

10
2e1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION PARCIAL DE LA ENZIMA
GLUCO-CINASA DE *Streptomyces peucetius* var.
caesius ATCC 27952.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARTINIANA CHOLULA SACRAMENTO



DIRECTOR DE TESIS: DR. GUILLERMO AGUILAR OSORIO.

MEXICO, D. E.



1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

267821



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Caracterización
Parcial de la enzima Gluco-cinasa de Streptomyces peucetius
var. caesius ATCC 27952

realizado por Cholula Sacramento Martiniana

con número de cuenta 8955245-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dr. Guillermo Aguilar Osorio.
Propietario

Propietario Dra. Clara Esquivel Huesca.

Propietario Dra. Diana E. Aguilar León.

Suplente M.en C. María Cristina ~~FACULTAD DE CIENCIAS~~ *Restin Frey S.:*

Suplente Q.F.B. José Luis Silencio Barrita. *J. Meloni B.*

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz
Dra. Edna María Suárez Díaz.

ESTAMENTO
BIOLOGIA

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Guillermo Aguilar Osorio y con el apoyo del proyecto DGAPA IN 204993.

Agradezco a :

Dr. Guillermo Aguilar Osorio

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Por sus valiosos comentarios para la realización de este proyecto.

Gracias al jurado integrado por :

Dr. Guillermo Aguilar Osorio

Dra. Clara Esquivel Huesca

Dra. Diana E. Aguilar León

M. en C. María Cristina Trejo Solís

Q.F.B. José Luis Silencio Barrita

Por su evaluación rápida de este trabajo y por todos sus comentarios.

Dedico este trabajo :

A mi Madre.

Por su mejor ejemplo, comprensión y apoyo.

A mi hermana.

Por su gran apoyo en todos los aspectos.

A mi cuñado, sus papás y mis sobrinos.

Con cariño.

Para Alejandro

Por las palabras alentadoras en los momentos difíciles.

Agradecimientos

Con mi mayor gratitud al Dr. Guillermo Aguilar y a Blanca por la paciencia y comentarios en la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Sergio Sánchez Esquivel por su gran apoyo brindado en este trabajo.

Gracias a mis compañeros y amigos. Luis, Blanca Rosa, Norma, Berenice, Leonardo, Marco Antonio, Pablo, Idalia, Rosy., Kenia, Angélica, Irma, Gaby, Gonzalo, Lourdes J., Tere, Miriam, Juanita, Andrómeda, Ileana, Raquel, y en especial Alette Ortega por su amistad y colaboración en el trabajo.

Agradezco muchísimo a la Dra. Amelia Farrés y alumnos por el gran apoyo brindado en la realización de este trabajo.

Agradezco al ingeniero Abel Blancas por el apoyo durante la fermentación en la planta piloto en Biomédicas.

Gracias a la Profra. Ma. Eve Uribe por su impulso y motivación

Gracias al Lic. Pablo Marentes por todos sus consejos y amistad durante todo mi trayecto como estudiante.

Gracias al Pintor Domingo Block y Manuela por sus consejos y amistad.

Gracias a mi prima Paula y familia por la hospitalidad y apoyo que me brindaron.

ABREVIATURAS

AMPC	Monofosfato de adenosina cíclico (1)
ATP	Trifosfato de adenosina (1)
G6P	Glucosa-6-Fosfato
G-6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (forma oxidada) (1)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (forma reducida) (1)
PBS	Amortiguador de fosfatos salino (1)
PTS	Sistema Fosfotransferasa (1)
PEP	Fosfoenolpiruvato (1)
Tris	(Hidroximetil) aminometano
YMG	Extracto de malta, extracto de levadura y glucosa (1)
Khz	Kilohertz o kilociclos
M	Mol
mM	milimolar
N	Normal
ml	mililitro
nm	nanómetro

(1) por sus siglas en inglés

CONTENIDO

Resumen.....	1
INTRODUCCION	2
Características de los actinomycetos.....	6
Importancia de estos microorganismos.....	8
Represión catabólica por glucosa.....	12
Antecedentes de la represión catabólica en <i>Streptomyces</i> y su diferencia con otros organismos.....	14
Enzimas cinasas.....	16
Importancia fisiológica de la gluco-cinasa.....	18
Transporte de glucosa.....	20
OBJETIVOS.....	22
Estrategia de trabajo.....	23
MATERIALES Y METODOS	
Microorganismo	24
Medios y condiciones de cultivo.....	24
Métodos analíticos.....	25
Rompimiento celular.....	26
Actividad de la gluco-cinasa de <i>S. peucetius</i>	27
Precipitación de la enzima con sulfato de amonio... ..	29
Caracterización de la gluco-cinasa.	
Cinética de Michaelis-Mente.....	30
Estabilidad a la temperatura y pH.....	30
Temperatura y pH óptimos.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Cinética de crecimiento y producción de la gluco-cinasa de <i>Streptomyces</i> <i>peucetius</i>	32
Caracterización enzimática de la gluco-cinasa	
Estabilidad al pH y la temperatura.....	42
Temperatura óptima.....	44
pH óptimo	44
Cinética Michaelis-Menten.	46
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFIA.....	52

RESUMEN

La cepa de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* ATCC 27952 es un microorganismo productor de antibióticos. Se ha reportado, que la represión catabólica por glucosa afecta negativamente la síntesis de antraciclinas y se ha propuesto que la gluco-cinasa esta involucrada en este tipo de represión. Esta enzima es constitutiva y tiene la función de transferir un grupo fosfato a la glucosa en la vía de la glucólisis.

Por lo que se consideró importante establecer las condiciones para la caracterización de la gluco-cinasa de *Streptomyces peucetius*, con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas para una futura purificación.

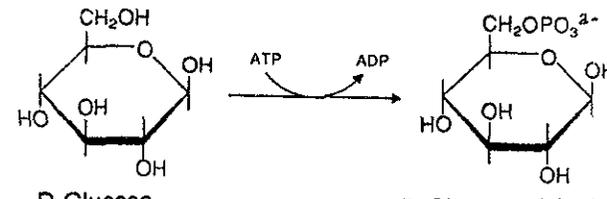
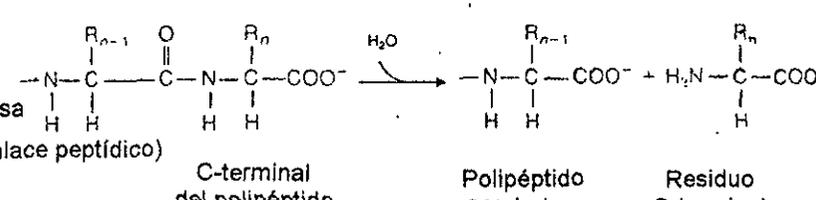
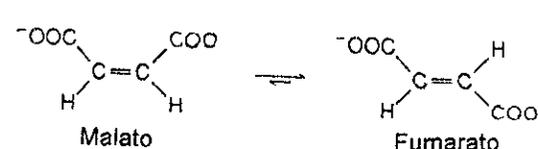
Se determinó el efecto sobre el crecimiento del microorganismo en las concentraciones 0.4, 1.0 y 2.0% de glucosa. No hubo variación en el crecimiento en las tres concentraciones, pero la actividad en 0.4% fue entre 15 a 20 % menos que en las de 1 y 2 %. Para la caracterización parcial se llevó a cabo una fermentación de 10 litros con 1 0% de glucosa. Con el rompimiento del micelio por molienda con hielo seco y acetona condujo a una mayor liberación de proteína y mejor actividad de la gluco-cinasa que por sonicación. Para la concentración de la enzima se precipitó con sulfato de amonio al 80% de saturación, en el cual, se obtuvo un rendimiento de 92% de actividad de la enzima y un 55.5% de la proteína recuperada con respecto al extracto enzimático sin precipitar. Al extracto enzimático concentrado se le determinó el pH óptimo, y fue de 7.5 en fosfatos y en Tris-malato. La temperatura óptima de la gluco-cinasa fue de 50°C. Se observó que la enzima es estable en un intervalo de pH 6.5 a 7.5 durante 24 h a 0°C. La mayor estabilidad térmica fue a 40°C., valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ fueron 8.43 mM y 4353.5 $\mu\text{mol/ml/min}$, respectivamente.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son compuestos orgánicos de naturaleza proteica que actúan como catalizadores de todas las reacciones químicas que se llevan a cabo en los seres vivos. Las enzimas tienen la peculiaridad de ser muy específicas en su acción, y actuar sobre una reacción en particular, además, requieren temperatura, pH y presión moderados.

En su hábitat natural, las células microbianas se enfrentan a una diversidad de fuentes potenciales de energía. La supervivencia de una especie en este ambiente competitivo, ha sido posible gracias a la gran capacidad para adaptarse a su medio (Joklik et al., 1991). Los microorganismos producen la maquinaria enzimática para la degradación de una amplia gama de compuestos orgánicos. La síntesis de esta maquinaria enzimática se encuentra regulada por mecanismos que responden directa e indirectamente al medio ambiente. Uno de ellos es la inducción enzimática, por este mecanismo la síntesis de algunas enzimas, requieren de la presencia de un sustrato específico para que sea degradado (Robertis y Robertis, 1989). Otro mecanismo de control, es la represión catabólica, en este, la síntesis enzimática se suspende cuando se le ofrece al organismo energía fácilmente catabolizable, por ejemplo, glucosa. La represión catabólica involucra a la molécula monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), que estimula la síntesis de un gran número de enzimas y que es necesaria para la síntesis de ARN mensajero, esto se ha observado en *Escherichia coli* (*E. coli*) (Lehninger, 1985). En el género *Streptomyces*, este mecanismo no responde a cambios de concentración del AMPc, y se ha propuesto que probablemente la enzima gluco-cinasa participe en la represión catabólica (Hodgson, 1980).

Tabla 1. Clasificación de las enzimas con ejemplos de cada grupo.

Clases	Tipo reacción	Reacción catalizada
1.- OXIDOREDUCTASAS	Alcohol deshidrogenasa (Oxidación con NAD)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \xrightarrow{\text{NAD}^+} \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{H} + \text{NADH} + \text{H}^+$ <p style="text-align: center;">Etanol Acetaldehido</p>
2.- TRANSFERASAS	Glucocinasa (Fosforilación)	 <p style="text-align: center;">D-Glucosa D-Glucosa-6-fosfato</p>
3.- HIDROLASAS	Carboxipeptidasa (Rompimiento en el enlace peptídico)	 <p style="text-align: center;">C-terminal del polipéptido Polipéptido acortado Residuo C-terminal</p>
4.- LIASAS	Piruvato descarboxidasa (Descarboxilación)	$\text{OOC}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_3 + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_3$ <p style="text-align: center;">Piruvato Acetaldehido</p>
5.- ISOMERASAS	Maleato isomerasa (Cis-Trans Isomerización)	 <p style="text-align: center;">Malato Fumarato</p>
6.-LIGASAS	Piruvato carboxilasa (Carboxilación)	$\text{OOC}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_3 + \text{CO}_2 \xrightarrow{\text{ATP}} \text{OOC}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{COO}^- + \text{ADP} + \text{P}_i$ <p style="text-align: center;">Piruvato Oxaloacetato</p>

Fuente: Mathews and Van Holde, 1990.

Tabla 2. Masa molecular y composición oligomérica de algunas cinasas

Enzima	Origen	Composición Oligomérica	Masa molecular (KDa)
Hexocinasa	Tejido de mamífero	Monómero	100
Gluco-cinasa	Hígado de mamífero	Monómero	50
Gluco-cinasa	<i>Zimomonas móbilis</i> Bacteria, Gram negativa	Dimérica	66
Fructo-cinasa	<i>Zimomonas mobilis</i>	Dimérica	66
Fosfofructo-cinasa PEK	Músculo de conejo	Tetrámero	40
Fosfoglicerato-cinasa PGK	Músculo de conejo	Monómero	64
Piruvato-cinasa	Músculo de conejo	Tetrámero	57
3-Deshidrocinaasa	<i>Streptomyces coelicolor</i> (S. <i>coelicolor</i>)	Multimérica	16-18
PEP Carboxi-cinasa	Hígado mamífero	Monómero	70
3-Deshidro-cinasa	<i>E. coli</i>	Dimérica	27

Fuente: Voet, 1992; Scopes, 1985; White, 1990 y Horton, 1993.

