



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN
LA FORMACION DE ERITROMICINA EN
Streptomyces erythreus BM-21-115.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

LAURA ANGELICA ESCALANTE DAVILA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES DE ERITROMICINA	3
ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS ERITROMICINAS	5
PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE ERITROMICINA	9
MECANISMO DE ACCION	10
BIOSINTESIS DE LA ERITROMICINA	13
Formación de Acil-CoA y de 2-Metil-Malonil-CoA	13
Síntesis de 6-Deoxieritronólido	14
Formación y Origen de los Azúcares	16
Regulación de las Enzimas	16
REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE ERITROMICINA	20
Estimulación por Propanol	20
Regulación por el Producto Final	20
Regulación por Fuente de Nitrógeno	21
Regulación por Fosfato Inorgánico	22
Regulación por la Fuente de Carbono	22
OBJETIVO	27
FUNDAMENTO DEL PROYECTO.	28
Regulación Catabólica por Fuente de Carbono	28

MATERIAL Y METODOS - - - - -	- 30
Microorganismos - - - - -	- 30
Preservación de las Cepas - - - - -	- 30
Medio de Esporulación - - - - -	- 30
Medio de Crecimiento del Preinóculo (1) - - - - -	- 31
Medio de Crecimiento y Producción de Eritromicina (II) - - - - -	- 31
Condiciones de Crecimiento - - - - -	- 32
Preinóculo - - - - -	- 32
Inóculo - - - - -	- 32
Determinación del pH Durante la Fermentación - - - - -	- 32
Determinación del Crecimiento - - - - -	- 33
Determinación de Eritromicina - - - - -	- 35
Fuentes de Carbono Utilizadas - - - - -	- 36
Identificación de Eritromicina A Como Producto del Metabolismo Secundario de la Cepa <u>Streptomyces</u> <u>erythreus</u> W.T. BM-21-115 - - - - -	- 37
Estabilidad de la Eritromicina en el Medio de Cul- tivo II - - - - -	- 38
Efecto de Diferentes Fuentes de Carbono en la For- mación de Eritromicina. Selección de la Fuente de Carbono - - - - -	- 39
Efecto de D-Glucosa en la Producción Específica de Eritromicina - - - - -	- 39
Efecto de Diferentes Concentraciones de Glucosa	

en la Producción Específica de Eritromicina - - - -	-40
Caracterización del Efecto de Glucosa en la Producción de Eritromicina -	-40
Caracterización del Fenómeno. Efecto de Glucosa Adicionada a Diferentes Tiempos del Crecimiento de <u>Streptomyces erythreus</u> en la Producción de Eritromicina -	-41
Identificación de Eritromicina A Como Producto del Metabolismo Secundario de la Cepa <u>Streptomyces erythreus</u> W.T. BM-21-115 -	-42
Estabilidad de la Eritromicina en el Medio de Cultivo II -	42
RESULTADOS -	47
Efecto de Diferentes Fuentes de Carbono en la Formación de Eritromicina. Selección de la Fuente de Carbono. -	47
Efecto de D-Glucosa en la Producción Específica de Eritromicina -	-51
Efecto de Diferentes Concentraciones de Glucosa en la Producción Específica de Eritromicina -	-53
Caracterización del Efecto de Glucosa en la Producción de Eritromicina -	-55
Caracterización del Fenómeno. Efecto de Glucosa Adicionada a Diferentes Tiempos del Crecimiento de <u>Streptomyces erythreus</u> en la Producción de Eritro-	

micina - - - - -	-58
DISCUSION DE LOS RESULTADOS - - - - -	60
CONCLUSIONES - - - - -	-64
BIBLIOGRAFIA - - - - -	-65

TABLAS

		pag.
Tabla 1	Sensibilidad a Eritromicina en Bacterias Gram-positivas de Interés clínico - - - - -	4
Tabla 2	Regulación por el Producto Final en la Biosíntesis de Antibióticos - - - - -	-24
Tabla 3	Regulación por Carbono en la Biosíntesis de Antibióticos - - - - -	-25
Tabla 4	Control de la Síntesis de Antibióticos por Fosfato Inorgánico - - - - -	26
Tabla 5	Efecto de la Fuente de Carbono Sobre el Crecimiento y Formación de Eritromicina en <u>Streptomyces erythreus</u> - - - - -	-49
Tabla 6	Efecto de 2-Deoxi-D-Glucosa en el Crecimiento de <u>S. erythreus</u> y Formación de Eritromicina - - - - -	57

FIGURAS

Fig. 1A Estructura Química de las Unidades Precursoras
de Eritromicina - - - - - 6

Fig. 1B Azúcares Presentes en las Eritromicinas - - - - - 7

Fig. 2 Tipos de Eritromicinas - - - - - 8

Fig. 3 Detalle de la Inhibición, Síntesis de Proteínas,
Elongación. - - - - - 12

Fig. 4 Vía de Biosíntesis de la Eritromicina - - - - - 18

Fig. 5 Regulación de la Biosíntesis de la Eritromicina - 19

Fig. 6 Cromatografía en Capa Fina de Eritromicina A
Producida por la Cepa de Streptomyces erythreus
BM-21-115 Comparada con un Estándar de Eritro-
micina de Sigma Chemical Co. - - - - - 44

Fig. 7 Ensayo Microbiológico de la Actividad Antibióti-
ca de la Eritromicina, Relación Existente entre
la Concentración de Eritromicina y el Halo de
Antibiosis Observado - - - - - 45

Fig. 8 Estabilidad de Eritromicina A en el Medio de
Cultivo II a Diferentes pH Durante Trece Días
de Incubación - - - - - 46

Fig. 9A Cinética de Crecimiento de S. erythreus en el

	Medio de Cultivo II y Producción de Eritromicina - - - - -	-48
Fig. 9	Efecto de Diferentes Fuentes de Carbono Sobre la Formación de Eritromicina - - - - -	-50
Fig. 10	Efecto de D-Glucosa en la Formación de Eritromicina - - - - -	-52
Fig. 11	Efecto de Diferentes Concentraciones de D-Glucosa Sobre el Crecimiento Máximo de <u>S. erythreus</u> y la Formación de Eritromicina - - - - -	-54
Fig. 12	Efecto de 2-Deoxi-D-Glucosa Sobre el Crecimiento y la Formación de Eritromicina en <u>S. erythreus</u> - - - - -	-56
Fig. 13	Efecto de la Adición de D-Glucosa a Diferentes Tiempos Sobre el Crecimiento y la Producción de Eritromicina en <u>S. erythreus</u> - - - - -	-59

RESUMEN

Streptomyces erythreus W.T. BM-21-115 produce el antibiótico eritromicina A, en la fase tardía de su crecimiento. Se encontró que D-glucosa, sacarosa, D-manosa y glicerol ejercen un efecto dual al estimular el crecimiento de S. erythreus y al inhibir la formación específica del antibiótico entre un 40 a 60% en comparación con un control. La máxima supresión específica de eritromicina se observó con D-glucosa. Un análogo de este carbohidrato (2-deoxi-D-glucosa) también suprimió la formación del antibiótico. El efecto de la glucosa se observó sólo cuando fué adicionada al cultivo antes de la etapa de producción del antibiótico. Dichas observaciones nos llevan a concluir que glucosa causa un efecto represivo transitorio en la formación de eritromicina.

INTRODUCCION

Existen más de 3000 antibióticos conocidos, de los cuales algunos son producidos por hongos y arriba de 2000 son producidos por actinomicetos (4, 23, 44). Aunque no todos tienen importancia terapéutica, muchos de ellos pueden ser empleados como suplemento en la alimentación animal, en la preservación de alimentos y como una herramienta en el campo de la investigación (22, 23, 27, 91).

Los antibióticos han sido clasificados como productos del metabolismo secundario y presentan las siguientes características (22, 23, 34):

- No son esenciales para el microorganismo que los produce, porque pueden dejar de producirlo y vivir en condiciones normales, aunque se piensa que puedan tener alguna función en la diferenciación.
- Su distribución está restringida a ciertos grupos taxonómicos.
- Su estructura química es poco frecuente.
- Generalmente son producidos cuando la célula ha dejado de crecer (idiofase).
- Su biosíntesis la llevan a cabo sintetisas del metabolismo secundario o como ramificaciones de las vías metabólicas del metabolismo primario.

De forma similar al metabolismo primario, el metabo-

lismo secundario es regulado por una serie de mecanismos que controlan la síntesis, como son la inducción y la represión o bien que controlan la actividad enzimática como la activación, inhibición, etc... (24, 25, 46, 64, 94).

Numerosas investigaciones han resultado en el conocimiento de varias de las vías metabólicas involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios de interés práctico, sin embargo se desconoce mucho sobre los mecanismos que regulan su producción y sobre todo de la maquinaria enzimática involucrada en la biosíntesis de éstos (20, 21, 22, 71, 74).

GENERALIDADES DE ERITROMICINA

Las eritromicinas son antibióticos macrólidos no poliénicos (9), sintetizados por cepas de Streptomyces erythreus (77) y por algunas especies del género Arthrobacter (30, - 55). Su descubrimiento fué reportado por Mc Guire y cols. en 1952 (58).

Existen cinco tipos de eritromicinas asociadas metabólicamente (83), las cuales son ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica, la eritromicina A y la eritromicina E destacan por su actividad antimicrobiana, el eritronólido B generalmente es utilizado como agente hipocolesterolémico y el micarosil-hidroxi-eritronólido B es utilizado como agente antipirético (72, 77).

La eritromicina A es generalmente utilizada en la clínica para el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias. Es un antibiótico activo contra bacterias Gram-positivas y micoplasmas (tabla 1), presenta baja actividad contra microorganismos Gram-negativos y no presenta actividad contra células eucarióticas intactas o en extractos libres de células, pero sí bloquea la síntesis de proteínas en ribosomas de cloroplastos y mitocondrias (77, 80). Es poco tóxico y no provoca efectos colaterales en el organismo salvo muy raros casos de alergias a nivel hepático (72, 77).

TABLA 1

SENSIBILIDAD A ERITROMICINA EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS DE INTERES CLINICO*

ORGANISMO	CONCENTRACION INHIBITORIA (µg/ml)
<u>Streptococcus</u> Grupo A	0.01 - 0.1
<u>Streptococcus</u> Grupo B	0.2
<u>Streptococcus</u> Grupo D	0.2 - 6.3
<u>Pneumococcus</u> sp.	0.02 - 0.05
<u>Staphylococcus</u> albus	1.6
<u>Staphylococcus</u> aureus	0.4
<u>Sarcina</u> lutea	0.02
<u>Bacillus</u> cereus	0.4
<u>Bacillus</u> subtilis	0.5
<u>Clostridium</u> sp.	0.1 - 2.0
<u>Corynebacterium</u> diphtheriae	0.01 - 0.1
<u>Actinomyces</u> israeli	0.1
<u>Mycobacterium</u> Kansasii	0.5 - 2.0
<u>Mycobacterium</u> tuberculosis	1 - 10

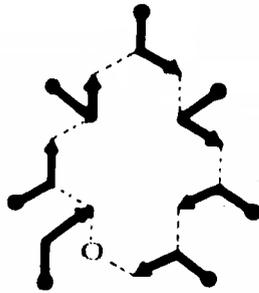
*Tomado de Finland et al (1952); Fusillo et al (1953); Hudson et al (1956); Guy y Chapman (1961); Molavi y Weinstein (1971).

ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS ERITROMICINAS

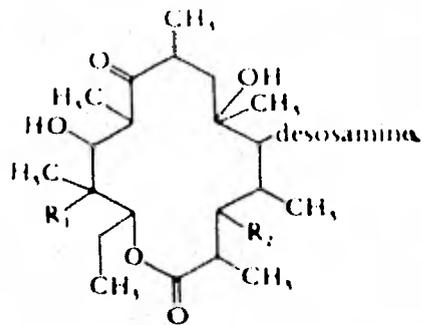
En base a la estructura química que presentan las eritromicinas se les ha clasificado como antibióticos macrólidos no poliénicos (9). Estos se caracterizan por presentar un anillo lactónico polifuncional que es llamado también aglicona, altamente sustituido, ya que posee grupos acil, metoxi o metil y generalmente pueden presentar de uno a dos esqueletos de azúcares unidos a la aglicona por medio de enlaces glicosídicos (Figura 1A). Los azúcares son generalmente 6-desoxihexosas uno de ellos es un aminoazúcar (desosamina) y el otro un azúcar neutro N-metilado o con grupos O-metil o C-metil ya sea cladinosa o micarosa (Figura 1B). En la posición del carbono 12 el grupo radical es variable (71, 83, 104).

Los cinco tipos de eritromicinas existentes se conocen como eritromicina A, B, C, D y E (Figura 2). Las eritromicinas A y C presentan un hidroxilo más en la posición del carbono 12, mientras que las eritromicinas D y B no lo presentan; el azúcar en las eritromicinas A y B es cladinosa y en las eritromicinas C y D es micarosa (carece de un grupo metilo en el carbono 3). La eritromicina E, producto de biotransformación de eritromicina A, sólo presenta un cambio en la unión de la cladinosa, la cual se encuentra ligada a un éster en posición orto en el anillo lactónico (77, 83, 102).

FIGURA 1A. ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS UNIDADES PRECURSORAS DE ERITROMICINA.

