

03088

6
2 ej.



UNAM



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
FACULTAD DE QUÍMICA**

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**EFFECTO DEL DIETIL-BARBITURATO SOBRE LA
BIOSÍNTESIS DE RIFAMICINA POR
*Amycolatopsis mediterranei.***

PRESENTA: M. en C. Armando Mejía Alvarez.

Tutor: Dr. Gustavo Viniegra González.

**Asesores: Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Dr. Edgardo Escamilla Marván**

octubre 30, 1998.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

267649



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Yareni

Por todo el apoyo, ayuda y comprensión que siempre me ha dado.

Y porque simplemente hace tuyas mis metas y aspiraciones.

A Emiliano

Por que su sola existencia me estimula y alienta a seguir adelante.

A nuestro bebé que ahora se está formando y que completará nuestra familia.

Agradecimientos:

A mi comité tutorial; el Dr. Gustavo Viniestra González, el Dr. Edgardo Escamilla Marván y el Dr. Sergio Sánchez Esquivel por sus valiosas sugerencias durante el curso de este trabajo de tesis.

Al Dr. Javier Barrios González por sus importantes contribuciones tanto en el desarrollo del proyecto como en mi propia formación académica.

A la Dra. Araceli Tomasini Campocoso por su apoyo como compañera de trabajo.

A la M. en C. Martha Contreras por la ayuda desinteresada que me brindó.

A la Sra. Leticia García; secretaria del proyecto académico del posgrado.

Al Jurado:

Dr. Edgardo Escamilla Marván (Presidente)

Dra. Gloria Soberón Chávez (Vocal)

Dr. Francisco José Fernández Perrino (Vocal)

Dra. Alicia González Manjarrez (Vocal)

Dra. Amelia Farrés González-Saravia (Secretario)

Dr. Federico Esteban Sánchez Rodríguez (Suplente)

Dra. María del Carmen Wachter Rodarte (Suplente)

Por la revisión crítica de este trabajo de tesis.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por la beca otorgada para la realización de estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado para la realización de este proyecto con número de convenio 400200-5-1413PB y la beca para estudios de doctorado.

ii. Indice

I.1. ABSTRACT	4
I.2. RESUMEN	5
II. INTRODUCCIÓN	6
II.1. ANTECEDENTES	9
II.1.1. BIOSÍNTESIS DE RIFAMICINAS	9
II.1.2. REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE RIFAMICINA	9
II.1.3. ESTIMULADORES DEL METABOLISMO SECUNDARIO DE ACTINOMICETOS	16
II.2. JUSTIFICACION	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
III. OBJETIVOS	23
HIPÓTESIS	23
III.1. OBJETIVO GENERAL	23
III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	25
IV.1. MICROORGANISMOS	26
IV.2. MEDIOS DE CULTIVO	26
IV.3. AMORTIGUADORES Y REACTIVOS	29
IV.4. MÉTODOS ANALÍTICOS	30
IV.5. CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE RIFAMICINA	31
IV.6. CRECIMIENTO EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO	32
IV.7. CONSUMO DE OXÍGENO DE CÉLULAS EN REPOSO	33

IV.8. ESPECTROS DE ABSORCIÓN CARACTERÍSTICOS DE CITOCROMOS, DE MICELIO PROVENIENTE DE CULTIVOS CON Y SIN BARBITAL.	33
IV.9. OBTENCIÓN DE MEMBRANAS Y FRACCIÓN SOLUBLE A PARTIR DE MICELIO PROVENIENTE DE CULTIVOS CON Y SIN BARBITAL.	34
IV.10. MUTAGÉNESIS Y SELECCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES A BARBITAL.	34
IV.11. FORMACIÓN Y REGENERACIÓN DE PROTOPLASTOS, PARA MUTAGÉNESIS Y SELECCIÓN DE MUTANTES SENSIBLES A BARBITAL.	35
IV.12. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN	35
IV.13. REPRODUCIBILIDAD DE RESULTADOS	36
V. RESULTADOS	37
V.1. EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE UN MEDIO DE PRODUCCIÓN	38
V.2. FERMENTACIÓN EN MATRAZ DE 250 ML	39
V.3. FERMENTACIÓN EN REACTOR DE 1 L	46
V.4. FERMENTACIÓN CON BURBUJEADORES	47
V.5. RESPIROMETRÍA DURANTE LA BIOSÍNTESIS DE RIFAMICINA	48
V.6. EFECTO DEL BARBITAL SOBRE EL CONSUMO DE OXÍGENO DE CÉLULAS EN REPOSO	51
V.7. ESTUDIO ESPECTRAL DE CITOCROMOS	53
V.7.1. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DIFERENCIAL CARACTERÍSTICO DE CITOCROMOS, DE MICELIO PROVENIENTE DE CULTIVOS CON Y SIN BARBITAL.	53
V.7.2. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DIFERENCIAL CARACTERÍSTICO DE CITOCROMOS ACOMPLEJADOS CON CO, DE MICELIO PROVENIENTE DE CULTIVOS CON BARBITAL.	58
V.8. EFECTO TÓXICO DEL BARBITAL SOBRE EL CRECIMIENTO	59
V.9. OBTENCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES AL EFECTO TÓXICO DEL BARBITAL	62
V.10. OBTENCIÓN DE MUTANTES SENSIBLES AL EFECTO TÓXICO DEL BARBITAL	64
V.11. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTANTES OBTENIDAS	65
VI. DISCUSIÓN	76
VII. CONCLUSIONES	85
VIII. RECOMENDACIONES	86
IX. REFERENCIAS	87

X. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS **94**

XI. ABREVIATURAS **97**

XII. PUBLICACIÓN **98**

1.1. Abstract

The results of this work indicate that the rifamycin B biosynthesis is stimulated by the presence of barbital because the oxygen uptake in respiratory chain is inhibited by it. These results suggest that the effect of barbital on secondary metabolism (rifamycin production) is related to its effect on primary metabolism (toxic effect on growth).

Moreover, it is shown that rifamycin B production by *A. mediterranei* can be improved by isolating mutants sensitive to the toxic effect of barbital. To do this, an enrichment selection method was developed, which is based in the use of lysozyme. This enzyme eliminates mycelium with the capacity of growing in the presence of the selected concentration of barbital and to generate protoplasts to isolate genetically pure colonies. Using this system, 2 mutants sensitive to 0.5% barbital were isolated. These mutants showed a 200% increase in rifamycin B production. Conversely, 30 resistant mutants were isolated which displayed lower rifamycin B production than the parental strain. Likewise, the characterization of the parental strain and mutants in the production medium indicate that the rifamycin biosynthesis correspond to production model closely associated to bacterial growth.

Another interesting finding was the observation that when the culture had good aeration (≥ 0.27 v.v.m.) no effect of barbital on rifamycin B biosynthesis could be observed. The conclusion is that high production can be achieved with barbital in the culture or with good aeration.

Finally, the application of these results to investigation of others antibiotics affected by barbiturates is discussed.

I.2. Resumen

Los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de que el mecanismo de acción del barbital es inhibiendo el consumo de oxígeno en cadena respiratoria para que de esta manera se permita la utilización del oxígeno en la biosíntesis de rifamicina B sin la acumulación de otros intermediarios. Esto parece indicar que el efecto del barbital sobre el metabolismo secundario (producción de rifamicina) está relacionado con su efecto sobre el metabolismo primario. Otros resultados sugieren también algún posible efecto inductor en un citocromo.

Así mismo se demuestra que es posible mejorar la producción de rifamicina B por *A. mediterranei*, mediante el aislamiento de mutantes sensibles al efecto tóxico del barbital. Para ello se desarrolló un sistema de enriquecimiento para la selección de este tipo de mutantes, el cual se basa en el uso de lisozima tanto para eliminar el micelio con capacidad de crecer en la concentración de barbital seleccionada, como para obtener protoplastos que permitan generar colonias genéticamente puras. Con este sistema se obtuvieron dos mutantes sensibles a 0.5% de barbital y con una capacidad de producción de rifamicina B superior en casi 200% con respecto a la cepa progenitora (ATCC 21789). En contraste con estas cepas, se aislaron 30 mutantes resistentes a barbital, las cuales por su parte mostraron menores niveles de producción. Así mismo, la caracterización, tanto de la cepa progenitora (ATCC 21789) como de las cepas mutantes, mostró que la producción de rifamicina B corresponde a un modelo de producción ligado al crecimiento.

Se demostró también que en cultivos con una buena aireación el nivel de producción de rifamicina B no se ve modificado por la presencia o la ausencia de barbital; es decir, que el barbital solo se requiere cuando las condiciones de aireación son limitadas (0.27 v.v.m.). Con esto se concluye que el barbital no provoca un incremento en la biosíntesis de rifamicina, sino que en realidad evita que esta decaiga en condiciones de baja aireación. En otras palabras, para una elevada producción de rifamicina B se requiere una de las siguientes dos condiciones: buena aireación o bien la presencia de barbital en el medio de cultivo.

De igual forma se discute la posible aplicación de estos conocimientos a la producción de otros metabolitos secundarios de actinomicetos cuya biosíntesis se ve afectada también por la presencia de barbitúricos.

Es bien conocida la capacidad de los actinomicetos para producir un gran número de metabolitos secundarios (pigmentos, antibióticos, agentes anti-tumorales, ionóforos, coccidiostáticos, antihelmínticos, inmunosupresores, inhibidores, fungicidas agrícolas, insecticidas y herbicidas, así como diversas proteínas extracelulares), siendo el grupo microbiano que más contribuye a la salud y economía del hombre (Demain, 1997a). Desde hace aproximadamente 50 años, estos metabolitos despertaron el interés en el mundo y se inició una carrera en la investigación de su biogénesis, modo de acción, posibilidad terapéutica y procesos de producción industrial. La comercialización de antibióticos provenientes de actinomicetos la inició Merck, Sharp & Dohme a finales de 1946 con la introducción en el mercado de la estreptomina (Shapiro, 1989a). En la actualidad, de los 7000 o más antibióticos descritos, casi el 70% de ellos son producidos por actinomicetos (Demain, 1997a).

En México hay varias compañías establecidas que producen a nivel industrial diversos metabolitos de actinomicetos, entre ellas destacan: Fermic, Orsabe, Mexama, Laboratorios Columbia y hasta hace algunos años Symbiotik y Pfizer, las cuales salieron del mercado en este tipo de productos. De los antibióticos de actinomicetos producidos a nivel industrial en México, se puede mencionar a la tetraciclina, oxitetraciclina, estreptomina, kana-

micina, gentamicina, así como la rifampicina y derivados entre otros. Sin embargo, a pesar de la aparente abundancia de estos metabolitos producidos en México, aun son limitados si se compara con los producidos a nivel internacional (menos de 10 antibióticos de actinomicetos producidos en México contra más de 160 a nivel industrial, lo que genera un mercado de aproximadamente 23 mil millones de dólares) (Demain, 1997a). Además todas estas compañías están destinadas a salir del mercado si no logran mejorar sus procesos. Cabe mencionar que la mayoría de ellas trabaja con tecnologías extranjeras, de las cuales existe un desconocimiento casi total de sus fundamentos, razón por la cual resulta muy difícil lograr mejorarlas. Es por todo lo anterior que tanto en México como en todos los países en desarrollo se deben conformar grupos de investigación, dedicados al estudio de actinomicetos de interés industrial.

Un grupo de antibióticos producidos por esta importante clase bacteriana son las rifamicinas (Sensi *et al.*, 1957), a partir de las cuales se obtiene el más conocido derivado semisintético llamado rifampicina (Ghisalba *et al.*, 1984). Esta familia de antibióticos es producida por un actinomiceto identificado originalmente como *Streptomyces mediterranei* (Margalith y Beretta, 1960), para posteriormente ser re-clasificado como *Nocardia mediterranei*, (Thiemann *et al.*, 1969) y finalmente como

Amycolatopsis mediterranei
(Lechevalier *et al.*, 1986).

Las rifamicinas poseen una gran actividad contra micobacterias, mediante la inhibición específica de la RNA polimerasa (Blanco *et al.*, 1984). Son particularmente útiles en el tratamiento contra la tuberculosis y lepra, enfermedades que en los últimos años han resurgido con gran fuerza, ya que además la tuberculosis es muy frecuente en enfermos del Síndrome de Inmuno-Deficiencia Adquirida (SIDA) (Auerbach *et al.*, 1994). En nuestro país se estima que el 12% de los casos de SIDA también presentan tuberculosis (Ferreira, 1995). En términos generales se considera que este es uno de los microorganismos patógenos más letales, provocando la muerte de aproximadamente 2.7 millones de personas en el mundo al año para el caso de la tuberculosis y 200,000 para la lepra (Nakamura, 1997; World Health Organization, 1998). Para el caso particular de México y de acuerdo con los datos proporcionados por la Dirección General de Epidemiología, SSa, se estima que existen arriba de 45,000 casos nuevos de tuberculosis al

año y según la Organización Mundial de la Salud la cifra correcta es alrededor de 110,000 casos nuevos, de cualquier forma la tuberculosis en México es la primera causa de muerte ocasionada por un solo agente infeccioso y la tercera ocasionada por una infección generada por varios agentes (solo detrás de las neumonías e influenza y las infecciones intestinales) (Ferreira, 1995; Secretaría de Salud, 1996).

En vista de la ya mencionada aplicación terapéutica, se han desarrollado numerosos estudios sobre su producción, algunos encaminables a optimizar las condiciones de fermentación (Margalith y Pagani, 1961; Lee *et al.*, 1983), otros sobre su biogénesis (Ghisalba *et al.*, 1982, Anderson *et al.*, 1989; Gyax *et al.*, 1990, Wang *et al.*, 1994, Kim *et al.*, 1997), mejoramiento genético y biología Molecular (Schupp *et al.*, 1975; Moretti *et al.*, 1985; Madon *et al.*, 1987; Zhu *et al.*, 1990; Lal *et al.*, 1991; Madon y Hutter, 1991; Li *et al.*, 1997; Pelzer *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1997; Lal *et al.*, 1998) y otros más sobre nuevos derivados semi-sintéticos.

II.1. Antecedentes

II.1.1. Biosíntesis de rifamicinas

Con la finalidad de comprender de manera sencilla la biosíntesis de rifamicina, primeramente se presenta la figura II.1a, en donde se muestra y

analiza su estructura química y se relaciona con el origen biosintético de algunos de sus componentes.

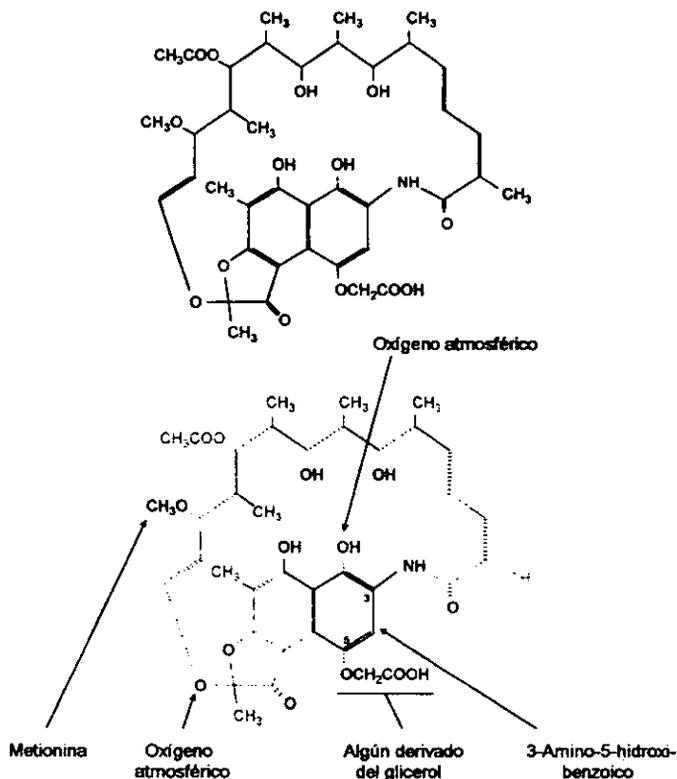
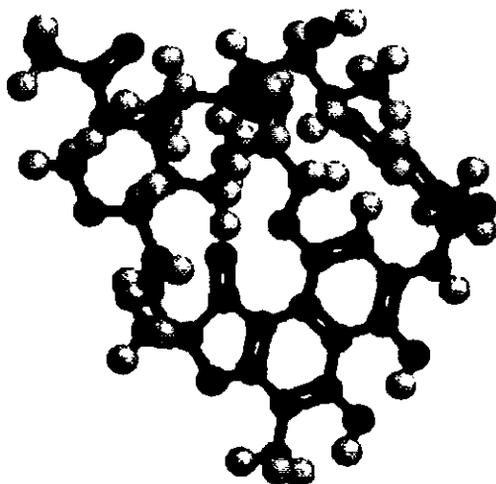


Fig. II.1a. Biogénesis de la rifamicina B. Cromóforo (rojo), acetato proveniente de acetil-CoA (café), malonato proveniente de malonil-CoA (verde) y metilmalonato de metilmalonil-CoA (azul) (White, *et al.* 1973a; White, *et al.* 1973b; Karlsson, *et al.* 1974; White y Martinelli, 1974; Becker, *et al.* 1983; Anderson, *et al.* 1989).



Gris oscuro:	Carbono
Gris claro:	Hidrógeno
Rojo:	Oxígeno
Azul:	Nitrógeno

Fig. II.1b. Estructura desarrollada y tridimensional de la rifamicina B (Estructuras modeladas con: HyperChem 5.02, Hypercube, Inc. Gainesville, FL, U.S.A.; RasWin Molecular Graphics Windows 2.6, R. Sayle; ChemWeb 3.1.4, SoftShell International, Ltd. Grand Junction, Co.).

En la figura II.1. se puede observar que la estructura de la rifamicina B está constituida de dos partes básicas, una de ellas es un grupo aromático con un anillo naftaleno conocida como cromóforo y la otra es una cadena alifática también conocida como cadena *ansa*. Esta cadena forma un puente entre dos posiciones no adyacentes del grupo aromático (Lancini y Grandi, 1981), y debido a este grupo, se relaciona en ocasiones como un antibiótico policétido, o bien, como perteneciente a las ansamicinas.

La biosíntesis de las rifamicinas (Fig. II.2) tiene una clara correspondencia con el metabolismo primario que básicamente se puede resumir en: a) la participación del ciclo de las pentosas, b) la glucólisis, c) la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y d) el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. A continuación se explica con mayor detalle la participación de estas rutas del metabolismo primario y finalmente su derivación en el metabolismo secundario.

La biosíntesis de la rifamicina se puede iniciar en la vía HMP (ciclo de las pentosas o de la hexosa monofosfato), en donde por cada dos moléculas de glucosa se producen una eritrosa-4-fosfato y una fructosa-6-fosfato. Esta última puede ser incorporada a la glucólisis o vía EMP (Emden-Meyerhoff-Parnas) para producir fosfoenolpiruvato, el que posteriormente es condensado con eritrosa-4-fosfato para formar 3-deoxi-D-arabinoheptuloseonato (DAH). Este compuesto, el DAH, pertenece a la tercera ruta del metabolismo primario,

la vía del sikimato, que conduce por un lado hacia la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y por el otro al metabolismo secundario para la biosíntesis del cromóforo o núcleo central de la rifamicina. Particularmente la ruta se desvía en el ácido 3-desoxi-D-arabinoheptuloseónico 7-fosfato (DAHP), lo cual fue demostrado por Gyax *et al.* (1990). Posteriormente, este aminoácido aromático es convertido en 3-amino 5-hidroxi-benzil-CoA (Becker *et al.*, 1983, Gyax *et al.*, 1990), por transferencia del grupo amino de la glutamina, dejando al glutamato disponible para captar otro grupo amino, generalmente a partir de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o de NH_4OH .

En una etapa siguiente se sintetiza la mencionada cadena *ansa*, mediante la incorporación sucesiva de dos moléculas de malonato y ocho de metilmalonato a través de malonil-CoA y metil-malonil-CoA, las cuales son generadas por isomerización enzimática del succinil-CoA (Karlsson *et al.*, 1974; Weiwen y Ruishen, 1996), y cuyo origen es la vía EMP y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

Finalmente, la figura II.3 muestra los últimos pasos de la biosíntesis de rifamicinas. En esta etapa final es importante resaltar la incorporación de un átomo de oxígeno como grupo éter vinílico en el carbono 29 a partir de la molécula de rifamicina S. Este oxígeno, al igual que el del carbono 1 del grupo aromático, proviene del oxígeno atmosférico, lo cual fue demostrado por Anderson *et al.* (1989) mediante estudios en atmósfera artificial con oxígeno radioactivo ($^{18}\text{O}_2$).

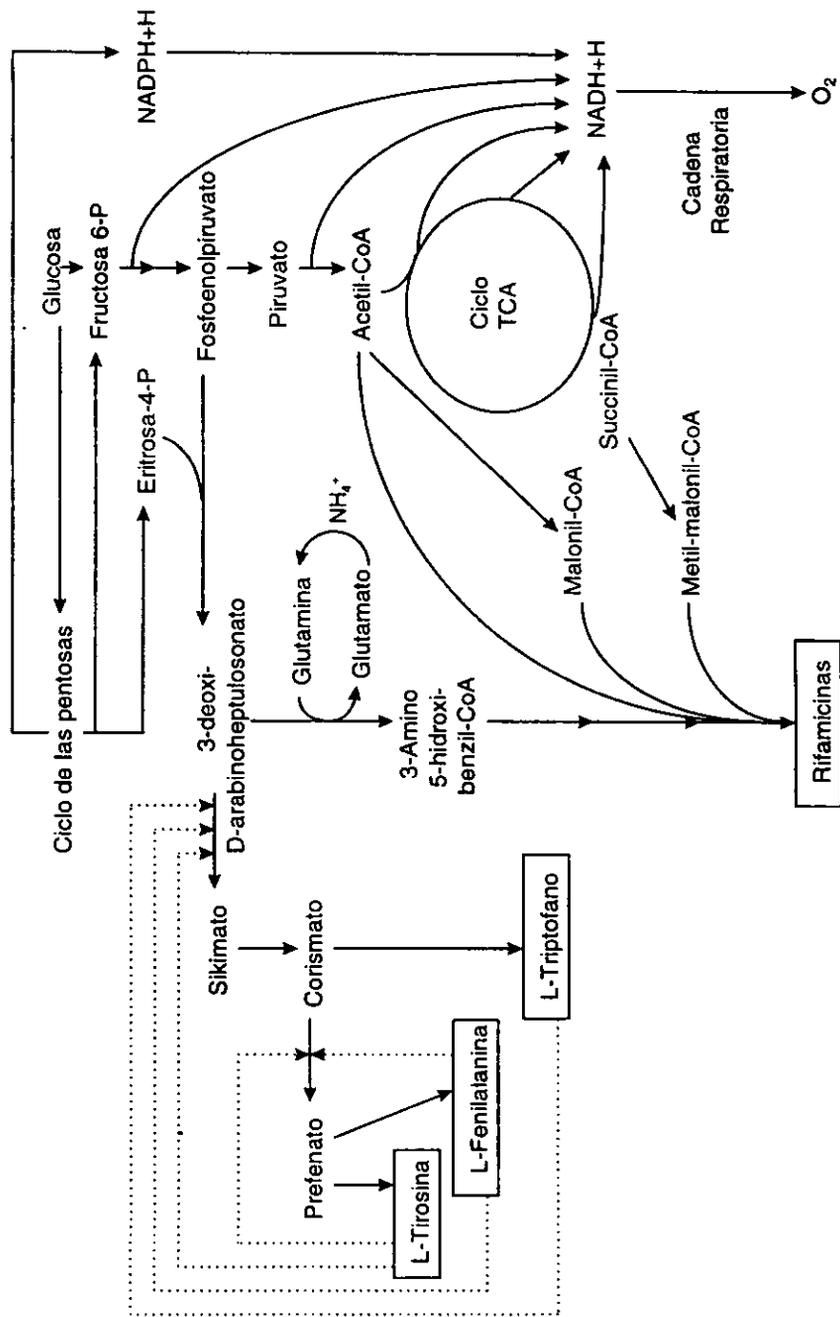


Fig. 11.2. Biosíntesis de rifamicina por *Amycolatopsis mediterranei* y su conexión con el metabolismo primario (Gygax, et al. 1990, Lancini y Grandi, 1981).

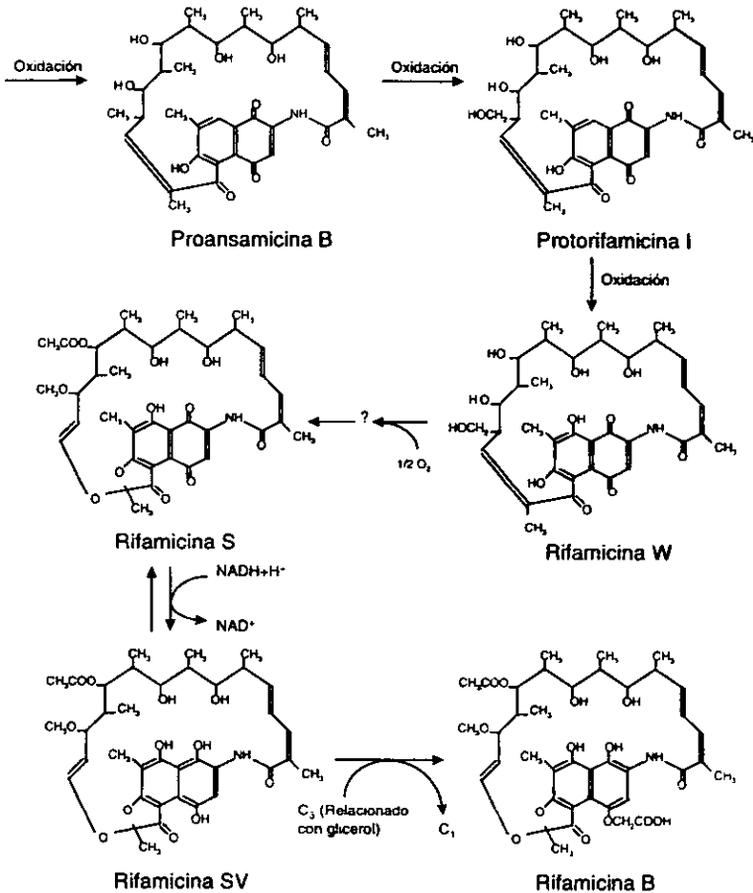


Fig. II.3. Etapa final de la biosíntesis de rifamicina B sin ramificaciones (White *et al.*, 1973; Martinelli *et al.*, 1974; White y Martinelli, 1974; Ghisalba *et al.*, 1978; Ghisalba *et al.*, 1980; Ghisalba *et al.*, 1982; Mejía *et al.*, 1990).

La rifamicina S, por su parte, es transformada en rifamicina SV por reducción $NADH+H^+$ dependiente (Ghisalba *et al.*, 1982), la cual finalmente es convertida en rifamicina

B. Esta última transformación aun no es muy clara, sin embargo Ghisalba *et al.* (1982) demostraron, mediante estudios con isótopos radiactivos ($1-^{14}C$)-glicerol que el grupo acetato

esterificado en el hidroxilo del carbono 4 del anillo aromático proviene de un compuesto de 3 carbonos relacionado con el glicerol. Resulta importante señalar que los

NADPH+H y NADH+H generados, pueden ser reoxidados en la cadena respiratoria y en la propia biosíntesis de rifamicina, en el paso de S a SV.

II.1.2. Regulación de la biosíntesis de rifamicina

Los metabolitos secundarios ("idolitos" o "metabolitos especiales") no son esenciales para el crecimiento del microorganismo productor pero tienen diversas funciones en la naturaleza. Generalmente son producidos como familias de compuestos como resultado de la baja especificidad de las enzimas del metabolismo secundario, sin embargo, la abundancia relativa de uno de los miembros de la familia puede incrementarse por la adición de determinados precursores (biosíntesis dirigida). Su producción está fuertemente regulada por el medio ambiente en el que crece el microorganismo. Además, si consideramos que debido a que una de las funciones del metabolismo secundario en la naturaleza es permitir la supervivencia del microorganismo, especialmente bajo condiciones de ayuno o de superpoblación, no es sorprendente que los genes del metabolismo secundario no sean expresados bajo condiciones que permiten la máxima velocidad de crecimiento. En consecuencia, el ambiente del microorganismo industrial en el tanque de fermentación tiene importancia crucial para la expresión de determinados genes (Demain, 1989; Gräfe, 1989; Demain, 1997b).

