

03072 16
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**CARACTERIZACION DEL EFECTO ESTIMULATORIO DEL AMONIO SOBRE LA
PRODUCCION FERMENTATIVA DE PENICILINA EN EL HONGO**

Penicillium Chrysogenum NRRL - 1951

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A :
QFB. SONIA ZAMUDIO ALONSO

**TESIS CON
FALTA DE 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.

INDICE

RESUMEN	1
GENERALIDADES	3
* Definición de antibiótico	3
* Desarrollo de la investigación de los antibióticos.	4
* Principales fuentes de los antibióticos.	5
* Clasificaciones de los antibióticos.	6
- Clasificación de la penicilina.	6
* Antibióticos β -lactámicos.	
- Efecto de los antibióticos β -lactámicos.	6
- Proteínas de Unión de las Penicilinas (PUP _S).	7
* Péptidoglicano.	
- Función.	8
- Composición química.	8
- Síntesis del péptidoglicano.	8
- Intermediarios solubles.	9
- Intermediarios unidos a lípidos.	9
- Polimerización.	9
- Mecanismo de acción de la penicilina.	10
ANTECEDENTES	
* Historia de la penicilina.	13
* Biosíntesis de la penicilina.	14
- Regulación de la biosíntesis de la penicilina.	17
- Efecto de la glucosa.	17
- Efecto de aminoácidos.	19
- Lisina.	19
- Ácido glutámico.	20
- Aminoácidos neutros.	20
- Efecto de la fuente de nitrógeno.	21
- Enzimas de la asimilación del amonio.	21
- Efecto negativo del amonio.	24
- Efecto positivo del amonio.	25
OBJETIVOS	28
ESTRATEGIA	29
MATERIAL Y METODOS	
* Microorganismos.	31
* Medios para la conservación de las cepas utilizadas.	31
* Medio para cuantificar el antibiótico.	32
* Medio para la producción de penicilina.	32
* Condiciones de crecimiento.	33
* Cuantificación del crecimiento.	33
* Cuantificación de penicilina.	34
* Cuantificación de amonio residual.	34
* Sistema de células en reposo sin cicloheximida.	34

RESULTADOS Y DISCUSION

- * ¿ El efecto estimuladorio de la producción de penicilina se presenta en altas concentraciones de amonio?. 36
- * ¿ Es el amonio per se el responsable del efecto estimuladorio en la producción de penicilina?. 36
- * ¿ Depende la biosíntesis de penicilina y la estimulación de su producción, de la síntesis de novo de proteínas? 43
- * Adicionando los precursores del antibiótico, ¿es posible restablecer la producción de penicilina cuando se utiliza cicloheximida? 46
- * ¿ Qué compuesto sería el responsable de la estimulación de la producción de penicilina? 54

CONCLUSIONES 69

BIBLIOGRAFIA 71

INDICE DE FIGURAS

FIG.1.	Estructura del péptidoglicano en <u>S. aureus</u> .	11
FIG.2.	Estructura de la penicilina G.	15
FIG.3.	Estructuras de penicilinas naturales.	16
FIG.4.	Ruta biosintética de la penicilina G.	18
FIG.5.	Modelo propuesto para la incorporación de aminoácidos en <u>Penicillium chrysogenum</u> NRRL-1951.	22
FIG.7.	Producción de penicilina G en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de amonio.	27
FIG.8.	<u>Penicillium chrysogenum</u> NRRL-1951 cultivado en medio mínimo con diferentes concentraciones de amonio.	37
FIG.9.	Crecimiento y producción específica de penicilina en la cepa <u>Penicillium chrysogenum</u> NRRL-1951.	39
FIG.10.	Evolución de pH y amonio residual de la cepa <u>P. chrysogenum</u> NRRL-1951.	40
FIG.11.	Crecimiento y producción específica de penicilina en la mutante <u>Penicillium chrysogenum</u> NRRL-1951.	41

- FIG.12.** Evolución de pH y amonio residual de la mutante Penicillium chrysogenum gdh A1. 42
- FIG.13.** Efecto de la adición de metilamina (análogo de amonio) sobre la producción específica de penicilina en el P. chrysogenum NRRL-1951. 44
- FIG.14.** Producción específica de penicilina por P.chrysogenum NRRL-1951 cicloheximida a las 36 y 72h de fermentación. 45
- FIG.15.** Crecimiento de Penicillium chrysogenum NRRL-1951 con adiciones de cicloheximida a 36 h de fermentación. 47
- FIG.16.** Evolución del pH durante la fermentación de P. chrysogenum NRRL-1951 con adiciones de cicloheximida a 36 y 72 h. 48
- FIG.17.** Efecto de la adición de precursores (con y sin cicloheximida) sobre la producción específica de penicilina por P. chrysogenum NRRL-1951. 50
- FIG.18.** Efecto de la adición de precursores (con y sin cicloheximida) en el crecimiento del P. chrysogenum NRRL-1951. 52

- FIG.19.** Evolución de pH de la fermentación de P. chrysogenum NRRL-1951 con adición de precursores, con y sin cicloheximida. 53
- FIG.20.** Efecto de glutámico y glutamina como única fuente de nitrógeno sobre la producción de penicilina por P. chrysogenum NRRL-1951. 55
- FIG.21.** Efecto del glutámico, glutamina y sus análogos sobre la producción específica de penicilina por P. chrysogenum NRRL-1951 en un "sistema de células en reposo", sin cicloheximida. 57
- FIG.22.** Crecimiento y producción de penicilina por la mutante Penicillium chrysogenum gdh A1 en presencia de diferentes concentraciones de prolina y amonio. 58
- FIG.23.** Crecimiento y producción de penicilina por la mutante Penicillium chrysogenum gdh A1 en presencia de diferentes concentraciones de alanina y amonio. 59
- FIG.24.** Efecto del glutámico, glutamina, y sus análogos en la producción de penicilina por P. chrysogenum gdh A1 en un "sistema de células en reposo", sin cicloheximida. 62

- FIG.25** Ruta de asimilación del glutámico cuando el medio de cultivo se suplementa con este aminoácido. 64
- FIG.26** Ruta de asimilación de la glutamina cuando el medio de cultivo se suplementa con este aminoácido. 66
- FIG.27.** Efecto de la adición de aminoácidos precursores de la penicilina sobre la producción del antibiótico en un "sistema de células en reposo", sin cicloheximida. 67
- FIG.28.** Comparación del efecto del glutámico, glutamina y aminoácidos precursores sobre la producción de penicilina por P. chrysogenum NRRL-1951 en un "sistema de células en reposo" sin cicloheximida. 68

RESUMEN

La penicilina G es un antibiótico β -lactámico formado por un núcleo central denominado ácido 6- aminopenicilánico (6-APA) el cual tiene una cadena lateral que es diferente en cada tipo de penicilina (Fig. 3), en el caso de la penicilina G el radical es un bencil, por lo que también recibe el nombre de bencil-penicilina.

La biosíntesis de la penicilina es regulada por la fuente de carbono y de nitrógeno, Schwartz (1985) reportó que concentraciones altas de amonio en el medio de cultivo, estimulan la producción del antibiótico. Debido a que este efecto se consideró de interés académico y con aplicación en estrategias de producción de la penicilina, se realizó este trabajo de investigación, en el cual se concluyó que: La estimulación en la producción de penicilina no es causada por el amonio per se sino por un producto de su metabolismo.

El efecto estimulador en la producción de penicilina, observado en altas concentraciones de amonio (200 mM), se previene con la adición de cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas); La síntesis de penicilina no se restablece cuando los aminoácidos precursores de la biosíntesis del antibiótico (ácido α -aminoadípico, cisteína y valina) se adicionan al mismo tiempo que la cicloheximida a las 36 ó 72 horas de fermentación, esto indica que la formación de las enzimas sintetizadas de la penicilina es inhibida por la cicloheximida.

En la cepa silvestre, el ácido glutámico y la glutamina (10 mM en ambos casos) estimulan la producción de penicilina en un "sistema de células en reposo" sin cicloheximida. Es necesario que el ácido glutámico y la glutamina se metabolicen para poder observar la estimulación en la producción del antibiótico.

Se tiene la hipótesis de que el efecto estimulador es a través de la glutamina mediante su transaminación con α -cetoácidos para formar aminoácidos, entre los cuales pueden estar los precursores de la penicilina. Estos aminoácidos también estimulan la producción del antibiótico en un "sistema de células en reposo", sin cicloheximida, cuando éstos se suplementan en forma independiente o en conjunto, siendo mayor la estimulación cuando se adicionan juntos.

. Los resultados obtenidos en la realización de este trabajo, contribuirán a esclarecer el efecto estimulatorio sobre la producción de penicilina, que se presenta en concentraciones altas de cloruro de amonio. La experiencia adquirida en la parte experimental del proyecto, será de utilidad para plantear estrategias relacionadas con la regulación de la producción del antibiótico estudiado u otros semejantes.

GENERALIDADES

Los antibióticos son compuestos de complejidad química variable sintetizados por algunos microorganismos, generalmente en la fase tardía de su crecimiento. Forman parte de los denominados metabolitos secundarios ó idiolitos en virtud de que son producidos durante la idiofase y no presentan ninguna función aparente para el crecimiento y reproducción de los microorganismos que los producen (Sánchez, 1981).

El desarrollo de la investigación de los antibióticos puede dividirse en tres periodos: El primero sucedió en los años 40's, y se caracterizó por un lento desarrollo y observaciones básicas. Durante este periodo los estudios se orientaron a la utilización terapéutica de la penicilina y la selección esquemática de actinomicetos.

El segundo periodo se distinguió por el logro sobre descubrimientos fundamentales, resultado de la investigación acelerada de 15 ó 20 años. En los años 60's, la situación cambió y se enfocó principalmente a la demanda de información terapéutica básica.

El tercero y último periodo al inicio de los años 70's, tuvo como características principales las siguientes:

1. La disminución de la investigación de antibióticos microbianos y el desarrollo de antibióticos semisintéticos y de fuentes poco convencionales, por ejemplo de organismos marinos.
2. La búsqueda de nuevos campos de aplicación y énfasis en las aplicaciones no terapéuticas.
3. La especialización e incremento de la investigación de los métodos clásicos de selección de antibióticos.
4. La intensificación de la investigación en nuevas fuentes de antibióticos.
5. La investigación extensiva de la bioquímica, farmacología y química de los antibióticos conocidos, y
6. El surgimiento de la clasificación y nomenclatura para los antibióticos (Bérdy, 1974).

En la actualidad se han reportado más de 3,000 antibióticos con una gran variedad de estructuras

(Sakaguchi y Okanishi, 1980). Las principales fuentes de estos antibióticos son: (a) Actinomicetos, (b) Bacterias y (c) Hongos microscópicos.

a) Actinomicetos

Los actinomicetos producen el 80% del total de los antibióticos reportados, entre los que podemos citar como ejemplos a la gentamicina y la rifamicina producidas por especies de Micromonospora y Nocardia respectivamente.

b) Bacterias

Estos microorganismos producen el menor porcentaje de los antibióticos existentes (5%). De la especie Bacillus se han aislado: colistina, gramicidina, tirotricina, bacitracina y aterrimina. Piocianina y pirrolnitrina de la especie Pseudomonas, y finalmente nisina obtenida de Eubacteriales. Excepto la pirrolnitrina, todas fueron descubiertas antes de 1950.

c) Hongos microscópicos

El 15 % de la producción de antibióticos reportados son producidos, principalmente, por Penicillium y Aspergillus, de los cuales gran parte se ha comercializado, como ejemplo de estos antibióticos se pueden mencionar a la penicilina G, penicilina V, penicilina O, cefalosporina, griseofulvina y ácido fusídico, entre otros.

Por otro lado, existen antibióticos aislados de fuentes no microscópicas, como son las plantas, insectos, productos marinos o cultivos de organismos animales; sin embargo, no se les ha dado uso terapéutico en seres humanos (Bérdy, 1974; Aharonowitz *et al.*, 1981).

Asimismo, todos los antibióticos han sido incluidos en diversas clasificaciones, en cada una de éstas se da prioridad a cierta característica de los mismos. Como ejemplo de éstas se pueden destacar las siguientes:

- Basada en la naturaleza del microorganismo productor. Existen 12 grupos bien establecidos entre los que se encuentran: Bacillus, Pseudomonas, Actinomicetos y plantas superiores, entre otros. Una de las ventajas de

esta clasificación es que todos los antibióticos pueden ser clasificados en grandes grupos, pero más allá de las listas de acuerdo a su taxonomía individual, no existe la posibilidad de subdivisiones. Sin embargo, la sistematización de acuerdo al origen o naturaleza del microorganismo puede ser insuficiente por las siguientes razones:

a. Varias especies del mismo género producen una gran variedad de sustancias de diversa estructura química y actividad. Actualmente es imposible dividir con estas bases a más de 200 antibióticos formados por Actinomycetales.

b. Antibióticos idénticos pueden ser producidos por organismos diferentes. Como ejemplos de esta situación están la ribostamicina y la butirosina, los cuales tienen igual esqueleto estructural, pero son sintetizados por los géneros Streptomyces y por Bacillus, respectivamente.

c. Una especie dada puede producir diferentes antibióticos. Por ejemplo, las cepas de Pseudomonas aeruginosa producen cerca de 40 antibióticos derivados, principalmente, del esqueleto N-heterocíclico.

d. Un mismo antibiótico puede ser producido por varias especies del mismo género. La oxitetraciclina es producida por 19 diferentes especies de Streptomyces.

- Basada en función de su biosíntesis. Esta clasificación, de acuerdo a Abraham y Newton (1959) está muy relacionada con la sistematización química, pero no es muy precisa debido a que algunas estructuras químicas similares son generalmente formadas por rutas biosintéticas idénticas o semejantes. Además, existen mezclas de rutas biosintéticas donde una parte de la molécula es construida en una vía diferente a la de la parte complementaria de la molécula.

- Basadas en su mecanismo de acción. Del total de los antibióticos conocidos, solamente en 200 de ellos se ha descrito completamente su mecanismo de acción. No obstante esta clasificación se ha visto limitada en sus aplicaciones debido a que se presentan diversos problemas de tipo experimental para poder establecer la manera en que actúa el antibiótico in vivo. Además, en algunos casos, un mismo antibiótico puede presentar dos mecanismos de acción diferentes, por ejemplo, la gramisidina S afecta la

función de la membrana así como a la fosforilación oxidativa.

- Basada en propiedades fisicoquímicas. Los antibióticos pueden ser diferenciados con base en su solubilidad en agua ó solventes orgánicos, carácter básico, ácido o anfotérico, ó de acuerdo a los grupos funcionales que posea en su molécula. Esta sistematización se encuentra muy relacionada con aquella que se basa en la estructura química de los antibióticos.

- Basada en su estructura química. Esta clasificación es la única en la cual no hay ambigüedades, ésta es posible de agrupar a los antibióticos de acuerdo a sus propiedades físicas, químicas, microbiológicas, farmacológicas y clínicas. En esta clasificación se asigna un código que consta de cinco números. El primer número de este código representa a la familia. La familia 4 por ejemplo, incluye a los "antibióticos peptídicos y de aminoácidos". El segundo número corresponde a la subfamilia, de este modo 4.1 nos indica la subfamilia "derivados de aminoácidos". El tercer número representa a la subclase, así 4.1.2 se refiere a "derivados biogénicos de aminoácidos". El cuarto número indica el subtipo y en nuestro caso el subtipo 4.1.2.1 afilia a "antibióticos β -lactámicos". Finalmente, la última cifra corresponde al tipo que en este caso es "penicilinas" y se representa por el número 1 (Berdy, 1974).

ANTIBIOTICOS β -LACTAMICOS

El nombre de estos antibióticos obedece a que en su estructura poseen un anillo β -lactámico.

Las penicilinas y los antibióticos β -lactámicos relacionados han sido inigualables por su utilidad para combatir enfermedades e infecciones bacterianas. Es bien conocido que el efecto de los antibióticos β -lactámicos es diferente al de otros agentes antimicrobianos en ciertos aspectos importantes como son:

- a) Toxicidad altamente selectiva hacia bacterias.

b) Afecta la morfología bacteriana, de los microorganismos susceptibles, cuando se utilizan diferentes concentraciones del antibiótico.

c) Requiere que la población bacteriana se encuentre en crecimiento celular activo para que la penicilina pueda ejercer su efecto.

Los estudios sobre el mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos se divide en tres etapas:

I. Los estudios realizados desde el descubrimiento de la penicilina en 1929 hasta 1957 permitieron concluir que estos antibióticos inhiben selectivamente la biosíntesis de la pared celular de bacterias. Gardner (1940) observó que a bajas concentraciones de antibiótico, el microorganismo no se lisa, pero se transforma en filamentos.

II. En la segunda etapa, las investigaciones demostraron que uno de los pasos terminales en la biosíntesis de la pared celular de bacterias, catalizado por la enzima peptidoglican transpeptidasa, es sensible a la penicilina. (Wise and Park, 1965; Tipper and Strominger, 1965; Izaki et al., 1966). Estudios realizados por Cooper (1956) indicaron que la penicilina radiactiva podía unirse específicamente a proteínas en la membrana de las bacterias.

III. Durante la tercera etapa, se demostró que las membranas de varias especies bacterianas contienen diferentes proteínas que se unen covalentemente a las penicilinas. Estas proteínas son denominadas Proteínas de Unión a las Penicilinas (PUP_S). En base a su peso molecular las PUP_S se agrupan en dos clases:

1. PUP_S de bajo peso molecular (menor a 40 - 50 Kd). Estas proteínas son altamente sensibles a las cefalosporinas y poco sensibles a penicilinas. Se localizan tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Pueden ser inactivadas o eliminadas sin matar al microorganismo. In vitro tienen la función de carboxipeptidasa y transpeptidasa.

2. PUP_S de peso molecular alto (60-110 kd). Tales proteínas son altamente sensibles tanto a cefalosporinas como a penicilinas. Representan la menor proporción del total de PUP_S y son esenciales para la viabilidad de la

célula. Dentro de las funciones que desempeñan las PUP_s in vivo se encuentra la elongación celular, forma celular y el entrecruzamiento del péptidoglicano.

Péptidoglicano

El péptidoglicano, también conocido como mureina o mucopéptido, es una estructura polimérica y representa la porción rígida de la pared celular bacteriana. El péptidoglicano rodea la membrana citoplásmica y determina la forma bacteriana. El 50% de las paredes de las bacterias Gram positivas están constituidas por péptidoglicano; las de las Gram negativas tienen una porción mucho menor (Hersbach, 1984).

Los peptidoglicanos varían en su composición química y estructura de una a otra especie, pero tienen similitudes básicas; son polímeros muy largos compuestos de tres clases de bloques de construcción: a) acetilglucosamina (AGA o GLcNAc), b) ácido acetilmurámico (AMA o MurNAc), y c) un péptido formado de cuatro o cinco aminoácidos de variedad limitada. La mejor manera de representar un péptidoglicano es por cadenas de un armazón polisacárido compuesto por unidades alternantes de AGA y AMA con cadenas de péptidos cortos que se proyectan de las unidades AMA. Muchas cadenas de péptidos están unidas transversalmente a otras, lo cual da una gran rigidez a la estructura total.