CARACTERÍSTICAS DE LOS ACTINOMICETOS

Los actinomicetos son bacterias miceliales o filamentosas y ramificadas. Sus hifas son de diámetro inferior que aquellos que están dentro del reino *fungi*, y están distribuidos ampliamente en la naturaleza. Se encuentran principalmente en el suelo, en donde actúan en la descomposición de la materia orgánica. Otra de las características de los actinomicetos, es que algunos pueden formar micelio dentro del sustrato o solamente aéreo y otros formar micelio tanto en el sustrato como aéreo.

Los actinomicetos eran agrupados por los bacteriólogos como bacterias y los micólogos los consideraban dentro del reino *fungi*, pero en la actualidad los han agrupado como bacterias gram positivas, no tienen núcleo, la mayoría son sensibles a la lisozima, a pH ácido y a los agentes antibacterianos a similitud con las bacterias flageladas (Sykes and Skinner, 1973).

Las características del género *Streptomyces*.

Los estreptomycetos son bacterias gram positivas, aerobias y tienen un crecimiento filamentosos. El diámetro de la hifa es de 0.7μ a 0.8μ , algunos tienen las hifas cortas, con poca o mucha ramificación. Estos microorganismos se reproducen por medio de esporas o por fragmentos del micelio. Las esporas o conidias se forman de hifas especiales del micelio aéreo que se comportan como esporas o esporóforos; que pueden tener forma monopodial, de ramillete o verticilios.

Las hifas que presentan la esporulación pueden ser rectas o curvas, el intervalo de la curvatura va de simples ondulaciones a espirales perfectos; el cual puede ser compacto, conglomerado, largo o abierto. Las esporas pueden ser planas, verrugosas, espinosas, o afelpadas. El crecimiento de *Streptomyces* puede ser en forma de manchas o círculos concéntricos y el micelio aéreo puede estar

fuertemente pigmentado dependiendo de las especies y de la composición del medio en placa (Waksman, 1961) así como se muestra en la (fig. 2)

Los microorganismos del género *Streptomyces* tienen 3 papeles importantes en el suelo:

1.-Descomposición de la materia orgánica.

2.-Su efecto en la estructura, es decir, una partículas de arcilla por medio de las hifas, esto hace que el suelo sea granular, por lo que conduce a cosechas más productivas.

3.- Le dan olor al suelo, debido a la gran producción de sustancias volátiles.

Tales organismos parecen ser comunes, en suelos áridos de las regiones más cálidas del mundo. La mayoría de estos microorganismos no son patógenos, solo algunas especies contaminan algunas plantas y productos de animales, por ejemplo *Streptomyces scabies* es patógeno de la papa y otros más han sido aislados de infecciones de animales y humanos. Pero estos parecen ser más oportunistas que patógenos (Sykes and Skinner, 1973).

Otra característica de estos microorganismos es que son nutricionalmente versátiles, ya que pueden utilizar una amplia variedad de compuestos orgánicos solubles como fuentes de carbono y energía. También son capaces de utilizar polímeros muy complejos como látex, quitina, lignocelulosa y péptido glucano (Stainer, *et al* 1986).

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Streptomyces* incluye dos fases diferentes: crecimiento del micelio (estado vegetativo) y la esporulación (fig. 2).

La germinación de las pequeñas esporas inmóviles bacilares u ovaladas dan lugar a un crecimiento miceliar, produciendo cada una de las esporas de 1 a 4 hifas separadas de 0.5 a 1 μ m de diámetro. El alargamiento y ramificación de las hifas del micelio hace que la colonia sea firme, compacta, lisa y húmeda. Este

micelio va a estar dentro del sustrato. Después surge el micelio aéreo más laxo sobre la superficie de la colonia y las hifas están rodeadas de una capa adicional de pared llamada vaina Fig. 3 (Stanier, 1986).

IMPORTANCIA DE ESTOS MICROORGANISMOS

Estos microorganismos pasan por diferentes estadios morfológicamente diferentes. Cuando los microorganismos entran en la fase estacionaria, comienzan a producir una gran variedad de metabolitos secundarios de un gran espectro de actividades biológicas, como son: antibióticos, inmunosupresores e insecticidas, lo cual hace que estos organismos sean interesantes para la industria y la ciencia (Kwakman and Postma, 1994). Estos organismos se distinguen por la síntesis de numerosos antibióticos ya que producen el 60% de los 600 antibióticos conocidos, además de enzimas extracelulares como celulasas, xilanasas, ligninasas, amilasas, lipasas, y nucleasas. También producen una gran variedad de pigmentos de rojo a azul, de naranja a amarillo y de pardo a negro. Por ejemplo *S. coelicolor* produce dos pigmentos, la undecilprodigiosina acumulado durante la fase de crecimiento exponencial y la actinorrodina que se acumula durante la fase estacionaria de crecimiento (Glyn, 1990).

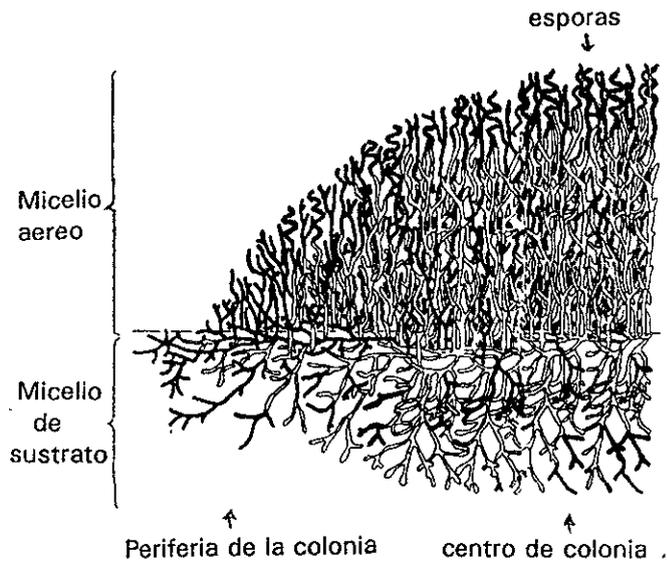


Fig. 2. Sección transversal de una colonia de actinomiceto *Streptomyces coelicolor* (Wildermuth, 1970).

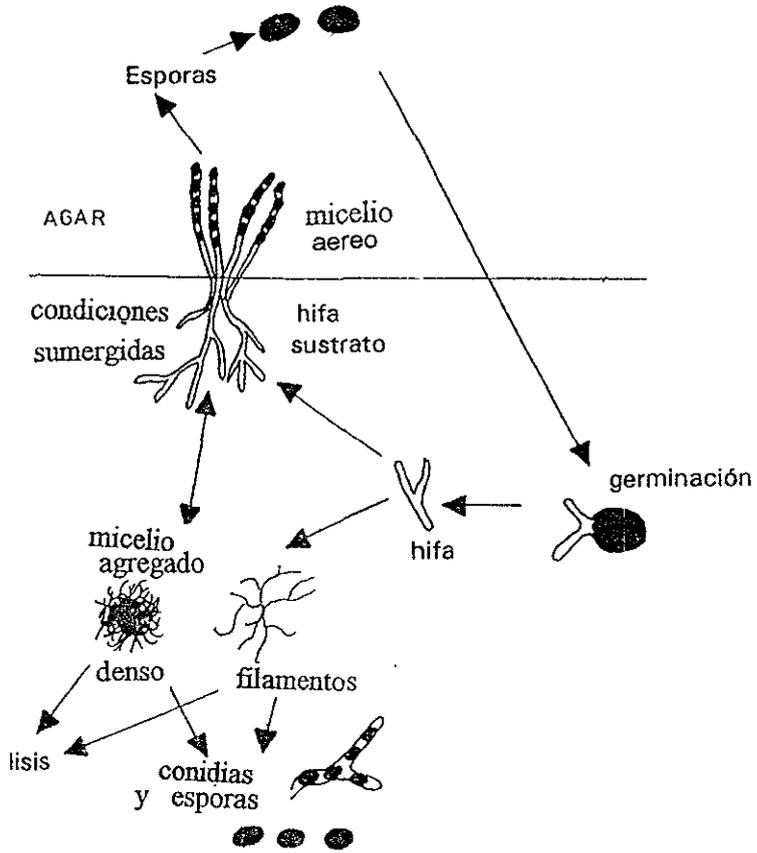


Fig. 3 Ciclo de vida de *Streptomyces* sp (Shapiro, 1989).

Las daunorrubicina y doxorubicina son importantes comercialmente como antibióticos, porque principalmente afectan a las bacterias gram positivas y sólo en algunos casos a gram negativas (Vanek et al 1977). La daunorrubicina fue aislada en 1963 de *Streptomyces peucetius* (*S. peucetius*), y la doxorubicina fue aislada en 1969 también de *S. peucetius*. Estos dos antibióticos se consideran como las mejores antraciclinas usados clínicamente en los E.U. para el tratamiento de neoplasias.

Se ha observado que algunos metabolitos secundarios se reprimen cuando la glucosa es la fuente de carbono (Shapiro, 1989) Tabla 3.

Tabla 3. Algunos metabolitos secundarios producidos por el género *Streptomyces* y algunos metabolitos reprimidos por glucosa.

Microorganismo	Metabolito (antibiótico y pigmento)	Metabolito secundario reprimido por glucosa.
<i>S. peucetius</i>	daunorrubicina y doxorubicina pigmento actinorrodina	adriamicina
<i>S. coelicolor</i>	metilenomicina actinorrodina undecilprodigiosina	
<i>S. ambofaciens</i>	espiramicina	
<i>S. antibioticus</i>	actinomicina	actinomicina
<i>S. lavendulae</i>	estreptoricina	clortetraciclina
<i>S. aureofaciens</i>	aureomicina	
<i>S. venezuelae</i>	cloranfenicol	

Fuente: Shapiro, 1989.

REPRESIÓN CATABÓLICA POR GLUCOSA

Durante las tres décadas pasadas, la investigación en el género *Streptomyces* se enfocó en la producción de metabolitos secundarios y su biosíntesis, pero en la actualidad se tiene un gran interés sobre la represión catabólica, que se puede definir como un fenómeno natural, en la cual hay una represión de la actividad enzimática por la presencia de un catabolito en el medio (Kwakman and Postma, 1994).

La regulación catabólica por carbono representa un fenómeno ampliamente distribuido en los sistemas microbianos, que resulta de la utilización organizada y secuencial de las fuentes de carbono presentes en el medio de crecimiento. Dentro de los compuestos que se conocen más efectivos para ejercer esta forma de control, se encuentra la D-glucosa. Este hidrato de carbono se usa eficientemente para el crecimiento de los microorganismos y además puede, prevenir la utilización simultánea de una segunda fuente de carbono. Por lo tanto la regulación de la fuente de carbono responde en general a un fenómeno de represión. Por ejemplo, se han hecho estudios en *E. coli*, que cuando en el medio existe lactosa y no hay glucosa, el inductor se une al represor y este se libera del operador, permitiendo la transcripción de los genes *lac* y la síntesis de las proteínas que degradan lactosa (*lac*). Cuando en el medio están presentes, simultáneamente, la glucosa y la lactosa, *E. coli* solo utiliza a la glucosa, y la lactosa permanece inalterada; es decir, las células no sintetizan más proteínas *lac*, entonces a la represión de estas proteínas por parte de la glucosa se le llama represión por catabolito.

También se ha observado en *E. coli*, que el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) se utiliza como mensajero para indicar si hay o no glucosa disponible como combustible celular. Las células de *E. coli* contienen la enzima adenilato ciclasa que produce AMPc a partir del ATP. Cuando la concentración de glucosa es elevada y adecuada para las necesidades de la célula, la concentración intracelular del AMPc es muy baja. Por el contrario, cuando la concentración de

la glucosa disminuye, el nivel del AMPc aumenta debido al incremento de la actividad de la adenilato ciclasa y al descenso de la actividad de la fofodiesterasa. Así el AMPc formado se une a la proteína activadora de catabolito (CAP) dando lugar al complejo CAP-AMPc y este se enlaza a su vez, al centro CAP del promotor. Sólo cuando el centro CAP está ocupado, de este modo, puede unirse RNA polimerasa al centro de iniciación y así iniciar la transcripción de los genes lac en mRNA (fig. 4).

