

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

MALATO DESHIDROGENASA: EFECTO DE LA FUENTE DE  
CARBONO SOBRE EL PERFIL DE ACTIVIDAD EN Saccharopolyspora  
erythraea CA340

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A :  
ANA PAULINA MENDOZA VON DER BORCH

DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. MARÍA ELENA DEL CARMEN FLORES CARRASCO

2005



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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección de la Dra. María Elena Flores Carrasco.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pavel Petrosyan por su asesoría técnica

## A G R A D E C I M I E N T O S

A la Dra. Ma. Elena del Carmen Flores Carrasco por su apoyo, dedicación y paciencia.

A los compañeros del laboratorio: Pavel, Tóshiko, Sara, Alfredo, Mónica, Fermín, Guille y Eduardo por su ayuda y por hacer mas amena la estancia en el laboratorio.

Al Octavio por haber estado conmigo durante la elaboración de este trabajo, por su apoyo y por darme ánimos en todo momento.

## DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico principalmente a mis señores padres: doña Lenchis y don Falfus por todo su apoyo, su cariño y sus consejos.

A las carnalitas la Tatu y la Lucas porque hasta eso son simpáticas y porque se les quiere retiarlo.

A mis amigos: Luciérnaga, Dianita, David, Guinilingüis, Toshikoti, Prokus, Leticia y Ulises por los ratos de diversión y distracción que también fueron necesarios para realizar este trabajo.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	1
ABREVIATURAS .....	3
1. RESUMEN .....	4
2. ANTECEDENTES .....	5
2.1. METABOLISMO CELULAR .....	5
2.2. CATABOLISMO DE CARBONO .....	5
2.2.1. VÍAS ANAERÓBICAS .....	9
2.3. CICLO DE KREBS .....	10
2.4. MALATO DESHIDROGENASA.....	13
2.4.1. MALATO:QUINONA OXIDOREDUCTASA .....	14
2.4.2. ISOFORMAS DE MDH.....	15
2.4.3. PESO MOLECULAR Y SUBUNIDADES .....	16
2.4.4. ESTRUCTURA PRIMARIA, SECUNDARIA Y Terciaria DE MDH.....	17
2.4.5. pH ÓPTIMO .....	18
2.4.6. OTRAS VÍAS EN QUE PARTICIPA MDH .....	18
2.4.7. RELACIÓN ENTRE MDH Y OTRAS ENZIMAS EN CITOPLASMA .....	19
2.4.8. UBICACIÓN EN EL CROMOSOMA .....	19
2.4.9. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MDH.....	20
2.4.10. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA SÍNTESIS Y ACTIVIDAD DE MDH .....	20
2.4.11. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE MDH A TRAVÉS DEL TIEMPO DE CRECIMIENTO .....	22
2.4.12. FILOGENIA DE MDH .....	22
2.5. <i>Saccharopolyspora erythraea</i> .....	22
3. OBJETIVOS.....	27
4. JUSTIFICACIÓN.....	28
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	29
5.1. MICROORGANISMO.....	29
5.2. CONSERVACIÓN DE LA CEPA.....	29
5.3. CULTIVO.....	29
5.4. CUANTIFICACIÓN DE CRECIMIENTO .....	29
5.5. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS .....	30
5.6. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE MALATO DESHIDROGENASA .....	30
5.7. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL PERFIL DE ACTIVIDAD DE LA MDH .....	30
5.8. ELECTROFORESIS DE POLIACRILAMIDA Y TINCIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS GELES .....	31
5.9. IDENTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MDH EN GELES DE POLIACRILAMIDA (ZIMOGRAMA).....	31
5.10. PURIFICACIÓN DE LA MDH DE <i>Sac. erythraea</i> CA 340.....	31
5.11. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES $K_m$ Y $V_{max}$ DE LA MDH DE <i>Sac. erythraea</i> CA 340 .....	32
5.12. INDUCCIÓN DE LA MALATO DESHIDROGENASA POR FRUCTOSA .....	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
6.1. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE MDH .....	33
6.2. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA ZIMOGRAMA DE MDH .....	35
6.3. OBTENCIÓN DEL ELC.....	36

6.4. PERFIL DE CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD DE MDH EN GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO .....	39
6.5. PERFILES DE CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD DE MDH AL CRECER EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO .....	42
6.6. PERFILES DE CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD DE MDH AL CRECER EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FRUCTOSA .....	46
6.7. EFECTO DE LA FRUCTOSA SOBRE LA SÍNTESIS DE MDH .....	49
6.8. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE MDH.....	53
6.9. PURIFICACIÓN PARCIAL DE MDH .....	55
6.10. CONSTANTES CINÉTICAS DE LA MDH .....	57
7. CONCLUSIONES.....	60
8. PERSPECTIVAS .....	61
9. BIBLIOGRAFÍA .....	62



# ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS	PÁGINA
Fig. 1. Fases de la respiración celular.....	7
Fig. 2. Vía de Entner-Doudoroff.....	8
Fig. 3. Ciclo de Krebs.....	12
Fig. 4. Reacción de MDH.....	14
Fig. 5. Estructura tridimensional de MDH.....	18
Fig. 6. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> y <i>Sac. erythraea</i> .....	24
Fig. 7. Zimograma de MDH.....	35
Fig. 8. Actividad de MDH en diferentes condiciones de extracción.....	36
Fig. 9. Efecto de la congelación sobre la actividad de MDH.....	38
Fig. 10. Efecto de la refrigeración sobre la actividad de MDH.....	38
Fig. 11. Geles de acríamida con ELC congelado y refrigerado.....	39
Fig. 12. Perfil de crecimiento y actividad de MDH en glucosa.....	40
Fig. 13. Zimograma de MDH al crecer en MM con glucosa.....	41
Fig. 14. Crecimiento de <i>Sac. erythraea</i> en MM con diferentes fuentes de carbono....	44
Fig. 15. Actividad específica de MDH al crecer en diferentes fuentes de carbono....	44
Fig. 16. Geles ND-PAGE con ELC de las diferentes fuentes de carbono.....	45
Fig. 17. Crecimiento en MM con diferentes concentraciones de fructosa.....	47
Fig. 18. Efecto de la concentración de fructosa sobre la actividad de MDH.....	47
Fig. 19. Geles ND-PAGE con ELC de <i>Sac. erythraea</i> crecida en MM con diferentes concentraciones de fructosa.....	48
Fig. 20. Crecimiento de <i>Sac. erythraea</i> en MM con fructosa o glucosa y en presencia o ausencia de cloranfenicol.....	50
Fig. 21. Actividad específica de MDH de <i>Sac. erythraea</i> crecida en MM con fructosa o glucosa y en presencia o ausencia de cloranfenicol.....	50
Fig. 22. Zimogramas de MDH al crecer a <i>Sac. erythraea</i> en MM con fructosa o glucosa y en presencia o ausencia de cloranfenicol.....	51
Fig. 23. Tinción de proteínas de ELC de <i>Sac. erythraea</i> crecida en MM con fructosa o glucosa y en presencia o ausencia de cloranfenicol.....	52
Fig. 24. Zimogramas de MDH realizados utilizando ELC obtenido mediante varios	

procedimientos.....	54
Fig. 25. Purificación parcial de MDH.....	56
Fig. 26. Cinética de la reacción de MDH al variar la concentración de NADH.....	57
Fig. 27. Cinética de la reacción de MDH al variar la concentración de oxaloacetato.....	58

## TABLAS

## PÁGINA

Tabla 1. pH óptimo de MDH reportado para distintos organismos .....	19
Tabla 2. Pesos moleculares de la MDH reportado para diferentes organismos.....	53
Tabla 3. Purificación parcial de la malato deshidrogenasa de <i>Sac. erythraea</i> .....	55
Tabla 4. Comparación de los valores de $K_m$ y $V_{max}$ reportados para la malato deshidrogenasa de varios organismos.....	59

## ABREVIATURAS

ADH	Alcohol deshidrogenasa
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELC	Extracto libre de células
FADH <sub>2</sub>	Flavina adenina dinucleótido reducido
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
LDH	Lactato deshidrogenasa
MC	Medio completo
MDH	Malato deshidrogenasa
MM	Medio mínimo
MQO	Malato:quinona oxidoreductasa
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
ND	No desnaturalizante
PEP	Fosfoenol piruvato
PM	Peso molecular
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
SDH	Succinato deshidrogenasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
UV	Ultravioleta
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima de una reacción enzimática
YEMEG	Medio completo con glucosa
YEMES	Medio completo con sacarosa

## 1. RESUMEN

La L-malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37) dependiente de  $\text{NAD(P)}^+$  cataliza la interconversión entre malato y oxaloacetato. Esta enzima ha sido estudiada en gran cantidad de organismos y participa en varias vías metabólicas esenciales, de las cuales la más importante es el ciclo de Krebs ya que a partir de éste se genera ATP y otros compuestos en las bacterias aerobias; a pesar de esto, la MDH ha sido muy poco estudiada en actinomicetos.

*Saccharopolyspora erythraea* CA340 es el principal microorganismo productor de eritromicina, antibiótico sintetizado a partir de una molécula de propionil-CoA y 6 moléculas de metilmalonil-CoA. Estas moléculas precursoras de eritromicina se pueden sintetizar a partir de succinil-CoA, un intermediario del ciclo de Krebs, por esta razón en nuestro grupo se decidió estudiar la regulación y propiedades de algunas enzimas del ciclo de Krebs en esta bacteria.

Siguiendo esta línea de investigación, en este trabajo se estudió el efecto de la fuente de carbono sobre el perfil de actividad de MDH, para lo cual fue necesario estandarizar los métodos para obtener el ELC, medir actividad y realizar el zimograma de esta enzima. Los resultados obtenidos sugieren que el gen que codifica para esta enzima presenta un patrón de expresión constitutivo, ya que el perfil de actividad específica al crecer a la bacteria en glucosa como fuente de carbono muestra que ésta se mantuvo constante dentro de cierto rango a lo largo del tiempo de cultivo, este mismo perfil se observó al utilizar otras fuentes de carbono tales como galactosa y lactosa, mientras que con sacarosa la actividad disminuye mostrando un valor mínimo a las 72 horas y luego vuelve a aumentar presentando un pico a las 96 h. Al utilizar fructosa como única fuente de carbono la actividad aumenta a lo largo del tiempo de crecimiento mostrando un máximo a las 96 h. Estas diferencias observadas en los perfiles de actividad no son causadas por diferencias en el crecimiento, ya que este microorganismo creció eficientemente en fuentes de carbono como glucosa, sacarosa y fructosa, mientras que en galactosa el crecimiento es menor y en lactosa fue casi nulo.

Debido a que el perfil de actividad observado en fructosa es diferente al de las otras fuentes de carbono, se analizaron los perfiles obtenidos con diferentes concentraciones de este compuesto (5, 10, 20 y 40 g/l), mostrando que el aumento en la actividad específica es mayor al disminuir la concentración de fructosa (5 g/l), contrariamente a lo que ocurre con el crecimiento.

Con el fin de determinar si el perfil observado en fructosa se debe a un aumento en la síntesis de la enzima o a una disminución en su degradación, se creció a la bacteria en presencia o ausencia de un inhibidor de síntesis de proteínas (cloranfenicol) y con fructosa o glucosa como fuentes de carbono. Los perfiles de actividad obtenidos en este experimento sugieren que el aumento de actividad observado en el perfil de fructosa se debe a una inducción de la síntesis de MDH.

También se realizó una purificación parcial de MDH con el fin de determinar el peso molecular aparente (PM) de la proteína y sus subunidades, así como las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$  para NADH y oxaloacetato. Así el PM calculado para la proteína intacta fue de 40 kDa, mientras que para las subunidades fue de 37 kDa lo cual sugiere que ésta es una proteína monomérica. La  $K_m$  para oxaloacetato fue 14.9  $\mu\text{M}$  y para NADH 56  $\mu\text{M}$ , estos valores se encuentran dentro del rango de lo reportado para la MDH de otros organismos mostrando que la enzima de *Sac. erythraea* presenta una alta afinidad por oxaloacetato. La  $V_{max}$  de la enzima fue 235  $\mu\text{mol/mg/min}$  y la enzima se inhibió a altas concentraciones de oxaloacetato.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. METABOLISMO CELULAR**

El metabolismo es la suma de todas las transformaciones químicas que se producen en una célula u organismo y tiene lugar en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente que constituyen las rutas metabólicas. Éste se divide en anabolismo y catabolismo siendo este último la fase degradadora en donde moléculas nutrientes orgánicas (carbohidratos, grasas y proteínas) se convierten en productos más pequeños y sencillos (ej. ácido láctico, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>). Las rutas catabólicas generan energía libre, parte de la cual se conserva en la formación de ATP y transportadores electrónicos reducidos (NADH y NADPH) (Nelson y Cox, 2000).

En el anabolismo, también llamado biosíntesis, precursores pequeños y sencillos se integran en moléculas mucho mayores y complejas, entre las que se cuentan los lípidos, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Las reacciones anabólicas requieren aporte de energía, generalmente en forma de energía libre obtenida de la hidrólisis del ATP y el poder reductor del NADH y NADPH (Nelson y Cox, 2000).

En bacterias, las rutas metabólicas están reguladas a dos niveles. El primero es la forma de respuesta más inmediata para la regulación y es a través de la acción de enzimas alostéricas, que son capaces de cambiar la actividad catalítica en respuesta a moduladores, ya sean estimuladores o inhibidores. El segundo nivel de regulación metabólica consiste en el control de la velocidad de un paso metabólico por regulación de la concentración de su enzima en la célula. La concentración de un enzima en un momento determinado es el resultado de un equilibrio entre su velocidad de síntesis y su velocidad de degradación, estando las dos sujetas a regulación en una escala de tiempo que va de minutos a horas (Nelson y Cox, 2000).

### **2.2. CATABOLISMO DE CARBONO**

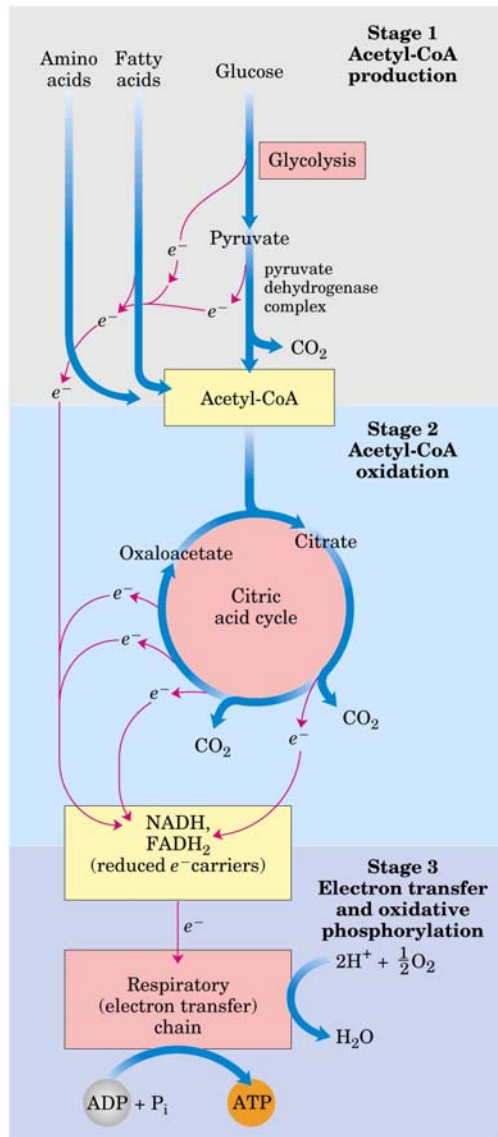
La energía utilizada por las células para realizar trabajo biológico proviene de la degradación de la glucosa y otras moléculas combustibles orgánicas, generalmente carbohidratos, los cuales son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas, o bien sustancias que dan lugar a estos compuestos después de su hidrólisis. Según la cantidad de unidades de polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas contenidos en la molécula, los

carbohidratos se clasifican en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos ó polisacáridos. La D-glucosa es el principal combustible de la mayoría de organismos y ocupa una posición central en el metabolismo (Nelson y Cox, 2000).

Los estreptomicetos habitan en el suelo, en donde los materiales derivados de las plantas son la principal fuente de nutrientes, por lo que es un medio rico en fuentes de carbono y pobre en nitrógeno y fosfatos; como consecuencia, estos organismos presentan una gran variedad de vías catabólicas degradadoras de carbohidratos. Los estreptomicetos obtienen los nutrientes simples secretando complejos enzimáticos extracelulares que rompen las paredes de las plantas. La inducción de estos complejos enzimáticos es generalmente coordinada por inductores que no siempre tienen relación estructural con el sustrato y en algunos casos tampoco con el producto de ninguna de las enzimas que conforman el complejo; por ejemplo, el producto de la degradación de xilano induce la producción de celulasas (Hodgson, 2000). *Saccharopolyspora erythraea* puede crecer en glucosa, xilosa, ramnosa, fructosa, galactosa, manitol e inositol como fuentes de carbono; arabinosa, y sacarosa son asimilados moderadamente, mientras que rafinosa es poco asimilada (Waksman y Henrici, 1948); también es capaz de asimilar acetato, citrato, lactato, malato, propionato, piruvato y succinato (Labeda, 1987).

La mayor parte de las células eucarióticas y un gran número de bacterias (incluyendo a *Streptomyces* y *Saccharopolyspora*) son aeróbicas y oxidan sus nutrientes completamente a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. El conjunto de los procesos moleculares involucrados en el consumo de O<sub>2</sub> y en la producción de CO<sub>2</sub> por parte de las células se denomina respiración celular. Esta tiene lugar en tres fases principales (Fig. 1). La primera fase; la glucólisis, está constituida a su vez por dos etapas; en la primera ocurre una serie de reacciones por medio de las cuales cada molécula de glucosa proporciona dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato, utilizando dos moléculas de ATP; en la segunda etapa el gliceraldehído-3-fosfato mediante cinco reacciones forma piruvato y se producen cuatro moléculas de ATP y dos de NADH (Nelson y Cox, 2000).

Hay varias vías que pueden proporcionar gliceraldehído-3-fosfato para la segunda etapa de la glucólisis. Hay evidencia de que tanto la glucólisis, como la vía de las pentosas fosfato se encuentran presentes en *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces reticuli* y *Streptomyces scabies* (Cochrane, 1961). Dekleva y Strohl (1988) extendieron estas observaciones a *Streptomyces C5*, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces aureofaciens*. Estos autores reportaron la ausencia de dos enzimas



**Fig. 1.** Fases de la respiración celular (Nelson y Cox, 2000).

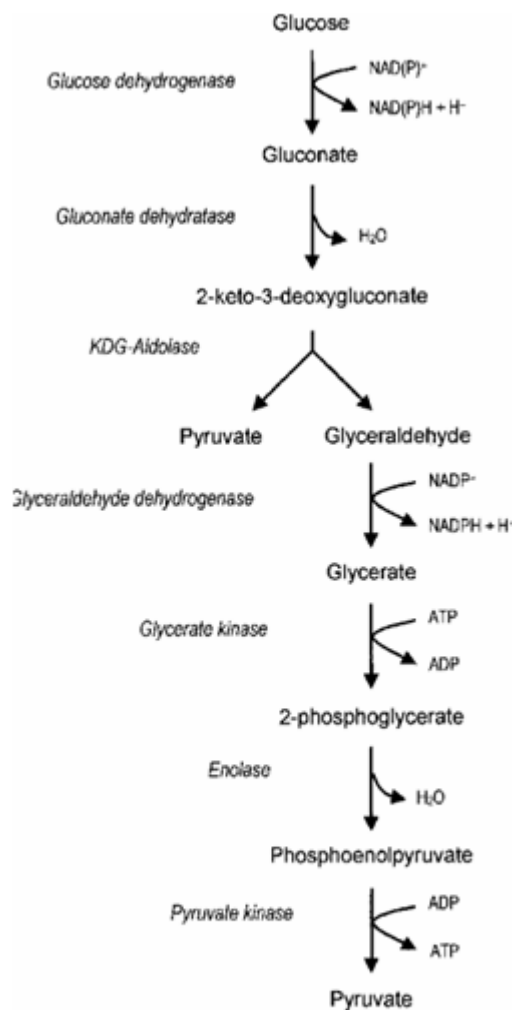
claves para la vía de Entner-Doudoroff (Fig. 2) en estos estreptomicetos, sin embargo, en una especie del género *Nonomuraea* se reportó que la glucosa se metaboliza principalmente por la vía de Entner-Doudoroff; este es el primer reporte de que esta vía es reconocida como la vía catabólica principal para obtener gliceraldehído-3-fosfato en actinomicetos (Gunnarsson *et al.*, 2004).

La segunda fase, el ciclo de Krebs, solo ocurre en la respiración aerobia. En ésta, los grupos acetilo se incorporan al ciclo donde son oxidados hasta CO<sub>2</sub>. La energía liberada en esta oxidación se conserva en los portadores de electrones reducidos NADH, NADPH y FADH<sub>2</sub> (Nelson y Cox, 2000).

En la tercera fase de la respiración, la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, estos cofactores reducidos son a su vez oxidados, liberando protones y electrones. A continuación se produce una transferencia de electrones a lo largo de una cadena de moléculas transportadoras, conocida como cadena

respiratoria, hacia el O<sub>2</sub>, que, al reducirse, da lugar a H<sub>2</sub>O. Durante este proceso de transferencia electrónica se libera una gran cantidad de energía que se conserva en forma de ATP gracias al proceso denominado fosforilación oxidativa (Nelson y Cox, 2000). En *Corynebacterium glutamicum*, análisis bioquímicos y moleculares recientes, junto con información obtenida de la secuencia del genoma muestran que este microorganismo cuenta con una cadena de transporte de electrones ramificada (Bott y Niebisch, 2003).

En *Streptomyces coelicolor* se realizaron estudios proteómicos y metabolómicos en crecimiento diáuxico en MM con maltosa y glutamato. El perfil de crecimiento muestra una primera fase (RG1) en la que el organismo usa glutamato como fuente de



**Fig. 2.** Vía de Entner-Doudoroff  
([www.biochemj.org/bj](http://www.biochemj.org/bj)).

carbono y nitrógeno, luego se observa una fase de transición (T) en la que el organismo se encuentra en estrés nutricional debido a que se termina el glutamato; después hay una segunda fase de crecimiento en la cual se utilizan maltosa como fuente de carbono y amonio (producido por la degradación de glutamato) como fuente de nitrógeno (RG2) y por último se presenta la fase estacionaria (S). Los genes que codifican para las enzimas del ciclo de Krebs citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y succinil-CoA sintasa mostraron una alta expresión durante las dos fases de crecimiento (RG1 y RG2) y una marcada disminución en la expresión en las fases T y S. Las enzimas glicolíticas se expresaron principalmente durante RG2. Las enzimas asociadas con el almacenamiento de energía se indujeron en la fase T. Los genes involucrados en el procesamiento de proteínas se expresaron

en las fases T y S. En la fase S se observó lisis celular, mayor expresión de proteasas y disminución en la expresión de enzimas del ciclo de Krebs y de la glucólisis. Así, en las fases en las que se detuvo el crecimiento, se reprimió la síntesis de proteínas involucradas en el anabolismo y se activaron los sistemas de reciclamiento de nutrientes (Novotna *et al.*, 2003).

La mayoría de los organismos se alimentan de varias fuentes de carbono y no solo de glucosa. Estos nutrientes son degradados a moléculas que pueden entrar en ciertas partes del ciclo de Krebs o de la vía glucolítica. Por ejemplo, los polisacáridos como el almidón son degradados en sus monosacáridos constituyentes y fosforilados a glucosa 6-fosfato; de esta manera penetran en la vía glucolítica. Las grasas primero se escinden en sus componentes glicerol y ácido graso. Luego, los ácidos grasos son



degradados en fragmentos de dos carbonos y entran en el ciclo de Krebs como acetil-CoA. Las proteínas son degradadas en sus aminoácidos constituyentes. Los aminoácidos son desaminados y el esqueleto de carbono residual se convierte en un grupo acetilo o bien en uno de los compuestos de carbono de la vía glucolítica o del ciclo de Krebs, de manera que puede ser procesado en esta etapa de la vía central (Curtis y Barnes, 1993).

