

104
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

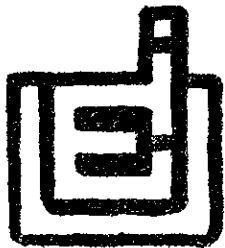
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTAGALA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

EFEECTO DEL AMONIO SOBRE LA BIOSINTESIS DE
ANTRACICLINAS EN *Streptomyces peucetius* var.
caesius.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
RAUL SNELL CASTRO



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

25875 2. 1998



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer al Dr. Sergio Sánchez Esquivel su apoyo y singular paciencia para la culminación de este trabajo.

Mis padres han sabido sembrar buena semilla y aunque con grandes tropiezos el árbol ha dado frutos dignos, les agradezco no solo su apoyo y amor sino la vida misma.

Un especial agradecimiento a mi hermano Luis y su familia quienes me dieron ánimos, cariño y su tiempo para imprimir este trabajo.

Con muy especial cariño agradezco la amistad y sincera ayuda de mis primeros compañeros; Daniel, quien me instruyó en el manejo de las técnicas; Anamol-Ana María, por que siempre me apoyo científica y espiritualmente; Elia, con quien podía tener una relajante y amena charla; Rina, por sus fresadas cómicas y peleas juguetonas; Angeles, quien un par de veces me mostró el carácter y la bondad de las regiomonanas; Sergio Alcantara, quien con unas cuantas palabras me decía la esencia de las cosas; Ruben y sus anécdotas llenas de humor blanco; Lulu Sato, quien siempre estaba dispuesta a apoyarnos con el material, limpiándolo con un cuidado como si lo fueran a utilizar sus hijos, tal vez lo fumos; Gilberto y su instrucción metodológica; Fabian, con quien compartí noches de intensa labor científica; LAURA, piedra angular de esta tesis “gracias por todo”.

Agradezco de igual manera a mis segundos compañeros; Bety, quien más de una vez y con singular destreza salvo este trabajo de las malignas garras del software; Angeles, por adiestrarme en el manejo del complicado laberinto windowniano; Araceli, quien me guió en el antes conocido mundo gráfico harvardiano; Ruth, por que siempre me guardaba palomitas cuando no llegaba a comer; Alejandra y sus vibras chamanescas magicizantes; todos aquellos que pusieron algo de su parte, Romina, Itzel y Luis.

Un agradecimiento especial a Hector, quien con mucha paciencia y espíritu docente, me presentó a la traviesa estadística.

INDICE

RESUMEN 1

INTRODUCCION 2

1. MARCO TEORICO 4

1.1. Biología de los actinomycetos 5

1.2. Generalidades sobre antraciclinas 5

1.2.1. Biosíntesis de antraciclinas 5

1.2.2. Regulación en la biosíntesis de antraciclinas 8

1.2.3. Aplicación clínica 10

1.2.4. Mecanismo de acción 10

1.2.5. Importancia económica 11

1.3. El nitrógeno en los actinomicetos 11

1.3.1. Asimilación de nitrógeno 11

1.3.2. Regulación de la antibiogénesis por nitrógeno 13

2. ANTECEDENTES 14

3. OBJETIVOS 16

4. MATERIALES Y METODOS 17

4.1. CONDICIONES DE CULTIVO 18

4.1.1. Material biológico 18

4.1.2. Obtención de la suspensión de esporas 18

4.1.3. Obtención de la suspensión micelial 19

4.1.4. Condiciones de precrecimiento y crecimiento del inóculo 19

4.1.5. Condiciones de producción de antraciclinas 20

4.2. METODOS ANALITICOS 21

- 4.2.1. Determinación del crecimiento 21
- 4.2.2. Cuantificación de antraciclinas 21
- 4.2.3. Determinación de amonio 22
- 4.2.4. Determinación de glucosa 22
- 4.2.5. Determinación de pH 22
- 4.2.6. Eliminación de desechos 22

5. DISEÑO EXPERIMENTAL 23

- 5.1. Efecto de diferentes concentraciones de amonio sobre la producción de antraciclinas 23
- 5.2. Efecto de una alta concentración de amonio a distintos tiempos de la fermentación sobre la producción de antraciclinas 23
- 5.3. Efecto del cloramfenicol, cerulenina, una alta concentración de amonio y metilamina sobre la producción de antraciclinas a las 72 horas de la fermentación 23
- 5.4. Producción de antraciclinas en un sistema de células en reposo (resting cell system) 24

6. RESULTADOS Y DISCUSION 25

7. CONCLUSIONES 42

ANEXO 1 43

REFERENCIAS 46

RESUMEN

Un grupo de compuestos microbianos, las antraciclinas, cobraron gran importancia desde el descubrimiento de la daunorubicina en 1963 y la doxorubicina en 1969, dos antraciclinas con potente actividad anticancerígena. Sin embargo, los microorganismos productores sintetizan una mezcla de diferentes antraciclinas que dificulta la obtención de los compuestos comercialmente importantes incrementando su valor en el mercado, así como el interés en su biosíntesis³⁷. La información referente a la regulación de la biosíntesis de antraciclinas es escasa a pesar del amplio uso como agentes antitumorales de algunas de ellas. Teniendo como base el antecedente de un efecto negativo por levadura de cerveza (fuente de nitrógeno en el medio de producción) y sales de amonio (fuente de nitrógeno en el medio químicamente definido) sobre la síntesis de antraciclinas en *Streptomyces peucetius* var. *caesius*⁶, se pretendió determinar el efecto del amonio sobre la producción de antraciclinas, la caracterización del efecto producido y si el amonio *per se* es el efector del proceso o un producto de su asimilación.

Las fermentaciones para la producción de antraciclinas en *Streptomyces peucetius* var. *caesius* se realizaron en medio mínimo (químicamente definido) descrito por Arcamone¹, modificado en las concentraciones de glucosa y fosfato de potasio dibásico que originalmente son de 60 g/L y 0.5 g/L a 18 g/L y 0.3 g/L, respectivamente²⁹, ya que ambas sustancias disminuyen la producción de antraciclinas cuando su concentración es alta en el medio de cultivo⁸. La fermentación se realizó a una temperatura de 29 °C y una agitación de 190 rpm durante 120 horas. Las antraciclinas fueron cuantificadas espectrofotométricamente registrando la absorbancia a una longitud de onda de 495 nm²⁸. Adicionalmente se cuantificó el crecimiento bacteriano, el amonio y glucosa residuales y pH.

Los resultados revelaron que la producción de antraciclinas fue afectada negativamente por el ión amonio cuando el microorganismo consumió más de 26 mM del ión; mientras más alto fue el consumo de éste, la disminución en la producción de antraciclinas resultó mayor. El efecto se observó a partir de la fase estacionaria de crecimiento o idiofase. Cabe mencionar que conforme más tempranamente se añadió un exceso de amonio al medio de cultivo, el efecto fue mayor sobre la producción de antraciclinas. Aunque se desconoce si el efecto del amonio es a nivel de metabolismo primario o secundario, se concluye que el efecto negativo fue resultado de una inhibición enzimática, ya que en el Sistema de Células en Reposo (SCR), un inhibidor de síntesis de proteínas (cloranfenicol) provocó una producción semejante al tratamiento con una concentración óptima de amonio; además, no mostró efecto al combinarse con el amonio y el análogo, por lo que se descartó a la represión como causante del efecto observado. Al igual que el tratamiento con cerulenina (inhibidor de la policétido sintetasa, PKS²⁰), aquellos que tuvieron adiciones de amonio o su análogo no produjeron antraciclinas en el SCR. Respecto a la comprobación del amonio como el causante del efecto, se presentó un patrón inhibitorio tanto con el amonio como con su análogo (metilamina) en la fermentación normal y en el SCR, confirmandose al amonio *per se* como el efector.

INTRODUCCION

El conocimiento y entendimiento de la biosíntesis de antibióticos ha avanzado significativamente en los últimos años, desde la búsqueda de cepas productoras de antibióticos (screening) en la primera mitad del siglo hasta la clonación completa de las rutas biosintéticas a inicios de los 1980's⁴.

El primer antibiótico purificado obtenido de un actinomiceto fue la actinomicina, en 1940. La importancia médica y comercial de los antibióticos de origen microbiano inició una serie de investigaciones dirigidas a la búsqueda de nuevas cepas microbianas y posterior identificación de sustancias activas útiles contra infecciones microbianas y neoplasias⁶.

Un grupo de compuestos microbianos, las antraciclinas, cobraron gran importancia desde el descubrimiento de la daunorubicina en 1963 y la doxorubicina en 1969, dos antraciclinas con potente actividad anticancerígena. Sin embargo, los microorganismos productores sintetizan una mezcla de diferentes antraciclinas que dificulta la obtención de los compuestos comercialmente importantes incrementando su valor en el mercado, así como el interés en su biosíntesis³⁷.

La biosíntesis de antibióticos producidos por microorganismos es notoriamente influenciada por la forma en que se suministran los nutrientes. Durante los pasados 40 años se ha acumulado información referente a la descripción de los efectos de compuestos esenciales y no esenciales, intentando encontrar las condiciones nutricionales óptimas tendientes a maximizar la producción del antibiótico. Desafortunadamente cada microorganismo productor y cada antibiótico requieren de sus propias condiciones para favorecer la producción. Sin embargo, existen algunos efectos generales que podemos utilizar en muchas fermentaciones para producir antibióticos, ciertas condiciones de abastecimiento de nutrientes esenciales (carbono, nitrógeno, fósforo o sulfuro) que limitan el crecimiento frecuentemente activan el metabolismo productor de antibióticos. Entre los nutrientes esenciales mencionados, diversos estudios han abordado el tema del control por fuentes de carbono, fuentes de fósforo y elementos traza. Mientras que los efectos regulatorios ejercidos por fuentes de nitrógeno fueron reconocidos posteriormente

28

Diversos antibióticos contienen en la estructura de sus moléculas átomos de nitrógeno derivados de metabolitos primarios. La relación con el metabolismo primario es muy obvia en el caso de los antibióticos peptídicos y β -lactamas, ya que son los aminoácidos con modificaciones menores los que forman el antibiótico. Los antibióticos aminociclotólicos constituyen un buen ejemplo de utilización de compuestos nitrogenados provenientes del metabolismo primario que son utilizados como donadores de grupos amino; L-glutamina y L-asparagina son usados de esta manera para la síntesis del esqueleto de estreptidina en la estreptomina. Incluso, antibióticos como el macrólido tilosina, que no posee átomos de nitrógeno en su estructura, está directamente ligado al

metabolismo del nitrógeno por aminoácidos que son usados como precursores carbonados para el anillo macrolídico; la biosíntesis de la tilosina es uno de los mejores ejemplos conocidos de control por nitrógeno ²⁸.

La información referente a la regulación de la biosíntesis de antraciclinas es escasa a pesar del amplio uso como agentes antitumorales de algunas de ellas, por lo que resulta interesante realizar estudios tendientes a esclarecer aspectos de regulación y de esta manera proporcionar conocimientos que ayuden a incrementar la producción de antraciclinas.

BIOLOGIA DE LOS ACTINOMYCETOS

Anteriormente reconocidos como hongos debido a su morfología y similar papel ecológico, los actinomycetos son un grupo de bacterias filamentosas en su mayoría, aunque también presentan formas unicelulares típicas. Estudios realizados en los 1950's sobre su estructura y composición química han confirmado su naturaleza procarionte. Actualmente son conocidas como actinobacterias ¹¹.

Las actinobacterias habitan una gran variedad de ambientes naturales y hechos por el humano. Crecen sobre diversos sustratos, aunque muchos son estrictamente saprófitos, algunos son parásitos y simbióticos. La gran mayoría son aerobios y habitan el suelo, siendo el género *Streptomyces* el más abundante. Este grupo de bacterias ha sido implicado en la degradación de humus y últimos estados de putrefacción de plantas, jugando un papel importante en la degradación de polímeros como hemicelulosas, pectina, queratina, quitina y componentes de paredes celulares fúngicas, éste último posiblemente es uno de los más abundantes sustratos para streptomycetos de suelo.

Se asume con frecuencia que los actinomycetos, particularmente los *Streptomyces*, juegan un importante papel en las interacciones antagonistas en el suelo debido a su capacidad para producir antibióticos *in vitro*, sin embargo, la evidencia directa referente a la presencia de dichos metabolitos en suelo no sustenta la anterior aseveración ¹¹.

La mayoría de los actinomycetos formadores de esporas (endosporas) pertenecen al género *Streptomyces*. Producen un micelio ramificado y no fragmentado muy semejante al de un típico hongo en cuanto a organización. Una diferenciación morfológica conduce a la esporogénesis que se origina en un tipo de micelio llamado aéreo debido a su crecimiento vertical al medio de cultivo ¹¹. La producción de antibióticos y la diferenciación morfológica han sido siempre consideradas como facetas diferentes del ciclo vital de los *Streptomyces*. Sin embargo, el descubrimiento de un gen involucrado tanto en la formación de esporas como en la codificación de la síntesis de policétidos (precursores de algunos antibióticos) ha modificado este esquema, quizás los antibióticos existen como un signo o efector de la diferenciación y no como consecuencia de ésta ⁴.

