

03062

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONÓMA
DE MÉXICO**

3
2y

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS**

**ESTUDIO DE LAS VÍAS DE FORMACIÓN DE LOS
PRECURSORES DEL ANILLO LACTÓNICO DE LA
ERITROMICINA EN *Saccharopolyspora erythraea*
CA340**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A

LIC. OMAIRA ALEJANDRA BERMÚDEZ ROMERO

1998

262034

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO

Presidente: Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Secretario: Dr. José Edgardo Escamilla Marván

Vocal: Dra. María Elena Flores Carrasco

Suplente: Dr. Guillermo Mendoza Hernández

Suplente: Dr. Barbarín Arreguín Lozano

Esta tesis se realizó en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. María Elena Flores Carrasco.

DEDICATORIAS

A Dios, a la virgen del Valle y a la virgen de Guadalupe.

A mis Padres y Hermanos.

A mi esposo Jorge Roberto.

A mis sobrinos Génesis, Carla, Alexis Javier e Isabel.

A mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser mi guía espiritual.

A la Dra. María Elena Flores, su orientación, amistad y sabios consejos dejaron una profunda huella en mi vida profesional y personal. Siempre tendrá un lugar muy especial en mi corazón.

Al Dr. Carlos Huitrón por las facilidades prestadas en su laboratorio, por su acertada orientación y amistad.

A la I.B.I. Marcela Ramírez Y. por el valioso apoyo técnico prestado durante la realización de este trabajo.

Al personal de la unidad de aminoácidos y síntesis de oligonucleótidos, en especial a Patricia Padilla, el invaluable apoyo técnico y conocimientos en HPLC que hicieron posible sacar adelante este trabajo. Gracias por la amistad brindada.

Al Dr. Antonio Velázquez y a Rocío Rodríguez por la valiosa colaboración prestada en su laboratorio y por la donación del $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ utilizado durante este trabajo.

Al Dr. Jorge Calderón (Q.E.P.D.) por las facilidades prestadas en su laboratorio.

A la Universidad de los Andes, por haberme permitido realizar mis estudios de posgrado.

A mis padres y hermanos, sus palabras de estímulo me dieron la fuerza para salir adelante.

A Jorge que con su amor y apoyo hizo más fácil la labor emprendida.

A personas especiales como Nancy, Toño, Julio César, María, Rosalba, Edgar, Marcela, Guillermina, Eduardo, Tere, Natasha, Alejandra, Araceli, Ivonne, Alejandro, Angeles y Verónica, que con su apoyo y amistad me hicieron sentir como en casa.

A la bella ciudad de México por haberme acogido en su seno y mostrarme la calidez de su gente.

A todas aquellas personas que se me escapan en este momento y que de una u otra forma hicieron posible la realización de este trabajo.

Gracias.

INDICE GENERAL

	Página
Indice de figuras	II
Abreviaturas	IV
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	5
Objetivo	16
Material y Métodos	17
Resultados y Discusión	22
Conclusiones	53
Bibliografía	55

INDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1.- Estructura química de la eritromicina.....	6
Fig. 2.- Vía de biosíntesis de la eritromicina.....	9
Fig. 3.- Rutas de formación de propionilCoA reportadas en actinomicetos...	12
Fig. 4.- Rutas de formación de metilmalonilCoA y propionilCoA en <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA 340.....	13
Fig. 5.- Perfiles de crecimiento, de producción volumétrica y específica de eritromicina, de consumo de azúcares, de consumo de amonio y de pH del medio de cultivo de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA340 crecida en glicina 20 mM y alanina 20 y 40 mM.....	23
Fig. 6.- Perfiles de crecimiento, de producción volumétrica y específica de eritromicina, de consumo de azúcares, de consumo de amonio y de pH del medio de cultivo de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA340 crecida en glicina 40 mM y NH ₄ Cl 20 y 40 mM.....	24
Fig. 7.- Perfiles de crecimiento, de producción volumétrica y específica de eritromicina, de consumo de azúcares, de consumo de amonio y de pH del medio de cultivo de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA340 crecida en treonina 20 mM y 40 mM y asparagina 20 mM.....	27
Fig. 8.- Perfiles de crecimiento, de producción volumétrica y específica de eritromicina, de consumo de azúcares, de consumo de amonio y de pH del medio de cultivo de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA340 crecida en asparagina 40 mM y valina 20 y 40 mM.....	28
Fig. 9.- Perfiles de crecimiento, de producción volumétrica y específica de eritromicina, de consumo de azúcares, de consumo de amonio y de pH del medio de cultivo de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA340 crecida en metionina 20 mM y 40 mM e isoleucina 20 mM.....	29
Fig. 10.- Perfiles de crecimiento, de producción volumétrica y específica de eritromicina, de consumo de azúcares, de consumo de amonio y de pH del medio de cultivo de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA340 crecida en triptofano 20 mM y 40 mM.....	30

Fig. 11.- Perfiles de crecimiento, producción volumétrica y específica, de actividad de isocitrato deshidrogenasa, metilmalonilCoA mutasa, metilmalonilCoA descarboxilasa y propionilCoA carboxilasa de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA 340 crecida en MM con sacarosa 2% y glicina 20 mM.....	34
Fig. 12.- Perfiles de crecimiento, de producción volumétrica de eritromicina y de actividad de isocitrato deshidrogenasa de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA 340 crecida en MM con diferentes fuentes de nitrógeno.....	39
Fig. 13.- Perfiles de crecimiento, de producción volumétrica de eritromicina y de actividad de metilmalonilCoA mutasa de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA 340 crecida en MM con diferentes fuentes de nitrógeno.....	40
Fig. 14.- Perfiles de crecimiento, de producción volumétrica de eritromicina y de actividad de metilmalonilCoA descarboxilasa de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA 340 crecida en MM con diferentes fuentes de nitrógeno.....	42
Fig. 15.- Perfiles de crecimiento, de producción volumétrica de eritromicina y de actividad de propionilCoA carboxilasa de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA 340 crecida en MM con diferentes fuentes de nitrógeno.....	44
Fig. 16.- Perfiles de crecimiento, de producción volumétrica de eritromicina y de actividad de isocitrato deshidrogenasa de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA 340 crecida en MM con diferentes fuentes de carbono.....	47
Fig. 17.- Perfiles de crecimiento, de producción volumétrica de eritromicina y de actividad de metilmalonilCoA mutasa de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA 340 crecida en MM con diferentes fuentes de carbono.....	48
Fig. 18.- Perfiles de crecimiento, de producción volumétrica de eritromicina y de actividad de metilmalonilCoA descarboxilasa de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA 340 crecida en MM con diferentes fuentes de carbono.....	49
Fig. 19.- Perfiles de crecimiento, de producción volumétrica de eritromicina y de actividad de propionilCoA carboxilasa de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> CA 340 crecida en MM con diferentes fuentes de carbono.....	50

ABREVIATURAS

ATP	Adenosin 5'-trifosfato
CoA	Coenzima A
6DBE	6-desoxieritronólido
DTE	Ditioeritritol
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta presión
MM	Medio mínimo
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propansulfónico
NADP⁺	fosfato de β -nicotinamida adenina dinucleótido
rpm	Revoluciones por minuto
YEMEG	Medio completo con glucosa
YEMES	Medio completo con sacarosa

RESÚMEN

El propionilCoA y el metilmalonilCoA, precursores de la molécula de eritromicina, pueden ser formados a partir de succinilCoA, de la degradación de los aminoácidos valina, isoleucina, treonina y metionina o por la degradación de ácidos grasos de número impar de átomos de carbono. Hasta la fecha es poco lo que se sabe de la ruta de formación de estos compuestos para la producción de eritromicina y de su regulación en *Saccharopolyspora erythraea*. Por lo que en este trabajo estudiamos la influencia que ejercen el carbono y el nitrógeno sobre la síntesis de los precursores en dicho microorganismo, a través de establecer los perfiles de crecimiento y de actividad de las enzimas metilmalonilCoA mutasa, metilmalonilCoA descarboxilasa, propionilCoA carboxilasa y NADP⁺-isocitrato deshidrogenasa en este microorganismo. Al crecer a *Sac. erythraea* CA 340 en diferentes aminoácidos como fuente de nitrógeno se pudo observar que valina, metionina y triptofano no fueron utilizados y por lo tanto no hubo crecimiento. Estos resultados indicaron que el propionilCoA y el metilmalonilCoA no pueden generarse por la degradación de aminoácidos. Los perfiles de las enzimas bajo diferentes condiciones nutricionales mostraron que tanto la isocitrato deshidrogenasa como la mutasa son enzimas que están asociadas al metabolismo primario, mientras que la descarboxilasa no depende de la etapa de crecimiento en que se encuentre el microorganismo y la carboxilasa se sintetiza cuando *Sac. erythraea* ha dejado de crecer, es decir en la fase de crecimiento estacionario. Por otra parte la síntesis de isocitrato deshidrogenasa y carboxilasa fue estimulada por glucosa y reprimida por amonio. Glucosa afectó negativamente la síntesis de mutasa y la actividad de descarboxilasa estuvo presente en todas las condiciones. Estos resultados sugieren que la presencia de glucosa y/o amonio provocan una disminución en la síntesis de metilmalonilCoA, propionilCoA y succinilCoA, debido al control que ejercen sobre las enzimas que participan en su formación. Por lo tanto, la regulación que estos compuestos ejercen sobre la síntesis de eritromicina podría llevarse a cabo, en primer lugar controlando la producción de los precursores del antibiótico.

INTRODUCCIÓN

Saccharopolyspora erythraea produce el antibiótico macrólido eritromicina cuya vía biosintética inicia con la síntesis de la aglicona del antibiótico, la cual se deriva de una molécula de propionilCoA y seis unidades de metilmalonilCoA (Higashide, 1984). Estos compuestos pueden tener múltiples orígenes metabólicos: a partir del catabolismo de ácidos grasos de número impar, de la reducción de acrilato, del rearrreglo de succinilCoA y del catabolismo de metionina, treonina o valina. Los dos últimos procesos parecieran ser las rutas primarias para la formación de metilmalonilCoA y propionilCoA bajo condiciones típicas de crecimiento (Tang y col., 1994). No obstante, la importancia de estos dos compuestos para la producción de eritromicina en *Saccharopolyspora erythraea*, su síntesis ha recibido poca atención.

PropionilCoA se puede formar por la descarboxilación de R-metilmalonilCoA, reacción catalizada por la enzima metilmalonilCoA descarboxilasa, la cual ya fue aislada de *Sac. erythraea* (Hunaiti y Kolattukudy, 1984b). Por otra parte, S-metilmalonilCoA se puede formar a partir de propionilCoA por la acción de una carboxilasa (Hunaiti y Kolattukudy, 1982). El R-metilmalonilCoA es generado a su vez del succinilCoA proveniente del ciclo de Krebs utilizando a la metilmalonilCoA mutasa (Hunaiti y Kolattukudy, 1984a). Ambos enantiómeros pueden ser interconvertidos por una metilmalonilCoA racemasa (Seno y Hutchinson, 1986).

El hecho que una mutante bloqueada en el gen que codifica para la metilmalonilCoA descarboxilasa no produce eritromicina sugiere fuertemente que la descarboxilasa es la única enzima que genera propionilCoA para la síntesis de eritromicina (Hsieh y Kolattukudy, 1994).

Para ampliar la información existente sobre la síntesis de los precursores de la eritromicina y la influencia de la fuente de carbono o nitrógeno sobre la producción de metilmalonilCoA, propionilCoA y succinilCoA, en este trabajo se

estudió el efecto que tenían algunos aminoácidos sobre la síntesis de eritromicina y se obtuvieron los perfiles de las enzimas involucradas en su síntesis, propionil CoA carboxilasa, metilmalonil CoA mutasa y metilmalonil CoA descarboxilasa en un medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno y carbono. De igual forma se determinó la actividad de isocitrato deshidrogenasa, enzima muy importante del metabolismo intermediario que controla el flujo de moléculas de carbono dentro del ciclo de Krebs, incluyendo la poza de succinilCoA, lo cual sirvió para tener un punto de referencia con una enzima que participa en el metabolismo primario, ya que no existe algún reporte al respecto en la literatura.

Los resultados obtenidos mostraron que *Sac. erythraea* CA 340 no pudo utilizar a la valina, metionina y triptofano como fuentes de nitrógeno para crecimiento y por lo tanto el propionilCoA no puede generarse a partir de valina o metionina, comprobando que la descarboxilación del metilmalonilCoA es la única vía de formación de propionilCoA.

Por lo que respecta a las enzimas, los resultados mostraron que la isocitrato deshidrogenasa y la mutasa fueron sintetizadas mientras el microorganismo estaba creciendo, la descarboxilasa se presentó durante toda la fermentación sin importar la fase de crecimiento. La carboxilasa claramente se sintetiza durante la fase estacionaria de crecimiento. En cuanto a su regulación, la síntesis de la isocitrato deshidrogenasa y de la carboxilasa fue estimulada por la presencia de glucosa, mientras que amonio la reprimió. Por otra parte, la glucosa afectó negativamente la síntesis de la mutasa y la producción de la descarboxilasa no fue afectada ni por la presencia de glucosa ni de amonio.

Estos resultados sugieren fuertemente que la síntesis de los precursores de eritromicina es regulada por la presencia de glucosa o de amonio, a través del control que se ejerce sobre la síntesis de las enzimas que les dan origen. Esto indicaría que tanto la glucosa como el amonio pueden ejercer su efecto represivo sobre la biosíntesis de eritromicina, en principio limitando la producción de los precursores. Esto de ninguna manera excluye que estos compuestos puedan actuar

llevando a cabo su efecto negativo directamente sobre las enzimas que participan en la síntesis del antibiótico.

ANTECEDENTES

- La eritromicina, descubierta en 1952 por MacGuire y col., es un antibiótico macrólido no poliénico producido principalmente por *Saccharopolyspora erythraea* (antes *Streptomyces erythreus*). Su estructura química consiste en un anillo lactónico macrocíclico constituido por un átomo de oxígeno y trece átomos de carbono, al cual se unen dos moléculas de azúcar mediante uniones glicosídicas (Higashide, 1984; Neuzil y Hostalek, 1986; Barrios, 1988). *Sac. erythraea* produce varios tipos de eritromicina (A,B,C,D,E y F), cuya actividad biológica como antibiótico difiere. De todas estas la más importante desde el punto de vista clínico y comercial es la eritromicina A (Fig. 1).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y USOS EN CLÍNICA.

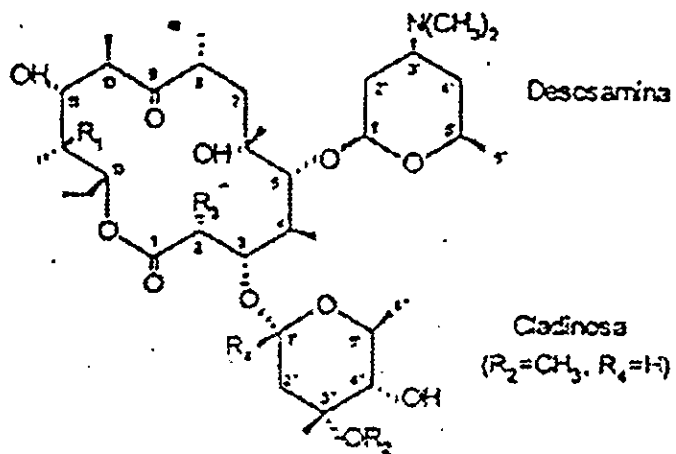
El espectro de acción de la eritromicina A abarca cocos gram positivos y gram negativos, bacilos grampositivos y algunos bacilos gram negativos (Prescott y Dunn, 1962; Omura y Tanaka, 1983; Higashide, 1984; Berkow, 1986; Djokic y col., 1987). Algunos autores lo señalan como el antibiótico de elección contra infecciones estreptocócicas, estafilocócicas y pneumocócicas, así como de infecciones causadas por especies de *Campilobacter* y *Micoplasma* (Djokic y col., 1987; White, 1994; Sánchez y col., 1994).

La acción bacteriostática de la eritromicina se debe a que interacciona con la subunidad 50 S de los ribosomas procarióticos. Diversos estudios señalan que tal unión podría estar estimulando la disociación de la peptidil-tRNA de los ribosomas durante la fase de elongación de la síntesis de proteína impidiendo su continuidad (Menninger y Otto, 1982; Mazzei y col., 1993).

Por otra parte, la eritromicina ha mostrado tener efectos clínicos que van más allá de su actividad como antibiótico. Se ha encontrado que dicho compuesto puede

ser muy útil en condiciones médicas y quirúrgicas en las cuales la gastroparesis sea un problema, ya que el mismo tiene un efecto estimulador sobre la motilidad de el

Figura 1. Estructura Química de la Eritromicina



	R1	R2	R3	R4
Eritro A	OH	CH3	CH3	H
Eritro B	H	CH3	CH3	H
Eritro C	OH	H	CH3	H
Eritro D	H	H	CH3	H
Eritro E	OH	CH3	CH2	-O
Eritro F	OH	CH3	CH ₂ OH	H
Eritronólido	H	*	CH3	*

Fuente: Higashide, 1984.

estómago y duodeno (Pilot, 1994). De igual forma se ha observado que la eritromicina incrementa la actividad bactericida de los neutrófilos humanos contra *Listeria monocytogenes*, debido a que potencia la locomoción del neutrófilo y estimula la quimiotaxis (Pilot, 1994). Hamada y col. (1995) encontraron que la eritromicina exhibe una actividad antineoplásica indirecta en ratones porque aumenta la producción de interleucina 4 la cual a su vez incrementa la actividad tumoricida de los macrófagos. Este hallazgo abre la posibilidad de poder usar la eritromicina clínicamente como droga de soporte en el cáncer en humanos. En clínica se prefiere el uso de la eritromicina para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias en enfermos alérgicos a la penicilina (Berkow, 1986).

A pesar de sus efectos secundarios, cuando se administra en altas dosis y por tiempo prolongado, la eritromicina sigue siendo, dentro de los antibióticos de su grupo, el menos tóxico, más activo y mejor tolerado de estos antibióticos, sobre todo cuando el paciente presenta infecciones hepatobiliares o infecciones acompañadas de insuficiencia renal (Neuman, 1978; Omura y Tanaka, 1983).

BIOSÍNTESIS DE LA ERITROMICINA Y SU REGULACIÓN

La vía biosintética de la eritromicina A en *Sac. erythraea* (Fig. 2) se inicia con la condensación de una molécula de propionilCoA y seis unidades de metilmalonilCoA, que son incorporadas cabeza a cola en el crecimiento de la cadena policetílica, en un proceso similar a la biosíntesis de ácidos grasos (Higashide, 1984). Esta condensación es catalizada por una enzima denominada eritromicina sintetasa, y se genera un macrólido intermedio, el 6-desoxieritronólido B (6DEB). La síntesis de 6DEB es seguida por una hidroxilación en el carbono 6 formando el eritronólido B. La adición del desoxiazúcar L-micarosa en el carbono 3 del eritronólido B, da como producto al 3-O-micarosil eritronólido B y la adición posterior del aminoazúcar D-desosamina en el carbono 5 del compuesto anterior genera a la eritromicina D, que es el primer compuesto con actividad antibacteriana.