Para producir metabolitos secundarios eficientemente, el ambiente debe ser limitante en una o más fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo y debe permitir una velocidad de crecimiento menor que la velocidad máxima (μ_{max}). Otros factores incluyen nutrientes inductores o represores, la regulación por producto final, pH, temperatura y suministro de oxígeno. Los factores ambientales no sólo regulan la expresión de los genes estructurales sino también las cascadas de genes regulatorios ligados a menudo a los sistemas de transducción de señales y controlados por factores sigma y por pequeñas moléculas auto-regulatorias (Gräfe, 1989; Demain, 1997b).

Particularmente para el caso de la rifamicina, Lee *et al.* (1983) reportaron un pH óptimo de 6.5 para el crecimiento y de 7.0 para la producción del antibiótico. De igual forma se ha observado un rango de temperatura que permite la biosíntesis del metabolito secundario, entre 20 y 27 °C con un óptimo a 22 °C (Votruba y Vaněk, 1989). Sin embargo, la regulación que probablemente ha recibido una mayor atención es la mediada por nitrógeno, ya que la producción de rifamicina puede ser sensiblemente modificada por la fuente de nitrógeno empleada. Por

ejemplo, Margalith y Pagani (1961) encontraron concentraciones de rifamicina de 100 a 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 48 h en un medio que contiene licor de maíz (2%), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.6%), y harina de soya (0.5%) (aproximadamente 90 mM de N total); posteriormente, omitiendo el licor de maíz y elevando el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una concentración de 0.7% (aproximadamente 105 mM de N total), se obtuvo una concentración de antibiótico de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado Gu y colaboradores, en el Instituto de Fisiología Vegetal de Shanghai (Gu *et al.*, 1983), estudiaron el efecto del nitrato sobre la biosíntesis de rifamicina SV por *A. mediterranei*, y observaron que no pudo crecer con nitrato como única fuente de nitrógeno. Sin embargo, la adición de nitrato a un medio que contenía peptona y harina de soya redujo ligeramente el crecimiento pero estimuló notablemente la biosíntesis del antibiótico. Aparentemente la actividad específica de las enzimas involucradas en la formación de metilmalonil-CoA fue mayor en el cultivo con nitrato, así como la actividad específica de diversas enzimas que incrementaron el flujo del carbono a través de la vía HMP, lo que elevó las pozas de eritrosa-4-fosfato así como del 3-amino-5-hidroxibenzoato (Shapiro, 1989b). Sin embargo, Ghisalba (1984) sugiere que el efecto observado por los investigadores de Shanghai fue específico de la cepa usada, pues esto no se consiguió con las cepas de Ciba-Geigy.

Jiao y colaboradores (1984), compararon también el efecto del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, L-glutamato y DL-glutamina (5 a 10 mM cada uno) sobre la biosíntesis de rifamicina. Ellos encontraron que a

pesar de que la biomasa se mantuvo sin cambios, la biosíntesis del antibiótico fue marcadamente mayor en presencia de DL-glutamina que en presencia de L-glutamato o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, o que en ausencia de fuente de nitrógeno. Por su parte Zhao *et al.* (1997) del mismo grupo de Shanghai, encontraron que existe una correlación positiva entre la actividad de la glutamato sintetasa (GS) y la biosíntesis de rifamicina SV y con esto concluyeron que la glutamina juega un papel clave en la conexión del metabolismo primario con el secundario. Actualmente, el gen estructural de la GS ya ha sido clonado y caracterizado, así mismo se sabe que posee dos promotores que responden de forma drásticamente diferente en función de la fuente de nitrógeno (Zhao *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Mei and Jiao, 1988).

Algunos otros mecanismos de regulación han sido estudiados, tal es el caso de la inhibición por producto, reportada por Küenzi *et al.* (1977), quienes encontraron que la rifamicina S inhibe su propia síntesis en un sistema *in vitro*, sin embargo sus resultados no son muy claros en este sentido ya que también se observó que la rifamicina S inhibe el crecimiento.

Finalmente es importante señalar que se han descubierto diversos estimuladores tanto orgánicos como inorgánicos, que alteran el rendimiento de los metabolitos secundarios (Weingberg, 1989), los cuales serán revisados en un apartado independiente.

II.1.3. Estimuladores del metabolismo secundario de actinomicetos

Se cree que el agotamiento de los nutrientes y/o descenso de la velocidad de crecimiento generan señales que producen una cascada de eventos regulatorios y que conducen a la diferenciación química (metabolismo secundario) y a la diferenciación morfológica (morfogénesis). La señal es a menudo una molécula inductora de bajo peso molecular (factor auto-regulador) que se une a una proteína reguladora (proteína represora/proteína receptora) que impide el metabolismo secundario y la morfogénesis durante el crecimiento exponencial y en presencia de exceso de nutrientes. Estas señales activan probablemente un "gen maestro" que actúa a nivel de traducción, el cual codifica para un tRNA raro y para un factor de transcripción positivo (Demain, 1989; Gráfe, 1989; Demain, 1997b).

Durante las pasadas tres décadas, diversas categorías de compuestos orgánicos biológicamente activos han sido estudiados por su posible efecto sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios. Estos grupos incluyen vitaminas, intermediarios metabólicos, inhibidores enzimáticos, antibióticos y otras clases de agentes medicinales. En *Streptomyces* el compuesto que probablemente ha sido más estudiado es el factor-A, el cual controla la biosíntesis de estreptomina, la resistencia al antibiótico y la formación de micelio aéreo (Onaka *et al.*, 1995). Para el caso particular de la rifamicina se ha aislado un compuesto inductor denominado factor-B (Azuma *et al.*,

1990; Kawaguchi *et al.*, 1984; Kawaguchi *et al.*, 1988), semejante al factor-A para la biosíntesis de estreptomina por *Streptomyces griseus* (Beppu, 1997). Este compuesto se reporta como un elemento regulatorio esencial para la inducción de la biosíntesis de rifamicina B, lo cual fue demostrado mediante el uso de mutantes deficientes en la síntesis del antibiótico. Esta deficiencia fue revertida en un medio que contenía extracto de levadura, de donde posteriormente fue purificado el factor-B. Finalmente se identificó mediante análisis estructural y síntesis química como 3'-(1-butilfosforil) adenosina. Se determinó también que la concentración de factor-B requerida para inducir la biosíntesis del antibiótico es extremadamente baja, alrededor de 10 ng/mL. Kawaguchi *et al.* (1988) encontraron también el factor-B en la cepa progenitora. Por su parte Azuma *et al.* (1990) reportaron que una ribonucleasa cataliza la biosíntesis del factor-B a partir de RNA en presencia de butanol y 2', 3'-cAMP.

Otro compuesto que da una marcada respuesta estimuladora, pero de origen exógeno, es el 5, 5-dietilbarbiturato (barbital o veronal) (Fig. II.4), el cual fue primeramente reportado por Ferguson *et al.* (1957), quienes observaron que a una concentración óptima de 13.5 mM, en un medio sintético y adicionado al momento de la inoculación, se obtiene consistentemente un incremento de cuatro veces en la producción de estreptomina por *S. griseus*. Otros

metil, no fueron activos, sin embargo, en aquellos análogos del barbital que conservaron la sustitución dialquil en el C-5 de la molécula, si mostraron actividad inductora. En estudios posteriores sobre la biosíntesis de estreptomina (Heding y Gurtu, 1977), el barbital no incrementó la producción de una cepa industrial altamente productora de *S. griseus*, tanto en medio definido como en medio complejo. El resultado fue similar con

una cepa semi-industrial, sin embargo con una cepa posterior en medio complejo, a una concentración de barbital de 8.14 mM, la producción de estreptomina se incrementó en un 29% (Heding y Gurtu, 1977). Otro aspecto interesante es el hecho de que el barbital de alguna manera evitó o antagonizó el efecto inhibitorio de la quinacrina y del 2, 4-dinitrofenol sobre la biosíntesis de estreptomina por *S. griseus* (Musílková, 1959).

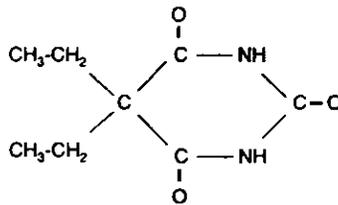


Fig. II.4. Estructura del 5, 5-dietil barbiturato (5, 5-dietil malonil urea, barbital o veronal) (Margalith y Pagani, 1961; Weinberg. 1989).

En un sistema diferente, con *Streptomyces galilaeus*, el barbital estimuló la biosíntesis de galirubinas (antraciclina) a una concentración de 22 mM, y un tiempo óptimo de adición de 12 h después de la inoculación. El incremento varió desde 1.5 veces hasta 2.85, dependiendo de la cepa (Královcová *et al.*, 1977).

En la biosíntesis de rifamicina por *A. mediterranei* el barbital ejerce un efecto extremadamente importante ya que, como se mencionó anteriormente, los metabolitos secundarios generalmente son producidos como familias de compuestos como resultado de la baja especificidad de las enzimas del metabolismo secundario, sin embargo la abundancia relativa de uno de los miembros de la familia puede incrementarse por la adición de ciertas sustancias (Demain, 1997b). Tal es el caso de la producción de rifamicina B, pues como se recordará, *A. mediterranei* bajo condiciones normales (sin la adición de ningún modulador), produce una amplia gama de rifamicinas, por lo que Margalith y Pagani desde la publicación de su trabajo clásico en 1961, estudiaron el efecto de diferentes barbituratos y compuestos relacionados. Ellos monitorearon la formación de 6 distintas rifamicinas durante el curso de la fermentación y encontraron que el 5-etil-5-metilbarbiturato, el 5-fenil-5-etilbarbiturato, el 5-etil-5-isopropilbarbiturato y el 5, 5-dietilbarbiturato (barbital) dirigen el metabolismo hacia la biosíntesis casi exclusiva de rifamicina B, y dejan el resto de las rifamicinas en niveles prácticamente despreciables. En un intento por

explicar dicho efecto, los autores de ese trabajo propusieron tres hipótesis: 1) el barbital puede ser un precursor en un sentido estricto; es decir, el barbital puede constituir parte de la molécula, 2) el barbital puede funcionar como activador o inhibidor de ciertas enzimas, y 3) el barbital ejerce un efecto inductor de alguna(s) enzima(s). El resultado de sus experimentos favoreció la segunda hipótesis ya que por un lado, la preadaptación de *A. mediterranei* por crecimiento en presencia de barbital, no dio como resultado la inducción del sistema enzimático responsable de la síntesis casi exclusiva de rifamicina B, además, muestras de micelio lavado a diferentes edades de un cultivo en medio de producción e incubadas en buffer de fosfatos, produjeron nuevamente el sistema completo de rifamicinas. La primera hipótesis fue descartada por Kluepfel *et al.* (1965), quienes al seguir el metabolismo del barbital marcado radioactivamente (C^{14}) concluyeron que este compuesto no constituye de ninguna manera parte de la molécula de la rifamicina. Otro dato interesante obtenido por Margalith y Pagani, es que la adición de barbituratos muestra cierto efecto tóxico sobre el crecimiento micelial en medio de fermentación, el cual es aproximadamente un 20 a 25% más abundante en ausencia del barbiturato. Finalmente, cabe señalar que no encontraron diferencias significativas en el metabolismo de carbohidratos, nitrógeno o fósforo cuando lo compararon con el control.

La selección de mutantes sobre-productoras de rifamicina o de cualquier otro antibiótico, es una de las labores clave del laboratorio de cepas en una fábrica de antibióticos (Vohra, 1992). Hasta la fecha no se han publicado protocolos de selección de *A. mediterranei* en función de fenotipos bioquímicos bien definidos. La selección de mutantes resistentes a un agente tóxico, es relativamente sencilla, pues se obtienen por selección positiva de colonias con el fenotipo deseado. Sin embargo, el aislamiento de mutantes sensibles (selección negativa) requiere de procedimientos más laboriosos, de los cuales aún no se han descrito protocolos específicos para *A. mediterranei*. Por lo tanto, el desarrollo de esta metodología puede ser vista como una contribución original para elevar la productividad de rifamicina a nivel industrial.

Por otra parte, el modo de acción del barbital sobre la producción de rifamicina está aún por describirse y su conocimiento podría contribuir de manera importante para el uso de técnicas avanzadas de biología molecular y con ello el mejoramiento acelerado de las cepas productoras de este antibiótico. Ya que si se determina que existe algún gen responsable de la inducción pre-ferencial

de la biosíntesis de rifamicina B por barbital, este puede ser clonado y con él incrementar el número de copias o bien si el efecto es negativo, intentar hacer disrupción génica.

Cabe señalar además que en México las industrias que producen antibióticos rara vez tienen tiempo, dinero y recursos humanos para realizar este tipo de estudios básicos, y por ello dependen continuamente del suministro de cepas industriales desarrolladas y vendidas por empresas internacionales. Tal es el caso de Química Fina Farmex, empresa mexicana que durante muchos años produjo rifamicina a partir del producto de fermentación importado (rifamicina B) y durante este tiempo trató sin éxito de desarrollar el proceso de fermentación. Otro ejemplo de esta situación es el caso de Fermic S. A., quienes si producían este producto de fermentación, sin embargo debido a que no pudieron mejorar su tecnología fueron desplazados del mercado en 1996 (Tiselli, 1997). Por lo tanto, compete a las Universidades e Institutos de investigación, el desarrollo de métodos y técnicas, así como la capacitación de profesionales para que gradualmente nuestra industria pueda establecer cierto grado de autonomía en el desarrollo de este tipo de procesos fermentativos.

Planteamiento del problema

Un problema recurrente, en la producción de rifamicina a nivel industrial, ha sido que las cepas de alta producción obtenidas, tienden a producir caldos

extremadamente viscosos, lo cual ocasiona una gran dificultad para proporcionar un adecuado mezclado y aporte de oxígeno en el biorreactor

(Mejía *et al.*, 1990; Ghisalba *et al.*, 1984). La menor transferencia de oxígeno en edades avanzadas del cultivo, provoca el cese de la producción de rifamicina B, ya que de acuerdo con los estudios de Anderson *et al.*, (1989), los cultivos de *A. mediterranei* utilizan el oxígeno atmosférico para formar el grupo éter vinílico del carbono 29 de la molécula de ansamicina. Así mismo, en el trabajo realizado por Mejía *et al.* (1990), se demostró que esta menor transferencia de oxígeno en caldos de edad avanzada, provoca el cese en la biosíntesis de rifamicina B con la concomitante acumulación de rifamicina W, intermediario de la ruta biosintética, localizado justo antes de la formación del grupo éter vinílico. También resulta importante considerar que *A. mediterranei* es un microorganismo aerobio (Williams, 1989), por lo que la demanda de oxígeno durante la idiofase depende no sólo de los requerimientos biosintéticos del antibiótico, sino también de los energéticos a través de la actividad de su cadena respiratoria. Esto nos conduce a dos niveles de estudio del problema planteado. Uno desde el punto de vista fisiológico, a través del efecto de un mayor aporte de oxígeno, y otro desde un nivel bioquímico al estudiar la posible relación de la actividad de la cadena respiratoria con la biosíntesis del antibiótico.

Por otra parte, para el estudio a nivel bioquímico, hay que considerar un fenómeno interesante que surge de las observaciones de Sensi *et al.* (1961), quienes reportan que en el medio de fermentación, la cepa silvestre produce diversas rifamicinas, y aunque la B es la

más estable, sólo se encuentra en pequeñas cantidades. Posteriormente en ese mismo año, se descubrió que la presencia de barbiturato de sodio en el medio de fermentación conducía a la producción prácticamente exclusiva de rifamicina B (Margalith y Pagani, 1961). Una pregunta que surge de este descubrimiento, es ¿por qué de entre tantos compuestos, fue seleccionado el barbital para este propósito?. La posible respuesta para este caso es una publicación hecha por Ferguson *et al.* (1957), en la cual demostraron que la producción de estreptomycin por *S. griseus* en medio sintético era fuertemente estimulada por la presencia de barbital. Sin embargo, en ninguno de los dos casos, se explicó a que nivel actuaba el barbital para estimular la biosíntesis. Resolver el planteamiento anterior contribuiría de manera importante a un mejor entendimiento de la regulación del metabolismo secundario, no solo de *A. mediterranei*, sino también de otros actinomicetos de interés industrial.

Una hipótesis planteada en el presente proyecto para explicar el efecto del barbital, es que este actúa como inhibidor a nivel de cadena respiratoria, efecto demostrado en mitocondria (Hatefi and Stiggall, 1979). Esta posible inhibición, provocaría una disminución en el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria, generando con ello una mayor disponibilidad del mismo en la formación del grupo éter vinílico de la molécula de ansamicina, y evitando con ello la acumulación de intermediarios (Anderson *et al.* 1989; Mejía *et al.* 1990).

Si la hipótesis planteada es correcta, la inhibición actuaría en el complejo I de la cadena respiratoria, bloqueando la oxidación del NADH+H y dejando libre la oxidación del FADH+H a nivel de complejo II. Esto favorecería el metabolismo de los lípidos y la formación de malonil-CoA requeridos para la condensación subsecuente de unidades de acetato y propionato respectivamente para dar lugar a la molécula de rifamicina (Shapiro 1989b). Cabe aclarar que el NADH+H no se acumularía ya que éste es reoxidado en el paso de rifamicina S a rifamicina SV, lo cual fue demostrado por Ghisalpa *et al.* (1982), mediante ensayos de transformación usando micelio permeabilizado.

De esta forma, resulta de gran importancia el conocimiento del mecanismo de acción de estimuladores del metabolismo secundario, como lo es el barbital sobre la biosíntesis de rifamicina, fenómeno también observado en la producción de estreptomycin por *S. griseus* (Ferguson *et al.*, 1957; Heding y Gurtu, 1977), en la producción de galirubina por *S. galilaeus* (Královcová *et al.*, 1977), de daunomicina por *S. coeruleorubidus* (Blumauerová *et al.*, 1977) y de kanamicina por *S.*

kanamyceticus (Basak y Majumdar, 1976). De acuerdo con lo anterior, la hipótesis central de este trabajo es que es posible obtener mutantes con una mayor capacidad de biosíntesis de rifamicina B incrementando su sensibilidad al efecto tóxico del barbital; es decir, mutantes resistentes al barbital (BAR^R) probablemente tendrían disminuida su sensibilidad ya sea porque tuviesen reducido el transporte del barbital o bien, porque las enzimas sujetas a su acción, tuviesen modificada su afinidad y por lo tanto, el barbital usado en dosis subletales no tendría un efecto importante sobre la biosíntesis de rifamicina B. Por otro lado, las mutantes sensibles (BAR^S) al ser más susceptibles a su acción tóxica, también responderían en forma más acentuada a la acción subletal de este barbiturato sobre la biosíntesis del antibiótico.

Se propone también que el sitio sobre el cual actúa el barbital se localiza en la cadena respiratoria, tanto para generar un efecto tóxico, como para favorecer la biosíntesis de rifamicina B. Para determinar lo anterior, se pretenden hacer estudios bioquímicos complementarios a nivel de respiración con dosis subletales de barbital.

Como ya se mencionó, el barbital presenta un efecto doble sobre *A. mediterranei*, es decir, que a concentraciones altas se observa un efecto tóxico sobre el crecimiento, y a concentraciones bajas ejerce un efecto estimulador de la biosíntesis de rifamicina B. Así mismo, considerando que es posible obtener mutantes con diferente grado de sensibilidad al efecto tóxico del barbital, se plantea la siguiente hipótesis:

Hipótesis

a) En virtud de que existe una relación entre el grado de sensibilidad de *A. mediterranei* al efecto tóxico del barbital sobre el crecimiento y el efecto estimulador sobre la biosíntesis de rifamicina B, mutantes con una mayor sensibilidad al efecto tóxico del barbital mostrarán un incremento en el nivel de producción de rifamicina B en comparación con la cepa progenitora.

b) El barbital actúa como inhibidor del consumo de oxígeno de la cadena respiratoria, lo que por un lado favorece su utilización en la biosíntesis de rifamicina y por el otro a elevadas concentraciones resulta tóxico para el crecimiento.

III. Objetivos

III.1. Objetivo general

Profundizar en el conocimiento del efecto del barbital sobre la biosíntesis de rifamicina B por *A. mediterranei* y su posible aplicación en la obtención de cepas mutantes con una capacidad biosintética incrementada.

III.2. Objetivos específicos

1. Establecer si dosis subletales de barbital ejercen algún efecto sobre el consumo de oxígeno, la respiración, el crecimiento de *A. mediterranei* y la biosíntesis de rifamicina B.
2. Diseñar un método de enriquecimiento y selección de mutantes sensibles al efecto tóxico del barbital.
3. Obtener mutantes resistentes y sensibles al efecto tóxico del barbital.

-
4. Comparar los fenotipos de producción de rifamicina, de las mutantes obtenidas, verificando si el coeficiente asociado al crecimiento (α) es el factor fundamental que determina el nivel de producción o si este está asociado a un cambio en la energía de mantenimiento (m).

IV.1. Microorganismos

Amycolatopsis mediterranei cepa tipo M18 (ATCC 21789). Todas las cepas (ATCC 13685), *A. mediterranei* cepa M18 (ATCC 21789) y cepas mutantes (series Mrb y Msb) derivadas de la cepa fueron conservadas por liofilización, y propagadas en tubos inclinados con agar Bennet.

IV.2. Medios de cultivo

Agar Bennet (Margalith and Pagani, 1961) (Composición en g/L):

Glucosa 10 (Baker, Lot. H29477)
Extracto de carne 1 (Bioxon, Lot. D903214E)
NZ-amina A 2 (Bioxon)
Extracto de levadura 1 (Bioxon, E603940F)
Agar bacteriológico 20 (Bioxon, G401628H)
pH 7.0 después de esterilizar

Medio Semilla (Kluepfel et al., 1965) (g/L):

Glucosa 20 (Baker, Lot. H29477)
Harina de soya 20 (Nutricasa, grado industrial, Lot. 02/03/89)
CaCO₃ 2.5 (Baker, Lot. A42343)
MgSO₄·7H₂O 0.4 (Baker, Lot. F30157)
FeSO₄·7H₂O 0.01 (Baker, Lot. 39210)
ZnSO₄·7H₂O 0.05 (Productos Químicos Monterrey, Lot. 004348)
CoCl₂·6H₂O 0.003 (Baker)
pH 7.5 con NaOH 5N
pH después de esterilizar 7.0

Medio de Producción FM (Mejía et al., 1990) (g/L):

Glucosa, 120 (Baker, Lot. H29477)
Harina de soya, 15 (Nutricasa, grado industrial, Lot. 02/03/89)
(NH₄)₂SO₄, 5 (Baker, Lot. A24464)
KH₂PO₄, 1 (Baker)
CaCO₃, 6 (Baker, Lot. A42343)
MgSO₄·7H₂O, 1 (Baker, Lot. F30157)

CuSO₄·5H₂O, 0.0033 (Técnica Química S.A., Lot. 031506483)
FeSO₄·7H₂O, 0.01 (Baker, Lot. 39210)
ZnSO₄·7H₂O, 0.05 (Productos Químicos Monterrey, Lot. 004348)
MnSO₄·7H₂O, 0.004 (Baker)
CoCl₂·6H₂O, 0.002 (Baker)
(NH₄)₂MoO, 0.001 (Baker)
5,5-dietilbarbiturato de sodio, 0.7 (Sigma, Lot. 33H1316)
pH 7.5 con NaOH 5N
pH después de esterilizar 7.0

Medio de Producción ASS/7 (Margalith and Pagani, 1961) (g/L):

Glucosa, 70 (Baker, Lot. H29477)
Harina de soya, 15 (Nutricasa, grado industrial, Lot. 02/03/89)
(NH₄)₂SO₄, 7 (Baker, Lot. A24464)
KH₂PO₄, 2 (Baker)
CaCO₃, 6 (Baker, Lot. A42343)
MgSO₄·7H₂O, 1 (Baker, Lot. F30157)
CuSO₄·5H₂O, 0.0033 (Técnica Química S.A., Lot. 031506483)
FeSO₄·7H₂O, 0.01 (Baker, Lot. 39210)
ZnSO₄·7H₂O, 0.05 (Productos Químicos Monterrey, Lot. 004348)
MnSO₄·7H₂O, 0.004 (Baker)
CoCl₂·6H₂O, 0.002 (Baker)
(NH₄)₂MoO, 0.001 (Baker)
5,5-dietilbarbiturato de sodio, 0.7 (Sigma, Lot. 33H1316)
pH 7.5 con NaOH 5N
pH después de esterilizar 7.0

Medio de Producción ASS/8 (Margalith and Pagani, 1961) (g/L):

Glucosa, 70 (Baker, Lot. H29477)
Harina de soya, 5 (Nutricasa, grado industrial, Lot. 02/03/89)
(NH₄)₂SO₄, 7 (Baker, Lot. A24464)
KH₂PO₄, 2 (Baker)
CaCO₃, 6 (Baker, Lot. A42343)
MgSO₄·7H₂O, 1 (Baker, Lot. F30157)
CuSO₄·5H₂O, 0.0033 (Técnica Química S.A., Lot. 031506483)
FeSO₄·7H₂O, 0.01 (Baker, Lot. 39210)
ZnSO₄·7H₂O, 0.05 (Productos Químicos Monterrey, Lot. 004348)
MnSO₄·7H₂O, 0.004 (Baker)
CoCl₂·6H₂O, 0.002 (Baker)

$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, 0.001 (Baker)
5,5-dietilbarbiturato de sodio, 0.7 (Sigma, Lot. 33H1316)
pH 7.5 con NaOH 5N
pH después de esterilizar 7.0

Medio Mineral MM (g/L):

Fuente de carbono, 5
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 (Baker, Lot. A24464)
 KH_2PO_4 , 1 (Baker)
 CaCO_3 , 6 (Baker, Lot. A42343)
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 (Baker, Lot. F30157)
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.0033 (Técnica Química S.A., Lot. 031506483)
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 (Baker, Lot. 39210)
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 (Productos Químicos Monterrey, Lot. 004348)
 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.004 (Baker)
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.002 (Baker)
pH 7.5 con NaOH

Medio de Producción Lee (Lee *et al.*, 1983) (g/L):

Glucosa, 120 (Baker, Lot. H29477)
Bacto-peptona, 10 (Bioxon)
Extracto de levadura, 10 (Bioxon, E603940F)
5,5-dietilbarbiturato de sodio, 0.7 (Sigma, Lot. 33H1316)
pH 7.2 con NaOH

Medio CRM (Hopwood *et al.*, 1985) (g/L):

Glucosa, 10 (Baker, Lot. H29477)
Sacarosa, 103 (Baker)
 $\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 101.2 (Baker)
Triptona de soya, 15 (Bioxon)
Extracto de levadura, 5 (Bioxon, E603940F)

IV.3. Amortiguadores y Reactivos

Amortiguador P (Hopwood *et al.*, 1985):

Solución basat:

Sacarosa, 103 g (Baker)
K₂SO₄, 0.25 g (Baker)
MgCl₂·6H₂O, 2.02 g (Baker)
¹Solución de elementos traza, 2 mL
Aforar con agua destilada a 800 mL
Dosificar en alíquotas de 80 mL y esterilizar

Antes de usar, adicionar a cada matraz en orden:

KH₂PO₄, 1 mL (Baker) (0.5%)
CaCl₂·2H₂O (3.68%), 10 mL (Baker)
Amortiguador TES (5.73% pH 7.2), 10 mL (Sigma, Lot. 23H5711)

¹Solución de elementos traza (mg/L):

ZnCl₂, 40 (Baker)
FeCl₃·6H₂O, 200 (Baker)
CuCl₂·2H₂O, 10 (Baker)
MnCl₂·4H₂O, 10 (Baker)
Na₂B₄O₇·10H₂O, 10 (Baker)
(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 10 (Baker)

Reactivo de Dische (Dische, 1955)

Difenilamina, 4 g (Baker)
Ácido acético glacial, 400 mL (Malinkrof)
Ácido sulfúrico concentrado, 11 mL (Baker)
Almacenar en frasco ámbar a 4 °C.