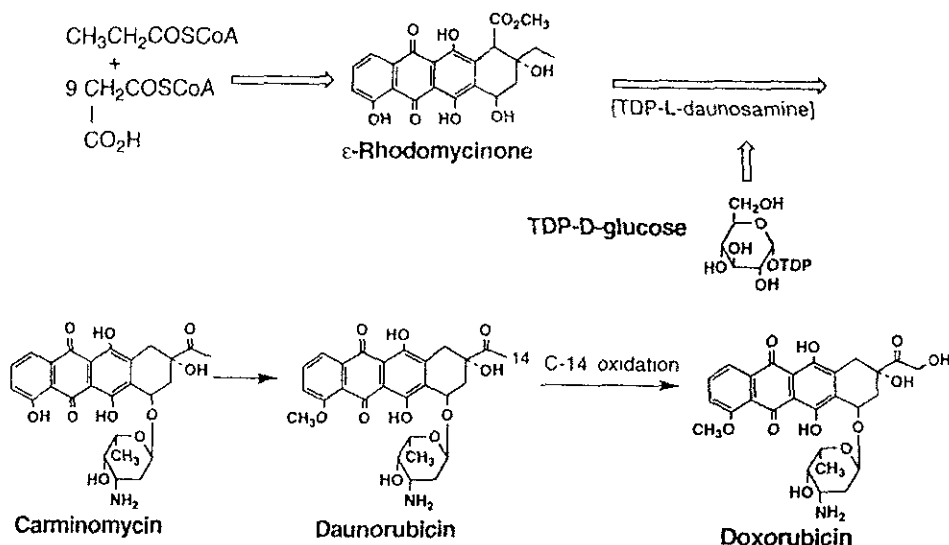
GENERALIDADES SOBRE ANTRACICLINAS

BIOSINTESIS DE LAS ANTRACICLINAS

Descubiertas inicialmente a finales de los 30's en cultivos de Actinomycetos, las antraciclina son compuestos coloreados derivados del 7,8,9,10-tetrahidro-5,12-naftacenoquinona, que contienen una o más unidades de azúcar unidas a los carbonos 7 y/o 10 de la naftacenoquinona ^{2 y 30}.

La biosíntesis es inicialmente mediada por la condensación lineal de nueve unidades de acetil-CoA y una de propionil-CoA con la intervención de la enzima policétido sintetasa (PKS) tipo II, mediante un mecanismo similar al propuesto para la biosíntesis de ácidos grasos, para originar un decacétido (no pigmentado) que constituirá el esqueleto carbonado de la primera antraciclina llamada aklavinona³³, que es hidroxilada para formar ε-rhodomycinona⁷; posteriormente, una serie de intermediarios modificados por reacciones de demetilación, descarboxilación, hidroxilación y oxidación dan origen a las diferentes antraciclinas^{2 y 3} (fig. 1).

FIGURA 1. Ruta biosintética de tres antraciclinas importantes comercialmente, las flechas anchas indican múltiples pasos.



FUENTE: (31).

Un número de aminoazúcares están relacionados con las antraciclinas, incluyendo daunosamina (constituyente de la adriamicina, baumicinas, carminomicina y daunomicina) y rhodosamina (N-dimetildaunosamina, constituyente de la aclacinomicina). La glucosilación de la antraciclina es un evento posterior a la formación de la ε-rhodomycinona en la biosíntesis de las antraciclinas^{2 y 30}.

Los microorganismos productores de antraciclinas generalmente originan mezclas ricas de compuestos relacionados, difiriendo principalmente en el tipo de sustituyente del azúcar y la distribución de los grupos hidroxilo y carboxilo alrededor de la naftacetoquinona ³⁰ (tabla 1).

TABLA 1. Microorganismos productores de antraciclinas.

ANTRACICLINAS

Ácido aklanónico
Ácido figaroico
Aclacinomicina

Aklavina
Aranciamicina
Baumicina
Beromicina
Carminomicina

Cicladina
Ciclamicina
Cinerubina
Cirolemicina
Citotetrina
Daunorubicina

Daunosamini-Daunorubicina
13-Desoxicarminomicina
11-Desoxidaunorubicina

11-Desoxidoxorubicina

11-Desoxi-13-Desoxidaunorubicina
11-Desoxi-4-O-Desmetil-daunorubicina
11-Desoxi-4-O-Desmetil-doxorubicina
11-Desoxi-4-O-Desmetil-13-Dihidro-daunorubicina
11-Desoxi-13-Dihidro-daunorubicina
13-Dihidro-daunorubicina
Doxorubicina
Eloramicina

Ericamicina
Galirrubina
Isorhodomicina
Latenomicina
Leucemicina
Maggiamicina
Marcelomicina
Marimicina
Mielina

Mimatomicina

CEPAS PRODUCTORAS

Streptomyces sp.
Streptosporangium sp
Streptomyces galilaeus
Streptomyces peucetius
Streptomyces sp
Streptomyces echinatus
Streptomyces coeruleorubidus
Streptomyces griseoruber variante *fructofermentans*
Actinoadura carminata
Streptomyces peucetius
Streptomyces coeruleorubidus
Streptomyces capoanus
Streptomyces capoanus
Streptomyces cinereoruber variante *fructofermentans*
Streptomyces bellus variante *cirolerosus*
Streptomyces griseoflavus
Streptomyces peucetius
Streptomyces peucetius variante *caesius*
Streptomyces coeruleorubidus
Streptomyces griseus
Streptomyces griseus variante *rubidofaciens*
Streptomyces bifurcus
Streptomyces insignis
Streptomyces griseoruber
Streptomyces viridochromogenes
Streptomyces sp
Streptomyces peucetius variante *carneus*
Streptomyces peucetius variante *carminatus*
Streptomyces peucetius variante *aureus*
Micromonospora sp
Streptomyces peucetius variante *aureus*
Micromonospora sp
Micromonospora sp
Streptomyces peucetius variante *aureus*
Streptomyces peucetius variante *aureus*
Streptomyces peucetius variante *aureus*
Micromonospora sp
Streptomyces peucetius variante *carneus*
Streptomyces peucetius variante *caesius*
Streptomyces glaucescens
Streptomyces olivaceus
Streptomyces sp
Streptomyces galilaeus
Streptomyces purpurascens
Streptomyces griseoruber
Streptomyces griseus
Streptomyces sp
Actinosporangium sp
Streptomyces mariensis
Streptomyces janthinus
Streptomyces violans
Streptomyces sp

TABLA 1. Continuación.

| | |
|-------------------|---------------------------------------|
| Mitromicina | <i>Streptomyces viridochromogenes</i> |
| Musettamicina | <i>Acinosporangium</i> sp. |
| Nocardorrubina | <i>Nocardia narashinoensis</i> |
| Nogalamicina | <i>Streptomyces nogalator</i> |
| Pilaromicina | <i>Streptomyces flavovirens</i> |
| Pirromicina | <i>Streptomyces galilaeus</i> |
| | <i>Streptomyces</i> sp |
| Quinociclina | <i>Streptomyces aureofaciens</i> |
| Requimocina | <i>Streptomyces filamentosus</i> |
| Retamicina | <i>Streptomyces olindensis</i> |
| Reticulomicina | <i>Streptomyces rubriretricoli</i> |
| Rhodomicetina | <i>Streptomyces griseus</i> |
| Rhodorrubina | <i>Streptomyces galilaeus</i> |
| Rhodomicina | <i>Streptomyces purpureus</i> |
| Riemicina | <i>Streptomyces ryensis</i> |
| Rubomicina | <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> |
| Rutilantina | <i>Streptomyces</i> sp |
| Steffimicina | <i>Streptomyces steffisbergensis</i> |
| Tauromicina | <i>Streptomyces tauricus</i> nov. sp. |
| Tetracenomicina C | <i>Streptomyces glaucescens</i> |
| | <i>Streptomyces olivaceus</i> |
| Tripanomicina | <i>Streptomyces diastochromogenes</i> |
| Vacunociclina | <i>Actinomyces</i> sp |
| Violacina | <i>Actinomyces</i> sp |
| | <i>Macrospora violaceus</i> |
| Violamicina | <i>Streptomyces violaceus</i> |
| Violarina | <i>Streptomyces violaceus</i> |
| | <i>Streptomyces coelicolor</i> |

FUENTE: (6).

REGULACION EN LA BIOSINTESIS DE ANTRACICLINAS

La relación entre metabolismo primario y secundario (trofofase e idiofase) varía de organismo a organismo y de una condición de cultivo a otra, por lo que el metabolismo secundario podría estar acoplado a la acumulación de biomasa durante la fase exponencial o demorado hasta la fase estacionaria del crecimiento bacteriano. Los factores responsables del cambio de metabolismo primario a secundario no han sido bien definidos, aunque se piensa que es posible cambiar el grado de solapamiento entre trofofase e idiofase mediante la manipulación de los nutrientes ³⁰.

Para la producción de cualquier metabolito la composición del medio de cultivo repercute de manera directa; entre los componentes que pueden tener un efecto se encuentran las fuentes de carbono y nitrógeno, los fosfatos y algunos metales como Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} , que son suministrados como elementos traza. Además de estos factores nutricionales, las fermentaciones microbianas son afectadas principalmente por la temperatura, el pH y la disponibilidad de oxígeno ³⁰, ésta última es muy importante en las fermentaciones sumergidas con *Streptomyces*, ya que la bacteria suele aglomerarse

formando pequeñas esferas o pellets que restringen la disponibilidad de oxígeno sólo a la superficie.

En relación al efecto por fuente de carbono, se presenta un tipo de inhibición a nivel de transcripción genética, común en bacterias, que actúa en genes de enzimas catabólicas. Un ejemplo clásico, lo representa la glucosa cuando se encuentra en el medio de cultivo, ya que impide la formación de β -galactosidasa (incluso en presencia de lactosa) al reprimir el operon Lac mediante un producto de su catabolismo, a este efecto se le llama represión catabólica, en este caso por glucosa; este fenómeno regulatorio ha sido descrito ampliamente en *Streptomyces*. Dekleva y cols. reportaron que *S. peucetius* es capaz de crecer y producir antraciclinas utilizando como fuente de carbono glucosa, manosa, celobiosa, lactosa, fructosa, maltosa y almidón, aunque la glucosa es la fuente de carbono más usada ⁸, manejándose en concentraciones de 60 g/L para *S. peucetius* var. *caesius* en el medio de producción ¹. Esta alta concentración de glucosa no produce la represión catabólica originada por altas concentraciones de glucosa en fermentaciones con *Streptomyces* productores de antibióticos, por lo que se sugiere que en *S. peucetius* la glucosa no promueve la represión catabólica sobre la biosíntesis de antraciclinas ⁸. Sin embargo, el uso de glucosa como fuente de carbono en cultivos sumergidos de *S. peucetius* suele conducir a una acidificación del medio de cultivo ligada a una escasa producción de antraciclinas, dicho incremento de la acidez en el medio se debe a la excreción de ácidos orgánicos, específicamente piruvato, 2-oxoglutarato y citrato, originados por un aumento en la actividad del ciclo de Krebs ⁹, esta excreción podría explicar la baja producción de antraciclinas que se presenta durante este fenómeno, ya que para la biosíntesis de antraciclinas se requiere de acetil-CoA como precursor y glucosa (en su forma aaminada), y siendo ambos sustratos directo e indirecto, respectivamente, en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, se dejaría de abastecer la ruta para la síntesis de antraciclinas.

Respecto a la fuente de nitrógeno, se ha observado una represión por amonio, en donde el blanco de tal represión es el regulón de nitrógeno *Ntr*, el cual es inducido en respuesta a bajos niveles de amonio y es monitoreado por la proteína NtrB, la transcripción de los genes del regulón Ntr es controlada por un factor sigma alternativo (σ^{54}) y por el activador transcripcional NtrC; cuando los niveles de amonio son bajos, la actividad cinasa del sensor NtrB es activada, guiando a la fosforilación y activación de NtrC, el cual activa la transcripción del regulón Ntr mediada por la RNA polimerasa holoenzima conteniendo el factor σ^{54} ¹⁵.

