

03072

*UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO*

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO  
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES (UACPyP-CCH)

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

***“REGULACION DE LA ASIMILACION DE AMONIO EN  
CULTIVOS CONTINUOS DE *Saccharomyces cerevisiae*”***

Que para obtener el título de

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

presenta

**QFB. FELIPE ORTIZ GUTIERREZ**

México, D.F. 1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**DEDICADO PARA:**

MIS PADRES

**TEODULO Y JUANA**

MI RETOÑO

**HILDA MARIANA**

MI ESPOSA

**TOMY**

MI SOBRINO

**MAY**

MIS HERMANOS

**FLOR Y MAURICIO**

MI CUÑADO

**GUSTAVO**

**CON TODO MI AMOR Y GRATITUD POR LA CONFIANZA Y EL APOYO QUE  
SIEMPRE ME BRINDARON**

**ESPECIALMENTE PARA:**

**Dra. ALICIA GONZALES MANJARREZ**

Gracias por tu apoyo y enseñanza

Y COMPAÑEROS DEL LABORATORIO 301-OTE.  
MICROBIOLOGIA:

**CRISTI**

**LOU**

**SANDRA**

**LINA**

**SIMON**

**HIRAM**

**CLAUDIA**

**BETY**

**LUCIA**

**Dr. Agustín López M.  
Dr. Guillermo Sánchez O.  
Instituto de Biotecnología UNAM**

**II. JURADO:**

**Dr. MIGUEL LARA**

**DRA. GLORIA SOBERON CH.**

**DRA. ALICIA GONZALEZ M.**

**DR. AGUSTIN LOPEZ M**

**DR. MARIO SOBERON**

**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA  
CONAC y T**

**U N A M**



**REGULACION DE LA ASIMILACION DE AMONIO EN CULTIVOS  
CONTINUOS DE Saccharomyces cerevisiae**

## INDICE

	Página
INDICE	1
1. INTRODUCCION	2
1.1. Generalidades sobre <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1.2. Cinética del crecimiento microbiano	3
1.3. Cultivo continuo en el quimostato	7
1.4. Metabolismo de compuestos nitrogenados	10
1.5. Enzimas involucradas en la asimilación de amonio en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2. ANTECEDENTES	16
3. HIPOTESIS	19
4. OBJETIVO	19
5. RESULTADOS Y DISCUSION	20
5.1. Actividades enzimáticas involucradas en la asimilación de amonio en la cepa S288C	20
5.2. Actividades enzimáticas involucradas en la asimilación de amonio en la cepa RX2ΔpLV2	23
5.3. Actividades enzimáticas involucradas en la asimilación de amonio en la cepa LA1ΔpLV1	25
5.4. Determinación de las concentraciones intracelulares de aminoácidos	28
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	30
7. MATERIAL Y METODOS	31
7.1. Cepas	31
7.2. Construcción de la cepa RX2ΔpLV2 de <i>S. cerevisiae</i>	31
7.3. Cultivo continuo	31
7.4. Extracto libre de células	32
7.5. Determinación de actividades enzimáticas	32
7.6. Determinación de proteínas totales	35
7.7. Determinación de las concentraciones intracelulares de aminoácidos	36
8. AGRADECIMIENTOS	37
9. BIBLIOGRAFIA	38

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Generalidades sobre *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces* se puede traducir literalmente como "hongo del azúcar" en referencia a su capacidad para fermentar azúcares. Diversas especies de *Saccharomyces* han sido empleadas por el hombre, entre las más importantes se encuentran: *S. cerevisiae* y *S. ellipsoideus*, la primera se utiliza en la fabricación de pan y la otra en la producción de alcohol. Pertenecen a la división eumicota y a la clase de los ascomicetes en el reino fungi. Se encuentran abundantemente en frutas maceradas, remolacha de azúcar y malta usada para la producción de cerveza. (1)

Las levaduras del género *Saccharomyces* han sido caracterizadas genética y bioquímicamente con más de 900 genes mapeados actualmente, crecen bien en medios sencillos semisólidos y líquidos. Tienen un tiempo de duplicación de 90 a 120 minutos y pueden crecer como organismos diploides o haploides (su contenido de DNA nuclear haploide es 3.5 veces mayor que el de *E. coli*). Pueden adaptarse a ambientes aerobios o anaerobios ya sea en matríz o en cultivos a gran escala. Muchos de sus procesos celulares están conservados entre las diferentes especies eucarióticas lo que las hace elegibles para abordar una enorme variedad de problemas en la biología molecular de los eucariotes. Su genoma haploide tiene un tamaño aproximado de 15 megabases y está organizado en 16 cromosomas lineales de 200 a 2200 kb. Por tanto, su cromosoma más largo es aún cien veces más pequeño que el cromosoma mamífero promedio lo que ha permitido la manipulación y análisis detallado de su estructura y función. Los orígenes de replicación (ARS elements), los centrómeros (CEN elements), y los telómeros que son los tres principales elementos requeridos para la función cromosómica, han sido clonados y utilizados en la construcción de cromosomas artificiales que han permitido clonar grandes segmentos de DNA de más de 400 kb de otros sistemas biológicos, (vectores lanzadera levadura/*E. coli*).

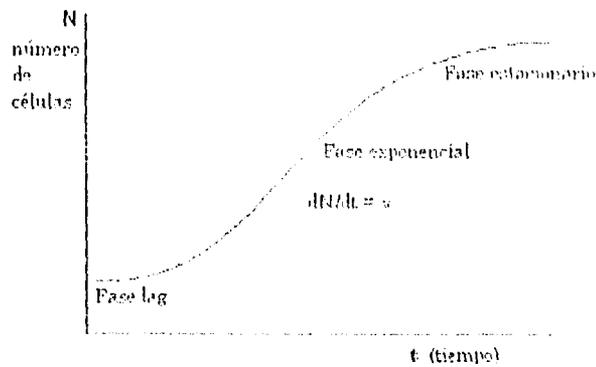
Contienen además, todos los principales organelos membranales subcelulares hallados en los eucariotes superiores así como un citoesqueleto característicos, aunque a nivel de núcleo no contienen la histona III. Los RNA mensajeros muestran las modificaciones características de los RNAs mensajeros eucariotes tales como una metil-G en el extremo 5' y una cola poli A en el 3'. Solo unos cuantos genes contienen intrones y secuencias de DNA repetido (secuencias *alu*). Una característica adicional que presentan estos microorganismos es el procesamiento proteolítico de proteínas precursoras en productos funcionales acopladas frecuentemente a la secreción. (1, 10, 16, 29).

## 1.2 Cinética del crecimiento microbiano.

H.M. Ward (1985) fué el primero en determinar los tiempos de duplicación de las bacterias y en describir una curva de crecimiento rudimentaria, reportó además, que factores tales como la temperatura, oxígeno, naturaleza y concentración de los nutrientes, luz y sustancias antisépticas influyen sobre el crecimiento de un microorganismo. Se identificaron posteriormente, las diferentes fases de la curva de crecimiento y se enfatizó mucho en el estudio de la fase "lag". Para finales de los 40's se sabía ya que la producción microbiana total estaba determinada por la naturaleza y concentración mínima crítica de un único sustrato. Con el trabajo de J. Monod en 1942 se impulsó el estudio de la cinética del crecimiento microbiano que culminó con el desarrollo del quimiostato y la obtención del estado estacionario (steady-state) en "cultivos continuos" por Novick y Szilard a mediados de los 50's. (6, 27, 29, 32)

La manera más común de obtener y analizar el crecimiento microbiano es inoculando una determinada cantidad del microorganismo de interés (**N<sub>0</sub>**) en un matríz conteniendo un medio de cultivo de composición definida (cultivo en lote o en batch), y midiendo la densidad de la población microbiana (**N**), que se incrementa en períodos cortos tiempo (**t**). De esta manera se obtiene un típica "curva de crecimiento" en la que se pueden observar diferentes etapas o fases de crecimiento que reflejan diferentes estados funcionales y/o fisiológicos del microorganismo. (ver Fig 1).

La fase de crecimiento exponencial se puede considerar metabólicamente uniforme aunque su duración no es prolongada y está influenciada por fases variables (fase lag y fase estacionaria). La escasez de algún nutriente en el medio de cultivo es una de las principales causas por las cuales las células inhiben su crecimiento en la fase estacionaria. Una manera de prolongar el crecimiento del microorganismo es agregar el sustrato limitante cuando éste se vaya agotando (cultivo feed-batch) o, para que no existan variaciones en el volumen del cultivo ni acumulación de otros productos, la alimentación continua es acompañada por una remoción continua de cultivo por lo que podrá obtenerse un "cultivo continuo" en el cual, si las condiciones ambientales no cambian con el tiempo, podrá establecerse un "estado estable o estacionario" (steady-state), donde las propiedades metabólicas de las células están lo más cercanamente uniformes y susceptibles para que el o los efectos de una alteración ambiental específica sean adecuadamente analizados.



**Fig. 1** Curva de crecimiento microbiana

En la fase de crecimiento exponencial, la velocidad de crecimiento puede ser calculada de la siguiente manera:

1. ....  $dN/dt = v$ .  
Dividiendo ambos lados por N, tenemos:
2. ....  $dN/Ndt = v/N = \mu$   
por lo que
3. ....  $dN/dt = \mu N$   
donde  $\mu$  es la velocidad de crecimiento específica.  
Separando los términos y reorganizando:
4. ....  $dN/N = \mu dt$
5. ....  $\int dN/N = \mu \int dt$
6. ....  $\ln N = \mu t + C$   
y obteniendo antilogaritmo natural, tenemos
7. ....  $N = e^{\mu t + C}$   
reorganizando
8. ....  $N = e^{\mu t} \cdot e^C$   
y finalmente

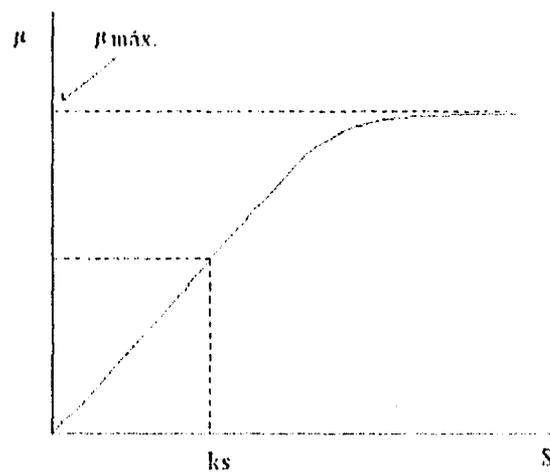
9. ....  $N = N_0 \cdot e^{\mu t}$

o en su expresión logarítmica:

10. ....  $\ln N = \ln N_0 + \mu t$

Esta expresión es análoga a la ecuación de una recta en donde al graficar  $\ln N$  contra  $t$ ,  $N_0$  corresponde a la intersección con el eje de las ordenadas, es decir, al número inicial de microorganismos y  $\mu$  a la razón de cambio o pendiente de la recta, es decir, a la velocidad de crecimiento específica. Es debido a la ecuación 10 que la fase de crecimiento exponencial comúnmente se denomine "fase log" lo cual no es del todo correcto.

