

R-2700

T. 108

UNIVERSIDAD DE SEVILLA - FACULTAD DE FARMACIA

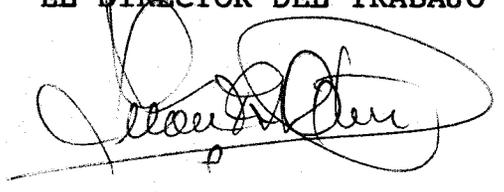
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

γ -GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA DE
Penicillium chrysogenum AS-P-78

Memoria que para optar al grado de
Licenciatura en Farmacia presenta
EMILIO ALVAREZ RUIZ

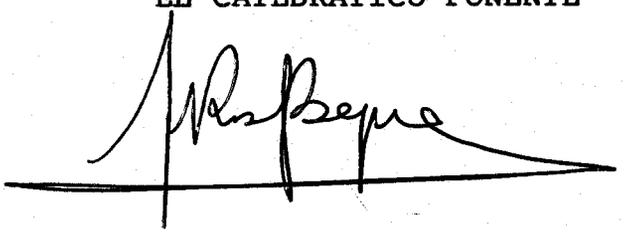
VºBº

EL DIRECTOR DEL TRABAJO



VºBº

EL CATEDRATICO PONENTE



Sevilla, Octubre de 1984

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que de alguna forma han contribuido a la realización del trabajo que se expone en esta memoria.

Al Prof. Dr. Juan Francisco Martín, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de León y Director de esta Tesina, por su dirección, orientación y estímulo durante el desarrollo de la misma.

Al Prof. Dr. Francisco Ruiz Barraquero, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, por haber aceptado actuar como Ponente de esta Tesina.

Al Dr. Manuel Jesús López-Nieto, a Filomena R. Ramos y a J. Manuel Cantoral, por su inestimable colaboración y apoyo a lo largo de este trabajo.

A Juan Mesas, cuya experiencia en el campo de la caracterización enzimática me ha sido tan útil.

A Angelita y a todos los demás compañeros del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de León, por su amistad y su grata cooperación durante mi estancia en dicho Centro.

A Antibióticos, S.A. de León, por la cesión de algunos de los microorganismos utilizados en este trabajo.

INDICES

INDICE DE MATERIAS

	<u>Pág.</u>
I. INTRODUCCION	1
I.A. Antibióticos β -lactámicos	2
I.A.1. Introducción histórica	2
I.A.2. Estructura química	4
I.A.2.1. β -lactamas hidrofóbicas	5
I.A.2.2. β -lactamas hidrofílicas	5
I.A.3. Mecanismo de acción y espectro antimicrobia- no	7
I.A.4. Ruta biosintética de los antibióticos β -lac- támicos	9
I.A.5. Ruta biosintética de las penicilinas hidrofó- bicas	11
I.A.5.1. Aminoácidos precursores	11
I.A.5.2. Precursores de la cadena lateral	13
I.A.5.3. El tripéptido ACV como precursor	14
I.A.5.4. Péptidos relacionados con el ACV	17
I.A.5.5. Biosíntesis del tripéptido ACV	20
I.A.5.6. Ciclación del ACV a isopenicilina N ..	23
I.A.5.7. Mecanismo de formación de isopenicili- na N	25
I.A.5.7.1. Formación del anillo β -lactámi- co	25
I.A.5.7.2. Formación del anillo tiazolidíni- co	26
I.A.5.8. Especificidad de la isopenicilina N sintetasa	27
I.A.5.9. Conversión de isopenicilina N en las diferentes penicilinas hidrofóbicas ..	28
I.A.5.10. R-acetil:Coenzima A ligasa	31

I.A.5.11.	Isopenicilina N amidoliasa	32
I.A.5.12.	Acil-Coenzima A:6-APA actiltransferasa	32
I.A.5.13.	Penicilina acilasa	34
I.A.5.14.	Modelo de conversión enzimática de isopenicilina N en las diferentes penicilinas hidrofóbicas	34
I.B.	Glutación y ciclo del γ -glutamilo	36
I.B.1.	Introducción	36
I.B.2.	Metabolismo del glutación:ciclo del γ -glutamilo	37
I.B.3.	Descripción de las principales enzimas del ciclo del γ -glutamilo	40
I.B.3.1.	γ -glutamil-cisteína sintetasa	40
I.B.3.2.	Glutación sintetasa	42
I.B.3.3.	γ -glutamil transpeptidasa	44
I.B.3.4.	5-oxo-L-prolinasa	47
I.C.	Objetivos del presente trabajo. El ciclo del γ -glutamilo en <u>P. chrysogenum</u>	49
II.	MATERIALES Y METODOS	51
II.1.	Microorganismos utilizados	52
II.2.	Medios de cultivo	54
II.2.1.	Medios de esporulación y mantenimiento	54
II.2.1.1.	Medio de esporulación utilizado para la cepa wisconsin 54-1255:Medio agar patata	54
II.2.1.2.	Medio de esporulación utilizado para la cepa AS-P-78:Medio PM-1	54
II.2.1.3.	Medio de esporulación y mantenimiento utilizado para <u>B. subtilis</u> :Medio agar común	55
II.2.1.4.	Medio de mantenimiento y crecimiento de <u>M. luteus</u> y <u>E. coli</u> :Medio TSA	56

II.2.2. Medios de inóculo y producción	56
II.2.2.1. Medio complejo de inóculo utilizado para la cepa <u>P. chrysogenum</u> AS-P-78 .	56
II.2.2.2. Medio complejo de inóculo utilizado para la cepa <u>P. chrysogenum</u> Wisconsin 54-1255 y mutantes no productores (npe U.L.)	56
II.2.2.3. Medio complejo de fermentación utili- zado para la cepa <u>P. chrysogenum</u> AS-P- 78	57
II.2.2.4. Medio complejo de fermentación utiliza- do para la cepa <u>P. chrysogenum</u> Wis. 54-1255	57
II.2.2.5. Medio de suspensión limitado en nitró- geno	58
II.2.2.6. Medio "Antibiotic" nº 5 (Difco) para la determinación de antibióticos por bioensayo	58
II.3. Mantenimiento de los cultivos	58
II.4. Producción de antibiótico. Desarrollo de la fermen- tación	59
II.4.1. Inóculo e incubación	59
II.4.2. Determinación del crecimiento	59
II.4.3. Preparación de un sistema de células sin cre- cimiento	60
II.4.4. Valoración de antibióticos por bioensayo ...	61
II.5. Técnicas para la caracterización de los productos de la actividad γ -glutamil transpeptidasa	64
II.5.1. Cromatografía en capa fina	64
II.5.2. Electroforesis en capa fina	64
II.5.3. Aislamiento de los productos de reacción ...	65
II.5.4. Hidrólisis y oxidación de las muestras	65
II.5.5. Revelado de aminoácidos y péptidos	66

II.5.6. Método para la obtención de γ -glutamil-cisteína	66
II.6. Obtención de extractos enzimáticos acelulares	68
II.6.1. Desintegración celular por sonicación	69
II.6.2. Rotura mecánica en desintegrador de células	69
II.6.3. Tratamiento con n-butanol	70
II.6.4. Tratamiento con Tritón X-100	70
II.7. Valoración de la actividad γ -glutamil transpeptidasa	71
II.7.1. Ensayos de reacción	71
II.7.2. Unidad enzimática	73
II.7.3. Determinación de proteína	73
II.8. Purificación parcial de la actividad γ -glutamil transpeptidasa	73
II.8.1. Precipitación con sulfato de protamina	73
II.8.2. Cromatografía de intercambio iónico	74
II.8.3. Precipitación con sulfato amónico	74
II.8.4. Filtración en gel	75
III. RESULTADOS	78
III.1. Estudio de la cinética de producción de penicilina de un cultivo de <u>P. chrysogenum</u> AS-P-78	79
III.2. Estudio de la actividad γ -glutamil transpeptidasa	81
III.2.1. Obtención de extractos acelulares	81
III.2.2. Valoración de la actividad γ -glutamil transpeptidasa a lo largo de la fermentación	84
III.2.3. Influencia del pH sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa	86
III.2.4. Influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática	88

III.2.5.	Influencia del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática	91
III.2.6.	Influencia de la concentración de proteína sobre la actividad enzimática	93
III.2.7.	Influencia ejercida por diversos iones sobre la actividad enzimática	94
III.2.8.	Estudio de la adición a la mezcla de reacción de diversos aceptores del resto γ -glutamilo	98
III.2.9.	Estudio de la relación entre la actividad γ -glutamil transpeptidasa y algunos de los compuestos más relevantes de la ruta biosintética de las penicilinas	99
III.2.10.	Efecto de la glucosa sobre la actividad enzimática	102
III.2.11.	Purificación parcial de la actividad γ -glutamil transpeptidasa	105
III.2.12.	Determinación del peso molecular de la actividad γ -glutamil transpeptidasa	105
III.2.13.	Actividad de la γ -glutamil transpeptidasa con respecto a varios sustratos. Influencia de la concentración de glutatión sobre la actividad enzimática	107
III.2.14.	Estabilidad de la γ -glutamil transpeptidasa	112
III.2.15.	Valoración de los niveles de γ -glutamil transpeptidasa en diferentes microorganismos	112
III.2.16.	Estudio de la inhibición por serina-borato de la actividad γ -glutamil transpeptidasa. Efecto de la inhibición "in vivo" sobre la producción de penicilina	113

	<u>Pág.</u>
IV. DISCUSION	119
V. CONCLUSIONES	129
VI. BIBLIOGRAFIA	133

INDICE DE FIGURAS

- I.1. Núcleos estructurales de los que derivan los dos principales tipos de antibióticos β -lactámicos.
- I.2. Esquema general de biosíntesis de los antibióticos β -lactámicos.
- I.3. Estructura de los péptidos P_1 , P_2 y P_3 encontrados en caldos de cultivo de organismos productores de penicilinas.
- I.4. Esquema de la formación del tripéptido ACV y ciclación del mismo para formar isopenicilina N.
- I.5. Modelo de conversión enzimática de isopenicilina N en las diferentes penicilinas hidrofóbicas.
- I.6. Esquema general del ciclo del γ -glutamilo.
- I.7. Localización celular e interconexiones de las diversas etapas del ciclo del γ -glutamilo.
- II.1. Colonia de P. chrysogenum crecido en medio sólido (YED)
- II.2. Placa de bioensayo para la valoración de penicilina.
- II.3. Esquema de obtención y purificación parcial de la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.
- III.1. Cinética de crecimiento y producción de penicilina de un cultivo de P. chrysogenum AS-P-78 en un medio complejo de producción.
- III.2. Variación de la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78 a lo largo de la fermentación.
- III.3. Influencia del pH sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.

- III.4. Influencia de la temperatura sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.
- III.5. Influencia del tiempo de incubación sobre la formación de γ -glutamil hidroxamato.
- III.6. Efecto de la concentración de proteína sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa.
- III.7. Efecto de la adición de glucosa al medio de cultivo sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa en P. chrysogenum AS-P-78.
- III.8. Recta de calibración y peso molecular obtenido para la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.
- III.9. Influencia de la concentración de glutatión sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.
- III.10. Efecto de la concentración del inhibidor serina-borato sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.
- III.11. Efecto de la serina-borato sobre la producción de penicilina G en un medio de suspensión limitado en nitrógeno.

INDICE DE TABLAS

- I.1. Penicilinas naturales y biosintéticas
- I.2. Especificidad para el sustrato de la isopenicilina N sintetasa de A. chrysogenum.
- III.1. Rendimientos obtenidos en los distintos métodos utilizados para la obtención de extractos acelulares con actividad γ -glutamil transpeptidasa.
- III.2. Efecto de la adición de diversos cationes al medio de reacción sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa.
- III.3. Utilización comparativa de diversos aceptores del resto γ -glutamilo por la γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum.
- III.4. Esquema de purificación de la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.
- III.5. Actividad comparada de los diversos compuestos utilizados como sustratos de la actividad γ -glutamil transpeptidasa.
- III.6. Actividad γ -glutamil transpeptidasa en varias cepas de P. chrysogenum.

INTRODUCCION

I.A. Antibióticos β -lactámicos

I.A.1. Introducción histórica

El primer estudio documentado que refiere la observación del antagonismo entre hongos del género Penicillium y bacterias es el del joven estudiante francés Ernest Duchesne quien, en 1896, analizaba la actividad antibiótica de Penicillium glaucum en su tesis de fin de carrera, si bien este descubrimiento pasó desapercibido para el mundo científico de la época. En 1928, y de forma fortuita, Alexander Fleming observó la actividad lítica que un hongo contaminante, del género Penicillium, identificado después como Penicillium notatum, ejercía sobre un cultivo de estafilococos. Fleming interpretó que la ausencia de crecimiento bacteriano en las inmediaciones de las colonias del hongo se debía a la presencia en el medio de cultivo de una sustancia difusible, excretada por el hongo y que era activa contra los estafilococos. A esta sustancia desconocida Fleming le aplicó el nombre de penicilina, nombre derivado de la denominación del género que la producía (Fleming, 1929).

La penicilina constituyó el elemento inicial de una larga serie de compuestos que iban a suponer un cambio radical en la terapéutica de las enfermedades infecciosas: los antibióticos. De acuerdo con la clásica definición de Waksman (1947), los antibióticos son "sustancias químicas orgánicas, de bajo peso molecular, producidas

por microorganismos y que son capaces de inhibir selectivamente, a bajas concentraciones, el crecimiento de otros microorganismos".

A partir de 1939, un grupo de investigadores de la Universidad de Oxford, encabezados por Florey, Chain y Abraham (Florey et al., 1949) emprendieron los trabajos relativos al aislamiento y cultivo de especies productoras de antibióticos y a la caracterización química de los mismos. En ese mismo período comienzan a aparecer los primeros estudios referentes a la producción industrial de penicilina y a la búsqueda de nuevas cepas superproductoras.

La especie con la que Fleming realizó su descubrimiento fue Penicillium notatum, organismo con una moderada capacidad de producción de penicilina. Paulatinamente fueron obteniéndose variedades cada vez más productivas, hasta llegar al año 1951, fecha en la cual se aisló en Peoria (Illinois, USA) la cepa Penicillium chrysogenum (NRRL, 1951), de mayor rendimiento que Penicillium notatum y de la cual derivan la mayoría de las cepas superproductoras utilizadas hoy a escala industrial.

En 1953, G.C.F. Newton y E.P. Abraham (Newton y Abraham, 1955) descubrieron la cefalosporina C mientras estudiaban los antibióticos producidos por el hongo hoy denominado Acremonium chrysogenum. Observaron que este antibiótico presentaba una estructura similar a la de la penicilina, estructura que se bautizó con el nombre de cefalosporina y que constituye la base de un amplio grupo de antibióticos.

Los primeros estudios farmacológicos en animales comenzaron en mayo de 1940, utilizando un material crudo con una riqueza en penicilina del 1%. A pesar del bajo contenido en antibiótico de estos extractos, los resultados obtenidos fueron espectaculares y sirvieron para que un gran número de investigadores encaminara sus esfuerzos hacia este nuevo campo. Como dato significativo podemos citar que tan sólo nueve años más tarde la producción americana de penicilina G era ya de 150 toneladas/año, lo que da una idea de la rapidez de los progresos conseguidos.

Próxima la década de los sesenta, concretamente en el año 1959, irrumpen las primeras penicilinas semisintéticas (ampicilinas) que aportaban un mayor espectro de actividad antimicrobiana. Este nuevo sector ha venido desarrollándose hasta el día de hoy y fruto del mismo han sido antibióticos de importancia decisiva en terapéutica.

I.A.2. Estructura química de los antibióticos β -lactámicos

Penicilinas y cefalosporinas, esencialmente, constituyen el núcleo principal del grupo de los antibióticos β -lactámicos. Esta denominación proviene del hecho de que todos ellos poseen en su molécula un anillo tipo β -lactama.

Según las características de los restantes componentes de la molécula del antibiótico, podemos distinguir dos grandes grupos de β -lactamas: hidrofóbicas e hidrofílicas.

I.A.2.1. β -lactamas hidrofóbicas

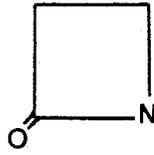
En este tipo de antibióticos un anillo tiazolidínico acompaña al anillo β -lactámico. La estructura resultante constituye el núcleo central de las penicilinas hidrofóbicas y se conoce como ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) (Fig. I-1).

La molécula de 6-APA presenta varios tipos de sustituyentes no polares (fencilacetato, fenoxiacetato, etc.) que van a dar origen a las distintas penicilinas hidrofóbicas (penicilina G, penicilina V, etc.). Este tipo de antibióticos es únicamente producido por hongos filamentosos, de los que Penicillium chrysogenum es la principal especie productora.

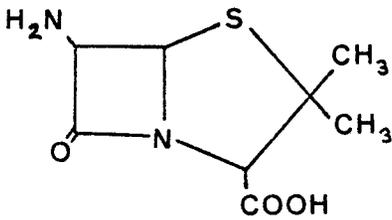
I.A.2.2. β -lactamas hidrofílicas

Dentro de este subgrupo podemos encontrar algunos derivados hidrofílicos del 6-APA, como es el caso de la penicilina N. Sin embargo, la mayoría de los antibióticos adscritos a este epígrafe tienen una estructura derivada del ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA). Este compuesto análogo al 6-APA, proviene de la condensación de un anillo β -lactámico con un anillo dihidrotiazínico (Fig. I-1).

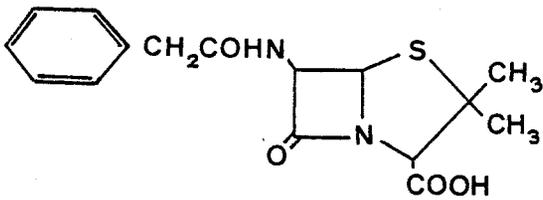
Los antibióticos β -lactámicos hidrofílicos son producidos por hongos filamentosos, actinomicetos y bacterias (Sykes, 1982) tales como: Pseudomonas (Imada et al., 1981), Gluconobacter, Chromobacterium, Agrobacterium (Sy-



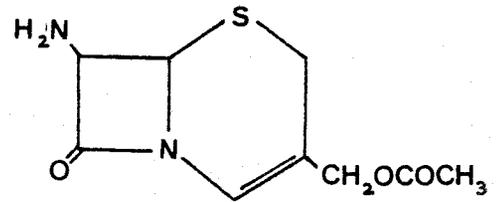
Anillo β -lactámico



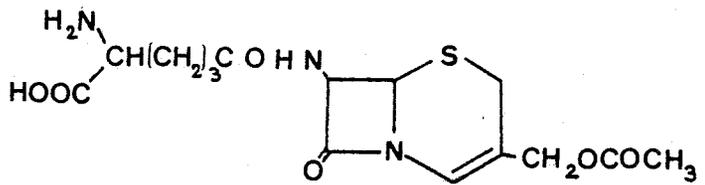
Acido 6-aminopenicilánico
(6-APA)



Penicilina G



Acido 7-aminocefalosporánico
(7-ACA)



Cefalosporina C

Fig. I.1. Núcleos estructurales de los que derivan los dos principales tipos de antibióticos β -lactámicos.

kes et al., 1981), Serratia y Ervinia (Parker et al., 1982).

I.A.3. Mecanismo de acción y espectro antimicrobiano

Básicamente, los antibióticos β -lactámicos actúan sobre microorganismos que poseen pared celular y que presentan un rápido ritmo de división celular. Ello explica la rarísima toxicidad celular de estos compuestos en los animales y seres humanos.

La pared celular de las células procariotas está constituida, fundamentalmente por peptidoglicanos. Su biosíntesis se lleva a cabo en tres fases específicas:

- 1ª fase: Síntesis del precursor de la pared (UDP-acetil muramilpentapéptido)
- 2ª fase: Unión del precursor a la membrana
- 3ª fase: Entrecruzamiento de los polímeros lineales.

Penicilinas y cefalosporinas alteran la formación de la pared bacteriana dando lugar a paredes defectuosas que no impiden la agresión del medio sobre la célula bacteriana, lo que acaba por provocar la muerte de ésta. Actúan inhibiendo el enzima muramiltranspeptidasa, que cataliza la formación de los enlaces peptídicos entrecruzados de las cadenas lineales de peptidoglicano.

Hasta ahora, éste había sido el único mecanismo aceptado para la acción de las penicilinas. Sin embargo, este único efecto no llega a explicar adecuadamente el efecto bactericida de estos antibióticos. En efecto, la

morfogénesis en la pared bacteriana no sólo precisa la adición biosintética de nuevas subunidades de peptidoglicano, sino que también es necesario romper las conexiones de la pared antigua. Se ha observado que cada célula bacteriana contiene un determinado número de enzimas específicas, que son susceptibles de ser inactivadas por las penicilinas (a las que se ha denominado "proteínas de fijación de penicilinas" o PBP, en inglés). Estos enzimas varían de una especie a otra, lo que explica el diferente grado de actividad de las diversas penicilinas sobre los microorganismos (Tomasz, 1983).

En lo concerniente a la capacidad de los antibióticos β -lactámicos para actuar sobre los distintos grupos de microorganismos, podemos afirmar que su grado de selectividad es muy variable, sobre todo si lo referimos a actividades útiles a nivel terapéutico. Así, mientras penicilinas tipo Penicilina G son especialmente útiles frente a bacterias Gram (+), las carboxipenicilinas centran mayoritariamente su actividad a nivel de gérmenes Gram (-) y otros grupos de penicilinas muestran espectros intermedios. Las cefalosporinas tienen un espectro más amplio y son útiles en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram (-). El sector de las penicilinas y cefalosporinas semisintéticas es hoy día una fuente continua de nuevos antibióticos con la que se pretende extender el espectro de acción a microorganismos que no son susceptibles a las penicilinas que actualmente se utilizan.

I.A.4. Ruta biosintética de los antibióticos β -lactámicos

No se conoce ningún microorganismo capaz de llevar a cabo la biosíntesis de ambos tipos de β -lactamas (hidrofóbicas e hidrofílicas), si bien la ruta biosintética consta de una serie inicial de reacciones comunes que conducen a la producción de isopenicilina N, intermediario para las dos clases de antibióticos β -lactámicos.

La rama izquierda de la figura I-2, que conduce a la formación de penicilina hidrofóbicas, corresponde a hongos filamentosos tipo Penicillium. La rama derecha, por el contrario, da lugar a β -lactamas hidrofílicas, y es propia de Cephalosporium y actinomicetos.

Los hongos sólo pueden realizar esta ruta hasta la producción de cefalosporina C, mientras que los actinomicetos pueden avanzar un poco más hasta llegar a producir 7-metoxiderivados de la cefalosporina C (cefamicinas).

La detección de los intermediarios de esta ruta ha sido una tarea ardua, debido a que se encuentran en las células en concentraciones muy bajas.

La ruta común para ambos tipos de β -lactamas (como se explicará más adelante) comienza con condensación de tres aminoácidos pertenecientes al metabolismo primario: ácido L- α -aminoadípico (L- α -AAA), cisteína y valina, originando el tripéptido α -aminoadipil-cisteinil-valina (ACV). Este compuesto va a sufrir una doble ciclación para originar la primera sustancia de la ruta con actividad antibiótica: la isopenicilina N (Martín et al., 1979; De-

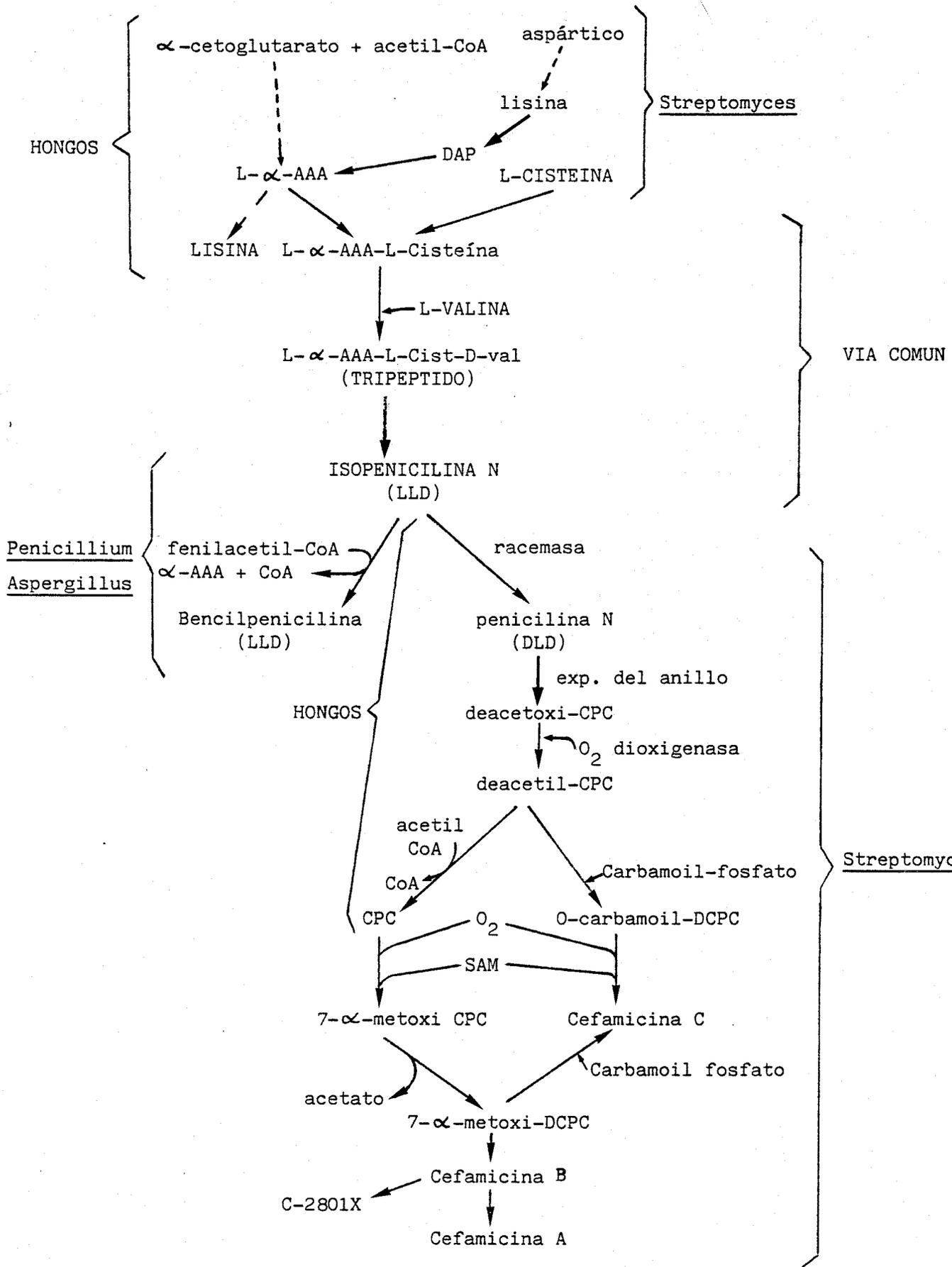


Fig. I.2. Esquema general de biosíntesis de los antibióticos β -lactámicos.

main, 1983). Este compuesto constituye el punto de ramificación de la vía biosintética. Los organismos productores de β -lactamas hidrofóbicas (tipo Penicillium) intercambian la cadena lateral de la isopenicilina N (el ácido L- α -aminoadípico) por otras que se añaden al medio de cultivo (ácido fenilacético, ácido fenoxiacético, etc.). Las especies que generan β -lactamas hidrofílicas provocan isomerización del L- α -aminoadípico a su forma D, lo que hace que la isopenicilina N se convierta en penicilina N y, a continuación, la expansión del anillo del 6-APA para dar lugar al 7-ACA, núcleo central de las cefalosporinas. Estos pasos son los comunes a todos los hongos productores de β -lactamas hidrofílicas (tipo Cephalosporium). No obstante, los organismos tipo Streptomyces son capaces de continuar la ruta hasta conducir a la formación de cefamincinas.

I.A.5. Ruta biosintética de las penicilinas hidrofóbicas

I.A.5.1. Aminoácidos precursores

La estructura central de la molécula de las penicilinas se origina mediante el concurso de tres aminoácidos: α -aminoadípico, cisteína y valina. Los tres van a intervenir en su forma isomérica L, si bien la valina va a sufrir una isomerización a la forma D, previa a su incorporación.

Estos compuestos proceden del metabolismo primario de la célula, motivo por el cual no son generalmente factores limitantes en la producción del antibiótico (Drew y Demain, 1977; Martín y Liras, 1981). Por esta razón, su adición al medio de fermentación no se traduce en un aumento en la formación de penicilina.