La regulación por fosfato en la biosíntesis de antibióticos ha sido observada en diversos microorganismos, Tanaka *et al.* reportaron un incremento en la producción de leucomicina por *S. Kitasatoensis* en presencia de fosfato de magnesio, el cual disminuyó en efecto inhibitorio por amonio que también se presentó; sin embargo, la adición por separado de sales de magnesio y fosfato tienen un efecto inhibitorio sobre la producción de leucomicina. Así mismo, se ha reportado un efecto inhibitorio del fosfato en las producciones de tilosina y estreptomina. En *S. coeruleorubidus*, se ha demostrado que

la producción de daunorubicina (una antraciclina comercial) es inhibida por fosfato. El papel del fosfato en la represión de la biosíntesis de antraciclinas se ha observado en estudios con fermentadores de 10 L, encontrándose que niveles de fosfato inorgánico mayores a 10 mg/L tienen un efecto inhibitorio sobre la producción de antraciclinas en *S. peucetius*, en donde el fosfato podría estar regulando el cambio de trofofase a idiofase en esta bacteria, aunque el mecanismo de regulación no se ha determinado ⁸.

APLICACION CLINICA

La daunorubicina (DAU), primer antibiótico de la familia de las antraciclinas que resultó efectivo clínicamente, fue aislado en 1963 a partir de *Streptomyces coeruleorubidus* y utilizada primeramente para el tratamiento de la leucemia aguda. La doxorubicina (DOX) se obtuvo como un intento de mejorar a DAU, por mutación de *S. peucetius*. DAU y DOX manifiestan una toxicidad cardiaca acumulativa, dependiente de la dosis e irreversible; en consecuencia se han intentado aislar o producir semisintéticamente muchas otras antraciclinas con el fin de obtener un agente eficaz con cardiotoxicidad reducida ³.

A pesar de su citotoxicidad, DOX es utilizada ampliamente (sola o en combinación con DAU) como droga anticancerígena en el tratamiento de diversos tumores tales como linfomas malignos, sarcomas, tumores sólidos pediátricos, tumores testiculares, carcinoma hepático y leucemias ³⁶.

Además de su actividad antitumoral, la capacidad de DOX para detener el proceso infeccioso del VIH "in vitro" mediante la inhibición de la enzima transcriptasa reversa ha aumentado el interés en estos compuestos microbianos ²⁰.

MECANISMO DE ACCION

Dentro de el grupo de las antraciclinas; doxorubicina, daunorubicina (también conocidas como adriamicina y daunomicina, respectivamente), carminomicina, aklavina y aclacinomicina A, son extensivamente usadas como agentes quimioterapéuticos, aunque son potencialmente cardiotoxícos y presentan otros efectos no deseables como la inducción de resistencia ⁷.

Su potente actividad antineoplásica se realiza mediante intercalamiento en el ADN rompiendo cadenas dobles y sencillas al reaccionar con los residuos de guanina, provocando una distorsión del anillo heterocíclico, impidiendo la unión entre nucleótidos adyacentes y bloqueando tanto su replicación como su transcripción a ARN. El mismo efecto es observado en ARN, ADN superenrollado y nucleosomas ³².

Ha sido reportado un efecto a nivel de membrana, del cual no se conoce su mecanismo de acción, aunque se ha observado que algunas alteraciones de la membrana están relacionadas con el desarrollo de resistencia al antibiótico por parte de la bacteria, hecho que frecuentemente caracteriza a las cepas sobreproductoras de antraciclinas^{3 y 4}.

IMPORTANCIA ECONOMICA

La quimioterapia contra el cáncer ha sido dirigida hacia el descubrimiento de agentes citotóxicos capaces de inhibir la división de las células de mamíferos. Los agentes derivados de fermentaciones representan del 30 al 45% de las drogas antitumorales más comunes³⁷.

Aunque se tiene el conocimiento de los métodos para la biosíntesis de antraciclinas, ninguno de los procesos ha logrado competir con los costos básicos de la producción fermentativa, por lo que el precio en el mercado de las antraciclinas utilizadas clínicamente es muy elevado¹⁸; a pesar de esto, DOX ha encabezado la venta de todos los agentes anticancerígenos en E.U.A. durante varios años³⁶.

Se estima que el mercado mundial de anticancerígenos alcanzará a finales de siglo los 27 mil millones de dolares³⁷.

EL NITROGENO EN LOS ACTINOMICETOS

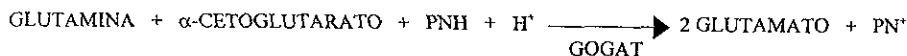
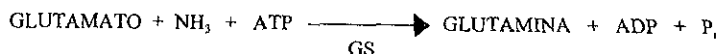
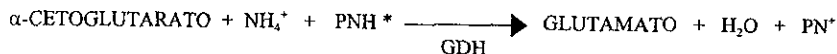
ASIMILACION DE NITROGENO

Los microorganismos silvestres, en su mayoría, tienen dos vías para asimilar amonio. La ruta asimilatoria con baja afinidad por el amonio es usualmente representada por la glutamato deshidrogenasa (GDH; EC 1.4.1.2), la cual cataliza la aminación reductiva del α -cetoglutarato a glutamina. Se pueden distinguir dos tipos de GDH en virtud de sus requerimientos coenzimáticos: la GDH dependiente de NADP⁺ que se piensa está involucrada en la asimilación de amonio, mientras que la GDH dependiente de NAD⁺ se cree que tiene una función predominantemente catabólica. La GDH dependiente de NADP⁺ tiende a ser inducida/desreprimida por amonio extracelular, en tanto que los niveles de la GDH dependiente de NAD⁺ no son afectados frecuentemente por amonio en los caldos de cultivo^{28 y 30}.

Cuando la concentración de amonio extracelular es de 0.1 a 1 mM, muchos microorganismos recurren a su sistema de asimilación de alta afinidad por el amonio, el cual está constituido por la glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.1.2) trabajando conjuntamente con la glutamato sintasa (glutamina: 2-oxoglutarato aminotransferasa;

GOGAT, EC 1.4.1.13). La GS cataliza la amidación endergónica del glutamato a glutamina, mientras que la GOGAT cataliza la transaminación reductiva del α -cetoglutarato por glutamina para producir dos moléculas de glutamato (Fig. 2)³⁰.

FIGURA 2. Reacciones químicas catalizadas por GDH, GS y GOGAT.

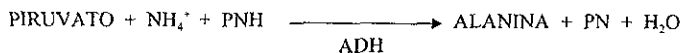


* PNH, nucleótido de piridina reducido; PN^{*}, nucleótido de piridina oxidado

FUENTE: (30).

La amplia distribución de GS en Actinomycetos está bien establecida. Gräfe et al. midieron las actividades de GS en 14 cepas de *Streptomyces* cultivadas con varias fuentes de nitrógeno, concluyendo que la enzima fué reprimida por amonio e inducida/desreprimida por aminoácidos³⁰, tal como sucede con *S. clavuligerus* en donde la asimilación de amonio se lleva a cabo vía GS/GOGAT⁵. Este parece ser el caso de la mayoría de los procariotas Gram positivos formadores de esporas³⁰.

Se piensa que la alanina deshidrogenasa (ADH), que cataliza la aminación reductiva del piruvato a alanina, tiene una función como ruta de asimilación para el amonio. Itoh y Morikawa detectaron actividad de ADH en 39 cepas de *Streptomyces*. En *S. erythraeus* ha sido postulado que la ADH tiene una función catabólica más que anabólica³⁰.



REGULACION DE LA ANTIBIOGENESIS POR NITROGENO

Ha sido reconocido que la asimilación y el metabolismo del nitrógeno afectan la transición de metabolismo primario (trofofase) a secundario (idiofase); y por ende, la producción de metabolitos secundarios. Dicho cambio se puede lograr mediante la manipulación de principios nutricionales como la fuente de nitrógeno ³⁰.

Las sales de amonio son la principal fuente de nitrógeno que interfiere con la producción de antibióticos. El efecto no se limita a un tipo de antibiótico, sino a una gran variedad de éstos, incluyendo los que no contienen nitrógeno en sus moléculas (tabla 2) ²⁸.

TABLA 2. Antibióticos producidos por actinomicetos afectados en su biosíntesis por sales de amonio.

| ANTIBIÓTICO | MICROORGANISMO |
|-------------------|-------------------------------|
| Antraciclinas | <i>Streptomyces peucetius</i> |
| Cefamicina C | <i>S. cattleya</i> |
| | <i>S. clavuligerus</i> |
| | <i>S. lactamdurans</i> |
| Cloranfenicol | <i>S. venezuelae</i> |
| Ácido clavulánico | <i>S. clavuligerus</i> |
| Entromicina | <i>S. erythreus</i> |
| Gilvocarcina V | <i>S. arenae</i> |
| Leucomicina | <i>S. kitasatoensis</i> |
| Lincomicina | <i>S. lincolnensis</i> |
| Nanaomicina | <i>S. rosa</i> |
| Nourseotricina | <i>S. noursei</i> |
| Novobiocina | <i>S. niveus</i> |
| Rifamicina | <i>Nocardia mediterranei</i> |
| Espiramicina | <i>S. ambofaciens</i> |
| Tilosina | <i>S. fradiae</i> |

FUENTE: (28).

Diversos estudios han mostrado que la represión por amonio de las enzimas involucradas en la biosíntesis de antibióticos es un hecho común ²⁸. Dicha represión originada por amonio o sus productos de asimilación puede reprimir la síntesis de algunas enzimas de vías catabólicas nitrogenadas, este efecto ha sido denominado represión por amonio y controla el catabolismo de purinas, arginina, histidina, transporte de urea y la síntesis de proteasas extracelulares y nitrógeno reductasa. El fenómeno de represión catabólica por nitrógeno ha sido demostrado en bacterias entéricas como *Escherichia coli* y *Klebsiella aerogenes* y en levaduras y otros hongos. En *Bacillus* y otras bacterias

Es importante mencionar que el grupo de trabajo del Dr. Sergio Sánchez Esquivel determinó que una concentración de K_2HPO_4 mayor a 0.3 g/L inhibe la producción de antraciclinas en *S. peuceitius* var. *caesius*. Adicionalmente, el equipo de trabajo estudió la concentración de glucosa en el medio de cultivo, observando que una concentración de 18 g/L descartaba un efecto negativo del carbohidrato sobre la producción de antraciclinas ²⁹.

Así mismo, el grupo de trabajo hizo observaciones referentes a un efecto negativo por levadura de cerveza (fuente de nitrógeno en el medio de producción) sobre la síntesis de antraciclinas en *S. peuceitius* var. *caesius* ⁶, y corroboró este efecto del nitrógeno en medio químicamente definido usando por separado tres sales de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio y sulfato de amonio, encontrándose que todas afectan negativamente la producción de antraciclinas, pero el sulfato de amonio fue el que favoreció un mejor crecimiento de la bacteria, por lo que se utilizó dicha sal durante esta investigación.

Considerando lo anterior se establecieron los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

GENERAL.

Determinar el efecto del amonio sobre la biosíntesis de antraciclinas en *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

PARTICULARES.

1. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de amonio sobre la producción de antraciclinas.
2. Caracterización fisiológica del efecto producido.
 - 2.1. Determinar si el efecto es una represión sobre la síntesis de proteínas.
 - 2.2. Establecer si el fenómeno es una inhibición de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de antraciclinas.
3. Determinar si el amonio *per se* es el efector del proceso o un producto de su asimilación.

CONDICIONES DE CULTIVO

MATERIAL BIOLÓGICO

La cepa empleada fue *Streptomyces peucetius* var. *caesius* NRRL B-5337, obtenida de la colección de cultivos del servicio para la investigación agrícola, departamento de agricultura de los Estados Unidos de América, Peoria, IL., E. U. A.

OBTENCIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE ESPORAS

Se sembraron 7 cajas de petri con medio de esporulación esterilizado en una autoclave a una presión de 15 lb/pulg² durante 15 min, éstas fueron incubadas a una temperatura de 29 °C durante 7 días.

MEDIO DE ESPORULACIÓN

| | |
|-------------------------------|-------|
| *Sacarosa..... | 2.0 % |
| Glucosa..... | 1.0 % |
| Almidón..... | 2.0 % |
| Extracto de levadura..... | 0.5 % |
| **Hidrolizado de caseína..... | 0.5 % |
| Carbonato de calcio..... | 0.1 % |
| Agar..... | 1.5 % |

*Se esterilizó por separado y fue agregada al medio antes de realizar el vaciado en las cajas petri

**Caseína hidrolizada de páncreas exenta de antagonistas de sulfamidas para microbiología.

Nota. no se ajustó el pH.

FUENTE: (1).

Las esporas se obtuvieron raspando con un asa bacteriológica el micelio aéreo de color blanco desarrollado sobre la superficie del medio, posteriormente se suspendieron en agua destilada esterilizada, la solución fue filtrada con algodón dos veces y por último se mezcló con una solución de glicerol al 20 % para ser almacenada a una temperatura de -20 °C para su conservación.

MEDIO DE CONSERVACION DE LA CERA

Glicerol..... 20 mL
Solución salina isotónica..... 80 mL

El medio fue esterilizado en una autoclave a una presión de 15 lb/pulg² durante 15 min.

