



2
Zeje.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

" MEJORAMIENTO GENETICO DE *Saccharopolyspora
erythraea* POR FUSION DE PROTOPLASTOS PARA
LA OBTENCION DE ANTIBIOTICOS "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A :
BIOL. GABRIELA GONZALEZ CERON

DIRECTORA DE TESIS:
DRA MARIA ELENA FLORES CARRASCO

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"Ayer es solo un sueño
mañana solo una visión,
pero el hoy bien vivido hace
que ayer sea un sueño de felicidad
y cada mañana una visión de esperanza.
Vive bien, por lo tanto, este día.
No hay nada demasiado bueno para que no lo poseas,
ninguna altura que no conviertas en realidad
tu poder es mayor que tu pensamieto,
es algo que debes sentir dentro de tí.
No debes temer nada, tu propio ser sabe
que tú eres tu propio ser infinito;
por tanto fija tu mente en la meta más alta,
no existe nada que no puedas hacer."

"El hombre que sabe como ha de leer, tiene en sus manos el poder para engrandecerse, multiplicar los rumbos de su existencia y dar a su vida plenitud, significación e Interés." Aldous Huxley.

El amor al estudio es vínculo grato y universal, pues el estudio trata de lo que es uno y no de lo que uno tiene. Freya Stark.

Con decisión aférrate a tu sueño, pues si de tí lograra el escapar, su existencia sería como ave herida, incapaz de volar. Langston Hughes.

NO SABEMOS quiénes somos hasta que vemos lo que somos capaces de hacer. Martha Grimes.

DEDICATORIAS.

*La mejor herencia que puede un padre dejar a sus hijos
es un poco de su tiempo cada día. O. A. Battista.*

A mis padres Ramón y Tofita por habernos dado la vida, su amor, apoyo y guía para superarnos, invaluable **GRACIAS.**

A mis hermanos Ramón, Carlos, Arturo y Alma por su paciencia, comprensión y apoyo, durante toda mi vida.

Las metas son sueños con límite de tiempo. Diana Schaufhaun.

Importa qué decimos no qué dirán. José Martí.

*La vida es un caballo, y de ti depende llevar las riendas, o
bien que ella te lleve a su estajo. Gregory McDonald.*

A mis Cuñadas, Sobrinas, Sobrinos, Tías, Tíos, Primos, que de alguna manera me han prestado su ayuda.

Al Sr. Rodolfo y la Sra. Guadalupe y sus Hijas, muy especialmente a Laura, que son como de la familia.

A la memoria de Irma (q.e.p.d.) que se adelantó por el camino que todos hemos de recorrer algún día; pero que me dejó la invaluable amistad de Norma.

A mis amigos Alma, Paty, Carmen Parra y Oscar por su comprensión y ayuda.

A todas y cada una de las personas que de una u otra forma me prestaron su ayuda y comprensión.

AGRADECIMIENTOS.

Esta Tesis se elaboró en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (I.I.B.), Departamento de Biotecnología, U.N.A.M. bajo la dirección de la Dra. María Elena del Carmen Flores Carrasco a la que le agradezco el apoyo, confianza, amistad y guía para la realización de este trabajo.

Agradezco a los Doctores Carlos Huitrón Vargas, Dra. Alicia González Manjarrez, Dr. Hermilo Leal Lara, Dra. Laura Estela Castrillón Rivera, Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz y la M. en C. Luisa Alba Lois, por la revisión crítica de esta Tesis, por sus sugerencias y por su colaboración para que saliera adelante este escrito.

Quisiera agradecer de manera especial a D.G.A.P.A. U.N.A.M. por el apoyo otorgado para llevar a término los estudios de Maestría.

Agradezco a la M. en C. Hortensia Lemus Díaz y a la Biol. Rosa Elena Cardoza Silva por sus recomendaciones para la optimización de mi trabajo y por su valiosa amistad.

Agradezco de manera especial a la Biol. Laura Escalante Dávila y a la M. en C. Elizabeth Ponce Rivas por la ayuda prestada en la realización de algunas determinaciones del trabajo, así como por el apoyo, amistad y ternura que otorgaron a mi persona.

Agradezco al Q. Agustín Reyo por la realización de los registros del H.P.L.C. durante la parte experimental de este trabajo.

Agradezco profundamente al Biol. Oscar Cesar Santoyo Martínez por la elaboración de este escrito, las figuras, tablas, gráficas, imágenes digitalizadas y en general la presentación de esta Tesis.

Agradezco también al personal del I.I.B. que facilitaron mi trabajo, especialmente al personal de Compras, Almacén, Biblioteca, a Eduardo, Tere, Margarita, Doña Guille, Lulu, al señor José del Departamento de Fotografía, a Angeles la secretaria y a la Técnica Carmen López.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
ANTECEDENTES.....	4
Protoplastos.....	4
Eritromicina.....	13
Vía Biosintética.....	14
Resistencia a Antibióticos en General.....	25
Regulación de la Producción de Eritromicina.....	28
OBJETIVOS.....	30
MATERIAL Y METODOS.....	31
a) Cepas Bacterianas.....	31
b) Mantenimiento de las Cepas.....	31
c) Formación de Protoplastos.....	31
d) Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI).....	33
e) Fusión de Protoplastos.....	33
f) Caracterización de los Híbridos.....	33
i) Cuantificación de la Eritromicina.....	33
ii) Crecimiento.....	34
iii) Extracción del Antibiótico.....	34
iv) Cromatografía.....	34
RESULTADOS Y DISCUSION.....	35
CONCLUSIONES.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	60

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

TABLAS

Tabla No. 1	Producción de eritromicina.....	3
Tabla No. 2	Ejemplos de fusión de protoplastos en Actinomicetos.....	6
Tabla No. 3	Ejemplos de fusión de protoplastos en hongos.....	8
Tabla No. 4	Ejemplos de fusión de protoplastos en bacterias.....	10
Tabla No. 5	Enzimas modificadoras de antibióticos presentes en productores.....	25
Tabla No. 6	Metilación del RNA ribosomal asociado a la resistencia a antibióticos aislados de Actinomicetos.....	26
Tabla No. 7	Modificación de los sitios blanco no ribosomales causantes de la resistencia en microorganismos productores de antibióticos.....	26
Tabla No. 8	Medios de regeneración.....	32
Tabla No. 9	Formación de protoplastos.....	36
Tabla No. 10	Regeneración de protoplastos.....	37
Tabla No. 11	Concentración mínima inhibitoria.....	38
Tabla No. 12	Fusión de protoplastos método de selección.....	40
Tabla No. 13	Fusión de protoplastos.....	40
Tabla No. 14	Fusión de protoplastos método de selección.....	50
Tabla No. 15	Concentración mínima inhibitoria.....	51
Tabla No. 16	Fusión de protoplastos.....	52
Tabla No. 17	Fusión de protoplastos.- Producción de eritromicina del 5º día de fermentación.....	57

FIGURAS

Figura No. 1.-	Estructura química de la eritromicina.....	13
Figura No. 2.-	Vía biosintética de la eritromicina.....	15
Figura No. 3a.-	Biosíntesis de 6-desoxieritronólido B.....	23
Figura No. 3b.-	Mapa físico de los genes de biosíntesis de eritromicina de <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	24
Figura No. 4.-	Regulación de la biosíntesis de eritromicina.....	29
Figura No. 5.-	Formación de protoplastos en función del tiempo de crecimiento de <i>Streptomyces kanamyceticus</i> en MC + glicina.....	35
Figura No. 6.-	Curva de sensibilidad a estreptomina de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338 en medio completo (porción superior) y medio de regeneración (porción inferior).....	39
Figura No. 7.-	Híbridos de la fusión de protoplastos de <i>S. erythraea</i> B-107 y <i>S. erythraea</i> CA-340 en medio completo más los marcadores (gentamicina y rifamicina).....	41
Figura No. 8.-	Híbridos de la fusión de protoplastos de <i>S. erythraea</i> NRRL 2338 y <i>Streptomyces kanamyceticus</i> en medio de regeneración MRK conteniendo rifamicina y eritromicina.....	41
Figura No. 9.-	Crecimiento y producción de la fusión de protoplastos de <i>S. erythraea</i> B-107 y <i>S. erythraea</i> CA-340.....	43

Figura No. 10.- Cromatografía en Placa Fina de los extractos de las muestras del 5º día de fermentación de las cepas <i>S. erythraea</i> B-107, <i>S. erythraea</i> CA-340 y sus híbridos.	44
Figura No. 11.- HPLC de los estándares de eritromicinas.	45
Figura No. 12.- HPLC de las eritromicinas producidas por <i>S. erythraea</i> B-107.	45
Figura No. 13.- HPLC de las eritromicinas producidas por <i>S. erythraea</i> C-340.	46
Figura No. 14.- HPLC del Fusante H1.	46
Figura No. 15.- HPLC del Fusante H2.	46
Figura No. 16.- HPLC del Fusante H3.	46
Figura No. 17.- HPLC del Fusante H4.	47
Figura No. 18.- Crecimiento y producción de la fusión de protoplastos de <i>S. erythraea</i> NRRL 2338 y <i>S. kanamyceticus</i> y sus híbridos.	48
Figura No. 19.- Cromatografía en Placa Fina de los estándares de eritromicina, de los extractos de las muestras del 5º día de fermentación de las cepas <i>S. erythraea</i> NRRL2338 y de los híbridos obtenidos de <i>S. erythraea</i> NRRL 2338 con <i>Streptomyces kanamyceticus</i>	49
Figura No. 20.- Híbridos de la fusión de protoplastos de <i>S. erythraea</i> B-107 y <i>S. erythraea</i> CA-340 en medio de regeneración más los marcadores.	52
Figura No. 21.- Crecimiento y producción de la fusión de protoplastos de <i>S. erythraea</i> CA-340, <i>S. erythraea</i> B-107, y sus híbridos.	53 y 54
Figura No. 22.- Híbridos de la fusión de protoplastos de <i>S. erythraea</i> B-107 y <i>S. erythraea</i> NRRL-2338 en medio de regeneración más los marcadores.	55
Figura No. 23. Crecimiento y producción de la fusión de protoplastos de <i>S. erythraea</i> NRRL2338, <i>S. erythraea</i> B-107, y sus híbridos.	55 y 56

ABREVIATURAS.

- ↑.- Concentraciones Mayores de.
—.- No Realizado.
- 3MEB:** 3-O-micarosil eritronólido B
6DEB: 6-desoxieritronólido B.
A: Apramicina
AAC: Aminoglucósido Acetiltransferasa.
ACP: Proteína Acarreadora de Acilos.
Am: 2'-O-metiladenosina.
AMG: Aminoglucósidos
APH: Aminoglucósido Fosfotransferasa.
AT: Aciltransferasa.
CAC: Capreomicina Acetiltransferasa.
CMI: Concentraciones Mínimas Inhibitorias.
CPH: Capreomicina Fosfotransferasa.
DDV: Dehidrodivanilina.
DEBS: 6-desoxieritronólido B sintasa.
DH: Dehidratasa.
DNA: Acido Desoxirribonucleico.
DO: Densidad Optica.
DPAT(PAT): Dimetilfosfinotricina (o Fosfinotricina) Acetiltransferasa.
EB: Eritronólido B.
EF: Factor de Elongación.
ER: Enoilreductasa.
G: Gentamicina
HPH: Higromicina Fosfotransferasa.
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography)
ile: Isoleucina
K: Kanamicina.
kDa: Kilodalton.
KR: β-ketoreductasa.
KS: β-ketoacil.
m¹A: 1-metiladenosina.
m⁶A: N⁶-monometiladenosina.
m⁷G: 7-metilguanosina.
MC: Medio Completo.
MCE: Medio para Conservar Esporas.
µg: Microgramos.
mg: Miligramos.
ml: Mililitros.
MLS: Resistencia Cruzada a Macrólidos, Lincosamidas y Streptograminas B.
MM: Medio Mínimo.
MP: Medio P.
MR: Medio de Regeneración.
MR1: Medio de Regeneración 1
MR2: Medio de Regeneración 2.
MR2T20: Medio de Regeneración 2T20.
MRK: Medio de Regeneración K.
NAT: Nuorseotricina Acetiltransferasa.
nm: Nanómetros.
NTG: N-metil-N'-nitrosoguanidina.
ORF: Marco de Lectura Abierto (Open Read Frame).
PAC: Puromicina Acetiltransferasa.
PAL: Fenilalanina Amoniliasa.
PEG: Polietilenglicol.
R: Resistencia (µg/ml).
R^E: Resistente a Eritromicina.
R^G: Resistente a Centamicina.
RNA: Acido Ribonucleico de Transferencia.
R^O: Resistente a Oleandomicina.
R^R: Resistente a Rifamicina.
rRNA: Acido Ribonucleico Ribosomal.
R^S: Resistente a Spiramicinas.
R^T: Resistente a Tilosina.
S: Sensibilidad (µg/ml).
SDS: Docecil Lauril Sulfato de Sodio.
S^E: Sensible a Eritromicina.
S^G: Sensible a Gentamicina.
SPH: Estreptomina Fosfotransferasa.
S^R: Sensible a Rifamicina.
STAT: Estreptotricina Acetiltransferasa.
std: Estándar.
SU: Unidad Sintasa.
TAAB.- Tiempo de Adición de los Antibióticos.
TCA: Acido Tricloroacético.
TDP-D-desosamina: Timidina Difosfo-D Desosamina.
TDP-L-micarosa: Timidina Difosfo-L Micarosa.
TE: Tioesterasa.
TLC: Cromatografía en Capa Fina (Thin Layer Chromatography).
UV: Luz Ultra Violeta.
VPH: Viomicina Fosfotransferasa.

RESUMEN

La fusión de protoplastos inducida por polietilenglicol (PEG), es un método eficiente para producir cepas recombinantes en cruza intraespecie dentro del grupo de Actinomicetos, particularmente en especies del género *Streptomyces*. Además de la ventaja de alta frecuencia de recombinación, la fusión de protoplastos vence la necesidad de transferencia de cromosomas mediada por un factor sexual y problemas potenciales asociados con el tipo de apareamiento o factores de incompatibilidad que pueden limitar el uso de procedimientos de acoplamiento. La fusión de protoplastos también provee una vía útil potencialmente para combinar características de cepas divergentes o especies diferentes para mejorar el rendimiento de productos comerciales, desarrollo de vías biosintéticas híbridas y producción de estructuras químicas nuevas (Mirdamadi-Tehrani et al., 1992).

La Eritromicina fue descubierta en 1952 por McGuire et al., y la compañía Eli Lilly, fue obtenida del cultivo de *Saccharopolyspora erythraea* (antes *Streptomyces erythreus*) (Seno & Hutchinson, 1986; Higashide, 1984).

El interés a nivel mundial en la investigación sobre la manipulación genética, clonación de los genes responsables de la biosíntesis de los antibióticos, la generación de antibióticos híbridos y la regulación de la producción de los microorganismos sigue incrementándose. En este sentido, en el caso particular de eritromicina a la fecha se han clonado casi todos los genes de la biosíntesis, sin embargo nada se ha reportado de su regulación ni tampoco se ha reportado la fusión de protoplastos intraespecíficos e intergenéricos de *Saccharopolyspora erythraea* y otros microorganismos. Es por estas razones que los objetivos de este trabajo fueron: mejoramiento genético de *Saccharopolyspora erythraea* mediante la obtención de cepas híbridas a través de fusión de protoplastos intraespecíficos e intergenéricos.

Después de montar las condiciones necesarias para formar, fusionar y regenerar protoplastos de diferentes cepas de *Streptomyces*, se obtuvieron 4 colonias híbridas de la fusión de protoplastos intraespecíficos de *Saccharopolyspora erythraea* B-107 y *Saccharopolyspora erythraea* CA-340, en los que se seleccionó una doble resistencia a los antibióticos. Estos híbridos producen eritromicina C a diferencia de una de las cepas parentales CA-340 que produce principalmente eritromicina A. También se obtuvieron 2 híbridos de la fusión de protoplastos intergenéricos de *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 y *Streptomyces kanamyceticus*. Los que producen cuando menos eritromicina A.

Adicionando los antibióticos a diferentes tiempos, después de realizar la fusión de protoplastos, se logró aumentar el número de híbridos obtenidos. Se obtuvieron 11 colonias híbridas de la fusión de protoplastos intraespecie de *Saccharopolysporalypospora erythraea* B-107 y *Saccharopolyspora erythraea* CA-340 adicionando los marcadores a las 96 horas después de la fusión, con diferentes rangos de producción del antibiótico, sin alcanzar la producción de la cepa parental CA-340.

Por otro lado también se obtuvieron 8 híbridos de la fusión de protoplastos de *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 y *Saccharopolyspora erythraea* B-107, adicionando los marcadores a las 0 y 72 horas después de la fusión. Con producción de antibiótico similar a la cepa parental B-107.

INTRODUCCION.

A la fecha se conocen alrededor de 3.000 antibióticos, sin embargo solo un pequeño número de éstos son manufacturados comercialmente. de estos 91 son realizados por procesos fermentativos. Actualmente los antibióticos se clasifican principalmente con base en su estructura química (Rose, 1979)

La Eritromicina fue descubierta en 1952 por McGuire et al., y la compañía Eli Lilly, y es producida por un cultivo de *Saccharopolyspora erythraea* (antes *Streptomyces erythreus*). Este microorganismo fue encontrado en una muestra de tierra cerca de la ciudad de Iloilo, Filipinas.

La eritromicina también es producida por cepas de *Streptomyces griseoplanus*, *Arthrobacter* NRRL B3381, y *Micromonospora* sp. 1225, además de la cepa de *Saccharopolyspora erythraea* Abbott 2NU153 la cual produce eritromicina E (Seno & Hutchinson, 1986; Higashide, 1984).

El término macrólido fue originalmente aplicado a un grupo de antibióticos básicos con un anillo lactona macrocíclico en su estructura química (Higashide, 1984) La Eritromicina es un antibiótico macrólido, y su estructura consiste de una lactona de 14 carbonos y dos aminoazúcares (desosamina y cladinosa). El principal compuesto es la eritromicina A, la cual se utiliza clínicamente para tratamientos de infecciones de bacterias Gram-positivas principalmente (Seno & Hutchinson, 1986).

La eritromicina es un agente bacteriostático. Su actividad biológica depende de dos factores, su acumulación intracelular y la posterior unión a la subunidad ribosomal 50 S de las bacterias susceptibles (Rose, 1979; Omura & Tanaka, 1983; Higashide, 1984; Crueger & Crueger, 1984; Seno & Hutchinson, 1986; Rosenstein, 1988).

La resistencia a eritromicina está asociada con la N-6-dimetilación de un residuo de adenina específica en el rRNA 23 S de *Saccharopolyspora erythraea*, que reduce la afinidad del antibiótico por el ribosoma. El gene de resistencia a eritromicina *ermE* ha sido clonado y secuenciado en *S. erythraea* por Thompson et al., (1982); Uchiyama & Weisblum, (1985); Bibb et al., (1985) y por Janssen & Bibb, (1988) y codifica para una metilasa ribosomal.

La Eritromicina es sintetizada en 3 etapas (Corcoran, 1981): en la primera etapa se ensambla la macrolactona de 14 carbonos a partir de propionato y 2 metilmalonato para formar el 6-desoxieritronólido B (6DEB), una posterior hidroxilación da lugar a la formación del eritronólido B (EB), en la segunda etapa se forman los desoxiazúcares micarosa y desosamina a partir de glucosa y su adición a EB para hacer eritromicina D, y finalmente en la tercer etapa se lleva a cabo una C-12 hidroxilación y una C3" O-metilación de éste último compuesto que producen eritromicina A (Vara et al., 1989).

De acuerdo a todos los reportes revisados, se puede decir que el mapa físico aproximado de los genes de las enzimas que participan en la biosíntesis de eritromicina, que han sido localizados en el genoma de *S. erythraea*, se encuentra en el orden siguiente: *ery B*, *ery D*, *ery CI*, *erm E*, *ery BI*, *ery H*, *ery F*, *ery G*, *ery BII*, *ery CII*, *ery AIII*, *ery AII*, *ery AI*, *ery K*.

La fusión de protoplastos es considerada como una técnica muy útil y prometedora para la manipulación genética de microorganismos industriales, es invaluable en la construcción de cepas industriales con nueva combinación de genes y las propiedades metabólicas deseadas que acompañan a la recombinación genética. La fusión de protoplastos no sólo induce alta frecuencia de recombinantes, sino también interacciones genéticas entre diferentes microorganismos a nivel intraespecie, interespecie o intergenéricas (Kim et al., 1983; Evans & Conrad, 1987).

El interés a nivel mundial en la investigación sobre la manipulación genética, clonación de los genes responsables de la biosíntesis de los antibióticos, la generación de antibióticos híbridos y la regulación de la producción de los microorganismos sigue incrementándose. En este sentido, en el caso particular de eritromicina a la fecha se han clonado casi todos los genes de la biosíntesis, sin embargo nada se ha reportado de su regulación ni tampoco se ha reportado la fusión de protoplastos intraespecíficos e intergenéricos de *Saccharopolyspora erythraea* y otros microorganismos. Es por estas razones que los objetivos de este trabajo fueron: mejoramiento genético de *Saccharopolyspora erythraea* mediante la obtención de cepas híbridas a través de fusión de protoplastos intraespecíficos e intergenéricos

En los primeros intentos se obtuvieron 4 colonias híbridas de la fusión de protoplastos intraespecie de *Saccharopolyspora erythraea* B-107 y *Saccharopolyspora erythraea* CA-340, utilizando la resistencia a diferentes antibióticos como marcadores.

Estos híbridos producen eritromicina C a diferencia de la cepa parental CA-340 que produce principalmente eritromicina A.

Por otro lado también se obtuvieron 2 híbridos de la fusión de protoplastos intergenérica de *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 y *Streptomyces kanamyceticus*. Los híbridos obtenidos de esta fusión intergenérica producen cuando menos eritromicina A.

Adicionando los antibióticos a diferentes tiempos después de realizar la fusión de protoplastos se logró aumentar el número de híbridos. De esta manera se obtuvieron 11 colonias híbridas de la fusión de protoplastos intraespecie a partir de *Saccharopolyspora erythraea* B-107 y *Saccharopolyspora erythraea* CA-340 adicionando los marcadores a las 96 horas después de la fusión, con diferentes rangos de producción del antibiótico, sin alcanzar la producción de la cepa parental CA-340.

Por otro lado también se obtuvieron 8 híbridos de la fusión de protoplastos de *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 y *Saccharopolyspora erythraea* B-107, adicionando los marcadores a las 0 y 72 horas después de la fusión, con producción de antibiótico similar a la cepa parental B-107.

De la fusión de protoplastos intergenérica se encontró que el genoma receptor fue el de la cepa *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338, ya que los híbridos presentan características más similares a ésta, aunque la recombinación fue probablemente en un sitio diferente al de producción de eritromicina.

El resumen de los resultados de producción de antibióticos de las fusiones en donde se obtuvieron híbridos, se pueden observar en la tabla No. 1.

<p style="text-align: center;">TABLA No. 1 PRODUCCION DE ERITROMICINA</p>	
<p><i>Saccharopolyspora erythraea</i> B-107 <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA-340</p> <p>Los 4 recombinantes presentan características similares de producción que la cepa parental B-107.</p>	<p><i>Saccharopolyspora erythraea</i> B-107 <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA-340</p> <p>6 Recombinantes no producen antibiótico. 3 Producen cantidades similares a la cepa parental B-107 2 Producen la mitad de lo que produce la cepa parental CA-340.</p>
<p><i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338 <i>Streptomyces kanamyceticus</i>.</p> <p>Los 2 recombinantes producen cantidades similares a la cepa original NRRL 2338, y un componente no identificado.</p>	<p><i>Saccharopolyspora erythraea</i> B-107 <i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338</p> <p>Los 8 recombinantes producen cantidades similares a la cepa parental B-107</p>

Es crucial el tiempo en el que se adicionan los antibióticos marcadores a las placas para permitir la sobrevivencia de los híbridos, siendo este entre 72 y 96 horas.

Los resultados obtenidos indicaron que es posible obtener y seleccionar híbridos fusionando protoplastos de diferentes cepas de *S. erythraea* y otras especies de *Streptomyces*, aunque la recombinación que se da a través de la fusión de protoplastos es al azar, es necesario seleccionar un poco más el tipo de híbrido que se quiere, dirigiendo la recombinación a los lugares deseados, para ello se podría intentar utilizar los marcadores de resistencia a rifamicina, complementación entre diferentes mutantes no productoras de eritromicina y de auxotrofia hacia metionina que son los genes que rodean a los genes de biosíntesis de eritromicina para incrementar la probabilidad de recombinación en esta región de DNA y por lo tanto alterar la producción de eritromicina. Estos híbridos tendrían una producción diferente y tal vez alguno sería mayor productor de eritromicina.

ANTECEDENTES.

PROTOPLASTOS.

Han sido descritos más de 3000 antibióticos en la literatura, de los cuales 2080 son producidos por Actinomicetos. Existe una gran demanda de nuevos agentes antitumorales, así como agentes antibacterianos; ello ha llevado a la búsqueda de nuevas tecnologías que permitan encontrar agentes más efectivos. Una de estas tecnologías es la fusión de protoplastos.

Actualmente la fusión de protoplastos es considerada como una técnica muy útil y prometedora para la manipulación genética de microorganismos industriales, es invaluable en la construcción de cepas industriales con nueva combinación de genes y las propiedades metabólicas deseadas que acompañan a la recombinación genética. La fusión de protoplastos no solo induce alta frecuencia de recombinantes, sino también interacciones genéticas entre diferentes microorganismos a nivel intraespecie, interespecie o intergenéricas (ver tablas No 2, 3, y 4). La formación de protoplastos ha sido reportada desde los años 50, mientras que la fusión de protoplastos mediante polietilenglicol no se estableció como una técnica sino hasta los 70 (Kim et al., 1983; Evans & Conrad, 1987).

Sagara y Okanishi (en Okanishi et al., 1974) iniciaron la técnica de formación de protoplastos para el género *Streptomyces*, la cual posteriormente fue extendida por Hopwood, Baltz y Shirahawa. La técnica de protoplastos está basada en el tratamiento con enzimas líticas, usualmente lisozima, de células crecidas preferencialmente en un medio rico en glicina o treonina para facilitar la digestión de la pared celular, ya que estos aminoácidos sensibilizan la pared celular, dado que reemplazan los residuos de D-Alanina en la formación del péptido-glicano, por lo tanto interfieren con el entrecruzamiento de éste (Hopwood, 1981).

Existen gran cantidad de información bibliográfica sobre la formación y regeneración de protoplastos de diferentes microorganismos así como su mejoramiento (Okanishi et al., 1974; Baltz & Matsushima, 1981; Shirahama et al., 1981; Ogawa et al., 1983; Moriguchi & Kotegawa, 1985; Morinaga et al., 1985; Illing et al., 1989; Isaeva et al., 1990).