Durante los primeros estudios de la ruta biosintética se obtuvieron evidencias de la incorporación de cisteína radiactiva intacta en la molécula de penicilina (Arnstein y Grant, 1954 a y b). Un método similar se empleó para comprobar la utilización de la molécula completa de valina en la biosíntesis de penicilina, concretándose que el aminoácido se incorporaba en forma D previa isomerización de la forma L (Stevens et al., 1956; Arnstein y Clubb, 1957; Arnstein y Margreiter, 1958).

Los primeros indicios de la participación del ácido α -aminoadípico en la ruta biosintética de la penicilina se obtuvieron al observarse que un 25% de los mutantes de Penicillium notatum auxótrofos de lisina no producían antibióticos. Esto llevó a postular (Bonner, 1947) la existencia de un precursor común a lisina y penicilina. Demain (1957) encontró que la lisina inhibía fuertemente la síntesis de penicilina por Penicillium chrysogenum. Cuando, en años posteriores, se dilucidó la ruta biosintética de la lisina en hongos, pudo establecerse que el ácido α -aminoadípico era un intermediario de la misma. Asimismo, se comprobó que el α -AAA no sólo revertía el efecto inhibitorio que la lisina ejercía sobre la formación

de penicilina, sino que estimulaba la síntesis del antibiótico en ausencia de este aminoácido (Somerson et al., 1961). A partir de esta evidencia y de otras posteriores se demostró la participación del α -aminoadípico como precursor común a las rutas biosintéticas de penicilina y de lisina en hongos (Luengo et al., 1979; 1980).

I.A.5.2. Precursores de la cadena lateral

Los primeros estudios relativos a los precursores de la cadena lateral de la molécula de penicilina condujeron al descubrimiento de la estimulación que el ácido fenilacético ocasionaba sobre la producción de antibiótico cuando dicho ácido se añadía a la fermentación, de forma que su presencia en el medio era el verdadero factor limitante de la biosíntesis de penicilina (Higuchi et al., 1946). De igual modo, se comprobó la incorporación de otros ácidos orgánicos a la molécula de penicilina, aunque ninguno de ellos lo hacía con el elevado rendimiento que el fenilacético.

Como norma general, los precursores de la cadena lateral se adicionan al medio de producción en forma de sal sódica o potásica, derivados de etanolamina, etc., dada la elevada toxicidad del ácido a pH bajo (Behrens et al., 1948; Halliday y Arnstein, 1956). La relativa inespecificidad que el complejo enzimático biosintético muestra por la cadena lateral ha sido aprovechada variando la naturaleza del precursor de la cadena lateral que se

añadía al medio de fermentación. De esta forma, se ha obtenido una gama de penicilinas tan amplia como el número de precursores susceptibles de ser incorporados (Tabla I.1) La elección de un precursor de la cadena lateral ha de hacerse de acuerdo con las características del antibiótico a obtener, ya que de dicho precursor van a depender parámetros fundamentales de la penicilina obtenida, tanto a nivel físico-químico como terapéutico (Demain, 1966).

Como características ideales de un precursor de la cadena lateral pueden considerarse las siguientes:

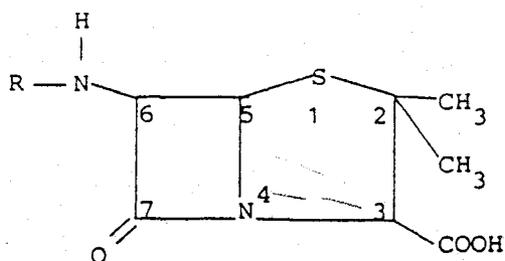
- a) que no sea tóxico para el hongo productor del antibiótico.
- b) que sea resistente a las oxidaciones biológicas.
- c) que esté sustituido en el carbono β pero no en el α , para que la eficiencia de su incorporación en penicilina así como su actividad antimicrobiana sean óptimas (Johnson, 1952).

I.A.5.3. El tripéptido ACV como precursor

Una vez confirmada la participación de los aminoácidos cisteína, valina y α -aminoadípico, quedaba por ver el mecanismo por el cual estas tres moléculas se incorporaban al ciclo biosintético de la penicilina.

Mediante estudios de incorporación de (^{14}C)valina en posibles precursores de la penicilina que presentaran algún resto de cisteína en su molécula, se encontró un tripéptido que contenía estos dos aminoácidos junto

Tabla I.1: Penicilinas naturales y biosintéticas



Penicilinas

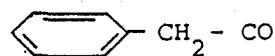
R

a. Naturales

6-aminopenicilánico (6-APA)

H

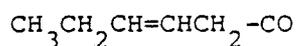
Benzil (G)



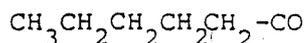
p-hidroxibenzil (X)



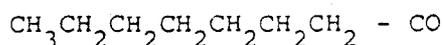
2-pentenil (F)



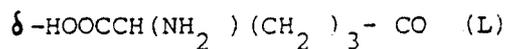
n-amil (dihidro F)



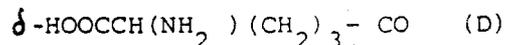
n-heptil (K)



L- α -(δ -aminoadipil) (iso-N)

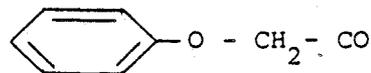


D- α -(δ -aminoadipil) (N)

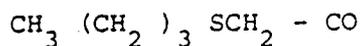


b. Biosintéticas

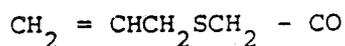
Fenoximetil (V)



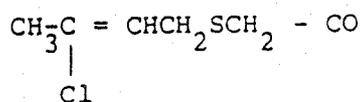
Butiltiometil (BT)



Aliltiometil (O)



3-cloro-2buteniltiometil



con el ácido α -aminoadípico (Arnstein et al., 1960).

Las cantidades detectadas fueron muy reducidas y sólo permitieron establecer la secuencia del tripéptido, la cual resultó ser α -aminoadipil-cisteinil-valina, sin poder concluir ningún dato sobre la configuración de cada uno de los aminoácidos. Loder y Abraham (1971b) consiguieron dilucidar esta última incógnita a partir del tripéptido que ellos obtuvieron en cultivos de Acremonium chrysogenum. Utilizando técnicas de espectrometría de masas determinaron la configuración de los 3 aminoácidos en el tripéptido era el LLD. Este resultado se confirmó posteriormente para el ACV obtenido en fermentaciones de P. chrysogenum (Adriaens et al., 1975b, Fawcett et al., 1976, Chan et al., 1976), Streptomyces clavuligerus (Abraham, 1978), Paecilomyces persicinus (Eriquez y Pisano, 1979) y otras especies productoras de antibióticos β -lactámicos.

Se pueden aducir algunas pruebas que corroboran el carácter de precursor que tiene el ACV:

1. Los mutantes de P. chrysogenum auxótrofos de lisina son incapaces de sintetizar penicilina ni tripéptido ACV. Dado que, como vimos anteriormente, el α -aminoadípico es un intermediario de la biosíntesis de lisina, es comprensible que los mutantes bloqueados a un nivel anterior a la formación de α -AAA no pueden formar ACV ni, como consecuencia, antibiótico.
2. La fusión de dos mutantes, uno no productor de penicilina pero sí de ACV y otro no productor de am-

bos metabolitos, condujo a la formación de un heterocarionte capaz de sintetizar ACV y penicilina (Nash et al., 1974). El primero de los mutantes no era capaz de ciclar el ACV aunque sí de sintetizarlo, mientras el segundo era capaz de ciclarlo pero no de sintetizarlo. Así, al poseer el heterocarionte ambas actividades la ruta biosintética del antibiótico resultaba completada. Resultados análogos obtuvieron Normansell et al., (1979), con mutantes no productores de P. chrysogenum.

3. Tanto en Penicillium como en Acremonium se han encontrado mutantes no productores que acumulan ACV y que no producen penicilinas ni cefalosporinas. Este hecho es indicativo de que el tripéptido es un precursor común de la biosíntesis de ambos tipos de antibióticos.

La prueba definitiva, que demuestra el carácter precursor del ACV se ha establecido mediante la ciclación del mismo (sintetizado químicamente) para originar isopenicilina N, llevada a cabo por extractos de Penicillium (Meesschaert et al., 1980; Hollander et al., 1984; Ramos et al., 1984).

I.A.5.4. Péptidos relacionados con el ACV

Durante los trabajos de aislamiento y purificación del ACV, Loder y Abraham (1971a) encontraron dos te-

trapéptidos a los que denominaron P_1 y P_2 . La secuencia del P_1 era α -aminoadipil-cisteinil- β -hidroxivalinil-glicina, mientras que para el P_2 era α -aminoadipil-cisteinil-valinil-glicina. Ambos péptidos se encontraron junto con el ACV en una proporción 1:2:10 respectivamente.

El papel que estos tetrapéptidos juegan en la ruta biosintética de la penicilina permanece sin dilucidar. A este respecto, Baldwin et al. (1980) propusieron un péptido que contuviera dehidrovalina, la cual convertiría a este último en un precursor de la cefalosporina C y al tetrapéptido P_2 en precursor de la penicilina N. No obstante, no se ha conseguido aislar ningún péptido con dehidrovalina que confirme las suposiciones de Baldwin.

En mutantes de C. acremonium no productores de antibiótico se han aislado péptidos directamente relacionados con el ACV, tales como ACV dímero (dos monómeros unidos por un puente disulfuro), ACV-metanotiol, ACV N-acetilado, ACV N-N-diacetilado y n-acetil-ACV-metanotiol dímero (Fujisawa, 1977).

Los derivados disulfuro pueden originarse por oxidación enzimática o no enzimática, como ocurre con el glutatión, péptido estrechamente relacionado con el ACV. Si bien se ha detectado la presencia de glutatión reductasa en P. chrysogenum (Woodin y Segel, 1968), aún no se ha encontrado el enzima análogo que transforme el dímero de ACV en monómero. Por otro lado, los restos metanotiol y n-acilo no parecen estar relacionados directamente con la formación de β -lactamas (Shirafuji et al., 1979).

Otro grupo de péptidos similares al ACV que no podrían ser ciclados por no presentar azufre en su estructura ha sido descrito por Neuss et al., (1980) en mutantes de Penicillium no productores de penicilina. Entre ellos se identificaron los siguientes: α -aminoadipil-serinil-valina, α -aminoadipil-serinil-isodehidrovalina y α -aminoadipil-alanil-valina. La presencia de estas moléculas podría ser un indicio de la baja especificidad del complejo enzimático encargado de la síntesis del ACV, característica que es común en enzimas que transforman metabolitos primarios en antibióticos (Queener et al., 1978). Un fenómeno similar ocurre en el caso de la glutatión sintetasa (Nishimura et al., 1964).

Por último, conviene hacer notar que en la mayor parte de los microorganismos mencionados se han detectado notables cantidades del tripéptido glutatión. La similitud estructural entre ACV y glutatión hace que los procesos de purificación de ambos sean similares y aparezcan conjuntamente en todos ellos. Esta semejanza no se limita a la estructura química, sino que se extiende al proceso de biosíntesis de los mismos (López-Nieto, 1984).

I.A.5.5. Biosíntesis del tripéptido ACV

Las distintas hipótesis referentes al esquema de condensación de los aminoácidos α -aminoadípico, cisteína y valina para originar ACV, tienen en común la proposición de un modelo no ribosomal para la explicación de dicho proceso (Martín et al., 1979).

Los estudios de incorporación "in vivo" de precursores radiactivos mostraron, desde un principio, que los tres aminoácidos antes citados pasaban rápidamente a formar parte de la molécula de ACV. La forma L del α -aminoadípico era incorporada con mejor rendimiento que la forma D, a pesar de que esta última era la forma isomérica encontrada en la penicilina N producida por Acremonium. Si bien el resto de valina terminal del ACV presenta la configuración D, la incorporación del aminoácido al tripéptido se hace en su forma L (Adriaens et al., 1976), sufriendo posteriormente un proceso de epimerización. La D-valina no se incorpora como tal al ACV e, incluso, se comporta como inhibidor de la síntesis del tripéptido (De-main, 1956). En lo que respecta a la cisteína, su incorporación al ACV se realiza exclusivamente en la forma L.

Los trabajos referentes a la incorporación de dipéptidos radiactivos en el ACV dieron como resultado que, independientemente de la naturaleza de los dipéptidos, éstos eran hidrolizados previamente a su incorporación por el micelio. La causa de este fenómeno se estableció en la baja permeabilidad que el micelio posee hacia esos dipéptidos (Adriaens et al., 1978 ; Loder et al., 1969).

Se ha conseguido la síntesis de ACV utilizando extractos acelulares en presencia de α -AAA, cisteína, valina y de un sistema generador de energía. Los extractos acelulares utilizados provenían de micelio sometido a diversos tratamientos de rotura y de protoplastos lisados por procedimientos suaves (Abraham, 1974).

La teoría que propone el dipéptido cisteinil-valina (CV) como intermediario en la biosíntesis de ACV bien como resultado de un proceso de reacción secuencial (Bicroft y Taylor, 1981), bien como sustrato de una trans-peptidización similar a la del dipéptido cisteinil-glicina en el caso del glutati6n (Arnstein y Morris, 1960), no parece contar con resultados experimentales que la corroboren. El modelo m1s aceptado actualmente propone un sistema de incorporaci6n secuencial en dos pasos consecutivos. En el primero de ellos se produce la condensaci6n de α -aminoadípico y cisteína, para originar el dipéptido α -aminoadipil-cisteína (AC); y en el siguiente se incorpora el resto de valina para formar ACV.

Con respecto al mecanismo de incorporaci6n de L-valina al ACV a6n no se ha aclarado c6mo se produce la epimerizaci6n del aminoácido a su forma D. Se ha propuesto la formaci6n de un intermediario activado de la L-valina, posiblemente adenil-valina, unido no covalentemente al enzima (ACV sintetasa), y posterior formaci6n de un enlace tioéster covalente con el enzima. El tioéster-D-valina reaccionaría con la forma activa de AC para dar lugar al tripéptido ACV unido al enzima, del que se liberaría por hidrólisis subsiguiente (Laland et al., 1978; Martín et al., 1979).

A grandes rasgos, el proceso de biosíntesis del ACV sigue la misma secuencia que el glutati6n (γ -glutamil-cisteinil-glicina): activaci6n del aminoácido inicial e incorporaci6n del segundo aminoácido para formar el dipép-

tido, a cuya forma activa se adiciona el tercer aminoácido. Esta es otra de las concordancias existentes entre las rutas metabólicas de ambos tripéptidos, algunas de las cuales se discuten a lo largo del presente trabajo.

I.A.5.6. Ciclación del ACV a isopenicilina N.

Esta etapa representa la última de las actividades enzimáticas implicadas en la ruta común de la biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas.

En extractos de A. chrysogenum, los primeros estudios sobre este proceso indicaron la utilización de forma exclusiva del isómero LLD del ACV, mientras que los otros isómeros no eran transformados (Fawcett et al., 1976). Se observó, asimismo, que la incorporación de (^{14}C) α -aminoadipil-cisteinil-valina-(^3H -metil) en isopenicilina N se llevaba a cabo en una proporción $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ idéntica a la inicial en ACV, lo que indicaba que éste se transformaba directamente en isopenicilina N sin ningún tipo de alteración (O'Sullivan et al., 1979).

En nuestro departamento, este proceso ha sido descrito en extractos de P. chrysogenum, y se ha aislado y caracterizado la actividad enzimática responsable del mismo (Ramos, 1984; Ramos et al., 1984).

Diversos autores han estudiado este proceso mediante extractos obtenidos por lisis de protoplastos de Acremonium chrysogenum y por rotura mecánica de las células vegetativas (Huddleston et al., 1980). El rendimiento

de la reacción se incrementaba en presencia de Fe^{++} , ditiotreitól y ascorbato (Sawada et al., 1980, Abraham et al., 1981).

I.A.5.7. Mecanismo de la formación de isopenicilina N

I.A.5.7.1. Formación del anillo β -lactámico

Una de las primeras hipótesis acerca de este paso fué la que propugnaba la participación de un intermediario con un resto dihidrocisteína como posible precursor de la isopenicilina N. Sin embargo, los estudios de incorporación de cisteína radiactiva descartaron esta teoría (Arnstein y Grant, 1954b; Bycroft et al., 1975).

La ciclación completa del tripéptido ACV para dar isopenicilina N requiere la pérdida de dos átomos de hidrógeno por cada anillo. Se ha comprobado que la cisteína radiactiva se incorpora intacta a la molécula de isopenicilina N (Young et al., 1977; Huddleston et al., 1978), si bien esto no aclara si se produce una estructura lineal intermediaria, para originar una β -lactama monocíclica, o un intermediario cíclico que da lugar simultáneamente a los dos anillos β -lactámico y tiazolidínico.

El proceso de formación del anillo β -lactámico es estereoespecífico y sigue el mismo mecanismo tanto en especies de Penicillium y Cephalosporium (Adriaens et al., 1975a; Morecombe y Young, 1975) como en Streptomyces (Whitney et al., 1972).

Estudios realizados en extractos de P. chrysogenum han demostrado la presencia de un intermediario denominado compuesto "Y" (Meesschaert et al., 1980) que posee la estructura L- α -aminoadipil-L-ciclocisteinil-D-valina (azetidionona). Este tipo de compuestos no ha sido identificado en cultivos de Acremonium (Demain et al., 1982). De todos modos, existen dudas sobre el carácter intermediario de esta molécula, ya que se ha demostrado que las estructuras tipo azetidionona no son convertidas en penicilinas (Baldwin y Jung, 1978).

Entre los mecanismos propuestos para explicar la transformación del ACV en un intermediario monocíclico (Queener y Neuss, 1982) se pueden citar los siguientes:

1. Hidroxilación en el C-3 del resto de cisteína del ACV y posterior activación de este grupo con retención de la configuración estérica.
2. Formación de un tioaldehído por deshidrogenización del enlace C-5.
3. Oxidación del nitrógeno del resto de valina del ACV, originando un ácido hidroxámico. Esta hipótesis se apoya en el modelo químico de la reacción y en la existencia de ácidos hidroxámicos sustituidos como productos naturales, aunque este tipo de compuestos no ha sido encontrado en fermentaciones de microorganismos productores de penicilinas.

I.A.5.7.2. Formación del anillo tiazolidínico

Los estudios de incorporación de valina radiactiva en penicilinas indican que toda la molécula de valina es retenida salvo un átomo de H que se pierde (Aberhart

et al., 1974), lo que invalidaba la hipótesis de la existencia de un intermediario con un resto isodehidrovalina.

Fawcett et al., (1976) confirmaron que la formación del anillo tiazolidínico no conlleva la participación de un intermediario 2-3 dehidrovalina en extractos de Acremonium. Resultados similares fueron obtenidos por Meesschaert et al., (1980) utilizando extractos de P. chrysogenum.

Los estudios mediante resonancia magnética nuclear (MMR) llevados a cabo en penicilinas marcadas con ^{13}C mostraban que la estereoquímica del C-3 de la valina era la misma que el C-2 de la penicilina (Neuss et al., 1973), lo que confirmaba que la configuración del C-3 de la valina es mantenida a través de todos los intermediarios.

Se han propuesto varios mecanismos de cierre del anillo tiazolidínico que implican la deshidrogenación de un intermediario (Baldwin y Wan, 1979), y también hidroxilaciones en algún punto (Aberhart, 1967), si bien no han sido hallados intermediarios que corroboren alguno de dichos procesos. Los tetrapéptidos hallados por Loder y Abraham (1971a) no son convertidos a isopenicilina N por extractos acelulares de A. chrysogenum (Bahadur et al., 1981).

I.A.5.8. Especificidad de la isopenicilina N sintetasa

La ciclación del tripéptido ACV para originar los anillos β -lactámico y tiazolidínico es llevada a cabo

por la enzima denominada isopenicilina N sintetasa (ciclasa). Esta actividad ha sido parcialmente purificada en Acremonium chrysogenum y se ha demostrado que su especificidad respecto al sustrato es muy baja, pues reacciona con análogos del ACV en los que el resto de valina es sustituido por isoleucina y produce una sustancia con actividad antibiótica (Abraham et al., 1981; Bahadur et al., 1981). Aquellos tripéptidos en los que el α -aminoadípico es sustituido por glutámico o la cisteína lo es por α -aminoadípico es sustituido por glutámico o la cisteína lo es por α -aminobutírico, serina o alanina, no son convertidos en productos activos (Demain et al., 1982). Recientemente, Wolfe et al., (1984), han logrado la ciclación del tripéptido LLD-carboximetil-cisteinil-valina utilizando extractos de C. acremonium.

I.A.5.9. Conversión de isopenicilina N en las diferentes penicilinas hidrofóbicas

Como vimos anteriormente, la ruta biosintética de los antibióticos β -lactámicos es común hasta el intermediario isopenicilina N. En este punto la ruta se bifurca en dos vías correspondientes a β -lactamas hidrofóbicas y β -lactamas hidrofílicas. Dado que en el presente trabajo sólo se ha utilizado P. chrysogenum, especie productora de penicilinas hidrofóbicas, vamos a centrar nuestra atención en la ruta de este tipo de antibióticos.

TABLA I-2

Especificidad para el sustrato de la isopenicilina N
sintetasa de *A. chrysogenum*

Sustrato	Formación de producto activo
L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina	+
L- γ -glutamil-L-cisteinil-D-valina	-
Adipil-L-cisteinil-D-valina	+
L- α -aminoadipil-L-aminobutiril-D-valina	-
L- α -aminoadipil-L-serinil-D-valina	-
L- α -aminoadipil-L-alanil-D-valina	-
L- α -aminoadipil-L-cisteinil-L-valina	-
L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-isoleucina	+
L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-aloisoleucina	+
L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D- α -aminobutírico	+
δ -N-acetil-ACV	+
Glicil-ACV	+

Según Demain et al., 1982.

El mecanismo por el cual la isopenicilina N es convertida en penicilinas hidrofóbicas sigue siendo objeto de viva controversia entre los investigadores del tema.

Las distintas penicilinas producidas en fermentaciones a las que no se ha añadido ningún tipo de suplementación se denominan penicilinas naturales, en tanto que aquellas que se producen en medios adicionados de precursores de la cadena lateral, se conocen como penicilinas de biosíntesis dirigida.

Cuando se estudiaron los productos que se acumulaban en fermentaciones en ausencia de precursores de la cadena lateral, se descubrió que el producto mayoritario en tales condiciones era el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) (Kato, 1953; Demain, 1959; Kitano et al., 1975). Este intermediario no ha sido hallado en caldos de fermentación de hongos no productores (Cole, 1966).

No está aclarado si el 6-APA juega algún papel en la síntesis "de novo" de las penicilinas hidrofóbicas. Wolff y Arnstein (1960) no consiguieron encontrar un compuesto intermediario entre el 6-APA y la bencilpenicilina. La teoría más aceptada al respecto propone que el 6-APA es un metabolito producido por desacilación de la isopenicilina N en las fermentaciones sin precursor de la cadena lateral (Murao, 1955; Erickson y Bennett, 1965). Ello implicaría que las reacciones terminales de la biosíntesis de penicilinas hidrofóbicas consisten en intercambios entre el α -aminoadípico y las diferentes cadenas laterales.

La adición de precursores de la cadena lateral a las fermentaciones no sólo activa la formación de una penicilina específica, sino que también incrementa la producción total de antibiótico (Singh y Johnson, 1948). Este fenómeno indica que el verdadero factor limitante en la formación de penicilinas es la síntesis del precursor de la cadena lateral. El número de precursores de la cadena lateral que pueden ser utilizados es muy elevado, lo que indica una baja especificidad de la unión de la cadena lateral al 6-APA (Demain, 1966). Estos precursores son, generalmente, derivados monosustituídos del ácido acético.

En resumen, podemos concluir que las reacciones terminales de la biosíntesis de penicilinas hidrofóbicas implican la existencia de la isopenicilina N como intermediario obligado, además de la presencia de las siguientes actividades enzimáticas: R-acetil:CoA ligasa; Amidoliasa; Acil CoA:6-APA Aciltransferasa.

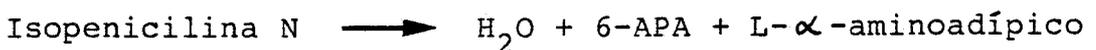
I.A.5.10. R-acetil:Coenzima A ligasa

La existencia de esta enzima ha sido demostrada en extractos de P. chrysogenum (Brunner et al., 1968) y aparece al inicio de la síntesis de penicilina, manteniéndose durante su formación. Esta actividad enzimática une un resto acetilmonosustituído al Coenzima A en presencia de ATP y tiene un pH óptimo de 6,5, aceptando por igual fenilacético, fenoxiacético y otros restos acetato sustituidos (Brunner y Rohr, 1975).



I.A.5.11. Isopenicilina N amidoliasa

Estudios realizados por Friedrich y Demain (1978) midiendo la incorporación de ^{14}C α -aminoadípico, su concentración intracelular y la formación de ^{14}C -cetoadípico, concluyeron que por cada molécula de α -aminoadípico utilizada podían sintetizarse 10 moléculas de Penicilina G en una cepa de baja producción. Sin embargo, Brundidge et al., (1980) observaron en cepas de alta producción que la cantidad de penicilina V formada era igual a la de 6-oxopiperidincarboxilato formado por ciclación del α -aminoadípico de la cadena lateral de isopenicilina N. Esta actividad indicaba la existencia del enzima isopenicilina N amidoliasa, con actividades amidohidrolasa y amidociclo-liasa.



Por otro lado, (Meesschaert et al., (1980) encontraron que extractos de P. chrysogenum formaban (3H)-6-APA a partir del intermediario monolactámico tritiado "Y", en presencia de 6-APA no marcado. Asimismo, este extracto era capaz de formar isopenicilina N tritiada a partir de α -aminoadípico y 6-APA tritiado. Estos experimentos indicaban la presencia de otra nueva actividad enzimática relacionada con la biosíntesis de penicilina y que se conoce como isopenicilina N : 6-APA aciltransferasa. Experimentos realizados con los mismos extractos en presencia de (3H)-

6-APA y (^{14}C)ACV conducían a la formación de (^3H - ^{14}C)isopenicilina N; la explicación de este fenómeno venía dada por la conversión de (^{14}C)ACV en (^{14}C)isopenicilina N seguida del intercambio de la cadena lateral entre ésta y el (^3H)6-APA.

I.A.5.12. Acil-Coenzima A:6-APA aciltransferasa

Loder (1972) demostró que la isopenicilina N estimula la incorporación de (^{14}C)fenilacetil-CoA en penicilina G, utilizando extractos crudos de P. chrysogenum y fracciones purificadas. Esto indicaba la existencia de una enzima soluble que intercambiaba la cadena lateral. La incorporación de fenilacetil-CoA tritiado en penicilina G también fue demostrada en Penicillium (Fawcett et al., 1975), y esta incorporación no tenía lugar sino en presencia de isopenicilina N.

Algo similar ocurría cuando se sustituía la isopenicilina N por el compuesto 6-APA.

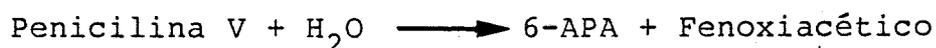


Estos experimentos indicaban la analogía entre Acil-CoA:Isopenicilina N aciltransferasa y Acil-CoA:6-APA aciltransferasa (Abraham, 1978). La actividad enzimática responsable de estos procesos no cataliza la reacción inversa ni la formación de penicilina G a partir de 6-APA y fenilacético; sin embargo, es capaz de intercambiar las cadenas laterales entre distintas penicilinas, salvo cuando una de ellas es isopenicilina N (Spencer y Maung, 1970;

Peterson y Wideburg, 1960; Pruess y Johnson, 1967).