FUENTE: (29):

OBTENCION DE LA SUSPENSION MICELIAL

Se inoculó 1 mL de solución stock de esporas en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio líquido YMG, éstos se incubaron a 29 °C y en agitación a 190 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 días.

MEDIO YMG

Extracto de levadura 0.4 %
Extracto de malta..... 1.0 %
Glucosa..... 0.4 %
Agua destilada..... 100 mL

El pH del medio se ajustó a un valor de 7.25 con hidróxido de sodio antes de ser esterilizado bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

FUENTE: (1):

El micelio obtenido fue lavado tres veces con solución salina isotónica, concentrado y suspendido en una solución de glicerol al 20% que se almacenó a una temperatura de -20 °C; verificando su viabilidad cada tres meses.

CONDICIONES DE PRECRECIMIENTO Y CRECIMIENTO DEL INOCULO

Para el precrecimiento se sembró 1 mL de la solución stock micelial en dos matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio líquido YMG y ocho perlas de plástico de 5 mm de diámetro, que fueron incubados a 29 °C y en agitación a 190 rpm durante 36 horas.

Para la preparación del inóculo, se tomo de este precrecido para sembrar matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio líquido YMG y ocho perlas de

plástico de 5 mm de diámetro, éstos se incubaron bajo las condiciones de temperatura y agitación antes mencionadas, pero durante 48 horas. Se consideró un matraz de este inóculo para sembrar cinco matraces con medio mínimo para producción.

CONDICIONES DE PRODUCCION DE ANTRACICLINAS

Se usó 1 mL del inóculo (el cual fue lavado tres veces con solución salina isotónica antes de ser utilizado) para sembrar matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio mínimo (químicamente definido) descrito por Arcamone ¹, pero modificado en la concentración de glucosa y en la de fosfato de potasio dibásico que originalmente son de 60 g/L y 0.5 g/L, respectivamente ²⁹; ya que ambas sustancias disminuyen la producción de antraciclinas cuando su concentración es alta en el medio de cultivo ⁸. La fermentación se realizó a una temperatura de 29 °C y una agitación de 190 rpm durante 120 horas. De este medio se tomaron dos mililitros de muestra cada 24 horas para análisis.

MEDIO MINIMO (MODIFICADO)

| | |
|--------------------------------|---------|
| *Glucosa..... | 18.0 g |
| **Cloruro de amonio..... | 2.2 g |
| Cloruro de sodio..... | 5.0 g |
| Fosfato de potasio dibásico .. | 0.3 g |
| Sulfato de magnesio..... | 0.5 g |
| Sulfato ferroso..... | 0.02 g |
| Sulfato de zinc..... | 0.05 g |
| Cloruro de manganeso..... | 0.001 g |
| Cloruro de cobalto..... | 0.001 g |
| Carbonato de calcio..... | 3.0 g |
| Agua destilada..... | 1000 mL |

El pH del medio se ajustó a un valor de 7.25 con hidróxido de sodio antes de la esterilización a una presión de 15 lb/pulg² durante 15 min, después del autoclaveado el pH fue de 6.78.

*Se esterilizó separadamente y se añadió al medio antes de efectuar la inoculación de cada matraz.

**Equivale a una concentración de 16.6 mM, la sal utilizada fue sulfato de amonio considerando la presencia de dos moles de amonio en la molécula, durante el trabajo se manejaron concentraciones en un rango de 5 a 200 mM de sulfato de amonio, equivalente a 10 y 400 mM del ión amonio, respectivamente.

FUENTE: (29).

METODOS ANALITICOS

DETERMINACION DEL CRECIMIENTO

Las muestras obtenidas fueron centrifugadas durante 10 min. a 5000 rpm para separar el micelio y el medio de cultivo. Posteriormente la biomasa se suspendió en un mililitro de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, agitándose durante 10 s aproximadamente para ser mantenida a una temperatura de -20 °C durante 12 horas como mínimo. Al término del tiempo la muestra fue centrifugada bajo las condiciones antes mencionadas para separar el TCA y el micelio. Este último se resuspendió en un mililitro de hidróxido de sodio 0.4 M, se agitó durante 10 s aproximadamente y se tomaron alícuotas de 100 µL que se llevaron a un mililitro con agua destilada para la determinación de la proteína por el método de Lowry ¹⁷, utilizando como patrón una solución de albúmina sérica bovina; las muestras se leyeron a una longitud de onda de 595 nm.

CUANTIFICACION DE ANTRACICLINAS

Cada muestra se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min., se separó el sobrenadante y la biomasa, a ésta última se le realizó la extracción de antraciclinas añadiendo un mililitro de solución 4:1 de acetona-ácido sulfúrico 0.1 N; inmediatamente después se agitó durante 20 s aprox. y fue centrifugado bajo las condiciones mencionadas anteriormente, el sobrenadante (extracto) obtenido fue separado y acumulado, mientras que a la biomasa se le agregó nuevamente un mililitro de solución 4:1 de acetona-ácido sulfúrico 0.1 N para repetir el procedimiento hasta que el extracto obtenido no presentó coloración rojiza alguna. Al término de las extracciones, las antraciclinas fueron cuantificadas espectrofotométricamente registrando la absorbancia a una longitud de onda de 495 nm; en caso de que la lectura fuese mayor de 1.0 se realizaron diluciones hasta obtener lecturas menores. El cálculo final de la concentración de antraciclinas se llevó a cabo con la siguiente fórmula:

$$D.O. \times 45.4545 \times D \times V = \text{ANTRACICLINAS } (\mu\text{g/mL})$$

En donde, D.O. es la densidad óptica registrada como absorbancia, 45.4545 es el factor de conversión calculado a partir de la Ley de Lambert y Beer, D es la dilución realizada al extracto en caso de que su lectura fuese mayor de uno y V es el volumen final del extracto en mL ²⁹.

Cabe mencionar que en el sobrenadante no se cuantificaron antraciclinas debido a su baja concentración en el caldo de cultivo.

CUANTIFICACION DE AMONIO

La cuantificación del amonio en el sobrenadante de las muestras se llevó a cabo mediante el método de Neatherburn²⁰, utilizando una curva patrón de sulfato de amonio (0.5, 1, 2, 3 y 4 mM).

CUANTIFICACION DE GLUCOSA

Se realizó utilizando en método colorimétrico enzimático de la glucosa oxidasa GOD-PAD marca Erlick para la determinación cuantitativa de glucosa en suero o plasma, utilizandose un patrón de glucosa de 100 mg/dl.

DETERMINACION DE pH

Para su cuantificación en el sobrenadante de las muestras se usó un potenciómetro Beckman modelo 3500. Antes de cada determinación, se ajustó el aparato con dos amortiguadores de pH conocido (4.02 y 8.0).

ELIMINACION DE DESECHOS

Al final de la toma de muestras, se añadió a los matraces 5 mL de solución saturada de hidróxido de sodio para elevar el pH y originar la descomposición de antraciclinas, siendo esterilizados bajo las condiciones antes mencionadas y finalmente desechadas por el drenaje.

Después de la cuantificación de antraciclinas, tanto al micelio como a los extractos se les añadió dos mililitros de una solución saturada de hidróxido de sodio. Posterior a su análisis, el sobrenadante fue tratado de igual manera, pero con la adición de solo un mililitro de una solución saturada de hidróxido de sodio para descomponer las escasas antraciclinas que logra secretar el microorganismo. Esto se realizó para poder desechar las antraciclinas por el drenaje minimizando los riesgos de toxicidad al ambiente.

Cabe mencionar que el manejo de estos compuestos tóxicos debe hacerse con bata, guantes de latex y anteojos de protección (si hay peligro de que salpiquen hacia el rostro); para reducir la posibilidad del contacto con la piel.

DISEÑO EXPERIMENTAL

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AMONIO SOBRE LA PRODUCCION DE ANTRACICLINAS

Este primer experimento se realizó para conocer el efecto de diferentes concentraciones de sulfato de amonio sobre la producción de antraciclina. Se usaron concentraciones de 5, 10, 20, 40, 50, 75 y 150 mM de sulfato de amonio, equivalentes a 10, 20, 40, 80, 100, 150, 200 y 300 mM de amonio. Cada fermentación se realizó por triplicado y tuvieron una duración de 120 horas, la toma de muestra se llevó a cabo cada 24 h.

EFFECTO DE UNA ALTA CONCENTRACION DE AMONIO A DISTINTOS TIEMPOS DE LA FERMENTACION SOBRE LA PRODUCCION DE ANTRACICLINAS

Este experimento se realizó con el propósito de averiguar si el efecto negativo del amonio en la producción de antraciclina se debía a una inhibición directa o indirecta sobre las enzimas involucradas en su biosíntesis, una represión de la síntesis de dichas enzimas o a un efecto combinado inhibición-represión. Se realizaron seis fermentaciones, la primera inició con una concentración de amonio 20 mM como control positivo, la segunda con 400 mM (control negativo) y las cuatro restantes comenzaron con una concentración de 20 mM y posteriormente se realizó una adición única de 3 mL de solución de sulfato de amonio para obtener en cada caso una concentración de 400 mM de amonio a las 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente; suspendiendo las fermentaciones a las 120 horas. Cada tratamiento se realizó por triplicado y las fermentaciones tuvieron una duración de 120 horas, la toma de muestra se llevó a cabo cada 24 h.

EFFECTO DEL CLORAMFENICOL, CERULENINA, UNA ALTA CONCENTRACION DE AMONIO Y METILAMINA SOBRE LA PRODUCCION DE ANTRACICLINAS A LAS 72 HORAS DE LA FERMENTACION

Para confirmar un fenómeno inhibitorio y establecer si el amonio *per se* es el efector y no un producto de su metabolismo, se realizaron fermentaciones para agregar a las 72 h al medio alguna de las siguientes sustancias, sola o en combinación: una represora de la síntesis de proteínas, el cloranfenicol; una inhibidora de la enzima PKS, la

cerulenina²⁰; una alta concentración de amonio y una sustancia análoga del amonio capaz de ser asimilada y no metabolizable, la metilamina²³. Los tratamientos se diseñaron de la siguiente forma; el primero fue una fermentación sin ninguna adición (control positivo), al segundo se le añadió cloranfenicol (50 µg/L), al tercero cerulenina (25 µg/L), al cuarto cloranfenicol y cerulenina, al quinto una alta concentración de amonio (400 mM), al sexto amonio y cloranfenicol, al séptimo metilamina 400 mM y al octavo metilamina y cloranfenicol. Todas las condiciones fueron por triplicado y las fermentaciones tuvieron una duración de 120 horas, la toma de muestra se llevó a cabo cada 24 h.

PRODUCCION DE ANTRACICLINAS EN UN SISTEMA DE CELULAS EN REPOSO (RESTING CELL SYSTEM)

Para establecer si el efecto negativo por amonio era una inhibición y descartar a la represión como la causante del efecto estudiado, se realizó una fermentación por triplicado para cada condición, que fue detenida a las 72 horas; el micelio obtenido se lavó tres veces con solución salina isotónica para formar el inóculo de un sistema de células en reposo (SCR) carente de fuentes de carbono y nitrógeno, así como de carbonato de calcio en relación al medio mínimo. El amortiguamiento del pH fue con fosfato dibásico de potasio que es parte de la formulación del medio mínimo. Los tratamientos fueron conformados de la siguiente manera; el primero consistió en una fermentación sin ninguna adición (control), al segundo se le añadió cloranfenicol (50 µg/mL), al tercero cerulenina (25 µg/mL), al cuarto cloranfenicol y cerulenina mezcladas, al quinto amonio 400 mM, al sexto amonio y cloranfenicol, al séptimo metilamina 400 mM y al octavo metilamina y cloranfenicol. Todas los SCR duraron 30 horas.