Los parámetros óptimos para la formación y regeneración de protoplastos, pueden variar considerablemente de cepa a cepa y de grupo a grupo (Ogawa et al., 1983; Otts & Day 1987), entre los cuales se toman en cuenta los siguientes (Hopwood, 1981; Goodfellow et al., 1988; Deed et al., 1990):

- | | |
|--|---|
| 1. Precrecimiento de las células. | <ul style="list-style-type: none">● Temperatura de crecimiento celular (Shirahama et al., 1981; Baltz & Matsushima, 1981).● Medio rico en Glicina o Treonina |
| 2. Estado de crecimiento al momento de la cosecha. | <ul style="list-style-type: none">● Fase de crecimiento exponencial.● Estado de transición entre la fase exponencial y estacionaria (Baltz 1978).● Células en fase estacionaria (Kim et al., 1983). |

- | | |
|--|--|
| 3. Enzima utilizada para la formación de protoplastos. | <ul style="list-style-type: none"> • Lisozima • Enzima lítica Nr2 (Anné, 1982). • Acromopeptidasa (Ogawa et al., 1983). • Novozym 234 (Chun et al., 1992) • Penicilina G (Yanase et al., 1985) • Quitinasa y Zimolasa (Moriguchi & Kotegawa, 1985) • Celulasa, β-glucuronidasa (Morinaga et al., 1985) |
| 4. Tiempo de digestión. | <ul style="list-style-type: none"> • Evitar tratamientos largos con la enzima por que decrece la capacidad de regeneración de los protoplastos (Baltz & Matsushima 1981; Otts & Day 1987) |
| 5. Condiciones para mantener los protoplastos. | <ul style="list-style-type: none"> • Densidad celular. • Estabilizador osmótico. |
| 6. Condiciones de regeneración. | <ul style="list-style-type: none"> • Composición del medio. • Temperatura de incubación (Baltz & Matsushima, 1981) • Deshidratación del agar de regeneración (Baltz & Matsushima, 1981; Shirahama et al., 1981). • Densidad de protoplastos para plaqueo. • Doble capa de agar (Shirahama et al., 1981; Furumai et al., 1982). |

Se ha reportado que el simple hecho de formar y regenerar protoplastos puede modificar a una cepa ya sea aumentando la resistencia a antibióticos (Yamashita et al., 1985), o provocando una variación genética (Ikeda et al., 1983; Malina et al., 1985), o aumentando la producción de antibiótico (Rodionova et al., 1987; Zakharova et al., 1990; Isaeva & Voeikova, 1990).

Malina et al., (1985) mejoraron genéticamente la cepa *Streptomyces incarnatus* productora de sinefungina, un antibiótico nucleósido antifúngico muy potente y antiparasítico. El mejor resultado fue obtenido con formación y regeneración de protoplastos de la cepa parental: así la producción del antibiótico se incrementó a 664 $\mu\text{g/ml}$ (40% más en comparación con los padres). La mayoría de la progenie después de la regeneración de protoplastos fue diferente en morfología, color del micelio aéreo y del vegetativo, producción de pigmento y producción de antibiótico, comparando con la cepa original. Dos variantes no producen micelio aéreo ni pigmento. Los autores mencionan que estas diferencias sugieren variaciones genéticas que ocurren durante la regeneración.

Rodionova et al., (1987) después de formar y regenerar protoplastos de *Streptomyces fradiae* obtuvieron ciertas variantes en las que aumentó la producción del antibiótico de 2 a 2.5 veces más que la cepa original. Estos cambios no fueron estables y se perdieron después de 4 resiembras. Inclusive con análisis de restricción de DNA total de las variantes no se detectaron los cambios en el genoma.

TABLA No. 2 EJEMPLOS DE FUSION DE PROTOPLASTOS EN ACTINOMICETOS			
CEPAS	TIPO DE FUSION.	RESULTADO DE LA FUSION.	REFERENCIA.
<i>Mycobacterium lactamdurans</i> . (Auxótrofos)	INTRAESPECIE	Hibrido que produce mayor cantidad de Cefamicina C, que los padres.	Wesseling et al., 1981. Develop Industrial Microbiol. 22: 641 - 651.
<i>Streptomyces fradiae</i> . (Mutante auxótrofo, no productor de Tilosina) <i>S. narbonensis</i> . (Mutante auxótrofo, no productor de Narbomicina)	INTERESPECIE	Hibrido complementario de auxotrofias, productor de Narbomicina	Ikeda et al., 1984 J Antibiotics 37 (10) 1224 - 1230
<i>S. griseus</i> subespecie <i>eryophilus</i> (Mutante que no transporta sulfato)	INTRAESPECIE	Hibrido con una mayor producción de Carbapenemo que las cepas originales.	Kitano et al., 1985 Agric. Biol. Chem 49 (3). 685 - 692
<i>S. azureus</i> . (Mutantes auxotróficos)	INTRAESPECIE	Complementación de auxotrofias (Protótrofos). Producen una mayor cantidad de Triostrepton, en comparación con los padres	Ogata et al., 1985 J Gen Appl Microbiol 31: 187 - 191
<i>S. griseus</i> (Mutante no productor, SM ^R) <i>S. taniimariensis</i> (Productor de Istamicina, KM ^R)	INTERESPECIE	Hibrido resistente a Kanamicina y Estreptomomicina, Produce un antibiótico que las cepas parentales no	Yamashita et al., 1985 J. Antibiotics 38 (1) 58 - 63
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA6202. (O-metiltransferasa ⁻ , Rifampicina ^S , esporas verdes) <i>Streptomyces avermitilis</i> MA4680. (O-metiltransferasa ⁺ , Rifampicina ^R , esporas café)	INTRAESPECIE	Híbridos relevantes, Rif ^R verdes y relevantes Rif ^S café con actividad Omt. Productores del antibiótico Avermectina, activo contra parásitos, Nemátodos, y Artrópodos.	Kholer & Darland 1988 J Industrial Microbiol 3 311 - 320
<i>Streptomyces antibioticus</i> (Auxótrofo, resiste y produce Multiomicina) <i>Streptomyces fradiae</i> . (Resiste y produce Neomicina)	INTERESPECIE (Por Electrofusión)	Híbridos más parecidos a <i>S. fradiae</i> resistentes a uno o ambos antibióticos (Neomicina y/o Multiomicina), producen uno u otro antibiótico, o ambos. Tres híbridos productores de un antibiótico no identificado	Okamura et al., 1988 Agric. Biol Chem 52 (6) 1433 - 1438

<p><i>Streptomyces hygroscopicus</i> variedad <i>yingchengensis</i> <i>S. ginsengmyceticus</i></p>	<p>INTERESPECIE.</p>	<p>Dos híbridos que cada uno, producen al mismo tiempo, los antibióticos que los padres producen de manera separada. Así como dos compuestos con actividad antimicrobial, que los padres no producen.</p>	<p>Zhou & Zhou. 1989. Chin. J. Biotechnol. 5 (3): 161 - 166.</p>
<p><i>Streptomyces monomycinii</i> (Productor de Monomicina) <i>Streptomyces kanamyceticus</i> (Productor de Kanamicina)</p>	<p>INTERESPECIE.</p>	<p>Híbrido que produce un antibiótico complejo albobungina y cloralbobungina, que los padres no producen.</p>	<p>Malanicheva et al., 1991. Antibiot- Khimioter 36 (5): 5 - 8</p>
<p><i>Streptomyces chrysemus</i> <i>Streptomyces</i> sp.</p>	<p>INTERESPECIE.</p>	<p>Híbrido productor de una sustancia antibiótica activa contra bacterias Gram positivas, y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.</p>	<p>Orlova T. I. 1991. Antibiot-Khimioter 36 (4): 3 - 5</p>
<p><i>Streptomyces dimorus</i> (Auxótrofos).</p>	<p>INTRAESPECIE.</p>	<p>El 20% de los híbridos producen una mayor cantidad del antibiótico oxitetraciclina, en comparación con los padres.</p>	<p>Yang & Kao. 1991 Proc-Natl-Sci-Coun- Repub-China-B 15 (1): 20 - 27</p>
<p><i>Streptomyces galliaeus</i> (Idiotrofos de aclacinomicina)</p>	<p>INTRAESPECIE.</p>	<p>Híbrido productor de un análogo de la antraciclina: 2-hidroxiacclacinomicina A y B. Nuevo compuesto con una actividad antitumoral mayor en contra de células de Leucemia murica.</p>	<p>Yoshimoto et al., 1991 Jpn. J. Antibiot. 44 (3) 269 - 276. 277 - 286.</p>
<p><i>Streptomyces hygroscopicus</i> variedad <i>yingchengensis</i></p>	<p>INTRAESPECIE.</p>	<p>Híbrido que produce una nueva sustancia antimicrobial, anibiótico macrólido heptano.</p>	<p>Yuan & Zhou 1991 Chin. J. Biotechnol. 7 (2): 135 - 143.</p>

TABLA No. 3
EJEMPLOS DE FUSION DE PROTOPLASTOS
EN HONGOS.

<p style="text-align: center;"><i>Penicillium patulum.</i> <i>Penicillium crissogenum.</i> (Mutante no Productor)</p>	<p style="text-align: center;">INTERESPECIE.</p>	<p>Híbrido estable que presenta una complementación de biosíntesis de penicilina. La producción del antibiótico es mayor, así mismo aparece un nuevo metabolito, un pigmento no parental</p>	<p>Anné J. 1982 Eur J Appl Microbiol Biotechnol. 15 41 - 46</p>
<p style="text-align: center;"><i>Zymomonas mobilis.</i> (Auxótrofos, no utilizan sacarosa o fructosa)</p>	<p style="text-align: center;">INTRAESPECIE.</p>	<p>Híbrido protótrofo con habilidad de fermentar sacarosa y rafinosa. Su crecimiento en fructosa es limitado. Produce etanol.</p>	<p>Yanase et al, 1985. Agric Biol Chem. 49(1): 133 - 140</p>
<p style="text-align: center;"><i>Mucor pusillus.</i> (tipo de apareamiento [+] y [-])</p>	<p style="text-align: center;">INTRAESPECIE.</p>	<p>Híbridos que mostraron una productividad de proteasas 1.7 veces más que los padres. Esta cepa se emplea en la manufactura de quesos.</p>	<p>Goto-Hamamoto et al., 1986 Agric Biol Chem. 50(6): 1467 - 1473.</p>
<p style="text-align: center;"><i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Auxótrofo, produce Etanol, no crece en Celobiosa, pero si en ac Lactico, Cicloheximida sensible y Sulfato de cobre resistente) <i>Zygosaccharomyces fermentati</i> (Auxótrofo, no produce Etanol, puede utilizar Celobiosa, Cicloheximida resistente y Sulfato de cobre sensible)</p>	<p style="text-align: center;">INTERGENERICA</p>	<p>Híbridos Protótrofos que hacen uso de Celobiosa y ácido Lactico como única fuente de carbono. Resistentes a Cicloheximida y Sulfato de cobre. Cepas fermentadoras, incapaces de producir esporas como <i>Zygosaccharomyces</i></p>	<p>Pina et al, 1986 Applied and Environmental Microbiol 51(5) 995 - 1003</p>
<p style="text-align: center;"><i>Rhodotorula rubra.</i> (Auxótrofo, no productor de Fenilalanina amonioliasa [PAL] sujeta a represión catabólica, pigmentada.) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Produce PAL, crece rápidamente y no pigmentada)</p>	<p style="text-align: center;">INTERGENERICA</p>	<p>Híbridos protótrofos con elevado rango de crecimiento, diversidad de morfología, y pigmentación anormal (naranja, amarillo, crema). La actividad de la enzima PAL se emplea en la producción comercial de L-fenilalanina de ácido transcinámico.</p>	<p>Evans & Conrad 1987 Arch Microbiol 148 77 - 82</p>
<p style="text-align: center;"><i>Aspergillus sojae</i> (1 - Cepa productora de proteasa y 2 - Cepa productora de glutaminasa)</p>	<p style="text-align: center;">INTRAESPECIE</p>	<p>Híbrido con alta producción de las dos enzimas (proteasa y glutaminasa), enzimas hidrolizantes importantes para la producción de salsa de soja sake y miso</p>	<p>Ushijima et al. 1987 Agric Biol Chem 51(4) 1051 - 1057</p>

<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida</i> sp.</p>	INTERGENERICA	Híbrido con alta eficiencia en la utilización del sustrato, que produce altas concentraciones de etanol.	Fang et al., 1990. Chin. J. Biotechnol 6(3): 207 - 213.
<p><i>Saccharomyces diastaticus.</i> (Productor de glucoamilasa y del gen POF causante del sabor fenólico en la cerveza) <i>Saccharomyces uvarum</i> (Levadura cervecera, puede utilizar: maltosa, maltotriosa, sacarosa, glucosa y fructosa. necesita glucoamilasa y α-amilasa para la fermentación del mosto)</p>	INTERESPECIE.	Híbrido que produce cerveza baja en carbohidratos y de sabor agradable, dado que produce glucoamilasa. No presenta el gen POF	Janderová et al., 1990. J. Basic Microbiol. 30(7) 499 - 505
<p><i>Aspergillus niger.</i> (Auxótrofos)</p>	INTRAESPECIE.	Híbridos productores de ácido cítrico, solo uno fue mejor productor que los padres.	Martin-Kova et al., 1990 Folia Microbiol (Praha) 35(3) 143 - 148
<p><i>Trichoderma harzianum</i> (Auxótrofos)</p>	INTRAESPECIE	Cepas híbridas de biocontrol mejoradas en su capacidad antagonística. Crecen más que los hongos patógenos de tierra como: <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Scierotium rolfsii</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> y que los padres.	Pe'er & Chet 1990 Can J Microbiol 36 1433 - 1438
<p><i>Claviceps purpurea.</i> (Auxótrofos, resistentes a diferentes fungicidas)</p>	INTRAESPECIE	Híbrido prototrófico que produce los tres tipos de alcaloides: ergocornina, ergocriptina, y ergocristina. La actividad biosintética es menor en comparación con los padres.	Didek-Brumec et al 1991 J Biotechnol 20 271 - 278
<p><i>Phaffia rhodozyma.</i> (Auxótrofos)</p>	INTRAESPECIE.	Híbrido prototrofo que produce mayor cantidad del carotenioide Astaxantina (pro-vee el sabor y color a la carne del salmón), y presenta resistencia a antimicina A.	Chun et al 1992 FEMS Microbiol Letters 73 221 - 226

TABLA No. 4
EJEMPLOS DE FUSION DE PROTOPOLASTOS
EN BACTERIAS.

<p style="text-align: center;"><i>Brevibacterium lactofermentum</i> <i>B. flavum</i></p>	<p style="text-align: center;">INTERESPECIE</p>	<p>Hibrido con mayor producción de los aminoácidos Treonina y Lisina. Su crecimiento en glucosa es más veloz en comparación con los padres.</p>	<p>Karasawa et al., 1986 Agric Biol. Chem 50(2) 339 - 346.</p>
<p style="text-align: center;"><i>Fusobacterium varium</i> (Sensible a penicilina y Glucosa+) <i>Enterococcus faecium</i> (Pen^R, requiere Glucosa)</p>	<p style="text-align: center;">INTERGENERICA</p>	<p>Híbridos con 2 a 4 veces mas actividad de degradación de Dehidrodivanilina (DDV), que los padres. Pen^R, Glu+ , produce ácidos grasos volátiles (ác. acético y ácido propiónico) diferentes a los paternos.</p>	<p>Chen et al., 1987 Appl. and Environmental Microbiol 53(3) 542 - 548</p>
<p style="text-align: center;"><i>Bacillus subtilis</i> (Rif^R, productor de xilanasas) <i>Corynebacterium acetoacidophilum</i> (Estreptomicina^R, productor de Lisina)</p>	<p style="text-align: center;">INTERGENERICA</p>	<p>Hibrido productor de Xilanasas a diferentes niveles, pero siempre por debajo del nivel parental; y productor de Lisina.</p>	<p>Deb et al., 1990 FEMS Microbiol Letters. 71 287 - 292</p>

Isaeva & Voeikova, (1990) determinaron las condiciones de formación y regeneración en una cepa comercial de *Streptomyces aureofaciens* productora de clortetraciclina. Como resultado de la formación de protoplastos observaron un amplio incremento en la variación morfológica y un cambio en la actividad del antibiótico. También obtuvieron variantes con alta productividad en comparación con la cepa inicial.

Actualmente la técnica de fusión de protoplastos se ha convertido en una herramienta indispensable principalmente en *Streptomyces*, sobre todo, para la recombinación de DNA. En varias especies de *Streptomyces* se desconocen los sistemas de transferencia conjugacional, por ello, por medio de la fusión de protoplastos se ha logrado obtener fusión de parejas (Baltz & Matsushima, 1981; Demain & Solomon, 1986; Mirdamadi-Tehrani et al., 1992).

Mirdamadi-Tehrani et al., (1992) analizaron la progenie de 4 marcadores auxotróficos de isoleucina, adenina, fenilalanina y tirosina (ile, ade, phe, tyr), en la cruce obtenida por fusión de protoplastos interespecie entre *Streptomyces griseus* y *Streptomyces griseolus*. Fueron identificados nueve fenotipos de progenie detectados, siendo la mayoría genéticamente estables. La frecuencia de recombinación para esta cruce interespecie fue relativamente baja comparada con lo reportado para la fusión de protoplastos intraespecie. Esto lo esperaban los autores ya que aunque las dos especies están moderadamente relacionadas, ellas presumiblemente no comparten homología total de cromosomas y las oportunidades para entrecruzarse son por lo tanto limitadas.

La técnica de fusión de protoplastos ha sido ampliamente utilizada para mezclar el genoma de dos padres, por otro lado, la frecuencia de fusión se incrementó con la adición de polietilenglicol (PEG), utilizando diferentes concentraciones y pesos moleculares, debido a que este compuesto favorece la aglutinación y desestabiliza la membrana celular permitiendo la interacción de éstas para la fusión, y por lo tanto, la permanencia de cuando menos dos genomas distintos en el citoplasma, mediante un periodo de tiempo que permite la recombinación. La frecuencia de recombinantes es dependiente de la temperatura del crecimiento celular y de la regeneración de protoplastos (Hopwood, 1981; Faisst & Seibicke, 1987). Se han reportado fusión de protoplastos tanto de hongos, bacterias, dentro de las cuales han sido extensamente usadas para investigación genética el género *Streptomyces*, e incluso también se han fusionado fibroblastos humanos utilizando PEG (Pontecorvo et al., 1977).

La fusión se puede llevar a cabo interespecie, intraespecie, intergenérica, e incluso se puede aplicar para la combinación donde estén involucrados más de dos padres, empleando marcadores genéticos apropiados para identificar las cruces (ver tablas No. 2, 3, 4).

Se ha reportado el mejoramiento de recombinación al usar propionato de calcio (Kavanagh et al., 1991), o con el uso de luz ultravioleta (U.V., agente mutagénico) (Hrauneli et al., 1983); aunque por otra parte se ha visto que los protoplastos son más susceptibles que las esporas a agentes mutagénicos como la N-metil-N'-nitrosoguanidina (NTG) (Vyskocil et al., 1987).

La formación y regeneración; o la formación, fusión y regeneración de protoplastos, están asociados con rearrreglos genéticos, porque no solo pueden perderse o variar el número de plásmidos o elementos móviles (Furumai et al., 1982; Kinashi et al., 1988), sino también otros rasgos tales como la producción de antibióticos o resistencia (Stonesifer et al., 1986), probablemente debido a deleciones (Kholer & Darland, 1988) aunque también pueden ocurrir amplificaciones (Robinson et al., 1981; Hotta et al., 1988; Ishikawa et al., 1988).

Kinashi et al., (1988) trabajaron con variantes de *Streptomyces lasaliensis* productoras y no productoras de un antibiótico poliéter, el lasalócido A (Las) y un antibiótico quinoxalina equinomicina (Ech). Mencionan que fue notable que la regeneración de protoplastos produjo mutantes Las⁻ en la misma frecuencia que con agentes mutágenos como luz U.V. o NTG. Esta

clase de resultados indicaron el papel que desempeña un plásmido en la producción del antibiótico, porque la regeneración de protoplastos puede causar una pérdida frecuente de plásmidos bacteriales. La pérdida frecuente y restauración de producción del antibiótico demostró que no es debido aparentemente a la deleción de grandes segmentos de DNA. Los autores sugieren examinar si otro elemento genético móvil (plásmido, transposón, o secuencia de inserción) está controlando la producción del antibiótico en *Streptomyces lasaliensis*.

Stonesifer et al. (1986) observaron que la biosíntesis del antibiótico tilosina y la resistencia a éste fueron perdidas al realizar la formación y regeneración de protoplastos de *Streptomyces fradiae*.

Robinson et al. (1981) recuperaron recombinantes prototróficas estables de la fusión de protoplastos interespecie a partir de derivados auxotróficos de *Streptomyces jumonjinensis* y *Streptomyces lipmanii*. Una característica poco usual de la fusión fue la presencia de recombinantes con secuencias de DNA repetidas extensamente. Los autores mencionan que el estado fisiológico anormal causado por la fusión de protoplastos interespecie desreprimió un sistema de replicación extensiva de un segmento limitado de DNA. El segmento seleccionado para la amplificación es aparentemente variable en tamaño y secuencia.

Este tipo de manipulación puede ser utilizada con varios propósitos (Kurth & Demain, 1984):

- (i) La generación de alta frecuencia de recombinantes estables.
- (ii) En la obtención de híbridos hiperproductores de algún metabolito primario (aminoácidos, enzimas, etc.) o secundarios (antibióticos) de interés industrial (ver tabla No. 2).
- (iii) En la obtención de híbridos productores de metabolitos diferentes a los de los parentales (ver tabla No.2).
- (iv) Para estudios de vías biosintéticas por complementación de mutantes.
- (v) Para facilitar la utilización de diversos nutrientes en mutantes hiperproductoras con requerimientos estrictos (Yanase et al., 1985; Fang et al., 1990).
- (vi) En análisis genéticos (Hamlyn et al., 1985).
- (vii) En la elaboración de mapas genéticos (Illing et al., 1989).
- (viii) En experimentos de transformación ya sea con DNA de plásmidos o mediada por liposomas.
- (ix) En experimentos de transfección.
- (x) Podría también ser utilizada para la investigación de la síntesis de pared celular y en estudios de funciones asociadas a la membrana (Szabó et al., 1989).

Pogell, (1984) realizó una fusión de protoplastos cruzando *Streptomyces coelicolor* M110 (micelio aereo Amy⁺, uracilo ura⁻, histidina his⁻, plasmido SCP2⁺) con *Streptomyces coelicolor* 1094/4 (Amy⁻, fenilalanina phe⁻, arginina arg⁻, SCP2⁻) produciendo una variedad de aislados Amy⁺ estables y arg⁺, varios phe⁻ y también encontraron prototrofos estables.

Las ventajas que presenta la fusión de protoplastos en la manipulación genética de microorganismos son varias, entre ellas:

- * La formación de protoplastos y la fusión son aplicables universalmente.
- * Se pueden obtener recombinantes de microorganismos en los cuales ninguna forma de transferencia de genes ha sido demostrada.
- * Ambos padres pueden jugar el mismo papel en la formación de recombinantes.
- * Las fusiones de protoplastos entre más de dos cepas pueden ser utilizadas para generar recombinantes multiprogenitores.
- * Existe fusión de protoplastos intra e interespecies.
- * Existe fusión de protoplastos intergenéricas.

ERITROMICINA.

La Eritromicina fue descubierta en 1952 por McGuire et al. y aislada por la compañía Eli Lilly; a partir de un cultivo de *Saccharopolyspora erythraea* (antes *Streptomyces erythraeus*) el cual fue encontrado en una muestra de tierra cerca de la ciudad de Iloilo, Filipinas. Este antibiótico también es producido por cepas de *Streptomyces griseoplanus*, *Arthrobacter* NRRI. B3381, *Micromonospora* sp. 1225 y por *Saccharopolyspora erythraea* abbott 2NU153 la cual produce eritromicina E principalmente (Seno & Hutchinson, 1986; Higashide, 1984). Recientemente Stanzak et al., (1990) utilizaron los genes de resistencia y de la biosíntesis de eritromicina clonados de *Saccharopolyspora erythraea* como sondas de hibridización para determinar si la secuencia de DNA codificada por estos genes está conservada en las diferentes especies de *Streptomyces* productoras de eritromicina, ellos encontraron que la secuencia de estos genes no está conservada altamente en cepas de actinomicetos taxonómicamente distintas, y no muestran una extensiva homología con el DNA de otros productores de antibióticos macrólidos.

El término macrólido fue originalmente aplicado a un grupo de antibióticos básicos con un anillo lactona macrocíclico en su estructura química (Higashide, 1984). La Eritromicina es un antibiótico macrólido, ya que su estructura consiste de una lactona de 14 carbonos y dos aminoazúcares (desosamina y cladinosa) unidos en el carbono 3 y 5. Aunque *S. erythraea* produce varias eritromicinas, el principal antibiótico sintetizado es eritromicina A, el cual es usado clínicamente para tratamientos de infecciones causadas por bacterias Gram-positivas principalmente, en la forma de base libre, ésteres, o sal (soluble en agua). También es utilizada en la suplementación alimenticia de animales como promotor del crecimiento. Las agliconas intactas de macrólidos de 14 miembros han sido aisladas de mutantes bloqueadas, lo cual ha llevado a concluir que ambas estructuras del macrólido (lactona y azúcares) son necesarias para que tengan actividad antibacteriana (Rose, 1979; Martín, 1979). Los subproductos eritromicina B, C, D, E, F, eritronólido B, varían poco en su estructura (Seno & Hutchinson, 1986), como lo muestra la figura No. 1.

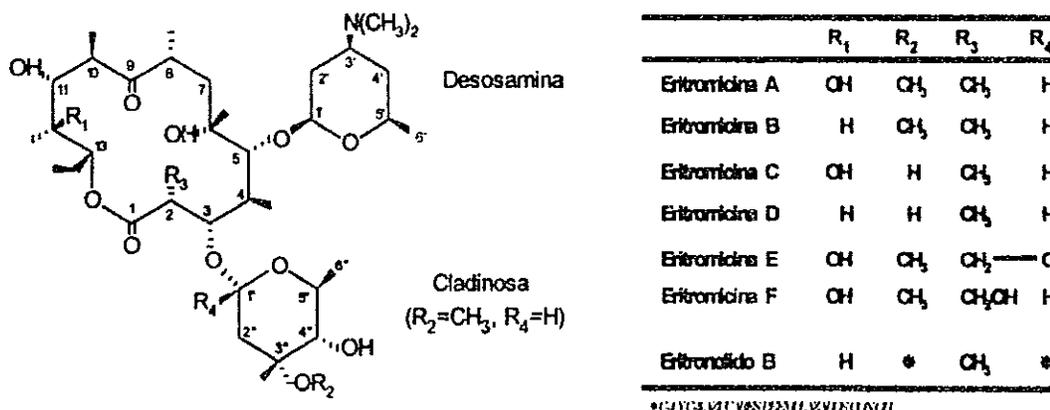


Figura No. 1.- Estructura química de la eritromicina (Seno & Hutchinson, 1986).

La eritromicina puede ser aislada y purificada por extracción con solventes a pH básico débil seguido por cromatografía, o por cristalización directa. El sistema de cromatografía líquida de

alta resolución (HPLC) está disponible para purificación a nivel laboratorio y análisis cuantitativos (Seno & Hutchinson, 1986).

La eritromicina es una base débil cristalina ligeramente amarilla, soluble en etanol y otros solventes orgánicos. Soluciones neutras son estables por muchas semanas a 5^o C, pero a temperatura ambiente se pierde algo de actividad después de pocos días. Por debajo de un valor de 5 en pH rápidamente se pierde la actividad (Garrod et al., 1973).

La eritromicina es un agente bacteriostático, su actividad biológica depende de dos factores, la acumulación intracelular y la unión a la subunidad ribosomal 50 S de las bacterias susceptibles. Las bacterias Gram-positivas son más sensibles a la eritromicina que las bacterias Gram-negativas, porque aquéllas acumulan altos niveles intracelulares del antibiótico. El efecto bacteriostático es debido a su capacidad para causar inhibición de la síntesis de proteínas que puede ocurrir primeramente por estimulación de la disociación del peptidil-RNA_t (ácido ribonucleico de transferencia) del ribosoma, probablemente durante la translocación (Rose, 1979; Omura & Tanaka, 1983; Higashide, 1984; Crueger & Crueger, 1984; Seno & Hutchinson, 1986; Rosenstein, 1988). La eritromicina es un antibiótico bacteriostático, eficaz en infecciones bacterianas del tracto respiratorio; actúa contra bacterias Gram-negativas como: *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Haemophilus influenzae*, espiroquetas *Treponema pallidum* y rickettsias. Y contra bacterias Gram-positivas como: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus faecalis*, *Diplococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma kansasii*, *Mycoplasma scrofulaceum*, *Chlamydia trachomatis*, *Legionella*, *Ureoplasma urealyticum*, *Corynebacterium diphtheriae*, y la amiba *Entamoeba histolytica* (Omura & Tanaka, 1983; Higashide, 1984; Berkow, 1986; Seno & Hutchinson, 1986; Rosenstein, 1988).