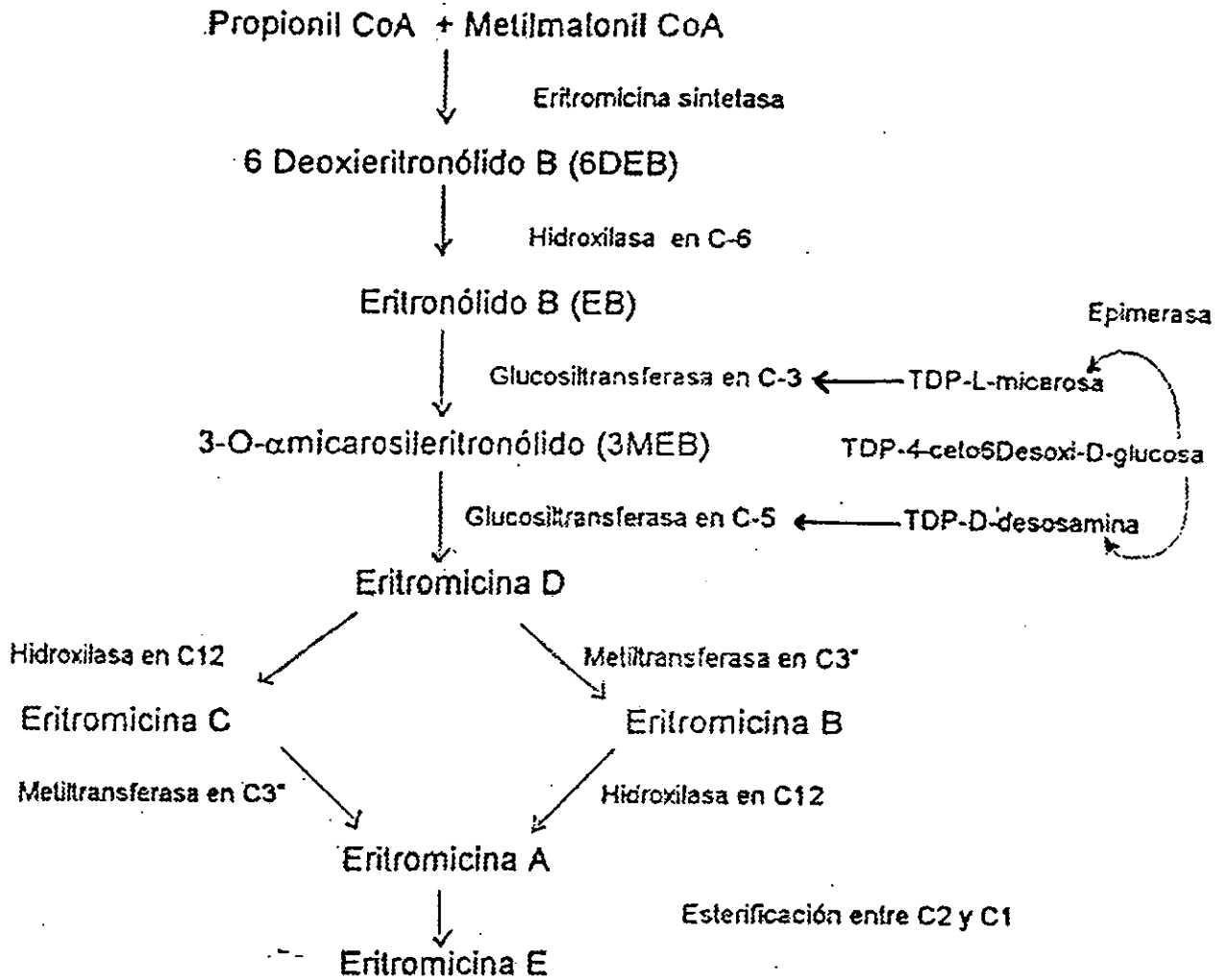
La eritromicina D puede ser hidroxilada en el carbono 12 para formar eritromicina C o metilada en el carbono 3" para formar eritromicina B. Mientras que la formación de eritromicina A a partir de eritromicina C por metilación en el carbono 3" ha sido demostrada claramente, la síntesis a partir de eritromicina B ha sido menos clara dado que existen reportes contradictorios en la literatura respecto a este paso (Corcoran, 1981, Neuzil y Hostalek, 1986). Las eritromicinas E y F son derivados de la eritromicina A y sólo están presentes en cantidades menores (Higashide, 1984).

Los azúcares timidina difosfo-L-micarosa y timidina difosfo-D-désosamina son sintetizados a partir de timidina difosfo-D-glucosa y unidos enseguida al eritronólido B (Neuzil y Hostalek, 1986; Vara y col., 1989). La enzima timidina difosfo-D-glucosa 4,6 dehidratasa ha sido purificada (Vara y Hutchinson, 1988) y la epimerización de timidina difosfo-4-ceto-6-desoxi-D-glucosa es asumida por analogía con otras L-hexosas (Vara y col., 1989).

En el caso particular de la eritromicina se han clonado casi todos los genes de la biosíntesis (Weber y col., 1990; Cortés y col., 1990; Haydock y col., 1991; Zotchev y Hutchinson, 1995; Linton y col., 1995). El aislamiento de dichos genes ha permitido esclarecer algunas peculiaridades de su localización, organización y estructura, más no aumentar la producción del antibiótico en base a su manipulación. Esto se debe, en parte, a que la complejidad del proceso de síntesis de antibióticos en los microorganismos dificulta enormemente el desarrollo de nuevas cepas productoras por medio de alteración directa de genes individuales. Además para la mayoría de los antibióticos comerciales, se desconoce el proceso completo de síntesis. De ahí que los ensayos encaminados a alterar genes individuales apenas incidan en un aumento de la productividad (Aharonowitz y Cohen, 1981).

Por otra parte se han realizado estudios sobre la regulación de la producción de eritromicina. Los mismos señalan como represores a diversos compuestos entre los que están: NH_4Cl , fosfato inorgánico y glucosa (Escalante y col., 1982; Omura y

Figura 2. Vía Biosintética de la Eritromicina



Tanaka, 1983; Martin, 1979; Higashide, 1984; Flores y Sánchez, 1985; Potvin y Péringer, 1994).

La sacarosa es generalmente preferida a la glucosa como fuente de carbono, debido a que se metaboliza lentamente y así se evita la represión ejercida por la D-glucosa (Escalante y col., 1982;). Por otro lado, la glicina se presenta como la mejor fuente de nitrógeno (Smith y col., 1962) y el aumento en la producción de eritromicina en presencia de propanol también ha sido observado (Potvin y Péringer, 1993).

Aunque se conoce mucho sobre la genética, regulación y producción de eritromicina por parte de *Sac. erythraea* (Neuzil y Hostalek, 1986; Cortés y col., 1990; Haydock y col., 1991; Linton y col., 1995; Flores y Sánchez, 1985; Escalante y col. 1982; Hsieh y Kolattukudy, 1994), aún no están claros algunos aspectos del metabolismo de este microorganismo relacionados con las rutas que operan durante la transición de metabolismo primario a metabolismo secundario para dar origen a la formación de los precursores del anillo lactónico de dicho antibiótico: propionilCoA y metilmalonilCoA.

En la literatura se han encontrado reportes acerca del origen del propionilCoA en actinomicetos. Como se puede observar en la fig. no. 4, este compuesto se puede formar por la descarboxilación de R-metilmalonilCoA a través de una reacción catalizada por la enzima metilmalonilCoA descarboxilasa, la cual ya ha sido aislada de *Sac. erythraea* (Hunaiti y Kolattukudy, 1984b).

Otras rutas para la formación de propionilCoA tales como el catabolismo de los aminoácidos valina, isoleucina, metionina, treonina, la degradación de ácidos grasos de número impar o cadena ramificada y la activación de propionato por medio del sistema acilCoA sintetasa y el sistema acilcinasa acoplado con acilfosfotransferasa han sido descritas en bacterias (Raczynska-Bojanowska y col., 1973; Lehninger y col., 1993; Dotzlar y col., 1984; Khaoua y col., 1992; Vancura y col., 1988; Tang y col., 1994). Sin embargo, la incapacidad para producir eritromicina, por parte de una mutante bloqueada en el gen que codifica para la

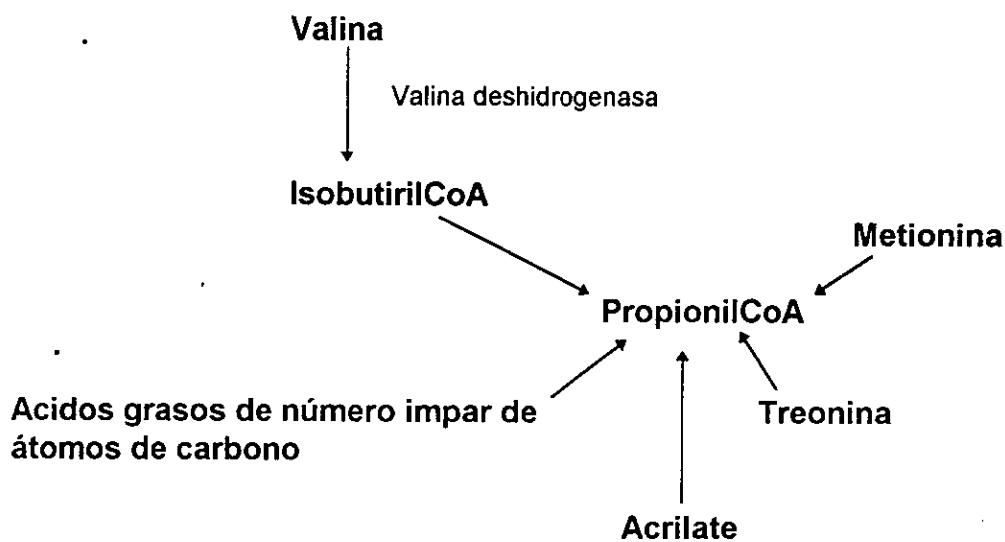
metilmalonilCoA descarboxilasa, unida a el hecho de que propionato exógeno hizo posible superar tal incapacidad, son resultados que sugieren fuertemente que es la descarboxilasa, la única ruta que proporciona propionilCoA para la síntesis de eritromicina (Hsieh y Kolattukudy, 1994).

S-metilmalonilCoA se puede formar a partir de propionilCoA por la acción de una carboxilasa aislada de *Sac. erythraea* crecida en un medio vegetativo (Hunaiti y Kolattukudy, 1982). El R-metilmalonilCoA es generado a su vez del succinilCoA proveniente del ciclo de Krebs utilizando a la metilmalonilCoA mutasa (Hunaiti y Kolattukudy, 1984a). Ambos enantiómeros pueden ser interconvertidos por una metilmalonil-CoA racemasa (Seno y Hutchinson, 1986). Recientes evidencias han indicado que solamente el enantiómero S de metilmalonilCoA es reconocido por la policétido sintetasa que interviene en la formación de la eritromicina (Marsden y col., 1994), lo cual apoya la formación de metilmalonilCoA a través de la acción de la propionilCoA carboxilasa. Sin embargo, estudios anteriores han sugerido la incorporación de acetato y piruvato vía isomerización de succinilCoA a metilmalonilCoA dentro de eritromicina, y la incorporación directa de succinato dentro de eritromicina también ha sido observada (Vanek y col., 1959; Friedman y col., 1964; Hunaiti y Kolattukudy, 1984a). Además, investigaciones realizadas con mutantes carentes de la actividad de propionilCoA carboxilasa han demostrado que las mismas conservan la capacidad de producir eritromicina (Donadio y col., 1996) lo cual concuerda con la existencia de múltiples rutas para la producción de metilmalonilCoA en *Sac. erythraea*. Las figuras 3 y 4 muestran las diversas rutas de formación de los precursores del anillo lactónico de la eritromicina descritas hasta el momento.

Tal y como lo señalan los estudios efectuados sobre los precursores de la eritromicina, existe una ruta para su formación, involucrando a la metilmalonil-CoA mutasa y a la metilmalonilCoA descarboxilasa, aunque no se puede descartar que la carboxilasa esté involucrada en ciertas etapas de crecimiento. Por otro lado, hasta el

momento se desconoce que factores influyen en la síntesis de estas enzimas y por lo tanto en la formación de los precursores en *Sac. erythraea*.

Fig. 3. Rutas de formación de propionilCoA reportadas en actinomicetos.



Por otro lado, muchas investigaciones han demostrado que la producción de los antibióticos en actinomicetos está influenciada por las condiciones nutricionales del medio donde crece el microorganismo productor (Martin y Demain, 1980). Por lo que es importante conocer como se lleva a cabo la relación entre el metabolismo primario y el secundario.

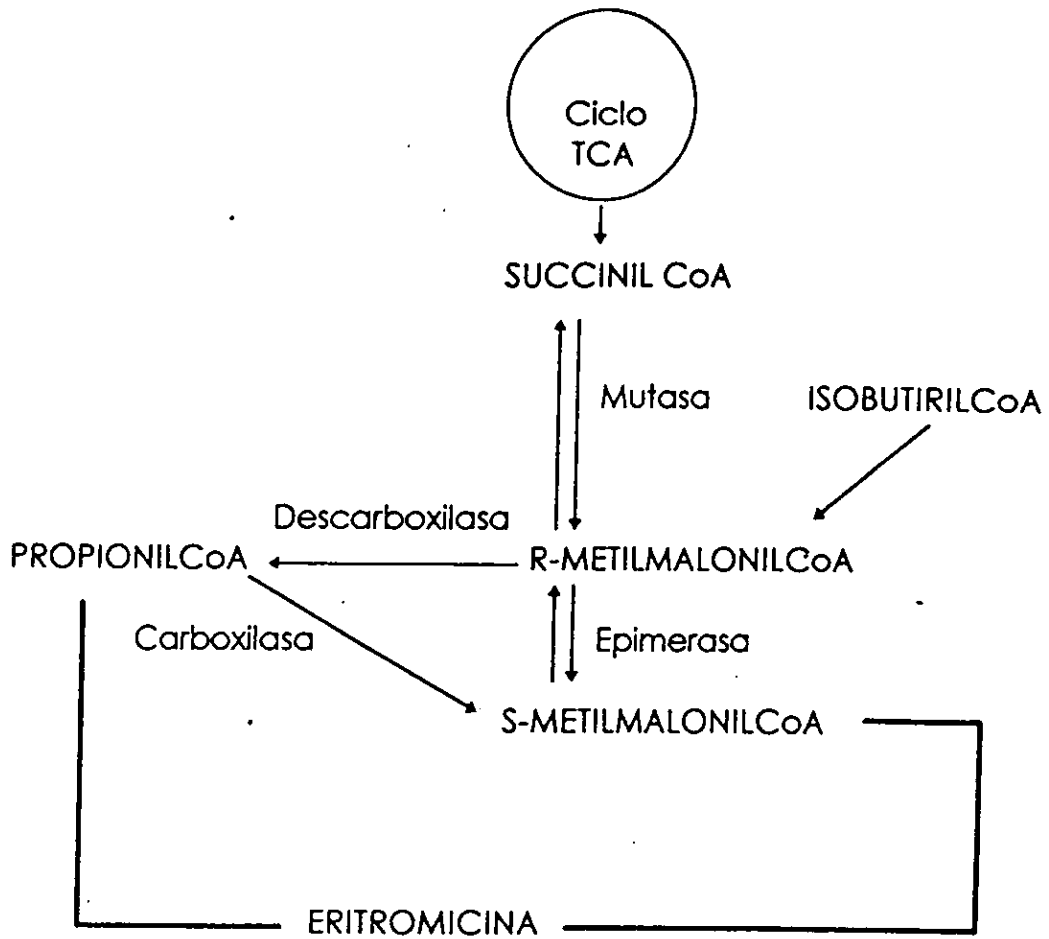


Fig. 4. Rutas de formación de propionilCoA y metilmalonilCoA reportadas en *Saccharopolyspora erythraea*.

En el metabolismo primario, las células en crecimiento catabolizan varios tipos de compuestos tales como los carbohidratos, lípidos, etc., a través de una serie de reacciones químicas que incluyen la glucólisis y el ciclo de Krebs, entre muchas otras, para la producción de energía necesaria en todas las funciones celulares. Los productos finales del catabolismo son reensamblados para formar intermediarios primarios tales como aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, carbohidratos y ácidos

grasos que a su vez son precursores de metabolitos más complejos que proporcionan la estructura y tienen una función biológica en el organismo. Por su parte, algunos de los intermediarios del metabolismo primario, como por ejemplo, ácidos grasos del catabolismo de aminoácidos (valina, treonina, leucina e isoleucina), ácidos orgánicos del ciclo de Krebs como ácido succínico, etc., pueden servir como precursores para la formación de metabolitos secundarios, incluyendo a los antibióticos; por lo tanto es de esperarse que aquellos factores que influyen sobre el metabolismo primario tengan algún efecto sobre metabolismo secundario.

En este sentido, la naturaleza de la fuente de nitrógeno usada en el medio de fermentación juega un importante papel en la producción de antibióticos. En *Streptomyces ambofaciens* (Untrau y col., 1992; Lebrihi y col., 1992; Untrau y col., 1994; Laakel y col., 1994a; Tang y col., 1994) y *Streptomyces fradiae* (Tang y col., 1994; Vancura y col., 1987; Vancura y col., 1988), la producción de espiramicina y de tilosina, respectivamente, fue incrementada por la utilización de ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno, tales como valina, leucina, isoleucina, lisina y treonina. Se ha demostrado en este caso, que el incremento en la producción del antibiótico se debe a los altos niveles de ácidos grasos y derivados acilCoA que resultan del catabolismo de dichos aminoácidos y que actúan como precursores de las agliconas de dichos antibióticos.

Además del suministro de precursores, las condiciones nutricionales del medio de cultivo pueden influir en la formación del antibiótico a nivel de la maquinaria enzimática que interviene en su síntesis o en la de sus precursores. En este sentido se ha observado que las actividades de propionilCoA carboxilasa y metilmalonilCoA carboxiltransferasa, enzimas involucradas en la síntesis de precursores del tilonólido en *Streptomyces fradiae*, fueron reprimidas en altas concentraciones de amonio y fosfato inorgánico. Así mismo, la actividad de la macrocin 3'-O-metiltransferasa, enzima que cataliza la metilación de macrocina para formar tilosina, también fue afectada por altas concentraciones de iones amonio añadidos en la trofofase (Vu-trong y col., 1981; Vu-Trong y Gray, 1987).

También se ha reportado que *S. fradiae* precrecido en altas concentraciones de amonio (100 mM) produjo menor cantidad de protilonólido a partir de succinato, que un micelio precrecido en condiciones de baja concentración de amonio (25 mM). Estos resultados sugieren que el amonio reprime el metabolismo del succinato hacia ácidos grasos precursores. Se asume que dos enzimas que participan en el metabolismo del succinato pueden ser posibles blancos para la acción del amonio, la metilmalonilCoA mutasa y la metilmalonilCoA carboxiltransferasa (Tanaka y col., 1986).

Por otro lado, la valina deshidrogenasa, enzima responsable del catabolismo de valina, leucina e isoleucina también fue reprimida e inhibida cuando un exceso de amonio estuvo presente en el medio de cultivo, causando una disminución en el suministro de ácidos grasos precursores de las agliconas de los antibióticos tilosina y espiramicina (Vancura y col., 1987; Lebrihi y col., 1992). La presencia de glicerol y fosfato en el medio de cultivo también afectó la actividad de valina deshidrogenasa en *S. ambofaciens* (Lounes y col., 1995a, Lounes y col., 1996).