IV.4. Métodos analíticos

Cuantificación de rifamicina por método espectrofotométrico.

Se cuantificó rifamicina B mediante el método espectrofotométrico reportado por Pasqualucci *et al.* (1970), el cual se basa en la oxidación por NaNO_2 de la hidroxiquinona del compuesto, modificando su máximo de absorción (425 nm) en el espectro de luz visible. De esta

forma se obtiene una absorción diferencial de la rifamicina B contra su forma oxidada, lo cual permite restar todos los compuestos que absorben a 425 nm presentes en el caldo de fermentación.

Cuantificación de rifamicina por HPLC.

Se cuantificó también la rifamicina B, W y V, mediante HPLC, según la técnica en gradiente en fase reversa descrita por Vohra y Dube (1989) y Vékey *et al.* (1989). El equipo empleado fue Waters con sistema de dos bombas y detector a 254 nm. Se logró una adecuada separación con una columna Nova Pak C18 en fase reversa, con un tamaño de partícula esférica de 4 μm y tamaño de poro de 60 \AA , 3.9 x 300 mm. Inyección de 100 μL a temperatura ambiente. Fase móvil: disolvente A, fosfato de amonio 0.05 M en agua desionizada pH 7.2 por adición de NaOH

0.1 M; el disolvente B fue metanol grado HPLC. Ambos disolventes fueron filtrados (0.22 μm) y desgasificados antes de usarse. El programa de mezcla de disolventes, fue un gradiente lineal de 10 min. de 50 a 75% del disolvente B en A, y entonces mantenido a 75% de B durante 15 min. Al final de cada corrida, las condiciones iniciales fueron restablecidas y la columna equilibrada por 10 min. El flujo fue 1 mL/min. en todos los casos. La calibración se hizo con estándares comerciales (Sigma) a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Cuantificación de Glucosa

La cuantificación de glucosa de las muestras del caldo de fermentación, fue realizada mediante el método de Miller (1959) para la determinación de

azúcares reductores. La curva patrón se hizo de 0.1 a 1.0 g/L de glucosa, y las muestras se diluyeron lo necesario para caer en el rango de la curva patrón.

Cuantificación de biomasa por peso seco

Para la determinación cuantitativa de biomasa de las muestras de medio líquido de fermentación, sin sólidos en suspensión, se hizo mediante peso seco en estufa de vacío a 60 °C hasta observar un peso constante, aproximadamente a las 4 h. En algunos casos cuando se requirió de un resultado rápido (p.e. normalización del inóculo), la

muestra se filtró y lavó con acetona con el fin de acelerar la pérdida de agua. Por su parte, la cuantificación de la biomasa de muestras de medio sólido (cultivos en agar), se realizó una serie de lavados previos de la muestra con agua destilada caliente (aprox. 80 °C), con la finalidad de remover el agar.

Cuantificación de biomasa por DNA

Con el fin de estimar de manera más rápida el crecimiento en comparación con la obtenida por peso seco, se cuantificó el DNA correlacionándolo con una curva patrón de biomasa. Para ello se tomó 1 mL de muestra y 2 mL de reactivo de Dische, se colocó en baño a ebullición durante 10 minutos exactos y se enfrió en agua con hielo para posteriormente leer a 600 nm. Estos datos se interpolaron en una curva patrón, la cual se obtuvo tomando 0, 0.3,

0.6 ... hasta 3 mL de una suspensión lavada de micelio y completando el volumen de cada tubo a 3 mL con solución salina (0.9%). La mitad del volumen de cada tubo se destinó a la determinación de biomasa por peso seco y la otra mitad a DNA por Dische. Con estos datos se obtuvo una gráfica de DNA (absorbancia a 600 nm) contra concentración de biomasa por peso seco.

IV.5. Condiciones de crecimiento y producción de rifamicina

Fermentación líquida en reactor de 1 L.

A partir del crecimiento de *A. mediterranei* en un tubo inclinado con agar Bennet, se homogeneizó en 3 mL de solución salina al 0.9 %. Con esta suspensión se inocularon 4 matraces de 250 mL con 50 mL de medio semilla, los

cuales fueron incubados a 25 °C y 150 r.p.m. durante 72 h aproximadamente. Con 140 mL del cultivo semilla se inoculó el fermentador (1 L de capacidad y un volumen de trabajo de 0.7 L) con 60 mL de medio de producción (medio FM) sin barbital.

Fermentación líquida en matraz.

Al igual que en el punto anterior se maceró el crecimiento de *A. mediterranei* de un tubo inclinado con agar Bennet, con 3 mL de solución salina al 0.9 %. Con esta suspensión se inocularon 4 matraces de 250 mL con 50 mL de medio semilla, los cuales fueron incubados a 25 °C y 150 r.p.m. durante 72 h aproximadamente. Cada uno de los matraces de 250 mL con 20 mL de medio de producción (medio FM) se inoculó con 5 mL del cultivo semilla previamente obtenido.

Fermentación líquida en burbujeadores.

Para estas pruebas se utilizaron tubos de vidrio de 50 mL de capacidad acondicionados con una salida de aire hasta el fondo del tubo, y una entrada en

la parte superior del mismo. Se siguió el mismo esquema de inoculación que el empleado para el fermentador y para los matraces. Los burbujeadores se usaron con 7 mL de medio de producción y se airearon con 4 l/h de aire estéril. A la salida de los mismos, se conectaron a un sistema de muestreo automático, el cual consiste en un muestreador neumático controlado por una computadora, este sistema administra una cantidad fija de aire procedente de la fermentación, a un cromatógrafo de gases. Una vez separados los componentes del aire, la computadora, mediante un software adaptado y modificado (Máxima 820, Waters) almacena y calcula las concentraciones, para finalmente generar las cinéticas de respiración (Mejía *et al.* 1997).

IV.6. Crecimiento de *A. mediterranei* en diferentes fuentes de carbono.

A partir del crecimiento de *A. mediterranei* en un tubo inclinado con agar Bennet, se homogeneizó en 3 mL de solución salina al 0.9 %. Con esta suspensión se inocularon matraces de 250 mL con 50 mL de medio líquido Bennet (misma composición que el agar Bennet). Se incubaron a 25 °C y 150 r.p.m. durante 72 h aproximadamente. El micelio obtenido fue cosechado y lavado por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 15 min. con solución salina al 0.9 %. Posteriormente fue sometido a ayuno en

medio mineral sin fuente de carbono, a 25 °C y 150 r.p.m. durante 24 h aproximadamente. Con este micelio se inocularon matraces de 250 mL con 50 mL de medio mineral, con 10 g/L de la fuente de carbono (glucosa, citrato y lactato), con y sin barbital (2 g/L). Se inocularon también matraces con medio mineral y sin fuente de carbono. Todos los matraces fueron incubados a 25 °C y 150 r.p.m. durante 240 h aproximadamente.

IV.7. Consumo de oxígeno de células en reposo.

El micelio obtenido durante la fermentación en matraz se cosechó y lavó por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 15 min. con solución salina al 0.9 %. A esta suspensión se le determinó peso seco y se mantuvo en hielo para la determinación del consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno se midió en una cámara de 3 mL. provista de un oxímetro con electrodo de Clark y graficador. Se realizaron las mediciones en 2.7 mL de una solución 117 mM de la fuente de carbono, 0.25 mL de amortiguador de fosfatos 0.2 M, pH 7 y 500 µg de peso seco de la suspensión micelial

(aproximadamente 50 µl). Para poder determinar el peso seco en el momento del análisis, se filtró 1 mL. de la muestra y se lavó con acetona con la finalidad de acelerar el proceso de deshidratación, posteriormente se colocó la muestra en una estufa de vacío a 60 °C por aproximadamente una hora.

Las adiciones de barbital a la cámara de medición, se hicieron a partir de una solución con 105 g/L con la cantidad necesaria para obtener 1.4 g/L de concentración final. Se repitió el experimento usando 2.1 y 2.8 g/L de barbital.

IV.8. Espectros de absorción característicos de citocromos, de micelio proveniente de cultivos con y sin barbital.

El medio de producción empleado fue el reportado por Læe *et al.* (1983), sin y con 0.7 g/L de barbital. El cultivo se cosechó a diferentes tiempos de fermentación a 4000 r.p.m. por 10 min. El paquete celular se resuspendió en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0. A 2 mL. de la suspensión celular perfectamente homogeneizada se le añadió 1 mL de etilen-glicol al 66.6%.

Para los espectros diferenciales, 800 µL de la muestra se redujeron con una *pizca* de ditionita (lo que se alcance a tomar con la punta de la espátula) y otros 800 µL como referencia se oxidaron con otra

cantidad similar de persulfato de amonio. Se leyó en un espectrofotómetro de doble rayo (SLM-AMINCO, DW-2000 UV-Vis). Para los espectros absolutos, se empleó una solución de leche descremada como referencia, ajustada de acuerdo con la turbidez de la muestra. La muestra se redujo con ditionita, o bien con 40 µL de succinato 0.6 M pH 7. Finalmente, para formar los posibles complejos con monóxido de carbono, la muestra una vez agregado el agente reductor, se incubó durante 60 min. y se burbujeó CO durante 30 min. en oscuridad. Por último, se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y en

obscuridad. Para todos los casos, la muestra y la referencia se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron

congeladas durante el corrimiento del espectro.

IV.9. Obtención de membranas y fracción soluble a partir de micelio proveniente de cultivos con y sin barbital.

A partir de un cultivo crecido en medio de producción Lee con 0.7 g/L de barbital, y de otro de medio Lee sin barbital, se cosechó y lavó la biomasa a 6000 r.p.m., se resuspendió en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7, y se le adicionaron perlas de vidrio. La mezcla se colocó en un homogeneizador y se molió en frío por 10 intervalos de 30 segundos, con descansos de 5 min. Posteriormente se centrifugó a baja velocidad (6000 r.p.m.) durante 10 min.,

con el fin de eliminar perlas y células sin romper. El sobrenadante se centrifugó a alta velocidad (40,000 r.p.m.) 40 min., el paquete se lavó dos veces con amortiguador de fosfatos 50 mM y finalmente se resuspendió en el mínimo volumen en amortiguador de fosfatos-etilén glicol 66.6% (2:1). El sobrenadante, por su parte se concentró por liofilización y se resuspendió igualmente en amortiguador de fosfatos-etilén glicol.

IV.10. Mutagénesis y selección de mutantes resistentes a barbital.

Se tomaron 2 mL de una suspensión micelial de *A. mediterranei* (ATCC 21789) cepa M18, y se inoculó un matraz de 250 mL con 50 mL de medio líquido Bennet. Se incubó a 25 °C en agitación a 150 rpm durante 72 h. La biomasa obtenida se lavó por centrifugación a 4000 rpm por 10 min con solución salina (NaCl 0.9%) y se resuspendió en 30 mL, de los cuales 3 mL se destinaron a cuantificación de biomasa por DNA (Dische, 1955). El volumen restante se colocó en una caja de petri estéril con un agitador magnético, ajustando la agitación a 85 rpm. La fuente de luz ultravioleta (250 nm) fue colocada a una

distancia adecuada para lograr una intensidad de 125 $\mu\text{w}/\text{cm}^2$, medida con un medidor de luz ultravioleta (Black-Ray Ultraviolet Meter, UVP, Inc. Modelo J225). Bajo estas condiciones y en obscuridad se llevó a cabo la mutagénesis, tomando 0.9 mL de muestra por duplicado cada minuto durante 10 minutos. Las muestras se colocaron en viales con 0.9 mL de glicerol al 50%, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C. Posteriormente, se inocularon placas de agar Bennet con 5, 7.5 y 10 g/L de barbital, las cuales se incubaron en la obscuridad a 25 °C durante 144 h aproxi-

madamente. Las colonias obtenidas se replicaron en medio mínimo (MM) e incubaron por un período similar.

IV.11. Formación y regeneración de protoplastos, para mutagénesis y selección de mutantes sensibles a barbital.

A partir de una suspensión micelial de *A. mediterranei* (ATCC 21789) cepa M18 en solución salina y glicerol al 25%, sometida a un tratamiento mutagénico con luz U.V., se inoculó un matraz de 100 mL con 15 mL de medio CRM adicionado con 2.5% de glicina, el cual fue incubado a 230 r.p.m. y 25 °C durante 36 h. El micelio se cosechó y lavó a 5000 r.p.m. con solución P (Hopwood, *et al.*, 1985), y se resuspendieron en 5 mL de solución P con 5 mg/mL de lisozima. Se incubó 3 h. a 30 °C, se filtró y se lavó a 2000 r.p.m. con solución P tres veces. Los protoplastos se resuspendieron en 1 ó 2 mL, con los que se sembraron placas con medio CRM y se les colocó encima una segunda capa delgada de agar suave del mismo medio (preparado con agar Difco). Las placas se incubaron a 25 °C, hasta observar el crecimiento de los protoplastos regenerados. El procedimiento se repitió usando otra muestra igual de micelio mutagenizado y

de igual forma se inoculó un matraz de 100 mL con 15 mL de medio CRM adicionado con 2.5% de glicina, pero ahora con 2.5 g/L de barbital; concentración a la cual la cepa M18 puede crecer. Bajo estas condiciones se esperaba que el micelio sensible al barbital no crece, por lo tanto queda como micelio viejo y menos sensible a la posterior acción de la lisozima. Posteriormente se cosechó y lavó a 5000 r.p.m. con solución P (Hopwood, *et al.*, 1985), resuspendiéndose en 5 mL de solución P con 5 mg/mL de lisozima (hasta ahora el procedimiento fue el mismo que para la primera muestra). Se incubó 3 h. a 30 °C y se lavó a 2000 r.p.m. con agua destilada, con el fin de eliminar a los protoplastos generados y conservar al micelio "viejo" que resistió la acción de la lisozima. La muestra se sembró en medio Bennet, y las colonias obtenidas, fueron replicadas en placas con agar Bennet con 0, 2.5 y 5 g/L de barbital.

IV.12. Estimación de parámetros de la fermentación

El programa de regresión no-lineal (Solver, Microsoft Windows 95) resultó apropiado para ajustar el modelo matemático a los datos experimentales,

con la finalidad de determinar en las mutantes obtenidas y la cepa progenitora en medio de producción el coeficiente de mantenimiento m y los

coeficientes α y β , con los cuales podemos determinar si existe relación entre la formación de producto y el crecimiento.

Los modelos usados fueron los siguientes:

$$dx/dt = \mu (1-x/x_{max}) x$$

$$-dS/dt = \mu dx/dt + mx$$

$$dP/dt = \alpha dx/dt + \beta x$$

Donde: t = tiempo de fermentación, x = biomasa, P = producción de rifamicina, S = sustrato residual, μ = velocidad

específica de crecimiento, m = sustrato requerido para el mantenimiento celular, β = constante de proporcionalidad para un proceso por lote, α = constante de proporcionalidad para un proceso por lote. Con las siguientes soluciones:

$$x = x_{max} / (1 + ((x_{max} - x_0) / x_0) e^{-\mu t}) ;$$

$$S = S_0 - ((x - x_0) / x) - (mx_{max} / \mu) \ln (x_{max} - x_0) / (x_{max} - x) ;$$

$$P = P_0 + \alpha (x - x_0) + (\beta x_{max} / \mu) \ln (x_{max} - x_0) / (x_{max} - x)$$

IV.13. Reproducibilidad de resultados

Todos los experimentos fueron realizados por duplicado y repetidos al menos una vez. Los resultados pre-

sentados son valores promedio, con una variación máxima no mayor del 10%.

V. Resultados

V.1. Evaluación y selección de un medio de producción

Con la finalidad de contar con un sistema de fermentación que proporcione niveles adecuados de producción de rifamicina B para la evaluación y estudio del efecto del barbital sobre su biosíntesis, se evaluaron 4 medios de cultivo, 2 de ellos (ASS/7 y ASS/8) reportados por Margalith y Pagani, en 1961, el medio Lee, reportado por Lee *et al.* (1983), y

el medio FM, el cual es un medio tipo industrial (Mejía *et al.*, 1990). Los resultados se muestran en la fig.V.1, en donde se pudo notar claramente que la mayor producción fue obtenida con el medio FM. La tabla 1, resume las características más importantes de la fermentación en cada uno de los distintos medios.

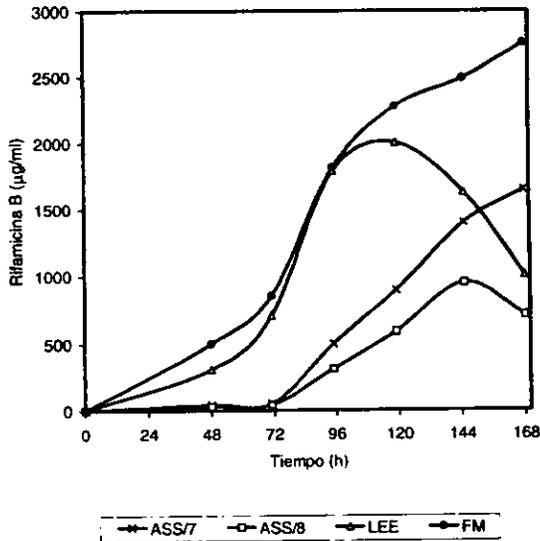


Fig. V.1. Cinéticas de producción de rifamicina B por *A. mediterranei* (M18) en matraz de 250 ml con 25 ml de diferentes medios de producción.

	ASS/7	ASS/8	Lee	FM
Producción máxima (g/L)	1.62 (± 0.07)	0.96 (± 0.04)	2.03 (± 0.07)	2.70 (± 0.13)
Productividad (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	9.6 (± 0.48)	6.7 (± 0.24)	16.9 (± 0.6)	16.1 (± 0.74)
Glucosa residual (g/L)	2	5	8	8
pH final	6.4	4.1	5.6	5.8

Tabla 1. Características en la producción de rifamicina por *A. mediterranei* en los diferentes medios de producción evaluados.

V.2. Fermentación en matraz de 250 mL

Se seleccionó el medio FM, debido a que en él se alcanzó la máxima producción (2.7 g/L), con una productividad elevada (16.1 mg L⁻¹ h⁻¹) y el menor tiempo de inicio de producción. Con este medio se procedió a evaluar el efecto del barbital sobre la producción de rifamicina B. Se determinaron las cinéticas de producción de rifamicina B, el crecimiento, consumo de glucosa y evolución del pH durante el desarrollo de *A. mediterranei* en matraz con medio FM y el efecto del barbital sobre estos parámetros. La fig. V.2 muestra que en ausencia de barbital (sistema testigo), la producción se inició después de las 24 h y antes de las 48 h, y alcanzó una producción máxima de 1500 µg/mL a las 118 h del cultivo.

Con respecto a los resultados obtenidos en medio FM con 2 g/L de barbital (fig. V.3), los resultados fueron muy similares con respecto al testigo, esto en cuanto al inicio y tiempo de producción máxima, la cual fue de

cerca de 1400 µg/mL. No se observaron diferencias significativas en el consumo de glucosa a lo largo de la fermentación, no así con el pH, el cual mostró oscilaciones mayores en presencia de barbital que en cultivo testigo. El crecimiento no fue posible medirlo debido a que este medio contiene sólidos en suspensión que interfieren con la determinación del peso seco.

Debido a lo inesperado en los resultados anteriores, se repitieron las fermentaciones en matraz pero evaluando el efecto del barbital a una concentración de 0.7 g/L y en medio Lee, con la finalidad de reproducir las condiciones descritas por Lee *et al.* (1983) quien reporta el uso de la misma cepa (M18), además se tuvo la ventaja que en este medio fue posible medir el crecimiento sin las interferencias de los sólidos en suspensión del medio FM. Las figuras V.4, V.5 y V.6 muestran los resultados obtenidos, donde puede observarse que tampoco bajo estas condiciones se

observó un efecto significativo del barbital sobre la producción de rifamicina B. El crecimiento fue al igual que la producción ligeramente menor en ausencia de barbital, específicamente después de las 96 h. La única

diferencia encontrada con respecto a las fermentaciones con 2 g/L de barbital, fue que el pH fue más estable y parecido en presencia y ausencia de barbital.

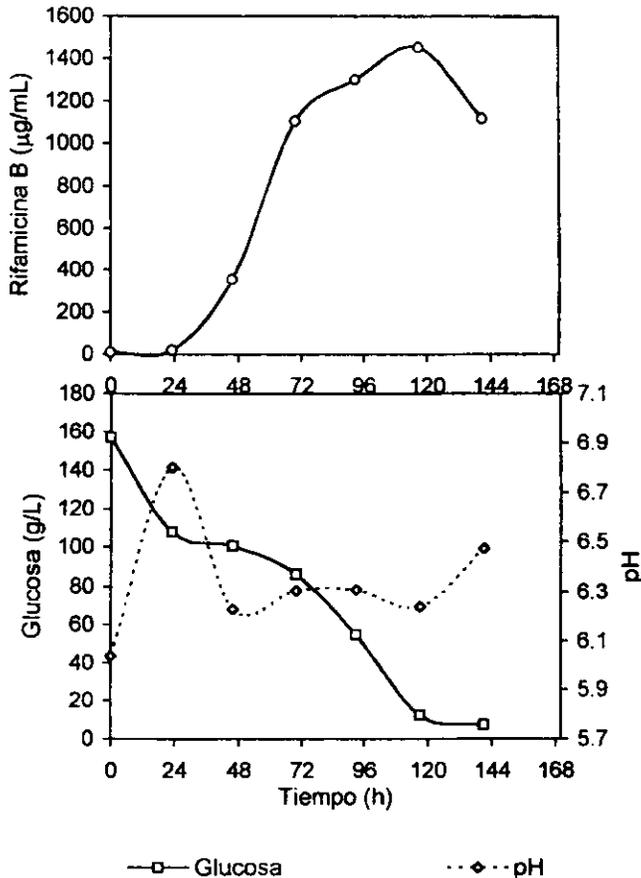


Fig. V.2. Cinéticas de producción de rifamicina B (arriba), pH y consumo de glucosa (abajo) por *A. mediterranei* (M18) en matraz de 250 ml con 25 ml de medio FM sin barbital (experimento testigo) a 25 °C y 250 rpm.

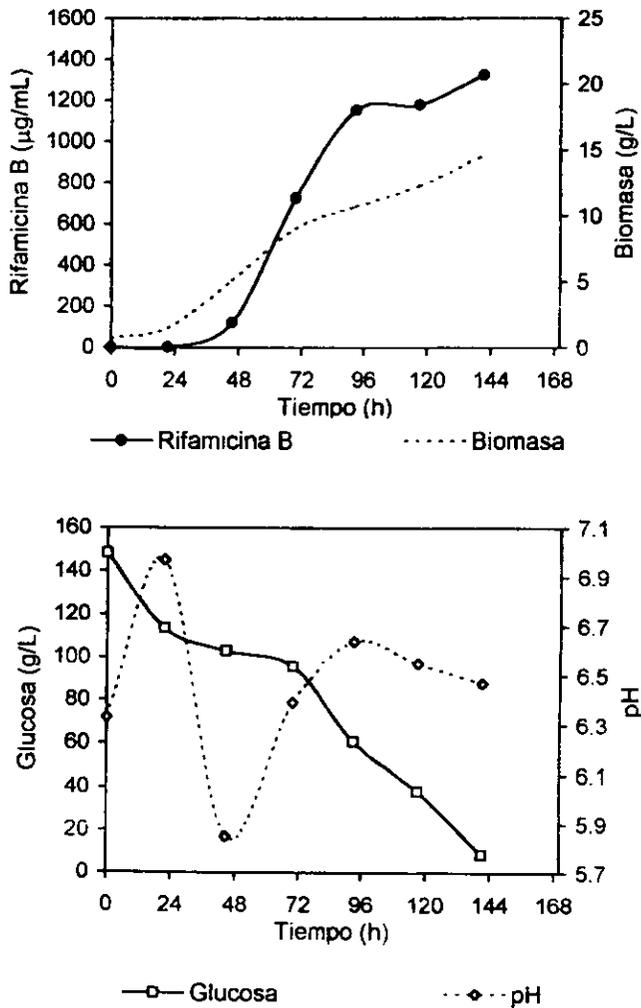


Fig. V.3. Cinéticas de crecimiento y producción de rifamicina B (arriba), pH y consumo de glucosa (abajo) por *A. mediterranei* (M18) en matraz de 250 mL con 25 mL de medio FM con barbital (2 g/L) a 25 °C y 250 rpm.

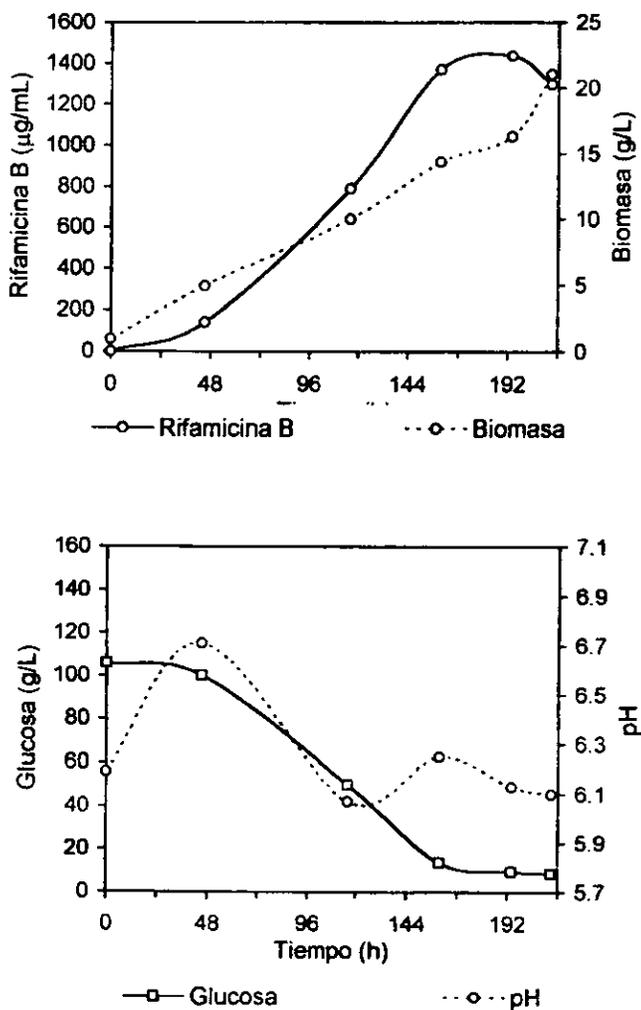


Fig. V.4. Cinéticas de crecimiento y producción de rifamicina B (arriba), pH y consumo de glucosa (abajo) por *A. mediterranei* (M18) en matraz de 250 ml con 25 ml de medio Lee sin barbital a 25 °C y 250 rpm.

