 y gdhA1.

Es bien conocido que en las células eucariontes que son crecidas utilizando nitrógeno inorgánico, este se asimila en forma de ácido glutámico o glutamina.

En *E. chrysogenum*, Hunter y Segel (37) reportaron que la concentración intracelular de glutamato fue mayor que la de cualquier otro aminoácido. Sánchez et al (15) estudiaron la relación de las pozas de glutámico y glutamina y encontraron que la máxima concentración de ambos aminoácidos se alcanzaba al final de la fase logarítmica de crecimiento (36 horas) y esta situación precedía a la formación del antibiótico.

Para estudiar los efectos sobre crecimiento y producción de penicilina en las cepas involucradas en este estudio, se cultivaron en el medio de producción sustituyéndose el cloruro de amonio por glutamina (10 mM) como fuente de nitrógeno.

En la cepa NRRL-1951 la síntesis de antibiótico se retrasa 12 horas y no alcanza los niveles de producción del control. En estas condiciones se detectó excreción de iones amonio al medio de cultivo (FIG 16a).

En la cepa gdhA1 se observa una estimulación en el crecimiento, sin embargo no hay producción del antibiótico. Además se manifiesta otra vez la excreción de iones amonio al medio de cultivo como cuando se utilizó nitrato de sodio como fuente de nitrógeno (FIG 16b).

Existen evidencias para la degradación de glutamina en otros sistemas celulares (30 y 31) por una vía llamada de la  $\omega$ -amidasa en la cual la glutamina en un proceso de transaminación produce

diferentes aminoácidos y  $\alpha$ -cetoglutarato a través de la enzima glutamina transaminasa. Posteriormente, el  $\alpha$ -cetoglutarato se hidroliza por la enzima w-amidasa obteniendo así amonio y  $\alpha$ -cetoglutarato. Calderón, et al, (32) han demostrado que esta vía opera en *Neurospora crassa* y que es la responsable de la conversión de glutamina a nitrógeno  $\alpha$ -amino, amonio y esqueletos de carbono.

Estos autores encontraron que la glutamina se degrada por esta vía y que el amonio es reasimilado por la GDH-NADPH por lo que una mutante que carezca de esta actividad excretaría amonio al medio de cultivo cuando se utiliza glutamina como fuente de nitrógeno.

En estudios anteriores (15) realizados utilizando concentraciones de nitrógeno inorgánico (85 mM) se ha observado un efecto negativo en la síntesis de penicilina. En el caso de cultivos con glutamina como fuente de nitrógeno se observa en la Figura 16 la excreción de amonio al medio de cultivo en ambas cepas.

En la mutante, esta excreción puede deberse a la falta de actividad de GDH-NADPH, sin embargo esta excreción también se observa en la cepa silvestre.

En esta cepa aún cuando hay producción de penicilina, ésta es menor que en el control por lo que podríamos pensar en que existe un efecto como el observado al añadir altas concentraciones de amonio al medio de cultivo.

## 7. SÍNTESIS DE PENICILINA EN UN MEDIO DE FORMACIÓN DE ANTIBIÓTICO DE CELULAS CULTIVADAS PREVIAMENTE EN DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO.

Con el fin de conocer si amonio, glutamina y ácido glutámico tenían efecto sobre la síntesis *de novo* de penicilina, utilizamos el medio de formación de antibiótico (MFA) que permite la medición de penicilina bajo condiciones controladas.

Las dos cepas se cultivaron durante 36 horas en el medio de producción de penicilina con 10 mM de cloruro de amonio, se cosecharon y se lavaron con dos veces su volumen de agua destilada y se resuspendieron en el MFA suplementado con las fuentes de nitrógeno utilizadas en este estudio, de la siguiente forma:

- a) sin fuente de nitrógeno (control)
- b) con 10 mM de cloruro de amonio
- c) con 10 mM de ácido glutámico
- d) con 10 mM de glutamina

A las 24 horas se midió la penicilina producida y se obtuvieron los resultados que se presentan en la Figura 17. En la cepa silvestre se puede observar que con la adición de