I.A.5.13. Penicilina Acilasa

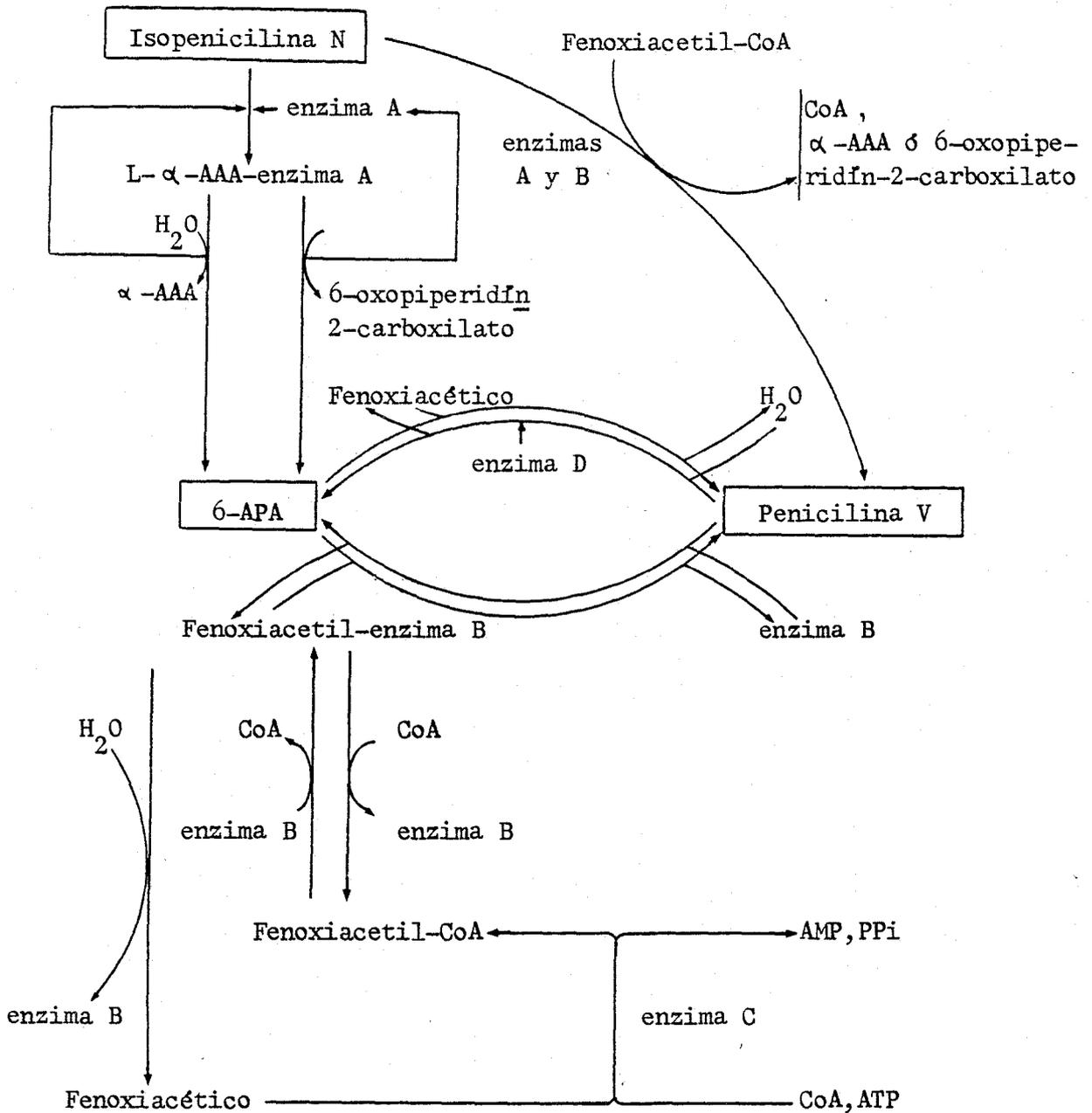
Los enzimas que rompen penicilinas dando origen al núcleo central 6-APA, y a la cadena lateral, se han denominado genéricamente acilasas (Cole et al., 1975) y han sido detectadas en un amplio número de hongos (Vanderhaeghe, 1975) y bacterias (Vandamme, 1977), incluyen do a microorganismos no productores de β -lactamas. En 1966, Cole determinó que el micelio lavado de P. chrysogenum cataliza la formación de 6-APA a partir de penicilina V en un proceso que se desarrolla como sigue:



I.A.5.14. Modelo de conversión enzimática de isopenicilina N en las diferentes penicilinas hidrofóbicas

Según se deduce de los estudios antes mencionados, al menos cuatro enzimas distintas están implicadas en la formación del 6-APA de las distintas penicilinas hidrofóbicas a partir de isopenicilina N: isopenicilina N amidoliasa, R-Acetil:CoA ligasa, AcilCoA:6-APA aciltransferasa y penicilina acilasa (Fig. I.5).

Aunque el proceso completo de reacciones finales de formación de penicilinas necesita de un estudio más profundo, puede afirmarse que sus bases generales están



Enzima A: Isopenicilina N amidoliasa

Enzima B: Acil-CoA:6-APA aciltransferasa (multiactiva)

Enzima C: R-acetil:CoA ligasa

Enzima D: Penicilina acilasa (reversible)

Fig. I-5. Modelo de conversión enzimática de isopenicilina N en las diferentes penicilinas hidrofóbicas.

establecidas. En la figura I.5 se recogen todas las actividades enzimáticas involucradas en la conversión de isopenicilina N en penicilinas hidrofóbicas, con las variantes mencionadas en esta presente introducción.

I.B. Glutación y ciclo del γ -glutamilo

I.B.1. Introducción

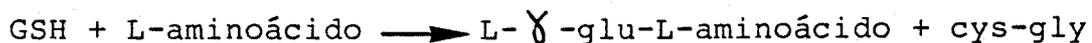
El glutati3n (GSH) es un compuesto ampliamente distribuido entre los seres vivos, tanto en c3lulas animales y vegetales como en microorganismos (Fahey et al., 1978; Fahey y Newton, 1984). Su estructura responde a la del trip3ptido lineal L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, la cual le hace poseedor de dos grupos que van a condicionar extraordinariamente sus caracter3sticas f3sico-qu3micas y biol3gicas: un grupo sulfhidrilo y un enlace γ -glutamilo.

Se encuentra intracelularmente en concentraciones relativamente altas (0,5-10 mM). El hecho de ser el tiol m3s abundante en la c3lula sugiere que este trip3ptido tiene importantes funciones biol3gicas, aunque no existen evidencias completas para todas las que se le han asignado. Entre las m3s relevantes de dichas funciones podemos citar las siguientes:

- a) mantenimiento de los grupos SH de las prote3nas y otras mol3culas.
- b) destrucci3n de per3xidos y radicales libres.
- c) catalizador de reacciones en las que intervienen grupos SH.

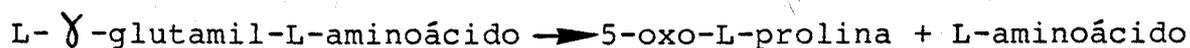
con extractos de riñón y páncreas, aunque trabajos posteriores mostraron que tal actividad estaba distribuída con profusión en tejidos de mamíferos, plantas y microorganismos.

El paso inicial en la ruptura del glutati3n es una reacci3n catalizada por el enzima γ -glutamyl transpeptidasa:



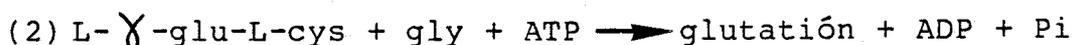
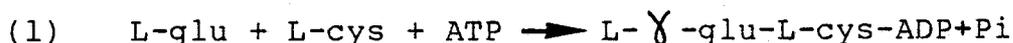
Trabajos posteriores establecieron: a) que la reacci3n catalizada por la γ -glutamyl transpeptidasa es reversible, b) que pueden utilizarse otros donadores del grupo γ -glutamilo, y c) que la enzima tambi3n cataliza la liberaci3n de glutamato a partir del donador. Se comprob3, asimismo, que la enzima est3 asociada a las membranas celulares de algunas estructuras epiteliales, lo cual se logr3 mediante procedimientos histoqu3micos e inmunocitoqu3micos (Spater et al., 1983).

La cisteinil-glicina formada en la reacci3n de transpeptidizaci3n es hidrolizada por una peptidasa, lo que origina los dos amino3cidos libres. Los γ -glutamyl-amino3cidos formados son convertidos en 5-oxoprolina y los correspondientes amino3cidos libres por la enzima soluble γ -glutamyl ciclotransferasa:



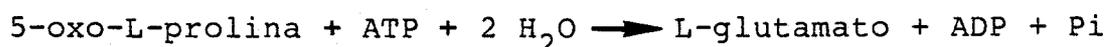
La activa presencia de las enzimas γ -glutamyl ciclotransferasa y γ -glutamyl transpeptidasa en el riñ3n,

un órgano que contiene una concentración importante de glutatión, condujo al estudio de la síntesis del glutatión en éste y otros tejidos. De esta forma se encontró que la síntesis del glutatión se llevaba a cabo mediante dos reacciones acopladas:



Estas reacciones son catalizadas por las enzimas γ -glutamyl-cisteína sintetasa (1) y glutatión sintetasa (2).

El hecho de que la 5-oxoprolina no se acumule normalmente en una cantidad apreciable en hígado, riñón, sangre u orina llevó a estudiar el metabolismo de este compuesto. Los trabajos llevados a cabo con (^{14}C)5-oxo-L-prolina mostraron rápidamente que dicha sustancia era metabolizada y convertida en glutamato cuando se incubaba con un extracto de células renales en presencia de Mg^{++} , ATP y un sistema generador de ATP. A la actividad responsable de esta transformación se la denominó 5-oxoprolinasa, concretándose que la reacción transcurría como sigue:



El descubrimiento de la reacción catalizada por la 5-oxoprolinasa demostró que existía un enlace metabólico entre las reacciones involucradas en la degradación del glutatión y las que catalizan su síntesis, e hizo posible visualizar un ciclo que necesita glutatión, ATP y

aminoácidos (Fig. I.6). La existencia de este ciclo "in vivo" se ha demostrado mediante la utilización de precursores y de inhibidores específicos (Meister, 1983; Viña et al, 1982).

I.B.3. Descripción de las principales enzimas del ciclo del γ -glutamilo

I.B.3.1. γ -glutamil-cisteína sintetasa

La enzima γ -glutamil-cisteína sintetasa ha sido aislada y purificada a partir de numerosas fuentes (hígado, riñón, eritrocitos humanos y bovinos, hongos) resultando ser la procedente del riñón de la rata la más activa de ellas.

Los valores de Km aparente para ATP, L-glutamato y L-cisteína son 0.2, 1.8 y 0.3 mM respectivamente, aunque la cisteína puede ser reemplazada por L- α -aminobutirato (Km, 3 mM); el uso de este compuesto elimina los riesgos que comparte la oxidación espontánea de la cisteína (Nishimura et al., 1964). Esta actividad no es capaz de utilizar el D-glutamato, el cual actúa de hecho como un potente inhibidor de la enzima (Nakayama et al., 1981).

Hay un gran número de aminoácidos que pueden servir como aceptores del resto γ -glutamilo. Su afinidad por dicho resto depende también de la presencia en el medio de reacción de cationes divalentes (Mg^{++} , Mn^{++}) (Orlowsky y Meister, 1971).

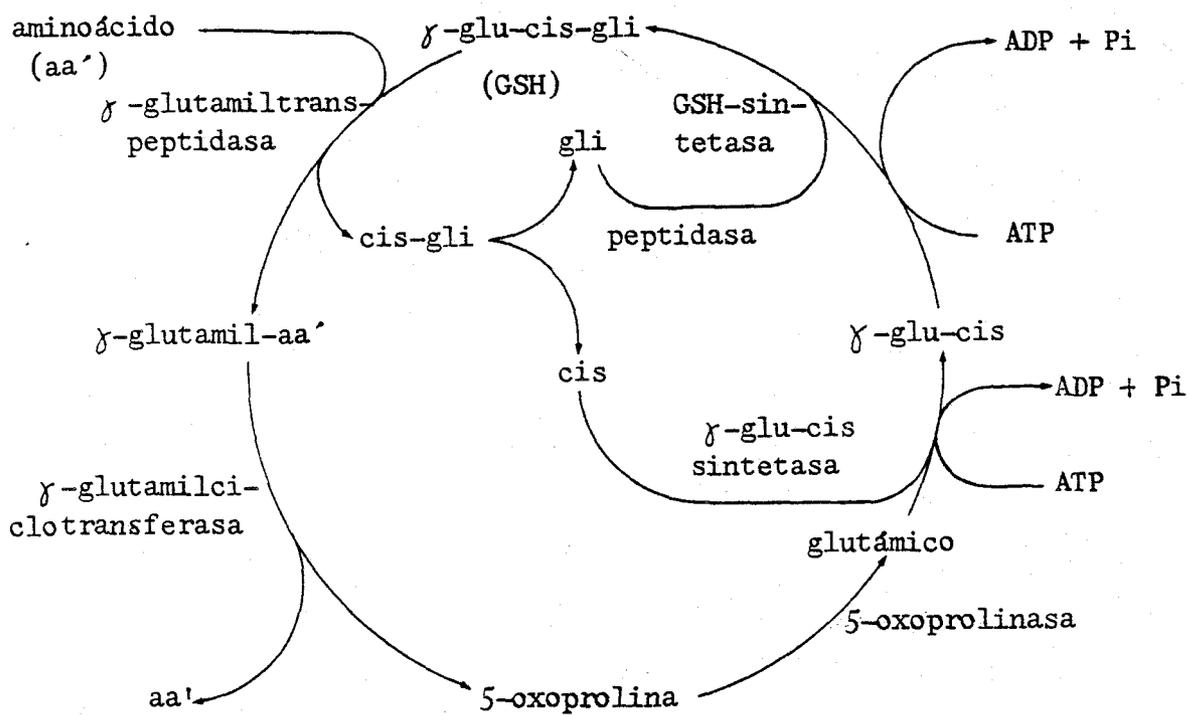


Fig. I.6. Esquema general del ciclo del γ -glutamilo.

La γ -glutamyl-cisteína sintetasa cataliza varias reacciones parciales que reflejan aspectos de su mecanismo catalítico normal. Esta enzima cataliza la incorporación de α -aminobutirato y glutamato en γ -glutamyl- α -aminobutirato en presencia de ADP y fosfato inorgánico. Aunque la enzima no cataliza intercambios ATP-ADP o ATP-Pi sí cataliza la formación de P_i a partir de ATP; esta reacción es activada por α -aminobutirato e inhibida por glutamato y por metionina-sulfoximina. La enzima exhibe actividad ATP-ásica, la cual es activada por α -aminobutirato e inhibida por ditiotreitol. La adición de glutamato al sistema inhibido por ditiotreitol conduce a la hidrólisis del ATP asociada a la formación de 5-oxoprolina.

Al igual que la glutamina sintetasa, la γ -glutamyl-cisteína sintetasa es inhibida por metionina-sulfoximina de forma competitiva, inhibición que da lugar a la aparición en el medio de reacción de metionina-sulfoximina fosfato. Esta es una de las pruebas que confirma la existencia de un intermediario fosforilado γ -glutamyl-fosfato en la reacción normal.

I.B.3.2. Glutación sintetasa

La glutación sintetasa ha sido estudiada en una gran variedad de preparaciones de tejidos de mamíferos, plantas superiores, levaduras y bacterias (Mooz y Meister, 1971). El peso molecular de las distintas enzimas se sitúa

entre 120.000 y 150.000, aunque en presencia de SDS se obtienen dos subunidades de peso molecular 60.000.

En contraste con la γ -glutamyl-cisteína sintetasa, la glutatión sintetasa es marcadamente estimulada por K^+ . La enzima utiliza también como sustratos los dipéptidos γ -glutamyl- α -aminobutirato y γ -glutamyl-alanina, y así cataliza la síntesis de los ácidos oftálmico y noroftálmico, respectivamente; actúa también sobre γ -glutamyl-serina, pero no sobre los γ -glutamyl derivados de leucina, valina, isoleucina, metionina, asparagina, prolina, lisina, fenilalanina y glicil-glicina. Dado que la γ -glutamyl-cisteína tiende a sufrir oxidación espontánea al correspondiente disulfuro, el cual no es sustrato del enzima, se suele utilizar γ -glutamyl- α -aminobutirato como sustrato en los ensayos de esta actividad. Los valores de K_m aparente para ATP, γ -glutamyl-cisteína, γ -glutamyl- α -aminobutirato y glicina son 0.36, 0.16, 0.60 y 2.3 mM, respectivamente, para la enzima de riñón de rata.

Estudios sobre el mecanismo de la reacción catalizada por esta enzima indican la formación de un intermediario acil-fosfato unido a la enzima (Nishimura et al., 1964). Al igual que otras sintetetasas de este tipo, también cataliza varias reacciones parciales. Por ejemplo, cataliza la formación de dipéptido hidroxamato a partir de glutatión e hidroxilamina, el intercambio de glicina en el tripéptido y la arsenolisis del mismo. Todas estas reacciones requieren la presencia de cantidades catalíticas de

nucleótido, iones de metales divalentes (Mg^{++} , Mn^{++}) y fosfato o arseniato. Asimismo, la enzima cataliza una lenta reacción ATP-ásica dependiente de dipéptido, la cual parece reflejar la formación y lenta hidrólisis del dipéptido fosfato intermediario.

I.B.3.3. γ -glutamil transpeptidasa

Al igual que en el caso de las anteriores, esta enzima ha sido obtenida de muy diversas fuentes, tales como riñón de mamíferos, hígado, vesículas seminales y tejidos fetales. Los métodos utilizados para separar la enzima de la membrana celular incluyen homogeneización mecánica, tratamiento con detergentes, solventes orgánicos y enzimas proteolíticas. El peso molecular de la enzima obtenida por estos métodos suele oscilar alrededor de 200.000, aunque pueden obtenerse preparaciones con un peso molecular de 68.000-90.000 cuando se utilizan proteasas durante el proceso de obtención. Esta forma ligera del enzima exhibe una mucho mayor actividad específica que la forma pesada. Las dos formas difieren significativamente en su contenido en aminoácidos e hidratos de carbono. La forma pesada puede ser convertida en la forma ligera por tratamiento con bromelaína; este procedimiento no afecta a la actividad enzimática total, pero incrementa considerablemente la actividad específica. El efecto de la pro-melaína se debe, probablemente, a la separación de la enzima de un complejo que contiene otras proteínas. Las pre-

paraciones de la forma pesada del enzima exhiben actividad dipeptidasa, un hecho consistente con esta interpretación.

Las especificidades de las preparaciones de γ -glutamil transpeptidasa obtenidas a partir de diversas fuentes son notablemente similares (Tate y Meister, 1975). Los mejores aminoácidos aceptores del grupo γ -glutamilo son los de naturaleza neutra: L-metionina, L-serina y L-alanina. Los aminoácidos de cadena ramificada, aspártico, treonina e histidina son menos activos, mientras que la L-prolina, D-aminoácidos y aminoácidos α -sustituídos son inactivos. La actividad observada con L-isoglutamina, glicinamida y L-metionina metil éster indica que la molécula de aceptor no necesita un grupo α -carboxilo libre. Varios dipéptidos pueden servir también como aceptores, y alguno de ellos con una gran actividad: glicil-glicina, glicil-L-alanina, L-glutamil-L-glutamina. Los péptidos que contienen D-aminoácidos son poco activos o inactivos.

La especificidad de la enzima con respecto al compuesto donador del γ -glutamilo es reducida, característica que ha sido aprovechada para utilizar sustratos que originen productos detectables por métodos colorimétricos. Los sustratos cromogénicos más utilizados para medir esta actividad han sido derivados de la anilina: N-(γ -glutamil)-anilida y γ -glutamil-p-nitroanilida (Orlowski y Meister, 1970).

Como donadores del grupo γ -glutamilo actúan la mayor parte de L- γ -glutamil-L-aminoácidos e incluso L- γ -glutamil-dipéptidos (Tate y Meister, 1974).

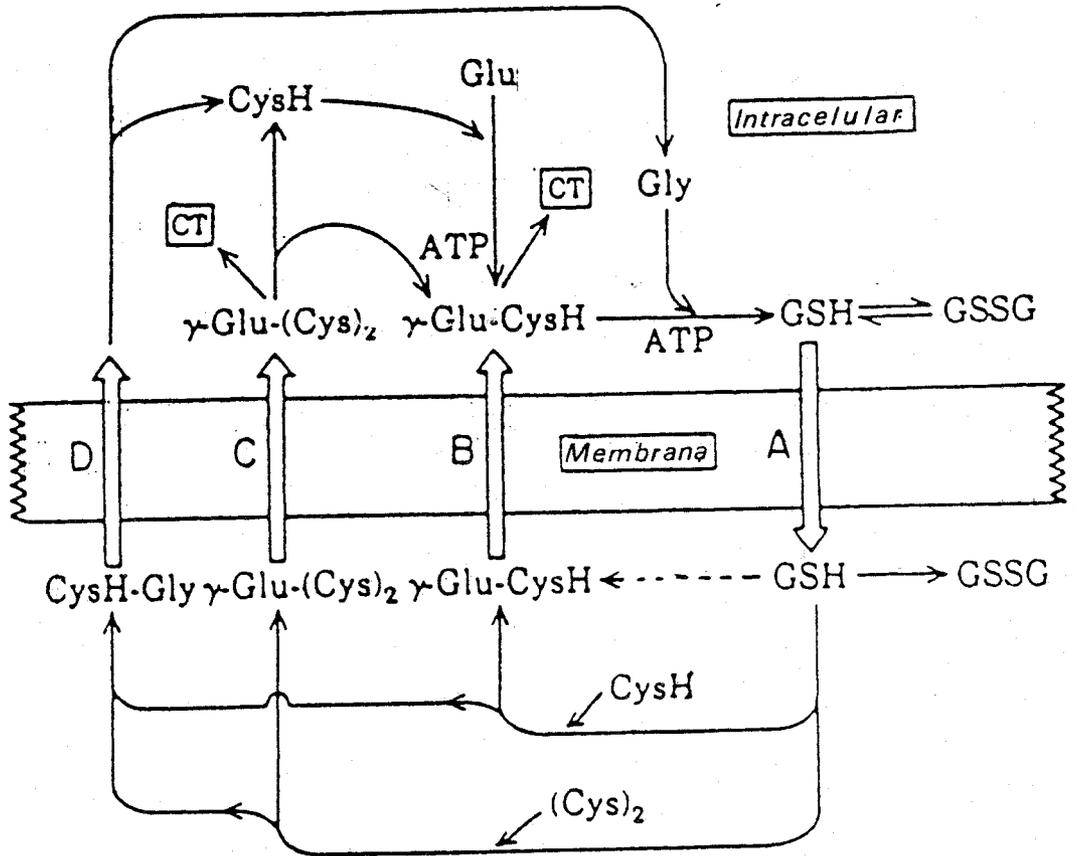


Fig. I.7. Localización celular e interconexiones de las diversas etapas del ciclo del γ -glutamilo.

Bajo ciertas condiciones, la transpeptidasa puede ser activada por Mg^{++} y también por cationes monovalentes incluyendo Na^+ y K^+ . Sin embargo, estos efectos sólo han sido observados con sustratos del tipo γ -glutamil-p-nitroanilida; no se han encontrado en estudios con glutatión como donador de γ -glutamilo y un aminoácido como aceptor.

Revel y Ball (1959) descubrieron que la γ -glutamil transpeptidasa es inhibida por L-serina en presencia de borato, aunque ninguno de los reactivos es capaz de inhibirla por sí solo. Se ha sugerido que se forma un complejo serina-borato que mimetiza la estructura del sustrato. En los últimos años se han descrito otros inhibidores, como derivados de sulfoftaleína, γ -glutamil-hidrazonas de α -cetoácidos, ácido kaínico (Lisy y Murphy, 1984), anthglutina y acivicina (Viña et al., 1983).

La L-glutamina es un débil donador de γ -glutamilo, pero la enzima cataliza la conversión de L-glutamina en γ -glutamil-glutamina y la hidrólisis de glutamina a glutamato en bajas proporciones. En presencia de maleato, la utilización de glutamina por la transpeptidasa aumenta varias veces y la hidrólisis ocurre en mayor proporción que la transferencia de γ -glutamil hidroxamato a partir de γ -glutamil derivados, o bien a partir de glutamina.

I.B.3.4. 5-oxo-L-prolinasa

Esta enzima ha sido aislada y purificada a partir de las mismas fuentes que las anteriormente descritas. Su

peso molecular determinado por filtración en gel, se ha establecido en 325.000. La actividad de la 5-oxo-L-prolinasa es óptima en presencia de iones K^+ (150-350 mM) o de NH_4^+ (25-35 mM) pero es nula cuando estos iones son reemplazados por Na^+ .

La hidrólisis de la 5-oxoprolina es de especial interés porque necesita energía. El equilibrio entre 5-oxoprolina y glutamato a valores de pH cercanos a la neutralidad se desplaza en favor de la ciclación. Durante la reacción, la hidrólisis de la 5-oxo-L-prolina está acoplada con la del ATP, aunque se han encontrado pruebas de que el proceso es reversible en cierta medida.

Con muy baja frecuencia se ha detectado en el ser humano un trastorno metabólico que se traduce en una excreción exageradamente anormal de 5-oxo-L-prolina. Este trastorno va asociado a desórdenes en el desarrollo mental del individuo, acidosis metabólica y otros perjuicios.

Estos hechos han sido explicados como producto de un bloqueo de la glutatión sintetasa, lo que origina un gran acúmulo intracelular del dipéptido γ -glutamil-cisteína. Dado que la γ -glutamil-cisteína es un buen sustrato de la γ -glutamil-ciclotransferasa, van a producirse importantes cantidades de 5-oxo-L-prolina, las cuales exceden la capacidad de la enzima 5-oxo-prolinasa para convertirlas en glutamato. La subsiguiente acumulación de 5-oxo-L-prolina unida al déficit de glutatión van a ser los causantes de los desórdenes fisiológicos anteriormente reseñados.

I.C. Objetivos del presente trabajo

El ciclo del γ -glutamilo en P. chrysogenum

Como vimos en la primera parte de esta Introducción, durante las etapas de aislamiento del tripéptido ACV se produce una purificación paralela del glutatión, ya que la similitud en su comportamiento físico-químico es extraordinaria. Por este motivo, el glutatión (obviamente, junto con el ácido glutámico) es el compuesto del ciclo del γ -glutamilo sobre el que más referencias se encuentran en la bibliografía sobre P. chrysogenum y otras especies productoras de β -lactamas.

A excepción de la glutatión reductasa (Woodin y Segel, 1968), no se han llevado a cabo trabajos concretos sobre las enzimas de este ciclo en P. chrysogenum, si bien en nuestro departamento se ha comprobado la presencia en P. chrysogenum de las enzimas γ -glutamil-cisteína sintetasa y glutatión sintetasa (López-Nieto, 1984).

El trabajo que abordamos en los próximos capítulos tiene por misión estudiar las características de la actividad γ -glutamil transpeptidasa en una especie productora de penicilinas hidrofóbicas e indagar acerca de su posible relación con la ruta biosintética del tripéptido precursor de dichos antibióticos.

Los objetivos perseguidos se han distribuido en los siguientes puntos:

- 1) Desarrollo de una técnica eficiente para la obtención de extractos acelulares activos de P. chrysogenum que nos

permitiera la valoración de esta actividad enzimática de forma rutinaria.

- 2) Determinación de las condiciones óptimas de ensayo de esta enzima (pH, temperatura, tiempo de reacción, etc.)
- 3) Estudio de la actividad frente a sustratos de diferente naturaleza.
- 4) Regulación "in vitro" de esta enzima; necesidad de cofactores, especificidad por el sustrato, etc.
- 5) Purificación parcial de esta actividad enzimática y determinación de algunos parámetros de interés.
- 6) Relación entre esta actividad enzimática y la producción de penicilina G a lo largo de la fermentación y en distintas condiciones de crecimiento.
- 7) Comparación de la actividad γ -glutamyl transpeptidasa en distintas cepas de P. chrysogenum, algunas de ellas no productoras de penicilina G.
- 8) Interacción de esta enzima con productos intermediarios de la ruta biosintética de la penicilina y estudio de una posible relación con la misma.

MATERIALES
Y
METODOS

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

II.1. Microorganismos utilizados

Penicillium chrysogenum AS-P-78, cepa de alta producción (aunque muy por debajo de las cepas utilizadas industrialmente) de penicilina (5.000 µg/ml de penicilina G, en fermentaciones realizadas en matraces), cedida por Antibióticos, S.A. de León con la que se ha llevado a cabo la mayor parte de este trabajo.

Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255, cepa de producción media de penicilina G (800 µg/ml, en matraces), cedida por el Dr. A.L. Demain, del Instituto Tecnológico de Massachusetts (M.I.T.). Se han empleado, asimismo, los mutantes npe U.L.1, npe U.L.2, npe U.L.3, npe U.L.4 y npe U.L.5, no productores de penicilinas, obtenidos en nuestro departamento por J.M. Cantoral (Cantoral, 1983).

Bacillus subtilis ATCC 6633. Bacteria Gram-positiva utilizada para la valoración, por bioensayo, de penicilina G dada su gran sensibilidad a este antibiótico.