Algunos peptidoglicanos difieren en que las cadenas de péptidos pueden no estar ligadas transversalmente a otras, sino que están unidas por otra clase de péptido que forma un puente entre el grupo carboxilo terminal de una cadena lateral y el grupo amino libre de lisina o ácido diaminopimélico (DPA).

Síntesis del péptidoglicano

Los pasos consecutivos de la síntesis del péptidoglicano se resumen de la siguiente manera: 1) Síntesis de intermediarios solubles. 2) Formación de intermediarios unidos a lípidos. 3) Polimerización. Cada uno de ellos se describe a continuación.

1) Síntesis de Intermediarios solubles:

La caracterización de las vías que conducen a la biosíntesis del peptidoglicano fue posible, no por un estudio directo del problema, sino por la observación en relación a que los estafilococos tratados con penicilina acumulan un péptido de escasa longitud, unido a un nucleótido. La función de este compuesto se desconocía totalmente hasta que se aisló la pared basal de estos microorganismos y se observó que contenía los mismos aminoácidos; de esta forma se inició una amplia colaboración entre los estudiosos de la síntesis de la pared y los que pretendían determinar el mecanismo de la acción de la penicilina.

Los compuestos acumulados resultaron ser uridin nucleótidos del MurNac, con el grupo carboxilo de la mitad correspondiente al ácido láctico unido a un pentapéptido o a un péptido de menor tamaño (probablemente el precursor). La secuencia de este proceso de biosíntesis llegó a determinarse gracias a los estudios enzimáticos realizados in vitro por Strominger y Ghuysen (1987). La síntesis del precursor completo UDP-MurNac-pentapéptido, a partir de los metabolitos corrientes, precisa de la acción de 15 enzimas, todas ellas presentes en el citoplasma.

2) Formación de los intermediarios unidos a lípidos:

Los estudios de Park y Strominger (1957), utilizando precursores radiactivos, demostraron que las preparaciones enzimáticas, probablemente procedentes de la membrana, y conteniendo lípidos, eran capaces de formar un péptidoglicano de elevado peso molecular y precipitable por ácido a partir de los precursores adecuados. Al fraccionar sus componentes se observó que el P-MurNac-pentapéptido es transferido, en primer lugar, de su nucleótido al fosfato de un lípido portador de membrana, el cual fue identificado como el undelcaprenol-P (este lípido portador interviene también en la biosíntesis de los lipopolisacáridos). A continuación se añade GlcNac, procedente de su derivado UDP, y en los organismos en que se forma un puente polipeptídico éste es añadido al pentapéptido en ese momento.

3) Polimerización:

En los procesos de polimerización, la subunidad completa formada por un disacárido es transferida del lípido

portador al extremo de crecimiento de la cadena de polisacáridos del péptidoglicano. El undecaprenol-PP, liberado a nivel de la membrana pierde un P adoptando de nuevo la forma que le permite aceptar a un precursor y quizá liberando la energía necesaria para reorientarse hacia la superficie interna de la membrana.

El paso final consiste en la formación de enlaces cruzados entre las cadenas laterales de los polipéptidos, mismo que se produce en el exterior de la membrana celular, por lo que no puede utilizar directamente el ATP intracelular para obtener la energía necesaria para establecer enlaces peptídicos. De ahí que la fuente de energía se encuentre en el propio pentapéptido, el cual contiene un aminoácido de más. Así el enlace cruzado se produce gracias a una reacción de transpeptidación que es neutra desde el punto de vista energético. En esta reacción, un radical NH_2 libre desplaza a la D-alanina terminal de una cadena lateral próxima, liberando dicho residuo y formando un puente con la D-alanina subterminal. Esta reacción llegó a conocerse gracias a su bloqueo específico por la penicilina, y su existencia se determinó en primer lugar en células completas y más tarde en extractos; Finalmente los precursores siguen polimerizándose, pero al bloquearse la reacción, dejan de establecerse enlaces cruzados (fig.1) (Davis *et al.*, 1983; Pelcsar, 1982).

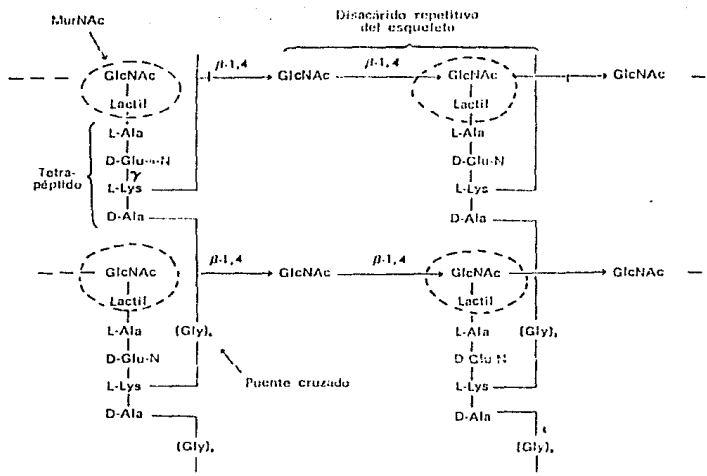
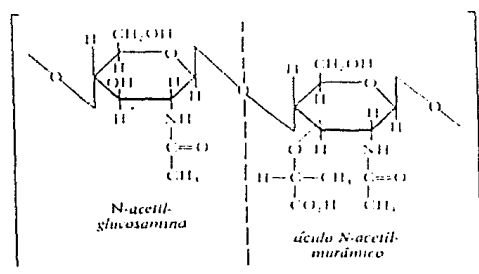
Mecanismo de acción de la penicilina

Desde el descubrimiento de la penicilina se sabe que este antibiótico tiene un efecto letal en las bacterias.

Park (1949) encontraron que el nucleótido uridina se acumula en el citoplasma de las bacterias tratadas con penicilina, las cuales tenían una composición idéntica en su pared celular (Park and Strominger, 1957). Asimismo se encontró que en un medio isotónico el antibiótico inducía más la formación de esferoplastos que la lisis (Lederberg, 1956). El resultado de estas observaciones fue que la penicilina actuaba a nivel de la pared bacteriana.

Actualmente se sabe que la formación de la pared celular se inicia con la unión de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico que se entrecruzan por pequeñas cadenas peptídicas que poseen D-alanina-D-alanina en su carboxilo terminal. En el último paso de la síntesis del péptidoglicano el grupo amino del tercer residuo del pentapéptido desplaza a la D-alanina terminal de una cadena

Esqueleto de disacáridos de peptidoglicano



Abreviaturas: GlcNAc, N-acetil-glucosamina; MurNAc, ácido murámico N-acetil; Ala, alanina; Glu-NH₂, isoglutamina; Lys, lisina; Gly, glicocola.

Fig. 1 Estructura del péptidoglicano en *S. aureus*
Fuente: Davis, 1983.

próxima, y por una reacción de transpeptidación se forma un puente con la D-alanina subterminal realizándose de esta forma un entrecruzamiento.

Tipper y Strominger (1965), así como Wise y Park (1965) demostraron que la penicilina actúa a nivel de la actividad de la enzima transpeptidasa. Debido a las similitudes estructurales entre la penicilina y la porción D-alanina-D-alanina del péptidoglicano, se postuló que el antibiótico actúa como análogo del sustrato, formándose un intermediario entre la penicilina y la enzima unidos covalentemente, con esto se previene la reacción de transpeptidación, y por ende el entrecruzamiento. En consecuencia, se forma una pared celular sumamente frágil llegando a la lisis en un medio no isotónico.

La interferencia de la penicilina con la formación de enlaces cruzados se demostró (Davis et al., 1983) a partir de haber encontrado los siguientes resultados: 1) Se produce una acumulación de glicina NH_2 -terminal. 2) El polímero retiene un exceso de D-alanina marcada radiactivamente. 3) El producto que carece de enlaces cruzados es mucho más soluble que el polímero con enlaces cruzados que forman las células no tratadas con el antibiótico. 4) Las células que crecen en presencia de penicilina acumulan grandes cantidades de un material amorfo entre la membrana celular y la pared, probablemente en las zonas de crecimiento.

ANTECEDENTES

La penicilina es uno de los antibióticos más importantes. Su descubrimiento fue en gran medida fortuito, pero su mejoramiento y su aplicación terapéutica representan el resultado de una gran investigación que produjo uno de los principales progresos de la medicina clínica.

Aunque muchos agentes microbianos se han conocido desde que se descubrió la penicilina, ésta todavía es un antibiótico muy usado para combatir un gran número de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos gram positivos principalmente.

La penicilina se ha utilizado en casos clínicos de pneumococos: meningococos; producidos por Streptococcus pyogenes, y otros no enterococales; streptococos microaerofilicos como son las provocadas por Streptococcus milleri y la gonorrea (Finch, 1990).

La penicilina fue descubierta por Alexander Fleming en 1929 quien observó que una colonia contaminante del hongo Penicillium notatum producía la lisis de las colonias Staphylococcus adyacentes, que contaminaban el cultivo; sin embargo, este agente lítico parecía ser excesivamente inestable como para poder ser utilizado. Diez años más tarde, Chain, en la Universidad de Oxford, demostró que después de su purificación, el material activo llamado penicilina era totalmente estable y presentaba una actividad extraordinaria.

En 1941 se realizaron las primeras investigaciones clínicas en varios enfermos con infecciones bacterianas. La expansión del programa clínico exigió la producción de una mayor cantidad de penicilina de la que podía obtenerse en el laboratorio, por tal motivo rápidamente se inició un amplio programa de investigación en los Estados Unidos de Norteamérica para cubrir esta demanda.

En los primeros años de producción toda la penicilina procedía del Penicillium notatum. La urgente necesidad de producir grandes cantidades del antibiótico durante la Segunda Guerra Mundial provocó una intensa búsqueda de otras cepas más productivas de penicilina. Una de las mejores cepas que se encontró fue Penicillium chrysogenum que se obtuvo a partir de un melón enmohecido (Davis et al., 1983).

La obtención sucesiva de cepas mutantes hiperproductoras de Penicillium chrysogenum se ha realizado en forma empírica, tomando en cuenta exclusivamente la capacidad biosintética del antibiótico, lo cual ha contribuido de manera importante a la producción de penicilina (Erlander y Elianz 1979; Erlander y Aohi, 1982).

En 1945 se logró determinar la estructura química de la penicilina y se demostró, por estudios cristalográficos, que está compuesta de 2 anillos, uno tiazolidínico y otro β -lactámico, los cuales constituyen un núcleo central denominado ácido 6-amino-penicilánico (6-APA). Posteriormente, Abraham en Inglaterra y Adraens en Bélgica esclarecieron la secuencia de síntesis de la penicilina en Penicillium chrysogenum, y demostraron que la condensación de L-cisteína y D-valina da lugar a los anillos mencionados (fig.2) (Abraham, 1974). La penicilina posee, además, una cadena lateral acílica, unida al núcleo de 6-APA y de cuyas características depende el tipo de penicilina resultante y la mayoría de las características antibacterianas y farmacológicas. Diversos ácidos pueden servir como precursores de la cadena lateral de la cual depende también la sensibilidad a la acción de las β -lactamasas (fig.3).

El aislamiento del ácido 6-aminopenicilánico en 1957 fue muy importante en el desarrollo de las penicilinas semisintéticas. El primer producto de este descubrimiento fue la ampicilina (Finch, 1990).

Biosíntesis de la penicilina

La penicilina es sintetizada a través de una serie de pasos metabólicos que se inician con el ácido α -aminoadípico, compuesto que a su vez es precursor de la vía de biosíntesis de L-lisina. El primer paso en la biosíntesis de la penicilina es catalizado por la enzima δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteína sintetasa, que lleva a cabo la unión de α -aminoadípico con el aminoácido L-cisteína, para formar el primer intermediario de la vía biosintética (Lara et al., 1983). Este intermediario se condensa con el aminoácido L-valina, para dar origen al tripéptido δ -(L- α -aminoadipil)-cisteinil-valina.

Los eventos finales en la biosíntesis del antibiótico implican la formación de los anillos β -lactámico y tiazolidínico creando el compuesto con actividad biológica llamado isopenicilina N, el cual es inestable y posee el α -aminoadípico en su cadena lateral que es cambiada, con

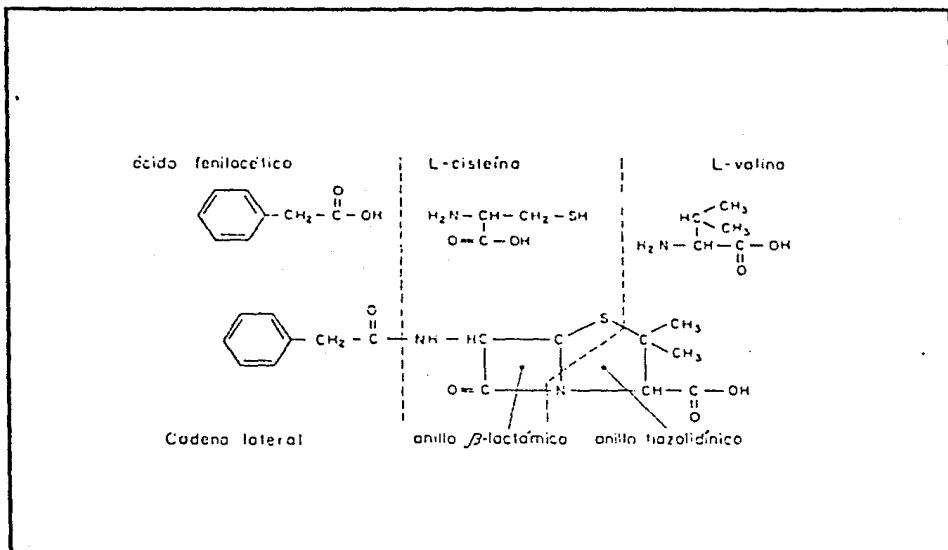
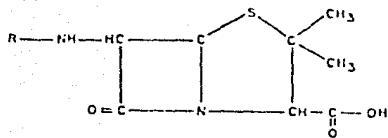


Fig. 2 Estructura de la penicilina G
Fuente: Sánchez, 1987.



Acido G-aminopenicilínico (G-APA)

Penicilina	Radical (R)
Bencil (G)	
2-Pencilil (F)	
n-Heptil (X)	
Fenacilacetil (V)	
p-Hidrosibencil (X)	

Fig. 3 Estructuras de penicilinas naturales
Fuente: Sánchez, 1987.

acción de una acil transferasa, por ácido fenilacético y da origen a la penicilina G o bencil penicilina, producto final de la vía (fig.4) (Flynn et al., 1962).

Regulación de la biosíntesis de penicilina

Efecto de la glucosa

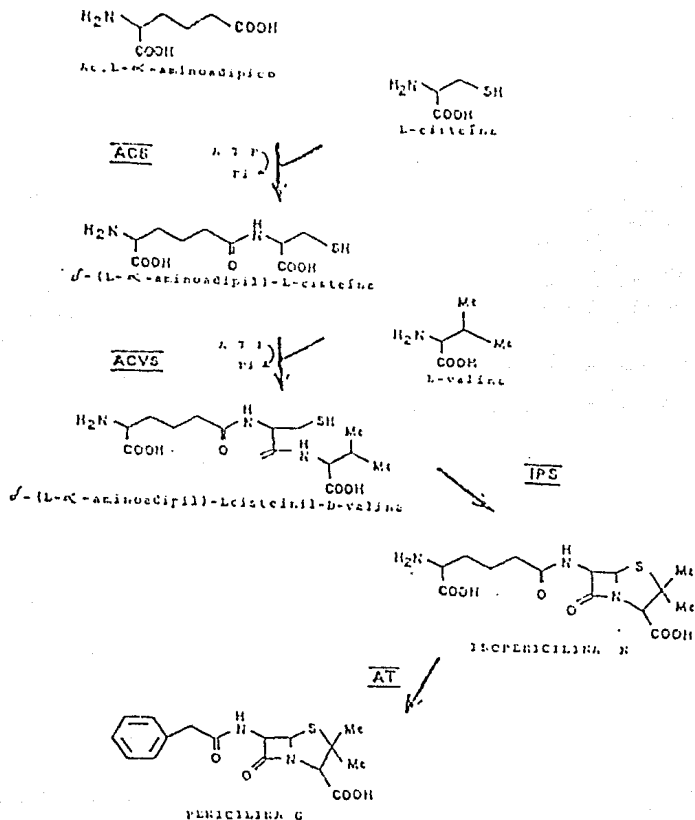
La regulación catabólica por carbono es un mecanismo que controla la biosíntesis de muchos antibióticos. Se conoce que la biosíntesis de éstos es inhibida o reprimida por los productos catabólicos o fuentes de carbono de rápida asimilación como es la glucosa o el citrato.

La glucosa es la mejor fuente de carbono para el crecimiento de varios microorganismos productores de antibiótico, pero el cultivo en glucosa generalmente reduce la actividad de las enzimas que sintetizan antibióticos.

Entre los antibióticos en los cuales se inhibe o reprime su biosíntesis por glucosa podemos mencionar los siguientes: actinomicina producida por Streptomyces antibioticus (Gallo y Katz, 1972), Puricina por Streptomyces alborigen (Pogell et al., 1976), cefalosporina por Cephalosporium acremonium (Demain, 1963) y Streptomyces clavuligerus (Aharonowitz y Demain, 1978)

El efecto inhibitorio de la glucosa sobre la producción de penicilina fue descubierto en estudios tempranos durante la fermentación del antibiótico en 1952 (Johnson, 1952).

Revilla y colaboradores (1986) estudiaron el efecto que tiene la glucosa sobre la biosíntesis de penicilina en Penicillium chrysogenum AS-P-78. Ellos encontraron que la formación del tripéptido δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV) disminuyó cuando el Penicillium chrysogenum es crecido en concentraciones altas de glucosa (140 mM). Un producto del metabolismo de la glucosa inhibe *in vivo* la incorporación de (¹⁴C)valina en el α -aminoadipil-cisteinil (AC) para formar el tripéptido α -aminoadipil-cisteinil-(¹⁴C)valina (ACV). Adicionalmente, la glucosa estimula la actividad *in vivo* de la homocitrato sintetasa, y de la sacaropina deshidrogenasa y aumenta la incorporación de lisina en las proteínas. Estos resultados sugieren que la glucosa estimula el flujo del carbono a través de la ruta biosintética de lisina, lo cual previene la acumulación del ácido α -aminoadipico (AAA). Sin embargo la represión



ACS: δ-(α-Amino adipil)-L-Cisteína Sintetasa

ACV: δ-(L-α-Amino adipil)-L-Cisteinil-D-Valina Sintetasa

IPS: Isopenicilina N Sintetasa

AT: Aciltransferasa

Fig. 4 Ruta biosintética de la penicilina G
Fuente: Sánchez, 1987.

de la síntesis de ACV no es revertida por la adición de AAA, cisteína o valina. La glucosa también disminuye la actividad de la isopenicilina N sintetasa, la cual convierte el ACV a isopenicilina N.

La aciltransferasa, última enzima en la biosíntesis de la penicilina no es afectada por el exceso de glucosa, lo que sugiere que el gen que codifica para esta enzima es diferente del que codifica para la ACV sintetasa y la isopenicilina N sintetasa (Revilla *et al.*, 1986).