### 2.2.1. VÍAS ANAERÓBICAS

La fermentación es un término general que indica degradación anaeróbica de la glucosa u otros nutrientes orgánicos a diversos productos para obtener energía en forma de ATP. En estos procesos anaeróbicos se da lugar a la glucólisis produciendo ácido pirúvico, pero éste no forma acetil-CoA para entrar a ciclo de Krebs sino se reduce para producir ácido láctico ó etanol (Nelson y Cox, 2000).

La mayoría de las bacterias que realizan la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato pueden crecer anaeróbicamente en glucosa y azúcares relacionados. Sin embargo, los estreptomicetos usualmente se clasifican como aeróbicos obligados (Hodgson, 2000). Se ha demostrado que *S. griseus* produce bajos niveles de lactato al crecer en glucosa en condiciones de poca aeración, lo que implica la presencia de lactato deshidrogenasa (Hockenhuil *et al.*, 1954). Para explicar la causa por la cual, los estreptomicetos no pueden crecer anaeróbicamente en glucosa, se ha sugerido que probablemente son sensibles a los desechos producidos por la fermentación. También es probable que se requiera oxígeno para otros procesos celulares esenciales (Hodgson, 2000). En *S. coelicolor*, una cepa mutante en el gen *citA* que codifica para la citrato sintasa, primera enzima del ciclo de Krebs, mostró acidificación del medio y deficiencias en la diferenciación morfológica y en la biosíntesis de antibióticos. Estas deficiencias en el desarrollo de la cepa mutante se debieron en parte a la acidificación del medio, ya que esta cepa fue capaz de producir micelio aéreo y pigmentos cuando se agregó buffer al medio para mantener un pH neutro (Viollier *et al.*, 2001). En cultivos de *Sac. erythraea* hay producción de ácido en presencia de varias fuentes de carbono como fructosa, galactosa, glucosa y sacarosa entre otras (Labeda, 1987). En el caso de *S. alboniger*, la acidificación del medio al crecer en glucosa se debe a que se secreta piruvato debido a un desbalance entre la glicólisis y el ciclo de Krebs (Redshaw *et al.*, 1976).

### 2.3. CICLO DE KREBS

El ciclo de Krebs es la vía metabólica más importante para la generación de ATP en las bacterias aerobias (Fig. 3); además provee importantes precursores biosintéticos como succinil-CoA y juega un papel clave en la producción de energía cuando la glucólisis es incapaz de satisfacer las necesidades de la célula (Nelson y Cox, 2000).

En el inicio de una vuelta del ciclo de Krebs, también llamado ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo del ácido cítrico, el acetil-CoA dona su grupo acetilo al compuesto de cuatro átomos de carbono oxaloacetato, formando una molécula de citrato de 6 carbonos. A continuación el citrato es transformado en isocitrato, otra molécula de seis carbonos, que, al deshidrogenarse con pérdida de CO<sub>2</sub>, genera el compuesto de cinco átomos de carbono  $\alpha$ -cetoglutarato. Este último compuesto sufre también una pérdida de CO<sub>2</sub> dando lugar finalmente al producto de cuatro carbonos succinato. A continuación el succinato es convertido, mediante una secuencia de tres reacciones enzimáticas, en el compuesto de cuatro carbonos oxaloacetato con el que se inició el ciclo; en este punto el oxaloacetato está listo para reaccionar con otra molécula de acetil-CoA y dar comienzo a una segunda vuelta. En cada vuelta del ciclo se produce la entrada de un grupo acetilo (dos carbonos) en forma de acetil-CoA y la salida de dos moléculas de CO<sub>2</sub> (Fig. 3). Cuatro de los pasos de este proceso son oxidaciones en las que la energía se conserva, con gran eficacia, mediante la formación de cofactores reducidos (NADH y FADH<sub>2</sub>) (Nelson y Cox, 2000).

En *Escherichia coli* se encuentra un grupo de genes en el minuto 17 del cromosoma en el que se encuentran nueve genes que codifican enzimas del ciclo de Krebs. Estos genes, *gltA-sdhCDAB-sucABCD*, codifican cuatro enzimas o complejos enzimáticos del ciclo de Krebs (citrato sintasa, succinato deshidrogenasa,  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y succinil-CoA sintetasa) en tres diferentes unidades transcripcionales. Los genes correspondientes a las otras enzimas del ciclo de Krebs, tales como isocitrato deshidrogenasa, fumarasa y malato deshidrogenasa, se encuentran muy alejados tanto entre ellos como del grupo de nueve genes (Nimmo, 1987).

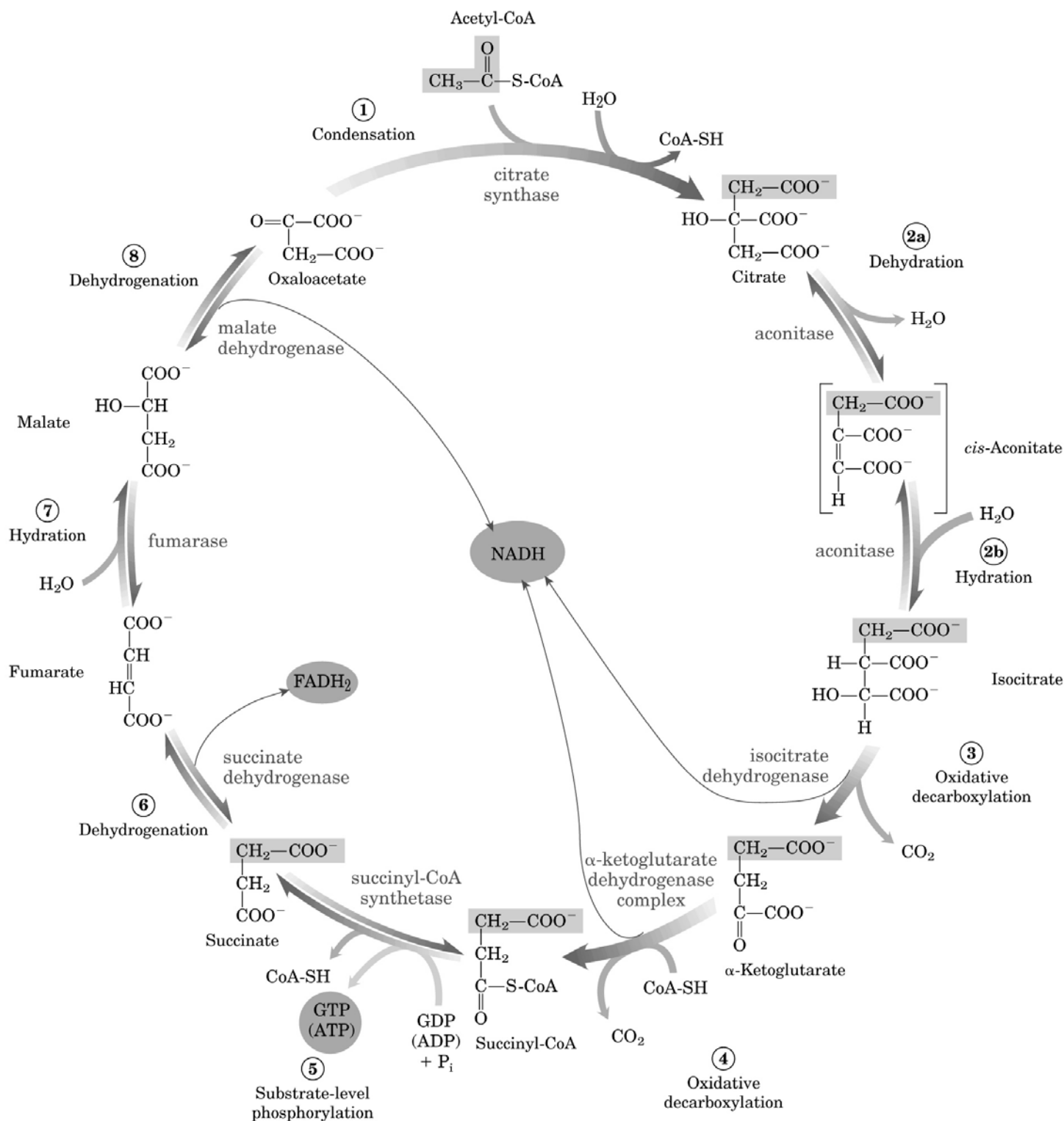
En la mayoría de los microorganismos, la regulación del ciclo de Krebs es ejercida a nivel de la actividad de algunos pasos del ciclo. El flujo de átomos de carbono de piruvato en y a través del ciclo del ácido cítrico está bajo una estricta regulación en dos niveles: la conversión de piruvato en acetil-CoA (piruvato deshidrogenasa) y la entrada de acetil-CoA en el ciclo (citrato sintetasa), aunque éste también es regulado a

nivel de la isocitrato deshidrogenasa y de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (Nelson y Cox, 2000). En *E. coli* se ha observado que la citrato sintasa controla la velocidad del flujo a través del ciclo ya que su actividad se regula por varios compuestos como ATP, acetil-CoA, NADH y  $\alpha$ -cetoglutarato; por otro lado, no hay evidencia confiable de que la isocitrato deshidrogenasa tenga un papel importante en el control del ciclo excepto al crecer en acetato o fuentes de carbono equivalentes (Nimmo, 1987).

Tres factores gobiernan la velocidad del flujo a través del ciclo: la disponibilidad de sustrato, la inhibición por productos que se acumulan y la inhibición por retroalimentación alostérica de enzimas iniciales por intermediarios en el ciclo (Nelson y Cox, 2000).

Por mucho tiempo se había dado por hecho que las enzimas del ciclo de Krebs presentan un patrón de expresión constitutivo, sin embargo, en varios microorganismos como *E. coli*, se ha observado que su expresión no es ni constitutiva ni coordinada. En general, estas enzimas se reprimen total o parcialmente en condiciones anaeróbicas. Esta represión es particularmente fuerte para la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa. En este microorganismo también se ha observado que varios genes que codifican para enzimas del ciclo de Krebs están sujetos a represión catabólica por glucosa, tal es el caso de la citrato sintasa, la succinato deshidrogenasa y la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (Nimmo, 1987).

En organismos aeróbicos, el ciclo de Krebs es una vía anfibólica, es decir, que no solo funciona en el catabolismo oxidativo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos, sino que también genera precursores de muchas vías biosintéticas. Ciertos intermediarios del ciclo de Krebs, pueden salir del ciclo y actuar como precursores de aminoácidos, nucleótidos, porfirinas, grupos hemo, ácidos grasos, esteroides y glucosa. El oxaloacetato participa en varias reacciones anabólicas dando lugar a precursores de aminoácidos (aspartato, asparagina, serina, cisteína, fenilalanina, tirosina y triptofano), nucleótidos (pirimidinas) y glucosa. El  $\alpha$ -cetoglutarato también participa en la formación de aminoácidos (glutamato, arginina, prolina y glutamina) y nucleótidos (purinas). El citrato participa en la formación de ácidos grasos y esteroides (Nelson y Cox, 2000).



**Fig. 3.** Reacciones del ciclo de Krebs. Los átomos de carbono sombreados son los que proceden del acetil-CoA (Nelson y Cox, 2000).

Las enzimas del ciclo de Krebs han sido estudiadas en varios estreptomicetos mostrando evidencias de que este ciclo es completo y activo en estos organismos (Cochrane, 1961; Dekleva y Strohl, 1988; Hostalek *et al.*, 1969).

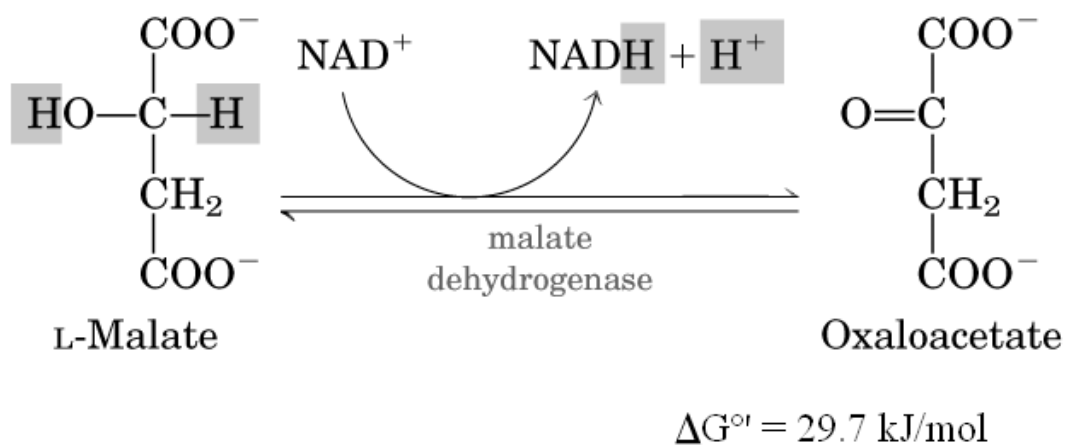
Cuando algún intermediario del ciclo de Krebs lo abandona para actuar como precursor biosintético, se produce un descenso en la velocidad del flujo a través del ciclo. Por medio de reacciones anapleróticas, es posible reponer los intermediarios perdidos del ciclo del ácido cítrico (Nelson y Cox, 2000). En bacterias, el oxaloacetato es restituido principalmente gracias a la PEP carboxilasa que cataliza la reacción de fosfoenolpiruvato (PEP) a oxaloacetato. El malato es resustituido por acción de la enzima málica que cataliza la interconversión entre piruvato y malato (Nelson y Cox, 2000).

El ciclo del glioxalato, una vía anaplerótica, es una modificación del ciclo de Krebs en donde la degradación de isocitrato no se produce a través de la reacción de la isocitrato deshidrogenasa, sino mediante una desviación catalizada por la isocitrato liasa que da lugar a la formación de succinato y glioxalato. A continuación, el glioxalato se condensa con el acetil-CoA para dar lugar a malato en una reacción catalizada por la malato sintasa. Después ocurren la serie de reacciones del ciclo de Krebs que llevan de malato hasta isocitrato y se reinicia el ciclo, el cual es una vía anabólica que permite la conversión de acetato en oxaloacetato como fuente de fosfoenolpiruvato para la síntesis de carbohidratos (Nelson y Cox, 2000).

#### **2.4. MALATO DESHIDROGENASA (MDH)**

Esta enzima (L-malato-NAD oxidoreductasa, EC 1.1.1.37) cataliza la interconversión de malato a oxaloacetato, utiliza NAD(P)<sup>+</sup> como cofactor y es la última enzima del ciclo de Krebs (Fig. 4).

El equilibrio de esta reacción se encuentra muy desplazado hacia la izquierda en condiciones termodinámicas estándar. Sin embargo, en la célula intacta, el oxaloacetato está siendo continuamente retirado por la reacción altamente exergónica de la citrato sintasa, como consecuencia de ello, la concentración intracelular de oxaloacetato se mantiene en niveles muy bajos ( $< 10^{-6}M$ ), lo que empuja la reacción de la malato deshidrogenasa hacia la formación de oxaloacetato (Nelson y Cox, 2000).



**Fig. 4.** Reacción catalizada por la malato deshidrogenasa (Nelson y Cox, 2000).

#### 2.4.1. MALATO:QUINONA OXIDOREDUCTASA

En varias bacterias gram-positivas y gram-negativas tales como *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *E. coli* y *Corynebacterium glutamicum*, se ha detectado otra enzima que cataliza la interconversión entre malato y oxaloacetato denominada malato:quinona oxidoreductasa (EC 1.1.99.16) (MQO), pero a diferencia de la MDH que se encuentra en citoplasma, esta enzima se asocia a la membrana celular y no usa  $\text{NAD}^+$  como aceptor de electrones, sino que éstos son donados a quinonas u otros aceptores artificiales en condiciones *in vitro*. En algunos organismos como *Mycobacterium smegmatis* y *Pseudomonas ovalis* no se encontró MDH dependiente de  $\text{NAD}^+$ . La actividad de MQO usualmente requiere cofactores adicionales como  $\text{FAD}^+$ , quinonas, lípidos o detergentes (Molenaar *et al.*, 1998). La  $\Delta G^\circ$  para la oxidación de malato por la MDH es de +28.6 kJ/mol, mientras que la  $\Delta G^\circ$  de la reacción catalizada por la MQO es de -55 o -18.9 kJ/mol dependiendo si el aceptor es ubiquinona o menaquinona respectivamente; esto sugiere que cuando ambas enzimas están presentes al mismo tiempo, catalizan la reacción en direcciones opuestas (Molenaar *et al.*, 2000).

En *Corynebacterium glutamicum*, las actividades de MQO, MDH y succinato deshidrogenasa (SDH) se regulan coordinadamente en respuesta a la fuente de carbono,

mostrando una menor actividad al crecer en glucosa que en sustratos como lactosa, piruvato o acetato en los que se requiere una mayor actividad del ciclo de Krebs para el crecimiento. MQO es la enzima principal para la catálisis de la oxidación de malato a oxaloacetato (Molenaar *et al.*, 2000).

En *E. coli* la expresión del gen de *mgo* también se regula por la fuente de carbono, mostrando una menor expresión al crecer en glucosa como fuente de carbono, que en manitol, glicerol, lactato, succinato, malato, acetato y la mayor expresión se observa al crecer en piruvato. La expresión de esta enzima parece estar bajo represión catabólica al igual que los genes *mdh* y *sdh* (succinato deshidrogenasa). La actividad de esta enzima fue muy alta durante la fase de crecimiento exponencial y disminuye dramáticamente al entrar en fase estacionaria. Tanto MDH como MQO están presentes al mismo tiempo en esta bacteria; sin embargo, no se ha encontrado un papel significativo de MQO en la oxidación de malato aunque en mutantes con delección en el gen de *mdh*, la MQO sustituye parcialmente sus funciones (Rest van der *et al.*, 2000).

#### **2.4.2. ISOFORMAS DE MDH**

Se han identificado muchas isoformas de MDH, las cuales difieren en su localización subcelular y en su especificidad por el cofactor ( $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ ) (Mikulášová *et al.*, 1998). En células eucarióticas se encuentran al menos dos isoformas de MDH; una mitocondrial y una citosólica (Gietl, 1992). En *Saccharomyces cerevisiae* hay 3 isoformas de esta enzima: la MDH1 se encuentra en la mitocondria y es la que participa en el ciclo de Krebs. La interrupción en este gen causa incapacidad de crecer en acetato como fuente de carbono, siendo este un fenotipo compartido con otras levaduras mutadas en genes que codifican para otras enzimas de este ciclo; la MDH2 participa en la gluconeogénesis, es una enzima citosólica y también es requerida para crecer en acetato como fuente de carbono al igual que otras enzimas gluconeogénicas como la PEPcarboxicinasas; la MDH3 se encuentra en el peroxisoma y participa en el ciclo del glioxalato (Gibson y McAlister-Henn, 2003). En *Methanobacterium thermoautotrophicum* se encuentran dos malato deshidrogenasas; una es específica para  $\text{NAD}^+$  y cataliza la deshidrogenación de malato aproximadamente a un tercio de la velocidad a la que cataliza la reducción de oxaloacetato; la otra puede utilizar igualmente  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$  como coenzimas y cataliza esencialmente solo la reducción de oxaloacetato (Thompson *et al.*, 1998). En la mayoría de las malato deshidrogenasas

eucarióticas y bacterianas, la eficiencia con NADP(H) no excede del 1.5% de la eficiencia con NAD(H) (Benveniste y Munkres, 1970), excepto la MDH de cloroplastos de plantas que es específica para NADPH (Issakidis *et al.*, 1992), la MDH de *Methanothermobacter ferredoxianus* (Honka *et al.*, 1990) y una MDH de *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Thompson *et al.*, 1998).

### 2.4.3. PESO MOLECULAR Y SUBUNIDADES

Las MDHs son enzimas homomultiméricas con subunidades de peso molecular de 30 a 40 kDa. Estas enzimas son casi siempre homodímeros u homotetrámeros (Sundaram *et al.*, 1980; Bonneté *et al.*, 1993; Maloney *et al.*, 2004) aunque se ha reportado un solo caso de MDH homooctamérica en *Nitzschia alba* (Yueh *et al.*, 1989) y una tetramérica con dos subunidades diferentes ( $\alpha$  y  $\beta$ ) en *Neurospora crassa* (Munkres, 1970). Las MDHs se dividen en dos grupos filogenéticos, en el primero se encuentran las MDHs homodiméricas, mientras en el segundo se encuentran las MDHs más cercanamente emparentadas a las lactato deshidrogenasas (LDH) por lo cual son homotetraméricas (Madern, 2002) aunque se ha reportado un solo caso en *Archaeoglobus fulgidus* una enzima homodimérica perteneciente a este grupo (Irimia *et al.*, 2004).

Cada subunidad de MDH contiene dos dominios estructural y funcionalmente diferentes; el sitio de unión al dinucleótido y el sitio activo. El primer dominio, es similar en estructura y función a otras enzimas dependientes de nicotinamida dinucleótido (Langelandsvik *et al.*, 1997).

El dominio catalítico contiene seis aminoácidos involucrados en la catálisis. Éstos están muy conservados entre especies encontrándose también en las LDHs aunque los aminoácidos involucrados en la especificidad a sustrato son diferentes (Langelandsvik *et al.*, 1997). El residuo 53 es importante para la unión a la coenzima, en las MDHs dependientes de  $\text{NAD}^+$ , este sitio corresponde a aspartato pero en las MDHs de cloroplastos de plantas, específicos de  $\text{NADP}^+$ , este sitio corresponde a glicina. Hay 3 residuos de arginina (R102, R109 y R171) que se encuentran conservados en todas las MDHs y son importantes para la unión a sustrato y la catálisis. Los residuos H195 y la D168 se encuentran muy conservados en todas las MDHs y LDHs secuenciadas lo que sugiere que ambas enzimas operan mediante un mecanismo similar (Goward y Nicholls, 1994).



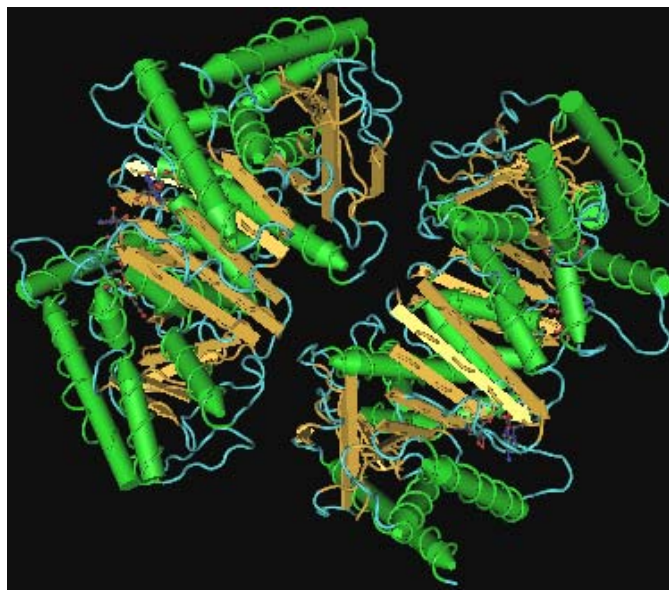
#### 2.4.4. ESTRUCTURA PRIMARIA, SECUNDARIA Y TERCIARIA DE MDH

Se ha reportado una gran cantidad de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de MDHs de eucariontes, arqueobacterias y eubacterias (Welch y Bartlett, 1997) y se ha observado que la estructura secundaria se encuentra relativamente conservada entre especies y consta de aproximadamente 40%  $\alpha$ -hélice, 20% hojas- $\beta$  y 40% asas (Maloney *et al.*, 2004).