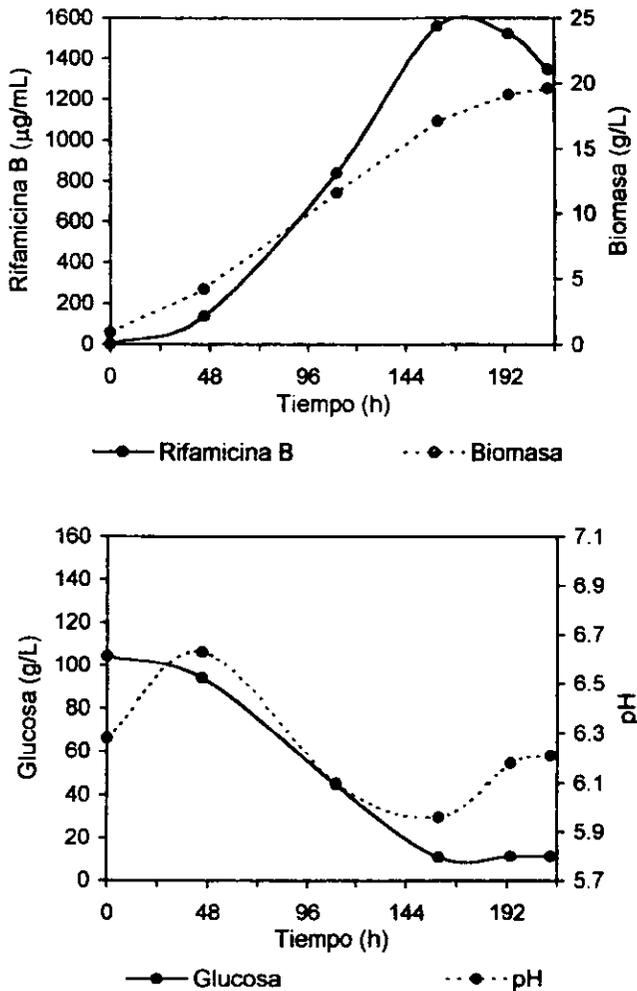


Fig. V.5. Cinéticas de crecimiento y producción de rifamicina B (arriba), pH y consumo de glucosa (abajo) por *A. mediterranei* (M18) en matraz de 250 mL con 25 mL de medio Lee con 0.7 g/L de barbital a 25 °C y 250 rpm.

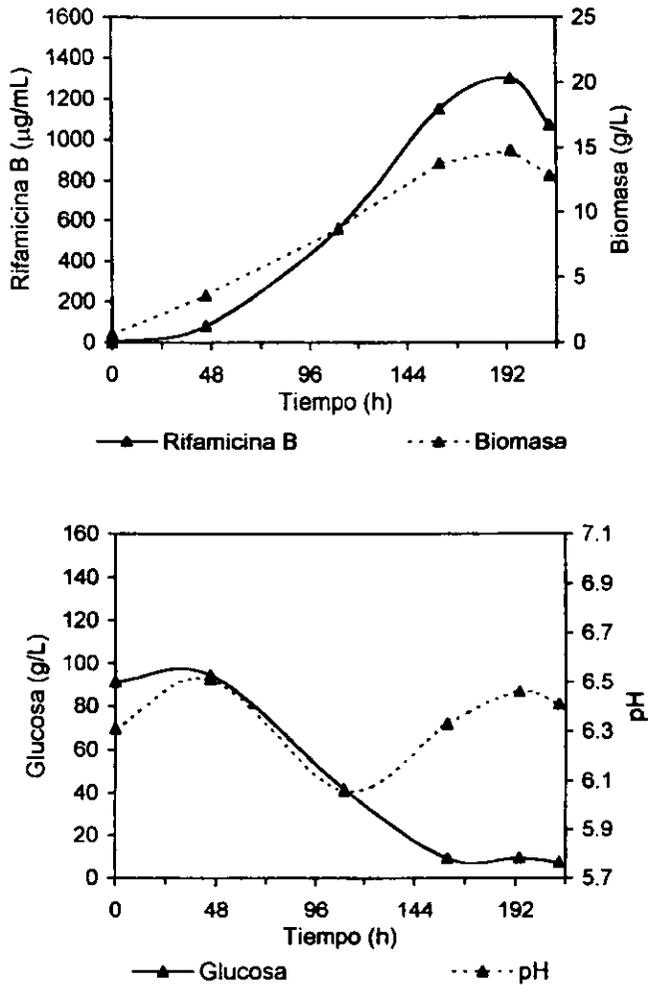


Fig. V.6. Cinéticas de crecimiento y producción de rifamicina B (arriba), pH y consumo de glucosa (abajo) por *A. mediterranei* (M18) en matraz de 250 mL con 25 mL de medio Lee con 2 g/L de barbital a 25 °C y 250 rpm.

La fig.V.7 muestra la comparación de las cinéticas de producción específica con y sin barbital. Los resultados muestran que bajo estas condiciones no se detectó incremento alguno en la producción de rifamicina B con la

adición de barbital al medio de cultivo, incluso fue posible observar que la producción en presencia de barbital fue ligeramente menor, de cualquier forma no fue el resultado esperado.

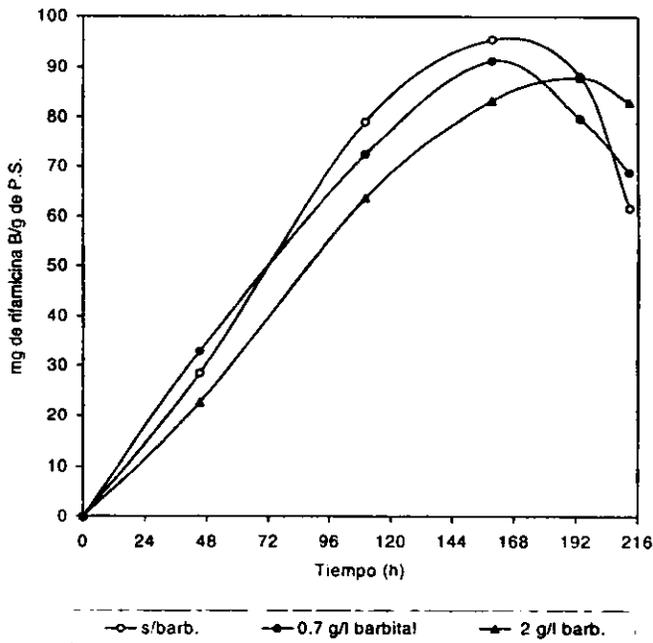


Fig. V.7. Cinéticas de producción específica de rifamicina B por *A. mediterranei* (M18) en matraz de 250 ml con 25 ml de medio de producción Lee con diferentes concentraciones de barbital.

V.3. Fermentación en reactor de 1 L

Los resultados obtenidos hasta este punto fueron, de cierta manera, contradictorios con lo reportado en la bibliografía, ya que no se detectaron diferencias significativas en el nivel de producción de rifamicina B en presencia y ausencia de barbitál. De acuerdo con lo anterior se planteó la hipótesis que esto se debió a que las condiciones de aireación no son las adecuadas para observar el efecto, ya

que además esto estaba de acuerdo con la idea original, en donde se plantea que existe una estrecha relación entre el consumo de oxígeno y el mecanismo de acción del barbitál. Para corroborar lo anterior se llevó a cabo una fermentación en reactor de 1 L, ya que en este sistema es posible controlar de manera más precisa el nivel de aireación requerido.

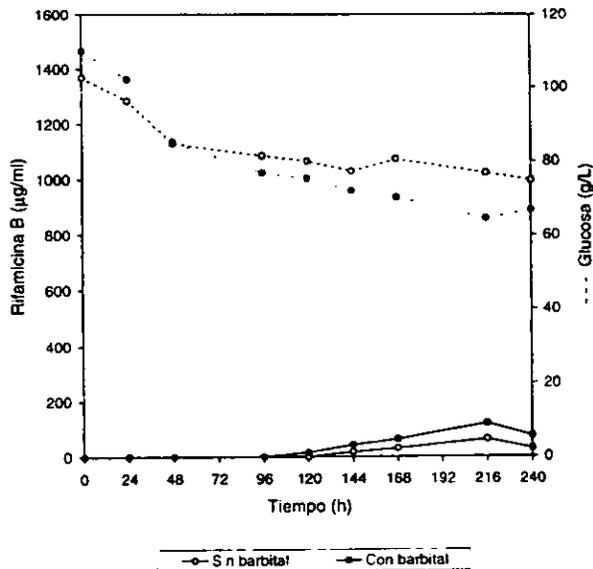


Fig. V.8. Cinética de producción de rifamicina B por *A. mediterranei* (M18) en fermentador de 1 L con 0.7 L de medio de producción Lee sin barbitál y con 0.7 g/L. Aireación 4 L/h, 500 r.p.m. a 25 °C

El resultado de la fermentación en reactor de 1 L, fue la producción excesiva de espuma, la cual obligó a disminuir la aireación y la agitación a niveles tan bajos que provocó la casi nula producción de rifamicina.

El experimento se repitió, usando Tween 20 como antiespumante, sin lograr resultados satisfactorios. Con el empleo de una mezcla de poli-dimetilsiloxano y dióxido de silicón se

logró controlar la espuma, sin embargo el nivel de producción de rifamicina fue extremadamente bajo. Los resultados se muestran en la fig. V.8, donde se puede observar que aun cuando la producción empezó a las 96 h, esta nunca rebasó los 100 µg/mL de rifamicina, lo cual resultó coherente con el bajo consumo de azúcares observado.

V.4. Fermentación con burbujeadores

Debido a que los resultados en fermentador de 1 L mostraron una muy baja producción, además de grandes problemas en el control del nivel de aireación, se decidió tratar de implementar un sistema basado en el uso de tubos burbujeadores, cuya ventaja sobre el fermentador fue la pequeña cantidad de medio, con lo cual se requirió de una aireación menos violenta para mantener la misma velocidad de aireación por volumen de medio.

En este sistema de burbujeadores, descrito en la sección de Material y Métodos, se pudo obtener un adecuado nivel de producción en un sistema que permitió evaluar el efecto del barbital con diferentes tasas de aireación, así como evaluar la respiración a lo largo de la fermentación. La fig. V.9 muestra los resultados obtenidos con una

aireación de 0.8 L/h en presencia y ausencia de barbital, en donde se observa una clara diferencia entre el cultivo sin barbital y el desarrollado en presencia de 0.7 g/L de barbital. La forma de la cinética de producción es similar en ambos casos, solo que el nivel máximo en presencia de barbital es de aproximadamente el doble (560 µg/mL) que la fermentación sin barbital y este fue alcanzado 48 h después (a las 168 h de fermentación). En cuanto al crecimiento, se observa un ligero incremento en el cultivo con barbital, sin embargo este no fue significativo. En los experimentos con una aireación de 2 y 3.4 L/h, no se observaron diferencias significativas en los niveles de producción en presencia y ausencia de barbital, es decir todos produjeron alrededor de 500 µg/mL de rifamicina B.

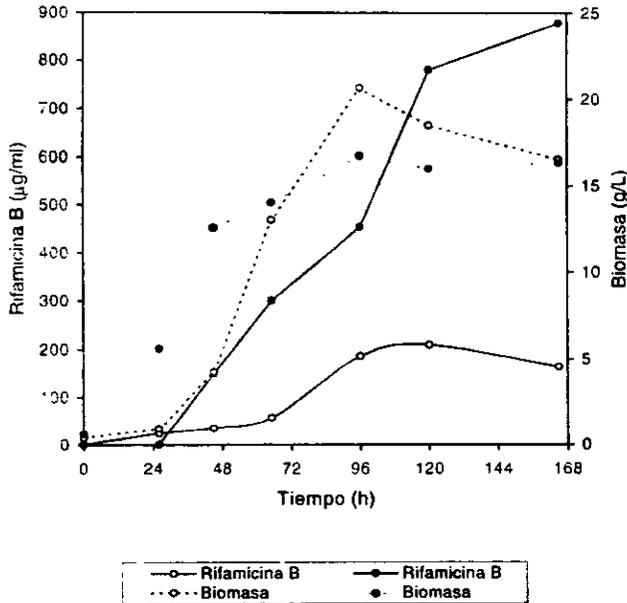


Fig. V.9. Cinéticas de crecimiento y producción de rifamicina B por *A. mediterranei* (M18) en burbujeadores de 50 ml con 7 ml de medio de producción Lee con 0.7 g/L de barbital (o) y sin barbital (n). Aireación de 0.8 L/h.

V.5. Respirometría durante la biosíntesis de rifamicina

De acuerdo con una de las hipótesis de este trabajo, en donde se planteó que el barbital puede actuar como inhibidor de la cadena respiratoria, resultó interesante evaluar el consumo de oxígeno y producción de CO₂ durante el curso de la fermentación en presencia y ausencia de barbital. De esta forma, en el sistema de burbujeadores fue posible seguir el

consumo de oxígeno y la producción de CO₂ durante el cultivo en medio Lee, en ausencia y en presencia de 0.7 g/L de barbital y una aireación de 0.8, 2 y 3.4 L/h. En la fig. V.10, se puede observar que a partir de las 48 h hubo una ligera disminución en la producción de CO₂ en el cultivo con barbital. Esta diferencia aunque es

muy pequeña cabe señalar que fue reproducible.

Con respecto al consumo de oxígeno, en la fig. V.11 se puede notar un considerable aumento del mismo en el cultivo con barbital, el cual se hace más evidente a partir de las 48 h. El consumo se estabiliza hasta el final de la fermentación en donde se observa

una tendencia a retomar al nivel original.

En la fig. V.12 se gráfica el cociente obtenido a partir del CO_2 producido entre el oxígeno consumido a todo lo largo del cultivo, tanto en presencia como en ausencia de barbital. En esta figura se acentúa más la diferencia encontrada en la respiración del microorganismo en ambos cultivos.

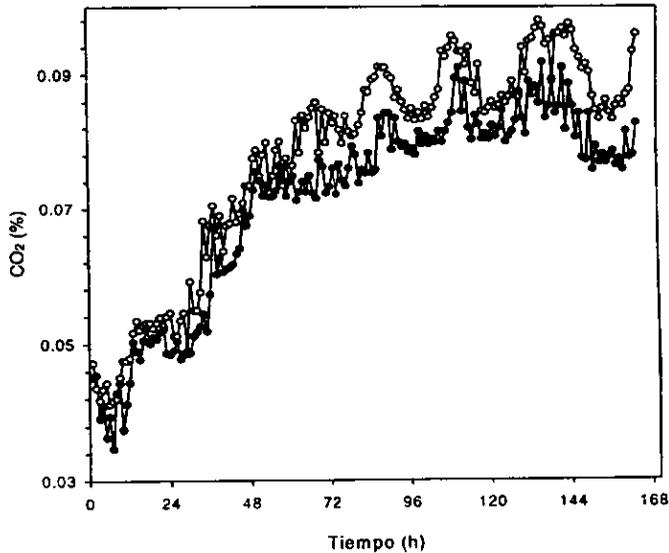


Fig. V.10. Cinética de producción de CO_2 por *A. mediterranei* durante el crecimiento y producción en burbujeadores de 50 mL con 7 mL de medio Lee a 25 °C. Cultivo sin barbital (-o-) y con 0.7 g/L (-●-). Aireación de 0.8 L/h.

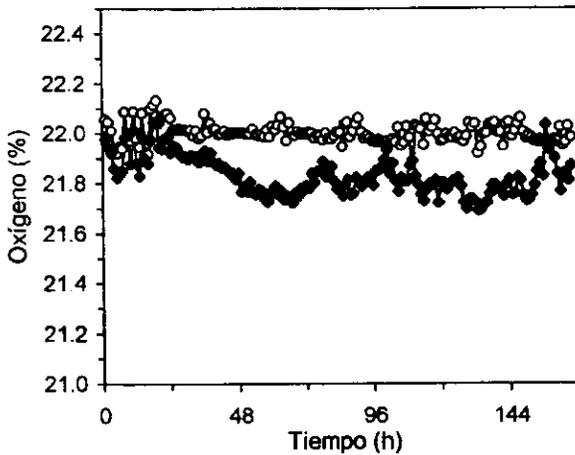


Fig. V.11. Consumo de oxígeno durante el crecimiento y producción de rifamicina B. *A. mediterranei* (M18) fue incubado a 25 °C en burbujeadores de 50 mL con 7 mL de medio Lee, con una aireación de 0.8 L/h, sin barbital (-○-) y con 0.7 g/L (-●-).

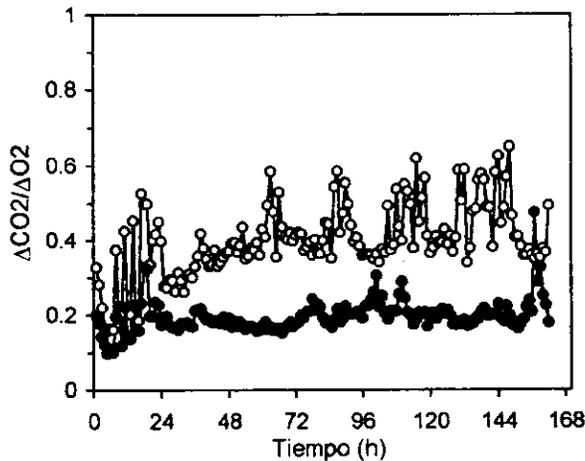


Fig. V.12. Cociente respiratorio durante el curso de la fermentación de *A. mediterranei* en burbujeadores con 7 mL de medio Lee sin barbital (-○-) y con 0.7 g/L (-●-).

V.6. Efecto del barbital sobre el consumo de oxígeno de células en reposo

Con la finalidad de diferenciar con mayor precisión el oxígeno que es utilizado en cadena respiratoria del empleado en biosíntesis de rifamicina, y por consiguiente determinar si el barbital ejerce el supuesto efecto inhibitorio, se procedió a determinar el consumo de oxígeno de células en reposo. Este sistema tiene la ventaja de que el microorganismo se encuentra en un medio carente de nitrógeno, con exclusivamente fuente de carbono y fosfatos, provocando con ello que la biosíntesis del antibiótico esté prácticamente detenida (restringida solamente a los intermediarios

acumulados y cierto metabolismo endógeno), de esta forma el consumo de oxígeno será ocasionado fundamentalmente por la actividad respiratoria.

La fig. V.13, muestra el consumo de O_2 de micelio de diferentes edades, en esta gráfica se puede notar un claro efecto inhibitorio del barbital, el cual fue más evidente después de las 90 h de edad. Contrastando con este efecto, pudimos observar la activación del consumo de oxígeno provocada por la adición del desacoplante 2, 4-dinitrofenol.

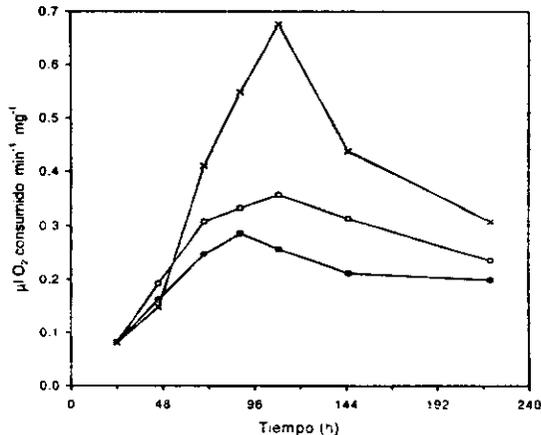


Fig. V.13. Consumo de oxígeno de células en reposo durante el crecimiento en medio Lee. 0.5 mL de muestra en 2.7 mL de glucosa 117 mM, 0.25 mL de fosfato 0.2 M pH 7. Con 2.1 g/L de barbital (-Δ-), con 0.092 g/L de dinitrofenol (x) y testigo (-o-).

En la misma fig. V.13 es interesante notar que la sensibilidad del micelio hacia ambos efectores, varía de acuerdo con la edad del cultivo, y se puede localizar la máxima sensibilidad entre las 105 y 145 h, tanto para el dinitrofenol como para el barbital.

Con la finalidad de determinar si el efecto observado varía con la concentración de barbital empleada, se repitió el experimento pero ahora con 1.4 y 2.1 g/L. Cabe señalar que estas concentraciones son similares a las usadas en el medio de fermen-

tación para estimular la biosíntesis de rifamicina B. Los resultados se muestran en la fig. V.14, observándose el mismo efecto que el encontrado con 0.7 g/L. Estos experimentos comprueban que el efecto inhibitorio del barbital sobre la respiración es saturado a niveles que van de 0.7 a 2.1 g/L de barbital, y los cuales están por debajo de las concentraciones a las cuales se observa inhibición sobre el crecimiento de la cepa M18 (Tabla 4).

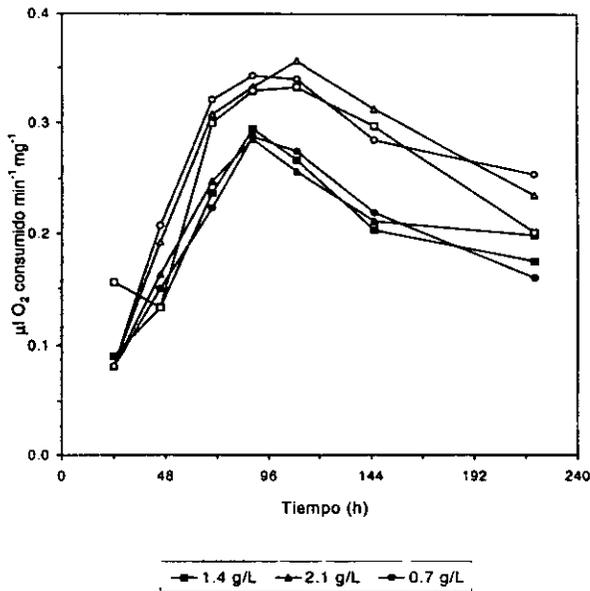


Fig. V.14. Consumo de oxígeno de células en reposo durante la cinética de crecimiento y producción en medio Lee. Sin barbitol (símbolos vacíos) y la misma muestra en presencia de diferentes concentraciones de barbitol (símbolos llenos).

V.7. Estudio espectral de citocromos

Con el fin de determinar si existe efecto inductor o represor del barbital sobre algún componente respiratorio, se procedió a realizar un estudio

espectral de citocromos con micelio proveniente de cultivos desarrollados en presencia y ausencia de barbital.

V.7.1. Espectro de absorción diferencial característico de citocromos, de micelio proveniente de cultivos con y sin barbital.

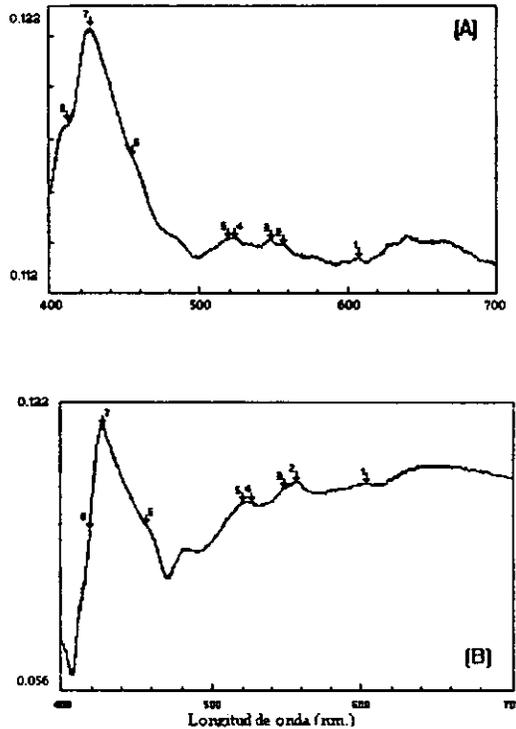


Fig. V.15. Espectro de absorción de células completas, cultivadas en medio de producción Lee sin barbital (A) y con 0.7 g/L de barbital (B). La muestra fue cosechada a las 48 h, reducida con ditionita, congelada en N_2 líquido y leída contra otra oxidada con persulfato de amonio.

Este tipo de espectros se basa en la capacidad de absorción en la región de la luz visible que presentan cada uno de los componentes respiratorios en estado reducido, a una determinada longitud de onda. De esta manera cuando una muestra de composición compleja; como lo es el micelio lavado pero integro, es analizado en un espectrofotómetro cuyo haz de luz se divide para pasar por un lado por la muestra en estado reducido y por el otro y de manera simultánea, por la misma muestra pero en estado oxidado, se logra un espectro con máximos de absorción característicos a cada componente presente en la muestra y que sea susceptible de ser reducido por un agente reductor; en este caso ditionita. De los máximos de absorción obtenidos es necesario diferenciar los correspondientes a los componentes respiratorios. Esto se logra gracias a la característica que tienen los citocromos de absorber en 3 regiones distintas de la luz visible, a estas regiones se les llama α , β y *Soret*.

Como puede observarse en la figura V.15A la cual corresponde al espectro obtenido con micelio cultivado en ausencia de barbital y cosechado a las 48 h, aparecen los picos característicos del citocromo b, en las zonas α , β y *Soret* (557, 524 y 427 nm respectivamente), marcados con los números 2, 4 y 7. Se observan también los picos característicos del citocromo c (549, 520 y 415 nm), marcados por su parte con los números 3, 5 y 8. Finalmente a 607 nm aparece un pico que podría ser aa_3 , sin embargo no se observa su correspondiente pico en la zona de *Soret* a 440 nm.

El espectro obtenido de micelio cultivado en presencia de barbital (Fig. V.15B) muestra de igual forma la presencia de citocromo b (557, 526 y 427 nm) (2, 4 y 7), citocromo c (549, 520 y 418 nm) (3, 5 y 8) y posiblemente aa_3 a 603 nm (1).

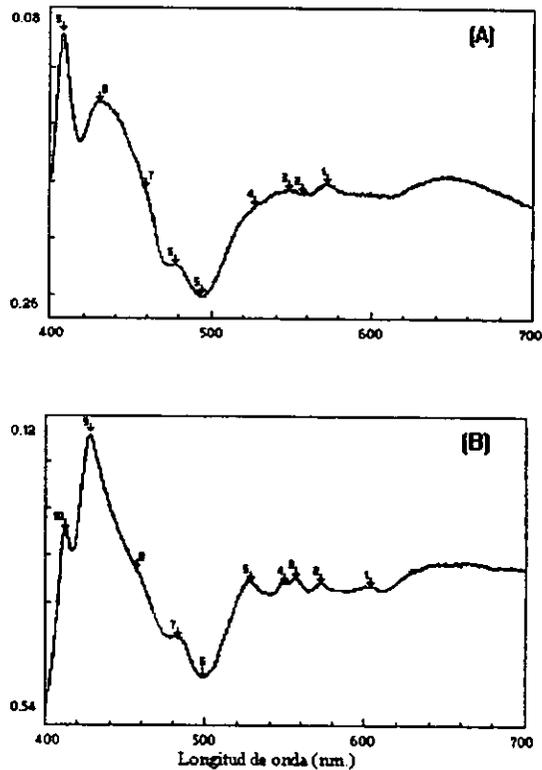


Fig. V.16. Espectro de absorción de células completas, cultivadas en medio de producción Lee sin barbital (A) y con 0.7 g/L de barbital (B). La muestra fue cosechada a las 137 h, reducida con ditionita, congelada en N_2 líquido y leída contra otra oxidada con persulfato de amonio.

Los espectros de la figura V.16, los cuales fueron obtenidos en condiciones similares, salvo que el micelio fue cosechado a las 137 h, muestran la presencia de citocromo b,

c y posiblemente aa_3 en micelio cultivado en presencia de barbital. Las diferentes longitudes de onda se muestran en la tabla 2.

Longitudes de onda en nm, correspondientes a la Fig. V.16A			
Citocromo:	α	β	Soret
b	557 (2)	527 (4)	431 (8)
c	549 (3)	--	408 (9)
aa ₃	--	--	--
P450	572 (1)	--	--
Longitudes de onda en nm, correspondientes a la Fig. V.16B			
Citocromo:	α	β	Soret
b	557 (3)	527 (5)	427 (9)
c	549 (4)	--	412 (10)
aa ₃	--	--	603 (1)
P450	572 (2)	--	--

Tabla 2. Identificación de picos del espectro mostrado en la fig. V.16 con las longitudes de onda de los principales citocromos reportadas para bacterias.

Finalmente los espectros de la figura V.17, con micelio cosechado a las 164 h, muestran la presencia de citocromo b, c y posiblemente aa₃ en micelio

cultivado en presencia de barbital. Las diferentes longitudes de onda se muestran en la tabla 3.

Longitudes de onda en nm, correspondientes a la Fig. V.17A			
Citocromo:	α	β	Soret
b	557 (2)	--	434 (8)
c	549 (3)	--	408 (9)
aa ₃	--	--	--
P450	572 (1)	538 (4)	--
Longitudes de onda en nm, correspondientes a la Fig. V.17B			
Citocromo:	α	β	Soret
b	557 (3)	527 (5)	428 (9)
c	549 (4)	--	410 (10)
aa ₃	--	--	603 (1)
P450	572 (2)	535	--

Tabla 3. Identificación de picos del espectro mostrado en la fig. V.17 con las longitudes de onda de los principales citocromos de bacterias.