Se sabe por otro lado, que  $\mu$  está en función de la naturaleza y concentración del sustrato nutritivo "S". (Esta es la principal contribución de J. Monod a la teoría del crecimiento microbiano).



**Fig. 2** Dependencia de la velocidad de crecimiento específica respecto a la concentración del sustrato nutritivo (J. Monod, 1942)

En la expresión:

$$\mu = \mu_{\text{máx}} S / (k_s + S)$$

$k_s$  (constante de saturación del sustrato) corresponde a  $1/2 \mu_{\text{máx}}$  y establece un límite en la utilización y en la velocidad de crecimiento en ese sustrato, y  $\mu_{\text{máx}}$  es la velocidad específica de crecimiento máxima.

### 1.3. Cullivo continuo en el quimlostato

El cullivo continuo es básicamente un método para prolongar la fase de crecimiento exponencial de un microorganismo. La técnica consiste en la alimentación del cullivo microbiano con sustratos frescos y al mismo tiempo en la eliminación del medio gastado más células producidas, de tal modo que los diversos factores que afectan las propiedades del cullivo permanezcan constantes con el tiempo: volumen del cullivo, concentración celular, concentración de productos, pH, temperatura, oxígeno disuelto, etc. ( ver la siguiente figura). A esta condición se le conoce como *estado estable* o *estado estacionario* (steady-state). Si el microorganismo es estable, es decir, no esté sujeto a mutaciones espontáneas, entonces el sistema puede mantenerse funcionando por largos períodos de tiempo. La ventaja de tal sistema es que la masa celular y otros productos pueden ser producidos bajo condiciones ambientales óptimas y controladas.

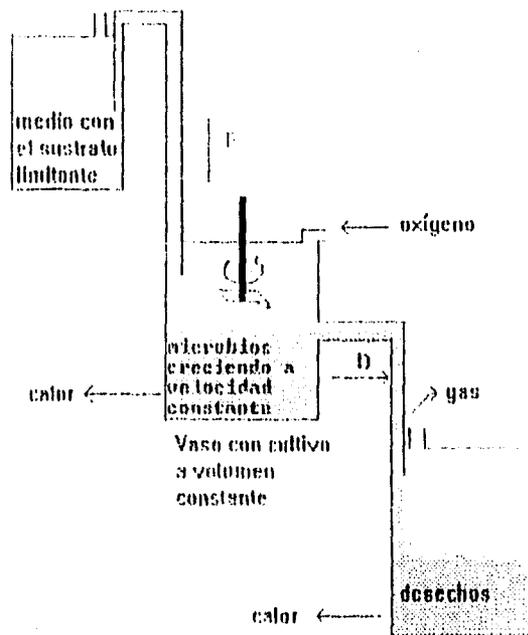


Fig. 3. Quimlostato

Para la formulación del modelo matemático es necesario hacer algunas consideraciones:

- 1.- La velocidad de dilución,  $D$ , no debe ser tan grande que provoque la eliminación o lavado de las células de la cámara de cultivo.
- 2.- La aportación del sustrato limitante a la cámara de cultivo debe ser suficientemente rápida para que los microorganismos crezcan normalmente.
- 3.- El cultivo microbiano debe estar bien agitado a modo de no existir variaciones espaciales en las concentraciones del sustrato o de los microorganismos.

Cuando el quimostato está en un steady-state, existe un balance de masa a través del sistema, es decir, el flujo del medio entrante hacia el vaso de cultivo iguala al flujo de salida del cultivo. La formación de nueva biomasa en el medio es el resultado de la adición de nutrientes frescos y está balanceada por la pérdida de biomasa en la puerta de salida, consecuentemente, la biomasa en el vaso de cultivo permanece constante.

Escribiendo una primera ecuación de balance utilizando la ecuación 1 del crecimiento microbiano, y para un intervalo infinitesimal de tiempo,  $dt$ , el balance para todo el cultivo será:

$$12. \dots\dots V dN = V\mu N dt - FN dt$$

donde  $F$  es la velocidad de flujo o de adición del sustrato limitante

Dividiendo entre  $V$ , (volumen del cultivo)

$$13. \dots\dots dN/dt = (\mu - D) N$$

donde  $D$  es la velocidad de dilución:  $F/V$ , y es la única variable en el sistema.

En el steady-state  $dN/dt = 0$ , por tanto, la ecuación anterior queda:

$$14. \dots\dots \mu - D = 0 \text{ o finalmente: } \mu = D$$

Esto es, se alcanza un estado estable o "steady state". De tal manera que controlando "D" se puede controlar una velocidad específica de

crecimiento determinada y con ello un estado fisiológico dependiente exclusivamente de S.

En términos fisicoquímicos se puede decir que un steady state es aquel en el que las propiedades intensivas del sistema son invariables con el tiempo considerando que el quimiostato es un sistema termodinámico abierto.

Existen, asimismo, varios tipos de cultivos continuos siendo el que se efectúa en el quimiostato del tipo homogéneo y de una sola etapa, es decir, donde crece solo una cepa microbiana en un único bioreactor. (1, 6, 10, 14, 29)

#### 1.4. Metabolismo de compuestos nitrogenados

Las propiedades de cualquier microorganismo están determinadas finalmente por las características de su genoma el cual lleva la información necesaria para que éste sea una unidad funcional y le proporciona la capacidad para responder a los cambios del microambiente donde se desarrolla (variación fenotípica). Un microorganismo con un genotipo dado es con mucho un producto de su ambiente, y es válido por tanto, hablar de la composición química de un microorganismo así como de las condiciones ambientales que lo produjeron.

De los estímulos ambientales que más comúnmente influyen sobre las propiedades de los microorganismos, la limitación nutricional es la que genera mayores cambios en su estructura y función, de ahí que para entender el comportamiento del microbio en la naturaleza sea necesario entender primero su respuesta a la disponibilidad y tipos de sustratos alimenticios. Esta respuesta se refiere a la capacidad que tiene la célula microbiana de crecer tan rápido como sea posible y producir material celular (biomasa) con un factor de producción máximo a la más baja concentración del sustrato limitante. Esta respuesta puede darse de tres maneras:

1.- Aumentando la velocidad de incorporación o entrada del sustrato limitante a través de la membrana plasmática, lo cual logra incrementando la síntesis de los sistemas de transporte existentes, modificando su estructura terciaria (cambios en la  $K_m$  o en su  $V_{máx}$ ), o, induciendo la síntesis de otros sistemas de transporte con mucho mayor afinidad por el sustrato limitante.

2.- Incrementando la velocidad de incorporación del sustrato a alguna ruta metabólica. Esto se logra ya sea incrementando la síntesis de las enzimas involucradas en su transformación inicial o induciendo la actividad de rutas metabólicas alternas de mayor afinidad.

3.- Rearreglando la composición química de las estructuras celulares. Es decir, reorientando el flujo de metabolitos que contengan al sustrato limitante.

Bajo este esquema, y especialmente enfocado a las levaduras, el o los compuestos orgánicos nitrogenados que sean metabolizados tienen así tres posibles destinos:

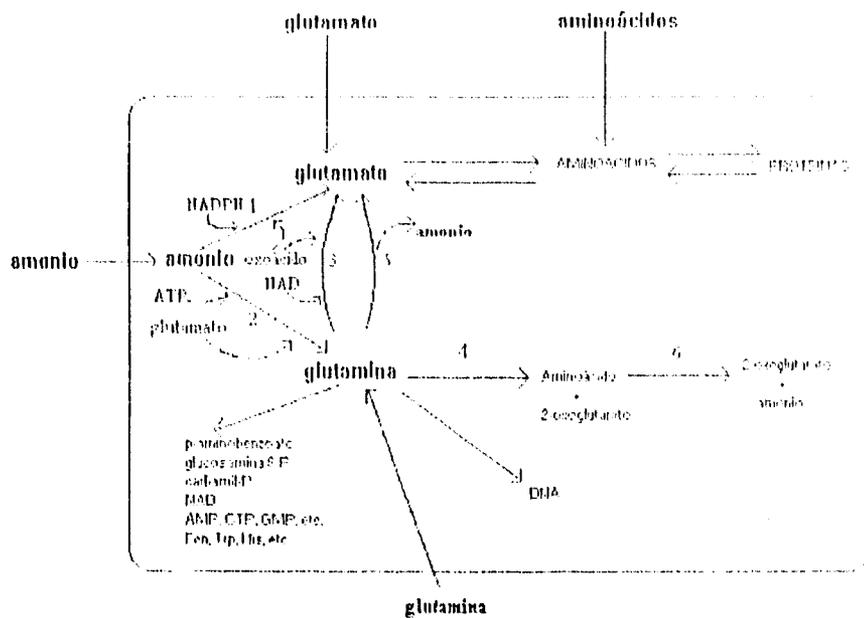
a) Pueden ser incorporados por las células sin modificación en los constituyentes celulares, por ejemplo, incorporando directamente algunos aminoácidos en las proteínas, etc.

b) Pueden ser degradados por la célula liberando el nitrógeno (generalmente aunque no siempre como amonio) y ser usado para la síntesis de otros compuestos nitrogenados celulares, o

c) El carbono que contienen estos compuestos puede ser utilizado con propósitos biosintéticos o energéticos.

