

03072
7
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSTGRADO

"REGULACION POR NITROGENO DE LA
SINTESIS DE GENTAMICINA POR
Mioramona para purpurea NRRL-2953"

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

Presenta:

RINA MARIA GONZALEZ CERVANTES

México, D.F. 1993.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	3
Gentamicina (generalidades).....	6
Química.....	9
Fermentación.....	11
Biosíntesis de 2-deoxiestreptamina.....	14
Biosíntesis de las gentamicinas.....	17
Asimilación de Nitrógeno en Actinomicetos.....	23
Regulación ejercida por la fuente de nitrógeno, sobre la ... síntesis de antibióticos, producidos por actinomicetos....	31
Regulación catabólica por nitrógeno en la síntesis de antibióticos.....	34
Regulación nitrogenada en la síntesis de aminoglucósidos..	39
Regulación de la síntesis de gentamicina.....	45
Objetivo.....	50
Material y Métodos.....	51
Resultados y Discusión.....	56
Conclusiones.....	91
Recomendaciones.....	93
Referencias.....	95

REGULACION POR NITROGENO DE LA SINTESIS DE GENTAMICINA POR
Micromonospora purpurea NRRL-2953.

RESUMEN

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido, con un amplio espectro de actividad en contra de especies como *Proteus* y *Pseudomonas*. (Wagman y Weinstein, 1980).

Debido a la importancia de este antibiótico es crucial conocer los mecanismos que regulan su síntesis. Existen hasta la fecha pocos reportes sobre la regulación de este idiolito, y en este trabajo se presentan los últimos resultados obtenidos sobre la caracterización fisiológica del efecto de amonio sobre la síntesis de gentamicina en *Micromonospora purpurea*.

Islas, (1991) reportó una estimulación por amonio sobre la síntesis de gentamicina, utilizando en el medio de producción como fuente de nitrógeno entre otras a sulfato de amonio o cloruro de amonio. Se obtuvieron valores crecientes de producción al ir aumentando la concentración de amonio hasta 150 mM. A partir de estos antecedentes se procedió a probar al glutámico y a la glutamina como fuente de nitrógeno para poder establecer através de cual de estos dos productos de la asimilación de amonio en bacterias se ejerce de la estimulación de la síntesis del antibiótico en estudio.

En medio mínimo de producción con glutámico como única fuente de nitrógeno se obtienen los valores más altos tanto de producción volumétrica como de producción específica. Al utilizar a

metionina-sulfoximina un potente inhibidor de la enzima glutamino sintetasa el titulo del antibiótico disminuye, indicando que al afectar la síntesis de glutamina, se afecta también la síntesis del antibiótico. Sin embargo, cuando se utiliza glutamina, las células prefieren utilizarla para crecimiento que para producción. Esto podría estar indicando que al ser glutamina preferida como fuente de nitrógeno, éste se dirige hacia metabolismo primario, impidiendo la expresión del metabolismo secundario en este microorganismo. Estos resultados sugieren que se requiere de una concentración intracelular de glutamina óptima para que se lleve a cabo la formación de gentamicina, ya que este aminoácido parece ser el modulador del metabolismo del nitrógeno en *Micromonospora*.

Así mismo, al adicionar el precursor 2-deoxiestreptamina (DOS), para revertir el efecto que produjo metionina-sulfoximina se consiguieron niveles de gentamicina aún mayores que con el control sin adición del inhibidor, lo que indica que la célula soporta mayores niveles de producción de gentamicina así como que quizás la formación de DOS sea uno de los pasos limitantes en la vía de síntesis del antibiótico.

INTRODUCCION.

Dentro del uso de los antibióticos aminoglucósidos, ha habido un gran interés principalmente por gentamicina, debido a su espectro tan amplio de actividad en contra de especies como *Proteus* y *Pseudomonas*. Es incluso superior a neomicina y kanamicina tanto en espectro, como en seguridad. Es también superior a la colistina, la cual es inactiva en contra de organismos gram-positivos así como en contra de especies de *Proteus*. (Wagman y Weinstein, 1980). Su acción bactericida se lleva a cabo por la unión de las moléculas aminoglucosídicas a los ribosomas, inhibiendo así, la síntesis de proteínas (Davis, 1987).

Debido a la importancia de este antibiótico es crucial conocer los mecanismos que regulan su síntesis. Existen hasta la fecha pocos reportes sobre la regulación de este idiolo, y en el laboratorio donde se realizó este trabajo, se han generado algunos datos en cuanto a la regulación de gentamicina por fuente de carbono (Escalante y cols., 1992); también en cuanto a su regulación por fosfatos (Obregón, 1991), y sobre los efectos del amonio en la formación del mismo (Islas, 1991).

Los compuestos nitrogenados, pueden afectar la síntesis de los antibióticos directamente a nivel de metabolismo secundario. Ya sea a través de su disponibilidad como sustratos para las "sintetasas de los antibióticos", o a través de la modulación de la biosíntesis/actividad/estabilidad de estas enzimas. El control indirecto de la síntesis de antibióticos puede ser ejercido también, antes de que se produzca el metabolismo secundario, vía regulación nitrogenada del metabolismo primario que es el que

suministra los precursores de los productos secundarios. (Shapiro, 1989). Así pues, el intentar conocer como afecta la fuente de nitrógeno a la formación de este metabolito, nos podría resultar desde el sentido práctico muy beneficioso; ya que la recopilación de la información generada sobre la regulación de gentamicina nos podría dar la pauta para diseñar estrategias de optimización de la producción del idiolito.

Uno de los microorganismos productores de gentamicina es la *Micromonospora purpurea*, la cepa utilizada en este estudio fué *M. purpurea* NRRL-2953. Este microorganismo pertenece al grupo de los actinomicetos. Los actinomicetos son bacterias gram positivas que presentan diferenciación celular, y que además producen una gran variedad de metabolitos secundarios. Estas características propias del grupo los hacen muy interesantes desde el punto de vista industrial y científico. Dentro de los actinomicetos el grupo más estudiado ha sido el género *Streptomyces*, mientras que se han logrado avances muy significativos en el entendimiento de la organización genética de actinomicetos del género *Streptomyces*, que han resultado en el aislamiento y caracterización de numerosos genes involucrados en el metabolismo tanto primario como secundario, no existen virtualmente, datos disponibles concernientes a los genes que se originan del género *Micromonospora*; las rutas biosintéticas extremadamente complejas en este género como es el caso de la gentamicina en *M. purpurea*, han sido parcialmente caracterizadas desde el punto de vista

bioquímico, pero no se sabe si los genes responsables de la biosíntesis de este antibiótico están organizados y controlados de la misma manera como en *Streptomyces* (Kelemen, y cols., 1991). Así mismo, la fisiología de este organismo permanece relativamente poco definida, debido a dificultades en su cultivo en medios químicamente definidos, así como por su sensibilidad fisiológica al ambiente y su esporulación limitada; por lo que el progreso en el conocimiento del metabolismo ha sido muy lento. Se debe estimular pues, el desarrollo de estudios tanto fisiológicos como genéticos para actinomicetos que no sean *Streptomyces*. En este estudio, se reportan los resultados al investigar la cinética de producción de gentamicina, en cultivo en lote, utilizando ácido glutámico o glutamina como fuente de nitrógeno. Los resultados obtenidos hasta ahora indican que la síntesis de gentamicina se ve influenciada positivamente por el ácido glutámico hasta una concentración de 20 mM y que glutamina puede estar actuando como modulador del metabolismo en este microorganismo.

GENTAMICINA.

Los antibióticos aminoglucósidos, junto con los beta-lactámicos, tetraciclinas, y macrólidos; son los fármacos más utilizados en la quimioterapia antibacteriana. Durante las últimas décadas, se ha acumulado una tremenda cantidad de conocimiento en todo el mundo, en el área de investigación de nuevos aminoglucósidos con mayor potencia y menor toxicidad. Los enfoques principales en estas investigaciones son:

- 1) Técnicas convencionales en fermentaciones microbianas.
- 2) Métodos de biotransformación, incluyendo mutasíntesis.
- 3) Manipulaciones genéticas de los microorganismos productores.
- 4) Modificación química de los aminoglucósidos conocidos.
- 5) Investigación detallada en bioquímica-clínica de estos compuestos.

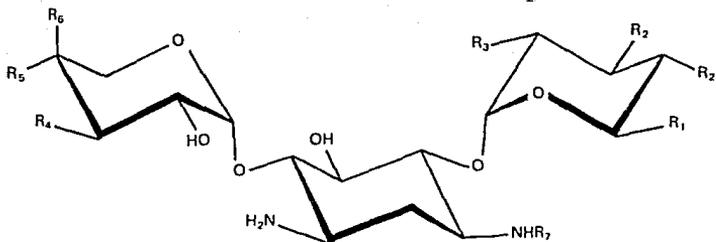
Los primeros descubrimientos en el área de los aminoglucósidos (estreptomina, 1943; neomicina, 1949; kanamicina, 1958) estaban relacionados casi exclusivamente con el género *Streptomyces*. En las últimas décadas, sin embargo, se aislaron nuevos aminoglucósidos, no solamente a partir de los llamados *Actinomycetales* raros, como la *Micromonospora*, sino también de diferentes tipos de microorganismos tales como *Bacillus*, *Corynebacterium*, y varias especies de *Pseudomonas*. Dos tercios del conocimiento actual, de aproximadamente 330 antibióticos del tipo aminoglucósido, se derivan de estas especies no-*Streptomyces* y casi la mitad de ellos fueron aislados de caldos de cultivo de

especies del género *Micromonospora*. Estos compuestos derivados de *Micromonospora* incluyen antibióticos muy importantes clínicamente como la gentamicina, sisomicina y fortimicina.

Actualmente se encuentran disponibles más de 20 aminoglucósidos para uso terapéutico o veterinario. Los aminoglucósidos más importantes, incluyen a la gentamicina, sisomicina, tobramicina, kanamicina, estreptomina, y sus derivados. La propia gentamicina comprende cerca de la mitad del total de ventas de los aminoglucósidos. (Bérdy y Járαι, 1986a).

El mecanismo de acción de este grupo de antibióticos ha sido estudiado más extensamente, y en más laboratorios, que cualquier otro grupo. Los resultados, en forma resumida, han revelado un grupo de efectos pleiotrópicos, de los cuales 4 parecen ser de especial importancia: bloqueo de los ribosomas, lectura equivocada para la síntesis de proteínas durante la traducción, producción de daños a la membrana y transporte irreversible del antibiótico. (Davis, B.D., 1987).

La gentamicina, es efectiva en contra de varias bacterias Gram-negativas incluyendo *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, algunas especies de *Proteus* y *Pseudomonas aeruginosa* con concentraciones mínimas inhibitorias de entre 0.06 y 8 µg/ml. Entre las bacterias sensibles Gram-positivas solamente *Staphylococcus aureus* es altamente sensible, la concentración mínima inhibitoria en contra de este organismo está entre 0.125 y 1 µg/ml. Otros organismos Gram-positivos que son susceptibles aunque en menor grado son: *Bacillus*, *Clostridium* y



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Gentamicin C ₁	X ₁	H	NH ₂	NHCH ₃	CH ₃	OH	H
Gentamicin C ₂	X ₂	H	NH ₂	NHCH ₃	CH ₃	OH	H
Gentamicin C _{12a}	CH ₂ NH ₂	H	NH ₂	NHCH ₃	CH ₃	OH	H
Gentamicin C _{12b}	X ₃	H	NH ₂	NHCH ₃	CH ₃	OH	H
Gentamicin C ₂₀ (sagamicin)	CH ₂ NHCH ₃	H	NH ₂	NHCH ₃	CH ₃	OH	H
Gentamicin B	CH ₂ NH ₂	OH	OH	NHCH ₃	CH ₃	OH	H
Gentamicin B ₁	X ₂	OH	OH	NHCH ₃	CH ₃	OH	H
Gentamicin X ₂	CH ₂ OH	OH	NH ₂	NHCH ₃	CH ₃	OH	H
G-418	X ₄	OH	NH ₂	NHCH ₃	CH ₃	OH	H
J1-20A	CH ₂ NH ₂	OH	NH ₂	NHCH ₃	CH ₃	OH	H
J1-20B	X ₃	OH	NH ₂	NHCH ₃	CH ₃	OH	H
TPJ-B1	X ₂	OH	NH ₂	NHCH ₃	CH ₃	OH	H
Gentamicin A	CH ₂ OH	OH	NH ₂	NHCH ₃	OH	H	H
Gentamicin A ₁	CH ₂ OH	OH	NH ₂	NHCH ₃	H	OH	H
Gentamicin A ₂	CH ₂ OH	OH	NH ₂	OH	OH	H	H
Gentamicin A ₃	CH ₂ NH ₂	OH	OH	NHCH ₃	H	OH	H
Gentamicin A ₄	CH ₂ OH	OH	NH ₂	NCHO CH ₃	OH	H	H

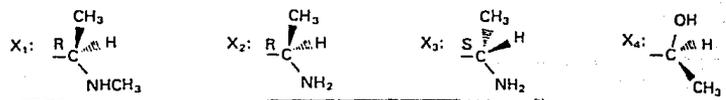


FIG. 1 Gentamicina y compuestos relacionados.
Fuente: Bérdy y Járal, 1986. (Fragmento)

Corynebacterium. *Listeria monocytogenes*, a concentraciones normales (entre 0.08 y 8 µg/ml) también puede ser inhibida (Weinstein y cols., 1967; Glasby, 1979).

QUIMICA.

Todos los antibióticos aminoglucósidos son pequeños relativamente (pesos moleculares de 300 a 700), son básicos, solubles en agua; y compuestos relativamente estables. Son antibióticos de amplio espectro, activos en contra de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas así como también de micobacterias. Su acción después de una administración parenteral en contra de patógenos Gram-negativos es su propiedad clínica más importante. Sin embargo, el uso prolongado de estos compuestos está restringido porque producen nefro y ototoxicidad (Bérdy J., y Járαι M., 1986a).

Ha habido un gran interés principalmente por gentamicina, debido a su espectro tan amplio de actividad en contra de especies como *Proteus* y *Pseudomonas*. Es incluso superior a neomicina y kanamicina tanto en espectro, como en seguridad. Es también superior a la colistina, la cual es inactiva en contra de organismos Gram-positivos así, como en contra de especies de *Proteus*. (Wagman & Weinstein, 1980).

El término aminoglucósido (o aminociclitol), se refiere a los compuestos que tienen una fracción (amino)ciclitol aglicona, unida con enlaces glucosídicos a varios azúcares y/o fragmentos de aminoazúcares. La molécula ciclitol tipo aglicona es un

derivado de inositol, o mas frecuentemente de estreptamina o fortamina; los cuales son derivados 1.3- y 1.4-diamino del ciclohexano, respectivamente.

Estos azúcares y aminoazúcares, muestran una variabilidad alta, desde las pentosas simples (xilosa), y aminoazúcares (2-aminoglucosa) a las aminoheptosas complicadas, tales como la garosamina, purpurosamina A, etc.

Los aminoglucósidos producidos por *Micromonospora* obtenidos por fermentación directa o por mutasíntesis, químicamente son pseudotrisacáridos (incluyendo algunos de sus derivados disacáridos, gentaminas).

La producción de los antibióticos del tipo de las gentamicinas, se realiza por varias especies de *Micromonospora*: *M. purpurea* NRRL-2953; *M. echinospora* NRRL-2985; *M. purpurea* var. *violacea* 75/5829; *M. purpurea* var. *luridus* KGO MNG-209. *M. echinospora* ssp. *ferruginea* NRRL-2995; *M. echinospora* spp. *pallida* NRRL-2996; *M. scalabitanana* var. *rubra* ATCC-31435; *M. scalabitanana* var. *sporogenes* ATCC-31436. Estas cepas, producen principalmente a la gentamicina en forma del complejo C (componentes C1, C2, C1a y C2a), junto con numerosos componentes menores incluyendo a las gentamicina C2b (sagamicina), A, B, X2 y G-418. (Ver figura de gentamicina y compuestos relacionados). (Bérdy y Járαι, 1986a).

El complejo gentamicina C, puede ser separado por cromatografía en capa fina, en columna y/o papel en sus tres principales componentes, viz. gentamicinas C1, C2, y C1a. Byrne y cols., (1977), llegaron a la conclusión de que el complejo de

gentamicina C, consiste de una mezcla de cinco compuestos activos biológicamente, viz. gentamicinas C1a, C2, C2a, C2b, y C1. Los componentes C2a y C2b son los menores en concentración, comprendiendo apenas el 4% de la mezcla de componentes. Todos éstos componentes del complejo C, difieren uno del otro en el grado de metilación y estereoquímica de la posición del carbono 6'.

FERMENTACION

A escala industrial, la gentamicina C es producida por *M.purpurea* NRRL-2953 y sus mutantes. Se han reportado otras cepas que también se utilizan como productoras de gentamicina a escala industrial como: *M. purpurea* var. *nigrescens*, *M. purpurea* var. *violacea*, *M. purpurea* ssp. *luridus*, así como también *M. scalabitan* (Bérdy y Járαι, 1986b) .

Para mantener y seleccionar las cepas productoras de gentamicina se utiliza un medio sólido convencional e.g., del tipo Czapek-Dox. El medio para inóculo, tanto para el laboratorio como para la industria, contiene harina de soya con licor de maíz o extracto de levadura como fuente de nitrógeno, y dextrina o sacarosa como fuente de carbono principal. El cultivo se lleva a cabo de 28 a 35°C durante 2 a 3 días. (Bérdy y Járαι, 1986b).

El medio de producción para la fermentación de gentamicina contiene generalmente del 12 al 14% de sólidos. La fuente de carbono es almidón, almidón hidrolizado, jarabe de maíz, u otros materiales disponibles comercialmente, solos o como mezcla. La glucosa puede ser usada en el medio de producción en cantidades

menores al 1%, debido a que concentraciones más altas en el caso de algunas cepas de *M. purpurea* puede reprimir la vía biosintética de la gentamicina C. (Escalante y cols., 1992).

La fuente de nitrógeno principal, usualmente es harina de soya y ocasionalmente licor de jarabe de maíz, extracto de levadura, semilla de algodón (Pharmamedia). Como fuente de nitrógeno inorgánico adicional, se utiliza de 0.3 a 0.7% de sales de amonio, de preferencia sulfato de amonio. Se debe enfatizar el uso de iones de cobalto Co^{++} en el medio de producción, una cantidad óptima va de 0.6 a 1.8 ppm, ya que las reacciones de metilación durante la biosíntesis son catalizadas por enzimas con co-enzimas que contienen cobalto. La fermentación de gentamicina a escala industrial, debe ser llevada a cabo de 33 a 35°C, con agitación de 80 a 120 rev/min y una aereación de 0.5 a 0.8 v/v de seis a siete días. El nivel máximo de producción que se ha alcanzado con *M. purpurea* spp. *luridus* después de 144 horas de fermentación, ha sido de 1900 µg/ml.

Las dificultades tecnológicas principales durante el proceso de fermentación surgen de una disminución significativa del coeficiente de transferencia de oxígeno ($K_L a$) debido a que, la viscosidad aparente del caldo de fermentación pseudoplástico (no-Newtoniano), aumenta de 800 a 1200 cP, causando una disminución considerable de la velocidad de disolución del oxígeno. La biosíntesis de gentamicina en general, y la relación de los componentes de la gentamicina C, depende en mucho de la concentración de oxígeno disuelto en el caldo. Para reducir la viscosidad, y así aumentar la concentración de oxígeno

disuelto, se puede diluir el caldo con varias porciones de agua de aproximadamente 30 a 40% del volumen total.(Bérdy y Járαι, 1986b).

BIOSINTESIS DE GENTAMICINA.

Biosíntesis de 2-deoxiestreptamina.

La síntesis de gentamicina, así como de otros aminoglucósidos clinicamente importantes como neomicina, kanamicina, sisomicina y sagamicina; se forman a partir de glucosa, para dar como resultado el primero de los componentes de los pseudosacáridos: 2-deoxiestreptamina (DOS).

Rinehart y cols., (1976), utilizando técnicas de competencia isotópica, con supuestos precursores marcados con ^{14}C -, ^{13}C - en estudios realizados con *Streptomyces fradiae*, productor de neomicina; postularon una ruta biosintética, a partir de glucosa; en la que se produce una oxidación y aminación inicial, en el C-3 del anillo aminociclitol (el cual proviene del C-5 de la glucosa), seguido de reacciones similares en el C-1 del anillo (el cual proviene el C-1 de la glucosa). Así mismo, Kase y col., (1980), lograron aislar un compuesto intermediario en la síntesis de DOS, producido por una mutante DOS- de *Micromonospora sagamiensis*, este compuesto denominado 2-deoxi-scyлло-inosamina (DOI) sufre una aminación para formar DOS. A partir de estos datos, se propuso la vía de síntesis de DOS: (Ver figura, biosíntesis de DOS).

-Aminación de la deoxi-inososa (1), rindiendo deoxi-inosamina (2) (reacción I),

-Conversión de la deoxi-inosamina a 2-deoxiestreptamina (4) (reacción II+III),

-Desaminación de 2-deoxiestreptamina rindiendo probablemente aminodeoxi-inososa (3) (reacción III').

Estudios relativamente recientes, realizados por Kakinuma y colaboradores (1989), utilizaron técnicas de análisis con deuterium marcado ^2H NMR; proponiendo el mecanismo por el cual la deoxi-inososa se forma a partir de D-glucosa al principio de la biosíntesis de DOS: Primero, demostraron que ambos hidrógenos del grupo hidroximetilo del C-6 de D-glucosa, son incorporados estereoespecíficamente en la posición C-2 de DOS; y segundo, que D-glucosa, o su derivado 6-fosfato, es convertida en un intermediario del tipo enol o enolato por una enzima del tipo liasa, y entonces éste intermediario se cicliza por una reacción aldol a 2-deoxi-scyllo-inososa. Estos investigadores sugieren que esta es una reacción análoga a la que cataliza la enzima deshidroquinato-sintasa para formar deshidroquinato a partir de ácido 3-deoxi-arabino-heptulosónico 7-fosfato en la vía de shikimato.