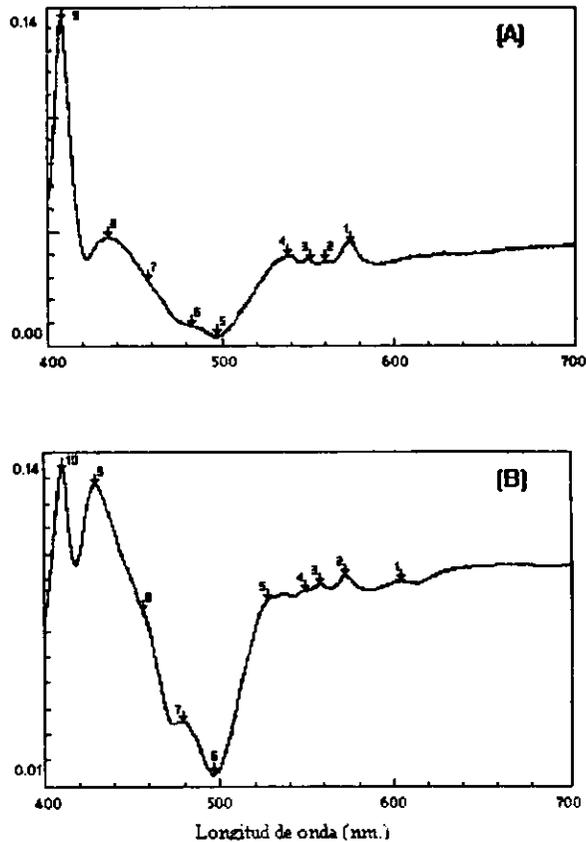


Fig. V.17. Espectro de absorción de células completas, cultivadas en medio de producción Lee sin barbital (A) y con 0.7 g/L de barbital (B). La muestra fue cosechada a las 164 h, reducida con ditionita, congelada en N_2 líquido y leída contra otra oxidada con persulfato de amonio.

V.7.2. Espectro de absorción diferencial característico de citocromos acomplejados con CO, de micelio proveniente de cultivos con barbital.

Con la finalidad de averiguar si efectivamente los máximos de absorción encontrados en los es-

pectros diferenciales, corresponden a la existencia de un citocromo del tipo del P450, se procedió a incubar

la muestra en presencia de monóxido de carbono, ya que bajo estas condiciones el citocromo P450 presenta dos máximos de absorción, uno a 548 nm y otro en la zona de Soret a 449-450 (longitud de onda de donde toma su nombre) (Black et al., 1994).

En este estudio espectral se puede observar la presencia de dos

pequeños picos a 548 nm (ligera antes del señalado con el número 3) y a 451 nm (4), los cuales podrían corresponder a los picos característicos del complejo citocromo P450/CO. Cabe señalar que aunque los picos son muy pequeños, éstos no se observan en la muestra del cultivo desarrollado en ausencia de barbital.

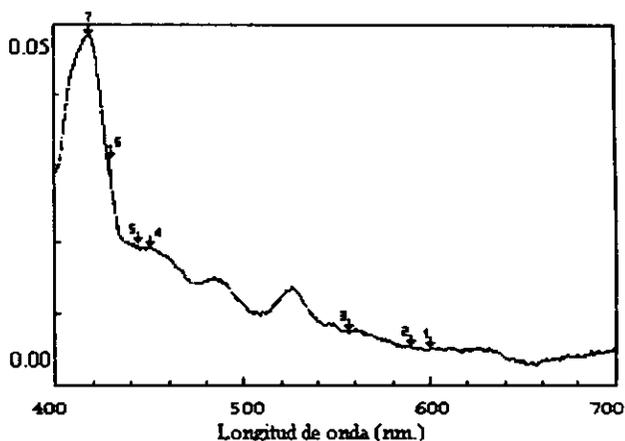


Fig. V.18. Espectro de absorción de células completas, cultivadas en medio de producción Lee con 0.7 g/L de barbital. La muestra fue cosechada a las 138 h, reducida con ditionita e incubada con CO, congelada en N₂ líquido y leída contra otra reducida con ditionita.

V.8. Efecto tóxico del barbital sobre el crecimiento

V.8.1. Efecto del barbital sobre la capacidad de crecimiento en sustratos no fermentables.

Tomando como base los resultados obtenidos, referentes al efecto inhibitorio del barbital sobre la cadena respiratoria, sería entonces de

esperarse que este microorganismo crezca con mayor dificultad en un medio mínimo con barbital y con fuentes de carbono no fermentables,

ya que al no poder obtener energía durante la glucólisis anaeróbica, el microorganismo depende de manera prácticamente absoluta de la ruta aeróbica. De esta manera usando como testigo el crecimiento observado en el medio con glucosa como única fuente de carbono, se comparó la capacidad de crecimiento del microorganismo al ser sembrado en medio con glicerol, citrato o lactato como única fuente de carbono. Los

resultados se muestran en la fig. V.19, en la cual se observa primeramente que el barbital no es usado como fuente de carbono, pues no se obtuvo crecimiento en el medio sin fuente de carbono y con barbital. En segundo lugar, el crecimiento observado, dependió de la fuente de carbono (según la secuencia: glucosa > glicerol > citrato), para el caso del lactato, este no pudo ser usado como fuente de carbono.

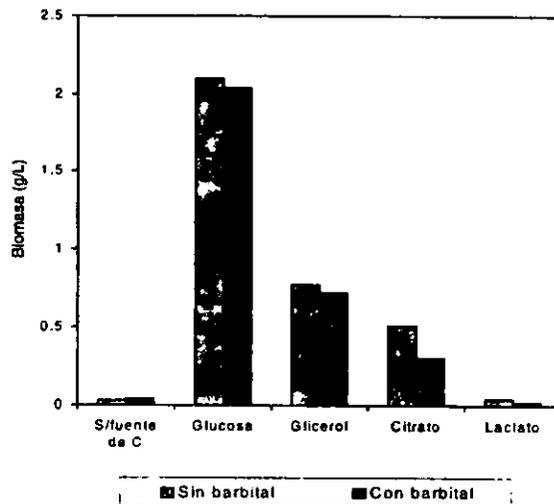


Fig. V.19. Crecimiento de *A. mediterranei* (M18) en medio mineral sólido con diferentes fuentes de carbono, en presencia y ausencia de barbital (2g/L). El crecimiento fue evaluado a las 240 h por peso seco.

Otra observación interesante, fue el diferente efecto tóxico del barbital sobre el crecimiento, el cual dependió del medio de cultivo empleado, siendo prácticamente nulo en el medio con

glucosa y glicerol, a diferencia del medio con citrato con más del 60% de inhibición.

La fig. V.20 muestra la cinética completa del efecto del barbital sobre

el crecimiento del microorganismo en medio líquido con citrato como única fuente de carbono y su comparación con el efecto del barbital bajo las mismas condiciones pero usando glucosa como fuente de carbono. De esta figura se determinó un 20% de

inhibición del barbital sobre el crecimiento en glucosa y de un 50 a 70% de inhibición con citrato, éstos cálculos fueron hechos tomando como 100% su respectivo máximo de crecimiento de cada fuente de carbono en ausencia de barbital.

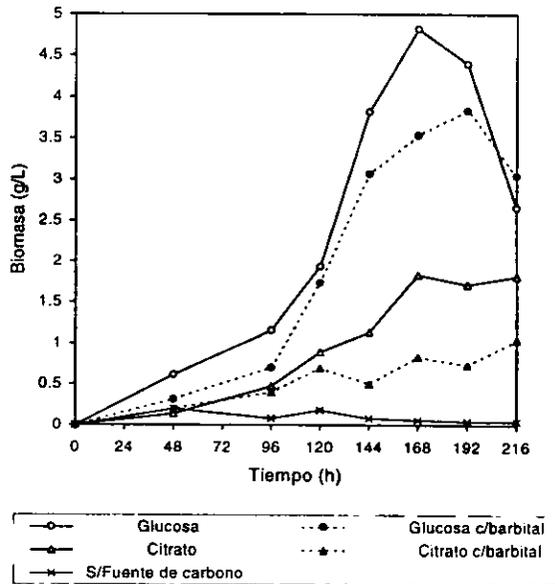


Fig. V.20. Efecto del barbital (2 g/L) sobre el crecimiento de *A. mediterranei* (M18) en matraz de 250 ml con 50 ml de medio mineral con glucosa o con citrato como fuente de carbono.

V.8.2. Efecto tóxico del barbital en medio completo y concentración mínima inhibitoria.

Con la finalidad de cuantificar el efecto tóxico del barbital sobre el crecimiento y conjuntamente comparar este nivel

de sensibilidad de 2 diferentes cepas de *A. mediterranei* se determinó dicho efecto tóxico sobre la cepa M18 de *A.*

mediterranei (ATCC 21789) en medio sólido completo Bennet, así mismo se compararon los resultados obtenidos con la cepa *tipo* (ATCC 13685) (Tabla 5).

Los resultados de probar 4 concentraciones diferentes se muestran

en la tabla 4, en donde se puede observar que la cepa M18 (ATCC 21789) resultó ser más sensible al efecto tóxico del barbital que la cepa *tipo* (ATCC 13685), con una concentración mínima inhibitoria de 5 y 7.5 g/L respectivamente.

	Barbital (g/L)						
	0	1.25	2.5	3.75	5	5.26	7.5
Cepa <i>Tipo</i> (ATCC13685)	180.2	182	181.3	123	78.5	20.9	0.9
Cepa M18 (ATCC21789)	178.6	181.4	180.7	42.1	0.7	0.5	0.6

Tabla 4. Crecimiento de *A. mediterranei*, en placas de con agar Bennet, en presencia de diferentes concentraciones de barbital (los resultados son expresados en miligramos totales de peso seco).

Se probó también si el efecto tóxico del barbital actúa evitando el crecimiento sin provocar la muerte del micelio. Esto con la finalidad de verificar si es posible usar el barbital en un proceso de enriquecimiento de mutantes sensibles. En este experimento, primeramente se inoculó agar Bennet con y sin barbital, posteriormente se resembró en agar Bennet sin barbital después de diferentes tiempos de incubación. Para el caso de las resiembra a partir del cultivo con barbital, simplemente se raspó la superficie del agar aun y cuando no se apreciaba crecimiento

alguno, simplemente con la finalidad de arrastrar el micelio del inóculo original. En la tabla 5 se puede observar que en la cepa M18, aun y cuando no puede crecer en presencia de 7 g/L de barbital, el efecto tóxico de este compuesto no mató de manera inmediata el micelio, ya que tanto después de 24 como de 48 h, la cepa M18 pudo ser resembrada y creció en un nivel comparable con el testigo. En la resiembra a las 72 y 96 h, se observó cierta mortandad, pues el crecimiento obtenido fue menor en relación al control. Finalmente, la resiembra a las 120 h, marca el

tiempo límite, menor al cual el micelio puede permanecer en presencia de barbital sin sufrir un daño letal. Estos resultados fueron aplicados en el

sistema de enriquecimiento para la selección de mutantes sensibles al barbital.

	1ª. Siembra en:	Resiembra a las 24h en Bennet	Resiembra a las 48h en Bennet	Resiembra a las 72h en Bennet	Resiembra a las 96h en Bennet	Resiembra a las 120h en Bennet
Agar Bennet (AB) (control)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
AB con barbital (7 g/L)	--	+++	+++	++	++	--

Tabla 5. Efecto del barbital sobre la preincubación de la cepa M18 (ATCC 21789) en medio sólido Bennet (+ : crecimiento; -- : sin crecimiento).

V.9. Obtención de mutantes resistentes al efecto tóxico del barbital

De acuerdo con los resultados anteriores y con base en la hipótesis central de este trabajo de tesis, en donde se plantea la posible relación entre el grado de sensibilidad al efecto tóxico del barbital y la capacidad biosintética, se procedió a tratar de obtener mutantes resistentes al mencionado efecto tóxico. Para ello, después del tratamiento mutagénico con U.V., a una intensidad de 125 $\mu\text{w}/\text{cm}^2$, durante 2 min (40% de supervivencia), se lograron aislar 32 mutantes resistentes al barbital (a una frecuencia de 8×10^{-5} , si se considera el número de ufc sin barbital), cuya

sensibilidad se muestra en la tabla 6. En esta tabla se puede observar que 9 de estas mutantes crecieron con 1% de barbital y 18 con 0.75%, de las cuales se seleccionaron 5 para posterior caracterización. Además cabe mencionar que de las 32 mutantes aisladas, 2 fueron inestables, 30 resultaron resistentes al efecto inhibitorio del barbital sobre el crecimiento, y 27 lo fueron a una concentración, al menos, tres veces mayor que la cepa progenitora.

Los datos de la Tabla 6 indican que la mayoría de las mutantes aisladas presentaron una resistencia al barbital

entre 5 y 7.5 g/L, esto con la notable excepción de las cepas 10, 21 y 27 que mostraron un crecimiento considerable (++) en la concentración de 10 g/L de barbital. Resulta también importante resaltar que la cepa progenitora (M18) fue claramente más

sensible, pues según se indica en la Tabla 4 su concentración mínima inhibitoria fue cercana a 5 g/L. De ahí que estas 32 mutantes se puedan catalogar con el fenotipo BAR^R (resistentes al barbital).

CEPA:	Barbital (g/L)					
	0	2.5	5	7.5	8.5	10
M18	+++	++	+-	-	-	-
1	++++	++++	++++	-	-	-
2	++++	++++	++++	+	-	+
3	++++	++++	++++	+	-	+
4	++++	ND	ND	-	-	-
5	++++	++++	+++	+	-	-
6	++++	++++	++	+	-	+
7	++++	++++	+++	+	+	-
8	++++	++++	++++	++	-	+
9	++++	++++	++++	+	-	-
10	++++	++	++	++	+	++
11	+++	+++	++	+	++	-
12	++++	++++	++++	+	-	+
13	+++	+++	+++	+	-	-
14	++++	++++	++	-	-	-
15	++++	++++	++	++	-	-
16	++++	++++	++	+	++	-
17	+++	+++	+	+	-	-
18	++++	++++	++	+	-	-
19	++++	++++	+++	-	-	-
20	+++	+++	+	+	+	-

Crecimiento (++++: invasión de la caja; +: crecimiento mínimo), sin crecimiento (-) y no determinado (ND).

Tabla 6. Evaluación de la resistencia al efecto tóxico del barbital sobre el crecimiento en medio Bennet de las 32 mutantes aisladas y de la cepa progenitora (M18). Las observaciones fueron hechas a las 96 h de incubación. Los números en *negritas* son las cepas seleccionadas para su posterior evaluación (continúa en la siguiente página).

CEPA:	Barbital (g/L)					
	0	2.5	5	7.5	8.5	10
M18	+++	++	+	-	-	-
21	++++	++++	++++	+	-	++
22	++++	++++	+++	+	-	-
23	++++	+++	+++	+	-	-
24	++	+	+	+	-	-
25	++++	++++	++++	+++	-	-
26	+++	++++	++++	++	-	-
27	++++	++++	++++	+++	+	++
28	++++	+	+	+	-	-
29	+++	++++	+++	+	-	-
30	++++	++++	+++	+	-	-
31	++++	++++	+	+	+	+
32	++++	ND	ND	-	-	-

Crecimiento (++++: invasión de la caja; +: crecimiento mínimo), sin crecimiento (-) y no determinado (ND).

Tabla 6 (Continuación). Evaluación de la resistencia al efecto tóxico del barbital sobre el crecimiento en medio Bennet de las 32 mutantes aisladas y de la cepa progenitora (M18). Las observaciones fueron hechas a las 96 h de incubación. Los números en *negritas* son las cepas seleccionadas para su posterior evaluación.

V.10. Obtención de mutantes sensibles al efecto tóxico del barbital

Con la misma base que para la obtención de mutantes resistentes, se procedió a tratar de aislar mutantes sensibles al efecto tóxico del barbital, solo que en este caso el lograrlo representa un problema mayor y por lo cual es necesario diseñar un método de enriquecimiento y selección de este tipo de mutantes. Para ello primeramente, se determinó si efectivamente la edad del micelio afecta la actividad de la lisozima sobre

su pared. Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla 7, donde se puede apreciar claramente que se pudo lograr la formación y regeneración de protoplastos a partir de micelio joven (de aproximadamente 48 h) crecido en presencia de glicina con la finalidad de favorecer la actividad de la lisozima (Hopwood *et al.*, 1985). No así a partir de micelio viejo; es decir de 144 h.

Tiempo de crecimiento en medio líquido CRM + glicina (h)	Crecimiento en medio CRM (ufc/mL)	Tratamiento con lisozima y cuenta directa de protoplastos (cel./mL)	Crecimiento en medio CRM después del tratamiento con lisozima (col./mL)	Crecimiento en medio CRM después del tratamiento con lisozima y resuspensión en agua destilada (col./mL)
48	1×10^6	1.4×10^4	1.3×10^2	0
72	2.3×10^6	3.5×10^2	0	0
96	8×10^6	0	0	0
120	1.2×10^7	0	0	0
144	1×10^7	0	0	0

Tabla 7. Efecto de la edad del micelio sobre la actividad de la lisozima para la formación de protoplastos de la cepa M18. El conteo de colonias regeneradas se hizo en agar CRM inoculado con micelio de diferentes edades y crecido en medio CRM líquido y glicina al 2.5%. Cel.= células; col.= colonias; ufc = unidades formadoras de colonias.

En base a los resultados obtenidos se diseñó un sistema de selección que consiste en inocular medio líquido CRM con 2.5 % de glicina y 0.07 % de barbital, con una suspensión micelial mutagenizada con luz U.V. a 46 % de supervivencia. Se incubó 48 h, para posteriormente tratar con lisozima (ver formación de protoplastos en Material y Métodos), se filtró y se lavó con agua destilada. El micelio retenido en el filtro se colocó nuevamente en medio líquido CRM con 2.5 % de glicina. pero ahora sin barbital. Se

incubó también 48 h, y se procedió a la formación de protoplastos. El crecimiento observado en el medio de regeneración se replicó en medio con 0, 2.5 y 5 g/L de barbital.

Con el sistema de selección anterior se lograron aislar 10 mutantes sensibles a barbital, aunque solo dos de ellas mantuvieron la característica de no poder crecer en presencia de 5 g/L de barbital y en 2.5% ligeramente, es decir que fueron las únicas estables. A estas mutantes se les denominó Msb1 y Msb2

Cepa	Barbital (g/L)			
	0	1	2.5	5
M18 (progenitora)	+++	+++	++	+
Msb1	+++	+++	+	--
Msb2	++	+++	+	--
Msb3	+++	++	+	+
Msb4	++	+	+	--
Msb5	+++	++	+	+
Msb6	+++	++	+	+
Msb7	+++	+++	+	--
Msb8	+++	++	+	--
Msb9	+++	++	+	-
Msb10	+++	+	+	+

Tabla 8. Comparación de la sensibilidad a diferentes concentraciones de barbital en agar Bennet, de las 10 mutantes obtenidas (Msb) y la cepa progenitora (M18). Las observaciones fueron hechas a las 96 h de incubación (+ : crecimiento; -- : sin crecimiento).

V.11. Caracterización de las mutantes obtenidas

De las mutantes aisladas resistentes al barbital se seleccionaron las 5 que mostraron la resistencia a dosis más elevadas. A estas mutantes se les evaluó su capacidad de producción de rifamicina B y se comparó con la cepa progenitora (M18), esto con la finalidad de corroborar la hipótesis planteada, en donde se establece que cepas con una mayor sensibilidad al efecto tóxico del barbital, pueden tener una mayor capacidad biosintética, esto en contraste con las mutantes resistentes.

Los resultados se muestran en la fig. V.21, donde se puede notar clara-

mente que la capacidad biosintética de las 5 cepas mutantes resultó considerablemente afectada, siendo de 3 veces menos la máxima producción alcanzada para la cepa Mrb2 con respecto a la cepa M18 (progenitora), y de prácticamente nula producción para la cepa Mrb11. Con estos resultados se demostró que la hipótesis inicial era correcta, en cuanto a que se establecía que el fenotipo BAR^R estaría negativamente relacionado con la producción de rifamicina B.

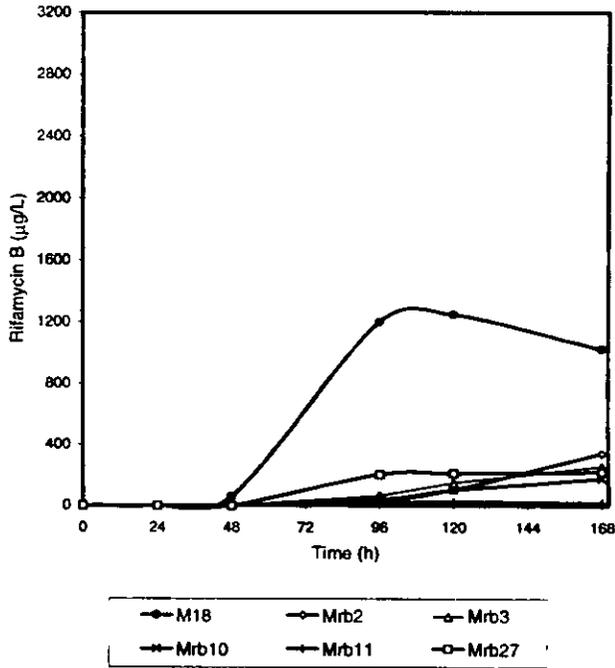


Fig. V.21. Cinética de producción de rifamicina B de la cepa progenitora (M18) y las 5 mutantes seleccionadas resistentes a barbitol (Mrb). Los cultivos se desarrollaron en matraces de 250 mL con 25 mL de medio Lee y con 0.7 g/L de barbitol.

Así mismo, se comparó la cinética de crecimiento y de consumo de glucosa de cada una de las cepas BAR^R y la progenitora. Los resultados se muestran en la fig. V.22. Por otro lado es importante mencionar que todas las mutantes seleccionadas (30) resis-

tentes a barbitol, mostraron un color en la colonia menos intenso que la cepa progenitora lo cual denota una capacidad biosintética alterada, pues cabe recordarse que la rifamicina posee un anillo cromóforo en su estructura.

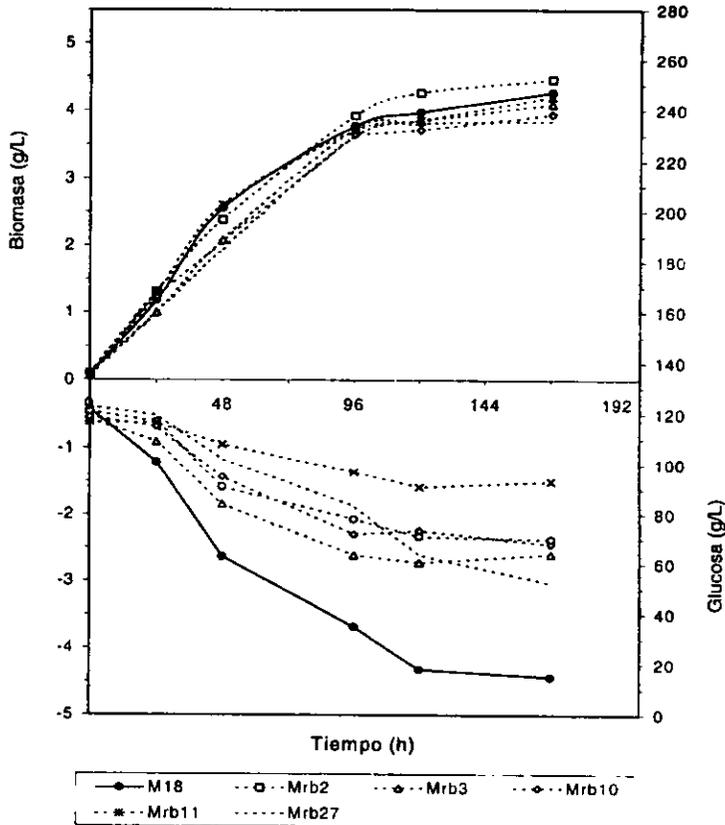


Fig. V.22. Cinética de crecimiento y consumo de glucosa de la cepa progenitora (M18) y las mutantes resistentes a barbital (Mrb). Matrices de 250 mL con 25 mL de medio Lee con barbital (0.7 g/L), 25 °C a 250 rpm.

De igual forma, a las 2 mutantes seleccionadas sensibles al barbital (Msb1 y Msb2) se les evaluó su capacidad de producción de rifamicina B y se comparó con la cepa progenitora (M18). La fig. V.23, muestra que tanto la cepa Msb1 como la Msb2 produjeron cerca de 4000

µg/mL, lo cual representó cerca de 350% más en la producción del antibiótico con respecto a la cepa progenitora. Cabe señalar que la cepa Msb2, presentó una mejor productividad (más del 20%) que la Msb1 (Tabla 9).

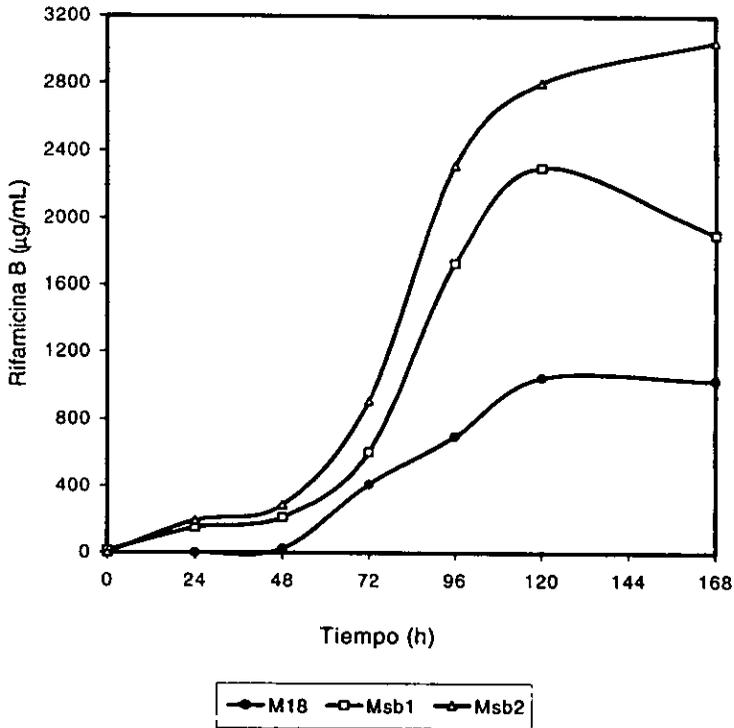


Fig. V.23. Cinéticas de producción de rifamicina B por la cepa progenitora (M18) y las mutantes sensibles al barbital (Msb). Matraces de 250 mL con 25 mL de medio Lee con barbital (0.7 g/L), 25 °C a 250 r.p.m.

Para comparar cuantitativamente los parámetros fisiológicos del crecimiento, catabolismo y producción del antibiótico, entre la cepa progenitora (M18) y las cepas BAR^R y BAR^S, se hicieron los ajustes de los modelos matemáticos que se describen en Materiales y Métodos y que incluye:

- a) La ecuación logística del crecimiento del actinomiceto:

$$dx / dt = \mu_{max} (1 - X / X_{max}) X$$

Con la máxima velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) y el máximo nivel de biomasa (X_{max}), suponiendo que la concentración de glucosa está saturando el catabolismo durante casi todo el tiempo de fermentación pues la K_S sería del orden de 10^{-5} g/L de glucosa (Pirt, 1975) y esta se añadió a niveles mucho más altos (120 g/L).

- b) La consideración de que el metabolismo del sustrato, siguió el balance usual entre crecimiento y mantenimiento (Pirt, 1975):

$$- dS / dt = (1 / Y_{X/S}) (dx / dt) + mX$$

Donde:

$Y_{X/S}$ = (g X / g S) es el coeficiente de rendimiento de biomasa en función del sustrato consumido y el coeficiente de mantenimiento $m = (gS/gX h^{-1})$

- c) Se tomó el modelo de formación de producto (Pirt, 1975):

$$dP / dt = \alpha dX / dt + \beta X$$

Donde: α es el coeficiente de producción asociado al crecimiento y β el coeficiente de producción asociado al mantenimiento.

