



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**“INFLUENCIA DEL FOSFATO EN LA DINÁMICA DE LAS  
ACTIVIDADES DE ATP Y Pp- GLUCOSA CINASAS EN  
*Streptomyces peucetius* Y EN *Streptomyces peucetius* var.  
*caesius*”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**MONSERRAT BETSABE MANZO RUIZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

**VOCAL:** Profesor: JOSE ADELFO ESCALANTE LOZADA

**SECRETARIO:** Profesor: DIANA IVONNE ROCHA MENDOZA

**1er. SUPLENTE:** Profesor: JOSE DE JESUS GARCIA TREJO

**2° SUPLENTE:** Profesor: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LA PRESENTE TESIS SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

## **ASESOR DEL TEMA:**

M. en C. Diana Ivonne Rocha Mendoza

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

## **SUSTENTANTE:**

Monserrat Betsabe Manzo Ruiz





# ÍNDICE

---

|  |    |
|--|----|
| 1. Resumen   | 7  |
| 2. Introducción  | 8  |
| 2.1. Generalidades del género <i>Streptomyces</i>        | 8  |
| 2.1.1. Ciclo de vida                                     | 8  |
| 2.1.2. Importancia industrial                            | 8  |
| 2.2. Generalidades sobre el fosfato                      | 9  |
| 2.2.1. Transporte del fosfato en <i>Streptomyces</i>     | 10 |
| 2.2.1.1 Sistema Pst                                      | 10 |
| 2.2.1.2 Sistema Pit                                      | 12 |
| 2.2.2 Regulación de la expresión de genes por fosfato    | 13 |
| 2.2.3 Papel del fosfato en la producción de antibióticos | 14 |
| 2.2.4 Almacenamiento del fosfato                         | 16 |
| 2.3 El polifosfato                                       | 16 |
| 2.3.1 Síntesis del polifosfato                           | 17 |
| 2.3.2 Funciones  | 18 |
| 2.3.3 El polifosfato como donador de fosfato             | 22 |
| 2.4 Las glucosas cinasas                                 | 22 |
| 3. Justificación   | 25 |
| 4. Hipótesis   | 26 |
| 5. Objetivos   | 27 |
| 6. Estrategia experimental                               | 28 |
| 7. Metodologías  | 29 |
| 8. Resultados  | 33 |
| 9. Análisis de resultados                                | 57 |
| 10. Conclusiones   | 62 |
| 11. Referencias  | 63 |

# ABREVIATURAS

---

|                  |  |
|------------------|--|
| Act              | Actinorrodina  |
| ADP              | Adenosindifosfato                                      |
| AMP              | Adenosinmonofosfato                                    |
| ATP              | Adenosintrifosfato                                     |
| ATP-Glk          | Glucosa cinasa dependiente de ATP                      |
| CTC              | Clortetraciclina                                       |
| glc              | Glucosa  |
| Glk              | Glucosa cinasa   |
| $\epsilon$       | Coefficiente de extinción molar                        |
| M                | Molar  |
| $\mu$            | Velocidad específica de crecimiento                    |
| mg               | Miligramo  |
| $\mu$ g          | Microgramos  |
| min              | Minutos  |
| $\mu$ L          | Microlitros  |
| mL               | Mililitros   |
| mM               | Milimolar  |
| mM <sub>Pi</sub> | Milimoles de fosfato                                   |
| N                | Normal   |
| nm               | Nanómetros   |
| PHB              | Polihidroxi butirato                                   |
| Pi               | Fosfato inorgánico                                     |
| Pit              | Transportador de fosfato inorgánico                    |
| Pp               | Polifosfato  |
| Pp-Glk           | Glucosa cinasa dependiente de polifosfato              |
| Ppk              | Polifosfato cinasa                                     |
| Ppx              | Exopolifosfatasa                                       |
| Pst              | Transportador específico de fosfato                    |
| Red              | Undecilprodigiosina                                    |
| RNA              | Ácido ribonucléico                                     |
| rpm              | Revoluciones por minuto                                |
| s                | Segundos   |
| t                | Tiempo   |
| U                | Unidad de actividad (nmol de NADPH/min*mg de proteína) |
| X                | Biomasa  |
| Y                | Rendimiento  |