La mayoría de los estudios sobre la asimilación de compuestos nitrogenados se han llevado a cabo utilizando compuestos sencillos y únicos en el medio de cultivo. Vale la pena mencionar que en ambientes naturales donde comúnmente se desarrollan las levaduras: malla, macerados de caña de azúcar, frutas, etc. (que contienen muy poco amonio libre), varias fuentes de carbono y nitrógeno pueden presentarse simultáneamente. Es por esta razón por la que la mayoría de los experimentos cuyo objetivo es analizar el metabolismo de nitrógeno se centran preferentemente en la asimilación y metabolismo de amonio. (1, 16).

Muchos compuestos pueden utilizarse como fuente de nitrógeno: D y L-aminoácidos, bases nitrogenadas y derivados, metilamina, colina, etilamina, bencilamina,  $\beta$ -aminoisobutirato, etc. La transferencia del grupo amino ( $-NH_2$ ) de estos compuestos a un aceptor  $\alpha$ -cetocácido, principalmente  $\alpha$ -cetoglutarato (reacción de transaminación) produce glutamato y su subsecuente amidación produce glutamina, ambos importantes intermediarios del metabolismo nitrogenado (ver reacción 1, 2 y 3). Es posible también que el grupo amino de estos compuestos sea liberado al citosol donde se utiliza directamente en la biosíntesis de glutamato via la enzima glutamato deshidrogenasa, GDH NADPH-dependiente (reacción 1). Por otro lado, el glutámico y la glutamina pueden acumularse en la célula o ser reutilizados en la biosíntesis de otros compuestos nitrogenados que demande el metabolismo celular.

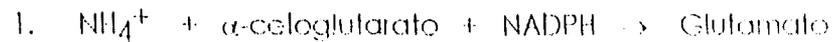


## ENZIMAS

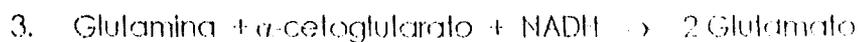
- 1.- GLUTAMATO DESHIDROGENASA NADPH-DEPENDIENTE
- 2.- GLUTAMINO SINTETASA
- 3.- GLUTAMATO SINTASA NAD-DEPENDIENTE
- 4.- GLUTAMINO TRANSAMINASA
- 5.- GLUTAMINASA B
- 6.-  $\alpha$ -AMIDASA

**Fig. 4** Metabolismo de nitrógeno en *S. cerevisiae*

La incorporación de amonio en la mayoría de las levaduras y bacterias procede, por tanto, por dos rutas bien establecidas: la ruta de la glutamato deshidrogenasa NADPH-dependiente (*GDH1*):



y la ruta de la glutamino sintetasa - glutamato sintasa NADH dependiente (*GS1* y *GS2* respectivamente):



En ambas vías el intermediario generado es el glutamato.

Bajo este esquema podrían plantearse algunas preguntas:

¿Por qué estos microorganismos necesitan dos rutas para la asimilación de amonio o para la biosíntesis de un mismo compuesto?. ¿Cómo se regula la expresión de estas dos rutas metabólicas?.

La estrategia para abordar el análisis de este modelo biológico es mantener a una población microbiana creciendo continuamente en condiciones sostenidas de limitación nutricional. (10, 16).

### 1.5. Enzimas involucradas en la asimilación de amonio en *Saccharomyces cerevisiae*.

La glutamato deshidrogenasa NADPH-dependiente, (EC 1.4.1.4), codificada por el gen *GDH1*, tiene un peso molecular de aproximadamente 54 000 D y es la principal vía de asimilación de amonio en la mayoría de los microorganismos.

La disponibilidad de los precursores para la biosíntesis del glutámico: amonio y  $\alpha$ -cetoglutarato, regulan la actividad de la enzima. Mazón, M. (20), demostró que en condiciones de severa limitación nutricional, particularmente de compuestos de carbono, la actividad de *GDH1* se inhibe mediante un mecanismo que involucra una rápida proteólisis, mientras que su contraparte catabólica la glutamato deshidrogenasa NADP<sup>+</sup> dependiente, codificada por el gen *GDH2*, (reacción 4), está regulada por mecanismos de fosforilación-defosforilación dependientes de AMPc. *El crecimiento en altas concentraciones de amonio induce la expresión de GDH1 que a su vez puede ser inhibida rápidamente al adicionar glutámico en el medio.* (19, 20, 25).

Magasanik, B. (22), ha señalado que cepas mutantes carentes de actividad de *GDH1* NADPH-dependiente y *GOGAT* son capaces de crecer muy lentamente en amonio como única fuente de nitrógeno indicando que probablemente la actividad de otra enzima *GDH2* NAD-dependiente este involucrada en asimilarlo bajo esas condiciones. La *GDH2* NAD-dependiente cataliza la reacción inversa en condiciones normales de crecimiento:



La mayor proporción de NAD que de NADH y de NADPH que de NADP en el citosol asegura que las reacciones anteriores (1,2,3,y 4) se lleven a cabo de la manera descrita.

Por otro lado, la enzima glutamino sintetasa, (EC 6.3.1.2), de *Saccharomyces cerevisiae* es una proteína estructuralmente parecida a la *GS* bacteriana. El gen *GLN1* de *S. cerevisiae* codifica una proteína de 370 aminoácidos (m.w. 42 000) y la enzima activa está compuesta por 10-12 subunidades (24). Legrain, C. (17), demostró que la actividad de *GS* se inhibe por una acumulación intracelular de glutamina (inactivación reversible por retroalimentación), es decir, es alta en cultivos creciendo en glutámico como única fuente de nitrógeno y baja rápidamente al adicionar glutamina al medio de cultivo.

La enzima se inactiva también por degradación proteolítica en condiciones de severa deprivación nitrogenada mediada al parecer, por modificación de los grupos sulfhidrilo de la enzima (inactivación irreversible), (17, 19, 23, 24). La presencia de GS se determina ensayando su actividad de sintetasa de glutamina y de glutamino transferasa. La primera se ensaya con glutamato más ATP y la velocidad de fosforilación del glutamato se evalúa mediante la reacción de este compuesto con hidroxilamina; la segunda se ensaya utilizando glutamina, ADP, hidroxilamina y arsenato (ver Material y Métodos). Cultivos de cepas carentes de actividad de glutamino sintetasa creciendo en amonio como única fuente de nitrógeno retienen la actividad de transferasa *in vitro* indicando que es la concentración intracelular de glutamina y no la de amonio la responsable de regular su actividad. (2, 19, 23, 24)).

Por último, muchos trabajos han reportado cepas de *S. cerevisiae* carentes de actividad de GOGAT NAD-dependiente (EC 1.4.1.14) y descrito su purificación parcial. (8, 12, 13, 31). Recientemente en este laboratorio se publicó la purificación y secuencia de aminoácidos de la porción N-terminal de la proteína y se demostró que se trata de un homotrímero de masa molecular de 600 000d, muy similar a las GOGAT de plantas. (5, 8). De la secuencia de aminoácidos deducida de la secuenciación parcial del gen estructural se ha descrito una pre-secuencia N-terminal que podría ser importante para su localización en algún compartimento membranar, posiblemente vacuola. (5, 21)

## 2. ANTECEDENTES

### **La glutamina es el intermediario clave en la utilización de nitrógeno.**

Con cualquier fuente de nitrógeno incluyendo amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), la enzima GS proporciona la glutamina necesaria para la biosíntesis de nucleótidos de purina y pirimidina y para la biosíntesis de algunos aminoácidos. Las cepas mutantes *gln1* son auxótrofos de glutamina.

El nivel de actividad de la enzima es baja en medios suplementados con glutamina y se incrementa 50 a 200 veces cuando el glutámico es la única fuente de nitrógeno. Cuando las células crecen en amonio la actividad de GS es aproximadamente un cuarto de la obtenida en glutámico como única fuente de nitrógeno. Al parecer, la glutamina inhibe la actividad de sintetasa de la GS mediante una modificación covalente de sus grupos sulfhidrilo provocándole una incrementada termosensibilidad. (19).

La expresión de *GLN1* responde a la disponibilidad de glutamina y está regulada a nivel de transcripción. Otros estudios reportan que el incremento en la expresión de *GLN1* responde a las bajas concentraciones intracelulares de nucleótidos de purinas y del aminoácido histidina aunque no en el mismo grado como cuando se presenta deficiencia intracelular de glutamina. (17, 19, 23).

### **En *E. coli*, GS y GOGAT participan en la asimilación de amonio.**

En bacterias, particularmente en *E. coli*, las enzimas GDH, GS y GOGAT participan en la biosíntesis de glutámico y glutamina, y por tanto, en la asimilación de amonio. Específicamente, GS y GOGAT asimilan amonio cuando su concentración en el medio de cultivo es muy baja. Se ha propuesto además, que este sistema regula los niveles intracelulares de glutamina. (19, 23, 24)

Estudios sobre la asimilación de amonio en *E. coli* creciendo en quimiostrato muestran que la actividad de GOGAT NADP-dependiente no mantiene relación fisiológica con la actividad de GS y GDH (32). Se ha propuesto que la función de GDH es también la asimilación de amonio y biosíntesis de glutámico pero solo cuando su concentración en el medio de cultivo es alta ( $\text{GDH } K_{\text{MNH}_4^+} \approx 3 \text{ mM}$ , en comparación con la  $\text{GS } K_{\text{MNH}_4^+} \approx <0.2 \text{ mM}$ ). (11, 32).

Por tanto, mutantes *glnBD*, *GDHA* de *E. coli* (carentes de GOGAT y GDH respectivamente) no crecen cuando la concentración extracelular de amonio es aproximadamente de 0.1 mM.

Considerando estos datos, algunos autores han planteado la siguiente pregunta:

En *E. coli*, ¿cuál es la importancia de la GDH en la asimilación de amonio y/o biosíntesis de glutámico si mutantes *gdhA* no son auxótrofos totales ni parciales de glutámico?

Dado que la GDH, al igual que GOGAT utiliza como cofactor NADPH, la enzima GDH debería ser más útil en la asimilación de amonio cuando este microorganismo se encontrara en una condición de limitación energética más que en una situación de limitación nitrogenada. Una situación de limitación energética se produce disminuyendo la cantidad de carbono u oxígeno en el medio de cultivo. (3, 11).