Las secuencias de aminoácidos de las MDHs que participan en el ciclo de Krebs bacterianas y eucarióticas son muy similares, de tal forma que la MDH de *E. coli* es 58% idéntica a la de mitocondria de puerco, lo cual concuerda con la teoría endosimbiótica de la evolución de las mitocondrias (Welch y Bartlett, 1997).

Se ha identificado una secuencia consenso amino-terminal para MDHs de seis cepas de actinomicetos, incluyendo una especie de *Streptomyces* (*S. atratum*), también se ha obtenido la secuencia amino-terminal de *S. aureofaciens* (Mikulášová *et al.*, 1998). Esta secuencia se encuentra muy conservada en MDHs procarióticas y mitocondriales (Maloney *et al.*, 2004). Así, la secuencia de aminoácidos del extremo amino-terminal reportada para *S. aureofaciens* (TRTPVNVTVTGAAGQIGYAL) presenta un 100% de identidad con las reportadas para *S. coelicolor*, *S. atratus*, *S. avermitilis*, *Kibdelosporangium aridum* y *Thermobifida fusca* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Las MDHs de muchos organismos se han cristalizado, tales como las de *Thermus flavus* (Kelly *et al.*, 1993), *Aquaspirillum arcticum* (Kim *et al.*, 1999), *Haloaracula marismortui* (Richard *et al.*, 2000), *Archaeoglobus fulgidus* (Irimia *et al.*, 2004) y *E. coli* (Hall *et al.*, 1992) (Fig. 5). Entre MDHs lejanamente relacionadas, hay generalmente una baja identidad, en ocasiones menor al 20%; a pesar de esto, la estructura tridimensional es esencialmente idéntica entre las diferentes MDHs y LDHs (Goward y Nicholls, 1994).



**Fig. 5.** Estructura tridimensional de la malato deshidrogenasa de *Escherichia coli* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

#### **2.4.5. pH ÓPTIMO**

Tanto para procariontes como para eucariontes, los valores de pH óptimo reportados para la reducción de oxaloacetato por malato deshidrogenasa se encuentran entre 7 y 8 incluyendo a la MDH de *S. aureofaciens*, que tiene un pH óptimo de 8 (Mikulášová *et al.*, 1998), mientras que para la oxidación de malato el valor aproximado es de 10 (Tabla 1). Se ha aceptado que la His195 es un residuo clave para la actividad de MDH, ya que debe protonarse por la unión a oxaloacetato y desprotonarse por unión a malato, lo que explica que el valor de pH óptimo se encuentre tan conservado entre especies (Ingold y Hudson, 1993).

#### **2.4.6. OTRAS VÍAS EN QUE PARTICIPA MDH**

El oxaloacetato actúa como precursor de varias vías biosintéticas dando lugar a aminoácidos, nucleótidos y azúcares y es a su vez restituido en el ciclo por medio de vías anapleróticas (Nelson y Cox, 2000). Así, esta enzima participa en diversas actividades metabólicas además del ciclo de Krebs, tales como la biosíntesis de aspartato y la gluconeogénesis (Banaszak y Bradshaw, 1975) y forma parte de vías biosintéticas como el ciclo del glioxalato y la producción de succinil-CoA a partir de

oxaloacetato. Esta última vía ocurre principalmente en condiciones anaeróbicas y la reacción se realiza en dirección de oxaloacetato a malato, es decir, en sentido contrario al ciclo de Krebs, sin embargo, en *E. coli* se ha reportado en condiciones aeróbicas con glucosa como fuente de carbono cuando la energía requerida por la célula es satisfactoriamente proporcionada por la glucólisis (Nimmo, 1987).

Microorganismo	pH óptimo reducción	pH óptimo oxidación	Fuente
<i>P. stutzeri</i>	8	10.5	Labrou y Clonis, 1997
<i>Vibrio sp.</i>	8	9.5	Ohkuma <i>et al.</i> , 1996
<i>T. emersonii</i>	7.5	10	Maloney <i>et al.</i> , 2004
<i>S. aureofaciens</i>	8		Mikulášová <i>et al.</i> , 1998
<i>S. ruber</i>	7.5		Madern y Zaccai 2004
<i>H. marismortui</i>	7.6		Madern y Zaccai 2004
Corazón de pollo	7.8	10	Kitto y Kaplan, 1966
<i>Ilyanassa obsoleta</i>	7.9		Meizel y Markert, 1967
<i>Bacillus</i> termofílico	7.5-8.0	11-11.5	Wynne <i>et al.</i> , 1996

**Tabla 1.** pH óptimo de la malato deshidrogenasa reportado para varios organismos

#### 2.4.7. RELACIÓN ENTRE MDH Y OTRAS ENZIMAS EN CITOPLASMA

La MDH2 de *Saccharomyces cerevisiae*, enzima citosólica que participa en la gluconeogénesis, se relaciona *in vivo* con la PEP carboxiquinasa y la fructosa-1,6-bifosfatasa facilitando el flujo metabólico a través de la gluconeogénesis. Se ha sugerido que esta enzima se inhibe cuando el organismo crece en presencia de glucosa como fuente de carbono; ésto puede mostrar una ventaja fisiológica al remover las enzimas que interfieren con la velocidad de la glicólisis (Gibson *et al.*, 2003).

#### 2.4.8. UBICACIÓN EN EL CROMOSOMA

Tanto en *Thermus flavus* (Nishiyama *et al.*, 1991) como en *T. thermophilus* (Park y Kilbane, 2004) y en *T. aquaticus* (Nicholls *et al.*, 1990) el gen que codifica para MDH (*mdh*) se encuentra en un operón junto a los genes que codifican para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la succinil-CoA sintetasa (*scsA* y *B*); el codón de término de *scsB*

se sobrelapa con el de inicio de *scsA* y la región intercistronica entre *scsA* y *mdh* es muy corta. En *E. coli*, el gen *mdh* se encuentra ubicado en el minuto 70 de su cromosoma circular, alejado de los demás genes que codifican para enzimas del ciclo de Krebs (Nimmo, 1987).

#### **2.4.9. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MDH**

En general, las MDHs dependientes de  $\text{NAD}^+$  no están sujetas a regulación a nivel de actividad, a excepción de la enzima mitocondrial que depende de control alostérico por citrato. En cambio las LDHs de eubacterias están sujetas a regulación alostérica por fructosa 1,6-bifosfato (Goward y Nicholls, 1994).

Frecuentemente se ha observado que altas concentraciones de oxaloacetato tienen un efecto inhibitorio sobre la malato deshidrogenasa (Madern y Zaccari, 2004; Labrou y Clonis, 1997; Langelandsvik *et al.*, 1997); sin embargo, la actividad de la MDH de *S. aureofaciens* no se vio afectada a altas concentraciones de sustrato (Mikulášová *et al.*, 1998). Ésta es la única MDH que se ha caracterizado bioquímicamente en estreptomicetos.

La MDH de algunos organismos como *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Archaeoglobus fulgidus* y *E. coli* también se inhibe por NADH (Thompson *et al.*, 1998; Langelandsvik *et al.*, 1997; Nimmo, 1987). La de *M. thermoautotrophicum* se inhibe además por NADPH, mientras que la de *A. fulgidus* por malato (Langelandsvik *et al.*, 1997). En *Pseudomonas stutzeri* esta enzima se inhibe no solo por oxaloacetato, sino también por ADP,  $\alpha$ -cetoglutarato y ácido oxálico; el citrato inhibe cuando la reacción va en dirección de oxaloacetato a malato y activa en dirección de malato a oxaloacetato (Labrou y Clonis, 1997).

#### **2.4.10. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA SÍNTESIS Y ACTIVIDAD DE MDH**

Para varios microorganismos se ha reportado que la expresión del gen *mdh* esta regulada por la fuente de carbono. Por ejemplo, en *T. thermophilus*, la expresión del operón en el que se encuentra *mdh* varía en un rango de dos veces dependiendo de la fuente de carbono, pero en todos los casos hay expresión mostrando un nivel basal constitutivo. Se observa una menor expresión al crecer en MM con glucosa o en MC; la

mayor expresión se observa al crecer en presencia de malato, seguida de succinato, piruvato y glutamato (Park y Kilbane, 2004).

En 1966, Gary y colaboradores y en 1985, Sutherland y cols. demostraron que la cantidad de MDH en células de *E. coli* se reduce en presencia de glucosa y en condiciones anaeróbicas y se induce por acetato y malato. En 1995, Park y cols. confirmaron que la expresión de este gen se regula por represión catabólica, mostrando una menor expresión al crecer en medio completo Luria (LB) o en medio mínimo con glucosa, que al crecer en MM con otras fuentes de carbono tales como glicerol, piruvato, acetato, fumarato y succinato. La mayor expresión se observa en piruvato, la cual es aproximadamente 10 veces mayor a la observada en LB con glucosa en condiciones aeróbicas. En condiciones aeróbicas se observa aproximadamente el doble de expresión que en condiciones anaeróbicas. El producto del gen *arcA* es un regulador negativo de la expresión del gen *mdh*, mostrando un efecto regulatorio mucho más fuerte en condiciones anaeróbicas. Los patrones de regulación por la fuente de carbono observados para el gen *mdh* son similares a los reportados para citrato sintasa (*gltA*) y para succinato deshidrogenasa (*sdhCDAB*) (Park *et al.*, 1995).

En *Corynebacterium glutamicum*, las actividades de MQO, MDH y SDH se regulan coordinadamente en respuesta a la fuente de carbono. En orden ascendente la actividad de estas tres enzimas en las diferentes fuentes de carbono fue la siguiente: glucosa, fructosa, manitol, lactato, piruvato y la mayor actividad se obtuvo en acetato. Estas tres enzimas mostraron respectivamente 3.4, 3.1 y 1.8 veces mayor actividad al crecer en acetato que en glucosa (Molenaar *et al.*, 2000).

En *T. emersonii* se realizaron análisis de Northern blot para determinar las diferencias en la transcripción de *mdh* al crecer al hongo en diferentes fuentes de carbono (glucosa, galactosa, lactosa, trealosa, melibiosa, rafinosa, xilano, pectina cítrica y pectina cítrica con glucosa). En todas las muestras se observó expresión, lo cual concuerda con el sobreentendido de que las enzimas del ciclo de Krebs son constitutivas; sin embargo, se observaron diferencias en la intensidad de las bandas, lo cual muestra el efecto de sustratos inductores en la expresión de *mdh*. En general, se observó un mayor nivel de expresión en monosacáridos y disacáridos como glucosa, galactosa, melibiosa y trehalosa. El nivel de expresión fue notablemente menor en oligosacáridos y polisacáridos como rafinosa, xilano y pectina cítrica. Esto puede reflejar una mayor rapidez metabólica al crecer al organismo en fuentes de carbono más simples (Maloney *et al.*, 2004).

#### **2.4.11. EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE MDH A TRAVÉS DEL TIEMPO DE CRECIMIENTO**

En *E. coli* se observó una relación inversamente proporcional entre la velocidad de crecimiento y la expresión del gen *mdh* (Park *et al.*, 1995).

La expresión de *mdh* a través del tiempo de crecimiento de *T. emersonii*, al crecer en pectina como fuente de carbono, se mantuvo constante (Maloney *et al.*, 2004), mientras la MDH de *S. coelicolor* mostró un patrón asociado al crecimiento, con una alta expresión durante las fases de crecimiento y una marcada disminución en las fase de transición y estacionaria (Novotna *et al.*, 2003).

#### **2.4.12. FILOGENIA DE MDH**

La L-MDH dependiente de NAD(P)<sup>+</sup>, la L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) dependiente de NAD<sup>+</sup> y la alcohol deshidrogenasa (ADH) son miembros de una superfamilia de deshidrogenasas y se encuentran distribuidas en los tres dominios: arqueobacterias, eubacterias y eucariotas (Banaszak y Bradshaw 1975; Birktoft *et al.*, 1989). La L-lactato deshidrogenasa cataliza la interconversión entre piruvato y lactato durante la fermentación láctica. La alcohol deshidrogenasa participa en la reducción de acetaldehído a etanol para la fermentación alcohólica. Se han hecho estudios filogenéticos sobre la relación entre L-MDH y L-LDH que claramente muestran que dos eventos ancestrales de duplicación génica son necesarios para explicar la existencia de dos funciones enzimáticas y de tres grupos principales en la superfamilia: L-LDH, (LDH-like) L-MDH y L-MDH. Los tres tipos de enzimas se han reportado tanto en eubacterias como en eucariotas, sin embargo, en arqueobacterias solo se han encontrado la (LDH-like) L-MDH y la LDH (Madern, 2002).

### **2.5. *Saccharopolyspora erythraea***

*Saccharopolyspora erythraea* es el principal microorganismo productor de eritromicina, antibiótico sintetizado a partir de una molécula de propionil-CoA y 6 moléculas de metilmalonil-CoA, las cuales provienen del succinil-CoA, un intermediario del ciclo de Krebs (Cortés *et al.*, 1995).

Esta bacteria tiene una alta similitud con los estreptomicetos. Anteriormente se le denominaba *Streptomyces erythraeus* hasta que, en 1987 Labeda lo reclasificó

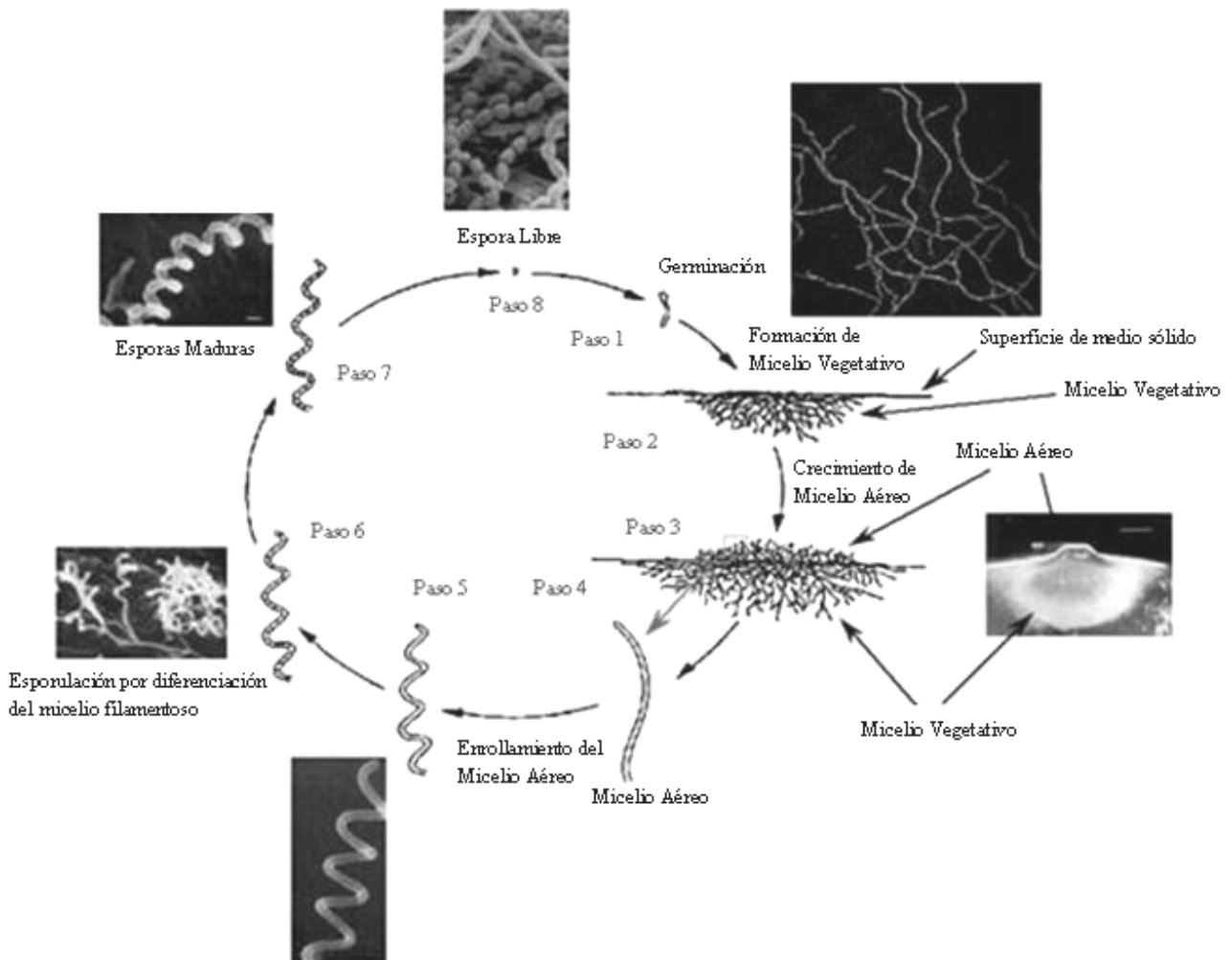
colocándolo en el género *Saccharopolyspora* ya que su pared celular contiene ácido meso-diaminopimélico, arabinosa y galactosa. Este género muestra gran similitud con otros géneros de actinomicetos tales como *Nocardiaceae*, *Nocardiopsis* y *Streptomyces* (Williams *et al.*, 1984).

Este microorganismo pertenece a la orden Actinomycetales y a la familia Pseudonocardiaceae ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). La mayoría de las actinobacterias presentan metabolismo oxidativo aunque algunos taxa son fermentativos; la lisina es el más común diaminoácido en la pared celular. El término “nocardiforme” se refiere a actinomicetos que forman micelio que se rompe en elementos pequeños; los miembros de esta familia son organismos Gram positivos, aeróbicos y con DNA rico en guanina y citosina.

Los miembros del género *Saccharopolyspora* presentan un ciclo de vida complejo con un crecimiento vegetativo filamentoso, formación de hifas aéreas y diferenciación de estas hifas en cadenas de esporas (Fig. 6), su micelio está bien desarrollado y ramificado. El micelio aéreo se encuentra segmentado en cadenas de esporas. Estas bacterias son resistentes a muchos antibióticos pero susceptibles a lisozima. Son quimioheterótrofos y su cromosoma es lineal (Paradkar *et al.*, 2003).

Tanto *Sac. erythraea* como *Streptomyces* son bacterias que habitan en el suelo, donde actúan como organismos saprófitos. En este ambiente hay una gran cantidad de microbios que compiten por los nutrientes, incluyendo bacterias, hongos y protistas, es por eso que el suelo es un ambiente pobre en nutrientes u oligotrófico. *Sac. erythraea* y *Streptomyces* son oligótrofos facultativos, ya que son capaces de crecer tanto en un ambiente oligotrófico como en un ambiente rico en nutrientes (Hodgson, 2000).

Los actinomicetos, en general, son microorganismos muy importantes biotecnológicamente, ya que son capaces de producir una gran variedad de metabolitos secundarios, de los cuales se obtiene el 70% de los antibióticos usados en la clínica para combatir enfermedades, así como también muchas enzimas hidrolíticas usadas en la industria (Morosoli *et al.*, 1997).



**Fig. 6.** Ciclo de vida de *Streptomyces* y *Saccharopolyspora erythraea* ([http://home.hiroshimau.ac.jp/mbiotech/hosenkin\\_lab/Strepto\(Eng\).html](http://home.hiroshimau.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto(Eng).html)).

Las vías y regulación del metabolismo secundario en actinomicetos han sido muy estudiados por su interés industrial; sin embargo, se conoce muy poco sobre su metabolismo primario a pesar de que éste proporciona los precursores para el metabolismo secundario (Hodgson, 2000).

En el caso de *Sac. erythraea* existe muy poca información acerca del metabolismo primario, por lo que se ha tomado como base la información publicada para otros actinomicetos, particularmente *Streptomyces*.



En este sentido, Novotna y colaboradores (2003) realizaron análisis proteómicos en *Streptomyces coelicolor*, los cuales muestran que la actividad de enzimas del metabolismo central que participan en la glucólisis, el ciclo de Krebs, almacenamiento de nutrientes y proteólisis presentan patrones identificables de síntesis que concuerdan lógicamente con la etapa de crecimiento del cultivo. Estos estudios también muestran una regulación interactiva entre el metabolismo y el sistema de respuesta a estrés.

En varios estreptomicetos como *S. aureofaciens*, *Streptomyces C5*, *S. coelicolor* y *S. lividans* se ha comprobado que la PEP carboxilasa es la enzima involucrada en la formación anaplerótica de oxaloacetato. Además, en *S. aureofaciens* se ha reportado la presencia de la enzima málica, la cual es responsable de restituir el malato al ciclo mediante la interconversión entre piruvato y malato. En *Streptomyces murayamaensis* y *Streptomyces verticillatus* se reportó la presencia de la fosfato dicinasa, que es responsable de la interconversión entre piruvato y PEP (Hodgson, 2000).

En *S. aureofaciens*, *S. lividans*, *S. coelicolor*, *S. arena*, *S. clavuligerus* y *S. collinus* se ha demostrado la presencia de malato sintasa al crecer en compuestos C2, aunque en ninguno de estos casos se encontró actividad de isocitrato liasa, es por eso que se ha sugerido la existencia de una ruta alternativa a la vía del glioxalato en estreptomicetos (Hodgson, 2000).

A pesar de que a partir del succinil-CoA, un intermediario del ciclo de Krebs, se sintetizan los dos precursores de la molécula de eritromicina, hasta la fecha solo se han reportado tres artículos sobre la actividad y propiedades de las enzimas del ciclo de Krebs en esta bacteria (Mironov *et al.*, 2004).

Lum *et al.* (2004) analizaron los niveles de transcripción de genes de *Sac. erythraea* utilizando microarreglos con las secuencias de genes de *S. coelicolor*. Éstos mostraron que los genes relacionados con el crecimiento se reprimen a las 20 horas de cultivo, sin embargo, el gen que codifica para la succinil-CoA sintetasa es el único gen de enzimas del ciclo de Krebs que muestran en sus resultados.

En nuestro grupo estamos interesados en las rutas de formación de los precursores que dan origen a la eritromicina y en consecuencia en las enzimas que participan en el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Resultados obtenidos previamente mostraron que la actividad específica de isocitrato deshidrogenasa (ICDH) de *Sac. erythraea* mostró un perfil asociado al crecimiento, teniendo un máximo a las 72 h al crecer al microorganismo en MM con sacarosa y glicina como fuentes de carbono y nitrógeno; los niveles de esta enzima disminuyen considerablemente cuando el

organismo deja de crecer (Bermúdez *et al.*, 1998; Alvarado y Flores, 2003). Aparentemente, no hay un perfil común de actividad específica de ICDH en diferentes microorganismos. En *Bacillus subtilis*, la síntesis de la enzima ocurre al inicio de la fase estacionaria (Jin *et al.*, 1997), mientras que en *C. glutamicum* es constitutiva durante todas las fases de crecimiento (Eikmanns *et al.*, 1995).

Al crecer a *Sac. erythraea* en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20 ó 40 mM, la actividad de ICDH disminuyó en un 50% respecto a la obtenida con glicina como fuente de nitrógeno. Cuando se utilizó glucosa 55 mM (1%) la actividad fue aproximadamente 30% mayor que cuando se creció en glucosa 220 mM (4%); sin embargo, la actividad específica fue 3 y 1.7 veces mayor al crecer en glucosa 55 mM y 220 mM respectivamente, que la observada con sacarosa 55 mM. Así, la síntesis de ICDH fue reprimida por cloruro de amonio y estimulada por glucosa (Bermúdez *et al.*, 1998). Respecto a la regulación de ICDH, *Sac. erythraea* es similar a las archeobacterias *Anabaena* sp. y *Synechocystis* sp. ya que en estos organismos la síntesis de ICDH también se reprime por amonio (Muro *et al.*, 1996).