Retomando el caso de la eritromicina, es posible que la interrelación y funcionamiento de las diversas rutas que dan origen a sus precursores se vean afectadas por las condiciones nutricionales del medio donde crece *Sac. erythraea*, ya sea porque el catabolismo de ciertos nutrientes pueda suministrar los precursores o porque la naturaleza de la fuente de carbono y nitrógeno afecte la síntesis de las enzimas que intervienen en la formación de los mismos, tal y como sucede con los otros microorganismos productores de antibióticos descritos hasta el momento, sin embargo los estudios realizados en torno a este tema han sido muy escasos en *Sac. erythraea*.

OBJETIVO

Definir el efecto que tienen la fuente de carbono y la de nitrógeno sobre la síntesis de las enzimas isocitrato deshidrogenasa, metilmalonilCoA mutasa, metilmalonilCoA descarboxilasa y propionilCoA carboxilasa de *Saccharopolyspora erythraea* CA340, para poder establecer si la regulación de la biosíntesis de eritromicina ocurre a través de la limitación de los precursores.

HIPÓTESIS

La síntesis de propionilCoA y metilmalonilCoA, precursores de la eritromicina, está controlada por la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno adicionados al medio de cultivo de *Saccharopolyspora erythraea*.

OBJETIVO

Definir el efecto que tienen la fuente de carbono y la de nitrógeno sobre la síntesis de las enzimas isocitrato deshidrogenasa, metilmalonilCoA mutasa, metilmalonilCoA descarboxilasa y propionilCoA carboxilasa de *Saccharopolyspora erythraea* CA340, para poder establecer si la regulación de la biosíntesis de eritromicina ocurre a través de la limitación de los precursores.

HIPÓTESIS

La síntesis de propionilCoA y metilmalonilCoA, precursores de la eritromicina, está controlada por la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno adicionados al medio de cultivo de *Saccharopolyspora erythraea*.

MATERIAL Y METODOS

MICROORGANISMO: La cepa que se usó en este trabajo fue *Saccharopolyspora erythraea* CA340 proporcionada por Abbott Laboratories.

REACTIVOS: Reactivos y solventes grado HPLC fueron usados. PropionilCoA, metilmalonilCoA, succinilCoA, acetato de sodio grado análisis y otros reactivos fueron obtenidos de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA). Acetonitrilo grado HPLC de Fisher Scientific (Fair Lawn, N.J., EUA). El agua grado HPLC se obtuvo mediante la filtración de agua desionizada por los cartuchos Norganic de Millipore (Bedford, MA, USA).

CONDICIONES DE CULTIVO: *Sac. erythraea* CA 340 se mantuvo en cajas de agar YEMES que contenía en g/l: 4 g de extracto de levadura, 4 g de sacarosa, 10 g de extracto de malta y 15 g de agar. Para los perfiles de crecimiento y de producción de enzimas, se inocularon 100 ml de medio YEMEG líquido (Hopwood et al., 1985) contenidos en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, con 10^8 esporas de *Sac. erythraea* CA 340 y se incubaron a 32°C con agitación (200 rpm) por 24 horas en una agitadora rotatoria New Brunswick. Con 50 ml del medio anterior se inocularon 450 ml del mismo medio y se incubaron en las mismas condiciones durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se lavó el micelio dos veces con solución salina estéril y se resuspendió en el volumen original pero de medio mínimo. Con 100 ml de este micelio se inocularon 1000 ml de medio mínimo (MM) que contenía en g/l: 2.5 g de K_2HPO_4 , 0.5 de $MgSO_4$, 0.02 g de $FeSO_4$, 0.05 g de $ZnSO_4$, 0.001 g de $MnCl_2$, 0.001 g de $CoCl_2$, 20 g de MOPS, la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno que se indican en el texto (el pH se ajustó a 7.8 con NaOH 10 N). Los matraces Fernbach se incubaron a 32°C con agitación a 200 rpm. Se tomaron muestras en función del

tiempo para las determinaciones de crecimiento, producción de antibiótico, pH, amonio, azúcares totales y para las mediciones de actividad de las enzimas.

PREPARACION DEL EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS: El micelio a diferentes tiempos de incubación se recolectó por centrifugación en frío y se lavó dos veces con diferentes soluciones amortiguadoras de extracción, dependiendo de la enzima que se va a medir. Se resuspendió el paquete miceliar en la misma solución amortiguadora y se rompió por sonicación durante 6 minutos en un Sonicador Soniprep 150 MSE. Posteriormente se centrifugó a 20 000 X g por 1 hora y el sobrenadante se utilizó como la fuente de la enzima.

ENSAYO ENZIMATICO PARA LA PROPIONILCoA CARBOXILASA: La actividad de la carboxilasa fue ensayada midiendo la cantidad de $H^{14}CO_3^-$ fijado como ^{14}C -metilmalonilCoA. La mezcla de reacción estuvo formada por 80 mM fosfato de potasio pH 8.0, 3 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, 30 mM $NaHCO_3$, 2 mM propionil CoA, 300 μg de albúmina sérica bovina y la enzima en un volumen final de 0.1 ml. La reacción se inicia por la adición de $H^{14}CO_3^-$ y se incubó por 15 minutos a 30°C. Se paró la reacción por la adición de 0.2 ml de ácido clorhídrico 6N, se evapora a sequedad y el residuo es disuelto en 1 ml de agua destilada y transferido a viales conteniendo 10 ml de líquido de centelleo y ensayado para radioactividad. La actividad enzimática es expresada como $\mu moles$ de $^{14}CO_2$ fijados por miligramo de proteína por minuto.

ENSAYO PARA LA ACTIVIDAD DE METILMALONILCoA MUTASA: La actividad de la enzima fue ensayada por la cuantificación del metilmalonilCoA formado por HPLC, de acuerdo a la metodología reportada por Hunaiti y Kolattukudy (1984a) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción contiene: 100 mM buffer Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM succinilCoA, 1 mM DTE, 60 μM Coenzima B_{12} y la enzima en un volumen final de 0.2 ml. La actividad se inició por la adición de succinilCoA y se

incubó a 30°C por 30 minutos en la oscuridad. Se paró la reacción por la adición de 20 µl de ác. perclórico concentrado. Se removieron las proteínas precipitadas por centrifugación a 10000 X g durante 10 minutos y la muestra fue sometida a HPLC para ver la aparición de metilmalonilCoA.

ENSAYO PARA LA ACTIVIDAD DE METILMALONILCoA DESCARBOXILASA: La actividad de la enzima fue ensayada por la cuantificación de propionilCoA formado por HPLC. La mezcla de reacción contenía 10 mM buffer citrato-fosfato pH 5.0, 1 mM DTE, 0.3 mM metilmalonilCoA y la enzima en un volumen final de 0.1 ml. Se Incubó por una hora a 30°C y se paró la reacción por la adición de 10 µl de ácido perclórico concentrado. Se removieron las proteínas precipitadas por centrifugación y las muestras resultantes se sometieron al HPLC.

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA ISOCITRATO DESHIDROGENASA: La actividad de la enzima fue ensayada midiendo el incremento en la absorbancia a 340 nm debido a la aparición de NADPH. La mezcla de reacción estuvo formada por 0.16 M de solución amortiguadora de Tris-acetato pH 7.6, 0.5 mM de NADP⁺, 1 mM MnSO₄, 3 mM isocitrato y la enzima en un volumen final de 1 ml. La reacción se inició por la adición de la enzima e inmediatamente se leía el incremento en la absorbancia a 340 mM en función del tiempo.

CUANTIFICACION DE PROPIONILCoA, METILMALONILCoA Y METILMALONICoA POR HPLC: El aparato de HPLC usado para estos estudios fue un cromatógrafo de líquidos modular marca Gilson (Middleton, WI, EUA), el cual consistió en dos bombas (modelo 36) con capacidad para elaborar gradientes de elución, un módulo monométrico modelo 805, un mezclador dinámico modelo 811-C, un detector de UV de longitud de onda variable modelo 117, un inyector Rheodyne (Berkeley, CA, EUA) modelo 7125 con un rizo de 20 µl y un software 715 HPLC system controller de Gilson, donde los datos fueron almacenados y analizados. La

columna usada fue una Waters μ Bondapak C18, 0.39 X 30 cm, con un tamaño de partículas de 10 μ m, la cual fue mantenida a temperatura ambiente y protegida con una precolumna de 20 X 3.9 mm de diámetro interno empacada con el mismo material usado en la columna analítica. En la fase móvil se usó un sistema de elución por gradiente que presentó una tendencia cóncava. La fase A contenía una solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM a pH 5.0 y la fase B fue acetonitrilo grado HPLC. Estas soluciones fueron mezcladas en proporciones determinadas por el programa de flujo del solvente. Todos los solventes fueron prefiltrados a través de filtros Millipore de 0.22 μ m, desgasificados bajo vacío y mezclados continuamente por agitadores magnéticos. Una vez concluido el programa continuó una etapa de lavado y regeneración de la columna que duró aproximadamente 20 minutos más antes de proceder a la siguiente inyección. La separación de los compuestos se realizó a temperatura ambiente, el flujo de la fase móvil fue de 1.2 ml min⁻¹, la detección de los compuestos se realizó a una longitud de onda de 254 nm y el volumen de muestra inyectada fue de 20 μ l.

CUANTIFICACION DE LA ERITROMICINA: La eritromicina se cuantificó por bioensayo usando *Sarcina lutea* como microorganismo de prueba de acuerdo a la metodología reportada por Flores y Sánchez (1985).

CUANTIFICACION DE CRECIMIENTO DE *Saccharopolyspora erythraea* CA 340: El crecimiento se cuantificó como proteína por el método de Lowry usando albúmina sérica bovina como estándar, de acuerdo a la metodología reportada por Flores y Sánchez (1985).

DETERMINACION DE pH DEL MEDIO DE CULTIVO: El pH del medio se determinó directamente en el sobrenadante con un potenciómetro marca Chemcadet (Cole Parmer).

CUANTIFICACION DE AZUCARES TOTALES: La cuantificación de sacarosa en el medio de cultivo se hizo mediante el micrométodo del fenol-sulfúrico reportado por Shao et al. (1995). La glucosa se determinó por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) utilizando una modificación del método de Miller (1959).

CUANTIFICACION DEL AMONIO EXTRACELULAR: El amonio extracelular se determinó directamente del sobrenadante usando un electrodo de amonio (Orion) y utilizando NH_4Cl a concentraciones de 0,01, 0,1, 10 y 100 mM como estándar.

RESULTADOS Y DISCUSION

En actinomicetos, el propionilCoA y el metilmalonilCoA, precursores de la molécula de muchos antibióticos macrólidos, pueden ser formados a partir de succinilCoA, de la degradación de los aminoácidos valina, isoleucina, treonina y metionina o por la degradación de ácidos grasos de número impar de átomos de carbono. A la fecha poco es lo que se sabe de la ruta de formación de estos compuestos en *Sac. erythraea* para la formación de eritromicina, por lo que, en principio, se tuvo que establecer si este microorganismo podía utilizar a diferentes aminoácidos como fuente de nitrógeno e inferir si el propionilCoA se formaba a partir de la degradación de los mismos. En este sentido, se llevó a cabo la elaboración de curvas de crecimiento y de producción de eritromicina por *Sac. erythraea* CA 340 en presencia de diferentes aminoácidos como fuentes de nitrógeno. En la figura 5 podemos observar que cuando el microorganismo creció en presencia de glicina 20 mM como fuente de nitrógeno y sacarosa al 2% como fuente de carbono, presentó un buen crecimiento con una fase exponencial que se prolonga hasta las 96 horas. La producción volumétrica de eritromicina se inició a las 48 horas, alcanzando sus máximos valores entre 144 y 168 horas, lo cual coincide con la fase de crecimiento estacionaria. La producción específica mostró el mismo comportamiento que la producción volumétrica con su máximo valor a las 144 horas. Otros parámetros de la fermentación que se determinaron fueron el consumo de azúcares, la formación de amonio y el pH del medio de cultivo. A este respecto, la formación de amonio y su excreción al medio de cultivo a partir de la glicina es baja a lo largo de la fermentación; los azúcares totales se fueron metabolizando durante las 168 horas que duró el cultivo alcanzando un consumo de 64% al final del mismo. El pH no sufre variaciones significativas.

En presencia de alanina 20 mM como fuente de nitrógeno y sacarosa al 2% (Figura 5) se presentó una fase lag de 24 horas para después crecer logarítmicamente hasta el final de la fermentación, encontrándose unos valores de

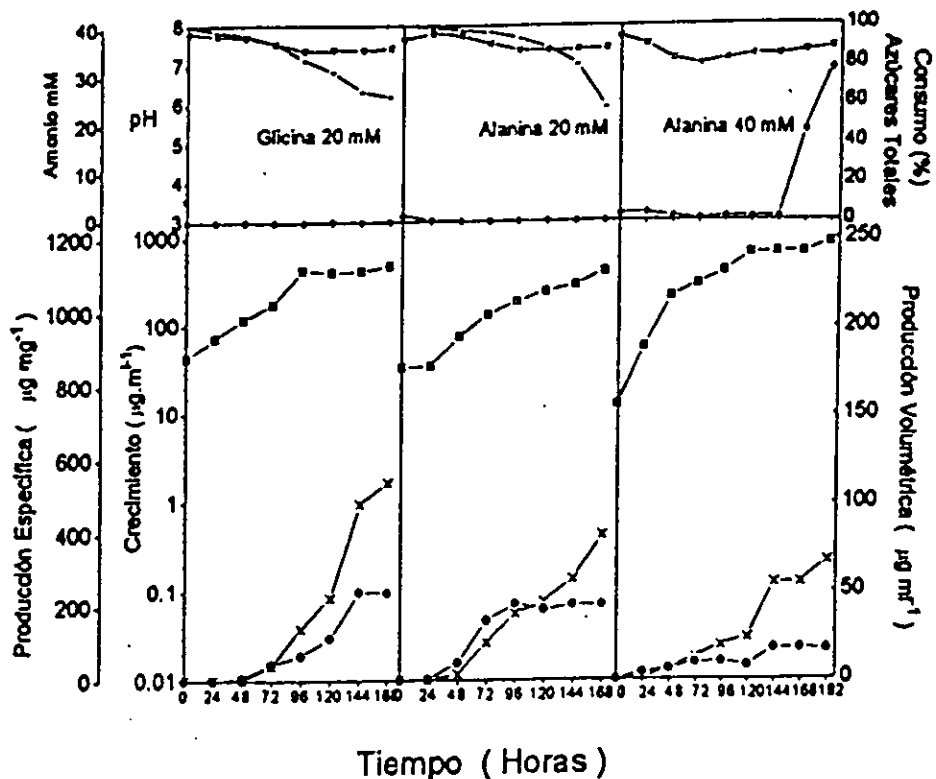


Fig. 5. Perfiles de crecimiento (■), de producción volumétrica (×), producción específica de eritromicina (●), consumo de azúcares (-), concentración de amonio extracelular (♦) y pH del medio de cultivo (*) de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 crecida en medio mínimo con sacarosa al 2% y las fuentes de nitrógeno indicadas, bajo las condiciones descritas en material y métodos.

crecimiento similares a los obtenidos en glicina 20 mM. La producción volumétrica disminuyó con respecto a la obtenida en glicina 20 mM, aunque inicia a las 24 horas y alcanza su máximo valor a las 168 horas. La producción específica siguió un perfil similar iniciando, de igual forma, a las 24 horas y alcanzó su máximo valor a partir de las 96 horas. La concentración de amonio extracelular es baja durante toda la fermentación y el pH no sufre variaciones significativas. Hubo un consumo de azúcares totales de 58%.

Cuando se adicionó alanina a una concentración de 40 mM (Figura 5), el microorganismo tuvo un buen crecimiento, el cual fue incluso superior al obtenido

con glicina 20 mM y con alanina 20 mM, sin embargo, la producción volumétrica y la producción específica disminuyeron con respecto a las anteriores. Ambas se detuvieron a partir de las 144 horas de fermentación momento en el cual se registró un aumento en la concentración de amonio extracelular. El valor promedio de pH durante la fermentación fue de 7.4.

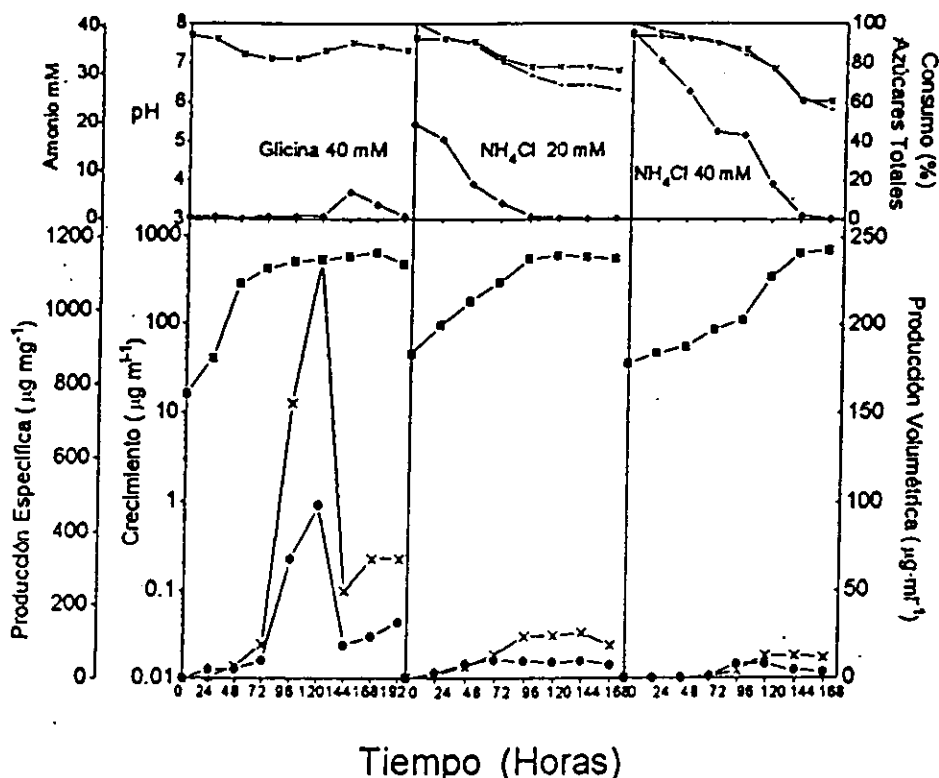


Fig. 6. Perfiles de crecimiento (■), de producción volumétrica (X), producción específica de entromicina (●), consumo de azúcares (-), concentración de amonio extracelular (◆) y pH del medio de cultivo (*) de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 crecida en medio mínimo con sacarosa al 2% y las fuentes de nitrógeno indicadas en la figura, bajo las condiciones descritas en material y métodos.

Cuando el microorganismo crece en presencia de glicina 40 mM como fuente de nitrógeno y sacarosa al 2% como fuente de carbono (Figura 6), como era de esperarse, presentó un mayor crecimiento al obtenido con glicina 20 mM, con una fase exponencial de 48 horas, momento en el cual se inicia la fase estacionaria. La producción volumétrica también fue superior a la obtenida en glicina 20 mM, pero

con el máximo valor a las 120 horas. La producción específica mostró el mismo comportamiento de la producción volumétrica. La concentración de amonio extracelular es baja hasta las 120 horas, momento en que presentó un ligero aumento que posiblemente incide en la disminución en la producción de eritromicina. El pH presenta un valor promedio de 7.5 a lo largo de la fermentación.