#### **En *S. cerevisiae* se ha analizado también la asimilación de amonio.**

En esta levadura la entrada de amonio a la célula es facilitada por dos (o posiblemente tres) permeasas más o menos caracterizadas, una de alta afinidad ( $k_m \approx 0.25$  mM) pero baja capacidad y otra de baja afinidad y alta  $V_{máx}$ . (50 nmol/min/mg de proteína). Una vez en el interior, el amonio es captado por la enzima GDH NADPH-dependiente para la biosíntesis de glutámico (GDH  $k_{mNH_4^+} \approx 1$  mM). Pero se cree que en ambientes naturales nutricionalmente agotados por la vigorosa actividad metabólica de otros microorganismos, la asimilación de amonio y biosíntesis de glutámico en esta levadura proceden preferentemente por la vía de las enzimas GS y GOGAT (GS  $k_{mNH_4^+} \approx 0.1$  mM).

Esta hipótesis fundamentada en las constantes de afinidad de las enzimas involucradas se apoya en los resultados obtenidos con algunas cepas de *E. coli*, *S. typhimurium* y *Klebsiella* carentes de actividad de GDH las cuales aunque no son auxótrofos de glutámico crecen lentamente cuando la concentración de amonio en el medio de cultivo es muy baja.

Estudios similares previos al presente trabajo han mostrado que la actividad de GDH NADPH-dependiente en *S. cerevisiae* es baja en condiciones de limitación de amonio y alta cuando éste se encuentra en exceso. La actividad de GDH baja rápidamente al adicionar glutamato al medio. (9, 11, 28, 35, 36). En *S. cerevisiae* no se ha abordado el aspecto energético de la asimilación de amonio.

#### **En *S. cerevisiae* la GOGAT NAD-dependiente no es una enzima esencial.**

Se ha mostrado que cepas de *S. cerevisiae* carentes de actividad de GOGAT y GDH son auxótrofos de glutamato y crecen bien en medios

glucosa/glutamina lo que ha postulado la existencia de rutas alternativas del catabolismo de glutamina que generen el glutamato requerido por la célula (33, 34).

En cepas carentes de GDH, la GOGAT supe aproximadamente el 88% del glutamato y algunas glutamino- amidotransferasas el 12 % restante. (4, 19, 30 ).

Por otro lado, se ha observado que cepas carentes de GDH NADPH-dependiente, crecen a la mitad de la velocidad de una cepa silvestre pero cepas carentes de GOGAT crecen tan bien como las cepas silvestres, ambas en medios glucosa/amonio. Esta observación ha llevado a postular que la enzima GOGAT pudiera **no ser esencial para la levadura.** (19, 33, 34)

### 3. HIPOTESIS

Dado que la mayoría de los estudios sobre la asimilación de amonio en *S. cerevisiae* se han efectuado utilizando cultivos en matraz y medios glucosa/amonio como única fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente, y dado que

a) La actividad de GS parece estar regulada por la concentración intracelular de glutamina y la concentración extracelular de amonio

b) La actividad de GDH es baja en condiciones de limitación extracelular de amonio y alta en condiciones de exceso del mismo

c) No se ha encontrado un comportamiento característico en la actividad específica de GOGAT al variar la concentración de amonio en el medio de cultivo, y

d) Trabajos previos sugieren que la enzima GOGAT no es esencial para la levadura dado que cepas *glt1* crecen a la misma velocidad que las cepas silvestres en medios glucosa/amonio. (17, 19, 24, 28, 30, 32)

Se propone que en cultivos continuos de *S. cerevisiae* creciendo en amonio como única fuente de nitrógeno, las enzimas GS y GOGAT pudieran ser importantes en la biosíntesis de glutamina y en la asimilación de amonio cuando este ión se encuentre limitante en el medio de cultivo; mientras que en condiciones de exceso, la enzima GDH sería más importante para la biosíntesis de glutamato y como consecuencia, en la asimilación de amonio.

### 4. OBJETIVO

Determinar y analizar las actividades específicas de las enzimas GDH, GS y GOGAT involucradas en la asimilación de amonio y en la biosíntesis de glutámico y glutamina de *S. cerevisiae* creciendo bajo condiciones de limitación y exceso extracelular de amonio en un quimiostato.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

La estrategia general para abordar el análisis del papel que juegan las enzimas GDH, GS y GOGAT en la asimilación de amonio y biosíntesis de glutámico y glutamina en *S. cerevisiae*, es la de mantener un cultivo de este microorganismo creciendo continuamente bajo condiciones de limitación y exceso de amonio generadas en un quimiostato.

En resumen, se obtuvieron cultivos continuos de *S. cerevisiae* de las cepas silvestre S288C, mutante RX2 $\Delta$ pLV2 (*gdh*), y mutante LA1ApLV1 (*gogat*). Las condiciones nutricionales fueron: de *limitación de amonio* a  $D \approx 0.05 - 0.15/\text{hr}$ , y *exceso del mismo* a  $D \approx 0.2 - 0.3/\text{hr}$ , usando  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno (ver material y métodos). Los demás sustratos están en exceso.

Las velocidades específicas de crecimiento máxima para cada una de las cepas reportadas a continuación, son aproximaciones al punto en que el cultivo se lava (wash-out point). Es decir, corresponden a una población celular estable por más de seis volúmenes de reposición después del cambio de una velocidad de crecimiento menor anterior, y después de seis volúmenes de reposición después de la toma de una alícuota del cultivo para la determinación de las actividades enzimáticas.

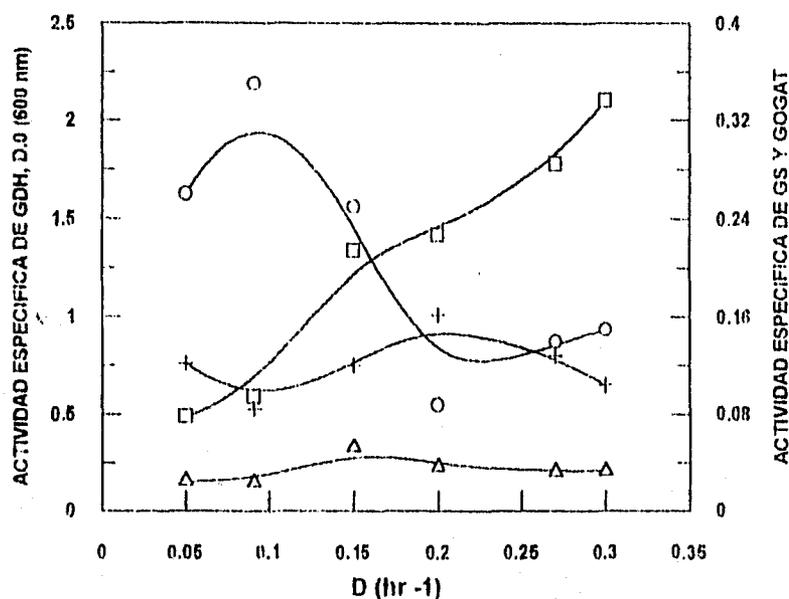
Como se mencionó en la introducción, en el estado estacionario la velocidad de dilución,  $D$ , de estos cultivos es igual a la velocidad de crecimiento específica,  $\mu$ , del microorganismo.  $D$  y  $\mu$  tienen las mismas dimensiones.

### 5.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA INVOLUCRADA EN LA ASIMILACION DE AMONIO EN LA CEPA S288C.

En la gráfica 1 se presentan las actividades específicas de las enzimas GDH-NADPH dependiente, GS y GOGAT NAD-dependiente en la cepa silvestre S288C bajo condiciones de limitación y exceso de amonio en el medio. En primer lugar se observa que la actividad específica de GDH-NADPH dependiente se incrementa proporcionalmente conforme aumenta la cantidad de amonio en el medio de cultivo, de 0.49 a 2.4 ( $D \approx 0.05 - 0.3/\text{hr}$ ). Por el contrario, la actividad específica de GS resultó alta en condiciones de limitación de amonio, ( $0.30$  a  $D \approx 0.05 - 0.15/\text{hr}$ ), y baja, ( $0.10$  a  $D \approx 0.2/\text{hr}$ ), en condiciones de exceso de amonio en el medio.

Por otra parte, GOGAT no mostró variaciones importantes presentando una actividad específica máxima de  $0.060$  a  $D \approx 0.15/\text{hr}$ , y una actividad específica promedio de  $0.035$ .

La velocidad específica de crecimiento máxima,  $\mu_{\text{máx}}$ , fué aproximadamente de  $0.3/\text{hr}$  que corresponde a un tiempo de duplicación,  $t_d$ ,  $\approx 2\text{hrs}$ . La  $\mu_{\text{máx}}$  se calculó extrapolando la curva de densidad óptica del cultivo con el eje de la velocidad de dilución.



Gráfica: 1. Actividades específicas de las enzimas GS (O), GOGAT (Δ) y GDH-NADPH dependiente (+), en cultivos continuos de la cepa silvestre S288C de *S. cerevisiae*. El símbolo (+) corresponde a la densidad óptica del cultivo en cada una de las D probadas. Los datos son promedios de muestreos por triplicado y se expresan como  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$  de proteína.

Como se observa de la gráfica 1, la actividad de GOGAT en condiciones de exceso de amonio ( $D = 0.2$  a  $0.3/\text{hr}$ ) fué similar respecto a las condiciones de limitación de amonio ( $D = 0.05$  a  $0.15/\text{hr}$ ). La actividad de GS fué alta en condiciones de limitación de amonio y baja en condiciones de exceso. La actividad de GDH, por otra parte, resultó alta en condiciones de exceso y baja en condiciones de limitación de amonio en el medio de cultivo.

Estos resultados podrían indicar, en primer lugar, que el papel propuesto para las enzimas GDH y GS en algunas bacterias, pudiera ser adecuado también para *S. cerevisiae*. Esto significa que GDH es más importante en la asimilación de amonio cuando se encuentra en exceso en el medio mientras que GS es más importante en la asimilación de amonio cuando éste se encuentra limitante (4, 9, 13, 23). Si se considera a las enzimas GS y GOGAT como pertenecientes a una misma ruta metabólica como en otros microorganismos, entonces esta ruta no parece ser relevante en condiciones de exceso pero sí de limitación de amonio.