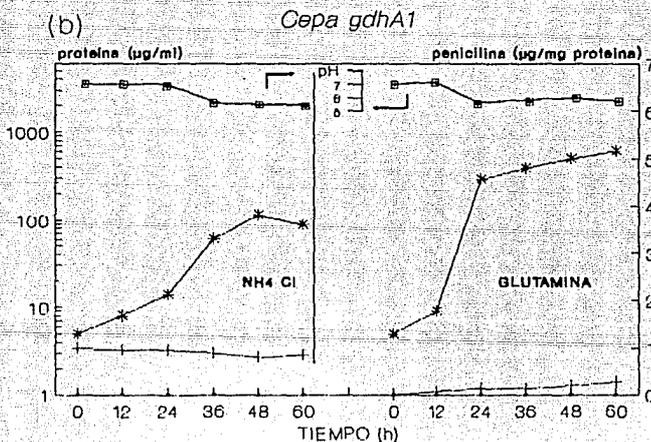
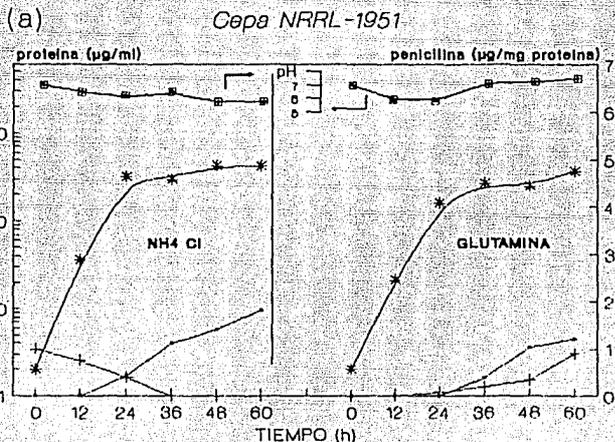


FIGURA 16. Cinética de crecimiento (X), producción de penicilina (•) y amonio extracelular (+) (10x mM).

Ambas cepas fueron crecidas en medio de producción con cloruro de amonio (10 mM) y glutamina (10mM) como fuentes de nitrógeno. (a) cepa NRRL-1951 y (b) cepa gdhA1.

ácido glutámico hay un incremento significativo de la producción de penicilina, no así en las otras condiciones (amonio y glutamina) que son similares al control sin fuente de nitrógeno.

Los datos para la cepa *gdhA1*, donde no hubo producción de antibiótico en ninguna de las condiciones sugieren que las células podrían carecer de las enzimas necesarias para la formación de penicilina por no haberse formado en presencia de amonio.

Para conocer si el ácido glutámico o la glutamina tenían efectos diferentes en la fase de crecimiento inicial se repitió el experimento anterior cultivando las células de *P. chrysogenum* en el medio de producción sustituyendo al cloruro de amonio por estos aminoácidos.

Después de 36 horas se cosecharon y transfirieron al MFA. Los resultados se muestran en las Figuras 18 y 19.

Cuando las células de la cepa NRRL-1951 se cultivaron con ácido glutámico como fuente de nitrógeno (Figura 18) se observa un incremento importante no sólo del control sin fuente de nitrógeno (1.35 vs 1.53 µg/mg) sino también cuando se adicionaron amonio y ácido glutámico al MFA.

En el caso de la cepa *gdhA1* se observó la formación de penicilina en el control (sin fuente de nitrógeno) y se observó también la estimulación por ácido glutámico en una proporción mayor que en la cepa NRRL-1951.

Sin embargo los niveles de antibiótico en la cepa mutante son 10 veces menos que para la cepa NRRL-1951 en el caso del MFA control.

Estos resultados indican que el ácido glutámico si tiene un papel inductor en la síntesis de penicilina y que su presencia en las etapas previas a la síntesis del antibiótico es necesaria para que esta síntesis se lleve a cabo.

Sin embargo para la cepa *gdhA1* parece no ser suficiente la presencia de esos niveles de ácido glutámico para alcanzar los niveles de producción del antibiótico.

En el caso de las células cultivadas previamente en glutamina como fuente de nitrógeno, se observa que la producción de penicilina ha sido afectada negativamente en ambas cepas.

En el caso de la cepa silvestre, Mateos, R.C. observó y postuló una explicación para el efecto inhibitorio de glutamina a niveles mayores de 2 mM (17).

Sus datos sugieren la posibilidad de que la glutamina este involucrada en el transporte de aminoácidos en forma de un ciclo similar al del  $\gamma$ -glutamilo y por la relación que parece existir entre la primera enzima de la síntesis de penicilina y de la que sintetiza glutatión, esta es una interesante posibilidad.