Barredo en 1988 obtuvo una mutante de Penicillium chrysogenum en la que no se presentó la represión de la biosíntesis de penicilina por glucosa. Esta mutante (glk 1) fue deficiente en la glucoquinasa dependiente de ATP y mostró una reducción en la asimilación de glucosa por tener dañado el sistema de transporte para este azúcar. La cepa original presentó *in vitro* actividad de fosforilación dependiente de ATP con D-glucosa, D-2-deoxiglucosa y D-galactosa. La cepa glk 1 fue deficiente en la fosforilación con D-glucosa y D-2-deoxiglucosa, pero mantuvo la actividad normal de fosforilación con D-galactosa. En la cepa de Penicillium chrysogenum AS-P-78 la D-glucosa reprimió la β -galactosidasa y la isopenicilina-N-sintetasa. La mutante fue derreprimida de la regulación en ambas enzimas, por lo que se sugirió que tienen un mecanismo regulatorio en común (Barredo *et al.*, 1988).

La vía biosintética de los antibióticos β -lactámicos, ha siendo explicada a nivel molecular (Demain, 1974; Martín, 1978). Sin embargo, el mecanismo molecular de la regulación por carbono requiere de más tiempo para ser dilucidado (Moo-Young, 1980).

Efecto de aminoácidos en la producción de penicilina

a) Lisina

La lisina afecta negativamente la producción de penicilina en Penicillium chrysogenum debido a que la enzima homocitrato sintetasa es inhibida por este aminoácido. Dicha enzima es la primera en la biosíntesis de lisina y del α -aminoadípico, intermediario común en la vía de producción de lisina y penicilina. EL efecto negativo de

la lisina es revertido por la adición del α -aminoadípico al medio de cultivo.

La homocitrato sintetasa de cepas con mayor producción de penicilina es menos sensible al efecto por lisina (Luengo et al., 1979)

b) Acido glutámico

En un estudio realizado por Lara y colaboradores (1988), para determinar el efecto del ácido glutámico sobre la producción de penicilina, incubaron al Penicillium chrysogenum NRRL-1951 (cepa silvestre) en medio mínimo durante 36 horas y posteriormente lo transfirieron a medio mínimo suplementado con ácido glutámico 10 mM, en esas condiciones se presentó una estimulación importante sobre la producción del antibiótico y las pozas de glutámico, glutamina y alanina también se incrementaron.

En el mismo sistema, denominado sistema de células en reposo, se observó que análogos no metabolizables de glutámico, estimularon la formación del antibiótico entre 3 y 6 veces comparados con el control alimentado con cloruro de amonio. Al inhibir la síntesis de proteínas en medio de cultivo con glutámico, se previno el aumento en la producción de penicilina, por lo que antes concluyeron que el efecto estimulatorio depende de la síntesis de proteínas.

A nivel enzimático, el L-glutámico incrementó 3.5 veces la actividad de la δ -L- α aminoadipil-cisteína sintetasa, por lo que sugirieron que el aminoácido estimula la formación de penicilina por una acción inductiva en la concentración de la primera enzima en la biosíntesis del antibiótico (Lara et al., 1983).

c) Aminoácidos neutros

En otro estudio, realizado por Mateos y colaboradores (1990) se observó que la producción de penicilina disminuyó cuando Penicillium chrysogenum se tenía en un sistema de células en reposo con cicloheximida suplementado con aminoácidos neutros. Algunos de los aminoácidos que inhibieron la biosíntesis del antibiótico

fueron: alanina, aspartato, cisteína, valina y glutamina. El efecto negativo de estos aminoácidos se previno cuando se preincubaron las células con glutatión.

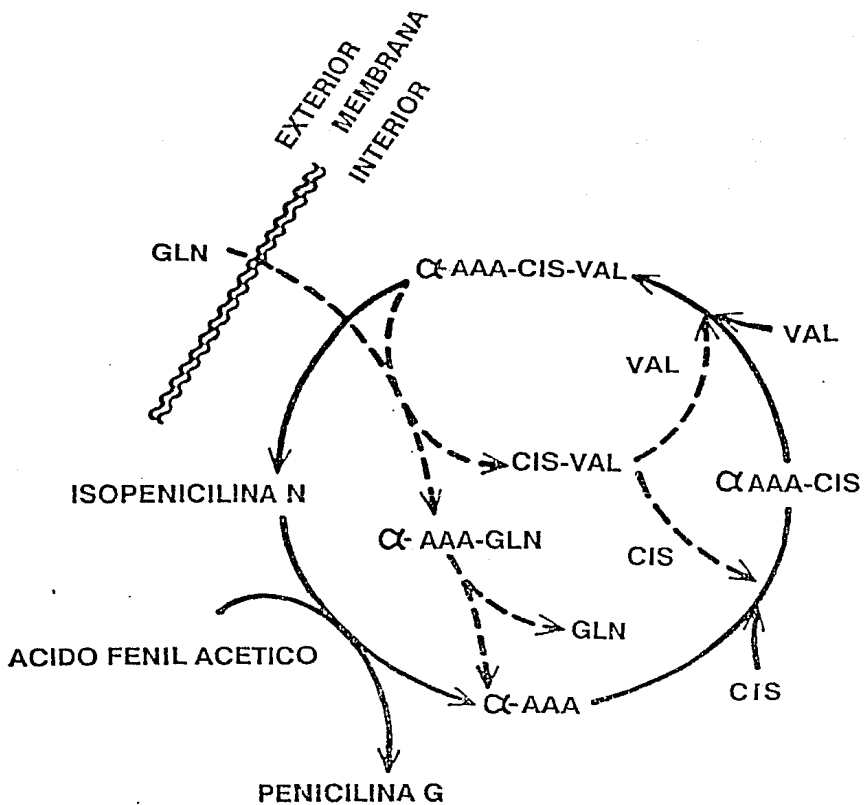
El transporte de glutamina se favoreció proporcionalmente a la concentración de glutatión administrado, por lo que se considero que ese comportamiento podía deberse a un mecanismo semejante al reportado por Meister en 1980 para el transporte de aminoácidos neutros en células de mamíferos, en el cual se incluye como intermediario al γ -glutamil aminoácido (Meister, 1980). Considerando que existe una gran similitud entre la estructura del glutatión y el tripeptido ACV, intermediario en la biosíntesis de penicilina, se pensó que este compuesto podría estrace utilizando para el transporte de aminoácidos y como consecuencia se provocaba que el tripeptido no continuara con la ruta biosintética de la penicilina como se muestra en la figura 5; de esa manera se explicó por qué disminuye la producción de antibiótico en presencia de aminoácidos neutros. Cuando las células se preincubaban con glutatión, éste podría estar participando como intermediario en el transporte sin que se interfiriera con la biosíntesis de la penicilina por el uso de ACV (Mateos y Sánchez, 1990).

Efecto de la fuente de nitrógeno

La mayoría de los hongos pueden utilizar el amonio como única fuente de nitrógeno para su crecimiento y reproducción. Para ese propósito, el amonio puede ser asimilado por diferentes enzimas (fig.6): glutamato deshidrogenasa (GDH), glutamino sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), glutamina transaminasa y la w-amidasa.

La GDH de Neurospora crassa es una de las enzimas de hongos más estudiada y mejor caracterizada desde un punto de vista estructural. Esta enzima es un hexámero constituido por subunidades iguales con un peso molecular de 48,000.

La GS, también caracterizada en Neurospora crassa, está constituida por dos monómeros denominados α y β , que difieren ligeramente en peso molecular. Los monómeros α de la GS ($GS\alpha$) se constituyen principalmente en un tetramero, mientras que los monómeros β ($GS\beta$) forman un octámero. Se ha encontrado que la Km para amonio de la $GS\alpha$ es un poco menor que la de la $GS\beta$, y que la velocidad máxima de reacción es mayor en la $GS\beta$. Cuando se crece al microorganismo en un medio con exceso de amonio, éste es fijado por la GDH y la $GS\beta$ y cuando el medio se encuentra



GLN: GLUTAMINA

α -AAA: ACIDO α -AMINOADIPICO

CIS: CISTEINA

VAL: VALINA

Fig. 5 Modelo propuesto para la incorporación de aminoácidos en *Penicillium chrysogenum* NRRL-1951
Fuente: Mateos, 1990.

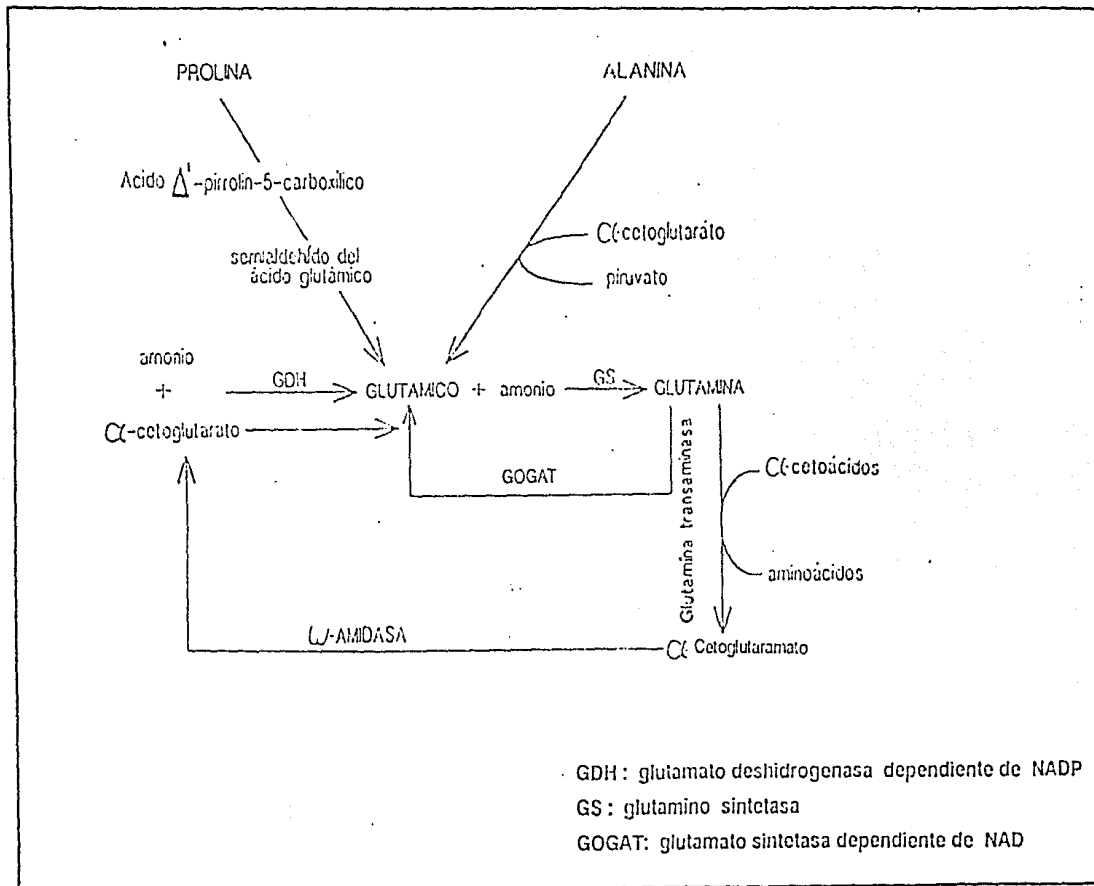


fig. 6 RUTAS METABOLICAS DE LA ASIMILACION DEL AMONIO

limitado en amonio, la vía que opera es la GSa-GOGAT (Hernández, 1984).

La participación de la GOGAT en la asimilación de amonio en hongos filamentosos se demostró por primera vez en Neurospora crassa, basándose en la observación de que una cepa mutante carente de actividad GDH crece igual que la cepa silvestre en cultivos limitados de amonio. La GOGAT esta constituida por un solo tipo de monómero de peso molecular mayor a 200,000 (Hernández, 1984).

La función de la GOGAT es importante en la asimilación de amonio para la formación de glutamina, esto se demostró en N. crassa a través de las siguientes evidencias: a) La acumulación de glutamina y contenido bajo de glutamato y alanina en una cepa GOGAT negativa. b) Acumulación alta de glutamina, bajo contenido de glutamato y alanina y alta excreción de amonio en la GOGAT negativa comparada con una cepa GDH negativa. c) Disminución del crecimiento en la cepa GOGAT negativa; la cepa GDH negativa tiene un crecimiento óptimo en glutamina como fuente de nitrógeno, así como en medio suplementado con alanina u otro aminoácido precursor de glutamato (Calderón y Mora, 1985).

La forma en que el ión amonio es administrado a las células es muy importante, puesto que algunas de sus sales son pobremente utilizadas. Existen varios trabajos acerca del transporte del amonio en hongos en los que se incluye al Penicillium chrysogenum. Se sabe que estos microorganismos poseen una gran variedad de sistemas de transporte para los diferentes compuestos nitrogenados que se presentan en la naturaleza. Se ha reportado que los hongos, al consumir su fuente de nitrógeno, generan incrementos en la tasa de incorporación del mismo. También se ha afirmado que el transporte de este ión es retroinhibido por el contenido intracelular de glutamina y asparagina.

Efecto negativo del amonio

El concepto de represión por amonio se ha originado a raíz del efecto negativo que este ión posee sobre la utilización de fuentes de nitrógeno alternativas. No obstante, se ha establecido que no solo la represión por amonio, sino también la represión catabólica ejercida por la fuente de carbono, son mecanismos de regulación normalmente involucrados en la biosíntesis de los antibióticos β -lactámicos (Sánchez et al., 1987).

En 1981, Sánchez y colaboradores observaron en Penicillium chrysogenum que al aumentar la concentración de amonio de 8.5 mM (control) a 85 mM, la producción del antibiótico se reducía sin que el pH del medio y el crecimiento se afectaran. Esta condición reprimió en un 80% a la enzima glutamino sintetasa, por lo que se consideró que muy posiblemente la glutamina donara los precursores para la síntesis de penicilina y que al estar disminuida su concentración, la producción del antibiótico se afectaba (Sánchez et al., 1981).

Existen otros antibióticos cuya producción también se ve afectada por la concentración del ión amonio (3 - 10 mM), tal es el caso de la leucomicina (Omura et al., 1980), cerulenina (Masuma et al., 1982) y tilosina (Masuma et al., 1983). El título de estos compuestos se incrementa si se adicionan agentes del ión amonio, el incremento de la producción fue asociado a la disminución del ión en el medio (Yoshitake et al., 1984).

Efecto positivo del amonio

La adición de pequeñas cantidades de NH_4^+ (6-34 mM) a un medio de cultivo complejo incrementa la producción de nanaomicina por Streptomyces rosa, subespecie notoensis OS-3966. El mejor donador del ión amonio para la producción de nanaomicina fue la zeolita saturada de amonio, con la cual el título máximo de producción fue cuatro veces mayor que el título del control. En contraste, los niveles bajos del ión amonio por adición de la zeolita no tratada redujo la producción del antibiótico. Concentraciones mayores a 70 mM de amonio inhiben la producción de nanaomicina. El mecanismo de estimulación y de inhibición de la producción de este antibiótico no se conoce aún (Yoshitake et al., 1984).

El grupo de Shunzo (1983) estudió el efecto estimulador del amonio en la formación de estreptomina por Streptomyces griseus HUT 6037. El microorganismo se cultivó en medio mínimo con diferentes concentraciones iniciales de amonio. El efecto estimulador del amonio en la formación del antibiótico se observó en la idiofase y la cantidad de estreptomina fue de 0 cuando la concentración de sulfato de amonio era 2 g/l, 62 cuando la concentración fue 4 g/l y 104 mg/l con 5 g de sulfato de amonio/l). El efecto del amonio en la formación de la estreptomina coincide con la sobreproducción de ácido glutámico durante la trofofase; éste último fue consumido antes de la formación del antibiótico en la idiofase. Cuando el ácido glutámico, la glutamina y la glucosamina fueron suplementados al medio de

cultivo al final de la trofofase, se estimuló la producción de estreptomomicina en la idiofase. Por tal motivo se concluyó que tanto el ácido glutámico como la glutamina tienen la función de donar el grupo amino en la biosíntesis de estreptomomicina (Shunzo et al., 1983).

En estudios con Penicillium chrysogenum realizados por Schwartz y colaboradores (1988) observaron que a tiempos cortos (menores de 60 horas) la producción de penicilina decrecía conforme aumentaba la concentración de amonio (en el rango de 10 a 300 mM), mientras que a tiempos largos (mayores 80 horas), el fenómeno se invertía, es decir, se estimulaba la producción del antibiótico a concentraciones altas de amonio (Fig.7). También se logró establecer que el efecto estimulador ejercido sobre la producción de penicilina es debido al amonio per se, y no al tipo de sal en la cual éste fue administrado (Schwartz, 1985; Schwartz et al., 1988).

Con base en los resultados mencionados, se consideró de gran interés estudiar el efecto estimulador sobre la producción de penicilina, con el fin de caracterizarlo y poder, en el futuro, utilizar la información generada no solo en el ámbito académico, sino también para el diseño de estrategias tendientes al aumento de la producción del antibiótico. Es por lo antes citado que el presente trabajo de investigación se realizó con los objetivos que a continuación se mencionan.

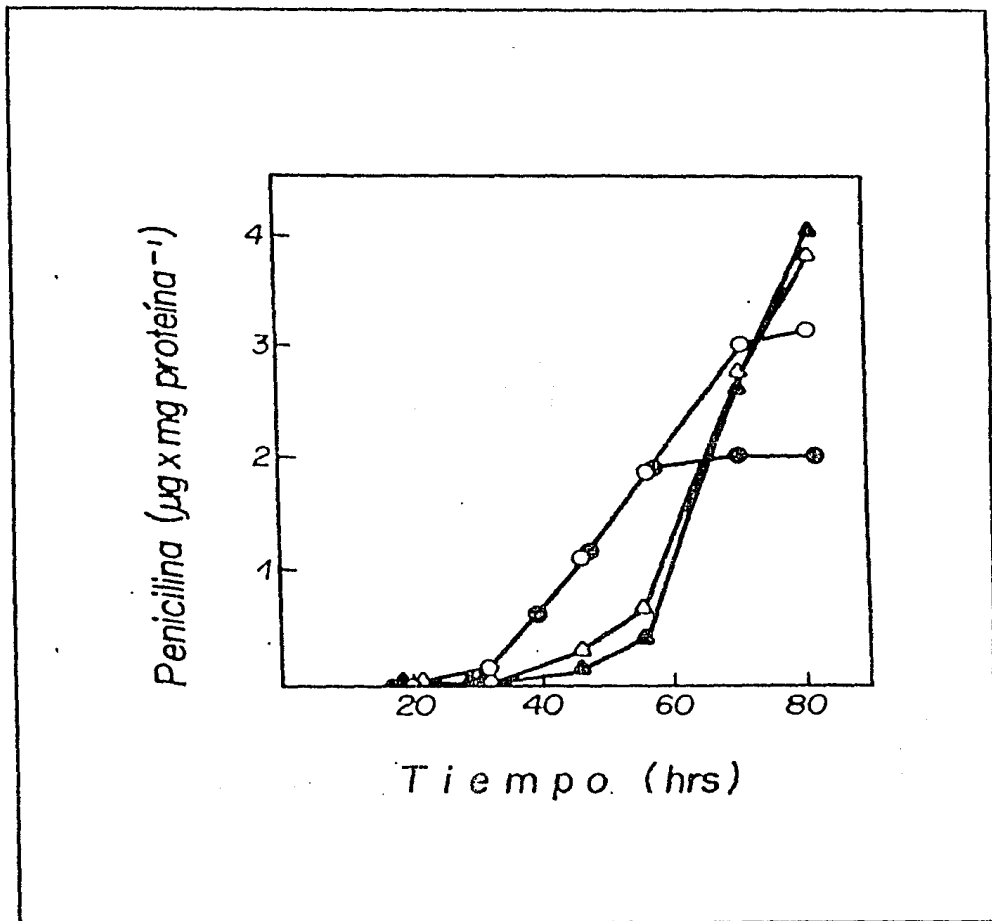


Fig. 7 Producción de penicilina G en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de amonio: (●) 10 mM; (○) 25 mM; (▲) 200 mM y (△) 300 mM Fuente: Schwartz, 1985.