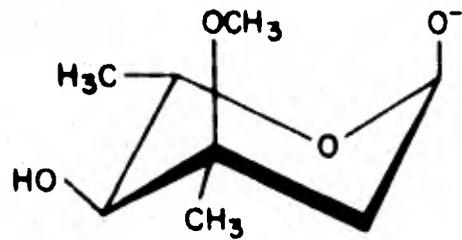


ERITRONOLIDO

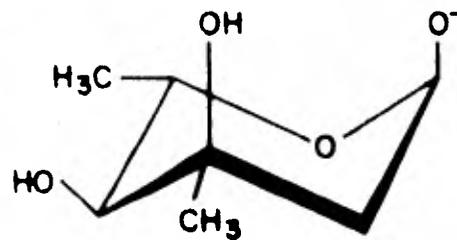


ERITRONOLIDO SUBSTITUIDO

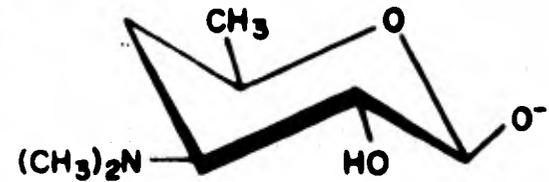
FIGURA 1B. AZUCARES PRESENTES EN LAS ERITROMICINAS



L-Cladinosa

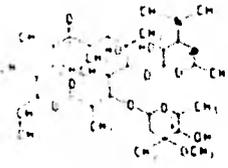


L-Micarosa



D-Desosamina

FIGURA 2 TIPOS DE ERITROMICINAS

ERITROMICINA	RADICALES	ESTRUCTURA QUIMICA
Eritromicina A	R ₁ Desosamina R ₂ Cladinosa R ₃ OH	
Eritromicina B	R ₁ Desosamina R ₂ Cladinosa R ₃ H	
Eritromicina C	R ₁ Desosamina R ₂ Micarosa R ₃ OH	
Eritromicina D	R ₁ Desosamina R ₂ Micarosa R ₃ H	
Eritromicina E	R ₁ Desosamina R ₂ Cladinosa R ₃ OH	

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE ERITROMICINA

La eritromicina A tiene un peso molecular de 733.9 Daltons, su fórmula condensada es $C_{37}H_{67}O_{13}N$ (17, 100); se presenta en forma de cristales hidratados; su punto de fusión es de 135° a 140°C. Es una sustancia básica poco soluble en agua (2.1 mg/ml R.T.) y es soluble en solventes no polares como etanol, metanol, benceno, acetato de etilo, cloroformo (17, 101). Es lábil en medio ácido, posee un pK_a de 8.6 (por el grupo amino de la desosamina), razón por la cual en la clínica cuando se administra en forma oral se presenta en forma de ésteres capaces de resistir la acidez estomacal (77). Tiene una rotación específica de $[\alpha]_D^{25} -73.5$ (CH₃OH) y $[\alpha]_D^{25} -78^\circ$ (61.99- ETOH) (10).

MECANISMO DE ACCION

La eritromicina es un antibiótico de acción bacterios-tática, es decir inhibe síntesis de proteínas a nivel de elon-gación (4, 77, 80, 103).

Muchos estudios realizados en sistemas " in vivo " e " in vitro " han demostrado que la eritromicina se une a la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos provocando dicho e-fecto (77, 80). Se ha sugerido que las diferencias en sen-sibilidad se deben a que la eritromicina se une con mayor afi-nidad a los ribosomas de bacterias Gram-positivas que a los de bacterias Gram-negativas (72). El sitio específico de acción fué determinado utilizando cepas mutantes de E. coli, B. subtilis y B. cereus resistentes a eritromicina, las cua-les presentan alteraciones ribosomales que les confieren esta resistencia al antibiótico. Estas han sido localizadas en la denominada "región de estreptomicina", aparentemente en el si-tio L₄. Los cambios en esta proteína ribosomal en cepas re-sistentes afectan la conformación de la subunidad 50S; esta alteración no sólo afecta la unión del antibiótico al riboso-ma sino también el centro de la peptidil-transferasa (80). Otros autores sugieren que existen tres sitios que determinan la resistencia a este antibiótico, dos de los cuales (L₄ y ARN 23S) al ser alterados por mutación sólo causan una dismi-

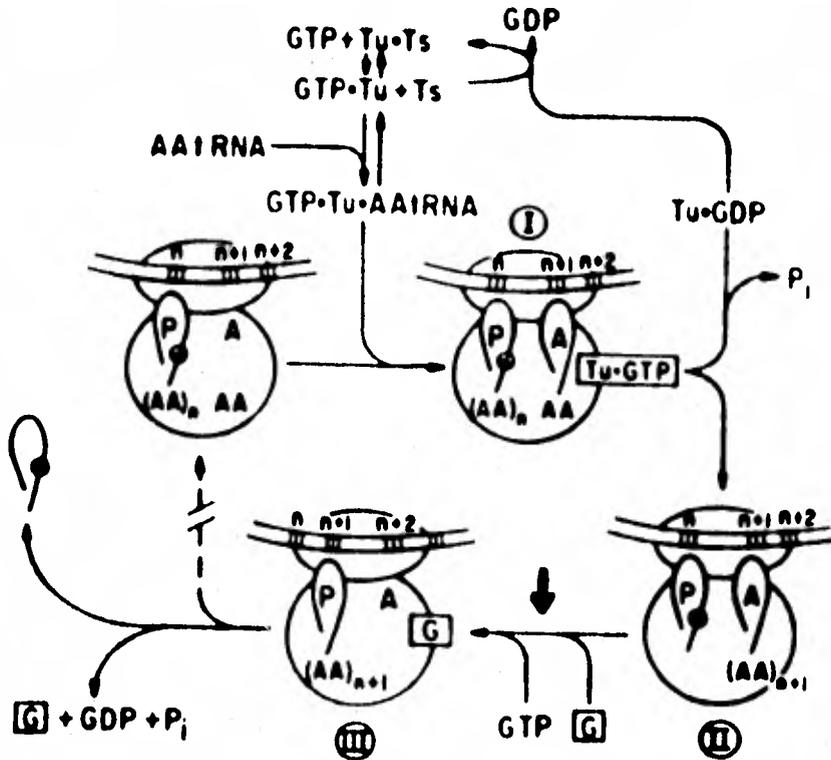
nución en la afinidad de eritromicina por la subunidad 50S; las mutaciones en la proteína L₂₂ (subunidad 50S) son las que confieren esta resistencia, sin afectar la afinidad del antibiótico por el ribosoma (103).

Si bien la eritromicina no inhibe la formación del enlace peptídico (a pesar de que toda la prueba experimental muestra que el sitio de acción de las agliconas en el ribosoma se halla superpuesto), es capaz de inhibir la formación de grandes péptidos, lo que hace suponer que su acción inhibitoria se manifiesta porque cuando el residuo peptídico del peptidil-ARN_t alcanza cierta longitud y el antibiótico está previamente unido al ribosoma afecta la velocidad de la reacción enzimática a causa de un impedimento estérico que no permite el movimiento del peptidil-ARN_t fuera del sitio A (99, 103). Por otro lado existe evidencia experimental de que tanto la aglicona como los azúcares unidos a ésta se requieren para que la molécula tenga actividad antimicrobiana (72, 102) (figura 3).

FIGURA 3 DETALLE DE LA INHIBICION

SINTESIS DE PROTEINAS

ELONGACION



Elongación de la cadena peptídica.

Reacción I a II es catalizada por pep

tidil-transferasa. Reacción II a III

traslocación; reacción inhibida por

Eritromicina A (↓).

Tomada de Haselkorn (1973).

BIOSINTESIS DE LA ERITROMICINA

La biosíntesis de eritromicina se inicia con una molécula de propionil-CoA y continúa con la condensación sucesiva de 6 moléculas de 2-metil-malonil-CoA (31) (figura 4); dando lugar a la formación del núcleo de la molécula de eritromicina, que es el eritronólido. A continuación se describen cada uno de los pasos de la formación de este antibiótico.

Formación de Acil-CoA y de 2-metil-malonil-CoA.

Dos reacciones consecutivas dan lugar a la formación de ésteres de CoA (figura 4). La primera catalizada por la enzima propionil-cinasa (ATP-fosfotransferasa), la cual fosforila una molécula de fosfo-propionato, que posteriormente es transformada a propionil-CoA mediante una segunda catálisis por la enzima acil-CoA-fosfotransferasa. Por medio de una carboxilación de propionil-CoA tiene lugar la formación de 2-metil-malonil-CoA; esta reacción es catalizada por una propionil-CoA-carboxilasa, la cual requiere ATP, Mg^{++} y CO_2 para efectuar la carboxilación.

Existen otras posibles vías de formación de los derivados de CoA, que pueden ser ramificaciones de la biosíntesis de los aminoácidos. Algunas evidencias en otros macrólidos por

ejemplo, sugieren que propionil-CoA puede ser formado a través de la vía de biosíntesis de isoleucina y metionina; propionato, a través de la alanina y 2-metil-malonil-CoA de valina e isoleucina o por racemización de succinil-CoA (35, 99) (figura 5). Existe otra vía alternativa en la formación de 2-metil-malonil-CoA, por medio de un sistema de transcarboxilación, utilizando oxaloacetato como donador de grupos carboxilo; sin embargo, esta reacción tiene un papel secundario en la síntesis del antibiótico, debido a que sólo se presenta en la trofofase, cuando el oxaloacetato es abundante y no en la etapa de síntesis (idiofase), siendo la vía principal de formación la carboxilación mediada por propionil-CoA-carboxilasa (84).

Los niveles intracelulares de derivados de acil-CoA son regulados por la acción de tioesterasas que catalizan la ruptura de moléculas de acil-CoA y propionil-CoA a acetatos y propionatos libres, los cuales pueden también ser canalizados hacia la síntesis de ácidos grasos (propionil-CoA) o el propionato ser transformado a succinil-CoA e integrarse al ciclo de Krebs (99) (figura 5).

Síntesis del 6-Deoxieritronólido.

La biosíntesis del eritronólido se inicia con una molécula de propionil-CoA y seis moléculas de 2-metil-malonil-CoA por medio del complejo multienzimático Eritromicina Sínte

tasa, dando lugar a la formación de 6-deoxieritronólido; éste al ser hidroxilado por acción de una hidroxilasa, da lugar a la formación del eritronólido B. Este eritronólido es glicosidado al incorporarse una molécula de micarosa, que es el primer azúcar que se incorpora a la molécula, dando lugar a 3-~~α~~-L-micarosileritronólido B (por acción de una micarosilasa). Se le incorpora otra molécula de azúcar, una desosamina, con la intervención de una desosaminilasa y cuyo producto es la eritromicina D, la que se transforma posteriormente en eritromicina C por medio de una hidroxilación (hidroxilasa). El grupo O-metil de la L-micarosa unida a eritromicina C es eliminado por medio de una enzima denominada S-adenosil-metionina-eritromicina-C-O-metil-transferasa o eritromicina transmetilasa, la cual convierte específicamente eritromicina C en eritromicina A en presencia de S-adenosil-metionina como donadora del CH_3 (12, 61). Este es el último producto de la vía de biosíntesis y es específico e irreversible (16, 35, - 72).

Existe una vía alternativa en la formación de eritromicina A, en la cual a partir de eritromicina D por medio de una metilación (metilasa) se forma la eritromicina B y por una posterior hidroxilación (hidroxilasa) tiene lugar la formación de eritromicina A. Este paso no es muy común pues se ha observado que la eritromicina B no excede el 2% en proporción a la formación de eritromicina D durante el proceso de biosíntesis

(78, 79) (figuras 4 y 5).

Cuando se adiciona eritromicina A a los caldos de cultivo, se obtiene eritromicina E, pero es generalmente un producto de bioconversión y no de síntesis (65, 83); esta estructura presenta una unión orto-éster adicional entre la claudinosa y el eritronólido (66).

Formación y Origen de los Azúcares.

La secuencia de unión de los azúcares desosamina, claudinosa y micarosa, en la biosíntesis de este antibiótico posee una gran relevancia. Estos son generalmente sintetizados a partir de glucosa, lo cual ha sido corroborado empleando glucosa radioactiva y los azúcares del eritronólido presentan al final de la síntesis, la marca originalmente adicionada (1, 13).

Experimentos de bioconversión " in vivo " indican que la glicosidación tiene lugar en la membrana plasmática, no así la formación de la aglicona (69, 72).

Regulación de las Enzimas.

A pesar de que se conoce la vía de biosíntesis, es poco lo que se conoce sobre las enzimas involucradas y la regulación de las mismas. Existen evidencias que sugieren que el

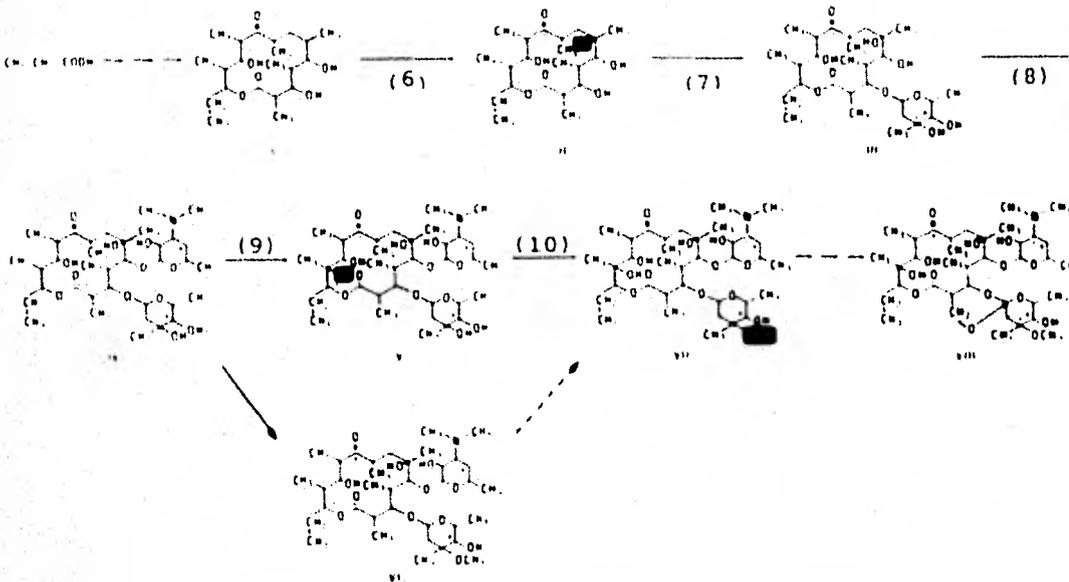
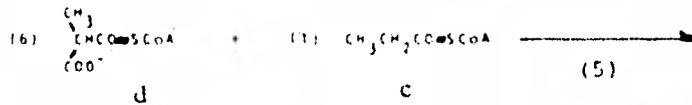
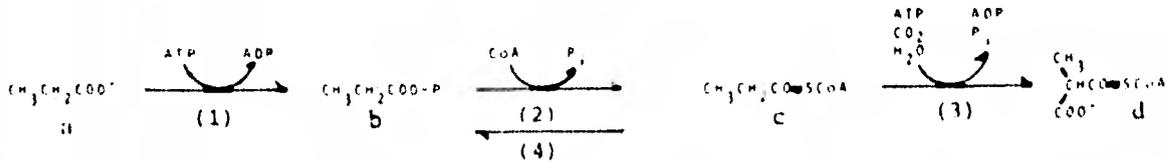
sistema multienzimático denominado eritromicina sintetasa de S. erythreus se deriva de la sintetasa de ácidos grasos, la cual es más parecida a las sintetasas de ácidos grasos de los hongos que a la de las bacterias (72, 89). Se caracteriza por ser un complejo no disociable y por ser activado por flavín-mononucleótido. Sintetiza ácidos grasos de cadena impar a partir de propionil-CoA y de acetil-CoA y malonil-CoA (15).