Sin embargo, el hecho de que la actividad de GOGAT no disminuya cuando la cantidad de amonio se incrementa, ni aumente en condiciones de limitación, podría sugerir que esta enzima tiene otro papel metabólico, probablemente similar al que se le propone en *N. crassa*, que consiste en la regulación de la concentración intracelular de glutamina, ya que un exceso de este aminoácido provoca un efecto represivo sobre la expresión de genes, incluyendo el de su biosíntesis, regulados por glutamina (13, 19, 30).

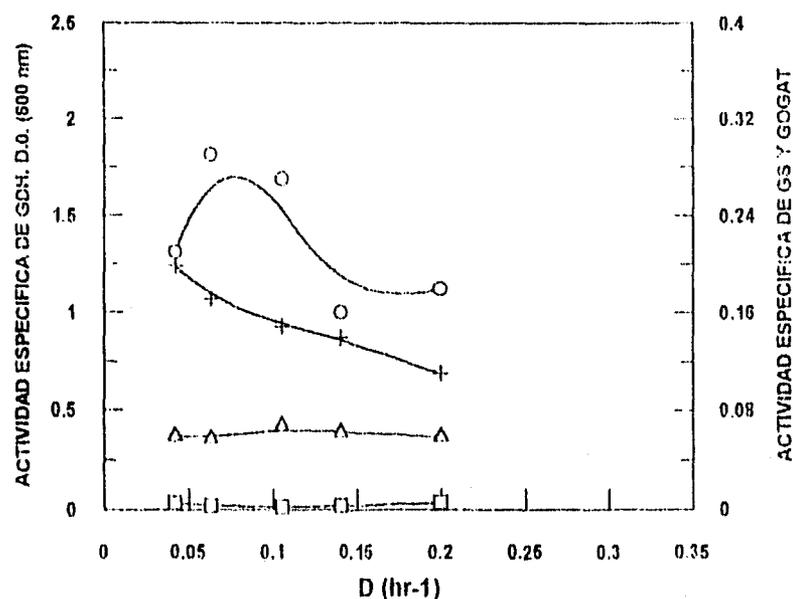
Como se mencionó en la Introducción, la maquinaria enzimática que posee *S. cerevisiae* le debe permitir crecer tan rápido como sea posible y producir material celular con un factor de producción máximo en la más baja concentración del sustrato limitante (10), por lo que el análisis de la asimilación de amonio en cepas mutantes carentes de actividad de GDH y/o GOGAT podría dar más información acerca de su propia función en este proceso.

En otras palabras, si se pudiera provocar algún tipo de alteración en una de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio, entonces se podrían inducir ajustes en la actividad de las otras enzimas también involucradas, y por tanto, en la biosíntesis de glutámico y glutamina, por ello, para este trabajo, se decidió generar cepas carentes de las enzimas GDH o GOGAT mediante interrupción de su gen estructural, respectivamente.

## 5.2. ACTIVIDADES ENZIMATICAS INVOLUCRADAS EN LA ASIMILACION DE AMONIO EN LA CEPA RX2 $\Delta$ plV2, (gdh-).

En la gráfica 2 se presentan las curvas de actividad específica de GS, GDH y GOGAT en la cepa RX2 $\Delta$ plV2, carente de GDH (ver material y métodos). Se observa que la curva de GS presenta casi el mismo comportamiento que se encontró para la GS en la cepa S288C, aunque el valor de actividad específica máxima promedio es ligeramente menor (0.28), y el de actividad específica mínima ligeramente mayor (0.16), a las mismas velocidades de dilución.

Como se pensaba, la actividad específica promedio de GOGAT se incrementó casi al doble (0.050), si se compara con la actividad específica promedio de GOGAT en la cepa silvestre (0.030). Esta cepa RX2 $\Delta$ pl.V2 presentó además, una actividad específica máxima de GOGAT de 0.065 a  $D \approx 0.15$ /hr, y no se observaron cambios importantes en su actividad al variar la concentración de amonio en el medio en cada una de las velocidades de dilución evaluadas. Asimismo, no se observó actividad de GDH-NADPH dependiente en todo el rango de velocidades de dilución analizadas.



Gráfica 2: Actividades específicas de las enzimas GS (O), GOGAT (Δ), y GDH-NADPH dependiente (+), en cultivos continuos de la cepa mutante gdh- (RX2 $\Delta$ plV2), de *S. cerevisiae*. El símbolo (+) corresponde a la densidad óptica del cultivo en cada una de las D probadas. Los datos son promedios de muestreos por triplicado y se expresan como  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$  de proteína.

En esta gráfica se observa que la ausencia de GDH NADPH dependiente no indujo ningún incremento en la actividad específica de GS, que de hecho, resultó ligeramente menor en condiciones de limitación y ligeramente mayor en condiciones de exceso de amonio comparada con la actividad de GS en la cepa silvestre.

La gráfica 2 muestra también que la curva de actividad de GS presentó un máximo lo que sugiere que tanto en la cepa S288C como en esta mutante el amonio asimilado y la biosíntesis de glutamina a través de esta enzima son suficientes para sostener el crecimiento del microorganismo en condiciones de deprivación nitrogenada y, corrobora de algún modo, la importancia de la GS en estas condiciones fisiológicas.

Acerca de la función de GDH, si esta enzima fuera importante en la biosíntesis de glutámico bajo limitación de su sustrato precursor ( $\text{NH}_4^+$ ), entonces, en su ausencia se debería inducir un incremento en la actividad de GOGAT que, como se observa en la gráfica 2, efectivamente sucedió, (la actividad específica promedio de GOGAT en esta cepa fué aproximadamente de 0.050, mientras que la actividad específica promedio de GOGAT en la cepa silvestre fué aproximadamente de 0.030). Nuevamente de estos resultados podría concluirse que las actividades de GDH y GOGAT pudieran complementarse en la cepa S288C para producir el glutamato que la célula demanda cuando crece lentamente debido a una limitación de amonio en el medio de cultivo. Sin embargo, cuando la concentración de amonio se incrementa, la actividad de GOGAT por sí sola en esta cepa carente de GDH no parece ser suficiente para la biosíntesis de glutamato por lo que el microorganismo solo alcanza una  $\mu$ máx aproximada de 0.2/hr, (lo que equivale a un tiempo de duplicación de 3.4 hrs) resaltando nuevamente la importancia de GDH en la biosíntesis de glutamato en exceso de amonio.

Estos resultados sugieren asimismo para esta cepa mutante, que la ruta GS-GOGAT pierde importancia en la biosíntesis de glutámico y en la asimilación de amonio en condiciones de exceso dado que la actividad de ambas enzimas no satisface la demanda de glutamato que la célula requiere.

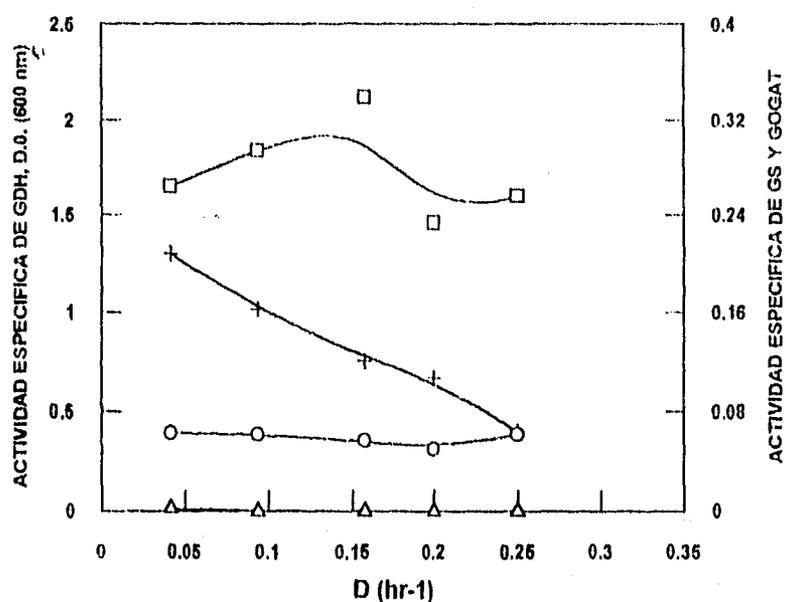
### 5.3. ACTIVIDADES ENZIMATICAS INVOLUCRADAS EN LA ASIMILACION DE AMONIO EN LA CEPA LA1ΔpLV1 (gogat<sup>-</sup>).

Con el mismo esquema planteado anteriormente, se cultivó una cepa carente de actividad de GOGAT, LA1ΔpLV1, bajo las mismas condiciones de las anteriores. La construcción de esta cepa ya ha sido reportada (5).

La gráfica 3 muestra que la mutación en el gen *GLI1* que codifica para la enzima GOGAT es estable ya que no se encontró actividad de esta enzima en todas las velocidades de dilución probadas.

De la gráfica 3 se puede observar también que la actividad de GS en esta cepa LA1ΔpLV1 fué muy baja respecto a las cepas silvestre S288C y mutante RX2ΔpLV2, (0.060), en todo el rango de velocidades de dilución analizadas. Más aún, la actividad de GDH en esta cepa LA1ΔpLV1 tanto en estricta limitación de amonio como en exceso resultó siempre alta de 1.8 a 2.0 respecto a su contraparte silvestre.

La  $\mu_{\text{máx}}$  aproximada para esta cepa fué de 0.25 lo que equivale a un tiempo de duplicación de 2.8hrs.



Gráfica 3. Actividades específicas de las enzimas GS (O), GDH-NADPH dependiente (□), y GOGAT (Δ), en cultivos continuos de la cepa mutante *gogat<sup>-</sup>* (LA1ΔpLV1), de *S. cerevisiae*. El símbolo (+) corresponde a la densidad óptica del cultivo en cada una de las D. probadas. Los datos son promedios de muestreos por triplicado y se expresan como  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteína.

Como se ha sugerido(13), la función de GOGAT en el reciclamiento de glutamina es aparentemente más importante bajo condiciones de limitación de amonio que en condiciones de exceso.

En condiciones de limitación de amonio en la cepa silvestre S288C, la GS asimila este ión de manera eficiente (la GS tiene una mayor afinidad por el amonio,  $k_m < 0.2 \text{ mM}$ , respecto de la GDH,  $k_m \approx 1 \text{ mM}$ ), produciendo poca cantidad de glutamina lo cual induce a su vez, la transcripción del gen estructural *GLN1* y por tanto, la actividad de GS se incrementa. La baja velocidad de crecimiento del microorganismo en esta situación demanda poco glutamato que a su vez puede ser proporcionado por la actividad de GDH presente (0.49 a  $D = 0.05/\text{hr}$ ). La actividad de GOGAT encontrada en estas condiciones es baja.