# 1. RESUMEN

---

Los estreptomicetos son conocidos como productores de diversos metabolitos secundarios, su biosíntesis es regulada negativamente por altas concentraciones de fosfato. Se ha reportado que el sistema de dos componentes PhoR-PhoP, que responde a bajas concentraciones de fosfato, tiene un papel importante en esta regulación mediante la unión de la forma fosforilada de PhoP a cajas PHO encontradas en diversos genes, en su mayoría involucrados en el metabolismo del fosfato. Tal es el caso del gen que codifica para la polifosfato cinasa, enzima encargada de producir el polímero de fosfato llamado polifosfato.

El polifosfato presenta diversas funciones en la célula, una de ellas es como donador de grupo fosfato para diversas reacciones enzimáticas, por ejemplo la fosforilación de glucosa llevada a cabo por la enzima glucosa cinasa.

En 1976, Hostalek *et al.*, encontraron que la cepa de *Streptomyces aureofaciens*, sobreproductora de clortetraciclina (CTC), presenta dos glucosa cinasas (Glc), una con actividad dependiente de ATP (ATP-Glc) y otra dependiente de polifosfato (Pp-Glc). La mayor actividad de la ATP-Glc se presenta en la fase estacionaria de crecimiento, mientras que la de Pp-Glc en la fase logarítmica y siguiendo el mismo patrón que la formación de CTC. Dicho comportamiento también se observa en *S. peucetius* var. *caesius*. Por tal motivo, se pretende determinar la influencia de la concentración de fosfato en el comportamiento de las actividades de la ATP-Glc y la Pp-Glc de *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius* y la relación de las mismas con la producción de antraciclinas.



## 2. INTRODUCCIÓN

---

### 2.1 Generalidades del género *Streptomyces*

#### 2.1.1 Ciclo de vida

Los estreptomicetos son bacterias filamentosas Gram-positivas con alto contenido de guanina-citosina en su genoma [Bowden, 1996]. Estas bacterias se encuentran en abundancia en el suelo [Demain, 2000], presentan un ciclo de vida complejo que inicia con la germinación de una spora, se extiende en forma de micelio vegetativo sobre su sustrato y, una vez que se terminan los nutrientes del medio, sufre un proceso de diferenciación en donde el micelio vegetativo se auto-lisa para utilizar los nutrientes obtenidos en la formación de micelio aéreo. Este micelio se enrosca y septa para dar lugar a la formación de nuevas esporas e iniciar nuevamente el ciclo [Chater *et al.*, 2010]. La producción de metabolitos secundarios como los antibióticos, además de compuestos de reserva como el glucógeno, están asociados con este proceso de diferenciación morfológica [Chater, 1989; Olukoshi *et al.*, 1994]. Se ha sugerido que los antibióticos son producidos como un mecanismo de defensa contra otros microorganismos durante la lisis celular que antecede a la formación del micelio aéreo [Chater, 1989; Sprusansky *et al.*, 2005].

#### 2.1.2 Importancia industrial

*Streptomyces* es un género de gran importancia industrial debido a que producen una amplia variedad de metabolitos secundarios [Demain, 2000]. De los 22 500 compuestos con actividad biológica obtenidos a partir de microorganismos, el 45% son producidos por actinomicetos [Sánchez y Demain, 2013]. Además, se estima que existen cerca de 15