En 20 mM de NH_4Cl (Figura 6) se observó un crecimiento similar al encontrado con glicina 20 mM. Las producciones volumétrica y específica de eritromicina presentaron el mismo comportamiento, disminuyendo mucho en comparación con esta fuente de nitrógeno. El inicio de ambas producciones fue a las 24 horas y sus más altos valores se relacionan con el inicio de la fase de crecimiento estacionaria y con la disminución de amonio extracelular en el medio de cultivo. El pH del medio disminuyó de un valor de 7.6 al inicio de la fermentación a un valor de 6.8 al final de la misma, el cual se encuentra dentro del rango de pH en el cual la producción de eritromicina no se ve afectada por este parámetro. El consumo de azúcares totales fue de 58% hasta el final de la fermentación.

Cuando se incrementó la concentración a 40 mM de NH_4Cl (Figura 6) el crecimiento fue similar al observado con 20 mM, pero con cierta disminución en la velocidad de crecimiento hasta las 96 horas, para posteriormente alcanzar un rendimiento final similar al obtenido en las otras fuentes de nitrógeno. Tal y como se esperaba, se observó un mayor efecto represor sobre la producción volumétrica y específica de eritromicina (Flores y Sánchez, 1985; Potvin y Péringer, 1994). En la misma figura se observa la disminución de amonio extracelular en el medio de cultivo, el cual es consumido totalmente hasta el final de la fermentación. El pH del medio disminuyó de 7.7 al inicio de la fermentación a 6.0 al final de la misma. El consumo de azúcares totales fue de 57%.

Treonina, uno de los aminoácidos cuya degradación puede dar origen a propionilCoA, también fue utilizado como fuente de nitrógeno para observar su influencia sobre la producción de eritromicina por *Sac. erythraea*. Se utilizaron las mismas concentraciones de 20 mM y 40 mM y los resultados se muestran en la

figura 7, donde se puede observar que este aminoácido no fue una buena fuente de nitrógeno ya que la velocidad de crecimiento fue más baja que con glicina, alanina y amonio. Hay que enfatizar que aunque *Sac. erythraea* crece mas lento, al final alcanza un valor de crecimiento similar a los anteriores. Las producciones volumétrica y específica de eritromicina en ambas condiciones fueron paralelas al crecimiento y disminuyeron con respecto a las obtenidas en glicina 20 mM. En 40 mM de treonina se observó una menor producción inclusive con respecto a treonina 20 mM. El pH en ambas condiciones no presentó variaciones significativas y mantuvo un valor promedio de 7.4.

Por otro lado, asparagina en concentraciones de 20 mM y 40 mM (Figura 7 y Figura 8) fue una buena fuente de nitrógeno, generando un crecimiento superior al observado en glicina 20 mM. Las producciones volumétrica y específica muestran una tendencia similar, iniciándose desde las 24 horas, después alcanzaron su máximo valor entre 144 y 168 horas pero disminuyeron con respecto a glicina 20 mM. La concentración de amonio en el medio de cultivo se incrementó a partir de las 144 horas en asparagina 20 mM y a las 120 horas en asparagina 40 mM, lo que pudo afectar negativamente a la producción de eritromicina y por esta razón se observa una menor producción de antibiótico en la concentración más alta. El pH no presentó variaciones en asparagina 20 mM, a diferencia de asparagina 40 mM en donde se observó un incremento del mismo a partir de las 144 horas, probablemente debido a la alta acumulación de amonio en el medio.

Valina en concentraciones de 20 mM y 40 mM (Figura 8) fue mala fuente de nitrógeno para *Saccharopolyspora erythraea* CA340 y por tanto se observó un muy bajo crecimiento, mientras que se encontró una producción volumétrica moderada y una excelente producción específica, pero debido al poco crecimiento. Es probable que en estas condiciones, el cultivo se esté comportando como un sistema de células en reposo y por lo tanto existe producción de eritromicina aunque no haya un buen crecimiento, lo que a su vez hace que se incremente la producción específica ya que, inclusive, en ambos casos la biomasa tiende a disminuir. El pH del medio de

cultivo no sufrió variaciones y mantiene un valor promedio de 7.6. La concentración de amonio extracelular es baja a lo largo de la fermentación, excepto en valina 40 mM en donde se presenta un aumento a las 168 horas. En isoleucina 20 mM (Figura

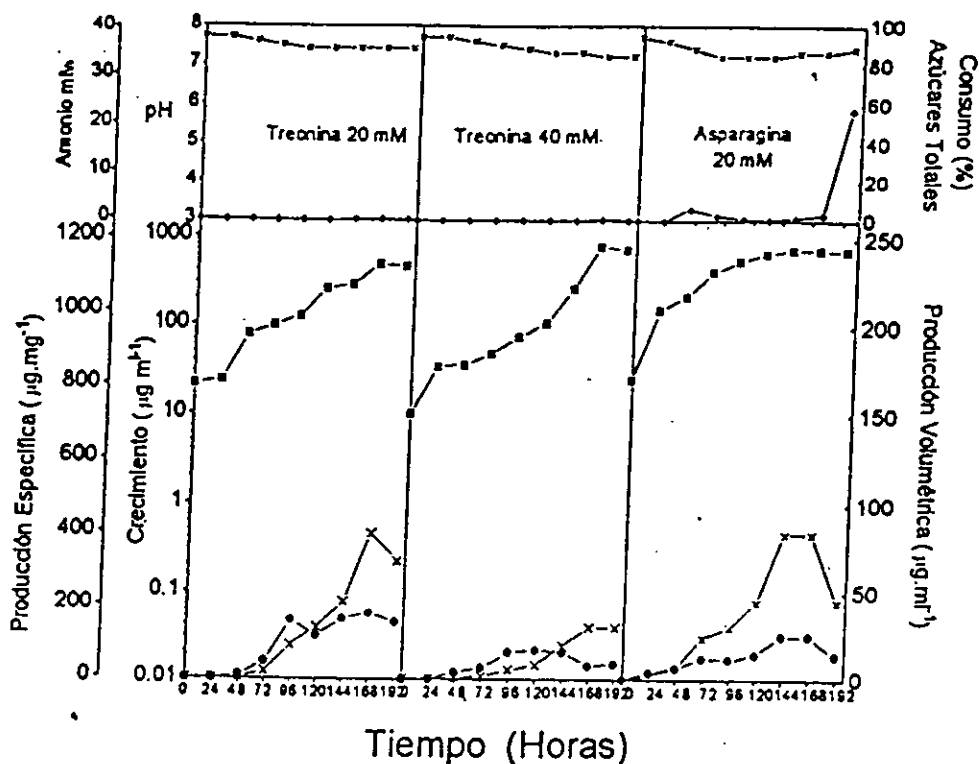


Fig. 7. Perfil de crecimiento (■), de producción volumétrica (X), producción específica de eritromicina (●), consumo de azúcares (-), concentración de amonio extracelular (◆) y pH del medio de cultivo (*) de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 crecida en medio mínimo con sacarosa al 2% y las fuentes de nitrógeno indicadas en la figura, bajo las condiciones descritas en material y métodos.

9) el crecimiento es muy lento y el inicio de ambas producciones fue a las 24 horas y alcanza su máximo valor a las 120 horas.

Por otro lado, metionina (20 y 40 mM; Figura 9) y triptófano (20 y 40 mM; Figura 10) no permitieron crecimiento alguno ni una producción volumétrica y

específica aceptables. El valor promedio de pH en metionina 20 mM fue de 7.8 y de 7.5 en metionina 40 mM y no presentó variaciones significativas en triptofano.

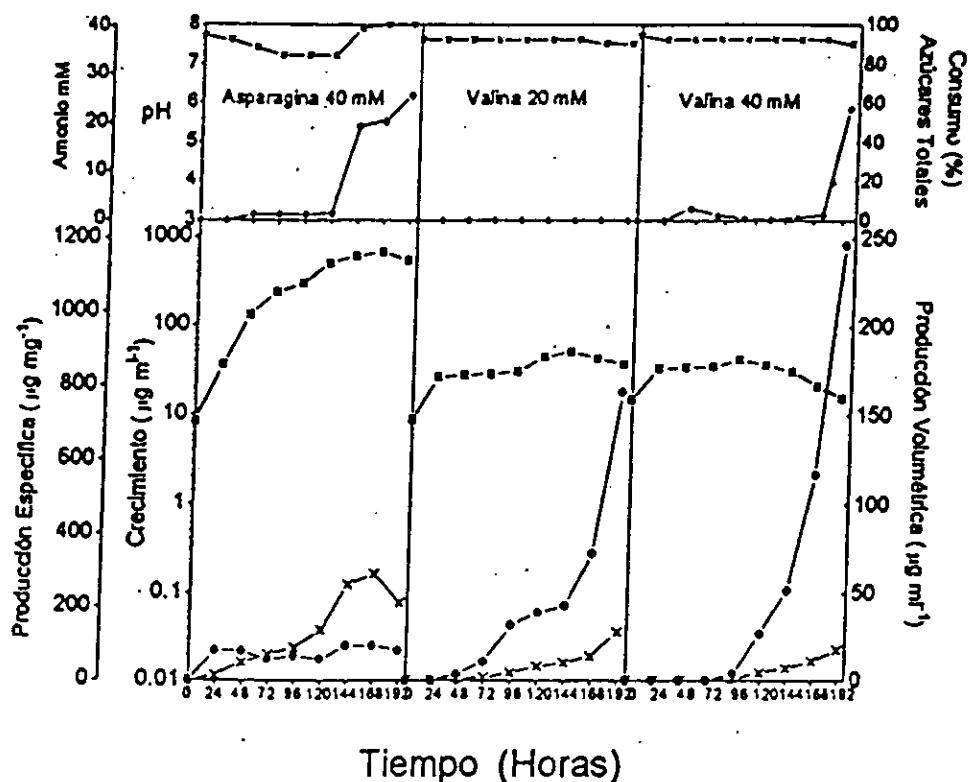


Fig. 8. Perfiles de crecimiento (■), de producción volumétrica (X), producción específica de eritromicina (●), consumo de azúcares (-), concentración de amonio extracelular (◆) y pH del medio de cultivo (*) de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 crecida en medio mínimo con sacarosa al 2% y las fuentes de nitrógeno indicadas en la figura, bajo las condiciones descritas en material y métodos.

Los resultados obtenidos con las diferentes fuentes de nitrógeno nos indicaron que los aminoácidos como la alanina y la treonina, que al ser degradados se incorporan a nivel de ác. pirúvico (Lehninger y col., 1993), no provocaron un incremento en la producción de eritromicina ni en la generación de los precursores, por el contrario afectaron negativamente la producción de eritromicina, por razones que se desconocen.

Otros aminoácidos, como la asparagina cuya desaminación genera ácido aspártico (Lehninger y col., 1993), permite un buen crecimiento, sin embargo, la producción de eritromicina no fue similar a la obtenida en glicina. Esto pudo deberse a la acumulación de amonio que provoca una disminución en la síntesis del antibiótico (Flores y Sánchez, 1985).

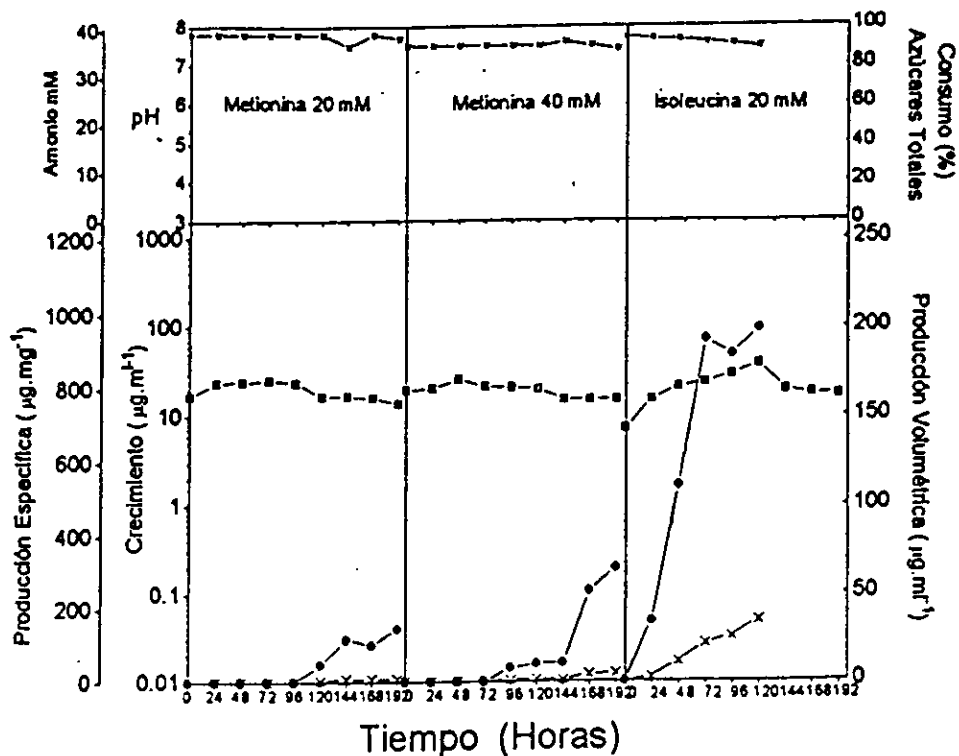


Fig. 9. Perfiles de crecimiento (■), de producción volumétrica (X), producción específica de eritromicina (●), consumo de azúcares (-) y pH del medio de cultivo (*) de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 crecida en medio mínimo con sacarosa al 2% y las fuentes de carbono indicadas en la figura, bajo las condiciones descritas en material y métodos.

Otros aminoácidos como la metionina y el triptofano no fueron utilizados como fuentes de nitrógeno, lo que nos sugiere que *Sac. erythraea* CA340 no tiene la información genética para su transporte y/o su degradación. Por otro lado, la valina y la isoleucina, cuya degradación podría generar propionilCoa y metilmalonilCoA, fueron pobres fuentes de nitrógeno, lo que originó un crecimiento casi nulo, sin

embargo hubo producción de eritromicina, lo que podría indicar que generan precursores a través de su degradación y que éstos se incorporan a la síntesis de eritromicina más fácilmente ya que no se desvían hacia crecimiento, el cual es muy pobre. Es la única explicación posible, ya que otros aminoácidos, como ya se mencionó, no permiten crecimiento ni producción de antibiótico.

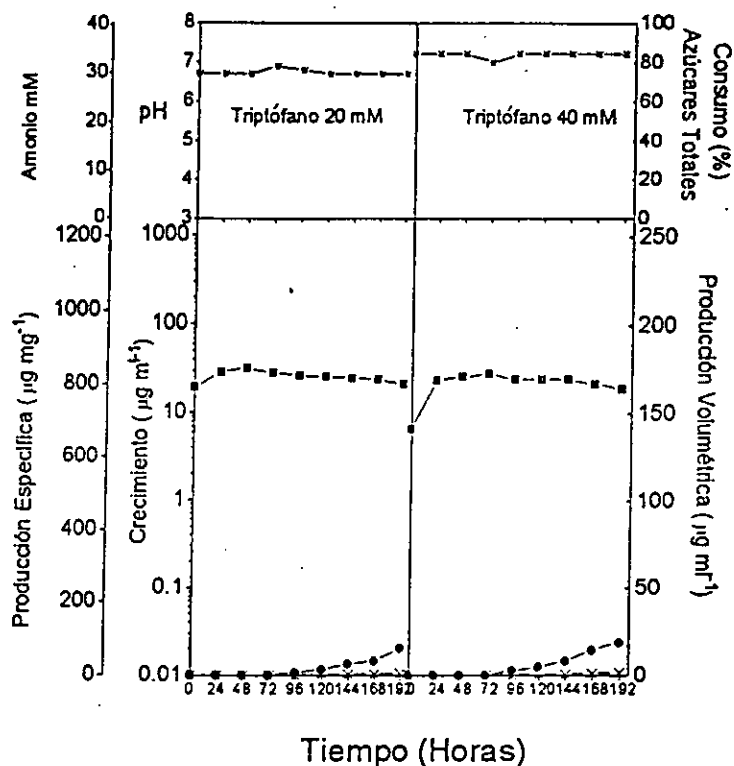


Fig. 10. Perfiles de crecimiento (■), de producción volumétrica (X), producción específica de eritromicina (●), consumo de azúcares (-) y pH del medio de cultivo (*) de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 crecida en medio mínimo con sacarosa al 2% y las fuentes de carbono indicadas en la figura, bajo las condiciones descritas en material y métodos.

Estudios realizados por Untrau y col. (1994) demostraron que algunos aminoácidos al ser utilizados como fuentes de nitrógeno, afectaron de modo

diferente la producción de espiramicina por *Streptomyces ambofaciens*, dependiendo de como eran desaminados y de su capacidad para suministrar precursores tales como acetato, propionato e isobutirato. Arginina, el cual contiene cuatro grupos amino, condujo a una alta excreción de dicho compuesto, lo cual disminuyó la producción de espiramicina. Por el contrario el catabolismo de lisina, el cual es transaminado y no desaminado como arginina, originó una baja concentración de amonio en el medio y favoreció la formación de acetilCoA precursor de la aglicona de espiramicina, incrementando la producción de dicho antibiótico.

De modo semejante, también ha sido reportada la disminución de nourseotricina por *Streptomyces noursei* debido a la acumulación de amonio proveniente de la desaminación de aminoácidos tales como alanina (Grafe y col., 1978).

Al igual que en estos microorganismos productores de antibióticos, el catabolismo de ciertos aminoácidos usados como fuente de nitrógeno podría estar afectando la producción de eritromicina en *Sac. erythraea* CA 340 como se señaló anteriormente. Aunque, a diferencia de lo observado en este trabajo, valina e isoleucina han mostrado ser buenas fuentes de nitrógeno para *Streptomyces fradiae*, microorganismo productor de tilosina y para *Streptomyces ambofaciens*, productor de espiramicina y además funcionaron como una importante fuente de ácidos grasos precursores para las agliconas de dichos antibióticos (Lebrihi y col., 1992; Tang y col., 1994; Lounes y col., 1995b). Así mismo, treonina estimula la producción de tilosina en *S. fradiae* (Vancura y col., 1988). Esto sugiere que la influencia de la fuente de nitrógeno sobre la producción de un antibiótico en particular, va a depender de que el microorganismo productor posea la información genética para su transporte y/o degradación. En este sentido, *Sac. erythraea* exhibió muy baja actividad de valina deshidrogenasa (enzima que cataliza la desaminación oxidativa de los aminoácidos de cadena ramificada) en diferentes condiciones de crecimiento (Navarrete y col., 1990), y por lo tanto no puede generar propionilCoA a partir de

este aminoácido. Estos datos sumados al hecho de que ninguna hibridización fue observada entre el material genético de este microorganismo y un sonda de VDH obtenida a partir de *Streptomyces coelicolor* (Tang y Hutchinson, 1993), concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo, donde se encontró que *Sac. erythraea* no puede utilizar a la valina como fuente de nitrógeno por carecer de la actividad de VDH y por lo tanto esta ruta de formación de propionilCoA a partir de aminoácidos no funciona en este microorganismo.

Los resultados anteriores indicaron que los precursores de la molécula de eritromicina podrían generarse únicamente a partir de succinilCoA. De acuerdo a la literatura, el metilmalonilCoA se puede formar a partir del succinilCoA, proveniente del ciclo de Krebs utilizando a la metilmalonilCoA mutasa y a partir del mismo propionilCoA a través de la enzima propionilCoA carboxilasa. Este último compuesto se genera por descarboxilación del metilmalonilCoA a través de la enzima metilmalonilCoA descarboxilasa (Figura 4).