Alvarado y Flores (2003) reportaron que la actividad específica de la ICDH de *Sac. erythraea* incrementó dos veces al crecer en presencia de glucosa o fructosa, mientras que en presencia de sacarosa, galactosa, lactosa y almidón, la actividad específica aumentó 20-60% sobre los niveles basales obtenidos con piruvato. Estas diferencias no se debieron a los cambios en la velocidad de crecimiento. Resultados similares se obtuvieron para *Bradyrhizobium japonicum* donde la actividad específica de ICDH varió en un rango de aproximadamente dos veces dependiendo de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento (Green *et al.*, 1998) y se han reportado variaciones en varias bacterias entéricas como *E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Serratia marcescens* al crecerlas en diferentes fuentes de carbono (Bennett y Holms, 1975).

La caracterización de la ICDH de *Sac. erythraea* mostró valores de  $K_m$  para isocitrato y  $\text{NADP}^+$  de 0.14  $\mu\text{M}$  y 0.026  $\mu\text{M}$  respectivamente. La enzima mostró un porcentaje de inhibición de entre 10 y 60% por ATP, ADP, GTP, ácido cítrico, oxaloacetato,  $\alpha$ -cetoglutarato, glioxalato y glioxalato mas oxaloacetato (Alvarado y Flores, 2003).

### 3. OBJETIVOS

- Observar el efecto de la fuente de carbono sobre el perfil de actividad de la MDH de *Sac. erythraea*.
- Realizar la purificación parcial de la malato deshidrogenasa de *Sac. erythraea* para determinar las siguientes características fisicoquímicas:
  - Peso molecular de la enzima nativa y de sus subunidades
  - Constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$  para oxaloacetato y NADH

## 4. JUSTIFICACIÓN

- *Sac. erythraea* es el principal microorganismo productor de eritromicina. Los dos precursores de este antibiótico provienen del succinil-CoA, un intermediario del ciclo de Krebs; sin embargo no se ha estudiado a profundidad y a la fecha solo se han reportado tres artículos sobre la actividad y propiedades de enzimas pertenecientes a este ciclo en esta bacteria (Mironov *et al.*, 2004).
- Se ha observado que en *Sac. erythraea* la síntesis de ICDH (una de las primeras enzimas del ciclo de Krebs) está regulada por la fuente de carbono (Alvarado y Flores, 2003); es por eso que decidimos investigar si la síntesis de MDH (enzima que participa al final del ciclo) se regula de la misma forma ya que, de ser así podríamos sugerir que la expresión de los genes que codifican para enzimas del ciclo de Krebs en este microorganismo tienen un patrón de regulación común.
- La MDH se encuentra muy difundida en la naturaleza ya que es una enzima esencial que participa en muchas vías metabólicas tales como el ciclo de Krebs, el ciclo del glioxalato, la síntesis de aminoácidos y nucleótidos, la gluconeogénesis y el mantenimiento del balance oxidación / reducción. Por esta razón y porque existe un método fácil y económico de medir su actividad, la MDH ha sido caracterizada y aislada de fuentes muy diversas tales como eubacterias, arqueobacterias, hongos, plantas y animales y de organelos subcelulares como mitocondrias, cloroplastos, glioxisomas y peroxisomas; sin embargo, en actinomicetos ha sido poco estudiada por lo cual resulta importante analizar sus características en estos organismos y compararlas con lo reportado previamente.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. MICROORGANISMO**

*Saccharopolyspora erythraea* CA340, microorganismo productor de eritromicina, se obtuvo de Abbott Laboratories, IL., EUA.

### **5.2. CONSERVACIÓN DE LA CEPA**

El microorganismo se mantuvo en cajas con medio sólido YEMES (4 g/l de extracto de levadura, 4 g/l de sacarosa, 10 g/l de extracto de malta y 15 g/l de agar) sembrándose cada mes.

### **5.3. CULTIVO**

Para la cuantificación del crecimiento y la obtención del extracto libre de células, se inocularon 50 ml de medio YEMEG líquido (Kieser *et al.*, 2000) contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, con  $10^8$  esporas de *Sac. erythraea* CA340 y se incubaron a 37°C con agitación rotatoria (200 rpm) por 48 horas. Después de este tiempo, se centrifugó el micelio, se lavó asépticamente y se resuspendió en el mínimo volumen de agua estéril. Con esta suspensión de micelio se inocularon 500 ml de medio mínimo (MM) contenidos en un matraz Fernbach de 2800 ml. El MM contenía por litro: 2.5 g de  $K_2HPO_4$ , 5 g de NaCl, 0.5 g de  $MgSO_4$ , 0.5 g de  $FeSO_4$ , 0.05 g de  $ZnSO_4$ , 0.001 g de  $MnCl_2$ , 0.001 g de  $CoCl_2$ , 10 g de fuente de carbono, 2 g de glicina como fuente de nitrógeno y 10 g de buffer MOPS. El pH se ajustó a 7.8 con NaOH 1N. Los matraces se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm (Flores y Sánchez, 1985).

### **5.4. CUANTIFICACIÓN DE CRECIMIENTO**

El crecimiento se cuantificó como proteína por el método de Lowry usando albúmina sérica bovina como estándar, de acuerdo a la metodología reportada por Flores y Sánchez (1985).

## **5.5. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS**

A los diferentes tiempos de incubación, el micelio se recuperó por centrifugación a 5,000 rpm, se lavó una vez con buffer Tris-HCl 0.01M, pH 7.0 con 35 µg/ml de PMSF, 0.3 mg/ml de EDTA y 1 mM de DTT (buffer A) y se resuspendió en 5 ml de este mismo buffer por cada gramo de pellet. Posteriormente se sonicó en un equipo Vibra-Cell Modelo 9130 durante 1 minuto en intervalos de 15 s en hielo. Para separar los restos celulares se centrifugó a 18,000 rpm por un lapso de 30 min a 4°C. El extracto libre de células (ELC) se usó para la determinación de actividad y para las electroforesis de proteínas. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina sérica bovina como estándar. Se realizaron las determinaciones por lo menos por triplicado en todos los casos.

## **5.6. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE MALATO DESHIDROGENASA**

La actividad de la enzima fue ensayada midiendo la disminución en la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NADH. La mezcla de reacción contenía 0.01M de buffer Tris-HCl, pH 7.0 (buffer B), 0.1 mM de NADH, 0.3 mM de ácido oxaloacético y 2.5 µg de proteína en un volumen final de 1 ml (Mikulášová *et al*, 1998). La reacción se inició por adición de la enzima e inmediatamente se leía la disminución en la absorbancia a 340 nm a temperatura ambiente en función del tiempo en un espectrofotómetro Shimadzu Modelo UV-1201. La actividad volumétrica se reportó en µmoles de NADH oxidado por minuto por ml de enzima. La actividad específica se reportó en µmoles de NADH oxidado por min por mg de proteína. En todos los casos la actividad se midió por lo menos por triplicado.

## **5.7. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL PERFIL DE ACTIVIDAD DE LA MDH**

Se creció a *Sac. erythraea* CA340 en matraces Fernbach con 500 ml de MM con las siguientes fuentes de carbono: glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, almidón, acetato de sodio y lactosa a una concentración de 10 g/l. Se tomaron muestras cada 24 h de cultivo desde 0 hasta 120 h para medir actividad y cuantificar

crecimiento. Las muestras de tiempo cero se midieron en el YEMEG utilizado para inocular el MM tomando en cuenta la dilución. El experimento con cada fuente de carbono se realizó por lo menos dos veces.

## **5.8. ELECTROFORESIS DE POLIACRILAMIDA Y TINCIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS GELES**

La electroforesis de las muestras se llevó a cabo en geles al 12.5% de acrilamida siguiendo la metodología reportada por Bollag *et al* (1996) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y no desnaturalizantes (ND-PAGE). Las proteínas se tiñeron con la técnica de nitrato de plata cuando se encontraban en baja concentración (2 a 10 ng de proteína por banda) y con azul de Coomassie cuando se tenían altas concentraciones de proteínas (0.1 a 1 µg de proteína por banda).

## **5.9. IDENTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MDH EN GELES DE POLIACRILAMIDA (ZIMOGRAMA)**

Para la identificación de las bandas de actividad en los geles ND-PAGE, se agregaron 15.43 mg de NADH a 70 ml del buffer de electroforesis y después del corrimiento, los geles se lavaron dos veces por 10 min en buffer Tris-HCl 0.01M, pH 7.0 (buffer B). Después se colocaban en 15 ml de una mezcla de reacción conteniendo 10 mg de oxaloacetato y 5 mg de NADH. Después de unos minutos de incubación a temperatura ambiente, los geles se colocaban sobre un transiluminador bajo luz UV y se observaban bandas oscuras de actividad sobre un fondo claro (Manchenko, 1994).

## **5.10. PURIFICACIÓN DE LA MDH DE *Sac. erythraea* CA 340**

Se corrieron cuatro geles no desnaturalizantes (ND) con 12.5 % de acrilamida colocando 500 µl del ELC de *Sac. erythraea* crecida en MM con fructosa como fuente de carbono en cada uno de ellos (un solo pozo). Se realizaron los zimogramas, se cortó la banda que mostró actividad de MDH y posteriormente se rompió la malla de poliacrilamida por homogeneización con un pistilo de teflón y se separó la proteína contenida en el gel por centrifugación (10 min a 5,000 rpm). La proteína

extraída fue sometida a electroforesis ND-PAGE y SDS-PAGE, los cuales se tiñeron para proteínas con el método de nitrato de plata para verificar la pureza de la enzima.

### **5.11. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES $K_m$ Y $V_{max}$ DE LA MDH DE *Sac. erythraea* CA 340**

Para determinar las constantes para el oxaloacetato se midió actividad con 0.035  $\mu$ g de MDH purificada, manteniendo en la mezcla de reacción constante la concentración de NADH en 0.1 mM y variando la de oxaloacetato en un rango de concentraciones de 0.00375 a 2.4 mM.

Las constantes para NADH se obtuvieron midiendo actividad en un rango de concentraciones de 0.005 a 0.4 mM, manteniendo constante la concentración de oxaloacetato en 0.3 mM y se usaron 0.035  $\mu$ g de MDH purificada en cada reacción.

Los datos se analizaron mediante gráficas de dobles recíprocos (Copeland, 1996).

### **5.12. INDUCCIÓN DE LA MALATO DESHIDROGENASA POR FRUCTOSA**

Para ver el efecto de la concentración de fructosa en el patrón de actividad específica se creció a *Sac. erythraea* CA 340 en matraces Fernbach con MM con diferentes concentraciones de fructosa (5, 10, 20 y 40 g/l), se tomaron muestras cada 24 h de cultivo para medir actividad específica y crecimiento hasta las 120 h.

Para observar la inducción por fructosa se incubó a *Sac. erythraea* en 1000 ml de MM con glucosa durante 48 h a 37°C y agitación a 200 rpm. Entonces el micelio se centrifugó, se lavó y se resuspendió en el mínimo volumen de agua estéril y posteriormente se dividió en cinco partes iguales para inocular cada uno de los matraces Erlenmeyer que contenían 200 ml de MM con glucosa (10 g/l), glucosa con cloranfenicol (100  $\mu$ g/ml), fructosa (10 g/l), fructosa con cloranfenicol y el último sin fuente de carbono. En el matraz que no contenía fuente de carbono se tomó muestra en ese momento para actividad de MDH y crecimiento; este valor se consideró como tiempo cero. Los otros 4 matraces se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm y se tomaron muestras a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h para medir actividad y crecimiento. En los matraces con cloranfenicol, éste se agregó adicionalmente a las 12 y 36 h de cultivo.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La L-malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37) dependiente de  $\text{NAD(P)}^+$  cataliza la interconversión entre malato y oxaloacetato. Esta enzima es de suma importancia principalmente porque forma parte del ciclo de Krebs, aunque también participa en otras vías metabólicas esenciales tales como el ciclo del glioxalato, la gluconeogénesis y la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos. A pesar de su importancia, esta enzima ha sido muy poco estudiada en actinomicetos. En el caso de *Saccharopolyspora erythraea*, a partir de succinil-CoA, un intermediario del ciclo de Krebs se sintetizan los dos precursores de la molécula de eritromicina, es por esta razón que en nuestro grupo se decidió estudiar la regulación y propiedades de la isocitrato deshidrogenasa (ICDH), una de las primeras enzimas del ciclo (Bermúdez *et al.*, 1998; Alvarado y Flores, 2003), mostrando que la síntesis de esta enzima esta regulada por la fuente de carbono pero no por la fuente de nitrógeno. A partir de estos resultados se decidió estudiar el efecto de la fuente de carbono sobre la actividad de MDH con el fin de definir si la síntesis de ambas enzimas presenta un patrón de regulación común ya que de ser así podría sugerirse que la síntesis de todas las enzimas del ciclo de Krebs se regulan de la misma forma en esta bacteria.

### 6.1. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA MEDIR ACTIVIDAD DE MDH

Para cumplir con este objetivo fue necesario primero estandarizar el método para medir la actividad de esta enzima. Inicialmente el ELC se obtuvo como se reportó para ICDH (Alvarado y Flores, 2003). Con este extracto se procedió a medir actividad, la cual, como se ha reportado en gran cantidad de artículos (Maloney *et al.*, 2004; Labrou y Clonis, 1997; Mikulášová *et al.*, 1998; Madern, 2002; Nishiyama *et al.*, 1991) puede ser fácilmente detectable debido a que el NADH absorbe a 340 nm de longitud de onda. De esta forma, se prepara la mezcla de reacción en una celda de cuarzo y se cuantifica el aumento o la disminución en la absorbancia en función del tiempo debido a la aparición o desaparición de NADH respectivamente. Inicialmente, se intentó medir actividad en dirección oxidativa, es decir, de malato a oxaloacetato, sin embargo no se logró detectar actividad en esta dirección a pesar de que se usó ELC proveniente de *Sac. erythraea* crecida en MM con dos fuentes de carbono distintas (glucosa y lactosa), se intentó dializando y sin dializar el ELC, se utilizó buffer pH 7.5 y pH 8 y por último se intentó

con  $\text{NAD}^+$  y con  $\text{NADP}^+$ . Debido a que para los objetivos planteados en este estudio resultaba indistinto medir actividad en un sentido u otro, se decidió medirla solo en dirección de oxaloacetato a malato, lo cual ha sido reportado en varios artículos (Mikulášová *et al.*, 1998; Madern, 2002; Nishiyama *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1995). Para esto se preparó la mezcla de reacción tomando como modelo lo reportado para *Streptomyces aureofaciens* (Mikulášová *et al.*, 1998) e inmediatamente se observó la disminución en la absorbancia a 340 nm como resultado de la actividad de MDH de *Sac. erythraea*.

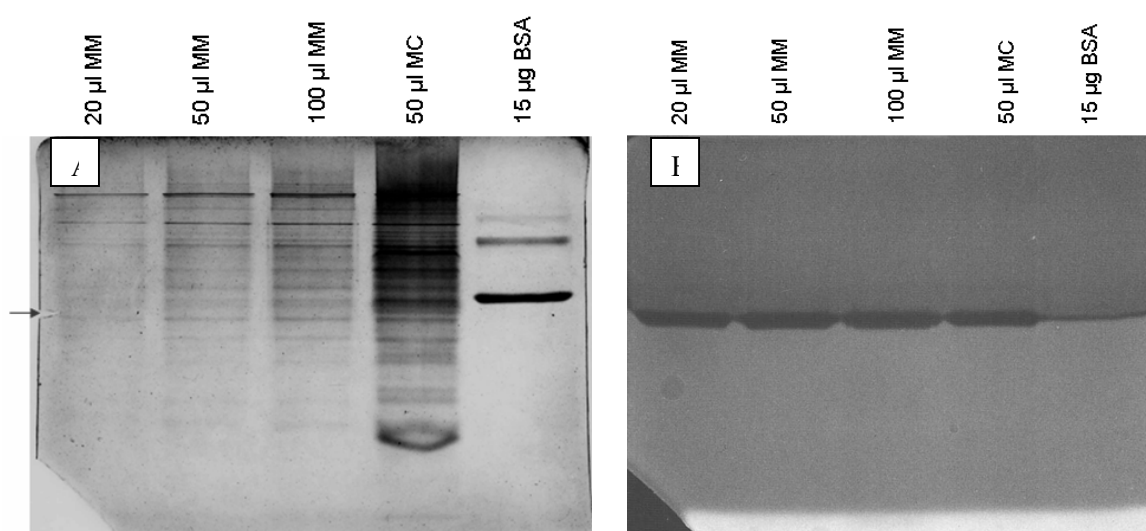
Posteriormente se estandarizaron las condiciones de reacción para obtener una adecuada medición de la actividad de MDH tomando en cuenta lo siguiente: 1) el sustrato y el cofactor deben estar en exceso en el coctel de reacción ya que el factor limitante de velocidad debe ser la enzima, 2) la actividad de muchas enzimas se ve afectada en altas concentraciones de sustrato, producto o cofactor, por lo tanto, se debe verificar que la cantidad de estas sustancias en el coctel no tengan un efecto negativo sobre la actividad de esta enzima y 3) la cantidad de NADH debe ser suficientemente baja para que el espectrofotómetro realice una buena detección de la absorbancia a 340 nm. Para determinar la concentración adecuada de NADH se midió actividad con diferentes concentraciones de este compuesto (25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{M}$ ). La actividad obtenida con NADH 25 y 50  $\mu\text{M}$  fue muy baja debido a que éste no se encontraba en exceso, con 300, 400 y 500  $\mu\text{M}$  la medición en el espectrofotómetro fue muy inexacta debido a la alta absorbancia obtenida. Con 100 y 200  $\mu\text{M}$  la actividad se mantuvo en su valor máximo. Con base en estos resultados se decidió utilizar NADH 100  $\mu\text{M}$  en cada reacción.

De esta forma, también se determinó la concentración adecuada de oxaloacetato para la mezcla de reacción, se comparó la actividad volumétrica obtenida al medir con oxaloacetato 75  $\mu\text{M}$  y 300  $\mu\text{M}$  utilizando ELC de 24, 48 y 84 hr de cultivo y no se observó diferencia significativa entre las actividades obtenidas. Al realizar los experimentos para determinar la estabilidad de este compuesto en congelación se determinó que éste se degrada lentamente a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , así la actividad volumétrica medida con oxaloacetato 75  $\mu\text{M}$  se ve afectada después de almacenar una solución stock de este compuesto durante 8 días a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ; en cambio la actividad calculada con oxaloacetato 300  $\mu\text{M}$  no se ve afectada al utilizar una solución stock congelada durante 8 días a esta temperatura (datos no mostrados), por lo tanto, se determinó utilizar oxaloacetato 300

$\mu\text{M}$  en la mezcla de reacción proveniente de una solución 3 mM de este compuesto, la cual se guardó congelada durante un máximo de 8 días.

## 6.2. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA ZIMOGRAMA DE MDH

Como no pudimos detectar actividad en dirección oxidativa decidimos no intentar realizar el zimograma utilizando los métodos indicados por Manchenko (1994) para esta enzima, ya que utilizan este sentido de la reacción, ocupando malato y  $\text{NAD}^+$  como sustratos. Fue por eso que decidimos estandarizar el método reportado por este autor para el zimograma de la gluconato reductasa para la MDH, ya que éste método se basa en la emisión de fluorescencia del NADH. En este sentido se prepararon geles ND-PAGE y SDS-PAGE y al buffer de electroforesis se agregó NADH. Después de la separación de las proteínas, el gel se incubó a temperatura ambiente en la mezcla de reacción y a los pocos minutos se observó en el gel ND-PAGE una banda oscura de actividad sobre un fondo claro causada por la desaparición de NADH en luz UV de onda larga (Fig. 7). En el gel SDS-PAGE no se detectó actividad bajo estas mismas condiciones, por lo que el gel se lavó tres veces para quitar el SDS del gel que podría estar inactivando a la enzima pero tampoco así se observó el zimograma. Esto puede deberse a que el gel SDS desnaturaliza a la proteína.



**Fig. 7.** Zimograma de MDH en geles ND-PAGE. Se usó ELC de 19 h de cultivo en MM o 24 h en MC. A, tinción de proteínas con azul de Coomassie, B, zimograma de MDH. La flecha indica a posición de MDH.

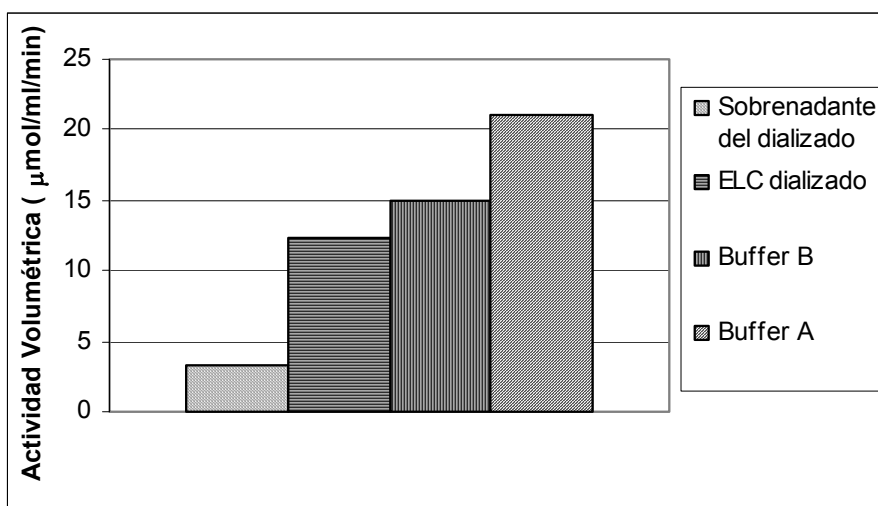
Al teñir el gel para proteínas se observó que la banda de MDH muestra un peso molecular menor al de la de albúmina y que esta banda se distingue bien de las otras bandas (Fig. 7 A). En el zimograma se observó perfectamente bien la banda de MDH aunque no se pueden distinguir las diferencias de grosor esperadas a causa de las diferencias de concentración de la enzima (Fig. 7 B).

También se probó agregando el NADH en el gel en vez de ponerlo en el buffer de electroforesis pero de esta forma no gelificó. Cuando no se agregó NADH todo el gel se ve oscuro ya que no absorbe la luz UV por lo que no se distingue la banda de actividad de MDH.

### 6.3. OBTENCIÓN DEL ELC

También fue necesario estandarizar el método para obtener el extracto libre de células (ELC) para evitar que haya pérdida, desnaturalización o inactivación de MDH a causa de este proceso, ya que la MDH es una enzima intracelular. Para esto, se comparó la actividad calculada con ELC obtenido mediante varios procedimientos.

En principio se probaron dos soluciones amortiguadoras diferentes para lavar y resuspender el micelio utilizado para obtener el ELC, obteniéndose mejores resultados con el buffer A (Fig. 8).



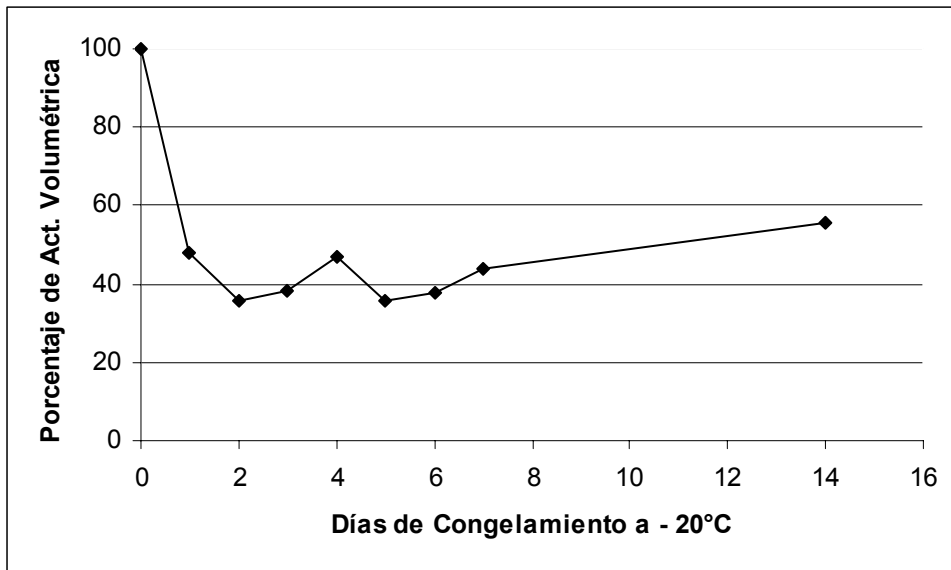
**Fig. 8.** Comparación de la actividad de MDH en diferentes condiciones de extracción.