Micrococcus luteus ATCC 9341. Bacteria esférica Gram-positiva utilizada para valorar isopenicilina N, antibiótico al que es mucho más sensible que B. subtilis.

Escherichia coli Ess. 22-31. Cocobacilo Gram-negativo, supersensible a penicilina G. Se utiliza en la valoración de microcantidades de penicilinas.

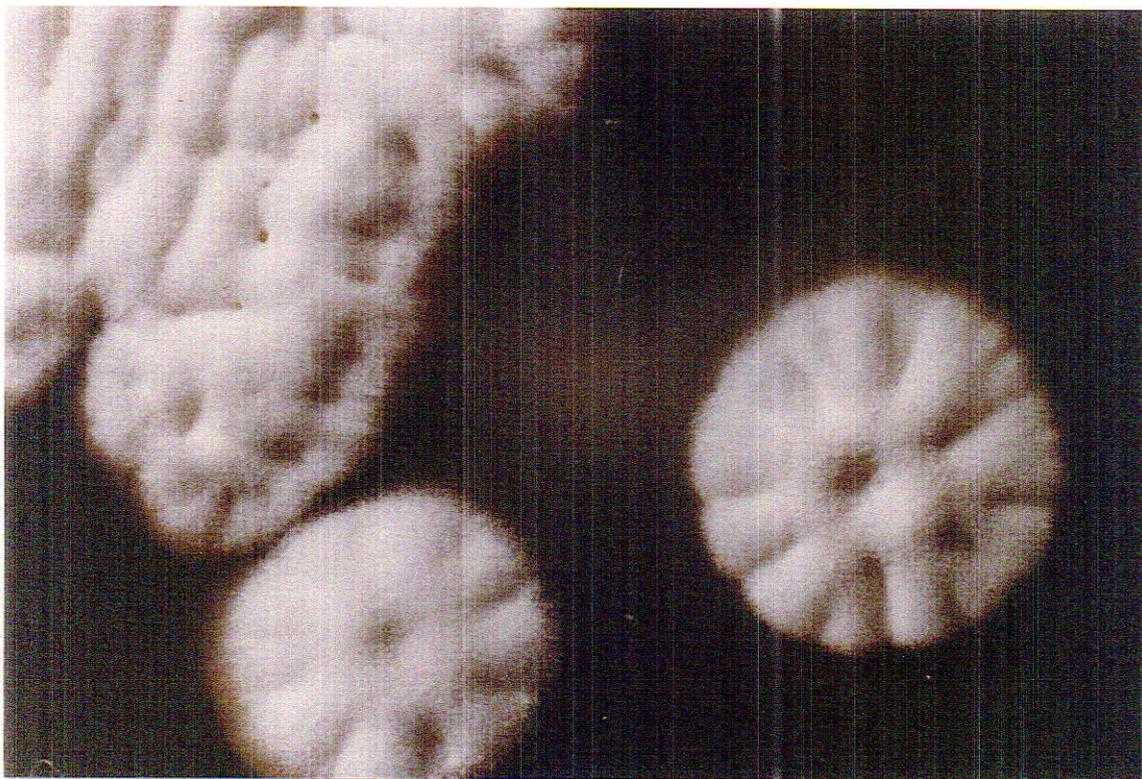


Fig. II.1. Colonia de P. chrysogenum crecido en medio sólido
(YED).

II.2. Medios de cultivo

II.2.1. Medios de esporulación y mantenimiento

II.2.1.1. Medio de esporulación utilizado para la cepa Wisconsin 54-1255: Medio agar-patata

El medio está compuesto por: Extracto de patata, 230 g.; glucosa, 20 g.; agar, 20 g.; agua destilada, c.s.p. 1 litro.

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 30 minutos, tras lo cual se distribuye en tubos que se dejan reposar en posición inclinada. Posteriormente se siembran en estría a partir de esporas de la cepa mencionada. Los tubos se incuban a 28°C durante 8 días y, a continuación, se pasan a un frigorífico a 4°C.

II.2.1.2. Medio de esporulación utilizado para la cepa AS-P-78: Medio PM-1

La composición del medio es la siguiente: SO_4Cu . $5\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g.; $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,003 g.; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,06 g.; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g.; ClNa , 4 g.; bacto-peptona, 5 g.; líquido de maceración de maíz, 0,5 g.; lactosa, 5 g.; agua destilada, c.s.p. 1 litro.

El pH del medio se ajusta a 5,5 con H_3PO_4 y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Se distribuye en tubos inclinados como el medio anterior. Tras la siembra de las esporas por la técnica de estría,

se incubaba 8 días a 28°C y, a continuación, se conserva a 4°C.

II.2.1.3. Medio de esporulación y mantenimiento utilizado para Bacillus subtilis: Medio Agar-común

Este medio está compuesto por: Peptona, 8 g.; extracto de carne, 3 g.; agar, 20 g.; agua destilada, hasta 1 litro.

El pH del medio se ajusta a 7,2. Se esteriliza a 120°C durante 20 minutos y se distribuye en tubos inclinados. Una vez solidificado, se siembran en estría y se incubaba durante 24 horas a 32°C. La conservación se hace a 4°C.

II.2.1.4. Medio de mantenimiento y crecimiento de M. luteus y E. coli: Medio TSA

La composición de este medio es la siguiente: Peptona de caseína, 17 g.; peptona de soja, 3 g.; ClNa, 5 g.; PO_4HK_2 , 2,5 g.; glucosa, 2,5 g.; agar, 20 g.; agua destilada, hasta 1 litro.

El pH del medio se ajusta a 7,0 y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Tras distribuirlo en tubos inclinados, se siembra y se incubaba 24 horas a 37°C. La conservación se realiza a 4°C.

El cultivo de estos microorganismos en medio líquido se llevó a cabo en medio TSB, cuya composición es la misma que se menciona más arriba, pero carece de agar.

II.2.2. Medios de inóculo y producción

El desarrollo completo de la fermentación para la producción de penicilina requiere un crecimiento previo del microorganismo (medio de inóculo) y su posterior transferencia a un medio de producción. El primero es un medio en el cual se inoculan directamente los conidios del microorganismo objeto de estudio, y en el que se obtiene un gran desarrollo miceliar en cortos períodos de tiempo. En el segundo, el crecimiento se atenúa, pero se potencia la formación del antibiótico. Este medio puede ser, a su vez, definido o complejo según se conozca o no su composición cualitativa y cuantitativa.

II.2.2.1. Medio complejo de inóculo utilizado para la cepa *P. chrysogenum* AS-P-78

La composición de este medio es la siguiente: líquido de maceración de maíz, 20 g.; sacarosa, 20 g.; destilados solubles de maíz, 20 g.; CO_3Ca , 5 g.; agua destilada hasta 1 litro.

El pH del medio se ajusta a 5,7 con NaOH, tras lo cual se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

II.2.2.2. Medio complejo de inóculo utilizado para la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y mutantes no productores (npe U.L.)

Este medio está compuesto por: líquido de mace-

ración de maíz, 20 g.; CO_3Ca , 5 g.; destilados solubles de maíz, 20 g.; melaza de remolacha, 26 g.; agua destilada hasta 1 litro.

El pH del medio se ajusta a 5,7 con NaOH y, a continuación, se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

II.2.2.3. Medio complejo de fermentación utilizado para la cepa *P. chrysogenum* AS-P-78

La composición del medio es la siguiente: Lactosa, 50 g.; fenilacetato potásico (40%), 10 ml; $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 3 g.; CO_3Ca , 5 g.; harina de algodón (Farmamedia), 20 g.; agua destilada hasta 1 litro.

El pH del medio se ajusta a 6,1 antes de esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Previamente a su utilización, es preciso añadir a cada matraz 3 ml de aceite de ballena por cada 100 ml de medio.

II.2.2.4. Medio complejo de producción utilizado para *P. chrysogenum* Wis. 54-1255

Este medio está compuesto por: Líquido de maceración de maíz, 35 g.; lactosa, 55 g.; fenilacetato potásico, 2,5 g.; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g.; CO_3Ca , 10 g.; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 7 g.; aceite de maíz, 2,5 g.; agua destilada hasta 1 litro.

La esterilización se lleva a cabo en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

II.2.2.5. Medio de suspensión limitado en nitrógeno

La composición de este medio es la siguiente: Lactosa, 48 g.; fenilacetato potásico (10%), 16 ml.; tampón fosfato 1 M, pH 7,0, 320 ml.; sales, 160 ml.; agua destilada, 344 ml.

La solución de sales está compuesta (en g/l) por: $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 30; $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5; $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0; $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2; SO_4Na_2 , 5,0; $\text{SO}_4\text{Mn}\cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,02; $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5.

El medio se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. La lactosa se esteriliza por separado y se añade antes de inocular el medio.

Este medio no posee fuente de nitrógeno, motivo por el cual las células no crecen, aunque sí producen penicilina; de ahí, que se utilice para estudiar procesos metabólicos típicos de la idiofase (fase de producción).

II.2.2.6. Medio "Antibiotic" nº 5 (Difco) para la determinación de antibióticos por bioensayo

La composición de este medio es la siguiente: Extracto de carne, 15 g.; extracto de levadura, 3 g.; peptona, 6 g.; agar, 15 g.; agua destilada, c.s.p. 1 litro.

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

II.3. Mantenimiento de los cultivos

Penicillium chrysogenum AS-P-78 se mantuvo liofi

lizado. A partir de los liófilos se sembraron tubos de agar inclinado con medio PM-1, que fueron utilizados posteriormente para inocular medios líquidos.

P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 se mantuvo liofilizado o en tubos inclinados de medio agar-patata, realizándose siembras periódicas para su conservación.

II.4. Producción de antibiótico. Desarrollo de la fermentación

II.4.1. Inóculo e incubación

Para la obtención de un inóculo apropiado, se siembran matraces de 250 ml que contienen 50 ml de medio complejo de inóculo con aproximadamente 10^8 conidios de P. chrysogenum por matraz. La incubación se lleva a cabo a 25°C en un agitador orbital a 250 r.p.m. durante 36 horas para la cepa AS-P-78 y 30 horas para Wisconsin 54-1255. El micelio desarrollado durante este tiempo fue utilizado para inocular el correspondiente medio de producción, utilizándose una proporción inóculo/medio de cultivo del 5% para la cepa AS-P-78 y del 10% para la cepa Wisconsin 54-1255.

II.4.2. Determinación del crecimiento

El crecimiento de las distintas cepas de P. chrysogenum se determinó como peso seco del micelio desarrollado tal y como se indica a continuación. Se tomaron alícuo-

tas de 2 ml de la suspensión a distintos tiempos de fermen-
tación y se centrifugaron a 2.000xg durante 10 minutos.
El sobrenadante se utilizó para la determinación del pH
y, previa dilución, para medir la concentración de antibió-
tico producido a lo largo de la fermentación. El precipi-
tado se filtró a través de filtros de fibra de vidrio
(Whatman GF/C), previamente secados y pesados. El micelio
así obtenido se lavó en el filtro con HCl 0,01 M repetidas
veces. A continuación, los filtros con el micelio se man-
tuvieron en estufa a 80°C hasta peso constante.

El crecimiento de los demás microorganismos (bac-
terias) se determinó midiendo la turbidez de los cultivos
en una espectrofotómetro a 600 nm, y comparando los datos
con una recta patrón que relacionaba la densidad óptica
con el número de células.

II.4.3. Preparación de un sistema de células sin creci- miento

Para preparar un sistema de células en reposo
(o células sin crecimiento), se sembraron conidios del
microorganismo deseado en medio de inóculo. Al cabo del
tiempo específico de crecimiento de cada microorganismo,
la suspensión miceliar formada se utilizó para inocular un
medio de producción. Tras incubar este último medio duran-
te el tiempo necesario, se recogió el micelio por filtra-
ción y se lavó con solución salina isotónica estéril
(ClNa 0,9%) a fin de eliminar el antibiótico retenido por

el micelio. La masa miceliar así obtenida es presionada entre dos papeles de filtro para eliminar la solución salina residual, y se transfiere al medio de suspensión limitado en nitrógeno en una proporción de 1 g de peso seco por cada 25 ml de medio. La incubación se realiza a 25°C y 250 r.p.m. en un agitador orbital.

II.4.4. Valoración de antibióticos por bioensayo

El fundamento de este método se basa en la inhibición que los antibióticos ejercen sobre el crecimiento de los microorganismos frente a los cuales son activos. El grado de inhibición del crecimiento es directamente proporcional a la concentración del antibiótico presente en la solución a valorar (Cooper, 1972). La técnica utilizada se desarrolló en los siguientes pasos:

- a) Crecimiento del microorganismo de ensayo: El microorganismo utilizado para la valoración de penicilina G fue Bacillus subtilis, el cual fue obtenido según se explica en el apartado II.2. Para la valoración de isopenicilina N se utilizaron Micrococcus luteus y E. coli Ess, crecidos en medio TSA e incubados en el medio de crecimiento TSB, en el que se incubaron 24 horas a 37°C y a 250 r.p.m.
- b) Preparación de inóculo: una suspensión de células del microorganismo de ensayo se utiliza como inóculo de las placas de bioensayo, previo ajuste de su densidad óptica hasta el valor de 1 (600 nm).

c) Realización del bioensayo: Sobre discos de papel de 6 mm de diámetro (Whatman AA) colocados en la superficie de las placas de bioensayo, se depositaron alícuotas de 10 ó 20 μ l de filtrado obtenido a partir del medio de fermentación. Simultáneamente, se prepararon soluciones patrón con distintas concentraciones del antibiótico de referencia en agua y se distribuyeron igualmente en discos de papel. Tras mantener las placas 3 horas a 4°C para permitir la difusión del antibiótico, éstas se transfirieron a una estufa de cultivo a 37°C para permitir el crecimiento del microorganismo y poder comprobar los halos de inhibición.

Para poder depositar cantidades mayores de muestra, se recurrió a la utilización de pocillos de 7 mm de diámetro realizados en el medio sólido de la placa de bioensayo. Con este procedimiento pueden utilizarse volúmenes de muestra de hasta 70 μ l.

d) Cuantificación de la actividad microbiana: Los diámetros de los halos obtenidos según el proceso descrito son directamente proporcionales a los logaritmos de las concentraciones de antibiótico en las muestras ensayadas. La concentración de antibiótico en la muestra ensayada se determina por comparación con una recta patrón obtenida mediante la determinación de los halos producidos por soluciones de antibiótico de concentraciones conocidas.

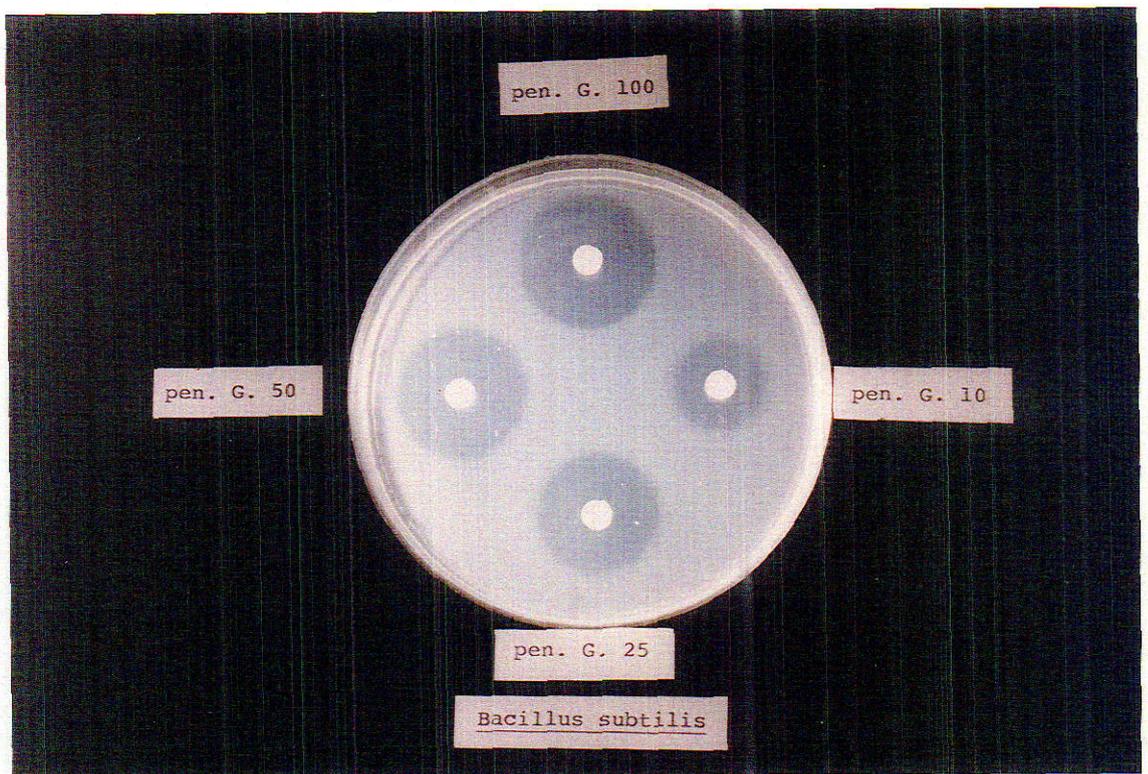


Fig. II.2. Placa de bioensayo para la valoración de penicilina G empleando B. subtilis como microorganismo indicador.

II.5. Técnicas para la caracterización de los productos de la actividad γ -glutamyltranspeptidasa

II.5.1. Cromatografía en capa fina

Las cromatografías se desarrollaron utilizando como soporte Silicagel G-60 (Merck) dispuesto en placas de vidrio de 200 x 200 x 0,25 mm. Los líquidos de desarrollo utilizados fueron butanol:acético:agua (4:1:4) y butanol:piridina:agua (1:1:1).

Los cromatogramas se desarrollaron a temperatura ambiente. Una vez secos, se revelaron con ninhidrina-cadmio.

II.5.2. Electroforesis en capa fina

El soporte utilizado en este tipo de electroforesis fue el mismo que en el epígrafe anterior. El método seguido se ajustó al descrito por Sargent y Vadlamudi (1968), modificado por López-Nieto (1984). Una vez depositadas las muestras a analizar, las placas fueron pulverizadas con el tampón de electroforesis (piridina:acético:agua, (1:10:135), pH 3.5, para muestras no oxidadas, y acético:fórmico:agua (10:1:39), pH 1,8, para muestras oxidadas). El proceso se desarrolló a 600 voltios durante 3 horas utilizando una cubeta FBE-3000 (Pharmacia) refrigerada con agua, y una fuente de alimentación Vokam 2000-300-150 (Shandon). Como colorante de referencia se usó azul de Bromofenol.

II.5.3. Aislamiento de los productos de reacción

Para aislar los productos de la reacción a partir de las placas de cromatografía y electroforesis, se procedió a un revelado parcial de las mismas, lo cual nos indicaba la posición de las muestras en las placas. Las zonas no reveladas que correspondían a las ocupadas por las muestras problema fueron cuidadosamente raspadas, y su contenido extraído por disolución en ácido acético al 10%.

II.5.4. Hidrólisis y oxidación de las muestras

Dada la naturaleza peptídica de algunos de los productos de la actividad estudiada, y, de cara a su identificación, se procedió a la hidrólisis de los mismos a fin de comprobar los compuestos que los integraban.

Los productos obtenidos mediante el proceso descrito en el epígrafe anterior se sometieron a hidrólisis ácida en HCl 6 N, a 150°C, durante 10 horas. Tras este período de tiempo. Las muestras se enfriaron y se concentraron a sequedad.

Con el fin de poner en evidencia la presencia de cisteína en las muestras a analizar, el residuo obtenido tras la hidrólisis se sometió a la acción de una mezcla oxidante, cuya composición es ácido fórmico: ácido perfoómico (1:1 v/v). El ácido perfoómico se preparó tratando ácido fórmico (98%) con peróxido de hidrógeno (30%) en una proporción 9:1 (v/v). La mezcla se mantuvo a tempera-

tura ambiente durante 2 horas, tras lo cual se almacenó a -20°C hasta el momento de su utilización.

La muestra a oxidar se resuspendió a 0,2 ml de ácido fórmico y se enfrió en hielo. A esta solución se le añadió un volumen igual de ácido per fórmico y se mantuvo durante 5 horas a 4°C . Tras este período de tiempo, la solución se diluyó con agua destilada y se concentró a sequedad. El producto obtenido fue analizado por electroforesis en capa fina a pH 1,8.

II.5.5. Revelado de aminoácidos y péptidos

Las placas de cromatografía y electroforesis, una vez secas, eran pulverizadas con el revelador de aminoácidos y péptidos denominado ninhidrina-cadmio. Su composición es la siguiente:

- Solución A: Agua destilada, 100 ml; acetato de cadmio 1 g.; ácido acético 50 ml.
- Solución B: Ninhidrina, 5 g.; acetona, 500 ml.

Para obtener el revelador se mezcla la solución B con 75 ml de la solución A. Una vez pulverizada la placa con el revelador a 70°C durante 10 minutos para que se desarrollen las manchas que dan reacción positiva al revelador.

II.5.6. Método para la obtención de γ -glutamil-cisteína

El principio en el que se basa este método es la hidrólisis que la enzima carboxipeptidasa A realiza sobre

la molécula de glutati3n oxidado (dímero), reacción en la que se generan el dipéptido γ -glutamil-cisteína y el aminoácido glicina.

El procedimiento que hemos seguido es el descrito por Strumeyer y Bloch (1962), modificado por Anderson y Meister (1983).

El sustrato de la reacción (glutati3n oxidado) es asequible comercialmente o puede ser preparado por reacción lenta entre el glutati3n reducido y peróxido de hidrógeno al 30%.

Un gramo de glutati3n oxidado se disuelve en 25 ml de agua y el pH se ajusta a 8,0 con NH_4OH . A esta solución se añaden 50 mg de carboxipeptidasa A y, a continuación, se incuban a 37°C con agitación durante 8-10 horas. Al cabo de este período, la proteína forma un precipitado floculento que se separa por adición de Super-Cel a la solución y posterior filtrado a través de un filtro Whatman No 50. El residuo retenido en el filtro se lava con cuatro porciones de 2 ml de agua destilada. Los líquidos de filtrado y lavado se mezclan y se les añaden 10 mg de carboxipeptidasa A, continuándose la incubación durante otras 12 horas.

La enzima floculada es separada por filtración. El filtrado se pasa a través de una columna de 2,5 cm de diámetro que contiene 25 ml de Dowex-1 en la forma de formiato. La glicina se eluye con agua destilada hasta que el eluato es ninhidrina-negativo.

La γ -glutamyl-cisteína (dímero) se eluye de la columna con ácido fórmico 4 N hasta que el test de la ninhidrina es negativo. La elución ha de realizarse en una cámara fría a 4°C. El dipéptido en forma de dímero se obtiene por liofilización del eluato.

La reducción del dipéptido a su forma de monómero se realiza disolviéndolo en una solución de ditioneitol 1 M que contiene EDTA a una concentración 1 mM (pH 8). El conjunto se mantiene a 25°C durante 60 minutos para que la reducción se lleve a cabo. Tras este período, se ajusta el pH de la solución a 2 con ácido fórmico y se extrae tres veces con 2 volúmenes de acetato de etilo saturado de agua. El monómero de γ -glutamyl-cisteína se obtiene evaporando a sequedad la fracción de acetato de etilo conseguida.

II.6. Obtención de extractos enzimáticos acelulares

El micelio desarrollado durante el cultivo de los microorganismos utilizados se recogió a distintos tiempos y se separó del medio de cultivo por filtración y sucesivos lavados con solución isotónica de ClNa (0,9%). El micelio así obtenido se resuspendió en tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 8, en una proporción de un gramo de peso fresco de micelio por cada 10 ml de tampón. Esta suspensión miceliar se utilizó para la obtención de extractos enzimáticos acelulares, según los procedimientos que a continuación se describen.

fue centrifugado a 20.000 xg durante 30 minutos a 4°C. La fracción sobrenadante fue utilizada como extracto enzimático crudo en la determinación de la actividad enzimática.

II.6.3. Tratamiento con n-butanol

El estudio que el n-butanol ejercía sobre la obtención de extractos enzimáticos acelulares se llevó a cabo según el método descrito por Penefsky y Tzagoloff (1971). Para ello, la suspensión miceliar intacta o tratada por los métodos de desintegración celular anteriormente citados, fue mezclada con n-butanol a 4°C en una proporción 1:1 (v/v) y, a continuación, sometida a agitación en un agitador magnético durante 5 horas a 4°C. Tras este período, la mezcla se centrifugó a 20.000 xg durante 30 minutos a 4°C y se procedió a colecta la fase acuosa (inferior) por aspiración). Una vez obtenida ésta, se la sometió a diálisis durante 24 horas a fin de separar los residuos de n-butanol. La fracción dializada resultante se utilizó como "extracto enzimático crudo (extraído con butanol)" en la determinación de la actividad enzimática.

II.6.4. Tratamiento con Tritón X-100

Con el fin de estudio los efectos que una sustancia de acción detergente y solubilizadora de membranas podría tener sobre la obtención de extractos enzimáticos acelulares, se sometieron la suspensión miceliar intacta

y las obtenidas por los diversos tratamientos de desintegración celular a la acción de Tritón X en una concentración del 2%. La mezcla se agitó mediante un agitador magnético durante 5 horas a 4°C, período tras el cual se centrifugó a 20.000 xg durante 30 minutos. El sobrenadante se dializó durante 24 horas para eliminar el Tritón-X y la fracción dializada se utilizó como extracto enzimático crudo para determinar la actividad enzimática.

II.7. Valoración de la actividad γ -glutamil transpeptidasa

II.7.1 Ensayos de reacción

Para el estudio de la actividad enzimática objeto del presente trabajo hemos utilizado, fundamentalmente, dos ensayos de reacción:

A. El primero de ellos se basa en la formación de un γ -glutamil hidroxamato a partir de glutatión, en presencia de hidroxilamina (Orlowski y Meister, 1965). La composición de la mezcla de reacción fue la siguiente: Glutatión 0,2 M, 100 μ l; hidroxilamina 2 M (ajustada a pH 8 con KOH), 100 μ l; Tris-HCl 50 mM pH 8, 600 μ l; enzima, 200 μ l. La reacción se incubó a 37°C durante períodos de 10-15 minutos, tras lo cual se paró con reactivo de Cl_3Fe (Cl_3Fe , 0,37 M; ácido tricloroacético 0,02 M, y HCl, 0,66 M). El γ -glutamil hidroxamato formado durante la reacción enzimática da lugar a una reacción coloreada con el reactivo de Cl_3Fe . Dado que la

intensidad del color originado es proporcional a la concentración de γ -glutamil hidroxamato, se procedió a la cuantificación de dicho compuesto por lectura de absorbancia de la mezcla de reacción, utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm (coeficiente de extinción molar del γ -glutamil hidroxamato = 340).

- B. El segundo de los ensayos utilizados se basa en la formación de p-nitroanilina a partir del compuesto L- γ -glutamil-p-nitroanilida (Orlowski y Meister, 1970). Durante la reacción enzimática, el resto γ -glutamilo de una molécula de γ -glutamil-p-nitroanilida es transferido a otra molécula de γ -glutamil-p-nitroanilida, o bien de otro aceptor colocado previamente en el medio de reacción, liberándose p-nitroanilina.

La solución utilizada como sustrato de la reacción estaba compuesta por: L- γ -glutamil-p-nitroanilida, 5,6 mM; Cl_2Mg , 11,1 mM, y Tris-HCl 110 mM, pH 9. La mezcla de reacción se componía de 0,9 ml de la solución de sustrato antes reseñada y de 0,1 ml de enzima. El conjunto se incubó durante 5 minutos a 37°C, tras lo cual la reacción será parada por adición de 2 ml de ácido acético 1,5 N. La absorbancia de la p-nitroanilina formada era medida en un espectrofotómetro a 410 nm (coeficiente de extinción molar de la p-nitroanilina = 8.800).

II.7.2. Unidad enzimática

Una unidad enzimática de γ -glutamil transpeptidasa se define como la cantidad de enzima capaz de producir 1 micromol de producto (γ -glutamil hidroxamato o p-nitroanilina, según el ensayo utilizado) por minuto.

II.7.3. Determinación de proteína

El contenido de proteína de los extractos utilizados se determinó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951), empleando seroalbúmina bovina como patrón de referencia.

II.8. Purificación parcial de la actividad γ -glutamil transpeptidasa

El proceso seguido para la obtención de extractos enzimáticos parcialmente purificados se desarrolló en las etapas que a continuación se relacionan.