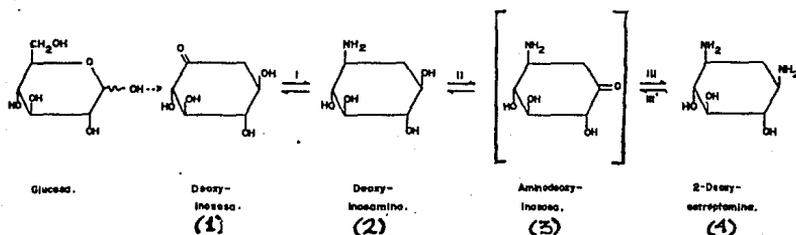


FIG. 2 Ruta propuesta para 2-deoxiestreptamina
Fuente: Suzukake y cols., 1985.

Se conoce muy poco de las propiedades de las reacciones enzimáticas, que se llevan a cabo durante la síntesis de 2-deoxiestreptamina, Chen y Walker, (1977), propusieron que los dos grupos amino de éste compuesto posiblemente se derivan de L-glutamina, y especularon que se trataba de una sola aminotransferasa la que catalizaba ambas aminaciones en la vía, sin embargo en ese entonces no lograron probarlo.

Suzukake y cols., (1985), utilizaron extractos de *S. fradiae* para catalizar 3 reacciones que están incluidas en la vía de síntesis propuesta: la aminación de la deoxi-inososa, para formar deoxi-inosamina, la conversión de deoxi-inosamina a 2-deoxiestreptamina y la desaminación de 2-deoxiestreptamina. Según sus resultados, glutamina fue muy efectivo como el donador amino para ambas reacciones de transaminación, aunque para la segunda reacción, glutámico resultó igual de efectivo. La conversión de deoxi-inosamina a 2-deoxiestreptamina, presumiblemente incluye reacciones de deshidrogenación y transaminación sucesivas en la posición 1, las cuales fueron estimuladas por NAD⁺.

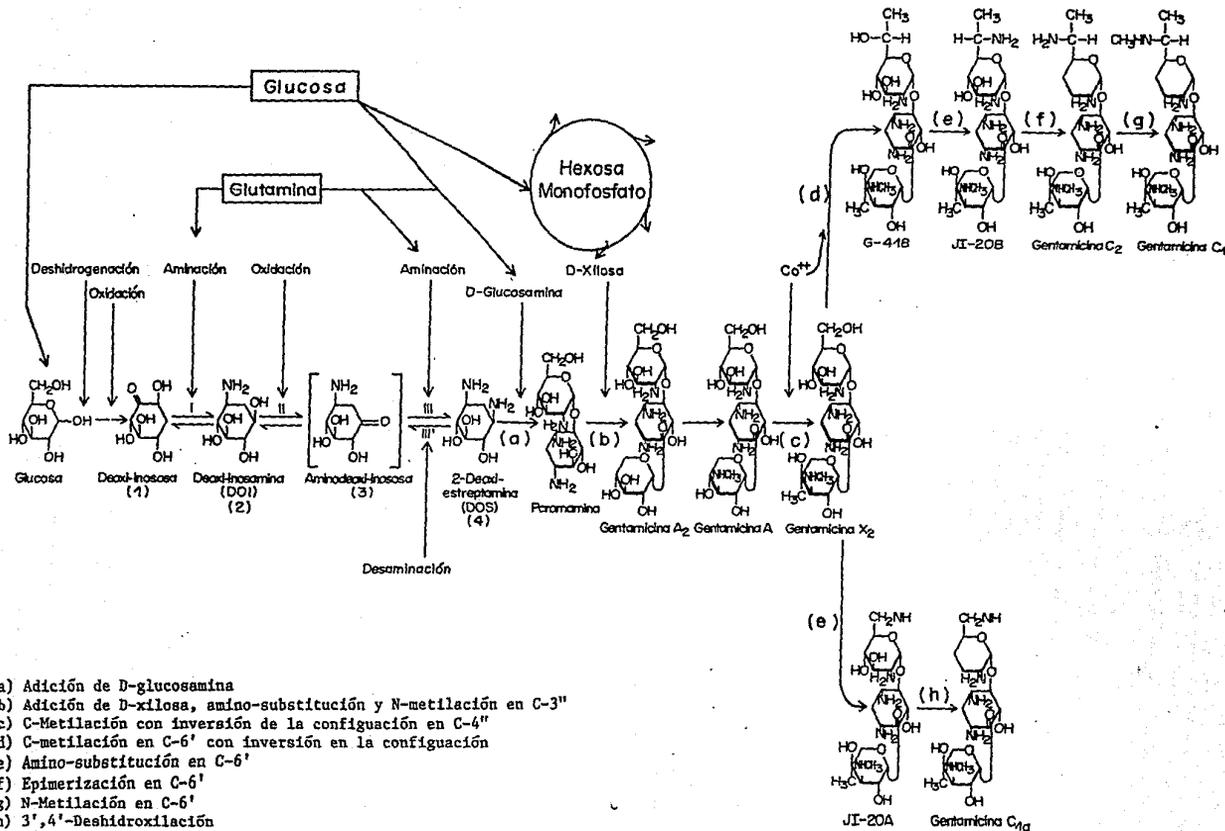
Lucher y cols., (1989), realizaron también estudios encaminados a entender las reacciones enzimáticas que conducen a la síntesis de DOS, y utilizando a *M. purpurea*; obtuvieron extractos dializados para determinar si estas transaminaciones eran catalizadas por una sola aminotransferasa o por enzimas múltiples. De este modo, lograron purificar y caracterizar a la enzima L-glutamina:Ceto-*scyllo*-inositol-aminotransferasa. Esta enzima fué purificada de 130 a 150 veces, a partir de

micelio cosechado en fase logaritmica tardia, tanto de la cepa silvestre como de un idi6trofo 2-deoxiestreptamina-menos de *M. purpurea*. Se encontr6 que la enzima est6 fuertemente unida al cofactor fosfato de piridoxal, y se demostr6 su participaci6n en la reacci6n de transaminaci6n. El donador amino principal para la enzima, parece ser L-glutamina; el alfa-ceto-6cido derivado de glutamina se identific6 como alfa-ceto-glutamato, indicando que es el grupo alfa amino de glutamina el que participa en la transaminaci6n. Se encontr6 pues, en los extractos crudos actividad de omega-amidasa la cual puede provocar que las reacciones de transaminaci6n con glutamina sean irreversibles *in vivo*. Se encontr6 tambi6n que la especificidad de la enzima por el sustrato esta restringida a deoxiciclitoles, monoaminociclitoles, y diaminociclitoles; glutamina, y 2-cetoglutamato, lo cual contrasta con la especificidad mas amplia de aminotransferasas de mamiferos. La aparici6n de la enzima en la fase logaritmica tardia, concuerda con su estrecha especificidad, y esto indica que su participaci6n es predominante en la sintesis de DOS m6s que en el metabolismo en general.

Biosintesis de las gentamicinas.

Los primeros investigadores que propusieron la secuencia de la ruta de biosintesis de gentamicina, fueron Testa y Tilley en 1976. Ellos elucidaron la via, mediante estudios de bioconversi6n en sistemas de c6lulas en reposo y analizando cromatogr6ficamente los productos. Demostraron que los compuestos menores que se producian durante la fermentaci6n de este antibi6tico (A, A1, B, X2, G-418, JI-20A y JI-20B), podrian ser convertidos a las

FIGURA 3
VIA DE BIOSINTESIS DE GENTAMICINA



- a) Adición de D-glucosamina
 b) Adición de D-xilosa, amino-sustitución y N-metilación en C-3''
 c) C-Metilación con inversión de la configuración en C-4''
 d) C-Metilación en C-6' con inversión en la configuración
 e) Amino-sustitución en C-6'
 f) Epimerización en C-6'
 g) N-Metilación en C-6'
 h) 3',4'-Deshidroxilación

Síntesis de otros intermediarios

- * Formación de gentamicina C_{2a} estereoisómero de C₂
 Metionina es el donador de los grupos metilo en las reacciones de C y N metilación.

Fuente: Escalante, 1988.

gentamicinas por una mutante de *M. purpurea* incapaz de producirla, ya que acumulaba paromamina. Posteriormente, Kase y cols., (1982) y Odakura y cols., (1983) realizaron estudios en los que también utilizaron mutantes bloqueadas de *M. purpurea* y *M. sagamiensis*. Estas mutantes eran capaces de acumular diferentes intermediarios de la vía biosintética de gentamicina y sagamicina respectivamente. Ellos propusieron algunas modificaciones sobre la secuencia y enzimas involucradas: (Ver figura de vía de síntesis de gentamicina).

a) Una vez que se ha formado el anillo aminociclitol, la biosíntesis de gentamicina se inicia con la condensación de D-glucosamina a esta molécula, dando lugar a la formación del disacárido denominado paromamina.

b) La incorporación posterior de una molécula de D-xilosa a este compuesto da origen a la gentamicina A, siendo en este paso en el que se integran las subunidades básicas que darán origen a las gentamicinas.

c) Ya integrado este compuesto es C-metilado en la posición del carbono 4' y una epimerasa invierte su configuración, lo cual da lugar a la conversión de gentamicina A, a gentamicina X2.

A partir de este intermediario, la vía de biosíntesis prosigue por dos rutas:

d) La primera conduce al antibiótico G-418, esta reacción se lleva a cabo por acción de una metilasa, la cual introduce un metilo en el carbono 6' de la gentamicina X2, (C-metilación) y una epimerasa invierte posteriormente su configuración.

La segunda conduce a la síntesis del antibiótico JI-20A, por una reacción de aminosustitución en el carbono 6'.

e) El antibiótico G-418 forma a su vez, el antibiótico JI-20B por amino-sustitución del carbono 6'; las reacciones involucradas en la conversión de gentamicina X2 al antibiótico JI-20A y del antibiótico JI-20B, puede que sean catalizadas por una sola enzima. Una segunda 3', 4' deshidroxilación, efectuada probablemente por la misma enzima que da origen a la formación de gentamicina C1a, convierte al antibiótico JI-20B en gentamicina C2a.

f) A su vez, la gentamicina C2a, es epimerizada en C-6' dando como resultado la formación de gentamicina C2, segundo metabolito activo del complejo; se ha demostrado que este paso es reversible.

g) La reacción que continúa, conduce a la conversión de gentamicina C2 a gentamicina C1, por acción de una metilasa la cual introduce un grupo metilo en el carbono 6' de la molécula, dando así origen al segundo componente de este antibiótico.

h) La última reacción es una deshidroxilación en los carbonos 3' y 4' convirtiendo al antibiótico JI-20A, en gentamicina C1a el tercero de los componentes activos del complejo de gentamicina.

Se ha demostrado, que el ión Co^{++} , tiene un efecto significativo en la producción de X2 y G-418. Supuestamente la C-metilación en la posición 6' y 4' (pasos c y d), dependen del ión Co^{++} , tanto en *M. purpurea* (reportado por Testa y Tilley, 1976); como en *M. sagamiensis* (Kase y cols., 1982 y Odakura y cols., 1983).

Hay que notar en la descripción del paso de un intermediario a otro, que no se han podido aislar todos los intermediarios involucrados en la ruta propuesta.

En cuanto a las reacciones de metilación, Lee y cols., (1976), utilizaron aminoácidos marcados para identificar al precursor que donaba los grupos metilo. L[-metil ^{14}C -metionina] fué el que produjo una mayor marca en el antibiótico. La distribución de la marca entre los diferentes componentes del antibiótico, varió en el orden de aparición de los mismos, con respecto al tiempo. Esto puede indicar que las reacciones que se llevan a cabo de un intermediario a otro son reversibles.

En conclusión con respecto a la vía de síntesis de gentamicina, podemos señalar que durante el proceso de formación del antibiótico, están involucrados diferentes tipos de reacciones hasta ahora identificadas. Las reacciones al menos son:

- transmetilación, ya sea C-metilación y/o N-metilación. (Podría ser que estas metilaciones fueran dadas, primero por oxidación del grupo metilo del aminoácido, para ser reutilizados biosintéticamente en la síntesis *de novo* de los compuestos). (Lee y cols., 1976).
- transaminación
- deoxigenación
- transglicosilación
- deshidrogenación
- epimerización
- deshidroxilación

De todas estas reacciones, solo las concernientes a la aminación y deshidrogenación de DOS, son las que han sido estudiadas y caracterizadas (Walker y cols., 1977, Susukake y cols., 1985; y Lucher y cols., 1989), quedando pendiente el estudio de las enzimas del resto de la vía, así como la identificación de cada uno de los intermediarios.

El poder llegar a conocer y caracterizar a las enzimas que intervienen en esta biosíntesis, nos facilitaría en mucho, el estudio de la regulación de la síntesis de este antibiótico tan interesante, comercial y académicamente.

ASIMILACION DE NITROGENO EN ACTINOMICETOS.

Como se mencionó en la introducción, el grupo de actinomicetos mas estudiado es el de *Streptomyces*, por lo que los datos de asimilación de amonio que se han reportado para este género son los que mencionaremos aquí. Aún así, y a pesar de que han sido motivo de diferentes estudios, las enzimas y las vías responsables de la síntesis de muchos metabolitos primarios no ha sido descrita, y los mecanismos que regulan el metabolismo tanto del carbono como del nitrógeno no están muy entendidos (Fisher, 1988).

La falta de conocimiento acerca de la fisiología es un obstáculo ya que el metabolismo primario claramente influye sobre el metabolismo secundario. En primer lugar porque los sustratos de las enzimas biosintéticas del metabolismo secundario son metabolitos primarios. Las investigaciones han demostrado que la producción de los metabolitos secundarios puede ser elevada al incrementar el suministro de los precursores metabólicos. Así, un entendimiento en la fisiología básica de los actinomicetos podría facilitar la elección de estrategias para aumentar la producción de los metabolitos secundarios, ya sea por manipulación genética de cepas o por la elección del medio de cultivo apropiado. En segundo lugar, la producción de los metabolitos secundarios puede llegar a darse por limitaciones nutricionales. La identificación de los mecanismos que regulan el metabolismo de carbono y nitrógeno nos daría información sobre las estrategias que los microorganismos usan para alterar la expresión genética durante

la limitación de nutrientes. Además, estos estudios pueden proveer una ayuda para el estudio de mecanismos que activan la síntesis de las enzimas biosintéticas del metabolismo secundario durante limitaciones del crecimiento. (Fisher, 1988).

METABOLISMO NITROGENADO EN BACTERIAS ENTERICAS.

Ya que las vías involucradas en el metabolismo nitrogenado y la regulación de estas vías están mejor entendidas en bacterias entéricas, puede ser útil revisar el metabolismo nitrogenado en estos microorganismos. Las bacterias entéricas en medio definido utilizan glucosa como la fuente preferida de carbono, y amonio como la fuente preferida de nitrógeno. Bajo estas condiciones de crecimiento, los grupos nitrogenados para el metabolismo intermediario se derivan de glutámico (glt) y glutamina (gln) como se ilustra en la figura 4 (Tyler, 1978; Brown, 1980; Fisher, 1988). Todo el nitrógeno celular para la síntesis de macromoléculas se deriva del grupo amido de glutamina, el grupo amino de glutámico, o directamente de la incorporación de amonio. El glutámico provee el nitrógeno para la síntesis de la mayoría de los aminoácidos, mientras que la glutamina provee el nitrógeno para la síntesis de purinas, pirimidinas, amino azúcares, histidina, triptofano, asparagina, NAD y el paraminobenzoato (fig. 4).

Cuando crecemos a las bacterias entéricas en medio con una concentración alta de amonio (más alta que 1 mM), tanto glutamina como glutámico pueden ser sintetizados directamente a partir de

PROTEINAS, PURINAS, PIRIMIDINAS, NAD,
AMINO-AZUCARES, HISTIDINA, ASPARAGINA, ETC..

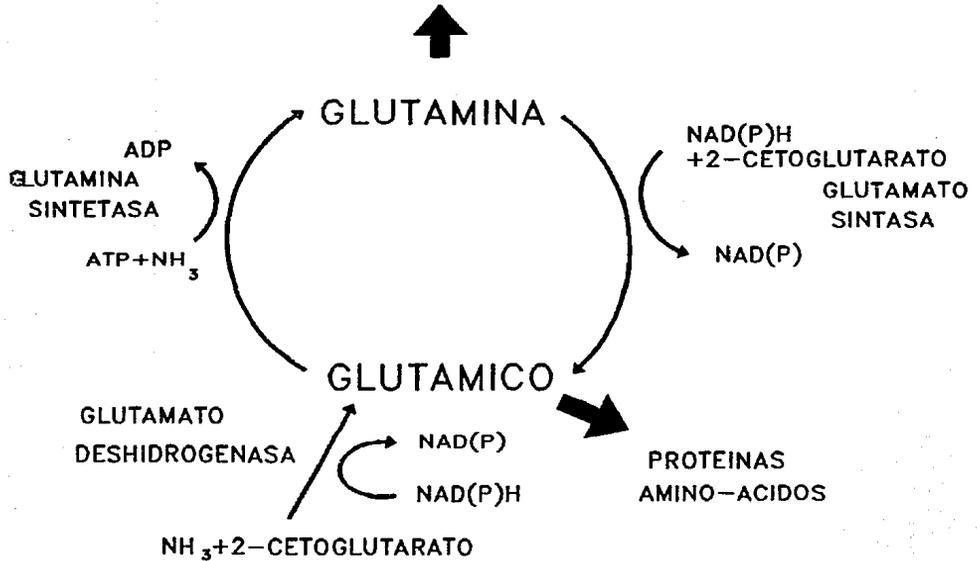


FIG. 4 Vías de Asimilación de Amonio.

Fuente: Fisher, 1988.

amonio. Las enzimas responsables para esta síntesis son respectivamente, glutamino sintetasa (GS) y glutamato deshidrogenasa (GDH), ver figura 4. En contraste, cuando las bacterias entéricas son crecidas en medio donde los niveles del amonio son bajos, i.e., menos de 0.1 mM, solamente la glutamina se sintetiza a partir de amonio. Durante el crecimiento en "bajas" de amonio, el glutámico no puede ser sintetizado por GDH, debido a que su Km por amonio es alto. El glutámico es sintetizado entonces, a partir de glutamina por la enzima glutamato sintasa (GOGAT) (fig. 4). Así, durante el crecimiento en medio con bajas concentraciones de amonio, la actividad de GS se requiere para la síntesis de glutamina y la asimilación de amonio en metabolitos celulares.

La GS es esencial para la síntesis de glutamina ya que mutantes deficientes en GS requieren glutamina para crecer en cualquier fuente de nitrógeno. Las mutantes deficientes en GOGAT requieren glutámico solo cuando se crece al microorganismo en concentraciones bajas de amonio. Y las mutantes GDH menos no tienen un fenotipo que se logre detectar.

Las bacterias entéricas pueden crecer en fuentes de nitrógeno alternativas, por ejemplo, arginina, histidina y urea; éstas pueden ser degradadas a amonio y/o glutámico.

La síntesis de muchas de estas enzimas así como de los sistemas de transporte específicos, se desreprimen durante el crecimiento en un medio limitado de amonio por el sistema Ntr (nitrogen regulated system) (Magazanik, 1982). Este sistema se encontró al aislar mutantes pleiotrópicas, defectuosas en la expresión de las

enzimas que degradan fuentes de nitrógeno alternativas, así como en GS. Estudios posteriores mostraron que el sistema Ntr, es una red global que activa la expresión de muchos productos genéticos involucrados en el metabolismo del nitrógeno durante una limitación en amonio.

Síntesis de Glutamina en *Streptomyces* y otros Actinomicetos.

La síntesis de glutamina es muy regulada tanto en bacterias entéricas como en *Streptomyces*, esta regulación se da a dos niveles:

- 1) La síntesis de GS debe estar regulada debido a que se han encontrado diferentes niveles de la enzima en extractos celulares crecidos con varias fuentes de nitrógeno. La regulación en la síntesis de GS durante el crecimiento exponencial ha sido demostrada en *S. cattleya*, *S. clavuligerus* y *S. coelicolor*.
- 2) En bacterias entéricas la actividad de GS, está regulada por la unión o enlace covalente del grupo adenilil. La adenilación de la enzima ha sido demostrada en *S. cattleya* y *S. coelicolor* (Fisher and Wray, 1989).

En bacterias entéricas, la inactivación de la actividad de GS por adenilación previene desvalances metabólicos durante cambios repentinos en la disponibilidad de amonio.

En *Streptomyces* parece suceder algo similar ya que cuando se adiciona amonio a células de *S. cattleya*, en condiciones de GS desreprimida, se presenta una inactivación rápida de la GS por adenililación (Streicher y Tyler, 1981). Aunque el mecanismo de regulación de este sistema no está bien entendido en *Streptomyces*.

En bacterias entéricas, está regulada por un sistema en cascada, que responde a la relación intracelular de glutamina con respecto a cetoglutarato.