En clínica, se prefiere el uso de la eritromicina para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias en enfermos alérgicos a la penicilina, por lo que la eritromicina es un producto de sustitución de la penicilina. Por otra parte podrían existir casos en los cuales el enfermo es alérgico a eritromicina pero no a la penicilina, en los que se substituye la eritromicina por la penicilina (Berkow, 1986).

El antibiótico eritromicina muestra baja toxicidad, y solo ha sido notado un efecto limitado (nefrotoxicidad o desórdenes del riñón) en pacientes tratados con altas dosis de estolato de eritromicina sobre un periodo de tiempo de más de 2 semanas (Glasby, 1979; Omura & Tanaka, 1983).

VÍA BIOSINTETICA.

La Eritromicina se sintetiza en tres etapas (Corcoran, 1981): (1) formación de la macrolactona de 14 carbonos a partir de la condensación de propionato y 2 metilmalonato para formar el 6-desoxieritronólido B (6DEB); seguido de una hidroxilación que da lugar a la formación del eritronólido B (EB). (2) Síntesis de los aminoazúcares micarosa y desosamina a partir de glucosa y su adición a EB para formar la eritromicina D; (3) en la tercera etapa hay un paso de C-12 hidroxilación y otro de C3" O-metilación del último componente lo cual da como producto final la eritromicina A (Vara et al., 1989).

La vía biosintética propuesta para eritromicina A en *Saccharopolyspora erythraea*, comienza en el centro aglicona de la eritromicina A que es un derivado de un propionil-CoA y seis unidades de metilmalonil-CoA, que son incorporadas cabeza a cola en el crecimiento de la

cadena policétida, en un proceso similar al de la biosíntesis de ácidos grasos, para generar un macrólido intermedio, 6-desoxieritronólido B. La síntesis del macrólido de 14 carbonos 6-desoxieritronólido B es seguida por una hidroxilación en el C-6 formando el eritronólido B. La adición del poco usual desoxiazúcar L-micarosa en el C-3 da como producto al 3-O- α -micarosil eritronólido B, y la adición posterior del aminodesoxiazúcar D-desosamina en el C-5 al anterior de la molécula da como resultado la formación de la eritromicina D, este es el primer producto con actividad antibacteriana (Corcoran, 1981; Seno & Hutchinson, 1986; Cortés et al., 1990 b). La síntesis de la eritromicina A se lleva a cabo mediante una hidroxilación en el C-12 y una metilación del grupo micarosil.

Después de la Eritromicina D, la vía se ramifica, formando una horquilla metabólica aparente. La Eritromicina D puede ser hidroxilada en el C-12 para formar eritromicina C ó metilada en el C-3" para formar eritromicina B. Mientras que la formación de eritromicina A a partir de eritromicina C por metilación en C-3" ha sido demostrado claramente, la formación de eritromicina A a partir de eritromicina B ha sido menos clara dado que existen reportes contradictorios en la literatura respecto a ello (Corcoran, 1981). La Eritromicina E y la Eritromicina F son derivados de la eritromicina A y solo están presentes en cantidades menores. El principal producto (figura No. 2), además de ser la molécula más activa biológicamente es la Eritromicina A (Paulus et al., 1990).

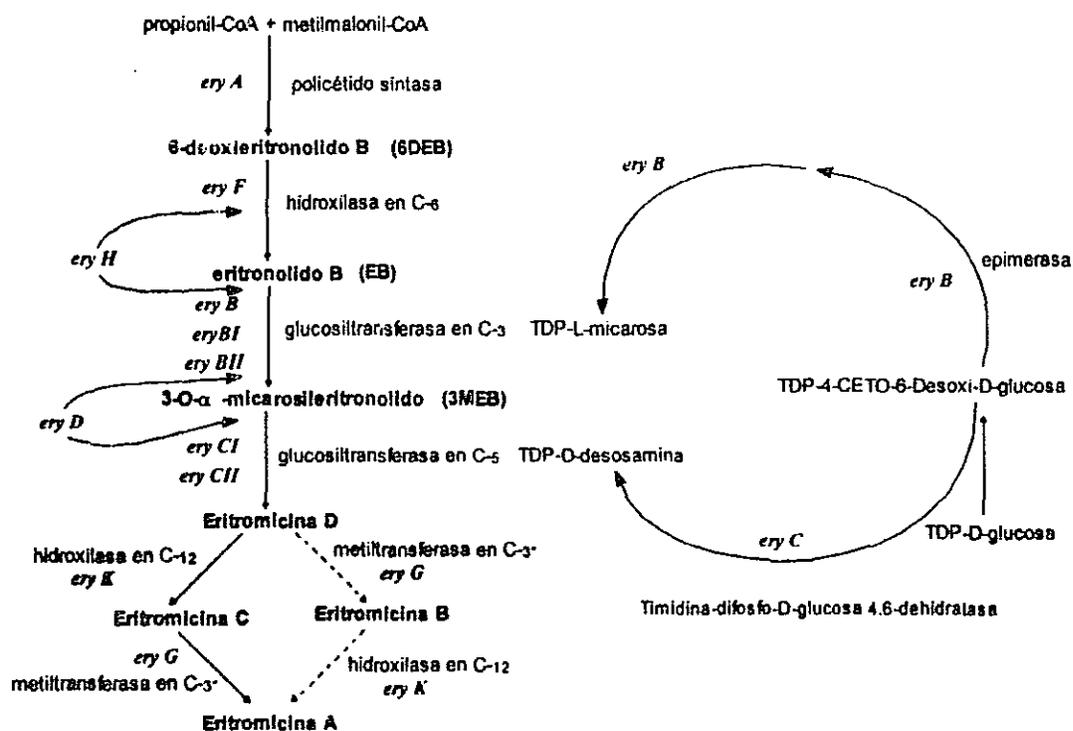


Figura No. 2.- Vía biosintética de la eritromicina. Los pasos bloqueados son indicados respectivamente por mutación *ery A*, mutación *ery D*, mutación *ery F*, mutaciones *ery G*, mutaciones *ery H* y mutaciones *ery K*. Las mutaciones *ery B* y *ery CI* pueden afectar más de un solo paso.

El bosquejo de la vía de biosíntesis de la eritromicina A fue originalmente deducida a partir de los resultados obtenidos a través de alimentar cultivos con precursores radioactivos y del

estudio de mutantes bloqueadas en la ruta de biosíntesis de la eritromicina (Corcoran, 1981; Seno & Hutchinson, 1986).

En vez de utilizar sondas de oligonucleótidos, se llevó a cabo la clonación de los genes que codifican para la biosíntesis; primero se clonó un gen que codifica para la resistencia al antibiótico, asumiendo (correctamente) que los genes que codifican para la biosíntesis probablemente estaban unidos al gen que codifica para la resistencia a este metabolito. Los genes involucrados en la biosíntesis de eritromicina (*Saccharopolyspora erythraea*), carbomicina (*Streptomyces thermotolerans*) y avermectina antihelmíntica (*Streptomyces avermitilis*) han sido clonados con esta aproximación (Fayerman, 1991).

El curso químico del ensamble del anillo macrolídico ha sido ampliamente confirmado. Sin embargo no se han encontrado intermediarios precursores entre acil-CoA y 6-desoxieritronólido B (Dhillon et al., 1989).

Los análisis genéticos de la vía han servido para identificar al menos 4 clases bien definidas de mutantes bloqueadas en la formación de la macrolactona y los desoxiazúcares intermediarios de la biosíntesis de eritromicina A, estas han sido designadas como: *ery A*, *ery B*, *ery C1*, y *ery D*, respectivamente, basándose en su comportamiento de cosíntesis, el tipo de intermediario biosintético acumulado y su habilidad o capacidad para biotransformar intermediarios bioquímicos conocidos de eritromicina A (Weber et al., 1985).

Todas las mutaciones que bloquean la conversión de 6DEB a eritromicina D en *S. erythraea* poseen fenotipo **Ery⁻** porque ninguno de los intermediarios de la vía acumulados poseen actividad antibiótica. Dichas mutantes han sido clasificadas solo en tres grupos (Weber et al., 1985): *Ery B⁻* (que acumula EB pero biotransforma 3MEB a eritromicina A), *Ery C⁻* (que acumula 3MEB pero biotransforma eritromicina D a eritromicina A) y *Ery D⁻* (que acumula EB pero no biotransforma 3MEB ó eritromicina D a eritromicina A). Las mutaciones *ery B25*, *ery B26*, *ery B40*, *ery B46*, *ery C1-60* y *ery D24* pueden afectar solo uno de los varios probables pasos en la formación y unión de L-micarosina y D-desosamina a EB y 3MEB, respectivamente. Ellos no pueden ser detectados por pruebas de cosíntesis del antibiótico por que ninguno de estos pasos involucra intermediarios "distinguibiles". La interrupción de una función regulatoria de la expresión de los genes de biosíntesis de desoxiazúcares puede ser una razón alternativa para el efecto múltiple de la mutación *ery D24* o, en hecho, solo de mutaciones *ery B*. El número limitado de fenotipos y mutaciones *Ery C⁻* y *Ery D⁻* disponibles (Weber et al., 1985) hacían difícil estimar cuanto DNA abarca el número posible de genes *ery B*, *ery C1* ó *ery D*.

Ahora está firmemente establecido que los genes que codifican para la biosíntesis de un antibiótico en *Streptomyces* están siempre empaquetados físicamente cerca o alrededor del gen estructural, que determina su propia resistencia al antibiótico, para la eritromicina ésto es cierto (Hopwood, 1986; Vara et al., 1989; Dhillon et al., 1989). Weber et al., (1985) aislaron 4 mutantes de *S. erythraea* no productoras del metabolito, fenotípicamente distinguibles (**Ery A⁻**, **Ery B⁻**, **Ery C⁻**, y **Ery D⁻**) y las utilizaron para demostrar el empaquetamiento de los genes de producción de eritromicina (*ery*) en el cromosoma de cepas NRRL 2338 por medio de experimentos de mapeo genético.

Los datos reportados por Vara et al., (1989) muestran solo que varios de estos genes (*ery B*, *ery C1* ó *ery D*) están empaquetados en aproximadamente 18 kb en la región arriba del gen **ermE**. También demostraron que al menos 3 de los genes *ery* están unidos al gen de resistencia de eritromicina **ermE**; sus conclusiones están basadas en el hecho de que el clon pKC488 con un inserto de DNA de 35 kbp conteniendo el gen **ermE** complementó las mutaciones *eryA 34*, *eryB 25* y *eryC1-60* en cepas de *S. erythraea* aisladas por Weber et al., (1985).

Weber & Losick. (1988) subsecuentemente confirmaron el enlace cercano de las mutaciones *eryA* 34 y *eryB* 25 al gen *ermE*. También encontraron que utilizando la comparación de frecuencias de recombinación en apareamiento conjugacional de mutantes *Ery^r* de *S. erythraea*, teniendo el marcador cromosomal *tsr* (resistencia a estreptomycin) integrado 23 kbp arriba del gen *ermE*, que el locus *ery B25* del mapa a la derecha de la marca *tsr* dentro de 20 kbp en la región alrededor de *ermE* lo que no correlaciona con los datos presentados por Vara et al., (1989).

Utilizando mutantes de *Saccharopolyspora erythraea eryB* 25 y *eryB* 26 las cuales tienen como marcador el antibiótico aminoglucósido apramicina, Lewandowska-Skarbek & Hutchinson, (1990) restauraron su producción de eritromicina, y concluyeron que la inhibición es debida a una supresión fenotípica de estas dos mutaciones por apramicina, y no por su complementación en trans o algún tipo de proceso de reparación del gen.

La existencia de las diferentes enzimas involucradas en la síntesis y unión de desoxiaminoazúcares a la lactona han sido difíciles de estudiar (Corcoran, 1981), aunque una enzima que puede estar involucrada en esta vía, timidina-difosfo-D-glucosa 4, 6-dehidratasa, ha sido purificada a homogeneidad en *Saccharopolyspora erythraea* CA-340 y puede servir como la 1ª enzima en la vía de timidina-difosfo-D-glucosa a timidina-difosfo-D-desosamina, que es el precursor inmediato de eritromicina D que se ha propuesto; pero la otra enzima de esta vía no ha sido detectada (Vara & Hutchinson, 1988; Dhillon et al., 1989).

Los azúcares timidina difosfo-L-micarosa (TDP-L-micarosa) y timidina difosfo-D-desosamina (TDP-D-desosamina) son sintetizadas a partir de timidina difosfo-D-glucosa y unidas en seguida a EB, el cual es sintetizado a partir de propionato y metil malonato, para formar la eritromicina D (Vara et al., 1989). La enzima timidina difosfo-D-glucosa 4, 6-dehidratasa ha sido purificada (Vara & Hutchinson, 1988), y la epimerización de timidina difosfo-4-ceto-6-desoxi-D-glucosa es asumida por analogía como otras L-hexosas que son formadas a partir de D-glucosa. La naturaleza de los otros pasos en la ruta que conduce a la síntesis de timidina difosfo-L-micarosa y timidina difosfo-D-desosamina son desconocidas (Vara et al., 1989).

El fenotipo de las mutantes *ery D^r* y las propiedades de clonado de DNA adyacente al gen *ery D* sugieren la existencia de regiones regulatorias que rigen la expresión de algunos de los genes *ery B* y *ery C1* (Vara et al., 1989).

El trabajo de Vara et al., (1989) fue enfocado principalmente al proceso biológico para la hidroxilación de 6DEB y a la formación y adición de desoxiazúcares a EB y 3 α -micarosil eritronólido B (3MEB). Los autores piensan que la mutación *ery D24* afecta una función regulatoria, más que un paso común para la formación de timidina difosfo-D-desosamina y timidina difosfo-L-micarosa, ya que la cepa WHM278 contiene niveles normales de actividad timidina difosfo-D-glucosa 4, 6-dehidratasa, enzima responsable del posible paso común en ambas vías. Algunos de sus resultados apoyan la existencia de una posible segunda región regulatoria. De hecho se obtuvo un incremento reproducible de 10 a 15 veces en la producción de eritromicina cuando la cepa silvestre *S. erythraea* fue transformada con el plásmido pWHM14, que contiene un segmento de 1 kbp situado justo a la izquierda de la región *ery D* entre los genes *ery B* y *ery D*.

Los resultados descritos por Vara et al., (1989) proveen alguna información en la localización y función de los genes que rigen la biosíntesis de desoxiazúcar en la vía de biosíntesis de la eritromicina. Se han identificado genes con función análoga a éstos en *Streptomyces fradiae* para la biosíntesis de tilosina (Baltz & Seno, 1988), pero la correspondencia entre tales genes y las enzimas de biosíntesis de desoxiazúcar implícitas en la vía es aún obscuro.

Antes de unir las dos unidades azúcar para formar la eritromicina D, el macrólido lactona 6-desoxieritronólido B es hidroxilado en la posición 6 para formar el eritronólido B. Se reportó originalmente que la enzima responsable para esta hidroxilación fue encontrada en un extracto libre de células de *S. erythraea* en la fracción rica en citocromo P-450 monooxigenasa (Corcoran, 1981). Más tarde esta actividad fue purificada a aparente homogeneidad, la 6DEB-hidroxilasa y 2 proteínas transportadoras de electrones citocromo P-450 que específicamente hidroxiló el 6-desoxieritronólido B y sus derivados *in vivo*, también como la timidina difosfo-D-glucosa 4,6 dehidratasa que puede catalizar el primer paso en la biosíntesis del desoxiazúcar de *S. erythraea* (Shafiee & Hutchinson, 1987; 1988).

Realizando mutaciones en la región del gen de resistencia a eritromicina *erm E* de *S. erythraea* por inactivación insercional, encontraron una mutante cuyo fenotipo se caracterizó por formar 6-desoxieritromicina A y no sintetizar eritromicina A, esto sugirió que la mutación estaba localizada en el locus 6-hidroxilasa, referido como *ery F*. El gen *ery F* que codifica para la síntesis de la enzima 6-desoxieritronólido B hidroxilasa, fue clonado de la región del cromosoma de *S. erythraea* aproximadamente 5.5 kb abajo de *erm E*, el gen que codifica la resistencia a eritromicina. (Weber et al., 1991).

La enzima citocromo P-450, previamente aislada de extractos celulares (Shafiee & Hutchinson, 1987) fue reexaminada, mostrando ahora que esta preparación de citocromo P-450 contiene dos proteínas, una de las cuales está presente en gran cantidad; el gen de esta P-450 fue también clonado (*orf 405*) y secuenciado y se encontró que es distinto al gen *ery F*, aunque el producto de los dos genes es bastante similar (son aproximadamente idénticos en tamaño, carga y punto isoeléctrico). Los genes de las dos enzimas fueron expresados en *Escherichia coli*, y las actividades enzimáticas de ambas proteínas fueron comparadas utilizando como sustrato 6-DEB. Los resultados indicaron que la especie menor de la mezcla de P-450 es el producto del gen *ery F* y la especie mayor tiene una función que no está relacionada con el metabolismo de eritromicina. El producto del gen *ery F* mostró un nivel mucho más alto de actividad en la hidroxilación de un análogo de 6-DEB, mientras que el producto de *orf 405* no mostró actividad detectable utilizando el mismo sustrato. Es posible, que la preparación del 6-desoxieritronólido B hidroxilasa originalmente purificado de *S. erythraea* fue realmente una mezcla de 2 enzimas citocromo P-450 y que la especie mayor está presente en exceso pero esencialmente no tiene actividad 6-desoxieritronólido B-hidroxilante (Andersen & Hutchinson, 1992).

También el gen de resistencia a eritromicina *ermE*, fue clonado de *S. erythraea* por Thompson et al., 1982; y por Bibb et al., 1985. Algunas evidencias genéticas mostraban claramente que el locus *ery C1* comenzaba cerca del extremo 5' de *ermE*, el gen estructural que codifica para una metilasa ribosomal que confiere resistencia al macrólido en los microorganismos productores (Uchiyama & Weisblum, 1985).

Janssen & Bibb, (1988) reportaron que la región promotora del gen *erm E* está sobrepuesta con el inicio de un marco de lectura abierto (ORF) cuyo transcrito en dirección opuesta. Las pruebas del efecto de mutaciones de transición y delección en la región promotora del gen *erm E* mostraron que el nivel de expresión de este gen y el ORF estaban inversamente correlacionados.

Por los resultados de Vara et al., (1989), este ORF parece ser el inicio de la región codificante para el producto del gen *ery C1*. Las mutaciones *ery C1-60* bloquean la formación de eritromicina D y ésta es el primer compuesto con actividad antibiótica en la vía de biosíntesis de eritromicina. El gen *ery C1* podría ser un punto ideal del organismo para regular la producción de eritromicina. El hecho de que la producción de EB puede ser incrementada mucho más que 3MEB ó eritromicina A por adición de n-propanol al medio de fermentación y de que se acumula más EB en la cepa silvestre que algún otro intermediario de la vía, sugiere que el paso en la conversión de

EB a eritromicina D es el cuello de botella en la síntesis de la eritromicina (Vara et al., 1989).

Algunas especulaciones acerca de tales mecanismos, conducen a pensar que aparentemente el gen *erm E* se expresa constitutivamente (Thompson et al., 1982; Uchiyama & Weisblum, 1985); a diferencia de otros *Streptomyces* cuyos genes de resistencia son inducidos por el antibiótico macrólido correspondiente.

La proximidad de los genes *ermE* y *ery C1* sugiere una posible expresión coordinada. Además la complementación de la mutación *ery C1-60* no se observa si la transformante no contiene todo el gen *erm E* (Vara et al., 1989).

Por otro lado, Weber et al., (1990) realizando análisis de mutantes *erm E* encontraron que éste gen solo es requerido para la resistencia a eritromicina, pero no es necesario para la producción del intermediario eritronólido B o para la conversión del 3- α -micarosil eritronólido B en eritromicina.

Vara et al., (1989), vencieron parcialmente el problema de la inestabilidad del vector que previamente impedía la clonación de genes *ery* por el método de escopeta "shotgun" (Yamamoto et al., 1986), al clonar segmentos de DNA de la región circunvecina al gen *ermE* en un vector plásmido integrativo o cósmido transportador *Escherichia coli-Streptomyces* capaz de transformar a *S. erythraea*. Encontraron que algunos de los genes *eryB*, *ery C1* y *ery D* están dentro de en una región de 18 kbp inmediatamente arriba del gen *ermE*.

La localización del gen *ery C1* simultáneamente fue confirmada por Dhillon et al., (1989) mediante la secuenciación de nucleótidos y experimentos de ruptura de genes. Presentaron la secuencia de nucleótidos completa de un marco de lectura abierta (ORF) inmediatamente arriba de *ermE*, la región promotora de *ermE* arreglada en tandem física y funcionalmente sobrelapada con la región promotora que transcribe a partir de la hebra opuesta de DNA, produciendo un transcrito de función desconocida (en ese entonces) que diverge lejos del gen de resistencia *ermE* propio (Bibb et al., 1985; Janssen & Bibb, 1988). La secuencia de aminoácidos deducida del producto del gen de este ORF no muestra similitud significativa a alguna de las proteínas comunes basándose en los datos del Protein Identification Resource cuando se analiza utilizando los programas de Devereux (en Dhillon et al., 1989); pero evidencias genéticas sugieren que esta región del paquete del gen puede contener el locus *ery C1*, y que el producto de este gen puede por lo tanto participar en la síntesis o en la unión del aminoazúcar desosamina.

Ha sido mostrado previamente (Weber et al., 1989; Weber & Losick, 1988) que el plásmido pIJ702 es incapaz de replicarse independientemente en *Saccharopolyspora erythraea* y que cuando produce un inserto de DNA en *Saccharopolyspora erythraea* éste puede integrarse dentro del cromosoma por recombinación homóloga tipo Campbell. Si pIJ702 se inserta en un fragmento de DNA en medio de un gen, puede resultar en una ruptura del gen. Este acceso es particularmente útil cuando la secuencia de nucleótidos es conocida, permitiendo que la integración pueda ser localizada con precisión (Dhillon et al., 1989).

Dhillon et al., (1989), muestran que el inserto de una mutante WHB 2221, en que el ORF es roto inmediatamente del lado 5' de *ermE*, está completamente bloqueada en la biosíntesis de eritromicina, y acumula específicamente 3-O-micarosileritronólido B. Esto es consistente con la evidencia genética previa de que las mutantes *ery C1* de *Saccharopolyspora erythraea* acumulan 3-O-micarosileritronólido B (Weber et al., 1985). En experimentos posteriores de mapeo genético recientes, se ha localizado el locus *ery C1* inmediatamente al lado 5' del gen *ermE* y *ery C1* ha sido registrado para esta región de DNA por complementación de mutantes. Evidencia posterior de la naturaleza monocistrónica del ORF es mostrada por la presencia de un terminador

de transcripción convencional inmediatamente abajo del ORF. No es posible, con las evidencias comúnmente disponibles, asignar una función regulatoria enzima específica al producto del gen *ery C1* (Dhillon et al., 1989).

Se ha encontrado que la ruptura de una unidad de transcripción localizada alrededor de 5 kbp 3' del *ermE* bloquea la metilación de eritromicina C, que es el paso terminal en la biosíntesis de eritromicina A (Weber et al., 1989). Esto implica que regiones inmediatas que rodean a los genes de resistencia, incluyendo los segmentos de DNA no definidos por mutaciones, pueden también contener genes involucrados en los últimos pasos de la vía (Dhillon et al., 1989).

Weber et al., (1989) y Donadio et al., (1989 en Vara et al., 1989) utilizaron métodos de complementación y ruptura de genes para demostrar que la unidad de transcripción del gen *ery G*, que rige la O-metilación de eritromicina C en C-3", esta situada al rededor de 7 kbp por debajo de *ermE*.

En los últimos años se han aislado cepas mutantes que no sintetizan Eritromicina (Weber et al., 1985). En general estas cepas pueden ser clasificadas en 3 tipos: i) aquellas que no sintetizan productos macrólidos detectables. ii) aquellas que acumulan el aglicon eritronólido B, y iii) aquellas que acumulan el monoglicon 3 α -micarosileritronólido B. La relación enzima-gen en estas mutantes es en gran parte desconocido debido al número y complejidad de pasos involucrados. Las mutaciones en la última porción de la vía son difíciles de encontrar, porque la actividad antibiótica de las eritromicinas intermedias (B, C, y D) no permiten hacer una selección fenotípica basada en la pérdida de producción de antibiótico (Paulus et al., 1990).

Paulus et al., (1990) para aislar mutantes de la última porción de la vía, primero desarrollaron y caracterizaron en ensayos *in vitro* la actividad O-metiltransferasa y posteriormente realizaron un análisis empírico de mutantes *S. erythraea* basándose en el método de cromatografía en capa fina (TLC). Fue aislada una mutante derivada por mutagénesis química de *S. erythraea*, la que acumula eritromicina C y en menor grado, su precursor, eritromicina D, con poca ó sin producción de eritromicina A o eritromicina B (la 3"-O-metilación de eritromicina C y eritromicina D, respectivamente). Esta mutante carece de actividad eritromicin O-metiltransferasa, detectable con eritromicina C, eritromicina D o los análogos como sustratos. Fue identificado un fragmento de DNA de 4.5 Kb de *S. erythraea* originado aproximadamente 6.5 kb abajo de la región promotor del gen que codifica para la resistencia a eritromicina *ermE* (Weber et al., 1990), éste regeneró el fenotipo parental y también restauró la actividad eritromicin O-metiltransferasa cuando fue transformada en la mutante eritromicin O-metiltransferasa-negativa. Paulus et al., (1990) han designado a este genotipo como *ery G* de acuerdo con Weber et al., (1989). Parece ser que una sola enzima cataliza todas las reacciones 3"-O-metilación de la vía biosintética de eritromicina en *S. erythraea* y que *ery G* es un gen estructural que codifica para esta enzima.

Se realizaron una serie de experimentos de rompimiento y reemplazamiento de genes para caracterizar mutagénicamente un segmento de 30 Kb de DNA en la región del gen de resistencia a la eritromicina *ermE* del cromosoma de *S. erythraea*. 5 locus entonces no descubiertos, pero previamente involucrados en la biosíntesis de eritromicina fueron encontrados, son: *ery BI*, *ery BII*, *ery CI*, *ery CII*, y *ery H*; y 3 locus conocidos *ery AI*, *ery G* y *ermE*. La mutante *ery H* fue bloqueada en 2 pasos aparentemente no relacionados de la vía. El nuevo fenotipo, *ery H* fue marcado por i) acumular el intermediario 6DEB, lo cual sugiere un defecto en la operación del sistema C-6 hidroxilasa, y ii) estar bloqueado en la reacción de síntesis o unión del primer aminoazúcar. El locus *ery H* parece contener un gen regulatorio o un operon en al menos dos genes estructurales biosintéticos involucrados en la vía (Weber et al., 1990).

El gen *ery K* fue identificado por Stassi et al., (1993), localizado al rededor de 50 kb abajo del gen *ery E*, la secuencia proteica de 44 kDa (kilodalton) de este gen muestra alta similitud a otras monooxigenasas P-450. La demostración de que *ery K* está involucrado en el paso final de hidroxilación en la vía de biosíntesis de eritromicina, en la conversión de eritromicina B a eritromicina C y en la conversión de eritromicina B a eritromicina A, fue obtenida de los análisis efectuados de metabolitos acumulados por una cepa que tenía un gen *ery K* defectuoso. Un fragmento de DNA interno a la secuencia codificadora de *ery K* fue generado y subclonado en un vector-integrativo; la inserción del plásmido resultante dentro del cromosoma en *ery K* resultó en una cepa que acumuló eritromicina D y B, confirmando que ambas eritromicinas son substratos de la C-12 hidroxilasa.