Represión catabólica

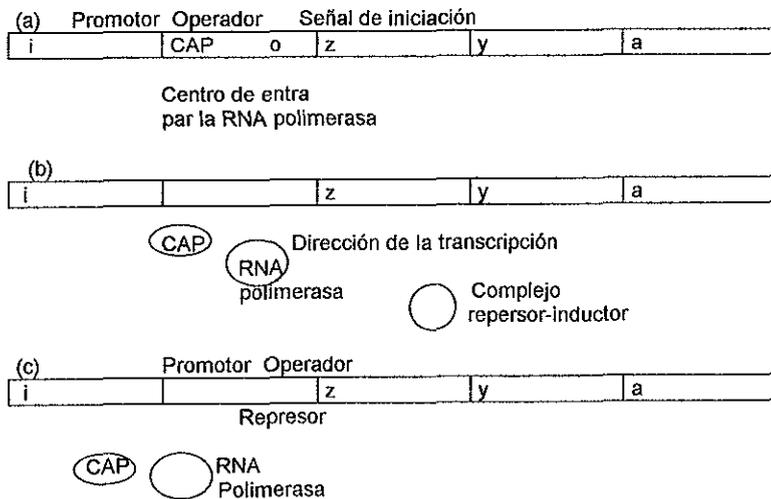


Fig.4. a) Regiones de control del operón lac. El centro CAP (proteína activadora del catabolito) presente en el promotor puede unir al complejo CAP-AMPcíclico, pero no a la molécula CAP libre. La RNA polimerasa sólo puede unirse en su centro de entrada cuando el CAP está ocupado. El represor sólo puede enlazarse al operador en ausencia del inductor.

b) Los genes del operón lac cuando las células disponen de lactosa y no hay glucosa.
 c) Cuando hay glucosa en el medio no se produce AMPc, la proteína CAP es incapaz de unirse al operador. La RNA polimerasa no se puede unir por tanto los genes lac no son transcritos (Lehninger, 1985)

ANTECEDENTES DE LA REPRESIÓN CATABÓLICA EN *Streptomyces* Y SU DIFERENCIA CON OTROS ORGANISMOS

El mecanismo responsable de la represión catabólica es muy complejo y varía dependiendo del sistema biológico, por ejemplo: en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la represión por glucosa involucra varios activadores transcripcionales y represores. Se ha propuesto en esta levadura un mecanismo de fosforilación en cascada con la participación de hexocinasa pII como enzima clave para iniciar la reacción (Trumbly, 1992). En otros organismos como *E. coli* que se ha descrito anteriormente, su sistema de regulación catabólica es diferente al de *Bacillus subtilis* (Gram positiva), aunque también presenta el sistema fosfotransferasa (PTS), pero no se ha podido detectar el AMPc (Setlow, 1973), por lo que es poco probable que esta molécula participe en el fenómeno. Además de regular la utilización de fuentes de carbono, la represión catabólica ha sido también observada como una forma de control en la síntesis de metabolitos secundarios (Doull, and Vining, 1990). Por ejemplo, los metabolitos sensibles a esta forma de regulación son. los pigmentos microbianos, toxinas y antibióticos (tabla 3).

Este fenómeno también se ha estudiado en el género *Streptomyces* y se ha observado que la glucosa afecta la expresión de genes involucrados en la utilización de fuentes de carbono (Delic, *et al.* 1992), (Robbins, *et al.* 1992) e inclusive se han seleccionado mutantes insensibles a esta acción (Sánchez and Quinto, 1975), (Hodgson, 1982).

El mecanismo de regulación por glucosa, por lo que se sabe en el género *Streptomyces* no posee el sistema PTS, antes mencionado para *E. coli* y *B. subtilis* (Dijkhuizen, 1992) y además, se ha observado que los niveles de AMPc, no varían con respuesta a los cambios en la fuente de carbono del medio (Hodgson, 1980). Sin embargo, desde hace algunos años, se ha sugerido la participación de la enzima gluco-cinasa como la responsable de esta acción, ya

que mutantes insensibles al efecto presentaron dicha actividad alterada (Hodgson, 1982).

Como se sabe, la gluco-cinasa es la responsable de la fosforilación de la glucosa (primera reacción de la glucólisis). De tal manera que su alteración en las mutantes resultaría en una disminución de los niveles intracelulares de la glucosa-6-fosfato. Por lo tanto no podría llevarse a cabo el fenómeno de represión (Angell, *et al.* 1992).

En esta misma línea experimental, pero trabajando el modelo biológico, a *S. peucetius var. caesius*. Se ha establecido que la D-glucosa previene la utilización de las fuentes de carbono como la lactosa y glicerol, además, reprime la síntesis de un metabolito secundario (adriamicina). Así mismo, se aisló mutantes, y se observó que la mayoría poseía poca o nula actividad de la gluco-cinasa en tales mutantes, capaces de utilizar diversas fuentes de carbono en la presencia de glucosa. Al determinar la actividad de la gluco-cinasa en tales mutantes, se observó que la mayor parte de las mismas posee poca o nula actividad en la enzima, resultados que coinciden con los estudios de Hodgson, 1982.

Por lo tanto la ausencia de variación en los niveles de concentración del AMPc con respecto a los cambios de fuentes de carbono en *Streptomyces* es diferente de *E. coli* (Sier, 1991).

Las proteínas envueltas en la fosforilación de la glucosa son frecuentemente regulados de ciertas fuentes de carbono (Kwakman and Postma 1994). La glucosa reprime la expresión de muchos genes envueltos en la utilización alternativa de fuentes de carbono por *S. coelicolor* y la deficiencia del sistema fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP) en *Streptomyces violacearuber* (Sabater *et al* 1972) y en *Streptomyces aureofaciens* (Novotha and Hostalek, 1985) .

Por lo tanto, los estudios que se han realizado con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y algunas gram negativas *E coli*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Salmonella*

y gram positivas, *Bacillus subtilis* y *S. coelicolor*. Ellos parecen tener mecanismo diferente de represión por glucosa que en *S. coelicolor*. Por lo que la glucocinasa es responsable de la fosforilación de la glucosa, parece jugar un papel central en la represión de glucosa ambos a nivel de transcripción y a nivel de inducción exclusión (Kwakman and Postma, 1994).

ENZIMAS CINASAS

Una cinasa es una enzima que transfiere grupos fosfatos entre el ATP y un metabolito que actúa como aceptor de un grupo fosfato, en una cinasa determinada viene identificado por el prefijo del nombre de la cinasa como se observa en la (Tabla 2). La hexocinasa es una enzima inespecífica que se encuentra en todas las células y cataliza la fosforilación de hexosas, como la D-glucosa y la D-fructosa. La gluco-cinasa la encontramos en procariontes y animales, en éstos últimos está en células del hígado que cataliza una misma reacción aunque de forma específica para la glucosa e interviene en el mantenimiento de los niveles de glucosa en la sangre, como un segundo sustrato, que es un requerimiento esencial para la actividad enzimática, y éste es el complejo Mg^{+2} -ATP, inclusive el ATP libre es un potente inhibidor competitivo de la hexocinasa.

Cinética y mecanismo de la reacción de la hexocinasa.

La hexocinasa posee un mecanismo al azar, en el que la enzima forma un complejo ternario con la glucosa y el Mg^{+2} -ATP antes de que tenga reacción el Mg^{+2} , al formar el complejo con los átomos de oxígeno del grupo fosfato, se cree que esconde sus cargas negativas, haciendo así más accesible el átomo de

fosfato, al ataque nucleofílico del carbono (6) OH de la glucosa así como se muestra en la (fig. 5).

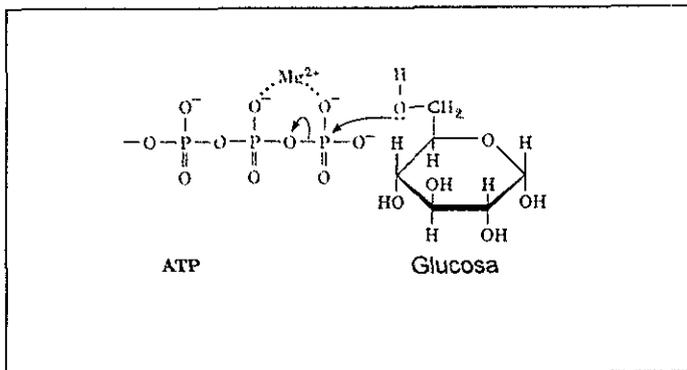


Fig. 5. El ataque nucleofílico del grupo C (6)-OH de la glucosa sobre el fosfato y de un complejo Mg^{2+} -ATP. La posición de ion Mg^{2+} favorece la función de esconder grupos cargados negativamente del ATP (Voet and Voet, 1990).

IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE LA GLUCO-CINASA.

La vía de la glucólisis es la vía metabólica por la que la mayoría de las formas de vida degradan la glucosa a dos moléculas de piruvato con la producción neta de dos ATPs.

La glucosa entra en la mayoría de las células a través de un transportador específico que la translada del exterior de la célula hasta el citosol; las enzimas de la glucólisis están situados en el citosol, donde están poco o nada asociados a las estructuras celulares como las membranas y, al parecer, no forman complejos organizados entre sí.

Estrategia de la glucólisis

1.- La adición de grupos fosfatos a la glucosa, a través de catalizadores como las cinasas.

2.-La conversión química de los intermediarios fosforilados a compuestos con potencial de transferencia de grupo fosfato elevado.

3.-Acoplamiento químico de la hidrólisis subsiguiente de las sustancias reactivas en la síntesis de ATP.

La glucólisis presenta 10 reacciones enzimáticas, al principio consume ATP para sintetizar compuestos fosforilos en las reacciones 1 y 3 pero en las reacciones 7 y 10 se regeneran (fig.6).

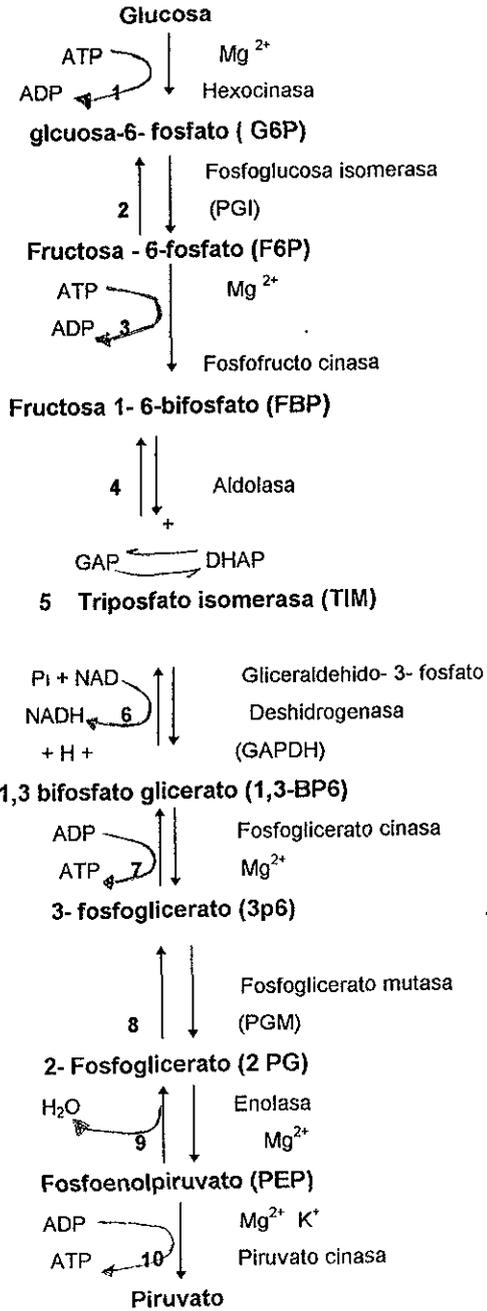


Fig 6. Vía de la glucólisis (Voet, 1990).

TRANSPORTE DE GLUCOSA

La traslocación de grupo es una variación del transporte activo impulsado por el ATP, que usan las bacterias gram-negativas para importar determinados azúcares; difiere del transporte activo en que las moléculas transportadas son, al mismo tiempo, modificadas químicamente. Uno de estos ejemplos, que es muy estudiado es el sistema fosfotransferasa (PTS) dependiente del fosfoenolpiruvato (PEP) de *E. coli*, descubierto por Saul Roseman en 1964. En donde el PEP es un dador de fosfato de alta energía para la síntesis de ATP en la reacción de la piruvato-cinasa de la glucólisis.