Se ha purificado parcialmente un complejo macrólido-sintetasa, el cual incorpora tanto propionil-CoA como 2-metil-malonil-CoA radioactivos en un intermediario no volátil, aparentemente similar al 6-deoxieritronólido; éste es parcialmente convertido en el eritronólido B por micelio intacto de S. erythreus (14, 15).

El requerimiento de cofactores reductores como el fosfato de nicotinamida-adenín-dinucleótido (NADPH) es menor en la síntesis del antibiótico que en la síntesis de ácidos grasos. En este último caso cada paso en la elongación involucra dos reacciones de reducción. En el caso de la eritromicina la mayoría de las funciones policarbonílicas se encuentra sin reducir (68).

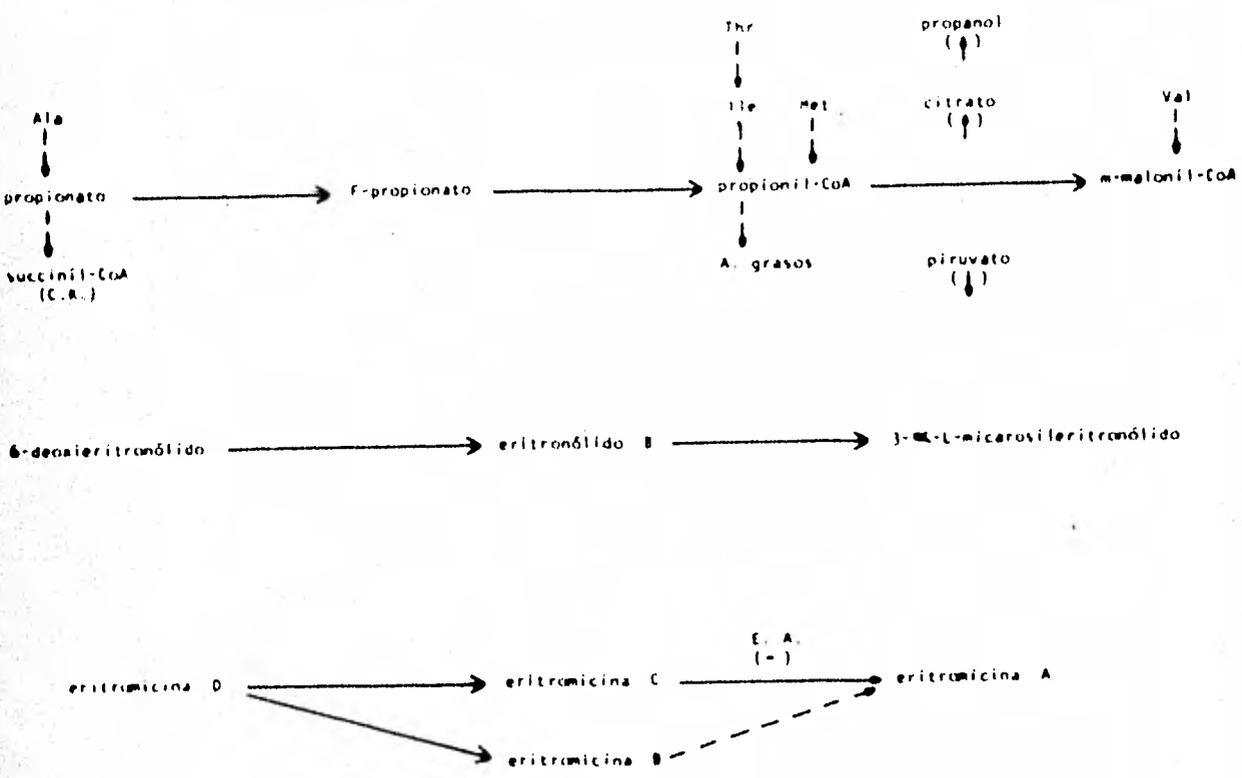
Se ha observado que la regeneración de cofactores por deshidrogenasas dependientes de NADP no es un factor limitante en la biosíntesis del antibiótico (9).

FIGURA 4 VIA DE BIOSINTESIS DE LA ERITROMICINA



- 1) Propionato cinasa, 2) Acil transferasa, 3) Propionil carboxilasa, 4) Tioesterasa, 5) Eritromicina sintetasa, 6) Hidroxilasa, 7) Micarosilasa, 8) Desosaminilasa, 9) Hidroxilasa, 10) Metilasa. a) propionato, b) fosfo-propionato, c) propionil-CoA, d) 2-metil-malonil-CoA. I) 6-deoxieritronólido, II) Eritronólido B, III) 3- α -L-micarosileritronólido, IV) Eritromicina D, V) Eritromicina C, VI) Eritromicina B, VII) Eritromicina A, VIII) Eritromicina E. Adaptada de Quener y cols. (1978).

FIGURA 5 REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE LA ERITROMICINA



EFFECTORES POSITIVOS EFFECTORES NEGATIVOS

propanol	fosfatos
propionato	eritronólido B
ácidos grasos	

(↑)	inducción
(↓)	represión
(-)	inhibición

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE ERITROMICINA

Al igual que en muchos antibióticos, la regulación de la vía de biosíntesis de eritromicina ha sido muy poco estudiada, dentro de la escasa literatura existente, en muchos casos sólo son comentarios sobre algunas observaciones (72).

Estimulación por Propanol.

El propanol y en menor grado el propionato, estimulan la producción de eritromicina. Se ha demostrado que el propanol, cuando es adicionado a fermentaciones industriales, produce un fuerte efecto estimulador, incrementando la producción hasta un 100%. Sin embargo, si se adiciona al inicio de la fermentación interfiere con el crecimiento del microorganismo disminuyendo incluso la producción (42). Además de su efecto como precursor, induce la actividad de la propionil-CoA-carboxilasa de S. erythreus. Este efecto estimulador parece tener lugar a nivel de transcripción (84).

Regulación por el Producto Final.

La biosíntesis de muchos antibióticos es inhibida por la acumulación de su producto final (74) (tabla 2).

En la mayoría de los casos, el mecanismo de retroregulación se desconoce. En antibióticos macrólidos, particularmente en eritromicina, se ha observado que ésta estimula su propia producción. La adición de altas concentraciones del antibiótico (2 mg ml^{-1}) a las células de S. erythreus, al cuarto día de la fermentación, aumenta casi en un 50% la velocidad de síntesis de la eritromicina. Este efecto, no se observa si las adiciones se practican al inicio de la fermentación, o dos días después. Se desconoce el mecanismo por el cual se lleva a cabo la estimulación (56, 96).

A nivel enzimático, se ha estudiado el efecto de la eritromicina A, producto final de la vfa, sobre la propionil-CoA-carboxilasa y la eritromicina transmetilasa en S. erythreus. La primera enzima, involucrada en la síntesis de 2-metil-malonil-CoA no es alterada " in vitro " con concentraciones de eritromicina equivalentes a las producidas en forma natural (84). La segunda enzima es inhibida " in vitro " por el producto de su reacción, eritromicina A (16). Es factible que este efecto regulatorio tenga importancia a un nivel fisiológico.

Regulación por Fuente de Nitrógeno.

La síntesis de estos metabolitos también esta regulada por la concentración de nitrógeno presente en el medio de cul

tivo (3, 6, 37, 92).

En el caso de eritromicina, trabajos recientes han demostrado que amonio en una concentración de 100 mM adicionado al inicio de la fermentación inhibe completamente la producción del antibiótico; y cuando es adicionado una vez que se ha producido provoca una pérdida de la actividad hasta de un 100%, dependiendo de la concentración de eritromicina ya sin sintetizada; la adición posterior de eritromicina comercial en el caldo de fermentación no logra revertir este efecto (29).

Regulación por Fosfato Inorgánico.

Un efector de la biosíntesis de muchos idiolitos, es el fosfato inorgánico (tabla 4). Los antibióticos se sintetizan únicamente en concentraciones de fosfato inorgánico subóptimas para el crecimiento del microorganismo. La mínima concentración inhibitoria de fosfato inorgánico se encuentra entre 1 y 50 mM para los diferentes antibióticos. Con concentraciones superiores, la producción del antibiótico se inhibe o se suprime totalmente, mientras que el crecimiento se estimula con concentraciones superiores a 500 mM (70, 71). Concentraciones mayores a 4 mM inhiben la producción de eritromicina (88).

Regulación por la Fuente de Carbono.

La regulación por la fuente de carbono es un mecanismo involucrado en la biosíntesis de un gran número de antibióticos. Está bien establecido que la biosíntesis de estos idiolitos es inhibida o reprimida por fuentes de carbono fácilmente catabolizables, como la glucosa o el citrato (24, 25, 46, 73, 74), sin embargo el mecanismo molecular de tal regulación se desconoce (tabla 3).

Tabla 2 REGULACION POR EL PRODUCTO FINAL EN LA BICSIÑTESIS DE ANTIBIOTICOS.*

ANTIBIOTICO	REFERENCIA
Cloranfenicol	Jones y Westlake, 1974
Cicloheximida	Kominek, 1975 a, b
A. Micofenólico	Muth y Nash, 1975
Aurodox	Liu y cols., 1975
Penicilina	Gordee y Day, 1972 Revilla y Martín, 1977
Ristomicina	Egorov y cols., 1971
Virginiamicina	Yanagimoto y Terui, 1971
Puromicina	Sankaran y Fogell, 1975
Fungicidina	Spizek y cols., 1965
Candihexina	Martin y Mc Daniel, 1974

* Adaptada a partir de Martín y Demain (1980).

TABLA 3 REGULACION POR CARBONO EN LA BIOSINTESIS DE ANTIBIOTICOS

ANTIBIOTICO	FUENTE INHIBITORIA	FUENTE NO INHIBITORIA	REFERENCIA
Penicilina	Glucosa	Lactosa	Johnson, 1953
Actinomicina	Glucosa	Galactosa	Gallo, 1972
Estreptomocina	Glucosa	Mananas, Glucosa*	Demain, 1970
Siamicina	Glucosa	Maltosa	Kimura, 1967
Indolmicina	Glucosa	Fructosa	Hurley, 1974
Bacitracina	Glucosa	Citrato	Haavik, 1974a,b
Cefalosporina C	Glucosa	Sacarosa	Demain, 1963
Cloranfenicol	Glucosa	Glicerol	Smith, 1963
Violacefna	Glucosa	Maltosa	De Moss, 1967
Prodigiosina	Glucosa	Galactosa	Ramsey, 1973
Mitomicina	Glucosa	Glucosa*	Kirsch, 1967
Neomicina	Glucosa	Maltosa	Majundar, 1971
Kanamicina	Glucosa	Galactosa	Basak, 1973
Eniatina	Glucosa	Lactosa	Audhya, 1975
Puromicina	Glucosa	Glicerol	Sankaran, 1975
Novobiocina	Citrato	Glucosa	Kominek, 1972
Candidina	Glucosa	Glucosa*	Martín, 1974
Candihexina	Glucosa	Glucosa*	Martín, 1974
Rutirosina	Glucosa	Glicerol	Howells, 1972
Cefamicina	Glicerol	Asparagina, Almidón	Aharonowitz, 1978

* Cultivos alimentados con bajas concentraciones de glucosa.

* Adaptada a partir de Martín y Demain (1980).

Tabla 4 CONTROL DE LA SINTESIS DE ANTIBIOTICOS POR-
FOSFATO INORGANICO (Martín, 1977).