La estructura física de la GSI purificada en *S. cattleya*, es similar a la de *E. coli* y *Bacillus subtilis*: es una enzima dodecamérica compuesta de subunidades idénticas con un peso molecular de 55,000. La caracterización de la enzima GSI de *Frankia* sp. cepa Cp11 sugirió que esta enzima es parecida al dodecámero con subunidades de 59 KDa. Esta cepa crecida en cultivos con una fuente de nitrógeno pobre, como N₂ o glutámico presenta otra enzima GS (GSII) sumamente activa y sensible al calor; y la GSI se encuentra con una actividad muy baja, bajo estas condiciones. La GSII es inhibida por glutamina, otros amino ácidos y por carga energética baja, no se ha encontrado evidencia de una regulación por adenilación para esta enzima. La GSII de *Frankia*, es parecida a la GSII encontrada en miembros de la familia *Rhizobiaceae*. (Schultz y Benzon, 1990).

En *S. coelicolor*, el gen estructural para GS (*glnA*) ya ha sido clonado y secuenciado, la subunidad de la enzima GSI en este microorganismo, también es de 55 kDa. La secuencia de aminoácidos sorprendentemente es más parecida a la proteína GS de bacterias Gram negativas que a las de otras bacterias Gram positivas como *B. subtilis* y *Clostridium acetobutylicum* (Fisher, 1988; Fisher, 1992).

Recientemente se ha clonado DNA del gen *glnII* que codifica para una enzima del tipo GSII tanto en *S. hirsopicus* como en *S. viridochromogenes*. Se cree que el gen *gln II* pudiera estar

presente en el cromosoma de varias cepas de *Streptomyces*, ya que se ha demostrado que existen secuencias que hibridizan con este gen realizadas por la técnica de Southern. El papel o la función de la GSII en el metabolismo de *Streptomyces* no está claro. Aunque los genes para *glnII* que se han clonado se han podido expresar en plásmidos de *Streptomyces*, esta expresión no ha sido analizada todavía y no se han purificado enzimas del tipo GSII de cualquier otra cepa de tipo silvestre de *Streptomyces* (Fisher, 1992).

En el caso de *S. clavuligerus* mutantes aisladas sin actividad GS, requieren glutamina para crecer en todas las fuentes de nitrógeno. Esto demuestra que GS es esencial en la síntesis de glutamina y que la vía GS-GOGAT es la principal para asimilar amonio (Braña y cols., 1986).

Síntesis de glutámico en *Streptomyces*.

Se han detectado actividades tanto de GOGAT, como de GDH en extractos celulares de *S. venezuelae*, *S. noursei*, *S. fradiae* y *S. coelicolor*. En *S. fradiae*, se encontraron dos formas distintas de glutamato deshidrogenasa (GDH); una GDH utiliza a NAD como coenzima, la otra usa NADP. El nivel intracelular de ambas enzimas está fuertemente regulado por la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo (Vancurová y cols., 1989). En *S. clavuligerus*, sólo se ha detectado actividad de GOGAT, ya que mutantes sin GOGAT requieren de glutámico o de aminoácidos cuyo catabolismo resulte en la formación de glutámico, ya sea por transaminación (aspartato, asparagina, lisina), o como un producto de degradación (glutamina, arginina, prolina, histidina)

para crecer en cualquier fuente de nitrógeno. Parece ser que GOGAT es la única enzima involucrada en la producción de glutámico en esta bacteria (Brafía y cols., 1986).

En *S. coelicolor*, en cambio, las mutantes sin GDH y sin GOGAT, son similares a las de bacterias entéricas: la cepa mutante sin GOGAT crece sólo sin glutámico en concentraciones altas de amonio y las mutantes sin GOGAT y sin GDH requieren glutámico para crecer (Fisher, 1989). La actividad de GDH, es inducida por altos niveles de amonio en *S. venezuelae* y en *S. coelicolor*. En *S. venezuelae* la GDH se reprime en fuentes que son pobre en nitrógeno. y en *S. coelicolor* y *S. clavuligerus*, la GDH es insensible a la fuente de nitrógeno utilizada en el medio de cultivo (Fisher, 1988).

Se conoce muy poco de la estructura física de GDH y GOGAT en *Streptomyces*, aunque GOGAT se ha purificado de *Nocardia mediterranei* y es similar a las de otras bacterias; es un complejo de flavoproteínas con 2 subunidades distintas. En *S. fradiae* se aisló la enzima GDH que depende de NAD y de NADP, ésta última tiene baja afinidad por amonio.

Como vía alternativa de asimilación de amonio, se ha detectado también en algunos microorganismos actividad de la enzima alanino deshidrogenasa (ADH), en el caso de *S. clavuligerus*, esta enzima es inducida por amonio y alanina; sin embargo no es esencial para la asimilación de amonio ya que mutantes sin ADH crecen similar a la cepa silvestre (Brafía y cols., 1986). Se ha detectado también en *S. noursei* y *S. venezuelae*.

REGULACION EJERCIDA POR LA FUENTE DE NITROGENO, SOBRE LA SINTESIS DE ANTIBIOTICOS, PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS.

La influencia de los diferentes componentes del medio de cultivo, en la biosíntesis de metabolitos secundarios, en particular antibióticos; es un fenómeno bien reconocido. Cambios en el tipo y/o concentración de la fuente de carbono (Demain y colaboradores, 1979), fuente de nitrógeno (Grafe 1982) y fosfatos (Martín 1989); tienen un efecto muy fuerte en la producción de estos compuestos. Aharonowitz (1980), menciona en sus estudios que de hecho, existe una correlación entre la capacidad de un microorganismo dado para sintetizar una molécula de antibiótico y el estado fisiológico del cultivo con respecto al metabolismo del nitrógeno.

Como veremos mas adelante, existen numerosos ejemplos de como la fuente de nitrógeno puede actuar sobre la síntesis de un antibiótico en particular, ya sea directa o indirectamente. Existen diferentes niveles desde los cuales el nitrógeno puede estar controlando la producción del metabolito de interés, aunque el mecanismo exacto de acción de las diversas fuentes de nitrógeno, ha sido investigado en contadísimos casos.

Coincidiendo con Braña & Demain (1988), en la mayoría de los casos los estudios han tratado de correlacionar la cantidad de antibiótico producida con las condiciones nutricionales utilizadas. Esta información nos da algunos lineamientos en cuanto a la optimización de la producción del producto deseado, sin embargo no nos revela el o los mecanismos regulatorios

responsables de los efectos. El principal problema es que los volúmenes producidos de cada antibiótico en cuestión, están en función del crecimiento celular y productividad, que a su vez, es un reflejo de todos los factores involucrados; tales como:

- Formación y actividad de las enzimas que participan en la síntesis del antibiótico.
- Transporte y/o asimilación de la fuente de nitrógeno utilizada.
- Biosíntesis y regulación del metabolismo primario que alimenta al secundario.
- Recambio de proteína en la célula.

La importancia relativa de cada uno de estos factores puede ser diferente en cada caso, y los cambios en las condiciones nutricionales pueden tener efectos opuestos en alguno de los determinantes mencionados.

Uno de los niveles desde el cual el nitrógeno ejerce su influencia es a través de la modulación del crecimiento y el metabolismo primario de la célula. Existe una relación estrecha entre la nutrición, la velocidad de crecimiento del microorganismo y el metabolismo primario y secundario. Shapiro (1989), menciona que la relación entre la trofofase e idiofase varía de organismo a organismo, y de una condición de cultivo a

otra; así, el metabolismo secundario puede estar acoplado a la fase de acumulación de biomasa, o puede estar supeditado a que el crecimiento se detenga y el cultivo llegue a fase estacionaria. Los factores responsables de que la célula atraviese por metabolismo primario y/o secundario, no han sido definidos con precisión.

La biosíntesis de cualquier molécula antibiótica, puede ser dividida arbitrariamente en dos procesos secuenciales:

- 1) Síntesis de metabolitos primarios, los cuales son los bloques de construcción del antibiótico y,
- 2) Las reacciones específicas, que son únicas del metabolismo secundario, y que resultan en la síntesis de un compuesto o una familia de compuestos relacionados con actividad antibiótica.

La primera parte de la secuencia implica competencia entre el metabolismo primario y secundario, ya que los metabolitos pueden ser utilizados ya sea para crecimiento y mantenimiento del microorganismo productor o ser dirigidos hacia la síntesis de un compuesto cuyo significado biológico no se conoce en la mayoría de los casos. (Braña & Demain, 1988). Como consecuencia, no se puede esperar que se sobreproduzca el antibiótico, a menos que; encontremos la forma de desbalancear el metabolismo microbiano y evitar la regulación del metabolismo primario que evita gastar energía y moléculas necesarias para el crecimiento.

Cuando en un medio de cultivo se provee en abundancia nutrientes que son fácilmente metabolizables y condiciones favorables de crecimiento (temperatura, agitación, viscosidad, etc.), los cultivos de tipo silvestre alcanzan velocidades de crecimiento

máximas, canalizando virtualmente todos sus recursos hacia la producción de biomasa. Si crecemos a las células en condiciones subóptimas, aunado a una situación en la cual el microorganismo esté expuesto a una cantidad del nutriente mucho mayor del que pudiera convertir a biomasa por unidad de tiempo, algunas de las pozas intracelulares de algunos metabolitos primarios podrían llegar a ser mas que adecuados para los requerimientos del crecimiento. En este caso, la diversificación de algunos metabolitos primarios hacia la producción de sustancias no esenciales para el crecimiento, podría ser tolerada o incluso deseable como medio de ajuste de los tamaños de las pozas. Este "sobreflujo de metabolitos", puede ser excretado simplemente, o puede ser utilizado para la síntesis de productos secundarios. En este último caso, presentándose velocidades de crecimiento suficientemente lentas y en presencia del sustrato en exceso, la idiofase podría coincidir con la trofofase (Shapiro,1989).

REGULACION CATABOLICA POR NITROGENO EN LA SINTESIS DE ANTIBIOTICOS.

Lo común en los reportes de regulación por fuente de nitrógeno sobre la síntesis del antibiótico, es encontrar resultados que indican una supresión de la producción del metabolito a diferentes concentraciones de amonio o de fuentes de nitrógeno que conduzcan a una acumulación de amonio intracelular. En la tabla que se presenta en la siguiente página, se enlistan los

ANTIBIOTICOS PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS CUYA SINTESIS ES INTERFERIDA POR SALES DE AMONIO

ANTIBIOTICO	MICROORGANISMO	REFERENCIA
Actinorrodina	<u>Streptomyces coelicolor</u>	Doull, JL y Vining, LC 1990.
Antraciclinas	<u>S. peucetius</u>	*
Avermectinas	<u>S. avermitilis</u>	Chermenskii, DN y cols., 1991.
Bialafos	<u>S. hygrosopicus 155</u>	Chipeva y cols., 1991.
Cefamicina C	<u>S. cattleya</u> <u>S. clavuligerus</u> <u>S. lactamdurans</u> <u>Nocardia lactamdurans</u>	*, Khaoua, S y cols., 1991. Kipekar, AC y Kirwan, DJ., 1991.
Cloranfenicol	<u>S. venezuelae</u>	Shapiro, S y Vining, LC 1983.
Acido clavulanico	<u>S. clavuligerus</u>	*
Eritromicina	<u>S. erythreus</u>	*
Gilvocarcina V	<u>S. arenae</u>	*
Leucomicina	<u>S. kitasatoensis</u>	*
Lincomicina	<u>S. lincolnensis</u>	*
Nanaomicina	<u>S. rosa</u>	*
Nourseotricina	<u>S. noursei</u>	*
Novobiocina	<u>S. niveus</u>	*
Rifamicina	<u>N. mediterranei</u>	*
Espiramicina	<u>S. ambofaciens</u>	*
Tilosina	<u>S. fradiae</u>	Masuma y cols., 1983.

* Braña y Demain 1988.

datos de la revisión de Braña y Demain (1988), y otros datos más, encontrados; actualizando la lista de antibióticos en los que se reporta este fenómeno.

En el caso de tilosina, antibiótico producido por *Streptomyces fradiae*, se llegó a demostrar la naturaleza del efecto; ya que se utilizó el análogo de amonio hidrocioruro de metilamina, produciendo ambos una disminución dramática en los títulos del antibiótico, lo que los llevó a concluir que se trata de una regulación catabólica por nitrógeno. (Masuma, y cols., 1983).

En el caso de *S. clavuligerus*, productor de cefamicina C, el uso de cloruro de amonio como única fuente de nitrógeno o junto con asparagina, disminuyeron la producción. Parece que el efecto negativo es debido a la represión de una o más enzimas en la vía biosintética. El análisis en la actividad de algunas enzimas, mostró que la ciclasa y en menor grado la expandasa son susceptibles a represión en presencia de amonio. (Braña, Wolfe y Demain 1985).

Otro microorganismo productor de cefamicina C, *Streptomyces cattleya* ha sido objeto de algunos estudios en los que se observó que la biosíntesis del antibiótico, comienza después de que el amonio, la glucosa y el fosfato se habían consumido por completo. Otra observación reportada es que la biosíntesis de cefamicina C, en este microorganismo es más sensible a represión por amonio que a represión por nitratos. Khaoua, 1991 confirmó el efecto de regulación por fuente de nitrógeno en este caso. La producción más alta de cefamicina C fué con asparagina, en comparación a otros aminoácidos y amonio. Cuando se aumenta la concentración

de asparagina la producción de cefamicina disminuyó aproximadamente 70%. En este estudio, se midieron las actividades de la vía, específicamente expandasa e hidroxilasa, en extractos celulares de cultivos en presencia de amonio, glutamina y varias concentraciones de asparagina, respectivamente. El amonio permite una producción muy débil de cefamicina C y las actividades de las enzimas mencionadas apenas se detectaron. Cuando se utilizó glutamina como fuente de nitrógeno, la biosíntesis de expandasa e hidroxilasa resultó en un 30% y 50% respectivamente, de los valores obtenidos con asparagina.

Algo que llama la atención en estos ejemplos, es que la regulación catabólica por nitrógeno, se puede dar; independientemente de que el antibiótico contenga o no nitrógeno en su molécula, como es el caso de tilosina.

La regulación catabólica por nitrógeno, a su vez, podría estarse dando no necesariamente sobre las enzimas de la vía de síntesis del antibiótico, sino que se sabe que algunas enzimas que tienen que ver con el metabolismo de ciertos aminoácidos, también están sujetas a represión catabólica por amonio. Esto podría afectar la síntesis de los antibióticos cuyos precursores sean aminoácidos, cuyo metabolismo sea sensible a este efecto.

O como en el caso de la producción de cefamicina por *Nocardia lactamdurans*, en el que se utiliza glutámico como fuente de nitrógeno y al rebasar la concentración de 4.25 g/L, la producción volumétrica del antibiótico disminuye; se encontró que bajo estas condiciones el glutámico es catabolizado por la

enzima glutamato-deshidrogenasa dependiente de NAD (GDH-NAD), que produce cetoglutarato y amonio. Este amonio se detectó en el medio de cultivo, lo que indica que muy probablemente los niveles de amonio intracelulares se encuentren lo suficientemente altos para producir la regulación sobre las enzimas de la vía biosintética. (Kirpekar y Kirwan, 1991).

Tanto en el caso de la fermentación de cefamicina C, como en el de tilosina, y otros antibióticos que se sabe que son susceptibles al amonio; el uso de "agentes atrapadores de iones amonio" como $MgPO_4$, zeolita, etc., han disminuido el efecto de amonio. Estos compuestos son capaces de formar complejos insolubles con las sales de amonio en el medio de cultivo. De este modo, se puede obtener un suministro continuo de amonio a bajas concentraciones, y la biosíntesis del antibiótico se lleva a cabo libre de la represión (Brafía y Demain, 1988).

REGULACION NITROGENADA EN LA SINTESIS DE AMINOGLUCOSIDOS.

Como ya se mencionó anteriormente, los aminoglucósidos (aminociclitoles, aminociclitol glicósidos), son una familia de antibióticos de pseudo-oligosacáridos cortos que incluyen sustancias bien conocidas como estreptomina, neomicina, y gentamicina.

Las fermentaciones industriales de antibióticos, demandan el uso de medios que sean relativamente baratos y que además rindan volúmenes altos de antibiótico.

Entre los antibióticos aminoglucósidos, el más desarrollado comercialmente es la estreptomina, por lo que también es sobre el que más se ha publicado en cuanto a su regulación y síntesis. Para la producción de estreptomina, se emplea un medio complejo en el cual la fuente principal de carbono es glucosa; y como fuente de nitrógeno se utiliza la harina de soya (algunas veces suplementada con licor de malz o solubles de destilación). Este medio conteniendo una alta disponibilidad de carbono y una baja de nitrógeno ayuda a dirigir los esfuerzos biosintéticos del organismo hacia el metabolismo secundario a expensas de la biomasa (Shapiro, 1989).

No existe un consenso en la literatura en cuanto a la influencia de nutrientes nitrogenados específicos en la productividad de estreptomina, lo cual indudablemente se debe a las diferencias fisiológicas entre cepas de *S. griseus* examinadas por diferentes investigadores, también como a la sensibilidad del metabolismo secundario a las condiciones de cultivo. Se ha reportado que se

puede lograr casi triplicar la producción de di-hidroxi-estreptomicina al utilizar en el medio de cultivo fosfato de magnesio, que es un agente atrapador de amonio. Sin embargo, otros estudios indican que la adición de amonio a cultivos en fase estacionaria, próximos a comenzar la antibiogénesis; aumenta la producción de estreptomicina.

Inoue y cols., (1983) postularon un efecto por precursores, donde altas concentraciones de amonio extracelular aumentaban las pozas intracelulares tanto de glutámico, como de glutamina. Los cuales a su vez mantenían una producción elevada de estreptidina y N-metil-L-glucosamina. Esto concuerda parcialmente con otros resultados obtenidos, en los que la glutamina y asparagina (aunque no el glutámico), estimularon la síntesis de glucosamina y estreptomicina por *S. griseus*.

Los aminoácidos han tenido ya sea efectos positivos, negativos o neutrales en la producción de estreptomicina. Se han encontrado efectos positivos de alanina, arginina, asparagina, y glutámico; y se han explicado en términos de que aumentan la producción de los aminoazúcares estreptidina y N-metil-L-glucosamina. La metionina, a partir de la cual el grupo N-metilo de la N-metil-L-glucosamina se deriva, también estimuló la síntesis de estreptomicina. Los mecanismos a través de los cuales muchos aminoácidos influyen la síntesis de estreptomicina no están bien entendidos; algunos pueden ejercer un efecto a nivel genético (reprimiendo o induciendo/desreprimiendo a los genes que codifican para las enzimas asociadas con la síntesis de estreptomicina), mientras que otros pueden ejercer su efecto a

nivel fisiológico (modulando actividades de "sintetasas de estreptomycinina" o de enzimas de metabolismo primario que tuvieran que ver con precursores.

En cuanto al efecto sobre alguna enzima, se sabe que la α -D-manosidasa, corta el residuo manosil terminal de la manosidoestreptomycinina o estreptomycinina B; para dar estreptomycinina. Se ha observado, que ciertos aminoácidos (valina, ornitina, glutámico, metionina); reprimen la síntesis de α -D-manosidasa por *S. griseus*. La adición de "nitrógeno estimulador" (amonio, asparagina, glutamina, etc.) a cultivos silvestres de *S. griseus* muy raramente conduce a una recuperación cuantitativa del nitrógeno en la forma de antibiótico. Por ejemplo, la adición de 60 mM N (glutámico, glucosamina, amonio) a cultivos en fase estacionaria de *S. griseus*, aumentó la producción de estreptomycinina a 85 μ g/ml. La recuperación de ese nitrógeno enteramente en la forma de antibiótico debiera rendir títulos de estreptomycinina de aproximadamente 6 mg/ml; el aumento observado representa cuando mucho solamente el 1.5% aproximadamente de la incorporación del "nitrógeno estimulador" en el antibiótico. Hasta que punto la disposición de este nitrógeno estimulador remanente, directamente va a soportar la producción de estreptomycinina en cuanto a incrementar la síntesis de RNA mensajero de genes que codifiquen para las enzimas de síntesis de estreptomycinina; aumentar la síntesis de de las enzimas biosintéticas, aumentar los tamaños de las pozas de los sustratos nitrogenados que son precursores, etc.; no se sabe.

El caso de la neomicina, nos interesa mucho, desde el punto de vista que es un antibiótico que como la gentamicina contiene en su molécula a 2-deoxiestreptamina. Lo produce el estreptomiceto *S. fradiae* y es una mezcla de neomicina A (neamina), neomicina B y neomicina C. La neomicina A, es un pseudodisacárido que consiste de neosamina B y su epímero C-5, neosamina C. La neomicina B (el componente más abundante) es un pseudotetrasacárido que consiste de neosamina B, 2-deoxiestreptamina, ribosa y neosamina C; la neomicina C difiere de la neomicina B en que éste contiene una segunda unidad de neosamina C en lugar de neosamina B.

En otra sección de este documento se han descrito todos los estudios recientes sobre la formación del intermediario 2-deoxiestreptamina y sobre los pasos de aminotransferencia que utilizan muy probablemente a glutamina como donador amino. Las neosaminas se derivan de glucosa via glucosamina, así que sus grupos amino del C-2 probablemente vengan de glutamina también. Las partes amino del C-6 de la neosamina B y neosamina C, surgen de una oxidación-transaminación secuencial de glucosamina: $-CH_2OH \rightarrow -CHO \rightarrow -CH_2NH_2$, de nuevo siendo glutamina el donador amino probable.