Investigadores de los Laboratorios Abbott han localizado el gen *ery AI* alrededor de 12 kbp abajo del gen *erm E*, por medio de experimentos de complementación y ruptura de gen (Donadio et al., 1989 en Vara et al., 1989). Por otra parte Katz y sus colaboradores del mismo laboratorio han mostrado que los genes para la biosíntesis de eritromicina, que codifican para los componentes de la policétido sintasa, están localizados juntos, aproximadamente 10 kbp en el lado 3' del gen de resistencia. Un gran número de genes están localizados en el 5' del gen de resistencia *ermE*, y han sido sujetos de análisis genéticos detallados (Donadio & Hutchinson, 1988; Tuan et al., 1988; Weber et al., 1989; Dhillon et al., 1989).

Caffrey et al., (1992) mencionan que la región *ery A* del paquete de genes biosintéticos de eritromicina de *S. erythraea* contiene 3 grandes marcos de lectura abierta (ORFs) que codifica para los componentes de 6-desoxieritronólido B sintasa (DEBS).

Caffrey et al., (1992) obtuvieron anticuerpos policlonales contra proteínas recombinantes obtenidas por sobreexpresión de la región 3' de los genes ORF2 y ORF3. En experimentos de Western blot, cada antisuero reaccionó fuertemente con tres proteínas de diferentes y alto peso molecular de un extracto de células de *S. erythraea* productoras de eritromicina. Estas proteínas denominadas DEBS2 y DEBS3 fueron purificadas y sujetas a análisis de secuencia (amino) N-terminal; las secuencias de las proteínas fueron enteramente consistentes con el sitio de inicio de la traducción predicha de la secuencia de DNA de ORFs 2 y 3. Existe una tercer proteína de alto peso molecular que se copurificó junto con DEBS2 y DEBS3, la secuencia proteica fue traducida a partir de 155 pares de bases de DNA encontradas por encima del codón de iniciación propuesto previamente para el ORF1.

El primer paso en la vía biosintética del antibiótico macrólido eritromicina A en *S. erythraea* involucra la construcción de una cadena policetídica, que es entonces ciclizada para formar el anillo lactona de 14 carbonos, el 6-desoxieritronólido B, que es el primer intermediario aislado (Corcoran, 1981; Seno & Hutchinson, 1986). La naturaleza de la policétido sintasa que cataliza este proceso multipaso, 6-desoxieritronólido B sintasa (DEBS) ha sido extensamente investigada por medio de análisis genéticos (Weber et al., 1985; Tuan et al., 1990; Weber et al., 1990) y por secuenciación de nucleótidos de genes estructurales que codifican para la sintasa (Cortés et al., 1990). Estos genes *ery A* fueron encontrados empaquetados cerca de *erm E*, el gen que codifica para la resistencia a eritromicina, y se extienden sobre un segmento de DNA de aproximadamente 45 kbp (Caffrey et al., 1992).

La secuencia parcial de nucleótidos de esta región realizada por Katz y sus colaboradores en los laboratorios Abbott revelaron copias múltiples de cada componente potencial de la sintasa, juzgado ésto por similitud de secuencia con las regiones sitio-activo de la sintetasa de ácidos grasos y otros policétidos sintasas simples (Hale et al., 1987; Hopwood & Sherman, 1990; Revill & Leadlay, 1991).

La secuenciación de un segmento completo de DNA de 11 kbp de la región proximal a *ermE* del locus *eryA* (Cortés et al., 1990 a y b) confirmó la existencia de versiones múltiples de cada componente enzimático y mostró que 9 sitios con distinta actividad estaban alojados en una sola cadena polipeptídica. Además, las enzimas fueron agrupadas en 2 a lo largo de la cadena polipeptídica, cada grupo teniendo la actividad requerida para acompañar uno de los 6 ciclos requeridos de la extensión de la cadena.

Hasta ahora, la única evidencia de la existencia de 3 polipéptidos grandes poco usuales como componentes de la policétido sintasa (DEBS) de productores de eritromicina han sido demostrados por análisis de secuenciación de DNA. La secuenciación de los genes *eryA* ha apoyado ambas ideas "una enzima para cada movimiento" y la probable organización en dominios de la sintasa (Cortés et al., 1990 a y b), con 3 polipéptidos multienzimáticos grandes poco usuales (DEBS 1, DEBS 2, y DEBS 3) hospedando un total de al menos 28 sitios activos distintos.

Los estudios enzimológicos en DEBS involucraron la expresión heteróloga de alto nivel en *Escherichia coli* de la porción C-terminal de DEBS 3, predicha para alojar una proteína con dominio acarreadora de acilos (ACP) y un dominio tioesterasa que puede actuar como una ciclasa para producir 6-desoxieritronólido B directamente (Hale et al., 1987; Revill & Leadlay, 1991; Caffrey et al., 1991). Sin embargo, no ha sido posible demostrar la biosíntesis de eritronólido en extractos de *S. erythraea*, y no se han desarrollado ensayos específicos para estas enzimas.

Caffrey et al., (1992) reportaron la detección inmunológica directa de polipéptidos DEBS en extractos libres de células de *S. erythraea*, confirmando su tamaño poco usual. Los datos de la secuencia N-terminal y la reacción del polipéptido con antisuero dirigido contra su dominio C-terminal confirman que los productos de los 3 grandes genes de *eryA* muy probablemente funcionan como polipéptidos multienzimáticos intactos más que sufrir un procesamiento proteolítico para formar dominios funcionales pequeños.

La síntesis de 6 desoxieritronólido B (6DEB) involucra 6 ciclos de alargamiento que se asemejan a los pasos en la síntesis de ácidos grasos. Se ha mostrado recientemente que la síntesis de 6 DEB requiere de 3 genes adyacentes a *eryA* que codifican para un gran polipéptido multifuncional y que el empaquetamiento de *eryA* consiste de 6 módulos (unidades repetidas), cada una codifica una unidad sintasa (SU) específica diferente para cada uno de los pasos de alargamiento. Actividades semejantes a ácidos grasos sintasas: Proteína acarreadora de acilos (ACP); aciltransferasa (AT); β -cetoreductasa (KR); y β -cetoacil ACP sintasa (KS) fueron identificadas en el polipéptido multifuncional codificado por *eryA*, por la presencia de "secuencias firma" encontradas en el sitio activo del dominio funcional (Cortés et al., 1990 a y b). Sin embargo, secuencias firma no han sido asignadas previamente a funciones dehidratasa (DH) y enoilreductasa (ER) (Donadio & Katz, 1992).

Donadio & Katz, (1992) determinaron la localización de dominios enzimáticos en los 3 polipéptidos multifuncionales de *S. erythraea*, involucrados en la formación de la porción policétido del antibiótico realizando un análisis auxiliado por computadora. Por comparación de 6 unidades sintasa (SU) de los genes *eryA* con otras sintasas establecieron la extensión de cada dominio de: proteína sintasa acarreadora de acilo β -cetoacil (ACP), aciltransferasa (AT), β -cetoreductasa (KR), ACP, y tioesterasa (TE). La extensión del dominio enoilreductasa (ER) fue establecido detectando la similitud con otras secuencias en la base de datos. Fue encontrado un segmento que contenía el dominio de la dehidratasa (DH) en *eryAIII*, con un residuo potencial

sitio-activo histidina. Donadio & Katz. (1992) subdividieron cada polipéptido codificado por *ery A* en sus dominios y propusieron una localización para los dominios DH y ER en *ery AII*.

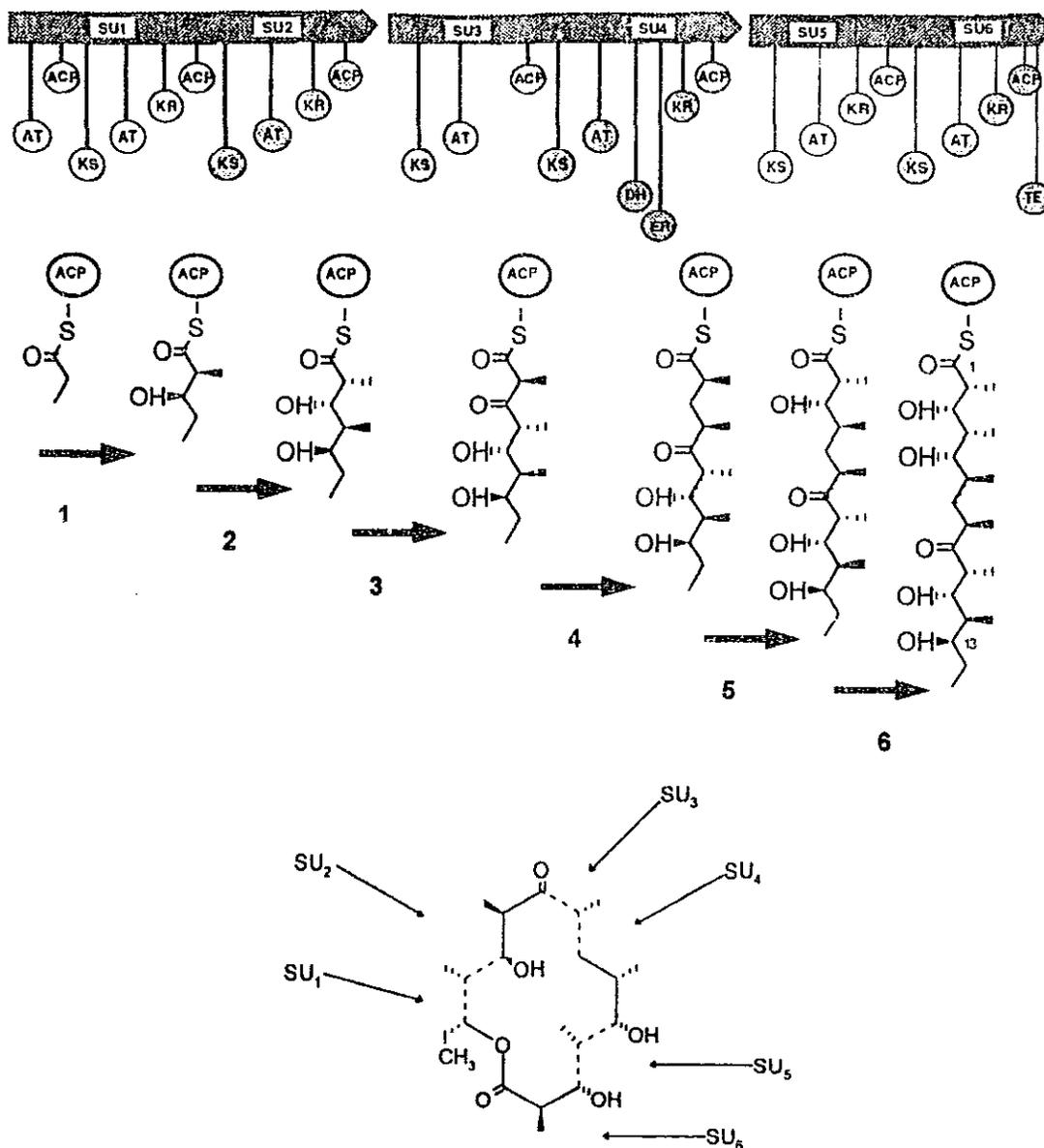


Figura No. 3a.- Biosíntesis de 6-desoxieritronólido B. La porción superior muestra los tres polipéptidos codificantes *ery A* conteniendo las 6 unidades sintasa (SU). Las actividades enzimáticas correspondiente a la primera y segunda SU de cada polipéptido se representan por círculos (ACP= proteína sintasa acarreadora de acilos; AT= acil transferasa; KR= β -cetoreductasa; KS= β -cetoacil ACP sintasa; TE= tioesterasa; ER= enoilreductasa; DH= dehidratasa), respectivamente. La porción inferior ilustra el papel de cada SU en la síntesis de 6-desoxieritronólido B, donde las unidades C2 en el anillo introducido por SU numerados se representan por raya y líneas continuas, respectivamente (Donadio & Katz. 1992; Donadio et al., 1993).

Donadio & Katz (1992) y Donadio et al., (1993) presentan el esquema de la síntesis de 6 DEB mostrando los 3 polipéptidos codificados por *ery A* conteniendo las 6 SU e ilustrando el papel de cada SU (Figura No. 3a). Cada módulo codifica para la producción de cada una de las SU que son responsables de cada uno de los 6 ciclos de alargamiento requeridos para la síntesis del policétido precursor, el orden en el cual están organizados los módulos corresponde al orden en el cual son empleados en la síntesis de cada SU. De tal manera que el módulo 1 que codifica para SU-1, es responsable del primer paso de la síntesis, el módulo 2 es responsable del paso 2, y así sucesivamente. Al asignarse a cada ciclo de alargamiento un diferente módulo que lleva la especificidad de las unidades de extensión y las determinaciones del proceso de extensión del β -carbonil a un paso determinado, se asegura que los requerimientos de la programación de cada ciclo se mantengan. El orden en el cual la cadena acil en crecimiento es transferida de una SU a otra determina finalmente el orden en el que los diferentes grupos químicos incorporados en cada ciclo aparecerán en el policétido completo.

Por todos estos reportes podemos sugerir un mapa físico aproximado de los genes de biosíntesis de eritromicina presentes en *Saccharopolyspora erythraea*, que sería: *ery B*, *ery D*, *ery CI*, *erm E*, *ery BI*, *ery H*, *ery F*, *ery G*, *ery BII*, *ery CII*, *ery AIII*, *ery AII*, *ery AI*, *ery K*; tal y como lo muestra la figura No. 3b. Los productos de los genes *ery B*, *ery D*, *ery CI* y *ery H*, no se han identificado, sin embargo se conoce a que nivel actúan las mutaciones de dichos genes. Los genes del mapa marcados en gris se consideran como las posibles regiones regulatorias, aún cuando no han sido del todo comprobadas.

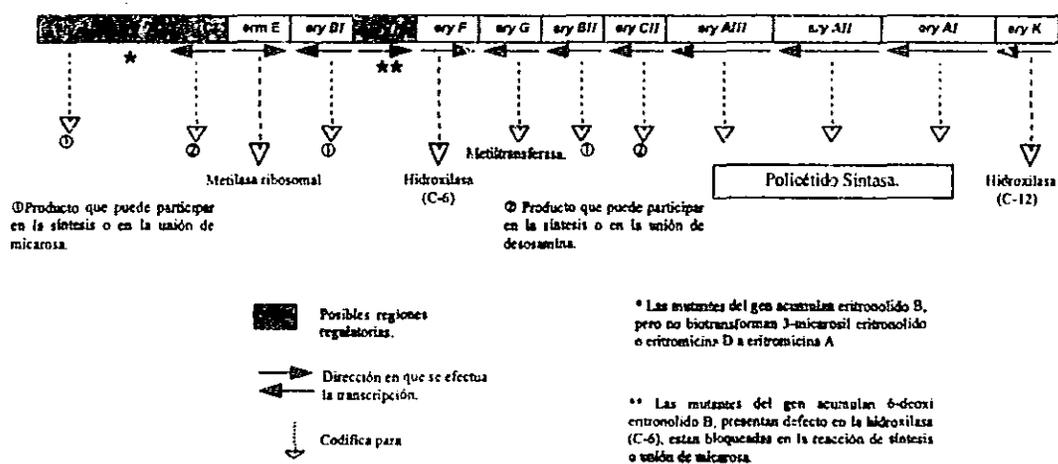


Figura No. 3b.- Mapa físico de los genes de biosíntesis de eritromicina de *Saccharopolyspora erythraea*.

RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS EN GENERAL.

La producción del antibiótico es un problema para los estreptomicetos, ya que éstos pueden resultar tóxicos para el microorganismo productor; para evitarlo, han desarrollado mecanismos de resistencia ante su propio producto: la información para ello se encuentra codificada en genes que le confieren dicha resistencia. En el caso de microorganismos que producen inhibidores de la síntesis de proteínas, mediante estudios bioquímicos se han identificado enzimas que modifican el antibiótico (tabla No. 5) o ribosomas (tabla No. 6) y previenen su interacción. Muchos estreptomicetos productores de antibiótico, son capaces de evitar su autoinhibición, al menos de 3 maneras: i) Modificando el sitio blanco intracelular normal (tabla No. 7), ii) Inactivando el antibiótico intracelularmente; p.e. la cepa *Streptomyces griseus* presenta una proteína que al unirse a tetraciclina la inactiva, por lo cual le confiere resistencia a dicho antibiótico (Cundliffe, 1989) y iii) Excluyendo el compuesto bioactivo del citoplasma; si es totalmente eficiente, confiere al organismo la capacidad de tolerar altos niveles extracelulares de su propio producto, p.e. *Streptomyces rimosus* sintetiza una proteína asociada a membrana que promueve la salida de la tetraciclina producida (Thompson et al., 1982; Cundliffe, 1989; Cundliffe et al., 1984).

Microorganismo Productor.	Antibiótico Producido.	Enzima(s) Modificadora(s)
<i>Streptomyces fradiae</i>	Neomicina	APH(3'), AAC(3)
<i>S. rimosus</i> forma <i>paramomycinus</i>	Paramomicina	APH(3'), AAC(3)
<i>S. lividus</i>	Lividomicina	APH(3'), AAC(3)
<i>S. ribosidificus</i>	Ribostamicina	APH(3'), AAC(3)
<i>Bacillus circulans</i>	Butirosina	APH(3'), AAC(3)
<i>S. kanamyceticus</i>	Kanamicina	AAC(6')
<i>S. tenebrarius</i>	Complejo nebramicina	AAC(6'), AAC(2')
<i>S. griseus</i>	Estreptomycina	SPH(6), SPH(3'')
<i>S. hygrosopicus</i> NRRL2387	Higromicina B	HPH
<i>S. alboniger</i>	Puromicina	PAC
<i>S. vinaceus</i>	Viomicina	VPH
<i>S. capreolus</i>	Capreomicina	CPH, CAC
<i>Streptomyces</i> V-13-1	Estreptotricina	STAT
<i>S. noursei</i>	Nourseotricina	NAT
<i>S. hygrosopicus</i> ATCC21705	Bialafos	DPAT(PAT)
<i>Streptovercillium</i> sp. JCM4673	Blasticidina S	Acetiltransferasa
<i>S. verticillus</i>	Bleomicina	Acetiltransferasa
<i>S. kasugaensis</i>	Kasugamicina	Acetiltransferasa

APH.- Aminoglucoído Fosfotransferasa
AAC.- Aminoglucoído Acetiltransferasa.
SPH.- Estreptomycina Fosfotransferasa.
HPH.- Higromicina Fosfotransferasa.
PAC.- Puromicina Acetiltransferasa.
VPH.- Viomicina Fosfotransferasa.

CPH.- Capreomicina Fosfotransferasa
CAC.- Capreomicina Acetiltransferasa
STAT.- Estreptotricina Acetiltransferasa
NAT.- Nourseotricina Acetiltransferasa
DPAT(PAT).- Dimetilfosfotricina (o Fosfotricina) Acetiltransferasa.

TABLA No.6 METILACION DEL RNA ribosomal ASOCIADO A LA RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS AISLADOS DE ACTINOMICETOS.				
Microorganismo Productor.	Gen de resistencia.	Caracter de resistencia	Sitio de Metilacion del RNA	Residuo Metilado
<i>Streptomyces azureus</i>	<i>tsr</i>	Tioestrepton	23S, 1067	Am
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	<i>ermE</i>	MLS	23S, 2058	m ⁵ A
<i>Streptomyces fradiae</i>	<i>tlrA (ermSF)</i>	MLS	23S, 2058	m ⁵ A
<i>Streptomyces caelestis</i>	<i>clr</i>	Lincosamidas	23S, 2058	m ⁶ A
<i>Streptomyces lividans</i>	<i>lrm</i>	Lincosamidas	23S, 2058	m ⁶ A
<i>Micrimonospora purpurea</i>	<i>kgmA</i>	K+G	16S, 1405	m ⁷ G
<i>Streptomyces tenjimariensis</i>	<i>kamA</i>	K+A	16S, 1408	m ¹ A
<i>Streptomyces tenebrarius</i>	<i>kgmB+kamB</i>	AMG	16S, 1405+1408	m ⁷ G+m ¹ A
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	<i>kan</i>	K+G	16S, 1405	m ⁷ G

MLS - Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B
K - Kanamicina.
G - Gentamicina
A - Apramicina
AMG.- Aminoglicosidos

Am - 2'-O-metiladenosina
m⁵A - N⁶-monometiladenosina
m⁷G - 7-metilguanosina
m¹A - 1-metiladenosina
m₂ A - N⁶,N⁶-dimetiladenosina

TABLA No. 7 MODIFICACION DE LOS SITIOS BLANCO NO RIBOSOMALES CAUSANTES DE LA RESISTENCIA EN MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ANTIBIOTICOS		
Microorganismo Productor.	Antibiótico Producido.	Blanco del Antibiótico
<i>Streptomyces sphaeroides</i>	Novobiocina	DNA Girasa
<i>Noecardia mediterranei</i>	Rifamicina	RNA Polimerasa
<i>S. lydicus</i>	Estreptolidigina	RNA Polimerasa
<i>S. spectabilis</i>	Estreptovarcina	RNA Polimerasa
<i>Amanita</i> sp.	a-amanitina	RNA Polimerasa II
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ac Pseudomonico	ile-tRNA Sintasa
<i>S. cinnamomeus</i>	Kirroticina	EF
<i>S. lactamdurans</i>	Efrotomicina	EF
<i>Cephalosporium caeruleus</i>	Cerulenina	Acilgraso Sintasa

EF.- Factor de Elongación

ile - Isoleucina

El organismo productor de eritromicina, *Saccharopolyspora erythraea*, es altamente resistente a dicho antibiótico, debido a que presenta una modificación estructural del sitio blanco (el ribosoma) eliminando la posibilidad de unión del antibiótico, esto ha sido demostrado en *Streptomyces azureus*, (rRNA 23 S ribosa metilasa) productor de tioestrepton, y en *Saccharopolyspora erythraea*, productor de eritromicina. Los ribosomas de *S. erythraea* poseen

muy baja afinidad por eritromicina. Esta resistencia ha sido demostrada por la presencia de N⁶, N⁶-dimetiladenina dentro del rRNA 23 S. Esta modificación ribosomal ha probado ser el mecanismo por el cual un organismo productor de antibiótico se defiende propiamente contra su producto. Esta metilasa confiere resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y streptograminas B (resistencia MLS); aunque la resistencia-MLS constitutiva ha sido encontrada en *Saccharopolyspora erythraea*, la resistencia-MLS inducible ha sido descrita en varios productores de macrólidos, lincosamidas y streptograminas B; y está asociada con la aparición de una adenina mono y/o dimetilada en rRNA 23 S. También se han encontrado ribosomas resistentes al antibiótico en *Streptomyces tenjimariensis* productor de istamicina (Skinner & Cundliffe, 1982; Thompson et al., 1982; Cundliffe et al., 1984; Fierro et al., 1988).

La resistencia a eritromicina esta asociada con la N-6-dimetilación de un residuo de adenina específica en rRNA 23 S de *Saccharopolyspora erythraea* que reduce la afinidad del ribosoma por el antibiótico. El gen que codifica para la resistencia a eritromicina *ermE* ha sido clonado y secuenciado de *S. erythraea* por Thompson et al., (1982); Uchiyama & Weisblum, (1985); Bibb et al., (1985) y por Janssen & Bibb, (1988).

Una comparación de la secuencia de aminoácidos de *ermE* metilasa con aquellas metiltransferasas inducibles de *Staphylococci* y *Bacilli* resistentes a eritromicina mostraron que el producto del gen *ermE* contiene una extensión C-terminal con varios pentapéptidos repetidos, no presentes en las metilasas inducibles. Subsecuentemente, en el gen que codifica para la resistencia *ermA* constitutivo del paquete biosintético de eritromicina de una especie de *Arthrobacter* se encontró que posee un extremo C-terminal, similar pero más corto que el de *ermE* de *Saccharopolyspora erythraea*. El reanálisis de secuencia nucleotídica del gen *ermE* de rRNA metil transferasa de *Saccharopolyspora erythraea* ha confirmado que el residuo 90 C-terminal constituye un dominio altamente polar, potencialmente flexible, con una alta carga neta positiva. La comparación entre la secuencia de aminoácidos C-terminal de las metilasas codificadas por *ermE* y *ermA* mostraron que ellas no poseen alguna secuencia conservada completamente, pero la similitud en la composición de aminoácidos, carga neta, polaridad y conformación predicha en solución, muestran una función común para este dominio. Una explicación para la presencia, en los productores de eritromicina, de un dominio C-terminal básico, potencialmente flexible es lo que facilita la unión de la metiltransferasa a su substrato rRNA. El producto del gen *ermE* es activo *in vitro* contra rRNA 23 S, pero no actúa eficientemente en partículas ribosomales 50 S, y la metiltransferasa codificada por *ermE* aparentemente co-sedimenta con la fracción ribosomal de *Saccharopolyspora erythraea*. El extremo C-terminal básico puede mediar en una interacción directa entre la enzima y el rRNA, o puede aumentar la afinidad de unión, a través de su interacción con proteína ribosomal específica (Dhillon & Leadlay, 1990).

En contraste, otros microorganismos que producen inhibidores de síntesis de proteínas, poseen ribosomas que son completamente sensibles al antibiótico que están produciendo. En tales casos, la vía biosintética debe estar organizada para que el compuesto bioactivo no se acumule en el citoplasma, como ocurre en *Streptomyces fradiae*, productor de neomicina, que puede ser modificada por 3-N-acetiltransferasa, y 3'O-fosfotransferasa presentes en el microorganismo productor. *Streptomyces vinaceus* productor del antibiótico péptido viomicina posee ribosomas sensibles a la droga pero presenta una O-fosfotransferasa capaz de inactivar la droga *in vitro*. *Streptomyces capreolus* productor de capreomicina posee una acetiltransferasa activa sobre todas las capreomicinas. Las enzimas modificadoras del antibiótico pueden participar en la síntesis y/o exportar el antibiótico producido como un precursor inactivo, como estreptomicina fosfotransferasa que esta involucrada en la biosíntesis de estreptomicina. En tales

casos, puede ser necesaria otra enzima para "activar" el producto, por ejemplo, fosfoestreptomina fosfatasa en *Streptomyces griseus*, y acetilkanamicina hidrolasa en *Streptomyces kanamyceticus*. Otro factor importante en la determinación de niveles de resistencia, particularmente cuando tiene acumulada alta concentración extracelular de droga, debe incluir las propiedades de permeabilidad de la membrana celular y el rango en que el antibiótico puede ser excretado (Thompson et al., 1982; Cundliffe et al., 1984).

Cramer & Davies, (1986) clonaron el gen que codifica para la 6'-N-acetiltransferasa, a partir de *Streptomyces kanamyceticus* M 1164, en el plásmido vector pIJ702 de alto número de copias, introduciéndolo posteriormente en *Streptomyces kanamyceticus* ATCC 12853 productor de kanamicina y en *Streptomyces fradiae*. En ambos casos, los transformantes que contenían el plásmido recombinante mostraron una alta resistencia a un número de antibióticos aminoglucósidos e incrementó la producción de kanamicina y neomicina. Esto demostró que la amplificación específica del producto del gen asociado con la biosíntesis del antibiótico provee un medio de mejoramiento de producción del antibiótico.

REGULACION DE LA PRODUCCION DE ERITROMICINA.

Se conoce muy poco sobre la regulación de la biosíntesis de macrólidos en general. Existen pocos reportes sobre la regulación por nitrógeno de la biosíntesis de macrólidos, se ha observado que la adición de glicina o NH_4Cl puede causar represión; se ha reportado que la adición de harina de soya a cultivos de *Saccharopolyspora erythraea* en idiofase causó una marcada reducción en la síntesis del antibiótico y en la incorporación de propionato marcado (Omura & Tanaka, 1983).