OBJETIVO GENERAL

Caracterización fisiológica del efecto estimulador del amonio sobre la producción fermentativa de penicilina G en el hongo Penicillium chrysogenum NRRL-1951.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Determinar si el efecto estimulador del amonio sobre la síntesis de penicilina se presenta en altas concentraciones de este ión.
2. Definir si el amonio per se es el responsable del efecto estimulador en la producción de penicilina.
3. Determinar si la producción de penicilina y la estimulación de la misma, depende de la síntesis de novo de proteínas.
4. Conocer qué compuesto es el responsable de la estimulación en la producción de penicilina, cuando se incuba al Penicillium chrysogenum NRRL-1951 en medio de cultivo con altas concentraciones de amonio.

ESTRATEGIA

Con el propósito de alcanzar los objetivos mencionados en la sección anterior, se estableció la siguiente estrategia experimental:

Las cepas que se utilizaron fueron Penicillium chrysogenum NRRL-1951 y la mutante P. chrysogenum gdh A1. La primera se eligió debido a que se tenían como antecedentes los resultados de Schwartz (1985), quien reportó que utilizando esta cepa se presentaba la estimulación en la producción de penicilina cuando el medio de cultivo contenía concentraciones altas de amonio. La mutante que se seleccionó fue obtenida por Lucas (1990) y debido a sus características, permitió que aún sin disponer de los inhibidores específicos de las enzimas que participan en la vía de asimilación de amonio, se pudieran realizar experimentos que ayudaran a esclarecer el efecto estudiado.

Los criterios de evaluación que se establecieron durante la investigación, fueron:

- pH del medio de cultivo.
- Crecimiento del hongo (mg de proteína/ ml).
- Producción específica de penicilina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína).
- Amonio residual (mM).

Los criterios más utilizados fueron el pH y la producción específica de penicilina debido a que el primero indicaría si el efecto observado podía deberse a cambios de éste en el medio de cultivo y no a los compuestos usados en la experimentación. La producción específica, permitiría conocer la cantidad de penicilina en el medio de cultivo por cada miligramo de proteína del Penicillium.

La investigación se inició con experimentos que nos indicaran si el efecto de estimulación sobre la producción de penicilina se reproducía en las condiciones con las que se estaba trabajando. Una vez que se reprodujo el efecto,

se realizaron experimentos para dilucidar si el amonio per se es el responsable de la estimulación en la producción de penicilina G.

A fin de continuar con la caracterización del efecto estimulatorio, se determinó si la estimulación mencionada anteriormente, dependía de la síntesis de novo de proteínas y cuales enzimas serían las que probablemente se inhibían por la acción de la cicloheximida.

Con el objetivo de conocer qué compuesto es el responsable de la estimulación de la producción del antibiótico, se realizaron experimentos en fermentaciones con adiciones de glutámico, glutamina y aminoácidos precursores de la síntesis de penicilina. También se llevaron a cabo "sistemas de células en reposo" con la cepa silvestre y la mutante, suplementando el medio de cultivo con los mismos aminoácidos que se adicionaron en las fermentaciones.

Finalmente, se analizaron los resultados y se obtuvieron las conclusiones del trabajo.

MATERIAL Y METODOS

MICROORGANISMOS

- Penicillium chrysogenum NRRL-1951 (cepa silvestre): Hongo en estudio, proporcionado por el Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL. U.S.A.

- Penicillium chrysogenum gdh A1: Cepa mutante obtenida en el laboratorio a partir de la cepa silvestre. Esta mutante posee baja, casi nula, actividad de la enzima glutámico deshidrogenasa.

- Sarcina lutea NRRL-B-1018: Microorganismo sensible a la penicilina, proporcionada por el Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL. U.S.A.

MEDIOS PARA LA CONSERVACION DE LAS CEPAS

Esporas de Penicillium chrysogenum NRRL-1951 y de la cepa mutante GDH⁻ se conservaron en congelación en medio Sabouraud suplementado con 0.1% de levadura (Cornelius, 1977) y 40% de glicerol.

Peptona	10.0 g
Dextrosa*	20.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada cbp.	1000.0 ml

* Se esteriliza por separado.

La D.O. de la suspensión de esporas de las cepas fue 1.5 a 540 nm de longitud de onda.

Sarcina lutea NRRL-B-1018 se conservó resemebrándola mensualmente en placas con medio para antibiosis (Booth, 1971), cuya formulación es la siguiente:

Peptona	6.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Extracto de carne	1.5 g
Agar	15.0 g
Agua destilada cbp.	1000.0 ml

MEDIO PARA CUANTIFICAR EL ANTIBIOTICO

El medio de cultivo empleado es el de antibiosis cuya composición se indicó antes.

MEDIO DE PRODUCCION DE PENICILINA (Jarvis, 1947)

Mezcla de sales de J & J	100.0 ml
Acido fenilacético	0.5 g
Acetato de sodio	3.2 g
Lactosa*	30.0 g
Glucosa*	10.0 g
Agua destilada cbp.	1000.0 ml

La concentración de cloruro de amonio se varió de 10 a 200 mM; en la parte correspondiente a la presentación de resultados ésta se indica en el texto.

* Se esterilizan por separado.

J & J: Mezcla de Jarvis y Johnson.

pH 6.8 - 6.9 ajustado con hidróxido de sodio 10N.

Mezcla de sales de Jarvis y M. Johnson (Jarvis, 1947):

KH_2PO_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
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.02 g
NaSO_4	0.50 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.02 g
$\text{CaCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05 g
Agua destilada cbp.	1000.0 ml

CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Los matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio de producción se inocularon con la suspensión de esporas con D.O. de 1.5 a 540 nm, en relación de 0.5 ml/ 50 ml de medio y se incubaron a 29 °C con agitación rotatoria de 165 rpm. durante períodos de 96 a 160 horas, dependiendo de la importancia del tiempo en el experimento. Cada 12 horas se tomaron muestras de 2 ml en forma aséptica.

CUANTIFICACION DE CRECIMIENTO

El crecimiento se cuantificó como proteína micelial de cada muestra mediante el método de Lowry (1951) utilizando como estándar para la curva de calibración albúmina sérica bovina (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El tratamiento previo a la determinación fue el siguiente:

Después de centrifugar y retirar sobrenadante, el micelio de cada muestra se homogenizó con un volumen igual al de la muestra original de ácido tricloroacético 5% utilizando un homogenizador mecánico K 45 de Tri-R-Instruments. Se agregó a la muestra 1.0 ml adicional de ácido tricloroacético 5%. El homogenizado se centrifugó y retiró

el ácido. El sedimento se resuspendió con hidróxido de sodio 0.4 N en proporción igual a la muestra original.

CUANTIFICACION DE PENICILINA

La penicilina se cuantificó por el método de difusión en agar en placa (Frederick, 1975; Aneé, 1982). El microorganismo de prueba fue la Sarcina lutea NRRL-B-1018 precrecida 12 horas, a 29°C con agitación de 160 rpm, D.O 1.8 a 540 nm.

La respuesta observada en esta prueba es la presencia de un halo de inhibición del crecimiento. El diámetro del halo es proporcional al logaritmo de la concentración del antibiótico. La curva patrón se elaboró con penicilina G del laboratorio Lakeside.

CUANTIFICACION DE AMONIO RESIDUAL

El amonio residual se determinó en el caldo de fermentación mediante el método de Weatherburn (1967).

SISTEMA DE CELULAS EN REPOSO (SCR)

Las células de Penicillium chrysogenum se preincubaron 36 ó 48 horas en el medio de producción de penicilina, suplementado con 10 ó 200 mM de cloruro de amonio, dependiendo del experimento, en las condiciones de crecimiento antes mencionadas. Posterior a la preincubación las células se cosecharon, se lavaron dos veces con igual volumen de agua destilada estéril y 2.5 ml se transfirieron a matraces de 125 ml con 22.5 ml medio suplementado con 10 mM del aminoácido deseado en la condición a estudiar.

Composición del medio:

Mezcla de sales J&J 10X	160 ml
Sol. amortiguadora de fosfatos 1M, pH 7.	320 ml
Acido fenil-acético	0.5 ml
Lactosa *	30 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

(*) Esterilizar por separado

RESULTADOS Y DISCUSION

En el desarrollo experimental de esta investigación se planteó una serie de preguntas a las que se daba respuesta con los experimentos realizados. De este modo, las preguntas fueron:

1.- ¿El efecto estimuladorio de la producción de penicilina se presenta en altas concentraciones de cloruro de amonio?

Para conocer si el efecto estimuladorio del amonio sobre la producción de penicilina se presentaba de acuerdo a lo reportado por Schwartz (1985) en el modelo con el que se estaba trabajando, se inocularon las esporas de Penicillium chrysogenum NRRL-1951 en matraces de 250 ml con 50 ml de medio, bajo las condiciones de incubación y tratamiento de las muestras como se indica en la sección de material y métodos de esta tesis.

Las concentraciones de cloruro de amonio experimentadas fueron las siguientes: 10, 50 y 130 mM.

Los resultados obtenidos se presentan en la fig.8, en donde es evidente que al aumentar la concentración del amonio, se incrementa la producción específica del antibiótico. La máxima producción específica alcanzada por el control (amonio 10 mM) fue de 4.74 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.; 7.18 en 50 mM y de 13.48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot. en 130 mM a las 60 h de fermentación.

En la misma figura 8, se observa que el crecimiento del hongo fue muy semejante en concentraciones con cloruro de amonio 50 y 130 mM y ambos estan por arriba del control; 51% el primer caso y 184% el segundo.

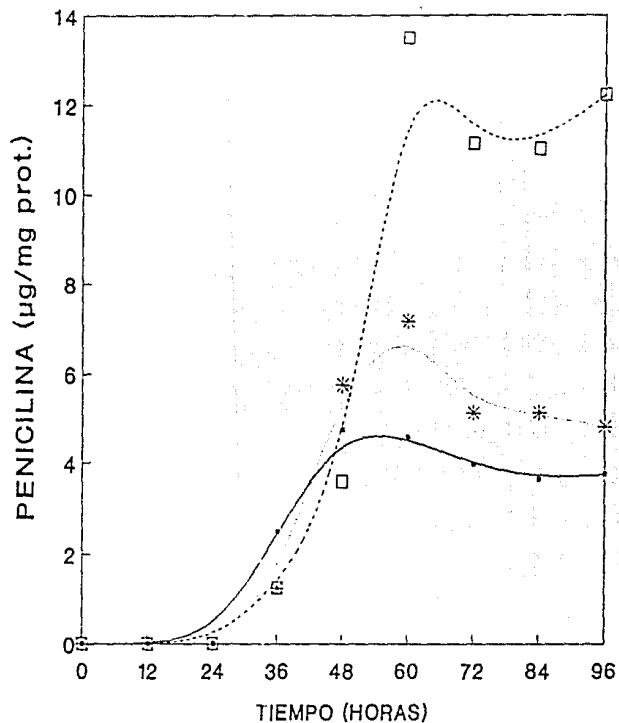
El pH evolucionó en forma muy parecida en las tres concentraciones de amonio utilizadas (fig. 8) lo que nos indica que el aumento en la concentración de amonio no modifica el pH del medio de cultivo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que se reprodujo el efecto de estimulación de la producción específica de penicilina cuando se somete al P. chrysogenum NRRL-1951 a concentraciones altas de cloruro de amonio (50 y 130mM).

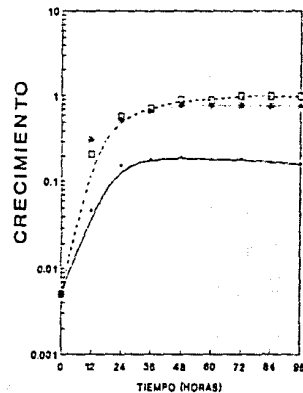
Ante esta conclusión, nuestra siguiente pregunta fue:

2.- ¿Es el amonio par se el responsable del efecto estimuladorio en la producción de la penicilina?

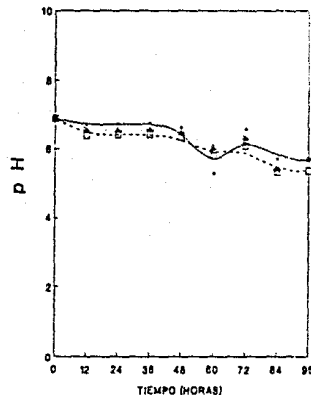
Fig. 8 *Penicillium chrysogenum* NRRL-1951 cultivado en medio mínimo con diferentes concentraciones de amonio



—●— 10 mM * 50 mM -□- 130 mM



Crecimiento (mg prot./ml)



Evolución de pH

Para responder esta pregunta se requería de compuestos que inhibieran de manera específica a las enzimas que metabolizan el ión amonio para que, de esta forma se pudiera observar el efecto de la acumulación intracelular de este ión sobre la producción específica de la penicilina. Ante la carencia de los inhibidores, se decidió utilizar una cepa que permitiera la acumulación del ión amonio, esta cepa fue una mutante de la cepa silvestre de Penicillium chrysogenum. Esta mutante, gdh A1, se obtuvo también en el laboratorio (Lucas, 1990) y tiene como características principales las siguientes: La actividad de la GDH-NADPH es 10 veces menor a la que presenta la cepa silvestre a las 24 horas de inoculación, y alcanza la máxima actividad a las 36 horas. Este valor máximo corresponde al 50% de la actividad de la cepa silvestre, por tal motivo, la mutante denominada gdh A1 es incapaz de asimilar el ión amonio como lo hace la cepa silvestre provocando con esto la acumulación intracelular del mismo (Lucas, 1990).

En el experimento se utilizó como control al P. chrysogenum NRRL-1951 (cepa silvestre) por tener actividades normales en sus enzimas. Ambas cepas se incubaron en medio con cloruro de amonio 10 y 200 mM.

La hipótesis planteada fue: Si el amonio per se era el efector de la estimulación para la producción de penicilina, entonces cuando la cepa gdh A1 se encuentra en alta concentración de amonio, al no poder metabolizarlo, lo acumularía intracelularmente, y se observaría el aumento en la producción específica del antibiótico.

Sin embargo, como se observa en la fig.9 y fig. 11, la mutante gdh A1 creció menos que la cepa silvestre, y no produjo antibiótico en 10 ni en 200 mM de cloruro de amonio; esto indico que el amonio per se no es el efector de la estimulación estudiada, y que este requiere metabolizarse para que se pueda observar la estimulación en la producción específica del antibiótico.

Otro aspecto importante en este experimento fue el consumo de amonio, como se puede observar en la fig. 10, la cepa silvestre, por tener un metabolismo normal del amonio, cuando la cepa se cultivó en el medio de cultivo con 10 mM de cloruro de amonio, éste se consumió casi en su totalidad a las 60 horas de fermentación. En el caso del medio de cultivo con 200 mM de cloruro de amonio, éste se consumió prácticamente 50 mM a las 60 horas de fermentación y posteriormente empieza a incrementarse, presentándose cerca de 180 a las 72 horas y volviendo a disminuir en tiempos posteriores.

Con la cepa mutante el consumo de amonio es diferente (fig. 12), el hongo no agota el amonio del medio de cultivo

Fig. 9 Crecimiento y producción específica de penicilina de la cepa *Penicillium chrysogenum* NRRL-1951

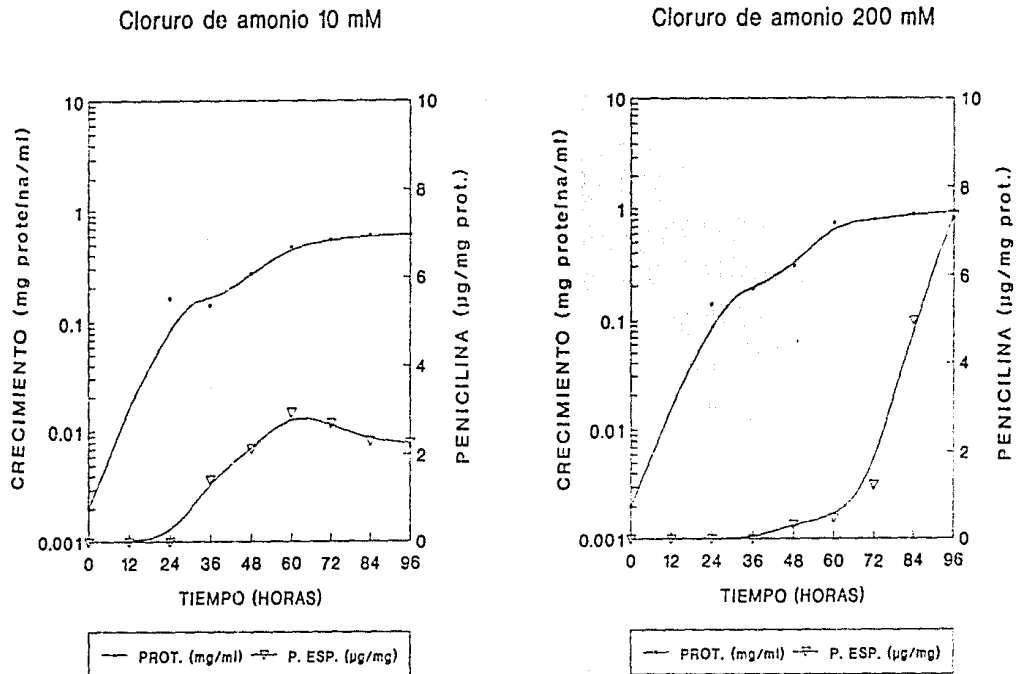
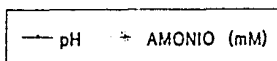
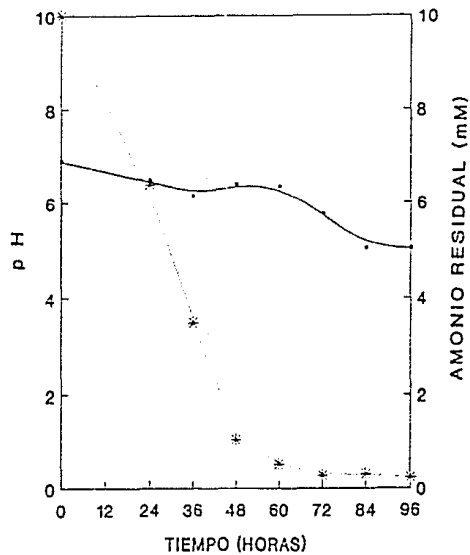


Fig. 10 Evolución de pH y amonio residual de la cepa *Penicillium chrysogenum* NRRL-1951

