

1
25/10



Universidad Nacional Autónoma de México

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

GLUTATION: EFECTO DEL AMONIO SOBRE LA
SINTESIS DEL TRIPEPTIDO EN EL HONGO
PENICILLIUM CHRYSOGENUM

T E S I S

Que para obtener el titulo de:
LICENCIADO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

P r e s e n t a :

RUTH SCHWARTZ ROSENTHAL



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 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.

ABREVIATURAS

AA	aminoácido
α - aaa	ácido α aminoadípico
α - aaa - cis	L - α - aminoadipil - L - cistefna
α - aaa - cis - val	L - α - aminoadipil - L - cistei - nil - D - valina
ADP	difosfato de adenosina
6 - APA	ácido 6 - aminopenicilánico
ATP	trifosfato de adenosina
cis	cistefna
CISH - GLI	cisteinil - glicina
CIS - GLI X	cisteinil - glicina S - derivada
D.O.	densidad óptica
γ - glu - aa	γ - glutamil - aminoácido
γ - glu - cis - X	γ - glutamil - cisteinil S - deri- vado
GSH	glutación
GSSG	glutación disulfuro
J.J. (10X)	mezcla de sales de Jarvis y John - son (diez veces más concentrada)
NADP	nicotinamida adenfn dinucleótido fosfato

Pi
val

fósforo inorgánico
valina

INDICE

RESUMEN.....	1
GENERO <u>PENICILLIUM</u>	6
Generalidades.....	6
Importancia para el hombre.....	9
Estructura de la penicilina.....	11
Biosíntesis de penicilina.....	14
GLUTATION.....	19
Metabolismo.....	19
Regulación de su síntesis.....	24
Funciones.....	26
Bloqueos y deficiencias del ciclo	
γ - glutamílico.....	36
REGULACION NITROGENADA.....	38
Control negativo.....	42
Control positivo.....	47
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	50
OBJETIVO.....	53
MATERIAL Y METODOS.....	54
RESULTADOS Y DISCUSION.....	63
CONCLUSIONES.....	106
BIBLIOGRAFIA.....	109

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
FIGURA 1.- Conidióforos formados por varias especies del género <u>Penicillium</u>	7
FIGURA 2.- Estructura del micelio producido por el género <u>Penicillium</u>	8
FIGURA 3.- Ciclo vital del género <u>Penicillium</u>	10
FIGURA 4.- Crecimiento y producción de penicilina presentados por el hongo <u>P. chrysogenum</u>	12
FIGURA 5.- Estructura fundamental de la penicilina	13
FIGURA 6.- Ruta postulada para la biosíntesis de penicilina.....	16
FIGURA 7.- Fórmula estructural del glutatión.....	20
FIGURA 8.- Metabolismo del glutatión.....	22
FIGURA 9.- Funciones del glutatión.....	27
FIGURA 10.- Curva patrón de la concentración de glutatión obtenida por un método enzimático	62
FIGURA 11.- Concentración específica de glutatión en células y en el medio de cultivo en presencia de amonio 10 mM.....	65
FIGURA 12.- Concentración específica de glutatión a diferentes tiempos de cultivo en presencia de amonio 10 mM.....	66
FIGURA 13.- Suma específica de glutatión a tiempos	

	cortos de cultivo y en esporas en presencia de altas y bajas concentraciones de amonio.	68
FIGURA 14.-	Concentración volumétrica de glutatión en presencia de altas y bajas concentraciones de amonio.....	70
FIGURA 15.-	Crecimiento en presencia de altas y bajas concentraciones de amonio.....	71
FIGURA 16.-	Concentración específica de glutatión en presencia de altas y bajas concentraciones de amonio.....	72
FIGURA 17.-	Concentración volumétrica de glutatión en presencia de altas y bajas concentraciones de amonio.....	73
FIGURA 18.-	Concentración específica de glutatión en presencia de altas y bajas concentraciones de amonio.....	74
FIGURA 19.-	Crecimiento en presencia de varias concentraciones de amonio.....	76
FIGURA 20.-	Suma volumétrica de glutatión producido en presencia de varias concentraciones de amonio.....	77
FIGURA 21.-	Suma específica de glutatión producido en presencia de varias concentraciones de amonio.....	78
FIGURA 22.-	Concentración de glutatión producido a las	

	90 horas de cultivo en presencia de diferentes concentraciones de amonio.....	79
FIGURA 23.-	Crecimiento en presencia de varias concentraciones de amonio.....	81
FIGURA 24.-	Suma volumétrica de glutatión producido en presencia de varias sales de amonio.....	82
FIGURA 25.-	Suma específica de glutatión producido en presencia de varias sales de amonio.....	83
FIGURA 26.-	Crecimiento y pH a diferentes tiempos de cultivo en presencia de altas y bajas concentraciones de amonio.....	84
FIGURA 27.-	Crecimiento y ajuste de pH a diferentes tiempos de cultivo en presencia de altas y bajas concentraciones de amonio.....	85
FIGURA 28.-	Concentración volumétrica de glutatión producido al ajustar el pH del cultivo.....	86
FIGURA 29.-	Concentración específica de glutatión producido al ajustar el pH del cultivo.....	87
FIGURA 30.-	Estructura química del glutatión y del tri péptido precursor de la penicilina.....	89
FIGURA 31.-	Crecimiento y concentración de penicilina producida en presencia de varias concentraciones de amonio.....	91
FIGURA 32A.-	Concentración volumétrica de penicilina producida en presencia de varias concentraciones de amonio.....	

nes de amonio.....	92
FIGURA 32B.-Concentración específica de penicilina producida en presencia de varias concentraciones de amonio.....	93
FIGURA 32C.-Crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de amonio.....	95
FIGURA 33.- Concentración volumétrica de penicilina producida en presencia de varias sales de amonio..	96
FIGURA 34.- Concentración específica de penicilina producida en presencia de varias sales de amonio..	97
FIGURA 35.- Concentración volumétrica y específica de penicilina producida por cultivos en los cuales se controló el pH.....	98
FIGURA 36.- Concentración de penicilina producida en presencia de varias concentraciones de amonio...	100
FIGURA 37.- Relación entre el crecimiento y la producción de glutatión y penicilina en presencia de altas y bajas concentraciones de amonio.....	102
TABLA 1.- Diversos tipos de penicilina.....	15
TABLA 2.- Aplicación de algunos metabolitos producidos por ciertos microorganismos.....	39
TABLA 3.- Concentración de sales por litro reportadas por Jarvis y Johnson para el medio de producción del <u>P. chrysogenum</u>	57

RESUMEN

El glutatión es un tripéptido ampliamente distribuido en la naturaleza. Posee muchas funciones dentro de los organismos vivos, además de servir como agente terapéutico para curar algunos trastornos del funcionamiento hepático. Estas características, aunadas a la gran similitud estructural existente entre el glutatión y la penicilina, así como ciertas evidencias que indican la posibilidad de que la primera enzima involucrada en la biosíntesis de ambos compuestos sea la misma; hacen del glutatión un metabolito digno de estudios más profundos con respecto a la regulación de su biosíntesis.

En estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio, se midieron las concentraciones de glutatión presentes en el hongo Penicillium chrysogenum, tanto en esporas como a diferentes tiempos de cultivo. Sin embargo, dichos estudios cubrieron solamente el intervalo de tiempo situado entre las 12 y las 72 horas de cultivo. En vista de que en estos estudios, la concentración de glutatión contenida en las esporas era la misma que la encontrada a las 12 horas de cultivo y, a partir de este punto, la concentración del tripéptido comenzaba a disminuir a medida que avanzaba el tiempo de incubación, decidimos medir las concentraciones de glutatión a tiempos cortos de cultivo; es decir, entre las 0 y las 12 horas con el fin de saber si el glutat

ti6n contenido originalmente en las esporas se degrada y resintetiza inmediatamente al poner las esporas en contacto con el medio de cultivo, o se comienza a degradar el trip6ptido a partir de las doce horas de incubaci6n.

Al unir los resultados del experimento mencionado anteriormente con los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio, logramos obtener un panorama completo acerca de la producci6n de glutati6n con respecto al tiempo de cultivo bajo condiciones estandarizadas de crecimiento.

El glutati6n proveniente de las esporas es utilizado o degradado al poner las esporas en contacto con el medio de cultivo ya que a6n desde las dos horas de crecimiento, el trip6ptido se encuentra en muy baja concentraci6n.

La sntesis " de novo " del glutati6n se inicia aproximadamente entre las dos y las cinco horas de incubaci6n. La suma de valores especificos con respecto al glutati6n localizado intra y extracelularmente, alcanza un m6ximo a las 24 horas de cultivo aproximadamente y baja posteriormente.

En base a que la producci6n de algunas sustancias formadas por microorganismos, se ve afectada por la concentraci6n de amonio en el medio de cultivo, quisimos conocer el efecto de dicho nutriente sobre la formaci6n del trip6ptido. Por esta raz6n, una vez establecida la cin6tica de producci6n de glutati6n en un medio de cultivo estandarizado, decidimos estudiar el perfil de

formación de dicho tripéptido en presencia de diferentes concentraciones de amonio.

El glutatión localizado en las esporas desaparece rápidamente y se comienza a sintetizar de nuevo a partir del intervalo comprendido entre las 3 y las 7 horas de cultivo; independientemente de la concentración de amonio presente en el medio de incubación. El amonio en altas concentraciones retrasa ligeramente la formación de glutatión, en comparación con la síntesis ocurrida en presencia de bajas concentraciones de dicho nutriente. Sin embargo, los niveles de glutatión se igualan a las 9 horas de cultivo. En presencia de altas concentraciones de amonio, la formación de glutatión se eleva a partir de las 24 horas de incubación aproximadamente. Dicha elevación alcanza magnitudes de hasta 14 veces con respecto a los cultivos donde el amonio se encuentra en baja concentración.

El efecto estimulador ejercido sobre la producción de glutatión es debido a la presencia de altas concentraciones de amonio y no al tipo de sal con la cual éste se administra al medio de cultivo, o al cambio de pH ocasionado por su adición.

En base a las evidencias que apuntan a la enzima γ -glutamil - cistefna sintetasa como la posible responsable de la formación de los dipéptidos intermediarios de la síntesis de penicilina y glutatión, pensamos que sería interesante estudiar adicionalmente, la regulación por amonio de la formación de penicilina.

Al adicionar amonio al comienzo del cultivo a concentra-

ciones mayores que el control (10mM), el comienzo de la síntesis de penicilina se retrasa y mantiene baja por un día aproximadamente. Sin embargo, la producción del antibiótico se incrementa 3 veces después de ese día de retraso al compararse con el control; por lo que es posible concluir que el amonio en altas concentraciones ejerce un efecto de retraso y estimulación sobre la producción de penicilina.

El efecto estimulador sobre la producción de penicilina es debido específicamente a la presencia de altas concentraciones de amonio en el medio de cultivo y no al tipo de sal con la cual éste se administre, o al cambio de pH ocasionado por su adición.

En base a los experimentos realizados en este trabajo, es posible concluir que el amonio en altas concentraciones ejerce un efecto estimulador tanto sobre la síntesis de penicilina como sobre la de glutatión.

Adicionalmente, los experimentos realizados nos permitieron efectuar las siguientes observaciones:

- 1.- El comienzo de la producción de penicilina ocurre ciertas horas antes del establecimiento de la fase estacionaria de crecimiento, tanto en altas como en bajas concentraciones de amonio.
- 2.- El incremento ocasionado en la producción de penicilina y glutatión por altas concentraciones de amonio, ocurre al mismo

tiempo que el establecimiento de la fase estacionaria de crecimiento.

El hecho de que las enzimas involucradas en la producción de metabolitos secundarios son menos específicas que las relacionadas con el metabolismo primario, aunado a los resultados obtenidos por varios grupos de investigación según los cuales se han detectado péptidos similares al tripéptido precursor de la penicilina y al glutatión en varios microorganismos y, sumando a lo anteriormente dicho, nuestra observación con respecto a la similitud en cuanto al tiempo de producción y al efecto estimulador del amonio sobre la producción de ambos compuestos, nos lleva a postular que la enzima involucrada en la catálisis del primer paso de la síntesis de penicilina y glutatión que funciona al establecerse la fase estacionaria de crecimiento, es la misma. Sin embargo, será necesario realizar experimentos de purificación enzimática y obtención de mutantes deficientes en la enzima γ - glutamil - cistefna sintetasa para aclarar este punto.

INTRODUCCION

GENERO PENICILLIUM

Generalidades

El género Penicillium está constituido por los hongos verdes o azules encontrados frecuentemente en cítricos, conservas u otros alimentos que hayan sido contaminados con sus esporas. Sus conidios, al igual que los del género Aspergillus, se encuentran tanto en el suelo como en el aire (7).

La morfología y el ciclo vital del género Penicillium perteneciente a la clase de los Ascomicetes (23), es la siguiente:

El micelio produce conidióforos erectos que se ramifican en forma simétrica o asimétrica (Figura 1). Los conidióforos, referidos comúnmente como cepillos, se denominan técnicamente "penicillus" y se encuentran formados por hifas rectas, aéreas y septadas que producen un grupo de células terminales formadas de esporas denominadas fiálides. Cada una de las células fiálides da lugar a la formación de una cadena de conidios o filiosporas en cuya base se encuentra la más joven (Figura 2) (55).

Los conidios son estructuras ovaladas que al observarse a través del microscopio, semejan perlas de vidrio. Las enormes

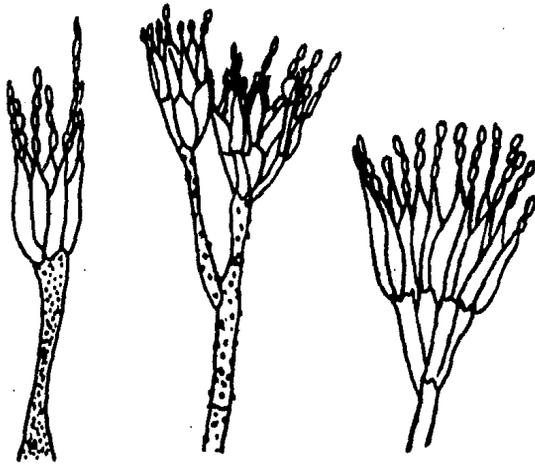


Figura 1.- Conidióforos formados por varias especies del género Penicillium.

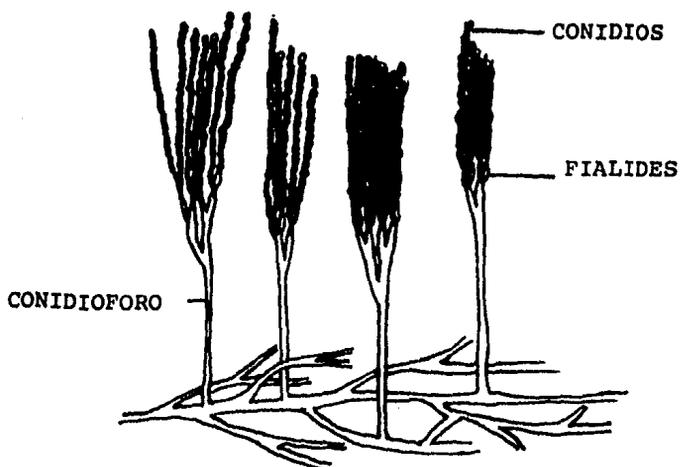


Figura 2.- Micelio producido por el género Penicillium en el cual pueden apreciarse los conidióforos formando cadenas de conidios.

cantidades de conidios verdes, azules o amarillos producidos por los microorganismos deben su color característico a algún pigmento formado por la especie en particular del género Penicillium que las produce.

Al germinar los conidios dan lugar a la formación de micelio (Figura 3). Este se encuentra constituido por células multinucleadas que, como se mencionó anteriormente, dan lugar a ramas en forma de cepillo las cuales contienen fiálides terminales en cargadas, a su vez, de la formación de esporas.

El género Penicillium es muy similar en cuanto a su morfología al género Aspergillus; sin embargo, el primero parece carecer de un ciclo de reproducción sexual tal como ocurre en el caso de algunas especies del género Aspergillus (37).

Importancia para el hombre

Entre las decenas de especies comprendidas en el género Penicillium hay algunas que poseen gran importancia económica debido a su utilización en la producción de quesos y antibióticos (7).

Entre las especies utilizadas para la producción de quesos cabe mencionar al Penicillium roqueforti y al Penicillium camemberti, responsables del sabor que caracteriza a los que-

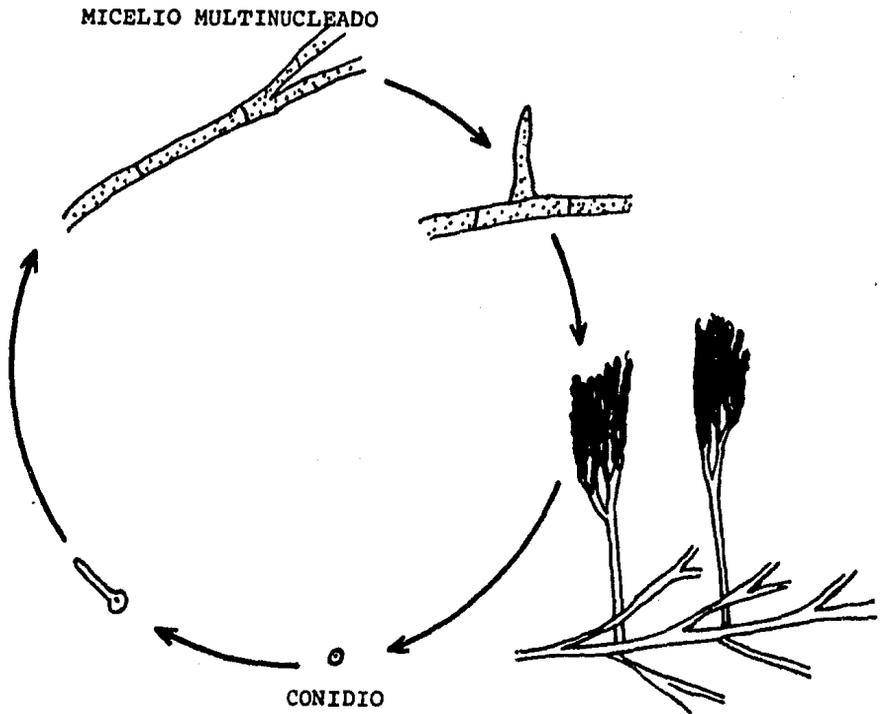


Figura 3.- Ciclo vital del género Penicillium

sos Roquefort y Camembert respectivamente (7).

El Penicillium notatum es históricamente famoso por ser el responsable del descubrimiento de la penicilina pues en 1929 contaminó e inhibió el crecimiento de un cultivo de estafilococos con el cual Alexander Fleming se encontraba trabajando en un hospital de Londres (2). Posteriormente se ha descubierto que el Penicillium chrysogenum es mejor productor de penicilina que el Penicillium notatum; es por esto que el primero se utiliza hoy en día para la producción de penicilina.

La penicilina es un antibiótico natural que sintetiza Penicillium chrysogenum durante la fase estacionaria de crecimiento (Figura 4) (117), y que actúa principalmente contra bacterias Gram positivas inhibiendo la formación de su pared celular (2, 39, 141).

Estructura de la penicilina

La estructura básica de la penicilina ha sido confirmada por medio de estudios cristalográficos con rayos X (54), los cuales han demostrado que dicho antibiótico se encuentra formado por un anillo β -lactámico fusionado a un anillo tiazolidínico y una cadena lateral acílica (Figura 5) (129).

El anillo bicíclico tiazolidín - β - lactámico (ácido 6

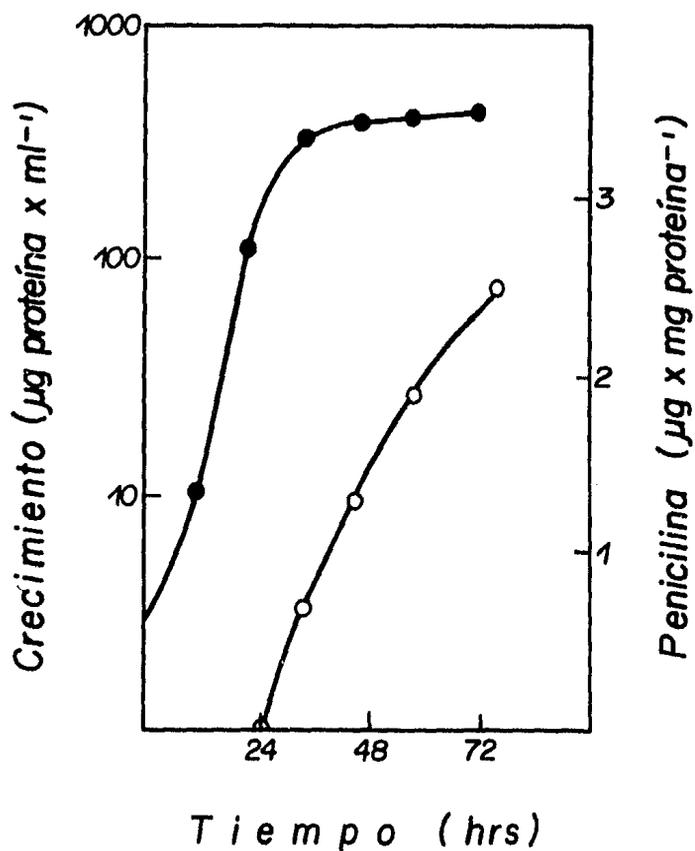


Figura 4.- Crecimiento (●) y producción de penicilina (○) a diferentes tiempos de cultivo, presentados por el hongo *P. chrysogenum*.

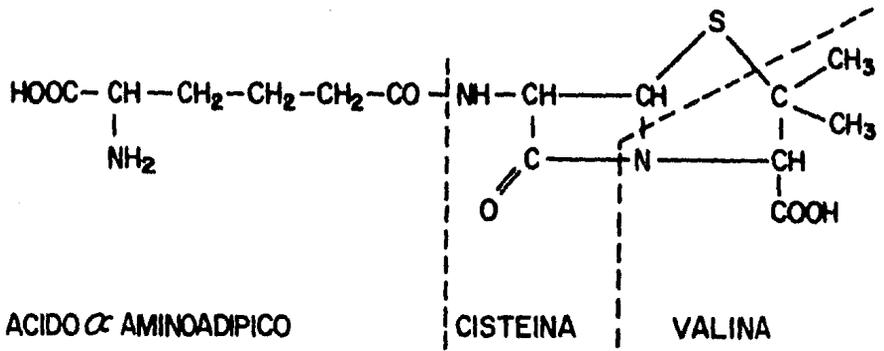


Figura 5.- Estructura fundamental de la penicilina.

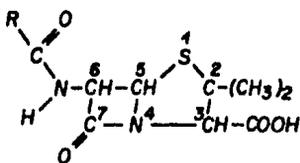
aminopenicilánico o 6-APA) es considerado como el núcleo de todas las penicilinas. Los diferentes tipos de penicilina existentes son producidos en función del ácido que sirve como precursor para la formación de la cadena lateral del antibiótico (Tabla 1) (105).