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AMONIO SOBRE LA PRODUCCION DE ANTRACICLINAS

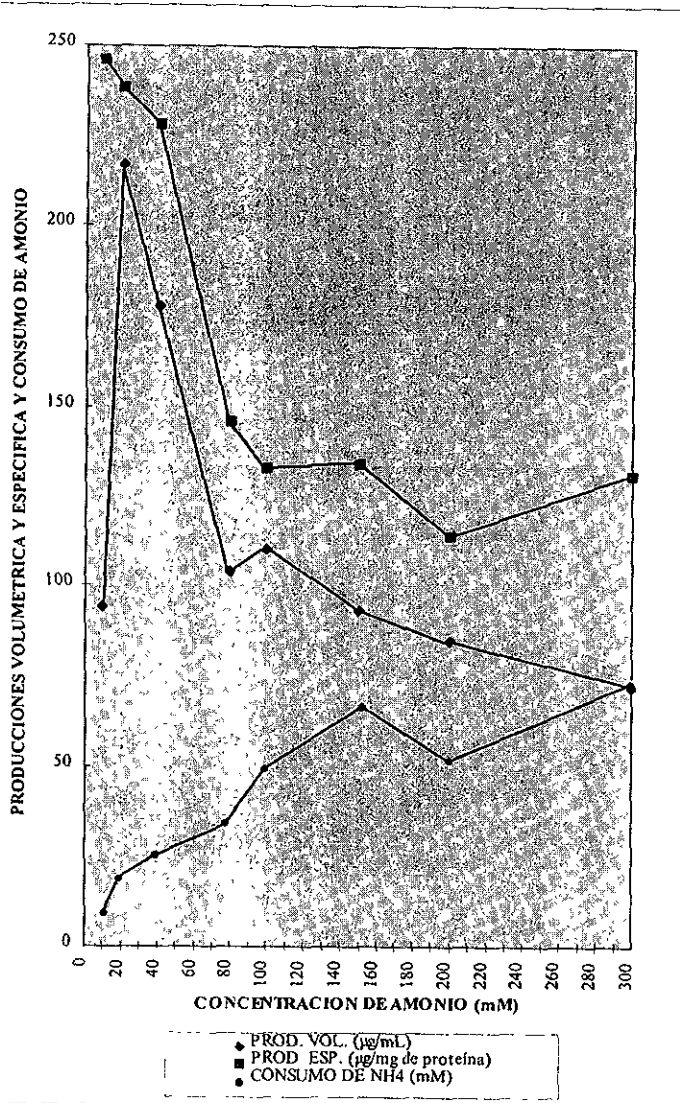
Los resultados revelaron que las concentraciones mayores a 20 mM de amonio presente en el medio de cultivo resultan en un consumo de amonio cada vez mayor, provocando la disminución de las producciones volumétrica y específica de antraciclina (gráfica 1A). Este efecto negativo sobre la producción tanto volumétrica como específica es notable después del consumo de 26 mM de amonio por el microorganismo, dicha concentración parece ser suficiente para disminuir la producción de antraciclina, el origen de tal efecto podría darse a nivel de metabolismo primario en las rutas de degradación oxidativa de aminoácidos que producen y/o tienen como intermediarios ácidos grasos de bajo peso molecular que son precursores de la biosíntesis de antraciclina (acetil-CoA y propionil-CoA); esta posible explicación ha sido comprobada en un antibiótico que también usa ácidos grasos de bajo peso molecular como precursores, se trata del macrólido tilosina producido por *Streptomyces fradiae*; la inhibición en la producción de tilosina involucra un mecanismo que interfiere con el metabolismo de la valina^{23, 24, 25 y 33}, la cual puede metabolizarse a acetil-CoA y propionil-CoA (ambos son precursores de antraciclina) y dado que la tilosina no contiene nitrógeno en su molécula pero es regulada por éste, es muy posible que este mecanismo regulado por amonio (nitrógeno) este generalizado en los *Streptomyces* para regular la producción de ácidos grasos de bajo peso molecular a nivel del metabolismo de aminoácidos.

El crecimiento no mostró diferencias importantes en las distintas condiciones, aunque aquella con 10 mM de amonio fue insuficiente para el crecimiento del microorganismo, por lo que se descartó para los siguientes experimentos (gráfica 1B).

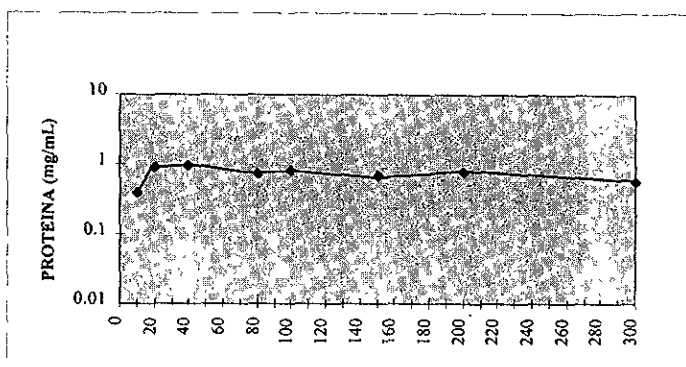
El pH en los diferentes tratamientos no tuvo variaciones significativas en relación al pH inicial del medio de cultivo (6.8), cabe mencionar que la condición con 20 mM de amonio, en donde la bacteria consumió 19 mM del ión, presentó un ligero cambio hacia la alcalinidad, típico de los cultivos sumergidos sobreproductores de antraciclina (gráfica 1C).

La utilización de glucosa en los distintos tratamientos fue similar, consumiéndose prácticamente la totalidad de la misma (excepto la condición con 10 mM de amonio), lo que descartó algún posible efecto por la incorporación de la fuente de carbono en el fenómeno estudiado (gráfica 2).

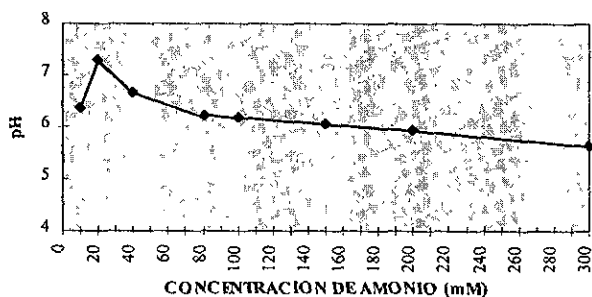
1A



1 B



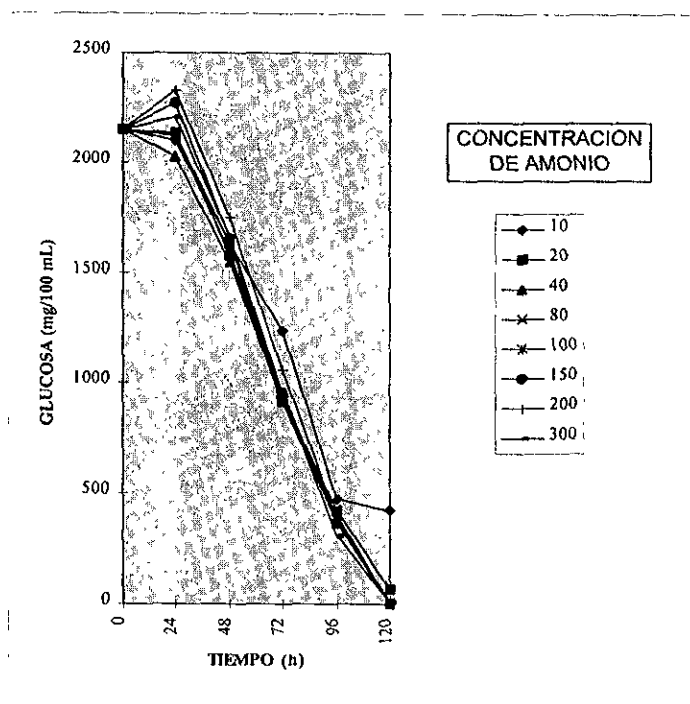
1 C



Gráfica 1. Efecto de la concentración de amonio al inicio de la fermentación sobre las producciones volumétrica y específica, consumo de amonio (1A), crecimiento (1B) y pH (1C). En el anexo 1 se muestra el análisis de varianza y las desviaciones estándar de las producciones volumétricas.

Dada la similitud en el consumo de glucosa de los distintos tratamientos, es de pensarse que la concentración de glucosa utilizada no tiene efecto sobre la biosíntesis de antraciclinas, pero cabe la posibilidad de que exista un efecto negativo en todos los tratamientos, tal efecto se refiere a la acumulación de antraciclinas que no contienen la aminoazúcar (*ε*-rodomicinona y sus intermediarios), ya que el grupo de trabajo ha observado en cromatografía de capa fina, un alto porcentaje de estas antraciclinas y uno

bajo de las antraciclinas con el aminoazúcar que son de interés clínico y comercial (daunorubicina y doxorubicina); dicho efecto podría explicarse mediante un mecanismo de regulación que podría estar ampliamente distribuido entre los *Streptomyces*, tal mecanismo involucraría la inactivación de la glutamino sintetasa (GS) por amonio, que ha sido observado en *S. cattleya*³⁶ y *S. clavuligerus*⁵; esta inactivación de GS se da como resultado de la unión covalente de 12 moléculas de ácido adenílico a cada una de las 12 subunidades de la enzima, dando una forma adenilada e inactiva de GS²⁷. La inhibición de GS y por consiguiente la disminución de la concentración intracelular de glutamina podría repercutir en la transferencia de grupos amino a diversos compuestos tales como la glucosa-6-fosfato para formar glucosamina-6-fosfato¹⁵, un aminoazúcar necesario para la biosíntesis de antraciclinas de interés comercial. Además, este último compuesto inhibe a la GS, representando un control adicional para la formación de tales aminoazúcares, afectando la antraciclínogénesis en las etapas finales. Si esto fuera acertado, la GS de *S. peucetius* var. *caesius* estaría inhibida por concentraciones de amonio arriba de 26 mM y sería muy sensible al modulador negativo glucosamina-6-fosfato.



Gráfica 2. Cinéticas del consumo de glucosa en los distintos tratamientos.

EFFECTO DE UNA ALTA CONCENTRACION DE AMONIO A DISTINTOS TIEMPOS DE LA FERMENTACION SOBRE LA PRODUCCION DE ANTRACICLINAS

En la gráfica 3 se muestra la producción volumétrica de antraciclina, el control positivo logró una producción volumétrica de 92 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el control negativo (adición a las 0 h) y los tratamientos con adición a las 24, 48 y 72 h produjeron siete veces menos; respecto al tratamiento con adición a las 96 h, se observó casi un paro total en la biosíntesis de antraciclina después de la adición del amonio.

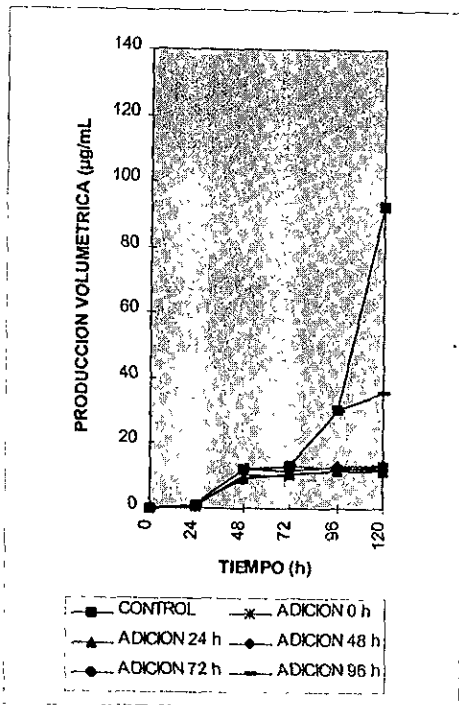
Las fermentaciones con adiciones mostraron una brusca interrupción de la producción de antraciclina en el momento de la adición del exceso de amonio, sugiriendo una inhibición de las enzimas involucradas en la biosíntesis o en el abastecimiento de precursores. Respecto a la producción específica (gráfica 4), se observa el mismo patrón inhibitorio; los incrementos de la producción en el periodo de las 24 a las 72 h en todos los tratamientos fueron debidos al crecimiento exponencial del microorganismo.

Mientras más pronto se añadió el exceso de amonio al medio de cultivo, la producción resultó menor (tal como sucede con la producción de tilosina en *S. fradiae*²⁴), siendo el control negativo el que logró los más bajos índices de producción de antraciclina y el mayor consumo de amonio (35.3 mM). La producción de antraciclina muestra nuevamente una relación inversa entre la biosíntesis de antraciclina y el aumento del consumo de amonio.

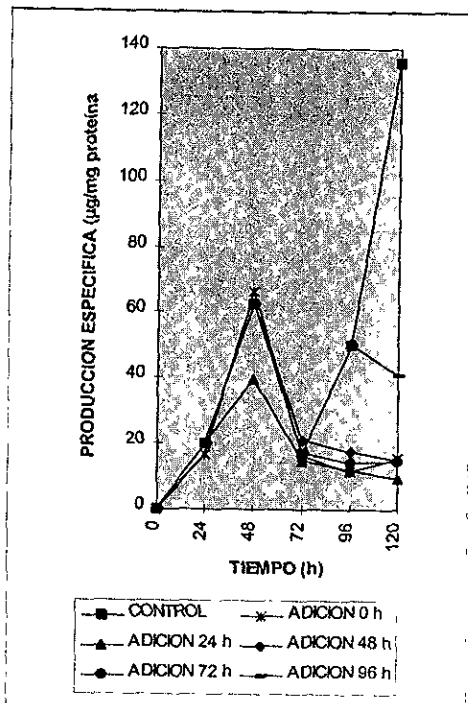
Durante la idiofase (a partir de las 72 h), las cinéticas de las producciones volumétrica y específica muestran el paro total de la biosíntesis de antraciclina cuando se añadió al medio de cultivo el exceso de amonio a los tiempos 0 (control negativo), 24, 48, 72 y 96 horas de la fermentación (gráficas 3 y 4).