Con respecto a la cepa *gdhA1*, el valor obtenido en el control (sin fuente de nitrógeno) es muy bajo y esta en los límites de

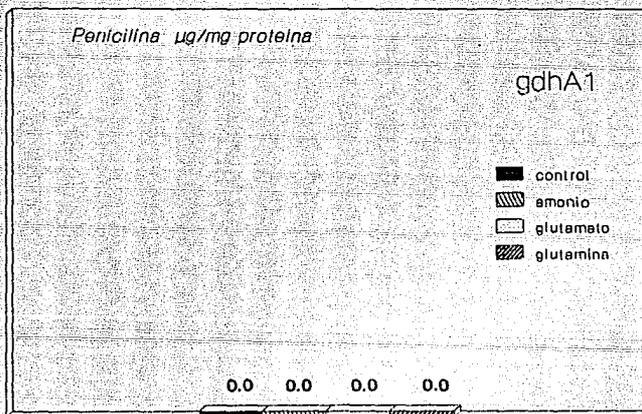
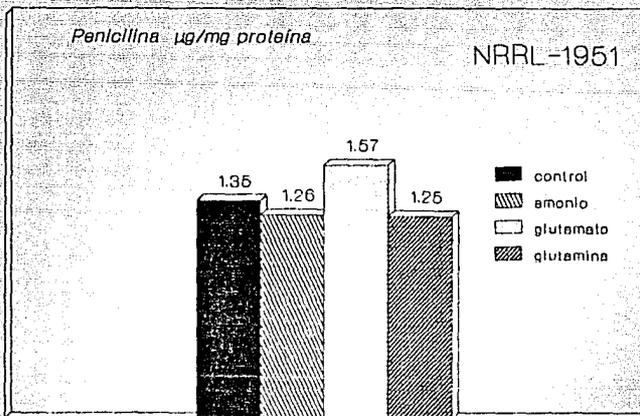


FIGURA 17: Células de *P. chrysogenum* precrecidas en medio de producción con amonio y transferidas a las 36 horas a MFA con diferente fuente de nitrógeno (control, amonio, glutamato y glutamina).

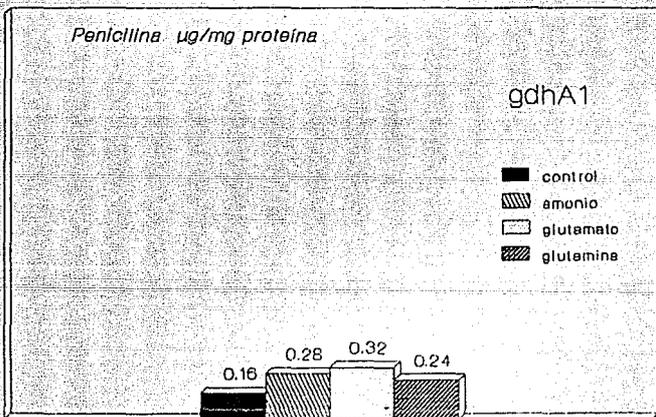
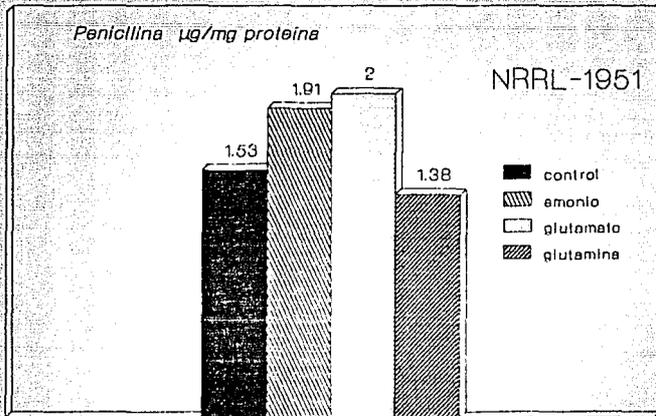


FIGURA 18. Células de *P. chrysogenum* precrecidas en medio de producción con glutamato y transferidas a las 36 horas a MFA con diferentes fuentes de nitrógeno (control, amonio, glutamato y glutamina).

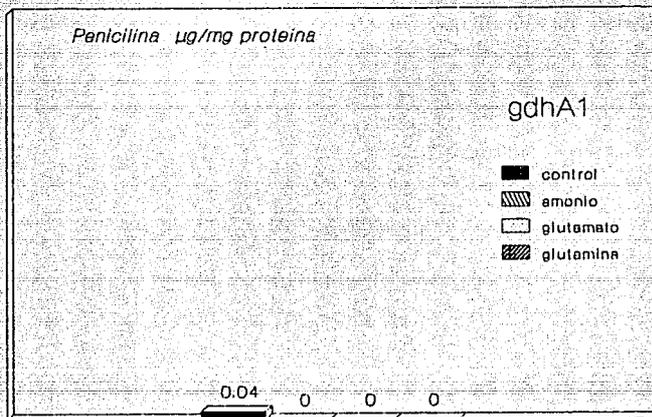
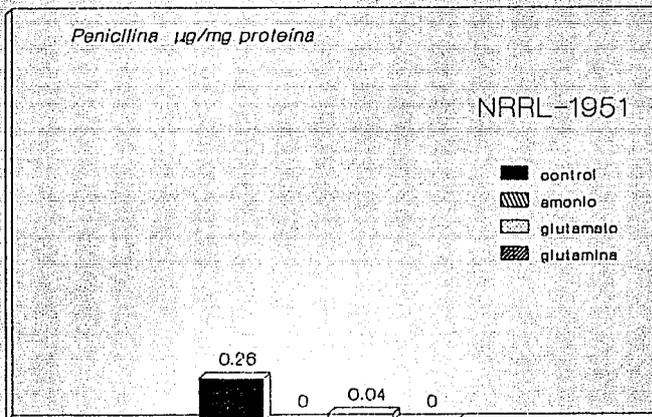