Biosíntesis de penicilina

La síntesis enzimática de la penicilina se lleva a cabo a partir de un tripéptido precursor constituido por los aminoácidos L - α - aminoácido, L - cisteína y L - valina (25, 42, 74, 125, 129, 140).

El primer paso de la biosíntesis del antibiótico consistiría en la condensación del ácido α aminoácido con la cisteína, dando como resultado la formación del dipéptido L - α - aminoácido - cisteína (Figura 6, reacción 1) (13, 101, 106).

Hasta este momento no ha sido posible demostrar la presencia del dipéptido L - α - aminoácido - cisteína en el micelio de los microorganismos productores de penicilina (51). Una posible explicación para este hecho podría ser que el dipéptido permaneciese unido a una enzima. Martín y colaboradores (77) han propuesto un mecanismo de "tio templado" para la formación del tripéptido precursor de la síntesis de penicilina, en el cual los aminoácidos son activados por ATP y unidos secuencialmente a grupos tioles pertenecientes a un complejo multienzimático,



penicilina: fórmula general

Substituyente R	Nomenclatura:química	común
aminoadipato	isopenicilina	N
ác. hexanoico	N-amilpenicilina	Dihidro F
ác. octanoico	N-heptil penicilina	K
ác. β hexenoico	2-pentil penicilina	F
ác. fenilacético	bencil penicilina	G
ác. fenoxiacético	fenoximetil penicilina	V
ác. pOH fenilacético	pOH bencil penicilina	X

TABLA 1.- Diversas penicilinas generadas por acción de la penicilina acil transferasa, enzima que promueve el cambio del ác. α - aminoadípico por otros substituyentes acídicos.

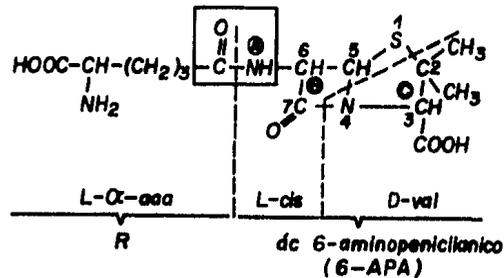
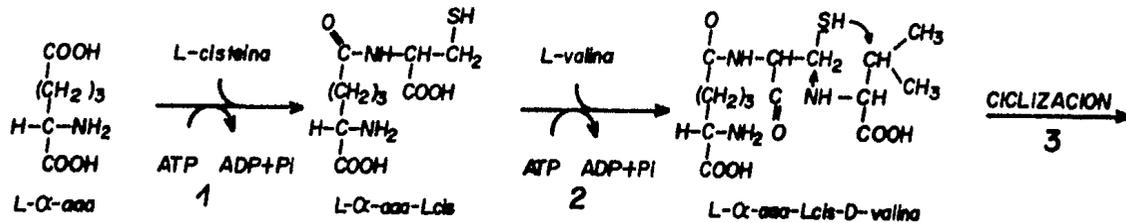


Figura 6.- Ruta postulada para la biosíntesis de penicilina: 1) Reacción catalizada por la δ (L- α - aminoadipil - cisteina sintetasa); 2) Reacción catalizada por la tri péptido sintetasa. 3) Reacción catalizada por la penicilina ciclasa.

liberando como producto al tripéptido γ - glutamil - cisteinil valina completo (77). Por otra parte, Kaszab y Enfors han sugerido que el dipéptido es sintetizado por una enzima con actividad idéntica a la γ - glutamil - cistefna sintetasa, catalizadora del primer paso en la biosíntesis de glutatión (61). Como conclusión de los datos mencionados anteriormente, es posible decir que no existe hasta ahora información precisa acerca del primer paso de la biosíntesis de penicilina, el cual debe ser catalizado por una enzima L - α - aminoadipil - cistefna sintetasa (101).

Una vez formado el dipéptido L - α - aminoadipil cistefna, se sintetizaría el tripéptido δ (L - α - aminoadipil) - L - cisteinil - D - valina gracias a la acción de la enzima tripéptido sintetasa, encargada de unir la valina al dipéptido anteriormente mencionado (Figura 6, reacción 2). La isomerización de la valina debe ocurrir al momento de la unión con el dipéptido y no antes, ya que no es posible formar al tripéptido cuando se suministra D - valina o DL - valina (3, 14, 36).

El siguiente paso en la vía de formación de la penicilina consiste en la ciclización del tripéptido gracias a la enzima isopenicilina N sintetasa que da como resultado la formación de isopenicilina N (1, 36, 66, 84, 100) (Figura 6, reacción 3). La isopenicilina N es una clase de penicilina formada por el núcleo 6 - aminopenicilánico unido al ácido α aminoadípico.

Como último paso en la síntesis de penicilina ocurre el in

tercambio de la cadena lateral acflica unida al núcleo 6 - a - aminopenicilánico por algún ácido presente en el medio de cultivo. Esta reacción es catalizada por una penicilina acil transferasa y da como resultado la formación de diferentes tipos de penicilina según el ácido que se incorpore al núcleo 6 - amino penicilánico, como puede observarse en la tabla 1 (105, 129, 140).

GLUTATION

El glutati6n es un trip6ptido ampliamente distribuido en la naturaleza. Se le ha detectado tanto en microorganismos como en plantas y animales. Ha sido blanco de estudio de muchos grupos de investigaci6n debido a su participaci6n en muchos fen6menos biol6gicos tales como la sntesis de protefnas y DNA, transporte, actividad coenzimática y protecci6n celular (88, 91).

En 1888 se aisl6 el glutati6n a partir de levaduras (111, 112) y posteriormente, en base a estudios cristalográficos y de sntesis se estableci6 su estructura qufmica como un trip6ptido formado por los aminoácidos glutámico, cisteina y glicina (L - γ - glutamil - L - cisteinil - glicina) (Figura 7) (49, 52, 53, 62).

Metabolismo

La sntesis y utilizaci6n del glutati6n se ha relacionado con el ciclo glutamflico, constituido por una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente. A pesar de que la mayor

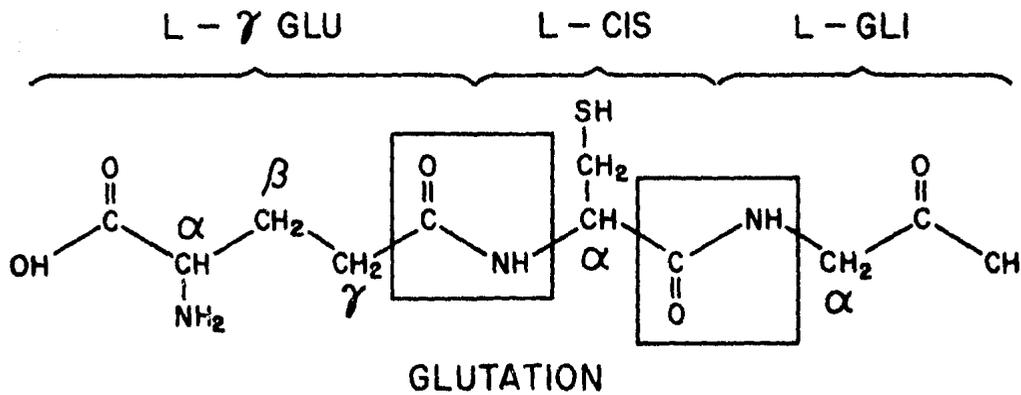


Figura 7.- Fórmula estructural del glutati6n.

parte de la información existente tanto acerca de estas enzimas como de las funciones de dicho ciclo in vivo se ha obtenido a partir de estudios realizados en tejidos de animales mamíferos, existen evidencias de que el ciclo funciona en otros organismos vivos como por ejemplo: levaduras (93), bacterias (35, 92, 132), insectos y plantas (21, 22, 41).

El glutatión se sintetiza intracelularmente gracias a la acción consecutiva de dos enzimas: la γ - glutamil transpeptidasa (Figura 8, reacción 1) y la glutatión sintetasa (Figura 8, reacción 2).

La ruptura del glutatión es catalizada por la γ - glutamil transpeptidasa, enzima asociada a membranas, que transfiere el grupo γ - glutamílico a ciertos aminoácidos aceptores, como por ejemplo: cisteína, glutamina, metionina y algunos dipéptidos (Figura 8, reacción 3). El glutatión intracelular es transportado hacia la membrana plasmática donde interactúa con la γ - glutamil transpeptidasa, localizada en la superficie exterior de la membrana, la cual cataliza la formación de los γ - glutamil aminoácidos. Estos a su vez son sustratos de la enzima γ - glutamil ciclotransferasa (Figura 8, reacción 4), encargada de convertir dichos compuestos a sus aminoácidos correspondientes y 5 - oxo - prolina. La conversión, dependiente de ATP, de la 5 - oxo - prolina a L - glutamato es catalizada por la enzima 5 - oxo - prolinasa (Figura 8, reacción 5). El dipéptido cisteinil - glicina formado en la reacción de transpepti-

CICLO DEL γ-GLUTAMILO

22

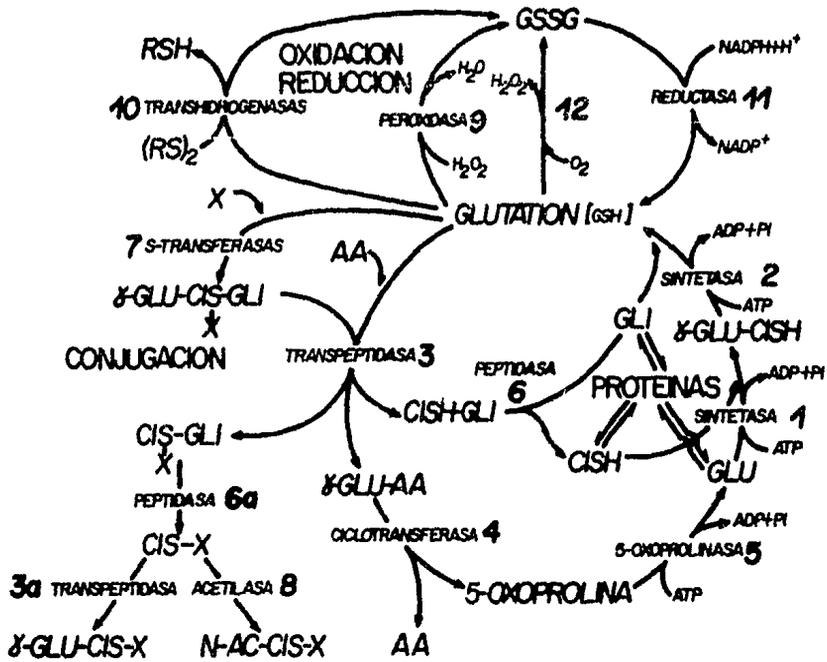


Figura 8.- Metabolismo del glutatión: 1)γ - glutamil - cistefna sintetasa, 2)glutatión sintetasa, 3 y 3a)glutamilo transpeptidasa, 4)glutamilo ciclotransferasa, 5)5 - oxo - prolinasa 6 y 6a) dipeptidasa, 7)glutatión S - transferasas, 8)N - acetilasa 9) glutatión peroxidasa, 10)transhidrogenasas, 11)GSSG reductasa, 12)oxidación de glutatión por peróxido de hidrógeno o radicales libres.

dación, es cortado por una dipeptidasa ampliamente distribuida en los sistemas biológicos (Figura 8, reacción 6) liberando cisteína y glicina (88, 91).

Las seis enzimas mencionadas anteriormente forman el ciclo γ - glutámico, encargado de efectuar la síntesis y la degradación del glutatión. La transpeptidasa y la peptidasa involucradas en el ciclo γ - glutámico funcionan adicionalmente en el metabolismo de conjugados del glutatión S - sustituidos, los cuales son compuestos formados enzimáticamente al reaccionar el glutatión con ciertas sustancias electrofílicas o bien, por la actividad de las glutatión transferasas (Figura 8, reacción 7).

La γ - glutamil transpeptidasa (Figura 8, reacción 3) remueve el grupo γ - glutámico de los conjugados y las cisteinil - glicinas S - sustituidas resultantes son disociadas por la dipeptidasa (Figura 8, reacción 6a) dando como resultado a la cisteína S - sustituida, que a su vez puede sufrir N - acetilación (Figura 8, reacción 8) o alguna transpeptidación adicional formando el derivado γ - glutámico correspondiente (Figura 8, reacción 3a). Esta última reacción se ha observado con sustratos tanto de origen exógeno como endógeno (9, 46).

Por otro lado, el glutatión es convertido a glutatión disulfuro (GSSG) gracias a la acción de la enzima glutatión peroxidasa, encargada de catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno y otros peróxidos (Figura 8, reacción 9). Adicional -

mente, el glutatión también puede ser convertido a glutatión disulfuro por medio de transhidrogenación (Figura 8, reacción 10).

La reducción del glutatión disulfuro a glutatión es realizada por la enzima glutatión disulfuro reductasa utilizando NADPH (Figura 8, reacción 11). Existe además la conversión extracelular de glutatión a glutatión disulfuro dependiente de oxígeno que lleva a su vez, a la formación de hidrógeno (Figura 8, reacción 12).

Regulación de la síntesis de glutatión

Es posible que la velocidad de la síntesis de glutatión se vea afectada por la concentración intracelular de cisteína (88).

El dipéptido γ - glutamyl - cisteína funciona como sustrato muy eficiente de la γ - glutamyl transpeptidasa y la γ - glutamyl ciclotransferasa además de la glutatión sintetasa. Sin embargo, se ha sugerido que la síntesis de glutatión se protege al prevenir la destrucción del dipéptido intermedio γ - glutamyl - cisteína por medio de una coordinación o unión entre las dos enzimas encargadas de sintetizarlo; es decir, la γ - glutamyl - cisteína sintetasa y la glutatión sintetasa (85, 86).

El hecho de que la γ - glutamil - cistefna - sintetasa purificada a partir de hígado de rata sea inhibida por glutatión bajo condiciones muy semejantes a las que ocurren in vivo (115), indica que el glutatión posee un mecanismo de retroregulación sobre su propia biosíntesis, fisiológicamente importante. Parece ser que el glutatión retroregula a la γ - glutamil - cistefna sintetasa al unírsele tanto en el sitio que reconoce al ácido glutámico como al que reconoce a la cistefna es decir; en forma no alostérica. En base a que el glutatión retroinhibe a la γ - glutamil - cistefna - sintetasa, y algunas observaciones realizadas en pacientes que presentan 5 - oxoprolinuria causada por deficiencias en la síntesis de glutatión y por consiguiente, a la ausencia de su efecto retroregulador (65, 142), se ha podido concluir que la enzima γ - glutamil - cistefna sintetasa no actúa normalmente a su máxima capacidad (88).

Ha sido posible formar in vivo análogos de glutatión capaces de inhibir la síntesis de dicho tripéptido gracias a la facultad de las sintetetas del glutatión para interactuar con otros aminoácidos (82, 98, 119). Estos estudios aunados a la utilización de sustancias inhibitoras de las enzimas involucradas en el ciclo γ - glutamflico, tales como la metionina sulfoximina (102), han sido y seguirán siendo muy útiles en cuanto al estudio del metabolismo y los mecanismos de acción de las enzimas relacionadas con el ciclo γ - glutamflico (45). Adicionalmente,

los estudios realizados en pacientes que presentan alguna deficiencia enzimática en el ciclo, también han sido de gran valor para el entendimiento de su funcionamiento.

Funciones del glutatión

El glutatión es un tiol ampliamente distribuido en la naturaleza. Se encuentra virtualmente en todas las células vivientes en concentraciones milimolares, así como en fluidos extracelulares entre los cuales cabe mencionar al plasma y a la sangre. Se le han adjudicado muchas funciones a este tripéptido tan abundante, las cuales serán expuestas en esta sección y se encuentran esquematizadas en la figura 9 (90).

I.- Transporte de aminoácidos

Las características que posee el ciclo γ - glutamílico hicieron que se le postulara como un mecanismo de transporte de aminoácidos en tejidos animales.

Se ha postulado a la γ - glutamil transpeptidasa, que se

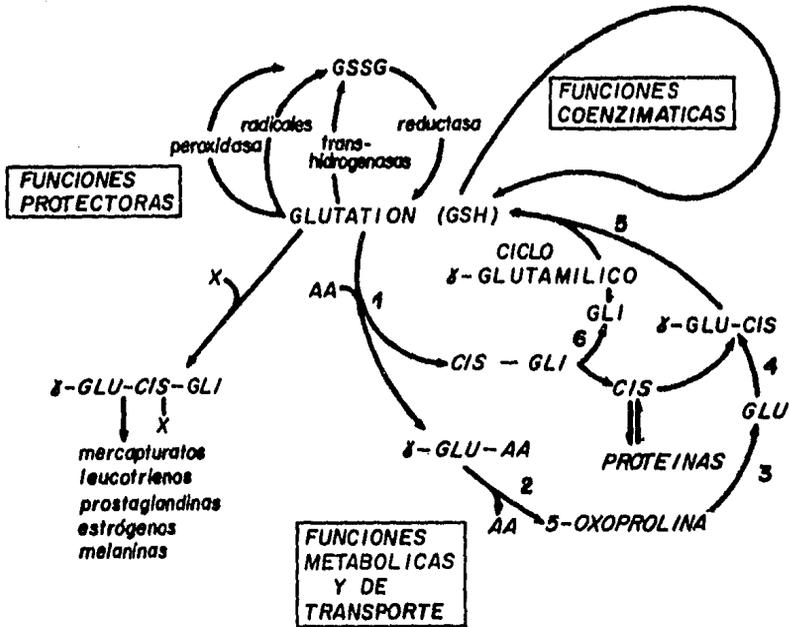


Figura 9.- Funciones del glutati3n. 1)transpeptidasa, 2)cilo-transferasa, 3)oxoprolinasa, 4) glutamil - cistefna sintetasa, 5)glutati3n sintetasa 6)dipeptidasa. AA)amino3cidos, X)compues to que reacciona con el glutati3n.

encuentra asociada a membranas celulares, como la enzima responsable de la translocación de aminoácidos al interactuar tanto con los aminoácidos extracelulares como con el glutatión intracelular. Asimismo se ha propuesto a la γ - glutamil ciclo - transferasa como la enzima encargada de liberar los aminoácidos de sus acarreadores γ - glutamílicos.

Las evidencias que apoyan el que el ciclo actúe en la translocación de aminoácidos residen en las siguientes observaciones:

- 1.- La administración de aminoácidos a animales de laboratorio causa la ruptura de glutatión (133).
- 2.- La γ - glutamil transpeptidasa cataliza la ruptura de glutatión ocasionada por la presencia de aminoácidos (8, 83).
- 3.- Cuando se administran aminoácidos a ratones en presencia de inhibidores de la γ - glutamil transpeptidasa, las concentraciones de glutatión no decrecen (128).
- 4.- Existe la formación de compuestos γ - glutamil - aminoácidos in vivo (104, 137).
- 5.- La transpeptidasa se localiza en estructuras epiteliales involucradas en fenómenos de transporte entre los cuales cabe mencionar los túbulos renales proximales (6, 40), la mucosa y yunal (29) y las vesículas seminales, entre otros.
- 6.- Existen altas concentraciones de glutatión en las estructuras epiteliales involucradas en fenómenos de transporte (16).
- 7.- Existen evidencias acerca del transporte de γ - glutamil -

aminoácidos hacia el interior de las células (91).

8.- La velocidad a la cual decrece el nivel de glutatión renal al administrar inhibidores de su síntesis baja al suministrar inhibidores de la transpeptidasa (91).

9.- Existe una relación directa entre el transporte de aminoácidos y las actividades de las enzimas γ - glutamil transpeptidasa, 5 - oxo - prolinasa y γ - glutamil - cistefna sintetasa en glándula mamaria de rata (138, 139).

10.- Cuando se incorpora la transpeptidasa a vesículas de fosfolípidos o membranas de eritrocitos éstas estructuras son capaces de internalizar algunos aminoácidos (60, 123).

Es importante notar que el ciclo γ - glutámico no funciona en todos los tipos celulares y no es capaz de transportar a todas las clases de aminoácidos existentes (91). Los candidatos más factibles para ser introducidos a las células por medio de la γ - glutamil transpeptidasa son la cistefna y la glutamina aunque la afinidad presentada por la transpeptidasa con respecto a los aminoácidos neutros permitiría suponer que dicha enzima podría ser capaz de transportar a dichos aminoácidos (127).

A pesar de que es necesario profundizar más acerca de la localización precisa de la γ - glutamil transpeptidasa, existen evidencias de que ésta se encuentra localizada en el exterior de las membranas celulares (69). El hecho de que la trans-

peptidasa se localice de un lado de la membrana y su sustrato (el glutatión) se encuentre en el lado opuesto, ha llevado a postular que exista un mecanismo encargado de transportar el glutatión intracelular hacia la transpeptidasa unida al lado exterior de la membrana (90), lo que ha sido demostrado por estudios realizados en células linfoides, hígados perfundidos y fibroblastos en cultivo.

Los tipos celulares que poseen altos niveles de la transpeptidasa, como por ejemplo el riñón, transportan el glutatión hacia dicha enzima unida a la membrana e internalizan los productos de su acción enzimática. Sin embargo, los tejidos que no poseen altos niveles de transpeptidasa, como por ejemplo el músculo, liberan el glutatión hacia el exterior de la célula (90).

II.- Transhidrogenación

Existen algunas funciones metabólicas y fisiológicas que involucran intercambios de tipo tiol - disulfuro. Cabe mencionar por ejemplo la síntesis y degradación de proteínas, activación e inactivación enzimática, síntesis de intermediarios para la formación de DNA y reducción de cistina. Puesto que el glutatión es un tiol muy abundante en la naturaleza, se ha pensado que muchas de las reacciones anteriormente mencionadas lo podrían requerir como agente reductor. Esta hipótesis ha sido

confirmada al detectar actividades enzimáticas que dependen del glutatión para realizar sus funciones reductoras; tal es el caso de la reducción de homocistina (107), cistina (94), disulfuros protéicos de bajo peso molecular (31), insulina (134, 135) y la formación de desoxirribonucleótidos (90).

III.- Conjugación del glutatión

a) Compuestos exógenos

El glutatión es capaz de reaccionar con una gran variedad de compuestos exógenos formando conjugados (26, 56). La interacción de dichos compuestos de origen extraño con el glutatión puede ocurrir espontáneamente o por medio de las glutatión - S - transferasas (Figura 8, reacción 7). Los conjugados son convertidos a ácidos mercaptúricos por medio de una serie de reacciones iniciadas por la γ - glutamil transpeptidasa (Figura 8, reacción 3) en la cual el grupo γ - glutamilo del conjugado es transferido a un aceptor y el compuesto cisteinil - glicina restante es convertido gracias a la acción de la dipeptidasa (Figura 8, reacción 6a) al conjugado cisteínico correspondiente, el cual se N - acetila para formar finalmente un ácido mercaptúrico (Figura 8, reacción 8) y excretarse en la orina o heces.