Antibiótico	Cepa Productora	Rango de ortofosfato - inorgánico que permi- te la producción de an- tibióticos (mM).
Estreptomina	<i>S. griseus</i>	1.5-15
Novobiocina	<i>S. niveus</i>	9-40
Monamicina	<i>S. jamaicensis</i>	0.2-0.4
Neomicina	<i>S. fradiae</i>	
Clortetraciclina	<i>S. aureofaciens</i>	1-5
Oxitetraciclina	<i>S. rimosus</i>	2-10
Vancomicina	<i>S. orientalis</i>	1-7
Viomicina	<i>S. sp.</i>	1-8
Bacitracina	<i>S. licheniformis</i>	0.1-1
Ristomicina	<i>P. fructiferi</i>	0.2-5
Actinomicina	<i>S. antibioticus</i>	1.4-17
Polimixina	<i>B. polymyxa</i>	
Tetraciclina	<i>S. aureofaciens</i>	0.14-0.2
Kanamicina	<i>S. kanamyceticus</i>	2.2-5.7
Cicloheximida	<i>S. griseus</i>	0.05-0.5
A-9145	<i>S. griseolus</i>	0.28-2.24
Piociarina	<i>P. aeruginosa</i>	0.1 ^a
Prodigiosina	<i>S. marcescens</i>	0.05-0.2
Butirosina	<i>B. circulans</i>	< 5.6
Corineicinas	<i>C. sp.</i>	2.24 ^a
Oleandomicina	<i>S. antibioticus</i>	0.5 ^a
Gramicidinas	<i>B. brevis</i>	10-60
Gramicidinas	<i>B. brevis</i>	50 ^a
Cefamicina	<i>S. clavuligerus</i>	25
Amfotericina B	<i>S. nodus</i>	1.5-2.2
Aifactina	<i>S. aureofaciens</i>	1-17
Candidina	<i>S. griseus</i>	0.5-5
Candidina	<i>S. viridoflavus</i>	0.5-5
Levorina	<i>S. levoris</i>	0.3-4
Micoheptina	<i>S. mycohepticum</i>	3.5 ^a
Nistatina	<i>S. noursei</i>	1.6-2.2
Ristomicina	<i>P. fructiferi var</i> <i>ristomycin</i>	< 2.8
Eritromicina	<i>S. erythreus</i>	< 4.0

^a Concentración óptima de fosfato para la producción de antibiótico.

O B J E T I V O:

Conocer el efecto de la fuente de carbono en la formación de eritromicina en Streptomyces erythreus W.T. BM-21-115.

FUNDAMENTO DEL PROYECTO

Regulación Catabólica por Fuente de Carbono

La regulación catabólica por fuente de carbono es un mecanismo en el cual la síntesis de algunas enzimas catabólicas es reprimida o inhibida por el producto del catabolismo de fuentes de carbono que son rápidamente utilizables, tales como glucosa o citratos (59, 60).

Este fenómeno ha sido descrito también para la biosíntesis de metabolitos secundarios (24, 25, 46, 64).

Se ha encontrado que determinadas concentraciones de la fuente de carbono traen como consecuencia una baja en la producción específica del antibiótico. Asimismo, se ha encontrado en el caso del antibiótico actinomicina, producido por Streptomyces antibioticus, que la producción de la enzima fenoxasinona sintetasa, involucrada en la biosíntesis del mismo es fuertemente reprimida por glucosa, lo cual implica que no haya síntesis del antibiótico (34); ejemplos similares son el de los antibióticos kanamicina (95), cuya síntesis también es reprimida por fructosa, lactosa, manosa y maltosa además de glucosa y de puromicina (82).

Se conoce muy poco sobre este tipo de regulación para la biosíntesis de eritromicina; no hay reportes al respecto

y es muy posible que este mecanismo de regulación esté también involucrado en la síntesis de este antibiótico.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Microorganismos:

El modelo biológico para el presente estudio fué el actinomiceto Streptomyces erythreus W.T. BM-21-115, perteneciente a la colección del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M., y el microorganismo de prueba Sarcina lutea - NRRL-B-1018, obtenida del Agricultural Research Service Culture Collection y conservado por el Northern Regional Research Laboratory, en Peoria, IL..

Preservación de las Cepas:

Streptomyces erythreus W.T. BM-21-115 fué preservado en tubos de cultivo de 16 por 150 mm. con tapón de rosca, con teniendo 7 ml. de medio sólido inclinado de Agar Nutritivo a 4°C (10).

Medio de Esporulación:

Para la esporulación de Streptomyces erythreus W.T. BM 21-115 se utilizaron placas de medio sólido de Levadura-Malta-Agar (76). Las placas fueron inoculadas por estría y se incubaron a 29°C por 5 días, al término de los cuales esporula perfectamente el microorganismo.

Medio de Crecimiento del Preinóculo (I):

Este medio está basado en el medio descrito por Pridham y cols. en 1957, corresponde al medio de Levadura-Malta-Agar (76), modificado en el laboratorio:

Extracto de Levadura	4 g
Extracto de Malta	3 g
pH (NaOH 1N)	7.3
Agua Bidestilada a	1 l

Medio de Crecimiento y Producción de Eritromicina (II):

El medio de crecimiento y producción de eritromicina está basado en el medio descrito por Aharonowitz y Demain en 1978 (2), modificado en el laboratorio.

Extracto de Levadura	4 g
Extracto de Malta	3 g
*MOPS 0.1 M	1 l
pH (NaOH 10N)	7.0

*MOPS- solución amortiguadora: ácido-3-(N-morfolino)-propano-sulfónico.

Este medio se mantuvo a lo largo de todos los experimentos sin modificaciones, como control. Las adiciones de otras sustancias se mencionarán en cada caso.

Condiciones de Crecimiento.

Preinóculo:

Se preparó una suspensión de esporas de S. erythreus (aproximadamente 10^8) en 10 ml. de medio de cultivo I, en matraces Erlenmeyer de 50 ml., la cual fué incubada a 29°C, con agitación de 160 rpm. durante 8 horas.

Inóculo:

Matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 ml., conteniendo 50 ml. de medio de cultivo II fueron inoculados con un mililitro del preinóculo e incubados a 29°C con agitación a 160 rpm. durante 96 horas.

Las condiciones de crecimiento se mantuvieron constantes en todos los experimentos realizados. Cada experimento se hizo por triplicado.

En todos los experimentos se tomaron muestras a las 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas respectivamente, y se determinó la variación del pH, el crecimiento y la producción de eritromicina de la siguiente manera:

Determinación de pH Durante la Fermentación.

Se determinó el pH a cada muestra en un potenciómetro digital Beckman modelo pH ASAR I.

Determinación del Crecimiento.

El crecimiento del microorganismo fué determinado de dos formas:

-Por Densidad Óptica a 540 nm. en un fotocolorímetro Baush & Lomb modelo Spectronic 20; las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm. durante 10 min. en una centrifuga Lourdes modelo AA-C, se descartó el sobrenadante, y el paquete micelial fué lavado dos veces con agua destilada; posteriormente se determinó la absorbancia a 540 nm. contra un blanco de agua.

-Por proteína del micelio, en base al método de Lowry (57). Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm. durante 10 min.; se descartó el sobrenadante y el paquete micelial se lavó dos veces con agua destilada; este último fué resuspendido en 2 ml. de ácido tricloroacético 0.3M y congelado durante 24 horas.

Posteriormente fué centrifugado a 10,000 rpm. por 10 min. y el precipitado fué resuspendido en NaOH 0.8N, en un volumen proporcional al precipitado; las muestras fueron calentadas en un baño maría a ebullición durante 1 hora. De la solución resultante se tomaron alícuotas para determinar proteína siguiendo el método de Lowry y cols (57).

Este método tiene como base la formación de un complejo colorido entre el grupo fenólico (o el grupo aromático, en el caso de triptofano, histidina y fenilalanina) de la tirosi

na de las proteínas y el ácido fosfo-wolfano-molibdico (color oro) que oxida al grupo hidroxilo de la tirosina en condiciones alcalinas, dando un color azul intenso que se puede medir a 595 nm.

Se utiliza como estándar una solución de albúmina sérica bovina y se realiza el siguiente cálculo:

$$\text{Proteína } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Estándar } \mu\text{g por D.O. 595 problema}}{\text{D.O. 595 estándar}}$$

Se prepara una solución de:

Solución A:

- Solución de proteínas Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1N
 - Solución de tartrato de sodio y potasio 1% en agua destilada.
 - Solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5% en agua destilada
- en una proporción de 10:0.1:0.1 (en el orden presentado).

Solución B:

- Reactivo de Folin-Cicalteau diluido en agua 1:3 (fenol:agua).

Las alícuotas de las muestras y del estándar son llevadas a un volumen final de 1 ml. con agua destilada. Se les adicionan 5 ml. de la solución A agitando rápidamente; se deja reposar durante 10 min. y se agregan 0.5 ml de la solución

B, se agita rápidamente y después de dejar reaccionar la mezcla durante 30 min. se leen las muestras en un fotocolorímetro a una D.O. de 595 nm., contra un blanco que ha llevado el mismo tratamiento que las muestras.

Determinación de Eritromicina.

La eritromicina fué determinada por medio de un método biológico utilizando la técnica de Difusión en Agar, teniendo a Sarcina lutea NRRL-B-1018 como microorganismo de prueba (2, 8, 51).

La técnica de Difusión en Agar se basa en la medición relativa de la respuesta del microorganismo al antibiótico, comparada a la que presenta ante un estándar (51), observada como una zona clara de no crecimiento, en el cual el diámetro de la zona de inhibición es proporcional al logaritmo de la concentración del antibiótico (8, 51).

Preparación del microorganismo de prueba:

Sarcina lutea NRRL-B-1018 fué crecida en un medio sólido de Agar Nutritivo por un lapso de 48 horas a 37°C, se hizo una suspensión del microorganismo en 10 ml. de solución de NaCl 0.85% estéril, con una D.O.₅₄₀ de aproximadamente 2.

Se prepararon placas de medio de antibiosis Difco no. 5, virtiendo 15 ml. en cada caja de Petri. Una vez que ha solidificado se colocan discos de papel Watman tipo AA de 6 mm.

de diámetro, impregnados con 20 μ l de caldo de fermentación libre de células. Se dejan difundir las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente y se procede a hacer sobre las placas una aspersión, con la suspensión del microorganismo de prueba previamente preparada.

Las placas se incuban por 36 horas a 37°C; tras lo que se miden las zonas de inhibición del crecimiento con un medidor de halos "Craft". Al mismo tiempo se corre una curva estándar con concentraciones conocidas de eritromicina.

Para hacerlo se utilizó eritromicina base obtenida de los Laboratorios Abbot.

Se cuantificó la producción de eritromicina por mililitro de medio de cultivo.

Se determinó producción específica del antibiótico por miligramo de proteína de la siguiente forma:

$$\text{Producción específica} = \frac{\mu\text{g de antibiótico}}{\text{mg de proteína}}$$

Fuentes de Carbono Utilizadas.

Las fuentes de carbono utilizadas fueron obtenidas de casas comerciales como Difco y Sigma; y fueron las siguientes:

D-fructosa

D-galactosa

D-glucosa

Glicerol

Lactosa

D-manosa

Sorbosa

y un análogo:

2-deoxi-D-glucosa

En cada caso, éstas fueron disueltas en 5 ml. de solución amortiguadora MOPS 0.1M pH 7.0, se rectificó el pH y en los casos en que hubo variación se ajustó a 7.0 con NaOH 1N. Se esterilizaron por separado y fueron adicionadas posteriormente al medio de cultivo, de la forma que se mencionará para cada condición experimental. A los controles se les adicionaron 5 ml. de solución amortiguadora MOPS 0.1M pH 7.0 para ajustar el volumen.

Identificación de Eritromicina A como Producto del Metabolismo Secundario de la Cepa de Streptomyces erythreus W.T. BM-21-115.

Además de las pruebas biológicas ya referidas, se determinó que el antibiótico producido por la cepa de S. erythreus efectivamente fuese eritromicina A, por medio de cromatografía en capa fina comparando con un estándar de eritromicina, obtenido de los Laboratorios Abbot, México, D.F., de los Laboratorios Fermic, S.A. de C.V., México, D.F. y de Sig-

ma Chemical Co., S. Louis, MO..

Se creció al microorganismo de la manera ya descrita, a 29°C con agitación de 160 rpm., durante 48 horas, al término de las cuales se separó el micelio del medio de cultivo por centrifugación a 10,000 rpm. durante 10 min.. Se ajustó el pH del sobrenadante, donde se encontraba el antibiótico a 9.8 y se hicieron dos extracciones con cloroformo (v/v). La mezcla solvente-antibiótico se lavó una vez con agua destilada y se evaporó al vacío, casi a sequedad, mediante el uso de un rotavapor marca "Jobling".

La muestra se corrió junto con un estándar de eritromicina A en una placa de silica-gel 60 (Merck), de 0.25 mm. de espesor, mediante un sistema de disolventes constituido por diclorometano-metanol-hidróxido de amonio (90/10/1 - v/v/v) (65) y se reveló por aspersion con una mezcla de etanol-p-anisaldehído-ácido sulfúrico concentrado (9/1/1 - v/v/v), posteriormente se calentó en una estufa 'J.M. Ortíz' para laboratorio, a 100°C durante 5 min. (62).

Estabilidad de la Eritromicina en el Medio de Cultivo II.

En tubos de ensaye de 10 por 150 mm. se incubó medio de cultivo II conteniendo 50 µg de eritromicina A proveniente de los Laboratorios Abbot, con diferentes valores de pH (4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 y 9); se mantuvo durante 13 días a 29°C. Se determinó la estabilidad del antibiótico

por medio de bioensayos realizados con muestras tomadas cada 24 horas, como se describió anteriormente.

Efecto de Diferentes Fuentes de Carbono en la Formación de Eritromicina.

(Selección de la Fuente de Carbono).

El microorganismo fué crecido en el medio de cultivo II, conteniendo diferentes fuentes de carbono, en una concentración de 10 mg ml^{-1} . Estas fueron adicionadas a tiempo cero. Se utilizó como control al microorganismo crecido en ausencia de fuente de carbono.

Se tomaron muestras cada 12 horas hasta las 96 horas y se determinó crecimiento, producción del antibiótico y pH de la manera en que ya se mencionó.

Efecto de Glucosa en la Producción Específica de Eritromicina.