Así como en la fermentación de estreptomina, se requiere de crecimiento abundante para obtener altos títulos de neomicina, aunque esta condición por sí sola es insuficiente. Existen algunas discrepancias en la literatura en cuanto a la habilidad de algunos nutrientes nitrogenados en particular para promover la antibiogenesis. Alanina, aspartico y glutámico soportaron

rendimientos de neomicina de moderados a altos, mientras que el amonio fué inhibitorio. Se ha reportado también, a la histidina y prolina como buenas fuentes de nitrógeno para la producción de neomicina, pero otros autores no obtuvieron antibiótico durante el cultivo de *S. fradiae* con estos aminoácidos. Por otro lado, en estos mismos reportes se obtuvieron los títulos más altos en neomicina utilizando nitrato de sodio (84 mg-%N), mientras que Dulmage encontró que el nitrato era insuficiente para la producción de este mismo antibiótico. Así mismo, se ha descubierto que la hexosamina intracelular y las pozas de los aminoácidos eran aumentadas hasta 4 veces cuando *S. fradiae* era incubado con glutámico, y que glutámico y glutamina (además de glucosa y Mg²⁺), eran esenciales para la formación de neomicina por suspensiones de células en reposo. Ellos propusieron que la productividad de la neomicina estaba en función de los tamaños de las pozas de los aminoácidos (particularmente glutámico). Las proporciones de neomicinas A, B, y C que se acumulan en los fluidos del cultivo parecen ser sensibles a la nutrición nitrogenada.

La nebramicina es un complejo de antibióticos de amplio espectro elaborado por *S. tenebrarius*, cuyo dos componentes: la kanamicina B (componente 5) y la tobramicina (componente 6) son de importancia clínica. La kanamicina B y la tobramicina son pseudotrisacáridos, cada uno conteniendo kanosamina (3-D-glucosamina) y 2-deoxiestreptamina; mientras que la tobramicina (3'-deoxikanamicina B) tiene nebrasamina como su tercer aminoazúcar, la kanamicina B contiene neosamina C. Stark

y cols., encontraron que las fuentes de nitrógeno afectaban fuertemente al antibiótico. en particular, glutamina que parecia dirigir la actividad micelial hacia el metabolismo secundario. Mientras que la glucosamina inhibió la biosíntesis de la nebramicina. Se ha sugerido que la acción inhibitoria de glucosamina yace en su competencia con glucosa por una enzima esencial para la producción de los antibióticos.

Las kanamicinas, son pseudotrisacáridos elaborados por *Streptomyces kanamiceticus*, contienen kanosamina y 2-deoxiestreptamina, pero difieren con respecto al aminoazúcar unido a 2-deoxiestreptamina: la kanamicina A, contiene 6-D-glucosamina, la kanamicina B contiene neosamina C, y la kanamicina C contiene 2-D-glucosamina. La unidad 6-D-glucosaminil de la kanamicina A, aparentemente se deriva de 2-D-glucosamina. Los títulos más altos de kanamicina reportados, (150 µg/ml al día 7), se obtuvieron con NaNO₃ (60mM), mientras que con NH₄NO₃, no se logró producir antibiótico. Excepto por la glicina (60 mM; 80 µg de kanamicina/ml al día 7), los aminoácidos resultaron ser fuentes muy pobres de nitrógeno para la producción del antibiótico, aunque algunos si permitieron un crecimiento abundante.

Yamamoto y cols., reportaron que el KNO₃ o NH₄Cl (50 mM cada uno), provocaron una producción de biomasa parecida por *Micromonospora oloasterospora*, aunque al día 4, el cloruro de amonio, soportó títulos más altos de fortimicina A. En medio sintético conteniendo NH₄Cl (95 mM), los aminoácidos arginina, asparagina, aspartico y glutámico estimularon tanto el

y cols., encontraron que las fuentes de nitrógeno afectaban fuertemente al antibiótico. en particular, glutamina que parecía dirigir la actividad micelial hacia el metabolismo secundario. Mientras que la glucosamina inhibió la biosíntesis de la nebramicina. Se ha sugerido que la acción inhibitoria de glucosamina yace en su competencia con glucosa por una enzima esencial para la producción de los antibióticos.

Las kanamicinas, son pseudotrisacáridos elaborados por *Streptomyces kanamiceticus*, contienen kanosamina y 2-deoxiestreptamina, pero difieren con respecto al aminoazúcar unido a 2-deoxiestreptamina: la kanamicina A, contiene 6-D-glucosamina, la kanamicina B contiene neosamina C, y la kanamicina C contiene 2-D-glucosamina. La unidad 6-D-glucosaminil de la kanamicina A, aparentemente se deriva de 2-D-glucosamina. Los títulos más altos de kanamicina reportados, (150 µg/ml al día 7), se obtuvieron con NaNO₃ (60mM), mientras que con NH₄NO₃, no se logró producir antibiótico. Excepto por la glicina (60 mM; 80 µg de kanamicina/ml al día 7), los aminoácidos resultaron ser fuentes muy pobres de nitrógeno para la producción del antibiótico, aunque algunos si permitieron un crecimiento abundante.

Yamamoto y cols., reportaron que el KNO₃ o NH₄Cl (50 mM cada uno), provocaron una producción de biomasa parecida por *Micromonospora olivasterospora*, aunque al día 4, el cloruro de amonio, soportó títulos más altos de fortimicina A. En medio sintético conteniendo NH₄Cl (95 mM), los aminoácidos arginina, asparagina, aspártico y glutámico estimularon tanto el

crecimiento como la producción de fortimicina A, mientras que la serina (20 mM) estimuló solamente a la producción de fortimicina A. Este último puede ser un efecto por precursores, ya que el residuo fortaminil de la fortimicina A contiene una fracción glicinamida.

REGULACION DE LA SINTESIS DE GENTAMICINA.

Aunque en esta sección me he limitado a describir los efectos producidos por el nitrógeno sobre la síntesis de los antibióticos. Me voy a permitir en el caso de gentamicina referirme también a los estudios de regulación por fuente de carbono y fosfatos en gentamicina, que se han llevado a cabo en el laboratorio donde se realizó este trabajo.

Regulación por fuente de Carbono.

En cuanto al efecto de carbono, Escalante y cols.,(1992); encontraron una relación inversa entre la producción máxima del antibiótico y la concentración inicial de glucosa y xilosa adicionadas al medio de fermentación. Otros carbohidratos como fructosa, maltosa, manosa y almidón no causaron efecto de represión. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la síntesis de la gentamicina es sensible a represión catabólica por glucosa, las conclusiones fueron las siguientes:

- a) El efecto negativo de los carbohidratos influye en el antibiótico solo si se adiciona durante la etapa activa de síntesis de proteínas.
- b) Se caracteriza por ser un efecto negativo fuerte y permanente sobre la síntesis de gentamicina.

c) D-glucosa, necesita ser metabolizada para ejercer su acción en la formación del antibiótico.

Un dato un poco inesperado, fué el hecho de que xilosa ejerciera represión, ya que esta molécula es precursora directa durante la síntesis de las gentamicinas (Ver sección de biosíntesis de gentamicina).

Regulación por fosfatos.

Al utilizar concentraciones de fosfato mayores de 1g/L, se provocó una disminución de aproximadamente el 50% en la producción específica del antibiótico, sin tener repercusión alguna en el pH y crecimiento del microorganismo. Al realizar experimentos en un sistema de células en reposo y en fermentaciones normales observamos que el efecto negativo de éste nutriente es debido a una represión y no a una inhibición. Por otro lado, el uso de análogos de fosfato sugiere que la molécula del fosfato *per se* es la responsable del efecto y no un producto de su metabolismo (Obregón, 1991).

Regulación por Nitrógeno.

Las publicaciones que describen un efecto de la nutrición por nitrógeno sobre la producción de gentamicina son muy pocas. Abou-Zeid y cols., (1976), encontraron que al administrar a un medio definido con NaNO_3 (25 mM), con pequeñas cantidades de ciertos aminoácidos (2 mg-%), la producción de gentamicina por *M. purpurea* aumentaba de dos a tres veces; (hasta 30 $\mu\text{g/ml}$), al día 5. Las purinas y pirimidinas (20 mg-%), también estimularon

la producción del antibiótico. Existe un reporte de inhibición de la producción de gentamicina por amonio, producida por *M. echinospora*. (Masuma y cols., 1983).

Laura Islas (1991), estudió el efecto de la fuente de nitrógeno en la producción fermentativa de gentamicina, y llegó a las siguientes conclusiones que son la base de éste trabajo.

1. *M. purpurea*, es capaz de crecer y producir gentamicina, en un medio mínimo con cloruro de amonio, sulfato de amonio o nitrato de amonio, como únicas fuentes de nitrógeno.

2. La producción de gentamicina se incrementa al aumentar la concentración de amonio en el medio de cultivo, obteniéndose la máxima estimulación en la concentración de amonio correspondiente a 150 mM. Tal efecto estimulador no es debido ni a incrementos en el crecimiento celular, ni a variaciones en el pH del medio fermentado y es independiente del tipo de sal con la cual se administre el ión al microorganismo.

3. Existe una relación entre el amonio consumido por el microorganismo y la producción de gentamicina; a mayor consumo de amonio, mayor producción del antibiótico.

4. En concentraciones de amonio menores o iguales a 40 mM, el microorganismo utiliza el sustrato preferentemente para su crecimiento, pero cuando la concentración de amonio se incrementa hasta 150 mM, dicho nutriente se utiliza con mayor eficiencia para la síntesis del antibiótico.

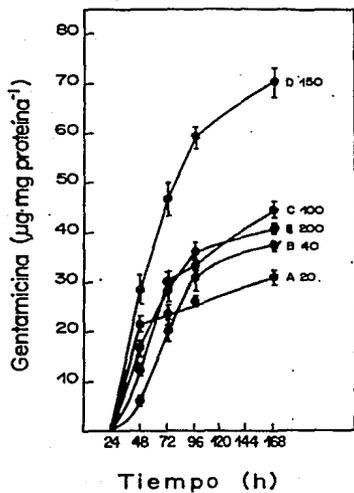
5. El ácido glutámico y la glutamina estimulan la producción de gentamicina cuando se adicionan al medio de cultivo junto con el amonio desde el inicio de la fermentación. La adición de los

aminoácidos al medio provoca un consumo más lento del amonio en las primeras horas de fermentación. Ambos aminoácidos son utilizados por el microorganismo para su crecimiento y para la producción de gentamicina.

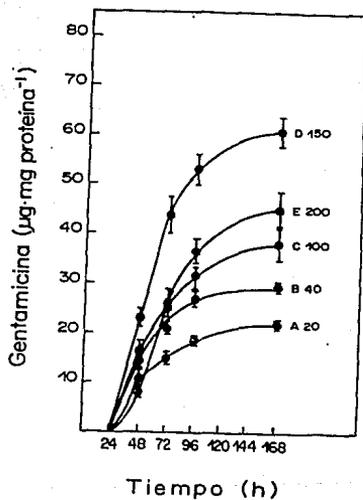
6. La adición de alanina al medio desde el inicio de la fermentación no incrementa la producción de gentamicina y provoca un menor consumo de amonio por el microorganismo.

7. Tanto el cloruro de amonio, como los aminoácidos, ácido glutámico y glutamina estimulan la síntesis de gentamicina cuando se adicionan a un sistema de células en reposo como únicas fuentes de nitrógeno. El efecto estimulador es mayor en presencia de ácido glutámico y menor en presencia de cloruro de amonio.

8. El efecto estimulador del amonio, el ácido glutámico y la glutamina sobre la síntesis de gentamicina no es debido a un fenómeno de inducción.



Producciones específicas de gentamicina obtenidas de cultivos de *M. purpurus* NRRL 2953 en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de clorato de amonio: (A) 20 mM; (B) 40 mM; (C) 100 mM; (D) 150 mM y (E) 200 mM.



Producciones específicas de gentamicina obtenidas de cultivos de *M. purpurus* NRRL 2953 en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de amonio: (A) 20 mM; (B) 40 mM; (C) 100 mM; (D) 150 mM y (E) 200 mM.

FIG. 5 Efecto estimulador del amonio sobre la síntesis de gentamicina.

Fuente: Isias, 1991.

En base a los antecedentes presentados, se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL.

"CARACTERIZAR EL EFECTO ESTIMULATORIO POR AMONIO EN LA SINTESIS DE GENTAMICINA, PRODUCIDA POR *Micromonospora purpurea* NRRL-2953".

Objetivos Especificos.

-Identificar, entre los principales productos de asimilación del amonio (glutámico y glutamina), cual es el efector principal de esta estimulación.

-Caracterizar el efecto desde el punto de vista fisiológico.

MATERIAL Y METODOS

Cepas.

Micromonospora purpurea NRRL-2953, es una cepa de tipo silvestre, que nos fué proporcionada por el "Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratories", Peoria, IL., U.S.A. Esta cepa es la que se utilizó para producir gentamicina en nuestro estudio.

Bacillus subtilis ATCC 6633, se adquirió de la "American Type Culture Collection", Rockville, Md. 20852, U.S.A. Este microorganismo fué el utilizado para realizar el bioensayo.

Conservación de la cepa.

A partir del liofilizado recibido, se procedió a propagar (a 29°C) el microorganismo en medio completo con la siguiente composición: Extracto de malta 1%, extracto de levadura 1% y carbonato de calcio 1%. Al presentar *Micromonospora purpurea* crecimiento abundante, las células se lavaron tres veces con solución salina 0.85% y se resuspendieron en glicerol al 20%. Posteriormente se guardaron en congelación (20°C bajo cero).

Crecimiento del microorganismo.

A partir de la solución de conservación arriba mencionada, la cepa se sembró en el siguiente medio: Glucosa 1%, almidón soluble 2%, extracto de levadura 0.5%; N-Z amina 0.5%, carbonato de

calcio 0.1% y agar 1.5%. Se procedió a su incubación durante aproximadamente 7 días a 29°C. Del crecimiento logrado en este medio se cosechó el micelio para la preparación del inóculo.

Preparación del Inóculo.

Aproximadamente la mitad del micelio crecido en el medio de conservación descrito, se cosechó para inocular en medio líquido descrito (50 ml) para *Micromonospora* (Porter, J.N. 1975) con la siguiente composición: extracto de carne 0.3%, triptona 0.5%, glucosa 0.1%; almidón soluble 2.4%, extracto de levadura 0.5%, carbonato de calcio 0.4%; pH (CaCO_3) 7.6.

La incubación se llevó a cabo a 29°C en una agitadora Corning Stirrer PC-353 a 180 rpm durante 48 hrs. El cultivo resultante se utilizó como inóculo para los experimentos.

Fermentación.

Para poder estudiar el efecto de las fuentes de nitrógeno que nos interesaban, sobre la producción del antibiótico, se realizaron experimentos en los que *Micromonospora purpurea* se ponía a crecer en un medio mínimo diseñado por Laura Islas (1991), modificado a partir de un medio reportado por Carbajal (1957) para la producción de antibióticos aminoglucósidos. La composición es la siguiente (g/L): sacarosa 24; K_2HPO_4 2.5; NaCl 5.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.02; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.05 $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0.001; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0.001; CaCO_3 3.0; pH (CaCO_3) 7.5. La sacarosa se esterilizó por separado. La fuente de nitrógeno que se utilizó, varió dependiendo del experimento. Cuando se utilizó

cloruro de amonio, éste se esterilizó junto con el medio de cultivo, en cambio cuando la fuente de nitrógeno se trataba de glutámico o glutamina éstos se esterilizaron por medio de filtración, utilizando membranas Millipore de 0.45 μ ; se procedió del mismo modo cuando se trataba de análogos o inhibidores. Las condiciones de fermentación fueron las siguientes: 2 ml del cultivo de inoculación, fueron agregados a un matraz de 250 ml conteniendo 50 ml del medio mínimo ya descrito, posteriormente se incubó a 29°C en la incubadora de agitación por lo general durante 6 días a 180 rpm, tomando 2 ml de muestra cada 24 h para realizar el análisis de crecimiento y producción.

Ensayo para cuantificar gentamicina.

La producción del antibiótico, fué determinada por la técnica de difusión en agar, utilizando a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 como microorganismo de prueba (Rosner y Aviv, 1980; Sánchez, S., y col. 1981). El medio de cultivo utilizado para el crecimiento del bacilo es el siguiente: extracto de levadura 1.0%, peptona 2.0% y glucosa 1.0%. Este microorganismo se creció durante 24 h a 37°C y 160 rpm para cosecharlo en fase exponencial y agregarlo en una concentración de 1% (v/v) al medio de bioensayo, cuya composición se describe a continuación: extracto de levadura 0.5%; triptona 1.0%; NaCl 0.5% y agar 1.0%. El ensayo se realizó en cajas petri con 10 ml del medio para bioensayo inoculado, a continuación se colocaron sobre el agar discos estériles de papel analítico Schleidcher & Schuell No.740-E de 1/4 de pulgada de diámetro, donde previamente se colocó asepticamente una alícuota

de 50 µl de muestra del caldo de fermentación. Las cajas con las muestras se dejaron difundir por 1 h a 4°C y después del período de incubación de éstas cajas, (36 h a 29°C), las zonas de inhibición se midieron y la cantidad de gentamicina se calculó utilizando sulfato de gentamicina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) como estandar (Escalante y cols., 1992).

Determinación del crecimiento.

De las muestras obtenidas, se retiró el medio de cultivo por medio de centrifugación para obtener el micelio, a éste se le trató con ácido tricloroacético al 10% durante 12 h en congelación. Posteriormente, también por medio de centrifugación se retiró el ácido de las muestras y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de NaOH 0.4 N, procediéndose a determinar la concentración de proteína por el método de Lowry, utilizando albúmina de suero de bovino como estandar (Lowry, O.H., y cols., 1951).

Ensayo enzimático para la determinación de actividad de glutamino-sintetasa (GS).

Los extractos obtenidos para realizar los ensayos enzimáticos para determinación de actividad GS, se prepararon a partir de células crecidas durante 48 y 72 h, en medio mínimo de producción con diferentes fuentes de nitrógeno. Las células se cosecharon, se lavaron 2 veces en solución salina, se suspendieron en glicerol al 60% y se mantuvieron en congelación hasta el momento de realizar el ensayo. Para obtener el extracto libre de

células, éstas se lavaron en amortiguador de extracción GS (en g/L: K_2HPO_4 0.870; EDTA 0.1861; K_2SO_4 8.713 y pH 7.6) posteriormente se resuspendieron en el mismo amortiguador en el mínimo volumen, y se rompieron en un homogeneizador Braun por 30 s a 0°C. Los restos celulares fueron retirados por centrifugación a 18,000 rpm durante 20 min. a 4°C. Las actividades de GS se determinaron en un sistema que consistió de 62 μ moles de solución amortiguadora de imidazol pH 7.4; 9 μ moles de hidroxilamina; 0.5 μ moles de EDTA; 30 μ moles de L-glutamato; 80 μ moles de $MgSO_4$; 7 μ moles de ATP y 100 μ l de extracto celular; en un volumen final de 0.5 ml. Después del tiempo de incubación (30-90 s a 35°C), se añadió una solución de Fe^{3+} /ac. tricloroacético. El precipitado proteico se eliminó por centrifugación y la absorbancia del sobrenadante se midió a 540 nm en un espectrofotómetro Bausch & Lomb modelo Spectronic 21. Un incremento en absorbancia de 0.035 correspondió a un μ mol de producto (Ferguson y Sims, 1974).

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto de glutámico y glutamina sobre la síntesis de gentamicina.