Por otro lado, se sabe que el fosfato inorgánico también es un efector negativo de la biosíntesis de muchos antibióticos especialmente de macrólidos derivados policétidos (Martín, 1979).

En cuanto a la represión catabólica por carbono, D-glucosa ejerce un efecto represivo transitorio en la producción de eritromicina; por ello para las condiciones de fermentación óptimas, la sacarosa es generalmente preferida a la glucosa debido a que es metabolizada lentamente, así es evitada la represión por carbono ejercida por glucosa. Se ha reportado que el incremento de CO_2 , durante la fermentación inhibe la síntesis de eritromicina pero, esto no parece afectar el crecimiento de *Saccharopolyspora erythraea*. Los Actinomicetos crecen normalmente en bajas concentraciones de O_2 disuelto, pero, para la biosíntesis del antibiótico por lo general se requiere de altas concentraciones de éste (Martín, 1979; Escalante et al., 1982; Higashide, 1984).

La biosíntesis de eritromicina es regulada a varios niveles, uno de ellos es la síntesis de la aglicona la cual es limitante para la producción de eritromicina. Para producir el aglicon se necesita de los precursores que son propionil-CoA y Metilmalonil-CoA, los cuales se producen por la actividad de las enzimas cinasa (I) y acil CoA (III); por otro lado otras enzimas tioesterasa (II) y carboxil transferasa (IV) podrían provocar que la vía se fuera hacia metabolismo primario y no al metabolismo secundario para la producción de la eritromicina (Figura No. 4).

peucetius) y productos deducidos de los genes de *Streptomyces coelicolor actII-orf4*, *afsR*, y *redD-orf1*. El grupo II lo forman: *dnrJ* (*Streptomyces peucetius*) y productos deducidos de los genes de *Streptomyces griseus str.S*, *Saccharopolyspora erythraea ery C1*, *ery B* y de *Bacillus stearothermophilus degT*. Se observó que los miembros de esta última familia presentan semejanzas del componente de proteína cinasa (sensor) con 2 de los componentes del sistema regulatorio de otras bacterias, y tienen un consenso típico de motivo hélice que gira en hélice de proteínas de unión a DNA.

Cómo se ha mencionado con anterioridad, el uso de los antibióticos macrólidos en medicina humana se inicia con el descubrimiento de la eritromicina A en 1952. Desde entonces se ha observado que es un fármaco valioso contra infecciones producidas principalmente por bacterias Gram-positivas. Debido a su importancia tanto en la clínica como comercialmente, la eritromicina es considerada como el prototipo de los antibióticos macrólidos (Vera et al., 1989).

En México se producen los antibióticos ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, penicilina, gentamicinas y lincomicinas entre otros, y para completar las necesidades básicas de medicamentos se importan los demás. A pesar de que se produce eritromicina en nuestro país desde hace algún tiempo (laboratorios Abbott y Fermic), la producción no es suficiente, por lo que es necesario importar una parte para satisfacer las demandas del mercado (Escalante, 1988; Dr. E. Tisselli comunicación personal).

Muchos de los resultados que se han obtenido en investigación, no solo en eritromicina, han beneficiado los procesos de fermentación ya existentes, así como han generado un cúmulo de conocimientos sobre genética, biología molecular y bioquímica de los actinomicetos, microorganismos hasta hace algunos años desconocidos y que son muy importantes desde el punto de vista comercial y económico.

El interés a nivel mundial en la investigación sobre la manipulación genética, clonación de los genes responsables de la biosíntesis de los antibióticos, la generación de antibióticos híbridos y la regulación de la producción de los microorganismos sigue incrementándose. En este sentido, en el caso particular de eritromicina a la fecha se han clonado casi todos los genes de la biosíntesis, sin embargo nada se ha reportado de su regulación ni tampoco se ha reportado la fusión de protoplastos intraespecíficos e intergenéricos de *Saccharopolyspora erythraea* y otros microorganismos. Es por estas razones que los objetivos de este trabajo fueron:

Objetivos:

Mejoramiento genético de *Saccharopolyspora erythraea* mediante la obtención de cepas híbridas a través de fusión de protoplastos intraespecíficos e intergenéricos.

MATERIAL Y METODOS.

a) Cepas Bacterianas:

Saccharopolyspora erythraea NRRL 2338.

Saccharopolyspora erythraea CA-340

Saccharopolyspora erythraea RC.

Saccharopolyspora erythraea B-52.

Saccharopolyspora erythraea B-107.

Streptomyces kanamyceticus.

Streptomyces griseus B-40 .

Streptomyces griseus B-231.

Nocardia mediterranei.

Microorganismos de prueba:

Sarcina lutea.

Bacillus subtilis.

b) Mantenimiento de las Cepas.

Cada una de las cepas fue cultivada en Medio Completo (MC) [Extracto de levadura 4 g/l; Extracto de malta 10 g/l; Glucosa 4 g/l; Agar 20 g/l, pH 7.9.] hasta la formación de esporas, manteniendo las cajas cubiertas para protegerlas de la luz lo cual permite la formación de esporas (excepto *Streptomyces kanamyceticus*), posteriormente fueron cosechadas para formar la suspensión de esporas en Medio para Conservar Esporas (MCE) [Extracto de levadura 4g/l; Extracto de malta 10g/l; Glicerol 20 %] y se almacenaron en congelación (-20°C).

c) Formación de Protoplastos.

Para activar nuevamente las esporas se inocularon 25 ml de MC líquido, con 0.1 ml de la suspensión de esporas, incubando con agitación a 200 revoluciones por minuto (rpm) a 29°C durante 48 hrs.

Transcurrido el tiempo se midió la densidad óptica (D.O.) a 540 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20 Bausch & Lomb; se tomaron 3 ml de este cultivo y se inocularon nuevamente en 50 ml de MC más la cantidad de glicina que fuera necesaria según la cepa (0.5 %, 0.6 % y 0.9 %), incubando con agitación a 200 rpm de 12-16 hrs según la cepa a 29°C (tabla No. 9).

Pasado el tiempo necesario de crecimiento se leyó la D.O. nuevamente (para conocer la concentración al comenzar la formación de protoplastos) y se centrifugó 5 min a 4500 rpm en una centrifuga clínica SOL-BAT. Se lavó el micelio 2 veces con una solución de sacarosa 10.3 %. Posteriormente se resuspendió el micelio en 4 ml de solución de lisozima (las concentraciones utilizadas se muestran en la tabla No. 9), en Medio P [MP] (Sacarosa 103 g/l; K₂SO₄ 0.25 g/l; MgCl₂•6H₂O 2.02 g/l; Elementos traza 2 ml [Elementos traza: ZnCl₂ 40 mg/l; FeCl₃•6H₂O 200 mg/l; CuCl₂•2H₂O 10 mg/l; MnCl₂•4H₂O 10 mg/l; Na₂B₄O₇•10H₂O 10 mg/l; (NH₄) Mo₇O₂•4H₂O 10 mg/l]. Se separó en 80 ml y se agregó, esterilizando por separado, en el orden siguiente: 1 ml de K₂HPO₄ al 0.5%; 10 ml de CaCl₂•2H₂O al 3.68%; 10 ml de TES al 5.73%; pH 7.2) y se agitó con un vortex de plataforma, Maxi Mix II SYBRON.

Se incubó el micelio sin agitación a 30°C hasta la formación de protoplastos observando al microscopio (tabla No. 9). Formados los protoplastos se filtraron en algodón para eliminar el

micelio y se centrifugó nuevamente, pero a 2000 rpm durante 10 min. resuspendiéndose para su lavado en MP 2 veces.

Listos los protoplastos en un volumen fijo, se contaron con la cámara de New Bauer. Se hicieron las diluciones necesarias en MP y en agua destilada estéril con Dodecil Lauril Sulfato de Sodio (SDS) al 0.01 % (para romper los protoplastos y así poder ver si quedó micelio). Las diluciones fueron plaqueadas 1 hr después en todos los Medios de Regeneración mostrados en la tabla No. 8, con el fin de evaluar en cual de ellos se obtenía una mejor regeneración (Hopwood et al., 1985; Ikeda et al., 1983; Maldonado S. M. E. M. 1982; Weber et al., 1985; Yamamoto et al., 1986). Las diluciones en SDS se plaquearon en MC; ambos tratamientos se incubaron a 29°C de 7 a 10 días y posteriormente se contaron las colonias.

TABLA No. 8 MEDIOS DE REGENERACION.			
Componentes	MR2 g/l	MRK g/l	MR2T20 g/l
Sacarosa	103	100	20
K ₂ SO ₄	0.25	0.25	0.25
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.12	10.25	10.2
Glucosa	10	10	10
Casaminoácidos	0.1	0.1	
Acido Glutámico		3	
Extracto de Levadura			6.5
Peptona			4
Triptona			5
NaOH		0.75	
NaNO ₃		0.3	
Elementos traza	2 ml (+)	2 ml	2 ml
Agar	22	22	22
K ₂ HPO ₄ 0.5 %	10 ml (+)	10 ml (+)	
Trizma base 2M			12.5 ml (+)
K ₂ HPO ₄ 5 %			5 ml (+)
CaCl ₂ ·2H ₂ O 3.68%	80 ml (+)		
NaOH 1N			2.5 ml (+)
CaCl ₂ ·2H ₂ O 1M			50 ml (+)
CaCl ₂ ·2H ₂ O 5M		4 ml (+)	
TES 5.73 %	100 ml (+)	100 ml	
L-Prolina 20 %	15 ml (+)	15 ml (+)	
pH	7.2 (+)	7.2	7

(*) Estos componentes se agregan al tiempo de usar, esterilizándose por separado.

(+) Se ajusta con NaOH 1 N, si es necesario se agregan 5 ml.

Nota: para la sobrecapa de los medios de regeneración se utilizó agarosa de bajo punto de fusión al 0.7 % en el medio de regeneración correspondiente.

d) Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI).

El micelio de las diferentes cepas se plaqueó en cajas con MC y se les colocaron discos de papel filtro (Wathman de 6mm de diámetro tipo AA) conteniendo diferentes concentraciones (de 5 a 1000 µg/ml) de antibiótico: gentamicina, estreptomina, rifamicina, kanamicina, eritromicina, así como otros antibiótico macrólidos, tilosina, oleandomicina, y espiramicina; dejando difundir una hora a 4°C; se incubó a 29°C durante 24 hrs y posteriormente se registraron los halos de inhibición para determinar las CMI a los diferentes antibióticos. Posteriormente se rectificaron las CMI en medio de regeneración.

e) Fusión de Protoplastos.

Formados y contados los protoplastos, se mezclaron cantidades iguales de las cepas por fusión y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. resuspendiendo con 0.8 ml de solución de PoliEtilenGlicol (PEG Sigma PM 3350) al 50 % en MP. Se incubó 2, 5, 10, y 15 min a 30°C, observando al microscopio.

Para eliminar el PEG, se centrifugó a 2000 rpm 10 min y se lavó dos veces con MP, resuspendiéndose finalmente en éste.

Posteriormente los protoplastos se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión licuado. La mezcla se vació en cajas con el MR en el cual los padres habían crecido mejor y marcadores (antibióticos) seleccionados con base en las CMI obtenidas previamente mediante resistencia cruzada. Los protoplastos de las cepas parentales se plaquean por separado en MR con los marcadores, con el fin de asegurar que son inhibidos por los antibióticos. Por último se incubó a 29°C hasta su crecimiento.

f) Caracterización de los Híbridos.

La caracterización de los híbridos se efectuó primero por su resistencia a ambos marcadores, resembrando éstos en medio con los antibióticos elegidos según la fusión.

Segundo por la producción de eritromicina. Para lo cual se efectuó una fermentación líquida. Para ello se preparó un preinóculo con 0.1 ml de suspensión de esporas de cepas híbridas y parentales en 25 ml de MC líquido, que se incubó en agitación a 200 rpm a 29°C por 48 hrs.

Transcurrido el tiempo se midió la D.O. a 540 nm para ajustar el inóculo antes de iniciar la fermentación en MC o Medio Mínimo [MM: K₂HPO₄ 2.5 g/l; NaCl 5 g/l; MgSO₄·7H₂O 0.5 g/l; FeSO₄·7H₂O 0.5 g/l; ZnSO₄·7H₂O 0.05 g/l; MnCl₂·4H₂O 0.001 g/l; COCl₂ 0.001 g/l; MOPS 20 g/l; Sacarosa 20 g/l; Glicina 2 g/l; pH (Ajuste con NaOH 10N) 7.8] tomando muestras cada 24 hrs, durante 5 días. Las muestras se congelaron para posteriormente ser procesadas.

i) Cuantificación de la Eritromicina.

Se determinó la producción por medio de bioensayo o técnica de difusión en placa de agar, en el cual el microorganismo prueba fue *Sarcina lutea* ó *Bacillus subtilis*. Este método está basado en la respuesta del microorganismo al antibiótico, comparada a la que presenta frente a un estándar de concentración conocida. La respuesta es observada como una zona clara, de inhibición del crecimiento, en el cual, el diámetro de esta zona es proporcional al logaritmo de la concentración del antibiótico (Kavanagh. 1975).

Creciendo *Sarcina lutea* ó *Bacillus subtilis* en 15 ml en su medio respectivo, sin agar. (Medio para *Sarcina lutea*: Extracto de levadura 3 g/l; Extracto de carne 1.5 g/l; Peptona 6 g/l;

Agar 15 g/l; diluido con Buffer K_2HPO_4 0.1M pH 7.9; Medio para *Bacillus subtilis*: Extracto de levadura 3 g/l; Extracto de carne 1.5 g/l; Peptona 6 g/l; Agar 15 g/l; diluido con Buffer K_2HPO_4 0.01M pH 8) por 18 a 20 horas a 29°C, con agitación a 200 rpm. Al término de este tiempo se agregaron los mililitros necesarios, para tener la D. O. deseada (2), de este cultivo al medio respectivo, con agar, y se homogeneizó antes que solidificara el medio. Una vez incluido el microorganismo, se colocaron 15 ml del medio en cajas de petri desechables de 9 cm de diámetro. Por otro lado se colocaron 20 µl de caldo de fermentación de las diferentes muestras en discos de papel filtro, y diferentes concentraciones de eritromicina para establecer una curva estándar de comparación. Posteriormente se colocaron los discos en las cajas de medio conteniendo *Sarcina* o *Bacillus* una vez que el medio se solidificó. Estas se mantuvieron a 4°C durante 1 hr para permitir que difundiera el antibiótico, y se incubaron durante 24 hrs a 29°C. Después de las 24 hrs de incubación se midió el halo de inhibición producido por las muestras y el estándar.

ii) Crecimiento.

El crecimiento se determinó midiendo la cantidad de proteína intracelular por el método de Lowry (Lowry et al., 1951, 1957).

Se centrifugaron 2 ml de muestra de la fermentación a 4500 rpm durante 5 min. Para separar el micelio del medio de cultivo, se decantó el sobrenadante, guardándolo para posteriormente medir el pH y cuantificar el antibiótico. Las células se lavaron con agua destilada dos veces, se decantaron y se les adicionó 2 ml de Ácido Tricloroacético (TCA) al 10 % agitando bien, para posteriormente refrigerar las muestras durante 12 hrs. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 4500 rpm por 5 min para eliminar el TCA, a continuación se adicionó de 0.2-2 ml de NaOH 0.4 N. Posteriormente se tomó de esta suspensión una alícuota de 200 µl de la muestra aforándose a 1 ml con agua destilada; se adicionó 5 ml de solución A ($NaCO_3$ 2% en NaOH 0.1 N) 98 % + solución B (Tartrato de Sodio y Potasio 1 %) 1 % + solución C ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 %) 1 %, agitando y dejando reposar durante 10 min.

Transcurridos los 10 min se le adicionó 0.5 ml de una dilución 1:3 de Folin-agua (reactivo de Folin-Ciocalteus), agitando y dejando reposar 30 min y por último se leyó la D.O. a 595 nm.

Se calcula la concentración interpolando en una curva estándar de albúmina sérica bovina (de 0 a 300 µg/ml), que se corre simultáneamente con las muestras y un blanco.

iii) Extracción del Antibiótico.

Para extraer el antibiótico, el caldo de fermentación libre de micelio se ajustó a pH 9.8 con hidróxido de amonio, posteriormente se extrajo con cloroformo 1:1 y por último con acetato de etilo 1:1. Con un rotavapor se evaporaron dichos compuestos, y posteriormente se resuspende con metanol.

iv) Cromatografía.

Los extractos fueron sometidos a cromatografía en placa fina de sílica gel con un sistema de solventes: cloruro de metileno, metanol, hidróxido de amonio (90:10:1), el revelado se efectuó con Yodo o por aspersión con los reactivos: etanol, ácido sulfúrico, paranisalaldehído (9:1:1), preparado al momento de uso, se corrieron estándares de eritromicina A, B, y C.

Algunas muestras se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), corriéndolas en una columna NOVOPAK de sílica C-18 (técnica implementada por el Q. Agustín Rey de Tsuji & Goetz, 1978; Kibwage et al., 1983; Kibwage et al., 1985).

RESULTADOS Y DISCUSION.

La formación de protoplastos de cualquier microorganismo involucra el crecimiento en las concentraciones adecuadas de glicina o treonina y posteriormente el tratamiento con enzimas líticas que en el caso de Actinomicetos y otras bacterias es la lisozima.

Para nuestro caso, debido a que no había reportes para algunos de los microorganismos usados se inició montando las condiciones de crecimiento y formación de protoplastos.

En la tabla No. 9 se muestran los resultados obtenidos que se utilizaron en este trabajo, se observa que se monitoreó la fase de crecimiento a través de la densidad optica (D. O.) a 540 nm al inicio del cultivo de las cepas en medio completo con glicina y después al comenzar la formación de protoplastos para que en los experimentos posteriores se utilizara la misma cantidad de micelio. La cantidad de glicina que se utilizó varió entre 0.5 y 0.9 % de acuerdo a la concentración reportada anteriormente (Hopwood et al., 1985; Yamashita et al., 1985), además de tener en cuenta la tolerancia de las cepas al crecimiento con glicina. Se controló el tiempo de crecimiento con glicina. Para una buena formación de protoplastos se requiere que el microorganismo esté en la fase de crecimiento exponencial o de transición (Baltz, 1978). Si se dejan crecer mucho tiempo las cepas pueden consumir la glicina, evitando sea introducido en la pared y dificultando así la formación de protoplastos. También se monitoreó el porcentaje de formación de protoplastos por observación al microscopio, procurando que fuera entre 80% y 95%. Para *Streptomyces* la enzima que se utiliza en la formación de protoplastos es generalmente la lisozima a una concentración entre 1 y 3 mg/ml, la cantidad utilizada de dicha enzima en éste trabajo fue la reportada por Hopwood et al., (1985), procurando evitar tratamientos largos con la enzima dado que decrece la capacidad que permita a los protoplastos regenerarse (Baltz & Matsushima, 1981; Otts & Day, 1987).

Malanicheva et al., (1991) trabajaron con la cepa *Streptomyces kanamyceticus*, sin embargo no reportaron las condiciones para la formación de protoplastos con dicha cepa. Dado lo cual, en este trabajo la formación de protoplastos de la cepa *Streptomyces kanamyceticus* fue repetida en varias ocasiones, dado que tardaban mucho tiempo en formarse los protoplastos, o sin formarse se lisaba completamente el micelio. Por estas razones se realizó una curva a diferentes tiempos de crecimiento con glicina para observar el tiempo que tardaban en formarse los protoplastos, al igual que se aumentó la concentración de lisozima (ver figura No. 5); se observó que el menor tiempo de formación de protoplastos es a las 12 horas de crecimiento con glicina (ver tabla No. 9).

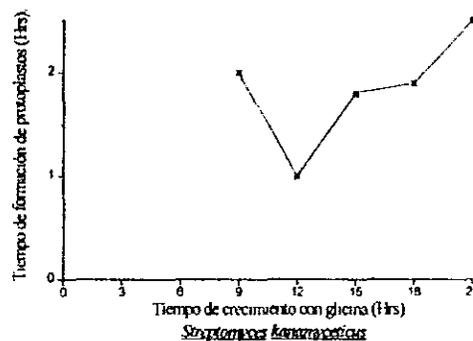


Figura No. 5.- Tiempo de formación de los protoplastos en función del tiempo de crecimiento de *Streptomyces kanamyceticus* en Medio Completo con 0.6 % de glicina.

**TABLA No. 9
FORMACION DE PROTOPLASTOS.**

CEPA	MC D.O. (540 nm)	CONCENTRACION DE GLICINA (%)	TIEMPO DE CRECIMIENTO (H) ^a	D.O. (540 nm) **	TIEMPO DE FORMACION (min)	% DE PROTOPLASTOS ^b	LISOZIMA (mg/ml)
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338.	0.538	0.5	14	0.409	15-20'	95	2
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA-340.	1.046	0.5	14	0.553	30'	95	2
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> RC.	0.337	0.5	14	0.276	30'	90	2
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> B-52.	0.796	0.5	14	0.432	15-20'	95	2
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> B-107	0.469	0.5	14	0.268	120'	80	3
	0.745	0.5	12	0.284	60'	80-90	3
<i>Streptomyces kanamyceticus</i> .	0.027	0.6	12	0.185	60'	90	3
<i>Streptomyces griseus</i> B-40.	—	0.9	16	—	30'	90	2

* D.O. al inicio de sembrar las cepas en Medio Completo con glicina.

** D.O. al comenzar la formación de protoplastos.

a Incubados a 29° C con una agitación de 200 rpm en 50 ml de Medio Completo en un matraz Erlen Meyer de 250 ml.

b % calculado al observar al microscopio con un objetivo de 40X.

La cepa *Saccharopolyspora erythraea* B-107 presentó el mismo comportamiento que la cepa *Streptomyces kanamyceticus*, por lo que se probó si con los mismos parámetros, creciendo la cepa 12 horas con glicina y usando 3 mg/ml de lisozima, se mejoraba la formación de protoplastos. Los resultados obtenidos mostraron una reducción en el tiempo de formación de protoplastos a la mitad (60 minutos) y un porcentaje de protoplastos entre 80 y 90 (tabla No. 9).

Otro punto importante después de la formación de protoplastos es la regeneración de los mismos, ya que de esto depende en buena medida la selección de los híbridos.

Se probaron los medios de regeneración reportados por Okanishi et al., (1974); Hopwood et al., (1985); Weber et al., (1985); Yamamoto et al., (1986); Maldonado. (1982); observando el crecimiento en cada uno de los medios y seleccionando los óptimos para cada una de las diferentes cepas (tabla No. 10).

Inicialmente se probó el medio MR1 y se observó que los protoplastos de la cepa *Saccharopolyspora erythraea* CA-340 no regeneraron bien en dicho medio (Okanishi et al., 1974). Posteriormente se utilizó el medio MR2T20, inicialmente empleado para transformar a la cepa *S. erythraea*, lo cual permitió la regeneración de esta cepa, así como también de la mayoría de las cepas *S. erythraea* (Weber et al., 1985; Yamamoto et al., 1986).

Por otro lado los protoplastos de la cepa *S. erythraea* B-107 tampoco regeneraron en el medio MR2T20, ni en el MR1 adecuadamente, en cambio en el medio MRK si se regeneraron un mayor número de protoplastos (ver tabla No. 10). Confirmando con esto que los parámetros óptimos para la formación y regeneración de protoplastos, pueden variar considerablemente de cepa a cepa y de grupo a grupo (Ogawa et al., 1983; Otts & Day 1987). Cabe mencionar que todas las cepas se probaron en todos los medios de regeneración, algunas cepas regeneraban en menor o mayor número en los diferentes medios, siendo los presentados en la tabla No.10 los medios de mejor regeneración para cada caso.

En virtud de que los protoplastos de las diferentes cepas no regeneraron bien en los mismos medios se decidió utilizar los dos medios de ambas cepas para seleccionar a los híbridos.

TABLA No. 10 REGENERACION DE PROTOPLASTOS.		
CEPA.	MEDIO DE REGENERACION.	REFERENCIA
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338.	MR2T20.	Weber et al., 1985; Yamamoto et al., 1986
<i>S. erythraea</i> CA-340.	MR2T20.	Weber et al., 1985; Yamamoto et al., 1986
<i>S. erythraea</i> RC.	MR2T20.	Weber et al., 1985; Yamamoto et al., 1986
<i>S. erythraea</i> B-52.	MR2T20.	Weber et al., 1985; Yamamoto et al., 1986
<i>S. erythraea</i> B-107.	MRK.	Hopwood et al., 1985
<i>Streptomyces kanamyceticus</i> .	MRK.	Hopwood et al., 1985
<i>Streptomyces griseus</i> B-40.	MR1.	Okanishi et al., 1974; Maldonado. 1982.

Como ya se mencionó anteriormente, la frecuencia de fusión de protoplastos se incrementó con la adición de polietilenglicol (PEG) a diferentes concentraciones que van de 30 % a 50 %, y

diferentes pesos moleculares observando que el más efectivo fue aquel cuyo peso molecular es de alrededor de 4000 kD (Hopwood. 1981; Faisst & Seibicke. 1987), por lo que se decidió utilizar concentraciones del 50 % y del 25 % de PEG Sigma de 3350 para las fusiones de protoplastos.

Los marcadores genéticos auxotróficos exhiben una influencia negativa en la producción de metabolitos secundarios, pero su introducción es necesaria para comprobar que realmente se produce la recombinación (Didek-Brumec et al., 1991). Debido al gran número de cepas, era difícil seleccionar marcadores auxotróficos para cada una de ellas y utilizar ésto como método de selección. Por lo que se buscó un método de selección para identificar a los híbridos, después de realizar la fusión de protoplastos, que consistió en el uso de marcadores de resistencia a diferentes antibióticos.

Para lo cual primero se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) a gentamicina, estreptomycin, rifamicina, eritromicina y kanamicina; que presentaban cada una de las cepas en MC (ver tabla No. 11). En la tabla No. 11 se puede observar que las cepas presentan diferente sensibilidad a gentamicina, estreptomycin, y rifamicina mientras que la mayoría de ellas presenta resistencia a los antibióticos eritromicina y kanamicina, excepto *Saccharopolyspora erythraea* B-107.

TABLA No. 11 CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA. (µg/ml)										
CEPA.	GENTA- MICINA		ESTREPTO- MICINA.		RIFA- MICINA		ERITRO- MICINA		KANA- MICINA	
	MC	MR	MC	MR	MC	MR	MC	MR	MC	MR
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> . NRRL 2338	40	40	20	↑600	10-20	20	1000	—	1000	—
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> . CA-340	16	16	60	↑400	10-20	20	1000	—	1000	—
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> . RC	8	8	20	↑200	5-10	30	1000	—	1000	—
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> . B-52	8	8	20	↑200	20	30	1000	—	1000	—
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> . B-107	8	8	390	↑1000	40	50	80-100	—	200	—
<i>Streptomyces griseus</i> B-40	80-500	—	30	↑600	—	200	1000	—	1000	—
<i>Streptomyces griseus</i> B-231	40	—	390	↑800	—	30	1000	—	1000	—
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	40	—	210	↑1000	—	200	600	600	1000-5000	—
<i>Nocardia mediterranei</i> .	40	—	10	—	—	—	1000	—	1000	—

MC.- Medio Completo.

MR.- Medio de Regeneración según la tabla 10.

↑.- Concentraciones mayores de...

—.- No realizado.

Hay que hacer resaltar que las concentraciones minimas inhibitorias variaron de Medio Completo a Medio de Regeneración. Para el caso de estreptomiceina en particular las cepas fueron resistentes hasta concentraciones muy altas a diferencia del Medio Completo en donde las concentraciones minimas inhibitorias van de 10 a 390 µg/ml (figura No. 6)



Figura No. 6.- Curva de sensibilidad a estreptomiceina (µg/ml) *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 en medio completo (porción superior) y medio de regeneración MR2T20 (porción inferior).