II.8.1. Precipitación con sulfato de protamina

El extracto enzimático crudo fue tratado con una solución de sulfato de protamina disuelto en Tris-HCl 50 mM, pH 8. La concentración final en el extracto fue del 2%. La solución de sulfato de protamina se añadió al extracto crudo en una proporción 1:10 (v/v) con agitación, y a continuación se mantuvo en reposo durante 15 minutos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 20.000 xg duran-

te 30 minutos a 4°C. El sedimento obtenido, constituido principalmente por ácidos nucleicos, fue eliminado y el sobrenadante se recogió y se mantuvo a 0°C en un baño de hielo.

II.8.2. Cromatografía de intercambio iónico

El sobrenadante obtenido en la etapa anterior se aplicó a una columna cargada con DEAE-Sephacel (Pharmacia) (15 x 3 cm) equilibrado con Tris-HCl 0,05 M, pH 8. La actividad enzimática se encontró en la fracción no retenida en la columna a esta fuerza iónica. Dada la gran cantidad de otras proteínas diferentes de la γ -glutamyl transpeptidasa que quedaban unidas al DEAE, se aprovechó esta característica como etapa de purificación.

II.8.3. Precipitación con sulfato amónico

Esta técnica se fundamenta en la disminución de la solubilidad de las proteínas con el incremento de la fuerza iónica de la solución en la que se encuentran. El agente precipitante más empleado es el sulfato amónico, que fue el utilizado en nuestro trabajo.

La fracción obtenida tras el paso por la columna de DEAE-Sephacel fue tratada con sulfato amónico hasta conseguir un grado de saturación del 55% (32,6 g/100 ml), mientras la solución era agitada en baño de hielo. Tras dejar reposar 15 minutos, la solución se centrifugó a 20.000 xg durante 30 minutos, 4°C. El precipitado se dese-

chó y al sobrenadante se le añadió sulfato amónico hasta una concentración final del 80% (16,1 g/100 ml). El extracto se centrifugó en las mismas condiciones que en el caso anterior. El sobrenadante se desechó y el precipitado fue resuspendido en 4 ml de Tris-HCl 0,05 M, pH 8.

II.8.4. Filtración en gel

La fracción proteica obtenida según se ha descrito en el apartado anterior, fue aplicada a una columna de Sephadex G-200, tipo "Fine" (Pharmacia) (60 x 2 cm). Este gel es capaz de separar proteínas en función del peso molecular de las mismas, en un rango comprendido entre 10.000 y 600.000 Dalton. La columna fue equilibrada con tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 8, y lavada con varios volúmenes del mismo tampón. El volumen muerto de la columna fue determinado con una solución de azul dextrano. La columna fue eluída con el mismo tampón, con un flujo de 7 ml/h, y conectada a un detector de proteína (Pharmacia UV-1) y a un colector de fracciones.

El volumen de cada fracción fue de 4,5 ml. Las distintas fracciones obtenidas fueron utilizadas directamente para la valoración de la actividad γ -glutamyl transpeptidasa, y las fracciones activas fueron reunidas y conservadas a -20°C hasta su utilización.

Este mismo procedimiento de filtración en gel fue utilizado también para determinar el peso molecular de la enzima estudiada. Con esta finalidad, la columna

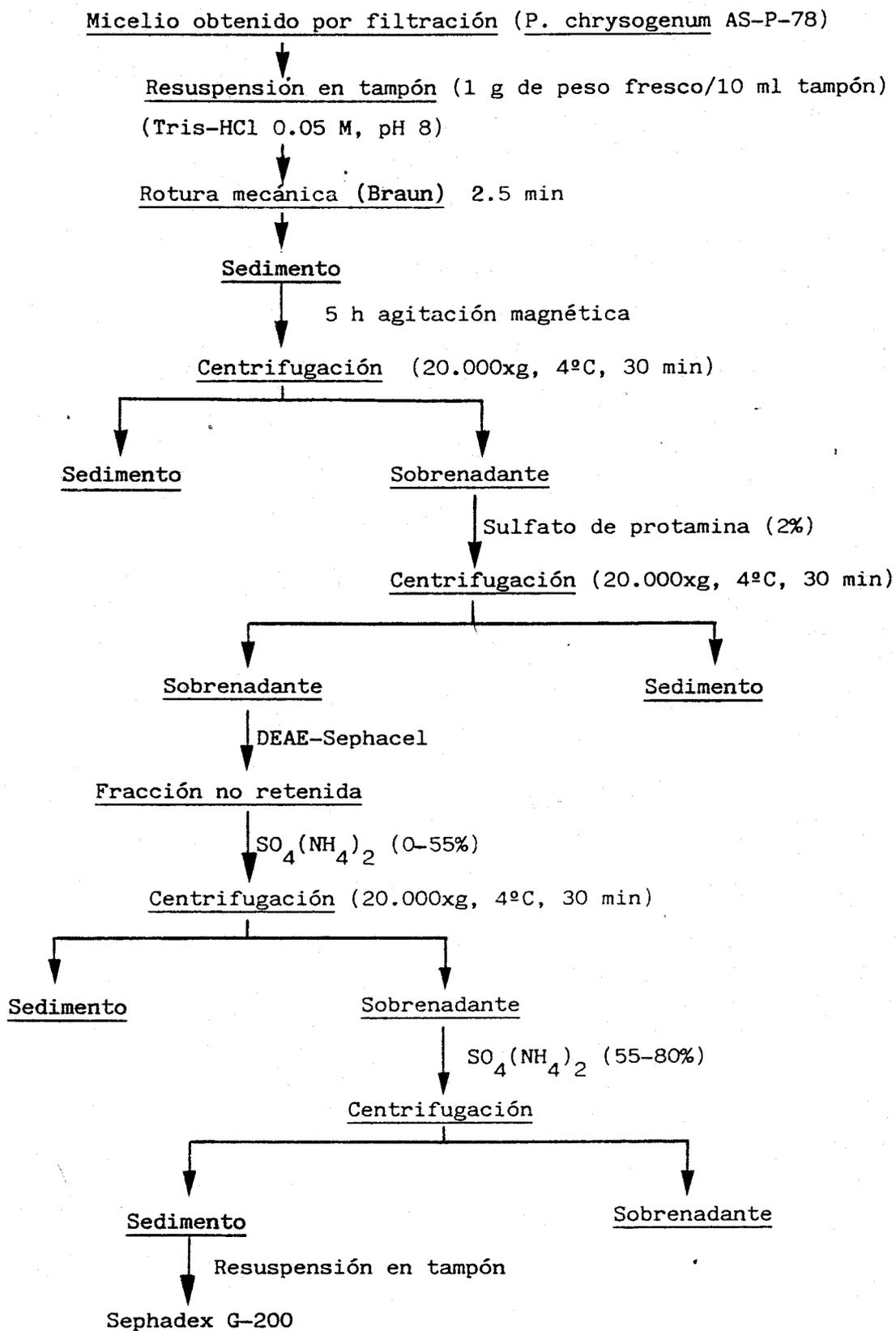


Fig. II.3. Esquema de obtención y purificación parcial de la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.

fue calibrada utilizando soluciones de proteínas comerciales (Pharmacia) de peso molecular conocido (ribonucleasa A, quimiotripsinógeno A, ovoalbúmina, albúmina, aldolasa, catalasa y ferritina). El desarrollo de la columna fue realizado de forma similar a la descrita para el extracto enzimático, estableciéndose una relación entre el volumen de elución y el peso molecular de cada proteína. De esta manera, conocido el volumen de elución de la γ -glutamyl transpeptidasa, es posible determinar su peso molecular por interpolación en la curva patrón obtenida con los volúmenes de elución y los pesos moleculares de las proteínas antes mencionadas.

RESULTADOS

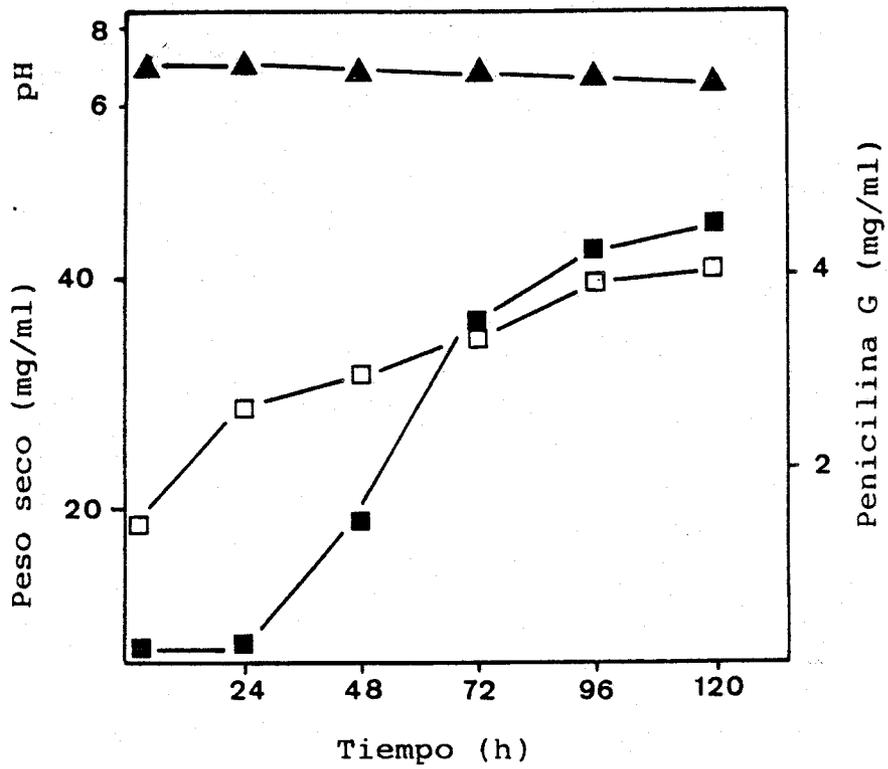
III.1. Estudio de la cinética de producción de penicilina de un cultivo de *P. chrysogenum* AS-P-78

Antes de comenzar el estudio de la actividad γ -glutamil transpeptidasa, es preciso dar algunos datos acerca de la cinética de crecimiento de un cultivo de *P. chrysogenum* AS-P-78, a fin de tener una serie de referencias con respecto a las cuales situar los parámetros de la actividad enzimática estudiada.

En la figura III.1. se representan el crecimiento y la producción de antibiótico de un cultivo de *P. chrysogenum* AS-P-78 desarrollado en un medio complejo de producción. Este medio se inocula con una pequeña cantidad de micelio que, previamente, ha sido crecido en un medio de inóculo. El crecimiento del hongo en el medio de producción es paulatino, si bien es un poco más rápido durante las primeras 24 horas de cultivo.

La producción de antibiótico es prácticamente nula durante las primeras 24 horas de cultivo (fase de crecimiento rápido) y a partir de ese tiempo comienza a aumentar, situándose la mayor velocidad de producción entre las 48 y 72 horas. Cuando el cultivo sobrepasa las 72 horas de desarrollo, la producción de antibiótico comienza a declinar, y a partir de las 120 horas se puede considerar que la cantidad de antibiótico presente en el medio permanece estacionaria.

La cepa utilizada a lo largo de nuestro estudio (*P. chrysogenum* AS-P-78), si bien no alcanza el rendimien-



- Peso seco
- Penicilina G
- ▲ pH

Fig. III.1. Cinética de crecimiento y producción de penicilina G de un cultivo de P. chrysogenum AS-P-78 en un medio complejo de producción.

to de una cepa industrial, sí puede considerarse como una cepa de alta producción. En cultivos en matraces en medio complejo su producción se sitúa alrededor de 5.000 µg de penicilina G/ml. Si se emplean medios de cultivo de composición definida su rendimiento disminuye hasta llegar a producir poco más de 1000 µg/ml.

Durante el proceso de la fermentación el pH se mantiene en valores cercanos a la neutralidad, con cifras que oscilan entre 6,0 y 8,0. Son precisamente estos valores los óptimos para la producción de penicilina.

III.2. Estudio de la actividad γ -glutamil transpeptidasa

III.2.1. Obtención de extractos acelulares

La primera etapa en el estudio de la actividad enzimática que nos ocupa era la puesta a punto de un método que nos permitiera obtener extractos enzimáticos libres de células lo más activos posibles, y de forma repetitiva.

Teniendo en cuenta las evidencias que existían sobre la presencia de la γ -glutamil transpeptidasa ligada a membranas celulares (Spater et al., 1983) y que la utilización de solventes orgánicos y sustancias con propiedades detergentes proporcionaba buenos rendimientos en la obtención de extractos enzimáticos crudos (Orlowski y Meister, 1965; Tate y Meister, 1975), nos decidimos a utilizar estos procedimientos junto a los métodos de desintegración micelar por sonicación y por rotura mecánica.

La sonicación de la suspensión miceliar de P. chrysogenum AS-P-78 se realizó durante un tiempo total de 4 minutos, período a partir del cual la actividad enzimática permanecía constante o con tendencia a disminuir. El tiempo óptimo de sonicación era ligeramente inferior para P. chrysogenum Wisconsin 54-1255 y mutantes no productores (unos 3 minutos), diferencia que tal vez sea ocasionada por la distinta constitución de la pared celular de las cepas ensayadas.

La rotura del micelio mediante el desintegrador mecánico (Braun) era óptima para un tiempo de 2,5 minutos. La actividad conseguida en este proceso era ligeramente superior a la obtenida por sonicación.

El tratamiento con n-butanol del micelio desintegrado proporcionó crudos con una actividad doble que en el tratamiento por sonicación o por rotura mecánica.

Sin embargo, el tratamiento del micelio desintegrado con el detergente Triton-X fue el que condujo a la obtención de crudos enzimáticos más activos (Tabla III.1), con una actividad total unas tres veces superior a la del micelio sonificado o tratado por rotura mecánica. Así pues, éste último fue el método empleado por nosotros para la obtención de extractos enzimáticos crudos.

El efecto drástico que producen la adición de un solvente orgánico como el n-butanol y, sobre todo, la de un detergente (Triton-X) sobre la actividad de los extractos enzimáticos crudos parece indicar que la enzima γ -glutamil transpeptidasa se halla asociada a algún tipo

Método empleado	γ -glutamil transpeptidasa (mU/mg proteína)	Rendimiento relativo (%)
Sonicación	27	30
Sonicación + n-butanol	60	67
Sonicación + Tritón-X	80	89
Rotura mecánica	32	36
Rotura mecánica + n-butanol	72	79
Rotura mecánica + Tritón-X	90	100

Tabla III.1. Rendimientos obtenidos en los distintos métodos utilizados para la obtención de extractos acelulares con actividad γ -glutamil transpeptidasa.

de estructuras mediante uniones que son rotas por la acción de dichas sustancias. Es posible, pues, que en P. chryso-
genum, al igual que ocurre en otras especies, esta enzima se halle ligada a estructuras tipo membrana celular de las que es liberada por tratamiento con agentes solubilizantes de dichas estructuras.

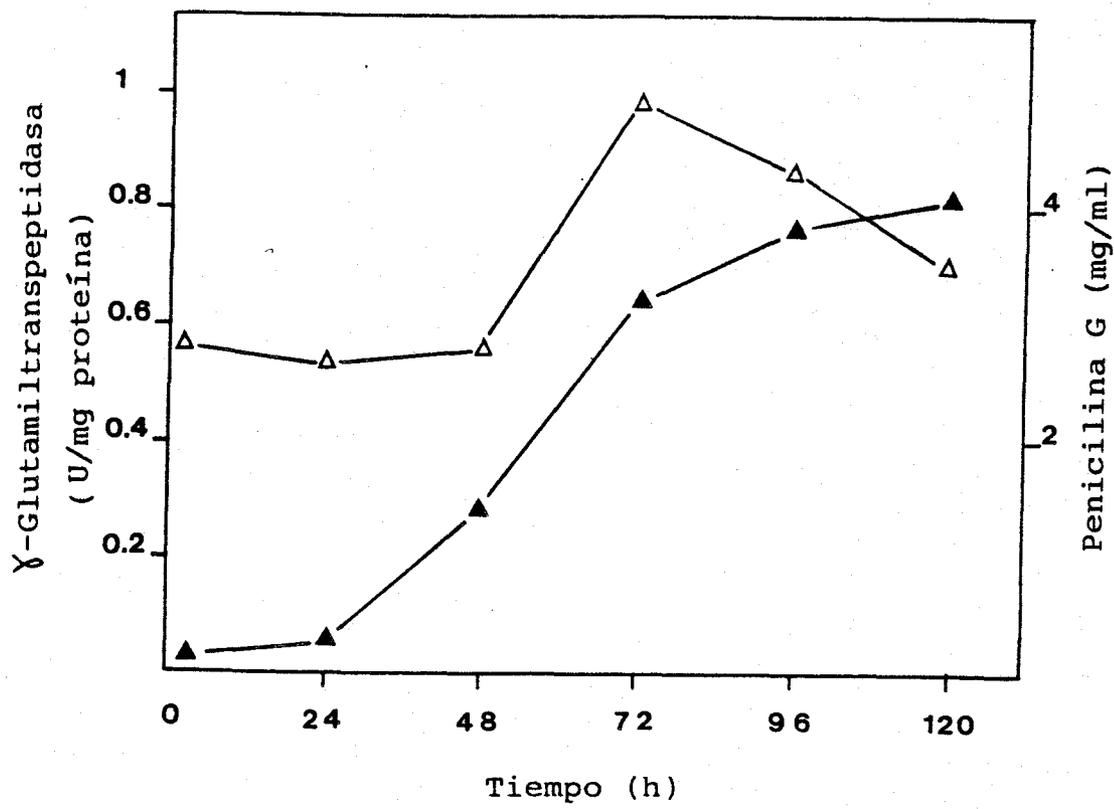
III.2.2. Valoración de la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78 a lo largo de la fermentación

La actividad γ -glutamil transpeptidasa se encuentra presente en las primeras 48 horas de cultivo en unos niveles de actividad específica uniformes, los cuales sufren un aumento considerable entre las 48 y las 72 horas de fermentación, descendiendo ligeramente entre las 72 y las 120 horas de cultivo.

Como se aprecia en la figura III.2, el aumento de la actividad γ -glutamil transpeptidasa coincide con la etapa de mayor velocidad de producción de penicilina, es decir, entre las 48 y 72 horas de fermentación.

Si bien a tiempo 0 de fermentación no existe desarrollo miceliar, se ha optado por representar en la gráfica la actividad enzimática correspondiente al micelio empleado como inóculo (ver capítulo II: Materiales y Métodos).

De acuerdo con los resultados mencionados se empleó micelio de 72 horas de crecimiento para la obten-



△ γ -Glutamyltranspeptidasa

▲ Penicilina G

Fig. III.2. Variación de la actividad γ -glutamyltranspeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78 a lo largo de la fermentación.

ción de extractos enzimáticos crudos y para posteriores procesos de purificación.

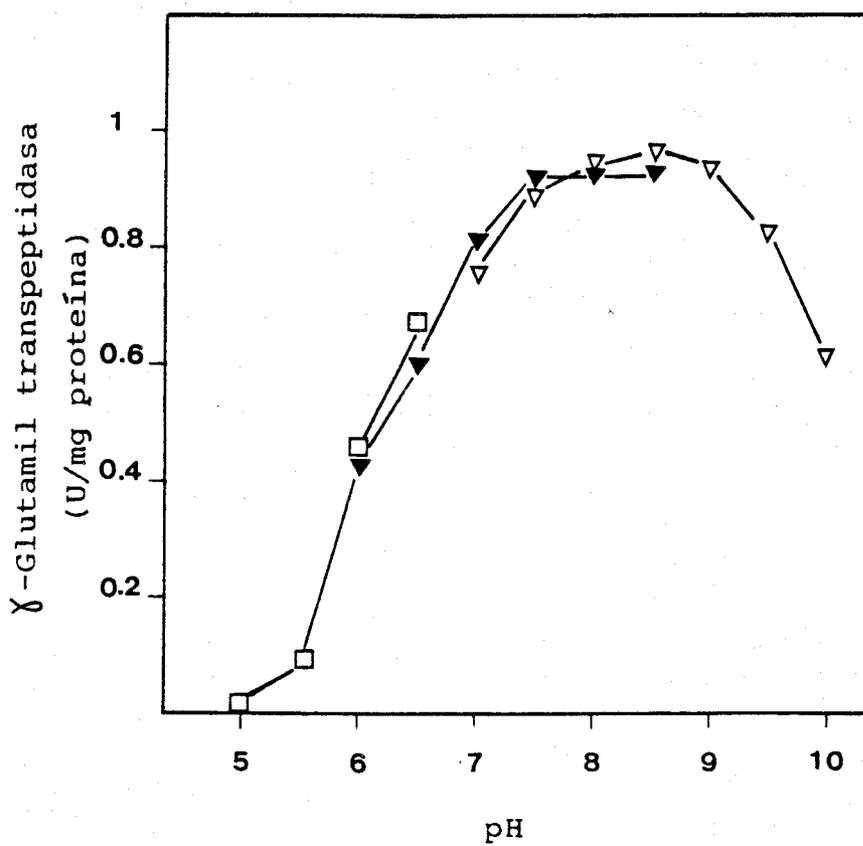
III.2.3. Influencia del pH sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa

El pH es un factor que afecta decisivamente a la actividad enzimática. La determinación del pH óptimo de la enzima constituye, pues, en uno de los puntos básicos de cualquier estudio sobre cinética enzimática.

La determinación del pH óptimo de la actividad γ -glutamil transpeptidasa se llevó a cabo previa diálisis del extracto enzimático frente a agua destilada, con el fin de eliminar el tampón de rotura. La actividad enzimática se midió empleando las dos reacciones que para el ensayo de esta enzima se describen en el capítulo II (Materiales y Métodos), con la salvedad de que el tampón empleado para el ensayo de la reacción era sustituido por los tampones que se describen más adelante.

Para cubrir el amplio rango de pH en el cual se desarrolla esta actividad enzimática, se utilizaron las siguientes soluciones tampón: citrato-fosfato para los valores de pH 5, 5.5, 6 y 6.5; MOPS para los valores de pH 6, 6.5, 7, 7.5 y 8; y Tris-HCl para los valores de pH 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 y 10. La concentración final de todos ellos en la mezcla de reacción fue de 50 mM.

Como se desprende de la figura III.3, la actividad de la enzima γ -glutamil transpeptidasa comienza a



□ Citrato-fosfato 0.1 M

▼ MOPS 0.1 M

▽ TRIS + HCl 0.1 M

Fig. III.3. Influencia del pH sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.

ser detectable a partir de pH 5.5, y se extiende hasta valores de pH tan elevados como 10, e incluso superiores. El rango de actividad óptima en nuestros ensayos se extiende de manera casi uniforme entre pH 7.5 y 9, lo cual coincide con los pH óptimos para esta misma actividad en distintas especies (Curthoys y Kuhlenschmidt, 1975; Orłowsky y Meister, 1965).

El hecho de que la actividad de esta enzima se desarrolle con preferencia a pH moderadamente alcalino puede tener algunas consecuencias de cara al funcionamiento de dicha actividad durante los procesos de fermentación, ya que, como hemos comentado anteriormente, son los valores de pH cercanos a la neutralidad los que favorecen el máximo desarrollo de la producción de penicilina.

III.2.4. Influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas se debe, por una parte, a la modificación de la energía cinética de las moléculas reaccionantes, lo que se traduce en una variación de la velocidad de reacción, y por otra a la desnaturalización y a las altas temperaturas de las moléculas de la enzima.

Para estudiar el efecto que la temperatura podía ejercer sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78, se realizaron mediciones de dicha actividad a lo largo de un rango de temperaturas que se

extendía entre 0 y 55°C, tomando intervalos de 5°C.

Los resultados de dicho estudio se pueden visualizar en la figura III.4. En ella observamos cómo la actividad enzimática ensayada se hace ya detectable a temperaturas tan bajas como 10°C. La temperatura óptima para el estudio de esta enzima se establece, casi sin diferencias, entre los valores de 30 y 40°C. A partir de 40°C, la actividad decae sensiblemente con el aumento de temperatura hasta llegar a ser apenas mensurable a la temperatura de 55°C. El hecho de que la enzima conserve actividad a temperaturas superiores a 50°C es consistente con los resultados encontrados con esta misma actividad cuando se estudió en otras especies. Orłowski y Meister (1965) encontraron una gran resistencia a la temperatura por parte de la γ -glutamil transpeptidasa de riñón de rana, muy particularmente si el ensayo se realizaba en presencia de glutatión, caso en el cual dicha termorresistencia se acercaba a límites sorprendentes.

En P. chrysogenum la actividad γ -glutamil transpeptidasa tiene una temperatura óptima de actuación "in vitro" (30-40°C) que es superior a la temperatura de máxima producción de antibióticos (25°C), si bien a esta última temperatura dicha actividad enzimática está muy cerca del rango considerado como más favorable.

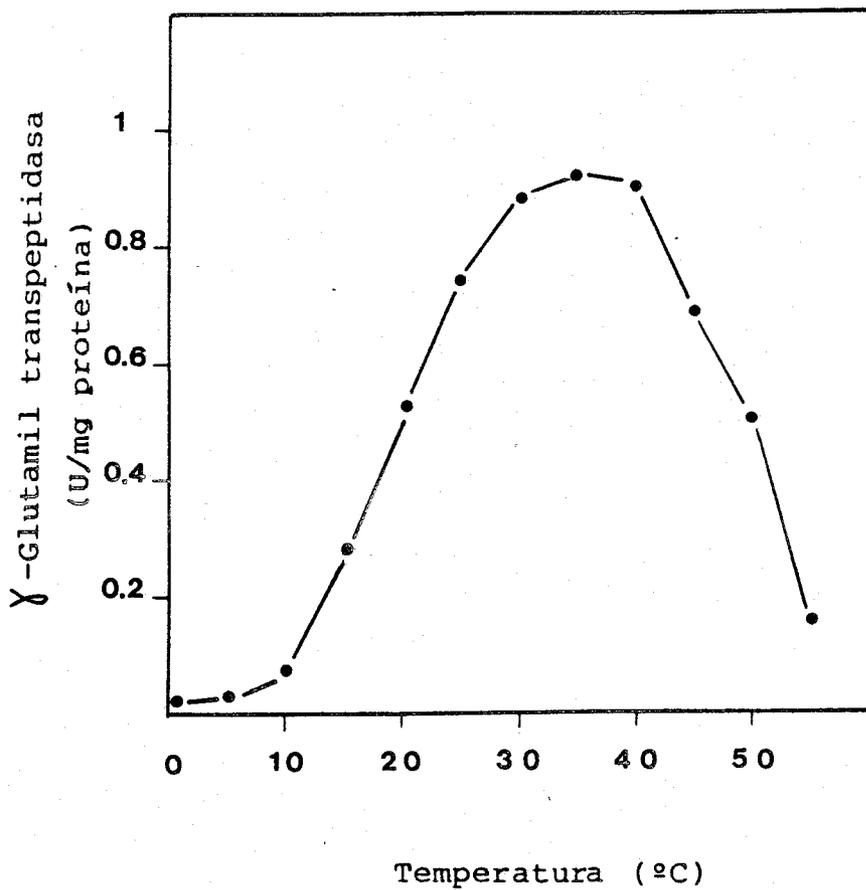


Fig. III.4. Influencia de la temperatura sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.

III.2.5. Influencia del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática

El estudio del efecto que el tiempo de incubación de una reacción tiene sobre la actividad de una enzima es un factor de gran trascendencia a la hora de delimitar las condiciones de actuación de dicha actividad y fijar parámetros definitorios de las características de la enzima, tales como la actividad específica.

Al igual que en el resto de los apartados de este estudio, se emplearon las dos reacciones descritas en el capítulo II (Materiales y Métodos), empleando diferentes tiempos de reacción.

La zona en la cual la formación de producto de la reacción aumenta linealmente con el tiempo se estableció en los primeros 5 minutos de reacción utilizando γ -glutamil-p-nitroanilida como sustrato, y 7 minutos de reacción utilizando glutatión, diferencia que puede deberse al método de medida de la reacción empleado en cada caso, además de a la diferencia de afinidad de la enzima por cada uno de los dos sustratos. Tiempos superiores a 30 minutos generalmente no suponían aumento sensible de la actividad de la enzima (Fig. III-5).

Los tiempos óptimos de ensayo encontrados para la γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum As-P-78 coinciden con los encontrados para la misma actividad en las diferentes especies estudiadas previamente por otros autores (Orlowski y Meister, 1965; Curthoys y Kuhlenschmidt, 1975).