Por otro lado, dado que la actividad de GOGAT depende de la disponibilidad de sus sustratos, en condiciones de exceso de amonio y carbono a altas velocidades de dilución ( $D = 0.2/\text{hr}$ ), la disponibilidad de sus sustratos derivados del metabolismo aerobio de carbono: NADH y  $\alpha$ -cetoglutarato está disminuida por lo que su actividad disminuye generando en contraposición una elevada concentración intracelular de glutamina y como consecuencia baja actividad de GS como se observa en la gráfica 1. (A altas velocidades de dilución se supone que el metabolismo es predominantemente anaerobio debido a una enorme disponibilidad de glucosa en el medio. A esto se le conoce como efecto Pasteur).

Si esta hipótesis es cierta, entonces, en mutantes *glt1* (GOGAT), se esperarían altas concentraciones intracelulares de glutamina y una muy baja actividad específica de GS (la glutamina es un inhibidor de la transcripción del gen *GLN1*). La demanda de glutámico para el crecimiento tanto en condiciones de limitación como de exceso sería satisfecha por la GDH.

De la curva de actividad de GS para esta cepa mutante mostrada en la gráfica 3, se puede plantear que la hipótesis anterior referente a la actividad de GOGAT pudiera ser correcta, ya que su ausencia en esta cepa *glt1* permite, posiblemente, la acumulación intracelular de glutamina ya que casi no se encontró actividad específica de GS (0.060), tal como se ha reportado para otras cepas de *S. cerevisiae* carentes de GOGAT creciendo en matríz. (2, 4, 19, 30).

NOTA: Hasta antes del presente trabajo no se habían reportado cepas mutantes en el gen estructural de GOGAT.

En la gráfica 3 se observa que la actividad de GDH resultó siempre alta a todas las velocidades de dilución probadas. Esto sugiere que tanto en la cepa *gIII* como en la cepa silvestre (ver gráfica 1), la actividad de GOGAT pudiera también ser necesaria para satisfacer la demanda de glutámico a bajas velocidades de dilución pero no a altas velocidades de dilución tal como lo sugiere la baja  $\mu_{m\acute{a}x}$  encontrada para la cepa RX2ApLV2 (ver gráfica 2).

También se puede sugerir a partir de los datos de actividad de GDH en las gráficas 1, 2 y 3, que en condiciones de exceso de amonio la ruta de las enzimas GS y GOGAT no es reelevante en la asimilación de este ión. Es la GDH NADPH-dependiente la que principalmente lo asimila del medio produciendo el glutámico necesario para el crecimiento del microorganismo.

Los datos de la velocidad específica de crecimiento máxima para cada una de estas cepas (aproximadamente 0.3/hr para la cepa silvestre, 0.2/hr para la cepa *gdh*-, y poco más de 0.25/hr para la cepa *gogat*-, y de acuerdo a como han sido reportadas para cultivos en matraz), apoyan este planteamiento. (19 ).

#### 5.4. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE AMINOACIDOS

La ausencia de GDH en la cepa RX2 $\Delta$ pLV2 y la ausencia de GOGAT en la cepa LA1 $\Delta$ pLV1 sugería, de antemano, alguna modificación en la concentración intracelular de glutámico y glutamina. Se decidió entonces, determinar las concentraciones intracelulares de estos aminoácidos en las tres cepas de este trabajo en condiciones de limitación de amonio (0.1/hr), ya que es ésta la situación en la que más comúnmente se desarrollan las levaduras en ambientes naturales, como se discutió en la introducción. La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos.

Tabla 1.

Poza Intracelular de glutamato <sup>a</sup> y glutamina <sup>a</sup> cepa <sup>b</sup>	glu	gln	gln/glu	$\mu$
S288C	0.253 <sup>c</sup>	0.012	0.05	0.1
<i>gdh1</i>	0.440	0.044	0.10	0.1
<i>glt1</i>	0.114	0.066	0.57	0.1

a, Concentración expresada como  $\mu$ moles de aminoácidos por miligramo de proteína

b, Las muestras fueron tomadas de un estado estacionario correspondiente a  $\mu = 0.1/hr$

c, Los resultados mostrados son el promedio de tres determinaciones en estado estacionario

Como se observa en la tabla anterior, la ausencia de GOGAT en la cepa LA1 $\Delta$ pLV1 provocó un incremento en la concentración intracelular de glutamina respecto a la concentración intracelular de glutámico y, como se observa en la gráfica 3, una baja actividad de GS.

Aunque la demanda intracelular de glutámico es cubierta por la GDH en la cepa *glt1*, la relación glutamina/glutamato mostrada en la tabla anterior para esta misma cepa es más alta comparada con la relación glutamina/glutamato de las otras dos cepas a la misma velocidad de dilución. Como se mencionó antes, la elevada concentración de glutamina actúa como una señal que inhibe la transcripción del gen estructural *Gln1* así como la actividad de GS. (2, 19, 24-30).

Se puede observar también que la relación glutamina/glutamato en la cepa RX2Apl.V2 es mayor (0.10) que en la cepa silvestre (0.05), y si se considera que el valor de la relación glutamina/glutamato en la cepa *gll1* es aún mayor (0.57), se puede concluir que, a mayor relación glutamina/glutamato, y por tanto mayor concentración intracelular de glutamina respecto de la del glutámico, menor actividad de GS.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se analizó brevemente la asimilación de amonio por *S. cerevisiae* utilizando condiciones fisiológicas estables generadas en un quimioestado y, por primera vez, una cepa carente de actividad de GOGAT.

1.- En cuanto al papel de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio, la ruta de las enzimas GS y GOGAT es, efectivamente, más importante en este proceso cuando el amonio se encuentra limitante en el medio de cultivo, mientras que la ruta de la GDH es más importante cuando se encuentra en exceso; en esta situación la ruta GS-GOGAT al parecer pierde relevancia.

2.- Los resultados obtenidos sugieren, que en *S. cerevisiae*, la actividad de la enzima GOGAT podría ser necesaria para evitar que la glutamina se acumule intracelularmente manteniendo adecuados niveles de transcripción de *GLN1* y de actividad de GS cuando el amonio sea la fuente de nitrógeno y sobre todo, esté escaso en el medio de cultivo.

Como se ha discutido (7), en cepas silvestres de *S. cerevisiae* una elevación de la concentración intracelular de glutamina induce, además de una disminución en la actividad de GS, una alta relación ATP/ADP la cual modifica a su vez, el flujo de glucosa a través de la glucólisis y se favorece la utilización de glutamina en el metabolismo oxidativo, por tanto

3.- La glutamina podría tener un papel central en la regulación tanto del metabolismo de carbono como de nitrógeno lo que justifica, asimismo, el análisis posterior del papel que pudiera tener también la GOGAT en la regulación del metabolismo de carbono en esta levadura.

4.- Esta nueva función aquí propuesta para la GOGAT, tendría que ser considerada en función de otras condiciones fisiológicas de crecimiento que permitan, asimismo, valorar a otras actividades enzimáticas implicadas en el catabolismo de glutamina, por ejemplo:  $\alpha$ -amidasas, glutaminasas, transaminaciones, etc. (33, 34).

5.- Finalmente, la existencia de una presecuencia N-terminal en la GOGAT inmadura sugiere una función más específica en algún compartimento membranoso (5, 21, 37), lo cual sería interesante también analizar.

## 7. MATERIAL Y METODOS

### 7.1. CEPAS

Cepa silvestre de *S. cerevisiae* S288C (*MAT α*, *SUC2*, *gal2*, *CUP1*, *GDH1*, *GLN1*, *GLT1*), adquirida del Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.

Cepa de *S. cerevisiae* RX2ΔpLV2 (CN41 *gdh1::URA3*). Cepa mutante carente de GDH obtenida como se describe en la parte de resultados de este trabajo.

Cepa de *S. cerevisiae* LA1ΔpLV1 (CN40 *glt1::URA3*). Cepa mutante carente de GOGAT obtenida como se describe en Cogoni, et al. (5).

### 7.2. Construcción de la cepa RX2ΔpLV2, (*gdh*<sup>-</sup>), de *S. cerevisiae*

La cepa RX2ΔpLV2 se construyó mediante interrupción del gen estructural *GDH1* en la cepa haploide RX2 la cual, a su vez, se obtuvo mediante cruce de la cepa R757 (*Mat α*, *his3*, *ura3*) con la cepa X2180-1A (*Mal*, *SUC2*, *mal*, *URA3*, *gal2*, *CUP1*), adquiridas ambas del Yeast Genetic Stock Center. Se diseñaron dos d-oligonucleótidos para poder amplificar, mediante PCR, un fragmento de 800 pb de la secuencia nucleotídica del gen *GDH1* de *S. cerevisiae* reportada por Moyer y Nagasu (25, 26). El producto de amplificación se utilizó a su vez para dirigir la recombinación homóloga en el genoma de la cepa RX2.

La sonda a: 5' TCAACAAGCTTACGAAGAAGTTG 3', complementa a una región que codifica la fracción N-terminal, y la sonda b: 5'GGGGATCCAGCACTGGAAATATCAGCCGAC 3' complementa a la región central del gen de la proteína GDH-NADPH dependiente. Se agregaron sitios HindIII y BamHI al extremo 5' de cada uno de los d-oligonucleótidos. La amplificación mediante PCR se realizó utilizando DNA genómico de la cepa silvestre S288C. La reacción de amplificación se efectuó en un Thermal Cycler, Perkin Elmer, con el siguiente programa: desnaturalización a 96 °C por un minuto, alineamiento a 55 °C por un minuto, y elongación a 72 °C por tres minutos, durante 50 ciclos. El producto de amplificación se clonó en los sitios HindIII-BamHI del plásmido integrativo Ylp5 que alberga el gen *URA3*, para dar el plásmido pLV2. Este plásmido se linealizó con BglI, quedando en un extremo un fragmento de 334 bp, y en el otro un fragmento de 450 bp de la región parcial utilizada del gen *GDH1*. Este plásmido linealizado se usó para dirigir la recombinación homóloga en el genoma de la cepa RX2 y, seleccionando prototrofia a uracilo, obtener la cepa RX2ΔpLV2 (*gdh1*<sup>-</sup>, *GLN1*, *GLT1*, *URA3*).