Las glutatión S - transferasas se encuentran en grandes cantidades en varios tejidos animales así como en plantas e in

sectos (28, 91). Son idénticas a las ligandinas, reconocidas inicialmente como protefnas capaces de unir compuestos aniónicos (48, 63), con el fin de transportarlos del plasma sanguíneo a las células hepáticas (110). Su importancia reside en que funcionan como detoxificantes celulares.

b) Compuestos endógenos

A pesar de que la mayoría de los estudios sobre la conjugación del glutatión ha versado acerca de la detoxificación de compuestos extraños, se ha observado que también existen conjugados con metabolitos endógenos. Por ejemplo: la formación del leucotrieno D (sustancia anafiláctica de liberación lenta), involucra la adición de glutatión al leucotrieno A y la subsecuente liberación del grupo γ - glutamilo gracias a la acción de la γ - glutamil transpeptidasa (99). El leucotrieno D continúa su metabolismo gracias a la dipeptidasa, que lo convierte en la cisteína S - substituída correspondiente liberando a la glicina. Ocurren reacciones similares en el metabolismo de esteroides y prostaglandinas; estas últimas son metabolizadas y excretadas como sus cisteínas - N - acetil - S - substituídas correspondientes (24, 91, 109). Se desconocen con precisión las vías seguidas por los compuestos endógenos metabolizados vía derivados de glutatión. Existen algunas indicaciones de que estos compuestos poseen funciones fisiológicas importantes, como por ejemplo, la 5 - S - glutatión DOPA formada en los mela-

nocitos que parece ser intermediaria en la incorporación de azufre a los pigmentos melanínicos (91).

IV.- Funciones coenzimáticas

Existen varias reacciones enzimáticas en las cuales el glutation participa como coenzima. La más conocida es la reacción de glioxilasa en la que el compuesto formado por la interacción no enzimática entre el metil glioxal y el glutation es convertido a S - lactil - glutation gracias a la glioxilasa I y, posteriormente, a D - lactato por la acción de la glioxilasa II (17, 32).

Otras reacciones que requieren glutation son las catalizadas por la maleil acetoacetato isomerasa y la formaldehído deshidrogenasa (121, 122), así como las catalizadas por la prostaglandina endoperóxido D isomerasa y E isomerasa (91).

La deshidroclorinación del DDT es catalizada por una enzima dependiente de glutation encontrada en las moscas; aparentemente, el DDT reacciona con el glutation formando un intermedio que da lugar a la síntesis de un producto deshidroclorinado, HCl y glutation, que en esta forma carece de toxicidad.

V.- Consideraciones adicionales

Se le han adjudicado al glutati6n y a su metabolismo funciones protectoras contra las radiaciones y el c6ncer, as6 como un papel regulador del metabolismo del calcio en mam6feros (47, 58, 89, 91, 114).

Adicionalmente, se ha planteado la posibilidad de que el ciclo γ - glutam6fico funcione en la translocaci6n de neurotransmisores formados por amino6cidos (87, 91).

Por otra parte, estudios realizados con celenterados, han mostrado que el glutati6n es capaz de activar ciertas respuestas nutricionales en las hidras, las cuales consisten en abrir la boca y mover los tent6culos (71, 72). Este tipo de descubrimientos son muy interesantes pues podr6an sentar las bases para alg6n modelo elemental de neurotransmisi6n (88).

Otro posible papel fisiol6gico del ciclo γ - glutam6fico es la conversi6n de la cistefna libre en una forma menos disponible para la formaci6n de prote6fnas, con el fin de controlar la velocidad de la s6ntesis de prote6fnas (88). Se ha postulado que los amino6cidos extracelulares penetran a la c6lula y estimulan la ruptura del glutati6n, catalizada por la transpeptidasa, y aumentan la disponibilidad de cistefna para la s6ntesis de prote6fnas. Por lo tanto, el ciclo γ - glutam6fico estar6a regulando la velocidad de s6ntesis de prote6fnas al limitar o

proveer de cisteína a las células (88).

VI.- Utilización industrial del glutatión

Además de todas las funciones metabólicas y fisiológicas del glutatión citadas hasta este momento, así como sus posibles aplicaciones en el futuro para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, cabe mencionar que el glutatión se utiliza industrialmente en la producción de medicinas destinadas al tratamiento de pacientes que sufren de cirrosis, insuficiencia hepática y hepatitis, debido a su actividad como detoxificante hepático y reconstructor de los grupos sulfhidrúlicos de los sistemas enzimáticos localizados en el hígado (116).

Bloqueos y deficiencias del ciclo γ - glutamflico

Una de las enzimas que ha sido bloqueada artificialmente es la 5 - oxo - prolinasa (130, 131, 133); sin embargo, dicho bloqueo no afecta al funcionamiento del ciclo ya que hay otras vías alternativas para la formación del ácido glutámico, como por ejemplo: la hidrólisis de la glutamina y la transaminación del ácido α - cetoglutárico (88).

Se han detectado bloqueos genéticos en la enzima glutatión sintetasa en pacientes que presentan 5 - oxo - prolinuria; no obstante, estos bloqueos no se han podido asociar con defectos en el transporte de aminoácidos, debido a que la γ - glutamil - cistefna puede actuar como donador de grupos γ - glutamflicos para ser utilizados por la transpeptidasa. Por otra parte, un bloqueo en la γ - glutamil - cistefna sintetasa podría detener el funcionamiento del ciclo ya que prevendría la síntesis de glutatión y de γ - glutamil - cistefna ocasionando, por consiguiente, la ausencia de compuestos donadores de grupos γ - glu-tamflicos. Se han detectado dos pacientes que presentan este tipo de deficiencia enzimática (67, 113), cuyos síntomas fueron bajas concentraciones de glutatión en eritrocitos, mal funcionamiento del sistema nervioso central y aminoaciduria.

Los estudios efectuados con respecto a la γ - glutamil transpeptidasa no han permitido llegar a una conclusión definitiva pues el paciente en el cual se detectó la deficiencia de

dicha enzima (120), no fue estudiado con respecto a las posibles implicaciones de una deficiencia en transpeptidasa sobre el transporte de aminoácidos.

Al considerar a los diferentes errores innatos del ciclo γ - glutamílico que han sido detectados en humanos, es interesante notar que en ningún caso se ha detectado la ausencia absoluta de alguna de las actividades enzimáticas que lo constituyen ni la ausencia total de glutatión. Es posible que el glutatión aún en muy bajas concentraciones sea suficiente para mantener las funciones en las cuales se ve involucrado. Por otro lado, estudios realizados con agentes que depletan de glutatión han indicado que concentraciones muy bajas de dicho tripéptido parecen ser efectivas para la protección celular (88).

Se han encontrado en E. coli cepas mutantes deficientes en las actividades de γ - glutamil - cisteína sintetasa y glutatión sintetasa (Figura 8) (11,12,38). El crecimiento de dichas mutantes fue normal: sin embargo, estas cepas presentaron mayor sensibilidad que sus cepas progenitoras a algunos antibióticos y reactivos químicos. Por lo tanto, aunque el glutatión no es un factor indispensable para el crecimiento, si posee funciones protectoras de importancia.

REGULACION NITROGENADA

Los microorganismos son capaces de sintetizar una gran variedad de metabolitos requeridos para su crecimiento, desarrollo y supervivencia (5). La existencia de mecanismos que regulan los procesos metabólicos presentados por los microorganismos, permite a éstos responder eficientemente a cambios nutricionales ocurridos en su medio ambiente. Algunos de los metabolitos producidos son de gran interés para el hombre ya que poseen características importantes para su aplicación en la medicina humana, medicina veterinaria, agricultura e investigación (Tabla 2) (18).

La regulación de la producción, mediada por microorganismos, de metabolitos que presentan interés industrial se efectúa por medio de dos clases de control:

- a) procesos regulatorios generales que operan en función de la tasa de crecimiento.
- b) efectos regulatorios que actúan sobre las vías sintéticas específicas de cada metabolito tales como inducción, regulación catabólica y retroregulación.

Estudios realizados por varios grupos de trabajo han indicado que la producción de una gran variedad de metabolitos que presentan interés comercial tales como los antibióticos, se ve afectada por las concentraciones de carbono, nitrógeno, fosfa-

MEDICINA HUMANA

Antibióticos de aplicación terapéutica en humanos.

Substancias que afectan actividades fisiológicas.

AGRICULTURA

Substancias que actúan contra patógenos de plantas.

Substancias que actúan como insecticidas.

Substancias que regulan el crecimiento en animales.

MEDICINA VETERINARIA

Antibióticos de aplicación terapéutica en animales.

Substancias que promueven el crecimiento en animales.

INVESTIGACION

Substancias útiles para la elucidación de procesos biológicos a nivel molecular.

TABLA 2.- Aplicación de algunos metabolitos producidos por ciertos microorganismos.

to y azufre en el medio de cultivo (78).

El nitrógeno es un elemento encontrado en una gran variedad de compuestos y en la mayoría de las macromoléculas complejas que constituyen a las células de los organismos vivos. Las proteínas y los ácidos nucleicos son especialmente ricos en nitrógeno, razón por la cual no es sorprendente que las células posean vías metabólicas que les permiten asegurarse fuentes constantes de nitrógeno para crecer (79).

El estudio del metabolismo nitrogenado presentado por los microorganismos productores de metabolitos con interés industrial posee una gran importancia tanto en el aspecto aplicado como en el básico ya que por un lado, si tomamos en consideración que el factor principal para la producción de alguna sustancia es el microorganismo mismo, el conocimiento y manejo de los factores que influyen sobre su capacidad para sintetizar dicha sustancia constituyen una herramienta de gran valor para el establecimiento de las bases tecnológicas de su producción a gran escala; mientras que por otro lado, el estudio acerca de la fisiología de los sistemas biológicos es interesante por sí mismo (34).

Estudios realizados por varios grupos de investigación han indicado que la producción de metabolitos con interés industrial se ve afectada por la concentración de nitrógeno en el medio de

cultivo (5).

La producción de estreptomicina por S. griseus es alta al utilizar como fuente de nitrógeno a la harina de soya. Por otra parte, al crecer S. niveus en un medio químicamente definido que contiene prolina y sulfato de amonio, la producción de novobiocina ocurre una vez que los iones de amonio han sido consumidos. Al incrementar la concentración de amonio, la producción del antibiótico se reduce un 90%, mientras que al substituir el sulfato de amonio por altas concentraciones de prolina, la producción de novobiocina es mayor (5).

En cuanto a la producción de gramicidina S por B. brevis, se requiere una combinación de cinco aminoácidos para obtener un buen crecimiento; sin embargo, es necesaria la adición de fenilalanina para adquirir una buena producción del antibiótico (5).

La producción de actinomicina D por S. parvulus se ve afectada favorablemente al adicionar al medio de cultivo algunos aminoácidos como fuente de nitrógeno. La combinación de histidina y ácido glutámico permitió una excelente producción de actinomicina D. Fuentes inorgánicas de nitrógeno tales como nitratos, nitritos y algunas sales de amonio redujeron la producción del antibiótico.

La producción de cefalosporina por S. clavuligerus se ve aumentada al suplementar el medio de cultivo con ciertos aminoácidos o urea (5).

Los efectos que poseen las moléculas nitrogenadas sobre

la producción de metabolitos con interés industrial pueden dividirse en dos: control negativo y control positivo (44).

Control negativo

Los tipos de control negativo ejercidos por los metabolitos nitrogenados pueden dividirse en dos:

- 1.- Efectos inhibitorios causados por un solo aminoácido sobre la producción y transporte de precursores del metabolito de interés.
- 2.- Efectos mediados por los mecanismos de la regulación nitrogenada en general.

Algunos ejemplos acerca del efecto negativo que presentan ciertos aminoácidos sobre la producción de compuestos precursores en la síntesis de algunos antibióticos, son los conocidos casos acerca de las interacciones inhibitorias efectuadas por la lisina y el triptofano sobre la síntesis de penicilina y can_udicidina respectivamente. Estos efectos retrorreguladores son ejercidos sobre la síntesis de los intermediarios de los antibióticos mencionados anteriormente; los ácidos α aminoadípico y p - aminobenzóico respectivamente. Pueden interpretarse de manera similar a estos ejemplos los efectos negativos ejercidos por el triptofano y la cisteína sobre la formación de actinomicina y estreptotricina respectivamente.

La inhibición producida por un aminoácido determinado

puede ser eliminada al seleccionar mutantes resistentes a análogos de dicho aminoácido, tal como ha sido el caso de la producción de candicidina por S. griseus (44).

Otra forma por medio de la cual los aminoácidos pueden ejercer un efecto negativo sobre la producción de algunos metabolitos de interés comercial se basa en los efectos de dichos aminoácidos sobre el transporte de los compuestos precursores del metabolito de interés. En C. acremonium, por ejemplo, la inhibición de la producción de cefalosporina ejercida por la cistefina puede deberse a la inhibición de la entrada de metionina la cual, a su vez, estimula la formación del antibiótico (95).

El hecho de que la regulación nitrogenada juegue un papel en la biosíntesis de los antibióticos ha sido enfatizada por los estudios de Aharonowitz y Demain (4), quienes demostraron que el amonio en altas concentraciones interfiere con la formación de cefalosporina en Streptomyces clavuligerus. El efecto negativo ejercido por el amonio se expresa cuando éste es adicionado a tiempos tempranos del crecimiento de los microorganismos; es decir, no se observa el efecto de inhibición por amonio cuando el antibiótico ya ha comenzado a producirse. En base a esta observación, se ha deducido que la inhibición de la biosíntesis de cefalosporina ejercida por el amonio no se debe a la inhibición de la actividad de las antibiótico - sintetetasas, si-

no que se encuentra afectando algún proceso que ocurre más tempranamente, como por ejemplo, la formación de las antibiótico sintetasas o algún otro paso metabólico requerido para aumentar la producción (30).

Al unir varios reportes aislados en la literatura, ha surgido una observación, la cual propone que altas concentraciones de amonio o de ciertos aminoácidos pueden reprimir la síntesis de algunos antibióticos, entre los que se encuentran rifampicina (59), cloranfenicol (143), actinomicina (30) y leucomicina (96).

Es posible que el efecto negativo ejercido por el amonio y algunos de sus productos sobre la formación de ciertos antibióticos, sea el mismo fenómeno de represión catabólica nitrogenada que se ha reportado como controlador de ciertas vías metabólicas tales como el catabolismo de purinas, arginina, higtidina, transporte de urea y síntesis de nitrato reductasa en algunos microorganismos (5).

El mecanismo por el cual opera la represión catabólica nitrogenada no se conoce detalladamente; sin embargo, se ha propuesto que en Neurospora, la glutamina es el metabolito efector de dicho fenómeno (79), en base al estudio del efecto de varios metabolitos nitrogenados sobre la inducción de la enzima nitrato reductasa. El amonio por sí solo resultó ser inefectivo como un metabolito represor ya que al adicionar dicho compuesto a mutantes am (las cuales carecen de glutamato deshidrogenasa, enzima catalizadora de la formación de ácido glutámico a partir de a-

monio), no causó represión sobre la nitrato reductasa; sin embargo, la adición de amonio y ácido glutámico a esta clase de mutante sí ocasionó la represión de nitrato reductasa. En forma similar, en mutantes gln (las cuales carecen de glutamino sintetasa, enzima catalizadora de la formación de glutamina a partir del ácido glutámico), la adición de amonio o glutamato, no ejerce su efecto represor sobre la nitrato reductasa, mientras que la adición de glutamina sí ocasiona la represión de la síntesis de la nitrato reductasa. Adicionalmente, el efecto represor de la glutamina sí puede observarse en mutantes incapaces de metabolizar a dicho aminoácido por lo tanto, no se requiere del metabolismo de glutamina para la represión de la enzima nitrato reductasa (79). Algunos compuestos nitrogenados tales como el amonio, el ácido glutámico y otros aminoácidos pueden ser convertidos a glutamina y así, en forma indirecta reprimir la síntesis de las enzimas reguladas por el fenómeno de represión catabólica nitrogenada. La glutamina ejerce su efecto a nivel transcripcional ya que su adición previene la acumulación del RNA mensajero de las enzimas nitrato reductasa y uricasa (79).

A pesar de la gran cantidad de estudios que se han realizado con el fin de entender el mecanismo por el cual opera la represión catabólica nitrogenada, se desconoce la acción de genes adicionales que pudieran estar involucrados en este tipo de regulación. Se ha establecido que en Neurospora crassa y en Aspergillus nidulans el producto de los genes nit - 2 y areA res

pectivamente, poseen efectos positivos sobre las enzimas reguladas por el fenómeno de represión catabólica nitrogenada (79). Uno de los mecanismos propuestos para la represión catabólica nitrogenada en N. crassa sugiere que la glutamina es un metabolito represor que interactúa con el producto génico de nit - 2, convirtiéndolo a una forma inactiva. De acuerdo a este punto de vista, al disminuir la concentración de glutamina, el producto génico de nit - 2 asume una conformación activa y se une a sitios de reconocimiento adyacentes a los genes estructurales de las enzimas reguladas por el fenómeno de la represión catabólica nitrogenada, permitiendo en esta forma, su expresión (79).

Recientemente, se ha propuesto un nuevo modelo acerca del mecanismo de acción de la represión nitrogenada. En base a la obtención de dos tipos de mutantes de N. crassa denominadas nmr - 1 y ms - 5, las cuales son insensibles a la represión nitrogenada mediada por glutamina con respecto a la producción de la desaminasa extracelular. El modelo postula que el gene nit - 2 codifica un efector positivo responsable de la expresión de los genes regulados por la represión nitrogenada y que la glutamina no es capaz de ejercer su efecto represor en ausencia de los productos génicos nmr - 1 o ms - 5 funcionales. En vista de que las mutaciones nmr - 1 y ms - 5 parecen ser alelos de un solo gene, el modelo se desarrollaría de la siguiente manera:

Existe un gene denominado nmr - 1 el cual, codifica una

proteína que al combinarse con la glutamina, reprime la transcripción del gene nit - 2. En ausencia del producto nit - 2, los genes estructurales sujetos a su control, no se transcriben. La alteración del gene nmr - 1 por alguna mutación podría estar afectando su habilidad de prevenir la transcripción del gene nit - 2 y por lo tanto, perdería su acción como agente represor de la regulación catabólica nitrogenada. Sin embargo, se requiere de mayor experimentación para aclarar los mecanismos por los cuales actúa el fenómeno de represión nitrogenada. (144)

Control positivo

Se ha reportado que ciertos aminoácidos pueden ejercer efectos estimulatorios sobre la producción de metabolitos con interés comercial. Sin embargo, ha sido difícil elucidar la naturaleza de los efectos estimulatorios presentados por los aminoácidos.

Generalmente, los aminoácidos con acción inductora deben ser agregados durante la fase temprana de crecimiento para que puedan ejercer su efecto estimulador. Este hecho sugiere que los aminoácidos pueden ser capaces de provocar la selección de ciertos programas metabólicos alternativos del desarrollo celular. Un ejemplo de inducción ejercida por un aminoácido precursor, es la producción de alcaloides estimulada por el triptofano (68).

Algunos aminoácidos o compuestos nitrogenados parecen ser

estimuladores de la producción de algún metabolito de interés industrial debido a su acción como activadores de la diferenciación más que a su papel como precursores. Cabe citar como ejemplos el efecto de la metionina sobre la producción de cefalosporina y del bencil tiocianato en la formación de clortetraciclina y parvamicina en Streptomyces alboniger (44).

Los estudios realizados por Gräfe y colaboradores (43), han revelado que el ácido antranílico (OABA), sin ser precursor de la síntesis de estreptotricina, estimula la producción de dicho antibiótico. El efecto del OABA reside en la disminución del nivel de la citocromo oxidasa a, ocasionando una restricción en la desaminación oxidativa y en consecuencia, una mayor disponibilidad de aminoácidos precursores en la formación del antibiótico.

Por otra parte, se ha encontrado que la adición de amonio en altas concentraciones a cultivos de S. griseus y de S. rosa nonotensis 3966, productores de estreptomícina (145) y de nanaomicina (146) respectivamente, incrementa la producción de dichos antibióticos. Sin embargo, se desconocen hasta este momento las bases de la estimulación ocasionada por el amonio; es posible que dicha activación en la producción de los antibióticos se deba a mecanismos de inducción por parte de algún aminoácido formado a partir del amonio como ocurre en el caso de la producción de alcaloides mencionada anteriormente. Sería necesario realizar más experimentos con el fin de elucidar la natu

raleza del efecto positivo ejercido por el amonio en los ejemplos citados.

En base a los ejemplos anteriores, es posible concluir que la sobreproducción de ciertos aminoácidos precursores o estimuladores puede mejorar la producción de algunos metabolitos que presentan interés comercial. Muchos microorganismos utilizados industrialmente presentan errores en su metabolismo, los cuales favorecen la producción excesiva de aminoácidos estimuladores (44).

El desarrollo de estrategias que hagan uso racional de la genética podrá ser de gran utilidad para el mejoramiento de la producción mediada por microorganismos, de sustancias que presenten interés industrial (44).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El conocimiento y manejo de los factores que influyen sobre la capacidad de los microorganismos para producir sustancias de interés comercial constituye una herramienta de gran valor para el establecimiento de las bases tecnológicas de la producción a gran escala o bien, del mejoramiento de los procesos ya existentes.

El glutatión es un tripéptido que posee muchas funciones dentro de los organismos vivos, además de servir como agente terapéutico para curar algunos trastornos del funcionamiento hepático.

La observación realizada por Kaszab y colaboradores (61) con respecto a la gran similitud existente entre la estructura química del dipéptido precursor de la biosíntesis de penicilina y el dipéptido inicial de la biosíntesis de glutatión, que lo llevó a postular la hipótesis de que ambos dipéptidos pudieran ser sintetizados por la misma enzima, ha despertado el interés de nuestro grupo de trabajo con respecto al estudio de la regulación de la formación tanto del glutatión como de la penicilina.

En estudios realizados previamente en nuestro laboratorio

(136), se midieron las concentraciones de glutatión presentes en el hongo Penicillium chrysogenum tanto en esporas como a diferentes tiempos de cultivo. Sin embargo, dichos estudios cubrieron solamente el intervalo de tiempo situado entre las 12 y las 72 horas de cultivo. En vista de que en esos estudios, la concentración de glutatión contenida en las esporas era aproximadamente la misma que la encontrada a las 12 horas de cultivo y, a partir de este punto, la concentración del tripéptido comenzaba a disminuir a medida que avanzaba el tiempo de cultivo, decidimos medir las concentraciones de glutatión a tiempos cortos de cultivo; es decir, entre las cero y las doce horas para saber si el glutatión contenido originalmente en las esporas se degrada y resintetiza inmediatamente al poner las esporas en contacto con el medio de cultivo o, se comienza a degradar el tripéptido a partir de las 12 horas de cultivo.

Al unir los resultados del experimento mencionado anteriormente con los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio, logramos obtener un panorama completo acerca de la producción de glutatión con respecto al tiempo de cultivo bajo condiciones estandarizadas de crecimiento.