La disminución en la producción de antraciclina que se presentó en este experimento con relación al anterior, no es importante para los objetivos que se persiguen y es difícil de controlar, ya que los *Streptomyces* tiene factores de autoregulación del metabolismo secundario y la morfogénesis, los cuales actúan a concentraciones muy bajas, como las hormonas en eucariontes; el principal de estos factores es el llamado factor-A, que ha sido observado en cepas de *S. griseus* productoras de estreptomina y antraciclina, en donde dicho factor restituye la producción y la esporulación de mutantes bloqueadas, lo cual indica que este factor es un regulador positivo para la producción de metabolitos secundarios y su actividad es pleiotrópica. Además, se ha observado que diferentes cepas pertenecientes a la misma especie muestran diferente producción del

factor-A ¹³, lo cual implica que la sincronización de las cepas respecto a este factor es complicada.

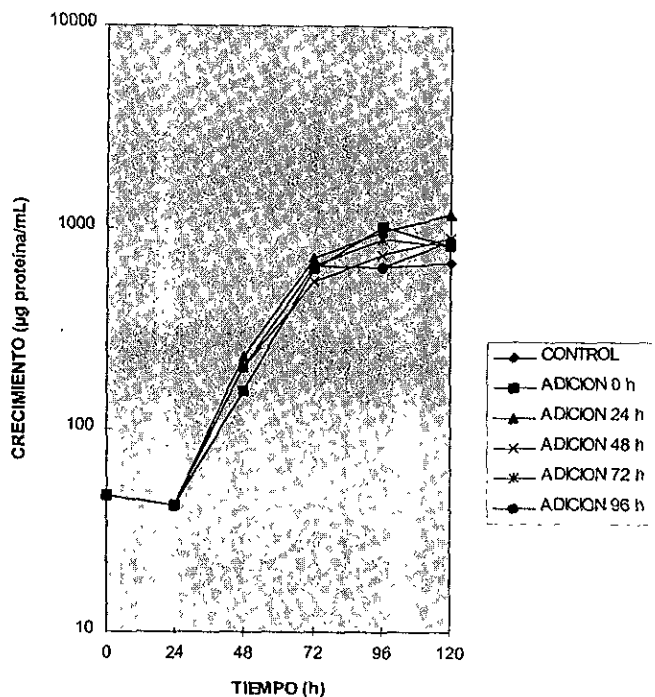


Gráfica 3. Producción volumétrica al adicionar 400 mM de amonio a distintos tiempos de la fermentación. En el anexo 1 se muestra el análisis de varianza y las desviaciones estándar.



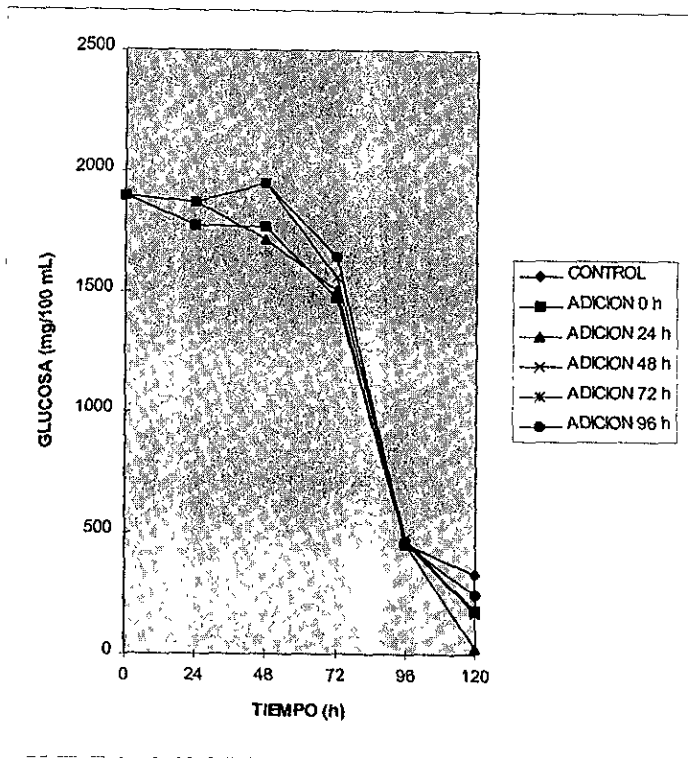
Gráfica 4. Producción específica al adicionar 400 mM de amonio a distintos tiempos de la fermentación.

El crecimiento mostró una cinética similar en todos los casos, llegando a valores superiores de los 1100 µg/mL de proteína (gráfica 5). Los tratamientos con adiciones tuvieron los niveles más altos de crecimiento hasta las 120 horas.



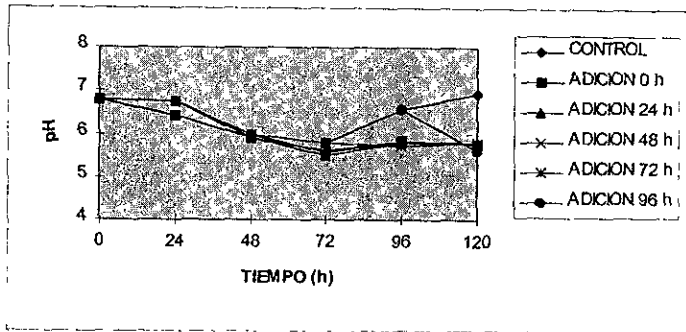
Gráfica 5. Cinéticas de crecimiento del control sin adición y los tratamientos con adiciones de amonio (400 mM) a diferentes tiempos de la fermentación.

La gráfica 6 muestra la cinética del consumo de glucosa, observándose que en todas las fermentaciones hay la misma tendencia, mientras que la producción de antraciclinas en los distintos tratamientos fue diferente, ésto confirma que la glucosa no es la causante del efecto negativo sobre la producción de antraciclinas. Aunque los resultados obtenidos en las producciones indican un posible efecto de tipo inhibitorio, podría darse también una represión, si es así y no es ejercida por glucosa, entonces podría tratarse de una represión por nitrógeno, siendo un posible blanco el regulón *Ntr*¹⁵, y por lo tanto, el responsable del paro total en la producción de antraciclinas observado después del shock por amonio a diferentes tiempos de la fermentación. Esto implicaría que la vida media de las enzimas involucradas en la producción de antraciclinas es muy corta y/o que simultáneamente se realiza una inhibición.



Gráfica 6. Cinética del consumo de glucosa de los diferentes tratamientos con adiciones de amonio (400 mM) a diferentes tiempos de la fermentación.

En relación al pH (gráfica 7), el control mostró el patrón de alcalinización al final de la fermentación, lo que es típico de los cultivos sumergidos con altas producciones de antraciclinas; los tratamientos con adiciones a las 0, 24, 48 y 72 h no presentaron tal recuperación del pH; la condición con adición a las 96 h tuvo una variación del pH al momento de la adición como resultado de la acidez propia del ión amonio ¹⁹, hasta ubicarse al mismo nivel de los distintos tratamientos con adiciones.



Gráfica 7. pH de los distintos tratamientos al añadir sulfato de amonio 200 mM (400 mM de amonio) a diferentes tiempos de la fermentación.

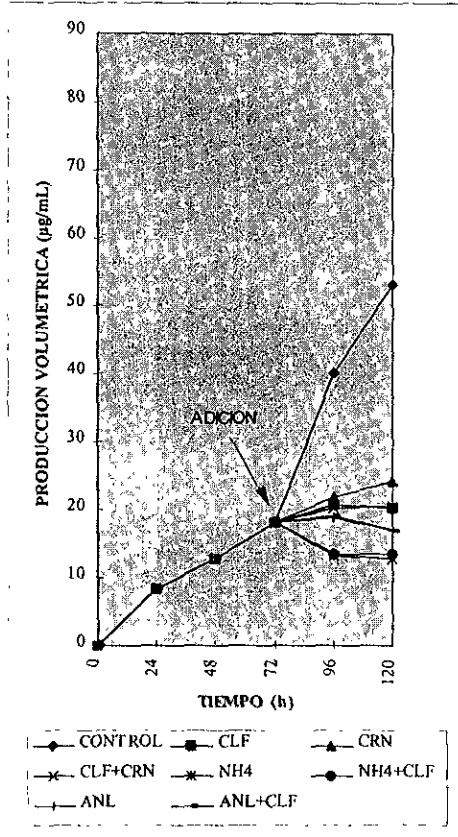
EFFECTO DEL CLORANFENICOL, CERULENINA, UNA ALTA CONCENTRACION DE AMONIO Y METILAMINA SOBRE LA PRODUCCION DE ANTRACICLINAS A LAS 72 HORAS DE LA FERMENTACION

Respecto a la caracterización del efecto, puede observarse en las gráficas 8 y 9 que las producciones volumétricas obtenidas con cloranfenicol, el amonio y el análogo son similares, ésto supondría que el efecto estudiado es una represión; pero la producción específica indicó una notable diferencia entre la cinética del cloranfenicol y las de los tratamientos con amonio y el análogo que sugieren inhibiciones, ya que se detiene completamente la biosíntesis de antraciclina e inclusive hay un decremento de los niveles debido posiblemente a la descomposición y/o secreción del idiolito; adicionalmente, este hecho muestra al amonio *per se* como el verdadero efector del fenómeno.

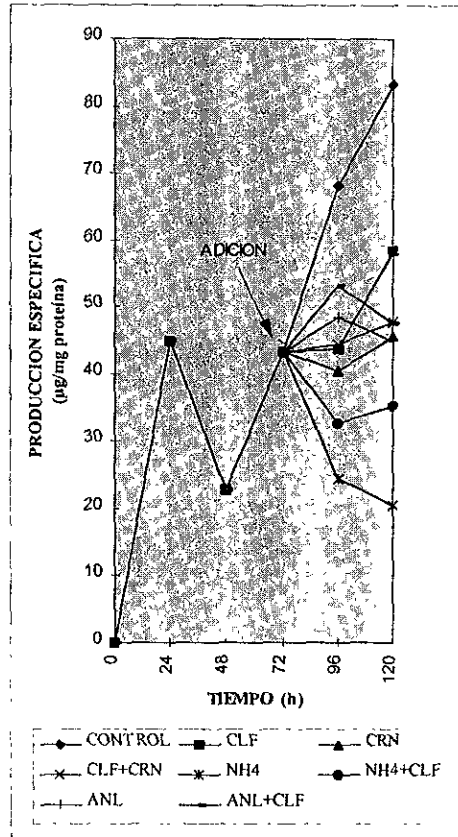
Cabe mencionar que el tratamiento con amonio originó un efecto mayor que el análogo debido posiblemente a una mejor asimilación del amonio por parte de la bacteria ²³ y/o por su afinidad como sustrato en una posible inhibición del metabolismo de aminoácidos que puede abastecer de precursores a la biosíntesis de antraciclina, este fenómeno ocurre en *S. fradiae* y *Streptoverticillium kitasatoensis* durante la producción de tilosina y leucomocina, respectivamente ^{24, 25, 26, 28 y 35}; ambos antibióticos son macrólidos y sus precursores son ácidos grasos de bajo peso molecular, por lo que podría ocurrir la misma situación en la síntesis de antraciclina.

Las condiciones con amonio más cloranfenicol y análogo más cloranfenicol tuvieron la misma producción volumétrica y mayor producción específica que los respectivos tratamientos sin cloranfenicol, indicando que este último compuesto no produce efecto alguno sobre las cinéticas de producción, descartando la posibilidad de considerar el fenómeno como una verdadera represión.

La producción específica con cerulenina presentó un efecto inhibitorio teniendo niveles de producción similares a los del análogo y análogo más cloranfenicol, sugiriendo que la metilamina produjo el mismo efecto. En cambio, la cerulenina en la producción volumétrica no mostró un patrón inhibitorio; cabe mencionar que el uso de la cerulenina es complicado debido a su inestabilidad en el medio de cultivo e inducción de resistencia ²⁰, por lo que su efectividad puede variar.