Se creció al microorganismo en el medio de cultivo II, como se describió anteriormente y se adicionó glucosa en una concentración de 10 mg ml^{-1} desde el inicio del crecimiento. Se utilizaron como control medios de cultivo con el microorganismo crecido en ausencia de glucosa, en las mismas condiciones.

A las muestras se les determinó crecimiento, pH y producción de antibiótico.

Efecto de Diferentes Concentraciones de Glucosa en la Producción Específica de Eritromicina.

El microorganismo fué crecido en presencia de las siguientes concentraciones de glucosa:

- 0.05 mg ml⁻¹
- 0.10 mg ml⁻¹
- 0.50 mg ml⁻¹
- 1.00 mg ml⁻¹
- 5.00 mg ml⁻¹
- 10.00 mg ml⁻¹
- 20.00 mg ml⁻¹

La adición del carbohidrato se hizo a tiempo cero y las condiciones de crecimiento y los controles se mantuvieron constantes como se mencionó anteriormente. De igual forma se determinó pH, crecimiento y producción del antibiótico.

Caracterización del Efecto de Glucosa en la Producción de Eritromicina.

El análogo de glucosa 2-deoxi-D-glucosa en una concentración de 20 y 50 mg ml⁻¹ y glucosa 20 mg ml⁻¹, fueron adicionados al inicio del crecimiento del microorganismo; de la misma manera en que se describió, se excluyó el carbohidrato en el control y se determinó pH, crecimiento y producción del antibiótico de la misma forma.

Caracterización del Fenómeno.

Efecto de Glucosa Adicionada a Diferentes Tiempos del Crecimiento de Streptomyces erythreus en la Producción de Eritromicina.

Glucosa en una concentración de 20 mg ml^{-1} fué adicionada a cultivos del microorganismo a diferentes tiempos del crecimiento:

0 hrs.

24 hrs.

48 hrs.

60 hrs.

Se utilizaron controles sin glucosa y también fué determinado el crecimiento, los cambios de pH y la producción del antibiótico.

Identificación de Eritromicina A como Producto del Metabolismo Secundario de la Cepa de Streptomyces erythreus W.T. BM-21-115.

S. erythreus W.T. BM-21-115 produce principalmente eritromicina A, lo cual puede observarse en la figura 6. Se corrieron dos estándares de eritromicina, de los cuales uno se mezcló con el extracto del medio de cultivo para desechar la posibilidad de que algún componente interfiriese con el patrón cromatográfico. Como se puede observar, los patrones son uniformes en los tres casos. La mancha principal corresponde a eritromicina A; también se pueden observar los intermediarios del antibiótico, los cuales tienen un R_f menor que eritromicina A y corresponden a las manchas inferiores en la cromatografía.

Estabilidad de Eritromicina A en el Medio de Cultivo II.

Este antibiótico es estable en solución a 29°C en un rango de pH de 6 a 9, como se puede observar en la figura 8.

El antibiótico se mantuvo en el medio de cultivo II con la finalidad de conocer su estabilidad en estas condiciones. En la figura se puede observar que sólo en valores de pH menores de 6 el antibiótico empieza a degradarse, pero esto es sólo hasta los 13 días de incubación; mientras que en condiciones alcalinas se mantiene estable y los halos de inhibición corres

ponden con los del control, en el cual la muestra fué tomada al momento de adicionar el antibiótico (0 horas).



Fig. 6 Cromatografía en capa fina de eritromicina A producida por la cepa de *S. erythreus* BM-21-115 (1), comparada con un estándar de eritromicina de Sigma Chemical Co. (2); mezcla de la muestra obtenida del cultivo y el estándar (3). Los cultivos y la cromatografía fueron realizados como se describió en material y métodos.

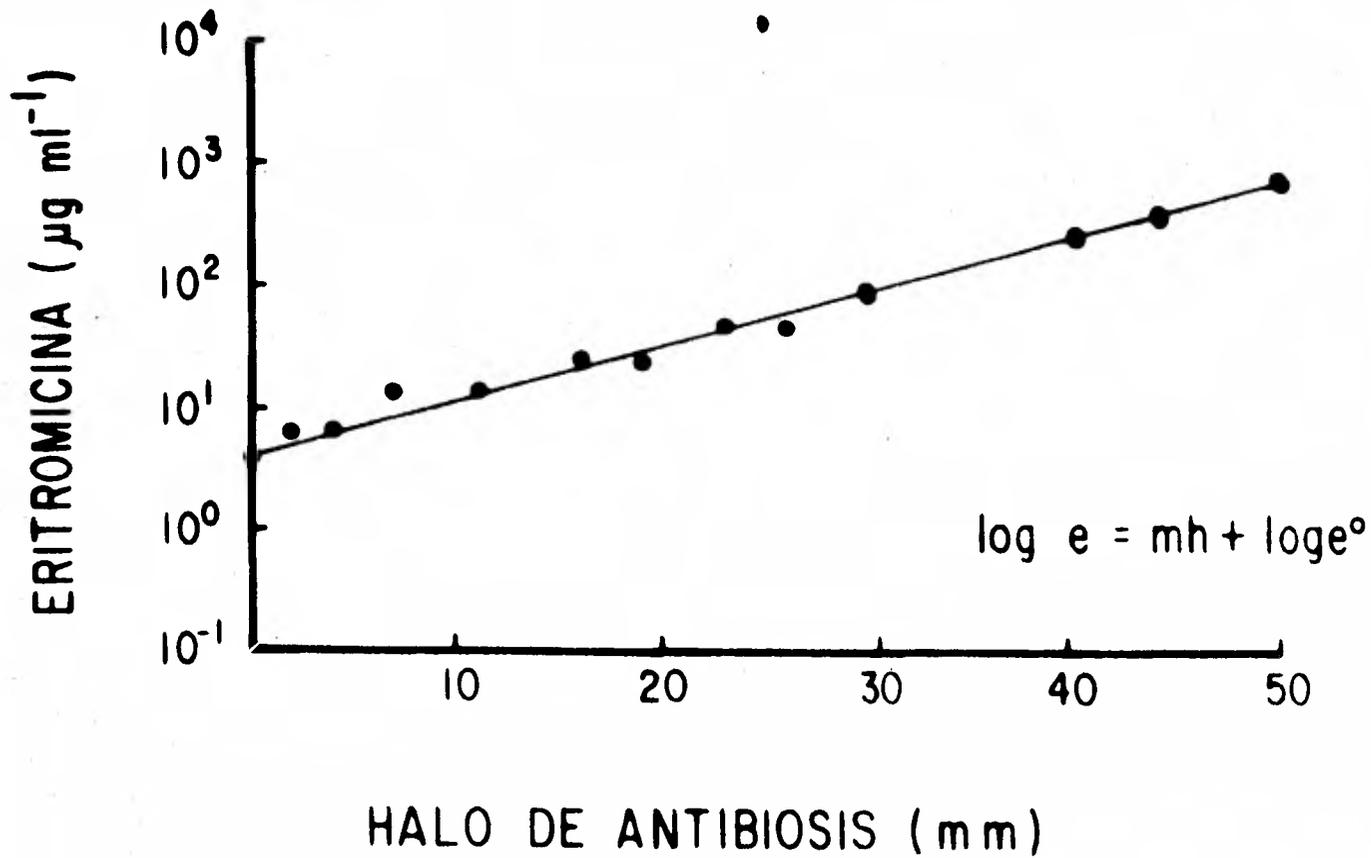
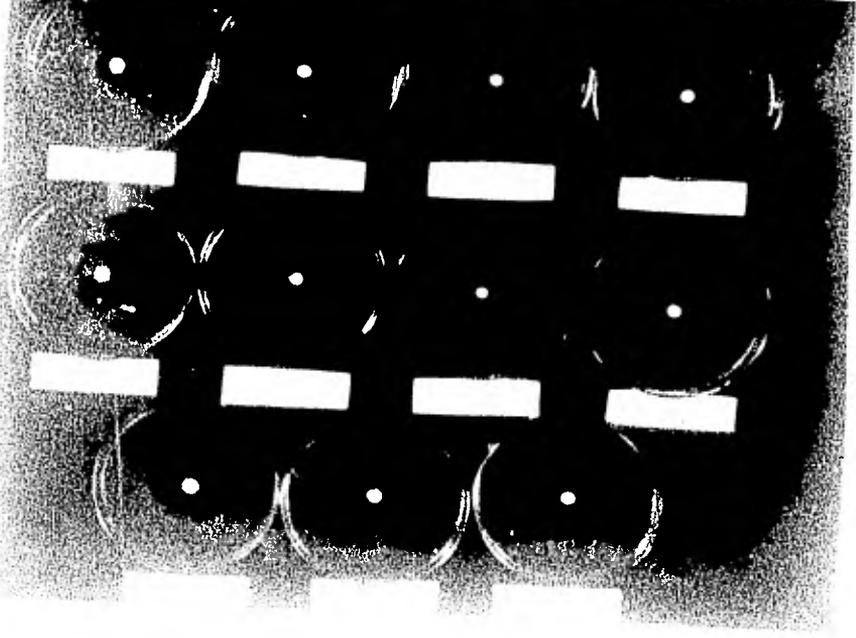


Fig. 7 Ensayo microbiológico de la actividad antibiótica de la eritromicina. Relación existente entre la concentración de eritromicina (e) y el halo de antibiosis observado (h), mediante la técnica de difusión en agar. " m ", valor de la pendiente de la recta y " e_0 " valor de la ordenada en el origen. Coeficiente de correlación de los valores experimentales: 0.97.



R E S U L T A D O S

Efecto de Diferentes Fuentes de Carbono en la Formación de Eri-tromicina.

Como se puede observar en la figura 8A, en estas condiciones de crecimiento el microorganismo empieza a producir el antibiótico a las 36 hrs. de incubación y continúa lineal durante 50 hrs. aproximadamente (control); sin embargo cuando es crecido en presencia de D-glucosa, sacarosa, D-manosa y glicérol se observa una estimulación en el crecimiento, no así en la producción del antibiótico (tabla 5), ya que la producción específica de éste es suprimida entre un 20 a 60% como se puede observar, y se presenta un retardo en la producción con respecto al control (figura 9).

Lactosa y sorbosa no tienen influencia sobre esta relación pues el crecimiento y la producción son similares al control; D-fructosa y D-galactosa muestran una acción intermedia.

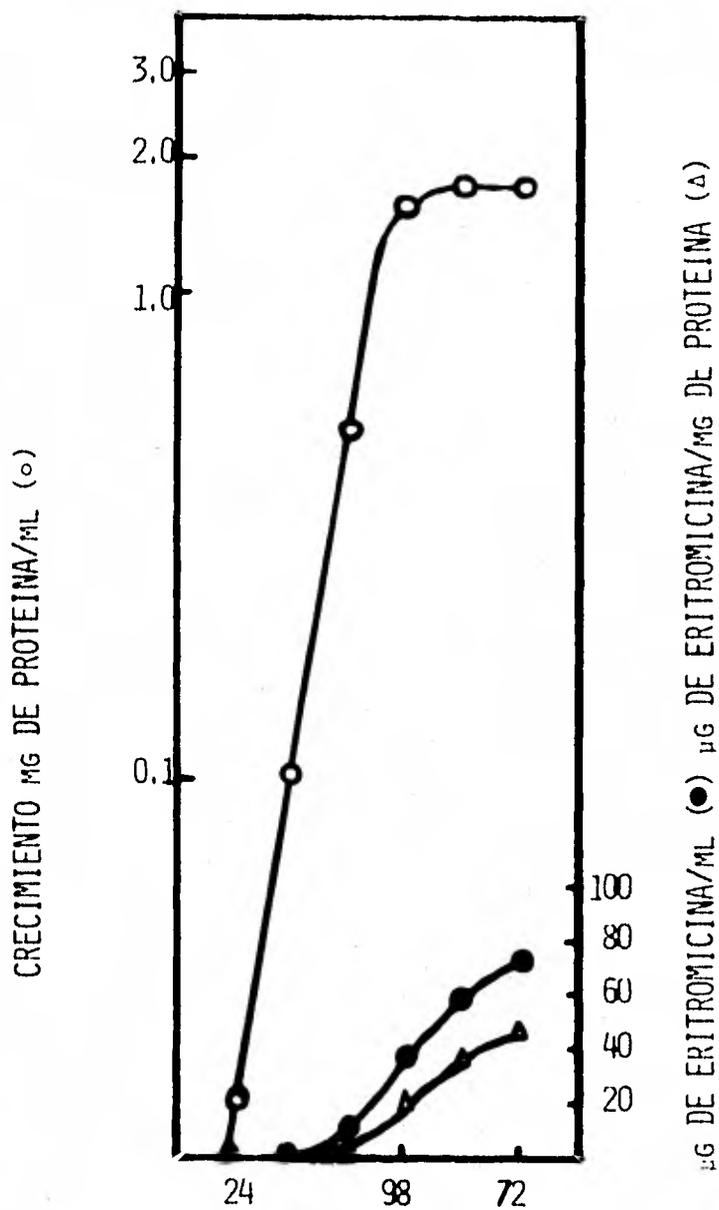


FIGURA 8A. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *S. ERYTHREUS* EN EL MEDIO DE CULTIVO II Y PRODUCCIÓN DE ERITROMICINA. LOS CULTIVOS FUERON CRECIDOS COMO SE DESCRIBIÓ EN MATERIAL Y MÉTODOS.

TABLA 5

EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL CRECIMIENTO Y FORMACION DE ERITROMICINA EN *S. erythreu*^(a)

FUENTE DE CARBONO ^(b)	CRECIMIENTO mg PROTEINA ml ⁻¹	ERITROMICINA	
		µg ml ⁻¹	µg (mg PROTEINA) ⁻¹
Control ^(c)	1.7	58	34.1
D-Fructosa	3.2	48	15.0
D-Galactosa	3.3	63	19.0
D-Glucosa	4.2	63	15.0
Glicerol	3.8	63	16.5
Lactosa	2.1	58	27.6
D-Manosa	3.4	68	20.0
Sorbosa	1.7	32	18.8
Sacarosa	4.1	78	19.0

(a) Las células fueron crecidas en medio CM durante 60h a 29°C con agitación tal como se describió en Materiales y Métodos.