Determinadas la CMI, se pudo establecer que fusiones se podían llevar a cabo complementando las resistencias. En la tabla No. 12 se muestran las concentraciones de los antibióticos usados para seleccionar a los híbridos por la doble resistencia, ya que cada una de las cepas originales eran sensibles y resistentes a diferentes antibióticos. También se muestran las fusiones que se podían realizar de acuerdo a las resistencias cruzadas. se observó que se podían fusionar *Saccharopolyspora erythraea* B-107 con CA-340; *Saccharopolyspora erythraea* B-107 con NRRL 2338 y *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 con *Streptomyces kanamyceticus*.

Así tenemos que en la fusión de la cepa *Saccharopolyspora erythraea* B-107 con CA-340, de las cuales la primera es sensible a gentamicina y resistente a rifamicina; mientras que CA-340 es sensible a rifamicina y resistente a gentamicina; el híbrido se seleccionó por su crecimiento en presencia de ambos antibióticos (gentamicina 8 µg/ml y Rifamicina 20 µg/ml); ya que los padres no pueden crecer en estas condiciones. De igual manera se realizaron las fusiones entre las cepas *Saccharopolyspora erythraea* B-107 con NRRL 2338 y *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 con *Streptomyces kanamyceticus*.

TABLA No. 12 FUSION DE PROTOPLASTOS METODO DE SELECCION.			
CEPA.	SENSIBILIDAD $\mu\text{g/ml}$. (S)	RESISTENCIA $\mu\text{g/ml}$. (R)	HIBRIDO.
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> B-107	GENTAMICINA SG 8	RIFAMICINA RR 50	GR R
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA-340	RIFAMICINA SR 20	GENTAMICINA RG 16	
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> B-107	GENTAMICINA SG 8	RIFAMICINA RR 50	GR R
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	RIFAMICINA SR 20	GENTAMICINA RG 40	
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	RIFAMICINA SR 20	ERITROMICINA RE 1000	ER R
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	ERITROMICINA SE 600	RIFAMICINA RR 20	

Los resultados de las fusiones de protoplastos intraespecífica e intergenérica, se presentan de manera general en el tabla No. 13 y las figuras No. 7 y No. 8.

TABLA No. 13 FUSION DE PROTOPLASTOS.			
CEPA.	FENOTIPO DE ESPORULACION PADRES	RECOMBINANTES TIEMPO DE PEG* 2' 5' 10' 15'	FENOTIPO DE ESPORULACION HIBRIDO.
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> B-107	BLANCO	0 4 0 0	3 CON ESPORAS BLANCAS. 1 CON ESPORAS GRISAS.
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA-340	BLANCO		
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> B-107	BLANCO	0 0 0 0	
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	ROJAS		
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	ROJAS	0 2 0 0	2 DE ESPORAS ROJAS
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	AMARILLAS		

*.-Tiempo de exposición de la mezcla de los protoplastos a PEG al 50% (Sigma PM 3350).

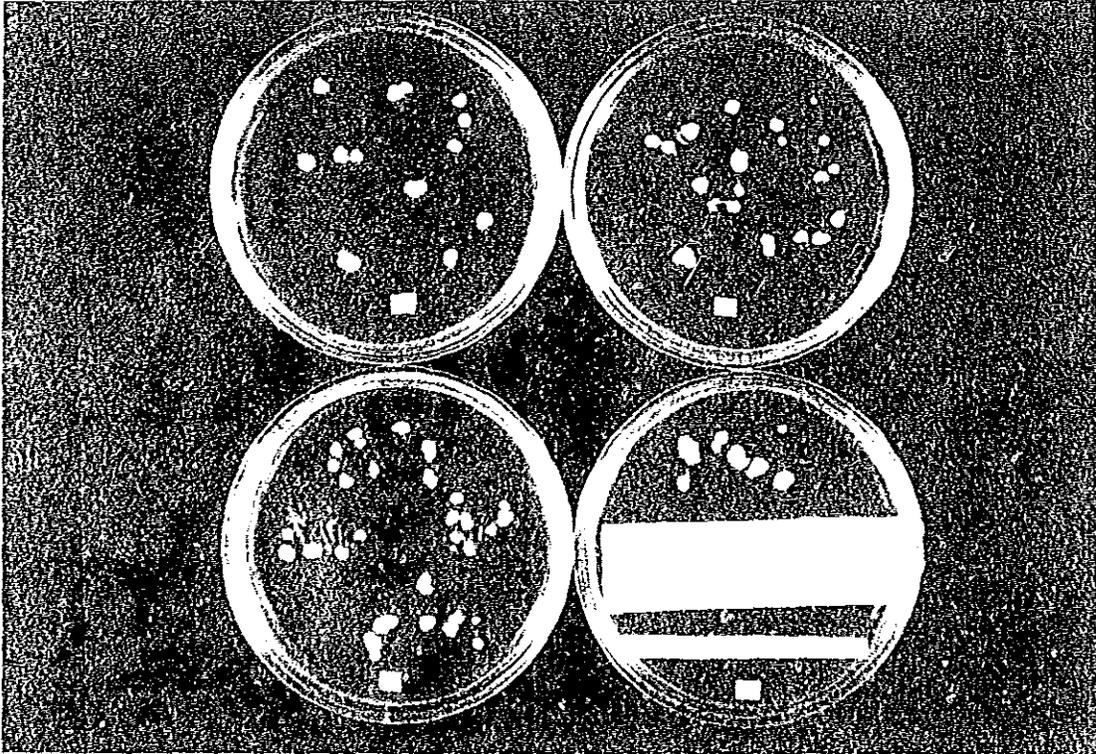


Figura No. 7 -Híbridos de la fusión de protoplastos de *Saccharopolyspora erythraea* B-107 y *Saccharopolyspora erythraea* CA-340 en medio completo más los marcadores (gentamicina y rifamicina).

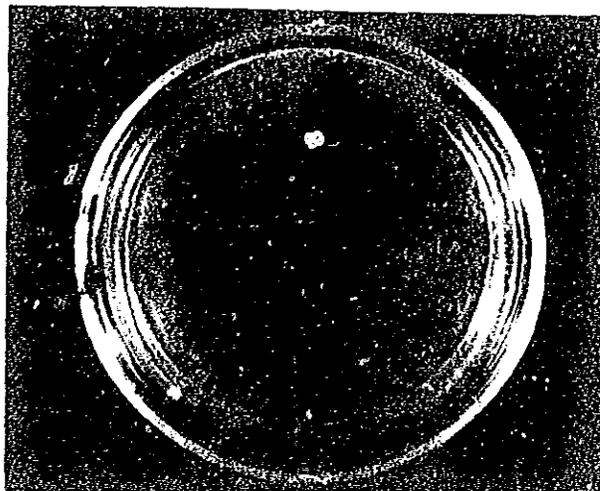


Figura No. 8 - Híbridos de la fusión de protoplastos *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 y *Streptomyces kanamyceticus* en medio de regeneración MRK conteniendo rifamicina y eritromicina.

De la fusión entre *S. erythraea* B-107 y la cepa *S. erythraea* CA-340, se obtuvieron cuatro colonias híbridas a los 5 min de tratamiento con PEG (tabla No. 13). Para verificar que estas cepas realmente eran híbridos estables se sembraron dos veces en medio completo conteniendo los antibióticos gentamicina y rifamicina.

De estas cuatro colonias se observó que una de las colonias tiene fenotipo de esporulación gris, que es diferente a las dos cepas originales; las otras tres colonias forman esporas blancas como las cepas originales.

Con el objeto de caracterizar a estos híbridos, en cuanto a la producción de eritromicina con respecto a las cepas originales se realizó una fermentación por duplicado de cada uno de ellos en medio completo, donde se determinó su crecimiento y la producción del antibiótico volumétrica y específica. Así como también se monitorearon las variaciones de pH durante la fermentación para cada condición. Estos resultados se pueden observar en la figura No. 9.

Como resultado de la fermentación se encontró que la cepa de fenotipo de esporas grises produce cantidades volumétricas de antibiótico similares a la cepa original B-107, sin embargo la producción específica es mayor que la de la cepa B-107. Por otro lado, las tres cepas con fenotipo de esporas blancas, producen más o menos el 50 % de antibiótico que la cepa original B-107; al comparar los resultados con la cepa CA-340 se encontró que la producción de los híbridos fue mínima.

En cuanto a crecimiento, éstas mostraron un comportamiento más parecido a la cepa B-107 que a la CA-340; los perfiles en variación del pH durante la fermentación fueron muy semejantes en todas las cepas.

Con el objeto de determinar el patrón de las eritromicinas producidas por los híbridos las muestras correspondientes al quinto día de fermentación (ya que en los otros días no se distingue, figura No. 9), fueron tratadas para extraer el antibiótico sintetizado. Los extractos fueron sometidos a cromatografía en placa fina y en la figura No. 10 se aprecia en ambos extremos el estándar (std) de eritromicina comercial que presenta las manchas correspondientes a la eritromicina A y a la eritromicina B. En los extractos obtenidos con la cepa *S. erythraea* CA-340 (hiperproductora de eritromicina, carriles 11 y 12) se observan además la banda correspondiente a eritromicina C y muchas otras que deben corresponder a los otros intermediarios. En los extractos de la cepa *S. erythraea* B-107 (carriles 9 y 10) se nota la presencia de eritronólido B y micarosileritronólido B, así como eritromicina C, de acuerdo a los ejemplos reportados (Weber et al., 1985; Weber et al., 1990; Paulus et al., 1990). De esto se puede deducir que esta cepa produce muy poco o nada de eritromicina A y que acumula los dos primeros intermediarios. En los carriles 1 y 2 se colocaron los extractos del fusante H1 donde no aparecen las manchas correspondientes a eritromicina A y B; los carriles 3 y 4 corresponden al fusante H2, donde tampoco se observan las eritromicinas A y B; en los carriles 5 y 6 correspondientes a los fusantes H3 (todos éstos de esporas blancas), se observan los mismos resultados que en los casos anteriores; en los carriles 7 y 8 del fusante H4 de esporas grises, se observan unas manchas que no corresponden a las observadas en el estándar pero que son parecidas a las que muestran la cepa parental B-107 en los carriles 9 y 10. La cepa *S. erythraea* CA-340, en los carriles 11 y 12 presentan manchas iguales a las del estándar.

En la cromatografía se puede observar que en los carriles de todos los fusantes (principalmente el fusante H4, carriles 7 y 8, en donde es más notorio), se muestran unas manchas en la parte superior similares a las de la cepa B-107 que pueden ser eritronólido B y 3 α -micarosil eritronólido B por comparación con los artículos de referencias reportados para estos compuestos (Weber et al., 1990). Sin embargo, éstas no aparecen en los carriles 5 y 6 que corresponden al fusante H3, ni en las muestras de la cepa CA-340.

En la parte inferior de la placa, tanto las fusantes como las cepas originales muestran el mismo número de manchas, las cuales no aparecen en el estándar, es posible que éstas pudieran ser intermediarios de la vía biosintética de eritromicina.

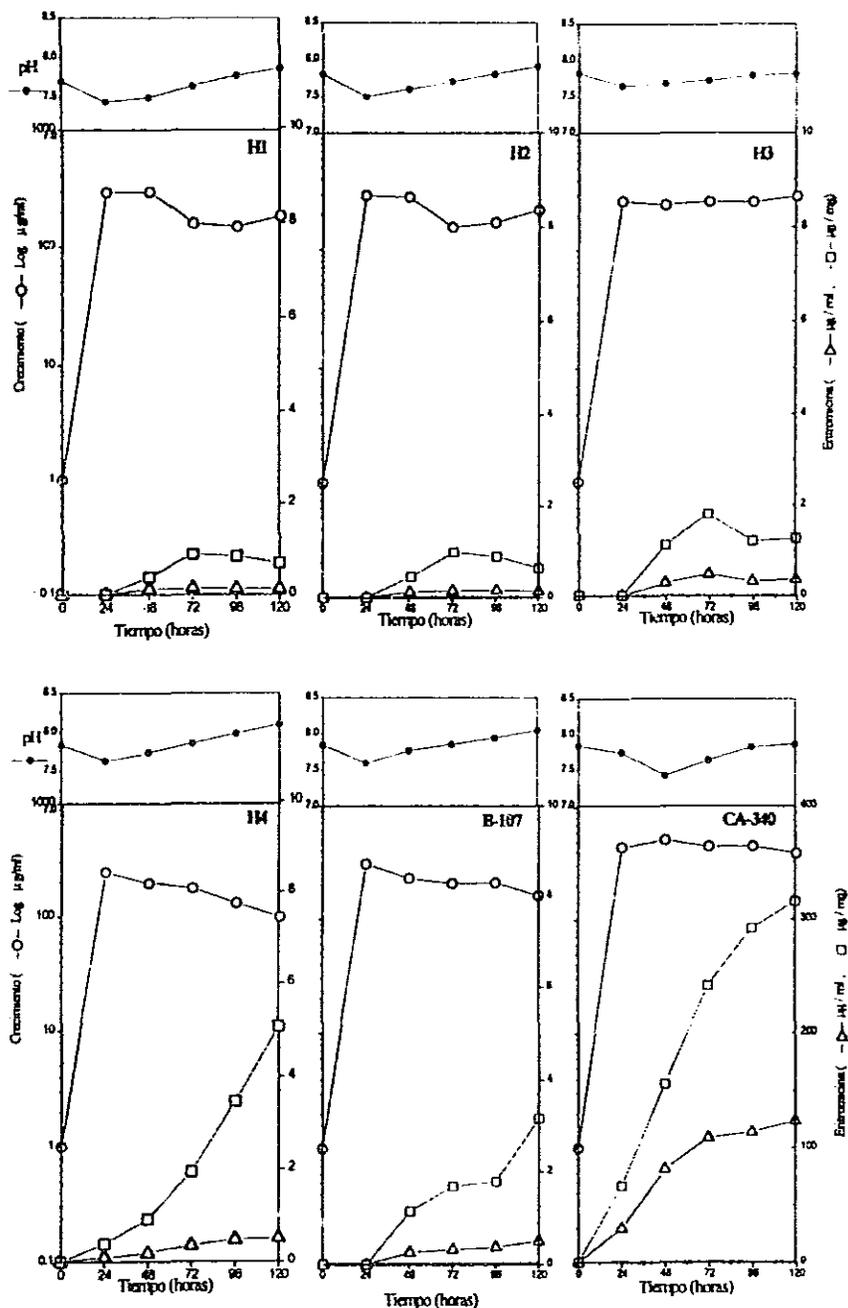


Figura No. 9.- Crecimiento (O), Producción Volumétrica (Δ), Producción específica de eritromicina (□) y perfil de pH (·), de los Híbridos de esporas blancas (H1, H2 y H3) e híbrido de esporas grises (H4) de la fusión de protoplastos entre *S. erythraea* B-107 y *S. erythraea* CA-340. Fermentación realizada en Medio Completo, a una temperatura de 29° C y 200 rpm de agitación rotatoria.

De acuerdo a lo que se observa en la placa cromatográfica, las cepas H1, H2, H3, y H4 no producen eritromicina A y B, o producen tan poco que no se detectan con esta técnica, por lo que parecen presentar características similares a la cepa parental B-107 y no de CA-340.

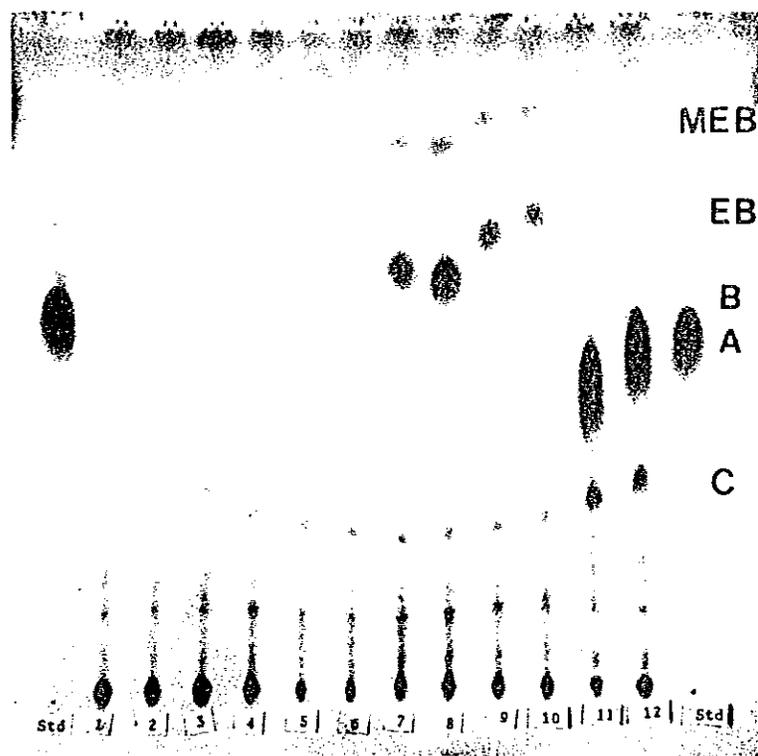


Figura No. 10.- Cromatografía en Placa Fina de los extractos de las muestras del 5° día de fermentación de las cepas *S. erythraea* B-107 (carriles 9 y 10) y *S. erythraea* CA-340 (11 y 12), así como los híbridos obtenidos después de la fusión de protoplastos. Fusante H1, 1 y 2; fusante H2, 3 y 4; fusante H3, 5 y 6; fusante H4, 7 y 8 (las mismas cantidades en todos los carriles); Std estándares de eritromicina en los extremos, eritromicina C (C); eritromicina A (A); eritromicina B (B); eritronólido B (EB); 3 α -micarosil eritronólido B (MEB).

Con el objeto de identificar con mayor precisión las eritromicinas que sintetizan estos microorganismos y para descartar que tal vez la concentración de los antibióticos en la muestra utilizada para la cromatografía en placa fina sea tan pequeña, que ésto hubiera impedido la observación de las eritromicinas que son de nuestro interés, se utilizaron las mismas muestras para analizarlas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); ésta técnica nos permite observar con mayor fineza los perfiles de producción aún a muy bajas concentraciones.

Para tener un patrón de comparación se corrieron primero los estándares puros de eritromicina A, eritromicina B y eritromicina C proporcionados por los laboratorios Abbott. Y se observa en la figura No. 11 que los tiempos de retención para las eritromicinas fueron los siguientes: eritromicina C 4.28; eritromicina A 6.1; eritromicina B 9.14 seg.

En los extractos de las cepas originales los tiempos de retención variaron con respecto al estándar. En la cepa B-107 (figura No. 12), que produce poca cantidad de este metabolito, se

encontró que la eritromicina C tiene un tiempo de retención de 5.02, la eritromicina A 6.54 y 10.48 para la eritromicina B; éstas últimas no detectadas claramente en la cromatografía en placa fina; en esta muestra aparece un cuarto pico cuyo tiempo de retención es de 20.72 que se desconoce a que compuesto corresponda.

En la cepa CA-340 (figura No.13), la eritromicina C está en 4.94, la eritromicina A en 6.62 y la eritromicina B en 10.48; y otro pico de 16.03 de tiempo de retención.

En cuanto a los fusantes, como se puede observar en las figuras No. 14, 15, 16, y 17 se obtuvo lo siguiente: en la muestra del fusante H1 (figura No. 14), se observan dos picos, el primero con un tiempo de retención de 4.96 que corresponde a eritromicina C; sin embargo el segundo con un tiempo de retención de 8.22, no corresponde ni a eritromicina A ni a eritromicina B.

En el caso del fusante H2 (figura No. 15) se observan tres picos, de los cuales, uno corresponde a eritromicina C con un tiempo de retención de 5.0; el segundo que pudiera corresponder a eritromicina B presenta un tiempo de retención de 10.7; y un tercer pico en 21.2 que se desconoce a que compuesto corresponda.

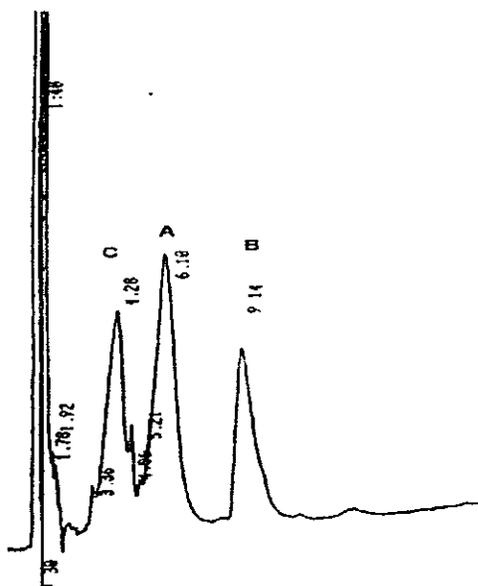


Figura No.11.- HPLC, de los estándares de eritromicinas, de las muestras corridas en una columna NOVOPACK de silica C-18, con una fase móvil de etanol.

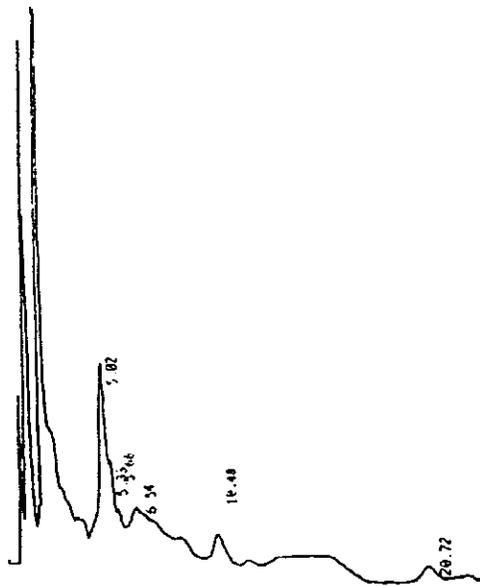


Figura No.12.- HPLC de las eritromicinas producidas por *S. erythraea* B-107, de las muestras corridas en una columna NOVOPACK de silica C-18, con una fase móvil de etanol.

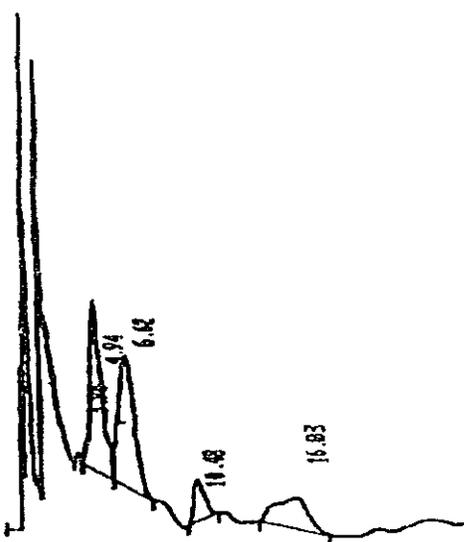


Figura No.13.- HPLC de las eritromicinas producidas por *S. erythraea* CA-340, de las muestras corridas en una columna NOVOPACK de silica C-18, con una fase móvil de etanol.

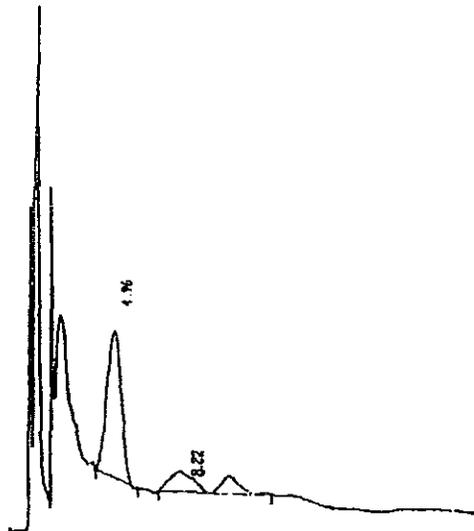


Figura No.14.- HPLC del fusante H1, de las muestras corridas en una columna NOVOPACK de silica C-18, con una fase móvil de etanol.

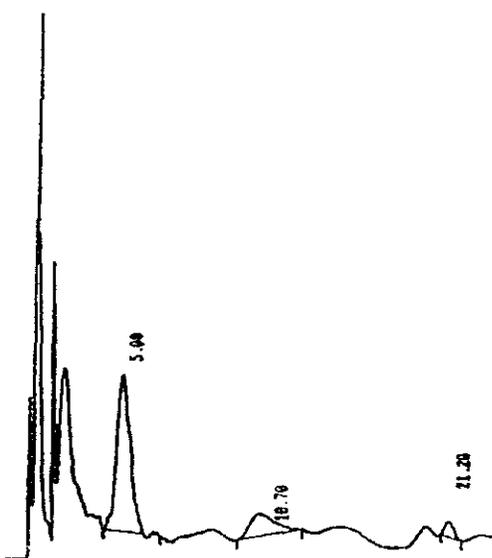


Figura No.15.- HPLC del fusante H2, de las muestras corridas en una columna NOVOPACK de silica C-18, con una fase móvil de etanol.

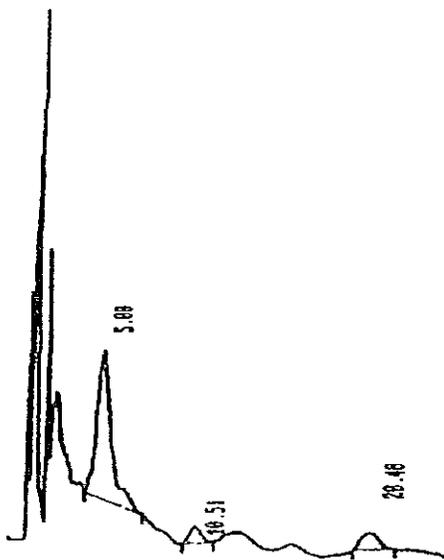


Figura No.16.- HPLC del fusante H3, de las muestras corridas en una columna NOVOPACK de silica C-18, con una fase móvil de etanol.

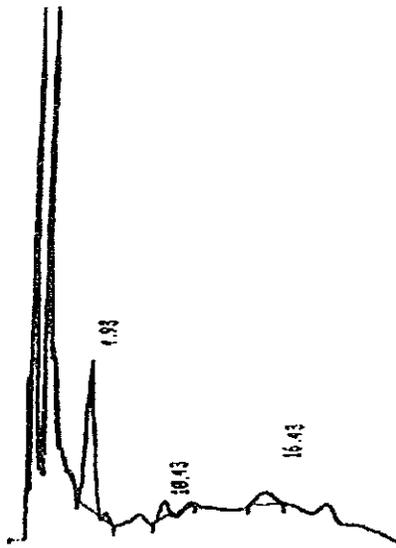


Figura No.17.- HPLC del fusante H4, de las muestras corridas en una columna NOVOPACK de silica C-18, con una fase móvil de etanol.

Al igual que el fusante H2, el H3 (figura No. 16) muestra tres picos, uno en 5.0 que corresponde a eritromicina C; otro en 10.51 que también pudiera tratarse de eritromicina B, y uno en 20.48 que se desconoce a que corresponda.

El fusante H4, de color de esporas gris (figura No. 17), que produce las mismas cantidades de antibiótico que la cepa original B-107 (figura No. 9), mostró también tres picos, el de eritromicina C en 4.93, uno en 10.43 que posiblemente sea eritromicina B y otro en 16.43 que también se desconoce a que corresponda.

Los resultados obtenidos con esta técnica confirman los obtenidos en la cromatografía en placa fina.

A pesar de que estos fusantes son el resultado de la fusión de las cepas *S. erythraea* B-107 y *S. erythraea* CA-340 productores de eritromicina, y a diferencia de lo que se esperaba; no se produjo eritromicina A (biológicamente activa) pero hay acumulación de eritromicina C, como se observa en la cromatografía en placa fina y en el HPLC, y como se comentó en los antecedentes, la eritromicina C se metila para formar la eritromicina A; al parecer estas cepas no pueden continuar la vía biosintética hasta eritromicina A; por lo que sería de gran interés medir la actividad de la metiltransferasa que convierte la eritromicina C en eritromicina A para saber si tienen dicha actividad o no. Esto se intentó realizar, pero el intermediario eritromicina C no se vende comercialmente y al solicitarlo a los Laboratorios Fermic y por otro lado al Dr. Paulus (laboratorios Abbott), no tenían en ese momento por lo que no se pudo efectuar dicha medición.