El hecho de que se obtenga una mayor actividad en buffer A indica que la MDH es susceptible a la acción de proteasas y a la oxidación. También se dializó el ELC para eliminar metales, iones u otras moléculas pequeñas que podrían interferir en la actividad, tal y como ocurre para ICDH, sin embargo, este no fue el caso de MDH ya que su actividad no aumenta al dializar sino que por el contrario disminuye debido a que una pequeña cantidad de esta enzima se pierde en este proceso; esto se observa al detectar actividad de MDH en el sobrenadante del dializado (Fig. 8).

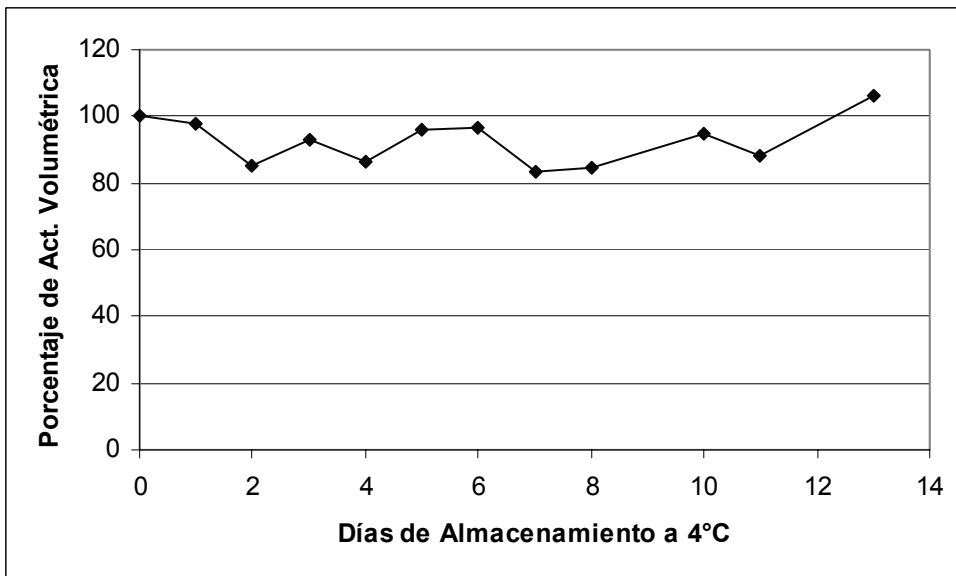
Para cumplir con los objetivos planteados en este estudio era necesario manejar una gran cantidad de muestras cada día, obtener el ELC, medir actividad y cuantificar las proteínas. Esto resultaba sumamente complicado, además de que en ocasiones era necesario verificar la actividad y la proteína cuantificadas previamente. Por estas razones fue necesario encontrar un método, mediante el cual, la actividad de MDH se conservara durante varios días ya sea en el micelio o en el ELC.

Inicialmente se intentó mantener el micelio o el ELC a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La actividad de MDH disminuyó aproximadamente en un 50% después de almacenar el ELC durante un día a esta temperatura, después de lo cual se mantuvo dentro de cierto rango (Fig. 9). La actividad tampoco se conservó en el micelio congelado durante una semana, mostrando solo un 70% de la actividad original. Estos resultados muestran que la actividad de MDH no se conserva ni congelando el micelio ni congelando el ELC.

Posteriormente se intentó mantener la actividad del ELC a  $4^{\circ}\text{C}$ . Como se puede observar en la Fig. 10, la actividad se conservó dentro de ciertos rangos aceptables durante 13 días a esta temperatura. Estos resultados concuerdan con varios artículos en los que se reporta la purificación de MDHs bacterianas y almacenan la enzima pura a  $4^{\circ}\text{C}$  (Langelandsvik *et al.*, 1997; van Kuijk y Stams, 1996; Wynne *et al.*, 1996); sin embargo, también hay varios artículos en los que reportan el almacenamiento de la MDH a  $-20^{\circ}\text{C}$ , entre estos se encuentran los artículos en los que estudian las MDHs de *Streptomyces aureofaciens* y de *Corynebacterium glutamicum* que al igual que *Sac. erythraea* son actinomicetos (Mikulášová *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 1998; Molenaar *et al.*, 2000).

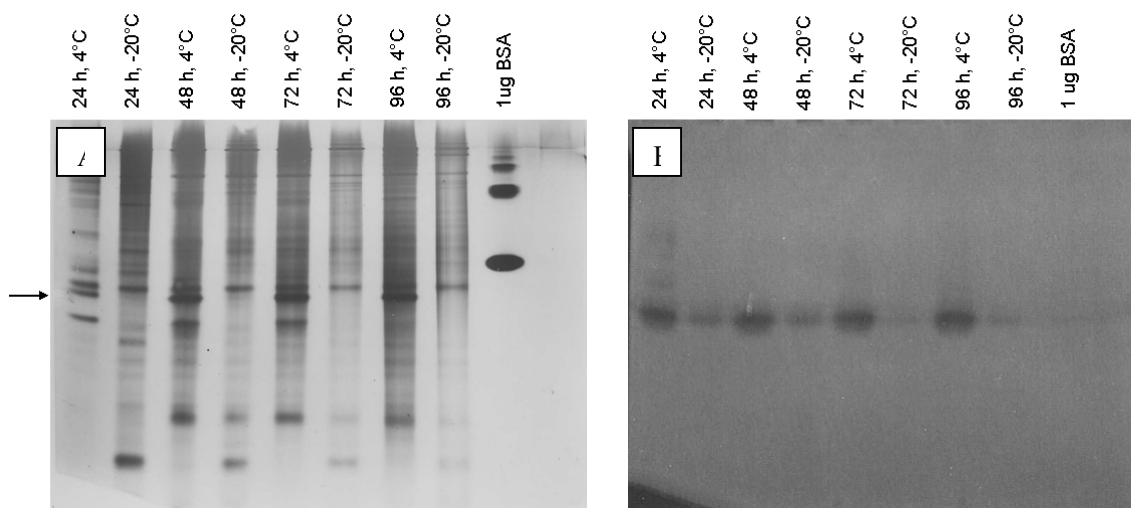


**Fig. 9.** Efecto de la congelación sobre la actividad de MDH.



**Fig. 10.** Efecto de la refrigeración (4°C) sobre la actividad de MDH.

Para establecer la razón por la cual se pierde actividad después de congelar se analizaron las proteínas y se realizó el zimograma en un gel ND-PAGE en el cual se corrieron muestras de ELC de diferentes horas de cultivo almacenado durante dos meses, una parte a 4°C y otra a -20°C (Fig. 11).



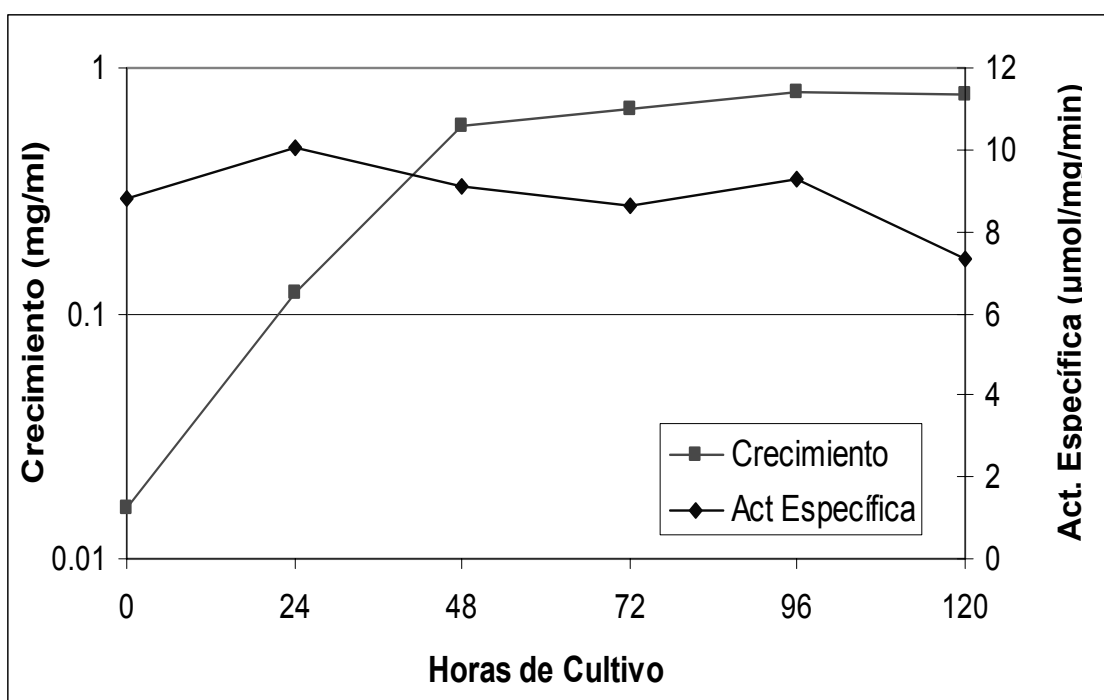
**Fig. 11.** Comparación entre ELC congelado a -20°C y refrigerado a 4°C durante dos meses. A, tinción de proteínas con nitrato de plata. B, zimograma. Se utilizaron 3 µg de proteína por carril. La flecha indica a posición de MDH.

En el zimograma se observa que la banda de actividad de MDH obtenida con ELC refrigerado presenta una banda de actividad aceptable a diferencia de la obtenida con ELC congelado en donde se observa una banda muy delgada y tenue. Al teñir para proteínas se puede notar que la banda correspondiente a esta enzima desaparece lo que sugiere que la enzima cambia su conformación al congelarse o que se degrada lo que es menos probable ya que a bajas temperaturas las proteasas no deberían actuar. Además, estos resultados muestran que no solo la MDH se ve afectada al congelar el extracto, sino que el patrón de muchas otras proteínas se altera con este proceso (Fig. 11).

#### 6.4. PERFIL DE CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD DE MDH EN GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO

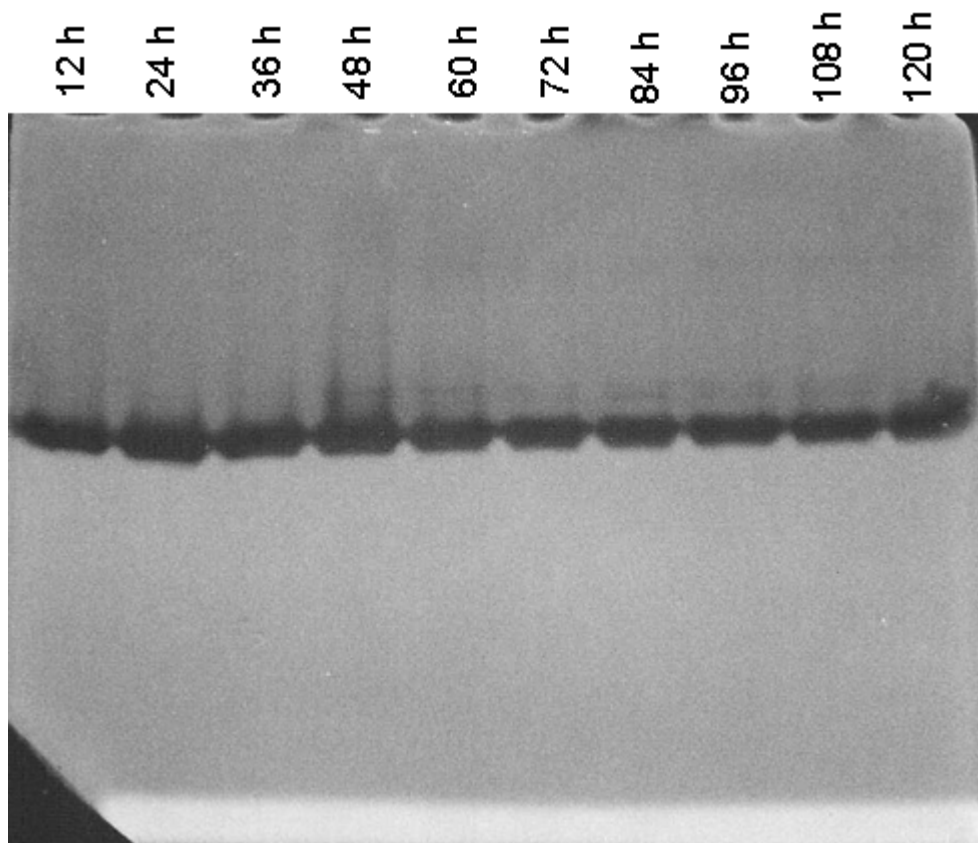
Cuando se utilizó glucosa como única fuente de carbono, *Sac. erythraea* mostró una fase exponencial de crecimiento durante las primeras 48 horas, después de las cuales la biomasa se mantuvo constante.

El perfil de actividad específica de MDH a través del crecimiento en glucosa se mantiene relativamente constante sugiriendo que la síntesis de esta enzima es constitutiva (Fig. 12). También en el zimograma correspondiente se observó que efectivamente hay actividad de MDH durante las diferentes fases de crecimiento de este microorganismo (Fig. 13). Estos resultados contrastan con el perfil reportado para ICDH, el cual presenta un pico muy marcado mostrando el valor máximo a las 72 horas de cultivo mientras a las 0 y 172 h, la actividad fue casi nula indicando que su síntesis se induce solo en cierta etapa de crecimiento (Alvarado y Flores, 2003). Estos resultados descartan nuestra hipótesis de que la síntesis de MDH tiene un patrón de regulación común con la ICDH.



**Fig. 12.** Perfil de crecimiento y actividad de la MDH de *Sac. eythraea* al crecer en MM con 1% glucosa como fuente de carbono.





**Fig. 13.** Zimograma de MDH a diferentes horas de cultivo de *Sac. erythraea* en glucosa 1%. Se utilizaron 10  $\mu$ l de ELC por pozo.

Por otro lado, el perfil de actividad de MDH de *Sac. erythraea* concuerda con el patrón de expresión reportado para el gen *mdh* de *T. emersonii*, en donde la expresión se mantiene constante a través del tiempo de crecimiento (Maloney *et al.*, 2004), sin embargo, es diferente del patrón reportado para otras bacterias como *S. coelicolor* en donde la mayor expresión ocurre en la fase de crecimiento exponencial (Novotna *et al.*, 2003) y *E. coli* en donde la mayor expresión del gen ocurre durante la fase estacionaria (Park *et al.*, 1995).

Para ICDH tampoco se observó un perfil común entre diferentes microorganismos. Mientras en *Sac. erythraea* se observó un pico de actividad muy marcado con un máximo a las 72 hr de cultivo (Alvarado y Flores, 2003), en *B. subtilis* la síntesis de esta enzima ocurrió en la fase estacionaria (Jin *et al.*, 1994) y en *C. glutamicum* se observó un patrón de síntesis constitutivo (Eikmanns *et al.*, 1995). Por lo

que no parece haber un patrón común entre los diferentes microorganismos para la síntesis de las enzimas del ciclo de Krebs.

## **6.5. PERFILES DE CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD DE MDH AL CRECER EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO**

Para confirmar que realmente la síntesis de la MDH era constitutiva, se decidió estudiar el perfil de actividad de MDH en diferentes fuentes de carbono, ya que podrían observarse variaciones dependiendo de la composición del medio de cultivo.

Los resultados obtenidos al medir el crecimiento en las diferentes fuentes de carbono (Fig. 14) mostraron que éste presenta su valor máximo al crecer a la bacteria en fuentes de carbono como glucosa, fructosa y sacarosa, mientras que en galactosa y lactosa éste fue menor y cuando se utilizó almidón o acetato de sodio no se observó crecimiento. *Sac. erythraea* CA340 se encontró en fase exponencial hasta las 48 h de cultivo, posteriormente se observó la fase preestacionaria y a las 72 h entró en fase estacionaria. La ausencia de crecimiento en acetato probablemente se debe a que este microorganismo carece de las vías alternas para restituir intermediarios de las vías metabólicas previas al ciclo de Krebs, los cuales son esenciales para la formación de algunos aminoácidos y otras reacciones biosintéticas. La falta de crecimiento en almidón sugiere que este microorganismo no produce amilasas; ésto nos llama la atención ya que los desechos de ciertas plantas son ricos en almidón (Nelson y Cox, 2000). Waksman y Henrici en 1948 reportaron que esta bacteria crece bien en glucosa, fructosa y galactosa como fuentes de carbono, mientras que en presencia de sacarosa crece pero moderadamente. Las diferencias en los resultados obtenidos en este trabajo con los reportados por Waksman y Henrici referente a la asimilación de sacarosa y galactosa pueden deberse a diferencias fisiológicas entre las cepas utilizadas ya que ellos utilizaron la cepa silvestre NRRL 2338 mientras que para este trabajo nosotros utilizamos la cepa CA340, la cual se ha modificado genéticamente por lo que presenta una mayor producción de eritromicina.

Los resultados obtenidos al medir actividad específica sugieren fuertemente que la síntesis de la malato deshidrogenasa presenta un patrón constitutivo (Fig.15), ya que al crecer a la bacteria en MM con galactosa, lactosa o glucosa como fuentes de carbono, la actividad específica se mantiene aproximadamente constante a lo largo de todo el tiempo de cultivo, mientras que en fructosa, ésta aumenta conforme transcurre el tiempo

de cultivo presentando el valor máximo a las 96 h; ésto puede deberse a que la fructosa induce la síntesis de MDH ó a que en esta fuente de carbono la velocidad de degradación de esta enzima es menor al promedio de las otras proteínas intracelulares. Al crecer en presencia de sacarosa como fuente de carbono la actividad específica disminuye hasta las 72 h, posteriormente aumenta un poco y luego vuelve a bajar; esto resulta muy extraño ya que esta molécula es un disacárido formado por una unidad de glucosa y una de fructosa y justamente en estos dos azúcares se observa el máximo crecimiento (Fig. 14).

Al analizar los zimogramas para la actividad de MDH en las diferentes fuentes de carbono se confirma que en todos los casos hay una banda de actividad, aunque no es posible distinguir diferencias entre valores altos o bajos de la misma, lo que puede deberse a que el zimograma es muy sensible y detecta la actividad aunque sea muy baja (Fig. 16 A, B, C y E). Las proteínas intracelulares se tiñeron con nitrato de plata y la MDH se observa como una banda muy bien definida en todos los casos, aunque tampoco pudimos distinguir las diferencias esperadas. Al analizar el patrón general de bandas se ve que algunas proteínas aparecen o desaparecen dependiendo de la fuente de carbono utilizada o del tiempo de cultivo (Figs. 16 D y F).

Estos resultados concuerdan con lo que se ha reportado para otros microorganismos en el sentido de que siempre se observa un nivel basal constitutivo de esta enzima, sin embargo hay diferencias en los niveles de expresión del gen *mdh*. En *E. coli* (Park *et al.*, 1995), *T. thermophilus* (Park y Kilbane 2004) y *C. glutamicum* (Molenaar *et al.*, 2000) se reportó una menor expresión en presencia de glucosa o en MC que en otros azúcares menos fácilmente asimilables; por el contrario, *T. emersonii* mostró una mayor expresión del gen al crecer en presencia de glucosa y galactosa que en melibiosa, trehalosa, rafinosa y xilano (Maloney *et al.*, 2004).

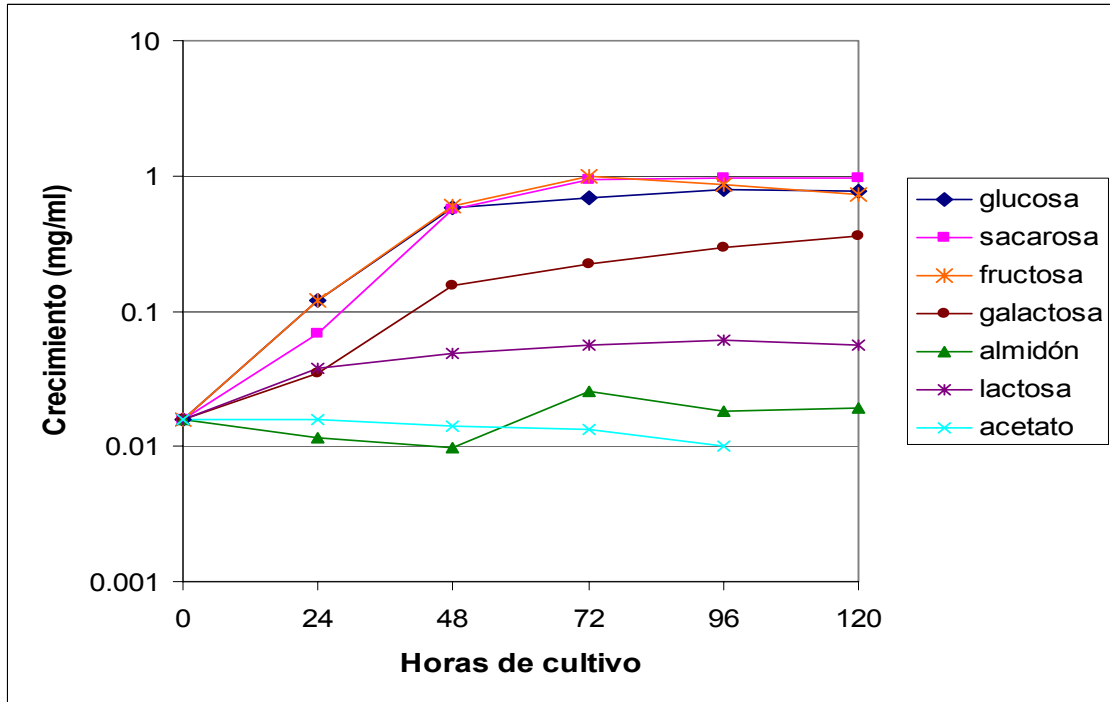


Fig. 14. Crecimiento de *Sac. erythraea* en MM con diferentes fuentes de carbono al 1% (w/v).