FIGURA 19. Células de *P. chrysogenum* precrecidas en medio de producción con glutamina y transferidas a las 36 horas a MFA con diferentes fuentes de nitrógeno (control, amonio, glutamato y glutamina).

detección del método analítico por lo que podemos considerar que el comportamiento de las células precultivadas en glutamina es el mismo que para las que se cultivan en amonio (Figura 17).

8. ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESO DE ASIMILACION DE NITROGENO: Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH (GDH-NADPH), Glutamino sintetasa (GS) y glutamato sintetasa (GOGAT).

Para tener un mayor conocimiento sobre las enzimas involucradas en el proceso de asimilación de nitrógeno en *F. chrysogenum*, se cultivaron ambas cepas en el medio de producción de penicilina usando como fuentes de nitrógeno, amonio y ácido glutámico. A las 24 horas de fermentación se cosechó el micelio y se midió la actividad de las tres enzimas involucradas en la asimilación de amonio (Figura 7).

Los resultados se muestran en la Figura 20 e indican que para ambas cepas la GDH-NADPH tiene una actividad menor cuando se utiliza ácido glutámico. Del mismo modo la actividad de GS se estimula en esas condiciones y esto se observa en mayor grado en la cepa *gdhA1*.

El efecto negativo por glutámico sobre la actividad de GOGAT es evidente también para ambas cepas.

En el medio de producción normal (con cloruro de amonio) encontramos que la actividad de GS para las dos cepas es la misma, sin embargo, para la cepa *gdhA1* la actividad de GOGAT sufre un aumento de aproximadamente 2 veces con respecto a la de la silvestre.

Esto sugiere que la cepa *gdhA1* suple sus necesidades de ácido glutámico por la vía GS/GOGAT.

*Enzimas involucradas en el proceso de asimilación de amonio*

( $\mu\text{mol/mg proteína/min}$ )