EL PTS transporta y fosforila azúcares, simultáneamente. Puesto que la membrana celular es impermeable a los azúcares-fosfato, una vez que han entrado en la célula, permanecen allí. El sistema PTS está constituido por dos proteínas citoplasmáticas, la enzima E1 y Hpr, éstas participan en el transporte de dos azúcares y otras dos proteínas que son específicas para los azúcares que se muestran en la (fig. 7). De este modo, el transporte de la glucosa es impulsado a través de la fosforilación exergónica indirecta por medio del PEP. El sistema PTS es eficiente desde el punto de vista energético, ya que sólo se requiere un equivalente de ATP para el transporte y la fosforilación. Cuando las etapas del transporte activo y la fosforilación de glucosa se dan por separado como ocurre en muchas células, se hidrolizan dos ATPs por glucosa procesada.

El transporte de azúcar en bacterias esta regulado genéticamente

El sistema PTS es más complejo que los otros sistemas de transporte, probablemente porque es parte de un complicado sistema regulador, que gobierna el transporte de azúcares. Cuando algunos de los azúcares transportados por el sistema del PTS se encuentra en abundancia, el transporte activo de los azúcares que entran a la célula a través de otros sistemas de

transporte se inhibe. Esta inhibición es llamada represión por catabolito, y está mediada por la concentración de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Este factor activa la transcripción de los genes que codifican para varias proteínas de transporte de azúcar. La presencia de la glucosa da lugar a una disminución en la concentración del AMPc, que a su vez, reprime la síntesis de estas proteínas de transporte de azúcar.

El mecanismo de control de la concentración del AMPc se cree que reside en E III *glc*. Pero en ausencia de glucosa, esta enzima se acumula en su forma fosforilada. Se cree que E III *glc* ~ P activa la adenilato ciclasa provocando elevadas concentraciones de AMPc. Cuando la glucosa es abundante, la concentración de la E III *glc* ~ P en el estado estacionario disminuye, al formarse la glucosa 6 - fosfato (G-6-P) durante el proceso de transporte mediante el PTS (fig. 7).

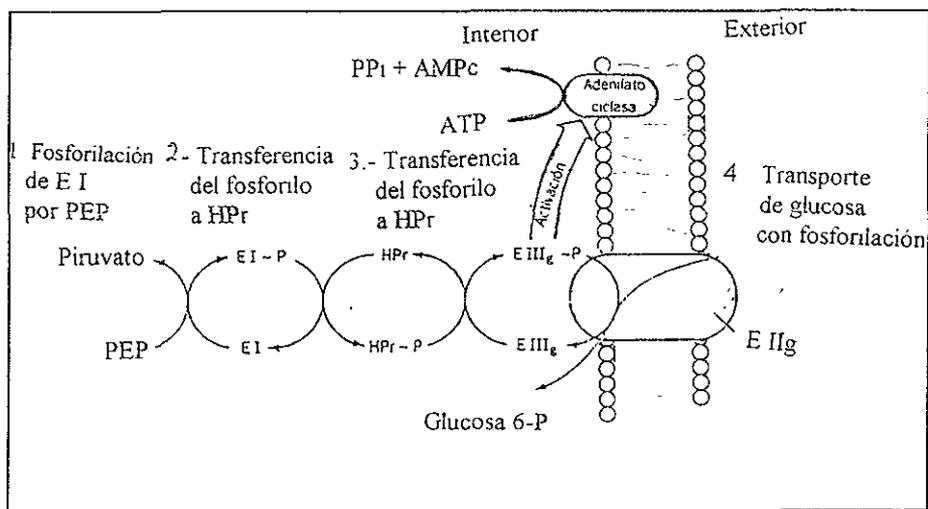


Fig.7. Transporte de glucosa mediante el sistema fosfotransferasa dependiente de PEP (PTS) y E I son proteínas citoplasmáticas comunes para todos los azúcares transportados. Las E IIg y E III g son proteínas específicas para la glucosa. La adenilato ciclasa es activa en presencia de E III g ~ P (Voet and Voet, 1990).

OBJETIVOS

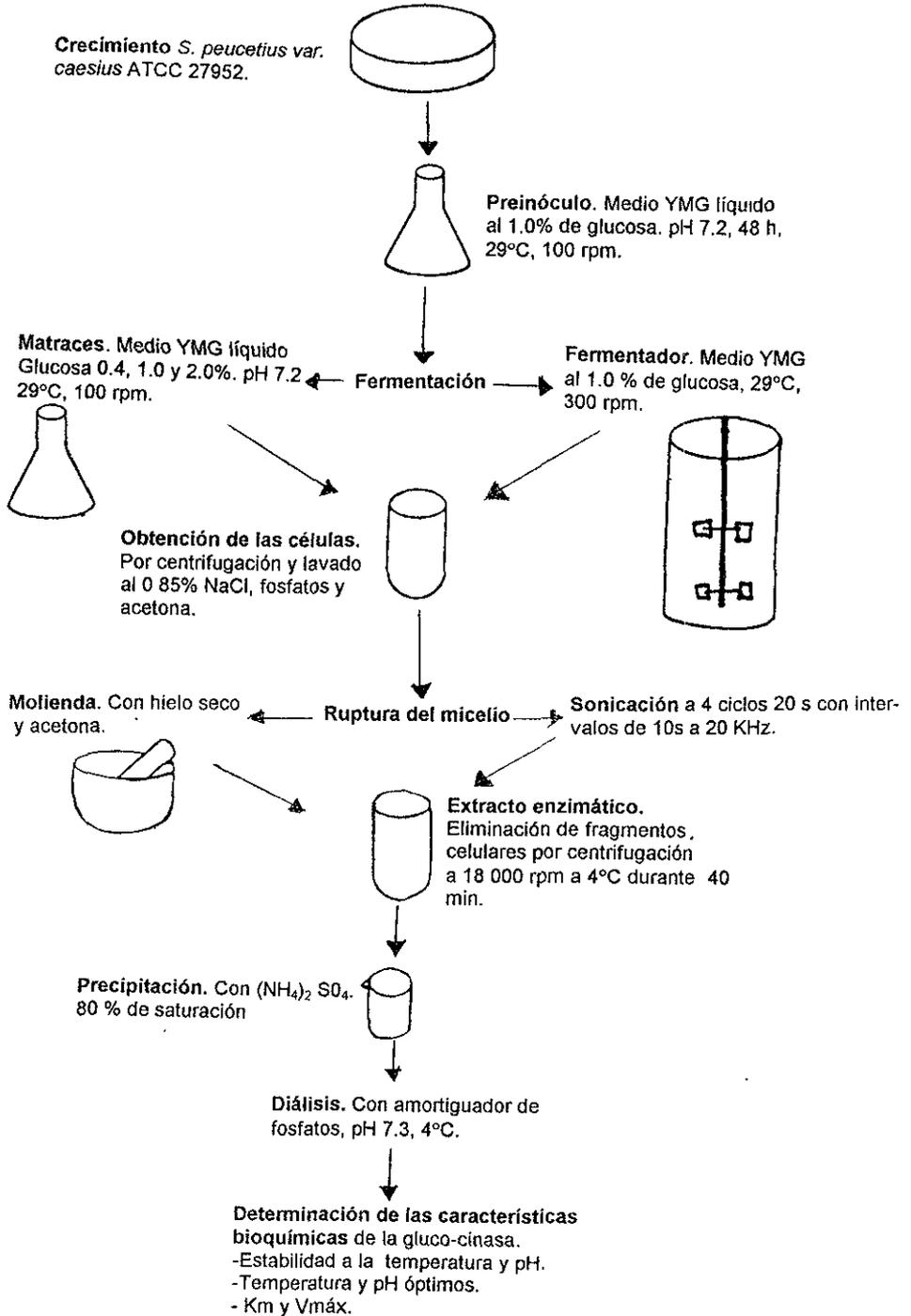
OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar la actividad de la gluco-cinasa en extractos celulares de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* ATCC 27952

Objetivos particulares:

- Determinar el efecto de la glucosa en el crecimiento de *S. peucetius*.
- Determinar pH óptimo
- Determinar la temperatura óptima.
- Determinar la estabilidad al pH.
- Determinar la estabilidad a la temperatura
- Determinar la K_m y la V_{max} .

ESTRATEGIA DE TRABAJO



MATERIALES Y METODOS

Microorganismo

Para realizar el presente trabajo se utilizó la cepa *Streptomyces peucetius var. caesius* ATCC 27952 (American Type Culture Collection, USA).

Medios de cultivo

Medio YMG:

Extracto de levadura	0.4 %
Extracto de malta	1.0 %
Glucosa anhidrida	1.0%

El medio YMG se le ajustó el pH 7.2 con una solución de NaOH 2N y se esterilizó a una temperatura de 121°C por 20 min

Para la conservación y propagación de la cepa de *S. peucetius var. caesius* se utilizó YMG sólido adicionando de agar bacteriológico al 2.0%.

En algunos casos se varió la concentración de glucosa al 0.4, 1.0, y al 2.0 %.

Preparación del preinóculo.

El microorganismo se sembró en placa con medio sólido YMG y se mantuvo durante 48 horas a 29°C para su crecimiento. Después de ese tiempo se cosechó el micelio y se resuspendió en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml del medio YMG líquido. Nuevamente se incubaron a la misma temperatura, tiempo y, con una agitación constante de 100 rpm, en una incubadora con control automático de temperatura (New Brunswick Scientific.

Edisón N.J.,USA) De estos matraces se tomaron 20 ml de cultivo como inóculo para la siguiente fermentación en tres matraces de 500 ml conteniendo 200 ml de medio YMG líquido, en las mismas condiciones de temperatura, agitación y durante 96 h.

Posteriormente se realizó una fermentación de 10 litros, con la finalidad de obtener la mayor cantidad de biomasa, en una jarra de fermentador con una capacidad de 14 litros (New Brunsmick Sci. N.J.,USA).

Para obtener el preinóculo para la fermentación se hizo igual que lo anteriormente descrito, pero se utilizó un matrás de 2 litros con 1 litro de medio líquido YMG al 1.0 % de glucosa para obtener el preinóculo y este se incubó a 29°C con una agitación de 200 rpm durante 48 horas. Este litro se utilizó para inocular los 9 litros de medio YMG en una jarra de 14 litros (fermentador), y se creció al microorganismo a la misma temperatura, con agitación constante a 300 rpm, flujo de aire de 10L/min durante 120 h.

METODOS ANALITICOS

Crecimiento celular

El crecimiento del microorganismo se cuantificó por peso seco y por la cantidad de proteína intracelular liberada a través del rompimiento del micelio.

En el transcurso de la fermentación tanto en matraces como en el fermentador, se tomaron muestras en condiciones estériles cada 24h, después de tomar la muestra se midió el pH sin centrifugar.

a) Determinación del peso seco

Diez mililitros de las muestras se filtraron a través de un sistema de filtración Millipore con membranas de 5.0 μm de tamaño de poro, las cuales fueron previamente pesadas, la biomasa retenida en la membrana se secó hasta

obtener el peso constante en una estufa a 80°C. El filtrado libre de células se recuperó para medirle azúcares reductores.

b) Determinación de proteína

La concentración de proteína intracelular, fue determinada después de romper las células, por el método de Lowry (1951).

Azúcares totales

Para evaluar el consumo de glucosa durante el crecimiento del microorganismo, se midieron los reductores totales

Los azúcares totales presentes en el filtrado libre de células, se determinaron por el método DNS (ácido 3,5 - dinitrosalisílico).

En tubos de ensayo se les añadió 0.1 ml de filtrado, 0.9 ml de agua y 2 ml de DNS. Por separado a dos tubos de ensayo se les agregó 1 ml de agua, 2 ml de DNS, y sin filtrado. Posteriormente estas mezclas fueron hervidas por 5 min, y se les añadió 10 ml de agua destilada, y en seguida se les determinó la absorbancia a 540 nm.

La concentración de los azúcares totales fue calculada utilizando una curva patrón de glucosa

Rompimiento celular

Dado que la gluco-cinasa es una enzima intracelular fue necesario romper la célula para extraerla y medir su actividad. Así mismo, se midió la proteína liberada para evaluar el crecimiento.

El micelio se recuperó y se lavó por centrifugación sucesivamente con solución salina al 0.85%, con amortiguador de fosfato pH 7.3, con acetona y fosfatos 1:1

y por último solo con acetona. Para cada lavado se centrifugó a 18000 rpm por 6 min a 4°C con un rotor JA -20 en una centrifuga refrigerada J2 MC (Beckman).

Para determinar cual era el mejor método de ruptura de las células para obtener la mejor actividad de la gluco-cinasa, para esto se probaron dos métodos:

a) Sonicación

En este método se utilizó micelio resuspendido en amortiguador de fosfatos pH 7.3 y se colocó en el sonicador y se le dio 7 ciclos de 20 s a 20 KHz (Sonic Dismembrator 550), con intervalos de descanso de 10 s. Del cual se tomaron muestras cada 20 s.