De acuerdo a los antecedentes, en los que el amonio al aumentar su concentración hasta 150 mM produce una estimulación en la producción del antibiótico (Islas, 1991 ver fig. 5), se procedió a probar al ácido glutámico y glutamina como única fuente de nitrógeno en medio mínimo; ya que éstos dos aminoácidos son los principales productos de asimilación del amonio en bacterias (ver fig.4). Como podemos observar en las figuras 6, 7 y 8, el ácido glutámico rebasa los títulos producidos tanto por el control que es amonio como por glutamina en las tres concentraciones utilizadas (10, 20 y 30 mM). Esta estimulación la podemos ver tanto en producción volumétrica como en producción específica. En el medio en el que se utilizó glutamina como fuente de nitrógeno, también se presenta un aumento en la producción volumétrica en comparación al control con amonio, en el caso de la producción específica la estimulación con este aminoácido no se refleja del mismo modo ya que el crecimiento es mayor bajo estas condiciones. Cuando trabajamos con concentraciones de 10 mM en los aminoácidos, la diferencia no es tan marcada, sin embargo, al ir aumentando la concentración de ambos aminoácidos las diferencias se van haciendo cada vez más considerables. En la fig. 9, podemos observar la variación de la producción de gentamicina con respecto a la concentración de la

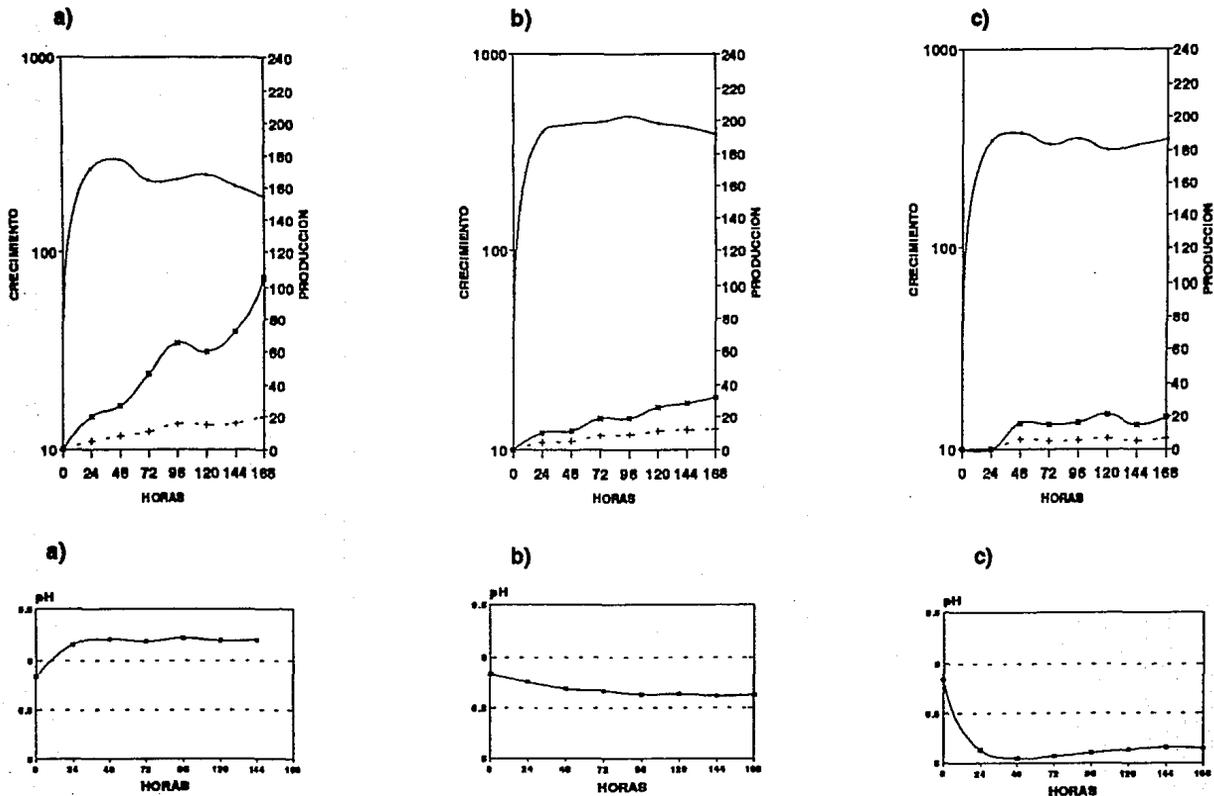


FIG. 6 Crecimiento (μg de proteína/ml), Producción volumétrica (μg de gentamicina/ml) y Producción específica (μg de gentamicina/mg de proteína); y pH, de una fermentación en medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno: a) glutámico 10 mM, b) glutamina 10 mM y c) control con cloruro de amonio 40 mM. — Crecimiento + Prod. volumétrica * Prod. específica

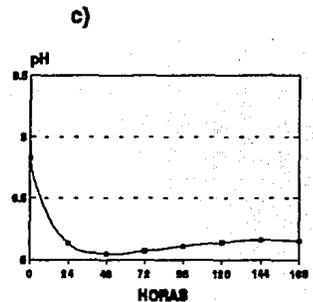
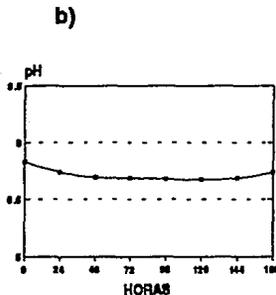
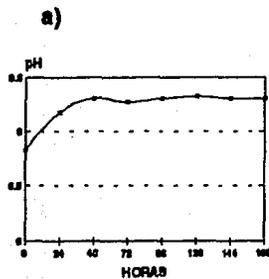
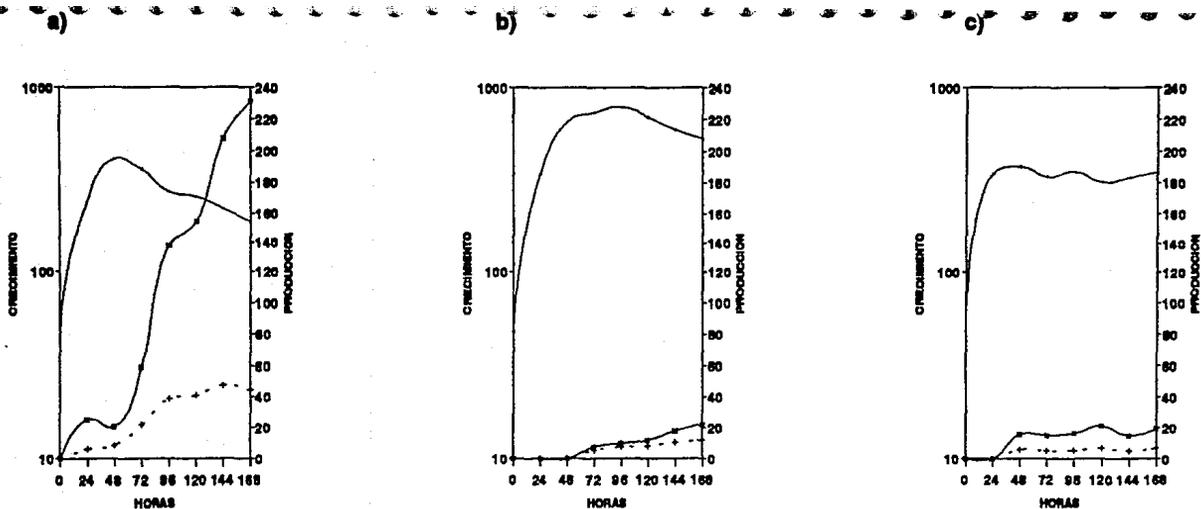


FIG. 7 Crecimiento (μg de proteína/ml), producción volumétrica (μg de gentamicina/ml) y producción específica (μg de gentamicina/mg de proteína); y pH, de una fermentación en medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno: a) glutámico 20 mM, b) glutamina 20 mM y c) control con cloruro de amonio 40 mM. — Crecimiento + Prod. volumétrica * Prod. específica

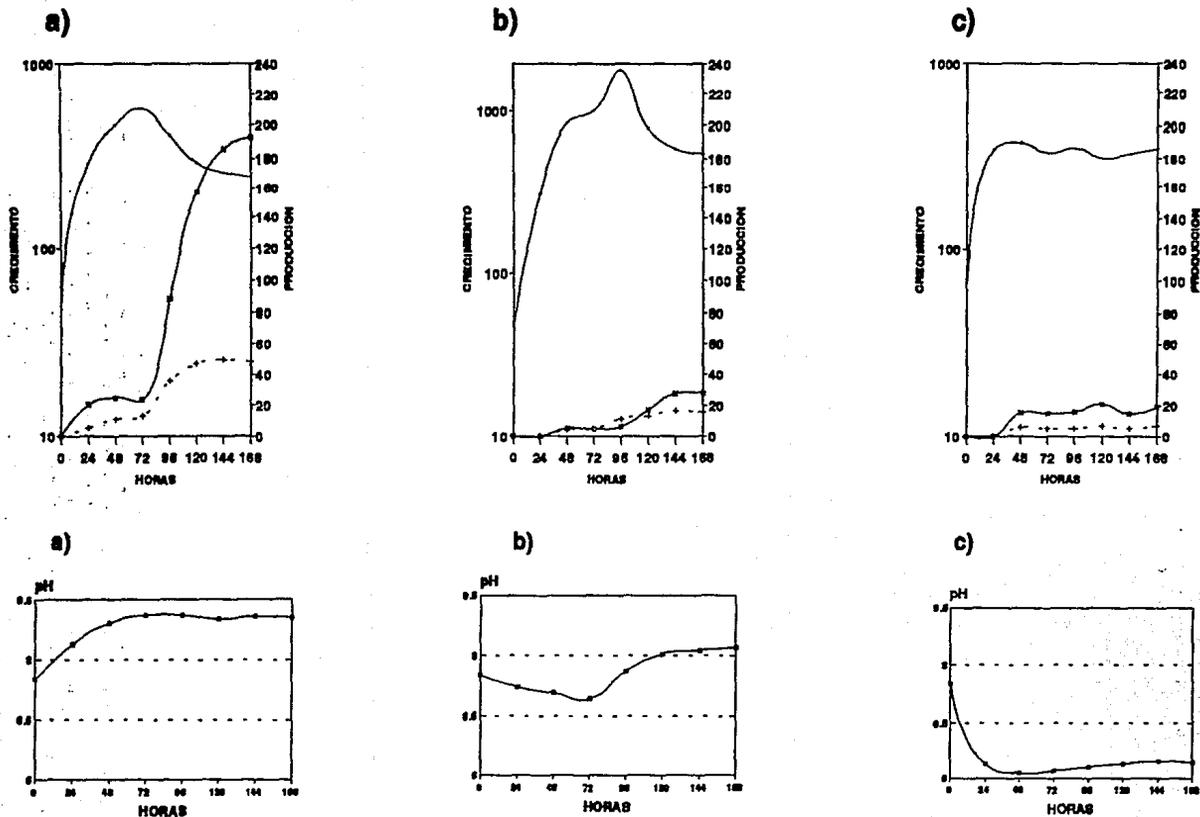
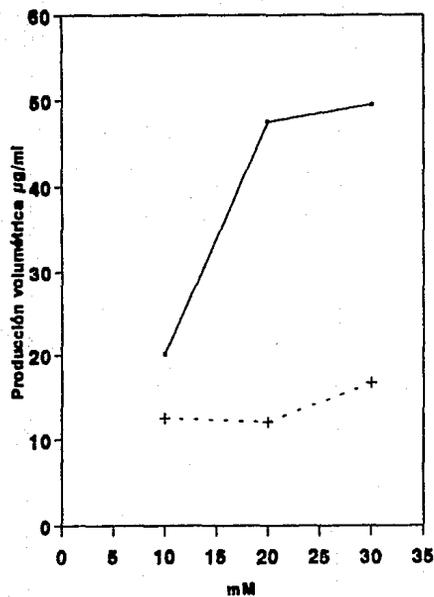


FIG. 8 Crecimiento (μg de proteína/ml), producción volumétrica (μg de gentamicina/ml) y producción específica (μg de gentamicina/mg de proteína); y pH, de una fermentación en medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno: a)glutámico 30 mM, b)glutamina 30 mM y c) control con cloruro de amonio 40 mM. — Crecimiento + Prod. volumétrica * Prod. específica

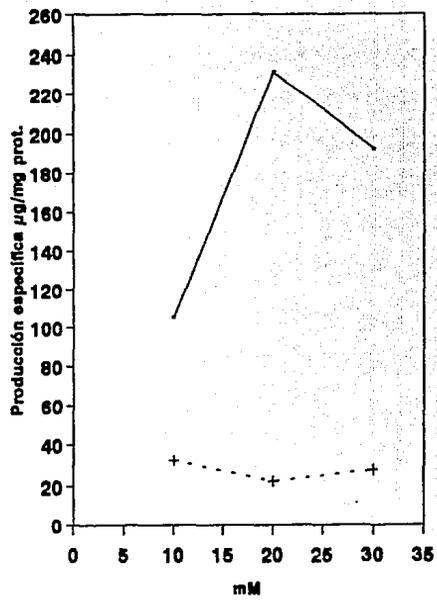
fuelle de nitrógeno utilizada, y es bastante claro el efecto positivo de la concentración de glutámico hasta 20 mM; disminuyendo el efecto al aumentar la concentración arriba de esta cifra en producción específica. El efecto de glutamina no es marcado, aunque nunca son menores los títulos que con el control con amonio. Una observación importante es que, obtenemos mayor crecimiento con glutamina que con glutámico y con amonio, lo que podría indicar que siendo glutamina una mejor fuente de nitrógeno que las otras dos utilizadas, el metabolismo celular prefiera dirigirse a producción de biomasa, más que a la síntesis del antibiótico.

Otra diferencia que se nota, es la de los cambios en pH, durante la fermentación con las diferentes fuentes. Aunque aparentemente una subida en el pH, es favorable para la producción del antibiótico, esto no parece ser la explicación para el caso de glutamina pues al ir aumentando la concentración de este aminoácido, el pH aumenta, y no se observa que esto afecte positivamente a la producción de gentamicina. Adicionalmente en el estudio realizado por Islas (1991), el pH del medio de cultivo disminuyó durante la fermentación, en todos los casos que se utilizó cloruro de amonio en diferentes concentraciones; éstas iban desde 20 mM hasta 200 mM. Se alcanzaron valores de pH cercanos a 6 a las 168 horas de fermentación. La producción específica fué desde 30 µg/mg en 20 mM, hasta 70 µg/mg en 150 mM, a pesar de ésta baja en el pH. Lo mismo sucedió cuando se utilizó tanto sulfato de amonio como nitrato de amonio. Como veremos más adelante, en los experimentos realizados, existieron

condiciones en los que al aumentar o disminuir ligeramente el pH del medio de cultivo no se observa una correlación con los niveles de producción. Sin embargo, las diferencias de pH que se observan en las figs., 6, 7 y 8 nos indican que sería conveniente verificar si al mantener un pH alcalino, digamos en un cultivo continuo, los niveles de producción se mantendrían más altos.



— Glutámico + Glutamina



— Glutámico + Glutamina

FIG. 9 Producción volumétrica y específica de gentamicina en función de la concentración de glutámico o glutamina.

Efecto de metionina-sulfoximina sobre la producción de gentamicina, en medio mínimo con glutámico como única fuente de nitrógeno.

Metionina-sulfoximina (MS) es un conocido inhibidor de la enzima glutamina-sintetasa (Griffith Owen W., y Meister A., 1978), por lo que el utilizar esta sustancia puede evitar la transformación de glutámico a glutamina a través de esta enzima (ver figura 4 de este documento). En base a estos antecedentes, se diseñó un experimento en el cual creciendo a las células en el medio mínimo de producción mas glutámico (10 mM) como única fuente de nitrógeno, adicionamos MS a las 48 horas de fermentación ya que en ese momento el cultivo se encuentra en fase estacionaria, evitando así de algún modo la interferencia del crecimiento. La concentración de MS fué de 1 mM, el resultado presentado en la figura 10 nos muestra que la producción, tanto específica como volumétrica se ve disminuida hasta aproximadamente un 25% (la producción específica a las 72 h en el medio de cultivo con glutámico fué de 147.28 µg de gentamicina/mg de proteína, en cambio en la condición de glutámico más MS, el valor cayó a 37.04 µg/mg), cosa que no sucede con el crecimiento, indicándonos así que el efecto del inhibidor de algún modo intervino para que ya no se pudiera continuar con la síntesis del antibiótico. Para poder comprobar que este inhibidor realmente actúa sobre la enzima GS de este microorganismo, el experimento se volvió a realizar hasta las 72 h, midiendo además del crecimiento y producción del antibiótico, las actividades de

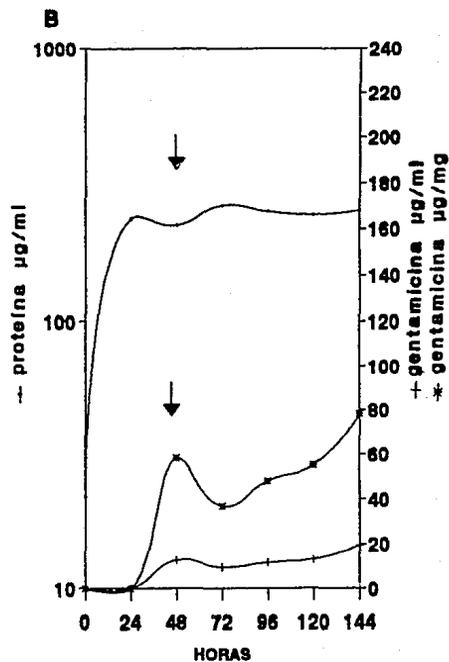
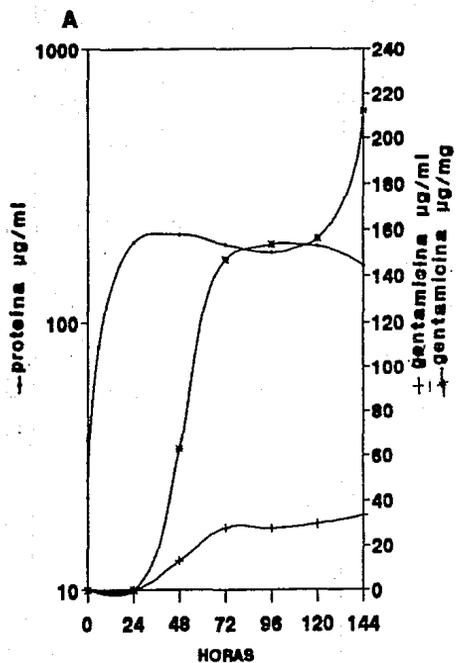


FIG. 10 Efecto de metionina-sulfoximina sobre la producción de gentamicina. MS se adicionó a las 48 horas a células creciendo en medio mínimo y glutámico como única fuente de nitrógeno. A) Medio mínimo + glutámico 10 mM, B) Medio mínimo + glutámico 10 mM + MS 1 mM. MS se adicionó a las 48 horas. —○— Crecimiento + Prod. volumétrica * Prod. específica

GS tanto en glutámico como en la condición de adición de MS, la medición se realizó cosechando a las células a las 48 h antes de la adición del inhibidor y a las 72 h, ya expuestas al inhibidor. El resultado fué que después de 24 horas de haberlo agregado al medio de cultivo, la actividad de GS se mantiene reducida hasta casi un 75% con respecto al control sin adición cuyo valor de actividad de GS fué de 3.182 $\mu\text{mol/mg/min}$ a las 72 horas, en cambio cuando se adicionó MS el valor de GS cayó a 0.836 $\mu\text{mol/mg/min}$; los valores de producción de gentamicina para este experimento se presentan en la figura 11. Aunque, por supuesto no podemos descartar un efecto adicional del inhibidor sobre las sintetetasas del antibiótico u otras enzimas que afecten la biosíntesis del metabolito. En ambos experimentos, el pH no varió al agregar el inhibidor.

Glutamina no revierte el efecto de metionina-sulfoximina.

Este efecto se trató de revertir, utilizando una condición en la que al adicionar MS, agregáramos también glutamina (10 mM), y para nuestra sorpresa observamos que aunque la producción volumétrica llegaba hasta niveles similares a los del control con glutámico; se produjo un aumento considerable en el crecimiento por lo que la producción específica no logró restablecerse (fig. 12). Posteriormente se repitió esta misma condición, pero con diferentes concentraciones de glutamina, ya que pudiéramos estar teniendo un efecto negativo con respecto a la concentración intracelular de glutamina hacia el antibiótico (fig. 13). Sin embargo, tampoco se encontró una reversión.

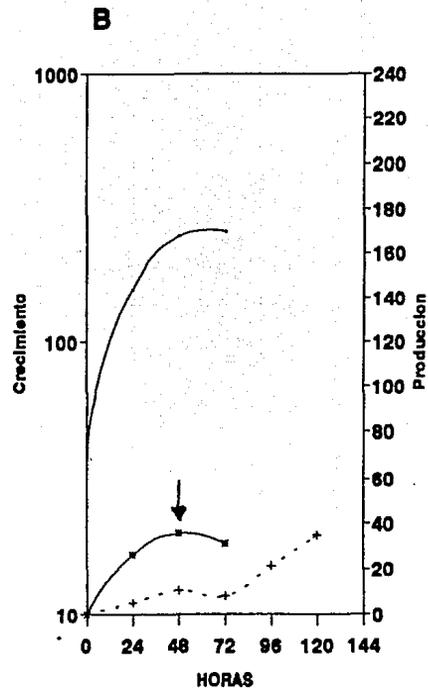
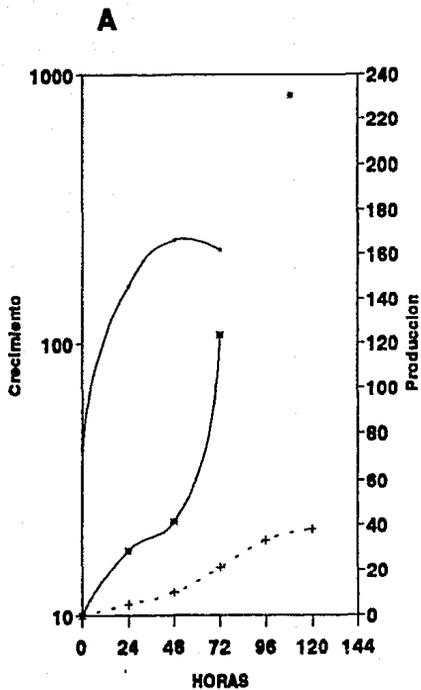


FIG. 11 Las condiciones del experimento son las mismas que en la gráfica anterior; en este caso se midió además la actividad de la glutamina-sintetasa cuyos valores se indican en el texto. — Crecimiento + Prod. volumétrica * Prod. específica

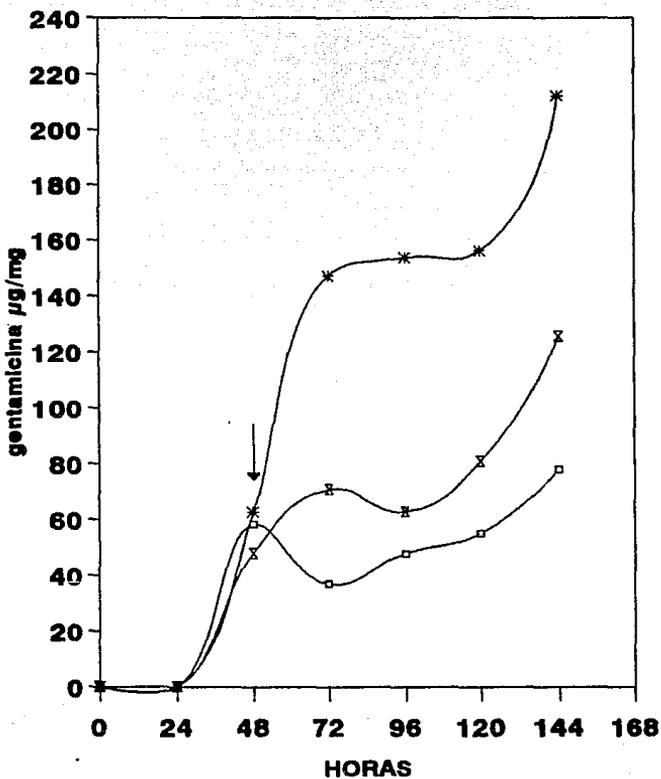


FIG. 12 Producción específica de gentamicina en medio mínimo y glutámico como fuente de nitrógeno. Las adiciones de MS y glutamina se realizaron a las 48 horas.