Como ya se mencionó anteriormente, la actividad de las tres enzimas, ya fue reportada en *Saccharopolyspora erythraea* CA340, sin embargo no se han descrito los perfiles de actividad de todas ellas, bajo las mismas condiciones de crecimiento ni como se regula su síntesis. Por lo tanto, en principio se decidió obtener los perfiles de la mutasa, descarboxilasa y de carboxilasa en este microorganismo crecido en un medio mínimo con sacarosa y glicina como fuentes de carbono y nitrógeno, condiciones en las cuales se obtiene un buen crecimiento y una buena producción de eritromicina. Hay que mencionar que también se determinó la actividad de la isocitrato deshidrogenasa (ICDH), enzima que participa en el ciclo de Krebs, para poder tener un punto de comparación con una enzima que participa en el metabolismo primario.

En la figura 11 se muestran los resultados de crecimiento y producción volumétrica de eritromicina, así como los perfiles de las enzimas mencionadas y se puede observar que este microorganismo presentó una curva de crecimiento y de producción de eritromicina similares a las obtenidas anteriormente. Bajo estas

condiciones de crecimiento, se detectó actividad de isocitrato deshidrogenasa desde las primeras horas de la fermentación, presentando su máxima actividad a las 72 horas momento a partir del cual disminuyó. Hay que enfatizar que en *Saccharopolyspora erythraea* CA340, la síntesis de la isocitrato deshidrogenasa estuvo asociada al crecimiento, a diferencia de otros microorganismos Gram positivos como *Bacillus subtilis*, en donde la síntesis de la ICDH se inició en la fase estacionaria (Jin y Shonenshein, 1994b) y como *Corynebacterium glutamicum* en donde la actividad específica de ICDH mostró ser independiente de la fase de crecimiento (Eikmanns y col., 1995). Por el contrario, la síntesis de la ICDH asociada a la fase de crecimiento exponencial ha sido reportada en el hongo zigomicete *Phycomyces blakesleeanus* (Alvarez y col., 1996). Es importante mencionar que, hasta donde sabemos, no existen reportes de la actividad de isocitrato deshidrogenasa o de alguna otra enzima del ciclo de Krebs en actinomicetos productores de antibióticos.

A diferencia de lo observado en actinomicetos, la enzima ICDH ha sido extensivamente estudiada a diferentes niveles en otros microorganismos debido a su importante papel en el suministro de intermediarios claves del metabolismo energético, así como de precursores y poder reductor para vías anabólicas. La ICDH más estudiada es la de *Escherichia coli*, la cual está constituida por dos subunidades idénticas, cuya actividad es regulada por fosforilación y cuyo gen ha sido clonado y secuenciado (Thorsness y Koshland, 1987; La Porte, 1993; Miller y col., 1996). Otras ICDH estudiadas han sido las de *Corynebacterium glutamicum* (Eikmanns y col., 1995), *Bacillus subtilis* (Jin y Sonenshein 1994a, 1994b), levaduras (Zhao y McAlister-Henn, 1996), *Thermus aquaticus* (Miyazaki, 1996), *Cephalosporium acremonium* (Olano y col., 1995), *Phycomyces blakesleeanus* (Alvarez y col., 1996) y las de cyanobacterias (Muro y col., 1996; Muro y Florencio, 1994). La mayoría de los estudios de las ICDH mencionadas están relacionados con la clonación y secuenciación de sus genes, así como con la caracterización de las mismas. A pesar de ciertas diferencias estructurales, la mayoría de las ICDH coinciden en el

requerimiento de manganeso o magnesio para su actividad, inhibición por oxaloacetato más glioxalato y su alta afinidad hacia isocitrato. Además la secuencia de aminoácidos muestra de un 60 a un 74% de similitud entre las diferentes enzimas.

Por lo que respecta a la actividad de metilmalonilCoA mutasa, ésta se detectó desde las primeras horas de la fermentación presentando su máxima actividad a las 72 horas ($512.26 \text{ pmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) para luego decaer. La actividad de esta enzima también se incrementó conforme el crecimiento aumentaba. De igual manera, el perfil de la producción volumétrica de eritromicina fue paralelo al de mutasa como el de la isocitrato deshidrogenasa (Fig 11).

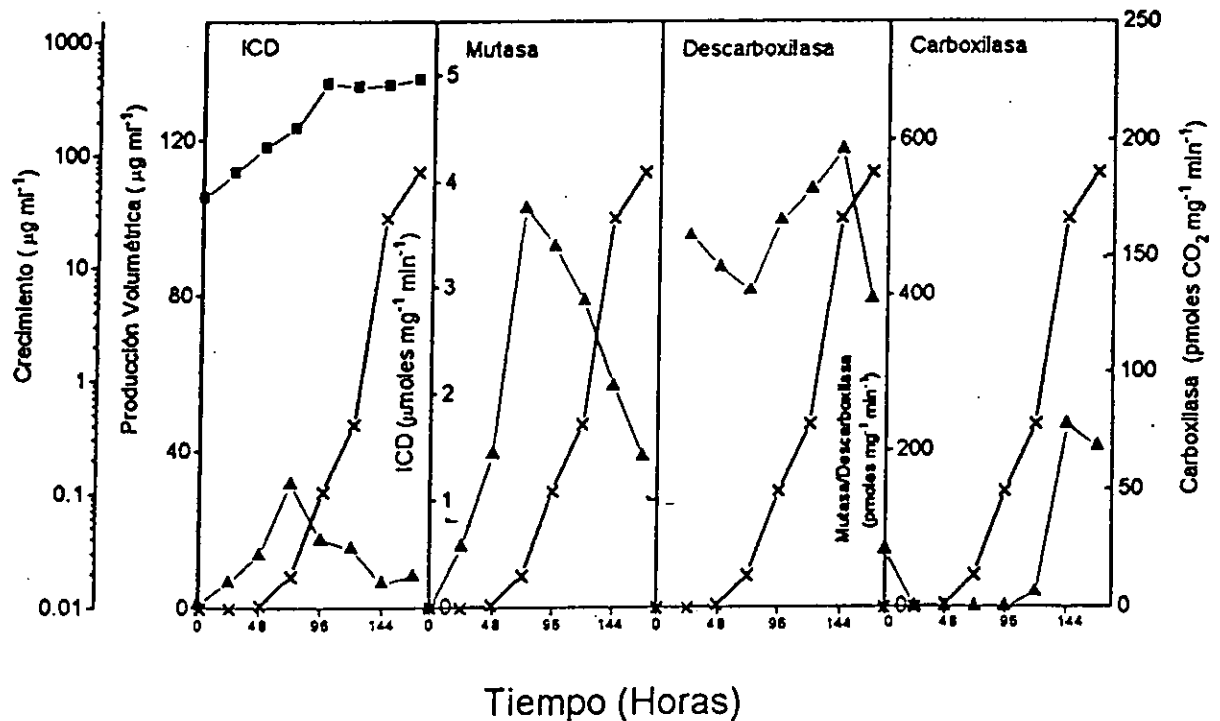


Fig. 11. Perfiles de crecimiento (■), producción volumétrica (X) de eritromicina, de actividad de isocitrato deshidrogenasa (▲), metilmalonilCoA mutasa (▲); metilmalonilCoA descarboxilasa (▲) y propionilCoA carboxilasa (▲) de *Saccharopolyspora erythraea* CA 340 crecida en medio mínimo con sacarosa al 2% y glicina 20 mM bajo las condiciones descritas en material y métodos.

Cabe señalar que en ninguno de los trabajos realizados sobre metilmalonilCoA mutasa en otros microorganismos, se indica alguna asociación entre el perfil de producción de esta enzima y la etapa de crecimiento. Los mismos se han limitado a la clonación y secuenciación de los genes que codifican a la enzima o a el aislamiento, purificación y caracterización de la misma. Al respecto, la metilmalonilCoA mutasa fue purificada a homogeneidad de *Propionibacterium shermanii*, en donde presentó una Mr aparente de 165000 daltones estando formada por dos subunidades diferentes de Mr 79000 y 67000 daltones respectivamente (Francalanci y col., 1986). El gen estructural para metilmalonilCoA mutasa de *Streptomyces cinnamonensis* fue clonado usando una sonda de un gene heterólogo que codificaba para la mutasa de *Propionibacterium shermanii* (Birch y col., 1993) y dos genes que codifican para dicha enzima han sido caracterizados en *Porphyromonas gingivalis* (Jackson y col., 1995). Por otra parte la actividad de dos metilmalonilCoA mutasas fue determinada en células de *Euglena gracilis* Z adaptadas a propionato, permitiendo, una de ellas, la fotoasimilación de dicho compuesto (Watanabe y col., 1996). Además, una vía involucrando a esta enzima ha sido descrita en la producción de los precursores del antibiótico macrólido tilosina (Omura y col., 1977).

Por otro lado, el perfil de producción de la descarboxilasa se incrementó rápidamente a partir del tiempo cero, pero después disminuyó ligeramente a partir de las 24 horas hasta las 72 horas, tiempo a partir del cual volvió a aumentar y alcanza su máximo valor a las 144 horas ($586.8 \text{ pmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Contrario a las dos enzimas anteriores, la actividad de la descarboxilasa no parece estar directamente asociada al crecimiento, aunque si se incrementa cuando la producción del antibiótico también lo hace (fig. 11). A diferencia del papel asignado a la metilmalonilCoA descarboxilasa presente en *Sac. erythraea*, en otros microorganismos, la actividad de esta enzima ha estado asociada con el transporte activo de iones sodio a través de la membrana usando la energía libre de la

descarboxilación de los respectivos sustratos y hasta donde se conoce ningún tipo de asociación con la etapa de crecimiento ha sido descrita (Dimroth, 1987; Hilpert y Dimroth, 1991; Huder y Dimroth, 1993; Huder y Dimroth, 1995). Una malonilCoA descarboxilasa también ha sido purificada de la glándula uropigial de ganso, la cual es estereoespecífica para el isómero S-metilmalonilCoA, el cual es utilizado en la síntesis de ácidos 2,4,6,8 tetrametil ramificados (Kim y Kolattukudy, 1980).

Bajo las mismas condiciones de crecimiento, la actividad de carboxilasa no se detectó hasta las 120 horas, momento en el cual sufrió un aumento para alcanzar un valor de $77.38 \text{ pmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ a las 144 horas, para luego disminuir ligeramente. Al comparar el perfil de actividad de carboxilasa con el de producción de eritromicina, se puede observar que esta enzima aparece después que la síntesis del antibiótico se ha iniciado y cuando el crecimiento se encuentra en fase estacionaria. Esto difiere de la propionilCoA carboxilasa de *S. fradiae* y la acetilCoA carboxilasa de *S. ambofaciens*, enzimas involucradas en la formación de los precursores, cuyas actividades fueron detectadas en las fases de crecimiento activo y de producción del antibiótico en dichos microorganismos (Vu-Trong y Gray, 1987; Laakel y col., 1994a).

Otras carboxilasas han sido reportadas en *Streptomyces coelicolor* (Bramwell y col., 1996), en diferentes especies de micobacterias (Wheeler y col., 1992) y en la glándula uropigial de ganso (Rainwater y Kolattukudy, 1982). Datos sobre su purificación, clonación y regulación han contribuido a ampliar el conocimiento que se tiene de dicha enzima en los microorganismos citados.

También hay que mencionar que los perfiles de actividad de la mutasa, descarboxilasa y carboxilasa obtenidos en *Sac. erythraea* CA 340 en este trabajo, no se asemejan a los reportados por Hunaiti y Kolattukudi (1982, 1984a, 1984b) y por Hsieh y Kolattukudy (1994), aunque las condiciones de crecimiento no son las mismas, ya que ellos usan un medio que contiene únicamente sacarosa y alanina y donde el microorganismo ya no puede crecer. Otra diferencia importante es que estos autores usaron malonilCoA en lugar de metilmalonilCoA, como sustrato para la

descarboxilasa, por lo que las actividades enzimáticas detectadas pudieran ser diferentes.

Estos resultados indicaron que tanto la isocitrato deshidrogenasa como la mutasa son enzimas que están asociadas al crecimiento y por lo tanto se pudieran también asociar al metabolismo primario, mientras que la descarboxilasa no depende de la etapa de crecimiento en que se encuentre el microorganismo y la carboxilasa se sintetiza cuando *Sac. erythraea* ha dejado de crecer, es decir, en la etapa de metabolismo secundario. El hecho de que las tres enzimas estén presentes en una misma condición de crecimiento, aunque a diferentes tiempos podría sugerir que la síntesis de los precursores se lleva a cabo primero a través de la mutasa-descarboxilasa y en etapas tardías de crecimiento, cuando la actividad de la mutasa está disminuyendo, el propionilCoA se podría carboxilar para dar origen a metilmalonilCoA, utilizando la propionilCoA carboxilasa. Sin embargo, Donadio y col. (1996) encontraron que mutantes de *Sac. erythraea* desprovistas de la actividad de propionilCoA carboxilasa eran todavía capaces de producir eritromicina cuando crecían en un medio complejo. Esto podría indicar o que realmente la carboxilasa no tiene un papel importante en la formación del metilmalonilCoA o que en ciertas condiciones de crecimiento sustituye a la mutasa en la generación de este compuesto, estableciéndose dos rutas de formación del metilmalonilCoA.

En este sentido, varias vías han sido descritas en *S. ambofaciens* y *S. aureofaciens* que conducen a la formación de los precursores del anillo lactónico de espiramicina y tetraciclina respectivamente, aunque a diferencia de lo encontrado en el presente trabajo, dichas rutas no fueron detectadas en una misma condición nutricional de crecimiento de esos microorganismos, sino cuando se utilizaban fuentes de nitrógeno específicas (Behal y col., 1977; Laakel y col., 1994b).

Habiendo establecido los perfiles de las actividades de mutasa, descarboxilasa, carboxilasa e isocitrato deshidrogenasa en *Sac. erythraea* CA 340 crecida en sacarosa y glicina, nos interesó saber si su síntesis se afectaba por la fuente de carbono o de nitrógeno, tal como sucede con la producción de eritromicina

(Escalante y col., 1982; Flores y Sánchez, 1985). Por esta razón se obtuvieron los perfiles de estas enzimas en presencia de otras fuentes de nitrógeno como el cloruro de amonio, el cual sabíamos que iba a reprimir la síntesis del antibiótico y en presencia de glucosa que también afecta negativamente la producción de eritromicina.

En la figura 12 se muestran los perfiles de crecimiento y producción volumétrica de eritromicina de *Sac. erythraea* CA 340 crecida en alanina 20 mM, en cloruro de amonio 20 y 40 mM y glicina 20 mM como control, utilizando sacarosa como fuente de carbono. El crecimiento obtenido fue muy similar en glicina, alanina y 20 mM de amonio, mientras que en 40 mM de amonio la velocidad de crecimiento disminuye aunque alcanza el mismo máximo que en las condiciones anteriores. La producción volumétrica disminuyó 26.87, 77.11 y 88.61% en alanina, NH₄Cl 20 mM y NH₄Cl 40 mM, respectivamente con respecto a la obtenida en glicina. En la misma figura 12 se muestran los resultados obtenidos al determinar la actividad de isocitrato deshidrogenasa y se puede observar que en alanina, en 20 o 40 mM de NH₄Cl, la actividad disminuye en un 50% aproximadamente.

La regulación por nitrógeno de ICDH ha sido reportada en organismos fotosintéticos como las cyanobacterias, en donde el promotor del gene de ICDH (*icd*) es un promotor regulado por el activador transcripcional NtcA, el cual ha sido identificado como un elemento regulatorio del mecanismo de control de nitrógeno en *Cyanobacteria*. Así la expresión del gen *icd* y de aquellos otros genes que participan en la asimilación del nitrógeno está coordinada (Muro y col., 1996).

Por lo que respecta a mutasa (Figura 13), en glicina y alanina, los perfiles son similares, incrementándose en las primeras horas para alcanzar el máximo a las 72 y 48 horas respectivamente. En las dos condiciones decae la actividad posteriormente. Cabe señalar que el perfil de producción de la enzima obtenido en alanina es muy similar al reportado por Hunaiti y Kolattukudy (1984a), aunque el perfil de producción de eritromicina varía, porque lo que estos autores utilizan es un sistema de células en reposo en donde hay producción pero no crecimiento. En

nuestras condiciones, si observamos crecimiento. Por otra parte en las dos concentraciones de amonio, el perfil se mantiene como en glicina, pero la actividad es ligeramente menor que en esta fuente de nitrógeno. En la figura 13 se observa que hubo una disminución de la actividad de mutasa de 15% en amonio 40 mM con respecto a la obtenida en el control, aunque al final se incrementa.

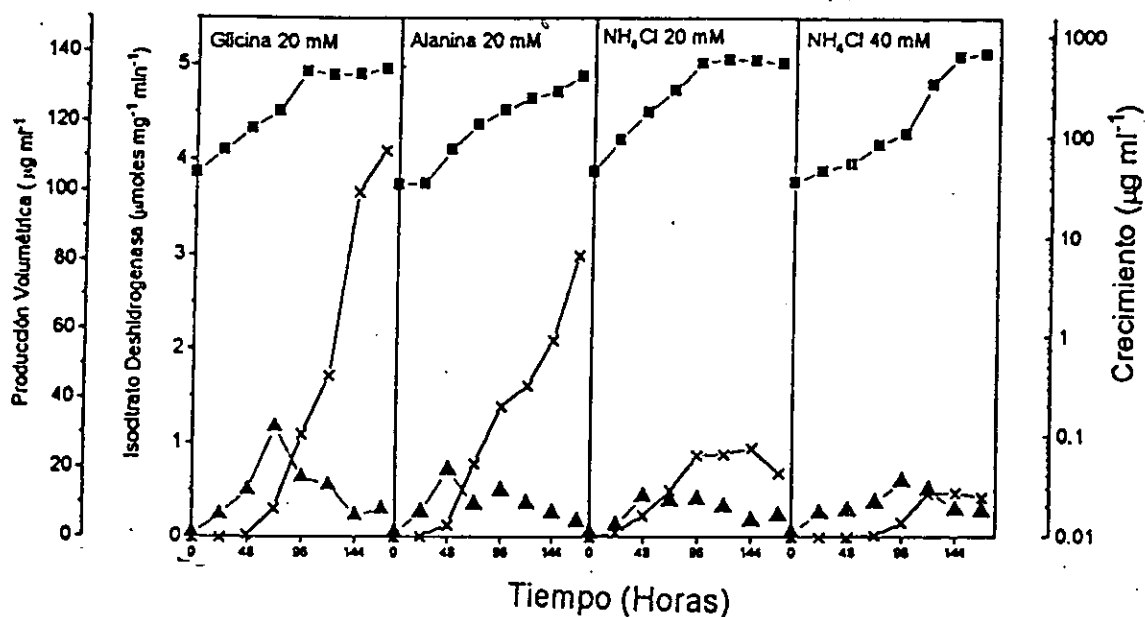


Fig. 12. Perfiles de de crecimiento (■); de producción volumétrica de eritromicina (X) y de actividad de isocitrato deshidrogenasa (▲) de *Saccharopolyspora erythraea* CA 340 crecida en medio mínimo con sacarosa al 2% y con las fuentes de nitrógeno indicadas en la figura, bajo las condiciones descritas en material y métodos.