Cloruro de amonio 10 mM



Cloruro de amonio 200 mM

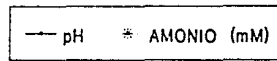
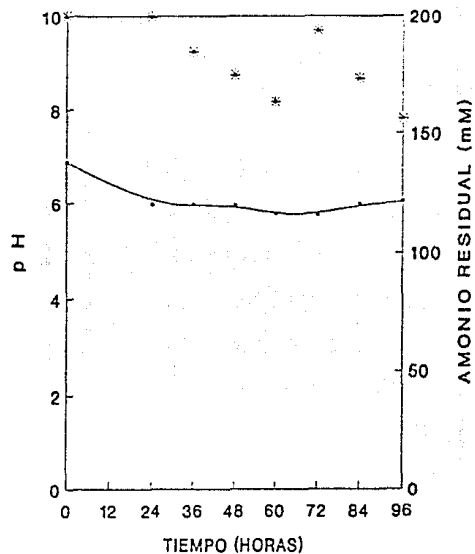
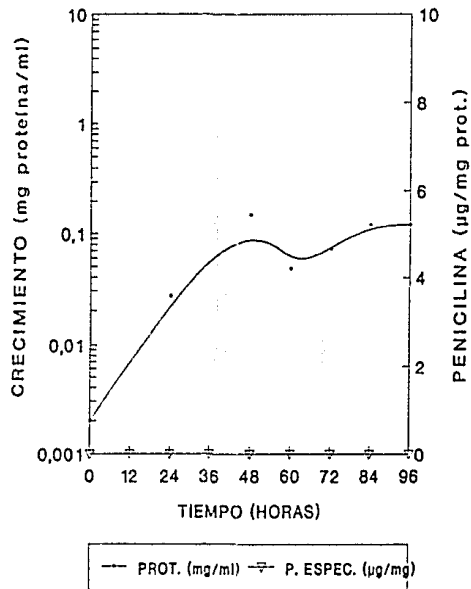


Fig. 11 Crecimiento y producción específica de penicilina de la mutante *Penicillium chrysogenum gdhA1*

Cloruro de amonio 10 mM



Cloruro de amonio 200 mM

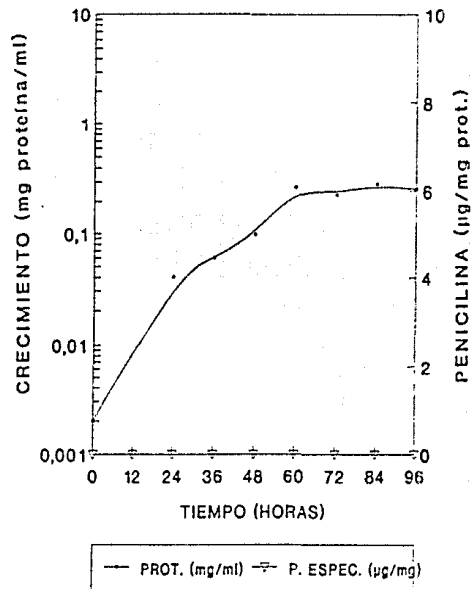
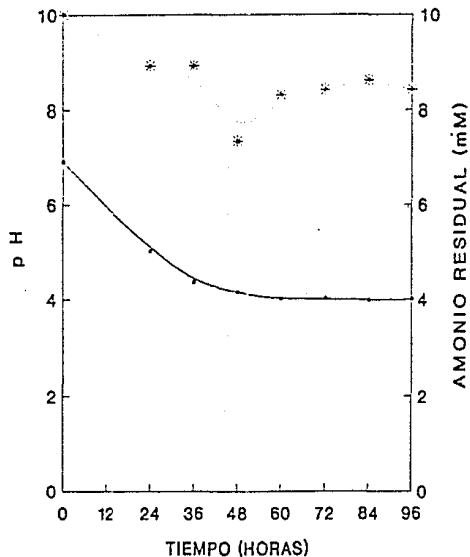


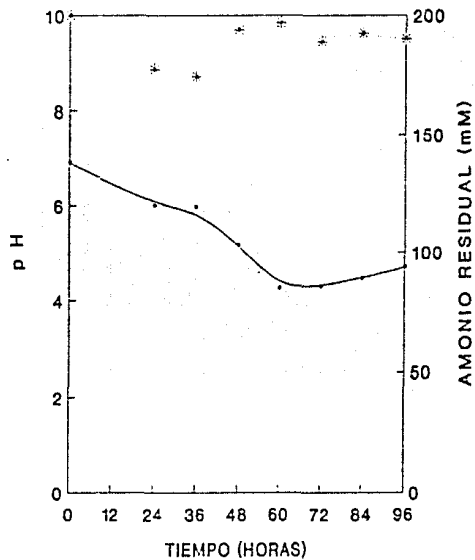
Fig. 12 Evolución de pH y amonio residual de la mutante *Penicillium chrysogenum* *gdhA1*

Cloruro de amonio 10 mM



— pH * AMONIO (mM)

Cloruro de amonio 200 mM



— pH * AMONIO (mM)

con 10 mM de cloruro de amonio, lo máximo que consume es 3 mM alas 48 horas y en tiempos posteriores este ión aumenta hasta más de 8 mM. Sucede algo semejante en el medio con 200 mM, el consumo no es como se observó con la cepa silvestre, tiene un menor consumo y desde las 48 horas la concentración de amonio se mantiene muy cerca a los 190 mM.

En otros estudios realizados en el mismo laboratorio (Cardoza, 1989) se observó que la cepa silvestre crecida en un medio con 5 mM de sulfato de amonio (control) y adicionando a las 36 horas de fermentación sulfato de amonio 200 mM ó metilamina 400 mM (análogo de amonio) la producción específica de penicilina es diferente. Los resultados se muestran en la fig.13, donde se observa que con la adición de sulfato de amonio la producción específica del antibiótico se estimula, pero sucede lo contrario cuando se adicionan al medio 400 mM de metilamina.

El experimento antes señalado podría apoyar nuestra conclusión pues sugiere que el ión amonio per se no es el responsable del efecto estimulatorio, ya que de ser así, análogos del amonio también estimularían la producción de la penicilina.

Con el fin de continuar caracterizando la estimulación de la producción de penicilina en nuestro modelo experimental, nos cuestionamos lo siguiente :

3.- ¿Depende la biosíntesis de penicilina, y la estimulación de su producción, de la síntesis de de novo de proteínas?

Con el fin de contestar esta pregunta, se utilizó la cepa de Penicillium chrysogenum NRRL-1951 y se cultivó en el medio de producción con 10 y 200 mM de cloruro de amonio, se adicionó cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas) a las 36 y 72 horas de fermentación (fig. 14,15 y 16), con el objetivo de poder definir si este inhibidor de síntesis de enzimas afectaba la síntesis de las enzimas que pudieran participar en la biosíntesis de la penicilina y/o en la estimulación de la producción del antibiótico.

Por otra parte, se debe mencionar que utilizar el medio de producción con las dos concentraciones (10 y 200 mM de cloruro de amonio) estudiadas, tuvo el siguiente fin: La concentración de 10 mM funcionó como control y permitiría saber si la síntesis misma del antibiótico requiere de síntesis de novo de proteínas en las condiciones de trabajo establecidas. Por lo que respecta a la de 200 mM

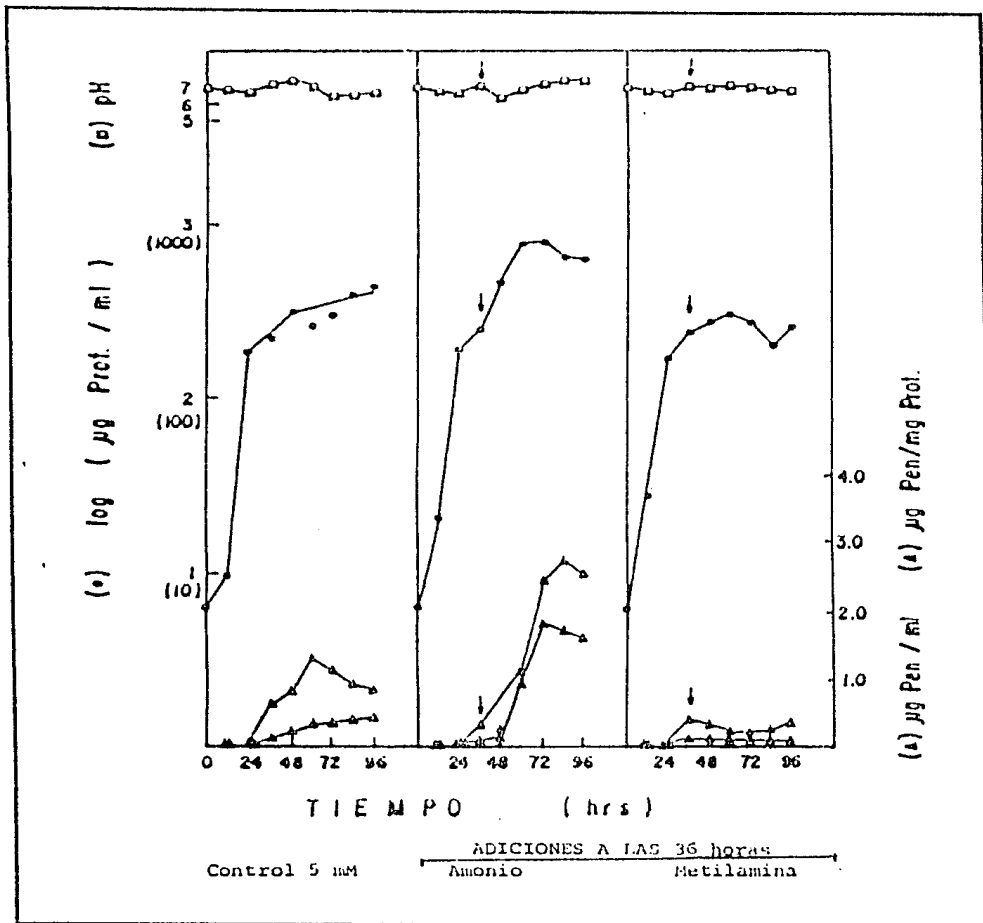
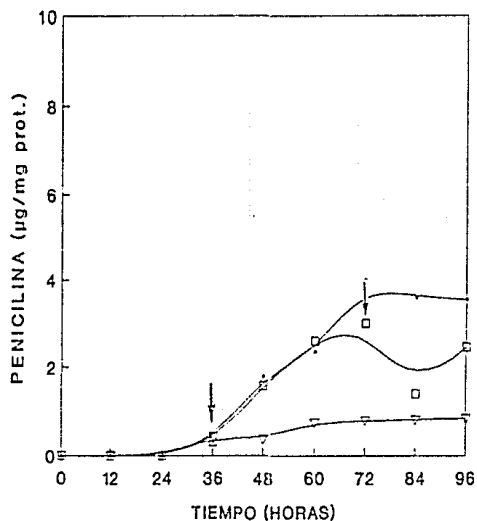


Fig. 13 Efecto de la adición de metilamina (análogo de amonio) sobre la producción específica de penicilina en el *P. chrysogenum* NRRL-1951 Fuente: Cardoza, 1989.

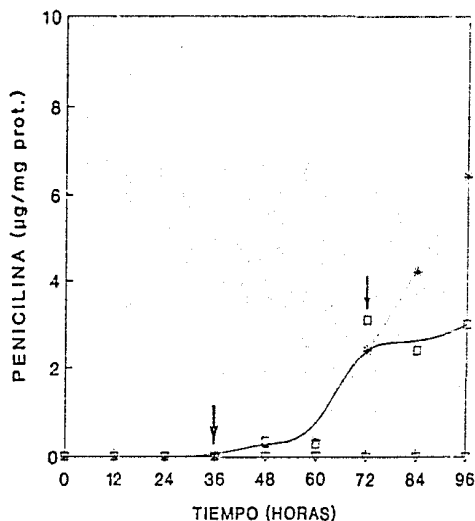
Fig. 14 Producción específica de penicilina por *Penicillium chrysogenum* NRRL -1951 con adición de cicloheximida a las 36 y 72 h de fermentación

Amonio 10 mM



— Control 10 mM -▽- Cicloheximida 36 h
 -□- Cicloheximida 72 h

Amonio 200 mM



* Control 200 mM -▽- Cicloheximida 36 h
 -□- Cicloheximida 72 h

Finalmente, se observó que el pH no sufrió cambios con las adiciones de cicloheximida en las condiciones experimentadas (fig. 16), por lo que es posible descartar que los efectos observados puedan deberse a cambios del pH.

Los resultados obtenidos nos indican que la síntesis del antibiótico, en bajas y altas concentraciones de cloruro de amonio, depende de la síntesis de novo de proteínas. Sin embargo, no se sabe si para el efecto estimulatorio en la producción de penicilina se requiere de la formación de las sintetetas del antibiótico o de las enzimas que producen los precursores de la penicilina. Es importante considerar este efecto ya que al no presentarse la estimulación en la producción del antibiótico no se puede concluir cuál de las enzimas son las que participan en dicha estimulación. A fin de esclarecerlo se planteó la siguiente pregunta.

4.- Adicionando los precursores del antibiótico, ¿es posible reestablecer la producción de penicilina, cuando se utiliza cicloheximida ?.

Para responder a esta pregunta se incubó al Penicillium chrysogenum NRRL-1951 en el medio de producción con 200 mM de cloruro de amonio, y se adicionaron simultáneamente los aminoácidos precursores: ac. α -aminoadípico, cisteína y valina 10 mM, cada uno, con y sin cicloheximida. Es importante aclarar que el ac. α -aminoadípico, se transporta muy lentamente, y que los otros dos aminoácidos no tienen problema en el transporte al interior de la célula cuando se utiliza cicloheximida (Mateos y Sánchez, 1990).

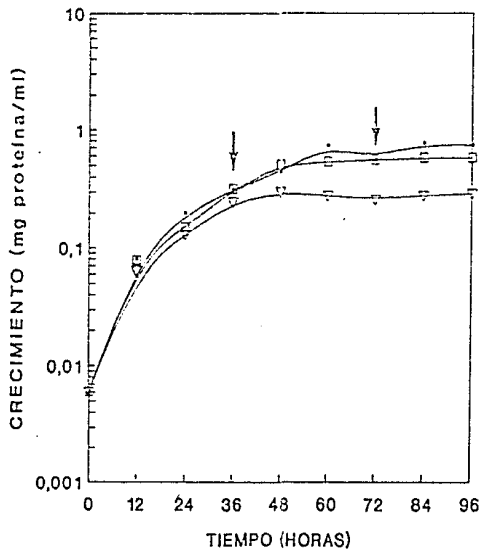
En este experimento se consideró lo siguiente:

Los controles que se tenían eran dos: 1) el medio con cloruro de amonio 10 mM que permitiría saber si existía estimulación, ya que la producción con esta concentración de amonio sería considerada como la mínima dentro de las concentraciones usadas y 2) el medio con cloruro de amonio 200 mM, que es la concentración de amonio en la que se presenta la estimulación de la producción de penicilina.

Si se observaba que la producción de penicilina se restablecía con la adición de los precursores en presencia de cicloheximida y alcanzaba niveles semejantes a los del control (amonio 10 mM), esto nos indicaría que se estaban produciendo en forma normal las sintetetas del antibiótico y que la síntesis de enzimas que se afectaba con la cicloheximida era la que da origen a la producción de los

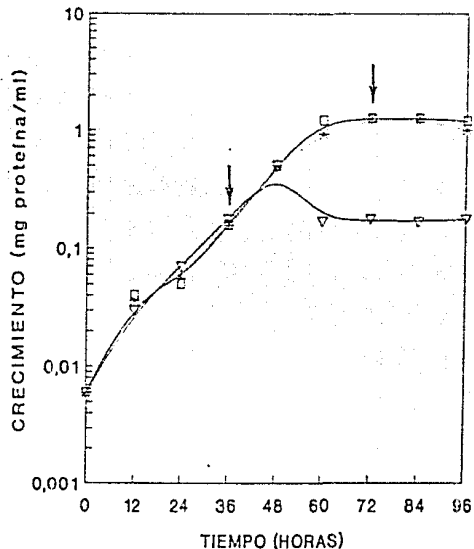
Fig. 15 Crecimiento de *P. chrysogenum* NRRL-1951 con adiciones de cicloheximida a 36 y 72 h de fermentación

Amonio 10 mM



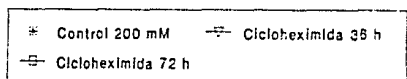
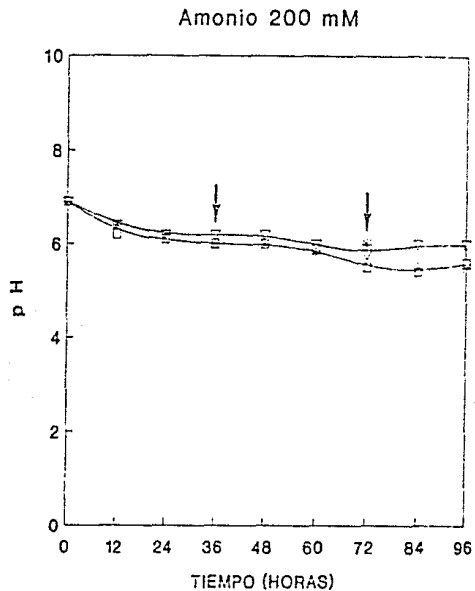
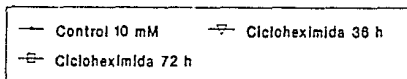
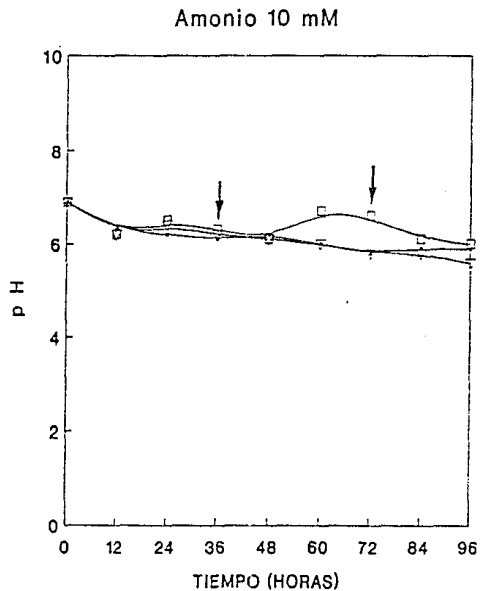
—●— CONTROL 10 mM -△- Cicloheximida 36h
 -□- Cicloheximida 72 h

Amonio 200 mM



*—●— CONTROL 200 mM -△- Cicloheximida 36h
 -□- Cicloheximida 72 h

Fig. 16 Evolución del pH durante la fermentación de *P. chrysogenum* NRRL-1951 con adiciones de cicloheximida a 36 y 72 h



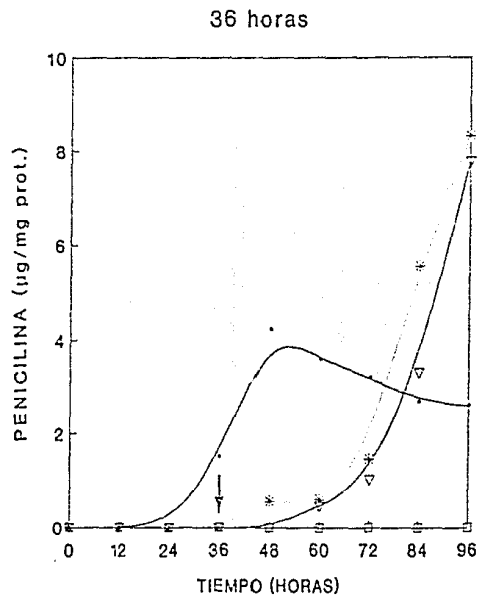
precursores del antibiótico. Si se presentaba la estimulación en la producción de penicilina cuando se adicionaban los aminoácidos precursores con cicloheximida, (por encima de los niveles del control), esto nos indicaría que alguno de los aminoácidos era el efector de dicha estimulación y que la manera en que actuaría podría ser activando las enzimas que se sintetizaron antes de la adición de cicloheximida.

Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 17, 18 y 19 en estas es claro que no se restablece la síntesis del antibiótico y que no se presenta el efecto estimulador con la adición de los compuestos probados. Esto nos indicó que la formación de sintetetasas para la producción de penicilina se inhibe con la cicloheximida; que la síntesis del antibiótico no se restablece con la adición de los aminoácidos precursores, y que el efecto estimulador en la producción de penicilina se previene cuando se inhibe la síntesis de novo de proteínas.

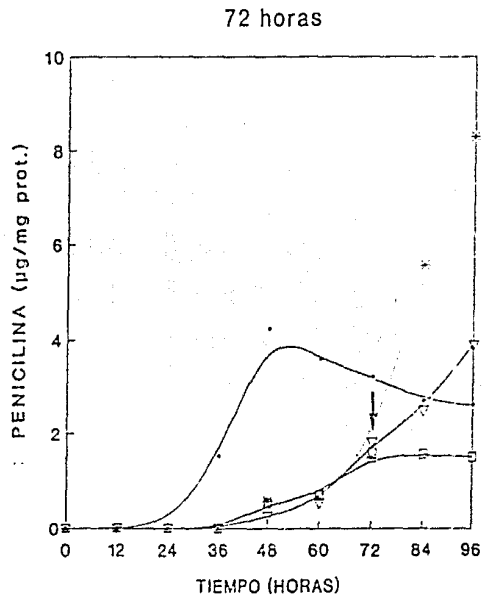
De la figuras 17, llama la atención que cuando los aminoácidos se añaden al medio a las 36 horas de fermentación, en ausencia de cicloheximida, la producción del antibiótico presenta un perfil muy semejante al del control con amonio 200 mM. Sin embargo cuando adicionan a las 72 horas, se observa que la síntesis del antibiótico en ausencia de cicloheximida es mayor que cuando ésta se encuentra presente en el medio, pero menor al control con 200 mM de amonio.

El efecto observado de los aminoácidos precursores sobre la producción del antibiótico, se puede explicar de la siguiente forma: Mateos y Sánchez (1990) publicaron que la producción de penicilina es inhibida por aminoácidos neutros en un sistema de células en reposo de Penicillium chrysogenum con cicloheximida. Estos investigadores realizaron análisis cromatográfico de extractos obtenidos de células incubadas con glutamina marcada y mostraron la incorporación de este aminoácido en la L- γ -glutamyl-L-glutamina y en la δ -(L- α -aminoadipil)-L-glutamina, de tal forma que cuando se inhibe la formación del α -aminoadipato disminuye la incorporación de glutamina. Por el contrario, cuando se incubaron las células con glutatión, la incorporación de glutamina y la síntesis del antibiótico aumentaron, por lo que establecieron que en esta condición los aminoácidos se transportan preferentemente mediante el primer intermediario de la síntesis de glutatión, que en estructura es muy semejante al de la penicilina.

Fig. 17 Efecto de la adición de precursores (con y sin cicloheximida) sobre la producción específica de penicilina por *P. chrysogenum* NRRL-1951



— CONTROL 10 mM * CONTROL 200 mM
 ▽ Precursores 36 h □ Prec. + Cicloheximida



— CONTROL 10 mM * CONTROL 200 mM
 ▽ Precursores 72 h □ Prec. + Cicloheximida

De acuerdo a lo anterior, la disminución en la producción del antibiótico observada cuando se adicionan los aminoácidos precursores a las 72 horas de fermentación, puede deberse a que estos aminoácidos utilizan el tripeptido δ -(aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina, para su transporte, interrumpiendo de esta manera la ruta biosintética de la penicilina G. El hecho de que no se observe el mismo efecto cuando los precursores se añaden a las 36 horas no se contradice con la explicación anterior, ya que según Juárez, K. (1991) la actividad máxima de la enzima δ -(L-aminoadipil)-L-cisteina sintetasa se presenta entre las 36 y 40 horas, esto nos lleva a considerar que a este tiempo se tiene la mayor cantidad de intermediario, el cual puede transportar los aminoácidos del medio de cultivo sin disminuir importantemente la producción del antibiótico.

En cuanto al crecimiento (fig. 18); con la adición de los aminoácidos en medio con 10 mM de cloruro de amonio a las 36 horas de fermentación, el hongo Penicillium creció, a partir de las 60 horas, a niveles semejantes a la condición con 200 mM de amonio en el medio de cultivo.

Cuando la adición de los aminoácidos precursores se realizó con cicloheximida, el crecimiento se detuvo en los niveles que se tenían en el momento de la adición, este efecto, como se había observado anteriormente, se debe a la cicloheximida, que impide que se sinteticen diversas enzimas, entre las que se encuentran las que participan en el crecimiento, dicho efecto es muy notorio a las 36 horas de fermentación, debido a que el hongo se encuentra en fase logarítmica de crecimiento, en la cual requiere de manera importante de la síntesis de enzimas.

En la misma fig. 18 se puede observar que al hacer las adiciones de los aminoácidos precursores a las 72 horas de fermentación, no se presentan cambios muy notorios, esto se debe a que el hongo se encuentra en fase estacionaria, donde su velocidad de crecimiento es menor que en la fase logarítmica, y no depende de la síntesis de enzimas, por lo que la cicloheximida no tiene el mismo efecto que a las 36 horas de fermentación.

Como se observa en la fig. 19, la adición de cicloheximida a las 36 y 72 horas de la fermentación, no modifica el perfil de pH durante la fermentación, es decir, en todas las condiciones experimentadas se comporta semejante a la evolución de pH en 200 mM de cloruro de amonio.

Fig. 18 Efecto de la adición de precursores (con y sin cicloheximida) sobre el crecimiento del *Penicillium chrysogenum* NRRL-1951

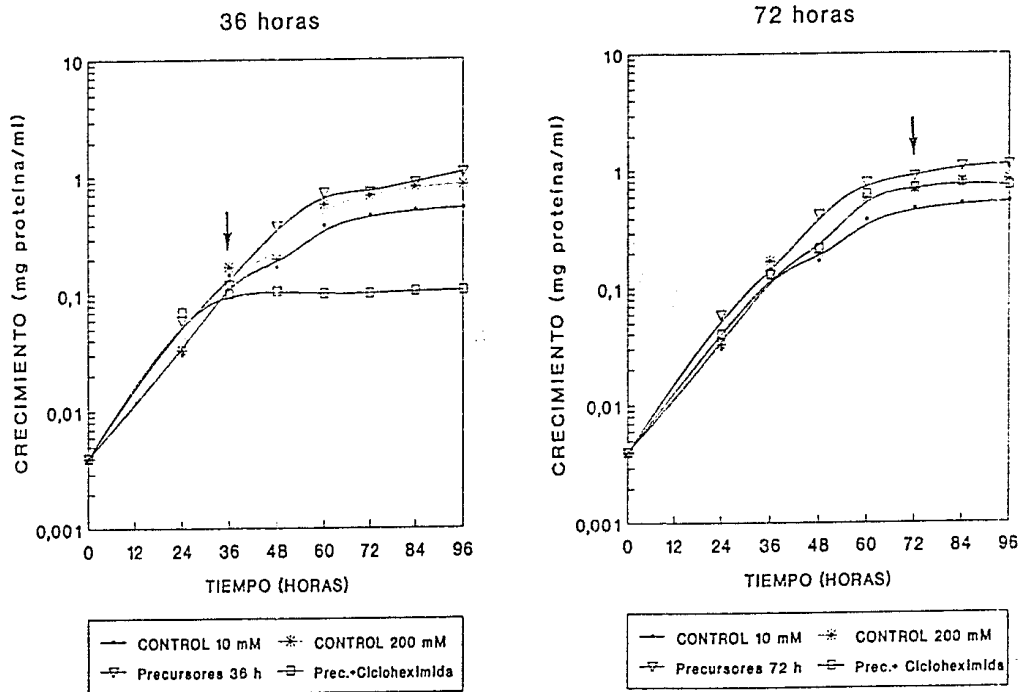
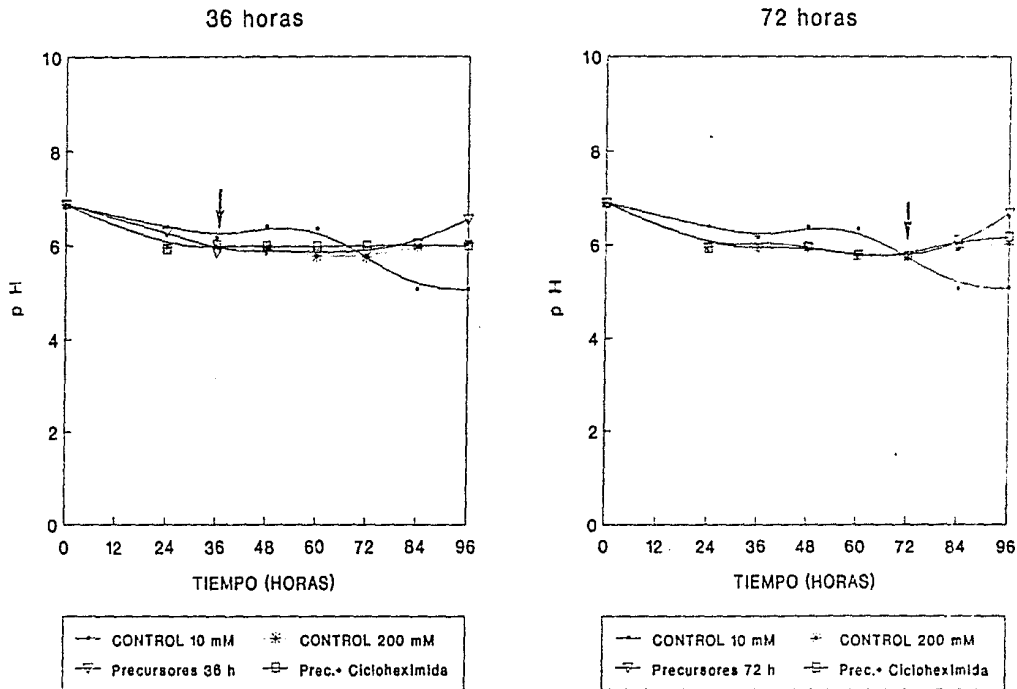


Fig. 19 Evolución de pH de la fermentación de *P. chrysogenum* NRRL-1951 con adición de precursores, con y sin cicloheximida



5.- Considerando que el efecto estimulador de la producción de la penicilina depende de la síntesis de proteínas y que no es debido al amonio per se, sino a un producto de su metabolismo; ¿Qué compuesto sería ese producto?.

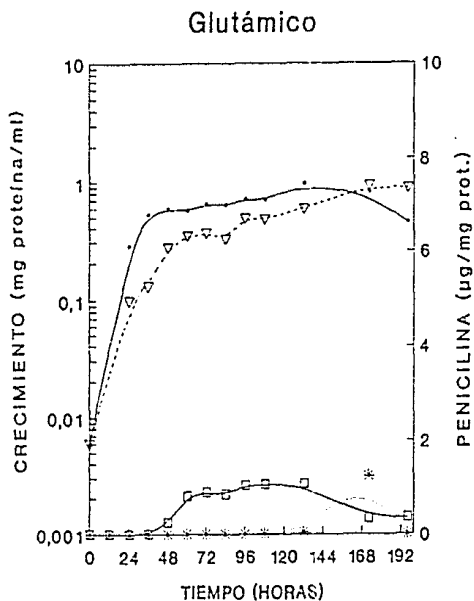
Para poder contestar esta pregunta era necesario conocer cuáles son los compuestos hacia los que se metaboliza el ión amonio; como se puede observar en la figura 6, los principales productos del metabolismo del amonio son el ácido glutámico y la glutamina. Con el fin de conocer el efecto de estos aminoácidos sobre la producción de penicilina cuando se encuentran como única fuente de nitrógeno en el medio, se adicionaron separados a tiempo cero de la fermentación en concentración de 10 mM. Los resultados se muestran en la figura 20, y se observa que comparados con el control que es cloruro de amonio 10mM en el que la producción de penicilina inicia a las 36 horas, esta se retrasa hasta las 168 horas en el caso de la adición de glutámico y 60 horas con glutamina. En ambos casos la producción específica del antibiótico es menor que la observada en el control.

El hecho de que el glutámico y la glutamina provoquen atraso y disminución en la producción del antibiótico puede deberse a que ambos aminoácidos se encuentran como única fuente de nitrógeno, por tal motivo, su metabolismo se dirige más hacia el metabolismo primario como podría ser crecimiento del hongo. Esto se puede confirmar al observar el crecimiento del hongo en presencia de ácido glutámico donde éste es mayor que con glutamina y con cloruro de amonio 10 mM.

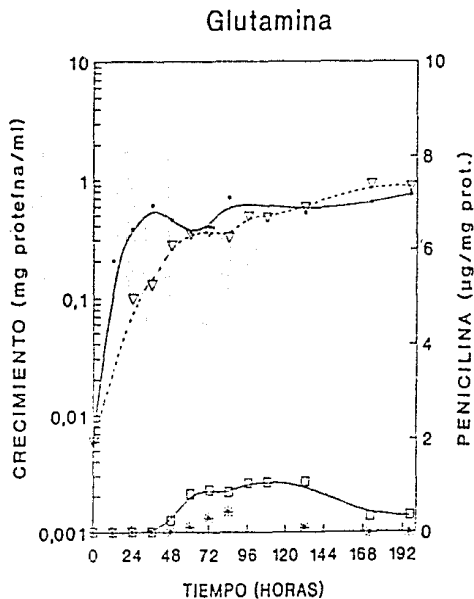
Los resultados obtenidos sugirieron que ambos aminoácidos, cuando se utilizan como única fuente de nitrógeno, pueden participar en la formación del antibiótico, aunque no en una forma tan eficiente como lo hace el cloruro de amonio.

Para confirmar la participación de estos aminoácidos en la producción de penicilina, se realizó un experimento empleando un "sistema de células en reposo" sin cicloheximida con el medio que se indica en la sección de Material y Métodos. Las células de Penicillium chrysogenum NRRL-1951 se preincubaron 36 horas en medio mínimo con cloruro de amonio 10 mM y se transfirieron a un medio para el sistema de células en reposo suplementado con los aminoácidos a probar por separado : ácido glutámico 10 mM, γ -bencil-L-glutamato 10 mM (análogo de ácido glutámico),

Fig. 20 Efecto de glutámico y glutamina como única fuente de nitrógeno sobre la producción de penicilina por *P. chrysogenum* NRRL-1951



Glutámico —●— Crecimiento * Penicilina
 Control -□- Crecimiento □ Penicilina
 Amonio 10 mM



Glutamina —●— Crecimiento * Penicilina
 Control -□- Crecimiento □ Penicilina
 Amonio 10 mM

glutamina 10 mM y metionina sulfoximina 10 mM (análogo de glutamina).

Como se puede observar en la fig.21, se presenta una estimulación en la producción de penicilina cuando se encuentra el Penicillium chrysogenum tanto en presencia de ácido glutámico como de glutamina, pero en ambos casos parece ser necesario que se metabolicen, ya que la producción en presencia de sus respectivos análogos se encuentra disminuida.

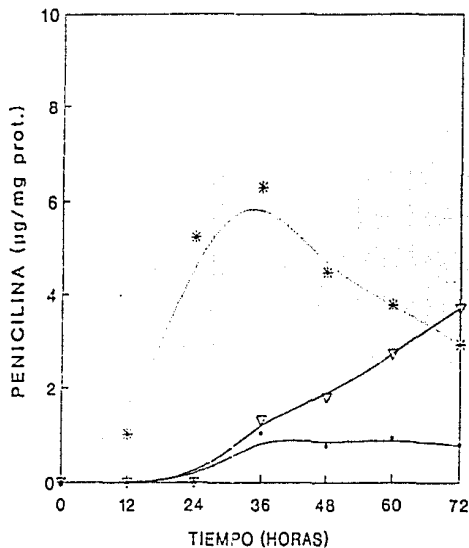
Con el fin de conocer cuál de estos dos aminoácidos, glutámico y glutamina, es el que tiene mayor importancia en la producción del antibiótico, y debido a que no se contaba con inhibidores específicos de las enzimas que participan en el metabolismo del amonio, se decidió realizar otro experimento utilizando un sistema de células en reposo sin cicloheximida, usando la cepa mutante de Penicillium chrysogenum gdh A1 que tiene la actividad de GDH muy baja, comparada con la cepa silvestre con el fin de no tener la ruta metabólica del amonio en forma normal y disminuir la reacción donde se encuentra involucrada la GDH y que cataliza la reacción del ión amonio más cetoglutarato para formar glutámico (fig. 6).

Para determinar las condiciones para trabajar con esta cepa, se realizó un experimento previo en medio mínimo conteniendo 10 y 200 mM de cloruro de amonio. En el primer caso (amonio 10 mM) el medio se suplementó con alanina y prolina, que son precursores del ácido glutámico (fig.6). Se deben usar los precursores de este aminoácido ya que como vimos en resultados anteriores, la cepa no produce antibiótico si no tiene un nivel basal de glutámico, esto también fue observado por Lucas (1990).

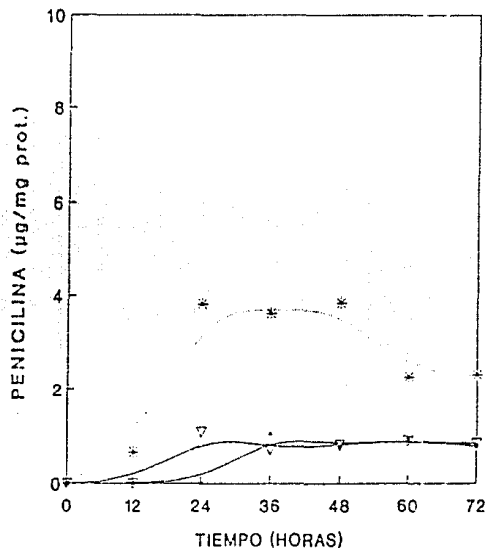
Los aminoácidos prolina y alanina se usaron en concentraciones de 10, 20, 30 y 50 mM con 10 mM de cloruro de amonio. En el segundo caso (cloruro de amonio 200 mM) se usaron concentraciones de 20 y 30 mM de esos aminoácidos, las que fueron determinadas en experimentos anteriores donde se observó que en estas concentraciones del aminoácido se obtenía penicilina. Los resultados se muestran en las figuras 22 y 23.