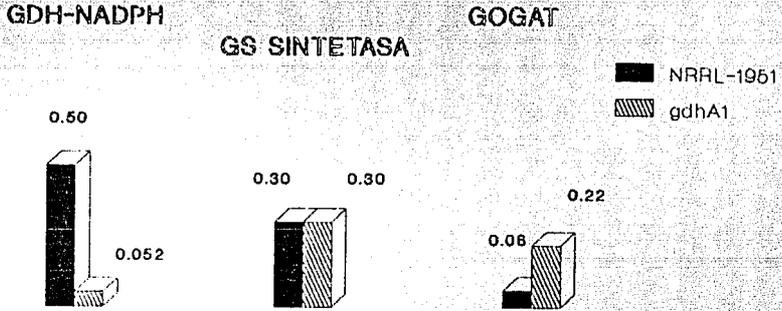


FIGURA 20a. Células cultivadas en amonio. Actividad medida a las 24 horas

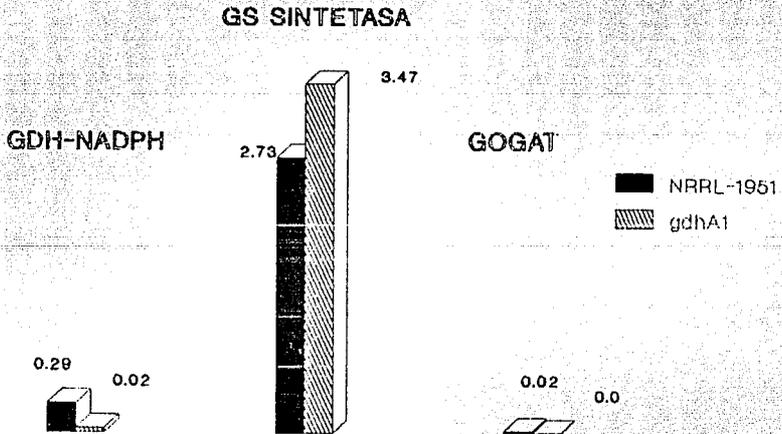


FIGURA 20b. Células cultivadas en glutamato. Actividad medida a las 24 horas

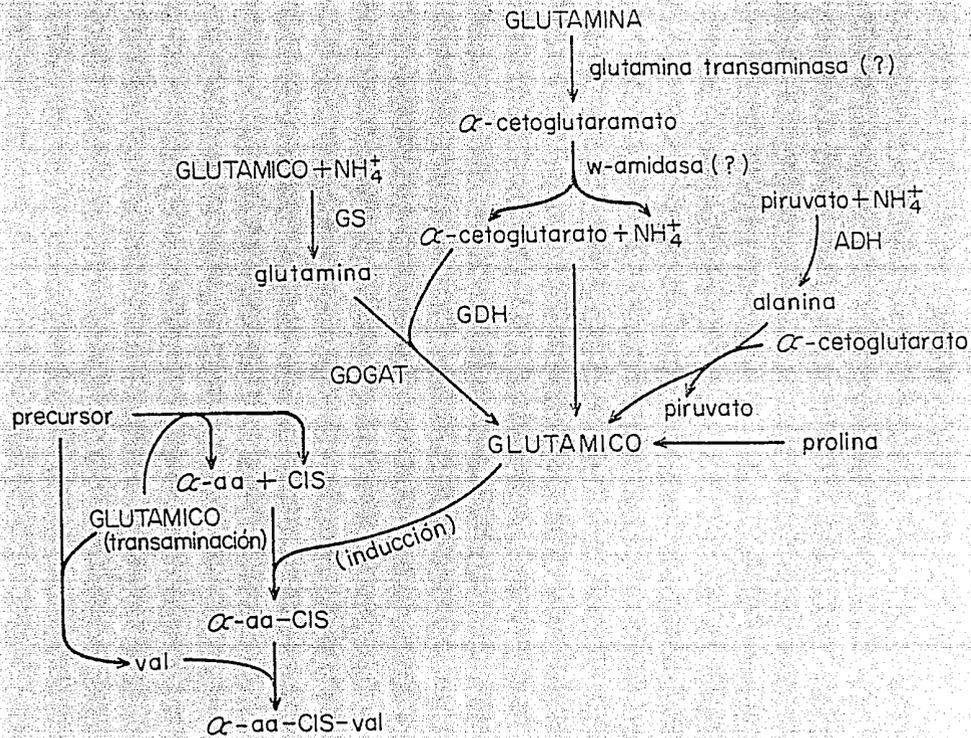


FIGURA 23. RELACION ENTRE EL METABOLISMO NITROGENADO Y LA PRODUCCION DE PENICILINA

## CONCLUSIONES

La relación entre metabolismo nitrogenado y la biosíntesis de metabolitos secundarios que contienen dentro de su estructura átomos de nitrógeno se ha estudiado en diferentes especies microbianas. En la mayoría de los casos los compuestos derivados del metabolismo nitrogenado que han merecido mayor atención han sido los aminoácidos glutamina y ácido glutámico por ser los que directamente derivan del fenómeno de asimilación de amonio.

Por una parte para *P. chrysogenum* parecen requerirse altas pozas de ácido glutámico para apoyar eficientemente la transaminación de compuestos que originan los precursores de penicilina (4, 15), además de que se ha observado que este aminoácido induce la síntesis de este antibiótico cuando es adicionado al medio de cultivo al inicio de la fase estacionaria.

En la cepa NRRL-1951 la desaparición del ión amonio del medio de cultivo está directamente relacionada con el inicio de la síntesis de penicilina. El retraso en la síntesis de este antibiótico cuando se utiliza nitrato como fuente de nitrógeno puede deberse a que este tiene que transformarse en amonio para ser asimilado y así continuar el camino metabólico hacia la formación de otros compuestos como glutamina y glutamato. Dependiendo de la eficiencia de las enzimas nitrato y nitrito reductasas podría existir mayor concentración de iones amonio intracelulares y que esto ejerciera un efecto negativo sobre la síntesis de penicilina (FIG 11a y 13a).

El efecto negativo encontrado en este estudio al adicionar ácido glutámico desde el inicio de la fermentación en la cepa NRRL-1951 ha sido descrito también para *Streptomyces clavuligerus* (13) para cefamicina y ácido clavulánico. Los autores sugieren que esto se debe a un fenómeno de control por catabolitos nitrogenados. Para *P. chrysogenum* podemos pensar, por los estudios que se han hecho en relación a la síntesis de glutatión, que este aminoácido está siendo canalizado a otras vías metabólicas entre las que puede encontrarse la del glutatión que lo utiliza directamente como precursor del tri péptido similar al que da origen a la penicilina.