Posteriormente las muestras se centrifugaron a 18000 rpm, durante 20 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína y la actividad de gluco-cinasa.

b) Rompimiento por molienda con hielo seco y acetona

En este método se utilizó micelio, acetona y trozos de hielo seco, se puso en un mortero y se trituró por 5 min.

El micelio roto se resuspendió en un amortiguador de fosfatos pH 7.3 y se centrifugó dos veces a una velocidad de 18000 rpm. a 4°C por 20 min. y se recuperó el sobrenadante, a este se le midió la concentración de proteína y actividad de la gluco-cinasa. Finalmente el sobrenadante se guardó a 0°C.

Actividad de la gluco-cinasa de *Streptomyces peucetius*

La actividad se determinó espectrofotométricamente, cuantificando la formación de glucosa-6-fosfato (G-6-P). A través de medir la reducción de NADP a 340nm catalizada por la enzima glucosa-6-P-Deshidrogenasa (G-6-PDH) acoplada (Angell *et al.*, (1992).

La gluco-cinasa cataliza la reacción:



Es decir, al reaccionar la glucosa-6-fosfato + NADP con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, (G-6-FDH). El NADP se reduce en NADPH y este es medido espectrofotométricamente.



El sistema de reacción para medir la actividad de la gluco-cinasa contenía los siguientes reactivos: 7 ml de amortiguador Tris-HCl 100mM pH 7.0, 1.4 ml MgCl₂ 250 mM, 1.4 ml de NADP 5 mM, 1.4ml de ATP 10 mM y 1.022 ml de agua. De este sistema se tomó 1.76 ml para cada tubo y se le añadió lo siguiente como se muestra en la (tabla 4).

Tabla 4. Ensayo para medir la actividad de la gluco-cinasa.

Reactivos	Muestra	Blanco
Sistema de reacción	1.76 ml	1.76 ml
Agua	-----	200 µl
Glucosa 200 mM	200 µl	-----
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	4 µl	4 µl
Extracto enzimático	50 µl	50 µl

La absorbancia fue determinada a 340 nm a los 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, y 180 segundos. En un espectrofotómetro (Espectronic 21D, Milton Roy).

Los valores de la absorbancia fueron procesados de la siguiente manera.

Al obtener las diferencias de absorbancia con el blanco, se calculó la regresión lineal para obtener la pendiente.

Para calcular la actividad total y específica se utilizó la siguiente ecuación:

$$A = Ebc$$

A=absorbancia

E=Coefficiente de extinción molar del NADP

b= Longitud de la celda

c= Concentraciónc =A/

Celda de cuarzo de 1 cm.E=6.3 l / mmol / cm.

$$\text{La velocidad de reacción} = \frac{\text{cambio de abs / min} \times 10 \text{ nmol} \times 1000 \text{ ml}}{(6.3 \text{ l / mmol}) (1 \text{ cm}) (1 \text{ mmol}) 1000 \text{ ml}}$$

Precipitación de la enzima con sulfato de amonio.

Con la finalidad de concentrar la enzima y de separarla de algunas proteínas que pudieran dañarla o interferir en las pruebas bioquímicas de la enzima se hizo una precipitación del extracto enzimático con sulfato de amonio al 80 % de saturación a 0°C (Chambers-1993).

Para esto se colocó una cantidad del extracto enzimático libre de células en un vaso de precipitado de 100 ml, en baño de hielo, sobre un agitador magnético con agitación suave, y se le fue agregando poco a poco el sulfato de amonio en polvo hasta obtener el 80 % de saturación. Al terminar de añadirlo, se dejó 60 minutos en agitación suave. Para recuperar el precipitado, se centrifugó a 18000 rpm durante 20 minutos a 4°C, con un rotor JA-20 Beckman. El precipitado se resuspendió en un volumen mínimo de amortiguador de fosfatos pH 7.3. Posteriormente se dializó con amortiguador de fosfatos pH 7.3 diluido 1:100 a 4°C. Después el extracto dializado se le midió la concentración de proteína y actividad.

Determinación de la Km y Vmax.

La actividad se midió a diferente concentración de sustrato (glucosa) a 5, 10, 15, 25, 50, 100, 200 y 300mM.

Usando el sistema de reacción ya mencionado.

Estabilidad a la temperatura

Se incubaron 200 μ l de extracto precipitado y dializado en un tubo Eppendorf para cada temperatura, desde 30 hasta 70°C con intervalos de 10 grados. Después de incubar se colocaron los tubos con extracto en baño frío. Posteriormente se le midió la actividad enzimática de la gluco-cinasa, con el método que anteriormente se describe.

Estabilidad al pH.

Para la determinación de la estabilidad de la enzima, el filtrado se incubó a 4°C durante 24 horas antes de determinar la actividad y a diferentes valores de pH.

En tubos Eppendorf se añadió 200 μ l de filtrado precipitado y dializado al cual se le añadió 200 μ l de amortiguador de fosfatos con una concentración de 0.1M para valores de pH de 5 hasta 7 y Tris-HCl para valores de pH de 7 hasta 9. El control con 200 μ l de extracto y 200 μ l de agua.

Después de las 24 h se le midió la actividad de gluco-cinasa

Temperatura y pH óptimos.

La temperatura óptima se estableció midiendo la actividad enzimática a pH 7.0 (Tris-HCl), para diferentes temperaturas de 25 hasta 75°C, con intervalos de 5 y 10°C. La mezcla del sistema de reacción se agregó en una celda de cuarzo de 2 ml, sin la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ni el extracto enzimático y se colocó en el espectro por tres minutos para equilibrar a la temperatura deseada, que se estaba controlando a través de la circulación de agua. Después de ese tiempo se le añadió la enzima (G-6-PDH), y se inició la reacción con el extracto y se le determinó la absorbancia, cada 20 segundos hasta los 3 min. En un espectro Du-65, (Spectrofometer Beckman Suft pac TM) con un módulo conectado a un sistema de control de temperatura.

Para obtener el pH óptimo de la enzima, se determinó la actividad con dos amortiguador en el sistema de reacción:

- a) Amortiguador monobásico y dibásico de sodio (fosfatos) 0.1 M en un intervalo de pH 6.0-9.0. (Jeffrey, et al. 1990).
- b) Amortiguador Tris-malato 0.1 M en un intervalo de pH 5.0-8.0. (Gomori, 1948).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de crecimiento y producción de la gluco-cinasa de *S. peucetius*.

Para obtener mejor crecimiento se evaluó el efecto de la glucosa en el crecimiento de *S. peucetius* ATCC 27952 var. *caesius*, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento, a diferentes concentraciones de glucosa 0.4, 1.0, y 2.0 % (Fig. 8).

El pH durante la fermentación, que se llevó a cabo en matraces, varió de 6.5 a 7.3, en ningún caso llegó a valores extremos que limitara el crecimiento del microorganismo (Fig. 8A). El pH se considera factor importante entre otros, ya que a valores por abajo de pH 5, el desarrollo se ve afectado (Sykes and Skinner, 1973). El pH óptimo en el crecimiento de otras especies de *Streptomyces*, tiene un intervalo de 6 a 8.

El crecimiento del microorganismo, se presentó de manera similar en las tres concentraciones durante la fermentación, excepto a las 48 h, fue menor para 1% y 2% de glucosa (Fig. 8B). En estas curvas de crecimiento no se observó la fase "log" el microorganismo entró en la fase exponencial rápidamente, seguramente debido a que no requiere inducir enzimas para la utilización de la glucosa.

Durante el crecimiento del microorganismo de las 0h hasta las 96h, se observó el consumo de glucosa de 1.1 mg en 0.4%, 3.2 mg en 1.0% y 4.2 mg en 2.0% de glucosa. Por lo que se observa en las dos últimas concentraciones fue de dos y tres veces más el consumo que en 0.4%. Con respecto a la velocidad de consumo se obtuvo 0.03 y 0.04 mg/ml/h en esas mismas concentraciones (Fig. 8C).

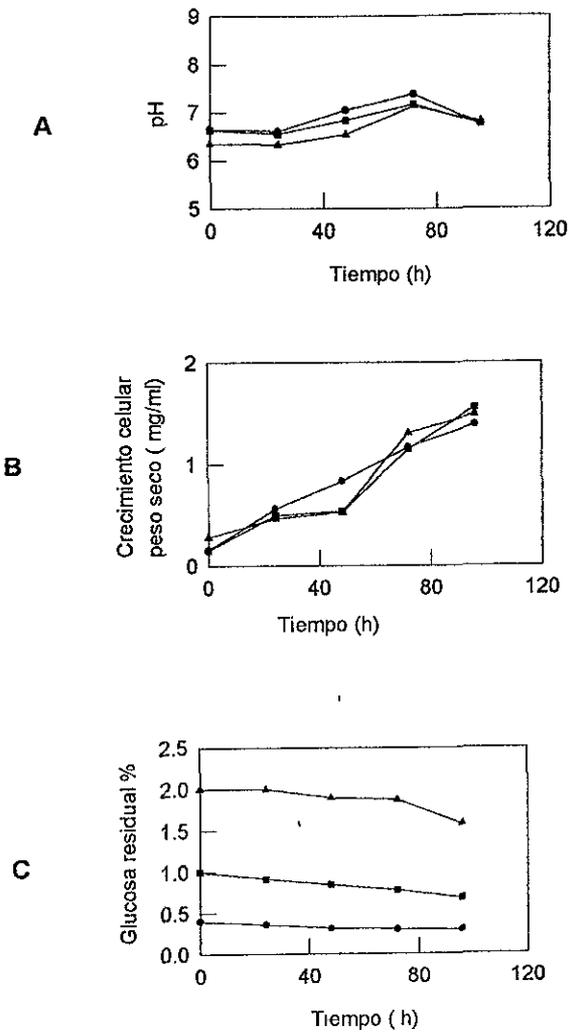


Fig. 8. Comportamiento del pH (A), crecimiento (B), glucosa residual (C), durante la fermentación de *S. peuceitius*. Medio (YM) con glucosa 0.4% (●), 1.0% (■) y 2.0% (▲) a 29°C con agitación de 100 rpm.

En las concentraciones 1.0% y 2.0% de glucosa, tanto el consumo total como la velocidad de consumo de glucosa mostrado por el microorganismo son prácticamente iguales. Sin embargo, el crecimiento en las tres concentraciones fue muy similar. Quizá en las concentraciones 1 y 2% el microorganismo estuvo almacenando glucosa, así como lo hacen otras bacterias (Bernard, 1973), y después lo utiliza conforme lo vaya requiriendo la célula para sus componentes nutricionales o metabolitos secundarios.

La actividad de la gluco-cinasa al 1.0 y 2.0% fue superior a la obtenida con la concentración de 0.4%, que resultó el 20% menor con respecto a las otras concentraciones. Sin embargo, a las 48 h se registró una pequeña disminución de la actividad en las dos últimas condiciones (Fig. 9). Esto se debió posiblemente a la menor biomasa obtenida en ese mismo tiempo de fermentación (Fig 8B). Lo que podría dar como resultado una menor concentración de la enzima.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el crecimiento del microorganismo; como el consumo de glucosa, la velocidad de consumo y la actividad de la gluco-cinasa en las diferentes concentraciones de glucosa utilizadas, se observaron pequeñas diferencias en las dos últimas, pero en 0.4% de glucosa fue ligeramente menor a estas. Por esta razón se decidió utilizar 1.0% de glucosa, en los siguientes experimentos.

La cepa de *S. peucetius*, se creció en un fermentador con 10 litros a fin de obtener suficiente biomasa para la extracción y caracterización del extracto enzimático.

En esta fermentación el perfil del pH fue similar al obtenido en matraces aunque un valor fue ligeramente más alto, de 7.5 a las 48 h en comparación con los otros tiempos de la fermentación (Fig. 10A), pero esto indica que el pH nuevamente se encontró dentro del intervalo óptimo para el crecimiento del microorganismo.