*- gln 10mM - x- gln 10mM+MS 1mM - □- gln 10mM+MS 1mM+gln 10

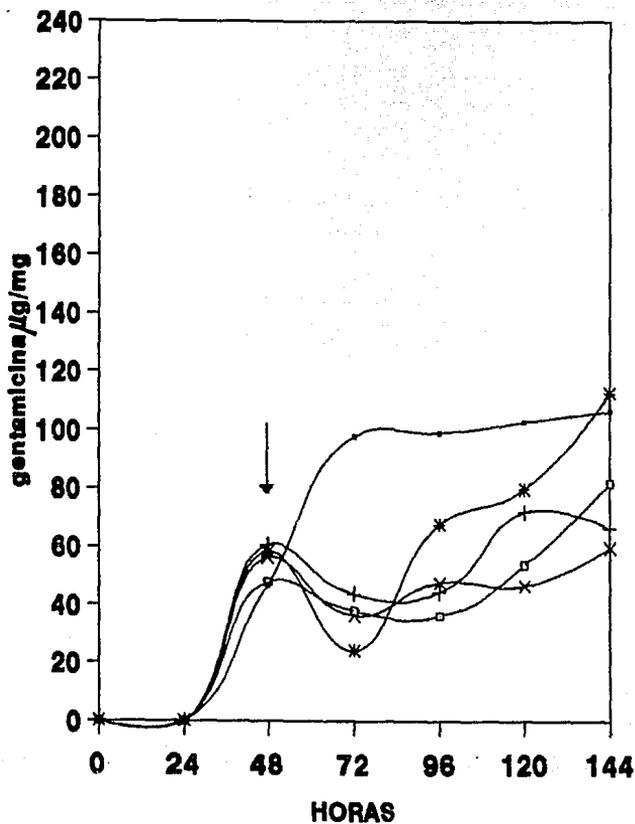


FIG. 13 Efecto de MS con diferentes concentraciones de glutamina. Adiciones a las 48 horas.

○ Glutámico + QR+MS * QR+MS+Gln 5mM □ QR+MS+Gln 1mM x QR+MS+Gln 0.005mM

MS, no interfiere con la asimilación de glutamina.

Para comprobar que MS no interfiere con el transporte de glutamina, se diseñó un experimento en el que las células crecidas con glutámico (10mM) como fuente de nitrógeno y MS (1mM) desde el tiempo cero se compararon con el crecimiento de un cultivo crecido en glutámico (10 mM) + MS (1 mM) + glutamina (10 mM) desde el tiempo cero. La primera condición se vió afectada considerablemente en el crecimiento, debido a que se impide la síntesis de glutamina, aminoácido esencial para la sobrevivencia del microorganismo; en la segunda condición si es que MS no interfiere con el transporte de glutamina, entonces las células deben crecer sin ningún contratiempo ya que tienen esta fuente de nitrógeno directamente disponible. Los resultados que se muestran en la figura 14 indican que glutamina es asimilada sin problema por las células en presencia de MS. Estos resultados concuerdan con otros estudios en los que se ha utilizado con éxito L-glutamina para revertir la inhibición del crecimiento producido, al utilizar MS en el medio de cultivo, en el cual no se observó interferencia del inhibidor con la entrada de glutamina, a diferencia de lo que se ha reportado con metionina; donde al parecer metionina-sulfoximina si comparte el sistema de transporte con este último aminoácido (Steimer-Veale y Brenchley, 1974). Como podemos observar también en esta misma figura, llega un momento en que las células se liberan del efecto de MS, aparentemente este metabolito se degrada rápidamente.

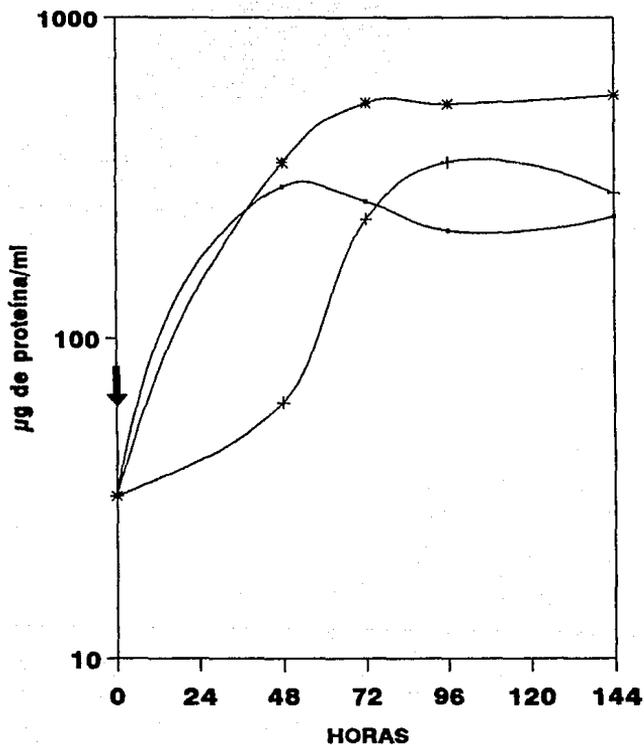


FIG. 14 Efecto de MS sobre el crecimiento de *M. purpurea* y sobre la asimilación de glutamina. La fuente o fuentes de nitrógeno fueron agregadas desde el tiempo cero. Glutámico y glutamina 10 mM, MS 1 mM.

— MM+glt + MM+glt+MS * MM+glt+MS+gln.

La razón por la cual glutamina no está revirtiendo en su totalidad el efecto de MS sobre la producción de gentamicina debe ser quizás, porque por alguna razón, este aminoácido se dirige preferencialmente hacia metabolismo primario, aún siendo el sustrato directo de la reacción de transaminación (Lucher y cols., 1989) para la síntesis del precursor del antibiótico. Si observamos la figura 15-A, notamos que aunque en las primeras horas de la fermentación entre las condiciones de glutámico solo, glutámico + MS + glutamina; glutámico + glutamina y glutamina sola, presentan una velocidad de crecimiento similar, la condiciones en las que está involucrada glutamina llegan a niveles más altos de crecimiento total y una fase logarítmica 24 h más prolongada que en el caso donde se utiliza glutámico solo. Esto nos indica muy claramente que glutamina es la fuente de nitrógeno de preferencia del microorganismo para crecer, no así para producir el antibiótico. Recordando la parte de regulación sobre la síntesis de antibióticos discutida anteriormente en esta tesis, varios autores mencionan que la producción de metabolitos secundarios puede depender de que el crecimiento se detenga y el cultivo llegue a fase estacionaria. La figura 15-B nos confirma este principio ya que en las condiciones donde obtenemos un mayor crecimiento, el nivel de antibiótico es más bajo que con glutámico a excepción del caso en el que se está utilizando MS en el que el efecto negativo sobre la formación de gentamicina es muy drástico. gentamicina es muy drástico. Podríamos pensar entonces, en la posibilidad de que glutamina estuviera modulando el metabolismo

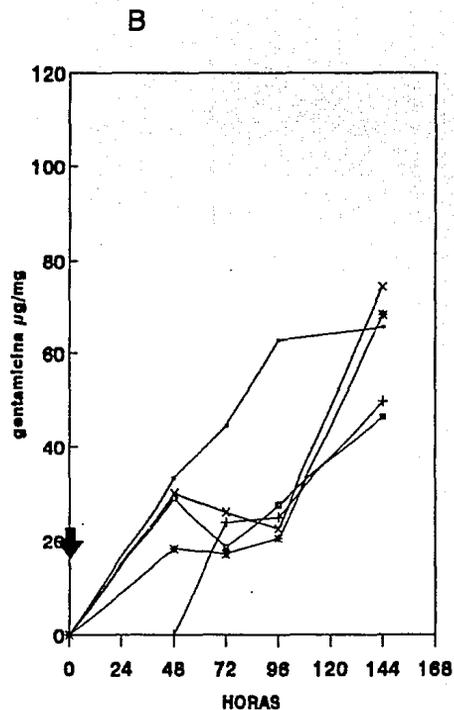
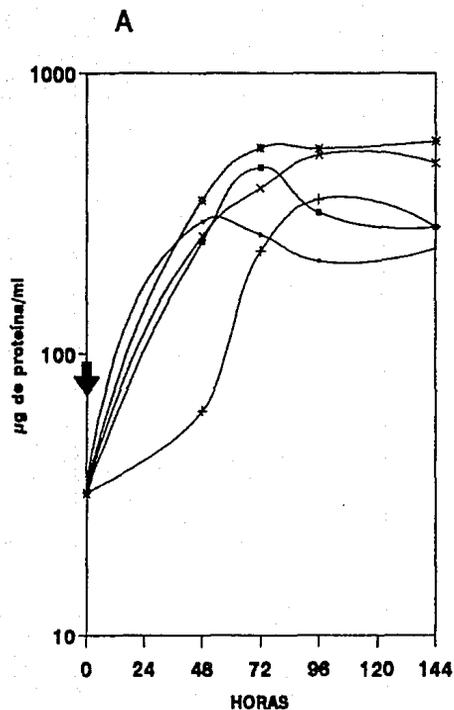


FIG. 15 Efecto de MS y glutamina en medio mínimo con glutámico como fuente de nitrógeno. A)Crecimiento, B) Producción específica. —glt +glt+MS *glt+MS+gln +glr *glt+gln

del microorganismo favoreciendo como dije anteriormente hacia metabolismo primario, esto a pesar de ser un sustrato de una de las enzimas de la vía biosintética. Cómo podría ser el mecanismo de esta modulación, no lo sabemos pero existen reportes en otros microorganismos en los que glutamina puede llegar a producir represión en la síntesis de algunas enzimas relacionadas con la utilización de fuentes de nitrógeno. Un ejemplo es el caso de *Neurospora crassa*, en el que se ha demostrado que glutamina ejerce un efecto negativo sobre la expresión de las enzimas nitrato reductasa, nitrito reductasa y la L-aminoácido-oxidasa. En el caso de ésta última, L-glutamina en bajas concentraciones induce a esta enzima, pero en altas concentraciones ejerce una represión (Marzluf y Fu, 1988).

Tal podría ser el caso de alguna de las enzimas que intervienen en la síntesis de gentamicina, ya que cuando inhibimos la enzima glutamina-sintetasa y por consecuencia se previene la síntesis de glutamina, el antibiótico disminuye, sin embargo cuando se le suministra la glutamina directamente; el efecto que se produce no es favorable precisamente. En la vía de síntesis de gentamicina (ver figura 3 de ésta tesis) encontramos varios pasos en los que se ven involucradas reacciones de transaminación de los que sólo sabemos de uno que sea específico para glutamina, que es la reacción para la síntesis de DOS; en el inciso b de la vía de biosíntesis descrita en la figura 3 se incorpora xilosa y se presenta otra aminosustitución. Posteriormente en el inciso c encontramos otra aminación en el C-6', así también en el paso e que va de gentamicina X2 a JI¹-20A. Se mencionó también en la

sección de biosíntesis del antibiótico que la utilización de metionina es muy importante para las reacciones de metilación de la molécula del antibiótico, esta reacción también podría ser sensible al efecto de glutamina.

La formación de 2-deoxiestreptamina, podría ser el paso limitante en la formación de gentamicina.

Otras condiciones utilizadas para tratar de revertir el efecto de MS en un cultivo con glutámico, fué el agregar al mismo tiempo que el inhibidor algunos de los intermediarios que intervienen en la síntesis de gentamicina tales como 2-deoxiestreptamina (DOS) y glucosamina (ambos en concentración de 10 mM). Ambos precursores lograron revertir el efecto del inhibidor (figs. 16 y 18), indicando así que, por un lado al disminuir considerablemente la síntesis de glutamina (abajo de los niveles mínimos requeridos para que este aminoácido pudiera ser utilizado para la síntesis de un metabolito no esencial) las pozas de estos dos precursores deben verse afectadas, limitando los sustratos para la producción del antibiótico. Esto querría decir, que debe existir un nivel óptimo de glutamina para que se den las condiciones de activación de la o las enzimas para las que pudiera estar sirviendo como sustrato y que a su vez, no afectara negativamente la producción del antibiótico.

En uno de los controles en los que se agregó DOS al medio de cultivo sin agregar el inhibidor (fig. 16-c) el aumento en el título del antibiótico fué considerable, con respecto al control que contenía únicamente glutámico sin adición posterior alguna (fig. 16-a); esto nos podría indicar que el paso limitante en la síntesis de gentamicina quizás sea la síntesis de este precursor ya que aún en las condiciones de máxima estimulación con glutámico no se logran obtener esos niveles de

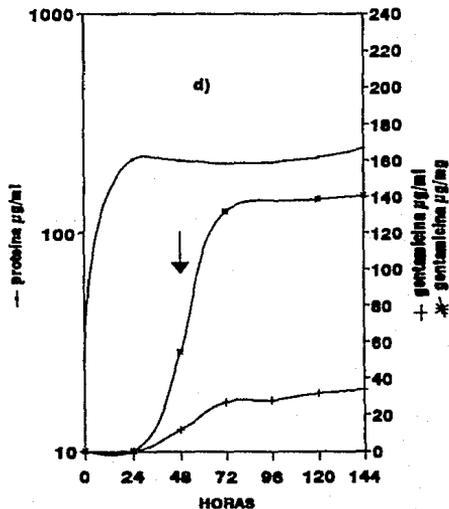
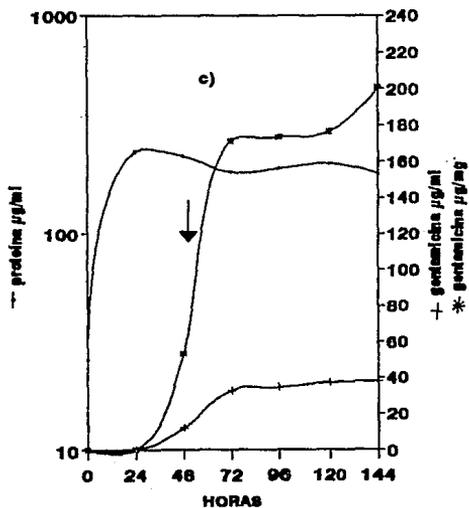
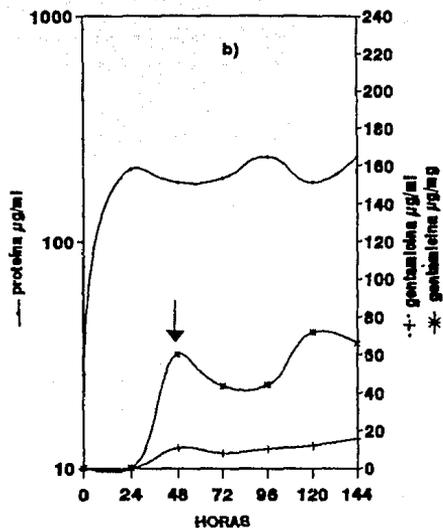
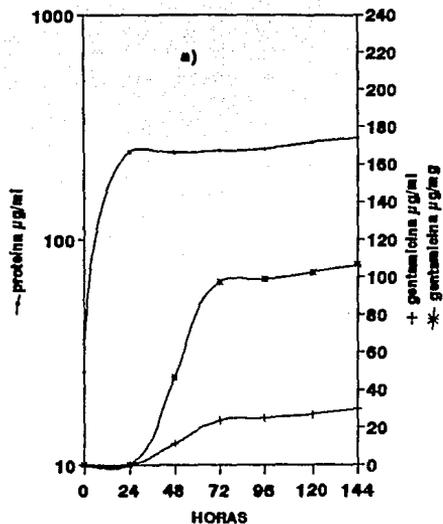


FIG. 16 Efecto de la adición de 2-deoxiestreptamina a una fermentación con glutámico como fuente de nitrógeno y sobre una fermentación inhibida con MS. a) control con glutámico 10 mM, sin adición; b) glutámico 10 mM + MS 1mM, c) glutámico 10 mM + DOS 10 mM; d) glutámico 10 mM + MS 1 mM + DOS 10 mM. Las adiciones se hicieron a las 48 horas. — Crecimiento + Prod. volumétrica * Prod. específica

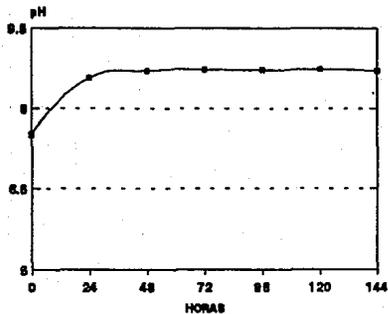
~~En la figura 1 se muestra el efecto de la glucosamina sobre la producción de ácido nucleico en la bacteria *Escherichia coli* en presencia de un sustrato limitado de nitrógeno. Se puede observar que la glucosamina aumenta la producción de ácido nucleico en un 50% con respecto al control. Este efecto se observa también en la figura 2, donde se muestra el efecto de la glucosamina sobre la producción de proteínas en la bacteria *Escherichia coli* en presencia de un sustrato limitado de nitrógeno. Se puede observar que la glucosamina aumenta la producción de proteínas en un 20% con respecto al control.~~

En apoyo a la idea sobre la limitación en la utilización del nitrógeno se realizaron experimentos en los que a una concentración de medio mínimo con amonio 40 mM (Fig. 4) como única fuente de nitrógeno, y otra de medio mínimo con glutamato 10 mM (Fig. 5) como única fuente de nitrógeno, se les adicionó 100 mM (Fig. 6) de glucosamina (10 mM) a las 40 h de inoculación. Como puede ser observado en estas figuras, al agregar 100 mM de glucosamina a la producción específica aumentan de forma notable a determinadas de las condiciones de suministro de nitrógeno en las que no hay prácticamente un cambio en la producción. En cambio, las producciones específicas de la bacteria *Escherichia coli* en presencia de glutamato - 100 mM, cuando se adiciona la glucosamina, aumentan por los mismos 50% de la bacteria *Escherichia coli* en presencia de amonio. Este resultado sugiere que en la limitación del nitrógeno por parte de la bacteria *Escherichia coli* en presencia de amonio, la glucosamina actúa como un factor limitante de la producción de ácido nucleico y proteínas. En las condiciones de medio mínimo con amonio 40 mM y glutamato 10 mM, la glucosamina actúa como un factor limitante de la producción de proteínas.

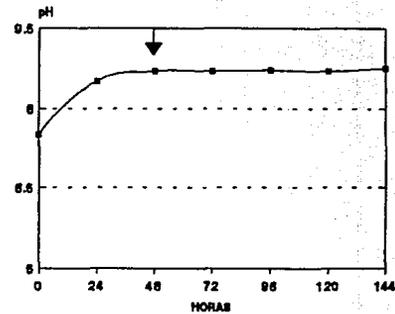
producción. Las figuras 17 y 19, muestran las diferencias en pH de las diversas condiciones utilizadas en el mismo experimento, en las que se nota una ligera baja del pH al utilizar los intermediarios, esta diferencia parece no haber tenido efecto sobre la producción. Por otra parte, esta estimulación no se observa con glucosamina (figs. 18-a y 18-c). En las figuras 20 y 21, se presenta un resumen de los resultados sobre la producción específica de este experimento.

En apoyo a la idea sobre la limitación en la síntesis de DOS, se realizaron experimentos en los que a una condición de medio mínimo con amonio 40 mM (fig. 22) como única fuente de nitrógeno, y otra de medio mínimo con glutamina 10 mM (fig. 23) como única fuente de nitrógeno, se les agregó DOS (10 mM) o glucosamina (10 mM) a las 48 h de incubación. Como puede ser observado en esas figuras, al agregar DOS, los niveles de la producción específica aumentan de forma notable a diferencia de las condiciones de suministro de glucosamina en las que no hay prácticamente un cambio en la producción. Incluso, las producciones obtenidas en el caso de amonio + DOS y de glutamina + DOS, llegan a alcanzar la producción obtenida por glutámico solo (no se muestra esta comparación gráficamente). Estos resultados sugieren que en la condición con glutámico se está favoreciendo una formación aumentada de DOS en comparación con las condiciones con amonio o glutamina como fuentes de nitrógeno.

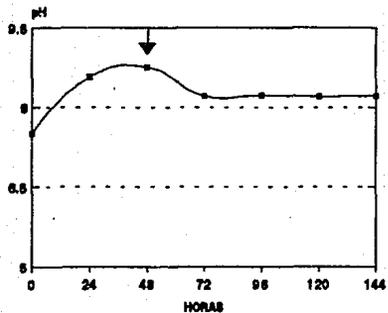
Glutámico 10mM



Glutámico+MS



Glutámico+DOS



Glutámico+MS+DOS

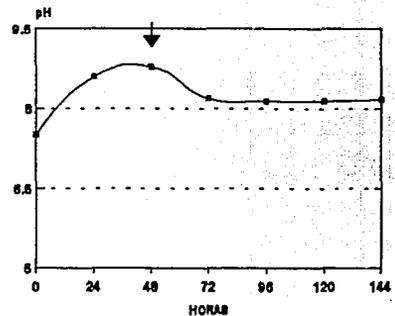


FIG. 17 Diferencias en el pH del medio de cultivo, entre las condiciones del experimento descrito en la figura anterior.