En las condiciones de adición inicial de ácido glutámico como fuente de nitrógeno y de adiciones constantes a las 0, 12, 24 y 36 horas es notorio el efecto que ejerce este aminoácido sobre la actividad de la enzima GDH-NADPH (FIG 14A y 14 B). Esto puede tratarse de una inhibición por producto final lo que estaría de acuerdo con Jacklitsch, et al (18) quienes encontraron que a una concentración de 10 mM de ácido glutámico, la actividad de la GDH-NADPH de *P. chrysogenum* se inhibe.

Sin embargo, al parecer, la enzima GDH-NADPH puede ser reprimida por este aminoácido y esto nos sugiere, tomando en cuenta los resultados obtenidos con la cepa *gdhA1* (FIG 15a y 15b), que la disminución en la producción de penicilina está relacionada no sólo con la poza de glutámico sino también con el papel regulador

que se le ha atribuido a esta enzima (27).

El estudio de la cepa *gdhA1* nos indica que la poza de ácido glutámico proviene inicialmente del funcionamiento del sistema glutámico sintetasa/glutamato sintetasa (GS/GOGAT) ya que la actividad de GDH-NADPH se detecta a partir de las 24 horas de fermentación (Fig 11b y 20).

La poza de este aminoácido disminuye cuando las células están en la fase de crecimiento y probablemente el glutamato o los metabolitos que pueden formarse a partir de éste se estén utilizando para el crecimiento celular.

Los niveles de crecimiento obtenidos en la cepa *gdhA1* sugieren que el sistema GS/GOGAT funciona con menores concentraciones intracelulares de amonio lo que provoca que este ión permanezca en el medio de cultivo ya que no puede ser asimilado por GDH-NADPH.

Cuando se utiliza nitrato como fuente de nitrógeno, las células crecen mejor que con el cloruro de amonio, sin embargo después de las 20 horas, la cepa excreta el amonio al medio de cultivo debido probablemente a su incapacidad de asimilación a través de GDH-NADPH y manteniendo así niveles adecuados de este ion que no disminuyen la actividad del sistema GS/GOGAT (Fig 13b).

El crecimiento de la cepa *gdhA1* en glutámico como fuente de nitrógeno (Fig 15a y 15b) se estimula y además se revierte el efecto negativo de la producción de penicilina.

Estos resultados también sugieren que el ácido glutámico está involucrado en la síntesis del antibiótico aunque el retraso observado en la aparición del antibiótico esta relacionado con el inicio de la fase estacionaria, la concentración de antibiótico es tres veces menor que el de la cepa silvestre.

El ácido glutámico además afecta la velocidad de crecimiento de la *gdhA1* lo que nos indica que esta cepa está afectada en las vías de formación del aminoácido aunque no es auxótrofa de éste ya que puede crecer en medio mínimo al igual que otras mutantes GDH- (28 y 29), cuyo sistema GS/GOGAT funciona más eficientemente que en la cepa silvestre correspondiente.

En estas condiciones no hay excreción de iones amonio al medio de cultivo.

Estos resultados sugieren que para que en las cepas estudiadas exista una estimulación de la síntesis de penicilina se requiere no solamente la presencia de una concentración alta de ácido glutámico sino también de ciertos niveles enzimáticos de la enzima GDH-NADPH (Figuras 14 y 15).

Sin embargo, también existe la posibilidad de que esta enzima tenga un papel indirecto afectando la concentración de amonio para permitir que se lleve a cabo o no el efecto negativo por

amonio que existe en la producción de penicilina.

La glutamina también estimula el crecimiento de la cepa *gdhA1*, sin embargo, en estas condiciones no hay producción de penicilina (Fig 16b). Un hecho interesante es que al utilizar glutamina como fuente de nitrógeno, la *gdhA1* excreta iones amonio al medio de cultivo. Existen evidencias para la degradación de glutamina en otros sistemas celulares (30 y 31) por una vía llamada de la  $\alpha$ -amidasa en la cual la glutamina en un proceso de transaminación produce diferentes aminoácidos y  $\alpha$ -cetoglutarato a través de la enzima glutamina transaminasa. Posteriormente, el  $\alpha$ -cetoglutarato se hidroliza por la enzima  $\alpha$ -amidasa obteniendo así amonio y  $\alpha$ -cetoglutarato. Calderón, et al, (32) han demostrado que esta vía opera en *Neurospora crassa* y que es la responsable de la conversión de glutamina a nitrógeno  $\alpha$ -amino, amonio y esqueletos de carbono.