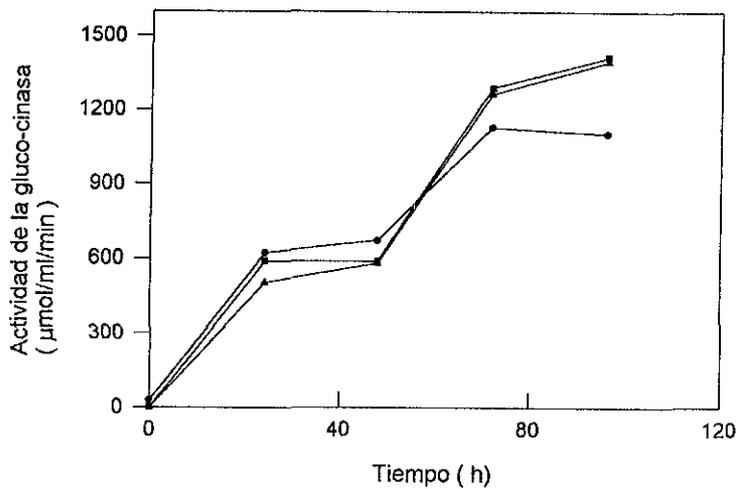


Fig. 9. Actividad de la gluco-cinasa, durante la fermentación de *S. peucetius*. Medio (YM) con glucosa 0.4% (●), 1.0% (■) y 2.0% (▲) a pH 7.2, 29°C con agitación constante a 100 rpm.

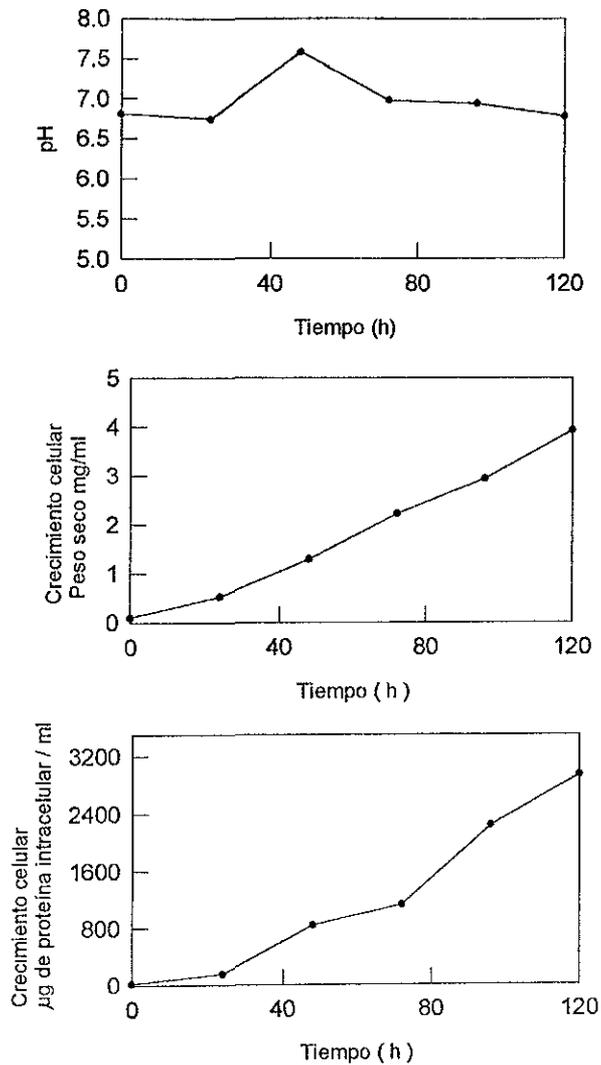


Fig.10. Comportamiento del pH (A), crecimiento por peso seco(B), proteína intracelular (D) durante la fermentación de *S. peucetius*. Medio (YM) con glucosa al 1.0%, pH 7.2, 29 °C, flujo de aire 10 l / min. con agitación constante a 300 rpm.

El crecimiento del microorganismo alcanzó a las 96 h 3.0 mg/ml de biomasa (Fig. 10B). Por lo tanto el crecimiento del microorganismo, se observó prácticamente 2 veces más en el fermentador que en matraces. Esto pudo deberse a la mejor aireación y agitación que se le suministró al fermentador.

El crecimiento también fue determinado por proteína intracelular (Fig. 10C). En la curva se muestra lo bien que creció el microorganismo y también se muestra la fase log entre las 24h.

Con los datos obtenidos de peso seco como de proteína intracelular se realizó una correlación lineal (Fig. 11), en el cual se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.955. Este resultado indica que hay una buena correlación entre ambos parámetros. Entonces esto puede permitir interpolar datos y así poder obtener el crecimiento del microorganismo, mediante proteína o peso seco para posteriores experimentos.

La producción de la actividad de la gluco-cinasa aumenta durante toda la fermentación, pero de las 96 a las 120 h se observa que la actividad de la enzima ha llegado a su saturación (Fig. 12A). La producción de la enzima estuvo relacionado con el crecimiento del microorganismo. Es decir a mayor crecimiento mayor cantidad de la enzima. Esto sucede, porque es una enzima constitutiva porque otras que no lo son, se producen en diferentes tiempos o inclusive, disminuye su síntesis durante la fermentación.

En relación a la actividad específica de la gluco-cinasa, se observaron bajas actividades a las 24 y 48 h, pero la máxima actividad se obtuvo a las 72 h, debido a la mayor la concentración de enzima disponible para el sustrato que se está dando pero, después de este tiempo la actividad de la gluco-cinasa empezó a disminuir (Fig. 12B). Esto podría deberse, a que las células están produciendo mayor cantidad de proteínas en comparación a la concentración de la gluco-cinasa, que ha llegado a su máxima producción. Es decir, por la diferencia de la composición química de las células en la fase estacionaria con respecto a la fase la exponencial, porque los componentes celulares se sintetizan a diferentes velocidades (Stanier, 1985).

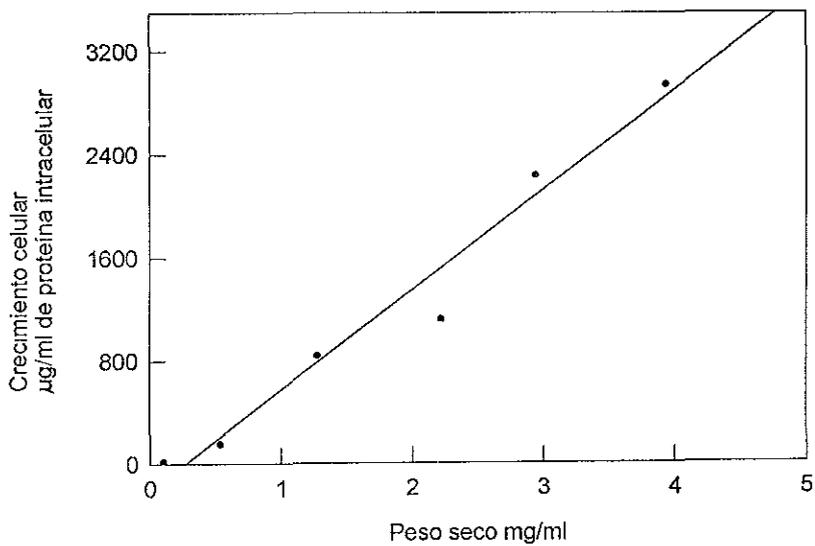


Fig. 11. La relación del peso con la proteína intracelular. Fermentación de *S. peuceitius*. Medio (YM) con glucosa al 1.0%, pH 7.2, 29 °C flujo de aire 10 l / min con agitación constante a 300 rpm.

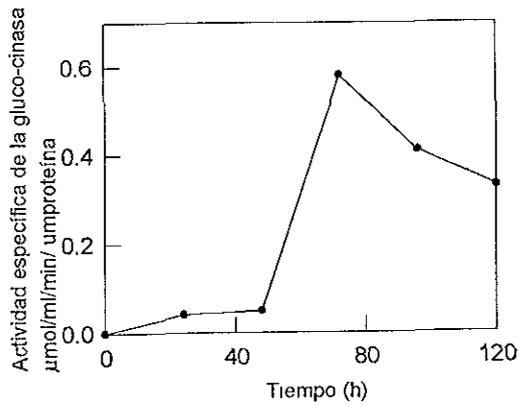
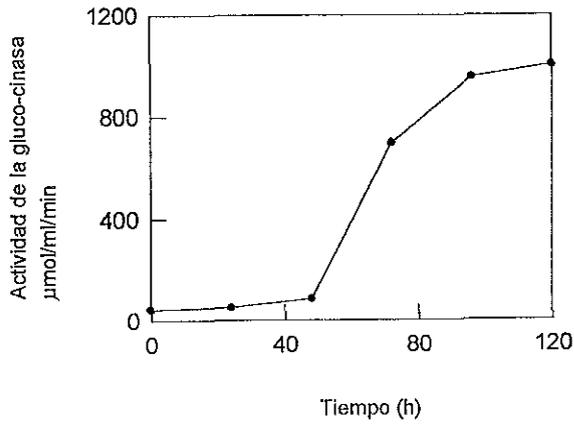


Fig. 12. Actividad de la gluco-cinasa (A), y la actividad específica de la gluco-cinasa (B) durante la fermentación de *S. peucetius*. Medio (YM) con glucosa al 1 0%, pH 7.2, 29 °C, flujo de aire 10 l /min con agitación constante a 300 rpm.

Extracción de la enzima

Para la obtención de la gluco-cinasa fue necesario romper la célula, para lo cual se utilizaron dos métodos: sonicación y molienda con hielo seco y acetona.

Cuando el micelio se rompió por el método de sonicación durante 7 ciclos de 20 s con intervalos de 10 s a 20 KHz de frecuencia. En el cual se determinó la máxima actividad a los 80 s pero, después de ese tiempo empezó a disminuir. Esto puede deberse, a que comienza a desnaturalizarse la proteína al darle mayor tiempo de exposición con el sonicador.

Al romperse el micelio por molienda con hielo seco y acetona se obtuvo mayor liberación de proteína, mayor actividad y preservación de la gluco-cinasa. Sin embargo, por sonicación se obtuvo 20 % menos de proteína con respecto al otro método y además de que se perdía la actividad. Por lo que se decidió utilizar el método por molienda con hielo seco y acetona en los siguientes experimentos, además de que se pudo incrementar la actividad al concentrarla por precipitación con sulfato de amonio.

Precipitación de la enzima con sulfato de amonio.

Una vez obtenido el extracto enzimático de *S. peuceetius*, se precipitó para concentrar la gluco-cinasa. Además, se pretendió separar a la enzima de otras proteínas que pudieran interferir en su caracterización.

Una cierta cantidad de extracto enzimático, se precipitó con sulfato de amonio al 80 % de saturación y se desaló. Este precipitado y dializado se le determinó la actividad de la gluco-cinasa, en el cual se recuperó un 92% de actividad y un 55.9% de proteína con respecto a la muestra original (tabla 5).

La precipitación con sulfato de amonio se utiliza comúnmente en el análisis y purificación de enzimas. Esta concentración de saturación con sulfato de amonio se ha usado también para la precipitación de la gluco-cinasa de

Aerobacter aerogenes (Kamel, *et al* 1965). El uso de esta sal resulta relativamente barato, además por su bajo efecto desnaturalizante sobre las enzimas y por su efecto estabilizador sobre algunas proteínas.

Tabla 5 Extracción y precipitación del extracto crudo de *S. peucetius*

Filtrado	Volumen ml	Proteínas mg/ml	Actividad $\mu\text{mol/ml/min}$	Actividad específica $\mu\text{mol/ml/min}/$ $\mu\text{g proteína}$	Proteína total mg/ml	Actividad $\mu\text{mol/ml/min}$	Proteína F.P.D %	Actividad F P D %
Filtrado Enzimático	140	2.24445	1237.46	0.5513	314.223	173244.4	100	100
Filtrado Precipitado Dializado	24.5	7.16925	5830.22	0.82	175.64663	142840.4	55.9	92.3

Nota. Filtrado, precipitado y dializado (F P D)

Caracterización enzimática de gluco-cinasa.

Estabilidad al pH y temperatura.

La estabilidad frente a la temperatura de la gluco-cinasa, se observó como máxima actividad a los 40°C. Por arriba de los 50°C empezó a disminuir la actividad rápidamente (Fig. 13). Para llevar a cabo reacciones con la enzima es necesario hacerlo en las condiciones óptimas de incubación. Del mismo modo es importante conocer la estabilidad térmica de la enzima a diferentes temperaturas para determinar las mejores condiciones de almacenamiento y saber que tan estable es ésta enzima a la temperatura de incubación. Por esta razón se determinó el efecto que tenía la temperatura sobre la actividad de la enzima y su estabilidad. Esto ayuda a evitar la pérdida de la actividad en las condiciones de trabajo, como puede ser una purificación de la enzima o algún otro estudio

En cuanto a la estabilidad al pH de la enzima se utilizó un intervalo de pH 6 a 9. Además el ensayo de estabilidad al pH se hizo a 4°C, en esta condición la enzima no mostró pérdida de la actividad. Encontrándose la máxima actividad de la gluco-cinasa en pH 6.5 a 7.5, en este intervalo la enzima se mostró estable (Fig. 14). Por tanto es importante que la enzima, se mantenga en este intervalo después de separarla de su entorno natural, ya que existen agentes que puedan dañarla irreversiblemente. Este factor, entre otros es importante, controlar en todas las fases del proceso de purificación, si no el rendimiento de la proteína puede reducirse o bien desaparecer la actividad (Voet and Voet, 1991).