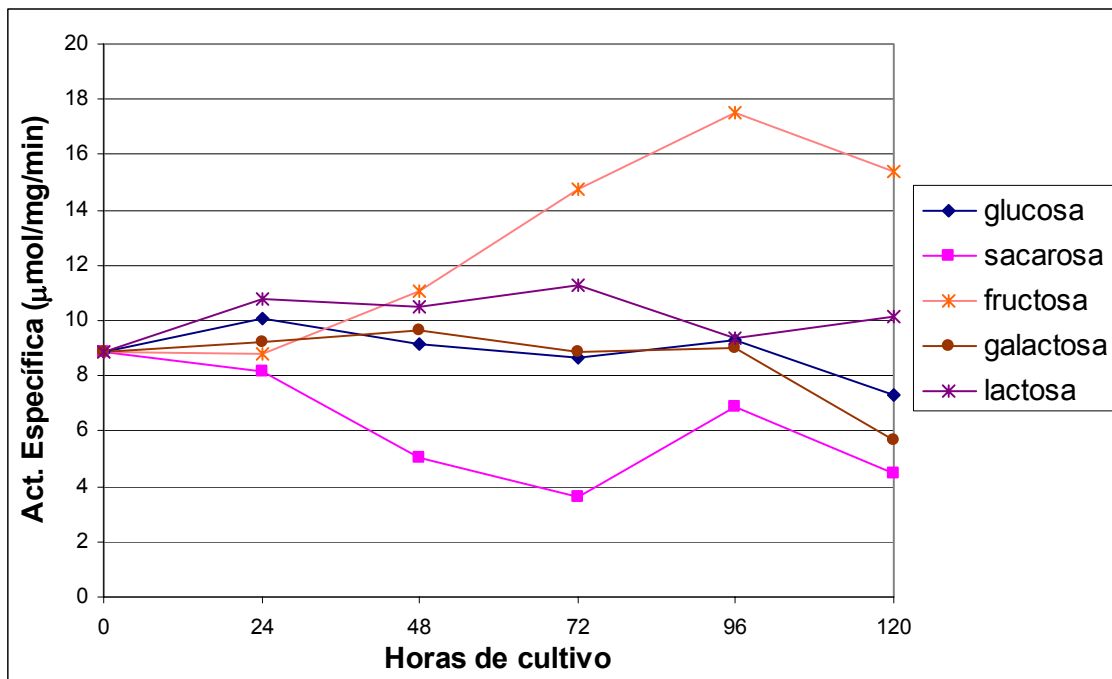
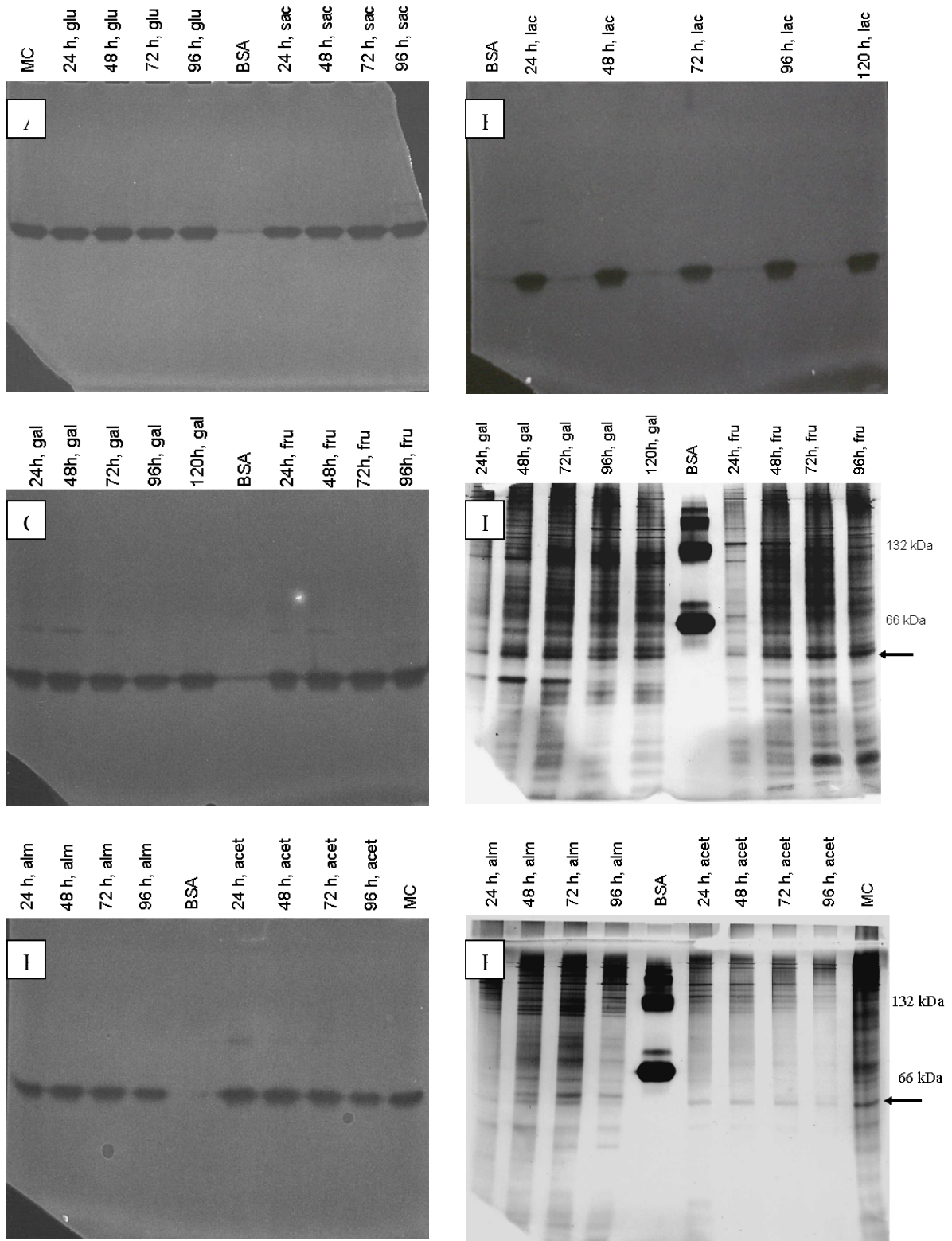


Fig. 15. Actividad específica de la MDH de *Sac. erythraea* crecida en diferentes fuentes de carbono al 1% (w/v).



**Fig. 16.** Geles ND-PAGE con ELCs obtenidos al crecer a *Sac. erythraea* en MM con diferentes fuentes de carbono. A, B, C y E, zimogramas. D y F, patrón general de proteínas teñidas con nitrato de plata. Se utilizaron 3  $\mu$ g de proteína por pozo. Las fechas indican la posición de MDH. glu: glucosa, sac: sacarosa, lac: lactosa, gal: galactosa, fru: fructosa, alm: almidón y acet: acetato de sodio.

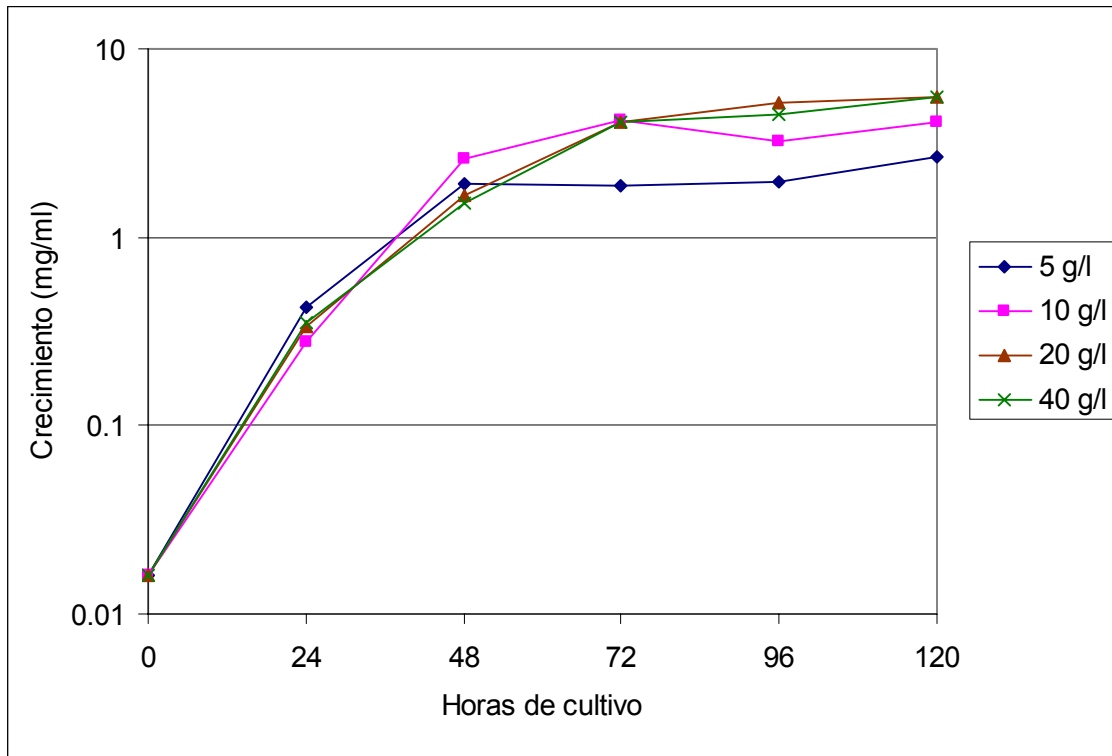
## 6.6. PERFILES DE CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD DE MDH AL CRECER EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FRUCTOSA

Debido a que el perfil de actividad específica de MDH observado con fructosa fue distinto al de las otras fuentes de carbono, se decidió determinar si estas diferencias dependen de la concentración de fructosa. Para esto, se incubó a la bacteria en MM con diferentes concentraciones de este azúcar y se midió actividad y crecimiento a las diferentes horas de cultivo.

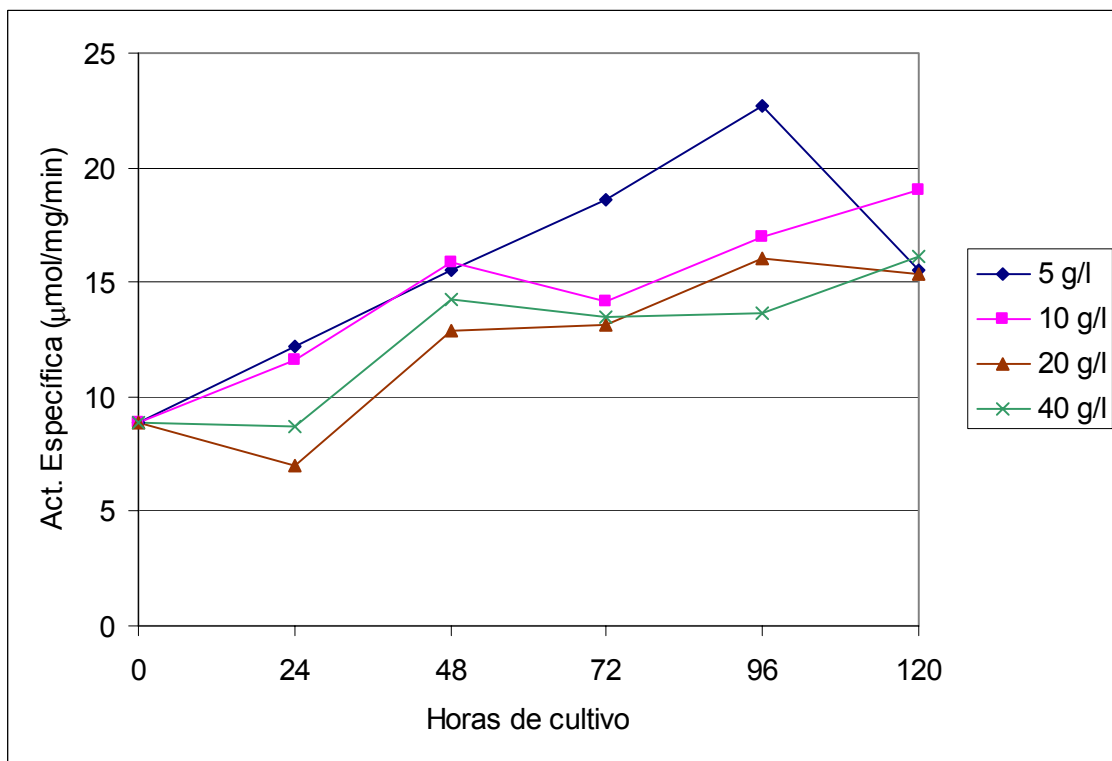
En la figura 17 se puede observar que, como era de esperarse cuando se tiene una menor concentración de fructosa (5 g/l) el crecimiento es menor; sin embargo, cuando la concentración de este azúcar es de 10, 20 o 40 g/l se obtiene el máximo crecimiento y las diferencias en los valores obtenidos con estas concentraciones no son significativas; esto se puede deber a que otro componente esencial como la fuente de nitrógeno se agota antes que la fuente de carbono.

La figura 18 muestra que la actividad específica presenta el patrón opuesto al observado para el crecimiento; es decir, al disminuir la concentración de fructosa aumenta la actividad específica mostrando el máximo valor de actividad al utilizar 5 g/l de esta fuente de carbono. La actividad es menor cuando se utiliza 10, 20 o 40 g/l de este compuesto. En este sentido, el efecto de la fructosa sobre el perfil de actividad de MDH es similar al efecto de la glucosa sobre el perfil de ICDH reportado para esta bacteria en donde se observó una mayor actividad específica al utilizar glucosa como fuente de carbono aunque al aumentar su concentración en el medio de cultivo se detectó una disminución en la actividad (Alvarado y Flores, 2003).

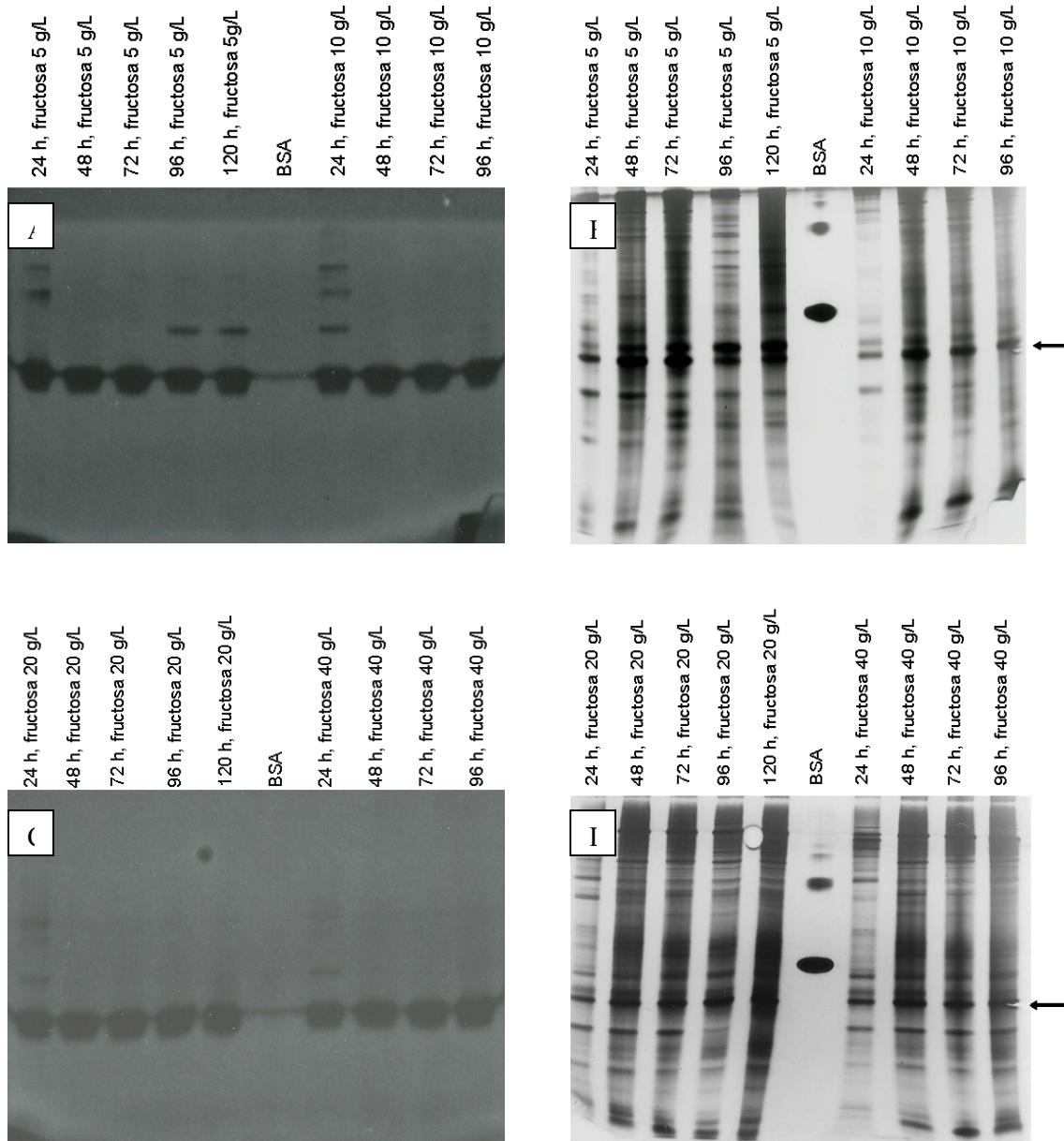
Al realizar los zimogramas de MDH con el ELC obtenido de las diferentes concentraciones de fructosa se observa que en todos los casos, a las 24 h de crecimiento aparecen otras bandas de actividad (Fig. 19 A y C). Esto puede deberse a la formación de isoformas de MDH ya que esto ha sido reportado para otras MDHs (Doménech *et al.*, 1987; Kulick y Barnes, 1968) o a que se inducen otras enzimas que utilizan NADH. Al teñir las proteínas en estos geles se puede notar que el patrón de varias proteínas se ve alterado por la concentración de fructosa (Fig. 19 B y D).



**Fig. 17.** Crecimiento de *Sac. erythraea* en MM con diferentes concentraciones de fructosa.



**Fig. 18.** Efecto de la concentración de fructosa sobre la actividad específica de la MDH de *Saccharopolyspora erythraea*.



**Fig. 19.** Geles ND-PAGE con ELC de *Sac. erythraea* crecida en MM con diferentes concentraciones de fructosa a diferentes horas de cultivo. A y C, zimogramas, B y D, tinción de proteínas con nitrato de plata. Las flechas señalan la posición de MDH.



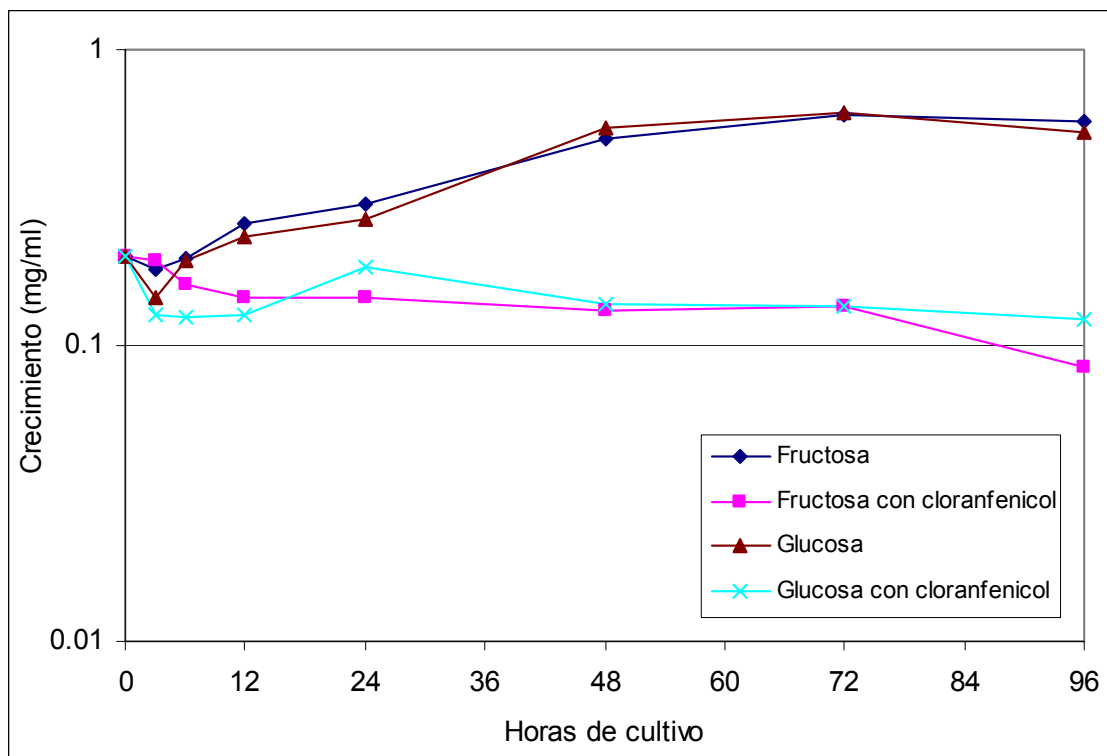
## 6.7. EFECTO DE LA FRUCTOSA SOBRE LA SÍNTESIS DE MDH

Con el fin de determinar si el perfil de actividad de MDH observado al crecer a *Sac. erythraea* en MM con fructosa como fuente de carbono se debe a que la síntesis de esta enzima se induce por fructosa o si más bien se debe a que en esta fuente de carbono la degradación de MDH es menor que en otras fuentes de carbono, se comparó la actividad específica y el crecimiento obtenidos al crecer en presencia de fructosa y fructosa con cloranfenicol utilizando glucosa como control. El cloranfenicol es un antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas por los ribosomas bacterianos al bloquear la transferencia de peptidilo (Nelson y Cox, 2000).

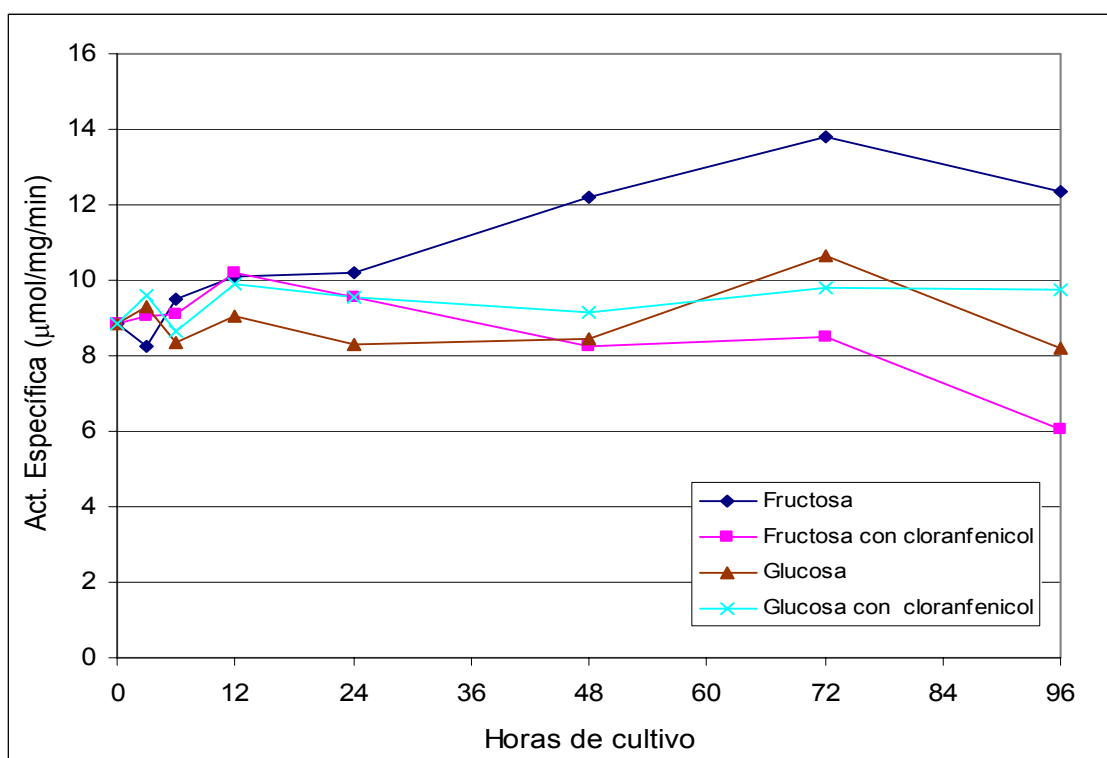
Al graficar los valores obtenidos para el crecimiento se obtuvieron los resultados esperados ya que en glucosa y fructosa se observa el mismo crecimiento mientras que en presencia de antibiótico no hay crecimiento en ninguna de las dos fuentes de carbono (Fig. 20).

La medición de la actividad específica en estas cuatro condiciones sugiere fuertemente que la diferencia en el perfil observado en fructosa en comparación con las otras fuentes de carbono se debe a que la síntesis de MDH se induce por fructosa, ya que al impedir la síntesis de proteínas la actividad específica en esta fuente de carbono se mantiene tal y como ocurre en las otras fuentes de carbono como la glucosa. Si el perfil de actividad observado en fructosa fuera debido a una disminución en la degradación, la actividad específica de MDH aumentaría aún en presencia de antibiótico; como esto no ocurre, se concluye que al crecer en fructosa la proporción de síntesis de esta proteína respecto a las demás proteínas celulares es mayor a la observada en otras fuentes de carbono, además, como la actividad específica tampoco disminuye a lo largo del tiempo de cultivo al incubar a la bacteria en presencia de cloranfenicol se concluye que no hay proteasas específicas para MDH (Fig. 21).