Es interesante mencionar que cuando el medio mínimo con 10 mM de cloruro de amonio se suplementó con 10, 20, 30 y 50 mM de prolina (fig.22), no se produjo antibiótico en ninguna de las condiciones, mientras que en el medio con

Fig. 21 Efecto del glutámico, glutamina y sus análogos sobre la producción específica de penicilina por *P. chrysogenum* NRRL-1951 en un "sistema de células en reposo" sin cicloheximida



— Sin adición * Ac. Glutámico 10 mM
 ▽ Anal. glutámico 10mM



— Sin adición * Glutamina 10 mM
 ▽ Anal. glutamina 10mM

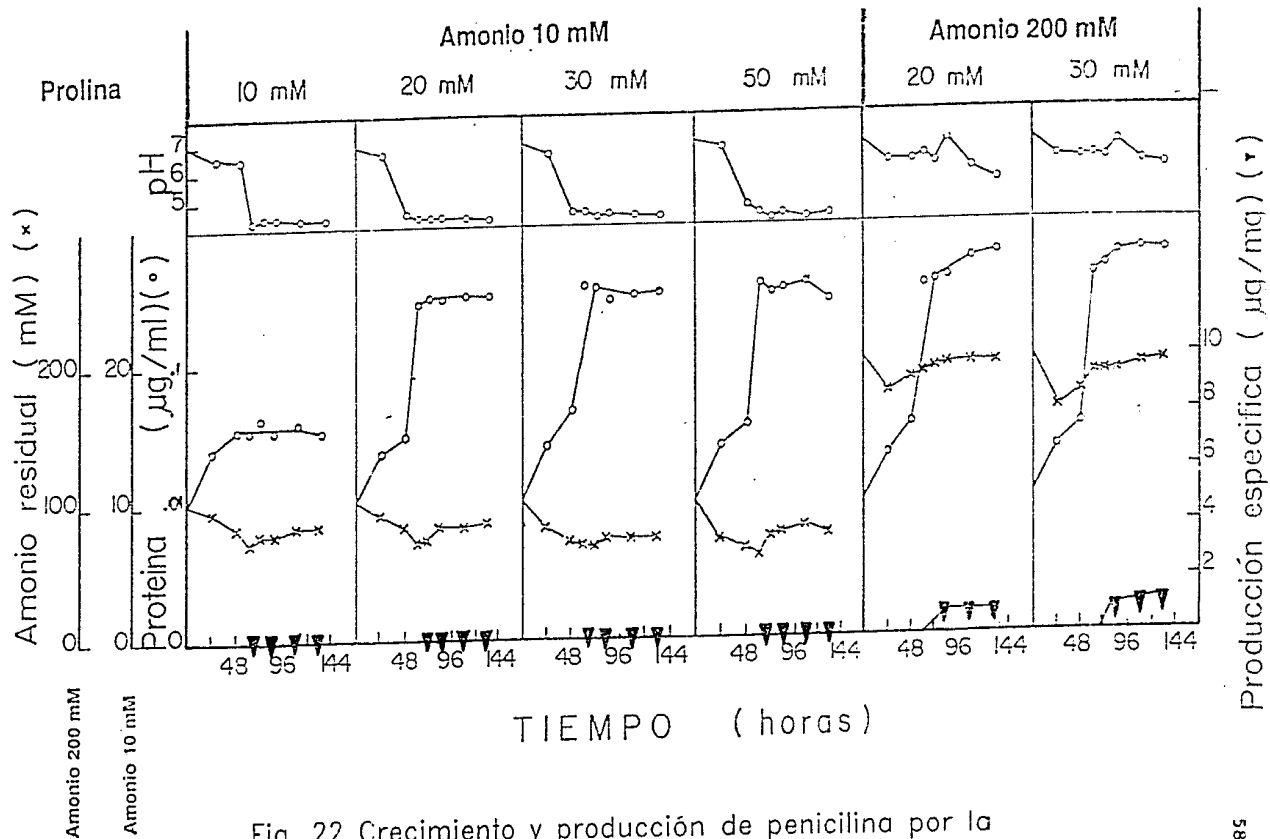


Fig. 22 Crecimiento y producción de penicilina por la mutante *P. chrysogenum gdh A1* en presencia de diferentes concentraciones de prolina y amonio.

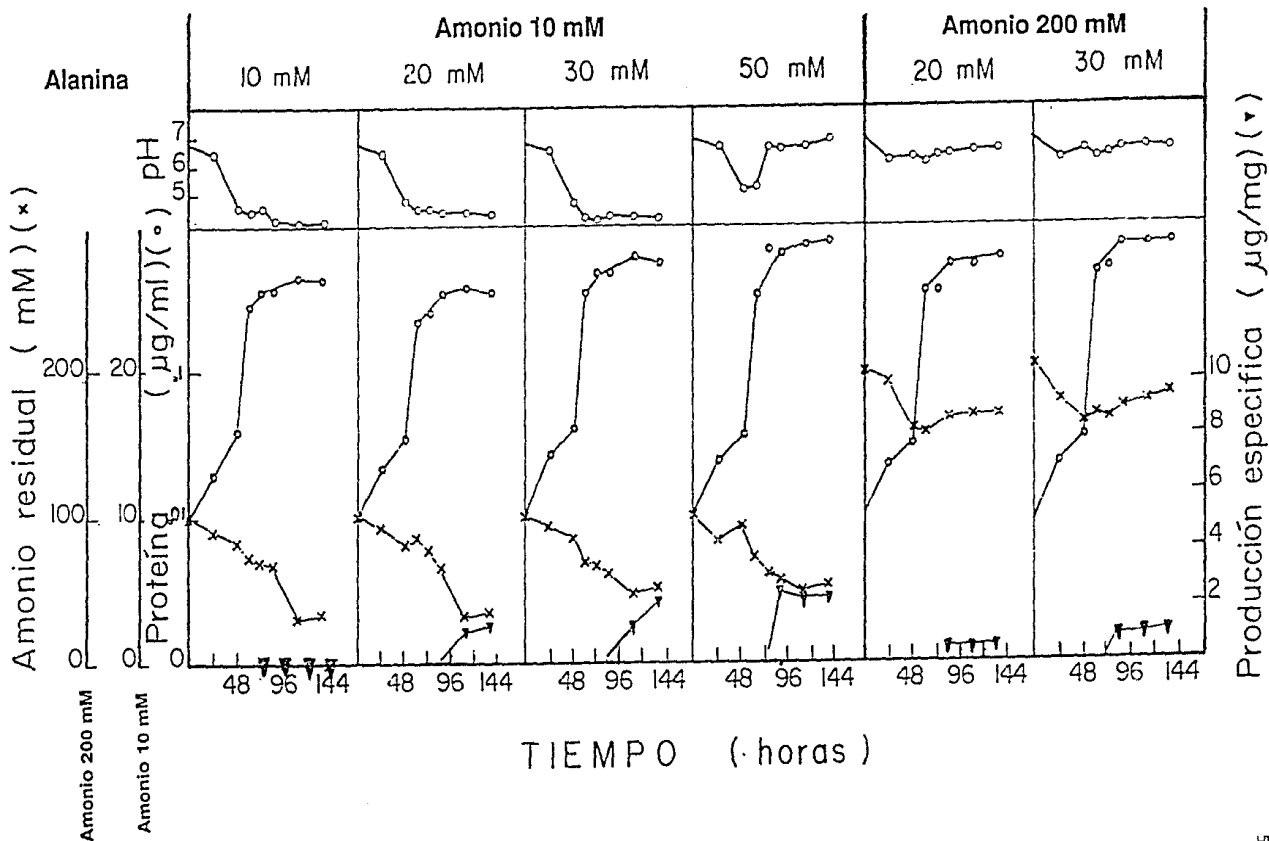


Fig. 23 Crecimiento y producción de penicilina por la mutante *P. chrysogenum gdh A1* en presencia de diferentes concentraciones de alanina y amonio.

200 mM de amonio suplementado con prolina 20 y 30 mM se formó antibiótico a partir de las 72 horas y alcanzó niveles semejantes a los obtenidos cuando se utilizó alanina (1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.), fig. 23. Por el contrario, cuando el medio mínimo con 10 mM de cloruro de amonio se suplementó con 10 mM de alanina, no se produce penicilina, lo que nos sugeriría que el ácido glutámico que se produce no es suficiente para la producción del antibiótico y que el que se sintetiza se puede estar dirigiendo a crecimiento. Cuando se utilizan concentraciones de 20, 30 mM la penicilina se forma (a partir de las 84 horas). A las 60 horas con 50 mM del aminoácido se inició la producción del antibiótico. En todos los casos la producción de penicilina alcanzada aumentó cuando se incrementó la concentración del aminoácido empleado (fig. 23).

Cuando el medio con 200 mM de cloruro de amonio esta suplementado con 20 y 30 mM de alanina, no existe gran diferencia en la producción de penicilina entre estas dos concentraciones. Asimismo, la mayor producción se obtiene en 50 mM de alanina (2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.). Esta resultó ser una concentración que permitió estudiar el efecto de los compuestos que nos interesa determinar debido a que se observa que reunía los elementos que necesita la célula para producir mayores concentraciones del antibiótico.

Este experimento, además de proporcionarnos la información necesaria para el "sistema de células en reposo", esto es, saber qué precursor utilizar, la concentración del mismo y el tiempo adecuado para preincubar, nos permitió concluir: que la alanina es utilizada mejor por la mutante de Penicillium chrysogenum gdh A1 como precursor del ácido glutámico para la producción del antibiótico y para el crecimiento del hongo; que es necesario que el amonio se metabolice hacia ácido glutámico, y tal vez continuar con el metabolismo de éste hacia glutamina para que la síntesis del antibiótico se lleve a cabo.

Sistema de células en reposo sin cicloheximida utilizando la mutante Penicillium chrysogenum gdh A1.

Con base en los resultados expuestos anteriormente, se preincubaron células de la mutante Penicillium chrysogenum gdh A1 durante 60 horas en medio mínimo con cloruro de amonio 10 mM suplementado con alanina 50 mM, aminoácido que como se indicó anteriormente, permitiría que la cepa creciera lo suficiente y que pudiera producir antibiótico. Las condiciones que se experimentaron fueron:

medio sin suplemento (control), glutámico 10 mM y glutamina 10 mM. Con la idea de poder dilucidar cuál de estos aminoácidos es el que tiene mayor importancia en la estimulación de la producción del antibiótico.

Como puede observarse en la fig.24, la mayor estimulación en la producción del antibiótico se obtiene en presencia del ácido glutámico (3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.), mientras que con la glutamina, ésta es muy semejante a la del control sin adición (1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.). Ambas producciones son menores que las obtenidas con células de la cepa silvestre, en la cual con el glutámico la producción fue de 6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot., y con glutamina 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot (fig. 17).

Al analizar los resultados obtenidos se observa que la producción en alanina 50 mM, es semejante al control sin suplemento y a la de glutamina, esto nos podría indicar que en estas condiciones alanina y glutamina no tienen un efecto importante sobre la producción del antibiótico. Cuando se suplementa el medio con ácido glutámico, al igual que con la cepa silvestre se observa la estimulación de la producción de penicilina.

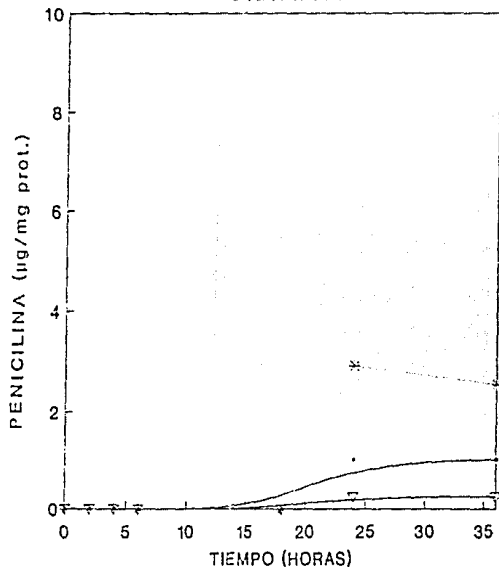
Con los resultados aquí presentados no podemos afirmar que el ácido glutámico sea el efector de la estimulación en la producción de penicilina, sin embargo si podemos mencionar que su presencia es muy importante para la síntesis del antibiótico y que probablemente también lo sea para la estimulación de la misma.

Con el fin de explicar lo que sucede con el ácido glutámico y la glutamina en cada una de las cepas, se realizó el siguiente análisis:

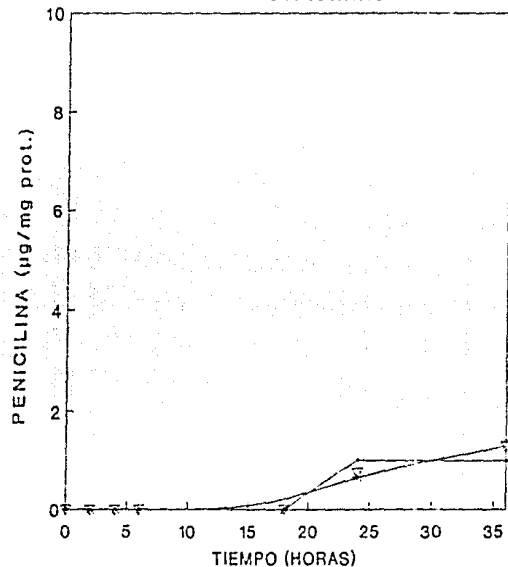
Mutante Penicillium chrysogenum gdh A1

Cuando la mutante se cultiva en presencia de ácido glutámico, éste puede generar otros aminoácidos por medio de su transaminación. El ácido glutámico también puede estimular la actividad de la GS para producir glutamina, la cual tiene dos posibles vías para metabolizarse; una de esta vías es a través de la GOGAT, que en teoría estaría inhibida por glutámico por ser éste el producto final de la reacción, sin embargo, por estudios de Lucas (1990), se sabe que esta enzima está dereprimida en esta cepa y presenta una actividad superior a la de la silvestre.

Fig. 24 Efecto del glutámico, glutamina y sus análogos sobre la producción específica de penicilina por *P.chrysogenum* *gdhA1* en un "sistema de células en reposo" sin cicloheximida



— Sin adición * Ac. Glutámico 10 mM
 - - - γ-bencil-L-glutamato



— Sin adición * Glutamina 10 mM
 - - - Metionina sulfóximina

La otra vía para metabolizar la glutamina formada a partir de glutámico, es que ésta transamine con α -cetoácidos para generar aminoácidos y α -cetoglutaramato, el cual es transformado por la w-amidasa en amonio y α -cetoglutarato, los cuales se acumulan en esta cepa porque la enzima GDH no presenta la actividad normal.

Cuando el medio se suplementa con glutamina, las posibles vías para metabolizarse son dos: a) por la ruta de la w-amidasa, en la que se puede transaminar y formar α -aminoácidos y por otro lado generar α -cetoglutarato y amonio, que como se mencionó anteriormente, tendería a acumularse al no tener la GDH su actividad normal. El amonio así acumulado podría estar ejerciendo su efecto negativo sobre la síntesis de penicilina. b) a través de la enzima GOGAT para obtener glutámico como producto, el cual no se metaboliza hacia glutamina porque la enzima GS se encuentra inhibida por glutamina, por lo cual se esperaría su acumulación.

Penicillium chrysogenum NRRL-1951

En la cepa silvestre cuando se añade glutámico al medio para formar antibiótico se inhiben las enzimas GDH (Jacklitsch, 1985) y GOGAT. El glutámico estimula la enzima GS y favorece su metabolismo hacia glutamina a través de la glutamina sintetasa, el aminoácido formado genera, a través de la vía w-amidasa, amonio y α -cetoglutarato que con ayuda de la GDH generan más ácido glutámico que se canaliza nuevamente hacia glutamina reiniciando así su ciclo. Como puede verse la glutamina en estas condiciones tiene solo esta vía para metabolizarse ya que la otra que sería a través de GOGAT, se encuentra inhibida por el glutámico adicionado al medio de cultivo (fig. 25).

Al emplear glutamina en el medio de cultivo, el aminoácido se metaboliza por la vía de la GOGAT y por la vía de la w-amidasa. Cuando la glutamina se canaliza por GOGAT, se sintetiza glutámico, el cual no puede metabolizarse fácilmente hacia glutamina ya que el aminoácido adicionado al medio de cultivo esta inhibiendo a la GS, por lo que el glutámico se acumula en el hongo.

Por otro lado, cuando la glutamina utiliza la vía de la w-amidasa, primero debe transaminar con α -cetoácidos para formar aminoácidos y posteriormente α -cetoglutarato y amonio, ambos utilizando la enzima GDH forman glutámico, el

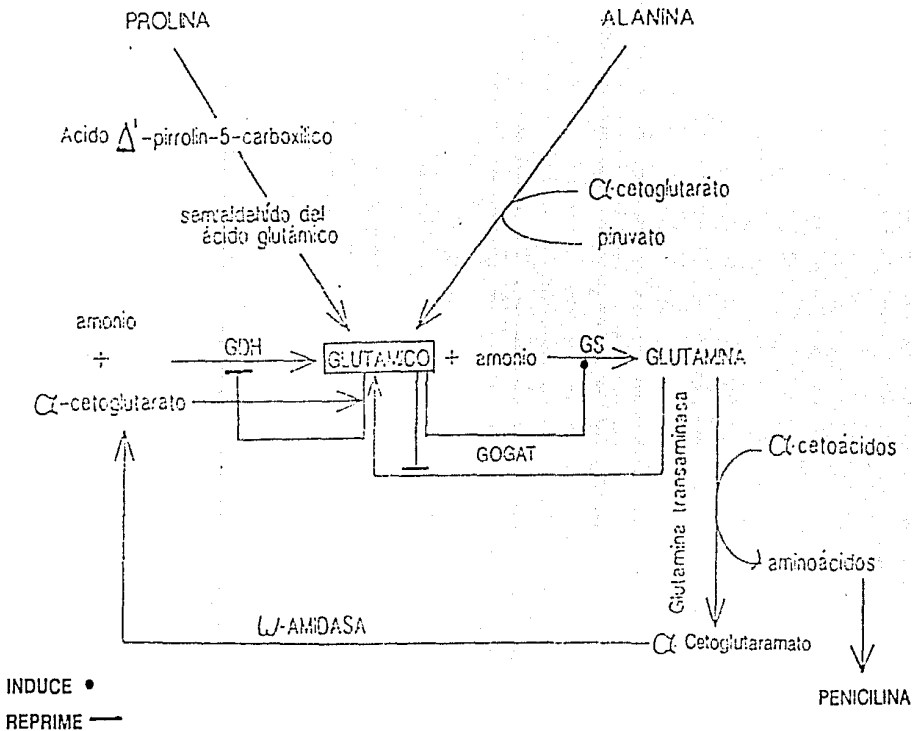


Fig. 25 Ruta de asimilación del glutámico, cuando el medio de cultivo se suplementa con este aminoácido.

cual se acumula porque la GS se encuentra inhibida (fig. 26).

Tomando en cuenta los resultados anteriores, podemos considerar que el ácido glutámico requiere metabolizarse para generar su efecto de estimulación sobre la síntesis de penicilina, dicho metabolismo es hacia glutamina y continuando con la vía del metabolismo del amonio, se transamina y forma aminoácidos, entre los que se encuentran muy probablemente los precursores de la penicilina.