La formación, regeneración y fusión de protoplastos pueden estar asociados con un rearrreglo genético en los recombinantes, pueden perderse plásmidos, u otros rasgos como producción de antibióticos ó resistencia, aunque igualmente pueden ocurrir amplificaciones, modificaciones, que no se pueden descartar que hayan ocurrido en los híbridos y que por esta razón no haya producido eritromicina A (Goodfellow et al., 1988).

Al tratar de fusionar 4 veces las cepas *S. erythraea* B-107 y *S. erythraea* NRRL 2338 a diferentes tiempos de exposición en PEG, no se obtuvieron híbridos en ninguna ocasión (tabla No. 13), lo cual es extraño ya que las cepas *S. erythraea* B-107 y *S. erythraea* CA-340 si

fusionaron y se pudieron seleccionar híbridos resistentes a estos mismos antibióticos, desconociéndose la causa.

También se fusionaron las cepas *S. erythraea* NRRL 2338 y *Streptomyces kanamyceticus*, donde se observó inicialmente que el porcentaje de regeneración de protoplastos era sumamente bajo, pero a pesar de ello se obtuvieron dos híbridos a los cinco minutos de exposición al PEG (tabla No. 13). De igual manera que para la fusión anterior, estas colonias fueron resembradas dos veces en medio completo con rifamicina y eritromicina, como marcadores, para asegurar que se trataba de los híbridos estables que se buscaban, resistentes a ambos antibióticos. En ambos casos, se observó que su fenotipo de esporas de color rojo es más parecido al de la cepa *S. erythraea* NRRL 2338, que a *Streptomyces kanamyceticus* que esporula de color amarillo.

La producción de antibióticos de los híbridos se determinó con la técnica de bioensayo por cilindros utilizando a *Sarcina lutea* y *Bacillus subtilis* como microorganismos de prueba. Se encontró que estas cepas producen antibiótico, y el tamaño del halo de inhibición es similar al de la cepa 2338; pero en todos los casos los microorganismos de prueba son sensibles a los productos, por lo que se enmascara que antibiótico (eritromicina, kanamicina, ó ambos) es el que realmente producen los híbridos.

Se realizó también una fermentación de cada fusante y las cepas parentales en medio mínimo de *S. erythraea*, donde se determinó su crecimiento y la producción del antibiótico volumétrica y específica por medio de bioensayo, utilizando a *Sarcina lutea* como microorganismo prueba, ya que éste también es sensible a kanamicina. Se monitorearon así mismo las variaciones de pH durante la fermentación para cada condición. Estos resultados se observan en la figura No. 18. La cepa parental *Streptomyces kanamyceticus* no creció en este medio mínimo, ni hubo producción de antibiótico por lo que no aparece en la figura.

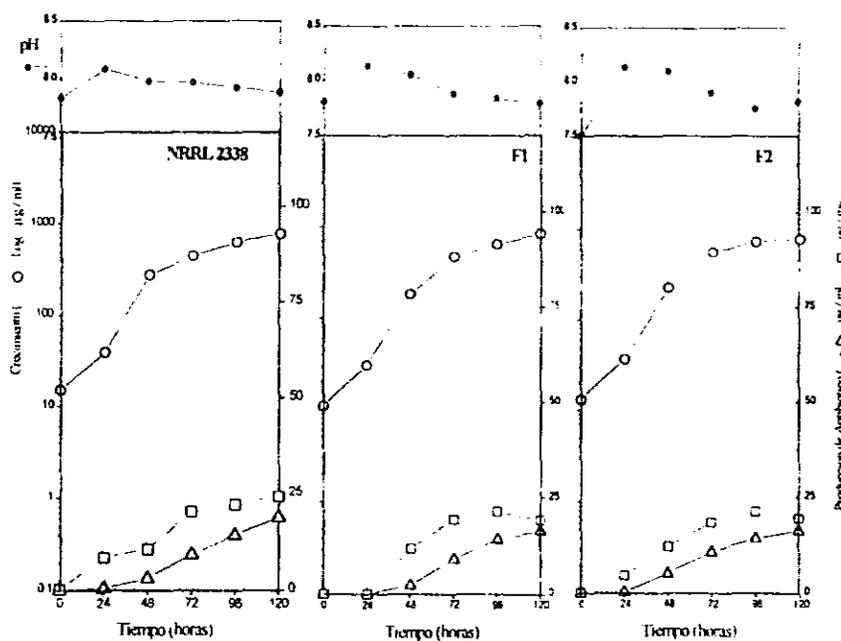


Figura No. 18.- Crecimiento (O), Producción Volumétrica (Δ), Producción específica de eritromicina (□) y perfil de pH (·), de los Híbridos de la fusión de protoplastos entre *Streptomyces kanamyceticus* y *S. erythraea* NRRL 2338. Fermentación realizada en Medio Mínimo, a una temperatura de 29° C y 200 rpm de agitación rotatoria.

Como resultado de la fermentación se encontró que los híbridos producen cantidades similares de antibiótico, a los de la cepa original NRRL 2338, como se había observado en los análisis previos utilizando cilindros de agar cortados de una colonia intacta en medio sólido. En cuanto al crecimiento, éstas también mostraron un comportamiento parecido a la cepa original NRRL2338; los perfiles en la variación del pH durante la fermentación fueron muy semejantes en todas las cepas.

Para identificar el tipo de antibiótico que están produciendo estos fusantes, las muestras del quinto día de fermentación (donde hay mayor cantidad de éste), se procesaron para extraer el antibiótico sintetizado, utilizando la técnica mencionada en material y métodos. Los extractos se corrieron en una cromatografía de capa fina (Figura No. 19), cabe mencionar que el frente de la cromatografía no corrió de manera lineal por lo que el estándar de eritromicina se metio a ambos extremos de la placa y en el centro de la misma, como se observa en los carriles 1,3 y 6. La distribución de los demas carriles es la siguiente: en el carril 2 el extracto de la cepa original 2338 con las manchas correspondientes a eritromicina A y C; en los carriles 4 y 5 los extractos de los híbridos de esta fusión que muestran un comportamiento de producción de antibiótico similar a la cepa original *S. erythraea* NRRL 2338 (Figura No. 18), con manchas correspondientes a eritromicina A y C.

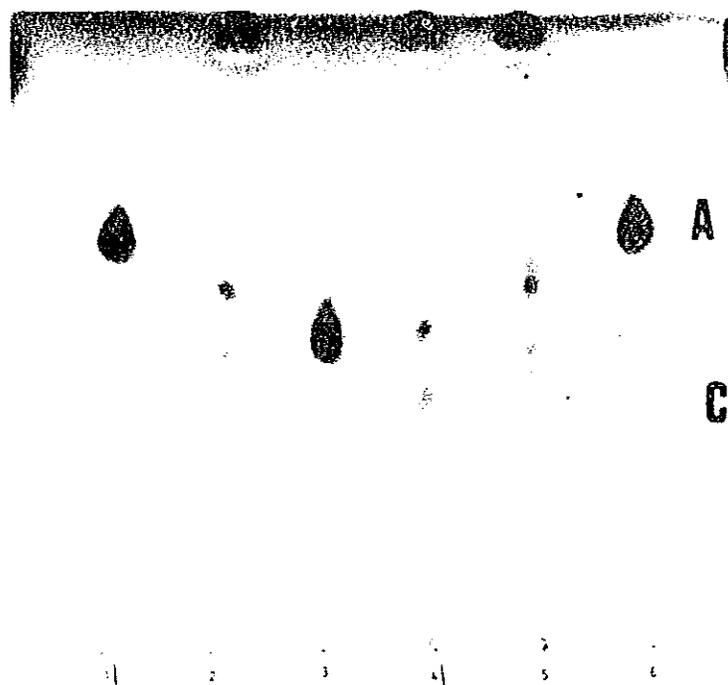


Figura No. 19.- Cromatografía en Placa Fina de los estándares (Std) de eritromicina (carriles 1, 3 y 6) y de los extractos de las muestras del 5º día de fermentación de las cepas *S. erythraea* NRRL 2338 (carril 2) observando eritromicina A (A) similar al estandar, así como los híbridos obtenidos (carriles 4 y 5) después de la fusión de protoplastos de *S. erythraea* NRRL 2338 con *Streptomyces kanamyceticus*.

Estos extractos también se corrieron en el HPLC pero dieron diferentes picos con diferentes tiempos de retención. Los tiempos de retención observados con respecto al estándar varían más del 10 % aceptable para este tipo de análisis, esto tal vez debido a que a medida que se corrian las muestras la columna retuvo alguna impureza que desfasó a las que fueron aplicadas posteriormente; por lo que se decidió hacer una mezcla del estándar y la muestra para facilitar la identificación del producto de estos híbridos, gracias a ello se mostró que estas cepas efectivamente producen eritromicina A (datos no mostrados)

Estos resultados obtenidos de la fusión de protoplastos de *S. erythraea* NRRL 2338 y *Streptomyces kanamyceticus* podrían sugerir que hubo fusión y recombinación entre los dos genomas, ya que los híbridos son resistente a los dos antibióticos (eritromicina y rifamicina), pero dominando el genoma de *S. erythraea* NRRL 2338 y conservando, por lo tanto, las características fenotípicas de este microorganismo.

Por otro lado, tomando en cuenta las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas (tabla No. 11) a diferentes antibióticos que presentan otras cepas utilizadas, se eligieron las cepas *Streptomyces kanamyceticus*, *S. erythraea* CA 340 y *S. erythraea* RC, para posteriores fusiones ya que tienen los marcadores de selección adecuados. Estas se muestran en la tabla No. 14.

TABLA No. 14 FUSION DE PROTOPLASTOS METODO DE SELECCION.			
CEPA.	SENSIBILIDAD µg/ml (S)	RESISTENCIA µg/ml (R)	HIBRIDO.
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	ERITROMICINA SE 600	RIFAMICINA RR 200	R
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA-340	RIFAMICINA SR 20	ERITROMICINA RE 1000	
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA-340	RIFAMICINA SR 20	GENTAMICINA RG 16	RG
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> RC	GENTAMICINA SG 8	RIFAMICINA RR 30	R

La fusión de protoplastos de las cepas *Streptomyces kanamyceticus* y *S. erythraea* CA 340 se realizó cuatro veces y la fusión de protoplastos de las cepas *S. erythraea* RC y *S. erythraea* CA 340 se llevó a cabo en dos ocasiones, todas ellas a diferente tiempo de exposición a PEG, sin embargo, no se logró obtener algún fusante en ninguna de ellas.

Debido a las limitaciones en cuanto a las CMI, obtenidas hasta el momento, para realizar las fusiones y que en algunas de las fusiones que se habían hecho no se obtuvieron híbridos; se pensó que buscando las CMI para otros antibióticos macrólidos se podrían obtener otras combinaciones de marcadores para hacer más fusiones, por lo que se realizaron otras curvas de sensibilidad a los antibióticos macrólidos tilosina, oleandomicina, espiramicina, y eritromicina; (tabla No. 15).

TABLA No. 15 CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA. (µg/ml)				
CEPA.	TILOSINA	OLEANDOMICINA	SPIRAMICINA	ERITROMICINA
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	TR	OR	SR	ER
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA-340	TR	OR	SR	ER
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> RC	TR	OR	SR	ER
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> B-52	TR	OR	SR	ER
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> B-107	300	200	30	100
<i>Streptomyces griseus</i> B-40	300	600	400	ER
<i>Streptomyces griseus</i> B-231	TR	OR	SR	ER
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	700	700	200	600

R.-Resistencia a más de 1000 µg/ml

Como se observa en el tabla No. 15, las cepas que producen poca cantidad de su antibiótico como *S. erythraea* B-107 (eritromicina) y *Streptomyces griseus* B-40 (estreptomycinina) son las que presentan mayor sensibilidad a estos antibióticos macrólidos en comparación de las cepas que producen mayor cantidad de antibiótico, las cuales son más resistentes.

La mayoría de las cepas utilizadas son resistentes a estos antibióticos macrólidos, lo que confirma que las cepas presentan un buen sistema de resistencia MLS descubierto por Thompson et al., (1982), por lo cual no se pueden usar como marcadores para una posterior fusión de protoplastos.

Debido a las limitaciones encontradas en las CMI y al obtener pocos híbridos en las fusiones, con las cepas probadas, se decidió continuar el proyecto, modificando el método de selección, para ello se utilizó PEG al 50 % y 25 % durante 5 min. Después de lavados, los protoplastos se vaciaron en MR con agarosa de bajo punto de fusión licuado, y posteriormente en cajas con MR; para la sobrecapa de los medios de regeneración se utilizó agarosa de bajo punto de fusión 0.7 % (Schupp & Divers. 1986; Benchmarks. 1989) en el medio de regeneración correspondiente. Sin embargo, la adición de los marcadores se efectuó a diferentes tiempos: 0, 24, 48, 72 y 96 hrs después de plaquar la mezcla de fusión en los medios correspondientes (comunicación personal con Hortensia Lemus Díaz y Rosa Elena Cardoza Silva).

Se realizaron nuevamente las fusiones de protoplastos de *S. erythraea* B-107 y *S. erythraea* CA-340 y de *S. erythraea* B-107 y *S. erythraea* NRRL 2338 con los marcadores que se observan en la tabla No. 12, pero adicionando los antibióticos a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. De esta manera se obtuvieron 11 híbridos de la fusión *S. erythraea* B-107 y *S. erythraea* CA-340

adicionando el antibiótico a las 96 hrs, 10 híbridos con un fenotipo de esporulación blanca y una calva, comprobando también posteriormente que son resistentes tanto a gentamicina como rifamicina al resembrarlas en presencia de dichos antibióticos (tabla No. 16 y figura No. 20).

En la tabla No. 16 se presentan los resultados de las fusiones de protoplastos adicionando el antibiótico a diferentes tiempos y utilizando una concentración de PEG de 25 % y 50 %, a diferencia de las primeras fusiones (tabla No. 13) en las cuales solo se empleó la concentración de 50 % de PEG y diferentes tiempos de exposición a éste. El tiempo de adición de los antibióticos en estos primeros casos se mantuvo constante (a las cero horas), mientras que en las últimas fusiones (tabla No. 16) fue a diferentes tiempos; cabe aclarar que tan solo se presentan aquellos casos en los que hubo algún híbrido.

TABLA No. 16 FUSION DE PROTOPLASTOS.					
CEPA.	FENOTIPO DE ESPORULACION PADRES	No. DE RECOMBINANTES PEG*		TAAB (h)	FENOTIPO DE ESPORULACION HIBRIDO.
		(25%)	(50%)		
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> B-107	BLANCO	11	0	96	10 BLANCAS 1 CALVA
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA-340	BLANCO				
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> B-107	BLANCO	0	8	0	1 BLANCA
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	ROJAS				

TAAB.- Tiempo de Adición de los Antibióticos.

* - PEG al 25 ó 50% (Sigma PM 3350)

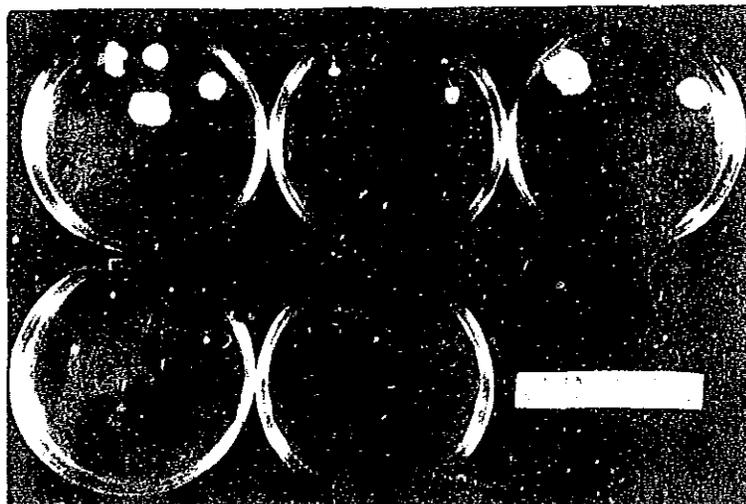


Figura No. 20.- Híbridos de la fusión de protoplastos de *Saccharopolyspora erythraea* B-107 y *Saccharopolyspora erythraea* CA-340 en medio de regeneración MR2T20 y MRK conteniendo los antibióticos (gentamicina y rifamicina).

Para caracterizar, en cuanto a la producción del antibiótico a los híbridos obtenidos con respecto a las cepas originales, se hizo una fermentación como en los casos anteriores, para ver mejor el efecto se realizaron en Medio Mínimo. Estos resultados se pueden observar en la figura No. 21.

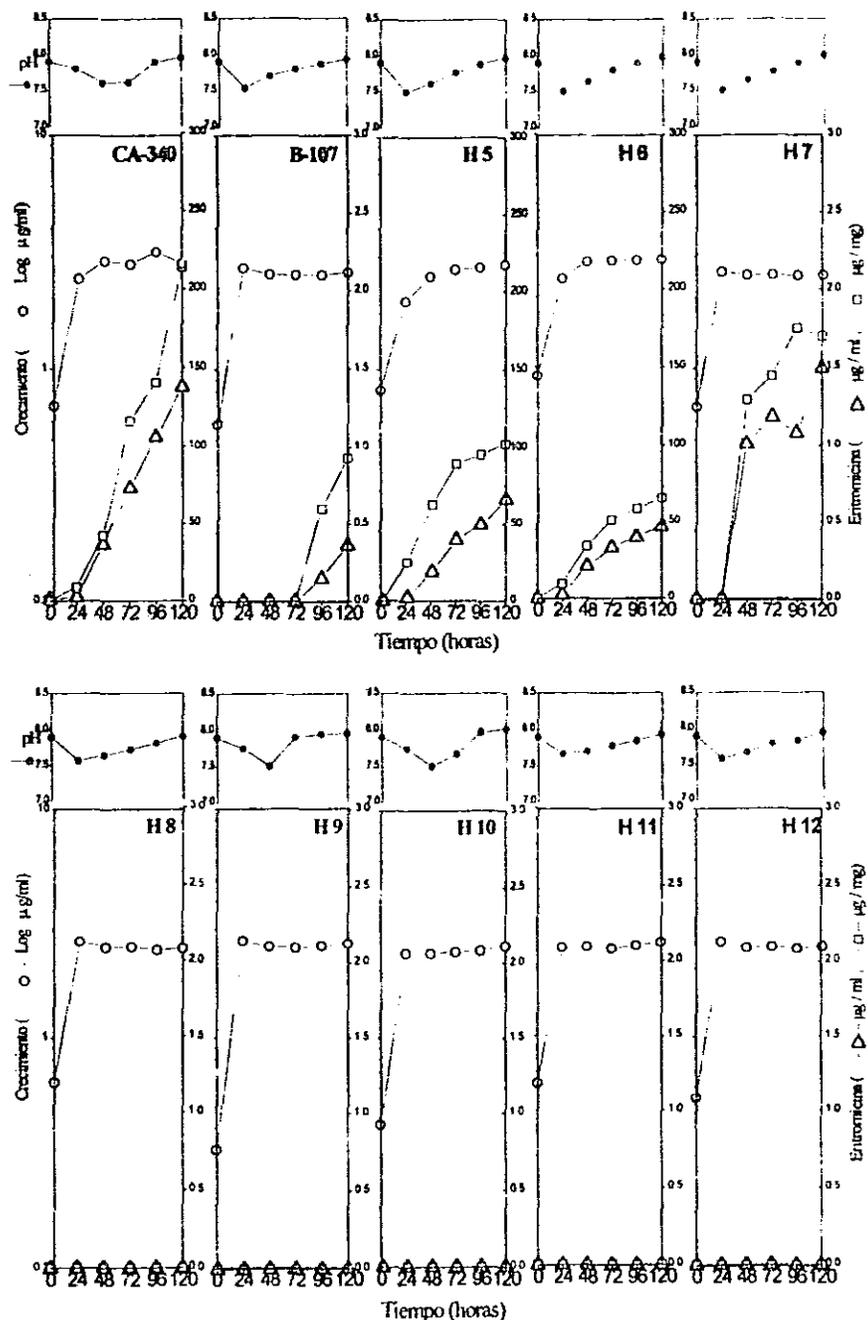


Figura No. 21.- Crecimiento (O), Producción Volumétrica (Δ), Producción específica de eritromicina (□) y perfil de pH (*), de las cepas originales *S. erythraea* CA-340, *S. erythraea* B-107, Híbridos H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14 y H15. Fermentación realizada en Medio Mínimo a 29°C, 200 rpm (las últimas tres gráficas se presentan en la siguiente página).

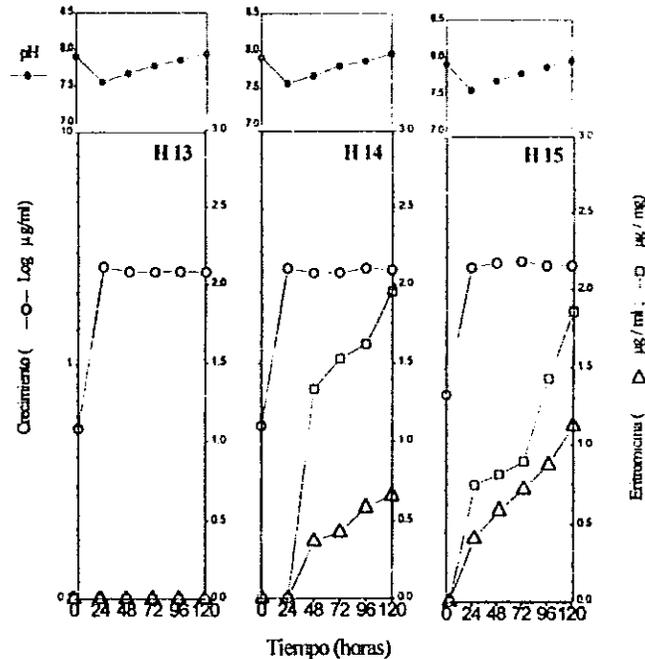


Figura No. 21.- Crecimiento (O), Producción Volumétrica (Δ), Producción específica de eritromicina (□) y perfil de pH (•), Continuación de la página anterior.

Como resultado de la fermentación, en cuanto a crecimiento todas las cepas mostraron un comportamiento muy parecido, así como también los perfiles de variación de pH durante la fermentación fueron muy semejantes en todas las cepas manteniéndose entre 7.5 y 8.

Con respecto a la producción del antibiótico, como se puede observar (figura No. 21) a seis colonias no se les detectó producción de antibiótico, tres producen cantidades de antibiótico similares a la cepa parental *S. erythraea* B-107, y las otras dos producen mayor cantidad de antibiótico que la parental *S. erythraea* B-107, pero comparando con la otra parental *S. erythraea* CA-340 producen aproximadamente la mitad.

De la fusión de *S. erythraea* B-107 y *S. erythraea* NRRL 2338 se obtuvieron 8 híbridos al adicionar el antibiótico a las 0 y 72 hrs después de la fusión. Todos los híbridos presentan fenotipo de esporas blancas como la cepa parental *S. erythraea* B-107, reiterando posteriormente que son resistentes a los antibióticos gentamicina y rifamicina al resembrarlos en estos antibióticos (tabla No. 16 y figura No. 22).

Como se hizo con todos los híbridos, se determinó la producción del antibiótico a éstos con respecto a las cepas originales. Estos resultados se pueden observar en la figura No. 23.



Figura No. 22.- Híbridos de la fusión de protoplastos de *Saccharopolyspora erythraea* B-107 y *Saccharopolyspora erythraea* NRRL-2338 en medio de regeneración MRK conteniendo los antibióticos (gentamicina y rifamicina).

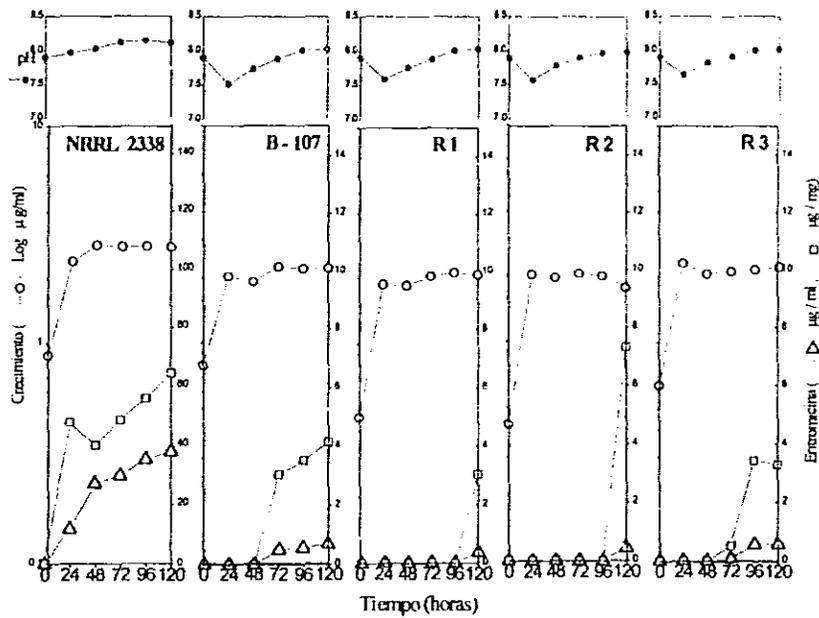


Figura No. 23. Crecimiento (O), Producción Volumétrica (Δ), Producción específica de eritromicina (□) y perfil de pH (•), de las cepas originales *S. erythraea* NRRL2338, *S. erythraea* B-107, Híbridos R1, R2, R3, R3, R4, R5, R6, R7, R8. Fermentación realizada en Medio Mínimo a 29°C, 200 rpm (esta página y la siguiente).

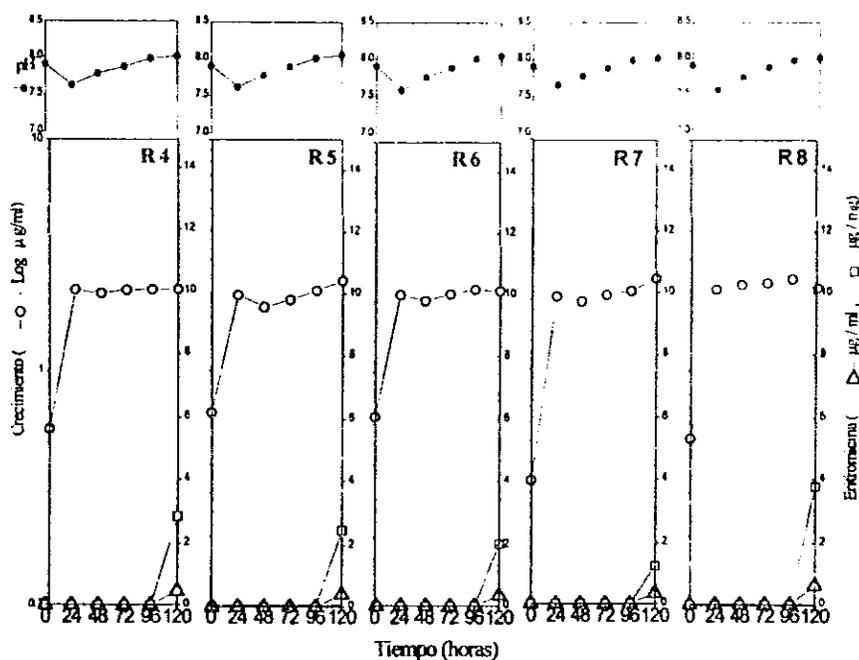


Figura No. 23.- Crecimiento (O), Producción Volumétrica (Δ), Producción específica de eritromicina (□) y perfil de pH (·), Continuación de la página anterior.