En base a que la producción de algunas sustancias que presentan interés industrial, las cuales son elaboradas por ciertos microorganismos, se ve afectada por la concentración de amonio en el medio de cultivo, decidimos estudiar el efecto de diferen

tes concentraciones de amonio sobre la producción de glutatión, una vez establecido el perfil completo de producción bajo condiciones estandarizadas de cultivo.

OBJETIVO

En base a que la producción de algunas sustancias que presentan interés industrial, las cuales son elaboradas por microorganismos, se ve afectada por las concentraciones de amonio presentes en el medio de cultivo y, a la importancia tanto fisiológica como terapéutica que posee el glutati6n, decidimos estudiar el efecto de diferentes concentraciones de amonio sobre la formaci6n de dicho tripéptido en el hongo Penicillium chrysogenum.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

a.- Penicillium chrysogenum NRRL - 1951 *- Microorganismo empleado para el estudio de la producción de glutatión y penicilina.

b.- Sarcina lutea NRRL - B - 1018*- Cepa utilizada para la cuantificación de penicilina.

* Ambas cepas fueron proporcionadas por el Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Ill. U.S.A.

c.- Glutatión reductasa (extraída de levadura).- utilizada para la cuantificación de glutatión. Obtenida de Sigma Chemical Co.

REACTIVOS QUÍMICOS

El glutatión, ácido 5,5' ditio - bis - nitrobenzólico (DT₂NB) y β - NADPH (sal tetrasódica) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

MEDIOS DE ALMACENAMIENTO

El Penicillium chrysogenum se conservó en placas conteniendo un medio cuya composición por litro es la siguiente:

Peptona	10.0 g
Dextrosa	20.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Agar	15.0 g

La Sarcina lutea se conservó en placas conteniendo un medio cuya composición por litro es la siguiente:

Peptona	6.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Extracto de carne	1.5 g
Agar	15.0 g

MEDIO PARA CUANTIFICAR ANTIBIOTICO

La composición del medio empleado para la cuantificación de penicilina es el mismo que se utilizó para la conservación de la Sarcina lutea.

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

La mezcla de sales utilizada para los medios de cultivo del Penicillium chrysogenum se preparó de acuerdo a lo reportado por Jarvis y Johnson (57) pero diez veces más concentrada (10X). La concentración de sales por litro está representada en la tabla 3.

MEDIO DE PRODUCCION

La composición por litro del medio de producción de glutatión y penicilina es la siguiente:

Sales J.J. 10X	100.00 ml
Acido fenil acético	0.50 g
Cloruro de amonio	0.53 g
Acetato de sodio	3.20 g
Lactosa*	30.00 g
Glucosa*	10.00 g

*Esterilizadas por separado

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

En los casos en los cuales el microorganismo fue crecido en presencia de altas concentraciones de alguna sal de amonio, se disolvió la cantidad de amonio requerida según la ocasión

Fosfato Monobásico de Potasio	
KH_2PO_4	3.00 g/l
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g/l
Sulfato de Fierro Heptahidratado	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10 g/l
Sulfato de Cobre Pentahidratado	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.005 g/l
Sulfato de Zinc Heptahidratado	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02 g/l
Sulfato de Sodio	
Na_2SO_4	0.50 g/l
Sulfato de Manganeso Hidratado	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.02 g/l
Cloruro de Calcio Dihidratado	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 g/l

TABLA 3.- Concentración de sales por litro reportada por Jarvis y Johnson para el medio de producción del Penicillium chrysogenum.

en agua bidestilada y se le ajustó el pH antes de agregarse al medio de producción.

CULTIVO EN MEDIO DE PRODUCCION

Para inocular a los matraces, se preparó una suspensión de esporas del Penicillium chrysogenum cuya D.O. fue de 1.5 a 540 nm. Dicha suspensión se añadió al 2% (v/v) a matraces con capacidad de 125 ml conteniendo 25 ml de medio de producción.

Los matraces se incubaron a 29°C con agitación rotatoria a 165 revoluciones por minuto.

En cada experimento se emplearon dos matraces para cada tiempo de incubación y para cada condición analizada.

CUANTIFICACION DE CRECIMIENTO

La cuantificación del crecimiento se realizó mediante la medición de la proteína micelial formada a tiempos diferentes en cada una de las condiciones experimentales empleadas. Las determinaciones se hicieron de la siguiente manera:

Para cada condición se tomó 1 ml de muestra el cual se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos; el sedimento se re-suspendió en 1 ml de ácido tricloroacético al 5% (p/v) y se

sometió a homogeneización mecánica en un aparato modelo K45 de tri - R - Instruments a velocidad 2. Se agregó 1 ml adicional de ácido tricloroacético al vaso de homogeneización con el fin de recuperar la proteína residual. El homogeneizado se centrifugó durante 10 minutos a 7000 rpm, se eliminó el sobrenadante mediante succión con una pipeta Pasteur; el sedimento se resuspendió en 1 ml de hidróxido de sodio 0.4 N (p/v) del que se tomaron alícuotas de 200 μ l y se aforó a un mililitro con agua bidestilada para cuantificar proteína por el método de Lowry (75). Se utilizó como referencia una solución de albúmina sérica bovina.

CUANTIFICACION DE ANTIBIOTICO

En el sobrenadante de las muestras obtenidas correspondientes a los diferentes tiempos de cultivo, se determinó la concentración de penicilina mediante el método de difusión en agar con Sarcina lutea como microorganismo de prueba (10 ,73).

La curva patrón se realizó con soluciones de bencil - penicilina a diferentes concentraciones (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 5.0 μ g/ml).

CUANTIFICACION DE GLUTATION

a.- Intracelular.- El micelio que provenia de 25 ml de cada tiempo y condición estudiada se colectó por filtración a través de papel Whatman Número 2; el paquete se resuspendió en 5 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M, EDTA 0.005 M a pH 7.5 y se sometió a homogeneización. Se hirvió durante 10 minutos a baño María y se centrifugó varias veces a 7000 rpm hasta obtener un sobrenadante claro. La cuantificación del glutatión se efectuó en alícuotas de dicho sobrenadante.

b.- Extracelular.- El medio libre de micelio, que resultó de la primera filtración arriba mencionada, se hirvió a baño María durante 10 minutos y de allí se tomaron alícuotas para efectuar la medición del glutatión.

La medición del glutatión se efectuó por medio del método reportado por Orfanos y colaboradores (97), el cual se basa en la reducción dependiente de glutatión del ácido 5,5' - ditiobis 2 - nitrobenzóico catalizada por la enzima glutatión reductasa en presencia de NADPH.

El volumen de las alícuotas utilizadas en las mediciones de glutatión varió en función de la concentración de dicho compuesto en cada muestra. Es decir, el valor de densidad óptica de las muestras en la mezcla de reacción debía caer dentro de la porción lineal de la curva obtenida al graficar concentracio

nes conocidas de glutatión contra densidad óptica (Figura 10), en base a este criterio se agregó a la mezcla de reacción el volumen de sobrenadante requerido.

Nota: Las concentraciones volumétricas intra y extracelulares de glutatión se encuentran expresadas en $\mu\text{g/ml}$. El valor total de glutatión producido por matraz equivale a la suma de las concentraciones del tripéptido localizadas tanto intra como extracelularmente multiplicadas por un factor de 25.

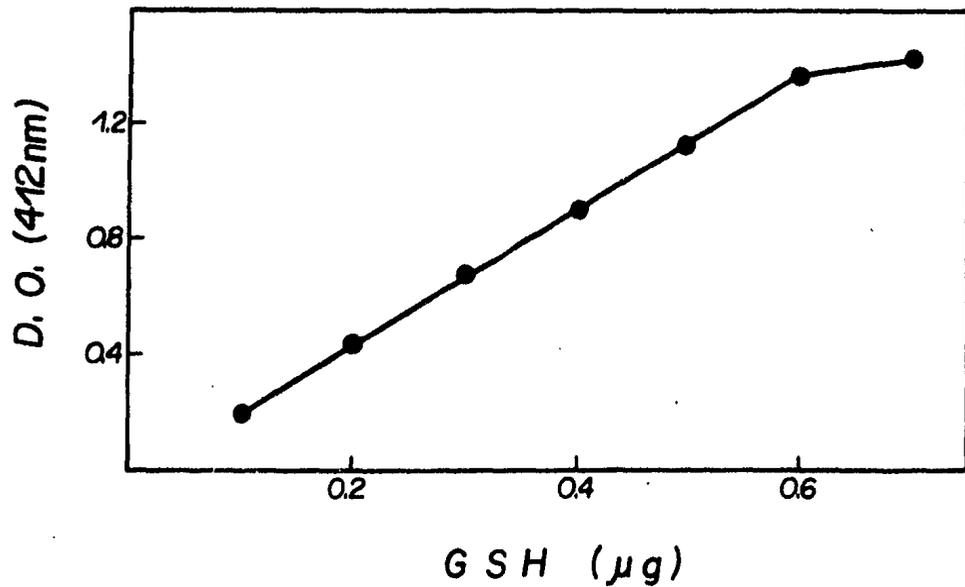


Figura 10.- Curva patrón de la concentración de glutatión contra densidad óptica obtenida por el método enzimático reportado por Orfanos y colaboradores.

RESULTADOS Y DISCUSION

En estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio (136), se midieron las concentraciones de glutatión presentes en el hongo Penicillium chrysogenum tanto en esporas, como a diferentes tiempos de cultivo. Sin embargo, dicho estudio cubrió solamente el intervalo de tiempo situado entre las 12 y las 72 horas de cultivo. En vista de que en esos estudios la concentración de glutatión contenida en las esporas era aproximadamente la misma que la encontrada a las 12 horas de cultivo y, a partir de ese punto, la concentración del tripéptido comienza a disminuir a medida que avanza el tiempo de cultivo, decidimos medir las concentraciones de glutatión a tiempos cortos de cultivo; es decir, entre las cero y las doce horas para saber si el glutatión contenido originalmente en las esporas se degrada y resintetiza inmediatamente al poner las esporas en contacto con el medio de cultivo o se comienza a degradar el tripéptido a partir de las 12 horas de cultivo.

Al cultivar al Penicillium chrysogenum, es posible detectar glutatión tanto dentro de las células que constituyen al micelio como en el medio de cultivo. Por esta razón, a lo largo de este trabajo, se grafican las concentraciones de glutatión tanto intra como extracelulares o bien, la suma de ambos.

En la figura 11 es posible apreciar que el glutatión proveniente de las esporas es utilizado o degradado inmediatamente al poner a las esporas en contacto con el medio de cultivo, ya que aún desde las 2 horas de cultivo, el tripéptido se encuentra a muy bajas concentraciones. Este resultado va de acuerdo con los datos observados por Meister y colaboradores (31), según los cuales, el recambio del glutatión es muy activo en mamíferos. Por otra parte, es posible observar en la figura 11 que la síntesis de glutatión se inicia aproximadamente entre las dos y las cinco horas de cultivo.

La suma de datos específicos concernientes al glutatión localizado intra y extracelularmente alcanza un máximo aproximadamente a las 24 horas de cultivo y baja posteriormente, como lo muestra la figura 12.

En base a que la producción de algunas sustancias que presentan interés industrial, las cuales son elaboradas por ciertos microorganismos, se ve afectada por la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, quisimos conocer el efecto del nitrógeno en el medio de cultivo sobre la formación del tripéptido. Por esta razón, una vez establecida la cinética de producción de glutatión en un medio de cultivo estandarizado, decidimos estudiar el perfil de formación de dicho tripéptido en presencia de diferentes concentraciones de amonio.

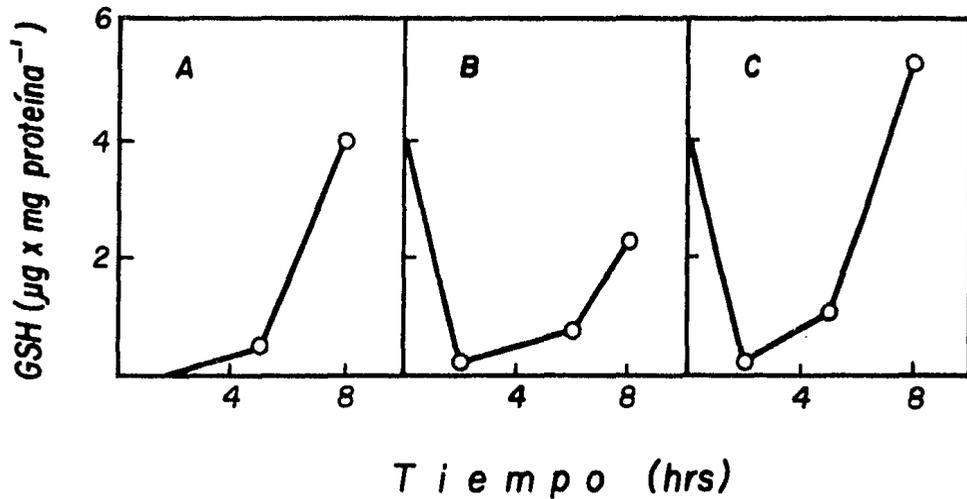


Figura 11.- Concentración específica de glutatión en células y en el medio de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM. A) extracelular B) intracelular C) suma.

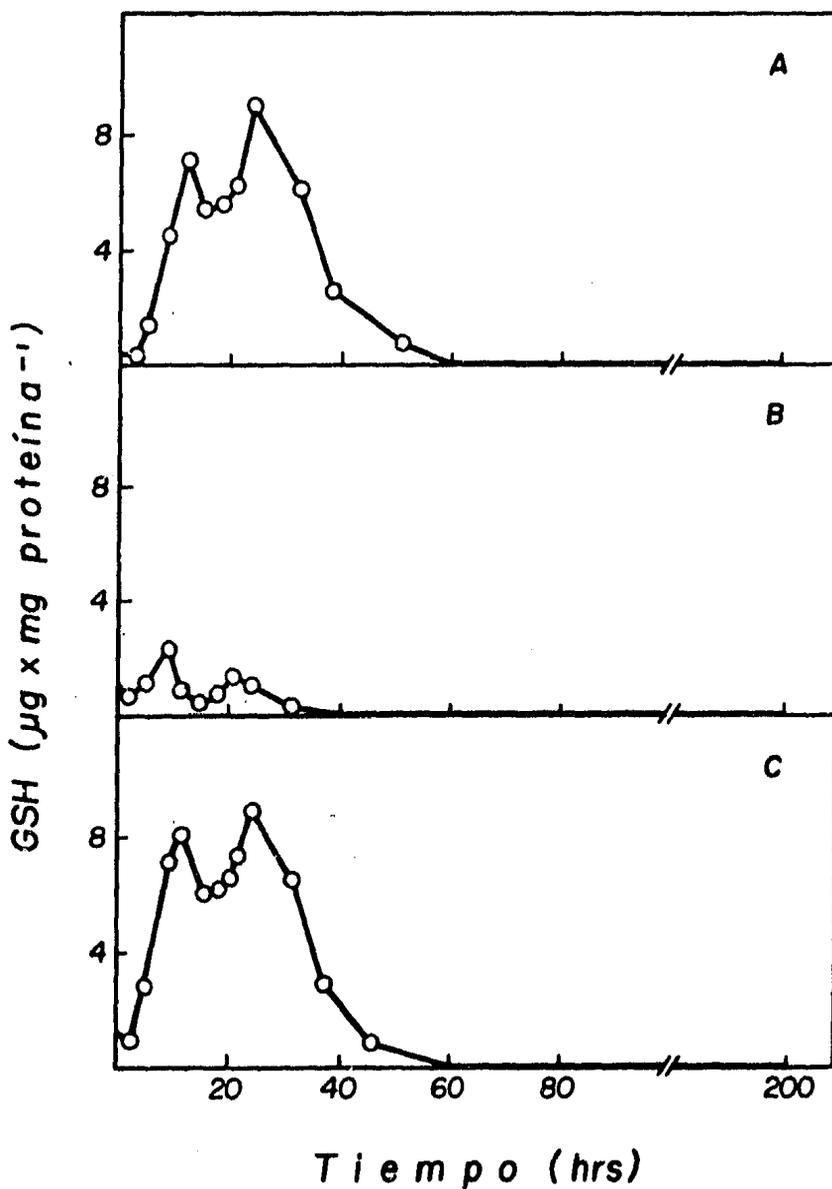


Figura 12.- Concentración específica de glutatión a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10 mM. A) extracelular, B) intracelular, C) suma.

Con el fin de conocer si existe alguna diferencia en cuanto a la cinética de la síntesis de glutatión entre cultivos que contienen altas o bajas concentraciones de amonio, decidimos realizar un experimento en el cual se midieron las concentraciones de glutatión tanto intra como extracelularmente, en presencia de altas y bajas concentraciones de amonio, a tiempos cortos de cultivo.

Como lo muestra la figura 13, el glutatión localizado en las esporas desaparece rápidamente y se comienza a sintetizar de nuevo a partir del intervalo comprendido entre las tres y las siete horas de cultivo aproximadamente, independientemente de la concentración de amonio presente en el medio de cultivo. El amonio en altas concentraciones retrasa ligeramente la formación de glutatión en comparación con la aparición de dicho tripéptido ocurrida en condiciones de cultivo en las cuales el amonio se encuentra en baja concentración. Sin embargo, los niveles de glutatión se igualan a las 9 horas de cultivo aproximadamente.

Con el fin de conocer los perfiles de glutatión producidos por el hongo P. chrysogenum a tiempos largos de cultivo (a partir de las 12 horas), en presencia de altas concentraciones de amonio, se realizó un experimento en el cual se creció al microorganismo en presencia de altas y bajas concentraciones de amonio (100 y 10mM respectivamente) y se midió el glutatión producido tanto intra como extracelularmente en ambas condiciones.

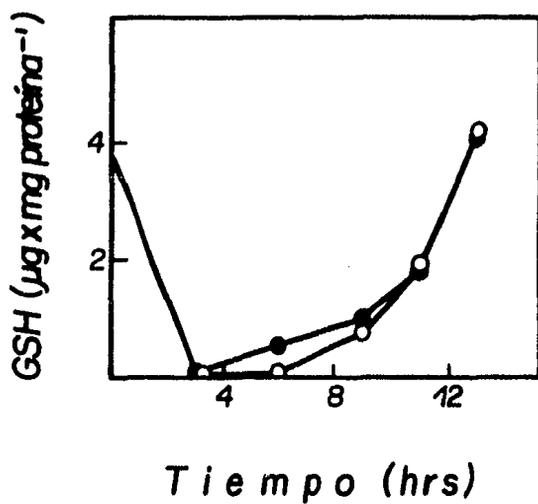


Figura 13.- Suma espec\u00edfica de glutati\u00f3n localizado intra y extracelularmente a tiempos cortos de cultivo y en esporas, en presencia de cloruro de amonio 10mM (●) y 100mM (○).

En la figura 14 es posible observar que el amonio en altas concentraciones (100mM), estimula la formación de glutatión a partir de las 24 horas de cultivo aproximadamente, en comparación con el cultivo que contiene bajas concentraciones de amonio (10mM) tanto dentro como fuera de las células. En vista de que el P. chrysogenum crece más cuando se cultiva en presencia de altas concentraciones de amonio (Figura 15), decidimos graficar los datos presentados en la figura 14 considerando las cantidades de protefna miceliar en cada punto, para descartar el hecho de que la mayor producción de glutatión presentada por los cultivos con altas concentraciones de amonio, se debiera a la existencia de más micelio produciendo dicho compuesto. En la figura 16 es posible apreciar que el cloruro de amonio en altas concentraciones incrementa la producción de glutatión a partir de las 24 horas de cultivo. Dicho incremento alcanza una magnitud de hasta 10 veces con respecto al cultivo donde el amonio se encuentra en baja concentración.

Para tener un panorama integral y más preciso de la evolución de las concentraciones de glutatión durante la incubación, realizamos un experimento en el cual se midieron los niveles de glutatión a intervalos cortos de tiempo abarcando de las 2 a las 60 horas de cultivo. Tal como lo muestran las figuras 17 y 18, es posible confirmar que a partir de las 24 horas de cultivo, la producción del tripéptido es mayor en presencia de altas concentraciones de amonio con respecto a la síntesis presentada con

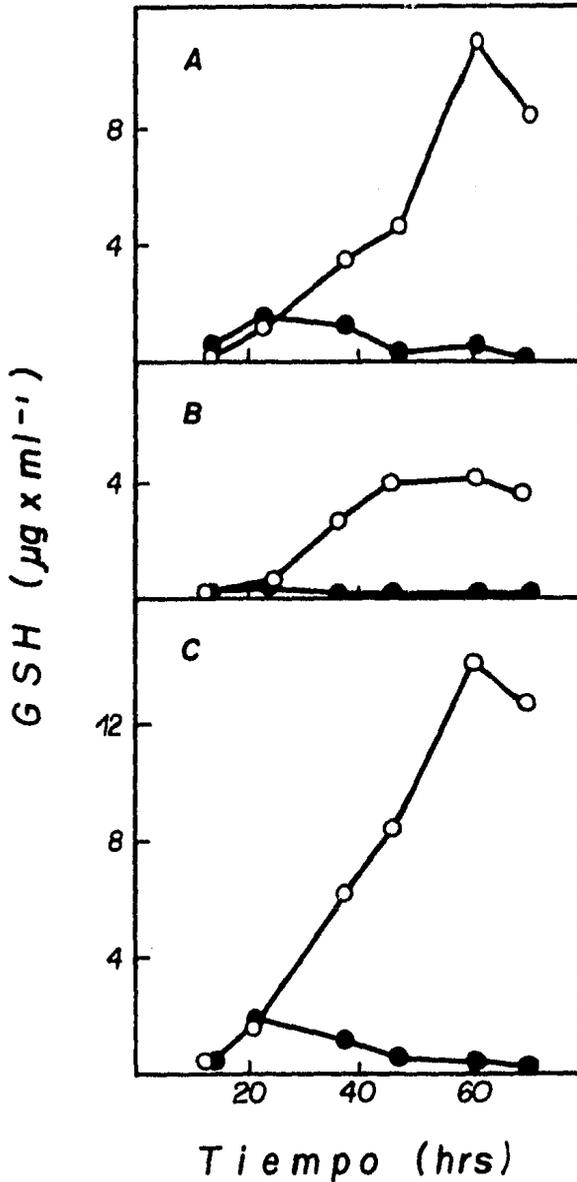


Figura 14.- Concentración volumétrica de glutatión a varios tiempos de cultivo en presencia de altas 100mM (O) y bajas 10mM (●) concentraciones de cloruro de amonio. A) extracelular B) intracelular C) suma.