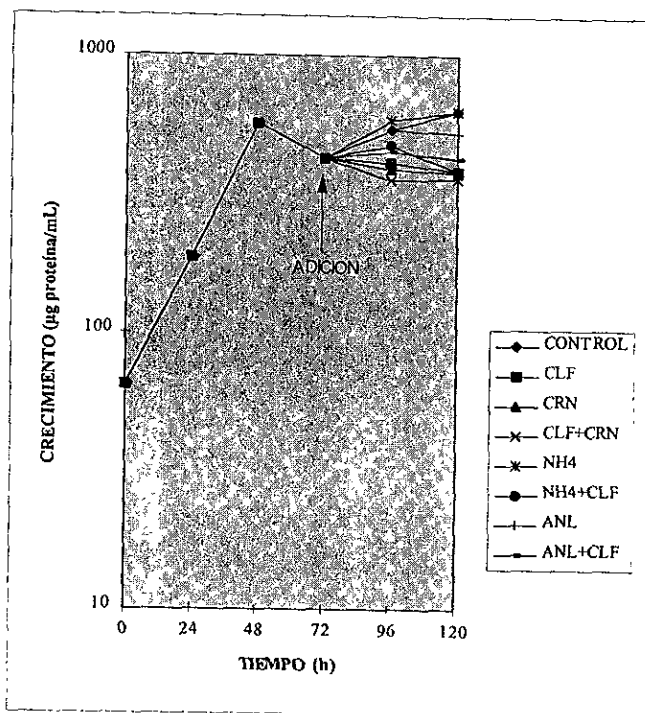


Gráfica 8. Efecto sobre la producción volumétrica, al adicionar a las 72 h cloranfenicol (CLF), cerulenina (CRN), amonio (NH4) y metilamina (ANL); los puntos correspondientes a las 24, 48 y 72 horas son promedios. En el anexo 1 se muestra el análisis de varianza y las desviaciones estándar.



Gráfica 9. Efecto sobre la producción específica, al adicionar a las 72 h cloranfenicol (CLF), cerulenina (CRN), amonio (NH4) y metilamina (ANL); los puntos correspondientes a las 24, 48 y 72 horas son promedios.

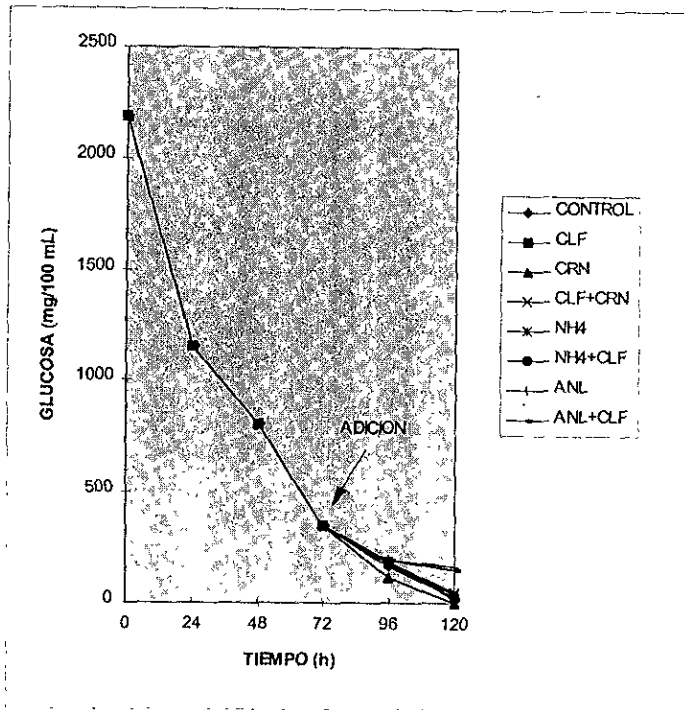
El crecimiento se presentó similar en todos los tratamientos hasta el momento de las adiciones, observándose un decremento de la proteína al añadir algún inhibidor del crecimiento y/o de la enzima PKS, cloranfenicol y cerulenina respectivamente (gráfica 10).



Gráfica 10. Cinéticas de crecimiento al añadir a las 72 h de la fermentación cloranfenicol (CLF), cerulenina (CRN), amonio (NH₄) y metilamina (ANL). Los tres primeros tiempos (24, 48 y 72 h) corresponden a promedios.

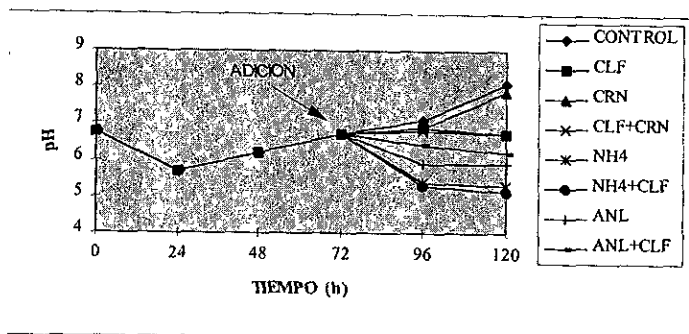
El consumo de amonio se mostró de igual manera en todos los casos hasta el momento de las adiciones (72 h). Cabe mencionar que el tratamiento con adición de amonio tuvo un crecimiento similar con respecto al control, teniendo producciones volumétrica y específica menores al 30% y un consumo de amonio 4 veces mayor, corroborando el efecto negativo sobre la producción de antraciclinas sin afectar el crecimiento bacteriano.

En relación al consumo de glucosa (gráfica 11), la mayoría de los tratamientos consumieron mas del 90 % del carbohidrato presente en el medio de cultivo. Los tratamientos con metilamina y la combinación metilamina y cloranfenicol no consumieron toda la glucosa, debido a que el análogo no representaba una fuente de nitrógeno y a la inhibición del crecimiento producida por el cloranfenicol; tales condiciones tuvieron los índices más bajos de crecimiento.



Gráfica 11. Cinéticas del consumo de glucosa en los distintos tratamientos al añadir a las 72 h de la fermentación cloranfenicol (CLF), cerulenina (CRN), amonio (NH₄) y metilamina (ANL).

Respecto al pH, el tratamiento sin adición (control) observó nuevamente la alcalinización del medio típica de los cultivos sumergidos con alta producción de antraciclinas; mientras que las condiciones con baja producción no presentaron ese patrón y permanecieron sin variaciones importantes. Cabe mencionar que las adiciones de amonio y metilamina mostraron una ligera variación hacia la acidificación del medio que coincide con la disminución en la producción de antraciclinas en dichos tratamientos, lo que podría implicar al pH como el responsable del efecto estudiado, tal como sucede en *S. peucetius*^{8 y 9}; pero aunque el amonio (NH₄⁺) efectivamente incrementa la acidez del medio, la metilamina (CH₃-NH₂) es una sustancia alcalina que eleva el pH¹⁹ y suprime la producción de antraciclinas al mismo tiempo, lo cual indicó que el efecto negativo estudiado (posible inhibición) no fue originado por pH sino por amonio y su análogo (gráfica 12). Cabe mencionar que la acidogénesis producida por el catabolismo de la glucosa se evitó bajando su concentración en el medio mínimo.

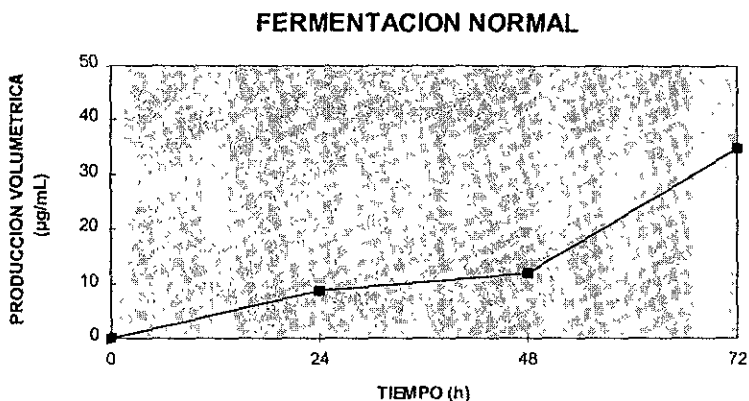


Gráfica 12. pH de los distintos tratamientos al añadir a las 72 h de la fermentación cloramfenicol, cerulenina, sulfato de amonio 200 mM y metilamina.

Aunque no se debe descartar una posible implicación del pH en la regulación de la biosíntesis del antibiótico, ya que se ha observado en *S. peucetius* var. *caesius* un incremento en la producción de antraciclinas conforme la concentración de CaCO_3 (amortiguador en el medio de producción) fue mayor en el medio de cultivo, siendo el pH inicial, después de esterilizar, cada vez mayor ⁶.

PRODUCCION DE ANTRACICLINAS EN UN SISTEMA DE CELULAS EN REPOSO (RESTING CELL SYSTEM)

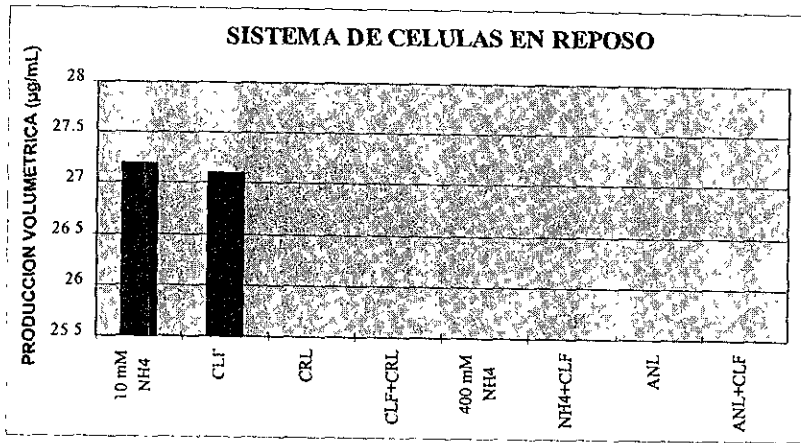
Los resultados obtenidos en la producción volumétrica de antraciclina mostraron que la represión de la síntesis de proteínas producida por cloranfenicol no afectó la producción de antraciclina, ya que tuvo niveles de producción similares al control sin adición, lo cual indica que la duración del experimento estuvo dentro del período de vida media de las enzimas involucradas en la antibiogénesis y/o formación de precursores, y que estas enzimas fueron inhibidas por cerulenina, amonio y metilamina, ya que ninguno de estos tratamientos produjo antraciclina. Además, se observó que las combinaciones de estos tratamientos inhibitorios con cloranfenicol fueron similares a aquellos sin cloranfenicol (gráficas 13 y 14). Lo anterior descartó a la represión como la causante del efecto estudiado.



Gráfica 13 Producción volumétrica durante la fermentación normal, todos los puntos son promedios.

Los resultados del SCR mostraron que los tratamientos con amonio y su análogo metilamina provocaron el paro total en la producción de antraciclina al igual que la cerulenina; sabiendo que ésta última es un inhibidor de la enzima PKS, es probable que el amonio y su análogo hallan producido un efecto inhibitorio sobre alguna enzima involucrada en etapas anteriores a la actividad de la PKS y relacionada con el

abastecimiento de precursores para la PKS, quizás del metabolismo de aminoácidos, tal como sucede en la producción de tilosina por *S. fradiae*, en donde la inhibición por amonio es revertida con la adición de ácidos grasos de bajo peso molecular; además, se observó que en la biosíntesis de tilosina los aminoácidos alifáticos (valina, leucina, isoleucina y alanina) y la treonina (que origina isoleucina) son incorporados al antibiótico²⁶. Dado que estos aminoácidos originan acetil-CoA y propionil-CoA¹⁶, es probable que *S. fradiae* y *S. peuceitius* var. *caesi*us tengan el mismo mecanismo de regulación por amonio a nivel del abastecimiento de los precursores para la biosíntesis de tilosina y antraciclinas, respectivamente; este mecanismo se refiere a la interferencia del amonio en el metabolismo de la valina²⁴.



Gráfica 14. Producción volumétrica durante el sistema de células en reposo, en el anexo 1 se muestra el análisis de varianza y las desviaciones estándar.

Estos resultados confirman la hipótesis de que una inhibición por amonio *per se* es la causante del fenómeno estudiado.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y su análisis se concluyó lo siguiente:

1.- La producción de antraciclinas en *Streptomyces peucetius* var. *caesius* es afectada negativamente por el ión amonio cuando el microorganismo ha consumido mas de 26 mM del ión; mientras mas alto fue el consumo de éste, la disminución en la producción de antraciclinas resultó mayor. El efecto se observó a partir de la fase estacionaria de crecimiento o idiofase.

2.- Aunque se desconoce si el efecto del amonio es a nivel de metabolismo primario o secundario, se concluye que el efecto negativo fue resultado de una inhibición enzimática, ya que al igual que la cerulenina (inhibidor de la PKS), tanto el amonio como el análogo no tuvieron producción de antraciclinas en el SCR; mientras que en el inhibidor de síntesis de proteínas (cloranfenicol) tuvo un nivel de producción semejante al control y no mostró efecto al combinarse con el amonio y el análogo, por lo que se descartó a la represión como causante del efecto observado. Conforme más tempranamente se añadió un exceso de amonio al medio de cultivo, el efecto fue mayor sobre la producción de antraciclinas.

3.- Respecto a la comprobación del amonio como el causante del efecto, se observó un patrón inhibitorio similar con el amonio o un análogo del mismo tanto en una fermentación normal como en un sistema de células en reposo, confirmandose al amonio *per se* como el efector.