Así mismo, se evaluaron los cocientes globales $Y_{P/S}$ (rendimiento en función del sustrato consumido) y $Y_{P/X}$ (rendimiento en función a la biomasa obtenida).

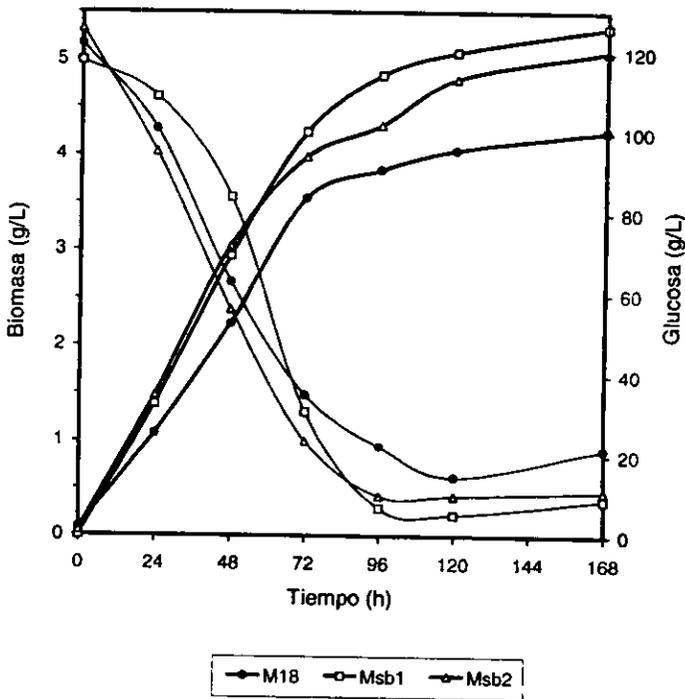


Fig. V.24. Cinéticas de crecimiento y consumo de glucosa de la cepa progenitora (M18) y mutantes sensibles al barbital (Msb). Matraces de 250 mL con 25 mL de medio Lee con barbital (0.7 g/L), 25 °C a 250 r.p.m.

La tabla 9 muestra una comparación en producción específica ($Y_{P/X}$), de las diferentes cepas, tanto mutantes resistentes como sensibles y por supuesto cepa progenitora. Las mutantes resistentes (fenotipo denominado BAR^R), mostraron un

valor promedio de $Y_{P/X}$ disminuido (51 mg/g), el cual representa 5 veces menos del valor mostrado por la cepa progenitora (259 mg/g) y 10 veces menos que el valor promedio de las mutantes sensibles (526 mg/g), cuyo fenotipo fue denominado BAR^S .

Fenotipo	Cepa:	$Y_{P/X}$ (mg/g)	$Y_{P/S}$ (g/g):	μ_m (h ⁻¹)	X_{MAX} (g)	m (g/mL)	β (mg g ⁻¹ L ⁻¹ h ⁻¹)	α (mg h g ⁻¹ L ⁻¹)	Suma de cuadrados
Progenitora	M18	259	9.8	0.053	4.08	0.009	0	5941	9.6 E-02
BAR ^R	Mrb2	86	6.4	0.050	4.36	0.001	0	1547	1.6 E-01
	Mrb3	65	5.1	0.060	3.98	0.005	0	1055	8.4 E-02
	Mrb10	45	3.5	0.034	3.98	0.002	0	1356	6.4 E-01
	Mrb11	6	1.0	0.038	3.98	0.002	0	171	6.1 E-01
	Mrb27	56	3.2	0.034	3.98	0.004	0	1739	8.9 E-01
	(media)	(51.6)	(3.8)	(0.043)	(4.06)	(0.003)	(0)	(1174)	(4.8 E-01)
BAR ^S	Msb1	453	20.4	0.059	5.18	0.009	0	7674	2.1 E-01
	Msb2	599	27.0	0.058	5.18	0.007	0	10512	7.8 E-01
	(media)	(526)	(23.7)	(0.058)	(5.18)	(0.008)	(0)	(9093)	(4.9 E-01)

Tabla 9. Características de la producción de rifamicina B de la cepa progenitora y las mutantes sensibles y resistentes a barbital. μ_m = velocidad específica de crecimiento máxima, X_{MAX} = biomasa máxima, m = substrato requerido para mantenimiento celular, β = constante de proporcionalidad para un proceso por lote, α = constante de proporcionalidad para un proceso por lote.

La producción de biomasa medida como $Y_{X/S}$, fue muy similar para todas las cepas con excepción de la Mrb11. Sin embargo, las cepas BAR^R mostraron un valor promedio ligeramente mayor (0.09 mg/g) que la cepa progenitora (0.04 mg/g).

Las cepas BAR^R presentaron menor rendimiento ($Y_{P/S}$) y muy baja productividad ($Y_{P/X}$). Por su parte, las mutantes sensibles duplicaron los valores de $Y_{P/S}$ y $Y_{P/X}$ en relación a la cepa progenitora.

La velocidad específica de crecimiento máxima (μ_m) de las cepas BAR^S fue ligeramente mayor que la μ de la cepa progenitora. Finalmente el nivel de biomasa (X_{MAX}) fue mayor para las cepas BAR^S y ligeramente menor para las cepas BAR^R en relación a la cepa

progenitora. Estas observaciones están de acuerdo con el patrón de valores de μ mencionado con anterioridad.

En cuanto al nivel de biomasa alcanzado (X_{MAX}), este fue mayor para las cepas BAR^S y menor para las cepas BAR^R en relación a la cepa progenitora. Estos resultados están de acuerdo con el patrón de valores de μ mencionado antes.

Las características de producción fueron obtenidas mediante el modelo descrito en Materiales y Métodos, mediante el cual se estimó el valor β , el cual en todos los casos fue prácticamente de cero y el coeficiente α positivo, mostrando un valor promedio para las cepas BAR^S de 9.035 g h g⁻¹ L⁻¹, el cual fue claramente

mayor que el coeficiente α de las cepas BAR^R ($1.174 \text{ g h g}^{-1} \text{ L}^{-1}$) y también con respecto a la cepa progenitora ($5.941 \text{ g h g}^{-1} \text{ L}^{-1}$). Esto muestra que la rifamicina B es un metabolito secundario estrechamente ligado al crecimiento del actinomiceto y por ello no se obtuvo correlación alguna entre los valores de m y los de $Y_{P/S}$ o $Y_{P/X}$.

Finalmente se repitió el experimento de medición del consumo de O_2 de micelio de diferentes edades, pero ahora comparando con una de las mutantes aisladas sensibles al barbital. En la figura V.25 se puede notar que la mutante tiene una considerablemente menor capacidad respiratoria.

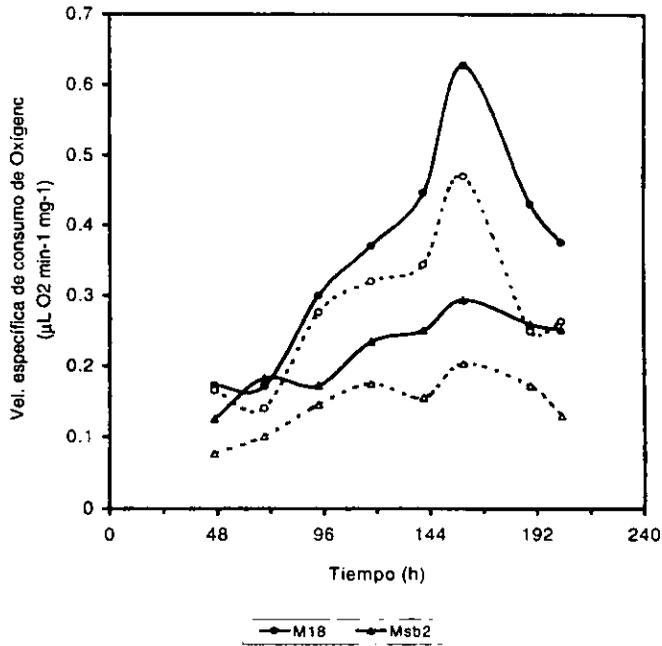


Fig. V.25. Velocidad específica de consumo de oxígeno de células en reposo sin barbitone (----) y con 1.43 g/L de barbitone (- - -) durante el curso de la fermentación en medio Lee con barbitone 0.7 g/L Cepa progenitora (M18) y mutante sensible (Msb2).

FALTA PAGINA

No. 74

VI. Discusión

El efecto del barbital sobre la biosíntesis de rifamicina B es conocido desde el establecimiento del sistema de producción desarrollado y publicado por Margalith y Pagani (1961), quienes propusieron que este compuesto estimulaba y dirigía la biosíntesis a la formación prácticamente exclusiva de rifamicina B. Así pues, con la finalidad de entender el mecanismo por medio del cual se da este efecto, primeramente se decidió poner en práctica un sistema de producción de rifamicina con la cepa M18 de *A. mediterranei*, la cual proviene de una colección microbiana (ATCC 21789), y fue depositada como una cepa mejorada en su nivel de producción (Lepetit Labs.). Cabe recordar que el barbital es requerido en concentraciones subletales por todas las cepas productoras de rifamicina B, incluyendo las empleadas a nivel industrial.

Durante el establecimiento del sistema de producción, se seleccionó originalmente el medio FM, ya que al igual que los medios ASS/7 y ASS/8 su composición es de tipo industrial, solo que además en este medio se logró un 70% más producción que en el ASS/7 y un 30% con respecto al medio Lee, lo cual significa cerca de 3000 µg/ mL de rifamicina B, cantidad que está en concordancia con el nivel reportado por la ATCC para esta cepa, y además significa un nivel adecuado para observar con claridad el efecto del barbital sobre la biosíntesis. Con este medio se procedió a corroborar el efecto reportado, sin embargo como se muestra

en resultados, no se detectó ninguna diferencia significativa con excepción del pH. Esto resulta ser en cierta medida, contradictorio con lo reportado hasta el momento (Margalith y Pagani, 1961; Weinberg, 1989), en donde se establece que en ausencia de barbital, lo que se produce es una amplia gama de intermediarios o subproductos y ninguno de ellos en franca predominancia. Nuestros resultados nos condujeron a plantear tres posibilidades. La primera de ellas, fue que la cepa que se estaba empleando requería de condiciones específicas, tales como medio de cultivo y concentración de barbital. La segunda, fue que el método químico de detección de rifamicina B, no era el adecuado para determinar si lo que se estaba produciendo era exclusivamente este compuesto, o bien se trataba del conjunto de varias rifamicinas. Y finalmente la tercera hipótesis, la cual de hecho está en concordancia con la hipótesis original de este trabajo, en donde se plantea la participación del oxígeno como crítica en el mecanismo de acción del barbital, por lo que se consideró que las condiciones de aireación eran las responsables de la ausencia del efecto. De hecho, la desviación de la biosíntesis de rifamicina B hacia rifamicina W, es un efecto provocado por una limitación de oxígeno, lo cual ya fue comprobado con anterioridad (Mejía *et al.*, 1990) realizando pruebas en fermentador piloto de 300 L.

Con el fin de establecer las condiciones que permitieran evaluar las posibilidades planteadas, se repitió el experimento anterior, pero ahora empleando otro medio, el reportado por Lee *et al.* (1983). Este medio como se recordará, también dio resultados satisfactorios, ya que aun cuando la producción fue menor que con el medio FM, esta alcanzó los 2000 $\mu\text{g/mL}$, por otro lado este medio tiene la ventaja de no contener sólidos en suspensión, lo cual facilita la evaluación del crecimiento. Así mismo, se probaron diferentes concentraciones de barbital y la concentración de rifamicina B fue determinada por HPLC, con la finalidad de establecer si la segunda hipótesis era válida. Los resultados de este experimento fueron los mismos que para el primer caso, es decir, no se observaron diferencias significativas en presencia y ausencia de barbital, lo cual significa que ninguna de las posibilidades planteadas fue correcta.

Debido a lo anterior, se trató de llevar a cabo la producción de rifamicina en fermentador de 1 L, con la finalidad de contar con un sistema que permitiera la evaluación del efecto a diferentes tasas de aireación. Como se muestra en los resultados (fig. V.8), el nivel de producción fue excesivamente bajo, sin embargo fue posible observar una pequeña diferencia en presencia de barbital, aunque esta fue estadísticamente no significativa. Desafortunadamente el sistema de producción en fermentador no resultó adecuado, ya que el microorganismo debido a sus características miceliales, se desarrolló generando una elevada viscosidad en el medio lo cual, aunado con un

inadecuado sistema de aireación y agitación, provocó gran cantidad de espuma (Vandamme, 1984). Actualmente es bien conocido que la viscosidad es uno de los principales factores limitantes de la transferencia de oxígeno en fermentaciones aeróbicas (Karsheva *et al.*, 1997). La alta viscosidad de las suspensiones miceliales causa serios problemas con el transporte de masas del gas al líquido, debido fundamentalmente al incremento de la fuerza de coalescencia de las burbujas (Karsheva *et al.*, 1997). La disminución de la transferencia de oxígeno evidentemente ocasionó que este nutriente se tomara limitante, por lo que los niveles de producción fueron severamente alterados (Reuss, 1993; Karsheva *et al.*, 1997).

El problema anterior podría haber sido adecuadamente resuelto modificando el sistema de agitación y aireación; es decir, cambiando el tipo de propela, difusor y baffles, ya que en el mercado existen diseños que permiten un mejor manejo de este tipo de fluidos altamente viscosos (Karsheva *et al.*, 1997). Sin embargo, esto hubiera conducido a otra línea de investigación tan amplia tal vez como la que se tuvo que realizar en este trabajo. Por lo tanto se decidió utilizar un sistema sencillo de producción, de poco volumen con la finalidad de que no requiriera de agitación mecánica, ya que se esperaba que al no necesitar condiciones de aireación tan drásticas, no se producirían los problemas de espuma mencionados. Mediante este sistema, el cual fue implementado y denominado burbujeador (descrito con detalle en Material y Métodos), se logró

establecer que efectivamente el efecto del barbital sobre la biosíntesis de rifamicina B es dependiente de las condiciones de aireación del cultivo; es decir que cuando la aireación se encuentra por debajo de 1 L/h, la biosíntesis de rifamicina B es limitada y en su lugar aparecen otros intermediarios o subproductos relacionados. Sin embargo, si el cultivo bajo estas condiciones es desarrollado en presencia de barbital, el efecto anterior no se manifiesta. Esto significa que de acuerdo con nuestros resultados el barbital no incrementa la producción de rifamicina B, tal y como se describe en trabajos previos (Margalith y Pagani, 1961; Weinberg, 1989), sino que en realidad evita que esta decaiga en condiciones de baja aireación, probablemente al inhibir, directa o indirectamente, vías colaterales que reduzcan el rendimiento neto de rifamicina B.

Otra de las cosas que resultaba interesante de este sistema de burbujeadores, fue la posibilidad de poder obtener cinéticas de consumo de oxígeno y producción de CO₂. Los resultados fueron hasta cierto punto inesperados, pues cabe recordar que la hipótesis original establecía que el barbital actuaría inhibiendo el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria. Sin embargo los resultados mostraron un incremento en el consumo de este nutriente en el cultivo que se desarrollo en presencia de barbital. Esto se puede explicar considerando que aún y cuando la hipótesis fuera correcta, lo que se cuantificó fue el consumo total; es decir que se incluyó al oxígeno utilizado en

biosíntesis. En otras palabras, el consumo de oxígeno total, no necesariamente tiene que disminuir en el cultivo con barbital, ya que en un momento dado el oxígeno no utilizado en cadena respiratoria, podría usarse en otros procesos oxidativos incluyendo la biosíntesis de la rifamicina. Así que para poder determinar si esta posibilidad es correcta, es necesario analizar los datos obtenidos en cuanto a producción de CO₂, ya que como sabemos la degradación de la glucosa mediante la ruta aerobia conduciría invariablemente a la producción de CO₂, por lo que si se mide el cociente respiratorio (CR); es decir, el CO₂ producido entre el oxígeno consumido en cualquier momento durante la fermentación, podríamos inferir sobre la cantidad de oxígeno que está siendo utilizado en biosíntesis y la que se emplea en cadena respiratoria. De acuerdo a lo anterior, al comparar las gráficas obtenidas del cociente respiratorio a lo largo de la fermentación, tanto en presencia como en ausencia de barbital, se encontró que este disminuyó con barbital; es decir, la cantidad de oxígeno consumido se incremento con respecto a la cantidad de CO₂ producido. Esto significaría que bajo estas condiciones el microorganismo consumiría mayor cantidad de oxígeno en biosíntesis que en la cadena respiratoria, pues conviene recordar que el CR, típicamente aerobio es de 1.0 y valores menores indican un aumento del metabolismo endógeno o de la excreción de productos ricos en carbono (pe. antibióticos). Estos resultados confirman parcialmente la hipótesis del trabajo, ya que un resultado más claro y directo hubiera sido que de igual forma el

cociente respiratorio hubiera disminuido en presencia de barbital, solo que debido a una disminución de la producción de CO₂, más que por un incremento en el consumo de oxígeno. Este razonamiento llevó a pensar que el barbital ejerce en realidad un efecto inductor de algún componente respiratorio alterno de participación esencial durante la biosíntesis del antibiótico, efecto que podría ser adicional al inhibitorio planteado originalmente, por lo cual antes de tratar de explorar esta nueva posibilidad, se consideró importante confirmar si efectivamente el barbital ejerce un efecto inhibitorio en la cadena respiratoria.

Para determinar lo anterior, se cuantificó la capacidad respiratoria de células en reposo obtenidas a diferentes tiempos de la fermentación. Aunque la forma en que se llevaron a cabo las mediciones fue explicada en Materiales y Métodos, cabe mencionar que se trata de un sistema de células en reposo, el cual solo contiene glucosa como fuente de carbono y energía y fosfatos, para amortiguar el medio y como fuente de fósforo inorgánico. Esto significa que al carecer de azufre y nitrógeno, el micelio no podrá continuar creciendo ni produciendo antibiótico, ya que como se recordará, la rifamicina contiene nitrógeno en su molécula. De esta forma este sistema nos permitió distinguir el oxígeno consumido exclusivamente por la cadena respiratoria. Los resultados en este punto fueron muy claros, el barbital presenta un efecto inhibitorio sobre el consumo de oxígeno de cadena respiratoria, sin embargo cabe señalar que este efecto varía con la edad del

cultivo, de tal forma que a las 24 h prácticamente no se observa efecto, y de las 48 h en adelante el porcentaje de inhibición se va incrementando, lo cual podría correlacionarse con la evolución de la idiofase. Con respecto a la forma de la curva, esta podría ser explicado considerando el estado metabólico del micelio a lo largo del cultivo. Pues alrededor de las 96 h es cuando se alcanza la mayor actividad metabólica y a partir de este momento, esta comienza a decaer. Por su parte, la biosíntesis de rifamicina es en esta última etapa cuando llega a la producción máxima.

Otra observación interesante de estos resultados es que cuando se probó el efecto inhibitorio del barbital sobre el consumo de oxígeno en células en reposo, empleando diferentes concentraciones, es decir, 0.7, 1.4 y 2.1 g/L, el resultado fue prácticamente el mismo. Esto implica que si el barbital no puede inhibir la cadena respiratoria más allá del 30% indica una posible ruta ramificada, lo cual es lo más común en cadenas respiratorias bacterianas (Hogarth *et al.*, 1977; Shvinka *et al.*, 1979).

Aún cuando los resultados muestran claramente que el barbital efectivamente ejerce un efecto inhibitorio en el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria, se consideró importante verificar si no existe algún efecto inductor sobre algún citocromo o algún otro componente respiratorio. Esto además fue alentado por el hecho de que ha sido reportado un citocromo del tipo P450, el cual participa en la biosíntesis de oleandomicina (Rodríguez *et al.*, 1995), eritromicina (Stassi *et al.*, 1993) y en una larga lista de actinomicetos con actividad

xenobiótica (O'Keefe y Harder, 1991), y lo más interesante es que este citocromo es inducido por fenobarbital en *Streptomyces griseolus* (O'Keefe y Harder, 1991) y por barbituratos en *Bacillus megaterium* (Black, 1994, Black, *et al.*, 1994). Cabe mencionar que este citocromo tiene actividad de mono-oxigenasa, la cual hidroxila al sustrato con la participación de oxígeno molecular (Koop, 1992). Esta actividad ha sido demostrada ser esencial durante la hidroxilación en los pasos finales de la biosíntesis de eritromicina (Stassi *et al.*, 1993). Cabe señalar que la rifamicina posee cuatro grupos hidroxilo, de los cuales al menos dos podrían tener su origen en el oxígeno atmosférico mediante la actividad de este citocromo.

De acuerdo con lo anterior, se obtuvieron una serie de espectros a partir de micelio crecido en presencia y ausencia de barbital, con la finalidad de observar si existía alguna diferencia en cuanto a los principales citocromos conocidos, incluyendo al mencionado P450. Lo primero que se pudo concluir de los espectros obtenidos fue la presencia de los citocromos *b* y *c*, ya que en ambos casos se pudo corroborar su presencia por sus máximos de absorción característicos en las zonas α , β y Soret; esto es 557, 524 y 427 nm respectivamente para el citocromo *b*, y 549, 520 y 415 nm para el citocromo *c*. En cuanto al citocromo aa_3 , solo apareció un pequeño pico alrededor de los 605 nm, pero no se distinguió su correspondiente en la zona de Soret. Sin embargo, se pudo confirmar que a pesar de lo anterior, efectivamente se trata de este citocromo, ya que se logró inhibir la

respiración en células en reposo con cianuro (KCN). El segundo aspecto interesante es la notoria variación en la proporción de citocromo *b* con respecto al *c*. Particularmente se observó un aumento de citocromo *b* o una disminución del *c* en el cultivo crecido en presencia de barbital contra el crecido en su ausencia, y aunque esto fue más claro en la zona de Soret, también se pudo confirmar en la zonas α y β del espectro diferencial. Por otro lado, es importante señalar que esta diferencia resultó más acentuada en la muestra de 137 h. Este posible incremento en la proporción de citocromo *b* con respecto a *c*, podría deberse justamente al efecto inhibitorio del barbital sobre la cadena respiratoria, ya que bajo estas condiciones el microorganismo para contrarrestar el efecto, tendería a sintetizar un exceso de algunos componentes respiratorios.

Finalmente, cabe mencionar que en presencia de barbital se detectaron pequeños picos a 572 y 535 nm, los cuales podrían corresponder a los máximos de absorción característicos del citocromo P450 en las zonas α y β respectivamente (Lewis, 1996). Esto no pudo ser confirmado, ya que al intentar obtener el espectro de absorción diferencial característico de citocromos acoplejados con monóxido de carbono, con la finalidad de detectar el pico característico a 450 nm de este citocromo, solo se pudieron ver dos muy pequeños picos a 548 y 451 nm, con lo cual sería prácticamente imposible detectar diferencias significativas al compararlo con muestras obtenidas de cultivos sin barbital. Debido a esto se

trató de obtener estos espectros, pero a partir de fracción soluble previa ruptura celular, ya que se esperaba que al estar los componentes respiratorios asociados a membrana (Voet y Voet, 1995), se eliminaría la mayor parte de las posibles interferencias en la obtención del espectro de absorción para el P450, ya que este se reporta presente en la fracción soluble en la mayoría de los sistemas bacterianos (O'Keefe y Harder, 1991; Black, 1994). Es posible que *A. mediterranei* posea alguna proteasa insensible a fluoruro de fenil-metil-sulfonilo, ya que no se observó espectro alguno ni en fracción soluble ni con fracción membranal. Esto pudo ser confirmado al determinar que el microorganismo prácticamente no consumió oxígeno cuando se rompió el micelio, aún en presencia de este inhibidor.

Hasta el momento se ha discutido solamente el efecto del barbital sobre la producción de rifamicina B. Sin embargo, desde el trabajo de Margalit y Pagani (1961) se reportó su toxicidad sobre el crecimiento. En cuanto a esto, se planteó la hipótesis de que si efectivamente el barbital actúa inhibiendo la cadena respiratoria y esta es la razón también de su toxicidad, este efecto debe de variar de acuerdo con la fuente de carbono. Los resultados confirman el planteamiento anterior, aunque adicionalmente podemos observar que la concentración usada en el medio de producción debe de estar muy por debajo de la mínima inhibitoria del crecimiento, pues los resultados obtenidos con glucosa como fuente de carbono, mostraron un nivel de

crecimiento muy similar al encontrado en presencia de barbital.

De acuerdo con lo discutido hasta ahora, se esperaba entonces que si el mecanismo de acción del barbital es correcto, mutantes resistentes al efecto tóxico del barbital sobre el crecimiento, deberían ser menos capaces de producir rifamicina B, ya que estas tendrían que estar, ya sea alteradas en su afinidad por el inhibidor (barbital), o bien contar con un sistema respiratorio más eficiente para contrarrestar dicho efecto. Por otra parte, las mutantes sensibles al barbital deberían presentar características contrarias, es decir, una mayor afinidad por el inhibidor, o bien, una cadena respiratoria menos eficiente, con lo cual en cualquier caso la biosíntesis de rifamicina B debería ser estimulada.

Para lograr lo anterior, antes que nada fue necesario determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del crecimiento, la cual fundamentalmente serviría como punto de partida para el aislamiento de las mutantes buscadas. Además de esto, la CMI para la cepa M18 fue menor (5 g/L) que la obtenida para la cepa tipo (7.5 g/L), lo cual resultó estar acorde con las consideraciones hechas en este punto; es decir, que la cepa mejor productora de rifamicina B es la más sensible al barbital.

El aislamiento de las mutantes resistentes al barbital no tuvo mayor complicación y los resultados en este punto se discutirán más adelante. Sin embargo, para el aislamiento de las mutantes sensibles fue necesario un cuidadoso diseño del sistema de selección, ya que cabe mencionar que

se trata de una mutación recesiva y como tal, difícil de aislar, pues es enmascarada por la gran mayoría de la población cuya resistencia es mayor. Lo anterior resulta agravado con el hecho de que este microorganismo (*A. mediterranei*) no esporula (Moretti *et al.* 1985), por lo que al emplear un fragmento micelial debemos considerar que éste es multigenómico, y el aislamiento de una mutante recesiva bajo estas condiciones es considerablemente más difícil. El aislamiento de protoplastos puede resolver parcialmente el problema, ya que aun con esto la probabilidad de lograr aislar una mutante recesiva es muy baja. De esta forma se pensó en diseñar un sistema de enriquecimiento con un fundamento similar al empleado para la obtención de mutantes bacterianas auxótrofas sensibles a penicilina (Watson, 1978) Cabe aclarar que no fue posible usar directamente este método ya que este microorganismo es resistente a penicilinas (Madón y Hüter, 1991). Para este sistema, primeramente fue necesario determinar si el barbital ejerció un efecto letal sobre el microorganismo o simplemente evitaba su crecimiento. Los resultados mostraron claramente que aunque el efecto fue letal, no se manifestó de inmediato, ya que fue posible lograr nuevamente el crecimiento en medio sin barbital, a partir de un micelio incubado durante 96 h. El siguiente paso consistió en determinar si efectivamente la lisozima tiene un efecto considerablemente menor sobre micelio cuya pared no haya sido sintetizada recientemente (Hopwood, 1985; Schupp y Divers, 1986), con la finalidad de

emplear a la lisozima de manera análoga a como se usa la penicilina en los sistemas de enriquecimiento convencionales. Un fragmento micelial resistente a la concentración de barbital usada crecería y sería comparativamente más joven que el fragmento micelial que no pudo crecer por ser sensible al barbital. Este crecimiento incrementaría la susceptibilidad a la actividad de la lisozima, la cual actuaría entonces de modo selectivo sobre el micelio resistente al barbital. De esta forma si ahora el cultivo fuese filtrado y lavado con detergente diluido, retendríamos casi exclusivamente al micelio sensible al barbital que no pueda crecer y por lo tanto no fuera atacado por la lisozima.