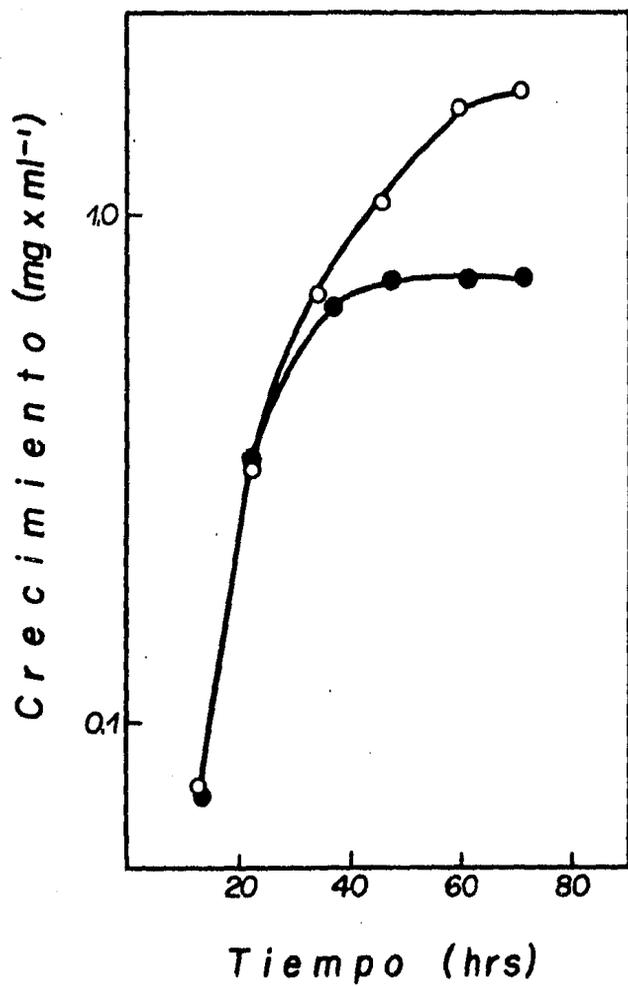


Figura 15.- Crecimiento del *P. chrysogenum* en presencia de altas 100mM (○) y bajas 10mM (●) concentraciones de cloruro de amonio.

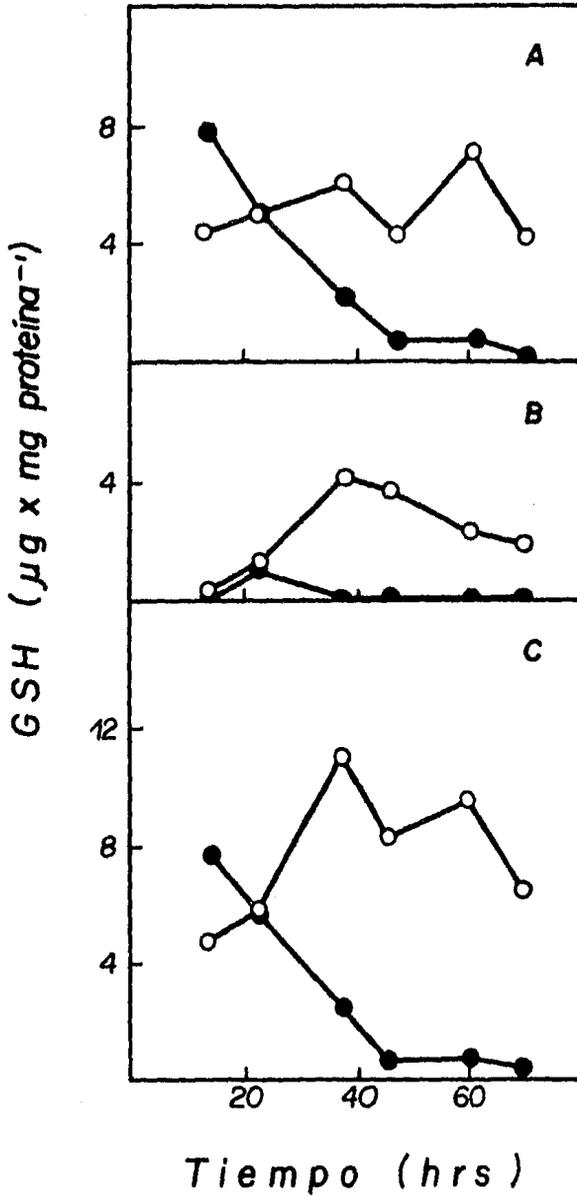


Figura 16.- Concentración específica de glutatión a diferentes tiempos de cultivo en presencia de altas 100mM (○) y bajas 10mM (●) concentraciones de cloruro de amonio. A) extracelular B) intracelular C) suma.

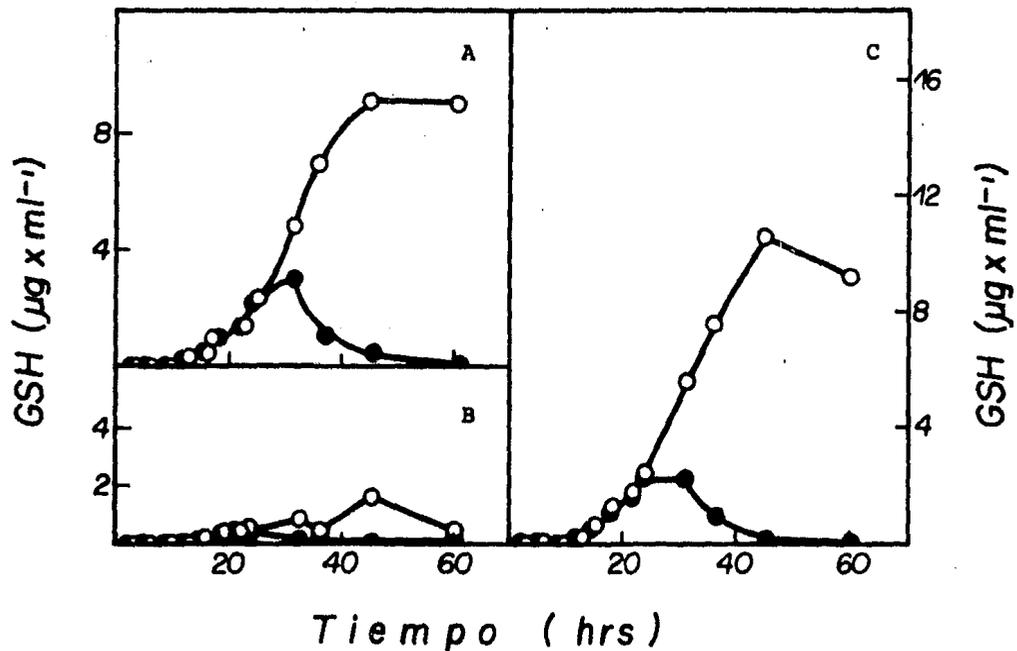


Figura 17.- Concentración volumétrica de glutatión a diferentes tiempos de cultivo en presencia de altas 100mM (o) y bajas 10mM (●) concentraciones de cloruro de amonio. A) extracelular B) intracelular C) suma.

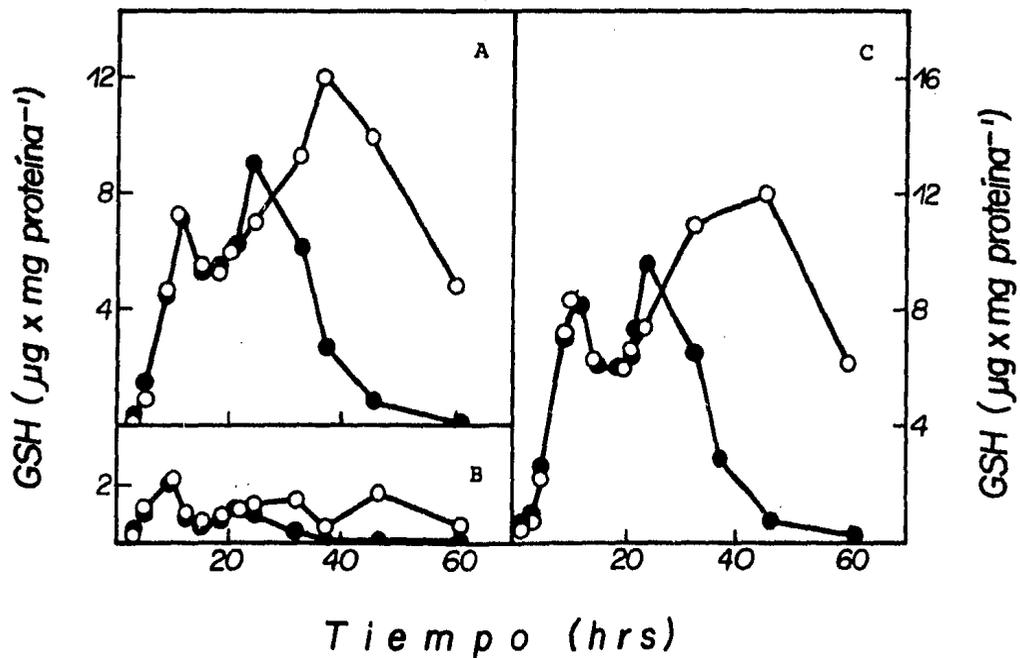


Figura 18.- Concentraci\u00f3n espec\u00edfica de glutati\u00f3n a diferentes tiempos de cultivo en presencia de altas 100mM (o) y bajas 10mM (●) concentraciones de cloruro de amonio. A) extracelular B) intracelular C) suma.

bajas concentraciones de dicho nutriente tanto intra como extra celularmente.

Para analizar si el incremento en la formación de glutatión depende de la concentración de amonio en el medio de cultivo, se utilizaron tres concentraciones de cloruro de amonio y se midió el glutatión producido en cada condición. Como se puede ver en la figura 19, el microorganismo crece más al estar en contacto con mayores concentraciones de amonio; asimismo, la producción específica y volumétrica de glutatión fue proporcional al amonio presente en el medio de cultivo es decir, a mayores concentraciones de amonio, se produce más glutatión que a menores concentraciones de dicho nutriente (Figuras 20, 21, 22).

Es posible por lo tanto concluir que el amonio en altas concentraciones ejerce un efecto estimulador sobre la síntesis de glutatión.

Con el fin de saber si el efecto positivo sobre la producción de glutatión anteriormente mencionada se debe al amonio y no específicamente al cloruro de amonio, realizamos varios experimentos en los cuales se cultivó al microorganismo en presencia de distintas sales de amonio en alta concentración y se midieron las concentraciones de glutatión producidas en cada condición. El crecimiento del hongo en presencia de sulfato, cloruro o nitrato de amonio en altas concentraciones (100mM)

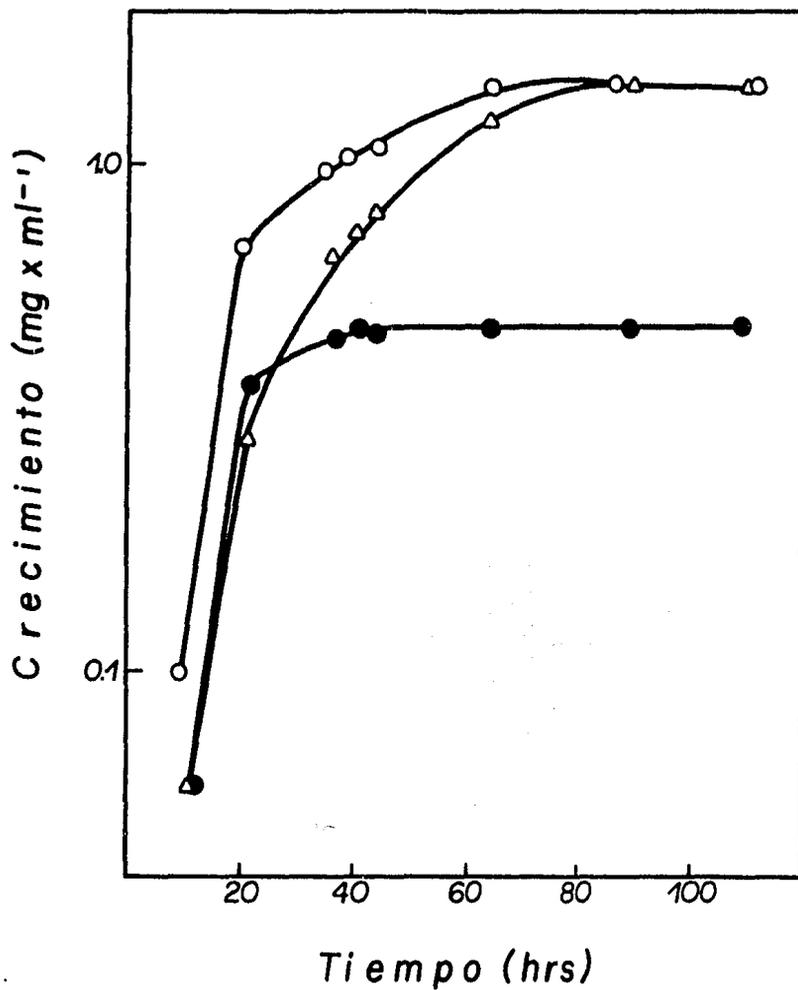


Figura 19.- Crecimiento del *P. chrysogenum* en presencia de cloruro de amonio 10mM (●), 50mM (▲) y 100mM (○).

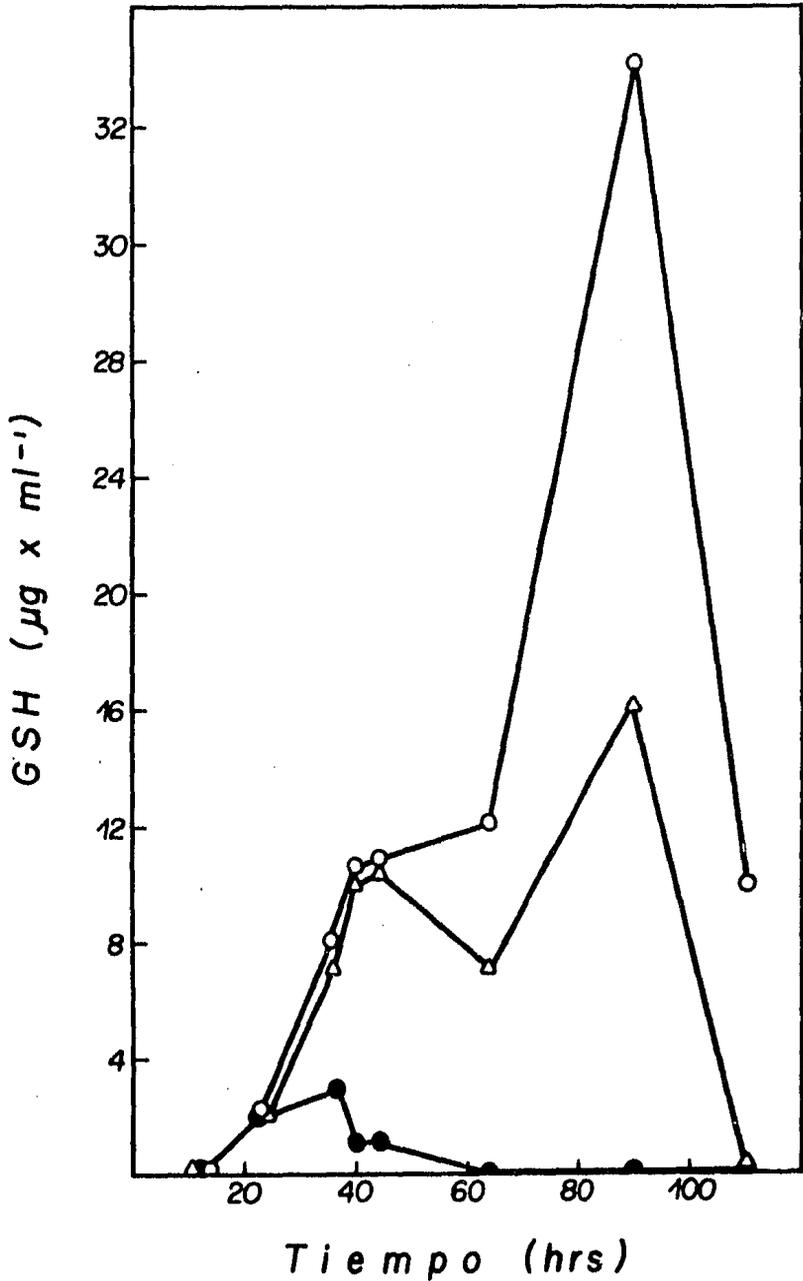


Figura 20.- Suma volumétrica del glutatión intra y extracelular producido a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●), 50mM (△) y 100mM (○).

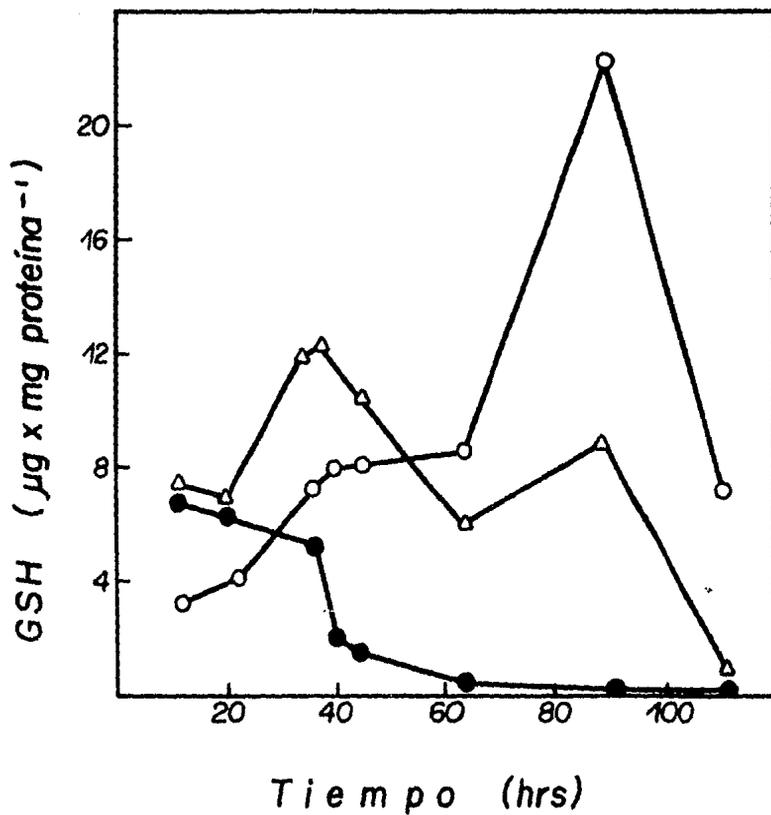


Figura 21.- Suma específica del glutatión intra y extracelular producido a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●), 50mM (Δ) y 100mM (○).

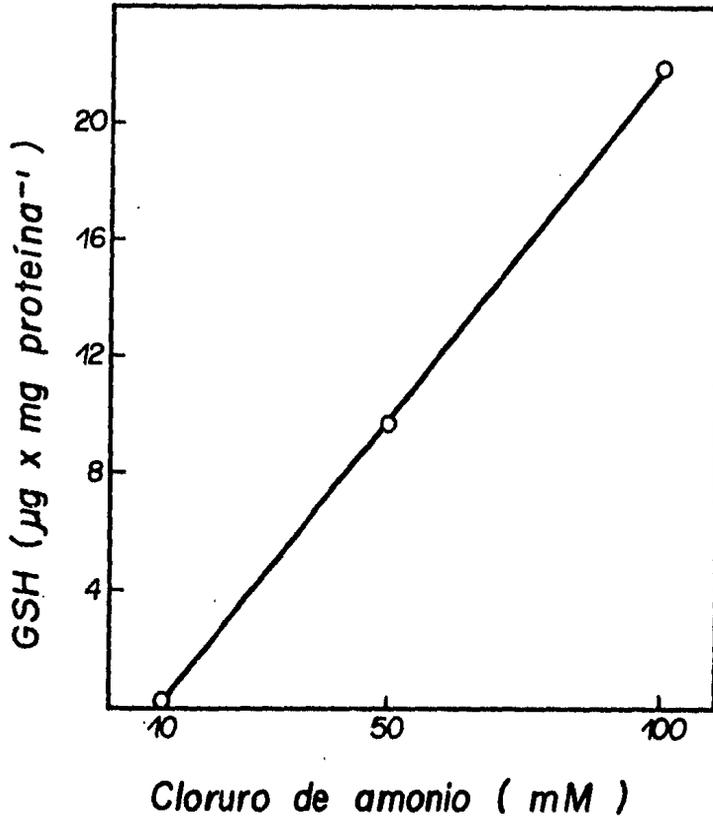


Figura 22.- Concentración de glutatión producida a las 90 horas de cultivo por el P. chrysogenum crecido en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de amonio.

fue mayor al presentado por el control (10mM cloruro de amonio) (Figura 23). Adicionalmente, tanto las producciones volumétricas como específicas de glutatión son francamente mayores en presencia de altas concentraciones de amonio en comparación con el control (Figuras 24 y 25). Por lo tanto, es posible concluir que el efecto positivo ejercido sobre la producción es debido específicamente a la presencia de altas concentraciones de amonio y no al tipo de sal con la cual éste se administre al medio de cultivo.

Es bien sabido que alteraciones en el pH del medio de cultivo pueden influir sobre la formación de sustancias producidas por los microorganismos (44, 64, 124). En los experimentos donde el microorganismo fue crecido en presencia de altas concentraciones de amonio, el pH bajó en comparación con el control (Figura 26). Decidimos entonces efectuar un ensayo en el cual se le ajustara el pH al medio de cultivo contenido en los matraces con altas concentraciones de amonio al nivel del control durante todo el experimento (Figura 27), y se midieron los niveles de glutatión, con el fin de elucidar si el efecto positivo sobre la producción de dicho compuesto se debe a la presencia de mayores concentraciones de amonio o a que el pH del medio de cultivo, al estar más bajo que el control, pudiera incrementar en alguna forma la producción de glutatión.

Como lo muestran las figuras 28 y 29, la producción de glu

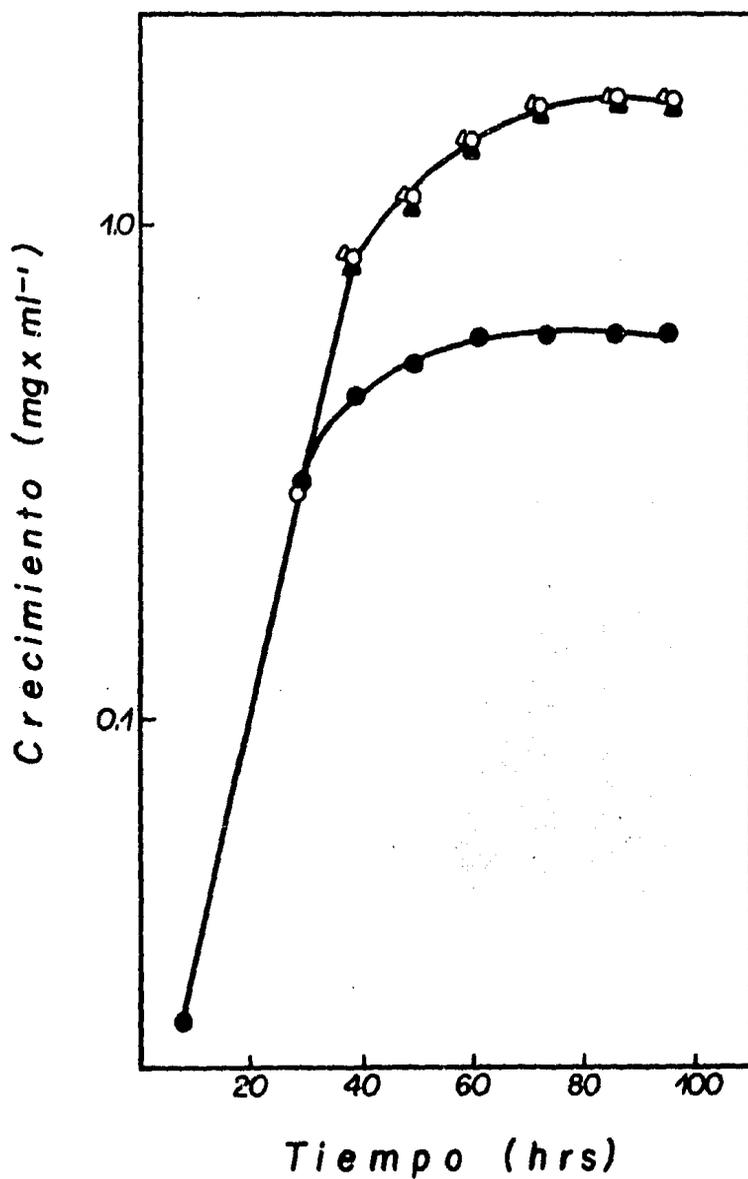


Figura 23.- Crecimiento en presencia de cloruro de amonio 10mM (●), cloruro de amonio 100mM (○), nitrato de amonio 100mM (▲) y sulfato de amonio 100mM (△).