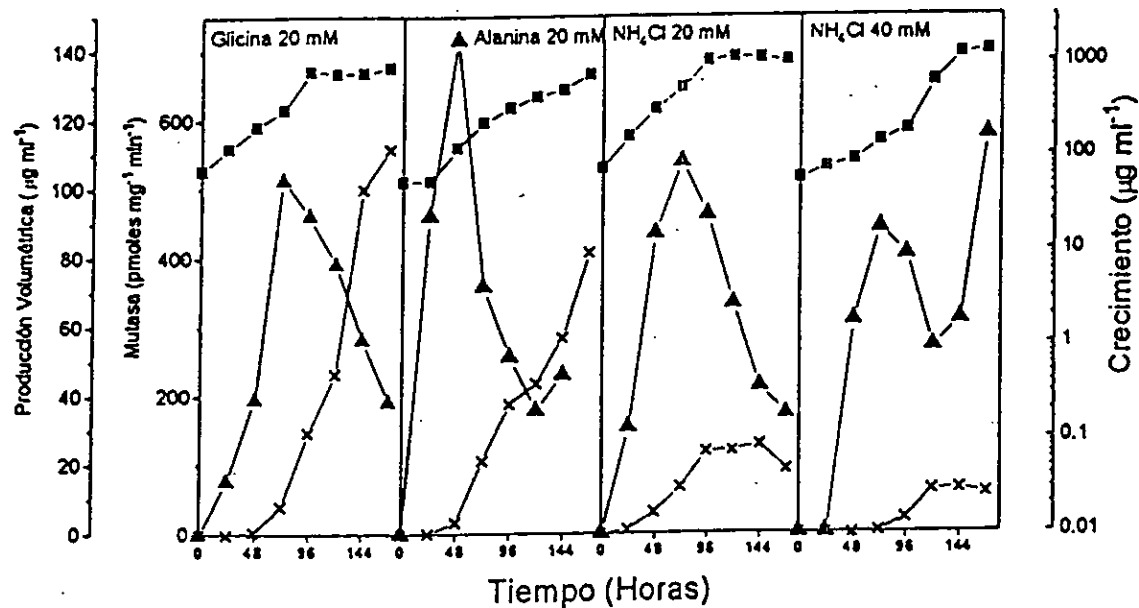


Fig. 13. Perfiles de actividad de metilmalonilCoA mutasa (▲), de crecimiento (■) y de producción volumétrica de eritromicina (X) de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 crecida en medio mínimo con sacarosa al 2% y con las fuentes de nitrógeno indicadas, bajo las condiciones descritas en material y métodos.

Esta disminución que también se observa en la actividad de isocitrato deshidrogenasa podría deberse a que la asimilación del amonio en NH_4Cl procede a través de la deshidrogenasa glutámica, desviando el α -cetoglutarico hacia la síntesis de ác. glutámico en lugar de hacia la formación de succinilCoA y que esto de alguna manera afectara la síntesis de ICDH y de mutasa. En glicina y en alanina, la asimilación del amonio se llevaría a cabo a través de la glutamina sintetasa, por lo que no habría una disminución en la concentración del α -cetoglutarico dentro del

Ciclo de Krebs. La presencia de ambos sistemas enzimáticos involucrados en la asimilación de amonio ha sido demostrada en *Sac erythraea* (Flores y Sánchez, 1989) y en otros microorganismos (Tyler, 1978; Shapiro y Vining, 1983).

Por su parte, Bhuwathanapun y Gray (1981) estudiaron el efecto del glutamato sobre la síntesis de tilosina. En este trabajo ellos detectan actividad de glutamato deshidrogenasa en *S. fradiae* y señalan la importancia de la poza de α -cetoglutarato en la formación de los precursores del protilonólido y sobre la poza de succinilCoA, el cual es un precursor directo de metilmalonilCoA y propionilCoA.

Por lo que respecta a la actividad de la metilmalonilCoA descarboxilasa, los resultados mostraron que la síntesis de esta enzima se inició desde las primeras 24 horas de la fermentación, en todas las fuentes de nitrógeno usadas, con valores que se mantienen dentro de un cierto rango hasta el final de la misma (Figura 14). Dicha enzima no parece estar directamente asociada al crecimiento en ninguna de las condiciones ni su síntesis parece depender de la fuente de nitrógeno. Hasta donde se sabe ningún efecto de la fuente de nitrógeno sobre esta enzima ha sido reportado en *Sac. erythraea*, ni en otros microorganismos.

Como se esperaba, en 20 mM de glicina más sacarosa al 2% (Figura 15), la actividad de carboxilasa se detectó a partir de las 120 horas, para aumentar hasta un valor de 77.38 pmoles de $^{14}\text{CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ a las 144 h, lo que constituyó la máxima actividad encontrada en dicha condición. En alanina 20 mM con la misma fuente de carbono, el perfil de producción de la enzima mostró la misma tendencia que en glicina pero se inició a las 72 horas y alcanzó su máximo nivel (104.95 pmoles $^{14}\text{CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) hasta las 168 horas de la fermentación. De igual manera, en 20 mM de NH_4Cl , el perfil de producción de carboxilasa mostró la misma tendencia ya que se inició a las 96 h y alcanzó su nivel máximo hasta las 144 horas. Este fue un valor de actividad mayor que con glicina o con alanina a las 144 horas. Sorprendentemente, en NH_4Cl 40 mM se obtuvieron los niveles de carboxilasa más bajos de todas las fuentes de nitrógeno usadas, con valores de casi cero hasta las 144 h cuando hubo un ligero aumento (13.7 pmoles $\text{CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Al igual que la

propionilCoA carboxilasa de *Sac. erythraea* CA 340, las actividades específicas de propionilCoA carboxilasa y metilmalonilCoA carboxiltransferasa, las cuales están involucradas en la formación de los precursores del tilonólido en *S. fradiae*, fueron reprimidas en presencia de amonio (Vu-Trong y Gray, 1987).

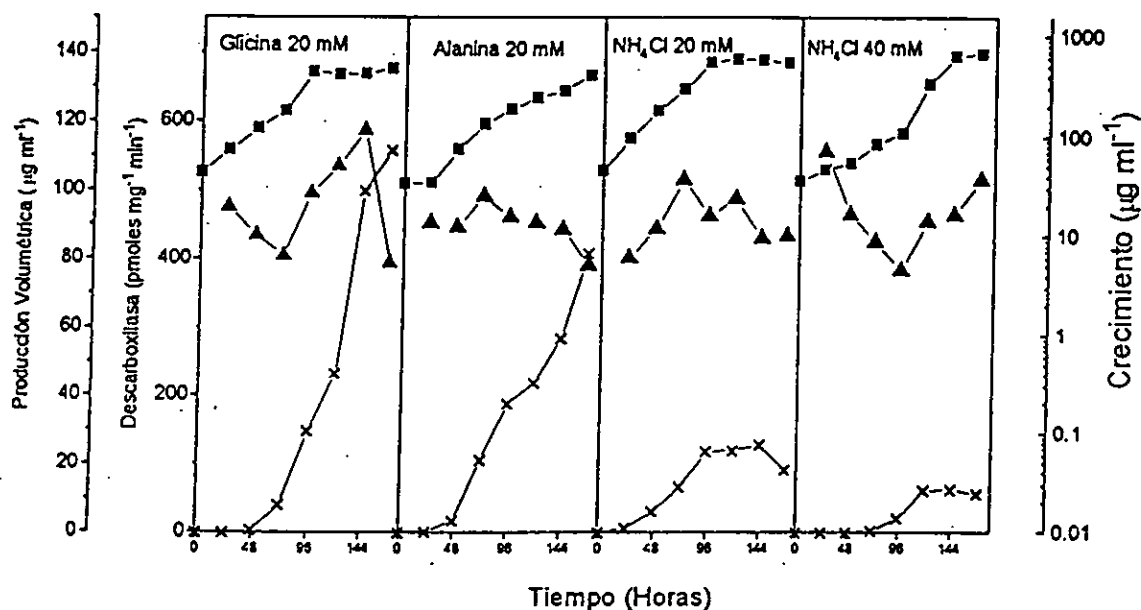


Fig. 14. Perfiles de crecimiento (■), de actividad de metilmalonilCoA descarboxilasa (▲) y producción volumétrica de eritromicina (X) de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 crecida en medio mínimo con sacarosa al 2% con las fuentes de nitrógeno indicadas, bajo las condiciones descritas en material y métodos.

Al contrario de otros microorganismos como *S. ambofaciens* y *S. fradiae* en donde la disminución del antibiótico en presencia de amonio podría atribuirse a la represión de ciertas enzimas involucradas en el suministro de precursores tales como valina deshidrogenasa, propionilCoA carboxilasa y carboxiltransferasa (Vu-

Trong y Gray, 1987, Lebrihi y col., 1992; Vancura y col., 1987), en *Sac. erythraea* pareciera que el suministro de metilmalonilCoA por acción de la carboxilasa o de la mutasa no es el único paso limitante en la vía, ya que a concentraciones de amonio de 20 mM, donde la producción de eritromicina ha disminuído en poco más del 80%, las actividades de dichas enzimas no se ven muy afectadas (Figs. 13 y 15). De igual forma en concentraciones de amonio de 40 mM donde la carboxilasa presenta muy bajos niveles al igual que la producción de eritromicina, la mutasa podría suministrar el metilmalonilCoA requerido para la síntesis del antibiótico (Fig. 13 y 15).

Por otra parte los perfiles de carboxilasa obtenidos mostraron que esta enzima tiene el comportamiento de una enzima de metabolismo secundario, ya que su síntesis se inicia hasta que el crecimiento se encuentra en fase estacionaria, incluso aparece después que la síntesis de eritromicina ha iniciado. Este hecho contradice lo expuesto por Hunaiti y Kolattukudy (1982) sobre la intervención de esta enzima en el suministro de malonilCoA para la síntesis de ácidos grasos en el periodo de rápido crecimiento. De acuerdo a nuestros resultados, la enzima parece participar en la producción del antibiótico exclusivamente, a diferencia de otras carboxilasas a las cuales se les ha atribuído una doble función biológica (Rainwater y Kolattukudy, 1982).

De estos resultados se puede resumir que la isocitrato deshidrogenasa disminuye en un 50% al adicionar NH_4Cl a el medio de cultivo, que la mutasa y la descarboxilasa no se afectan por la fuente de nitrógeno, mientras que carboxilasa se reprime en un exceso de amonio, aunque su síntesis podría estar retrasada porque el crecimiento también se retarda.

Cabe señalar que a diferencia de *Sac. erythraea* en donde el metabolismo del succinato hacia ácidos grasos precursores por acción de la mutasa no se afecta por la fuente de nitrógeno, en *S. fradiae* amonio si reprime dicho metabolismo y dos enzimas que participan en el mismo han sido señaladas como posibles blanco. Ellas son metilmalonilCoA mutasa y metilmalonilCoA carboxiltransferasa (Tanaka y col., 1986).

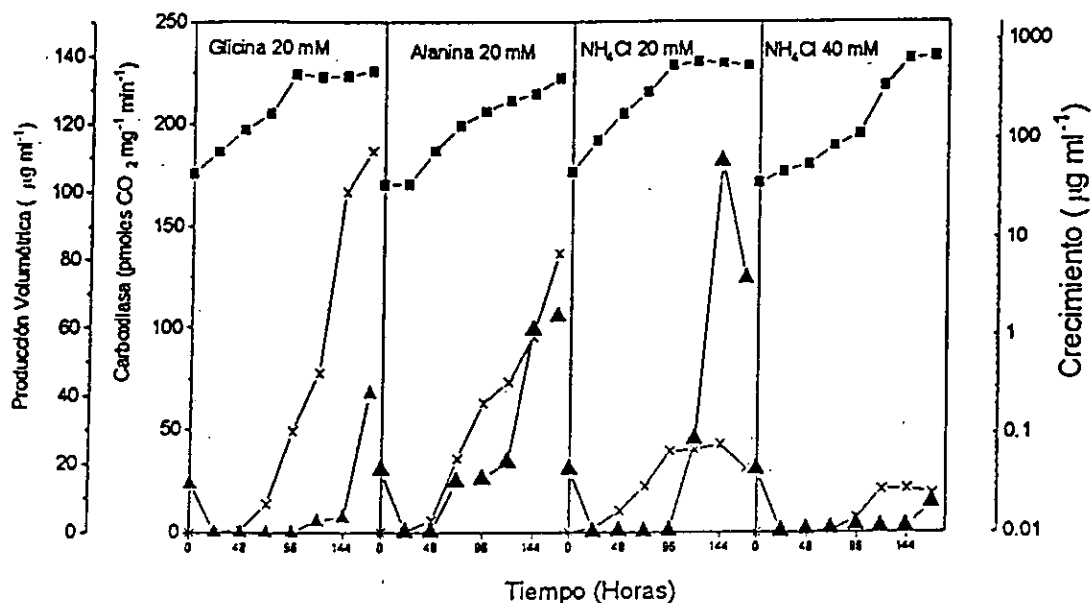


Fig. 15. Perfiles de crecimiento (■), actividad de propionilCoA carboxilasa (▲) y de producción volumétrica de eritromicina (X) de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 crecida en diferentes fuentes de nitrógeno bajo las condiciones descritas en material y métodos.

Por otro lado, también se creció a *Sac. erythraea* CA340 en glucosa 1 y 4% manteniendo en ambos casos a la glicina como fuente de nitrógeno, para tratar de establecer alguna influencia de la fuente de carbono sobre la síntesis de estas enzimas. En la figura 16 se muestran los resultados de crecimiento y producción volumétrica. En presencia de glucosa al 1% y glicina se presentó una fase lag de 48 horas, seguida por un crecimiento logarítmico hasta las 120 horas, momento en el cual se inició un crecimiento estacionario; los valores de crecimiento obtenidos fueron similares a los de sacarosa al 2%. Las producciones volumétrica y específica de eritromicina disminuyeron con respecto a las obtenidas en sacarosa. Ambas

producciones comenzaron a las 48 horas y alcanzaron su máximo valor a las 168 horas y 96 horas respectivamente. Con glucosa al 4% y glicina se presentó un crecimiento máximo similar al obtenido con sacarosa al 2% y glucosa al 1%, con una fase lag de 72 h y una fase logarítmica hasta las 144 horas, momento en el cual disminuye el crecimiento. La producción volumétrica inició a las 48 horas y alcanzó su máximo valor a las 168 horas y disminuye con respecto a sacarosa al 2%.

Bajo estas mismas condiciones se obtuvieron los perfiles de actividad de las cuatro enzimas anteriores, isocitrato deshidrogenasa, mutasa, descarboxilasa y carboxilasa para observar si la fuente de carbono regulaba la síntesis de alguna de ellas, ya que la glucosa también reprime la síntesis de eritromicina (Escalante y col., 1982).

El perfil de producción de isocitrato deshidrogenasa en presencia de sacarosa al 2% y glicina 20 mM se muestra en la figura 16, en donde se puede observar que la actividad se inició a partir de las primeras 24 horas de la fermentación, incrementándose hasta las 72 horas, momento a partir del cual disminuyó para llegar casi a cero. En glucosa al 1%, el perfil de producción de esta enzima mostró la misma tendencia que en sacarosa al 2%, pero alcanzó un valor más alto a las 72 horas ($3,4 \mu\text{moles}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Cuando la glucosa se adicionó a una concentración del 4%, los niveles de producción de esta enzima son menores que en glucosa 1% pero mayores que en sacarosa. La actividad se inició a las 24 horas y alcanzó su máximo valor a las 96 horas ($2,06 \mu\text{moles mg}^{-1} \text{min}^{-1}$). Al cambiar a glucosa como fuente de carbono, nuevamente la actividad de la isocitrato deshidrogenasa es mayor y precede a la producción de eritromicina, la cuál se ve reprimida por este azúcar. Estos resultados indican que la ICDH se induce por la presencia de glucosa, aunque a valores muy altos, la síntesis tiende a disminuir. Esto podría indicar que en presencia de este azúcar, el metabolismo intermedio tiende a estar aumentado, a fin de obtener el máximo de energía y poder reductor.

Varios reportes señalan que la síntesis de la ICDH en otros microorganismos varía cuando las células están creciendo sobre diferentes fuentes de carbono,

aunque una ICDH constitutiva fue descrita en *Corynebacterium glutamicum* (Eikmanns y col., 1995). En bacterias entéricas tales como *E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Serratia marcescens*, la actividad específica de ICDH resultó ser de tres a cuatro veces más baja durante el crecimiento con acetato que durante el crecimiento con glucosa (Bennet y Holms, 1975). Estudios adicionales con *E. coli* revelaron que este cambio en la actividad específica se debe a una modificación covalente reversible de la enzima por un mecanismo de fosforilación y desfosforilación (La Porte, 1993). En otras bacterias tales como *Bacillus subtilis*, varias actividades enzimáticas que forman parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ejm: citrato sintasa, aconitasa e ICDH) son reducidas casi dos veces, en presencia de una fuente de carbono que se metaboliza rápidamente como la glucosa (Jin y Shonenshein, 1994b). De igual forma en *Phycomyces blakesleeanus* los niveles de actividad enzimática de ICDH fueron de dos a tres veces más altos en acetato que en glucosa (Álvarez y col., 1996).

Por otro lado, los perfiles de producción de mutasa se muestran en la fig. 17 donde se puede observar que la producción de mutasa en glucosa al 1% comenzó desde el tiempo cero pero muy lentamente para incrementarse después y alcanzar su máximo valor a las 48 horas, el cual fue 69.45% menor que en el disacárido. En glucosa al 4%, la síntesis de la enzima también se inició desde las primeras horas, pero se mantuvo en niveles muy bajos y presentó su máximo valor a las 144 horas ($134.47 \text{ pmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$), disminuyendo en relación a las otras dos fuentes de carbono. En las dos primeras condiciones, la síntesis de la enzima ocurrió antes que la de eritromicina, mientras que en glucosa 4% la aparición de la mutasa se retrasó y fue entonces casi simultánea que la del antibiótico, pero hay que resaltar que el crecimiento se retrasó también por 72 horas.

Es importante señalar que la glucosa esta regulando negativamente la síntesis de esta enzima y por lo tanto se podría estar disminuyendo la cantidad de precursores disponibles para la formación del anillo lactónico a pesar del incremento en la poza de succinilCoA proveniente del ciclo de Krebs, generado por la inducción

de la actividad de ICDH en presencia de esta fuente de carbono. Estos datos, de ninguna manera descartan que la glucosa también este reprimiendo la síntesis de las enzimas que participan directamente sobre la síntesis de la eritromicina.