### 7.3. CULTIVO CONTINUO

Para el cultivo de estos microorganismos se utilizó un quimiostato modelo BioFlo 1 (New Brunswick Sci. Co), con un volumen de trabajo de 600 ml. El medio de cultivo se elaboró de acuerdo a la fórmula de Difco, Labs. (Detroit, Mi.), conteniendo sales, elementos traza, vitaminas, glucosa al 2% (p/v) como fuente de carbono y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fuente de nitrógeno.

#### PROCEDIMIENTO:

- 1.- De un placa reciente de *S. cerevisiae* en medio mínimo tomar una asada e inocularla, en condiciones de esterilidad, en el vaso del quimiostato conteniendo el medio de cultivo.
- 2.- Iniciar el bombeo del medio a diferentes velocidades de flujo o dilución (30 a 180 ml/hr), e iniciar el flujo de aire (1000 ml/min). Agitar el cultivo a 400 rpm. El pH del cultivo monitoreado continuamente mantuvo un valor aproximado de 3.0.
- 3.- Cambiar la concentración del (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en el medio de 1 mM, a 2mM y/o 5 mM conforme se requiriera para soportar las diferentes velocidades de crecimiento.

4.- Ajustar las diferentes velocidades de crecimiento específicas ( $\mu$ ), manipulando las correspondientes velocidades de dilución, D (hr<sup>-1</sup>). Generalmente se requieren de 3 a 6 volúmenes de reposición del cultivo para obtener un nuevo estado estacionario cada vez que se requiera una nueva velocidad de crecimiento.

#### 7.4. Extracto libre de células

Los extractos libres de células (extracto celular) para la determinación de las actividades enzimáticas y de proteínas totales se obtuvieron por el método descrito por González, et al. 1987 (9). En términos generales:

- 1.- Tomar una alícuota de 50 a 100 ml, dependiendo de la densidad óptica del cultivo, y filtrar a través de una membrana Millipore de 1.2  $\mu$ m al vacío.
- 2.- Lavar la muestra con dos volúmenes de agua destilada, removerla con una espátula y resuspenderla en un tubo de ensayo conteniendo 1 ml del amortiguador de extracción GDH-GOGAT o GS según fuese el caso.
- 3.- Agregar suficientes perlas de vidrio, tapar el tubo con papel parafilm y agitar mecánicamente tres veces, en Vortex, de dos minutos cada una y a 4°C.
- 4.- Separar el extracto con una pipeta pasteur y depositarlo en un tubo eppendorf, centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos, recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo y utilizarlo en el ensayo de la actividad enzimática correspondiente y en la determinación de proteínas totales.

#### 7.5. DETERMINACIONES ENZIMATICAS

##### a) Glutamato deshidrogenasa NADPH-dependiente

Coctel de ensayo GDH, pH 7.8

Reactivos	Concentración final
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7.8	100 mM
$\alpha$ -cetoglutarato	3.0 mM
NH <sub>4</sub> Cl	50.0 mM
NADPH	130 $\mu$ M

##### Coctel completo GDH

Preparar una solución amortiguadora de fosfatos, 100 mM, pH 7.8. (mezclando soluciones 100 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), y en 160 ml de esta mezcla disolver los siguientes reactivos:

$\alpha$ -cetoglutarato.K ..... 0.1006 g  
NH<sub>4</sub>Cl ..... 0.4882 g

Ajustar a pH 7.8 con solución ácida o básica de fosfatos y aforar a 180 ml con la mezcla de fosfatos pH 7.8.

Repartir en alícuotas de 15 ml en tubos Falcon. Congelar.

##### Coctel control GDH

Como para el coctel completo, en una mezcla de fosfatos pH 7.8 preparar una solución sin  $\alpha$ -cetoglutarato y otra sin amonio que servirán como controles de la actividad de GDH.

Repartir en alícuotas de 15 ml en tubos Falcon. Congelar.

#### Ensayo de actividad

- 1.- Directamente en tres celdas de espectrofotómetro colocar 985  $\mu$ l del coctel completo, control sin amonio y control sin  $\alpha$ -cetoglutarato, respectivamente
- 2.- Antes de correr el ensayo, pesar exáctamente 500mg de NADPH y disolverlos en 0.5 ml de agua. Agregar 15  $\mu$ l a cada celda, disolver. Volúmen final 1 ml.
- 3.- Iniciar la reacción agregando a cada celda 5  $\mu$ l del extracto celular, mezclar bien con ayuda de un trozo de papel parafilm y leer la disminución en la absorbancia del NADPH a 340 nm
- 4.- El ensayo con el coctel completo puede hacerse por duplicado. Repetir el ensayo utilizando 10 o 15  $\mu$ l del extracto libre de células ajustando el volúmen de los reactivos a 1 ml de volúmen final.

5.- Registrar los datos y calcular la actividad enzimática específica como sigue:

$$\text{Actividad específica (U/mg)} = m/6.22/v/mg$$

donde: m, es la pendiente de la curva de disminución de la absorbancia del NADPH, 6.22, es el coeficiente de extinción molar del NADPH, v, es el volúmen de la alícuota del extracto celular y, mg, son los miligramos/ml de proteínas totales del extracto celular.

#### b) Glutamato sintasa

Coctel de ensayo GOGAT, pH 7.0

Reactivos	Concentración final
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.0	100 mM
$\alpha$ -cetoglutarato	6.0 mM
L-glutamina	6.0 mM
NADH	180 $\mu$ M

#### Coctel completo

Preparar una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM pH 7.0

(mezclando soluciones 100 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y en 340 ml disolver los siguientes reactivos:

$\alpha$ -cetoglutarato.K 6 mM ..... 0.405 g

L-glutamina 6 mM ..... 0.321 g

Ajustar a pH 7.0 con solución ácida o básica de fosfatos y aforar a 360 ml con la mezcla de fosfatos pH 7.0.

Repartir en alícuotas de 11 ml en tubos Falcon

Aparte, justo antes de iniciar el ensayo pesar 0.0015 g de NADH y disolverlos en una alícuota del coctel previamente descongelada a temperatura ambiente.

#### Azaserina 50 mM

Azaserina ..... 0.0432 g

H<sub>2</sub>O ..... 5 ml. Congelar

#### Ensayo de actividad

- 1.- Como para el ensayo de GDH, colocar en tres celdas 900  $\mu$ l del coctel GOGAT, aforar con 100  $\mu$ l de agua en las dos primeras, y agregar en la tercera 100  $\mu$ l de azaserina (inhibidor específico de GOGAT). Volúmen final 1 ml.
- 2.- Iniciar la reacción agregando 20  $\mu$ l del extracto celular y determinar la disminución en la absorbancia del NADH a 340 nm espectrofotométricamente.
- 3.- Calcular la actividad específica de GOGAT como para la GDH.

c) *Glutamino sintetasa*

Coctel de ensayo de GS, pH 6.4

Reactivos	Concentración final 1X
ADP	0.75 mM
L-Glutamina	35.0 mM
NH <sub>4</sub> OH	8.75 mM
Na <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub>	17.5 mM
MnCl <sub>2</sub>	2.25 mM

*Preparación del coctel GS*

En 45 ml del *Amortiguador de ensayo GS* hacer las siguientes soluciones:

1.- ADP	0.1539 g
2.- L-Glutamina	2.3010 g
3.- NH <sub>4</sub> OH	0.2763 g
4.- Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>	2.4570 g
5.- MnCl <sub>2</sub>	0.2003 g

*Solución coctel GS, 1X*

Mezclar 2.5 ml de las soluciones anteriores en el orden indicado en un vaso de precipitado y aforar a 25 ml con agua. Depositar 2 ml de este coctel en tubos de 10x100 y llevar a 30°C en antes de iniciar la reacción.

*Amortiguador de Ensayo de GS*

Tris-Acetalos 50 mM	2.7180 g
EDTA.K 0.5 mM	0.0469 g
H <sub>2</sub> O	250 ml

Ajustar a pH 6.4 con Trizma base. Filtrar en Millipore 0.22 µm

*Solución de Paro de GS*

HCL (0.5 N)	10.23 ml
H <sub>2</sub> O	250 ml

En esta solución ácida disolver los siguientes reactivos:

TCA (0.25 M)	10.212 g
--------------	----------

(Ac. tricloroacético)

FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (0.2 M)	13.515 g
--	----------

Filtrar tres veces con papel Whatman y una vez con Millipore de 0.22 µm.

*Ensayo de actividad*

- 1.- En seis tubos de ensayo 13x100 a 30 °C en baño maría, colocar 2 ml del coctel GS, 1X.
  - 2.- Iniciar la reacción agregando 60 µl del extracto celular cada 30 seg.
  - 3.- Parar la reacción del primer tubo uno o dos minutos después de iniciada con 1 ml del *reactivo de paro de GS*.
  - 4.- Parar la reacción de los demás tubos de la misma manera pero a los 5, 10, 15 y 20 minutos (o 25 minutos si fuese necesario).
- La reacción del sexto tubo pararla inmediatamente después de agregar el extracto (Tubo control).
- 5.- Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos y, procurando no resuspender el precipitado, determinar la absorbancia del complejo formado a 550 nm.
- Calcular la actividad enzimática como sigue:

$$\text{Actividad específica (U/mg)} = m \times 0.35/v/mg$$

donde:  $m$ , es la pendiente de la curva de aumento de absorción del complejo formado (D.O/min), 0.35, es el coeficiente de extinción molar del complejo formado,  $v$ , es el volumen de la alícuota del extracto celular y,  $mg$ , son los miligramos/ml de proteínas totales del extracto celular.

*Amortiguador de extracción GDH-GOGAT*

EDTA 1 mM  
 DTT 1 mM  
 PMSF 1 mM  
 TLCK 50 µg/ml

Ajustar a pH 7.5 con solución ácida o básica de fosfatos 100 mM y aforar a 45 ml con la mezcla de fosfatos pH 7.5.