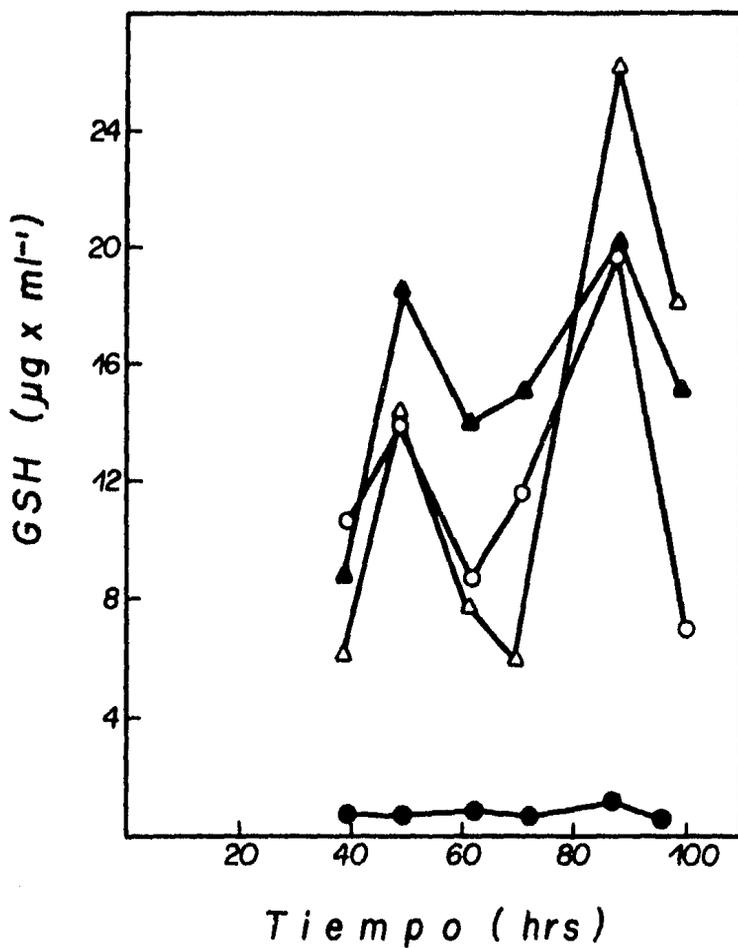


Figura 24.- Suma volumétrica de glutati6n intra y extracelular producida a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●), cloruro de amonio 100mM (○), nitrato de amonio 100mM (▲) y sulfato de amonio 100mM (△).

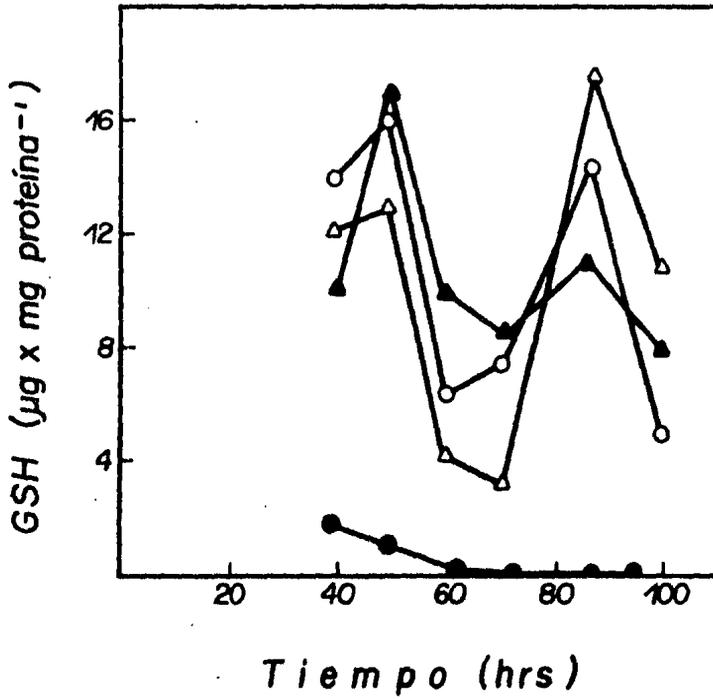


Figura 25.- Suma específica de glutatión intra y extracelular producido a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●), cloruro de amonio 100mM (○), nitrato de amonio 100mM (▲) y sulfato de amonio 100mM (△).

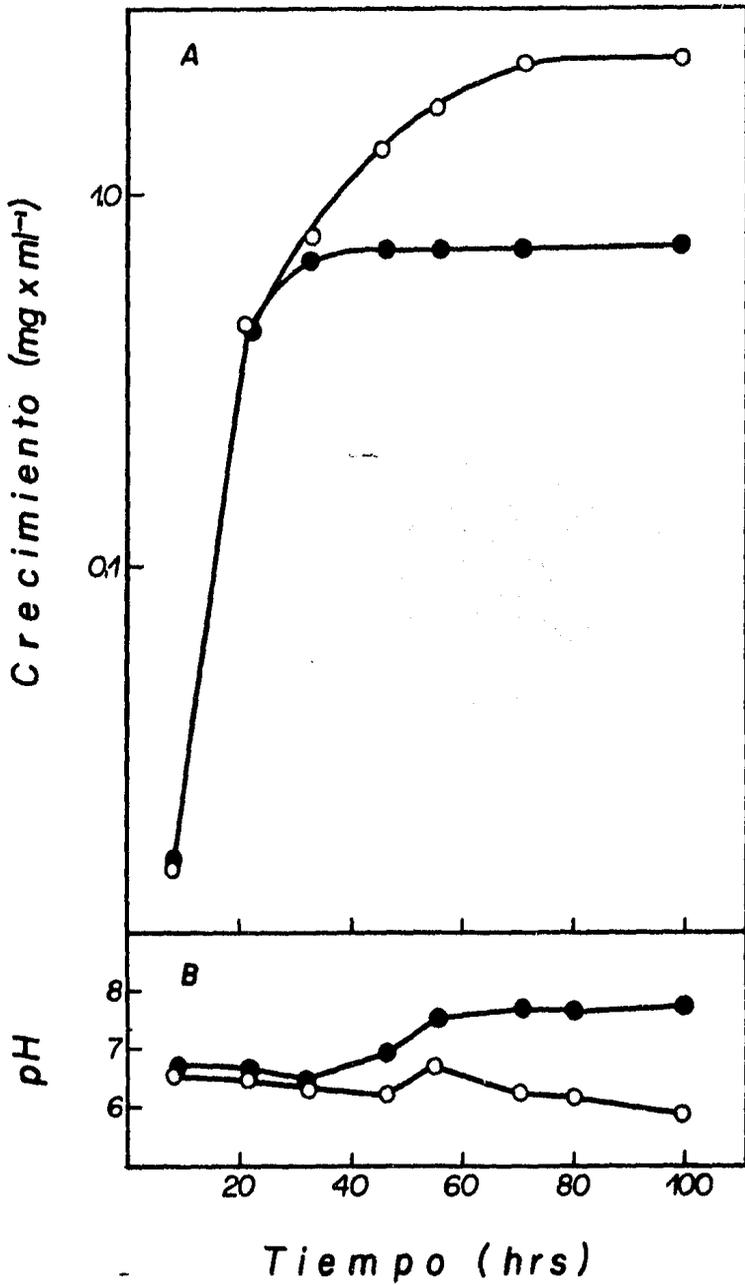


Figura 26.- A) Crecimiento y B) pH a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●) y 100mM (○).

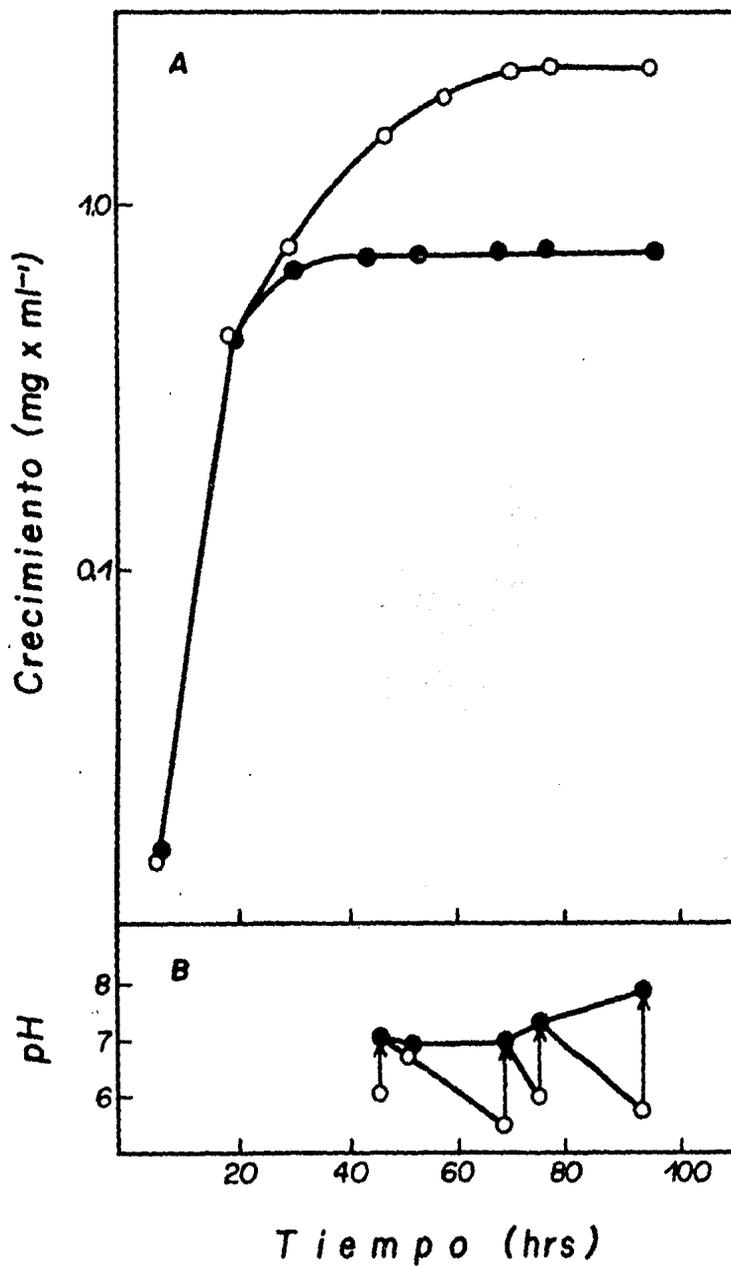


Figura 27.- A) Crecimiento y B) ajuste de pH a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●) y 100mM (○).

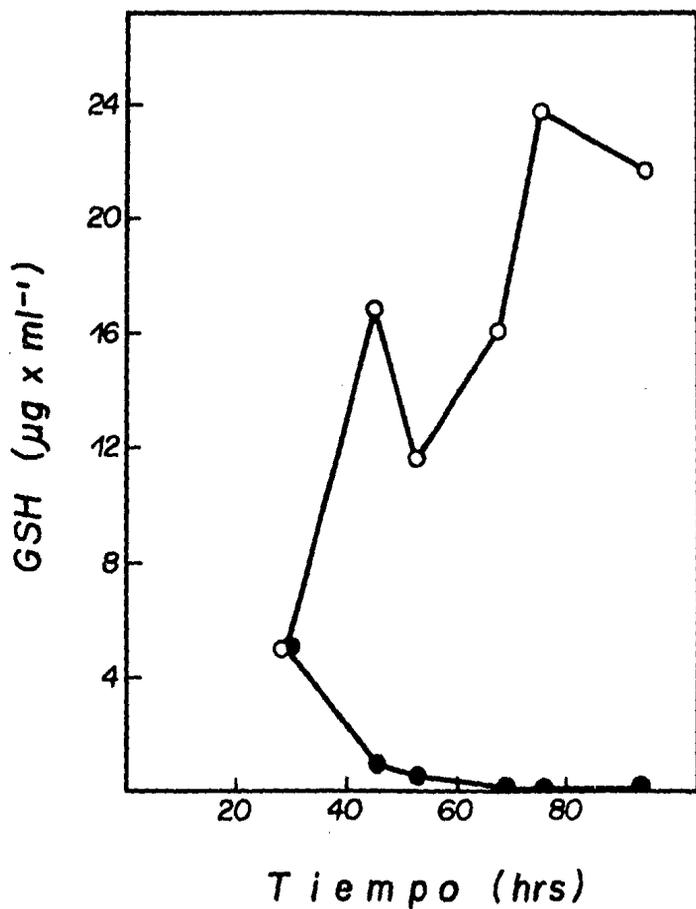


Figura 28.- Concentración volumétrica de glutatión a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●) y 100mM (○), ajustando el pH durante el cultivo.

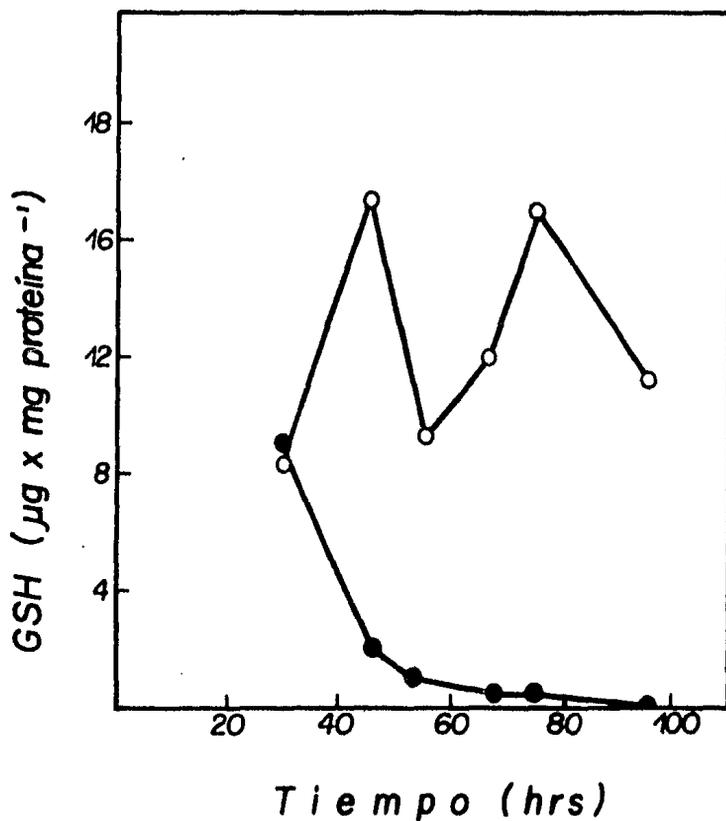


Figura 29.- Concentración específica de glutatión a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●) y 100mM (○), ajustando el pH del cultivo.

tación se incrementó en presencia de altas concentraciones de amonio y a un pH igual al control. Por lo tanto, es posible concluir que el efecto positivo sobre la producción de glutatión se debe a la presencia de altas concentraciones de amonio y no al cambio de pH ocasionado por la adición de dicho nutriente .

Penicilina

En base a la gran similitud existente entre la estructura química del dipéptido iniciador de la síntesis de penicilina y el dipéptido inicial de la biosíntesis de glutatión (Figura 30), Kaszab y colaboradores postularon que ambos dipéptidos podrían ser sintetizados por la misma enzima (61).

Al estudiar las propiedades catalíticas de la γ - glutamil cistefna sintetasa, purificada a partir de cristalino de bovino, se observó que el DL α - aminoácido puede ser sustrato de la enzima; aunque la actividad de la γ - glutamil - cistefna sintetasa con respecto a dicho sustrato fue de 1.3% (108). Al suponer que en microorganismos la especificidad por sustrato es menor que en organismos superiores, el grupo de Kaszab aisló la enzima a partir del hongo P. chrysogenum para estudiar sus propiedades y encontraron que la γ - glutamil - cistefna sintetasa es activa en presencia de DL aminoácido en un 70% al compararse con su actividad con respecto al ácido glutámico (61).

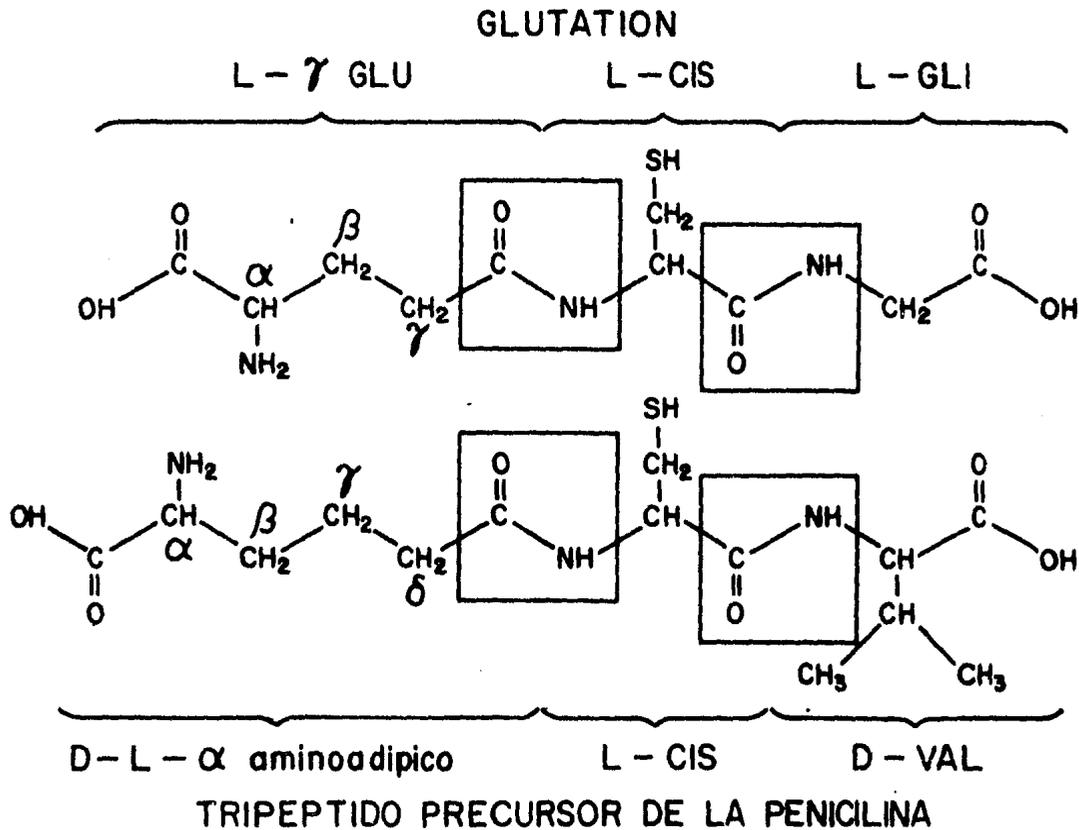


Figura 30.- Estructura química del glutati6n y del tripéptido precursor de la penicilina

Estudios realizados por Sánchez y colaboradores (136) confirmaron el hecho de que la enzima del P. chrysogenum es capaz de actuar en presencia de glutamato o de ácido α - aminoadípico, además de que la regulación en cuanto a la síntesis de ambos compuestos responde en forma parecida al efecto inductor del ácido glutámico (136).

Richman y Meister han encontrado que la γ - glutamil - cisteína sintetasa es inhibida por glutatión in vitro (115). A su vez, Sánchez y colaboradores observaron que el glutatión inhibe la síntesis del dipéptido L - α - aminoadípil - cisteína tanto in vitro como in vivo (80, 136).

Resumiendo los datos anteriores, se ha logrado obtener mayor evidencia de que la enzima γ - glutamil - cisteína sintetasa podría ser la responsable de la formación de los dipéptidos intermediarios en la síntesis de penicilina y glutatión.

En base a la hipótesis anterior, decidimos estudiar el efecto que ejercen altas concentraciones de amonio sobre la producción de penicilina. Se realizaron varios experimentos en los cuales se creció al P. chrysogenum en presencia de varias concentraciones de cloruro de amonio como fuente de nitrógeno.

Como lo muestran las figuras 31, 32A y 32B, cuando se administra el amonio al comienzo del cultivo a concentraciones mayores que el control (10mM), se retrasa el comienzo de la síntesis de penicilina y ésta se mantiene baja por un día aproximadamente. Sin embargo, la producción volumétrica y específica

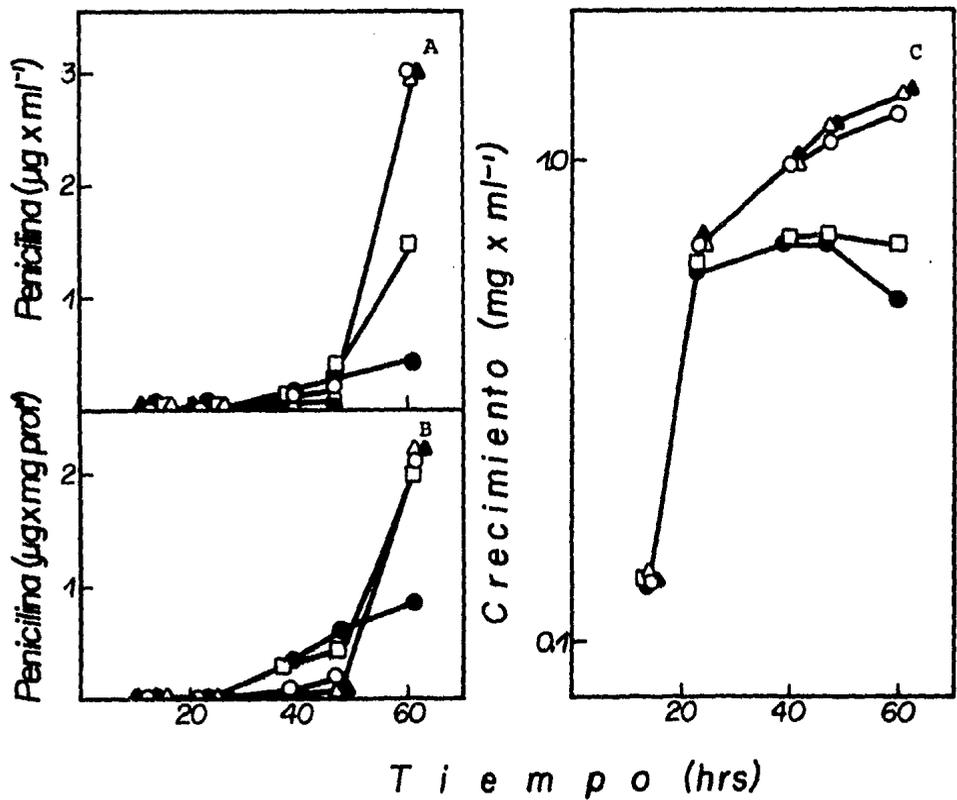


Figura 31.- Concentración de penicilina y crecimiento a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●), 25mM (◻), 50mM (○) 75mM (▲) y 100mM (△). A) producción volumétrica B) producción específica C) crecimiento.