Con el fin de saber si los aminoácidos precursores pueden estimular la producción del antibiótico, se realizó el siguiente experimento: Se preincubaron células de Penicillium chrysogenum NRRL-1951 36 horas en medio mínimo con cloruro de amonio 10 mM y se transfirieron a medio para "sistema de células en reposo" suplementado con los aminoácidos a estudiar: ac. α -aminoadípico, cisteína y valina, todos en concentración 10 mM. Los resultados se muestran en la fig.27, donde se observa que todos los precursores del antibiótico cuando se estudian por separado estimulan la producción de penicilina en niveles cercanos a 3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot. en el caso de cisteína y valina. Cuando se suplementa el medio con ácido α -aminoadípico la producción de penicilina es prácticamente 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot. La mayor estimulación se observó cuando los tres precursores se encuentran juntos (6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.). Este nivel es mayor que el alcanzado con glutamina y menor que el obtenido con glutámico.

Finalmente a manera de resumen, en la figura 28 se compara el efecto de glutámico, glutamina y aminoácidos precursores de la síntesis de penicilina en un sistema de células en reposo con la cepa silvestre, en esta gráfica se observa que el aminoácido con mayor capacidad de estimulación es el ácido glutámico, en menor nivel se encuentran los aminoácidos precursores y glutamina. Aparentemente, de acuerdo a esta gráfica el ácido glutámico y la glutamina se metabolizan en forma más eficiente para sintetizar el antibiótico, pues a las 24 horas de la fermentación se presentan niveles mayores en la producción de penicilina que con los precursores juntos.

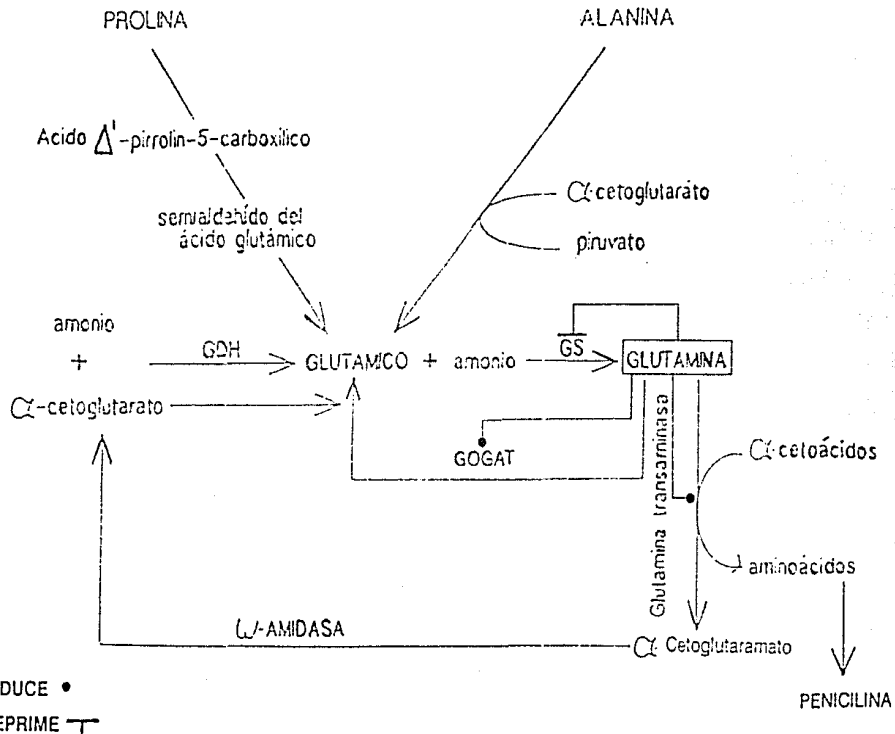
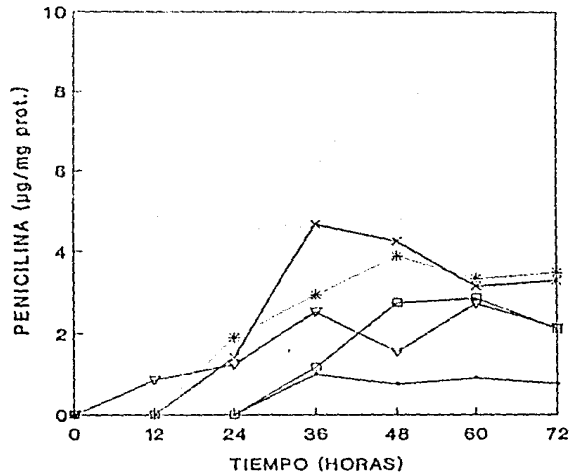


Fig. 26 Ruta de asimilación de la glutamina cuando el medio de cultivo se suplementa con este aminoácido.

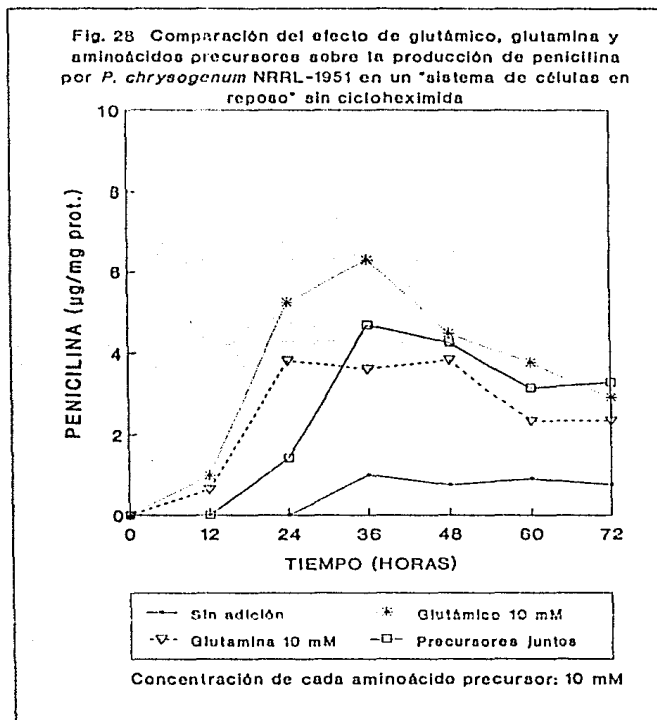
Fig. 27 Efecto de la adición de los aminoácidos precursores de la penicilina sobre la producción del antibiótico por *P. chrysogenum* NRRL-1951 en un sistema de células en reposo.



— Sin adición * AminoAdip. ▽ Cisteína
 -□- Valina -X- Precursos juntos

Concentración de cada aminoácido: 10 mM

Fig. 28 Comparación del efecto de glutámico, glutamina y aminoácidos precursores sobre la producción de penicilina por *P. chrysogenum* NRRL-1951 en un "sistema de células en reposo" sin cicloheximida



CONCLUSIONES

1. Cuando el Penicillium chrysogenum NRRL-1951 (cepa silvestre) se cultiva en medio mínimo suplementado con altas concentraciones de amonio (50,130 y 200 mM) se presenta una estimulación en la producción de penicilina.

2. La estimulación en la producción de penicilina no es causada por el amonio per se sino por un producto de su metabolismo.

3. La síntesis del antibiótico en concentraciones bajas (10 mM) y altas (200 mM) de amonio, depende de la síntesis de novo de proteínas.

4. El efecto estimulatorio en la producción de penicilina, observado en altas concentraciones de amonio, se previene con la adición de cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas).

5. La síntesis de penicilina no se restablece cuando los aminoácidos precursores de la biosíntesis del antibiótico (ácido α -aminoadípico, cisteína y valina) se adicionan al mismo tiempo que la cicloheximida a las 36 ó 72 horas de fermentación, esto nos indica que la formación de las enzimas sintetetasas de la penicilina es inhibida por la cicloheximida.

6. En la cepa silvestre, el ácido glutámico y la glutamina (10 mM en ambos casos) estimulan la producción de penicilina en un "sistema de células en reposo" sin cicloheximida. En el caso de la cepa mutante, solo con el ácido glutámico se observa el efecto mencionado.

7. Es necesario que el ácido glutámico y la glutamina se metabolícen para poder observar la estimulación en la producción del antibiótico. La mayor estimulación, en ambas cepas, se obtiene cuando se adiciona ácido glutámico al medio de cultivo, el cual debe metabolizarse a glutamina y ésta a su vez canalizarse por la vía de la w -amidasa.

8. Se tiene la hipótesis de que el efecto estimulatorio sobre la producción de penicilina es a través de la glutamina mediante la transaminación con α -cetoácidos para

formar aminoácidos, entre los cuales pueden estar los precursores del antibiótico.

9. Los aminoácidos precursores de la biosíntesis del antibiótico (ácido α -aminoadípico, cisteína y valina 10 mM) estimulan la producción del antibiótico en un sistema de células en reposo, sin cicloheximida, cuando éstos se suplementan en forma independiente o en conjunto, siendo mayor la estimulación cuando se adicionan juntos.

10. Finalmente, los resultados obtenidos en la realización de este trabajo, contribuirán a esclarecer el efecto estimulatorio sobre la producción de penicilina, que se presenta en concentraciones altas de cloruro de amonio. La experiencia adquirida en la parte experimental del proyecto, será de utilidad para plantear estrategias relacionadas con la regulación de la producción del antibiótico estudiado u otros semejantes.

BIBLIOGRAFIA

- Abraham, E.P., and Newton, G.G. (1959). Proc. Int. Congr. Biochem. 4th, 5:42-63.
- Abraham, E.P. (1974). Biosynthesis and enzymic hydrolysis of penicillins and cephalosporins. University of Tokyo Press, Tokyo.
- Aharonowitz, J. Balwin, E., et al. (1981). A study of the biosynthesis of tripeptide δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cisteinyl-D-valine in a β -lactam negative mutant of Cephalosporium acremonium. Biochem. J. 213:573-576.
- Aharonowitz, J. and Demain, A. (1978). Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in Streptomyces clavuligerus. Antimicrob. Ag. Chemother. 14:159-164.
- Barredo, J.L., Alvarez, E., Cantoral, J.M., Diez, B., Martín, J.F. (1988). Glucokinase deficient mutant of Penicillium chrysogenum is derepressed in glucose catabolite regulation of both β -galactosidase and penicillin biosynthesis. Antimicrob. Agents Chem. 32:1061-1067.
- Bérdy, J., (1974). Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure.
- Booth, C. (1971). Methods in Microbiology, Vol. 4. Ed. Academic Press.
- Calderón, J. and Mora, J. (1985) Glutamine cycling in Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol. 131:3237-3242.
- Cardoza, R.E. (1989). Regulación de la biosíntesis de penicilina en Penicillium chrysogenum NRRL-1951 efecto de la fuente de nitrógeno. Tesis grado licenciatura. IIBM-U.N.A.M.
- Castro, J. M., Liras, P., Cortes, J. and Martín, J. F. (1985). Regulation of α -aminoadipyl-cisteinyl-valine, isopenicillin N synthetase, isopenicillin N isomerase and deacetoxycephalosporin C synthetase by nitrogen source in Streptomyces lactamdurans. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22:32-40.
- Cooper, P.D. (1956). Bacteriol, Rev. 20: 28-48.
- Cornelius, G., Friedrich, L., and Demain, A. (1977). Appl. Environ. Microbiol., No. 6, 34:706-709.

- Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H., Wood, B. and Mc Carty, M. (1983). Tratado de Microbiología. 2a. ed., México, Edit. Salvat.
- Demain, A. (1963). Biosynthesis of cephalosporin C and its relation to penicillin formation. Transactions of the New York Academy of Sciences, Series II, 25:731-742.
- Demain, A. (1974) Biochemistry of penicillin and cephalosporin fermentations. Lloydia, 37:147-167.
- Elander, R.P. and Chang, L.T. (1979). Microbial Technology 2a. ed., New York, Edit. Academic Press.
- Elander, R.P. and Aohi, H. (1982). Chemistry and Biology of β -lactam Antibiotics. Vol. 3, Cap. 3.
- Finch, R. (1990). The penicillins today. BMJ, May 19, 300:1289-1290.
- Flemming, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a Penicillium with special reference to their use in the isolation of Bacillus influenzae. Brit. J. Exp. Pathol. 10:226-236.
- Flynn, E., Cormick, M., Stamper, M., De Valeria, H., and Gadzeski, C.W. (1962). A new natural penicillin from Penicillium chrysogenum. J. Am. Chem. Soc. 81:4594-4595.
- Frederick, K. (1985). Methods. Enzymol., vol. XLIII: 55-69.
- Gallo, M. and Katz, E. (1972). Regulation of secondary metabolite biosynthesis: catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. J. Bacteriol. 109:659-667.
- Gardner, A.D. (1940). Nature (London), 146: 837-838.
- Izaki, K., Matsushashi, M., and Strominger, J.L. (1966). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55: 656-663.
- Jarvis, F., and Jhonson, M. (1947). The role of the constituents of synthesis media for penicillin production. Am. Chem. Sci. 69:3010-3017.
- Johnson, M. (1952) Recent advances in penicillin fermentation. Bulletin of the World Health Organization. 6:99-121.
- Juárez, L., K. (1991). Optimización de las condiciones experimentales para el estudio de la δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteina, primera enzima de la biosíntesis de la

penicilina. Tesis nivel licenciatura, Fac. de Ciencias, UNAM.

- Lara, F., Mateos, R.C., Vazquez, G y Sánchez, S. (1983). Inducción de la biosíntesis de penicilina por L-Glutamato en Penicillium chrysogenum. Bol. Estud. Méd. Biol., México, suplemento Vol.32.

- Lederberg, J. (1956). Bacterial protoplasts induced by penicillin. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 42:574-577.

- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A. and Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

- Lucas, M.T. (1990). Relación entre la glutamato deshidrogenasa y la producción de penicilina en Penicillium chrysogenum. Tesis de maestría en biotecnología. IIBM - U.N.A.M.

- Luengo, J., Revilla, J., Villanueva, J. and Martín, J. (1979). Lysine regulation of penicillin biosynthesis in low-producing and industrial strains of Penicillium chrysogenum. J. Gen. Microbiol. 115:207-211.

- Martín, J. (1978). Manipulation of gene expression in the development of antibiotic production. Antibiotics and other secondary metabolites: biosynthesis and production. Academic Press, London pp.19-34.

- Masuma, R., Tanaka, Y., and Omura, S. (1982). Enhancement of cerulenin production by a natural zeolite, an ammonium ion-trapping agent. J. antibiotics 35:1184-1193.

- Masuma, R., Tanaka, Y., and Omura, S. (1983). Ammonium ion-depressed fermentation of tylosin by use of a natural zeolite and its significance in the study of biosynthesis regulation of the antibiotic. J. Ferment. Technol. 61: 607-614.

- Mateos, R. del C. and Sánchez, S. (1990). Transport of neutral amino acids and penicillin formation in Penicillium chrysogenum. J. of General Microbiol. 136:1713-1716.

- Meister, A. (1980). Possible relation of the γ -glutamyl cycle to amino acid and peptide transport in microorganisms en Microorganisms and nitrogen sources (Payne and Wiley & sons ed).

- Moo-Young, M. (1980). Advances in Biotechnology. Vol. III. London, Pergamon Press.

- Omura, S., Tanaka, Y., Masuma, R., et al. (1980). Stimulation of leucomycin production by magnesium phosphate

- and its relevance to nitrogen catabolite regulation. Antimicrob. Agents Chemother. 18:691-695.
- **Palcsar, M.** (1982). Microbiologia, España, Ed. del Castillo.
- **Park, J. T., and Johnson, M. J.** (1949). Accumulation of labile phosphate in Staphylococcus aureus grown in the presence of penicillin. J. Biol. Chem. 179:585-592.
- **Park, J. T., and Strominger, J. L.** (1957). Mode of action of penicillin. Biochemical basis for the mechanism of action of penicillin and for its selective toxicity. Science 125:99-101.
- **Pogell, B., Sankaran, P., Redshaw, P. and Mc Cann, P.** (1976). Regulation of antibiotic biosynthesis and differentiation in streptomycetes. D. Schlessinger (Ed). Microbiology-1976, American Society for Microbiology. Washington pp 543-547.
- **Revilla, G., Ramos, F., López-Nieto, M.J., Alvarez, E. and Martin, J.F.** (1986). Glucose repress formation of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine and isopenicillin N synthetase but not penicillin acyltransferase in Penicillium chrysogenum. J. Bacteriol. 168:947-952.
- **Sakaguchi, K., Okanishi, M.** (1980). Molecular breeding and genetics of applied microorganisms. Ed. Kodansha LTD & Academic Press, Japan. U.S.A.
- **Sánchez, S., Paniagua, L., Mateos, R.C., Lara, F., and Mora, J.** (1981). Nitrogen regulation of penicillin G biosynthesis in Penicillium chrysogenum NRRL-1951, en Advances in Biotechnology, vol II, Vézina, C. and Singh, K. (eds), Pergamon Press, Toronto, Canada, pp. 147-154
- **Sánchez, S., Cardoza, R.E., Flores, M.E.** (1987). Papel de la fuente de nitrógeno en la producción fermentativa de los antibióticos penicilina y cefalosporina. Bol. Ed. Bioq. 6:2-6.
- **Schwartz, R.** (1985). Glutation: Efecto del amonio sobre la síntesis del tripéptido en el hongo Penicillium chrysogenum. Tesis de licenciatura en Investigación Biomédica Básica. IIBM-U.N.A.M.
- **Schwartz, R., Lucas, M.T., Escalante, L., Vazquez, G. and Sánchez, S.** (1988). Glutathione formation in Penicillium chrysogenum: Stimulatory effect of ammonium. J. Gen. Microbiol. 134:1117-1121.
- **Shunzo, I., Yoshinori, N. and Shiro, N.** (1983) Stimulatory effect of ammonium on streptomycin formation by

- Streptomyces griseus growing on a glucose minimal medium. J. Ferment. Technol. No. 1, 61:7-12.
- Strominger, J.L. and Ghuysen, J.M. (1987). Mechanisms of enzymatic bacteriolysis. Science, 156:213.
 - Tipper, D.J., and Strominger, J.L. (1965). Mechanism of action of penicillins: A proposal made on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 54:1133-1141.
 - Weatherburn, M. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. An. Chem. 39:971-974.
 - Wei-Shou, H., Braña, F., Demain, A. L. (1984). Carbon source regulation of cephem antibiotic production by resting cells of Streptomyces clavuligerus and its reversal by protein synthesis inhibitors. Enzyme Microb. Technol. 6:155-160.
 - Wise, E. M., and Park, J. T. (1965). Penicillin: Its basic site of action as an inhibitor of a peptide cross linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 54:75-81.
 - Yoshitake, T., Rokuro, M. and Satoshi, O. (1984). Control of ammonium ion level for efficient nanaomycin production. J. of antibiotics, Nov., 37:1370-1375.
 - Zhang, J. Y., Wolfe, S. and Demain, A. L. (1987). Effect of ammonium as nitrogen source on production of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cisteinyl-D-valina sintetase by Cephalosporium acremonium C-10. J. Antibiot. 40: 1746-1750.
 - Zhang, J. Y., Wolfe, S. and Demain, A. L. (1989). Ammonium ion repress δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cisteinyl-D-valina sintetase in Streptomyces clavuligerus NRRL-3585. Can. J. Microbiol. 35:399-402.