*Amortiguador de extracción de GS*

Preparar una mezcla de  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , 5 mM, pH 7.2, y en 40 ml disolver los siguientes reactivos:

EDTA.2K, 0.5 mM ..... 0.0084 g  
 $K_2SO_4$ , 50 mM ..... 0.3960 g

Ajustar a pH 7.2 con solución ácida o básica de fosfatos 5 mM y aforar a 45 ml con la mezcla de fosfatos pH 7.2.

**7.6. DETERMINACIÓN DE PROTEINAS TOTALES**

Preparar las siguientes soluciones para el método descrito por Lowry, O. H., 1951. (18).

*Solución A*

1.- NaOH, 1N ..... 4.0 g  
 Agua c.b.p. .... 100 ml  
 2.-  $Na_2CO_3$ , 2% ..... 2.0080 g  
 Solución 1 ..... 100 ml

*Solución B*

Tartrato de sodio-potásio  
 ( $C_4H_4NaO_6 \cdot 6H_2O$ ), 2% ..... 2.7127 g  
 Agua c.b.p. .... 100 ml

*Solución C*

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 1% ..... 1.5817 g  
 Agua c.b.p. .... 100 ml

*Solución A,B,C, de Lowry*

Solución A: 98 (98%)  
 Solución B: 1 (1%)  
 Solución C: 1 (1%)

*Solución de Folín & Ciocalteu's*

Solución de Folín & Ciocalteu's ..... 4 ml  
 Agua c.b.p. .... 4 ml

*Stándar de Albúmina (BSA): 10 mg/ml*

Cada microlitro de solución estándar contiene 10 µg de BSA

Pesar exactamente 0.01054 g de BSA y disolverlos en exactamente 1 ml de agua.

En una celda de cuarzo a 280 nm (luz UV):

10 mg/ml equivalen a una D.O. de 0.660 de absorbancia

una solución 1:10 ..... 0.066, y

una solución 1:100 ..... 0.006

#### **7.7. DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES INTRACELULARES DE AMINOACIDOS.**

Del cultivo continuo en estado estacionario, tomar una alícuota de 20 a 30 ml y separar en dos volúmenes iguales. Filtrar uno de ellos utilizando membranas Millipore de 1.2  $\mu\text{m}$ , remover el filtro de su soporte con las células e introducirlo en un vial conteniendo 5 ml de etanol al 80% precalentado. Calentar a ebullición en baño maría por 10 minutos, retirar el filtro libre de las células, tapar el vial y guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Filtrar el otro volumen de la misma manera que el anterior, retirar el filtro del soporte e introducirlo en un tubo de centrifuga conteniendo 2 ml de TCA al 5%. Guardar a  $4^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, neutralizar con 1 ml de NaOH 1N, mezclar, separar las células mediante centrifugación a 2000 rpm por 5 min, desecchar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 1 ml de agua destilada. Utilizar esta suspensión para la determinación de proteínas totales.

Las concentraciones intracelulares de glutamato y glutamina se determinaron por el método de González et al.(9, 13).

## 8. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fué apoyado por:

- 1.- La Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, No. IN201894.
- 2.- Comunidad Económica Europea No. CII-C191-0898.
- 3.- CONACyT que me otorgó la beca No. 84576.

Deseo agradecer, asimismo, a las siguientes personas:

Dr. Hiram Olivera (INDRE-SA), por su invaluable asesoría durante la realización del trabajo y revisión del manuscrito final.

MC. Cristina Aranda (IFC-UNAM) por su importante asistencia técnica

Dra. Oralia Ladrón de Guevara (Unidad de Análisis de Aminoácidos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), por la determinación de las concentraciones de aminoácidos

Dra. Laura Ongay (Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM), por la síntesis de los d-oligonucleótidos para los experimentos de PCR.

Biol. Simón Guzmán por su invaluable apoyo técnico, interés y crítica hacia el proyecto

MIBB. Lourdes Valenzuela por la construcción de la cepa LATApLV1 y RX2ApLV2, y por la crítica hacia el proyecto.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. **Alcamo, I.E.** The Fungi, pp 470-485, in *Fundamentals of microbiology*, 1th. ed., by I.E. Alcamo. Benjamin/Cummings, 1991.
2. **Benjamín, M. P., J. Wu, A. P. Mitchell and B. Magasanik.** 1989. Three regulatory systems control expression of glutamine synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* at the level of transcription. *Mol. Gen. Genet.* **217**:370-377.
3. **Boles, E., W. Lehnert, and F.K. Zimmermann.** 1993. The role of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase in restoring growth on glucose of a *Saccharomyces cerevisiae* phosphoglucose isomerase mutant. *Eur. J. Biochem.* **217**: 496-477.
4. **Bravo, A., and J. Mora.** 1988. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.* **170**(2): 980-984.
5. **Cogoni, C., I.Valenzuela, D. González-Halphen, H. Ollvera, G. Macino, P. Ballario, and A. González.** 1995. *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J. Bacteriol.* **177**(3): 792-798.
6. **Fishov, I., A. Zaitzsky, and N.B. Grover.** 1995. On microbial states of growth. *Mol. Microbiol.* **15**(5): 789-794.
7. **Flores, S. B., H. Ollvera, and A. Gonzáles.** 1993. Glutamine synthesis is a regulatory signal controlling glucose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **175**(23): 7705-7706.
8. **Gregerson, R.G., S.S. Miller., S.N. Tway., J.S. Gantt., and C.P. Vance.** 1993. Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. *Plant cell.* **5**: 215-226.
9. **González, A., I. Rodríguez, H. Ollvera, and M. Soberón.** 1985. NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase activity is impaired in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that lack aconitase. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 2565-2571.
10. **Harder, W. and L. Dijkhuizen.** 1983. Physiological responses to nutrient limitation. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 1-23.
11. **Helling, R.B.** 1994. Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate?. *J. Bacteriol.* **176**(15): 4664-4668.
12. **Holmes, A.R., A. Collings, K.J.F. Farnen, and M.G. Shepherd.** 1989. Ammonium assimilation by *Candida albicans* and other yeast: evidence for activity of glutamate synthase. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1423-1430.
13. **Hummel, G. And J. Mora.** 1980. Regulation and function of glutamate synthase in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**: 1688-1694.
14. **Jannasch, H.W. and T. Egl.** 1993. Microbial growth kinetics: a historical perspective. *Antonie van Leeuwenhoek.* **63**: 213-224.
15. **Khale, A., M.C. Srinivasan, and M. V. Deshpande.** 1992. Significance of NADP/NAD glutamate dehydrogenase ratio in the dimorphic behavior of *Benjaminiella paitrasii* and its morphological mutants. *J. Bacteriol.* **174**(11): 3723-3728.

16. **Large, P.J.** 1986. Degradation of organic nitrogen compounds by yeast. *Yeast*, **2**: 1-34.
17. **Legrain, C., S. Vissers, E. Dubois, M. Legrain, and JM. Wiame.** 1982. Regulation of glutamine synthetase from *Saccharomyces cerevisiae* by repression, inactivation and proteolysis. *Eur. J. Biochem.* **123**: 611-616.
18. **Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-277.
19. **Magasanik, B.** Regulation of nitrogen utilization, pp283-318, in *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, Vol.2: Gene expression, Edit. by E.W. Jones, J.R. Pringle, and J.R. Broach. CSHL Press, 1992.
20. **Mazon, M.J., and B. A. Hemmlings.** 1979. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dependent glutamate dehydrogenase by proteolysis during carbon starvation. *J. Bacteriol.* **139**(2): 686-689.
21. **Mesenguy, F., D. Colln., JP. Ten Have.** 1980. Regulation of compartmentatio of amino acid pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control. *Eur. J. Biochem.* **108**: 439-447.
22. **Miller, S.M., and B. Magasanik.** 1990. Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **172**(9): 4927-4935.
23. **Minohart, P.L. and B.Magasanik.** 1992. Sequence of the GDH gene of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the upstream region in regulation of glutamine synthetase expression. *J. Bacteriol.* **174**(6): 1828-1836.
24. **Mitchell, A., and B. Magasanik.** 1983. Purification and properties of glutamine synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bil. Chem.* **258**: 119-124.
25. **Moye, W.S., N. Amuro, J.K. Mohana Rao, and H. Zalkin.** 1985. Nucleotide sequence of yeast GDH encoding nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **260**(14): 8502-8508.
26. **Nagasu, T., and B.D. Hall.** 1985. Nucleotide sequence of the GDH gene coding for the NADP-specific glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. **37**: 247-253.
27. **Novick, A. and L. Szilard.** 1950. Description of the chemostat. *Science*, **112**: 715-716.
28. **Olivera, H., A. González and A. Peña.** 1993. Regulation of the aminoacid permeases in nitrogen-limited continuous cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **9**: 1065-1078.
29. **Quintero Ramírez, R.** Cultivo Continuo. pp.57-79. in *Ingeniería Bioquímica. Teoría y aplicaciones.*, 1a edic. Alhambra, México. 1993.
30. **Reitzer, L.J. and B. Magasanik.** Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. pp.302-320. in *E. coli and cellular and molecular biology*. F.C.Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik and H.E. Umbarger (edits). American Society for Microbiology, Washington .D.C. 1983.

31. **Roon, R.J., H.L. Even, and F. Larimore.** 1974. Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **118**(1): 89-95.
32. **Senior, P.J.** 1975. regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous-culture technique. *J. Bacteriol.* **123**(2): 407-418.
33. **Soberón, M., and A. González.** 1987a. Physiological role of glutaminase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1-8
34. **Soberón, M., and A. González.** 1987b. Glutamine degradation through the  $\alpha$ -Amidase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 9-14.
35. **ter Schure, E., H.H.W. Silljé, L.J.R.M. Raeven, J. Boonstra, A.J. Verkleij, and C.T. Verrips.** 1995. Nitrogen-regulated transcription and enzyme activities in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* **141**: 1101-1108.
36. **Uno, I., K. Matsumoto, K. Adachi, and T. Ishikawa.** 1984. Regulation of NAD-dependent glutamate dehydrogenase by protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **259**(2): 1288-1293.
37. **Watson, T.G.** 1976. Amino-acid pool composition of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of growth rate and amino-acid nitrogen source. *J. Gen. Microbiol.* **96**: 263-268.
38. **Wlame, J.M., M.Grenson, and H.N. Arst.** 1985. Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **26**: 1-