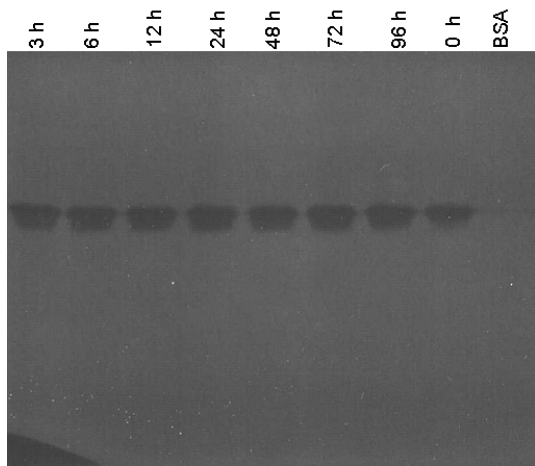
En los geles de acrilamida se observó perfectamente el zimograma, así como la banda perteneciente a MDH y otras proteínas al teñirlas con nitrato de plata (Fig. 22 y 23) sin embargo, no fue posible distinguir las diferencias en el patrón de bandas ni en el aumento de actividad de MDH causado por la inducción por fructosa.



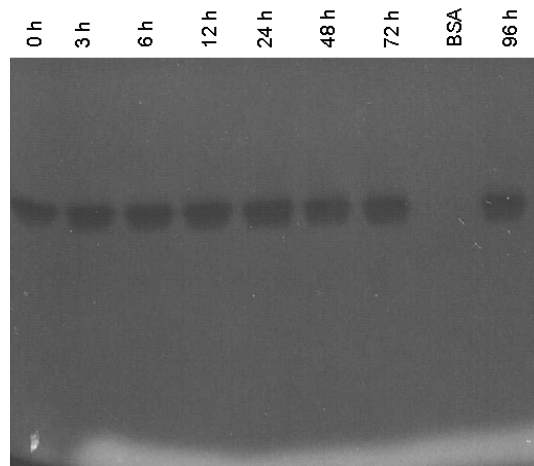
**Fig. 20.** Crecimiento de *Sac. erythraea* en MM con fructosa o glucosa y en presencia o ausencia de cloranfenicol (100 µg/ml).



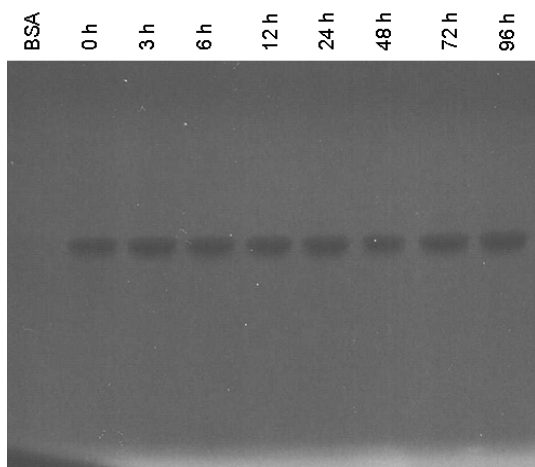
**Fig. 21.** Actividad específica de MDH al crecer a *Sac. erythraea* en MM con fructosa o glucosa y en presencia o ausencia de cloranfenicol (100 µg/ml).



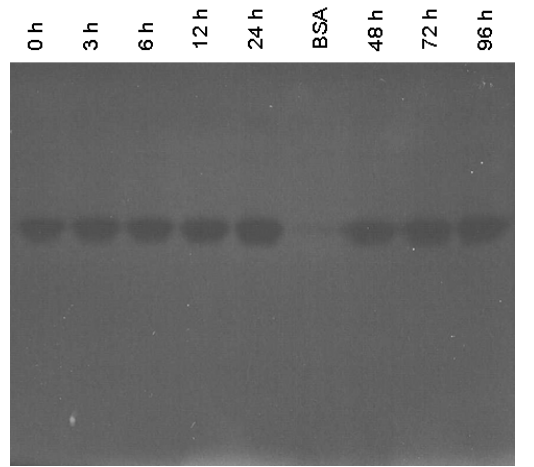
A. Fructosa sin cloranfenicol



B. Fructosa con cloranfenicol

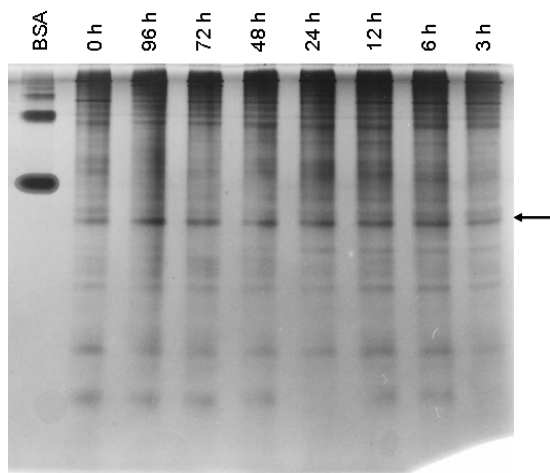


C. Glucosa sin cloranfenicol

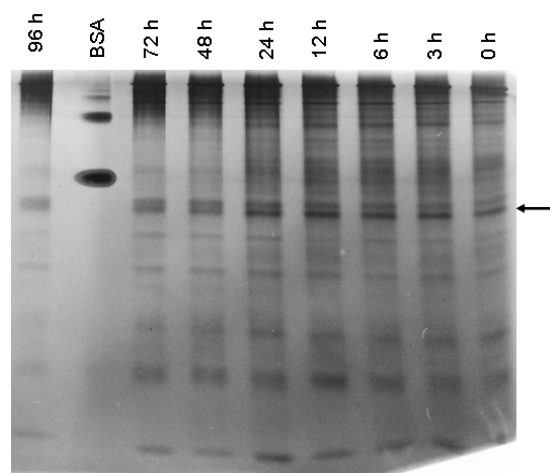


D. Glucosa con cloranfenicol

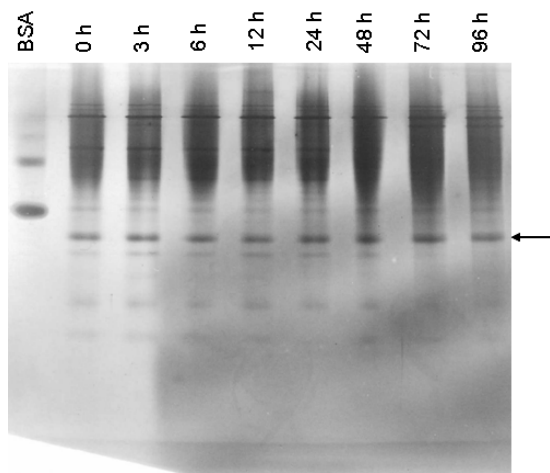
**Fig. 22.** Zimogramas de MDH al crecer a *Sac. erythraea* en MM con fructosa o glucosa y en presencia o ausencia de cloranfenicol (100 µg/ml).



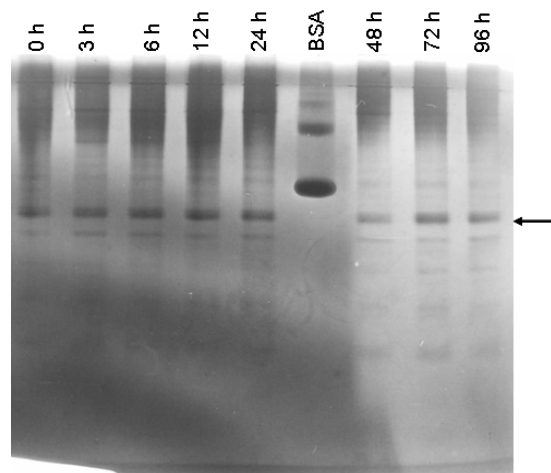
A. Fructosa sin cloranfenicol



B. Fructosa con cloranfenicol



C. Glucosa sin cloranfenicol



D. Glucosa con cloranfenicol

**Fig. 23.** Tinción de proteínas con nitrato de plata al crecer a *Sac. erythraea* en MM con fructosa o glucosa y en presencia o ausencia cloranfenicol (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Las fechas indican la posición de MDH.

## 6.8. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE MDH

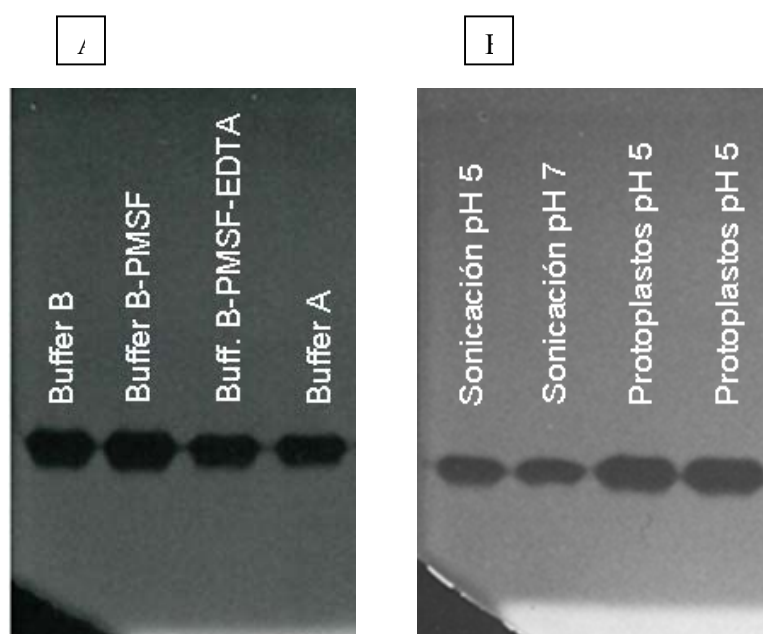
El peso molecular de MDH calculado en geles de acrilamida ND-PAGE fue de 37 kDa, esto se confirmó utilizando varios marcadores de PM diferentes (Sigma para ND, Invitrogen para SDS y Bio Rad para SDS). Este valor concuerda con lo que se ha reportado en la literatura para el tamaño de las subunidades de MDH en otros organismos (Tabla 2), sin embargo, no se ha reportado ningún caso de una monomérica, ya que las MDHs son enzimas homodiméricas u homotetraméricas (Sundaram *et al.*, 1980; Bonneté *et al.*, 1993 y Maloney *et al.*, 2004).

**Tabla 2.** PM de la MDH reportado para diferentes organismos.

Microorganismo:	PM de las subunidades (kDa)	PM total (kDa)	Fuente:
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	34	66.5	Labrou y Clonis 1997
<i>Escherichia coli</i>	30	60	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	38	70	Mikulášová <i>et al.</i> , 1998
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	35	70	Langelandsvik <i>et al.</i> , 1997
<i>Talaromyces emersonii</i>	35	70	Maloney <i>et al.</i> , 2004
<i>Bacillus termofilico</i>	35	140	Wynne <i>et al.</i> , 1996

En este caso el resultado esperado era tener una enzima homodimérica con un PM aproximado para la enzima nativa de 70 kDa ya que este valor es el que se ha reportado para la MDH de *S. aureofaciens* (Mikulášová *et al.*, 1998) y de otros organismos similares, es por esto que al obtener un PM de 37 kDa para la MDH de *Sac. erythraea* se sospechó que la enzima se estaba descomponiendo en sus subunidades por el proceso de obtención del ELC y seguía conservando actividad a pesar de no encontrarse la proteína completa. Para demostrar o rechazar esta hipótesis se realizaron las siguientes modificaciones al método de obtención del ELC: las células se rompieron lisando protoplastos, el cual es un método menos agresivo que la sonicación, se utilizó buffer pH 5 en lugar de pH 7 y se utilizó buffer B o buffer A modificado para lavar y resuspender el micelio ya que los componentes del buffer podrían estar afectando la estructura cuaternaria de la enzima (Fig. 24).

Los resultados mostrados en la fig. 24 indican que la estructura cuaternaria de la proteína no se ve afectada por el método de obtención del ELC, ya que de ser así, en alguno de los carriles debería aparecer otra banda de actividad correspondiente a un PM aproximado de 70 kDa. Por lo tanto, el PM estimado para la MDH de *Sac. erythraea* es de 37 kDa, sin embargo este valor debería corroborarse con un método mas confiable ya que la determinación del PM en geles ND-PAGE resulta de baja confiabilidad. En los casos mostrados en la tabla 2 en que se reporta el PM de la proteína completa, éste fue determinado por cromatografía de filtración en gel.



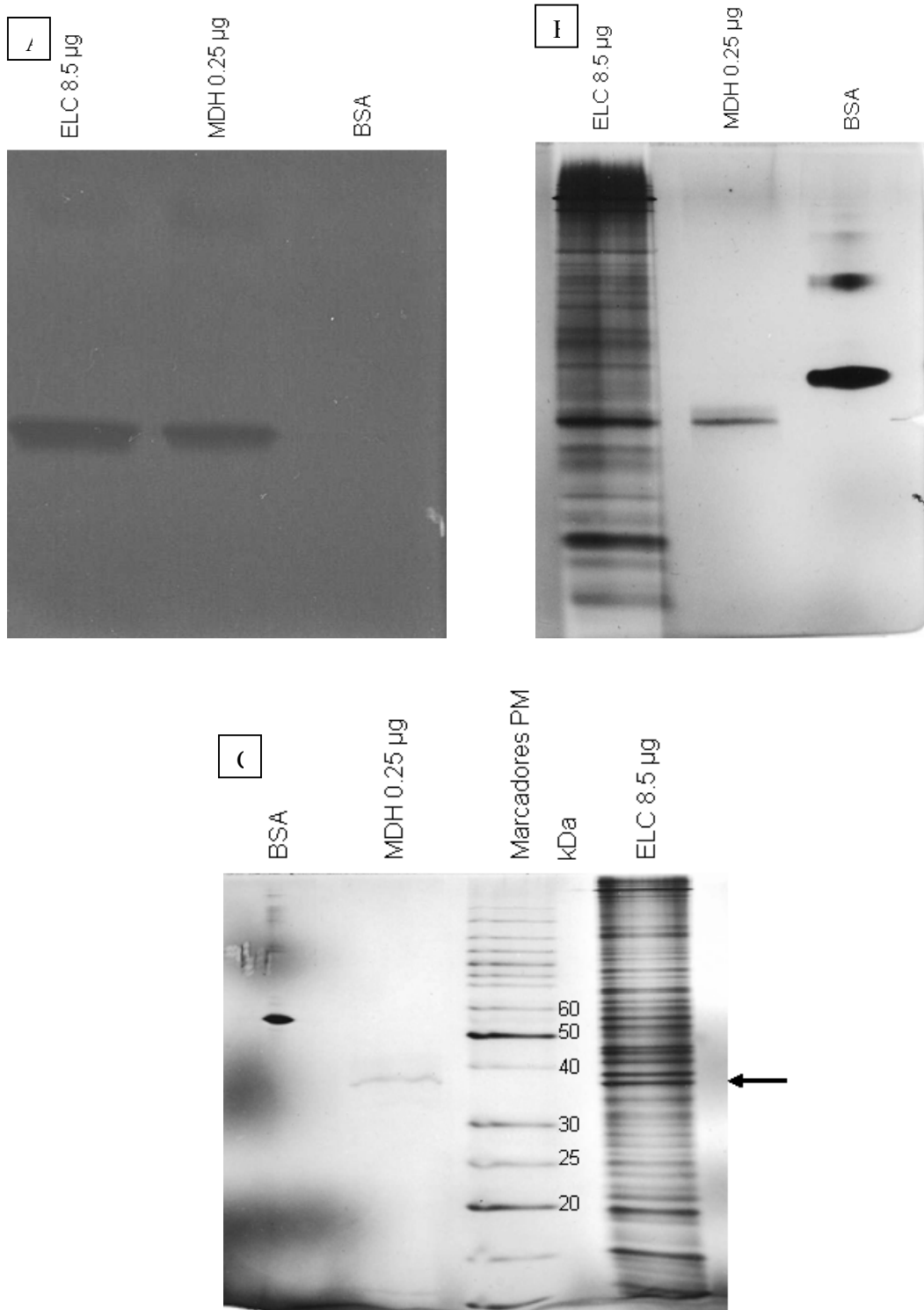
**Fig. 24.** Zimogramas de MDH realizados utilizando ELC obtenido mediante varios procedimientos. Gel A, se varió la composición del buffer utilizado para lavar y resuspender el micelio con el que se obtuvo el ELC. Gel B, se varió el método para romper las células y el pH del buffer A utilizado para obtener el ELC. Se utilizaron 10  $\mu$ l de ELC por pozo.

## 6.9. PURIFICACIÓN PARCIAL DE MDH

Como no fue posible realizar el zimograma para MDH en geles SDS-PAGE, la enzima se purificó como se indica en Material y Métodos con el fin de determinar el peso molecular de la proteína en geles SDS-PAGE y compararlo con el obtenido anteriormente en ND-PAGE. En la tabla 3 se muestra que la enzima se logró purificar 16 veces, siendo este un valor bastante bajo comparado con lo reportado en otros artículos (Kuijk van y Stams 1996; Labrou y Clonis 1997 y Mikulášová *et al.*, 1998), lo cual sugiere que la enzima no se purificó totalmente sino que hay varias proteínas que se encuentran en la misma banda del gel ND-PAGE por lo que se esperaría observar varias bandas en el gel SDS-PAGE, sin embargo estas no se detectan probablemente debido a su baja concentración. En la figura 25 A y B se puede observar que realmente se eluyó del gel solamente la banda perteneciente a esta enzima y en la figura 25 C se observa una banda de proteína que aparentemente pertenece a MDH. El PM calculado para esta proteína fue de 40 kDa. Los pesos moleculares para las subunidades de MDH que han sido previamente reportadas en la literatura se encuentran entre 33 y 40 kDa (Tabla 2), lo cual concuerda con lo obtenido en este estudio. Estos resultados sugieren que esta es una enzima monomérica aunque el PM de la proteína completa se debe corroborar por espectrofotometría de masas ó por filtración en gel.

**Tabla 3.** Purificación parcial de la malato deshidrogenasa de *Sac. erythraea*.

	Actividad específica	Actividad volumétrica	proteína (mg/ml)	Purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	11.88	8.38	0.705	1	100
MDH eluída del gel	192.68	1.15	0.006	16.21	13.79

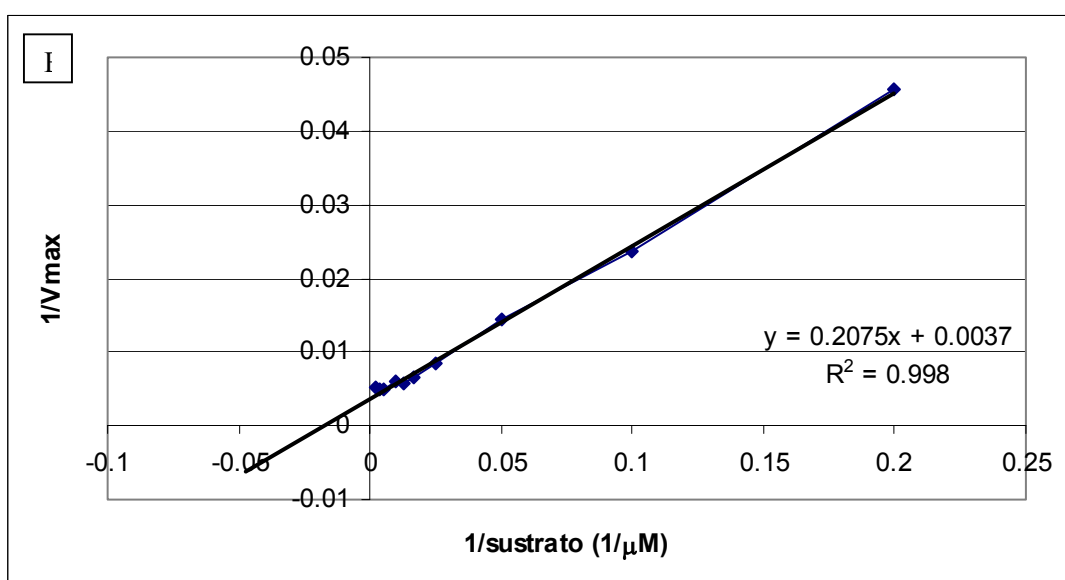
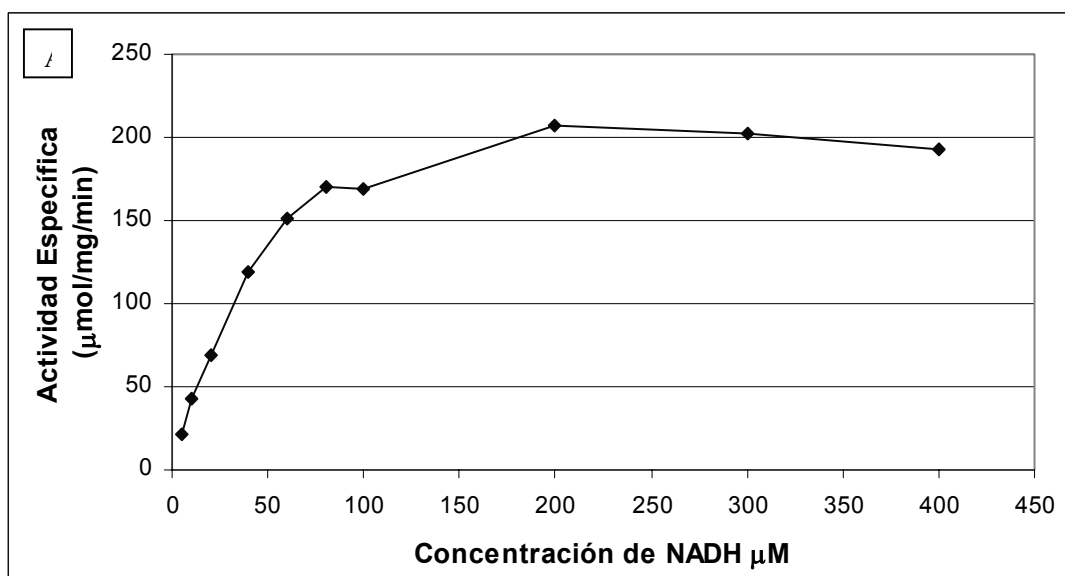


**Fig. 25.** Purificación parcial de MDH por elusión de la proteína del gel de electroforesis. Geles A y B, zimograma y tinción de proteínas con nitrato de plata en gel ND-PAGE respectivamente. Gel C, tinción de proteínas con nitrato de plata en gel SDS-PAGE.