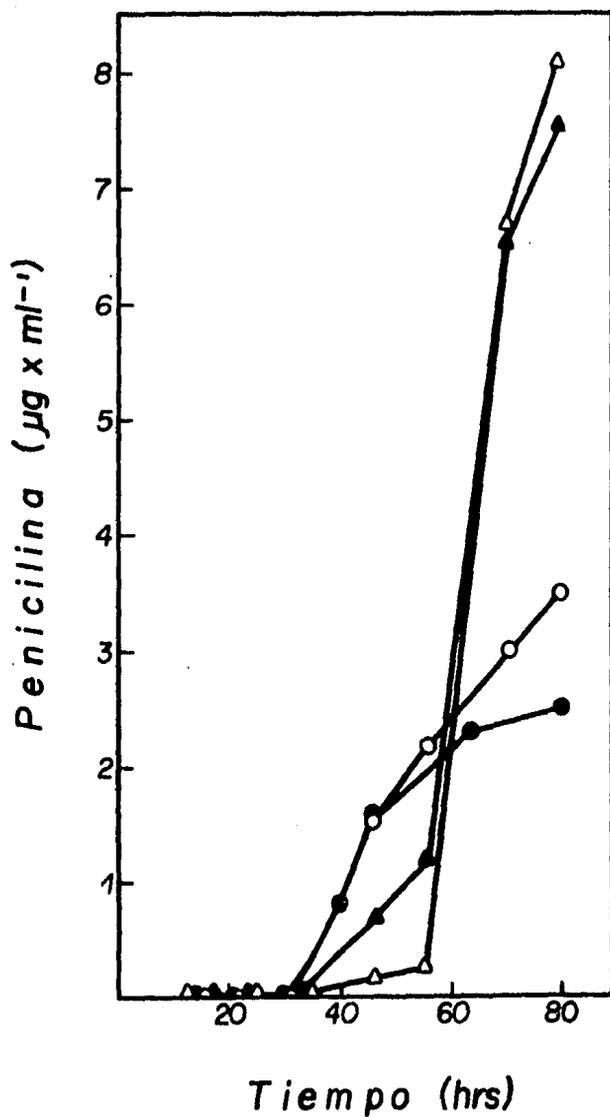


Figura 32A.- Concentración volumétrica de penicilina a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●), 25mM (○), 200mM (▲) y 300mM (△).

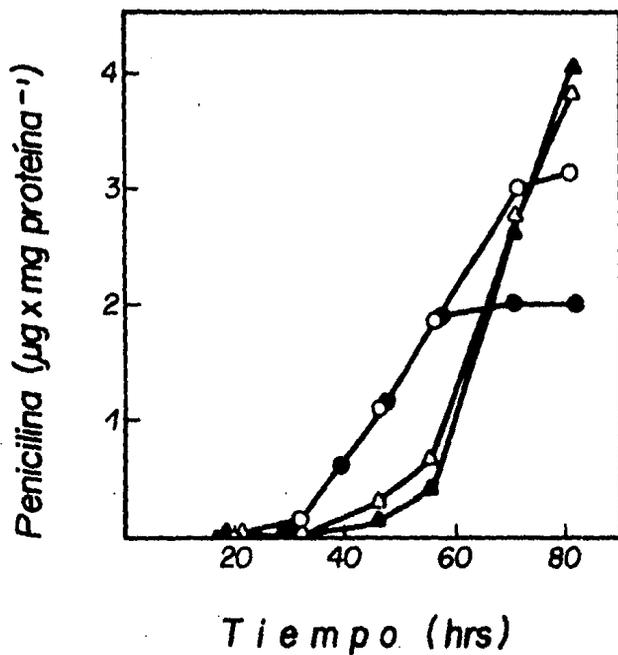


Figura 32B.- Concentración específica de penicilina a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●), 25mM (○), 200mM (▲) y 300mM (△).

ca del antibiótico se incrementa 3 veces aproximadamente después de ese día de retraso. El crecimiento del hongo en presencia de altas concentraciones de amonio es mayor con respecto al control (Figuras 31C y 32C). Esto podría sugerir una relación entre el comienzo de la fase estacionaria de crecimiento y la producción del antibiótico, ya que el cultivo crecido con altas concentraciones de amonio, llega más tarde a la fase estacionaria de crecimiento que el cultivo control.

En forma análoga a los experimentos realizados con respecto al glutatión, en los cuales se midió la producción de dicho tripeptido bajo condiciones controladas de pH en el medio de cultivo y en presencia de otras sales de amonio, realizamos varios experimentos con la finalidad de esclarecer si el incremento en la producción de penicilina ocasionado al adicionar cloruro de amonio en altas concentraciones al medio de incubación es debido al amonio por sí solo y no al tipo de sal con la cual dicho compuesto se administra, o al cambio de pH ocasionado en el medio de cultivo.

Al analizar las figuras 33 y 34, es posible observar que el efecto positivo ejercido sobre la producción de penicilina es debido específicamente a la presencia de altas concentraciones de amonio y no al tipo de sal con la cual éste se administra al medio de incubación.

Observando la gráfica 35, es posible concluir que el e-

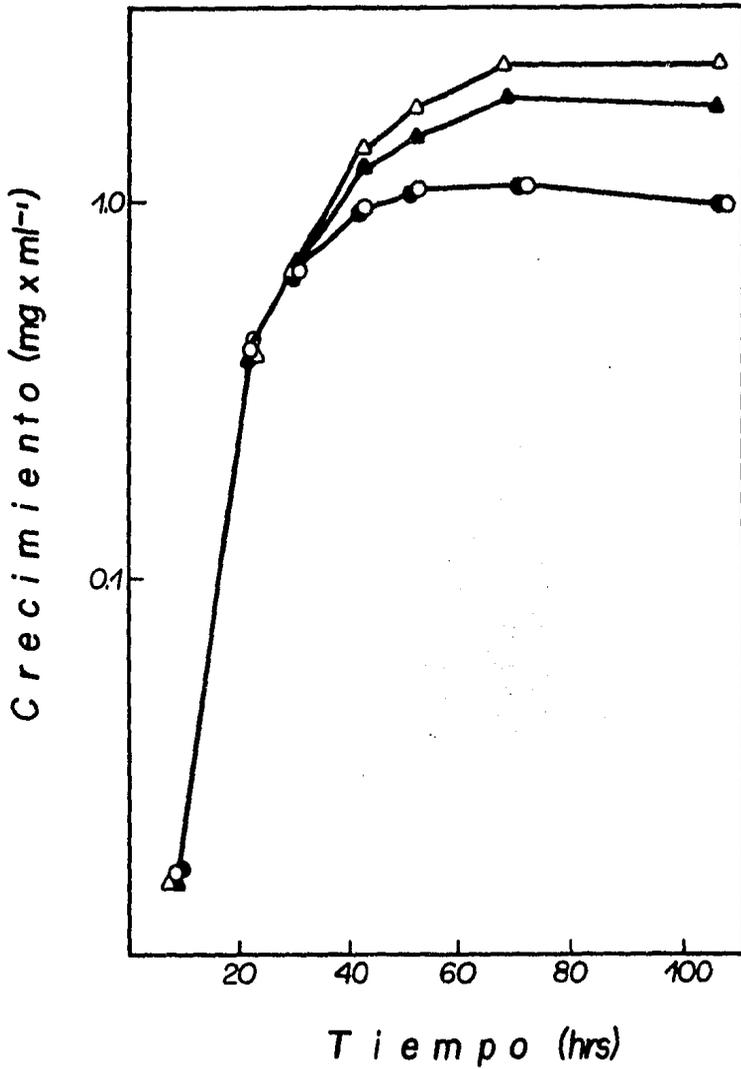


Figura 32C.- Crecimiento a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●), 25mM (○), 200mM (▲) y 300mM (Δ).

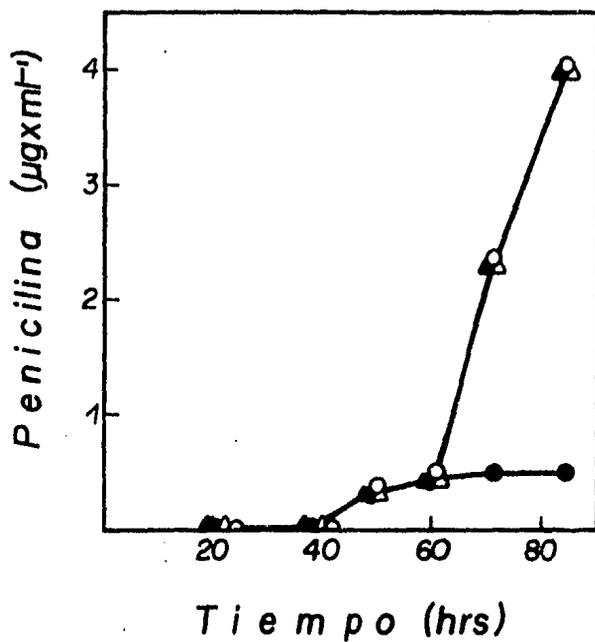


Figura 33.- Concentración volumétrica de penicilina a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●), cloruro de amonio 100mM (○), nitrato de amonio 100mM (▲) y sulfato de amonio 100mM (△).

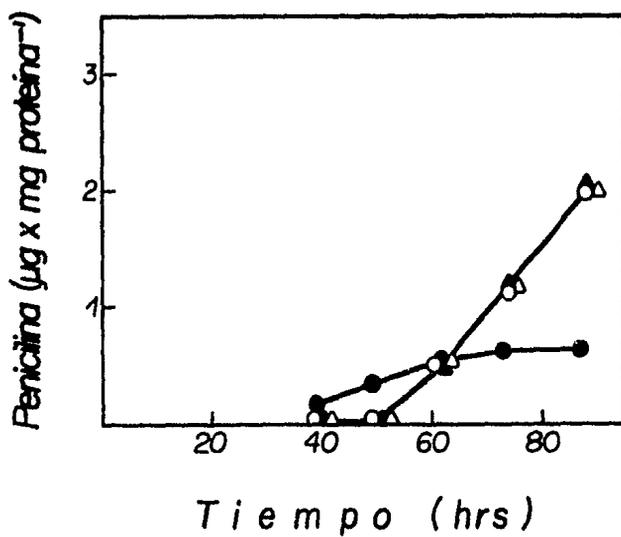


Figura. 34.- Concentración específica de penicilina a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●), cloruro de amonio 100mM (○), nitrato de amonio 100mM (▲) y sulfato de amonio 100mM (△).

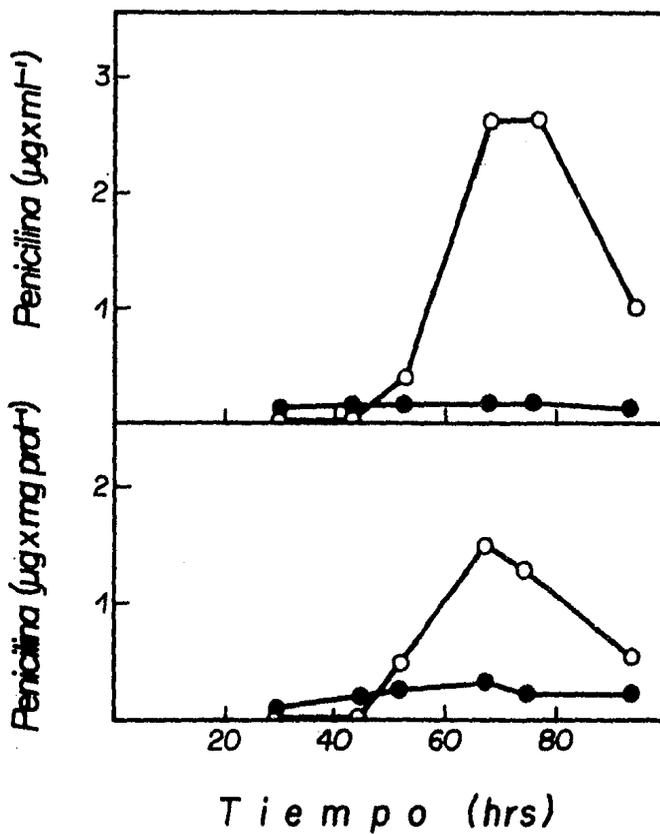


Figura 35.- Concentración A) volumétrica y B) específica de penicilina a diferentes tiempos de cultivo en presencia de cloruro de amonio 10mM (●) y 100mM (○), ajustándole el pH al medio de cultivo.

fecto positivo ejercido por altas concentraciones de amonio es debido a dicho compuesto por sí solo y no se relaciona con el cambio de pH producido por su adición al medio de cultivo.

En base a los experimentos mencionados hasta el momento, es posible concluir que el amonio en altas concentraciones ejerce un efecto estimulador tanto sobre la síntesis de penicilina como sobre la de glutatión.

Durante el desarrollo de este trabajo experimental hemos observado que el comienzo de la producción de penicilina no ocurre siempre al mismo tiempo de cultivo y que el aumento presentado por altas concentraciones de amonio sobre la producción del antibiótico se retrasa o no se presenta (Figura 36).

En busca de una posible explicación para estos datos, decidimos correlacionar el tiempo en que se establece la fase estacionaria de crecimiento con el inicio de la síntesis de penicilina y con el incremento ocasionado por altas concentraciones de amonio en varios experimentos.

Un resumen de los resultados que se han obtenido hasta ahora indica que el comienzo de la producción de penicilina ocurre ciertas horas antes del establecimiento de la fase estacionaria de crecimiento tanto en presencia de altas como de bajas concentraciones de amonio. El incremento ocasionado en la producción de penicilina por altas concentraciones de amonio ocu-

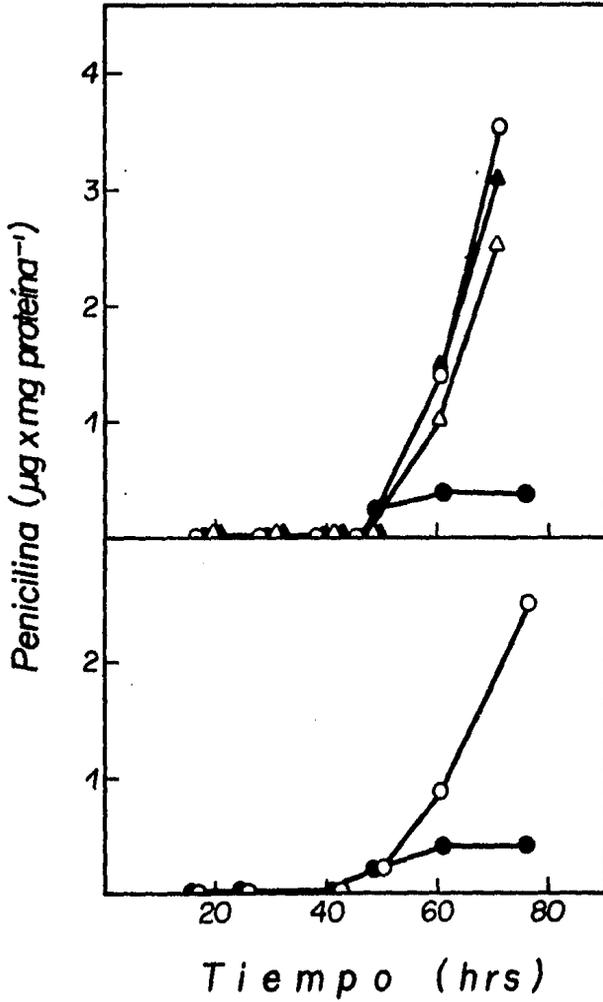


Figura 36.- Concentraci\u00f3n de penicilina a diferentes tiempos de cultivo producida en presencia de cloruro de amonio 10mM (●), 50mM (▲), 75mM (△) y 100mM (○).

re al mismo tiempo que el establecimiento de la fase estacionaria de crecimiento (Figura 37).

Al analizar de manera análoga el pico máximo de la producción de glutatión, es posible afirmar que existe una relación entre el establecimiento de la fase estacionaria de crecimiento y un pico en la concentración de glutatión (Figura 37).

Es interesante notar que el aumento de la producción del antibiótico producido por altas concentraciones de amonio coincide con un pico en la formación de glutatión; estos dos hechos, a su vez, se relacionan con el tiempo de establecimiento de la fase estacionaria de crecimiento. Este resultado coincide con las observaciones realizadas por algunos grupos de trabajo (20, 30) según los cuales, la baja en la velocidad de crecimiento regula la producción de ciertos metabolitos como gramicidina S y bacitracina entre otros.

El hecho de que las enzimas involucradas en la producción de metabolitos secundarios son menos específicas que las relacionadas con el metabolismo primario (30), aunado a los resultados obtenidos por varios grupos de investigación según los cuales se han detectado péptidos similares al tripéptido precursor de la penicilina y al glutatión en varios microorganismos, y sumando a lo anteriormente dicho nuestra observación con respecto a la similitud en cuanto al tiempo de producción de ambos compuestos, nos lleva a postular que la enzima involucrada en la catálisis del primer paso de la síntesis de penicilina

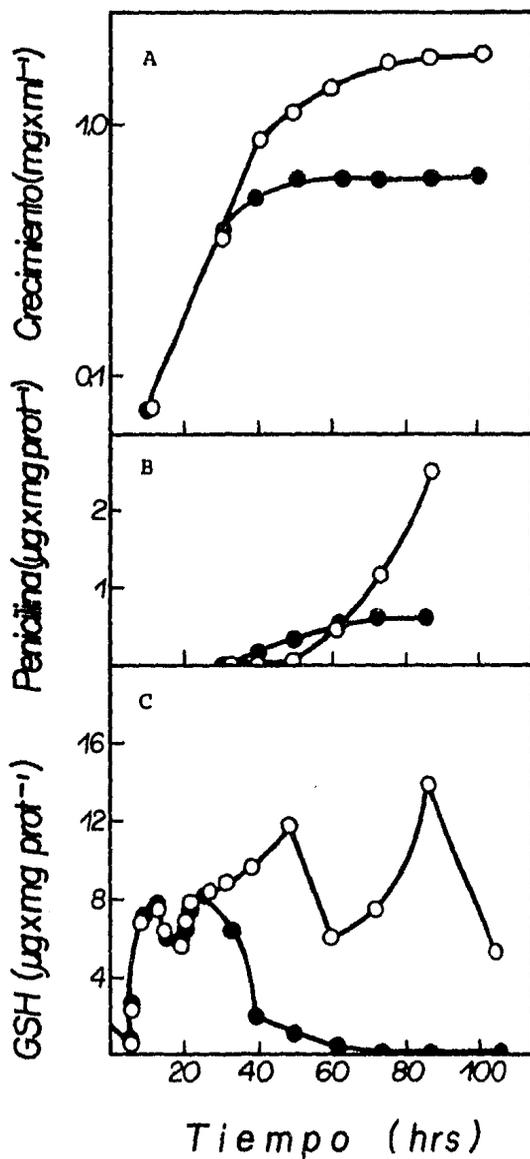


Figura 37.- Relación entre A) crecimiento, B) producción de penicilina y C) producción de glutati6n en presencia de altas 100mM (o) y bajas 10mM (●) concentraciones de cloruro de amonio.

lina y glutatión que funciona al establecerse la fase estacionaria de crecimiento, pudiera ser la misma.

Si esta hipótesis fuera cierta, cabría cuestionarse lo siguiente:

¿Por qué se produce solamente glutatión y no se sintetiza penicilina durante la fase exponencial de crecimiento, si estamos postulando que la enzima encargada de sintetizar los dipéptidos precursores de ambos compuestos es la misma?

Las respuestas a dicha pregunta podrían ser varias:

- 1.- Que exista otra enzima capaz de catalizar únicamente el primer paso de la síntesis de glutatión y opere durante la fase logarítmica de crecimiento.
- 2.- Que durante la fase de crecimiento exponencial no haya suficiente cantidad de sustratos disponibles para la síntesis de penicilina.
- 3.- Que los sustratos precursores o, la enzima catalizadora del primer paso de la síntesis de penicilina se encuentren compartimentalizados como ocurre en el caso de la producción de alcaloides (76).
- 4.- Que el tripéptido precursor de la síntesis de penicilina si sea sintetizado durante la fase exponencial de crecimiento pero no sea convertido en penicilina debido a la ausencia de las enzimas que catalizan la transformación de este tripéptido en el antibiótico.

Hasta este momento, no se sabe cual de las posibles res-

puestas sea la correcta; sin embargo, los estudios realizados en el presente trabajo abren la puerta a un nuevo proyecto de investigación encargado de responderlas.

Es importante señalar por otra parte, que la similitud en cuanto al efecto del amonio sobre la producción de penicilina y glutatión podría ser una casualidad y no tener nada que ver con la proposición de que la primera enzima de la vía de biosíntesis de ambos compuestos sea la misma.

Por otro lado, falta aclarar las bases del efecto positivo ejercido por el amonio sobre la síntesis de glutatión y penicilina. Dicho efecto podría deberse a que el amonio se convierta en ácido glutámico e induzca la producción de glutatión, en forma análoga a lo ya anteriormente reportado con respecto a penicilina (70) o a que el amonio se convierta en aminoácidos precursores de la penicilina y del glutatión, aumentando así la síntesis de dichos compuestos, como ocurre con respecto a la producción de alcaloides y antibióticos peptídicos (19, 27).

Con el fin de conocer la base del incremento en la producción y penicilina ocasionado por altas concentraciones de amonio, será necesario realizar experimentos en los cuales se observe el efecto que poseen análogos no metabolizables del ácido glutámico, así como aminoácidos precursores de la síntesis de glutatión y penicilina, sobre la producción de dichos compuestos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que existe cierta similitud entre el tiempo de producción y la regulación de la penicilina y glutatión. Sin embargo, para saber si la enzima encargada de la formación de los dipéptidos precursores de ambos compuestos es la misma, será necesario realizar varias clases de experimentos entre los cuales cabe mencionar:

- 1.- Purificación de la enzima antes mencionada a diferentes tiempos de cultivo y caracterización de sus afinidades con respecto a los distintos aminoácidos precursores de la penicilina y el glutatión.
- 2.- Estudiar la producción de penicilina en mutantes de la enzima γ - glutamil - cistefna sintetasa.