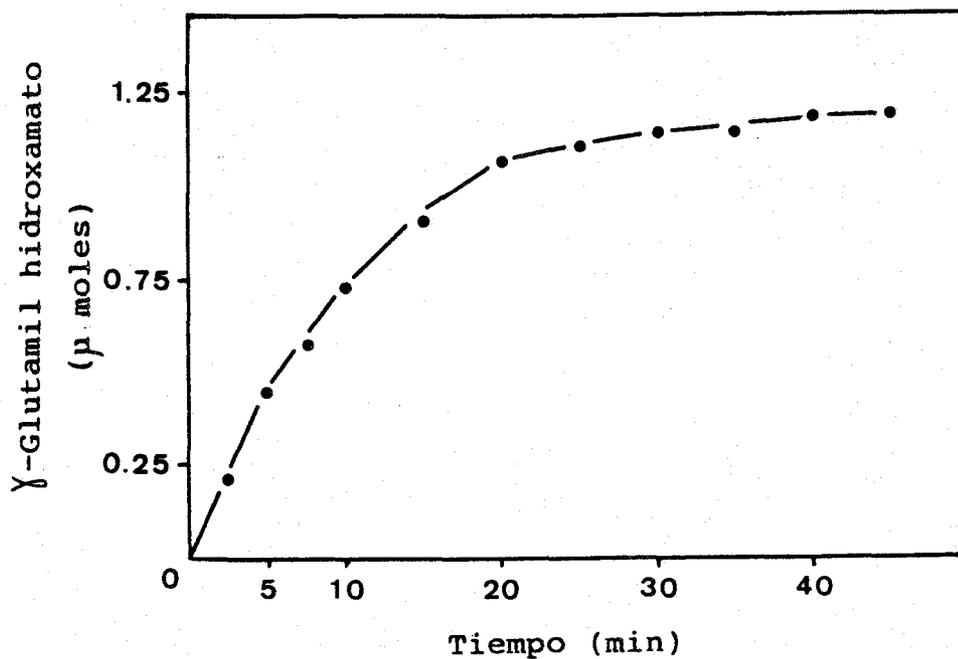


Fig. III.5. Influencia del tiempo de reacción sobre la formación de γ -glutamil hidroxamato, utilizando glutatión como sustrato.

III.2.6. Influencia de la concentración de proteína sobre la actividad enzimática

El efecto que la concentración de proteína ejerce sobre la actividad enzimática se determinó empleando mezclas de reacción con concentraciones crecientes de proteína.

Dado que para realizar los ensayos citados necesitábamos partir de soluciones enzimáticas de concentraciones proteína relativamente elevadas, y que era preciso contar con un grado de purificación enzimática lo más alto posible, hubimos de recurrir a concentrar las fracciones que obteníamos en la última etapa del proceso de purificación de la γ -glutamil transpeptidasa; dichas fracciones eran las correspondientes a la fase de purificación por filtración en gel (Sephadex G-200). Las fracciones obtenidas mediante este procedimiento tenían una concentración de proteína que oscilaba alrededor de 1 mg/ml. Era, pues, necesario concentrarlas de 10 a 20 veces.

Para proceder a esta concentración, las fracciones obtenidas tras el paso por la columna fueron depositadas en el interior de una membrana de diálisis, la cual, una vez cerrada, fue sometida a la acción higroscópica de una cantidad apropiada de polietilenglicol de alto peso molecular (PEG 20.000, SIGMA Chem. Co.). Transcurrido el tiempo necesario para la concentración, la membrana de diálisis fue lavado convenientemente con agua destilada y se procedió a la extracción, de su interior, de la solución enzimática concentrada.

En la realización de los ensayos se utilizó como sustrato el glutati6n, a una concentraci6n final de 30 mM. Esta concentraci6n es superior a la m6xima concentraci6n fisiol6gica de glutati6n encontrada en un ser vivo en condiciones de desarrollo normales (aproximadamente 10 mM), a fin de que el sustrato no fuese un factor limitante para la reacci6n.

Como se aprecia en la figura III-6, la relaci6n entre actividad espec6fica y concentraci6n de prote6na en la reacci6n es lineal hasta un valor de prote6na de 2 mg/ml. A partir de esa cifra, la relaci6n existente se desplaza en detrimento de la actividad espec6fica, ya que a aumentos en la concentraci6n de prote6na de la mezcla de reacci6n no corresponden aumentos proporcionales en la actividad de la enzima.

III.2.7. Influencia ejercida por diversos iones sobre la actividad enzim6tica.

Los ensayos realizados para comprobar el efecto que distintos iones podr6an ejercer sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa se llevaron a cabo seg6n el procedimiento descrito anteriormente (cap6tulo II), con la salvedad de que el tamp6n era sustituido parcialmente por una soluci6n en el tamp6n del i6n a ensayar.

Los resultados obtenidos en este estudio corroboraron la casi nula influencia que iones de diversa naturaleza ejercen sobre la actividad ensayada, y que es una

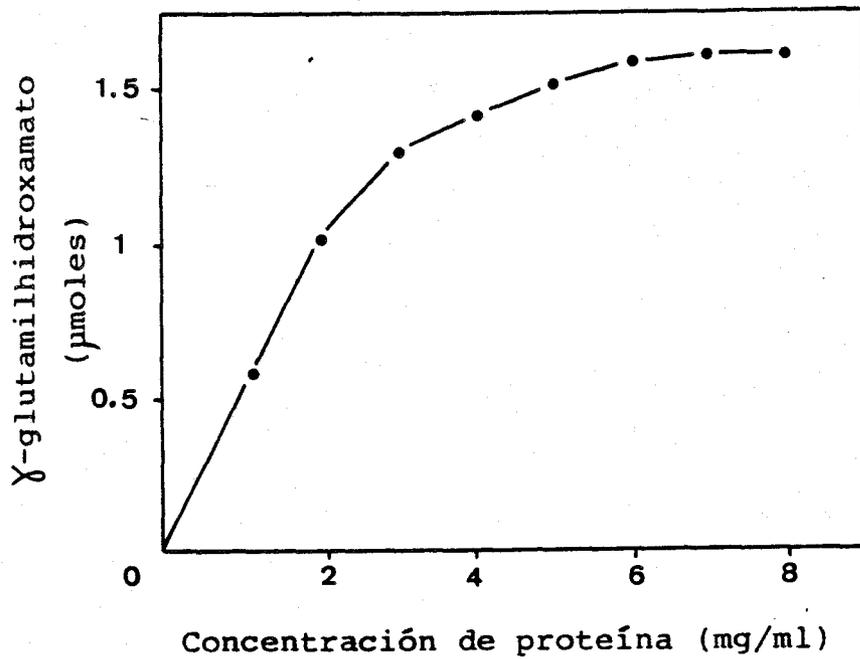


Fig. III.6. Efecto de la concentración de proteína sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa.

constante que se repite a lo largo de toda la bibliografía que sobre dicho tema hemos podido consultar.

Se ensayaron los siguientes aniones: sulfato, sulfito, nitrato, nitrito, bromuro, cloruro, ioduro, fluoruro, fosfatos mono y dibásico, borato, arseniato, acetato, carbonato y bicarbonato. Todos ellos se estudiaron en concentraciones crecientes hasta un límite de 20 mM, y en ninguno de los casos se observaron desviaciones en la actividad específica de la enzima que pudieran ser consideradas significativas.

Los cationes utilizados en los ensayos se reseñan en la tabla III-2. en ella observamos que, al igual que ocurre con los aniones, los efectos de la adición de cationes al medio de reacción son nulos en la mayor parte de los casos probados. Unicamente para concentraciones de Mg^{++} y Ca^{++} entre 1 y 5 mM se encontró un ligero incremento de la actividad γ -glutamyl transpeptidasa, equivalente a un 10% sobre la actividad de la mezcla control sin dichos cationes. Esta diferencia, si bien no es cuantitativamente muy importante, coincide cualitativamente con la observación de Orłowski y Meister (1965), los cuales describen una estimulación por Mg^{++} de un 30% en las reacciones de esta enzima que utilizan sustratos sintéticos tipo γ -glutamyl-p-nitroanilida, aunque dicha estimulación no se produce cuando se utiliza glutati3n como sustrato.

En nuestros ensayos, los cationes se ańadieron al medio de reacci3n en concentraciones crecientes hasta

Catión añadido (5 mM)	Aumento de la actividad enzimática (%)
Control	0
Cd ⁺⁺	0
Mn ⁺⁺	0
Mg ⁺⁺	0
Zn ⁺⁺	0
Na ⁺⁺	0
K ⁺	0
Mg ⁺⁺	10
Ca ⁺⁺	10
Fe ⁺⁺	0
Cu ⁺⁺	0

Tabla III.2. Efecto de la adición de diversos cationes al medio de reacción sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa.

un máximo de 20 mM. Los aniones correspondientes fueron cloruros, sulfatos o acetatos, los cuales, como ya se vió previamente, no ejercen ningún efecto sobre la actividad enzimática estudiada.

III.2.8. Estudio de la adición a la mezcla de reacción de diversos aceptores del resto γ -glutamilo

Durante las reacciones catalizadas por la enzima γ -glutamil transpeptidasa, el grupo γ -glutamilo del sustrato (glutati3n, glutamil-cisteína, etc.) es transferido a un aceptor presente en el medio de reacción (aminoácidos, hidroxilamina, etc.). La capacidad de los distintos aceptores para recibir el resto γ -glutamilo es diferente, y depende directamente de sus características moleculares intrínsecas (disposición atómica, distribución de cargas en la molécula, etc.).

Los aceptores fueron en su mayor parte aminoácidos, aunque también se incluyeron algunos análogos de aminoácidos y sustancias relacionadas con los mismos. Todos ellos se añadieron al medio de reacción en una concentración final de 20 mM, si bien los más insolubles (fenilalanina, tirosina) se emplearon en condiciones de saturación.

El método empleado para cuantificar el efecto de cada aceptor sobre la actividad enzimática fue la medida de la liberación de p-nitroanilina en la reacción que emplea γ -glutamil-p-nitroanilida como sustrato (capítulo II). Los mejores aceptores del resto γ -glutamilo producen un aumento en la liberación de p-nitroanilina con respecto

a los demás y al propio control que emplea γ -glutamil p-nitroanilida como donador y como aceptor del resto γ -glutamilo.

Como se aprecia en la tabla III-3, los compuestos que se comportan como mejores aceptores del resto γ -glutamilo son los aminoácidos de carácter neutro y con cadena lineal (L-metionina, L-alanina, L-serina, L-glutamina). Los aminoácidos muy polares (L-glutámico, L-aspartico) o aquellos que poseen grupos aromáticos en su estructura (L-tirosina, L-triptófano) no presentan especiales cualidades como aceptores del resto γ -glutamilo.

Es de hacer notar que el aminoácido L-cisteína se comporta como un excelente aceptor del resto γ -glutamilo, lo cual es interesante dado que dicho aminoácido se comporta como sustrato aceptor fisiológico de la enzima γ -glutamil transpeptidasa, reacción en la cual se origina el dipéptido γ -glutamil-cisteína; este dipéptido se incorpora al ciclo del γ -glutamilo como sustrato de la enzima glutatión sintetasa (Griffith et al., 1981).

III.2.9. Estudio de la relación entre la actividad γ -glutamil transpeptidasa y algunos de los compuestos más relevantes de la ruta biosintética de las penicilinas

Con el objeto de determinar una posible interacción entre la actividad estudiada y algunos de los intermediarios de la ruta biosintética de las penicilinas, se

Aceptor	Actividad relativa γ -glutamil transpeptidasa (%)
γ -glutamil-p-nitroanilida	100
L-iso-leucina	101
L- α -aminoadípico	100
L-metionina	123
L-aspártico	100
glicina	100
L-treonina	103
L-triptófano	100
L-asparragina	111
L-prolina	104
L-leucina	118
L-tirosina	100
L-valina	117
L-cisteína	126
L-alanina	116
L-serina	121
L-glutámico	100
L-lisina	101
L-histidina	100
L-homoserina	102
L-fenilalanina	100
L-glutamina	119
p-aminobenzoico	100

Tabla III.3. Utilización comparativa de diversos aceptores del resto γ -glutamilo por la γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.

hicieron los estudios que se detallan en los párrafos siguientes.

A fin de determinar si la actividad de la enzima γ -glutamil transpeptidasa podía hacerse extensiva a restos de aminoácidos que tan sólo difirieran en un átomo de carbono con respecto al ácido glutámico (como es el caso del ácido α -aminoadípico) se incubaron extractos enzimáticos activos en presencia del tripéptido ACV y de isopenicilina N. No se detectó actividad de la enzima sobre ninguna de las dos sustancias. En el caso del ACV no se encontró formación de α -aminoadipil-hidroxiato, como habría sucedido en el caso de que se hubiera producido reacción; tampoco se observó formación de α -aminoadipil cisteína al hacer electroforesis de muestras obtenidas de una incubación con ACV en presencia de cisteína. En lo que concierne a la isopenicilina N tampoco se observaron en su molécula cambios detectables por cromatografía ni por variaciones en su actividad antibiótica (bioensayo), lo cual habría sucedido en el caso de que la reacción de transpeptidización se hubiera producido.

Se estudió, asimismo, la posibilidad de que el núcleo de la penicilina (el ácido 6-aminopenicilánico) se comportara como aceptor del resto γ -glutamilo del glutatión, en presencia de la enzima γ -glutamil transpeptidasa. Este hecho era posible dado que el 6-APA posee en su molécula un grupo amino libre, el cual es susceptible de reacción con el resto γ -glutamilo generado a partir del glutatión. Los resultados en este sentido fueron negativos,

pues no se detectó incorporación de un resto γ -glutamilo al 6-APA, ni mediante técnicas de hidrólisis ni por variación en la actividad antibiótica de este intermediario.

Por último, comprobamos el efecto que ACV, isopenicilina N, 6-APA y penicilina G tenían sobre la actividad enzimática. Para ello, estos compuestos se añadieron al medio de reacción en una concentración final superior a la fisiológica: ACV, 2 mM, isopenicilina N, 2 mM; 6-APA, 2 mM, y penicilina G, 1 mg/ml. En ninguno de los casos citados se produjeron diferencias sensibles en la actividad γ -glutamyl transpeptidasa con respecto a los controles sin dichas sustancias.

III.2.10. Efecto de la glucosa sobre la actividad enzimática

La adición de glucosa a un cultivo de P. chrysogenum en un medio de producción, tiene como consecuencia la inhibición de la producción de penicilina mientras la glucosa se encuentra en el medio de cultivo. Una vez ésta es consumida, la producción del antibiótico se reanuda en condiciones normales.

Este efecto, conocido como regulación catabólica por carbono (Magasanik, 1961; Revilla et al., 1981), se explica por una acción represora de algún metabolito de la glucosa sobre las enzimas de la ruta biosintética de las penicilinas (Martín et al., 1982; Revilla, 1983; Revilla et al., 1984).

En la figura III-7 se observa la incidencia que la adición de glucosa a tiempo cero (en el momento de inoculación) al medio de producción, a una concentración final del 2,5% (140 mM), tiene sobre la actividad enzimática γ -glutamil transpeptidasa. En un medio de producción normal (con lactosa como fuente de carbono), la actividad enzimática γ -glutamil transpeptidasa es máxima a las 72 horas de fermentación. Si el medio de cultivo ha sido suplementado con glucosa (2,5%), la actividad γ -glutamil transpeptidasa aumenta rápidamente durante las primeras 24 horas de cultivo, tiempo a partir del cual disminuye lentamente, para estabilizarse a partir de las 72 horas de fermentación.

El efecto que la glucosa ejerce sobre esta actividad enzimática se produce exclusivamente "in vivo", ya que la adición de esta sustancia a una mezcla de reacción "in vitro" no supone variación alguna en la actividad γ -glutamil transpeptidasa.

La explicación del gran aumento que la actividad enzimática estudiada sufre durante las primeras 24 horas de cultivo en presencia de glucosa, tal vez se encuentre en la estimulación del metabolismo primario que dicho azúcar induce en el hongo. Cuando la glucosa es consumida (48-72 horas) los niveles de actividad específica se estabilizan en valores inferiores a los iniciales.

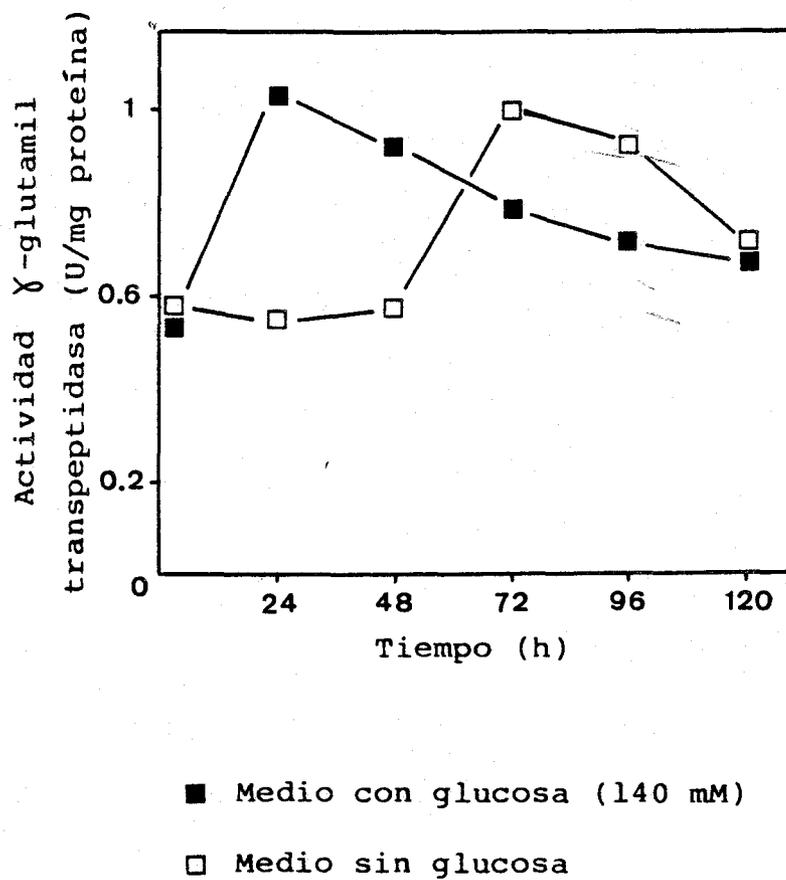


Fig. III.7. Efecto de la adición de glucosa al medio de cultivo sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.

III.2.11. Purificación parcial de la actividad γ -glutamil transpeptidasa

Las etapas seguidas para el proceso de purificación parcial de la actividad γ -glutamil transpeptidasa se han descrito en el capítulo II (Materiales y Métodos), y los resultados obtenidos en cada una de ellas se han recogido en la Tabla III-4.

El proceso seguido consistió en sucesivos tratamientos con sulfato de protamina, DEAE-Sephacel, sulfato amónico (55-80%) y, por último, filtración en columna de Sephadex G-200. El grado máximo de purificación de esta actividad fue de 27,7 veces.

III.2.12. Determinación del peso molecular de la actividad γ -glutamil transpeptidasa

El peso molecular de la actividad γ -glutamil transpeptidasa de *P. chrysogenum* AS-P-78 se determinó por el procedimiento de filtración en columna de gel Sephadex G-200, según se detalla en el capítulo II de este trabajo (Materiales y Métodos). La muestra que se utilizó en dicho proceso provenía de un extracto enzimático tratado con sulfato amónico (fracción 55-80%). La elución se llevó a cabo empleando Tampón Tris-HCl, 0,05 M, pH 8.

La actividad γ -glutamil transpeptidasa se detectó en la fracción 13, equivalente a un volumen de elución de 77.9 ml. El valor V/V_0 obtenido para dicha actividad fué 1,56 y el de K_{av} 0,30. Este valor se obtiene mediante la siguiente fórmula:

	VOLUMEN (ML)	CONCENTRACION DE PROTEINA (MG/ML)	PROTEINA TOTAL (MG)	ACTIVIDAD TOTAL (U)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/MG)	PURIFICACION (VECES)
1. EXTRACTO CRUDO	100	9.6	960	86.4	0.09	
2. SULFATO DE PROTAMINA	121	5.2	629.2	71	0.11	1.25
3. DEAE-SEPHACEL	137	1.3	178.1	60	0.33	3.74
4. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 55-80%	4	6.2	24.8	27	1.1	12.2
5. FILTRACION SEPHADEX G-200	9	0.7	6.3	15.7	2.5	27.7

TABLA. III. 4. ESQUEMA DE PURIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD γ -GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA DE P. CHRYSOGENUM AS-P-78.

$$K_{AV} = \frac{V_E - V_0}{V_T - V_0}$$

Donde V_E : Volumen de elución

V_0 : Volumen de elución para el azul dextrano

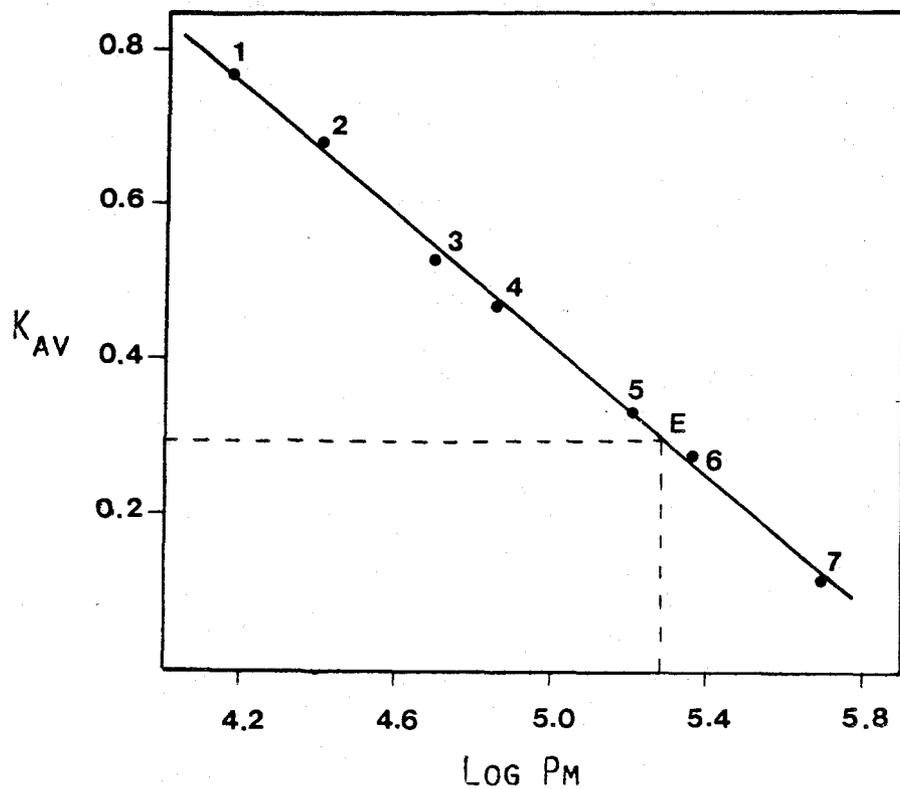
V_T : Volumen total del gel

Representantes de los valores de K_{AV} frente a los logaritmos de los pesos moleculares de las proteínas utilizadas para la calibración, se obtiene la recta patrón que se representa en la figura III-8. Llevando a esta recta el valor de K_{AV} hallado para la actividad γ -glutamyl transpeptidasa, resulta un valor de peso molecular aproximado de 180.000 para dicha actividad enzimática. Este valor es semejante al encontrado para esta actividad en riñón de rata y riñón de cerdo (Tate y Meister, 1975).

III.2.13. Actividad de la γ -glutamyl transpeptidasa con respecto a varios sustrato. Influencia de la concentración de glutatión sobre la actividad enzimática

La enzima γ -glutamyl transpeptidasa se muestra activa hacia un gran número de γ -glutamyl derivados de aminoácidos y péptidos. Esta baja especificidad por el sustrato nos llevó a ensayar varios de ellos, empleando la reacción de formación de γ -glutamyl hidroxamato descrita previamente (capítulo II).

Se utilizó un sustrato artificial: γ -glutamyl-p-nitroanilida, y cuatro sustratos que se encuentran en



Gel utilizado: Sephadex G-200

1. Ribonucleasa A
 2. Quimotripsinógeno A
 3. Ovoalbúmina
 4. Albúmina
 5. Aldolasa
 6. Catalasa
 7. Ferritina
- E- γ -glutamiltanspeptidasa

P_m: 180.000

Fig. III.8. Recta de calibración y peso molecular obtenido para la actividad γ -glutamiltanspeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.

el medio celular de forma permanente, si bien en concentraciones diversas. Todos ellos se utilizaron a la misma concentración (5 mM) en estos experimentos.

En la Tabla III-5 se representan las actividades relativas de la γ -glutamyl transpeptidasa hacia cada uno de dichos sustratos, tomando como punto de referencia la actividad hacia el glutati3n (mon3mero), ya que fue con este sustrato con el que la enzima ensayada se mostr3 m3s activa. Este hecho no es de extra3ar, ya que el glutati3n es el sustrato natural mayoritario de la γ -glutamyl transpeptidasa. Por el contrario, el glutati3n en su forma d3mera se mostr3 pr3cticamente inactivo como sustrato.

Las dos formas del compuesto γ -glutamyl-ciste3na se comportaron como buenos sustratos de la enzima, especialmente el mon3mero. Por 3ltimo, la γ -glutamyl-p-nitroanilida actu3 como sustrato de la γ -glutamyl transpeptidasa con una eficiencia de aproximadamente la mitad que la del glutati3n (mon3mero).

Para estudiar la influencia que la concentraci3n de sustrato ejerce sobre la actividad elegimos el glutati3n como id3neo en su doble faceta de sustrato natural y de sustrato m3s activo de los ensayados.

Como se observa en la figura III-9, la velocidad de reacci3n se incrementa con la concentraci3n del sustrato hasta que 3sta alcanza valores de 15 mM, cifra por enzima de la cual la velocidad permanece invariable (representaci3n de Dixon). Empleando la representaci3n de Line-

SUSTRATO	ACTIVIDAD RELATIVA (Glutación monómero:100)
γ -glutamil-p-nitroanilida	47
γ -glutamil-cisteína (monómero)	80
γ -glutamil-cisteína (dímero)	63
Glutación (dímero)	1
Glutación (monómero)	100

Tabla III.5. Actividad comparada de los diversos compuestos utilizados como sustratos de la actividad γ -glutamil transpeptidasa.

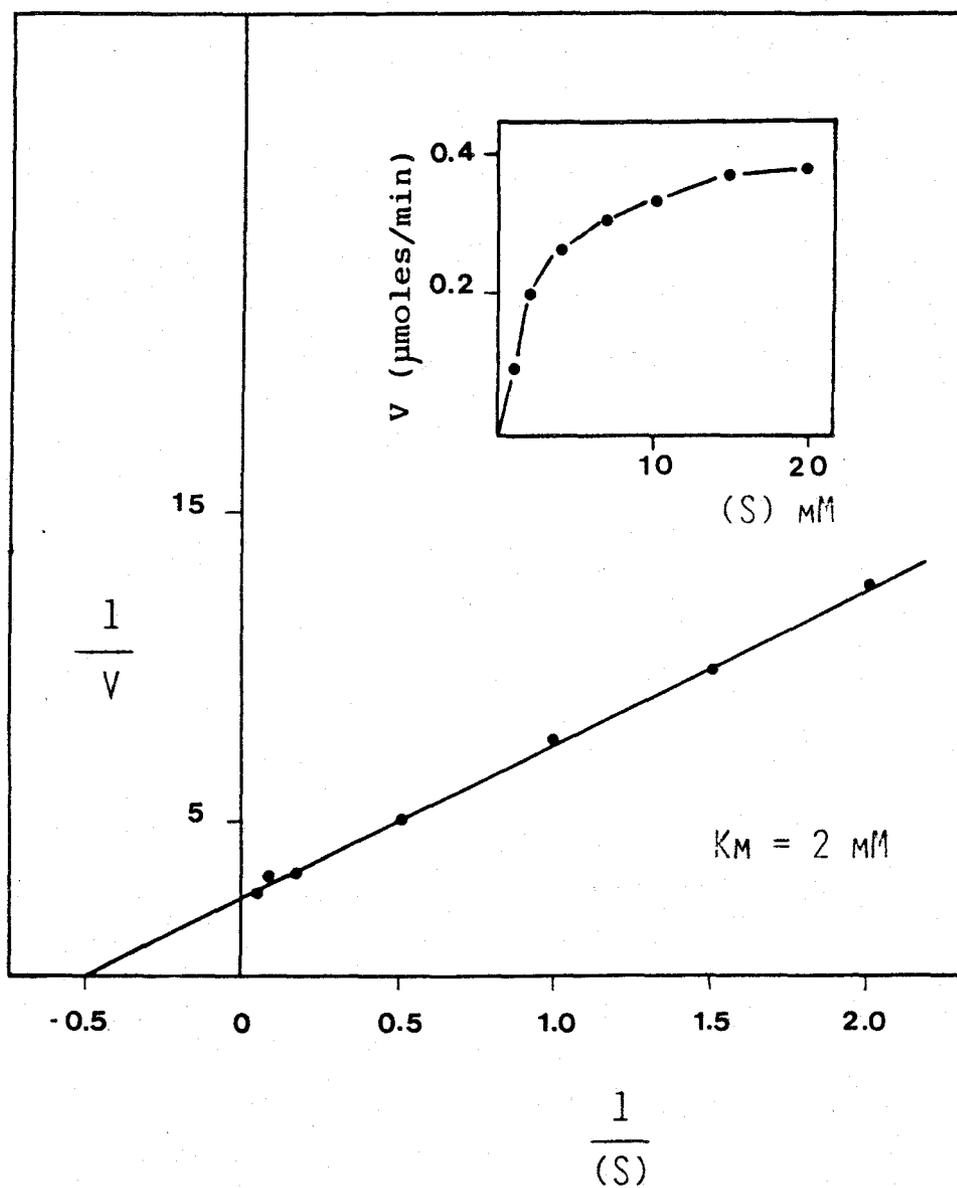


Fig. III.9. Influencia de la concentración de glutati3n sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.

weaver y Burk, se obtiene un valor de Km aparente para el glutati3n de 2 mM.