000 antibióticos, de los cuales el 75% son producidos por actinomicetos y de estos el 75% son producidos por el género *Streptomyces* [Demain, 2014]. La amplia variedad de metabolitos secundarios producidos por los estreptomicetos incluyen compuestos de alto y bajo peso molecular pertenecientes a diversas clases químicas, y con diversas bioactividades (Tabla 1), tales como antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antitumorales, inmunomoduladores, agentes neurológicos, inhibidores enzimáticos, insecticidas, pesticidas, herbicidas, factores de crecimiento, sideróforos, entre otros [Sánchez y Demain, 2013; Tarkka y Hampp, 2008]. Sin embargo, la producción de dichos compuestos puede ser regulada por diversos mecanismos, uno de los procesos más estudiados es la regulación por fosfato, de la cual se desconoce hasta el momento el mecanismo exacto de regulación [Martín *et al.*, 2012].

**Tabla 1.** Ejemplos de metabolitos secundarios producidos por *Streptomyces*.

| <b>Metabolito secundario</b> | <b>Actividad</b>   | <b>Cepa productora</b>                  |
|------------------------------|--|---|
| <b>Cloranfenicol</b>         | Antimicrobiano   | <i>S. venezuelae</i>                    |
| <b>Doxorrubicina</b>         | Antitumoral  | <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> |
| <b>Rapamicina</b>            | Inmunosupresor, antifúngico, antitumoral, neuroprotector | <i>S. hygroscopicus</i>                 |
| <b>Avermectinas</b>          | Antihelmíntico, insecticida                              | <i>S. avermitilis</i>                   |
| <b>Ácido clavulánico</b>     | Inhibidor enzimático, antibiótico                        | <i>S. clavuligerus</i>                  |
| <b>L-fosfinotricina</b>      | Herbicida  | <i>S. viridochromogenes</i>             |

[Sánchez y Demain, 2013]

## 2.2 Generalidades sobre el fosfato

El fosfato es la principal fuente de fósforo en las bacterias. En la naturaleza, de manera orgánica puede encontrarse en restos de plantas

y animales, mientras que en su forma inorgánica se encuentra en forma de sales de calcio u otros cationes. Preferentemente es utilizado por bacterias en su forma inorgánica (Pi), el cual se encuentra en pequeñas proporciones en el suelo, hábitat de los *Streptomyces* [Martín *et al.*, 2012]. El Pi es un compuesto esencial para todos los organismos vivos que en las células ejerce un papel metabólico, estructural y como regulador. Existen diversas moléculas que contienen Pi y que participan en el metabolismo central y energético, dentro de estas se encuentra el ATP, el fosfoenol piruvato y pirofosfato [Alves *et al.*, 1997]. Otras moléculas que contienen fosfato y que tienen un papel estructural en la célula son los ácidos nucleicos, ácidos teicoicos, fosfolípidos, lipopolisacáridos y ciertas enzimas modificadas post-traduccionalmente mediante fosforilación [Martín *et al.*, 2012; Santos-Beneit *et al.*, 2008]. El papel del Pi como regulador se discutirá más adelante.

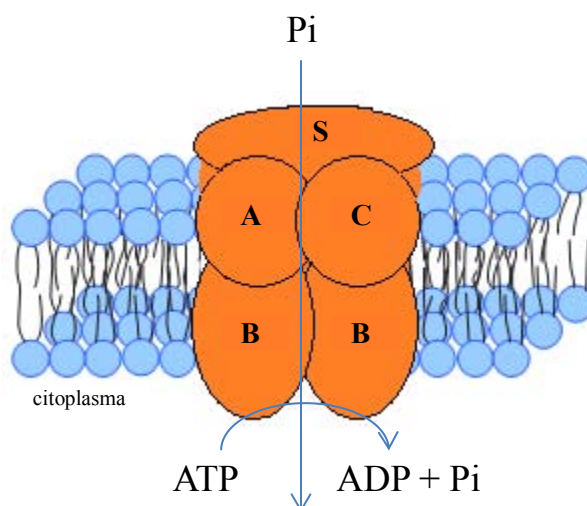
### ***2.2.1 Transporte del fosfato en Streptomyces***

En *Streptomyces* se han descrito dos sistemas de transporte de Pi al interior de la célula: el sistema Pst (Phosphate specific transporter) de alta afinidad, y el sistema Pit (Phosphate inorganic transporter) de baja afinidad y alta velocidad [Díaz *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2012; Santos-Beneit *et al.*, 2008; van Veen, 1997].