ANEXO 1

El modelo estadístico para el análisis de varianza se planteó con un solo factor de efectos fijos, sin bloqueos y con un grado de significancia de 0.05 ($\alpha=5\%$). Se maneja para todos los experimentos la siguiente hipótesis nula:

H_0 : Todos los tratamientos son iguales

Hipótesis alternativa $\Rightarrow H_1$: Al menos un tratamiento es distinto

EXPERIMENTO 1: Análisis de varianza de la producción volumétrica de antraciclinas (gráfica 1A).

| FUENTE DE VARIABILIDAD | SUMA DE CUADRADOS | GRADOS DE LIBERTAD | CUADRADOS MEDIOS | F calculada (F_0) |
|------------------------|-------------------|--------------------|------------------|-----------------------|
| TRATAMIENTO | 56205.14 | 6 | 9367.52 | 20.55 |
| ERROR | 6380.67 | 14 | 455.76 | |
| TOTAL | 62585.81 | 20 | | |

F de tablas = 1.55 < $F_0 = 20.55$ \therefore se rechaza la hipótesis nula, al menos algún tratamiento es diferente.

DESVIACIONES ESTANDAR

| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h |
|---------------|------|------|-------|-------|-------|
| 10 mM NH_4 | 2.44 | 2.56 | 0.87 | 7.42 | 29.48 |
| 20 mM NH_4 | 0.79 | 3.97 | 10.82 | 30.2 | 27.23 |
| 40 mM NH_4 | 1.76 | 4.61 | 9.04 | 1.73 | 12.12 |
| 80 mM NH_4 | 0.51 | 2.26 | 3.97 | 4.24 | 5.3 |
| 100 mM NH_4 | 1.15 | 1.01 | 5.68 | 12.58 | 20.25 |
| 150 mM NH_4 | 1.07 | 2 | 6.76 | 6.54 | 16.52 |
| 200 mM NH_4 | 0.17 | 1.27 | 3.18 | 1.06 | 4.24 |
| 300 mM NH_4 | 0.36 | 1.43 | 3.46 | 7.7 | 21.34 |

EXPERIMENTO 2. Análisis de varianza de la producción volumétrica de antraciclinas (gráfica 3).

| FUENTE DE VARIABILIDAD | SUMA DE CUADRADOS | GRADOS DE LIBERTAD | CUADRADOS MEDIOS | F calculada |
|------------------------|-------------------|--------------------|------------------|-------------|
| TRATAMIENTO | 15405.61 | 5 | 3081 | 401.89 |
| ERROR | 92 | 12 | 7.67 | |
| TOTAL | 15497.61 | 17 | | |

F de tablas = 1.54 < $F_0 = 401.89$ ∴ se rechaza la hipótesis nula, al menos algún tratamiento es diferente.

DESVIACIONES ESTANDAR

| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h |
|------------|------|------|------|------|-------|
| CONTROL | 0.13 | 1.25 | 2.62 | 1.21 | 4.01 |
| ADICION 0 | 0.06 | 0.77 | 1.33 | 0.79 | 0.73 |
| ADICION 24 | 0.03 | 1.36 | 1.07 | 0.51 | 0.9 |
| ADICION 48 | 0.06 | 0.64 | 1.39 | 1.22 | 1.03 |
| ADICION 72 | 0.84 | 1.76 | 0.3 | 0.7 | 0.54 |
| ADICION 96 | 0.0 | 3.23 | 0.94 | 5.73 | 5.36 |

EXPERIMENTO 3. Análisis de varianza de la producción volumétrica de antraciclinas (gráfica 8).

| FUENTE DE VARIABILIDAD | SUMA DE CUADRADOS | GRADOS DE LIBERTAD | CUADRADOS MEDIOS | F calculada |
|------------------------|-------------------|--------------------|------------------|-------------|
| TRATAMIENTO | 3510.73 | 7 | 501.53 | 137.4 |
| ERROR | 58.38 | 16 | 3.65 | |
| TOTAL | 3569.11 | 23 | | |

F de tablas = 2.66 < $F_0 = 137.4$ ∴ se rechaza la hipótesis nula, al menos algún tratamiento es diferente.

DESVIACIONES ESTANDAR

| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h |
|---------|------|------|------|------|-------|
| CONTROL | 1.1 | 1.7 | 1.97 | 2.71 | 2.58 |
| CLF | 1.1 | 0.2 | 1.95 | 2.39 | 1.34 |
| CRN | 1.7 | 0.5 | 1.09 | 1.41 | 1.66 |
| CLF+CRN | 0.4 | 0.8 | 0.58 | 0.55 | 2.40 |
| NH4 | 1.1 | 0.8 | 1.64 | 0.61 | 1.37 |
| NH4+CLF | 0.2 | 1.1 | 0.68 | 0.45 | 3.15 |
| ANL | 0.3 | 0.8 | 1.15 | 0.86 | 1.33 |
| ANL+CLF | 0.6 | 0.7 | 0.63 | 1.75 | 1.9 |

EXPERIMENTO 4. Análisis de varianza de la producción volumétrica de antraciclinas (gráfica 14).

| FUENTE DE VARIABILIDAD | SUMA DE CUADRADOS | GRADOS DE LIBERTAD | CUADRADOS MEDIOS | F calculada |
|------------------------|-------------------|--------------------|------------------|-------------|
| TRATAMIENTO | 1125.83 | 7 | 160.83 | 71.48 |
| ERROR | 36 | 16 | 2.25 | |
| TOTAL | 1161.83 | 23 | | |

F de tablas = 1.46 < $F_0 = 71.48$ \therefore se rechaza la hipótesis nula, al menos algún tratamiento es diferente.

DESVIACIONES ESTANDAR

| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h |
|---------|------|------|------|------|-------|
| CONTROL | 2.53 | 3.14 | 3.71 | 1.0 | 2.09 |
| CLF | 3.0 | 0.55 | 2.26 | 0.99 | 1.79 |
| CRN | 2.67 | 1.21 | 1.08 | 1.29 | 0.98 |
| CLF+CRN | 3.96 | 0.99 | 0.52 | 1.59 | 1.17 |
| NH4 | 0.44 | 1.14 | 0.78 | 0.27 | 1.94 |
| NH4+CLF | 0.93 | 1.48 | 1.95 | 2.34 | 0.25 |
| ANL | 1.55 | 2.69 | 0.47 | 2.61 | 1.42 |
| ANL+CLF | 3.09 | 1.48 | 1.35 | 1.63 | 0.79 |

REFERENCIAS

1. Arcamone, F., G. Franceschi y S. Penco. (1969). Adriamicin (14-Hidroxidaunomycin). A novel antitumor antibiotic. Tetrahedron Lett. 13:1007-1010.
2. Arcamone, F. (1981). Doxorubicin. Anticancer antibiotics. Academic Press. New York.
3. AubeI-Sadron, G. y D. Londos-Gagliardi. (1984). Daunorubicin and doxorubicin, antracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. Biochimie. 66:333-352.
4. Baumberg, S., H. Krügel y D. Noack (Eds). (1991). Genetics and product formation in *Streptomyces*. Plenum Press. New York.
5. Braña, A. F., N. Paiva y A. L. Demain. (1986). Pathways and regulation of ammonium assimilation in *Streptomyces clavuligerus*. J. Gen. Microbiol. 132:1305-1317.
6. Casillas, P. G. (1994). Optimización de un medio de cultivo para la producción de antraciclinas mediante un diseño factorial avanzado. Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones Biomedicas, U.N.A.M.
7. Connors, N. C., P. L. Bartel y W. R. Strohl. (1990). Biosynthesis of anthracyclines: enzymic conversion of aklanonic acid to aklavinone and ϵ -rhodomycinone by anthracycline-producing streptomycetes. J. Gen. Microbiol. 136: 1887-1894.
8. Dekleva, M., J. Titus y W. Strohl. (1985). Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in defined media. Can. J. Microbiol. 31:287-294.
9. Dekleva, M. y W. Strohl. (1987). Glucose-stimulated acidogenesis by *Streptomyces peucetius*. Can. J. Microbiol. 33:1129-1132.
10. Flores, M. E. y S. Sánchez. (1985). Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*. FEMS Microbiol. Lett. 26:191-194.
- 11.- Goodfellow, M. y M. Mordarski. (1983). The biology of the actinomycetes. Academic Press. London.
12. Hobbs, G., C. M. Frazer, D. C. J. Gardner, F. Flett y S. G. Oliver. (1990). Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): kinetics and the influence of nutrients. J. of Gen. Microbiol. 136:2291-2296.

13. Horinouchi, S. y T. Beppu. (1990). Autoregulatory factors on secondary metabolism and morphogenesis in actinomycetes. Crit. Rev. Biotechnol. 10(3): 191-204.
14. Inoue, S., Y. Nishizawa y S. Nagal. (1983). Stimulatory effect of ammonium on streptomycin formation by *Streptomyces griseus* growing on a glucose minimal media. J. Ferment. Technol. 61(1):7.
15. Kolter, R. y D. Siegele. (1992). Life after log. J. of Bacteriol. 174(2): 345-348.
16. Lehninger, A. L. (1975). Bioquímica. Segunda edición. Ediciones Omega. Barcelona.
17. Lowry, O. H., et. al. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol-reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
18. McGuire, J. C., B. K. Hamilton y R. J. White. (1979). Approaches to development of the daunorubicin fermentation. Process Biochemistry. December:2-5.
19. Morrison. R. T. y R. N. Boyd. (1985). Química orgánica. Cuarta edición. Fondo Educativo Interamericano. E. U. A.
20. Nakashima, H. y N. Yamamoto. (1987). Inhibition by doxorubicin of human-deficiency virus (HIV) infection and replication in vitro. J. of Antibiot. Vol. XL. (3):396-399.
21. Neatherburn, N. W. (1967). Phenol-hypoclorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem. Vol. 39 (8):971- 974.
22. Novák, J., P. Hájek, T. Rezanka y Z. Vanek. (1992). Nitrogen regulation of fatty acids and avermectins biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. FEMS Microbiol. Lett. 93:57-62.
23. Omura, S. (1981). Cerulenin. en: Substrates, analogs and inhibitors. Methods in Enzymology. Vol. 72. Academic Press.
24. Omura, S., Y. Tanaka, H. Mamada y R. Masuma. (1983). Ammonium ion suppresses the biosynthesis of tylosin aglicone by interference with valine catabolism in *Streptomyces fradiae*. J. of Antibiot. 36 (12):1792-1794.
25. Omura, S., Y. Tanaka, H. Mamada y R. Masuma. (1984). Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids on the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglicone. J. of Antibiot. 37 (5):494-502.
26. Omura, S., A. Taki, K. Matsuda y Y. Tanaka. (1984). Ammonium ion suppress the amino acid metabolism involved in the biosynthesis of protylonolide in a mutant of *Streptomyces fradiae*. J. of Antibiot. 37 (11): 1362-1369.

27. Payne, J.W. (Ed). (1980). Microorganisms and nitrogen sources. John Wiley & Sons. Gran Bretaña.
28. Sánchez, S. (Ed.). (1988). Nitrogen source control of microbial processes. CRC Press. Florida.
29. Segura, D. (1995). Estudio sobre la producción de doxorubicina en mutantes de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones Biomedicas, U.N.A.M.
30. Shapiro, S. (1989). Regulation of secondary metabolism in Actinomycetes. CRC Press. Florida.
31. Sharee, L. O., J. Ferguson y R. Hutchinson. (1995). Regulation of daunorubicin production in *Streptomyces peucetius* by the *dmrR₂* locus. J. of Bacteriol. Vol.177 (5):1216-1224.
32. Stroh, W. R. y N. C. Connors. (1992). Significance of anthraquinone formation resulting from the cloning of actinorodin genes in heterologous streptomycetes. Mol. Microbiol. 6 (2): 147-152.
33. Simpkins, H., L. F. Pearlman y L. M. Thompson. (1984). Effects of adriamycin on supercoiled DNA and calf thymus nucleosomes studied with fluorescent probes. Cancer Res. 44:613-618.
34. Tanaka Y., R. Masuma y S. Omura. (1984). Control of ammonium ion level for efficient nanaomycin production. J. of Antibiot. Vol. 38 (11): 1370-1375.
35. Tanaka Y., A. Taki, R. Masuma y S. Omura. (1986). Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. J. of Antibiot. Vol. 39 (6):813-821.
36. Vandamme, E. J. (1984). Biotechnology of industrial antibiotics, drugs and pharmaceutical sciences. Vol. 22. Marcel Dekker Inc. New York.
37. Ward, O. P. (1989). Biotecnología de la fermentación. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
38. Wax, R., L. Synder y L. Kaplan. (1982). Inactivation of glutamine synthetase by ammonia shock in the Gram-Positive bacterium *Streptomyces cattleya*. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 44 (4):1004-1006.

39. Young, M. D. y L. L. Kempe. (1985). Effects of phosphate, glucose and ammonium on cell growth and lincomycin production by *Streptomyces lincolnensis* in chemically defined media. Biotechnol. and Bioeng. 27:327-333.