Estos autores encontraron que la glutamina se degrada por esta vía y que el amonio es reasimilado por la GDH-NADPH por lo que una mutante que carezca de esta actividad excretaría amonio al medio de cultivo cuando se utiliza glutamina como fuente de nitrógeno.

Si esto sucediera en *P. chrysogenum*, la razón de que no se produzca antibiótico en estas condiciones, aun cuando el crecimiento sea mejor que en amonio, podría deberse a las concentraciones intracelulares de amonio que al ser tan altas no permitan el funcionamiento del sistema GS/GOGAT y ejerzan el efecto negativo sobre la síntesis del antibiótico, además de que la poza de ácido glutámico fuera muy baja.

Al cultivar la cepa *gdhA1* en amonio, ácido glutámico y glutamina y después observar el efecto de estos mismos compuestos en el medio de formación de penicilina (Fig 17, 18 y 19) encontramos que solamente cuando el ácido glutámico se usa como fuente de nitrógeno, se produce el antibiótico.

Con respecto a las actividades enzimáticas que intervienen en la asimilación de amonio encontramos que: (Fig 20)

- a) GS se induce cuando el ácido glutámico es la fuente de nitrógeno.
- b) GOGAT sufre un efecto negativo en estas condiciones al igual que la GDH-NADPH.
- c) En la cepa *gdhA1*, cuando se utiliza como fuente de nitrógeno amonio, GOGAT presenta altos niveles de actividad y GS también aumenta.

De los datos obtenidos para la cepa *gdhA1*, podemos concluir que aunque es necesario que exista una poza de ácido glutámico de alta concentración para la síntesis de penicilina, este no es un evento único para ejercer el efecto estimulador.

## ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Jaklitsch, W.M. mostró que en cepas de *Escherichia coli* de diferentes capacidades de producción, la poza de ácido glutámico era muy alta en condiciones que permiten un crecimiento rápido pero no la producción de penicilina (16).

En estudios paralelos a este, que tienen como objetivo caracterizar el comportamiento de la cepa gdhA1 frente a diferentes fuentes de nitrógeno, se observó que al cultivar esta cepa en prolina y alanina, producía penicilina a niveles de aproximadamente un 70 % del valor de la cepa NRRL-1951, aunque la producción se iniciaba a las 60 horas. (S. Sánchez, comunicación personal).

En ambos casos la síntesis de penicilina por esta cepa podría estar favorecida debido a que el catabolismo de prolina genera ácido glutámico, y alanina interviene en reacciones de transaminación con ácido  $\alpha$ -cetoglutarico produciendo ácido glutámico.

En la figura 21 se resume la relación que parece existir entre las enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno (GDH, GS y GOGAT), los aminoácidos (glutamina, ácido glutámico, alanina y prolina) y los intermediarios de la síntesis de penicilina ( $\alpha$ -aacis y  $\alpha$ -aacis-val).

La reacción catalizada por la enzima GDH-NADPH que se encuentra disminuida en la cepa gdhA1 provoca que la concentración de ácido glutámico disminuya y que el abastecimiento de éste a la célula tenga que llevarse a cabo aumentando las actividades enzimáticas del sistema GS/GOGAT. Para que este sistema sea eficiente y GS funcione, la célula debe contar con un nivel por lo menos basal de ácido glutámico lo que puede conseguir la cepa gdhA1 ya que no es autótrofa para este aminoácido.

Por otra parte aminoácidos como alanina y prolina que forman a través de su catabolismo ácido glutámico provocan que la mutante sintetice el antibiótico aun cuando esto no se deba al hecho de que el microorganismo crece mejor en su presencia ya que al utilizar glutamina como fuente de nitrógeno, el crecimiento es igual sin que se observe la aparición del antibiótico.

La excreción de iones amonio al medio de cultivo en el caso de glutamina, nos indica que al aumentar la concentración intracelular de éstos por el catabolismo de glutamina se sigue observando el efecto negativo que tiene este ión sobre la síntesis de penicilina.

El efecto inductor del ácido glutámico observado en un trabajo anterior (4) y reproducido en este trabajo bajo condiciones de fermentación, apoya la importancia de este compuesto en la síntesis de penicilina y podemos concluir que cualquier evento que afecte la presencia intracelular de este aminoácido puede afectar la síntesis de la penicilina.