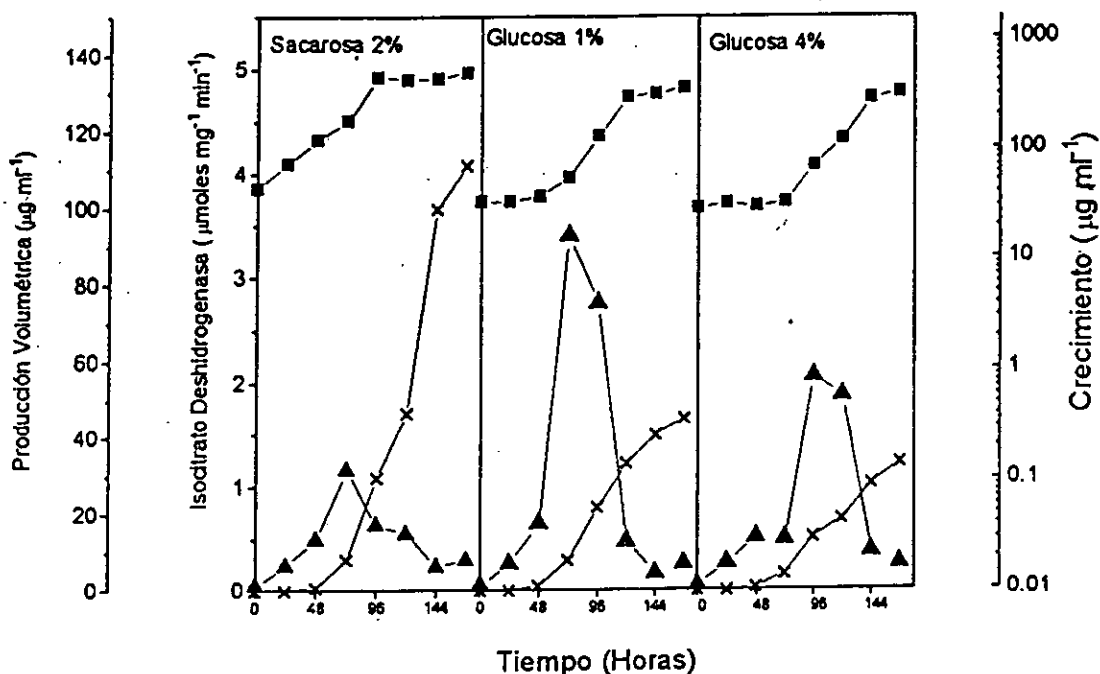


Fig. 16. Perfiles de crecimiento (■), actividad de isocitrato deshidrogenasa (▲) y de producción volumétrica de eritromicina (X) de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 crecida en medio mínimo con sacarosa o glucosa como fuente de carbono, bajo las condiciones descritas en material y métodos.

Por lo que respecta a la actividad de descarboxilasa (Figura 18), también se detectó esta actividad en glucosa al 1% desde las 24 horas de fermentación, se incrementó hasta las 72 horas, para posteriormente disminuir y mantener valores más o menos constantes hasta el final de la misma. De la misma manera, en glucosa

al 4%, la actividad nuevamente apareció desde el inicio de la fermentación y mantiene valores más o menos constantes durante la misma.

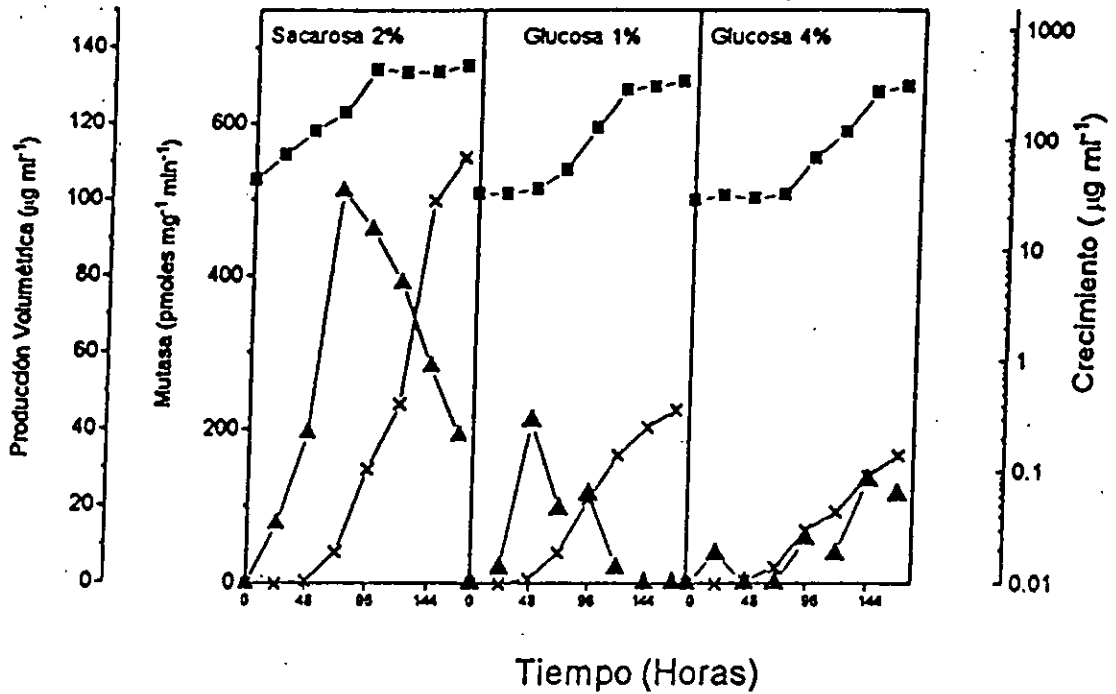


Fig. 17. Perfiles de crecimiento (■), de actividad de metilmalonilCoA mutasa (▲) y de producción volumétrica de eritromicina (X) de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 crecida en medio mínimo con sacarosa o glucosa como fuente de carbono, bajo las condiciones descritas en material y métodos.

En ambos casos, dicha actividad no parece estar directamente relacionada al crecimiento microbiano, ni ser regulada por la fuente de carbono o nitrógeno en particular, por lo tanto podemos decir que la síntesis de la metilmalonilCoA descarboxilasa es constitutiva y no es regulada ni por la fuente de carbono ni de nitrógeno. Esto significa que la síntesis del propionilCoA a partir del metilmalonil procede continuamente a través de la actividad de esta enzima confirmando la

importancia que le dan Hsieh y Kolattukudy (1994) quienes la catalogan como indispensable para la síntesis de la eritromicina.

Por último se obtuvieron los perfiles de actividad de propionilCoA carboxilasa en las dos fuentes de carbono. Los resultados se muestran en la figura 19 y se puede observar que en glucosa al 1%, la producción de carboxilasa inició a partir de

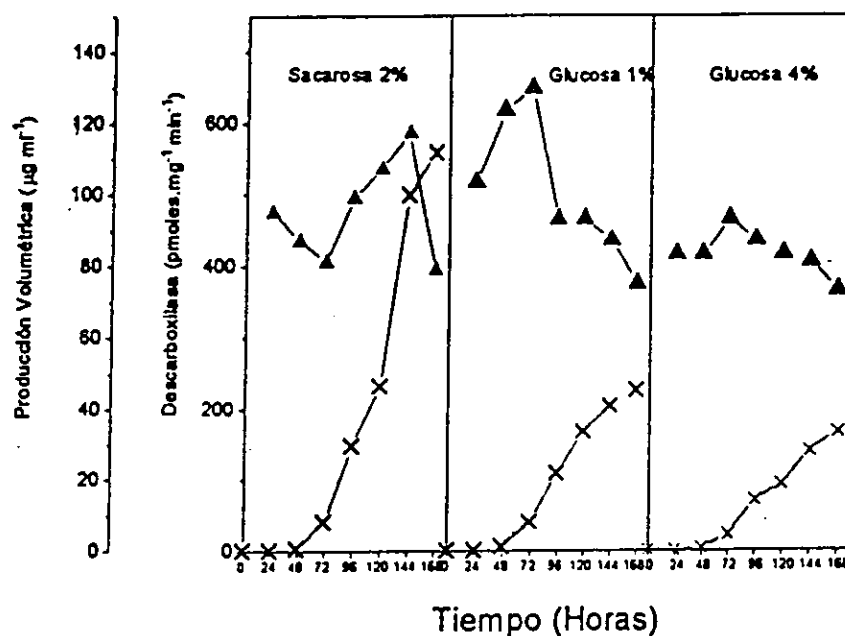


Fig. 18. Perfiles de crecimiento (■), de actividad de metilmalonilCoA descarboxilasa (▲) y de producción volumétrica de eritromicina (X) de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 crecida en medio mínimo con sacarosa o glucosa como fuente de carbono, bajo las condiciones descritas en material y métodos.

las 72 horas con una tendencia similar a la obtenida en sacarosa al 2%, aunque declina drásticamente entre las 144 y las 168 horas. Hay que remarcar que el valor máximo de actividad es tres veces mayor al obtenido en sacarosa (237.1 pmoles

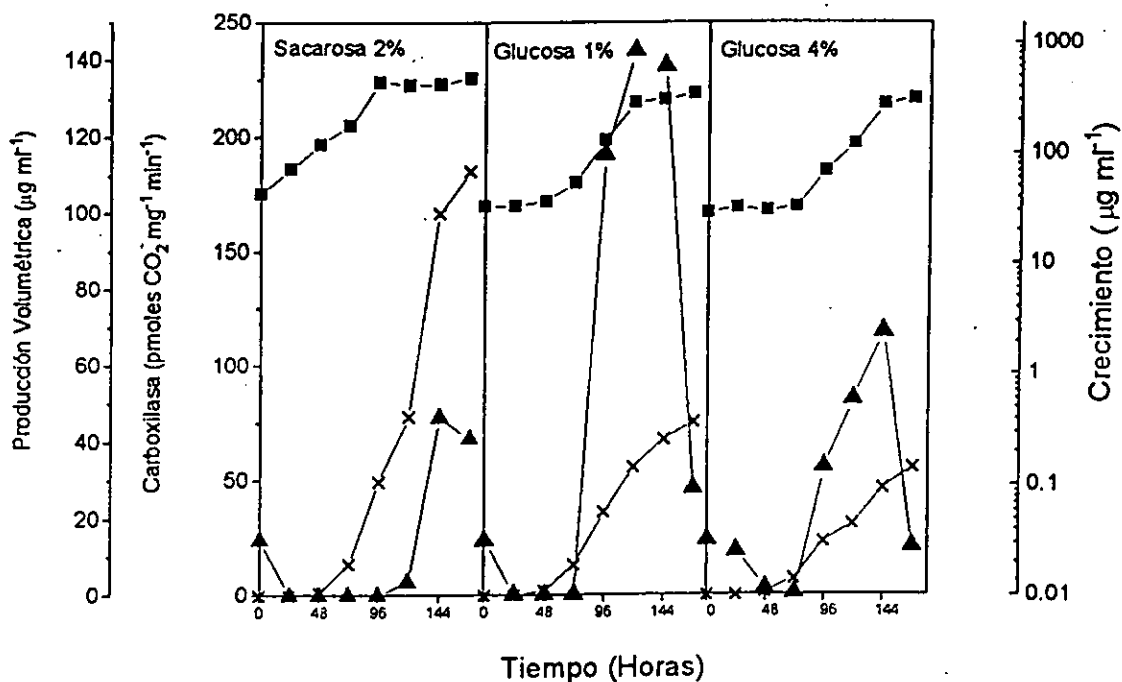


Fig. 19. Perfiles de crecimiento (■), de actividad de propionilCoA carboxilasa (▲), y de producción volumétrica de eritromicina (X) de *Saccharopolyspora erythraea* CA340 crecida en medio mínimo con sacarosa o glucosa como fuentes de carbono, bajo las condiciones descritas en material y métodos.

CO₂ mg⁻¹ min⁻¹). Al igual que en glucosa 1%, el perfil de producción de carboxilasa en la concentración más alta de glucosa se inició al final de la fermentación (96 horas) con su máximo valor a las 144 horas (114.07 pmoles ¹⁴CO₂ mg⁻¹ min⁻¹), el cual es menor que en la concentración anterior de glucosa, pero mayor que en sacarosa.

Cuando glucosa es utilizada, la actividad de esta enzima aparece al mismo tiempo que la síntesis de la eritromicina, probablemente para compensar la disminución en la formación del metilmalonilCoA, ya que la mutasa se encuentra baja en esta fuente de carbono y sería necesario formarlos a través de la carboxilación del propionilCoA, aunque la producción del antibiótico no mejore debido a la posibilidad de que otro paso de la vía este siendo afectado por glucosa tal y como se mencionó anteriormente.

En resumen, se puede decir que la isocitrato deshidrogenasa y la propionil CoA carboxilasa se inducen en presencia de glucosa 1% y disminuyen en glucosa

4%, mientras que la metilmalonil CoA mutasa se reprime por la presencia de este azúcar en el medio de cultivo y la metilmalonil CoA descarboxilasa no es regulada por la fuente de carbono, manteniendo niveles constitutivos durante toda la fermentación.

El efecto negativo de la fuente de carbono sobre la formación de precursores ya ha sido descrito por Lounes y col. (1995a), quienes observaron que la adición de glicerol causó una represión parcial de la valina deshidrogenasa y de la α -cetoisovalerato deshidrogenasa. La represión catabólica por glucosa de valina deshidrogenasa en *Streptomyces coelicolor* también ha sido descrita (Tang y Hutchinson, 1995). En *Sac. erythraea* al no existir la valina deshidrogenasa, sería lógico suponer que la regulación que ejerce glucosa sea a nivel de la metilmalonilCoA mutasa, para prevenir la formación de precursores y por lo tanto un gasto inútil en condiciones en que no se debe sintetizar eritromicina.

Por otra parte y hasta donde se tiene conocimiento la inducción por glucosa de enzimas que participan en el suministro de precursores para la formación de antibióticos tales como la carboxilasa no ha sido descrita hasta el momento, por lo que este sería uno de los primeros reportes sobre el tema.

Tomando en cuenta el papel asignado a cada enzima en la formación de los precursores del anillo lactónico de la eritromicina, propionilCoA y metilmalonil CoA y la reproducibilidad del comportamiento de las mismas en las diferentes condiciones nutricionales, pareciera ser que efectivamente en etapas tempranas del crecimiento dichos precursores se forman a través de la acción de la mutasa y descarboxilasa y en etapas tardías, cuando una fuente de precursores como el ciclo de Krebs ha disminuido su actividad, la carboxilasa viene a suplir la falta de metilmalonilCoA. Por otra parte la única fuente de propionilCoA en *Sac. erythraea* CA 340 parece ser la descarboxilación de metilmalonilCoA, ya que otra fuente como el catabolismo de aminoácidos tales como valina, isoleucina, metionina y treonina pareciera no contribuir eficientemente a su formación en este microorganismo. Este hecho concuerda con lo observado por Hsieh y Kolattukudy (1994) quienes al interrumpir el

gen de esta enzima encuentran que la producción de eritromicina cesa y que la misma es restaurada por la adición de propionato exógeno.

Aunque la fuente de nitrógeno y carbono controlen la síntesis de las enzimas involucradas en la formación de metilmalonilCoA, pudiendo por lo tanto ejercer su efecto represivo sobre la biosíntesis de eritromicina, en principio limitando la producción de los precursores, la disponibilidad de estos compuestos no parece ser el único factor que determine la disminución de eritromicina en presencia de amonio o glucosa, ya que como observamos en los resultados, las enzimas mutasa y carboxilasa no se ven muy afectadas en concentraciones de 20 mM de amonio en donde la producción de eritromicina esta disminuída y en concentraciones de 40 mM de amonio, la mutasa podría suplir la falta de metilmalonilCoA. De igual forma cuando las condiciones nutricionales tales como la fuente de carbono afecta una de las vías como la mutasa, la otra representada por la carboxilasa parece suplir tal falta, sin embargo para que haya propionilCoA se requiere de la presencia de la mutasa para generar metilmalonilCoA y a su vez que éste se descarboxile y de origen al propionilCoA. Lo que sugiere que la mutasa es una enzima muy importante para la generación de los precursores de la molécula de eritromicina.

CONCLUSIONES

- ≈ Isocitrato deshidrogenasa y metilmalonilCoA mutasa se comportan como enzimas de metabolismo primario, estando los perfiles de producción asociados a crecimiento.
- ≈ La síntesis de la metilmalonilCoA descarboxilasa no se asocia a una etapa de crecimiento específicamente.
- ≈ La actividad de propionilCoA carboxilasa se presenta generalmente cuando el crecimiento ha cesado, comportándose como una enzima de metabolismo secundario. La síntesis de esta enzima es estimulada por 1% de glucosa y reprimida por 40 mM de amonio y por 4% de glucosa.
- ≈ La síntesis de isocitrato deshidrogenasa es estimulada por 1% de glucosa y reprimida por amonio y por 4% de glucosa.
- ≈ La síntesis de metilmalonilCoA mutasa es afectada negativamente por glucosa, pero no por amonio.
- ≈ MetilmalonilCoA descarboxilasa no es regulada ni por la fuente de carbono ni por la fuente de nitrógeno, manteniendo niveles constitutivos durante toda la fermentación.
- ≈ La formación de metilmalonilCoA en *Sac. erythraea* CA 340 procede principalmente a través de la metilmalonilCoA mutasa-metilmalonilCoA descarboxilasa y en etapas tardías de crecimiento por acción de la carboxilasa.

≈ La disponibilidad de los precursores parece ser, en parte, el factor responsable del efecto negativo del amonio o glucosa sobre la producción de eritromicina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aharonowitz, Y. y Cohen, G. (1981). Producción microbiológica de fármacos. *Investigación y Ciencia* 62: 78 - 93.
2. Alvarez-Villafañe, E., Soler, J., Del Valle, P., Busto, F. y De Arriaga, D. (1996). Two NAD⁺-Isocitrate Dehydrogenase Forms in *Phycomyces blakesleeanus*. Induction in Response to Acetate Growth and Characterization, Kinetics, and Regulation of Both Enzyme Forms. *Biochemistry* 35: 4741-4752.
3. Barrios, A. (1988). Control de Microorganismos. En: *Bacteriología y Virología Básicas*. Capítulo XIV. Ed. Venezolana. C.A. Mérida. Venezuela. pp. 228-230.
4. Behal, V., Jechova, V., Vanek, Z. y Hostalek, Z. (1977). Alternate Pathways of MalonylCoA Formation in *Streptomyces aureofaciens*. *Phytochemistry* 16:347-350.
5. Bennett, P. M. y Holms, W. H. (1975). Reversible inactivation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli* ML 308 during growth on acetate. *J. Gen. Microbiol.* 87: 37-51.
6. Berkow, R. (1986). Manual Merck. Séptima edición MSD. De. Nueva Editorial Interamericana S.A. de CV. México. pp. 2117.
7. Bhuwathanapun, S. y Gray, P. P. (1981). Production of the macrolide antibiotic tylosin in fed-batch culture. *J. Ferment. Technol.* 59:235.
8. Birch A., Leiser A. y Robinson, J. A. (1993). Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene Encoding Methylmalonyl-Coenzyme A Mutase from *Streptomyces cinnamonensis*. *J. Bacteriol.* 175:3511-3519.
9. Bramwell, H., Hunter, I. S., Coggins, J. R. y Nimmo, H. G. (1996). Propionyl-CoA Carboxylase from *Streptomyces coelicolor* A3(2): Cloning of the Gene Encoding the Biotin-Containing Subunit. *Microbiology* 142:649-655.
10. Corcoran, J. W. (1981). Mode of action and resistance mechanisms of macrolides. *Antibiotics* Vol. 4. Ed. Corcoran J. W. Springer - Verlag. N. Y. pp. 132-174.
11. Cortés, J., Haydock, S. F., Roberts, G. A., Bevitt, D. J. y Leadlay, P. F. (1990). An Unusually Large Multifunctional Polypeptide in the Erythromycin-

- Producing Polyketide Synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. Nature 348: 176-180.**
12. Dimroth, P. (1987). **Sodium Ion Transport Decarboxylases and Other Aspects of Sodium Ion Cycling in Bacteria.** Microbiol. Reviews 51:320-340.
 13. Djokic, S., Kobrehel, G. y Lazarevski, G. (1987). **Erythromycin series XII. Antibacterial In Vitro Evaluation of 10-Dihydro-10-deoxy-11-Azaerythromycin A: Synthesis and Structure-Activity Relationship of its Acyl Derivatives.** J. of Antibiotics. 40:1006-1015.
 14. Donadio, S., Staver, M. J. y Katz, L. (1996). **Erythromycin Production in *Saccharopolyspora erythraea* Does Not Require a Functional Propionyl-CoA Carboxylase.** Mol. Microbiol. 19:977-984.
 15. Dotzlaw, J. E., Metzger, L. S. y Foglesong, M. A. (1984). **Incorporation of Amino Acid-Derived Carbon into Tylactone by *Streptomyces fradiae* GS14.** Antimicrobial Ag. and Chemother. 25:216-220.
 16. Eikmanns, B. J., Rittmann, D. y Sahm, H. (1995). **Cloning, Sequence Analysis, Expression, and Inactivation of the *Corynebacterium glutamicum icd* Gene Encoding Isocitrate Dehydrogenase and Biochemical Characterization of the Enzyme.** J. Bacteriol. 177:774-782.
 17. Escalante, L., López, H., Mateos, R. del C., Lara, F. y Sánchez, S. (1982). **Transient Repression of Erythromycin Formation in *Streptomyces erythraeus*.** J. Gen. Microbiol. 128:2011-2015.
 18. Flores, M. E. y Sánchez, S. (1985). **Nitrogen Regulation of Erythromycin Formation in *Streptomyces erythraeus*.** FEMS Microbiol. Letts. 26:191-194.
 19. Flores, M. E. y Sánchez, S. (1989). **Ammonium-Assimilating Enzymes and Erythromycin Formation in *Saccharopolyspora erythraea*.** J. Gen. Appl. Microbiol. 35:203-211.
 20. Francalanci, F., Davis, N. K., Fuller, J. Q., Murfitt, D. y Leadlay, P. F. (1986). **The Subunit Structure of Methylmalonyl-CoA Mutase from *Propionibacterium shermanii*.** Biochem. J. 236:489-494.
 21. Friedman, S. M., Kaneda, T. y Corcoran, J. W. (1964). **Antibiotic glycosides. V. Comparison of 2-methylmalonate and propionate as precursors of the C₂₁ branched chain lactone in erythromycin.** J. Biol. Chem. 239: 2386-2391.