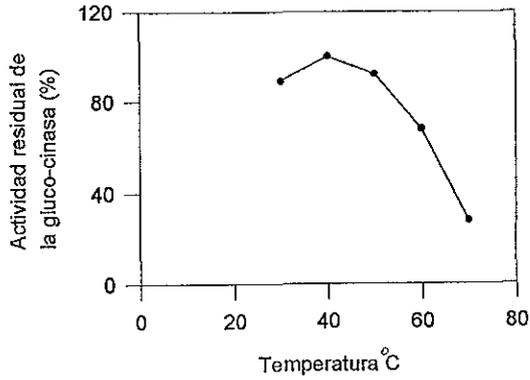


Fig. 13. Estabilidad térmica de la gluco-cinasa de *S. peucetius*. 10min de incubación para cada temperatura.

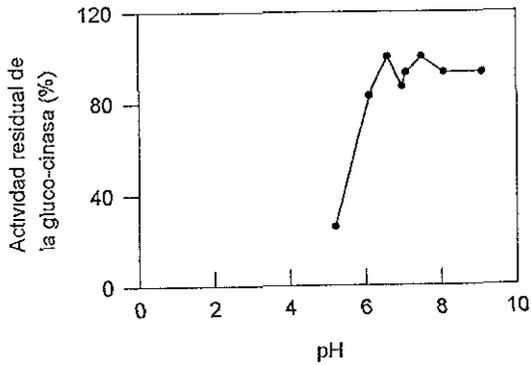


Fig. 14. Estabilidad al pH de la gluco-cinasa de *S. peucetius* con amortiguador de fosfatos por 24 h a 4°C de temperatura.

Temperatura Óptima.

El intervalo de temperatura que se manejó para evaluar la actividad enzimática fue de 25 a 75°C. Observando la máxima actividad de la gluco-cinasa a 50°C, pasando esta temperatura la actividad empezó a disminuir haciéndose más pronunciada después de los 70°C (Fig. 15). Por lo tanto la temperatura óptima donde la enzima tiene su mayor efectividad es a 50°C. Ahora bien, estos resultados indican que si la temperatura esta por abajo o por arriba de la temperatura óptima se obtiene una disminución en la actividad. Si la temperatura es de tan solo de 10 a 15 °C más alta, la energía es suficiente como para romper unos cuantos enlaces, los enlaces próximos se debilitan y la estructura entera se desorganiza; a la pérdida de la conformación se le conoce como desnaturalización de la proteína (Mc. Gilvery, 1972).

pH óptimo

El pH óptimo de la gluco-cinasa se determinó con un amortiguador de fosfatos 0.1 M. Con un intervalo de pH de 6 a 9. En pH 6 se observó una disminución de la actividad de 32.34% con respecto a la máxima actividad registrada (Fig. 16A). La máxima actividad se obtuvo a 7.5. Por arriba de pH 8 empezó a disminuir la efectividad de la gluco-cinasa (Fig. 16A).

Al evaluarse el pH óptimo de la gluco-cinasa con otro amortiguador (Tris-malato) 0.1 M. Mostrando que a valores menores de pH 6 no hubo actividad. Sin embargo a pH 7.5 se registró la máxima actividad (Fig. 16B). El valor de pH óptimo obtenido para la gluco-cinasa en ambos amortiguadores fue igual. Estos datos son similares a la gluco-cinasa de *Aerobacter aerogenes* donde su pH óptimo es de 7.5 con un amortiguador de glicilglicina y 8.9 con glicina, (Kamel, *et al* 1966). También se ha observado que las hexocinasas tienen un pH óptimo en un intervalo de 8.0 a 8.4 (Colowick, 1977). En estos últimos datos son diferentes a los que se obtuvieron con *S. peuceitius*.

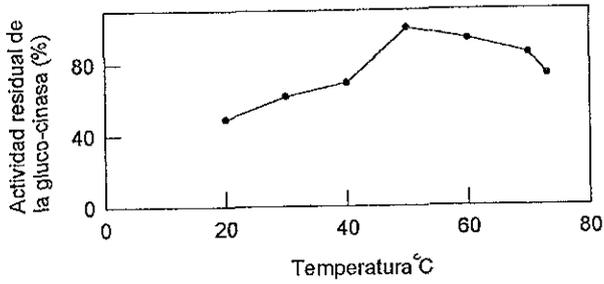
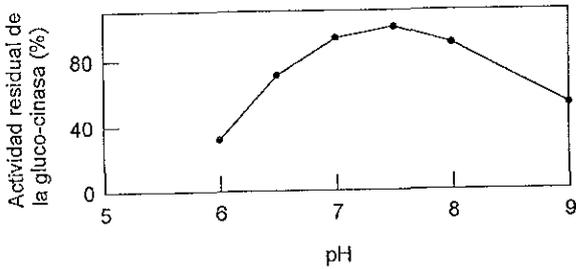


Fig. 15 Temperatura óptima de la gluco-cinasa con amortiguador Tris HCl pH 7.0.

A



B

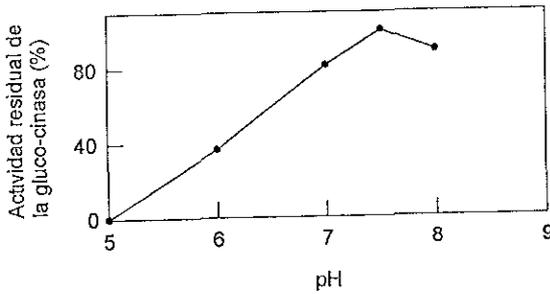


Fig. 16. pH óptimo de la enzima en amortiguador de fosfatos (A) y amortiguador Tris-malato (B).

Generalmente, las enzimas trabajan a un pH característico para su actividad máxima; por arriba o por abajo de ese valor la actividad disminuye. Entonces las reacciones enzimáticas dependen del pH externo para su efectividad, y no siempre es el pH intracelular.

Determinación de la Km

En la figura 17 se muestra la actividad de la gluco-cinasa de *S. peucetius* cuando se varía la concentración de glucosa, al graficar la actividad contra la concentración de sustrato se observa una curva hiperbólica tipo Michaelis-Menten, alcanzando una saturación a los 50mM de glucosa.

Para obtener la Km y así, saber que tan afín es la enzima al sustrato, se determinó por el método de transformación de lineweaver-Burk para la reacción catalizada por la gluco-cinasa (Fig. 18). Mediante un análisis por regresión lineal se obtuvo una Km de 8 43 mM y 4353.5 $\mu\text{mol/ml/min}$.

En la tabla 6 se muestran valores de Km que presentan las gluco-cinasas de diferentes bacterias para comparar la Km y Vmáx obtenida de *S. peucetius*. La Km aparente que se obtuvo de *S. peucetius* es más alta que la de otros microorganismos. Esto indica, que la enzima tiene poca afinidad a la glucosa.

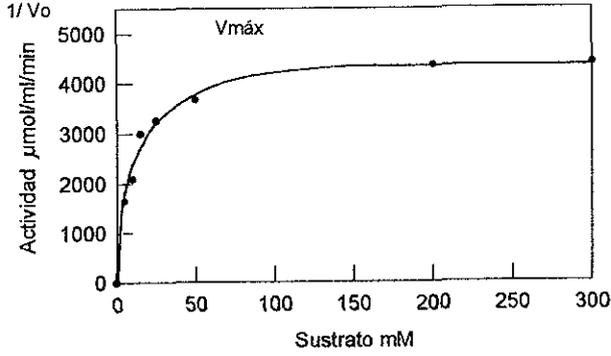


Fig. 17. Actividad enzimática a diferentes concentraciones de glucosa.

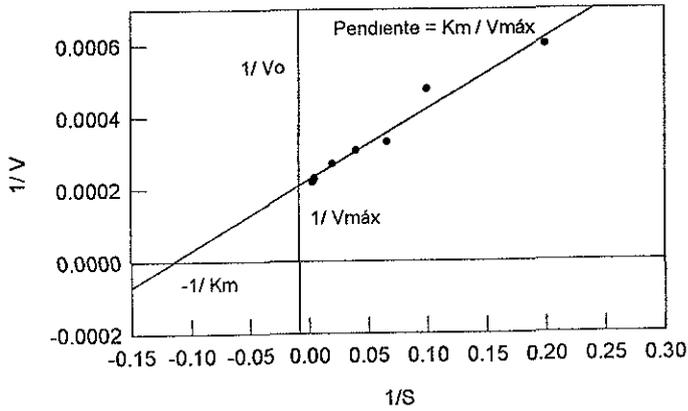


Fig. 18. Gráfica de Lineweaver-Burk para la gluco-cinasa.

Tabla 6. Valores de Km y Vmáx para gluco-cinasas provenientes de diferentes bacterias.

Enzima	Km	Vmáx	Referencias
Gluco-cinasa de:			
<i>S. peuceitius</i>	$8.43 \times 10^{-3} \text{ M}$	$4353.5 \mu\text{M} / \text{ml} / \text{min} /$	El presente trabajo
<i>Streptococcus mutans</i>	$6.1 \times 10^{-4} \text{ M}$	9.13 iu/mg de proteína	Porter, et al. 1982.
<i>Aerobacter aerogenes</i>	$8 \times 10^{-5} \text{ M}$		Kamel, et al. 1965
<i>Zymomonas mobilis</i>	0.22 mM	400 $\mu\text{M} / \text{min} / \text{por mg}$	Scopes, et al.1985.
Levadura (hexocinasa)	$2.2 \times 10^{-7} \text{ M}$ $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$		Dixon, et al.1979.
Leucocitos PMN	$6.6 \times 10^{-6} \text{ M}$	4.17 mM/ml/min 4170 $\mu\text{M} / \text{ml} / \text{min}$	Silencio,1989.

Se ha visto que otras gluco-cinasas son enzimas alostéricas que poseen sitio catalítico al que se une el sustrato y se transforma, y también poseen uno o más sitios reguladores a los que se unen diferentes moléculas que ejercen el efecto regulador y que reciben el nombre de efectores o moduladores. Este tipo de enzimas no presentan el comportamiento de Michaelis-Menten sino que tienen un comportamiento sigmoide más que hiperbólico en una curva de velocidad contra la concentración de sustrato. Para estas enzimas, la constante de afinidad se obtiene por medio de la ecuación de Hill:

$$V = \frac{[S]^n}{V_{\max} K + [S]^n}$$

Donde S = sustrato, K= constante intrínseca de disociación, Vmax = Velocidad máxima, y n= es el número de sitios de la enzima.

Al realizar una gráfica de $\log (V / V_{\max} - V)$ contra el $\log [S]$ es una línea recta con una pendiente igual a n (Segel, 1982). La gluco-cinasa de hígado de mamífero exhibe una K = 10 mM y n = 1.5 (Voet,1995). Por esta razón, en la gluco-cinasa extraída de *S. peuceitius* se le determinó el número (n) de sitios equivalentes de unión al sustrato de acuerdo a la ecuación de Hill. Se obtuvo el número de sitios activos de la enzima y se determinó una "n" de 0.98 (Fig 19).

Esto indica que la gluco-cinasa de *S. peuceitius* tiene un solo sitio de unión al sustrato. Entonces la ecuación se reduce a la ecuación de Henri Michaelis-Menten (Fig. 17).

El comportamiento de la gluco-cinasa de *S. peuceitius* fue semejante al obtenido con las gluco-cinasas de *A. aerogenes* y *Z. mobilis* (Kamenl et al, 1965) y (Scopes et al, 1985).