## BIBLIOGRAFIA

1. O'Sullivan, J. y C. Ball. Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics. (Ed. L.C. Vining). 1983. Capitulo 4. Addison Wesley Publishing Co.
2. Queener, S.W. y N. Neuss. Chemistry and biology of  $\beta$ -lactam antibiotics. (Eds. R.B. Morin y M. Gorman). 1982. Vol. 3, cap. 1. Academic Press.
3. Hensbach, G.; C.P. Van Der Beek y P.W.M. Van Dijk. Biotechnology and industrial antibiotics. (Ed. E. Vandamme). 1984. Cap. 3. Marcel Dekker Inc.
4. Lara, F. ; R.C. Mateos ; G. Vázquez y S. Sánchez. 1982. B.B.R.C. 105:172-178
5. López-Nieto, M.J.; F.R. Ramos; J.M. Luengo y J.F. Martín. 1985. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22:343-351
6. Adrians, P.; B. Meeschaert; W. Wuyts; H. Vanderhaegue y H. Eyseen. 1975. Antimicrob. Agents Chemother. 8:638-642
7. Ramos, F.R.; M.J. López-Nieto y J.F. Martín. 1985. Antimicrob. Agents Chemother. 27:380-387
8. Martín, J.F., et al. Regulation of secondary metabolite formation. Workshop Conferences Hoechst, Vol. 16. (Eds. H. Kleinkauf; H. Döhren; H. Dornauer y G. Neesemann). 1985. Academic Press.
9. Martín, J.F. y A.L. Demain. 1980. Microbiol. Rev. 44:230-251
10. Cephalosporins. Comprehensive Biotechnology. (Ed. M. Moo-Young). 1985. Vol. 3. Cap. 4. Pergamon Press.
11. Aharonowitz, Y. y A.L. Demain. 1979. Can. J. Microbiol. 25:61-67
12. Queener, S.W.; J. McDermott y A.E. Radue. 1975. Antimicrob. Agents Chemother. 7:646-657
13. Romero, J.; P. Liras y J.F. Martín. 1984. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:318-325
14. Castro, J.M.; P. Liras; J. Cortés y J.F. Martín. 1985. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22:32-40
15. Sánchez, S.; L. Paniagua; R.C. Mateos; F. Lara y J. Mora. Advances in Biotechnology (Eds. C. Vezina y K. Singh). 1980. Vol. 3. Pergamon Press.

16. Gräfe, U. Overproduction of microbial products. (Eds. V. Krumphanzl, B. Sikyta y Z. Vanek). 1982. Cap. 5. Academic Press.
17. Flores, M.E. y S. Sánchez. 1985. FEMS Microbiology letters 28:191-194
18. Jaklitsch, W.M.; M. Röhr y C.P. Kubicek. 1985. Exp. Myc. 9:310-317
19. Mateos, R.C.; G. Vázquez y S. Sánchez. 1984. Biotechnology Letters 6:109-114
20. Meister, A. y S.S. Tate. 1976. Ann. Rev. Biochem. 45:927-932
21. Kaszab, I. y S.O. Enfors. 1981. Second European Congress of Biotechnology. Eastbourne, England.
22. Jarvis, F.G. y M.J. Johnson. 1947. J. Am. Chem. Soc. 69:3010-3017
23. Lowry, D.H.; N.J. Rosenbrough; A.L. Farr y R.J. Randell. 1951. J. Biol. Chem. 193:265-275
24. Weatherburn, M.W. 1967. Anal. Chem. 39:971-974
25. Banko, G.; S. Wolfe y A.L. Demain. 1986. B.B.R.C. 137:528-535
26. Ryu, D.D.Y. y J. Hospodka. 1980. Biotechnol. Bioeng. 22:289-298
27. Marzluf, G.A. 1981. Microbiol. Rev. 45:437-461
28. Hummelt, G. y J. Mora. 1980. B.B.R.C. 96:1688-1694
29. Pateman, J.A.; J.R. Kinghorn; E. Dunn y E. Forbes. 1973. J. Bacteriol. 114:943-949
30. Cooper, A.J.L. y A. Meister. 1977. Crit. Rev. Biochem. 4:281-303
31. Cooper, A.J.L. y A. Meister. 1981. Comp. Biochem. Physiol. 69B:137-145
32. Calderón, J.; E. Morett y J. Mora. 1985. J. Bacteriol. 161:807-809
33. Cooney, L. y F. Acevedo. 1977. Biotechnol. Bioeng. 19:1449-1462
34. Ferguson, A.R. y A.P. Sims. 1974. J. Gen. Microbiol. 80:159-171
35. Meers, J.L.; D.W. Tempest y C.M. Brown. 1970. J. Gen. Microbiol. 64:187-194

36. Espin, G.; R. Falacios y J. Mora. 1979. J. Gen. Microbiol. 115:59-68
37. Mateos, R.C. 1983. Tesis para obtener el grado de Maestria en Investigación Biomédica Básica. U.N.A.M.
38. Kinghorn, J.R. y J.A. Pateman. 1973. J. Gen. Microbiol. 78:39-46