CONCLUSIONES

El glutatión proveniente de las esporas es utilizado o degradado al poner las esporas en contacto con el medio de cultivo. El tripéptido se comienza a sintetizar de nuevo a partir del intervalo comprendido entre las 3 y las 7 horas de cultivo, independientemente de la concentración de amonio presente en el medio. El amonio en altas concentraciones retrasa ligeramente la formación de glutatión en comparación con la síntesis ocurrida en presencia de bajas concentraciones de dicho nutriente. Sin embargo, los niveles de glutatión se igualan a las 9 horas de incubación. En presencia de altas concentraciones de amonio, la formación de glutatión se eleva a partir de las 24 horas de incubación aproximadamente. Dicha elevación alcanza magnitudes de hasta 14 veces con respecto a los cultivos donde el amonio se encuentra en baja concentración.

El efecto estimulador ejercido sobre la producción de glutatión es debido específicamente a la presencia de altas concentraciones de amonio y no al tipo de sal con la cual éste se administre, o al cambio de pH ocasionado en el medio de incubación por su adición.

Al administrarse amonio al comienzo del cultivo, a concentraciones mayores que el control (10mM), el comienzo de la sín-

tesis de penicilina se retrasa y mantiene baja por un día aproximadamente. Sin embargo, la producción del antibiótico se incrementa 3 veces después de ese día de retraso al compararse con el control; por lo que es posible concluir que el amonio en altas concentraciones ejerce un efecto de retraso y estimulación sobre la producción de penicilina.

El efecto estimulador sobre la producción de penicilina es debido específicamente a la presencia de altas concentraciones de amonio, y no al tipo de sal con la cual éste se administra al medio de cultivo, o al cambio de pH ocasionado por su adición.

En base a los experimentos realizados en este trabajo, es posible concluir que el amonio en altas concentraciones ejerce un efecto positivo tanto sobre la síntesis de penicilina, como sobre la de glutatión.

Adicionalmente, los experimentos mostrados en este trabajo nos permitieron realizar las siguientes observaciones:

- 1.- El comienzo de la síntesis de penicilina ocurre ciertas horas antes del establecimiento de la fase estacionaria de crecimiento tanto en altas como en bajas concentraciones de amonio.
- 2.- El incremento ocasionado en la producción de penicilina y glutatión ocurre al mismo tiempo que el establecimiento de la fase estacionaria de crecimiento.

El hecho de que las enzimas involucradas en la producción de metabolitos secundarios son menos específicas que las relacionadas con el metabolismo primario, aunado a los resultados obtenidos por varios grupos de trabajo según los cuales se han detectado péptidos similares al tripéptido precursor de la penicilina y al glutatión en varios microorganismos y, sumando a lo anteriormente dicho nuestra observación con respecto a la similitud en cuanto al tiempo de producción y al efecto estimulatorio del amonio sobre la producción de ambos compuestos, nos lleva a postular que la enzima involucrada en la catálisis del primer paso de la síntesis de penicilina y glutatión, que funciona al establecerse la fase estacionaria de crecimiento, podría ser la misma. Sin embargo, será necesario realizar experimentos de purificación enzimática y obtención de mutantes deficientes en la enzima γ - glutamil - cisteína sintetasa para aclarar este punto.

Los estudios realizados en este trabajo abren la puerta a un proyecto en el cual se aclaren las bases del efecto positivo ejercido por el amonio sobre la síntesis de glutatión y penicilina.

REFERENCIAS

- 1.- E.P. Abraham, J.A. Huddleston, G.S. Jayatilake, J. O'Sullivan, R.L. White. 1980. Recent Advances in Chemistry of β - Lactam Antibiotics (G.I. Gregory ed.) pg. 125-134. Royal Society of Chemistry, London.
- 2.- E.P. Abraham. Sci. Am. 244:64-74.1981.
- 3.- P. Adriaens, H. Vanderhaeghe, B. Meeschaert, H. Eysen.1975. Antimicrob. Agents Chemother. 8:15-17.
- 4.- Y. Aharonowitz, A.L. Demain. 1979. Can. J. Microbiol. 25: 61-67.
- 5.- Y. Aharonowitz. Ann. Rev. Microbiol. 1980. 34:290-33.
- 6.- Z. Albert, M. Orłowski, A. Szewczuk. 1961. Nature 191:767-68.
- 7.- C.J. Alexopoulos. 1962. Introductory Mycology. Cap. 13. Wiley International Edition.
- 8.- R.D. Allison, A. Meister. 1981. J. Biol. Chem. 256:2988-92.
- 9.- M.E. Anderson, R.D. Allison, A. Meister. 1982. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1088-91.
- 10.- J. Anné. 1982. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 15:41-46.
- 11.- P. Apontoweil, W. Berends. 1975. Biochim. Biophys. Acta 399:10-22.
- 12.- P. Apontoweil, W. Berends. 1975. Mol. Gen. Genet. 141:91-

95.

- 13.- H.R. Arnstein. *Ann. Rept. Progr. Chem.* 54:399. 1957.
- 14.- H.R. Arnstein, D. Morris, E.J. Toms. 1959. *Biochim. Biophys. Acta* 35:561-562.
- 15.- H.N. Arst, D.J. Cove. 1973. *Mol. Gen. Genet.* 126:111-142.
- 16.- K. Asghar, B.G. Reddy, G. Krishna. 1975. *J. Histochem. Cytochem.* 23:774-79.
- 17.- J.C. Ball, D.L. Vander. 1979. *Anal. Biochem.* 98:472-77.
- 18.- J. Berdy. 1974. *Adv. Appl. Microbiol.* 8:309-406.
- 19.- M.L. Bianchi, P.A. Cattaneo, P. Crespi, A. Guicciardi, A. Minghetti, C. Spalla. Mechanisms of control in the qualitative biosynthesis of lysergic acid alkaloids. En *Overproduction of microbial products.* (Krumphanzl V., Sikyta B., Vanek Z. eds.) 1982. Academic Press.
- 20.- M. Blumaerova, Z. Vanek. Quantitative aspects of oligopeptide antibiotic biosynthesis in streptomycetes. En *Overproduction of microbial products.* (V. Krumphanzl, B. Sikyta, Z. Vanek eds.) 1982. Academic Press.
- 21.- R.P. Bodnaryk. 1971. *Can. J. Biochem.* 50:524-528.
- 22.- R.P. Bodnaryk. 1974. *Insect. Biochem.* 4:439-454.
- 23.- C.H. Bold, C.J. Alexopoulos, T. Delevorgas. *Morphology of plants and fungi.* 1980. Cap. 34. Harper and Row Publishers. New York. Cuarta edición.
- 24.- L.M. Cagen, J.J. Pisano. 1979. *Biochim. Biophys. Acta* 573: 547-51.

- 25.- T.R. Carrington. Proc. R. Soc. Lond. B. 179:321-333. 1971.
Printed in Great Britain.
- 26.- L.F. Chasseaud. 1979. Cancer Res. 29:175-274.
- 27.- C. Claridge. Mutasyntesis and directed biosynthesis for
the production of new antibiotics. En Basic biology of new de-
velopments in biotechnology. (Hollaender, Laskin, Rogers eds.)
Plenum Press. New York. 1983.
- 28.- G. Clifton, N. Kaplowitz. 1977. Cancer Res. 37:788-91.
- 29.- J.S. Cornell, A. Meister. 1976. Proc. Natl. Acad. Sci. USA
73:420-22.
- 30.- A.L. Demain, Y. Aharonowitz, J.F. Martfn. Biochemistry and
genetic regulation of commercially important antibiotics (L.V.
Vining ed.) 1983. Addison-Wesley Publishing Company. Cap. 3.
- 31.- M.L. Dinamarca, L. Levenbrook, E. Valdes. 1971. Arch. Bio-
chem. Biophys. 147:374-83.
- 32.- K.T. Douglas, I.N. Nadvi, 1979. FEBS Lett. 106:393-96.
- 33.- E. Dubois. S. Vissers, M. Grenson, J.M. Wiame.1977. Bio-
chem. Biophys. Res. Commun. 75:233-239.
- 34.- R.P. Elander. Genetics of industrial microorganisms (O.K.
Sebek, A.I. Laskin eds.) 1979. American Society for Microbio-
logy pg. 21-35.
- 35.- R.C. Fahey, W.C. Brown, W.B. Adams, M.B. Worsham. 1978. J.
Bacteriol. 133:1126-1129.
- 36.- P.A. Fawcett, J.J. Usher, J.A. Huddleston, R.C. Bleany, J.
J. Nisbet. E.P. Abraham, 1976. Biochem. J. 157:651-660.

- 37.- J.R.S. Fincham, P.R. Day, A. Radford. 1979. Fungal gene -
tics. Vol. 4. Cap. 1. Cuarta edición. University of California
Press.
- 38.- J.A. Fuchs, H.R. Warner. 1975. J. Bacteriol. 124:140-48.
- 39.- J.M. Ghysen. 1977. J. Gen. Microbiol. 101:13-33.
- 40.- G.G. Glenner, J.E. Folk, P.C. McMillan. 1962. J. Histo --
chem. Cytochem. 10:481-89.
- 41.- M.Y. Goore, J.F. Thompson. 1967. Biochim. Biophys. Acta
132:15-26.
- 42.- S.A. Goulden, F.W. Chattaway. 1968. Biochem. J. 110:55.
- 43.- U. Gräfe, A. Steudel, H. Bocker, H. Thrum. 1980a. Z. Allg.
Mikrobiol. 20:185-194.
- 44.- U. Gräfe. Overproduction of microbial products. (V. Krum-
phanzl, B. Sikyta, Z. Vanek ed.) 1982. Academic Press. Cap. 5.
- 45.- O.W. Griffith, A. Meister. 1978. J. Biol. Chem. 253:2333-
2338.
- 46.- O.W. Griffith, R.J. Bridges, A. Meister. 1981. Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 78:2777-81.
- 47.- E.S. Guzmán Barrón. 1951. Adv. Enzymol. 11:201-66.
- 48.- W.H. Habig, M.J. Pabst, G. Fleischner, Z. Gatmaitan, I.M.
Arias, W.B. Jakoby. 1974. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:3879 -
82.
- 49.- C.R. Harrington, T.H. Mead. 1935. Biochem. J. 29:1602-11.
- 50.- E. Heenz. 1972. Metabolic pathways. (L.E. Hokin ed.) 6:
455-501. New York. Academic Press. Tercera edición.

- 51.- G. Hensbach, C.P. Van Der Beek. P.W.M. Van Dijk. Biotechnology and industrial antibiotics. (E. Vandamme ed.) 1984. Marcel Dekker Inc. Cap. 3.
- 52.- F.G. Hopkins. 1921. Biochem J. 15:286-305.
- 53.- F.G. Hopkins. 1929. J. Biol. Chem. 84:269-320.
- 54.- R. Hüter, T. Leisinger, J. Nüesch, W. Währli. Antibiotics and other secondary metabolites. FEMS Symposium No. 5 pg. 142. 1978. Academic Press.
- 55.- C.T. Ingold. 1979. The biology of fungi. Cap. 4. Hutchinson and Co. Publishers Ltd.
- 56.- W.B. Jakoby ed. Methods Enzymol. 77:1-476.
- 57.- F.G. Jarvis, M.J. Johnson. 1947. J. Am. Chem. Soc. 69:3010-3017.
- 58.- J.A. Jewell, G. Bellomo. H. Thor, S. Orrenius, M.T. Smith. 1982. Science 217:1257-79.
- 59.- R.S. Jiao, Y.M. Chen. M.G. We, W.L. Gee 1979. Acta Physiol. Sinica 5:395-402.
- 60.- V.K. Kalra, S.C. Sikka, G.S. Sethi. 1981. J. Biol. Chem. 256:5567-71.
- 61.- I. Kaszab, S.O. Enfors. 1981. Abstracts of the Second European Congress of Biotechnology. Eastbourne, England. pg. 179.
- 62.- E.C. Kendall, H.L. Mason. 1929. J. Biol. Chem. 84:657-74.
- 63.- J.N. Ketley, W.H. Habig, W.B. Jakoby. 1975. J. Biol. Chem. 250:8670-73.
- 64.- J. Kleinkauf, H. von Döhren. Peptides. En Biochemistry

- and genetic regulation of commercially important antibiotics, (L.C. Vining ed.) Addison Wesley Publishing Company. 1983.
- 65.- T. Kluge, H.C. Borresen, E. Jellum, O. Stokke, L. Eldjarn, B. Fretheim. 1972. *Surgery* 71:104-9.
- 66.- T. Konomi, S. Herchen, J.E. Baldwin, M. Yoshida, N.A. Hunt, A.L. Demain. 1979. *Biochem. J.* 184:427-430.
- 67.- P.N. Konrad, F. Richards, W.N. Valentine, D.E. Paglia. 1972. *N.Engl.J.Med.*286:557.
- 68.- V.M. Krupinski, J.E. Robbers, H.G. Floss.1976. *J. Bac.* 125: 158-165.
- 69.- T. Kuhlenschmidt, N.P. Curthoys 1975. *Arch. Biochem. Bio - phys.* 167:519-24.
- 70.- F. Lara, R.C. Mateos, G. Vázquez, S. Sánchez. *Biochem. Bio phys. Res. Commun.* 1982. 105:172-178.
- 71.- H.M. Lenhoff. 1968. *Science* 161:434-42.
- 72.- H.M. Lenhoff, E.M. Kosower, N.S. Kosower. 1969. *Nature* 224:717-18.
- 73.- C.M. Liu, T. Henmann, P.A. Miller. 1977. *J. Antibiot.* 30: 244-251.
- 74.- P.B. Loder, E.P. Abraham. 1971. *Biochem. J.* 123:471-476.
- 75.- O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall. 1951. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- 76.- M. Luckner, W. Roos. Enzymic and compartmental regulation of alkaloid biosynthesis in P. cyclopium . En Overproduction of microbial products (V. Krumphanzl, B. Sikyta, Z. Vanek eds.) A-

cademic Press. 1982.

- 77.- J.F. Martfn, J.M. Luengo, G. Revilla, J.R. Villanueva. 1979
Biochemical genetics of the β -lactam antibiotic biosynthesis
(O.K. Sebek, A.I. Laskin eds.) American Society for Microbiolog
y Washington D.C. pg. 83-89.
- 78.- J.F. Martfn, A.L. Demain. 1980. Microbiol.Rev. 44:230-51.
- 79.- G. Marzluf. Microbiol.Rev. 1981.437-461.
- 80.- R.C. Mateos. Tesis para obtener el grado de Maestrfa en
Investigaci3n Biom3dica B3sica UNAM. 1983.
- 81.- R.C. Mateos, G. V3zquez, S. S3nchez. Biotech. Lett. 6:109-
114. 1984.
- 82.- G.A. Maw, C.M. Coyne. 1968. Arch. Biochem. Biophys. 127:
241-51.
- 83.- T.M. McIntyre, N.P. Curthoys. 1979. J. Biol. Chem. 254:
6499-504.
- 84.- B. Meeschaert, P. Adriaens, H. Eysser. 1980. J. Antibiot.
33:722-730.
- 85.- A. Meister. 1973. Science 180:33-39.
- 86.- A. Meister. 1974. Life. Sci. 15:177-90.
- 87.- A. Meister. 1974. Res. Pebl. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.
53:273-91.
- 88.- A. Meister, S. Tate. Ann. Rev. Biochem. 45:559-604. 1976.
- 89.- A. Meister, O.W. Griffith. 1979. Cancer Treat. Rep. 63:
1115-21.
- 90.- A. Meister. TIBS. September 1981. 231-234.

- 91.- A. Meister, M.E. Anderson. Ann. Rev. Biochem. 52:711-60. 1983.
- 92.- R. Milbauer, N. Grossowicz. 1965. J. Gen. Microbiol. 41: 185-194.
- 93.- E.D. Mooz. L. Wigglesworth. 1976. Biochem. Biophys. Res. Commun. 68:1066-1072.
- 94.- S. Nagai. S. Black. 1968. J. Biol. Chem. 243:1942-47.
- 95.- J. Nüesch, S. Hinnen, H. Liersch, H.J. Treichler. 1976. Second International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms (K. Mc. Donald ed.)pg. 451-472.
- 96.- S. Omura. Y. Tanaka. C. Kitao, H. Tanaka, Y. Iwai. 1980. Antimicrob. Agents Chemother 18:691-695.
- 97.- O.H. Orfanos, E.W. Naylor, R. Guthrie. 1980. Anal. Biochem. 104:71-74.
- 98.- M. Orlowski, M. Wilk. 1975. Eur. J. Biochem. 53:581-90.
- 99.- L. Orning, S. Hammarström, B. Samuelson, 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2014-2017.
- 100.- J. O'Sullivan, R.C. Bleany, J.A. Huddleston, E.P. Abraham 1979. Biochem. J. 184:421-426.
- 101.- J. O'Sullivan, C. Ball. Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics (L.C. Vining ed.) Cap. 4. 1983. Addison Wesley Publishing Co.
- 102.- A.G. Palekar, S.S. Tate, A. Meister. 1975. Biochem. Biophys. Res. Commun. 62:651-57.
- 103.- A.B. Pardee. 1968. Science 162:632-37.

- 104.- H. Peck, R.J. Pollitt. 1979. Clin.Chem. Acta 94:237-40.
- 105.- K.E. Price. Structure activity relationships among the semisynthetic antibiotics. Cap. 1. (D. Perlman ed.) 1977. Academic Press.
- 106.- S.W. Queener, N. Neuss. Chemistry and biology of β -lactam antibiotics (R.B. Morin, M. Gorman eds.) Vol. 3. Cap. 1. 1982. Academic Press.
- 107.- E. Racker. 1955. J. Biol. Chem. 217:867-74.
- 108.- W.B. Rathbun. 1967. Arch. Biochem. Biophys. 122:62-72.
- 109.- A. Raz, R. Kenig Wakshal, M. Schwartzman. 1977. Biochim. Biophys. Acta 488:322-29.
- 110.- H. Reyes, Z. Gatmaitan, I.M. Arias. 1971. J. Clin. Invest. 50:2242-52.
- 111.- J. de Rey-Pailhade. 1888. C.R. Acad. Sci. 106:1683-84.
- 112.- J. de Rey-Pailhade. 1888. R. Acad. Sci. 107:43-44.
- 113.- F.H. Richards, M.R. Cooper, L.A. Pearce, R.J. Cowan, C.L. Spurr. 1974. Arch. Intern. Med. 134:534-37.
- 114.- W.L. Richards, E.G. Astrop. 1982. Cancer Res. 42:4143-52.
- 115.- P. Richamn, A. Meister. 1975. J. Biol. Chem. 250:422-26.
- 116.- E. Rosenstein. Diccionario de especialidades farmacéuticas 27a.1981. Impresora y editora mexicana S.A. de C.V.
- 117.- S. Sánchez, L. Paniagua, R.C. Mateos, F. Lara, J. Mora. Adv. Biotechnol. Vol III pg. 147-154. Proceedings of the Sixth International Fermentation Symposium. London, Canadá. 1980.
- 118.- S. Sánchez, R.C. Mateos, L. Escalante, J. Rubio, H. Ló -

- pez, A. Farrés. M.E. Flores. Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes. 1984. (L. Ortiz, L. Bojalil, V. Yakoleff eds.)pg 343-355.
- 119.- K. Sasoka, C. Lauinger, S.N. Nigam, C. Ressler. 1968. *Biochim. Biophys. Acta.* 156:128-34.
- 120.- J.D. Schulman, S.I. Goodman, J.W. Mace, A.D. Patrick, F. Tietze, E.J. Butler. 1975. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 68-74.
- 121.- S. Saltzer. 1973. *J. Biol. Chem.* 248:215-22.
- 122.- S. Seltzer, M. Lin. 1979. *J. Am. Chem. Soc.* 101:3091-97.
- 123.- S.C. Sikka, V.K. Kalra. 1980. *J. Biol. Chem.* 255:4399-402.
- 124.- J.E. Smith, D.R. Berry. *The filamentous fungi. Vol. 2 Biosynthesis and metabolism.* Edward Arrol Publishers Limited. 1976.
- 125.- N.L. Somerson, A.L. Demain, T.D. Nunheimer. 1961. *Arch. Biochem. Biophys.* 93:238.
- 126.- S.S. Tate, A. Meister. 1974. *J. Biol. Chem.* 249:7593-7602.
- 127.- S.S. Tate, A. Meister. 1975. *J. Biol. Chem.* 250:4619-24.
- 128.- S.S. Tate, A. Meister. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4806-9
- 129.- E.J. Vandamme. *Advances in applied microbiology* (D. Perlman ed.) Vol. 21. pg. 83-123. Academic Press New York. 1977.
- 130.- P. Van Der Werf, R.A. Stephani, A. Meister. 1973. *Fed.*

Proc. 32:1969.

131.- P. Van Der Werf, R.A. Stephani, M. Orlowski, A. Meister. 1973. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70:759-61.

132.- P. Van Der Werf, A. Meister. 1974. Biochem. Biophys. Res. Commun. 56:90-96.

133.- P. Van Der Werf, R.A. Stephani, A. Meister. 1974. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:1026-29.

134.- P. Varandani. 1973. Biochim. Biophys. Acta 320:249-57.

135.- P. Varandani, M.A. Nafe, M.L. Chandler. 1975. Biochemistry 14:2115-20.

136.- G. Vázquez. Tesis para obtener el título de Maestría en Ciencias (Bioquímica) UNAM 1984.

137.- D.H.G. Verteeg, A. Witter. 1970. J. Neurochem. 17:41-52.

138.- J.R. Vina, J.R. Puertes, I. Vina. 1981. Biochem. J. 200: 705-8.

139.- J. Vina, J.R. Vina, J. Puertes, J.M. Estrela, J.L. Galbis, 1981. Biochem. J. 194:99-102.

140.- S.C. Warren, G.G.F. Newton, E.P. Abraham. 1967. Biochem. J. 103:891-901.

141.- D.J. Waxman, J.L. Strominger. Chemistry and biology of β -lactam antibiotics. Vol. 3. Cap. 4. Academic Press. 1982.

142.- V.P. Wellner, R. Sekora, A. Mesiter, A. Larson. 1974. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:2505-9.

143.- D.W.S. Westlake, F. Sala, R. McGrath, L.C. Vining. 1968. Can. J. Microbiol. 14:587-593.

- 144.- R. Mason, S. Oglive. 1984. J. Bac. 160(2):656-661.
- 145.- S. Inoue, Y. Nishizawa, S. Nagai. 1983. J. Ferment. Technol. 61:7-12.
- 146.- Y. Tanaka, R. Masuma, S. Omura. 1984. J. Antibiot. 37(11): 1370-75.