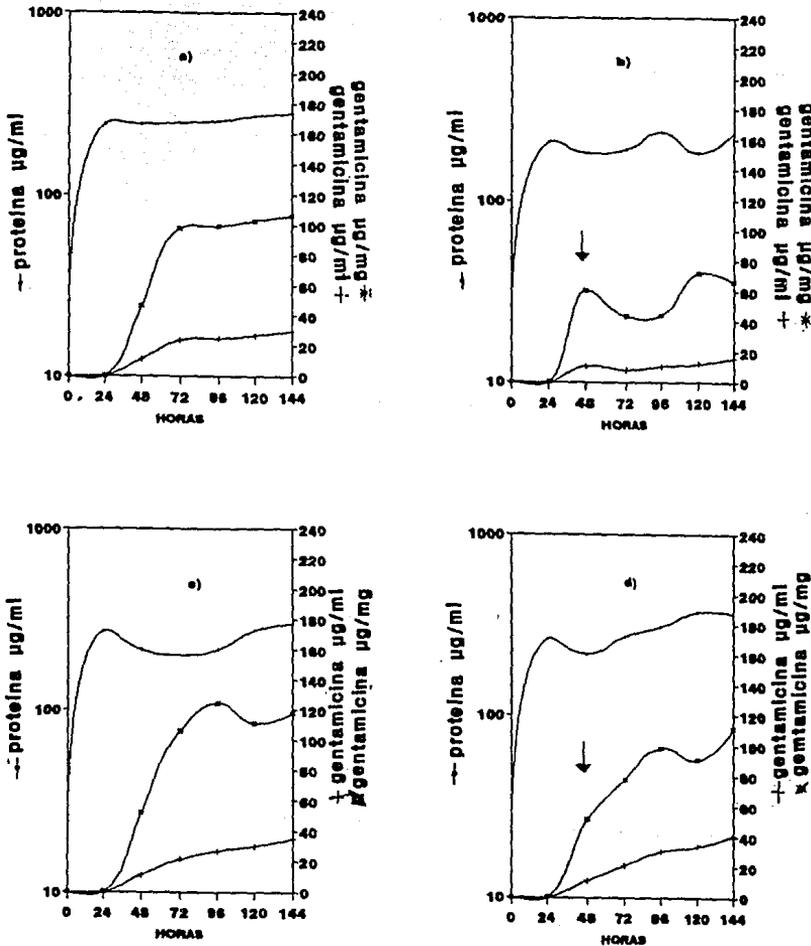
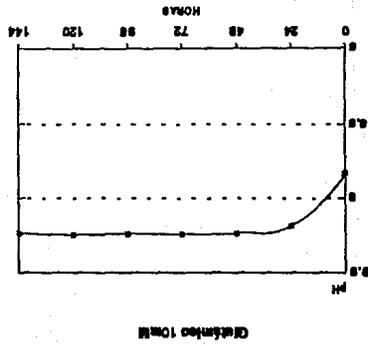
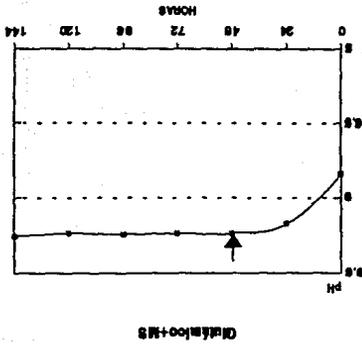
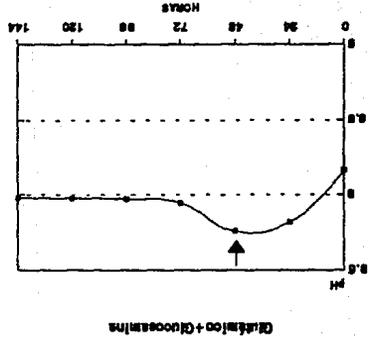
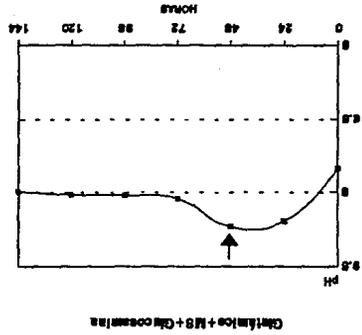


FIG. 18 Efecto de la adición de glucosamina a una fermentación con glutámico como fuente de nitrógeno y sobre una fermentación inhibida con MS. a) control con glutámico 10 mM, sin adición; b) glutámico 10 mM + MS 1 mM, c) glutámico 10 mM + Glucosamina 10 mM y d) glutámico 10 mM + MS + Glucosamina 10 mM. Las adiciones se hicieron a las 48 horas.
 \square Crecimiento $+$ Prpd. volumétrica $*$ Prod. específica

FIG. 19 Diferencias en el pH del medio de cultivo entre las condiciones del experimento descrito en la figura anterior.



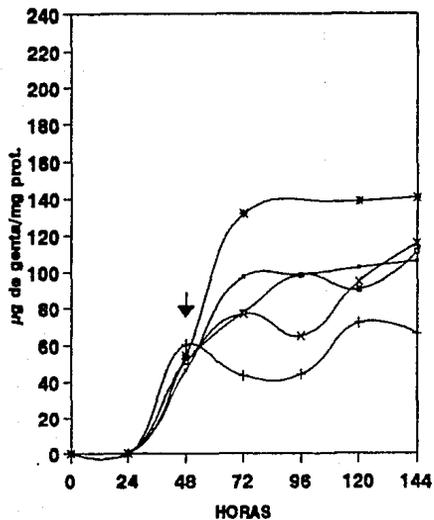


FIG. 20 Reversión del Efecto de MS sobre la producción específica de gentamicina. La adición de MS, DOS y Glucosamina fué a las 48 horas. — Glutámico 10mM - - - Glutámico+MS ··· Glutámico+MS+DOS △ Glit+MS+Glucosamina * Glit+MS+DOS+Glucosami

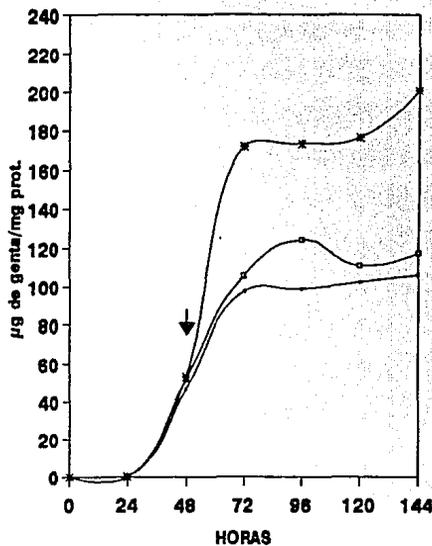


FIG. 21 Efecto de la adición de DOS y Glucosamina sobre la producción específica de gentamicina en medio mínimo con glutámico como única fuente de nitrógeno. La adición de DOS y glucosamina fué a las 48 horas. — Glutámico 10mM * Glutámico+DOS △ Glit+Glucosamina

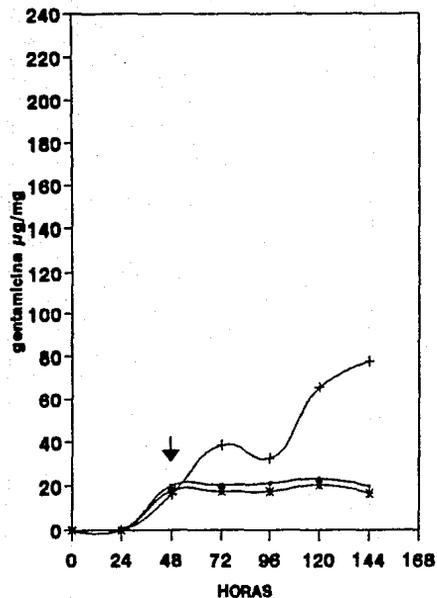


FIG. 22 Efecto de DOS, y glucosamina sobre la producción volumétrica de gentamicina con amonio como fuente de nitrógeno. Todas las adiciones al tiempo 48 horas.

— Amonio + Amonio+DOS * Amonio+Gluc

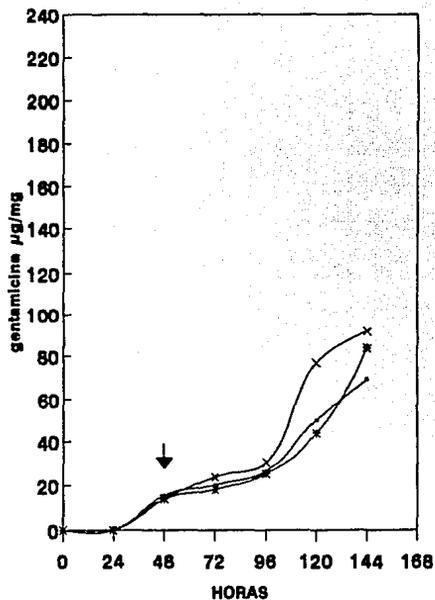


FIG. 23 Efecto de DOS y glucosamina sobre la producción específica de gentamicina con amonio como fuente de nitrógeno. Todas las adiciones se hicieron a las 48 horas.

— Gln * Gln+Glucosamina x Gln+DOS

Efecto de Azaserina (AZAS), sobre la producción de gentamicina.

Azaserina (AZAS), es un análogo de glutamina y un potente inhibidor de las reacciones de transamidación. Entre éstas inhibe Glutamato sintasa (GOGAT) (Kanemoto y Ludden, 1987), y subsecuentemente reduce la velocidad de conversión de glutamina a glutámico causando un aumento en la concentración de glutamina intracelular. Por este motivo, se pensó que sería interesante realizar experimentos utilizando a este análogo, agregándolo a una condición en la que se utilizara glutámico como fuente de nitrógeno y otra condición en la que se utilizara glutamina. Los resultados podemos verlos en la figura 24. En este caso las concentraciones de los aminoácidos fué de 10 mM y Azas se agregó al cultivo a las 48 horas en una concentración de 2 mM. En las primeras horas después de la adición, se nota un ligero aumento de la producción específica, tanto en la condición con glutámico como con glutamina; esta situación podría ser el reflejo de la disminución inmediata que se da en la concentración de proteína, siendo mayor esta disminución en proporción a la producción volumétrica, lo que deriva en que el cálculo de producción específica sea ligeramente mayor al de los controles sin adición. Posteriormente, la producción se mantiene en niveles muy por abajo de los controles, pareciendo que el efecto inhibitorio de azaserina es tardío.

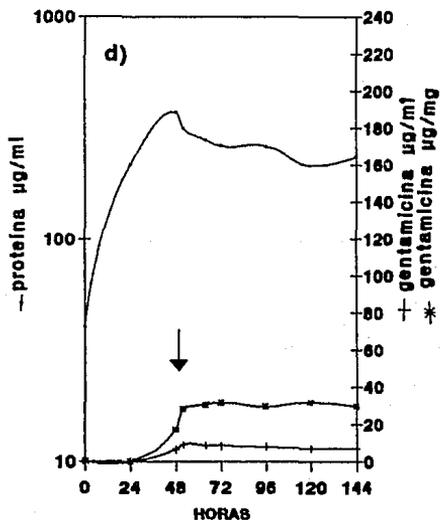
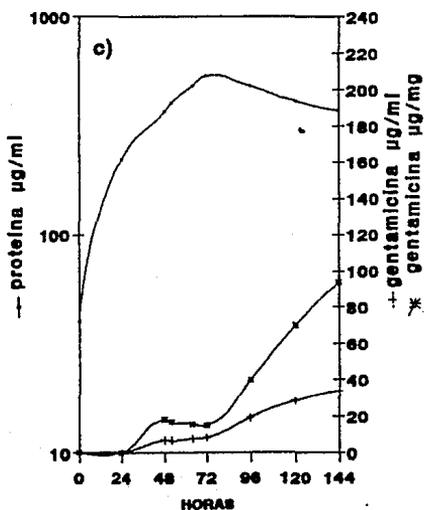
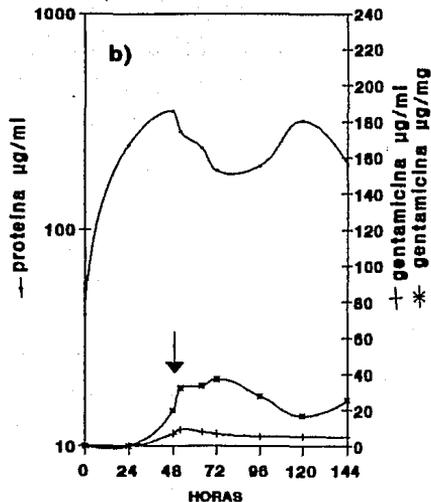
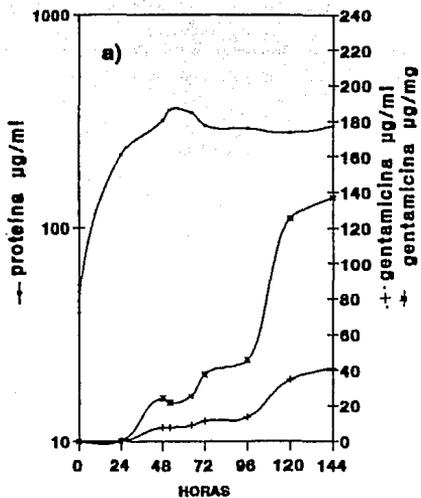


FIG. 24 Efecto de Azaserina sobre el crecimiento y la producción de gentamicina en *M. purpurea*. Las adiciones se hicieron a las 48 horas. a) control con glutámico 10 mM, b) glutámico 10 mM + azaserina 2 mM; c) glutamina 10 mM, d) glutamina 10 mM + azaserina 2 mM.

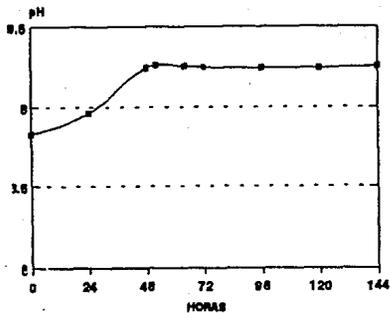
— Crecimiento + Prod. volumétrica * Prod. específica

En presencia de AZAS, tanto en el caso de glutámico, como de glutamina, supuestamente la poza intracelular de glutamina debería estar aumentada. Existen reportes en los cuales se han llegado a tener hasta 10 veces más glutamina intracelular al utilizar AZAS, entre ellos está el caso de *Rhodospirillum rubrum*, en el que se utilizó el inhibidor en un medio de cultivo con glutámico (Kanamoto y Ludden, 1987).

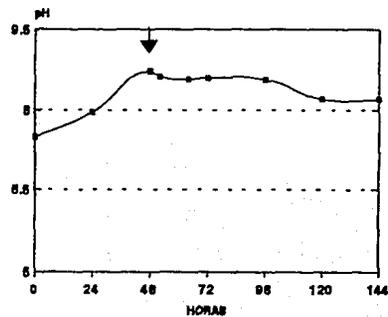
En las condiciones anteriores en las que se utilizó glutamina como fuente de nitrógeno, al adicionar el inhibidor, no se favorece el crecimiento, sin embargo, tampoco logramos favorecer la síntesis del antibiótico.

Esto podría deberse a dos causas: primero que al inhibir GOGAT, y prevenir con ello la acumulación de glutámico, se repercutiría de algún modo en la síntesis de gentamicina, no a través de DOS, ya que la glutamina parece ser el donador directo de los grupos amino de esta molécula, sino en las reacciones adicionales de la vía de síntesis del antibiótico, en las que la molécula adquiere grupos amino de los que se ignora su procedencia; requiriendo así posiblemente de las actividades de enzimas que sean sensibles a AZAS (ver figura 3). En la figura 25 se muestran las curvas de pH durante este experimento, en las que se ve en el caso de glutámico una ligera baja del pH y en el caso de glutamina, el perfil fué prácticamente el mismo.

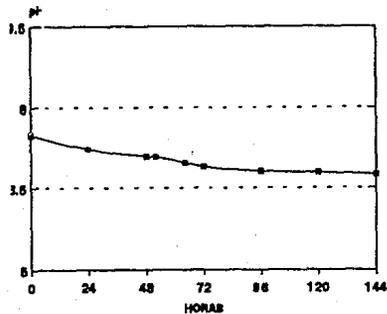
Glutámico



Glutámico+AZAS



Glutamina



Glutamina+AZAS

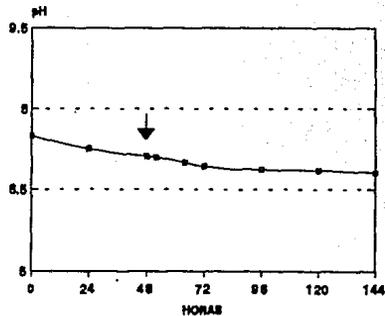


FIG. 25 Efecto de Azaserina sobre el pH del medio durante la producción de gentamicina. Mismas condiciones del experimento descrito en la figura anterior.

Se realizó otra serie de experimentos para observar el efecto de AZAS (1.5 mM) sobre la utilización de algunos intermediarios en la incorporación de éstos en la producción de gentamicina. Se utilizó como fuente de nitrógeno glutamina (10 mM), obteniendo el resultado que se describe en las figuras 26, 27 y 28. De nuevo DOS (10 mM) aparece como el intermediario capaz de aumentar la producción del antibiótico, sin embargo este aumento fué muy ligero, a comparación de los valores obtenidos anteriormente en los que se utilizó este precursor. La adición de glucosamina (10 mM) no produjo ningún cambio en la cinética de producción, por lo que no es por falta de glucosamina que no se produzca la misma cantidad de antibiótico que en las condiciones en donde la síntesis de gentamicina se ve estimulada; ni tampoco por falta de glucosamina es que no aumenta la producción del antibiótico en presencia de AZAS. Estos resultados sugieren que el efecto de azaserina probablemente se encuentra también en pasos posteriores a la formación de DOS y glucosamina. Otra posible explicación es que al aumentar la poza de glutamina se hubiera alcanzado los niveles represivos hacia las enzimas que estuvieran afectadas (si este es el caso).

Es difícil dar una explicación contundente en cuanto al efecto producido por azaserina ya que como se mencionó, esta sustancia es un fuerte inhibidor de amidotransferasas, que tienen que ver incluso con la síntesis de algunos aminoácidos; por lo que quizás se produzcan cambios metabólicos que de algún modo e indirectamente estén afectando los resultados.

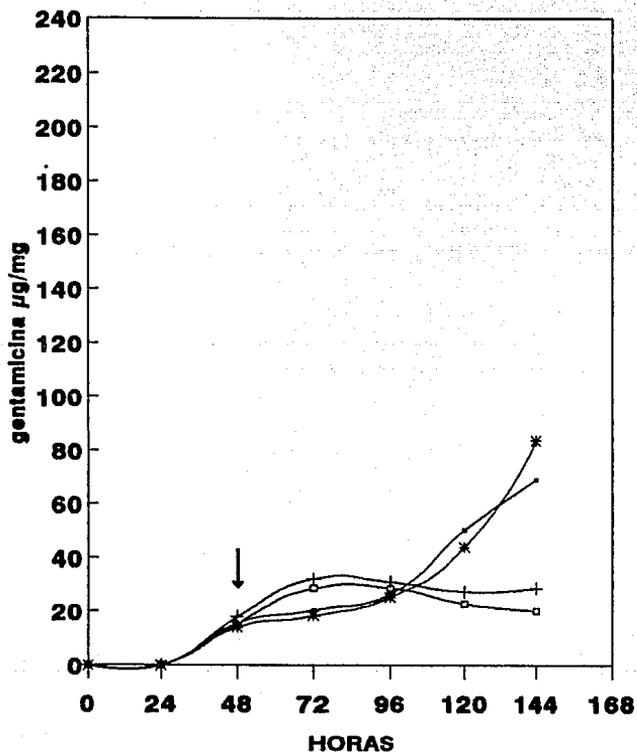


FIG. 26 Efecto de Azaserina y glucosamina sobre la producción específica de gentamicina en un cultivo con glutamina como fuente de nitrógeno. Las adiciones se hicieron a las 48 horas.

— Gln + AZAS * Gln+Glucosamina ◻ Gln+Glucosamina + AZAS

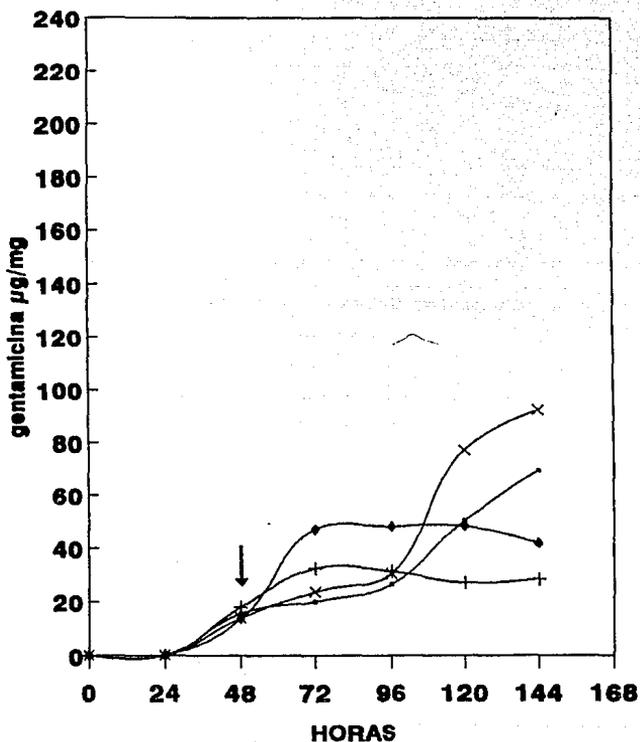


FIG. 27 Efecto de Azaserina y 2-deoxiestreptamina sobre la producción específica de gentamicina en un cultivo con glutamina como fuente de nitrógeno. Las adiciones se hicieron a las 48 horas.