22. Grafe, U., Bocker, H., Reinhardt, G. y Thrum, H. (1978). **Regulative Influence of o-aminobenzoic Acid on the Biosynthesis of Nourseothricin in Cultures of *Streptomyces noursei* JA 389Ob. III. Change of Redox State of Nicotinamide-Adenine-Dinucleotides in the Presence of Aminobenzoic Acids.** Z. Allg. Mikrobiol. 18:479-486.
23. Hamada, K., Kita, E., Sawaki, M., Mikasa, K. y Narita, N. (1995). **Antitumor Effect of Erythromycin in Mice.** Chemotherapy 41:59-69.
24. Haydock, S. F., Dowson, J. A., Dhillon, N., Roberts, G. A., Cortés, J. y Leadlay, P. F. (1991). **Cloning and Sequence Analysis of Genes Involved in Erythromycin Biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*: Sequence Similarities Between EryG and a Family of S-adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases.** Mol. Gen. Genet. 230:120-128.
25. Higashide, E. (1984). **Macrolides: Properties, Biosynthesis, and Fermentation.** En: Biotechnology of industrial Antibiotics. Vol. 22. Cap. 15 Drug and the Pharmaceutical Sciences. Ed. Vandamme E. J. Dekker M. INC. USA. pp. 451-509.
26. Hilpert, W. Y Dimroth, P. (1991). **On the Mechanism of Sodium Ion Translocation by Methylmalonyl-CoA Decarboxylase from *Veillonella alcalescens*.** Eur. J. Biochem. 195:79-86.
27. Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. and Schrempf, H. (1985). **Genetic Manipulation of Streptomyces.** The Jones Innes Foundation, Norwich.
28. Hsieh, Y. y Kolattukudy, P. E. (1994). **Inhibition of Erythromycin Synthesis by Disruption of Malonyl-Coenzyme A Decarboxylase Gene *eryM* in *Saccharopolyspora erythraea*.** J. Bacteriol. 176:714-724.
29. Huder, J. B. y Dimroth, P. (1993). **Sequence of the Sodium Ion Pump Methylmalonyl-CoA Decarboxylase from *Veillonella parvula*.** J. Biol. Chem. 268:24564-24571.
30. Huder, J. B. y Dimroth, P. (1995). **Expression of the Sodium Ion Pump Methylmalonyl-Coenzyme A-Decarboxylase from *Veillonella parvula* and of Mutated Enzyme Specimens in *Escherichia coli*.** J. Bacteriol. 177:3623-3630.
31. Hunaiti, A. R. y Kolattukudy, P. E. (1982). **Isolation and Characterization of an Acyl-Coenzyme A Carboxylase from an Erythromycin-Producing *Streptomyces erythreus*.** Arch. Biochem. and Biophys. 216:362-371.

32. Hunaiti, A. R. y Kolattukudy, P. E. (1984a). Source of Methylmalonyl-Coenzyme A for Erythromycin Synthesis: Methylmalonyl-Coenzyme A Mutase from *Streptomyces erythreus*. *Antimic. Agents and Chemother.* 25:173-178.
33. Hunaiti, A. R. y Kolattukudy, P. E. (1984b). Malonyl-CoA Decarboxylase from *Streptomyces erythreus*: Purification, Properties, and Possible Role in the Production of Erythromycin. *Arch. Biochem. and Biophys.* 229:426-439.
34. Jackson, C. A., Kirszbaum, L., Dashper, S. y Reynolds, E. C. (1995). Cloning, Expression and Sequence Analysis of the Genes Encoding the Heterodimeric Methylmalonyl-CoA Mutase of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Gene* 167:127-132.
35. Jin, S. y Sonenshein, A. L. (1994a). Identification of Two Distinct *Bacillus subtilis* Citrate Synthase Genes. *J. Bacteriol.* 176:4669-4679.
36. Jin, S. y Sonenshein, A. L. (1994b). Transcriptional Regulation of *Bacillus subtilis* Citrate Synthase Genes. *J. Bacteriol.* 176:4680-4690.
37. Khaoua, S., Lebrihi, A., Laakel, M., Schneider, F., Germain, P. y Lefebvre, G. (1992). Influence of Short-chain Fatty Acids on the Production of Spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:763-767.
38. Kim, Y. S. y Kolattukudy, P. E. (1980). Stereospecificity of Malonyl-CoA Decarboxylase, Acetyl-CoA Carboxylase, and Fatty Acid Synthetase from the Uropygial Gland of Goose. *J. Biol. Chem.* 255:686-689.
39. Laakel, M., Lebrihi, A., Khaoua, S., Schneider, F., Lefebvre, G. y Germain, P. (1994a). Relationship Between Valine, Fatty Acids, and Spiramycin Biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Can. J. Microbiol.* 40:672-676.
40. Laakel, M., Lebrihi, A., Khaoua, S., Schneider, F., Lefebvre, G. y Germain, P. (1994b). A Link Between Primary and Secondary Metabolism: Malonyl-CoA Formation in *Streptomyces ambofaciens* Growing on Ammonium Ions or Valine. *Microbiology* 140:1451-1456.
41. LaPorte, D. C. (1993). The Isocitrate Dehydrogenase Phosphorylation Cycle: Regulation and Enzymology. *J. Cell. Biochem.* 51:14-18.
42. Lebrihi, A., Lamsaif, D., Lefebvre, G. y Germain, P. (1992). Effect of Ammonium Ions on Spiramycin Biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:382-387.

43. Lehninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. 1993. **Principles of Biochemistry**. Worth Pub. New York.
44. Linton, K. J., Jarvis, B. W. y Hutchinson, C. R. (1995). **Cloning of the Genes Encoding Thymidine Diphosphoglucose 4,6-Dehydratase and Thymidine Diphospho-4-Keto-6-Deoxyglucose 3,5-Epimerase from the Erythromycin-Producing *Saccharopolyspora erythraea***. *Gene* 153:33-40.
45. Lounes, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G. y Germain, P. (1995a). **Glycerol Effect on Spiramycin Production and Valine Catabolism in *Streptomyces ambofaciens***. *Current Microbiology* 31:304-311.
46. Lounes, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G., Germain, P. (1995b). **Regulation of valine catabolism by ammonium in *Streptomyces ambofaciens*, producer of spiramycin**. *Can. J. Microbiol.* 41:800-808.
47. Lounes, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G. y Germain, P. (1996). **Regulation of Spiramycin Synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: Effects of Glucose and Inorganic Phosphate**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:204-211.
48. Marsden, A. F. A., Caffrey, P., Aparicio, J. F., Loughran, M. S., Staunton, J. y Leadlay, P. F. (1994). **Stereospecific Acyl Transfer on the Erythromycin-Producing Polyketide Synthase**. *Science* 263:378-380.
49. Martín, J. F. (1979). **Nonpolyene Macrolide Antibiotics**. En: *Economic Microbiology. Vol 3, Secondary Products of Metabolism.* Ed. Rose A. H. Academic Press. London, N. Y. pp. 239-291.
50. Martín, J. F. y Demain, A. L. (1980). **Control of Antibiotic Biosynthesis**. *Microbiol. Reviews* 44:230-251.
51. Mazzei, T., Mini, E., Novelli, A. y Periti, P. (1993). **Chemistry and Mode of Action of Macrolides**. *J. of Antimicrobial Chemother.* 31:1-9.
52. Menniger, J. R. y Otto, D. P. (1982). **Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes**. *Antimic. Agents and Chemother.* 21:811-818.
53. Miller, G. L. (1959). **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar**. *Anal. Chem.* 31:426-428.
54. Miller, S. P., Karschnia, E. J., Ikeda, T. P. y LaPorte, D. C. (1996). **Isocitrate Dehydrogenase Kinase/Phosphatase**. *J. Biol. Chem.* 271:19124-19128.

ESTRADA
NO DEBE
BIBLIOTECA

55. Miyazaki, K. (1996). Isocitrate Dehydrogenase from *Thermus aquaticus* YT1: Purification of the Enzyme and Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene. *Appl. Environm. Microbiol.* 62:4627-4631.
56. Muro-Pastor, M. I. y Florencio, F. J. (1994). NADP⁺-Isocitrate Dehydrogenase from the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120: Purification and Characterization of the Enzyme and Cloning, Sequencing, and Disruption of the *icd* Gene. *J. Bacteriol.* 176:2718-2726.
57. Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C. y Florencio, F. J. (1996). The NADP⁺-Isocitrate Dehydrogenase Gene (*icd*) Is Nitrogen Regulated in Cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 178:4070-4076.
58. Navarrete, R. M., Vara, J. A. y Hutchinson, R. (1990). Purification of an Inducible L-Valine Dehydrogenase of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 136:273-281.
59. Neuman, M. 1978. VADE-MECUM de los Antibióticos y Agentes Quimioterápicos Antiinfecciosos. 4ta Edición. Ed. Pesclee de Brouwer. España. pp. 209-215.
60. Neuzil, J. y Hostalek, Z. (1986). Enzymes of Secondary Metabolism and the Biosynthesis of Macrolide Antibiotics. *Folia Microbiol.* 31:402-421.
61. Olano, J. , Arriaga, D. de, Busto, F. y Soler, J. (1995). Kinetics and Thermostability of NADP-Isocitrate Dehydrogenase from *Cephalosporium acremonium*. *Appl. Environm. Microbiol.* 61:2326-2334.
62. Omura, S., Takeshima, H., Nakagawa, A., Miyazawa, J., Piriou, F. y Lukacs, G. (1977). Studies on the Biosynthesis of 16-Membered Macrolide Antibiotics Using Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochemistry* 16:2860-2866.
63. Omura, S. y Tanaka, H. (1983). Macrolides. En: *Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics*. Cap. 7. Ed. Vining L. C. Addison-Wesley Publishing Company USA. pp. 179-206.
64. Pilot, M. A. (1994). Macrolides in roles beyond antibiotic therapy. *British J. of Surgery* 81:1423-1429.
65. Potvin, J. y Péringer, P. (1993). Influence of n-Propanol on Growth and Antibiotic Production by an Industrial Strain of *Streptomyces erythreus* Under Different Nutritional Conditions. *Biotechnol. Letters.* 15:455-460.

66. Potvin, J. y Péringer, P. (1994). **Ammonium Regulation in *Saccharopolyspora erythraea*. Part I : Growth and Antibiotic Production.** *Biotechnol. Letters.* 16:63-68.
67. Prescott, S. y Dunn, C. (1962). *Microbiología Industrial.* 3 ed. Ed. Aguilar. Madrid. 842-843.
68. Raczynska-Bojanowska, K., Ruczaj, Z., Sawnor-Korszyńska, D. y Rafalski, A. (1973). **Limiting Reactions in Activation of Acyl Units in Biosynthesis of Macrolide Antibiotics.** *Antimic. Agents and Chemother.* 3:162-167.
69. Rainwater, D.L. y Kolattukudy, P.E. (1982). **Purification and Characterization of Acyl-CoA Carboxylase from the Goose Uropygial Gland Which Produces Multimethyl-Branched Acids and Evidence for Its Identity with Avian Acetyl-CoA Carboxylase.** *Arch. Biochem. and Biophys.* 213:372-383.
70. Sánchez, R., Fernandez-Baca, V., Díaz, M.D., Muñoz, P., Rodríguez-Creixems, M. y Bouza, E. (1994). **Evolution of Susceptibilities of *Campylobacter* spp. to Quinolones and Macrolides.** *Antimic. Ag. and Chemother.* 38:1879-1882.
71. Seno y Hutchinson, C. R. (1986). **Antibiotic Producing *Streptomyces*.** En: *The bacteria, Volumen IX.* Academic Press, Orlando F., pp. 231-279.
72. Shao, W., Deblois, S. y Wiegel, J. (1995). **A High Molecular Weight, Cell-Associated Xylanase Isolated from Exponentially Growing *Thermoanaerobactericum* sp. Strain JW/SL-YS485.** *Appl. Environm. Microbiol.* 61:937-940.
73. Shapiro, S y Vining, L. C. (1983). **Nitrogen Metabolism and Chloramphenicol Production in *Streptomyces venezuelae*.** *Can. J. Microbiol.* 29:1706-1714.
74. Smith, R. L., Bungay, H. B. y Pittenger, R. C. (1962). **The erythromycin fermentation.** *Appl. Microbiol.* 10:293.
75. Tanaka, Y., Taki, A., Masuma, R. y Omura, S. (1986). **Mechanism of Nitrogen Regulation of Protylonolide Biosynthesis in *Streptomyces fradiae*.** *J. Antibiot.* 39:813-821.
76. Tang, L. y Hutchinson, R. (1993). **Sequence, Transcriptional, and Functional Analyses of the Valine (Branched-Chain Amino Acid) Dehydrogenase Gene of *Streptomyces coelicolor*.** *J. Bacteriol.* 175:4176-4185.

77. Tang, L. y Hutchinson, R. (1995). Regulation of Expression of the Valine (Branched-Chain Amino Acid) Dehydrogenase-Encoding Gene from *Streptomyces coelicolor*. *Gene* 162:69-74.
78. Tang, L., Zhang, Y. y Hutchinson, R. (1994). Amino Acid Catabolism and Antibiotic Synthesis: Valine Is a Source of Precursors for Macrolide Biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* 176:6107-6119.
79. Thorsness, P.E. y Koshland, D. (1987). Inactivation of Isocitrate Dehydrogenase by Phosphorylation Is Mediated by the Negative Charge of The Phosphate. *J. Biol. Chem.* 262:10422-10425.
80. Tyler, B. (1978). Regulation of the Assimilation of Nitrogen Compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 47:1127-1162.
81. Untrau, S., Leбриhi, A., Germain, P. y Lefebvre, G. (1992). Lysine Catabolism in *Streptomyces ambofaciens* Producer of Macrolide Antibiotic, Spiramycin. *Current Microbiology.* 25:313-318.
82. Untrau, S., Leбриhi, A., Lefebvre, G. y Germain, P. (1994). Nitrogen Catabolite Regulation of Spiramycin Production in *Streptomyces ambofaciens*. *Current Microbiology.* 28:111-118.
83. Vancura, A., Rezanka, T., Maršlálek, J., Vancurova, I., Kristan, V. y Basarová, G. (1987). Effect of Ammonium Ions on the Composition of Fatty Acids in *Streptomyces fradiae*, Producer of Tylosin. *FEMS Microbiol. Letters.* 48:357-360.
84. Vancura, A., Resanka, T., Maršlálek, J., Melzoch, K., Basarova, G. y Kristan, V. (1988). Metabolism of L-threonine and Fatty Acids and Tylosin Biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *FEMS Microbiol. Letters.* 49:411-415.
85. Vanek, Z., Majer, J., Babicky, A., Liebster, J. y Veres, K. (1959). *Proc. 2nd Intern. Conf. Peaceful uses At. Energy, Geneva, 1958 Vol 25, p.143.* Columbia Univ. Press (I.D.S), New york.
86. Vara, J. A. y Hutchinson, C. R. (1988). Purification of Thymidine-Diphospho-D-Glucose 4,6-Dehydratase from an Erythromycin-Producing Strain of *Saccharopolyspora erythraea* by High Resolution Liquid Chromatography. *J. Biol. Chem.* 263:14992-14995.
87. Vara, J., Lewandowska-Skarbek, M., Wang, Y., Donadio, S. y Hutchinson, C. R. (1989). Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the

- erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*).** J. Bacteriol. 171:5872-5881.
88. Vu-trong, K., Bhuwathanapun, S. y Gray, P.P. (1981). **Metabolic Regulation in Tylosin-Producing *Streptomyces fradiae*: Phosphate Control of Tylosin Biosynthesis.** Antimic. Agents and Chemother. 19:209-212.
89. Vu-trong, K. y Gray, P.P. (1987). **Influence of Ammonium on the Biosynthesis of the Macrolide Antibiotic Tylosin.** Enzyme Microb. Technol. 9:590-593.
90. Watanabe, F., Abe, K., Tamura, Y. y Nakano, Y. (1996). **Adenosylcobalamin-dependent Methylmalonyl-CoA Mutase Isozymes in the Photosynthetic Protozoon *Euglena gracilis* Z.** Microbiology 142:2631-2634.
91. Weber, J.M., Leung, J.O., Maine, G.T., Potenz, R.H.B., Paulus, T.J. y Dewitt, J.P. (1990). **Organization of a Cluster of Erythromycin Genes in *Saccharopolyspora erythraea*.** J. of Bacteriol. 172: 2372-2383.
92. Wheeler, P.R., Bulmer, K., Ratledge, C., Dale, J.W. y Norman, E. (1992). **Control of Acyl-CoA Carboxylase Activity in Mycobacteria.** FEMS Microbiol. Letters. 90:169-172.
93. White, R.J. (1994). **Why use Erythromycin ?** Thorax. 49:944-945.
94. Zhao, W.N. y McAlister-Henn, L. (1996). **Expression and Gene Disruption Analysis of the Isocitrate Dehydrogenase Family in Yeast.** Biochemistry 35:7873-7878.
95. Zotchev, S.B. y Hutchinson, R. (1995). **Cloning and Heterologous Expression of the Genes Encoding Nonspecific Electron Transport Components for a Cytochrome P450 System of *Saccharopolyspora erythraea* Involved in Erythromycin Production.** Gene 156:101-106.