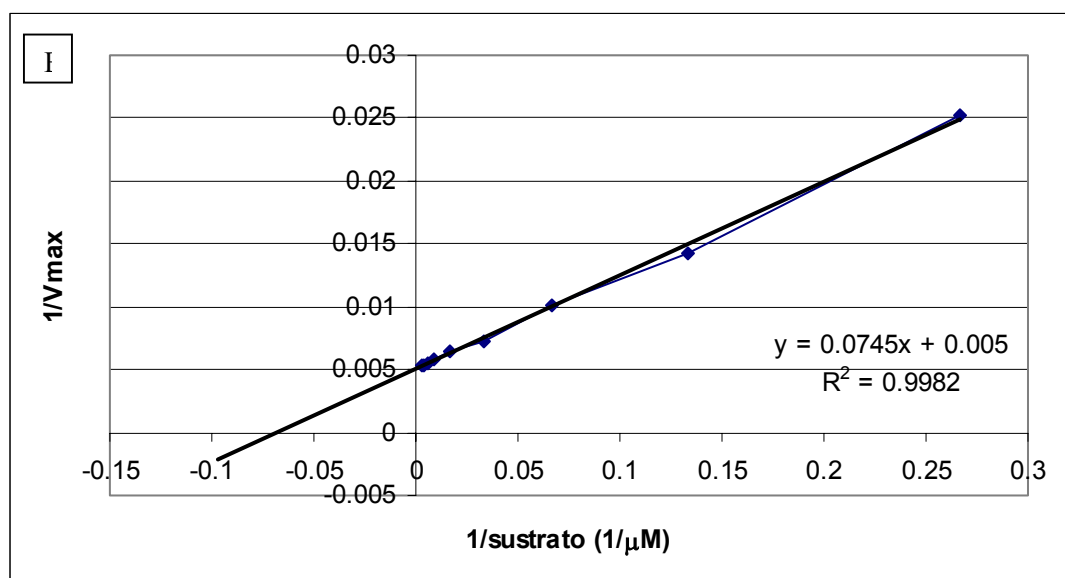
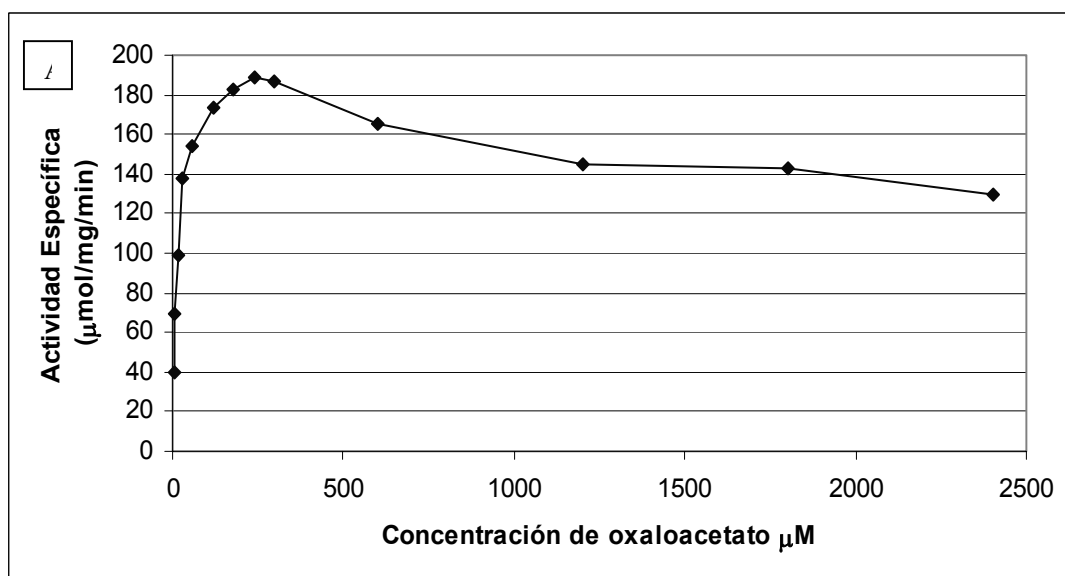
## 6.10. CONSTANTES CINÉTICAS DE MDH

La MDH semipurificada se utilizó para calcular las constantes  $K_m$  y  $V_{max}$  para NADH y oxaloacetato. En la figura 26 A se puede observar que altas concentraciones de NADH no parecen tener un efecto inhibitorio sobre la enzima y en la fig. 26 B se muestra la gráfica de Lineweaver-Burk mediante la cual se obtuvo un valor de  $K_m$  para NADH de  $56.1 \mu\text{M}$  y una  $V_{max}$  de  $270 \mu\text{mol/mg/min}$  (Fig. 26 B).



**Fig. 26.** Cinética de la reacción de MDH al variar la concentración de NADH. A, Variación de la actividad específica en función de la concentración de NADH. B, Curva de Lineweaver-Burck.

En la figura 27 A se observa que el máximo valor de actividad se obtiene al utilizar oxaloacetato 240  $\mu\text{M}$  en la reacción y que altas concentraciones de este compuesto inhiben la actividad de la enzima. Con oxaloacetato 0.6 mM se observa un 11.3% de inhibición y con 2.4 mM la enzima se inhibe en un 30.5%. El  $K_m$  para oxaloacetato es de 14.9  $\mu\text{M}$  y la  $V_{\text{max}}$  de la reacción tiene un valor de 200  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$  (Fig. 27 B).



**Fig. 27.** Cinética de la reacción de MDH al variar la concentración de oxaloacetato. A, Variación de la actividad específica en función de la concentración de ácido oxaloacético. B, Curva de Lineweaver-Burck.

Al comparar los valores de  $K_m$  obtenidos para la malato deshidrogenasa de *Saccharopolyspora erythraea* con los reportados para otros organismos (Tabla 4) se observa que el  $K_m$  obtenido en este estudio para oxaloacetato es de los valores más bajos, mientras que el reportado para la enzima de *S. aureofaciens* se encuentra entre los más altos, por lo tanto la MDH de *Sac. erythraea* tiene una alta afinidad por este sustrato en comparación con otras MDHs. El valor de  $K_m$  calculado para NADH se encuentra aproximadamente en el promedio de los reportados, mientras que el de la MDH de *S. aureofaciens* también se encuentra en los valores más altos, mostrando que la enzima de *S. aureofaciens* presenta baja afinidad por ambos sustratos.

Existen muy pocos artículos en los que se reporta el valor de  $V_{max}$  para esta enzima y hay una enorme variación entre los valores reportados para los diferentes microorganismos. Esto probablemente se debe a que, como ocurre en este estudio, la enzima no es totalmente purificada por lo que al estimar la  $V_{max}$ , se obtiene un valor menor al valor real (Tabla 4).

**Tabla 4.** Comparación de los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  reportados para la malato deshidrogenasa de varios organismos.

Microorganismo:	$K_m$ Oxaloacetato (mM)	$K_m$ NADH (mM)	$K_m$ Malato (mM)	$K_m$ NAD <sup>+</sup> (mM)	$V_{max}$ ( $\mu$ mol/mg/ min) reducción	$V_{max}$ ( $\mu$ mol/mg/ min) oxidación	Fuente:
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0.032	0.036	0.67	0.34			Labrou y Clonis, 1997
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	0.1	0.085	9	0.27			Mikulášová <i>et al.</i> , 1998
<i>Helicobacter pylori</i>	0.128	0.065	0.177	0.161	0.111	0.04	Pitson <i>et al.</i> , 1999
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	0.04	0.08	0.4	0.110			Thompson <i>et al.</i> , 1998
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	0.03	0.09	1	0.5			Thompson <i>et al.</i> , 1998
<i>Vibrio sp.</i>	0.005	0.01	0.15	0.015			Ohkuma <i>et al.</i> , 1996
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	0.043	0.024			880	~ 88	Langelandsvik <i>et al.</i> , 1997
<i>Bacillus termofilico</i>	0.022	0.014	0.26	0.1			Wynne <i>et al.</i> , 1996
<i>Talaromyces emersonii</i>	0.02	0.025	1.25	0.12	4300	122	Maloney <i>et al.</i> , 2004
<i>Salinibacter ruber</i>	0.004-0.03*	0.028					Madern y Zaccai, 2004
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	0.015	0.056			235		Este estudio

\*Depende de la concentración de sales

## 7. CONCLUSIONES

- El gen que codifica para la malato deshidrogenasa tiene un patrón de expresión constitutivo en presencia de glucosa, galactosa y lactosa como fuentes de carbono.
- Con fructosa como fuente de carbono se induce la síntesis de MDH.
- La enzima nativa y en SDS mostró un PM aproximado de 37 kDa.
- La  $K_m$  calculada para oxaloacetato fue de 14.9  $\mu\text{M}$  y para NADH fue de 56  $\mu\text{M}$ .
- La  $V_{\text{max}}$  de la enzima fue 235  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ .
- La actividad de esta enzima se inhibe a altas concentraciones de oxaloacetato.

## 8. PERSPECTIVAS

- Clonar y secuenciar el gen que codifica para la malato deshidrogenasa de *Sac. erythraea* y confirmar los resultados obtenidos en este estudio sobre la regulación de la síntesis de esta enzima a nivel molecular.
- Sobreexpresar el gen y purificar la malato deshidrogenasa.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarado, A. y Flores, M.E. (2003) Characterization and regulation of NADP<sup>+</sup> – isocitrate dehydrogenase from *Saccharopolyspora erythraea*. *Biotechnology Letters* 25, 1175-1178.
2. Banaszak, L.J. y Bradshaw, R.A. (1975) Malate dehydrogenases. In *The enzymes* (Boyer, P.D., ed.), vol. 9, pp 369-396. Academic Press, New York.
3. Bennet, P.M. y Holms, W.H. (1975) Reversible inactivation of isocitrate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. *Current Microbiology* 7, 45-47.
4. Benveniste, K. y Munkres, K.D. (1970) Cytoplasmic and mitochondrial malate dehydrogenase of *Neurospora*. Regulatory and enzymic properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 220, 161-177.
5. Bermúdez, O., Padilla, P., Huitrón, C. y Flores, M.E. (1998) Influence of carbon and nitrogen source on syntesis of NADP<sup>+</sup> –isocitrate dehydrogenase, metylmalonyl-coenzyme A mutase, and methylmalonyl-coenzyme A decarboxylase in *Saccharopolyspora erythraea* CA340. *FEMS Microbiology Letters* 164, 77-82.
6. Birktoft, J.J., Rhodes, G. y Banaszak, L. J. (1989) Refined crystal structure of cytoplasmic malate dehydrogenase at 2.5Å°. *Biochemistry* 28, 6065-6081.
7. Bollag, D.M., Rozycki, M.D. y Edelstein, S.J. (1996) *Protein Methods*. 2<sup>nd</sup> edition. Ed. Wiley-Liss.
8. Bonneté, F., Ebel, C., Zaccai, G. y Eisenberg, H. (1993) A biophysical study of halophilic malate dehydrogenase in solution: revised subunit structure and solvent interactions in native and recombinant enzyme. *Journal of Chemical Society Faraday Trans.* 89, 2659-2666.
9. Bott, M. y Niebisch, A. (2003) The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* 104, 129-153.
10. Bradford, MM. (1976) A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
11. Cochrane, V.W. (1961) Physiology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 15, 1-26.
12. Copeland, R.A. (1996) *Enzymes. A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. Ed. Wiley-VCH.
13. Cortés, J., Wiesmann, K.E.H., Roberts, G.A., Brown, M.J.B., Staunton, J. y Leadlay, P.F. (1995) Repositioning of a domain in a modular polyketide synthase to promote specific chain cleavage. *Science* 268, 1487-1489.

14. Curtis, E. y Barnes, N.S. (1993) *Biología*. Ed. Panamericana. 5ªed.
15. Dekleva, M.L. y Strohl W.R. (1988) Biosynthesis of epsilon-rhodomyconone from glucose by *Streptomyces* C5 and comparison with intermediary metabolism of other polyketide-producing streptomycetes. *Canadian Journal of Microbiology* 34, 1235-1240.
16. Doménech, C., Abante, J., Bozal, F. Mazo, A., Cortés, A. y Bozal, J. (1987) Microheterogeneity of the malate dehydrogenase from several sources. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 147, 753-757.
17. Eikmanns, B.J., Rittmann, D. y Sahm, H. (1995) Cloning, sequence analysis, expression and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum* *icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *Journal of Bacteriology* 177, 774-782.
18. Flores, M.E. y Sánchez, S. (1985) Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*. *FEMS Microbiology Letters* 26, 191-195.
19. Gary, C.T., Wimpenny, J.W.T. y Mossan, M.R. (1966) Regulation of metabolism in facultative bacteria. II. Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of Krebs cycle enzymes in *Escherichia coli*. *Biochimical and Biophysical Acta* 117, 33-41.
20. Gibson, N. y McAlister-Henn, L. (2003) Physical and genetic interactions of cytosolic malate dehydrogenase with other gluconeogenic enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 278, 25628-25636.
21. Gietl, C. (1992) Malate dehydrogenase isoenzymes: Cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochemical and Biophysical Acta* 1100, 217-234.
22. Goward, C.R. y Nicholls, D.J. (1994) Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Science* 3, 1883-1888.
23. Green, L.S., Karr, D.B. y Emerich, D.W. (1998) Isocitrate dehydrogenase and glyoxalate cycle enzyme activities in *Bradyrhizobium japonicum* under various growth conditions. *Archives of Microbiology* 169, 445-451.
24. Gunnarsson, N., Mortensen, U.H., Sosio, M. y Nielsen, J. (2004) Identification of the Entner-Doudoroff pathway in an antibiotic-producing actinomycete species. *Molecular Microbiology* 52, 895-902.
25. Hall, M.D., Levit, D.G. y Banaszak, L.J. (1992) Crystal structure of *Escherichia coli* malate dehydrogenase. A complex of the apoenzyme and citrate at 1.87 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 226, 867-882.
26. Hockenull, D.J.D., Fantes, K.H., Hervert, M. y Whitehead, B. (1954) Glucose utilization by *Streptomyces griseus*. *Journal of General Microbiology* 10, 353-370.

27. Honka, E., Farbry, S., Niermann, T., Palm, P. y Hensel, R. (1990) Properties and primary structure of the L-malate dehydrogenase from the extremely thermophilic archaebacterium *Methanothermus fervidus*. *European Journal of Biochemistry* 188, 623-632.
28. Hodgson, D.A. (2000) Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. Vol. 42. Academic Press.
29. Hostalek, Z., Tinterova, M. y Jechova, V. (1969) Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. I. Biosynthesis of chlortetracycline and tricarboxylic acid cycle activity. *Biotechnology and Bioengineering* 11, 539-548.
30. Ingold, C.T. y Hudson, H.J. (1993) *The Biology of Fungi*, 6th ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
31. Irimia, A., Vellieux, F.M., Madern, D., Zaccai, G., Karshikoff, A., Tibbelin, G., Ladenstein, R., Lien, T. y Birkeland, N. (2004) The 2.9 Å resolution crystal structure of malate dehydrogenase from *Archaeoglobus fulgidus*: Mechanisms of oligomerisation and thermal stabilisation. *Journal of Molecular Biology* 335, 343-356.
32. Issakidis, E., Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Jacquot, J-P. Crétin, C. y Gadal, P. (1992) Site-directed mutagenesis reveals the involvement of an additional thioredoxin-dependent regulatory site in the activation of recombinant sorghum leaf NADP-malate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 267, 21577-21583.
33. Jin S., Levin P.A., Matsuno K., Grossman A.D. y Sonenshein, A.L. (1997) Deletion of the *Bacillus subtilis* isocitrate dehydrogenase gene causes a block at stage I of sporulation. *Journal of Bacteriology* 179, 4725-4732.
34. Kelly, C.A., Nishiyama, M., Ohnishi, Y., Beppu, T. y Birktoft, J. (1993) Determinants of protein thermostability observed in the 1.9-Å crystal structure of malate dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Thermus flavus*. *Biochemistry* 32, 3916-3922.
35. Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. y Hopwood, D.A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. Capítulo 1. The John Innes Foundation. England.
36. Kim, S.-Y., Hwang, K.Y., Kim, S.H., Sung, H.C., Han, Y.S. y Cho, Y. (1999) Structural basis of cold adaptation, sequence, biochemical properties, and crystal structure of malate dehydrogenase from a psychrophile *Aquaspirillum arcticum*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 11761-11767.
37. Kitto, G.G. y Kaplan, N.O. (1966) Purification and properties of chicken heart mitochondrial and supernatant malic dehydrogenases. *Biochemistry* 5, 3966-3980.



38. Kuijk van, B.L.M. y Stams, A.J.M. (1996) Purification and characterization of malate dehydrogenase from the syntrophic propionate-oxidizing bacterium strain MPOB. *FEMS Microbiology Letters* 144, 141-144.
39. Kulick, R.J. y Barnes, F.W. (1968) Heterogeneity of supernatant malate dehydrogenase. *Biochemica et Biophysica Acta* 167, 1-8.
40. Labrou, N.E. y Clonis, Y.D. (1997) L-Malate dehydrogenase from *Pseudomonas stutzeri*: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 337, 103-114.
41. Labeda, D.P. (1987) Transfer of the type strain of *Streptomyces erythraeus* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1948 to de genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975 as *Saccharopolyspora erythraea* sp. nov., and designation of a Neotype strain for *Streptomyces erythraeus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 19-22.
42. Langelandsvik, A.S., Steen, I.H., Birkeland, N. y Lien, T. (1997) Properties and primary structure of a thermostable L-malate dehydrogenase from *Archaeoglobus fulgidus*. *Archives of Microbiology* 168, 59-67.
43. Lum, A.M., Huang, J., Hutchinson, C.R. y Kao, C.M. (2004) Reverse engineering of industrial pharmaceutical-producing actinomycete strains using DNA microarrays. *Metabolic Engineering* 6, 186-196.
44. Manchenko, G.P. (1994) Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC Press.
45. Madern, D. (2002) Molecular evolution within the L-malate and L-lactate dehydrogenase super-family. *Journal of Molecular Evolution* 54, 825-840.
46. Madern, D. y Zaccari, G. (2004) Molecular adaptation: the malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacterium *Salinibacter ruber* behaves like a non-halophilic protein. *Biochimie* 86, 295-303.
47. Maloney, A.P., Callan, S.M., Murray, P.G. y Tuohy, M.G. (2004) Mitochondrial malate dehydrogenase from the thermophilic, filamentous fungus *Talaromyces emersonii*. Purification of the native enzyme, cloning and overexpression of the corresponding gene. *European Journal of Biochemistry* 271, 3115-3126.
48. Meizel, S. y Markert, C.L. (1967). Malate dehydrogenase isozymes of the marine snail, *Ilyanassa obsoleta*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 122, 753-765.
49. Mikulášová, D., Kollárová, M., Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Jacquot, J., Kutejová, E., Mernik, N., Egyudová, I., Mustrati, R. y Horecká, T. (1998). Purification and characterization of the malate dehydrogenase from *Streptomyces aureofaciens*. *FEMS Microbiology Letters* 159, 299-305.

50. Mironov, V.A., Sergienko, O.V., Nastasyak, I.N. y Danielenko, V.N. (2004) Biogenesis and regulation of biosynthesis of erythromycins in *Saccharopolyspora erythraea*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40, 531-541.
51. Molenaar, D., Rest van der, M.E. y Petrovic, S. (1998) Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (aceptor) from *Corynebacterium glutamicum*. *European Journal of Biochemistry* 254, 395-403.
52. Molenaar, D. Rest van der, M.E., Drysch, A. y Yücel, R. (2000) Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenase in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology* 182, 6884-6891.
53. Morosoli, R., Shareck, F. y Kluepfel, D. (1997) Protein secretion in streptomycetes. *FEMS Microbiology Letters* 146, 167-174.
54. Munkres, K.D. (1970) Allosteric y multifunctional properties of *Neurospora* mitochondrial malate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* 220, 149-160.
55. Muro-Pastor, M.I., Reyes, J.C. y Florencio, F.J. (1996) The NADP<sup>-</sup> –isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) is nitrogen regulated in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 178, 4070-4076.
56. Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*. Ed Freeman & Company. New York. 3<sup>d</sup> edition.
57. Nicholls, D., Sundaram, T.K., Atkinson, T. y Minton, N.P. (1990) Cloning and nucleotide sequences of the *mdh* and *sucD* genes from *Thermus aquaticus* B. *FEMS Microbiology Letters* 70, 7-14.
58. Nimmo, H.G. (1987) The tricarboxylic acid cycle and anaplerotic reactions, p.156-169. In F.C. Neidhart, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: celular and molecular biology, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
59. Nishiyama, M., Horinouchi, S. y Beppu, T. (1991) Characterization of an operon encoding succinyl-CoA synthetase and malate dehydrogenase from *Thermus flavus* AT-62 and its expression in *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics* 226, 1-9.
60. Novotna, J., Vohradsky, J., Berndt, P., Gramajo, H., Langen, H., Li, X., Minas, W., Orsaria, L., Roeder, D. y Thompson, C. (2003) Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. *Molecular Microbiology* 48, 1289-1303.

61. Ohkuma, M., Ohtoko, K., Takada, N., Hamamoto, T., Usami, R., Kudo, T. y Horikoshi, K. (1996) Characterization of malate dehydrogenase from deep-sea psychrophilic *Vibrio* sp. Strain no. 5710 and cloning of its gene. *FEMS Microbiology Letters* 137, 247-252.
62. Paradkar, A., Trefzer, A., Chakraburty, R. y Stassi, D. (2003) *Streptomyces* genetics: a genomic perspective. *Critical Reviews in Biotechnology* 23, 1-27.
63. Park, S., Cotter, P.A. y Gunsalus, R.P. (1995) Regulation of malate dehydrogenase (*mdh*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, carbon and heme availability. *Journal of Bacteriology* 177, 6652-6656.
64. Park, H.S. y Kilbane, J.J. (2004) Gene expression studies of *Thermus thermophilus* promoters *PdnaK*, *Parg* and *Pscs-mdh*. *Letters in Applied Microbiology* 38, 415-422.
65. Pitson, S.M., Méndez, G.L., Srinivasan, S. y Hazell, S.L. (1999) The tricarboxylic acid cycle of *Helicobacter pylori*. *European Journal of Biochemistry* 260, 258-267.
66. Redshaw, P.A., McCann, P.A., Sankaran, L., y Pogell, B.M. (1976) Control of differentiation in streptomycetes: involvement of extrachromosomal deoxyribonucleic acid and glucose repression in aerial mycelia development. *Journal of Bacteriology* 125, 698-705.
67. Rest van der, M.E., Frank, C. y Molenaar, D. (2000) Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenase in the citric acid cycle of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 182, 6892-6899.
68. Richard, S.B., Madern, D., Garcin, E. y Zaccai, G. (2000) Halophilic adaptation: novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry* 39, 992-1000.
69. Sundaram, T.K., Wright, I.P. y Wilkinson, A.E. (1980) Malate dehydrogenase from thermophilic and mesophilic bacteria. Molecular size, subunit structure, amino acid composition, immunochemical homology and catalytic activity. *Biochemistry* 19, 2017-2022.
70. Sutherland, P. y McAlister-Henn, L. (1985) Isolation and expression of the *Escherichia coli* gene encoding malate dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* 163, 1074-1079.
71. Thompson, H., Tersteegen, A., Thauer, R.K. y Hedderich, R. (1998) Two malate dehydrogenases in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Archives of Microbiology* 170, 38-42.

72. Viollier, P.H., Minas, W., Dale, G.E., Folcher, M. y Thompson, C. (2001) Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological differentiation and antibiotic biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 183, 3184-3192.
73. Waksman, S.A. y Henrici A.T. (1948) Family II. Actinomycetaceae Buchanan, p. 929-980. En Breed R.S., Murray E.G.D. y Hitchens A.P. (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 6<sup>th</sup> ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
74. Welch, T.J. y Bartlett, D.H. (1997) Cloning, sequencing and over expression of the gene encoding malate dehydrogenase from de deep-sea bacterium *Photobacterium* species strain SS9. *Biochimica et Biophysica Acta* 1350, 41-46.
75. Williams, S.T., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. (1984) *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Vol. 4. Williams and Wilkins.
76. Wynne, S.A., Nicholls, S.J., Schwen, M.D. y Sundaram, T. K. (1996) Tetrameric malate dehydrogenase from a thermophilic *Bacillus*: cloning, sequence and overexpression of the gene encoding the enzyme and isolation and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemical Journal* 317, 235-245.
77. Yueh, A.Y., Cheng, CH.S. y Lai, Y.K. (1989) Purification and molecular properties of malate dehydrogenase from the marine diatom *Nitzschia alba*. *Biochemical Journal* 258, 221-228.
78. [www.biochemj.org/bj](http://www.biochemj.org/bj)
79. [http://home.hiroshimau.ac.jp/mbiotech/hosenkin\\_lab/Strepto\(Eng\).html](http://home.hiroshimau.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto(Eng).html)
80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>