(b) La concentración de la fuente de carbono fue 10 mg ml⁻¹

(c) El control contenía sólo medio CM

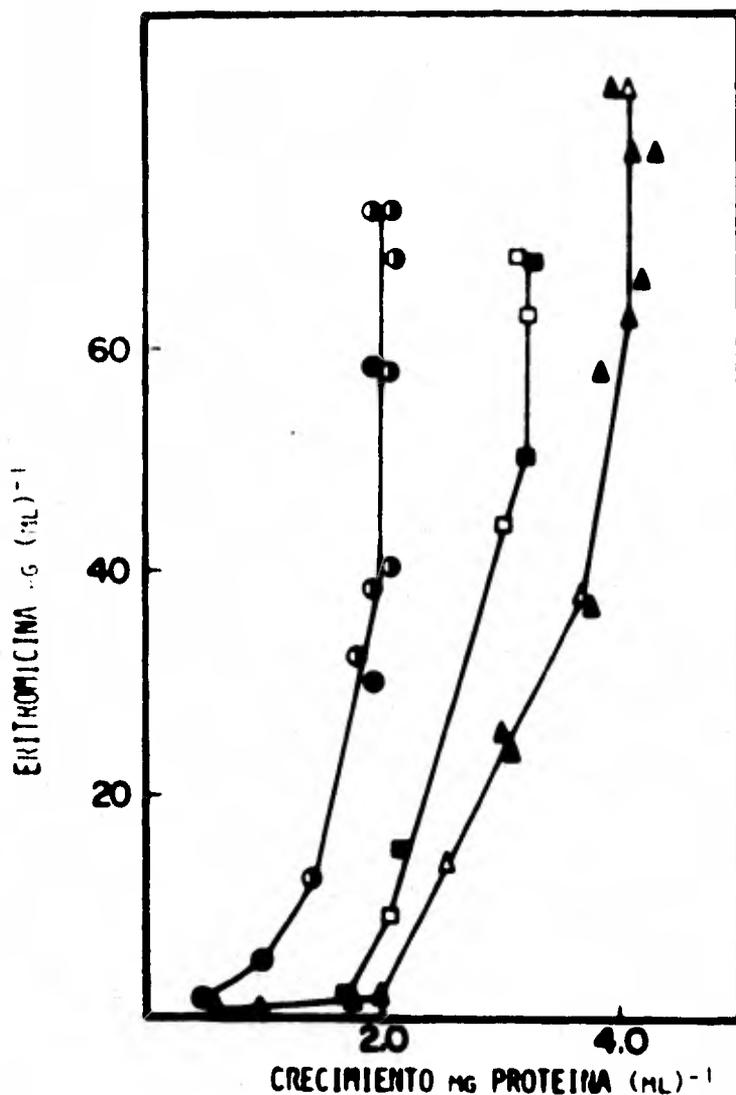


FIGURA 9. EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO SOBRE LA FORMACION DE ERITROMICINA. LOS CULTIVOS FUERON CRECIDOS EN EL MEDIO II, SUPLEMENTADO O NO CON EL CARBOHIDRATO (10 mg ml^{-1}). LOS AZUCARES UTILIZADOS FUERON LACTOSA (●), SORBOSA (○), D-FRUCTOSA (■), D-GALACTOSA (□), D-GLUCOSA (▲), SACAROSA (▲), D-MANOSA (▲), Y GLICEROL (▲). CONTROL (●), SIN FUENTE DE CARBONO.

Efecto de D-Glucosa en la Producción de Eritromicina.

D-glucosa produce la máxima supresión en la formación específica del antibiótico, como se puede observar en la figura 10. La producción por mililitro es un poco mayor con respecto al control, no así la producción específica del antibiótico, la cual es suprimida en un 70%. También se puede observar, incluso, un retraso en la producción del antibiótico; en el control éste se produce a las 36 horas y cuando el microorganismo es crecido en presencia de glucosa empieza aproximadamente a las 42 horas.

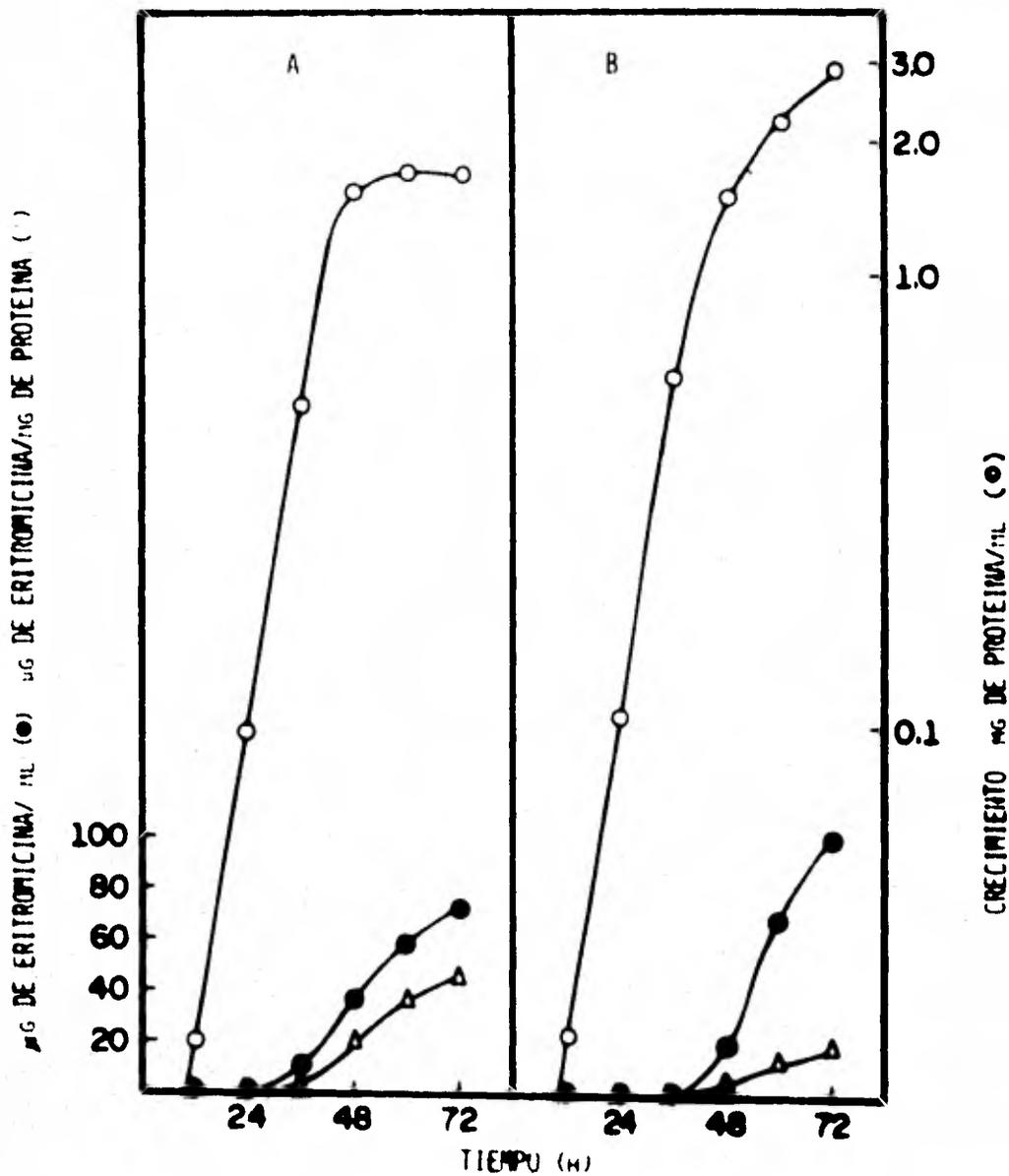


FIGURA 10. EFECTO DE D-GLUCOSA (10 mg ml^{-1}) EN LA FORMACION DE ERITROMICINA (B). CONTROL (A). LAS CELULAS FUERON CECIDAS DURANTE 72 HORAS A 29°C , COMO SE DESCRIBIO EN MATERIAL Y METODOS.

Efecto de Diferentes Concentraciones de D-Glucosa en la Producción Específica de Eritromicina.

Como se muestra en la figura 11, el microorganismo fué crecido en varias concentraciones de glucosa durante 84 horas; tanto el crecimiento como la producción por mililitro de eritromicina fueron estimuladas en función de la concentración de glucosa, sin presentar cambios significativos en el pH del cultivo. Sin embargo, como se puede observar, la síntesis específica del antibiótico fué afectada negativamente, alcanzándose el máximo efecto en una concentración de 20 mg ml^{-1} . Esta acción negativa se empieza a observar desde una concentración de 0.5 mg ml^{-1} .

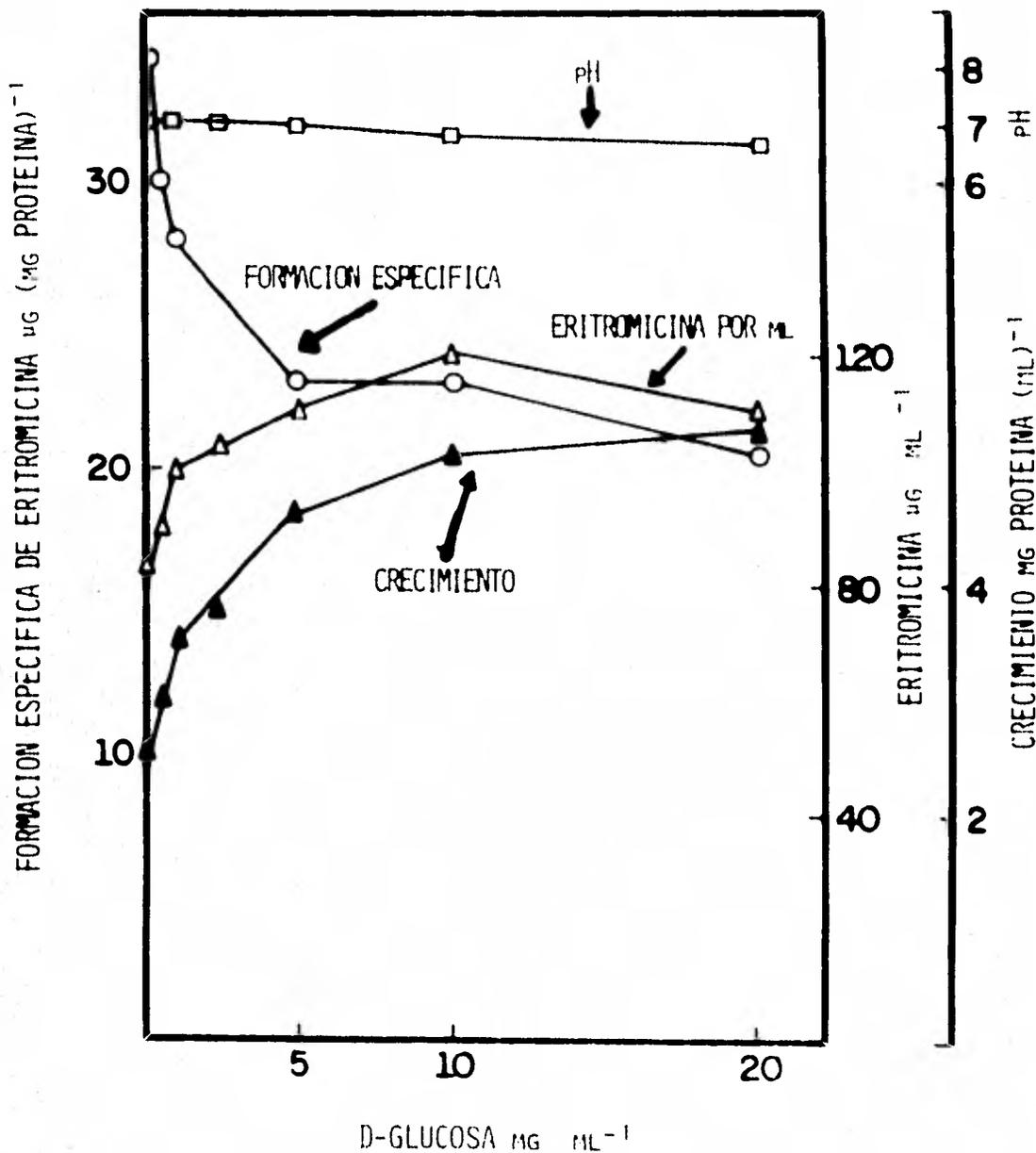


FIGURA 11. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE D-GLUCOSA SOBRE EL CRECIMIENTO MAXIMO DE *S. ERYTHREUS* Y LA FORMACION DE ERITROMICINA: LAS CELULAS FUERON CRECIDAS A 29°C DURANTE 34 HORAS, COMO SE DESCRIBIO EN MATERIAL Y METODOS.

Caracterización del Efecto de D-Glucosa en la Producción de E-ritromicina.

El efecto de un análogo no metabolizable de D-glucosa sobre el crecimiento del microorganismo y la producción del antibiótico se puede observar en la figura 12. El crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo control y en 10 mg. ml^{-1} de 2-deoxi-D-glucosa son similares. En presencia de concentraciones mayores del análogo (20 mg ml^{-1}), el crecimiento tampoco se modifica considerablemente, sin embargo, la producción del antibiótico en relación al control se afecta considerablemente, pues en una concentración de 10 mg ml^{-1} la producción específica presenta un fuerte decremento, y en concentraciones mayores de análogo hay una supresión casi total (tabla 6).