III.2.14. Estabilidad de la γ -glutamil transpeptidasa

La enzima γ -glutamil transpeptidasa ha mostrado a lo largo del presente trabajo una gran estabilidad, lo cual ha facilitado sobremanera todas las tareas concernientes a su manipulaci3n y almacenamiento.

Los extractos enzimáticos obtenidos por rotura mecánica eran almacenados a -20°C durante varios meses sin p3rdida detectable de su actividad, a3n en ausencia de inhibidores de proteasas (PMSF) y agentes reductores (DTT). Las soluciones enzimáticas procedentes de las diversas etapas seguidas durante el proceso de purificaci3n parcial de la γ -glutamil transpeptidasa, eran tambi3n almacenadas a -20°C con p3rdidas en su actividad que apenas sobrepasaban el 10% de la actividad original.

La enzima estudiada mostr3, igualmente, una gran estabilidad frente a los cambios de temperatura. La congelaci3n y descongelaci3n repetida de los extractos enzimáticos no afectaba de forma importante a la actividad enzimática, la cual se mantenía en unos niveles similares a los iniciales.

III.2.15. Valoraci3n de los niveles de γ -glutamil transpeptidasa en diferentes microorganismos

Si bien la cepa utilizada a lo largo de este

trabajo ha sido la cepa de alta producción de penicilina en P. chrysogenum AS-P-78, hemos empleado otra cepa de producción media (P. chrysogenum 54-1255) y algunos mutantes no productores de penicilinas obtenidos en nuestro laboratorio (npe 1, 2, 3, 4 y 5), con objeto de comparar los niveles de la actividad γ -glutamil transpeptidasa en cepas con diferente capacidad de producción de antibióticos.

Los resultados obtenidos (Tabla III-6) muestran muy poca variación en los niveles enzimáticos de la actividad γ -glutamil transpeptidasa de los distintos microorganismos ensayados. A la vista de los resultados mencionados no es posible establecer una relación directa entre la producción de penicilina y la actividad γ -glutamil transpeptidasa para las cepas ensayadas.

III.2.16. Estudio de la inhibición por serina-borato de la actividad γ -glutamil transpeptidasa. Efecto de la inhibición "in vivo" sobre la producción de penicilina

Desde 1959, fecha en la que Revel y Ball descubrieron el efecto inhibitorio que una mezcla equimolecular de L-serina y borato ejercía sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa (efecto que no producen los dos compuestos por separado), estudios sobre inhibición de esta enzima se han llevado a cabo con dichos componentes (Viña et al., 1983; Nakayama et al., 1984).

Cepa	Actividad específica (U/mg prot.)		Producción de penicilina
	Extracto crudo dializado	55-80% SO ₄ (NH ₄) ₂	
<u>P. chrysogenum</u> AS-P-78	0.09	0.68	5.000 µg/ml
<u>P. chrysogenum</u> Wis. 54-1255	0.07	0.60	800 µg/ml
<u>P. chrysogenum</u> Wis. 54-1255 npe U.L.1	0.08	0.70	50 µg/ml
<u>P. chrysogenum</u> Wis. 54-1255 npe U.L.2	0.06	0.65	200 µg/ml
<u>P. chrysogenum</u> Wis. 54-1255 npe U.L.3	0.08	0.62	200 µg/ml
<u>P. chrysogenum</u> Wis. 54-1255 npe U.L.4	0.07	0.61	50 µg/ml
<u>P. chrysogenum</u> Wis. 54-1255 npe U.L.5	0.08	0.63	50 µg/ml

Tabla III.6. Actividad γ -glutamil transpeptidasa en varias cepas de P. chrysogenum.

Nuestro estudio sobre este inhibidor se ha realizado en dos frentes: a) comprobación de su efectividad en reacciones llevadas a cabo "in vitro", y b) ensayo de su acción "in vivo" sobre la producción de penicilina.

El efecto inhibitorio de la serina-borato se manifiesta en cualquiera de las reacciones que lleva a cabo la enzima γ -glutamil transpeptidasa, independientemente de la naturaleza del donador y del aceptor del resto γ -glutamilo. Si bien no se conoce con exactitud el mecanismo de la inhibición, se ha postulado que serina y borato forman un complejo que mimetiza la estructura del resto γ -glutamilo.

La gráfica de la figura III-10 se ha obtenido representando los valores de inhibición producidos por concentraciones crecientes de serina-borato, en una reacción de formación de γ -glutamil hidroxamato a partir de glutatión 0,01 M (capítulo II).

La inhibición se hace ya detectable con una concentración de 1 mM de serina-borato; el 50% de la inhibición se produce con una concentración de 3,5 mM del inhibidor, y concentraciones superiores a 12 mM de serina-borato no originan un aumento sensible en el grado de inhibición, que es prácticamente del 100%.

Los estudios de inhibición "in vivo" se realizaron empleando una concentración de inhibidor de 40 mM. Cuando un medio complejo de producción era suplementado con serina-borato 40 mM, el micelio del inóculo era incapaz de desarrollarse en dicho medio. Si la adición de se-

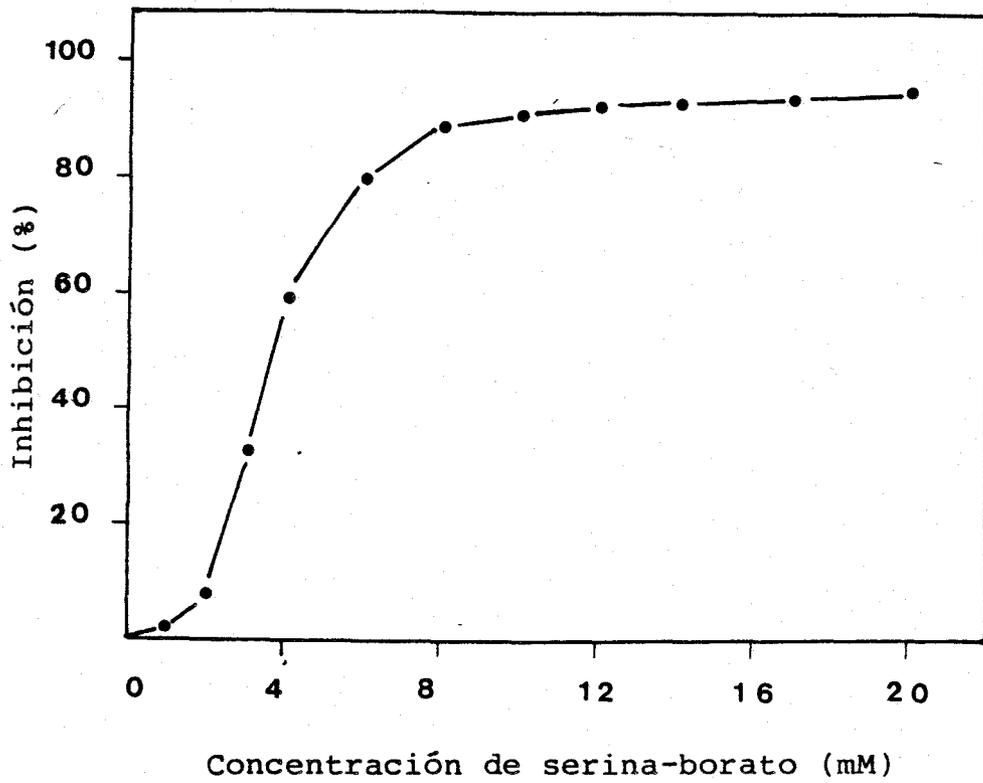
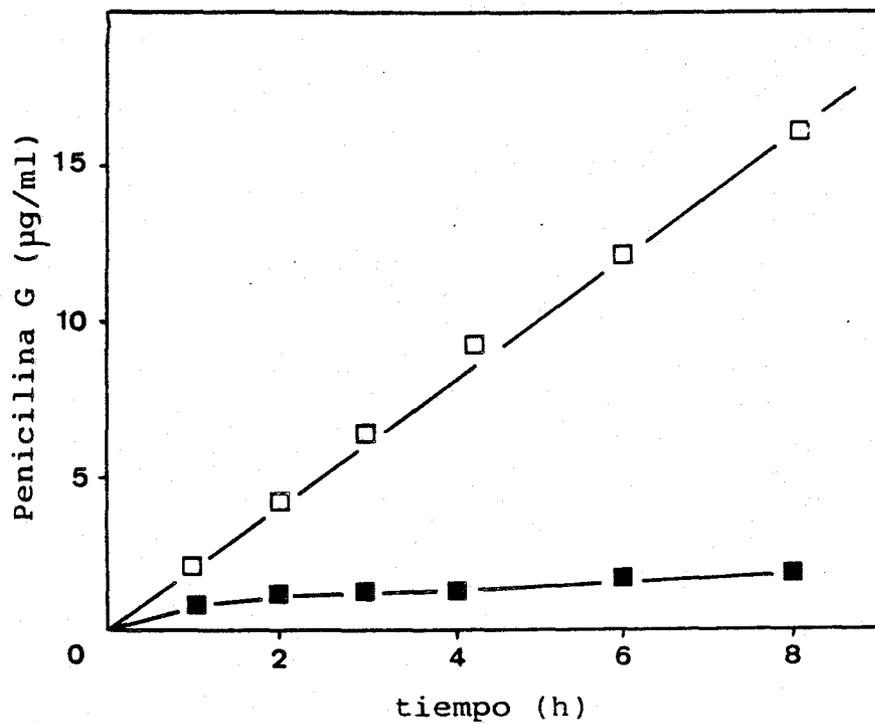


Fig. III.10. Efecto de la concentración del inhibidor serina-borato sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum AS-P-78.

rina-borato al medio de producción se hacía a las 48 horas de cultivo, no se detectaban cambios aparentes en el crecimiento del hongo ni en la producción de penicilina (muestras tomadas a intervalos de 12 horas tras la adición de inhibidor). Hay que precisar que este medio de cultivo posee una fuente de nitrógeno de fácil metabolización como es el sulfato amónico.

Los resultados obtenidos por adición de serina-borato 40 mM a un medio de suspensión limitado en nitrógeno se muestran en la figura III-11. El medio de suspensión limitado en nitrógeno impide que el hongo crezca, si bien la producción de penicilina se mantiene de forma lineal. En nuestro experimento, el medio de suspensión se sembró con micelio procedente de un cultivo de 48 horas (fase de máxima velocidad de producción de penicilina). Como se observa en la mencionada figura, la producción de penicilina en el medio que no contiene serina-borato es lineal a lo largo del tiempo. En el medio que posee una concentración de inhibidor de 40 mM la producción de penicilina se ve disminuída en una proporción del 90% a las 8 horas de cultivo.



■ Medio con serina-borato 40 mM
□ Medio sin serina-borato

Fig. III.11. Efecto de la serina-borato sobre la producción de penicilina G en un medio de suspensión limitado en nitrógeno.

DISCUSSION

El trabajo que se desarrolla en estas páginas se enmarca en los estudios que se están realizando en nuestro departamento sobre una posible relación entre el ciclo del γ -glutamilo y la primera etapa de la ruta biosintética de los antibióticos β -lactámicos. La gran similitud existente en las estructuras químicas y en las rutas biosintéticas del glutatión y del ACV (tripéptido precursor de las penicilinas y cefalosporinas), y el efecto inhibitorio que el glutatión es capaz de ejercer sobre la enzima isopenicilina N sintetasa (enzima clave de la ruta biosintética de las penicilinas) (Ramos et al., 1984) hacen suponer que existe una relación entre ambas vías.

La enzima γ -glutamil transpeptidasa es un componente clave del ciclo del γ -glutamilo. Además de estar involucrada en el transporte de compuestos a través de la membrana celular, se encarga de controlar el nivel de glutatión intracelular, en cooperación con la glutatión sintetasa.

Los métodos utilizados en este trabajo para la obtención de crudos enzimáticos incluyeron sonicación del micelio, rotura mecánica (en desintegrador Braun), tratamiento con solventes orgánicos (n-butanol) y tratamiento con agentes detergentes (Tritón X-100). De todos ellos, el que produjo extractos enzimáticos más activos fue el que combinaba la rotura mecánica del micelio (durante un tiempo de 2.5 minutos) con el tratamiento del homogeneizado resultante con Tritón X-100 al 2% (veáse Tabla III.1). El efecto potenciador de la actividad enzimática de los

crudos que ejerce el Tritón X-100 parece indicar que la enzima γ -glutamil transpeptidasa de P. chrysogenum se halla ligada a estructuras membranosas de la célula de las que es liberada por acción de un agente solubilizador de dichas estructuras como es el Tritón X-100. Este hecho es consistente con los estudios relativos a la γ -glutamil transpeptidasa de otras especies animales (rata, cerdo, hombre), en los que se demuestra que dicha actividad está ligada a la membrana celular (Spater et al., 1983).

El pH óptimo para la actividad estudiada se sitúa en un rango comprendido entre 7.5 y 9, el cual coincide con estudios previos de dicha actividad enzimática en riñón de cerdo (Orlowski y Meister, 1965) y riñón de rata (Curthoys y Kuhlenschmidt, 1975). La temperatura de actuación considerada más favorable para esta actividad enzimática en P. chrysogenum es la comprendida en el intervalo entre 30 a 40°C. El pH y la temperatura a los que se desarrollan los cultivos de P. chrysogenum AS-P-78 para la producción de penicilina, si bien no coinciden exactamente con el pH y la temperatura óptimos para la actividad in vitro de la γ -glutamil transpeptidasa se acercan bastante a los mismos. Estos resultados pueden hacer suponer que la enzima γ -glutamil transpeptidasa se encuentra in vivo en condiciones moderadamente favorables para ejercer un posible papel en la formación de péptidos relacionados con la biosíntesis de penicilina.

Las condiciones encontradas por nosotros para el desarrollo de la actividad γ -glutamil transpeptidasa

de P. chrysogenum AS-P-78 coinciden con las halladas por otros autores para esa misma enzima en especies como rata, cerdo y hombre (Orlowski y Meister, 1965; Curthoys y Kuhlenschmidt, 1975). Así, nuestros resultados coinciden con los de estos autores en la nula influencia que ejercen sobre esta actividad los iones que se encuentran con más abundancia en el medio celular. Tan sólo la presencia de Ca^{++} y Mg^{++} a una concentración de 5 mM incrementó un 10% la actividad enzimática.

Los mejores aceptores del resto γ -glutamilo son los aminoácidos de carácter neutro o poco polar (cisteína, metionina, serina), siendo muy poco activos en este sentido los aminoácidos cargados y con restos aromáticos (glutámico, aspártico, fenilalanina). La cisteína se comporta como un buen aceptor del resto γ -glutamilo, lo cual no es de extrañar dado que es un sustrato aceptor natural de la γ -glutamil transpeptidasa; en esa reacción se produce el dipéptido γ -glutamilcisteína, que constituye un sustrato de la glutatión sintetasa (Griffith et al., 1981).

Los estudios realizados para intentar observar alguna actividad de la γ -glutamil transpeptidasa sobre los intermediarios más relevantes de la ruta biosintética de las penicilinas han demostrado que la enzima no tiene ningún efecto sobre estos compuestos. La enzima no es capaz de utilizar el resto α -aminoadípico inicial del ACV y de la isopenicilina N, lo cual podría haber sido factible, dado que sólo difiere del resto γ -glutamilo en un $-\text{CH}_2-$ adicional. Este hecho indica una alta especificidad

de la enzima con respecto a la longitud de la cadena del resto aminoácido que se transfiere. Tampoco se ha encontrado que exista transferencia de un resto γ -glutamilo al intermediario 6-APA como aceptor. La actividad enzimática no se vió afectada por la presencia en el medio de reacción de los intermediarios y productos de la ruta biosintética de la penicilina ensayados.

La actividad γ -glutamil transpeptidasa presenta un nivel constante durante las primeras 48 horas del cultivo de *P. chrysogenum*, momento a partir del cual aumenta hasta llegar a un máximo a las 72 horas, para a continuación disminuir lentamente y estabilizarse entre 96 y 120 horas de cultivo. Cuando el cultivo se inicia en presencia de una concentración de glucosa de 140 mM, la curva de distribución de la actividad γ -glutamil transpeptidasa experimenta un cambio radical. La actividad enzimática es máxima a las 24 horas de cultivo, tiempo a partir del cual decrece lentamente y se estabiliza en valores medios a partir de las 72 horas. El rápido aumento inicial de la actividad enzimática coincide con la presencia en el medio de cultivo de la glucosa añadida. A partir de las 24 horas de cultivo el nivel de glucosa comienza a descender, lo que coincide con la disminución de la actividad γ -glutamil transpeptidasa. Este efecto posiblemente se deba a la estimulación del metabolismo primario que la glucosa ejerce, lo cual redundaría en un aumento de la actividad de la γ -glutamil transpeptidasa, cuya función primaria

parece ser el transporte de aminoácidos mediante el acoplamiento del radical γ -glutamilo.

De los sustratos que se emplearon para el ensayo de la actividad enzimática el que mostró una mayor capacidad de reacción fue el glutati6n en su forma mon6mera. Este compuesto es precisamente el sustrato natural de la γ -glutamil transpeptidasa. La forma d6mera del glutati6n no mostr6 pr6cticamente actividad durante los ensayos realizados. Los dip6ptidos γ -glutamilciste6na (mon6mero y d6mero) actuaron como buenos sustratos donadores del grupo γ -glutamilo, aunque con un grado de efectividad inferior al del glutati6n. Esto indica que, dado que ambos se encuentran normalmente en la c6lula, pueden ser empleados como sustratos secundarios por la enzima γ -glutamil transpeptidasa.

A lo largo de nuestro trabajo, la enzima ha mostrado una gran estabilidad en lo que se refiere a conservaci6n de la actividad enzimática. Los extractos crudos o parcialmente purificados conservaron su actividad pr6cticamente sin variaciones tras un per6odo de 2 meses congelados a -20°C . Por otro lado, la enzima presenta actividad a temperaturas de 50°C y aun superiores. Esta gran resistencia a las variaciones t6rmicas del medio ha sido empleada por algunos investigadores (Orlowsky y Meister, 1965) como factor a tener en cuenta durante el proceso de purificaci6n de la enzima. Los mismos autores encontraron que la γ -glutamil transpeptidasa de ri6n de cerdo

era capaz de soportar el calentamiento a 58°C durante 1 hora en presencia de glutatión conservando el 100% de la actividad inicial.

El ensayo de la actividad γ -glutamil transpeptidasa en varias cepas de P. chrysogenum con distinta capacidad de producción de penicilina proporcionó datos muy semejantes en cuanto a la actividad enzimática encontrada en cada una de las cepas. Este resultado, por otra parte, era previsible a la luz de los resultados previos, pues no cabía esperar una dependencia estricta de la biosíntesis de penicilina del nivel de la actividad γ -glutamil transpeptidasa. Aún cuando la γ -glutamil transpeptidasa tenga un papel relacionado con la formación de péptidos precursores de penicilina, la concentración de este antibiótico que se produce viene probablemente determinada por la actividad de las enzimas posteriores que ciclan el tripéptido ACV a isopenicilina N (isopenicilina N sintetasa) o intercambian la cadena lateral de la isopenicilina N a penicilina G (penicilina transacilasa). De hecho, en nuestro laboratorio se ha demostrado que existe una correlación estricta entre el nivel de isopenicilina N sintetasa y la capacidad de producción de penicilina de distintas cepas de P. chrysogenum (Ramos et al., 1984).

Los estudios realizados in vitro con la mezcla equimolecular de serina y borato ha dado como resultado un marcado efecto inhibitorio de este complejo sobre la actividad γ -glutamil transpeptidasa, hecho que está ampliamente reflejado en la literatura (Revel y Ball, 1959;

Viña et al., 1983; Nakayama et al., 1984) y que confirma la similitud de comportamiento entre esta enzima en P. chrysogenum y las estudiadas en otras especies.

El efecto de la inhibición in vivo por serina borato de la actividad γ -glutamyl transpeptidasa sobre la producción de penicilina era un paso obligado tras el estudio del efecto in vitro. Los ensayos iniciales efectuados en medio complejo de producción mostraron que el micelio del inóculo es incapaz de crecer en medio de producción con una concentración de serina-borato de 40 mM. Visto esto, la adición del inhibidor se realizó a las 48 horas de cultivo, tiempo en el cual la velocidad de producción de penicilina es máxima. La concentración del inhibidor en el medio de cultivo fue de 40 mM. Las muestras, tomadas cada 12 horas, no revelaron ninguna variación en la producción de penicilina ni en el crecimiento del hongo crecido en presencia o en ausencia del inhibidor, debido probablemente a que el hongo está utilizando en estas condiciones aminoácidos procedentes del medio complejo para el crecimiento y para la biosíntesis de penicilina.

El estudio del efecto del complejo serina-borato sobre la producción de penicilina utilizando un medio de suspensión limitado en fuente de nitrógeno en el cual se produce penicilina en ausencia de crecimiento, arrojó resultados distintos a los encontrados en medio de producción. En el medio de suspensión limitado en nitrógeno una concentración de serina-borato de 40 mM inhibió un 90% de la producción total de penicilina. Este resultado sugiere

que en el medio de suspensión limitado en fuente de nitrógeno, la γ -glutamil transpeptidasa probablemente interviene en procesos de transpeptidización relacionados con la formación del tripéptido precursor de penicilina. Esto explicaría que cuando se inhibe la actividad γ -glutamil transpeptidasa por serina-borato se corte casi completamente la biosíntesis de penicilina.

La etapa de la ruta biosintética de la penicilina se ve afectada por la presencia del complejo serina-borato ha de ser confirmada por estudios de acumulación de productos intermediarios de dicha ruta en un futuro próximo. Dado que no hay información sobre efectos inhibitorios de la serina-borato sobre el complejo enzimático encargado de la biosíntesis de penicilina, aún sin descartar esta posibilidad, parece más probable que el mecanismo por el que se lleva a cabo dicha inhibición este relacionado con la formación del tripéptido ACV precursor de penicilina.

Los resultados encontrados por algunos autores (Nakayama et al., 1984) indican, que la inhibición de la enzima γ -glutamil transpeptidasa origina la acumulación de cantidades no fisiológicas de glutatión. Este hecho era de todo punto esperable ya que dicha enzima es la encargada de la degradación del glutatión celular. Si bien en otros microorganismos un aumento de la concentración intracelular de glutatión no tiene mayor trascendencia fisiológica, en P. chrysogenum este hecho puede tener importantes consecuencias de cara a la producción de penici-

lina, ya que el glutati3n se comporta como inhibidor de la isopenicilina N sintetasa, enzima de la ruta biosint3tica de la penicilina que se encarga de la ciclaci3n del trip3ptido ACV para formar isopenicilina N (Ramos, 1984). La comprobaci3n de los niveles de glutati3n y de ACV en ausencia y presencia del inhibidor serina-borato servir3 para corroborar el efecto argumentado anteriormente.

CONCLUSIONES

- 1ª.- La técnica más eficiente para la obtención de extractos acelulares con actividad γ -glutamil transpeptidasa en la especie P. chrysogenum AS-P-78 consiste en un proceso de rotura mecánica del micelio (en un desintegrador Braun) durante 2.5 minutos en tampón Tris-HCl 0.05 M, pH 8 y posterior tratamiento con Tritón X-100 al 2% durante 5 horas con agitación.
- 2ª.- Los ensayos de reacción se llevaron a cabo a una temperatura óptima de 37°C y a pH 8. El tiempo idóneo de reacción fue de 7 minutos para reacciones con glutatión como sustrato y de 5 minutos para sustratos tipo γ -glutamil-p-nitroanilida. Empleando fracciones parcialmente purificadas se determinó un valor de K_m aparente para el glutatión igual a 2 mM.
- 3ª.- La enzima γ -glutamil transpeptidasa no necesita de la presencia de cofactores, estabilizadores enzimáticos o iones para ejercer su actividad. Únicamente en reacciones con γ -glutamil-p-nitroanilida como sustrato la adición al medio de reacción de Mg^{++} o Ca^{++} a una concentración final de 5 mM supuso un aumento del 10% en la actividad enzimática.
- 4ª.- De todos los aminoácidos ensayados como aceptores del resto γ -glutamilo, los que han mostrado una mayor efectividad han sido los de carácter neutro y cadena lineal (metionina, cisteína, serina); los aminoácidos con estructura marcadamente polar (glutámico, aspártico) o con sustituyentes aromáticos (fenilala-

nina, tirosina) han actuado con poca efectividad como sustratos aceptores del resto γ -glutamilo.

- 5^a.- La actividad γ -glutamil transpeptidasa se mantiene de manera uniforme durante las primeras 48 horas de cultivo en medio complejo de producción, aumenta rápidamente entre 48 y 72 horas y, a continuación, disminuye moderadamente. Cuando el medio de cultivo es suplementado con glucosa (140 mM) la actividad aumenta drásticamente mientras la glucosa permanece en el medio de cultivo (24 horas), para disminuir lentamente cuando dicho azúcar empieza a desaparecer del medio.
- 6^a.- La enzima γ -glutamil transpeptidasa se ha purificado por tratamiento con sulfato de protamina (2%), cromatografía en DEAE-Sephacel, precipitación con sulfato amónico (55-80%) y filtración en Sephadex G-200. El grado de purificación logrado fue de 27.7 veces. El peso molecular de esta actividad, determinado por filtración en gel, se estableció en un valor aproximado de 180.000.
- 7^a.- La actividad enzimática no mostró alteraciones detectables cuando las muestras eran congeladas y almacenadas a -20°C durante dos meses. La adición de inhibidores de proteasas (PMSF) o agentes reductores (DTT) no redundó en ningún efecto sobre la actividad enzimática que demostró poseer un alto grado de estabilidad a lo largo de todo nuestro trabajo.
- 8^a.- Los niveles de actividad γ -glutamil transpeptidasa

de la cepa de alta producción de penicilinas P. chrysogenum AS-P-78 se encuentran en el mismo rango que los de otras cepas ensayadas y que tienen moderada o muy baja capacidad de producción de antibiótico, lo cual hace suponer que no existe una dependencia estricta entre la actividad enzimática estudiada y la producción de penicilinas.

- 9ª.- Al igual que ocurre para la γ -glutamyl transpeptidasa obtenida de otras fuentes (rata, hombre), la procedente de P. chrysogenum es inhibida in vitro por la mezcla equimolecular de L-serina y borato. Una concentración de serina-borato de 3.5 mM inhibe el 50% de la actividad enzimática cuando se emplea glutatión a una concentración 10 mM como sustrato.
- 10ª.- La inhibición in vivo por serina-borato (40 mM) de la actividad γ -glutamyl transpeptidasa ocasiona una disminución superior al 90% en la capacidad para producir penicilina, cuando el experimento se realiza en un medio de suspensión limitado en fuente de nitrógeno.