→ Gln + Gln+AZAS * Gln+DOS x Gln+DOS+AZAS

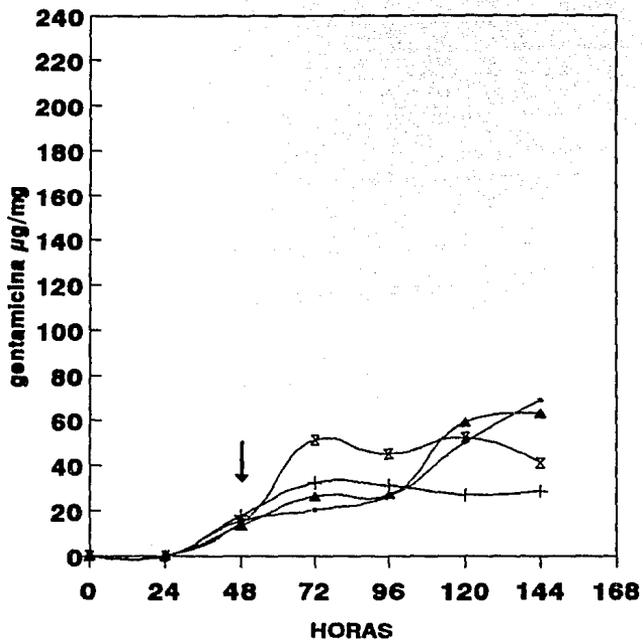


FIG. 28 Efecto de Azaserina, 2-deoxiestreptamina y glucosamina sobre la producción específica de gentamicina en un cultivo con glutamina como fuente de nitrógeno. Las adiciones se hicieron a las 48 horas. — Gln — Gln+AZAS — Gln+DOS+Glucosamina — Gln+DOS+Glucosami+AZAS

CONCLUSIONES.

1. En medio mínimo de producción, con glutámico como fuente de nitrógeno se alcanzan los niveles máximos de producción de gentamicina, tanto en producción específica como volumétrica.
2. Esta estimulación se da a través de la conversión de glutámico por GS a glutamina, ya que al afectar la actividad de GS por MS; la producción del antibiótico llega a disminuir hasta casi un 75%.
3. La discusión anterior nos lleva a la conclusión de que glutamina probablemente sea un precursor de la producción de gentamicina, a través de la formación del intermediario 2-deoxiestreptamina que aparentemente es de los pasos más limitantes en la vía de síntesis del antibiótico.
4. Curiosamente la estimulación en la producción del antibiótico no se da en un medio mínimo con glutamina como fuente de nitrógeno, aún y cuando podrían lograrse pozas elevadas del aminoácido, debido probablemente a que el microorganismo prefiere utilizar este aminoácido para formar biomasa y de algún modo el metabolismo celular limita la dirección de glutamina como precursor del antibiótico hacia el metabolismo secundario. Glutamina entonces, a pesar de ser un sustrato para la vía de síntesis de gentamicina, podría estar actuando incluso como represor de algunas enzimas que estuvieran relacionadas con la síntesis del antibiótico.
5. Al disminuir la producción de gentamicina en las últimas horas de fermentación por efecto de azaserina, podría estarse dando una disminución en la poza de glutámico y aunado al

aumento de la poza de glutamina, esta por si misma estaria afectando la sintesis del antibiótico. No obstante, no se puede descartar que pudieran estarse necesitando reacciones de transamidación para que se lleve a cabo la sintesis de gentamicina, y que estas estuvieran siendo afectadas por la propia azaserina.

6. La formación de glucosamina no parece ser un paso limitante en la biosintesis de gentamicina.

7. Se ha comprobado que las células de *M. purpurea* soportan una incorporación mayor de DOS para utilizarlo en la sintesis de gentamicina en todas las condiciones utilizadas, por lo que parece ser que la sintesis de DOS es al menos uno de los pasos limitantes de la via de formación de gentamicina.

8. La regulación nitrogenada en la biosintesis de gentamicina se da a través de favorecer las reacciones de transaminación o transamidación requeridas lo cual va a depender de la fuente de nitrógeno utilizada para el medio de producción y de la concentración intracelular de glutamina . Los mecanismos a través de los cuales se pueden llegar a favorecer estas reacciones no se logran esclarecer con los resultados obtenidos sin embargo, si marcan una tendencia en cuanto a que muy probablemente la clave de la dirección del metabolismo primario a secundario sean las diferentes formas de utilización de glutamina, por lo que el investigar las vias catabólicas de este aminoácido nos daría más luz en el entendimiento de la regulación nitrogenada sobre la sintesis de gentamicina en *M. purpurea*.

~~SECRET~~

Las ~~características~~ de ~~los~~ ~~microorganismos~~ ~~de~~ ~~esta~~ ~~especie~~ ~~son~~ ~~tales~~ ~~que~~ ~~en~~ ~~estas~~ ~~condiciones~~ ~~de~~ ~~crecimiento~~ ~~la~~ ~~producción~~ ~~de~~ ~~la~~ ~~enzima~~ ~~de~~ ~~esta~~ ~~especie~~ ~~se~~ ~~ve~~ ~~afectada~~ ~~por~~ ~~la~~ ~~complejidad~~ ~~de~~ ~~los~~ ~~factores~~ ~~que~~ ~~intervienen~~ ~~en~~ ~~el~~ ~~metabolismo~~ ~~secundario~~ ~~como~~ ~~por~~ ~~las~~ ~~condiciones~~ ~~de~~ ~~la~~ ~~cepa~~ ~~en~~ ~~la~~ ~~que~~ ~~se~~ ~~está~~ ~~estudiando~~.

1. Estudiar las vías de utilización tanto de glutámico como de glutámico, ya que el conocer como se metabolizan estos aminoácidos en las condiciones de producción, nos podría dar un indicio de hacia donde y en que momento se utilizan preferencialmente.

2. Como se mencionó en la parte de subcultivos de este proyecto, el estudio de los sistemas que participan en la asimilación de amonio y como se regulan, también nos ayudaría a poder inferir el comportamiento de la célula bajo ciertas condiciones.

3. Obtener cepas mutantes, por ejemplo si tenemos una cepa deficiente en GE, sería interesante si se puede producir o no en la regulación del metabolismo y si se puede producir o no en la regulación del metabolismo y si se puede producir o no en la regulación del metabolismo.

4. Realizar experimentos, a fin de determinar si ~~los~~ ~~microorganismos~~ ~~de~~ ~~esta~~ ~~especie~~ ~~son~~ ~~tales~~ ~~que~~ ~~en~~ ~~estas~~ ~~condiciones~~ ~~de~~ ~~crecimiento~~ ~~la~~ ~~producción~~ ~~de~~ ~~la~~ ~~enzima~~ ~~de~~ ~~esta~~ ~~especie~~ ~~se~~ ~~ve~~ ~~afectada~~ ~~por~~ ~~la~~ ~~complejidad~~ ~~de~~ ~~los~~ ~~factores~~ ~~que~~ ~~intervienen~~ ~~en~~ ~~el~~ ~~metabolismo~~ ~~secundario~~ ~~como~~ ~~por~~ ~~las~~ ~~condiciones~~ ~~de~~ ~~la~~ ~~cepa~~ ~~en~~ ~~la~~ ~~que~~ ~~se~~ ~~está~~ ~~estudiando~~.

RECOMENDACIONES

Las alternativas de continuación de este trabajo son varias, ya que aún falta mucho para poder conocer la regulación de la síntesis de este antibiótico. Esto es debido en parte a la complejidad que presenta tanto el estudio de la regulación de un metabolito secundario como por las características intrínsecas de la cepa en la que se está estudiando.

1. Estudiar las vías de utilización tanto de glutamina como de glutámico, ya que el conocer como se catabolizan estos dos aminoácidos en las condiciones de producción, nos podría dar un indicio de hacia donde y en que momento se dirigen preferencialmente.

2. Como se mencionó en la parte de antecedentes de este proyecto, el estudio de las enzimas que participan en la asimilación de amonio y como se regulan, también nos ayudaría a poder inferir el comportamiento de la célula bajo ciertas condiciones.

3. Obtener cepas mutantes, por ejemplo el obtener una cepa deficiente en GS, podría indicarnos si esta enzima participa o no en la regulación del antibiótico y/o también dosificar a glutamina como sustrato del antibiótico para lograr mayores volúmenes de producción.

4. Diseñar experimentos, a fin de esclarecer el efecto de glutamina sobre las enzimas que intervienen directamente en la vía de síntesis del antibiótico; ya que sería interesante comprobar si realmente este aminoácido podría estar actuando como represor.

5. Continuar con los estudios bioquímicos que iniciaron Lucher y cols., sobre la enzima L-glutamina-scilo-inositol-aminotransferasa con la idea de poder purificarla a homogeneidad y así tratar de localizar el gene que codifica para esta proteína y estudiar la regulación directamente en su expresión.

6. Se requiere también, de caracterizar los demás pasos de la vía de síntesis de gentamicina para poder conocer cuales podrían ser los pasos limitantes en la misma, además de la formación del precursor DOS.

7. Los genes de resistencia a gentamicina, en *M. purpurea* ya fueron clonados por Kelemen y cols., (1991) sin embargo no se menciona en las publicaciones hasta la fecha si estos se localizaron adyacentes a los genes de biosíntesis para este antibiótico; definitivamente sería de suma importancia tanto desde el punto de vista industrial como académico poder realizar la clonación de la vía de síntesis completa.

8. Las diferencias en los niveles de producción de la cepa utilizada dificultan el manejo de la misma durante los experimentos, por lo que se recomienda buscar las condiciones en las cuales la cepa se comporte en forma estable.

REFERENCIAS

- Abou-Zeid, A.A., Wahab, A.E. y Salem, H.M. 1976. Influence of some compounds on gentamicin formation by Micromonospora purpurea. J. Appl. Chem. Biotechnol. 26:318-322.
- Aharonowitz, Y. 1980. Nitrogen Metabolite Regulation of Antibiotic Biosynthesis. Ann. Rev. Microbio. 34:209-233.
- Berdy, J. y Jarai, M. 1986a. Micromonospora produced aminoglycoside antibiotics: Chemistry and Microbiology. Process Biochemistry. Junio:93-100.
- Berdy, J. y Jarai, M. 1986b. Micromonospora produced aminoglycoside antibiotics: Chemistry and Microbiology. Part II. Process Biochemistry. Agosto:103-106.
- Braña, A.F., Wolfe, S., Demain, A.L. 1985. Ammonium repression of cephalosporin production by Streptomyces clavuligerus. Can. J. Microbiol. 31:736-743.
- Braña, A.F., Paiva, N., y Demain, A.L. 1986. Pathways and Regulation of Ammonium Assimilation in Streptomyces clavuligerus. J. Gen. Microbiol. 132:1305-1317.
- Braña, A.F., Demain, A.L. 1988. Nitrogen Control of Antibiotic Biosynthesis in Actinomycetes. En: Nitrogen Source Control of Microbial Processes. Sergio Sanchez-Esquivel (ed.) CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA. Pp. 99-119.
- Brown, C. M. 1980. Ammonia Assimilation and Utilization in Bacteria and Fungi. En: Microorganisms and Nitrogen Sources J. W. Payne ed. pp 511-535.
- Byrne, K.M., Kershner, A.S., Maehr, H., Marquez, J.A., Schaffner, C.P. 1977. Separation of gentamicin C-complex into five components by Craig distribution. J. Chromatography 131: 191-203.
- Carvajal, F. 1957. Production of Streptomycin by culture immune to phage. United States Patent Office. N 2,808,364. Patented Oct. 1, 1957.
- Chen, Yu-ming and Walker, James B. 1977. Transaminations involving keto- and amino-inositols and glutamine in actinomycetes which produce gentamicin and neomycin. Biochem. and biophys. research communications, 77(2): 688-692.
- Chermenskii, y cols., 1991. Avermectins: Biotechnological characteristics of the producing strain Streptomyces avermitilis VKM Ac1301. Applied Biochem. & Microbiol. Vol. 27, No.6 p:635.

Chipeva, V., Dumanova, E., Todorov, TS., e Ivanova, I. 1991. Impact of Nitrogen Assimilation on Regulation of Antibiotic Production in Streptomyces hygroscopicus 155. Antibiot-Khimioter; Mar:36(3); p 5-8. (Abstract)

Davis, Bernard D. 1987. Mechanism of Bactericidal Action of Aminoglycosides. Microbiol. Reviews 51:341-350.

Demain, A.L., Kennel, Y. M., and Aharonowitz, Y. 1979. Carbon catabolite regulation of secondary metabolism, en: Microbial Technology; Current State and Future Prospects, Bull, A.T., Ellwood, D.C., and Ratledge, C., Eds., Cambridge University Press, Cambridge. p 163.

Doull, JL, Vining, LC. 1990. Nutritional control of actinorhodin production by Streptomyces coelicolor A3(2): Suppressive effects of Nitrogen and Phosphate. Appl. Microbiol. Biotechnol.; vol.32, No. 4, Pp. 449-454.

Escalante, Laura. 1988. Efecto de la Fuente de Carbono sobre la Biosintesis de gentamicina en Micromonospora purpurea NRRL-2953. Tesina para obtener el diploma de Especializacion en Biotecnologia. Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM. Mexico, D.F.

Escalante Laura, Gonzalez Rina, Obregon Ana Maria y Sanchez Sergio. 1992. Carbon Catabolite Regulation of Gentamicin Formation. J. Antibiotics. 45:465-469.

Fisher, Susan H. 1988. Nitrogen Assimilation in Streptomyces. En: Biology of Actinomycetes '88 Okami Yoshiro y cols., ed. Japan Scientific Societies Press. Pp 47-50.

Fisher, Susan H. 1989. Glutamate Synthesis in Streptomyces coelicolor. J. Bacteriol. 171(5):2372-2377.

Fisher, Susan H., y Wray, Lewis V.JR. 1989. Regulation of Glutamine Synthetase in Streptomyces coelicolor. J. Bacteriol. 171(5):2378-2383.

Fisher, Susan H. 1992. Glutamine synthesis en Streptomyces-a review. Gene, 115 pp 13-17.

Ferguson, A.R., and Sims, A.P. 1974. The regulation of glutamine metabolism in *Candida utilis*: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. J.Gen Microbiol. 80:159-171.

Glasby, J.S. 1979. Encyclopaedia of Antibiotics. Segunda edicion. John Wiley and Sons. N.Y. USA. Pp:233-235

Gräfe, U., Relevance of microbial nitrogen metabolism to production of secondary metabolites. En: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, V., Sikyta, B., and Vanek, Z., Eds., Academic Press, London. p 63.

Griffith, Owen W., Meister, Alton. 1978. Differential Inhibition of Glutamine and gamma-Glutamylcysteine Synthetases by alfa-Alkyl Analogs of Methionine Sulfoximine that Induce Convulsions. J. Biol. Chem. 253(7):2333-2338.

Hasegawa, Mamoru. 1992. A novel, highly efficient gene-cloning system in Micromonospora applied to the genetic analysis of fortimicin biosynthesis. Gene 115:85-91.

Inoue, S., Nishizawa, Y., y Nagai, S. 1983. Stimulatory Effecto of Ammonium on Streptomycin Formation by Streptomyces griseus Growing on a Glucose Minimal Medium. J. Ferment. Technol., Vol.61, No.1, p.7-12.

Islas, Laura. 1991. Efecto de la Fuente de Nitrogeno en la Produccion Fermentativa de Gentamicina. Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnologia. Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM. Mexico, D.F.

Kakinuma, K., Owawa, Y., Sasaki, T., Seto, H., Otake, N. 1989. Mechanism and seterochemistry of the biosynthesis of 2-deoxystreptamine and neosamine C. J. Antibiotics 42(6):926-933.

Kanemoto, H. R., y Ludden, Paul W. 1987. Amino acid concentrations in Rhodospirillum rubrum during expression and switch-off of nitrogenase activity. J. Bact. Julio:3035-3043.

Kase, H., Iida, T., Odakura, Y., Shirahata, K. y Nakayama, K. 1980. Accumulation of 2-deoxyscillo-inosamine by a 2-deoxystreptamine-requiring idiotroph of Micromonospora sagamiensis. J. Antibiotics 33:1210-1212.

Kase, H., Odakura, Y., y Nakayama, K. 1982. Sagamicin and the related aminoglycosides: fermentation and biosynthesis. I. Biosynthetic Studies with the Blocked Mutants of Micromonospora sagamiensis. J. Antibiotics 35(1): 1-9.

Kelemen, G.H., Cundliffe, E., y Financsek, I. 1991. Cloning and characterization of gentamicin-resistance genes from Micromonospora purpurea and Micromonospora rosea. Gene 98:53-60.

Khaoua, S., Lebrihi, A., Germain, P., y Lefebvre, G. 1991. Cephamycin C biosynthesis in Streptomyces cattleya: nitrogen source regulation. Appl. Microbio. Biotechnol. 35:253-257.

- Kirpekar, AC., y Kirwan, DJ., y Stieber, RW. 1991. Effects of Glutamate, Glucose, Phosphate, and Alkali Metal Ions on Cephamycin C Production by Nocardia lactamdurans in Defined Media. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 38, Pp. 1100-1109.
- Lee, B.D., Condon, R.G., Wagman, G.H. y Katz, E. 1976. Micromonospora produced gentamicin components. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 9:151-159.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L.; y Randall, R.J. 1951. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- Lucher, L.A., Chen, Y. y Walker, J.B. 1989. Reactions catalized by purified L-glutamine> keto-scyllo-inositol aminotransferase, an enzyme required for biosynthesis of aminocyclitol antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 33:452-459.
- Magazanik, Boris. 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. Ann. Rev. Genet. 16: 135-68.
- Martin, Juan F. 1989. Molecular Mechanisms for the Control by Phosphate of the Biosynthesis of Antibiotics and Other Secondary Metabolites. En: Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes. S. Shapiro ed. CRC Press. pp 213-237.
- Masuma, R., Tanaka, Y., y Omura, S. 1983. Ammonium Ion-Depressed Fermentation of Tylosin by the Use of a Natural Zeolite and Its Significance in the Study of Biosynthetic Regulation of the Antibiotic. J. Ferment. Technol., Vol. 61, No.6, p. 607-614.
- Marzluf, George A., Fu, Ying-Hui. 1988. Genetic and Metabolic Regulation of Nitrogen Metabolism in Neurospora crassa. En: Nitrogen Source Control of Microbial Processes, Sergio Sanchez-Ezquivel ed. CRC Press. pp 83-98.
- Obrigón, Ana-Maria. 1991. Efecto del fosfato en la producción fermentativa del antibiótico gentamicina. Tesis de Maestría en biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México.
- Odakura, Y., Kase, H. y Nakayama, K. 1983. Sagamicin and the related aminoglycosides: Fermentation and biosynthesis. III. Isolation and characterization of Micromonospora sagamiensis mutants blocked in gentamicin C1 pathway. J. Antibiotics 36:125-130.
- Porter, J.M. 1975. Cultural conditions for antibiotic producing microorganisms. En: Methods in Enzymology. Ed. Hash, J.H. 43:3-23.

Rinehart, K.L., y Stroshane, R.M. 1976. Biosynthesis of aminocyclitol antibiotics. The J. Antibiotics 39:319-333.

Rosner, A., Aviv, Haim. 1980. Gentamicin Bioautography assay VS. The Microbiological Disk Test. J. Antibiotics 33(6):600-603.

Sanchez, S., R.C. Mateos, L. Paniagua, F. Lara y Jaime Mora. 1981. Nitrogen regulation of penicillin G production in Penicillium chrysogenum. En Advances in Biotechnology. III. Fermentation Products. Eds., M. Moo-Young & C. Vezina, pp. 147-154, Pergamon Press,

Shapiro, S., y L.C. Vining. 1983. Nitrogen metabolism and chloramphenicol production in Streptomyces venezuelae. Can. J. Microbiol. 29:1706-1714.

Shapiro, S. 1989. Nitrogen Assimilation in Actinomycetes and the Influence of Nitrogen Nutrition on Actinomycete Secondary Metabolism. En: Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes. S.Shapiro ed. CRC Press. Pp 135-211.

Schultz Nancy A., y Benson David R. 1990. Enzymes of Ammonia Assimilation in Hyphae and Vesicles of Frankia sp. Strain Cp11. J. Bacteriol. 172(3):1380-1384.

Steimer-Veale, K., y Brenchley, Jean E. 1974. Characterization of Salmonella typhimurium strains sensitive and resistant to methionine sulfoximine. J. Bact. 119(3):848-856.

Streicher, Stanley L., y Tyler Bonnie. 1981. Regulation of glutamine synthetase activity by adenylation in the Gram-positive bacterium Streptomyces cattleya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78(1):229-233.

Suzukake, K., Tokunaga, K., Hayashi, J. y Hori, M. 1985. Biosynthesis of 2-deoxystreptomine. J. Antibiotics 38: 1211-1218.

Testa, R.T., y Tilley, B.C. 1976. Biotransformation, a new approach to aminoglycoside biosynthesis: II Gentamicin. J. Antibiotics 29:140-146.

Tyler, Bonnie. 1978. Regulation of the Assimilation of Nitrogen Compounds. Ann. Rev. Biochem. 47:1127-62.

Vancurova, I., Vancura, A., Volc, J., Kopechy, J., Neuzil, J., Basarova, G., y Behal, V. 1989. Purification and Properties of NADP-dependent Glutamate Dehydrogenase from Streptomyces fradiae. J. Gen. Microbiol. 135:3311-3318.

Wagman, G.H. y Weinstein, M.J. 1980. Antibiotics from Micromonospora. Ann. Rev. Microbiol. 34: pp. 537-557.

Weinstein, M.J., Wagman, G. H., Oden, E.E. y Marquez, J.A. 1967. Biological Activitie of the Antibiotic Components of the Gentamicin Complex. J. of Bacteriology. 94:789-790.