Con este sistema de enriquecimiento, se logró finalmente la selección de las mutantes sensibles al barbital, con las cuales, junto con las mutantes resistentes, se pudo verificar las hipótesis principales de esta tesis. Como se mostró en los resultados, el efecto de las mutaciones obtenidas fue de acuerdo con lo esperado, ya que las 30 mutantes resistentes al barbital aisladas resultaron ser menos productoras que la cepa progenitora (M18). Respecto a las 2 mutantes sensibles al barbital finalmente aisladas, las dos mostraron un incremento en la producción (entre 140 y 200%) en relación a la cepa progenitora. Esto indica que efectivamente hay una relación entre la sensibilidad al barbital y el nivel de producción de rifamicina. Para concluir respecto a esto último, primeramente se discutirán los resultados obtenidos en la caracterización de las mutantes y la progenitora.

Un resultado inesperado fue que el crecimiento de las cepas sensibles, en presencia de dosis bajas (subletales) de barbital fue mayor que el mostrado por la cepa progenitora. Sin embargo si comparamos este crecimiento de la cepa progenitora (M18) con el de la cepa tipo, el crecimiento de la M18 resultó ser mayor. En otras palabras, aparentemente entre más sensible es la cepa al barbital, más produce y crece más, tanto en ausencia de barbital, como cuando se le añade dosis bajas (la empleada en el medio de producción). Relacionado con esto el valor β estimado fue prácticamente de cero en todos los casos y el coeficiente α positivo, lo cual indica que el sistema corresponde al modelo de producción estrechamente ligado al crecimiento bacteriano (Pirt, 1975). Los resultados en la evaluación del crecimiento y producción de las mutantes obtenidas podrían ser explicados si se considera una mutación a nivel de permeabilidad, sin embargo hay que considerar la baja probabilidad de que las 30 mutantes resistentes hayan disminuido su permeabilidad, por otro lado las dos mutantes sensibles la hayan incrementado, y por último, que esto mismo haya ocurrido con la cepa M18 con respecto a la cepa tipo. Hay que considerar también que de las 5 mutantes resistentes seleccionadas para su caracterización, 3 mostraron una velocidad específica menor que la progenitora, sin embargo una presentó un valor similar y de la última el valor fue incluso mayor que para la progenitora.

Estos resultados serían compatibles con un efecto doble del barbital. Por un lado disminuye el cociente respiratorio, y por

el otro, aumenta la producción de biomasa y la biosíntesis de rifamicina B. Estos efectos aparentemente paradójicos podrían ser explicados si el barbital usado a dosis bajas inhibiese una parte del metabolismo secundario, facilitando la canalización de más carbono hacia la producción casi exclusiva de rifamicina B y biomasa, lo cual disminuiría la producción de bióxido de carbono y reduciría la necesidad de consumir oxígeno por una elevación en el rendimiento celular intrínseco (Y_{XS}). Así, las mutantes BAR^S tienen aumentado el Y_{XS} y la μ_m , y al mismo tiempo tienen considerablemente elevado el coeficiente α asociado a la producción de rifamicina ligada al crecimiento. En cambio las mutantes BAR^R tienen disminuido el Y_{XS} y la μ_m , y considerablemente reducido el coeficiente α . Como el coeficiente β tiene un valor despreciable, los efectos del barbital sobre el coeficiente de mantenimiento (m) no son evidentes, ya que el barbital tiene su efecto máximo al final de la curva de crecimiento y casi no tiene efecto cuando el crecimiento ha cesado.

Los resultados permiten demostrar completamente la hipótesis inicial indicando que el fenotipo BAR^S es el adecuado para desarrollar cepas mutantes de *A. mediterranei* que sobreproduzcan rifamicina B crecidas con dosis subletales de barbital.

También permiten plantear nuevas hipótesis sobre el efecto del barbital; además de la inhibición del consumo de oxígeno en cadena respiratoria, también podría actuar en la inducción de enzimas

o sistemas enzimáticos, como alguna monooxigenasa del tipo del citocromo P-450, la cual como ya se mencionó, se ha demostrado su participación en la biosíntesis de otros antibióticos por actinomicetos (Rodríguez *et al.*, 1995; Stassi *et al.*, 1993), además de ser inducible por barbituratos (O'Keefe y Harder, 1991; Black, 1994). Esto favorecería el flujo metabólico hacia la biosíntesis prácticamente exclusiva de un solo tipo de rifamicina. Esta hipótesis podría ser investigada, primeramente demostrando la existencia de este sistema enzimático inducido por barbital, el que posteriormente se aislaría y purificaría sus componentes, con la finalidad de secuenciarlo y poder entonces sintetizar un oligonucleótido, que pueda servir como sonda para la identificación del gen correspondiente. Con este gen se podría entonces transformar a las diferentes cepas de *A. mediterranei*, y observar su efecto sobre la biosíntesis de rifamicina B.

Por otra parte, es importante mencionar que esta es la primera vez que se reporta que existe esta relación entre sensibilidad al efecto tóxico del barbital y el nivel de producción, lo cual tiene gran repercusión desde el punto de vista práctico. Sería interesante también, promover el uso de estas técnicas de selección y caracterización de cepas de *A. mediterranei* para su empleo en la industria productora de rifamicina.

Finalmente, cabe destacar que el barbital también provoca un considerable efecto sobre la producción de otros metabolitos secundarios. De tal forma, la adición de una solución de barbital 8 mM al medio de cultivo incrementa la producción de estreptomina en 29% (Heding y Gurtu, 1977). Además, el barbital fue capaz de evitar el efecto inhibitorio del 2,4-dinitrofenol sobre la biosíntesis de este mismo antibiótico, lo cual sugiere que el mecanismo de acción está relacionado con el planteado en el presente trabajo ya que como se recordará, el dinitrofenol es un compuesto desacoplante y por consiguiente provoca un efecto antagónico al del barbital, es decir, provoca un incremento en el consumo de oxígeno en cadena respiratoria (Voet y Voet, 1995). En un sistema diferente, 22 mM de barbital estimula la producción de galirubinas en un 285% (Královcová *et al.*, 1977). En base a esto, es muy posible que el mecanismo de acción del barbital en todos estos sistemas esté de alguna forma relacionado y por lo tanto resulta interesante el aislamiento de mutantes de estas cepas con diferente sensibilidad al barbital. De hecho Weinberg (1989) sugiere que el barbital sea probado de manera rutinaria cuando se desarrolla un medio de fermentación para la producción de nuevos metabolitos secundarios.

VII. Conclusiones

Con respecto al primer objetivo específico planteado se concluyó lo siguiente:

1. El efecto del barbitol solo se presenta bajo condiciones de aireación limitada (0.27 v.v.m.).
2. El barbitol disminuye el cociente respiratorio del cultivo, mediante un incremento en el consumo de oxígeno total y un ligero descenso en la producción de CO₂.
3. El barbitol inhibe el consumo de oxígeno de cadena respiratoria hasta en un 31% durante la idiofase.
4. El resultado de 31% de inhibición máxima sugiere la existencia de una cadena respiratoria ramificada.
5. El barbitol no incrementa la producción de rifamicina B, sino evita que esta decaiga cuando las condiciones de aireación son bajas (0.27 v.v.m.).

Para el segundo y tercer objetivo específico se concluyó que:

5. El sistema de selección de mutantes sensibles a barbitol propuesto; basado en el uso de lisozima es efectivo, con una eficiencia del 2.5% (2 mutantes estables sensibles / 78 ufc.).
6. El aislamiento de este tipo de mutantes mediante el uso de protoplastos indica que el micelio es compartimentalizado sin intercambio de material genético entre células vecinas.

En relación al cuarto objetivo específico:

6. La producción de rifamicina B mostró corresponder a un modelo de producción ligado al crecimiento.

Finalmente y de acuerdo con las conclusiones anteriores:

7. Se confirma la hipótesis central del trabajo, en donde se establece que existe una correlación entre la sensibilidad al efecto tóxico del barbitol y el nivel de producción de rifamicina B, de modo que el aislamiento de mutantes sensibles al barbitol es un sistema efectivo para mejorar la producción de rifamicina B.

VIII. RECOMENDACIONES

Los resultados del presente trabajo, además de su importancia desde el punto de vista práctico en cuanto a la generación de cepas sobreproductoras, abren una serie de caminos para investigaciones futuras.

En primer lugar, el contar con cepas mutantes con un fenotipo seleccionable y asociado a la producción (sensibilidad al efecto tóxico del barbital), resulta muy valioso, ya que con esto es posible identificar el gen responsable de dicho efecto, y con ello profundizar en el mecanismo de acción del barbital. En este sentido, la aplicación de electroforesis bidimensional de proteínas a partir de extractos obtenidos de micelio incubado en presencia y ausencia de barbital podría aclarar el problema. La clonación de genes que se expresan de modo diferencial en estas dos condiciones y con los dos tipos de mutantes permitiría la determinación exacta de los pasos implicados en la inducción de la biosíntesis de rifamicina B por barbital.

En segundo lugar, resulta interesante determinar el sitio exacto de la inhibición del barbital dentro de la cadena respiratoria, así como algunos de los componentes de la misma, ya que prácticamente no existe ninguna información al respecto, y como ya se

discutió, existe una participación estrecha de la cadena respiratoria con el metabolismo secundario. Cabe señalar que esto también podría ser aplicable a otros antibióticos en cuya estructura exista el oxígeno de origen atmosférico.

En cuanto a la posible existencia de un citocromo del tipo P450 inducible por barbital, a pesar de que no se pudieron obtener resultados concluyentes, sigue siendo una posibilidad muy atractiva para explorar, ya que eso explicaría tanto aspectos regulatorios mediados por el barbital, como mecanismos biosintéticos en cuanto a la participación de este citocromo en la incorporación de átomos de oxígeno atmosférico a la molécula.

Finalmente, es interesante probar el efecto que tendrían este tipo de mutaciones (resistencia y sensibilidad al barbital) sobre la biosíntesis de otros metabolitos secundarios por otros actinomicetos como por ejemplo la estreptomicina por *S. griseus*, o galirubinas (antraciclina) por *S. galilaeus*, en donde también se ha observado efecto positivo del barbital sobre la biosíntesis de estos metabolitos y cabe la posibilidad de que al igual que ocurre en *A. mediterranei*, este fuese un sistema válido para la obtención de cepas sobreproductoras de estos metabolitos.

IX. Referencias

- Anderson M.G., Monypenny D., Rickards R.W. and Rothschild J.M. (1989). Biosynthetic origins of the oxygen atoms in the ansamycin antibiotics rifamycin B, O and S. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 5: 311-313.
- Auerbach J.D., Wypijewska C. and Brodie H.K.H. (1994). AIDS and behavior. An integrated approach. National Academy Press. Washington D.C., U.S.A. 136-138.
- Azuma M., Nishi K., Horinouchi S. and Beppu T. (1990). Ribonucleases catalyze the synthesis of B-factor (3'-butylphosphoryl AMP), an inducer of rifamycin production in a *Nocardia* sp. *J. Antibiotics* 43 (3): 321-323.
- Basak K. and Majumdar S.K. (1976). Effect of some inhibitors on streptomycin biosynthesis. *Folia Microbiol.* 21: 43.
- Becker A.M., Hertt A.J., Hilton G.L., Kibby J.J. and Rickards R.W. (1983). 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid in antibiotic biosynthesis. VI. Directed biosynthesis studies with ansamycin antibiotics. *J. Antibiotics* 36 (10): 1323-1328.
- Beppu T. (1997). A-factor and beyond; chemical signals in *Streptomyces* and its implication. Xth International Symposium on Biology of Actinomycetes. May 27-30. Beijing, China.
- Black SD. (1994). On the domain structure of cytochrome P-450 102(BM-3): Isolation and properties of a 45-kDa FAD/NADP domain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 203 (1) 162-168.
- Black SD, Linger MH, Freck LC, Kazemi S and Galbraith A. (1994). Affinity isolation and characterization of cytochrome P-450 102(BM-3) from barbiturate-induced *Bacillus megaterium*. *Archives Biochem. Biophys.* 310 (1) 126-133.
- Blanco MG., Hardisson C. and Salas J.A. (1984). Resistance to inhibitors of RNA polymerase in actinomycetes with produce them. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2883-2891.
- Blumauerová M., Matěju, J., Stajner K. and Vaněk Z. (1977). Studies on the production of daunomycinone-derived glycosides and related metabolites in *Streptomyces peuceitius*. *Folia Microbiol.* 22: 275.
- Demain AL. (1989). Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. En: "Regulation of secondary metabolism in actinomycetes". Cap. 4. Shapiro

- S. Eds. CRC Press, Inc., Florida U.S.A., 127-134.
- Demain AL. (1997a). Health, wealth and actinomycetes. X th International Symposium on Biology of Actinomycetes. May 27-30. Beijing, China.
- Demain AL. (1997b). Factores ambientales que regulan la fisiología de los microorganismos industriales productores de metabolitos secundarios. Conferencia impartida en el Área de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de León, España.
- Dische Z. (1955). A method for the determination of DNA. En: *The Nucleic Acids*. Vol. I, Chargaff E. and Davidson JN. Eds. Academic Press, N.Y. U.S.A.
- Ferguson JH., Huang HT. and Davisson JW. (1957). Stimulation of streptomycin production by a series of synthetic organic compounds. *Appl. Microbiol.* 5: 339.
- Ferreira E. (1995). Es necesaria la detección temprana de la tuberculosis. *Ciencia Médica* Vol. 1(4): 24-33.
- Ghisalba O., Traxler P. and Nüesch J. (1978). Early intermediates in the biosynthesis of ansamycins. I. Isolation and identification of prorifamycin I. *J. Antibiotics* 31 (11): 1124-1131.
- Ghisalba O., Traxler P., Fuhrer H. and Richter W.J. (1980). Early intermediates in the biosynthesis of ansamycins. III. Isolation and identification of further 8-deoxyansamycins of the rifamycin-type. *J. Antibiotics* 33 (8): 847-856.
- Ghisalba O., Roos R, Schupp T and Nüesch J. (1982). Transformation of rifamycin S into rifamycin B and L. A revision of the current biosynthetic hypothesis. *J. Antibiotics* 35 (1): 74-80.
- Ghisalba O., Auden JAL., Schupp T. and Nüesch J. (1984). The rifamycins: Properties, biosynthesis and fermentation. En: *Biotechnology of industrial antibiotics*. Vandamme EJ. Eds. Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A. pag. 282-327.
- Gräfe U. (1989). Autoregulatory secondary metabolites from actinomycetes. En: "Regulation of secondary metabolism in actinomycetes". Cap. 3. Shapiro S. Eds. CRC Press, Inc., Florida U.S.A., 75-126.
- Gu W., Lu X., Geng Y., Liu C., Jin Z. and Jiao R. (1983). The regulatory effect of nitrate on the relationship between the production of rifamycin SV and the biosynthesis of cellular lipid components. *Acta Microbiol.* 23: 313-317.
- Gygax D., Ghisalba O, Treichler H. and Nüesch J. (1990). Study to the biosynthesis of the rifamycin-chromophore in *Nocardia mediterranei*. *J. Antibiotics* 43 (3): 324-326.
- Hatefi I and Stiggall DL. (1979). Metal-containing flavoprotein dehydrogenases. En: *The*

- Enzymes. Boyer PD. (eds.) Academic Press, New York, 13; 203-207.
- Heding H. and Gurtu AK. (1977). Effect of barbital on the biosynthesis of streptomycin in *Streptomyces griseus* J. Antibiot. 30 (10): 879-880.
- Hogarth C., Wilkinson B.J. and Ellar D.J. (1977). Cyanide-resistant electron transport in sporulating *Bacillus megaterium* KM. Biochim. Biophys. Acta 461(1): 109-123.
- Hopwood D. A., Bibb M.J., Chater K.F., Kieser T., Bruton T., Kieser C.J., Lydiate H.M., Smith D.J., Ward J.M. and Schrepf H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Jiao R., Liu C., Jin Z., Zhang X., Ni L. and Lu Z. (1984). The route of incorporation of nitrogen atoms into rifamycin during its biosynthesis. Sci. Sinica 27: 280-285.
- Karlsson A., Sartori G. and White R.J. (1974). Rifamycin biosynthesis: further studies on origin of the ansa chain and chromophore. Eur. J. Biochem. 47: 251-256.
- Karsheva M., Hristov J., Penchev I. and Lossev V. (1997). Rheological behavior of fermentation broths in antibiotic industry. Appl. Biochem. Biotechnol. 68: 187-206.
- Kawaguchi T., Asahi T., Satoh T., Uozumi T. and Beppu T. (1984). B-Factor, an essential regulatory substance inducing the production of rifamycin in a *Nocardia* sp. J. Antibiotics 37 (12): 1587-1595.
- Kawaguchi T., Azuma M., Horinouchi S. and Beppu T. (1988). Effect of B-factor and its analogues on rifamycin biosynthesis in *Nocardia* sp. J. Antibiotics 41 (3): 360-365.
- Kim CG., August PR., Yu TW., Müller R., Müller M., Ning S., Hoffman D., Leistner E. and Floss HG. (1997). Biosynthesis of rifamycin and related compounds. Xth International Symposium on Biology of Actinomycetes. May 27-30. Beijing, China.
- Kluepfel D., Lancini GC. and Sartori G. (1965). Metabolism of barbital by *Streptomyces mediterranei*. Appl. Microbiol. 13 (4): 600-604.
- Koop D.R. (1992). Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. FASEB J. 6: 724-730.
- Královcová E., Blumauerová M. and Vaněk Z. (1977). The effect of 5, 5-diethylbarbituric acid on the biosynthesis of anthracyclines in *Streptomyces galilaeus*. Folia Microbiol. 22: 182.
- Küenzi MT., Gruner J., Fiechter A. and Nüesch J. (1977). Product inhibition during the rifamycin S fermentation. Experientia 33/1: 141.
- Lal R., Lal S., Grund E. and Eichenlaub R. (1991). Construction of a hybrid plasmid capable of replication in

- Amycolatopsis mediterranei*. Appl. Env. Microbiol. 57 (3): 665-671.
- Lal R., Khanna R., Dhingra N. Khanna M. and Lal S. (1998). Development of an improved cloning vector and transformation system in *Amycolatopsis mediterranei* (*Nocardia mediterranei*). J. Antibiot. 51 (2): 161-169.
- Lancini G. and Grandi M. (1981). Biosynthesis of ansamycins. En: Antibiotics. Vol. 4. Biosynthesis, Corcoran J. W. Ed., Springer-Verlag, Berlin, F.R.G. p.p. 12-40.
- Lechevalier MP., Prauser H., Labeda DP. and Ruan JS. (1986). Two new genera of nocardioform Actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 36 (1): 29-37.
- Lee JG, Choi CY, Seong BL and Han MH. (1983). Optimal pH profile in rifamycin B fermentation. J. Ferment. Technol. 61 (1): 49-53.
- Lewis D.F.V. (1996). Cytochromes P450: Structure, Function and Mechanism. Taylor & Francis, Great Britain. p.p. 348.
- Li W., Yao H., Shen M., Jin M., Zhao GP. and Chiao JS. (1997). Characterization of FMMR1, a newly isolated narrow host-range lytic bacteriophage of *Amycolatopsis mediterranei* U119. X th International Symposium on Biology of Actinomycetes. May 27-30. Beijing, China.
- Liu, Y., Peng WT., Zhao GP. and Chiao JS. (1997). The promoters of the glutamine synthetase structural gene (*glnA*) of the rifamycin SV producing Actinomycete, *Amycolatopsis mediterranei* U32. X th International Symposium on Biology of Actinomycetes. May 27-30. Beijing, China.
- Madón J., Moretti P. and Hütter R. (1987). Site-specific integration and excision of pMEA100 in *Nocardia mediterranei*. Mol. Gen. Genet. 109 (2): 257-264.
- Madón J. and Hütter R. (1991). Transformation system for *Amycolatopsis* (*Nocardia*) *mediterranei*. direct transformation of mycelium with plasmid DNA. J Bacteriol. 173 (20): 6325-6331.
- Margalith P. and Beretta G. (1960). Rifomycin XI. Taxonomic studies on *Streptomyces mediterranei*. nov. sp. Mycopatol. Mycol. Appl. 13: 4.
- Margalith P. and Pagani H. (1961). Rifomycin: XIV. Production of rifomycin B. Appl. Microbiol. 9: 325-333.
- Martinelli E., Gallo GG., Antonini A. and White RJ. (1974). Structure of rifamycin W. A novel ansamycin from a mutant of *N. mediterranei*. Tetrahedron. 30: 3087-3091.
- Mei B. and Jiao R. (1988). Purification and properties of glutamate synthase from *Nocardia mediterranei*. J. Bacteriol. 170: 1940-1944.

- Mejía A, Gelista A, Resendiz B and Rodríguez F. (1990). A strain of *Nocardia mediterranei* that produces a mixture of rifamycin B and W. *Biotechnol. Lett.* 12 (4): 283-288.
- Mejía A., Tomasini A. and Barrios-González J. (1997). Application of on-line measurement of oxygen uptake and carbon dioxide evolution to penicillin production in solid state fermentation. En: "Advances in Solid State Fermentation". Cap. 34. Roussos S. and col. Eds. Kluwer Academic Publishers, Holanda.
- Miller GL. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Moretti P., Hintermann G. and Hutter R. (1985). Isolation and characterization of an extrachromosomal element from *Nocardia mediterranei*. *Plasmid* 14 (2): 126-133.
- Musílková M. (1959). The effect of some inhibitors on streptomycetes biosynthesis. *Folia Microbiol.* 4: 76-78.
- Nakamura RM. (1997) Immunology of tuberculosis. Xth International Symposium on Biology of Actinomycetes. May 27-30. Beijing, China.
- O'Keefe DP. and Harder PA. (1991). Occurrence and biological function of cytochrome P450 monooxygenases in the actinomycetes. *Mol. Microbiol.* 5 (9): 2099-2105.
- Onaka H., Ando N., Nihira T., Yamada Y., Beppu T. and Horinouchi S. (1995). Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 177 (21): 6083-6092.
- Pasqualucci CR., Vigevani A., Radaelli P. and Gallo GG. (1970). Improved differential spectrophotometric determination of rifamycins. *J. Pharmaceutical Sci.* 59 (5): 685-687.
- Pelzer S., Reichert W., Hupper M., Heckmann D. and Wohlleben W. (1997). Cloning and analysis of a peptide synthetase gene of the balhimycin producer *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908 and development of a gene disruption/replacement system. *J. Bacteriol.* 56 (2): 115-128.
- Pirt S.J. (1975). Principles of microbe and cell cultivation. Cap. 2 y 16. Blackwell Scientific Publications, London, Great Britain.
- Reuss M. (1993). Oxygen transfer and mixing: Scale up implications. En: *Biotechnology*. Cap. 10. Rehm H., Reed G., Pühler A. and Stadler P. Eds. VCH Publishers Inc. Weinheim, Germany.
- Rodríguez AM, Olano C, Méndez C, Hutchinson CR and Salas JA. (1995). A cytochrome P450-like gene possibly involved in oleandromycin biosynthesis by

- Streptomyces antibioticus*. FEMS Microbiol. Lett. 127 (1-2): 117-120.
- Schupp T., Hutter R. and Hopwood D.A. (1975). Genetic recombination in *Nocardia mediterranei*. J. Bacteriol. 121 (1): 128-136.
- Schupp T. and Divers M. (1986). Protoplast preparation and regeneration in *Nocardia mediterranei*. FEMS Microbiol. Lett. 36: 159-162.
- Secretaría de Salud (1996). Estadísticas del Sector Salud, México. Página de Internet <http://www.ssa.gob.mx>
- Sensi P., Margalith P. and Timbal MT. (1957). Rifamycin, a new antibiotic. Preliminary report. Farmaco Ed. Sci. 14: 146-147.
- Sensi P., Ballotta R., Greco A.M. and Gallo G.G. (1961). Rifamycin, XV - Activation of rifomycin B and rifomycin O.- Production and properties of rifomycin S and rifomycin SV. Farmaco Ed. Sci. 14: 146-147.
- Shapiro S. (1989a). Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. CRC Press, Inc., Florida U.S.A. p.p. 304
- Shapiro S. (1989b). Nitrogen assimilation in actinomycetes and the influence of nitrogen nutrition on actinomycete secondary metabolism. En: "Regulation of secondary metabolism in actinomycetes". Cap. 5. Shapiro S. Eds. CRC Press, Inc., Florida U.S.A.
- Shvinka I.E., Viestur U.E. and Toma M.K. (1979). Alternative oxidation pathways in the respiratory chain of *Brevibacterium flavum*. Mikrobiologija 48(1): 10-16.
- Stassi D., Donadio S., Staver MJ. and Katz L. (1993). Identification of a *Saccharopolyspora erythraea* gene required for the final hydroxylation step in erythromycin biosynthesis. J. Bacteriol. 175 (1): 182-189.
- Thiemann JE., Zucco G. and Pelizza G. (1969). A proposal for the transfer of *Streptomyces mediterranei* (Margalith and Beretta) to the genus *Nocardia mediterranei*. Arch. Mikrobiol. 67: 147-151.
- Tiselli, E. (1997). Director general. Fermic S. A. de C. V., Fábrica de antibióticos. Comunicación personal.
- Vandamme EJ. (1984). Biotechnology of industrial antibiotics. Eds. Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A.
- Vékey K., Edwards D.M.E. and Zerilli L.F. (1989). Liquid chromatographic-mass spectrometric studies on rifamycin antibiotics. J. Chromatography 474: 317-327.
- Voet D. y Voet J.G. (1995). Biochemistry. 2nd. Edition. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. p.p. 569-591.
- Vohra R.M. and Dube S. (1989). Identification and quantitation of rifamycins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 477 (2): 463-466.

- Vohra R.M. (1992). Novel assay for screening rifamycin B-producing mutants. *Appl. Env. Microbiol.* 58 (1): 403-404.
- Votruba J. and Vaněk Z. (1989). "Physicochemical factors affecting actinomycete growth and secondary metabolism" En: Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. Cap. 8. Shapiro, S., Ed. CRC Press, Florida, U.S.A.
- Wang N.J., Han B.L., Yamashita N. and Sato M. (1994). 31-Homorifamycin W, a novel metabolite from *Amycolatopsis mediterranei*. *J. Antibiotics* 47 (5): 613-615.
- Watson J.D. (1978). *Biología molecular del gen. 3era. Edición.* Fondo Educativo Interamericana S.A., Madrid, España.
- Weinberg, (1989). Roles of micronutrientes in secondary metabolism of actinomycetes. En: Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. Cap. 7. Shapiro, S., Ed. CRC Press, Florida, U.S.A.
- Weiwen Z. and Ruishen J. (1996). Purification and characterization of methylmalonyl-CoA mutase and methylmalonyl-CoA racemase from a rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32. *Weishengwu Xuebao* 36 (3): 199-207.
- White R.J., Martinelli E., Gallo G.G. and Lancini G. (1973a). Rifamycin biosynthesis studied with ^{13}C enriched precursors and carbon magnetic resonance. *Nature* 234: 273-277.
- White R.J., Martinelli E. and Lancini G. (1973b). Ansamycin biosynthesis: Studies on a novel rifamycin isolated from a mutant strain of *Nocardia mediterranei*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71 (8): 3260-3264.
- White R.J. and Martinelli E. (1974). Ansamycin biogenesis: Incorporation of $[1-^{13}\text{C}]$ glucose and $[1-^{13}\text{C}]$ glycerate into the chromophore of rifamycin S. *FEBS Lett.* 49 (2): 233-236.
- Williams E. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Williams & Wilkins. Baltimore U.S.A. 4: 2350-2361.
- World Health Organization. (1998). Global Tuberculosis Programme. <http://www.who.int/gtb/>
- Zhao, G.P., Yang Y. and Chiao J.S. (1997). Physiology and molecular biology of rifamycin SV biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* U32. Xth International Symposium on Biology of Actinomycetes. May 27-30. Beijing, China.
- Zhu B., Madon J., Häusler A. and Hütter R. (1990). Amplification on the *Amycolatopsis (Nocardia) mediterranei* plasmid pMEA100: Sequence similarities to actinomycete att sites. *Plasmid* 24: 132-142.

X. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS:

- Fig. II.1. Biogénesis de la rifamicina B.
- Fig. II.2. Biosíntesis de rifamicina por *Amycolatopsis mediterranei* y su conexión con el metabolismo primario.
- Fig. II.3. Etapa final de la biosíntesis de rifamicina B sin ramificaciones.
- Fig. II.1.3. Estructura del 5, 5-dietil barbiturato.
- Fig. V.1. Cinéticas de producción de rifamicina B por *A. mediterranei* (M18) en matraz con diferentes medios de producción.
- Fig. V.2. Cinéticas de producción de rifamicina B, pH y consumo de glucosa en matraz con medio FM sin barbital.
- Fig. V.3. Cinéticas de producción de rifamicina B, pH y consumo de glucosa en matraz con medio FM con barbital (2 g/L).
- Fig. V.4. Cinéticas de producción de rifamicina B, pH y consumo de glucosa en matraz con medio Lee sin barbital.
- Fig. V.5. Cinéticas de producción de rifamicina B, pH y consumo de glucosa en matraz con medio Lee con barbital (0.7 g/L).
- Fig. V.6. Cinéticas de producción de rifamicina B, pH y consumo de glucosa en matraz con medio Lee con barbital (2 g/L).
- Fig. V.7. Cinéticas de producción específica de rifamicina B, en matraz con medio Lee con diferentes concentraciones de barbital.
- Fig. V.8. Cinéticas de producción de rifamicina B, y consumo de glucosa en fermentador de 1 L con medio Lee con y sin barbital.
- Fig. V.9. Cinéticas de crecimiento y producción de rifamicina B, en burbujeadores con medio Lee con (0.7 g/L) y sin barbital.
- Fig. V.10. Producción de CO₂ durante el crecimiento y producción de rifamicina B, en burbujeadores con medio Lee con (0.7 g/L) y sin barbital. Aereación de 0.8 L/h.
- Fig. V.11. Consumo de O₂ durante el crecimiento y producción de rifamicina B, en burbujeadores con medio Lee con (0.7 g/L) y sin barbital. Aereación de 0.8 L/h.

- Fig. V.12. Cociente respiratorio durante el curso de la fermentación en burbujeadores con medio Lee con (0.7 g/L) y sin barbital. Aereación de 0.8 L/h.
- Fig. V.13. Consumo de O₂ de células en reposo durante la cinética de crecimiento en medio Lee. Con barbital (2.1 g/L), con 0.092 g/L de dinitrofenol y testig-+}.o.
- Fig. V.14. Consumo de O₂ de células en reposo durante la cinética de crecimiento en medio Lee. Sin barbital y con diferentes concentraciones de barbital.
- Fig. V.15. Espectro de absorción de células completas, cultivadas en medio de producción Lee sin barbital y con 0.7 g/L de barbital. Muestra de 48 h del cultivo.
- Fig. V.16. Espectro de absorción de células completas, cultivadas en medio de producción Lee sin barbital y con 0.7 g/L de barbital. Muestra de 137 h del cultivo.
- Fig. V.17. Espectro de absorción de células completas, cultivadas en medio de producción Lee sin barbital y con 0.7 g/L de barbital. Muestra de 164 h del cultivo.
- Fig. V.18. Espectro de absorción de células completas, cultivadas en medio de producción Lee con 0.7 g/L de barbital. Muestra de 138 h de edad, reducida con ditionita e incubada con CO.
- Fig. V.19. Crecimiento de *A. mediterranei* (M18) en medio mineral sólido con diferentes fuentes de carbono, en presencia (2 g/L) y ausencia de barbital.
- Fig. V.20. Efecto del barbital (2 g/L) sobre el crecimiento de *A. mediterranei* (M18) en matraz con medio mineral y glucosa o citrato como fuente de carbono.
- Fig. V.21. Cinética de producción de rifamicina B de la cepa progenitora (M18) y 5 mutantes resistentes a barbital (Mrb). Matraces de 250 mL con 25 mL de medio Lee con 0.7 g/L de barbital.
- Fig. V.22. Cinética de crecimiento y consumo de glucosa de la cepa progenitora (M18) y las mutantes resistentes a barbital (Mrb). Matraces de 250 mL con 25 mL de medio Lee con barbital (0.7 g/L), 25 °C a 250 rpm.
- Fig. V.23. Cinéticas de producción de rifamicina B de la cepa progenitora (M18) y las mutantes sensibles al barbital (Msb). Matraces de 250 mL con 25 mL de medio Lee con 0.7 g/L de barbital.
- Fig. V.24. Cinéticas de crecimiento y consumo de glucosa de la cepa progenitora (M18) y las mutantes sensibles al barbital (Msb). Matraces de 250 mL con 25 mL de medio Lee con barbital (0.7 g/L), 25 °C a 250 rpm.
- Fig. V.25. Velocidad específica de consumo de oxígeno de células en reposo sin barbital (---) y con 1.43 g/L de barbital

(- - -) durante el curso de la fermentación en medio Lee con barbital 0.7 g/L. Cepa

progenitora (M18) y mutante sensible al barbital (Msb2).

TABLAS:

- | | |
|--|--|
| <p>Tabla 1. Características en la producción de rifamicina por en los diferentes medios de producción evaluados.</p> <p>Tabla 2. Identificación de picos del espectro mostrado en la fig. 7.2 con las longitudes de onda de los principales citocromos reportadas para bacterias.</p> <p>Tabla 3. Identificación de picos del espectro mostrado en la fig. 7.3 con las longitudes de onda de los principales citocromos de bacterias.</p> <p>Tabla 4. Crecimiento de <i>A. mediterranei</i>, en placas de con agar Bennet, en presencia de diferentes concentraciones de barbital.</p> <p>Tabla 5. Efecto del barbital sobre la preincubación de la cepa M18 (ATCC 21789) en medio sólido Bennet.</p> <p>Tabla 6. Evaluación de la resistencia al efecto tóxico del barbital sobre el crecimiento en medio Bennet, de las 32 mutantes aisladas y de la</p> | <p>cepa progenitora (M18). Las observaciones fueron hechas a las 96 h de incubación.</p> <p>Tabla 7. Efecto de la edad del micelio sobre la actividad de la lisozima para la formación de protoplastos de la cepa M18.</p> <p>Tabla 8. Comparación de la sensibilidad a diferentes concentraciones de barbital en agar Bennet, de las 10 mutantes obtenidas (Msb) y la cepa progenitora (M18).</p> <p>Tabla 9. Características de la producción de rifamicina B de la cepa progenitora y las mutantes sensibles y resistentes a barbital. μ_m = velocidad específica de crecimiento máxima. X_{MAX} = biomasa máxima, m = sustrato requerido para mantenimiento celular, β = constante de proporcionalidad para un proceso por lote. α = constante de proporcionalidad para un proceso por lote.</p> |
|--|--|

XI. ABREVIATURAS

α	Constante de proporcionalidad asociado al crecimiento
β	Constante de proporcionalidad no asociado al crecimiento
μ_m	Velocidad específica de crecimiento máxima
AB	Agar Bennet
ASS/7	Medio de producción con 15 g/L de harina de soya
ASS/8	Medio de producción con 5 g/L de harina de soya
Barbital	5,5-dietilbarbiturato
BAR ^R	Fenotipo resistente al barbital
BAR ^S	Fenotipo sensible al barbital
CR	Cociente respiratorio
CRM	Medio complejo para protoplastos
DAHP	3-desoxi-D-arabinoheptuloseonato
FM	Medio de producción tipo industrial
m	Sustrato requerido para mantenimiento celular
M18	Cepa progenitora (ATCC 21789)
MM	Medio mineral
Mrb	Mutante resistente a 5 g/L de barbital
Msb	Mutante sensible a 5 g/L de barbital
X _{MAX}	Biomasa máxima
Y _{P/S}	Rendimiento de producto por sustrato consumido
Y _{P/X}	Rendimiento de producto por biomasa generada
Y _{X/S}	Rendimiento de biomasa por sustrato consumido

XII. PUBLICACIÓN

Overproduction of Rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei* and Its Relationship with the Toxic Effect of Barbitol on Growth

ARMANDO MEJÍA*, JAVIER BARRIOS-GONZALEZ and GUSTAVO VINEGRA-GONZÁLEZ

Depto. de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa,
Apdo. Postal 55-535, México D. F. 09340, México

(Received for publication August 11, 1997)

A novel method for selecting overproducing strains of rifamycin B was developed. This technique involves the use of lysozyme and the effect of barbitol on the growth of *A. mediterranei*. Complete medium added with glycine and barbitol was inoculated with mutagenized mycelium, incubated for 48 hours and treated with lysozyme. The lysozyme resistant mycelium was washed with dilute detergent. Complete medium with glycine but without barbitol was inoculated with the washed mycelium. Protoplasts were obtained and regenerated and the colonies were picked and seeded on Bennet agar plates with and without barbitol. Two selected mutants were sensitive to 0.5% barbitol producing 200% more rifamycin than the parental strain. In addition, 30 barbitol resistant mutants were isolated and their production level was lower than the one observed with the parental strain. These results suggest that the effect of barbitol on secondary metabolism (rifamycin production) is related to its effect on primary metabolism.

Rifamycin B is an important antibiotic produced by *Amycolatopsis mediterranei*, originally described by SENSI and coworkers¹⁾. Semisynthetic derivatives are prepared from this fermentation product. This family of antibiotics has activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. The former is the causative agent of an infection common in patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)²⁾.

Several attempts have been made to improve rifamycin production strains of *A. mediterranei*, using recombinant DNA techniques³⁾ and classical mutation methods⁴⁾. But none has been based on a compound that gives a marked stimulatory response on rifamycin B biosynthesis, such as barbitol (5,5-diethylbarbituric acid). MARGALITH and PAGANI in their classical work⁵⁾, showed that addition of 11 mM barbitol to the culture medium caused a shift towards production of rifamycin B and away from other rifamycins.

On the other hand, barbitol has a toxic effect upon *A. mediterranei*. Mycelial growth is 20 to 25% more abundant in a medium without barbitol than in its presence. In addition, the presence of 0.2% barbitol reveals inhibition in colonial growth in surface culture. In this paper, we demonstrate that there is a relationship between the toxic effect of barbitol and biosynthesis of

rifamycin B in *A. mediterranei*. We developed a novel method to isolate high rifamycin-producing mutants, based on their sensitivity to barbitol. A comparison was also made between sensitive and resistant mutants and the parental strain, in relation to their production of rifamycin B.

Materials and Methods

Microorganism

A. mediterranei type strain (ATCC 13685), *A. mediterranei* M18 (ATCC 21789) and mutant strains derived from M18 (ATCC 21789) were used for these studies. They were stored lyophilized and maintained in Bennet agar medium.

Media and Culture Conditions

Agar Bennet was composed of (g/liter): glucose, 10; meat extract, 1; NZ-amine A, 2; yeast extract, 1 and agar, 20.

Bacteria were usually grown in seed medium containing the following components, in grams per liter: glucose, 20; soybean meal, 20; CaCO₃, 2.5; MgSO₄ · 7H₂O, 0.4; FeSO₄ · 7H₂O, 0.01; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.05 and CoCl₂ · 6H₂O, 0.003. The cultures were grown in a

shaking incubator at 25°C for 84 hours. The production medium was composed of glucose, 120; soybean meal, 15; (NH₄)₂SO₄, 5; MgSO₄·7H₂O, 1; KH₂PO₄, 1; CaCO₃, 6; CuSO₄·5H₂O, 0.0033; FeSO₄·7H₂O, 0.01; ZnSO₄·7H₂O, 0.05; MnSO₄·7H₂O, 0.004; CoCl₂·6H₂O, 0.002; (NH₄)₂MoO₄, 0.001 and 5,5-diethylbarbiturate 0.7. This medium was inoculated with 20% of the seed culture and was incubated at 25°C and 250 rpm for 144 hours.

For the determination of specific production, liquid Bennet medium was used as the seed culture and production medium as it was described by LEE *et al.*⁹.

Assays

Rifamycin B production was measured by reversed-phase high-performance liquid chromatography⁷. The biomass concentration was measured on the basis of its dry cell weight. MILLER's method was used for measurement of glucose in the fermentation broth.

Mutagenesis

A culture in Bennet medium was incubated for 48 hours at 25°C and 150 rpm. Mycelium was collected by centrifugation, resuspended in water and placed in a Petri dish. It was irradiated under the UV lamp with constant agitation for an appropriate time (40% of survival).

Protoplast Formation and Regeneration

Mycelium was collected from cultures grown 36 hours, 250 rpm at 25°C in CRM medium (glucose 1%, sucrose 10.3%, MgCl₂·6H₂O 1.012%, soybean tryptone 1.5% and yeast extract 0.5%) supplemented with 2.5% of glycine. The protoplasts were obtained by the method described by SHUPP and DIVERS⁸ and LAL *et al.*³, but we used P buffer⁹ instead of R2L, and the incubation with lysozyme (5 mg/ml) was done at 30°C by 3 hours. Protoplasts were plated on CRM (with agar Difco) and then the plates were overlaid with 3 ml of soft agar (0.5%).

Selection of Sensitive Mutants to Barbitol

CRM medium with glycine (2.5%) and barbitol (0.4%) was inoculated with mutagenized mycelium. The incubation was done at 25°C and 150 rpm for 48 hours. The culture was treated with lysozyme as it was described previously. The resistant mycelium to lysozyme was washed with diluted detergent (0.01% SDS). CRM medium with glycine and without barbitol was inoculated with this washed mycelium. Protoplasts were obtained and the regenerated colonies were seeded on Bennet agar

plates with 0.5% barbitol and without barbitol.

Estimation of Unknown Parameters

The non-linear regression program (Solver, Microsoft Windows 95) fits a mathematical model to experimental data in order to determine a number of unknown parameters.

Models used: $dx/dt = \mu(1 - x/x_{max})x$;

$-dS/dt = \mu dx/dt + mx$;

$dP/dt = \alpha dx/dt + \beta x$.

where: t = fermentation time, x = biomass, P = rifamycin production, S = residual substrate, μ = specific growth rate, m = substrate required for cell maintenance, β = constant of proportionality for a batch process, α = constant of proportionality for a batch process.

Reproducibility of Results

Experiments were performed in duplicate and repeated at least once. The results are mean values.

Results

Barbitol Sensitivity of *A. mediterranei*

The toxic effect of barbitol on growth was determined in plates with Bennet medium supplemented with barbitol. The data in Table 1 shows that the M18 strain could not grow with 0.5% barbitol, and it was more sensitive than the type strain (ATCC 13685).

Growth of the M18 strain was observed when Bennet medium without barbitol was inoculated with mycelium from a young culture (96 hours) with 0.75% barbitol. In accordance with Table 1, in this concentration the strain could not grow. However, this preincubation did not result in the death of mycelium.

Effect of the Age of Mycelium on Lysozyme Activity

The effect of the age of mycelium on lysozyme activity was studied with a view to develop an efficient procedure to select sensitive mutants to barbitol. The results of these experiments are shown in Table 2.

Selection of Resistant Mutants

Thirty mutants were selected for their ability to grow with 0.5% barbitol (at a frequency of 8×10^{-5}). Eighteen of these mutants grew with 0.75% barbitol and 9 with 1%. Five, out of 30 isolated mutants, were chosen at random for further characterization.

Table 1. Effect of barbital on the growth of *A. mediterranei* in plates with Bennet medium (The results are expressed in total milligrams of dry weight).

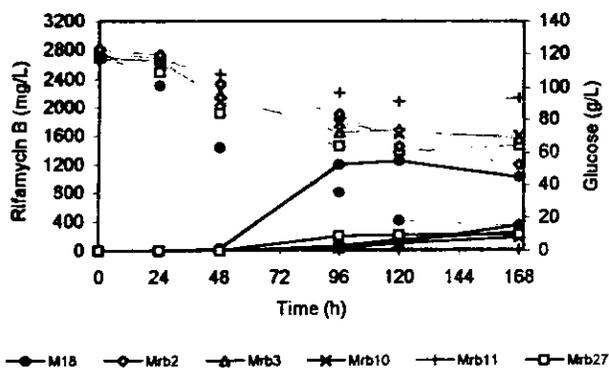
Strain	Barbital (%)						
	0	0.125	0.250	0.375	0.500	0.625	0.750
Type (ATCC 13685)	180.2	182.0	181.3	123.0	78.5	20.9	0.9
M18 (ATCC 21789)	178.6	181.4	180.7	42.1	0.7	0.5	0.6

Table 2. Effect of the age of mycelium on lysozyme activity.

Time of growth in liquid medium CRM + glycine (hour)	Growth on plates with CRM medium (cfu ml)*	Lysozyme treatment and protoplast count by hemocytometer (protoplast ml)	Growth on plates with CRM medium after lysozyme treatment (col. ml)
48	1×10^6	1.4×10^4	1.3×10^2
72	2.3×10^6	3.5×10^2	0
96	8×10^6	0	0
120	1.2×10^7	0	0
144	1×10^7	0	0

The mycelium of *A. mediterranei* (ATCC21789) was obtained from cultures (CRM with 2.5% glycine) incubated from 48 hours to 144 hours. Then the mycelium was treated with lysozyme. Plates with CRM medium were inoculated before and after lysozyme treatment.

Fig. 1. Time course of rifamycin B production (—) and glucose consumption (-----) in the parental strain (M18) and the mutants resistant to barbital (Mrb).



The time course of rifamycin B production by the parental strain (M18) and five selected mutants is presented in Figure 1. These mutants showed less rifamycin production and glucose consumption than the parental strain.

It is important to mention that the colonies of all resistant mutants (30 isolates) showed less intense color

than the parental strain, which indicates that secondary metabolism is altered.

Selection of Sensitive Mutants

Ten mutants were selected and two of them were sensitive to 0.5% barbital. The time course of antibiotic production of these mutants is shown in Figure 2.

Fig. 2. Time course of rifamycin B production (—) and glucose consumption (-----) in the parental strain (M18) and the mutants sensitive to barbital (Msb).

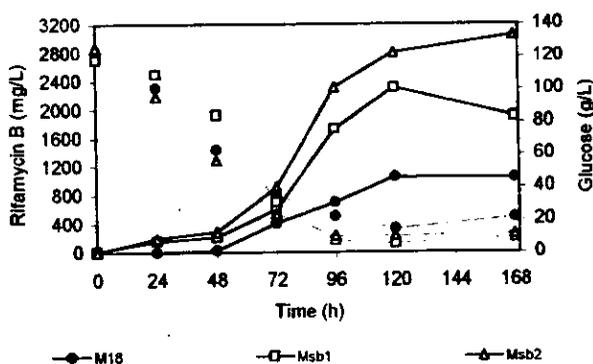


Table 3. Characteristics of rifamycin B production of the parental strain and mutants.

Phenotype	Strain:	Yield P/X (mg/g):	Yield P/S (g/g):	μ_m (h^{-1}):	X_{max} (g):	m (g/ml):	β ($mg\ g^{-1}\ l^{-1}\ h^{-1}$):	α ($mg\ h\ g^{-1}\ l^{-1}$):	Sum of squares
Parental	M18	259	9.8	0.053	4.08	0.009	0	5941	9.6 E-02
BAR ^R	Mrb2	86	6.4	0.050	4.36	0.001	0	1547	1.6 E-01
	Mrb3	65	5.1	0.060	3.98	0.005	0	1055	8.4 E-02
	Mrb10	45	3.5	0.034	3.98	0.002	0	1356	6.4 E-01
	Mrb11	6	1.0	0.038	3.98	0.002	0	171	6.1 E-01
	Mrb27	56	3.2	0.034	3.98	0.004	0	1739	8.9 E-01
	(mean):	(51.6)	(3.8)	(0.043)	(4.06)	(0.003)	(0)	(1174)	(4.8 E-01)
BAR ^S	Msb1	453	20.4	0.059	5.18	0.009	0	7674	2.1 E-01
	Msb2	599	27.0	0.058	5.18	0.007	0	10512	7.8 E-01
	(mean):	(526)	(23.7)	(0.058)	(5.18)	(0.008)	(0)	(9093)	(4.9 E-01)

μ_m = maximum specific growth rate, X_{max} = maximum biomass, m = substrate required for cell maintenance, β = constant of proportionality for a batch process, α = constant of proportionality for a batch process.

Both sensitive mutants (Msb1 and Msb2) produced more rifamycin than the parental strain (M18) and consumed similar amounts of glucose.

Table 3 gives a comparison in specific production ($Y_{P/X}$), of the different strains. The resistant mutants to barbital (BAR^R) reduced their $Y_{P/X}$ mean value (50 mg/g) to less than half of the $Y_{P/X}$ value (315 mg/g) of the parental strain, and 10 times less than sensitive mutants (525 mg/g). Also the mean $Y_{P/X}$ value for the two BAR^S mutants was 67% higher than the $Y_{P/X}$ of the parental strain. The values of substrate yields ($Y_{P/S}$) changed in a similar way to $Y_{P/X}$. They were the lowest (3.8 mg/g) for BAR^R strains, the highest (47 mg/g) for BAR^S strains

and intermediate for the parental strain.

Biomass production measured as $Y_{X/S}$ was very similar for all strains except for Mrb11, although BAR^R strains had slightly higher mean value (0.09 mg/g) than the parental strain (0.04 mg/g).

BAR^R strains had lower substrate yields ($Y_{P/S}$) and very low productivity ($Y_{P/X}$). Whereas, sensitive mutants nearly doubled the $Y_{P/X}$ and $Y_{P/S}$ values as compared to the parental M18 strain.

The specific growth rate (μ) of BAR^S strains was slightly higher than μ of the parental strain. This is a very good trait, because these strains had similar production times than the parental strain.

Biomass level (X_{max}) was higher for BAR^S strains and lower for BAR^R strains than the parental strain. This observation is in agreement with the pattern of μ values mentioned above.

Finally, it is important to mention that the concentration of rifamycin W and V (indicators of the more than 20 rifamycins) produced by the mutants or the parental strain was very low (5 $\mu\text{g/ml}$ or less), practically undetectable by the analytic method used (HPLC).

Production curves were followed by the Model described in Materials and Methods. In all cases β value was approximately zero and α coefficient positive. This corresponds to production model closely associated to bacterial growth. Mean α coefficient of BAR^S strains (9,035 $\text{mg h}^{-1} \text{l}^{-1}$) was clearly higher than α coefficient of BAR^R strains (1,174 $\text{mg h}^{-1} \text{l}^{-1}$) and also higher than the parental strain (5,941 $\text{mg h}^{-1} \text{l}^{-1}$).

These experiments were done in a medium without insoluble solids, because we were interested in specific antibiotic production. However, it is interesting to note that the mutant Msb2 was able to produce up to 6 mg/ml of rifamycin B when in an industrial type medium (unpublished results).

Discussion

As mentioned in the Introduction, barbital at sublethal concentrations has a positive effect on rifamycin B biosynthesis. In addition, the presence of high concentrations of this compound has a toxic effect on the growth of *A. mediterranei*, which was demonstrated by MARGALITH and PAGANI⁵ in 1961. However, the relationship between barbital sensitivity and high rifamycin production had not been studied previously.

Our results show that all (30) the isolated barbital-resistant mutants produced less rifamycin than the parental strain. On the other hand, the two sensitive mutants isolated showed an important increase in rifamycin B production (around 200%). This suggests that there is a relationship between the sensitivity to barbital and the overproduction of rifamycin B. This idea is further supported by the fact that the parental strain (M18) and the type strain (ATCC 13685) showed the same pattern: the M18 strain was more sensitive to barbital and higher rifamycin B producer (1200 $\mu\text{g/ml}$) than the type strain (350 $\mu\text{g/ml}$).

Another interesting finding was the observation that the specific growth rate of sensitive mutants was greater than the parental strain in fermentation (Bennet) medium. This was an unexpected result, but when we compared M18 against the type strain, the growth of

M18 was greater. In other words, the higher producing strains were more sensitive to barbital and they grew faster in the fermentation medium.

With respect to the selection of sensitive mutants, the classical enrichment methods involve the use of penicillin or successive filtering. However, these techniques were not available for this organism. This was mainly due to the fact that *A. mediterranei* is resistant to penicillins and these strains do not produce spores. These characteristics of the organism pose a problem when we wanted to isolate a recessive mutant. The random selection has been the only technique available so far and it is a very long procedure.

Our results indicate that barbital does not provoke the death of mycelium when it is incubated for 96 hours. This means that barbital can be used in the enrichment technique. On the other hand, the older mycelium (72 hours) is resistant to lysozyme activity. With these data, we developed an enrichment technique. This is based on the hypothesis that sensitive mycelium can not grow in a medium with barbital, and after incubation for 48 hours it will be resistant to lysozyme activity. In accordance with the hypothesis, we isolated two mutants sensitive to barbital. One of these mutants showed 270% greater yield, higher productivity (207%), and was able to produce 230% more rifamycin B than the parental strain. These results show that selection of barbital sensitive mutants is an effective way to improve the production of rifamycin B by *A. mediterranei*.

All these results support the use of BAR^S phenotype as a good selection criterion. This is, to our knowledge, the first time that the selection of BAR^S phenotype is suggested as a practical way to improve production of this antibiotic.

Future work should focus on identifying the genes responsible for barbital sensitivity in order to examine whether barbital sensitivity is related to rifamycin production.

Finally, it is important to mention that barbital gives a marked stimulatory response on production of other secondary metabolites. Addition of 8 mM solution of this compound to the culture medium increased the yield of streptomycin¹⁰ by 29%. Also in a different system, 22 mM barbital stimulated yields of galurubins¹¹ as much as 285%. Therefore, we think it is interesting to isolate sensitive and resistant mutants to barbital of *Streptomyces griseus* and *S. galilaeus*.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México.) for financial support (Grant 2115-30902). Thanks are also due to Dr. SERGIO SÁNCHEZ and Dr. EDGARDO ESCAMILLA for helpful advice.

References

- 1) SENSI, P.; P. MARGALITH & M. T. TIMBAL: Rifomycin, a new antibiotic. Preliminary report. *Farmaco Ed. Sci.* 14: 146~147, 1959
- 2) VIKFY, K., D. M. F. EDWARDS & L. F. ZFRILLI: Liquid chromatographic-mass spectrometric studies on rifamycin antibiotics. *J. Chromatogr.* 474: 317~327, 1989
- 3) LAL, R.; S. LAL, E. GRUND & R. EICHENLAUB: Construction of a hybrid plasmid capable of replication in *Amycolatopsis mediterranei*. *Appl. Env. Microbiol.* 57 (3): 665~671, 1991
- 4) VOHRA, R. M.: Novel assay for screening rifamycin B-producing mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1): 403~404, 1992
- 5) MARGALITH, P. & H. PAGANI: Rifomycin. XIV Production of rifamycin B. *Appl. Microbiol.* 9: 325~333, 1961
- 6) LEE, J. G.; C. Y. CHOI, B. L. SEONG & M. H. HAN: Optimal pH profile in rifamycin B fermentation. *J. Ferment. Technol.* 61 (1): 49~53, 1983
- 7) VOHRA, R. M. & S. DURE: Identification and quantitation of rifamycins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 477 (2): 463~466, 1989
- 8) SCHUPP, T. & M. DIVERS: Protoplast preparation and regeneration in *Nocardia mediterranei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 36: 159~162, 1986
- 9) HOPWOOD, D. A.; M. J. BIBB, K. F. CHATER, T. KJESER, T. BRUTON, C. J. KJESER, H. M. LYDIATE, D. J. SMITH, J. M. WARD & H. SCHREMPF: Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom, 1985
- 10) HEDING, H. & A. K. GURTU: Effect of barbital on the biosynthesis of streptomycin. *J. Antibiot.* 30: 879~880, 1977
- 11) KRÁLOVCOVÁ, E.; M. BLUMAUEROVÁ & Z. VANĚK: The effect of 5,5-diethylbarbituric acid on the biosynthesis of anthracyclines in *Streptomyces galilaeus*. *Folia Microbiol.* 22: 182~185, 1977