BIBLIOGRAFIA

- ABERHART, D.J. (1967). Biosynthesis of β -lactam antibiotics. Tetrahedron, 33: 1545-1559.
- ABERHART, D.J., J.Y.R. CHU, N. NEUSS, C.H. NASH, J. OCCOLOWITZ, L.L. HUCKSTEP y N. DE LA HIGUERA. (1974). Retention of valine methyl hydrogens in penicillin biosynthesis. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 564-565.
- ABRAHAM, E.P. (1974). Biosynthesis and enzymatic hydrolysis of penicillins and cephalosporins. Univ. of Tokio Press. Tokio.
- ABRAHAM, E.P. (1978). Developments in the chemistry and biochemistry of β -lactam antibiotics. En: Antibiotics and other secondary metabolites. pp. 141-164. Ed. por R. Hutter, T. Leisinger, J. Nuesch y W. Wehrli. Academic Press. London.
- ABRAHAM, E.P., J.A. HUDDLESTONE, G.S. JAYATILAKE, J. O'SULLIVAN y R.L. WHITE (1981). Conversion of δ -(L- α -amino-adipyl-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N in a cell free extract of Cephalosporium acremonium. En: Recent advances in the chemistry of β -lactam antibiotics. pp. 125-134. Ed. por G.I. Gregory. The Royal Society of Chemistry. London.
- ADRIAENS, P., B. MEESSCHAERT, K. EYSEN y H. VANDERHAEGUE. (1978). Use of L-cysteinyl-bis-L-valine for the biosynthesis of penicillin by Penicillium chrysogenum. FEMS. Microbiol. Letters 4: 15-18.
- ADRIAENS, P., B. MEESSCHAERT, H. VANDERHAEGUE y K. EYSEN. (1976). Incorporation of double labelled valine into δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine by Penicillium chrysogenum. Arch. Internat. Physiol. Biochem. 84: 767-770.
- ADRIAENS, P., B. MEESSCHAERT, W. WUYTS, H. VANDERHAEGUE y K. EYSEN. (1975a). Presence of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine in fermentations of Penicillium chrysogenum. Antimicrob. Agents Chemother. 8: 638-642.
- ADRIAENS, P., H. VANDERHAEGUE, B. MEESSCHAERT y K. EYSEN. (1957b). Incorporation of double labelled L-cystine and DL-valine in penicillin. Antimicrob. Agents Chemother. 18: 15-17.
- ANDERSON, M.E. y A. MEISTER. (1983). Transport and direct utilization of γ -glutamyl cyst(e)ine for glutathione biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 707-711.
- ARNSTEIN, H.R.V., N. ARTMAN, D. MORRIS y E.J. TOMS. (1960). Sulfur containing amino acids and peptides in the mycelium of Penicillium chrysogenum. Biochem. J. 76: 353-357.

- ARNSTEIN, H.R.V. y M.E. CLUBB. (1957). The biosynthesis of penicillin. Comparison of valine and hydroxyvaline as penicillin precursors. *Biochem. J.* 65: 618-621.
- ARNSTEIN, H.R.V. y P.T. GRANT. (1954a). The biosynthesis of penicillin. The incorporation of cysteine into penicillin. *Biochem. J.* 57: 360-367.
- ARNSTEIN, H.R.V. y P.T. GRANT (1954b). The biosynthesis of penicillin. The incorporation of some amino acids into penicillin. *Biochem. J.* 57: 353-359.
- ARNSTEIN, H.R.V. y H. MARGREITER. (1958). The biosynthesis of penicillin. 7. Further experiments on the utilization of L and D valine and the effect of cysteine and valine analogues on penicillin biosynthesis. *Biochem. J.* 68: 339-348.
- ARNSTEIN, H.R.V. y D. MORRIS. (1960). The structure of a peptide containing aminoadipic acid, cysteine and valine present in the mycelium of Penicillium chrysogenum. *Biochem. J.* 76: 357-361.
- BAHADUR, G.A., J.E. BALDWIN, J.J. USHER, E.P. ABRAHAM, G.S. JAYATILAKE y R.L. WHITE. (1981). Cell-free biosynthesis of penicillins. Conversion of peptides into new β -lactam antibiotics. *J. Amer. Chem. Soc.* 103: 7650-7651.
- BALDWIN, J.E. y M. JUNG. (1978). Conversion of penicillins into biosynthetically significant peptides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* pp. 609-610.
- BALDWIN, J.E., J. JUNG, P. SINGH, T. WAN, S. HABER, S. HERCHEN, J. KITCHIN, A.L. DEMAIN, M. KOHSAKA, T. KONOMI y M. YOSHIDA. (1980). Recent biosynthetic studies on β -lactam antibiotics. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 289: 169-172.
- BALDWIN, J.E. y T.S. WAN. (1979). Penicillin biosynthesis: a model for carbon and sulfur bond formation. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* pp. 249-250.
- BEHRENS, O.K., J. COORSE, R.G. JONES, E.C. KLEIDERECK, Q.F. SOPER, F.R. ABECLE, L.M. LARSON, J.C. SYLVESTER, W.J. HAINES y H.C. CARTER. (1948). Utilization of deuterophenylacetyl-DL-15N-valine in penicillin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 175: 765-769.
- BICROFT, B.W. y P.M. TAYLOR. (1981). The role of cysteinylvaline peptides as precursors of penicillin G in Penicillium chrysogenum. En: *Recent advances in the chemistry of β -lactam antibiotics*. (2nd International Symposium Special publication). pp. 135-141. Ed. por G.I. Gregory. The Royal Society of Chemistry. London.

- BONNER, D. (1947). Studies on the biosynthesis of penicillin. Arch. Biochem. 13: 1-9.
- BRUNDIDGE, S.P., F.C.A. GAETA, D.J. HOCK, C.JR. SAPINO, R.P. ELANDER y R.B. MORIN (1980). Association of oxo-piperidine-2-carboxylic acid with penicillin V production in Penicillium chrysogenum fermentation. J. Antibiotic. 33: 1448-1451.
- BRUNNER, R. y M. ROHR. (1975). Phenacyl: coenzyme A ligase. Methods Enzymol. 43: 476-481.
- BRUNNER, R., M. ROHR y M. ZINURI. (1968). Zur biosynthese der penicillins. Z. Physiol. Chem. 349: 95-103.
- BYCROFT, B.S., C.M. WELS, K. CORBETT y D.A. LOWE. (1975). Incorporation of (α -³H)-L-cysteine into penicillin G and the location of the label using isotope exchange and (³H)-nuclear magnetic resonance. J. Chem. Soc. Commun. p. 123.
- CANTORAL, M. (1983). Obtención y caracterización de mutantes de Penicillium chrysogenum Wis 54-1255, bloqueados en la biosíntesis de penicilina. Tesina de Licenciatura. (Universidad de León).
- CHAN, J.A., F.C. HUANG y C.J. SIH. (1976). The absolute configuration of the amino acids in δ -(α -aminoadipyl) cysteinylvaline from Penicillium chrysogenum. Biochemistry 15: 177-180.
- COLE, M. (1966). Formation of 6-aminopenicillanic acid, penicillins and penicillin acylase by various fungi. Appl. Microbiol. 14: 98-104.
- COLE, M., T. SAVIDGE y H. VANDERHAEGUE. (1975). Penicillin acylase (assay). Methods. Enzymol. 43: 698-705.
- COOPER, K.E. (1972). The theory of antibiotic diffusion zones. En: Analytical Microbiology, vol. 2, pp. 13-30. F. Kavanagh (ed.). Academic Press. London y New York.
- CURTHOYS, N.P. y T. KUNLENSCHMIDT. (1975). Phosphate-independent glutaminase from rat kidney. J. Biol. Chem. 250: 2099-2105.
- DEMAIN, A.L. (1956). Inhibition of penicillin formation by amino acid analogs. Arch. Biochem. Biophys. 64: 74-79.
- DEMAIN, A.L. (1957). Inhibition of penicillin formation by Lysine. Arch. Biochem. Biophys. 67: 244-245.
- DEMAIN, A.L. (1959). The mechanism of penicillin biosynthesis. Adv. Appl. Microbiol. 1: 23-47.

- DEMAIN, A.L. (1966). Biosynthesis of penicillins and cephalosporins. En: Biosynthesis of antibiotics. 1: 29-94. Ed. por J.F. Snell. Academic Press. New York.
- DEMAIN, A.L. (1981). Biosynthetic manipulations in the development of β -lactam antibiotics. En: β -lactams, mode of action, new developments and future perspective. pp. 567-583. Ed. por M.R.J. Salton y G.D. Schochwan. Academic Press. New York.
- DEMAIN, A.L. (1983). Biosynthesis of β -lactam antibiotics. En: Handbook of experimental pharmacology. (Antibiotics. Containing the β -lactam structure). 67: 188-228. Ed. por A.L. Demain y N.A. Solomon. Springer-Verlag. New York.
- DEMAIN, A.L., J. KUPKA, Y.Q. SHEN y R. WOLFE. (1982). Microbiological synthesis of β -lactam antibiotics. En: Trends in antibiotics research. Genetics, biosynthesis, actions and new substances. pp. 238-247. Ed. por H. Umezawa, A.L. Demain, T. Hata y C.R. Hutchinson. Japon Antibiotics Research Association.
- DREW, S.W. y A.L. DEMAIN. (1977). Effect of primary metabolites on secondary metabolism. Ann. Rev. Microbiol. 31: 343-356.
- ERICKSON, R.C. y R.E. BENNET. (1965). Penicillin acylase activity of Penicillium chrysogenum. Appl. Microbiol. 13: 738-742.
- ERIQUEZ, L.A. y M.A. PISANO. (1979). Isolation and nature of intracellular alpha-aminoadipic acid-containing peptides from Paecilomyces persicinus P-10. Antimicrob. Agents Chemother. 16: 392-397.
- FAHEY, R., W.C. BROWN, W.B. ADAMS y M.B. WORSHAM. (1978). Occurrence of glutathione in bacteria. J. Bacteriol. 133: 1126-1129.
- FAHEY, R., G.L. NEWTON, B. ARRICK, T. OVERDANK-BOGART y S.B. ALEY. (1984). Entamoeba histolytica: An eukaryote without glutathione metabolism. Science. 224: 70-72.
- FAWCETT, P.A., J.J. USHER, J.A. HUDDLESTON, R.C. BLEANEY, J.J. NISBET y E.P. ABRAHAM. (1976). Synthesis of δ -(α -aminoadipyl)cysteinylvaline and its role in penicillin biosynthesis. Biochem. J. 157: 651-660.
- FAWCETT, P.A., J.J. USHER y E.P. ABRAHAM. (1975). Behaviour of tritium-labelled isopenicillin N and 6-aminopenicillanic acid as potential penicillin precursors in an extract of Penicillium chrysogenum. Biochem. J. 151: 741-746.

- FLEMING, A. (1929). On the antibacterial action of a Penicillium with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. B. J. Exp. Pathol. 10: 226-236.
- FLOREY, H.W., E.B. CHAIN, N.G. HEATLEY, M.A. JENNINGS, A.G. SANDERS, E.P. ABRAHAM y M.E. FLOREY. (1949). Antibiotics vol. 2. Oxford. University Press. London.
- FRIEDRICH, C.G. y A.L. DEMAINE. (1978). Uptake and metabolism of α -amino adipic by Penicillium chrysogenum Wis 54-1255. Arch. Microbiol. 119: 43-47.
- FUJISAWA, Y. (1977). Studies on the biosynthesis of cephalosporin. Ph.D. Thesis. Kyoto University. Kyoto. (J. Takeda Res. 36: 295-356).
- GRIFFITH, O.W., R.J. BRIDGES y A. MEISTER. (1981). Formation of γ -glutamyl-cyst(e)ine in vivo is catalyzed by γ -glutamyl transpeptidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 2777-2781.
- HALLIDAY, W.J. y H.R.V. ARNSTEIN. (1956). The biosynthesis of penicillin.4. The synthesis of benzylpenicillin by washed mycelium of Penicillium chrysogenum. Biochem. J. 64: 380-384.
- HIGUCHI, K., F.G. JARVIS; W.H. PETERSON y M.J. JOHNSON. (1946) Effect of phenylacetic acid derivatives on the types of penicillin produced by Penicillium chrysogenum Q-176. J. Amer. Chem. Soc. 68: 1669-1670.
- HOLLANDER, I.J., Y.Q. SHEN, J. HEIM y A.L. DEMAINE. (1984). A pure enzyme catalyzing penicillin biosynthesis. Science. 224: 610-612.
- HUDDLESTON, J.A., E.P. ABRAHAM, D.W. YOUNG, D.J. MORECOMBE y P.K. SEN. (1978). The stereochemistry of β -lactam formation in cephalosporin biosynthesis. Biochem. J. 169: 705-707.
- HUDDLESTON, J.A., R.L. WHITE, G.S. JAYATILAKE, J.O'SULLIVAN y E.P. ABRAHAM. (1980). Int. Symp. Chem. β -lactam Antibiot. 2nd. Cambridge. Citado en Abraham et al., (1981)
- IMADA, A., K. KITANO, K. KINTAKA, M. MUROI y M. ASAI. (1981). Sulfazecin and isosulfazecin, novel β -lactam antibiotics of bacterial origin. Nature 289: 590-591.
- JENSEN, G.L. y A. MEISTER. (1983). Radioprotection of human lymphoid cells by exogenously supplied glutathione is mediated by γ -glutamyl transpeptidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 4714-4717.
- JOHNSON, M.J. (1952). Recent advances in penicillin fermentation. Bull. Worl. Health Organization 6: 99-121.

- KATO, K. (1953). Occurrence of penicillin nucleus in culture broths. *J. Antibiot.* 6: 130-136.
- KITANO, K., K. KINTAKA, K. KATAMOTO, K. NARA e Y. NAKAO. (1975). Occurrence of 6-aminopenicillanic acid in culture broth of strains belonging to the genera Thermoascus, Gymnoscus, Polypaecilum and Malbranchea. *J. Ferment. Technol.* 53: 339-346.
- KLEINHAUF, H. y H. KOISCHWITZ. (1978). Glutathione and related peptides. *Progress Mol. Subcell. Biol.* 6: 59-112.
- LALAND, S.G., T.L. ZIMMERT y O. FROSHOV. (1978). Bioactive peptides produced by microorganisms. Ed. por H. Umezawa, T. Takita y T. Shiba. pp. 7-34. Wiley. New York.
- LISY, V. y S. MURPHY. (1984). γ -glutamyl transpeptidase activity can be altered by kainic acid and related compounds. *Physiologia Bohemoslovaca.* 33: 17-22.
- LODER, P. B. (1972). Postepy Hig Med. Dos. 26: 493-500.
- LODER, P.B. y E.P. ABRAHAM. (1971a). Isolation and nature of intracellular peptides from a cephalosporin C-producing Cephalosporium sp. *Biochem. J.* 123: 471-476.
- LODER, P.B. y E.P. ABRAHAM. (1971b). Biosynthesis of peptides containing α -amino adipic acid and cysteine in extracts of a Cephalosporium sp. *Biochem. J.* 123: 477-482.
- LODER, P.B., E.P. ABRAHAM y G.G.F. NEWTON. (1969). Behaviour of α -amino adipyl-cysteine and γ -glutamylcysteine in the presence of intact and disrupted mycelium of Cephalosporium sp. *Biochem. J.* 112: 389-396.
- LOPEZ-NIETO, M.J. (1984). Biosíntesis y regulación del tri péptido α -amino adipil-cisteinil-valina en Penicillium chrysogenum y Acremonium chrysogenum. Tesis Doctoral. (Universidad de Salamanca).
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR y R.J. RANDALL. (1951) Protein-measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- LUENGO, J.M., G. REVILLA, J.R. VILLANUEVA y J.F. MARTIN. (1979). Lysine-regulation on penicillin biosynthesis in low producing and industrial strains of Penicillium chrysogenum. *J. Gen. Microbiol.* 115: 207-211.
- LUENGO, J.M., G. REVILLA, M.J. LOPEZ-NIETO, J.R. VILLANUEVA y J.F. MARTIN. (1980). Inhibition and repression of homocitrate synthetase by lysine in Penicillium chrysogenum. *J. Bacteriol.* 144: 869-876.
- MAGASANIK, B. (1961). Catabolite repression. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26: 249-250.

- MARTIN, J.F. y P. LIRAS. (1981). Biosynthetic pathways of secondary metabolites in industrial microorganisms. En *Biotechnology*. 1: 14-31. Ed. por H.J. Rehm y G. Reed. Verlag-Chemie-Weinheim, W.G.
- MARTIN, J.F., J.M. LUENGO, G. REVILLA y J.R. VILLANUEVA. (1979). Biochemical genetics of the β -lactam antibiotics biosynthesis. En: *Genetics of industrial microorganisms*. p. 83. Ed. por O.K. Sebek y A.I. Laskin. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- MARTIN, J.F., G. REVILLA, D.M. ZANCA y M.J. LOPEZ-NIETO. (1982). Carbon catabolite regulation of penicillin and cephalosporin biosynthesis. *Trends in Antibiot. Res.* pp. 258-268.
- MEESSCHAERT, B., P. ADRIAENS y H. EYSSSEN. (1980). Studies on the biosynthesis of isopenicillin N with a cell-free preparation of Penicillium chrysogenum. *J. Antibiot.* 33: 722-730.
- MEISTER, A. (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science*. 220: 472-477.
- MEISTER, A. y S.S. TATE. (1976). Glutathione and γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 559-604.
- MOOZ, D. y A. MEISTER. (1971). Glutathione biosynthesis. *Methods Enzymol.* 17B: 483-495.
- MORECOMBE, D.J. y D.W. YOUNG. (1975). Synthesis of chirally labelled cysteines and the steric origin of C-5 in penicillin biosynthesis. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* pp. 198-199.
- MURAO, S. (1955). Studies on penicillin amidase.2. Research on conditions of producing penicillin amidase. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 29: 400-403.
- NAKAYAMA, R., H. KUMAGAI y T. TOCHIKURA. (1984). Leakage of glutathione from bacterial cells caused by inhibition of γ -glutamyl transpeptidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 653-657.
- NAKAYAMA, R., H. KUMAGAI, T. MARUYAMA, T. TOCHIKURA, T. UNEO y F. FUKAMI. (1981). Synthesis of γ -glutamyl peptides by γ -glutamylcysteine synthetase from Proteus mirabilis. *Agric. Biol. Chem.* 45: 2839-2845.
- NASH, C.H., N. DE LA HIGUERA, N. NEUSS y P.A. LEMKE. (1974). Application of biochemical genetics to the biosynthesis of β -lactam antibiotics. *Dev. Ind. Microbiol.* 15: 114-123.

- NEUSS, N., R.D. MILLER, C.A. AFFOLDER, W. NAKATSUKASA, J. MABE, L.L. HUCKSTE, N. DE LA HIGUERA, A.H. HUNT, J.L. OCCOLOWITZ y J.H. GILHAM. (1980). High performance liquid chromatography (HPLC) of natural products.3. Isolation of new tripeptides from the fermentation broth of Penicillium chrysogenum. Helv. Chim. Acta. 63: 1119-1129.
- NEUSS, N., C.H. NASH, J.E. BALDWIN, P.A. LEMKE y J.B. GRUTZNER. (1973). Incorporation of (2RS, 3S)-(14-¹³C)valine into cephalosporin C. J. Am. Chem. Soc. 95: 3797-3798.
- NEWTON, G.G.F. y E.P. ABRAHAM. (1955). Cephalosporin C a new antibiotic containing sulfur and D- α -aminoadipic acid. Nature. 175: 548-556.
- NISHIMURA, J.S., E.A. DODD y A. MEISTER. (1964). Intermediate formation of dipeptide-phosphate anhydride in enzymatic tripeptide synthesis. J. Biol. Chem. 239: 2553-2558.
- NORMANSELL, P.J., J.D. NORMANSELL y H. HOLT. (1979). Genetic and biochemical studies of mutants of Penicillium chrysogenum impaired in penicillin production. J. Gen. Microbiol. 112: 113-126.
- ORLOWSKI, M. y A. MEISTER. (1965). Isolation of γ -glutamyl transpeptidase from hog kidney. J. Biol. Chem. 240: 338-347.
- ORLOWSKI, M. y A. MEISTER. (1970). γ -Glutamyl transpeptidase (Hog kidney). Methods Enzymol. 17A: 883-889.
- ORLOWSKI, M. y A. MEISTER. (1971). γ -Glutamylcysteine synthetase (Rat kidney). Methods Enzymol. 17B: 495-500.
- O'SULLIVAN, J., R.T. APLIN, C.M. STEVENS y E.P. ABRAHAM. (1979). Biosynthesis of 7- α -methoxycephalosporin. Incorporation of molecular oxygen. Biochem. J. 179: 47-52.
- OZAWA, N. y F.P. GUENGERICH. (1983). Evidence for formation of an S-(2-(N⁷-guanyl)ethyl)glutathione adduct in glutathione-mediated binding of the carcinogen 1,2-dibromoethane to DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 5266-5270.
- PARKER, W.L., M.L. RATHNUM, J.W. WELLS, W.H. TREJO, P.A. PRINCIPE y R.B. SYKES. (1982). S027,860, a simple carbapenem produced by species of Serratia y Erwinia. J. Antibiot. 35: 653-660.
- PENEFSKY, H.S. y A. TZAGOLOFF. (1971). Extraction of water-soluble enzymes and proteins from membranes. Methods Enzymol. 22: 204-219.

- PETERSON, W.H. y N.E. WIDEBURG. (1960). Enzymatic interconversion of penicillin G and V. Proceedings 4th. International Congress of Biochemistry. 5: 136-137. Viena.
- PRUESS, D.L. y M.J. JOHNSON. (1967). Penicillin acyltransferase in Penicillium chrysogenum. J. Bacteriol. 94: 1502-1508.
- PURI, R.N. y A. MEISTER. (1983). Transport of glutathione, as γ -glutamyl-cysteinylglycyl ester, into liver and kidney. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 5258-5260.
- QUEENER, S.W. y N. NEUSS. (1982). The biosynthesis of β -lactam antibiotics. En: Chemistry and biology of β -lactam antibiotics. 3: 2075. Ed. por R.B. Morin y M. Gorman. Academic Press. New York.
- QUEENER, S.W., O.K. SEBEK y C. VEZINA. (1978). Mutants blocked in antibiotic synthesis. Ann. Rev. Microbiol. 32: 593-636.
- RAMOS, F.R. (1984). Isopenicilina N sintetasa de Penicillium chrysogenum AS-P-78. Tesina de Licenciatura. (Universidad de León).
- RAMOS, R.F., M.J. LOPEZ-NIETO y J.F. MARTIN. (1984). Isopenicillin N synthetase of Penicillium chrysogenum. (En Prensa). Antimicrob. Agents Chemother.
- REVEL, J.P. y E.G. BALL. (1959). The reaction of glutathione with amino acids and related compounds as catalyzed by γ -glutamyl transpeptidase. J. Biol. Chem. 234: 577-582.
- REVILLA, G. (1983). Regulación de la biosíntesis de penicilina en Penicillium chrysogenum. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. Salamanca.
- REVILLA, G., M.J. LOPEZ-NIETO, J.M. LUENGO y J.F. MARTIN. (1984). Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by Penicillium chrysogenum. J. Antibiotics. 37: 781-789.
- REVILLA, G., J.M. LUENGO, J.R. VILLANUEVA y J.F. MARTIN. (1981) Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis. En: Advances in Biotechnology 3: 155-158. Ed. por C. Vezina y K. Sing. Pergamon Press. Toronto.
- SARGENT, J.R. y B.P. VADLAMUDI. (1968). Electrophoresis of peptides on thin layer of silica gel. Anal. Biochem. 25: 583-587.
- SAWADA, Y., J.E. BALDWIN, P.D. SINGH, N.A. SOLOMON y A.L. DE-MAIN. (1980). Cell-free cyclization of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine into isopenicillin N. Antimicrob. Agents Chemother. 18: 465-470.

- SERRANO, A., J. RIVAS y M. LOSADA. (1984). Purification and properties of glutathione reductase from the cyanobacterium Anabaena sp. strain 7119. J. Bacteriol. 158: 317-324.
- SHIRAFUJI, H., Y. FUJISAWA, M. KIDA, T. KAMZAKI y M. YONEDA. (1979). Accumulation of tripeptide derivatives by mutants of Cephalosporium acremonium. Agric. Biol. Chem. 43: 155-160.
- SING, K. y M.J. JOHNSON. (1948). Evaluation of precursors for penicillin G. J. Bacteriol. 56: 339-355.
- SOMERSON, N.L., A.L. DEMAIN y T.D. NUNHEIMER. (1961). Reversal of lysine inhibition of penicillin production by L- α -amino adipic acid. Arch. Biochem. Biophys. 93: 238-241.
- SPATER, H.W., N. QUINTANA, F.F. BECKER y A.B. NOVIKOFF. (1983). Immunocytochemical localization of γ -glutamyltransferase in induced hyperplastic nodules of rat liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 4742-4746.
- SPENCER, B. y C. MAUNG. (1970). Multiple activities of penicillin acyltransferase of Penicillium chrysogenum. Biochem. J. 118: 29-30.
- STEVENS, C.M., E. INAMINE y C.W. DELONG. (1956). The rates of incorporation of L-cysteine and D and L-valine in penicillin biosynthesis. J. Biol. Chem. 219: 405-409.
- SYKES, R.B., C.M. CIMARUSTI, D.P. BONNER, K. BUSH, D.M. FLOYD, N.H. GEORGOPAPADAKOU, W.H. KOSTER, W.C. LIU, W.L. PARKER, P.A. PRINCIPE, M.L. RATHNUM, W.A. SLUSARCHYK, W.H. TREJO y J.S. WELLS. (1981). Monocyclic β -lactam antibiotics produced by bacteria. Nature. 291: 489-491.
- SYKES, R.B., W.L. PARKER y J.S. (1982). β -lactam antibiotics produced by bacteria. En: Trends in antibiotic research. pp. 115-124. Ed. por H. Umezawa, A.L. Demain, T. Hata y C.R. Hutchinson. Japan Antibiotics Research Association, Tokyo.
- STRUMEYER, D. y K. BLOCH. (1962). γ -L-Glutamyl-L-Cysteine from glutathione. Biochemical Preparations. 9: 52-54.
- TATE, S.S. y A. MEISTER. (1974). Interaction of γ -glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides and derivatives and analogues of glutathione. J. Biol. Chem. 249: 7593-7602.
- TATE, S.S. y A. MEISTER. (1975). Identity of maleate-stimulated glutaminase with γ -glutamyl transpeptidase in rat kidney. J. Biol. Chem. 250: 4619-4627.

- TOMASZ, A. (1983). Mode of action of β -lactam antibiotics, a microbiologist's view. En: Handbook of experimental pharmacology (Antibiotics). 67: 15-96. Ed. por A.L. Demain y N.A. Solomon. Springer-Verlag. Berlin.
- VANDAME, E.J. (1977). Enzymes involved in β -lactam antibiotic biosynthesis. Adv. Appl. Microbiol. 21: 89-123.
- VANDERHAEGUE, H. (1975). Penicillin acylase (fungal). Methods Enzymol. 43: 721-728.
- VIÑA, J., J.J. BOIX, M. IZQUIERDO y A. IRADI. (1982). Role of γ -glutamyl transferase and glutathione in amino acid uptake by isolated hepatocytes in culture. Biochem. Soc. Trans. 10: 112-113.
- VIÑA, J., J.M. ESTRELA, C. GUERRI y F.J. ROMERO. (1980). Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. Biochem. J. 188: 549-552.
- VIÑA, J., I.R. PUERTES, J.B. MONTORO y J.R. VIÑA. (1983). Effect of specific inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase on amino acid uptake by mamary gland of the lactating rat. FEBS Lett. 159: 119-122.
- WAKSMAN, S.A. (1947). What is an antibiotic or an antibiotic substance?. Mycology. 39: 565-569.
- WHITNEY, J.G., D.R. BRANNON, J.A. MABE y K.J. WICKER. (1972). Incorporation of labelled precursors into A 16886 B, a novel β -lactam antibiotic produced by Streptomyces clavuligerus. Antimicrob. Agents. Chemother. 1: 247-251.
- WOLFE, S., I.J. HOLLANDER y A.L. DEMAIN. (1984). Enzymatic synthesis of a sulfur-analog of penicillin using the "cyclase" of Cephalosporin acremonium. Biotechnology. 2: 635-636.
- WOLFE, E.C. y H.R.V. ARNSTEIN. (1960). The metabolism of 6-aminopenicillanic acid and related compounds by Penicillium chrysogenum and its possible significance for the penicillin biosynthesis. Biochem. J. 76: 375-381.
- WOODIN, T.S. y I.H. SEGEL. (1968). Isolation and characterization of glutathione reductase from Penicillium chrysogenum. Biochim. Biophys. Acta. 167: 64-77.
- YOUNG, D.W., D.J. MORECOMBE y P.K. SEN. (1977). The stereochemistry of β -lactam formation in penicillin biosynthesis. Eur. J. Biochem. 75: 133-147.