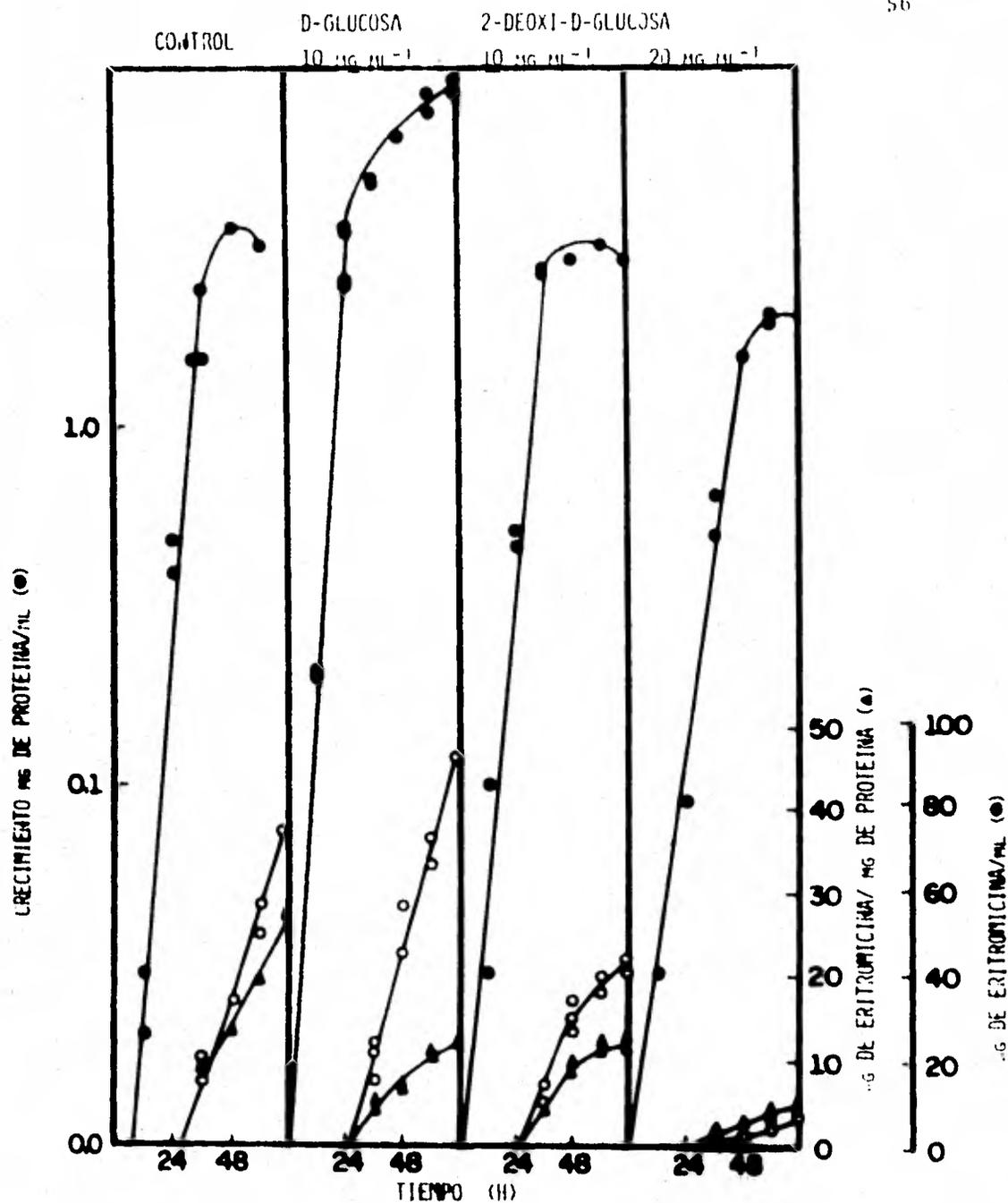


FIGURA 12. EFECTO DE 2-DEOXI-D-GLUCOSA SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA FORMACION DE ERITROMICINA EN *S. ERYTHRAEUS*. LOS MICROORGANISMOS FUERON CRECIDOS DE LA MANERA EN QUE SE DESCRIBIO EN MATERIAL Y METODOS

TABLA 6

EFFECTO DE 2-DEOXI-D-GLUCOSA SOBRE EL CRECIMIENTO DE *S. erythreus* Y FORMACION DE ERITROMICINA ^(a)

2-Deoxi D-Glucosa ^(b) mg ml ⁻¹	Crecimiento mg Proteína ml ⁻¹	Formación de Eritromicina	
		µg ml ⁻¹	µg Proteína ⁻¹
0	2.0	74.0	37.0
10	2.2	45.0	20.4
20	1.8	6.0	3.3

(a) Las células fueron crecidas en medio CM a 29°C a 72 h.

(b) Antes de ser añadidas el análogo fue esterilizado por filtración a través de una membrana Millipore tipo HAWP 02500, Millipore Co., Bedford, MA.

Caracterización del fenómeno. Efecto de D-Glucosa Adicionada a Diferentes Tiempos de Crecimiento de Streptomyces erythreus en la Producción de Eritromicina.

Glucosa en una concentración de 20 mg ml^{-1} fué adicionada a cultivos del microorganismo a las 0, 24, 48 y 60 horas de crecimiento, como se puede observar en la figura 13. Cuando la glucosa fué adicionada al inicio del cultivo (0 hrs.) y durante la fase de crecimiento (24 hrs.) se observa un retardo en la síntesis del antibiótico, no así cuando ésta es adicionada a las 48 y 60 horas (una vez que ha comenzado la síntesis), donde prácticamente el efecto negativo no existe. También se puede observar que una vez que ha pasado el efecto de la adición de glucosa, se presenta un cambio en la pendiente con respecto a la producción del antibiótico, lo cual sugiere una posterior "activación" de la síntesis del antibiótico (0 y 24 horas).

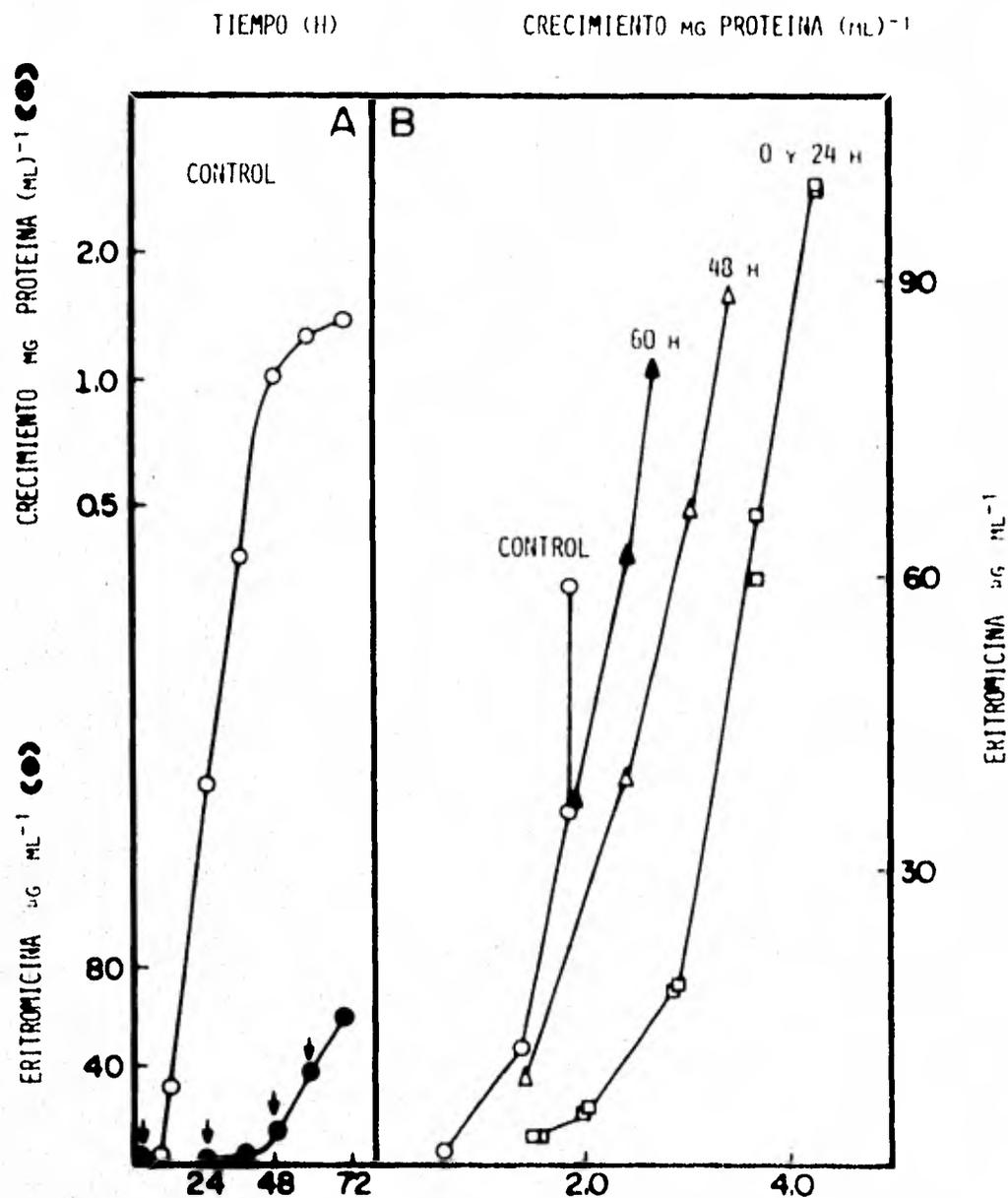


FIGURA 13. EFECTO DE LA ADICION DE D-GLUCOSA A DIFERENTES TIEMPOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCION DE ERITROMICINA EN *S. ERYTHRAEUS*. A - EL CONTROL SIN GLUCOSA MUESTRA EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCION DE ERITROMICINA AL TIEMPO EN QUE SE ADICIONO LA GLUCOSA (●). B - CAMBIOS OBTENIDOS EN LA FORMACION DE ERITROMICINA, CUANDO D-GLUCOSA FUE ADICIONADA EN LOS INTERVALOS DE INCUBACION INDICADOS. LAS CELULAS FUERON CRECIDAS COMO SE MENCIONO EN MATERIAL Y METODOS.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Streptomyces erythreus W.T. BM-21-115 en las condiciones experimentales ya mencionadas empieza a producir el antibiótico a las 36 horas de incubación y continúa lineal hasta las 50 horas aproximadamente. Sin embargo cuando éste fué crecido en presencia de diferentes carbohidratos como principales fuentes de carbono y energía provocó cambios en esta relación de crecimiento del microorganismo y en la producción del metabolito, ya que como se pudo observar, entre las fuentes de carbono probadas en este trabajo D-glucosa, sacarosa, D-manosa y glicerol mostraron un efecto dual en la estimulación del crecimiento y la formación del antibiótico y al mismo tiempo disminuir la síntesis específica de eritromicina. En estas condiciones parece ser que las células utilizan la fuente de carbono más para crecer que para producir el antibiótico. Efectos similares han sido observados en la formación de cefalosporina en S. clavuligerus (2) utilizando glicerol como fuente de carbono. Por otro lado lactosa y sorbosa no tuvieron efecto sobre esta relación y fructosa y galactosa presentaron un efecto intermedio en la síntesis del antibiótico. Como se pudo observar, estos carbohidratos lograron suprimir la síntesis específica del antibiótico entre un 20 y 60%.

Esta supresión específica de la formación del antibiótico se pudo observar con mayor detalle cuando se adicionó glucosa al inicio del cultivo en una concentración de 20 mg . ml⁻¹, ya que la síntesis específica del antibiótico disminuye en un 70% y además hay un desfase en la producción de éste.

Este carbohidrato, más que algún producto derivado de su catabolismo, parece ser el responsable de este efecto, ya que un análogo no metabolizable de glucosa suprimió drásticamente la síntesis del antibiótico.

Por otro lado, glucosa ejerce su efecto sólo cuando es adicionada a los cultivos antes de que comience la fase de producción, lo cual sugiere que el carbohidrato está ejerciendo un efecto represor más que inhibitorio o inactivador, ya que glucosa no ejerce efecto una vez que las sintetazas del antibiótico ya se han formado.

La cinética de este efecto es muy similar al reportado en E. coli por Perlman y cols. en 1969 (81), donde la glucosa " per se " provoca una represión transitoria en la síntesis de β -galactosidasa. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la fuente de carbono afectan la síntesis de los metabolitos secundarios no se conoce (25).

Magasanik (59, 60) ha estudiado los efectos que ejerce la glucosa en el metabolismo de lactosa, ha encontrado que ésta ejerce tres tipos de efectos principalmente. En el pri-

mer caso evita la entrada del inductor a la célula, lo cual no permite la inducción del operón de la lactosa, a este fenómeno lo denominó "Exclusión del Inductor". En el segundo caso, "Represión Transitoria", reprime fuerte pero transitoriamente a la enzima β -galactosidasa. Cuando este control se termina la síntesis de la enzima se restablece con la misma pendiente que en el control. En el tercer caso reprime la formación de la enzima β -galactosidasa débil pero de manera permanente; este efecto de glucosa no refleja interferencia con el inductor y en mutantes constitutivas la síntesis de la enzima es también reprimida por el carbohidrato.

En los primeros dos casos es la molécula de glucosa "per se" la que provoca este efecto. En el último caso este efecto es provocado por algún producto del catabolismo de la glucosa.