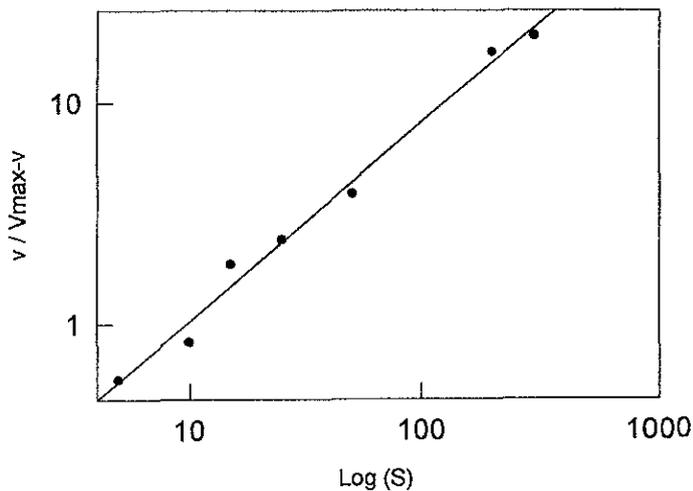


Fig. 19 . Gráfica de la ecuación de Hill de la gluco-cinasa.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES

- En el crecimiento de *S. peucetius var. caesius* en las concentraciones de 0.4, 1.0 y 2.0% de glucosa no se encontró diferencias, pero si hubo una pequeña variación de la actividad en 0.4 de 15 a 20% menos que en la actividad de 1.0 y 2.0% entre las 72 y 96h.
- La mayor actividad específica de la gluco-cinasa se mostró a las 72 horas en un fermentador instrumentado.
- Con el rompimiento del micelio. Se obtuvo mayor liberación de proteína, mayor actividad y preservación de la enzima por molienda con hielo y acetona que por el método de sonicación. Ya que en este último se registró un 23% menos de proteína y una pérdida importante de la actividad.
- En la precipitación del extracto enzimático al 80% de saturación con sulfato de amonio, se obtuvo un rendimiento de 92% de actividad y 55.5% de proteína con respecto al extracto enzimático no precipitado.
- En los amortiguadores de fosfatos y Tris-malato, se obtuvo un pH óptimo de 7.5 de la gluco-cinasa. Es decir no hubo efecto negativo por la composición de los amortiguadores.
- La estabilidad al pH de la gluco-cinasa, se observó que está dentro de un intervalo de 6.5 a 7.5.
- La mayor estabilidad térmica de la enzima fue a los 40°C y su temperatura óptima se obtuvo a los 50°C.

- El comportamiento de la gluco-cinasa puede ser descrito por Michaelis-Menten con un valor de K_m de 8.4 mM y una $V_{m\acute{a}x}$ de 4353.5 $\mu\text{mol/ml/min}$.

-El número de sitios equivalentes de unión al sustrato de la gluco-cinasa fue de 1 obtenido de acuerdo a la ecuación de Hill. Lo cual indica que tiene comportamiento de tipo hiperbólico.

BIBLIOGRAFIA

- Abbe, K. and Yamada T. 1982. Purification and properties of piruvato kinase of *Streptococcus mutans*. J. Bact. 299- 305.
- Angell ,S., Lewis C. G., Buttner M. J., 1994. Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3 (2): a likely regulatory role for glucose kinase. Mol. Gen. Genet. 244: 135-143.
- Angell, S., Schwarz E., M.J. 1992. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3 (29:its nucleotide secuencia, transcriptional analysis and role in glucose repression. Mol. Microbiol. 6: 2833-2844.
- Arcamone, F.1981. Doxorubicin: Anticancer Antibiotics. Academic Press.
- Bascaran, V., Sanchez L., Hardisson C., and Braña A.F. 1991. Stringent response and initiation of secondary metabolism in *Streptomyces clavuligerus* J. Gen. Microbiol. 137: 1625-1634.
- Becker, J M., Cadwell G.A., and Zachgo E A 1990. Biotechnology Academic press. inc. U.S.A. p. p. 117-119.
- Bernard. 1973 Microbiology. 2da ed. Harper International edition. pag 85.
- Chambers, J A. A. and D. Rickwood. 1993. Biochemistry. BIOS Scientific Publishers p. p. 9-34.
- Chatterjee, S , and Vining L. C. 1982 Catabolite repression in *Streptomyces venezuelae*. Induction of B-Galactosidase, Chloramphenicol production, and

- intracellular cyclic adenosine 3, 5-monophosphate concentration. *Can. J. Microbiol.* 28: 311-317.
- Colowick, S. P. 1977. The hexocinasas in the enzymes. Ed. Academic Press. 9: 1-48.
- Colombo, A. L., Salinas M. M., Perini G., Biamonti G., Zanella G., Carusco M., Torti F., Felippini S., Inventi- Solari A., Garofano L. 1992. Expression of doxorubicin -daunorubicin resistance genes in different anthracycline mutants of *Streptomyces peucetius*. *J. Bact.* 174: 1641- 1646.
- De los Reyes, G. C., Covadonga B. S, Hudisson C., and Sánchez J. 1991. Nutritional regulation of differentiation and synthesis of an exocyttoplasmic deoxyribo endonucleasa in *Streptomyces antibioticus*. *J. Genet. Microbiol.* 136: 299-305.
- Dekleva, M. L., Titus J. A., Strohl W. R. 1985. Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can. J. Microbiol.* 31: 287-294.
- Dekleva, M. L., Strohl W. R 1987. Glucose stimulated acidogenesis by *Streptomyces peucetius*. *Can J. Microbiol.* 33: 1129-1132.
- Delic, Y., Robbins, P. and Westpheling, J. 1992. Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1885 -1889.
- Dixón M., Webb E. C. Thorne C J., Tipton K F. 1979. Enzimes Cap. VI Enzyme specificity. Third edition Ed. Academic press. P. 248.
- Escalante, L., Gonzalez, R. Obregón, A.M. and Sánchez, S. 1992 Carbon catabolite regulation of gentamicin formation. *J. Antibiotics* 45. 465-469.

-Gomori.1948. Pro. Soc. Exp. Biol. Med. p. p. 68, 354

-Hobbs, G., Frazer C. M., Gardner D. C. 1990. Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) . Kinetics and the influence of nutrients. J. Gen. Microbiol. 136: 2991-2296.

-Hobbs, G , Obanye A. T. C., Petty J., Mason J. C., Barratt E., Gardner D. C. J., Flett F., Smith C. P., Broda P., and Oliver S. G.1992. An integrated approach to studing Regulation of production of the antibiotic methylenomycin by *Streptomyces coelicolor* A3 (2) .J. Bact. 1487 - 1494.

-Hodgson, D A. 1982. Glucose Repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and its perturbation in mutants resistant to 2- Deoxyglucosa. J. Gen. Microbiol. 128: 2417-2430.

-James, P. D. A., Edwards C., and Dawson M. 1991. The effects of the temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus* grown in a chemostat. J. Gen Microbiol. 137: 1715 - 1720.

-Jeffrey M., Becker G.A.,Caldwell E. A Z.1990. Biotec. Laboratory.

Joklik W. K., Willet H., Bernard A. M. 1991. Microbiologia Ed. p. p. 173-180

-Kamel M. Y.,Allison D.P. and Anderson R.L. 1966. Stereospecific. D- Glucokinase of *Aerobacter aerogenes*. J. Biol. chemi. 241: (3); 690-693.

Kwakman, J. H. J. M and Postma P. W. 1994. Glucokinase has a regulatory role in carbono catobolite repression in *Streptomyces coelicolor*. J. Bact 176. 2694-2698.

-Lehninger, A L. 1982 Biochemistry. Chapter 29. Protein synthesis and its regulation. 2a edición U. S. A. p p. 906 - 909

-Lowry, O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. 1951. Protein measurement with Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275

-Mc.Gilvery R. 1972. *Conceptos bioquímicos* De. Reverté, España

-Mathews, C. K., and Van Holde K. E. 1990. *Biochemistry*. Chapter 10 Enzymes, Biological catalysis. Ed. The Benjamin/ Cummings publishing company. p. p. 340-342.

-Robertis E.D.P y Robertis E. M. F. 1989. *Biología celular y molecular*. Cap. 2 Organización Molecular de la Célula. 11 de. Ed. El Ateneo. p. p. 50.

-O'Leary, W.. 1977. *Practical Handbook of Microbiology*. Chapter 51 Actinomycetes. 2a edición. United States. p. p. 151-152.

-Otten, S. L., Stutzman-Engwall K. J., and Hutchinson C. R. 1990 Cloning and expression of Daunorubicin biosynthesis genes from *Streptomyces peuceetius* and *S. peuceetius subsp. caesius*. *J. Bact.* 172: 3427-3434.

-Rose Matthias, Albig W., and Entian K. D. 1991. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose Phosphorylation by hexokinases PI and PII. *J. Biochem* 199: 511- 518.

-Sanches, S. and Quinto C., 1975. D-glucosa isomerase: constitutive and catabolite repression-resistant mutants of *Streptomyces Phaeochromogenes*. *Applied Microbiol* 30: 750 -754

-Saier, M. H. 1989. Protein Phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phosphoenolpyruvate sugar phosphotransferasa system. *Microbiol Reviews*. 53: 109-120

- Segel I.H. 1982. Cálculos de bioquímica. Cap. 4 Enzimas. 1a edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España. p. p. 391-404.
- Scopes, R. K , Testolin V., Stoter A., Griffiths-Smith K. and Algar E. M. 1985. Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. Biochem. J. 228: 627-634.
- Setlow, P. 1973. Inability to detect cyclic AMP in vegetative or sporulating cells or dormant spores of *Bacillus megaterium*. Biochem. Biophys. Res comm. 52: 365-372.
- Silencio Barrita J. L. 1989. Evaluación de la actividad de enzimas leucocitarias como indicadores del estado de nutrición. Tesis. Facultad Química. UNAM. México
- Sharp, P. A. 1987. Contents, volumes 1 and 2 Current protocols p. p. A.2 3
- Shapiro, S. 1989. Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. Chapter 3 Autoregulatory secondary metabolites from actinomycetes and Chapter 4 Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. Ed. CRC press. Inc Unites States. p. p. 76, 127 -132.
- Stanier, R. Y., Ingraham J. L., Wheelis M. L., and Pianter P.R. 1986. The Microbial World. Chapter 24 Gram-positive Eubacteria: The Actinomycetes. Fifth Edition, New Jersey. p. p. 505-506 y 517.
- Stanier, R. Y., Adelberg E.A., and Ingraham J. L. 1985. Microbiol. 4a Ed. Editorial Reverte. Barcelona España. p. p. 645-647 y 667.669.

-Stutzman-Engwall, K. J., Otten S. L., and Hutchinson E R 1992. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces s.p.p.* and overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius*. J. Bact.174: (1);1641-1646.

-Sykes, G., and Skinner F. A. 1973. Actinomycetales Ed. Academic. press inc. Great Britain. p. p. 1- 13.

-Tang, L., Zhang Y. X., and Hutchinson C. R. 1994. Amino acid catabolism and antibiotic synthesis: valine is a source of precursors for macrolide biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae*. J. Bact. 176 (19); 6107-6119.

-Thompson, M. W., Strohl W. R., and Floss H. G. 1992. Purification and characterization of TDP-D. glucose 4.6- dehidratase from anthracycline - producing *Streptomyces*. J. Gen Microbiol. 138: 779- 786

-Trumbly, R.J. 1992.glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Mol. Microbiol. 6 : 15-21

-Vanék Z., Tax J., Komersová I., Sedmero P., Vokoun. J. 1977. Antracyclines. Folia Microbiol. 22: 139-159.

-Voet, D. and Voet J. G. 1990. Bioquímica. Chapter 16 Glicolisis. Ed. Omega Barcelona España. p p. 81, 424-460.

-Voet D. and Voet J. G. 1995. Biochemistry. Chapter 17 Glycogen Metabolism Ed. Omega Barcelona España. Second edition. p p. 505

-Victoria Porter E., Bruce M. Chassy and Chester. 1982. Purification and Kinetic Characterization of a specific Glucokinase from *Streptococcus mutans* OM270 cells Bioch. et Biophysica act., 709.178 -186.

-Waksman, S. A. 1959. The actinomycetes. Chapter 4 Nomenclature and General Systems of Classification and Chapter 5 Morphology Cytology, and Life Cycles. Volumen I. Baltimore 2, MD, U. S. A p. p. 47-60, 71-85,

-Waksman, S. A. 1961. The actinomycetes. Chapter 4 Characterization of *Streptomyces* Species and Chapter 5 Systems of Classification and Identification of the genus *Streptomyces*. Volumen II Baltimore 2. U.S. A. p. p. 61- 70, 82-84.

-Wildermuth, H. 1970. Development and organization of the aerial micelium in *Streptomyces coelicolor*. J. gen. Microbiol. 60. 43- 50