Se puede observar que el crecimiento de todas las cepas fue muy similar, así como también los perfiles de variación de pH durante la fermentación fueron muy semejantes en todas las cepas. En cuanto a la producción del antibiótico (figura No. 23), los ocho híbridos producen muy poco antibiótico similar a la cepa parental *S. erythraea* B-107.

Las muestras correspondientes al 5º día de fermentación (ya que en los otros días no se detecta) de los híbridos de estas dos fusiones fueron tratadas también para extraer el antibiótico sintetizado y éstos sometidos a cromatografía en placa fina, pero no se detectó nada, ni los intermediarios, probablemente por que era muy poca cantidad para que se detectara por placa fina, a diferencia de las cepas parentales (datos no mostrados).

En la tabla No. 17 se muestra un resumen de las fusiones realizadas, los híbridos obtenidos de cada una de ellas y la producción de antibiótico.

La fusión de protoplastos ha sido usada como una herramienta genética para el mejoramiento de cepas. En cuanto a la formación de protoplastos la cantidad de glicina que se utilizó, fue de acuerdo a las concentraciones reportadas anteriormente para *Streptomyces* en general o particular (Hopwood et al., 1985; Yamashita et al., 1985). La cantidad de lisozima utilizada fue de acuerdo a Hopwood et al. (1985), evitando tratamientos largos como sugieren Baltz & Matsushima (1981); Otts & Day (1987), excepto para *Streptomyces kanamyceticus* y *Streptomyces griseus* ya que no respondieron de la misma manera que las otras cepas, a pesar de que Malanicheva et al. (1991) ya habían trabajado con *S. kanamyceticus*, no reportaron las condiciones para la formación de protoplastos de dicha cepa, por lo que para *S. kanamyceticus* y *S. griseus* fue necesario probar con mayor concentración de lisozima.

Se probaron diferentes medios reportados como buenos medios de regeneración de protoplastos (Weber et al., 1985; Yamamoto et al., 1986; Hopwood et al., 1985; Okanishi et al., 1974; Maldonado. 1982) seleccionando solo aquellos en los que se regeneraban mejor los protoplastos. El peso molecular del PEG empleado fue el que comúnmente se utiliza así como la

concentración, ya que el reporte de Hopwood (1981) discute y concluye que es lo más efectivo y de ahí en adelante se generalizó su uso.

En este trabajo se reporta la selección de híbridos obtenidos a través de marcadores de resistencia a antibióticos de diferentes cepas de *Saccharopolyspora erythraea*.

Como en muchos otros reportes la fusión de protoplastos se obtuvo mediante el uso de PEG, se encontró que el tiempo de adición del antibiótico en la placa de agar para la selección fue crucial para la sobrevivencia de los híbridos, los resultados mostraron que la adición a las 72 o 96 hrs dan el mejor resultado.

Se puede observar que utilizando la doble resistencia a antibióticos se pueden seleccionar híbridos, resultado de la recombinación de genomas de las cepas originales, ya que en todos los casos se llevaba a cabo la siembra de los protoplastos de cada una de las cepas padres en el medio de regeneración con los dos antibióticos y no se obtuvo alguna colonia que hubiera adquirido la doble resistencia. A pesar de que en los híbridos hubo recombinación, ésta afectó en general, de manera negativa sobre la producción de eritromicina, ya que en todos los híbridos la síntesis del antibiótico fue menor que en los padres. Por el contrario, cuatro de ellas acumularon eritromicina C en lugar de eritromicina A. La razón de este comportamiento es desconocido; probablemente esta región de DNA es inestable y se afectó durante la formación, regeneración o fusión de protoplastos.

TABLA No. 17. FUSION DE PROTOPLASTOS PRODUCCION DE ERITROMICINA DEL 5° DIA DE FERMENTACION (µg/ml)			
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> . CA-340 152.63 <i>Saccharopolyspora erythraea</i> . B-107 0.69	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> . NRRL 2338 33.8 <i>Streptomyces kanamycoticus</i> . no se detectó	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> . CA-340 152.63 <i>Saccharopolyspora erythraea</i> . B-107 0.69	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> . NRRL 2338 33.8 <i>Saccharopolyspora erythraea</i> . B-107 0.69
Recombinante H1 0.31 H2 0.37 H3 0.34 H4 0.45	Recombinante F1 16.23 F2 16.23	Recombinante H5 72.9 H6 48.6 H7 0.56 H8 -H13 no producen H14 0.76 H15 1.26	Recombinante R1 0.64 R2 0.77 R3 0.93 R4 0.77 R5 0.70 R6 0.70 R7 0.71 R8 1.10

De la fusión de protoplastos intergenérica se encontró que el genoma receptor fue el de la cepa *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338, por lo que los híbridos presentan características mas similares a ésta, la recombinación fue probablemente en otro sitio diferente al de producción de eritromicina.

El uso de la resistencia a rifamicina, cuyo gene que la codifica se encuentra muy cercano a los genes de biosíntesis de eritromicina, no nos aseguró que hubiera existido recombinación en esta región ó si la hubo afectó de manera negativa a la producción del antibiótico. Una manera de incidir directamente sobre la región de DNA que contienen los genes de la biosíntesis de

eritromicina sería utilizando mutantes bloqueadas en éstos, y seleccionar híbridos productores en lugar de los padres que no producen. Esto dificultaría o mejor dicho haría la selección más difícil, sin embargo probablemente se encontrarían híbridos con mayor producción.

La recombinación que se da a través de la fusión de protoplastos es al azar, por lo que es necesario seleccionar un poco más el tipo de híbrido que se quiere, dirigiendo la recombinación a los lugares deseados. Una alternativa sería la de utilizar a los genes que flanquean a los genes de biosíntesis de eritromicina, como son la resistencia a rifamicina y de biosíntesis de metionina (Webér et al., 1985). En este caso se tendrían que seleccionar primero auxótrofos de metionina de ambas cepas parentales y combinar la selección de los híbridos con la resistencia a rifamicina. De esta manera, podría esperarse que hubiera recombinación inclusive en la zona central entre ambos marcadores. Estos híbridos podrían tener una diferente producción y sólo alguno sería mayor productor de eritromicina.

Un punto importante en que hay que enfatizar es que la región de biosíntesis de eritromicina es muy grande, de alrededor de 75 kb, lo que dificulta que haya recombinación en toda esta parte del genoma. Consideramos, por esto, que para tener mayor éxito deberían escogerse las mutantes bloqueadas en genes que sean los más importantes para la biosíntesis de eritromicina y seleccionar los híbridos productores

Durante el desarrollo del proyecto se observó que es necesario realizar un gran número de fusiones para que se pueda incrementar la probabilidad de obtener un híbrido con mayor producción de antibiótico; o dicho de otra manera es necesario obtener un gran número de híbridos y que alguno de ellos produzca mayor cantidad de antibiótico.

En los reportes encontrados de fusión de protoplastos se mencionan que encuentran uno, dos, o más híbridos con mayor producción, mejor crecimiento, etc. (mayores aptitudes) que los padres sin embargo, en general son pocos los híbridos que se obtienen, al igual que en este trabajo.

De los trabajos revisados solo Deb et al. (1990), reportaron haber encontrado híbridos con diferentes niveles de producción de Xilanasa, pero siempre por debajo del nivel parental; como en este trabajo. Sin embargo, puede suceder que no se reporten los trabajos en que no se obtienen resultados satisfactorios como el anteriormente mencionado.

Se ha estudiado la síntesis de eritromicina mutando o transformando a *Saccharopolyspora erythraea* (Corcoran. 1981; Thompson et al., 1982; Bibb et al., 1985; Weber et al., 1985; Shafiee & Hutchinson. 1987; Hale et al., 1987; Janssen & Bibb. 1988; Weber & Losick. 1988; Vara & Hutchinson. 1988; Shafiee & Hutchinson. 1988; Donadio & Hutchinson. 1988; Tuan et al., 1988; Vara et al., 1989; Dhillon et al., 1989; Weber et al., 1990; Tuan et al., 1990; Cortés et al., 1990; Paulus et al., 1990; Hopwood & Sherman. 1990; Revill & Leadlay. 1991; Caffrey et al., 1991; Weber et al., 1991; Andersen & Hutchinson. 1992; Caffrey et al., 1992; Donadio & Katz. 1992; Stassi et al., 1993; Donadio et al., 1993) pero no se encontró ningún reporte de fusión de protoplastos de esta cepa. De ahí la importancia de este trabajo.

CONCLUSIONES.

- A través del uso de Polietilenglicol (PEG) se logró fusionar protoplastos de diferentes cepas de *Saccharopolyspora erythraea* y realizar fusiones intergenéricas entre *S. erythraea* y *Streptomyces kanamyceticus*.
- El tiempo de crecimiento en Medio Completo (MC) con glicina es crucial para que haya una buena formación de protoplastos.
- Se debe buscar el mejor Medio de Regeneración (MR) para cada una de las cepas a utilizar.
- La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de un antibiótico puede variar al utilizar diferentes medios.
- La doble resistencia cruzada a antibióticos es un buen método para seleccionar a los híbridos provenientes de padres sensibles.
- El tiempo de adición de los antibióticos marcadores al Medio de Regeneración, después de plaquear la mezcla de fusión, es muy importante para tener un mayor número de híbridos sobrevivientes, siendo este entre 72 y 96 horas.
- Es indispensable obtener un gran número de híbridos para que la probabilidad de encontrar el adecuado sea mayor.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- Andersen J. F.; & Hutchinson C. R. 1992. *J. Bacteriol.* 174 (3): 725 - 735.
- Anne J. 1982. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15: 41 - 46.
- Baltz R. H. 1978. *J. Gen. Microbiol.* 107: 93 - 102.
- Baltz R. H.; & Matsushima M. 1981. *J. Gen. Microbiol.* 127: 137 - 146.
- Baltz R. H.; & Seno E. T. 1988. *Annu. Rev. Microbiol.* 42: 547 - 574.
- Basabe J. R.; et al., 1979. *Anal Biochem.* 92: 356 - 360.
- Benchmarks. 1989. *BioTechniques (BioFeedback)*. 7 (4): 336.
- Berkow R. 1986. *Manual Merck. Séptima edición MSD. Ed. Nueva Editorial Interamericana SA de CV. México.* pp 2117.
- Bibb M. J.; Janssen G. R.; & Ward J. M. 1985. *Gene* 38: 215 - 226.
- Caffrey P.; Bevitt D. J.; Saunton J.; & Leadlay P. F. 1992. *FEBS LETTERS* 304 (2,3): 225 - 228.
- Caffrey P.; Green B.; Packman L. C.; Rawlings B. J.; Staunton J.; & Leadlay P. F. 1991. *Eur. J. Biochem.* 195: 823 - 830.
- Chen W.; Ohmiya K.; & Shumizu S. 1987. *Appl. and Environmental Microbiol.* 53 (3): 542 - 548.
- Chun S.B.; Chin J. E.; Bai S.; & An G. H. 1992. *FEMS Microbiol. Letters.* 73: 221 - 226.
- Corcoran J. W. 1981. *Antibiotics Vol. 4. Ed. Corcoran J. W. Springer-Verlag. N. Y.* pp 132 - 174.
- Cortés J.; Haydock S. F.; Roberts G. A.; Bevitt D. J.; & Leadlay P. F. 1990 (a). *Nature.* 348: 176 - 178.
- Cortés J.; Haydock S. F.; Roberts G. A.; Bevitt D. J.; Caffrey P.; Dhillon N.; & Leadlay P. F. 1990 (b). 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. GIM 90. Agost 1990. Abstract. Book. Strasbourg. A. 120: 108.
- Cramerí R.; & Davies I. E. 1986. *J. Antibiotics.* 39 (1): 128 - 135.
- Crueger W.; & Crueger A. 1984. *Biotechnology: A text book of Industrial Microbiology. Cap. 13 Antibiotics. Ed. T. D. Brock USA.* pp 197 - 226.
- Cundliffe E.; Skinner R. H.; & Thompson J. 1984. *Biological, Biochemical, and Biomedical Aspects of Actinomycetes. Ed. Ortiz-Ortiz L.; Bojalil L. F.; & Yakoleff V. Academic Press, INC. USA.* pp. 303 - 314.
- Cundliffe E. 1989. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 207 - 233.
- Deb J.K.; Malik S.; Ghosh U. K.; Mathai S.; & Sethi R. 1990. *FEMS Microbiol. Letters.* 71: 287 - 292.
- Deed et al., 1990. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 940 - 944.
- Demain A. L.; & Solomon N. A. 1986. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Ed. American Society for Microbiology. U.S.A.*
- Dhillon N.; & Leadlay P. F. 1990. *FEBS LETTERS* 262 (2): 189 - 193.
- Dhillon N.; Hale R. S.; Cortés J.; & Leadlay P. F. 1989. *Mol. Microbiol.* 3(10): 1405 - 1414.
- Didek-Brumec M.; Gaberc-Porekar V.; Alacević M.; Milicić S.; & Socic H. 1991. *J. Biotechnol.* 20: 271 - 278.
- Donadio S.; & Katz L. 1992. *Gene* 111: 51 - 60.
- Donadio S.; Stassi D.; McAlpine J. B.; Staver M. J.; Sheldon P. J.; Jackson M.; Swanson S. J.; Wendt-Pienkowski E.; Wang Y.; Jarvis B.; Hutchinson C. R.; & Katz L. 1993. *Comunicación personal.*
- Escalante D. L.; Lopez H.; Mateos R. C.; Lara F.; & Sanchez S. 1982. *J. Gen. Microbiol.* 128: 2011 - 2015.
- Escalante D. L. 1988. *Tesina IIB. Depto. Biología. UNAM.*
- Evans C.T.; & Conrad D. 1987. *Arch. Microbiol.* 148: 77 - 82.
- Faisst S.; & Seibicke S. 1987. *Cell Biol. International Reports.* 11 (7): 563.
- Fang A. Q.; Li S. L.; Chen Y. W.; & Li P. 1990. *Chin. J. Biotechnol.* 6 (3): 207 - 213.
- Fayerman J. T. 1991. *I Second-Generation Products: Antibiotics. Drug Biotechnology Regulation Scientific Basis and Practices. Ed. Chiu Y. H.; Gueriguian J. L. Marcel Dekker Inc. USA.* pp 415 - 424.
- Fierro J. F.; Hardisson C.; & Salas J. A. 1988. *J. Antibiotics.* 41 (1): 142 - 143.
- Furumai T.; Takeda K.; & Okanishi M. 1982. *J. Antibiotics.* 35 (10): 1367 - 1373.
- Garrod et al., 1973. *Antibiotic and Chemotherapy. Ed. Churchill Livingstone. Gran Bretaña.*
- Glasby J. S. 1979. *Enciclopedia of Antibiotics. Second Ed. J. Wiley & Sons. USA.* pp 212 - 214.
- Goodfellow M.; Williams S. T.; Mordarski M. 1988. *Actinomycetes in Biotechnology. Ed. Academic Press. U.S.A.*
- Goto-Hamamoto M.; Ohnuki T.; Uozumi T.; & Beppu T. 1986. *Agric. Biol. Chem.* 50 (6): 1467 - 1473.
- Hale R. S.; Jordan K. N.; & Leadlay P. F. 1987. *FEBS LETTERS.* 224 (1): 133 - 136.
- Hamlyn P. F.; Birkett J. A.; Perez G.; & Peberdy J. F. 1985. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2813 - 2823.
- Higashide E. 1984. *Biotechnology of Industrial Antibiotics Vol. 22. Cap. 15 Macrolides: Properties, Biosynthesis, and Fermentation. Drugs and the Pharmaceutical Sciences. Ed. Vandemme E. J. Dekker M. INC. USA.* pp 451 - 509.
- Hopwood D. A. 1981. *Ann. Rev. Microbiol.* 35: 237 - 272.

- Hopwood D. A. et al., 1985. Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual. John Innes Foundation, England.
- Hopwood D. A.; & Sherman D. H. 1990. *Annu. Rev. Genet.* 24: 37 - 66.
- Hotta K; Ishikawa J; Ichihara M; Naganawa H; & Mizuno S. 1988. *J. Antibiotics* 41 (1): 94 - 103.
- Hrauneli D; Pigac J; Smokuina T; & Alacevic M. 1983. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1415 - 1422.
- Ikeda H. et al., 1984. *J. Antibiotics.* 37 (10): 1224 - 1230.
- Ikeda H; Inoue M; & Omura S. 1983. *J. Antibiotics* 36 (3): 283 - 288.
- Illing G. T; Normansell I. D; & Peberdy J. F. 1989. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2289 - 2297.
- Isaeva L. M; & Voelikova T. A. 1990. *Antibiot-Khimioter.* 35 (12): 26 - 29.
- Ishikawa J; Koyama Y; Mizuno S; & Hotta K. 1988. *J. Antibiotics* 41 (1): 104 - 112.
- Jandrová B; Curcková F; & Bendová O. 1990. *J. Basic Microbiol.* 30 (7): 499 - 505.
- Janssen G. R; & Bibb M. J. 1988. *Developments in Industrial Microbiol. (J. Industrial Microbiol. Suppl. 3)* 29: 89 - 96.
- Jekkel et al., 1989. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1727 - 1733.
- Karasawa M. et al., 1986. *Agric. Biol. Chem.* 50 (2): 339 - 346.
- Kavanagh F. 1975. *Methods in Enzymology* XLIII: 55 - 69.
- Kavanagh K; Walsh M; & Whittaker P. A. 1991. *FEMS Microbiology Letters.* 65 (3): 283 - 286.
- Kholer J; & Darland G. 1988. *J. Industrial Microbiol.* 3: 311 - 320.
- Kibwage I. O; Roets E; & Hoogmartens J. 1983. *J. Chromatogr.* 256: 164 - 171.
- Kibwage I. O; Janssen G; Roets E; Hoogmartens J; & Vanderhaeghe. 1985. *J. Chromatogr.* 346: 309 - 319.
- Kim K. S; Ryu D. Y; & Lee S. Y. 1983. *Enzyme Microb. Technol.* 5: 273 - 280.
- Kinashi H; Otten S. L; Duncan J. S; & Hutchinson C. R. 1988. *J. Antibiotics.* 41 (5): 624 - 637.
- Kitano K. et al., 1985. *Agric. Biol. Chem.* 49 (3): 685 - 692.
- Kurth R; & Demain A. L. 1984. *Biotechnology of Industrial Antibiotics* Vol. 22. Cap. 29 The Impact of the New Genetic on Antibiotic Production. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. Ed. Vandemme E. J. Dekker M. INC. USA. pp 781 - 789.
- Lewandowska-Skarbek M; & Hutchinson C. R. 1990. *J. Bacteriol.* 172 (11): 6605 - 6606.
- Lowry O. H; et al., 1957. *Methods in Enzymology* III: 447 - 456.
- Lowry O. H; Rosenbrough N. J; Farr A. L; & Randall R. J. 1951. *J. Biol. Chem.* 143: 265 - 275.
- Lynch et al., 1989. *FEMS Microbiology Letters.* 59: 225 - 228.
- Malanicheva I.A; Koz'mian L. I; Dudnik Iuv; Novozhenov Mlu; Laiko A. V; & Potapova N. P. 1991. *Antibiot-Khimioter.* 36 (5): 5 - 8.
- Maldonado, S. M. E. M. 1982. Tesis Licenciatura. V. A. Edo de Méx.
- Malina H; Tempete C. H; & Robert-Gero M. 1985. *J. Antibiotics* 38 (9): 1204 - 1210.
- Martin J. F. 1979. *Economic Microbiology. Vol. 3 Secondary Products of Metabolism. Nonpolyene Macrolide Antibiotics*. Ed. Rose A. H. Academic Press. London, N. Y. pp 239 - 291.
- Martin-Kova L; Musilkova M; Ujcova E; Machek F; & Seichert L. 1990. *Folia Microbiol. (Praha).* 35 (3): 143 - 148.
- Mirdamadi-Tehrani J; Mitchell J. I; Williams S. T; & Ritchie D. A. 1992. *FEMS Microbiology Letters.* 91: 187 - 192.
- Moriguchi M; & Kotegawa S. 1985. *Agric. Biol. Chem.* 49 (9): 2791 - 2793.
- Morinaga T; Kikuchi M; & Nomi R. 1985. *Agric. Biol. Chem.* 49 (2): 523 - 524.
- Ogata S. et al., 1985. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 31: 187 - 191.
- Ogawa et al., 1989. *J. Fermentation and Bioengineering.* 63 (3): 207 - 209.
- Ogawa H; Imai S; Satoh A; & Kojima M. 1983. *J. Antibiotics.* 36 (2): 184 - 186.
- Okamura T; Nagata S; Misono H; & Nagasaki S. 1988. *Agric. Biol. Chem.* 52 (6): 1433 - 1438.
- Okanishi M; Suzuki K; & Umezawa H. 1974. *J. Gen. Microbiol.* 80: 389 - 400.
- Omura S; & Tanaka Y. 1983. *Biochemistry and Genetic. Regulation of Commercially Important Antibiotics. Cap. 7 Macrolides*. Ed. Vining L. C. Addison-Wesley Publishing Company USA. pp 179 - 206.
- Orlova T.I. 1991. *Antibiot-Khimioter.* 36 (4): 3 - 5.
- Ott D. R; & Day D. F. 1987. *Applied and Environmental Microbiology.* 53 (7): 1694 - 1695.
- Paulus T. J; Tuan J. S; Luebke V. E; Maine G. T; DeWitt J. P; & Katz L. 1990. *J. Bacteriol.* 172 (5): 2541 - 2546.
- Pe'er S; & Chet I. 1990. *Can. J. Microbiol.* 36: 6 - 9.
- Pina A; Calderón L. I; & Benítez T. 1986. *Applied and Environmental Microbiol.* 51 (5): 995 - 1003.
- Pogell B. M. 1984. *Biological, Biochemical, and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. Ed. Ortiz-Ortiz L; Bojalil L. F; & Yakoleff V. Academic Press, INC. USA. pp. 289 - 314.
- Pontecorvo G; Riddle P. N; & Hales A. 1977. *Nature.* 265: 257 - 258.
- Revill W. P; & Leadlay P. F. 1991. *J. Bacteriol.* 173 (14): 4379 - 4385.
- Robinson M; Lewis E; & Napier E. 1981. *Mol. Gen. Genet.* 182: 336 - 340.

-  Rodionova I. I.; Danilenko V. N.; & Gracheva I. M. 1987. *Antibiot Med. Biotekhnol.* 32 (12): 883 - 887.
-  Rose A. H. 1979. *Economic Microbiology. Vol. 3 Secondary Products of Metabolism. I Production and Importance of Secondary Products of Metabolism.* Ed. Rose A. H. Academic Pres. London, N. Y. pp 1 - 33.
-  Rosenstein E. 1988. *Diccionario de Especialidades Farmaceuticas. 34ª Edición.* Ed. P. L. M., S.A. de C.V. México.
-  Schupp T.; & Divers M. 1986. *FEMS Microbiol. Letters.* 36: 159 - 162.
-  Seno E. T.; & Hutchinson C. R. 1986. *The Bacteria Vol. 9. Cap. 7 The biosynthesis of tylosin and erythromycin: Model systems for studies of the genetics and biochemistry of antibiotic formation.* Ed. Quener S. W.; & Day L. E. Academic Press. N. Y. pp 231 - 279.
-  Shafiee A.; & Hutchinson C. R. 1987. *Biochemistry.* 26: 6204 - 6210.
-  Shafiee A.; & Hutchinson C. R. 1988. *J. Bacteriol.* 170 (4): 1548 - 1553.
-  Shirahama T.; Furumai T.; & Okanishi M. 1981. *Agric. Biol. Chem.* 45 (5): 1271 - 1273.
-  Skinner R. H.; & Cundliffe E. 1982. *J. General Microbiol.* 128: 2411 - 2416.
-  Stassi D.; Donadio S.; Staver M. J.; & Katz L. 1993. *J. Bacteriol.* 175 (1): 182 - 189.
-  Stazak R.; Matsushima P.; Baltz R. H.; & Schoner B. E. 1990. *J. General Microbiol.* 136: 1899 - 1904.
-  Stonesifer et al., 1986. *Mol. Gen. Genet.* 202: 348 - 355.
-  Stutzman-Engwall K. J.; Otten S. L.; & Hutchinson C. R. 1992. *J. Bacteriol.* 174 (1): 144 - 154.
-  Szabó I.; Penyige A.; Barabás G.; Szabó G.; & Dinya Z. 1989. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy.* 33 (1): 58 - 62.
-  Thompson C. J.; Skinner R. H.; Thompson J.; Ward J. M.; Hopwood D. A.; & Cundliffe E. 1982. *J. Bacteriol.* 151 (2): 678 - 685.
-  Thompson C. J.; Ward J. M.; & Hopwood D. A. 1982. *J. Bacteriol.* 151 (2): 668 - 677.
-  Tsuji K.; & Goetz J. F. 1978. *J. Chromatogr.* 147: 359 - 367.
-  Tuan J. S.; Weber J. M.; Staver M. J.; Leung J. O.; Donadio S.; & Katz L. 1990. *Gene.* 90: 21 - 29.
-  Uchiyama H.; & Weisblum B. 1985. *Gene.* 38: 103 - 110.
-  Ushijima et al., 1990. *Agric. Biol. Chem* 54 (9): 2393 - 2399.
-  Ushijima S. et al., 1987. *Agric. Biol. Chem.* 51 (4): 1051 - 1057.
-  Vara J.A.; & Hutchinson C. R. 1988. *J. Biol. Chem.* 263 (29): 14992 - 14995.
-  Vara J.; Lewandowska-Skarbek M.; Wang Y.; Donadio S.; & Hutchinson C. R. 1989. *J. Bacteriol.* 171 (11): 5872 - 5881.
-  Vyskocil P.; Homolka L.; & Pilát P. 1987. *Biotechnology Techniques.* 1 (1): 25 - 30.
-  Weber J. M.; & Losick R. 1988. *Gene.* 68: 173 - 180.
-  Weber J. M.; Leung J. O.; Maine G. T.; Potenz R. H. B.; Paulus T. J.; DeWitt J. P. 1990. *J. Bacteriol.* 172 (5): 2372 - 2383.
-  Weber J. M.; Leung J. O.; Swanson S. J.; Idler K. B.; & McAlpine J. B. 1991. *Science* 252: 114 - 117.
-  Weber J. M.; Schoner B.; & Losick R. 1989. *Gene* 75: 235 - 241.
-  Weber J. M.; Wierman C. K.; & Hutchinson C. R. 1985. *J. Bacteriol.* 164 (1): 425 - 433.
-  Wesseling A.C.; & Lago B. D. 1981. *Develop. Industrial Microbiol.* Ed. S.M.I. USA. 22: 641 - 651.
-  Yamamoto H.; Maurer K. H.; & Hutchinson C. R. 1986. *J. Antibiotics.* 39 (9): 1304 - 1313.
-  Yamashita F.; Hotta K.; Okami Y.; & Umezawa H. 1985. *J. Antibiotics.* 38 (1): 126 - 127.
-  Yanase H.; Yasui M.; Miyazaki T.; Tonomura K. 1985. *Agric. Biol. Chem.* 49 (1): 133 - 140.
-  Yang S.S.; & Kao C.Y. 1991 *Proc-Natl-Sci-Coun-Repub-China-B.* 15 (1): 20 - 27.
-  Yoshimoto A.; Johdo O.; Ishikura T.; & Takeuchi T. 1991. *Jpn. J. Antibiot.* 44 (3):269 - 276.
-  Yoshimoto A.; Johdo O.; Ishikura T.; & Takeuchi T. 1991. *Jpn. J. Antibiot.* 44 (3): 277 - 286.
-  Yuan D.J.; & Zhou Q. 1991. *Chin. J. Biotechnol.* 7 (2): 135 - 143.
-  Zakharova G. M.; Belova T. S.; & Danilenko V. N. 1990. *Antibiot-Khimioter.* 35 (1): 3 - 4.
-  Zhou X.F.; & Zhou Q. 1989. *Chin. J. Biotechnol.* 5 (3): 161 - 166.