Resultados similares sobre la represión de las enzimas involucradas en la síntesis de otros metabolitos secundarios por este carbohidrato han sido reportados, como es el caso de actinomicina (fenoxasinona-sintetasa) (34), puromicina (O-dimetil-puromicina-metil-transferasa) (82) y kanamicina (N-acetil-kanamicina-amidohidrolasa) (95).

Además de la represión en la formación de eritromicina por glucosa, la concentración total del antibiótico se incrementó notablemente, lo cual sugiere que este efecto pudiera ser una activación posterior causada por algún producto deri-

vado del catabolismo de glucosa. Posteriores experimentos tendrán el objetivo de esclarecer este fenómeno.

C O N C L U S I O N E S

En base a la discusión de los resultados se puede concluir que:

- a) Glucosa ejerce un efecto represivo en la síntesis del antibiótico eritromicina, ya que aún en bajas concentraciones en el medio de cultivo logra suprimir la producción específica de este metabolito; este efecto sólo se presenta cuando es adicionada a las 0 y 24 horas de crecimiento, momento en el cual aún no están presentes las sintetasas del antibiótico.
- b) Es la molécula de glucosa "per se" la que provoca dicho efecto.
- c) La posterior estimulación de la formación del antibiótico, aunado al incremento en la producción total, sugieren que se trata de un fenómeno similar al de Represión Transitoria.
- d) El responsable de la activación posterior puede ser algún producto del catabolismo de glucosa, el cual pudiera actuar como inductor del sistema de formación de las sintetasas del antibiótico.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Achenbach, H. y Grisenbach, H., 1964. Zeitschrift für Naturforschung. 19b:561.
- 2) Aharonowitz, Y. y Demain, A.L., 1978. Antimicrob. Agents. Chemother. 14:159-164.
- 3) Aharonowitz, Y. y Demain, A.L., 1979. Can. J. Microbiol. 25:61-67.
- 4) Aharonowitz, Y. y Cohen, G., 1981. Investigación y Ciencia. 62:8-20.
- 5) Andhya, T.K. y Russell, D.W., 1975. J. Gen. Microbiol. 86:327-332.
- 6) Bacon, C.W., Robbins, J.D. y Burdick, D., 1975. Appl. Microbiol. 25:61-67.
- 7) Basak, K. y Majumdar, S.K., 1973. Antimicrob. Agents. Chemother. 4:6-10.
- 8) Bauner, A.W. y cols., 1966. Am. J. Pathol. 45:493-496.
- 9) Berdy, J., 1974. Appl. Microbiol. 18:309-406.
- 10) Booth, C., 1971. Methods in Microbiology. Academic Press ed. 4:80-91.

- 11) Clements-Jewery, S., 1976. *Separatum. Experientia.* 32: 421-422.
- 12) Corcoran, J.W., 1961. *J. Biol. Chem.* 236:PC 27.
- 13) Corcoran, J.W., 1964. *Llodia.* 27:1.
- 14) Corcoran, J.W., 1973. En: *Genetics of Industrial Microorganisms. Actinomycetes and Fungi.* Vanek, Z. ed. Elsevier, Amsterdam. Vol. II, p. 339.
- 15) Corcoran, J.W., 1974. *Developments in Industrial Microbiology.* 15:93.
- 16) Corcoran, J.W., 1975. *Methods in Enzymology.* 43:487.
- 17) Dawson, R.C.M. y cols., 1969. En: *Dats for Biochemical Research.* Oxford University Press. Great Britain. 360-361.
- 18) Demain, A.L., 1963. *Clin Med.* 70:2045-2051.
- 19) Demain, A.L. e Inamine, E., 1970. *Bacteriol. Rev.* 34: 1-19.
- 20) Demain, A.L., 1971. *Adv. Biochem. Eng.* 1:113.
- 21) Demain, A.L., 1973. *Appl. Microbiol.* 16:177-202.
- 22) Demain, A.L., 1974. *J. Gen. Microbiol.* 82:143-151.

- 23) Demain, A.L. y Solomon, N.A., 1981. Investigación y Ciencia. 62:8-20.
- 24) Demain, A.L., 1976. En: Stadler Symp. Vol. 8. University of Missouri, Columbia. pp. 41-55.
- 25) Demain, A.L., Kennel, Y.M. y Aharonowitz, Y., 1979. En: Bull, Ellwood and Ratledge (eds.). Microbial Technology, Society for General Microbiology, Ltd., Printed in Great Britain. p. 163-185.
- 26) De Moss, R.D., 1967. En: Antibiotics. Biosynthesis. Gottlieb and P.D. Shaw eds. Springer Verlag. Berlin. 2: 77-81.
- 27) Dree, S.W. y Demain, A.L., 1975. Eur. J. Appl. Microbiol. 1:121-128.
- 28) Findland, M.C. y cols., 1952. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 81:725.
- 29) Flores, M.E., López, H.H. y Sánchez, S., 1981. XII Congreso Nacional de Microbiología. Mérida, Yuc. p. 60.
- 30) French, J.C., Howells, J.D. y Anderson, L.E., 1970. U.S. Patent. 3,551,294.
- 31) Frieman, S.M., Kaneda, T. y Corcoran, J.W., 1964. J. Biol. Chem. 239:2386-2391.

- 32) Friedrich, C.G. y Demain, A.L., 1978. Arch. Microbiol. 119:43-47.
- 33) Fusillo, M.H. y cols., 1953. Antibiot. and Chemother. 3:581.
- 34) Gallo, M. y Katz, E., 1972. J. Bacteriol. 109:659-667.
- 35) Gersch, D., Boker, H. y Thrum, H., 1977. J. Antibiotics. 30:488.
- 36) Gersch, D., 1979. FEMS. Microbiology Letters. 6:343-347.
- 37) Grafe, U., Bocker, H. y Thrum, H., 1977. Z. Allg. Mikrobiol. 17:201-209.
- 38) Guy, L.R. y Capman, J.S., 1961. Am. Respirat. Dis. 87:746.
- 39) Haavik, H.I., 1974. J. Gen. Microbiol. 84:321-326.
- 40) Haavik, H.I., 1974. J. Gen. Microbiol. 81:383-390.
- 41) Haselkorn, R. y Rothman-Denes, L.B., 1973. Ann. Rev. Biochem. 42:397-438.
- 42) Hockenull, D.J.D., 1963. En: Biochemistry of Industrial Micro-organisms. C. Rainbow and A.H. Rose eds. Academic Press, Londres y New York. p. 159.

- 43) Holjevac, M. y Vlasic, D., 1976. En: Proceedings of the Fifth International Fermentation Symposium. H. Dellweg ed. Berlin. p. 145.
- 44) Hopwood, D.A. y Merrick, M.J., 1977. Bacteriol. Rev. 41(3):595-635.
- 45) Howells, J.D. y cols., 1972. Antimicrob. Agents. Chemother. 2:79-83.
- 46) Hu BSc, W.S. y Demain, A.L., 1979. Process Biochem. 14: 2-6.
- 47) Hudson, D.G., Yoshihara, G.M. y Kirby, W.M.M., 1956. Arch. Internal. Med. 97:57.
- 48) Hurley, L.H. y Bialek, D., 1974. J. Antibiot. 27:49-56.
- 49) Inamine, E., Lago, B.D. y Demain, A.L., 1969. En: Fermentation Advances. D. Perlman ed. Academic Press Inc., New York. p. 199-221.
- 50) Jhonson, M.J., 1952. Bull. Wld. Hlth. Org. 6:99-121.
- 51) Kavanagh, F., 1975. Methods in Enzimology. XLIII:55-69.
- 52) Kimura, A., 1967. Agr. Biol. Chem. 31:845-852.

- 53) Kirsh, E.J., 1967. En: Antibiotics. Biosynthesis. Gottfried and P.D. Shaw eds. Springer Verlag. Berlin. 2: 66-76.
- 54) Kominek, L.A., 1972. Antimicrob. Agents. Chemother. 1: 123.
- 55) Lechevalier, H.A., 1975. Appl. Microbiol. 19:25-57.
- 56) López, H.H., 1981. Tesis. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Colegio de Ciencias y Humanidades, UNAM.
- 57) Lowry, O.H. y cols., 1951. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- 58) Mc Guire, J.M. y cols., 1952. Antibiot. and Chemother. 2:281.
- 59) Magasanik, B.P., 1970. En: J.R. Beckwith and D. Zipser eds. Cold Spring Harbor Laboratory. p. 189-219.
- 60) Magasanik, B.P., 1961. En: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26:249.
- 61) Majer, J. y cols., 1961. Chemistry and Industry. p. 659.
- 62) Majer, J. y cols., 1977. J. Am. Chem. Soc. 99:1620-1622.

- 63) Majumdar, M.K. y Majumdar, S.K., 1971. *Folia. Microbiol.* 16:285-292.
- 64) Malik, V.S., 1980. *TIBS.* 4645-68-72.
- 65) Martin, J.F. y Goldstein, A.W., 1970. En: *Progress in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy.* University Press Baltimore. 11:112.
- 66) Martin, J.F. y cols., 1975. *Tetrahedron.* 31:1985.
- 67) Martin, J.F. y Mc Daniel, L.E., 1974. *Dev. Ind. Microbiol.* 15:324-327.
- 68) Martin, J.F., 1976. *Dev. Ind. Microbiol.* 17:223.
- 69) Martin, J.F., 1977. *Ann. Rev. Microbiol.* 31:13-38.
- 70) Martin, J.F., 1977. *Adv. Biochem. Engin.* 6:105-127.
- 71) Martin, J.F., 1979. En: *Antibiotics and Other Secondary Metabolites: Biosynthesis and Production.* R. Hutter. T.H. Leisinger, J. Nuesch y W. Wehrli eds. Academic Press, London. 3:2-33.
- 72) Martin, J.F., 1979. En: *Antibiotics and Other Secondary Metabolites: Biosynthesis and Production.* R. Hutter. T.H. Leisinger, J. Nuesch y W. Wehrli eds. Academic Press, London. 3:239-291.

- 73) Martin, J.F., 1979. En: Economic Microbiology Secondary Products of Metabolism. A.H. Rose ed. Academic Press. London. 3:2-23.
- 74) Martin, J.F. y Demain, A.L., 1980. Microbiol. Rev. 44: 230-251.
- 75) Molavi, A. y Weinstein, L., 1971. J. Infect. Diseases. 123:216.
- 76) Norris, J.R. y Ribbons, D.W., 1970. Methods in Microbiology. 3A:129.
- 77) Oleinick, N.L., 1975. En: Antibiotics Mechanism of Action of Antimicrobial Agents. J.W. Corcoran ed. Springer Verlag. New York. 111:396.
- 78) Ostrowska-Krysiak, B., 1971. Acta Microbiológica Polónica. Serie B3-23.
- 79) Ostrowska-Krysiak, B., 1974. Postepy Higieny I Medizin Dosw. 29:515.
- 80) Otaka, E. y cols., 1971. Molecular and General Genetics. 114:4.
- 81) Perlman, L.R., De Crombrughe, B. y Oastan, I., 1969. Nature. 223:810-812.

- 82) Pogell, B.M. y cols., 1976. En: Microbiology-1976. D. Schlessinger ed. Washington: American Society of Microbiology. p. 543-547.
- 83) Queener, S.W., Sebek, O.K. y Vezina, C., 1978. Ann. Rev. Microbiol. 32:593-636.
- 84) Raczynska-Bojanowska, K., Rafalski, A. y Ostrowska-Krysiak, B., 1970. Acta Biochimica Polonica. 17:331.
- 85) Ragan, C.M. y Vining, L.C., 1978. Can. J. Microbiol. 24:1012-1015.
- 86) Ramsey, H.H., Hussain, S.M. y Williams, R.P., 1973. Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. p. 180.
- 87) Redshaw, P. y cols., 1976. J. Bacteriol. 125:698-705.
- 88) Romero, J.G., 1981. Tesis. Facultad de Ciencias, UNAM.
- 89) Rossi, A. y Corcoran, J.W., 1973. Biochem. Biophys. Res. Comm. 50:597.
- 90) Roszkowsky, J. y cols., 1971. Acta Microbiológica Polónica. 3:97.
- 91) Sánchez, S.E. y Lara, F.N., 1978. Rev. Mex. de Ciencias Farm. 9:11-16.

- 92) Sánchez, S. y cols., 1980. *Adv. Biotechnol.* 111:147-154.
- 93) Sankaran, L. y Pogell, B.H., 1975. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 8:721-732.
- 94) Sanwal, B.D., Kapoor, M. y Duckworth, H.W., 1971. En: *Current Topics in Cellular Regulation.* 3:1-115.
- 95) Satoh, A., Ogawa, H. y Sotomwa, Y., 1976. *Agr. Biol. Chem.* 40:191-196.
- 96) Smith, R.L., Bungay, H.R. y Pittenger, R.C., 1962. *Appl. Microbiol.* 10:253-256.
- 97) Smith, C.G. y Hinman, J.W., 1963. *Prog. Ind. Microbiol.* 10:137-163.
- 98) Soltero, F.V. y Johnson, M.J., 1953. *Appl. Microbiol.* 1:52-57.
- 99) Stryer, L., 1980. *Biochemistry.* 2d. ed. W.H. Freeman, New York. pp
- 100) Umezawa, H., 1978. En: *Index of Antibiotics from Actinomycetes.* Japon Scientific Societies. Press Tokyo. 1:273-275.

- 101) Umezawa, H., 1978. En: Index of Antibiotics from Actinomyces. Japon Scientific Societies Press. Tokio. II:357-358.
- 102) Vanek, Z. y Majer, J., 1967. En: Antibiotics: Biosynthesis. D. Gottlieb y P.D. Shaw eds. Springer Verlag, Berlin. II:154-188.
- 103) Vázquez, D., 1981. Investigación y Ciencia. 62:130-144.
- 104) Wiley, P.K. y cols., 1957. J. Am. Chem. Soc. 79:6070.