#### ***2.2.1.1 Sistema Pst***

El sistema Pst (Figura 1) se trata de un sistema compuesto por cuatro proteínas: PstS que es una proteína periplasmática de unión a fosfato, PstA y PstC que son proteínas integrales de membrana que median la translocación del fosfato a través de la membrana, y PstB que es una ATPasa que provee energía para el transporte [Aguena *et al.*, 2002; van Veen, 1997]. Es un sistema de transporte primario, es decir, el

transporte del Pi a través de la membrana está acoplado a la reacción dada por la ATPasa.



**Figura 1.** Representación del sistema Pst en bacterias. S: proteína de unión a fosfato, A y C: proteínas de membrana, B: proteína dimérica de unión a ATP. Modificado de van Veen, 1997.

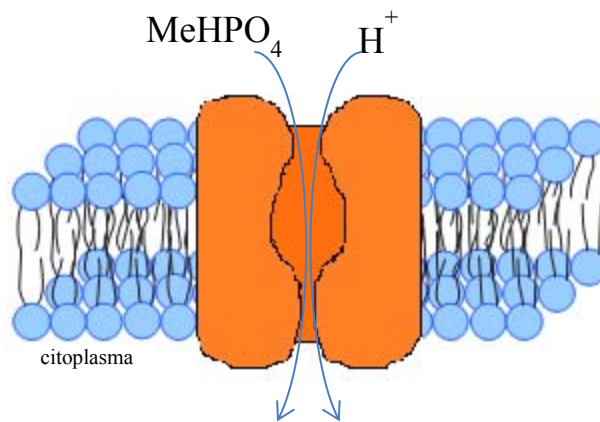
Es inducible a bajas concentraciones de Pi en el medio [Díaz *et al.*, 2005; Lichá *et al.*, 1997]. Puede transportar fosfato en forma mono o dibásica ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) [van Veen, 1997]. En *Escherichia coli* se ha reportado que la inducción se da cuando la concentración de Pi en el medio es menor a  $4 \mu\text{M}$  [Aguena *et al.*, 2002]. En *S. lividans* se evaluó la acumulación de la proteína PstS en cultivos con  $200 \mu\text{M}$  de Pi, no se observó acumulación de la proteína incluso después de cuatro días en los que la concentración de Pi disminuyó a  $30 \mu\text{M}$ , solo se observó acumulación en presencia de fructosa 5%; pero en cultivos con concentraciones de Pi superiores a  $5 \text{ mM}$  no se observó acumulación de PstS a pesar de la presencia de fructosa, comprobando que el sistema es regulado por la concentración de Pi [Díaz *et al.*, 2005].

Los genes que codifican a este transportador forman parte de un operón regulado por el sistema Pho de dos componentes, que se encuentra constituido por las proteínas PhoB-PhoR en *E. coli* [Aguena *et al.*, 2002]

y PhoP-PhoR en *Bacillus subtilis* [Fabret *et al.*, 1999] y en *Streptomyces* [Sola-Landa *et al.*, 2003]. Dicho sistema responde a las concentraciones de Pi en el medio, lo cual se discutirá más adelante.

### 2.2.1.2 Sistema Pit

El sistema Pit (Figura 2) es un sistema de transporte secundario, es decir, es simporte en el que además del fosfato en forma de complejo metálico neutro ( $\text{MeHPO}_4$ ) transporta  $\text{H}^+$ , por lo que requiere de la fuerza motriz de protones como fuente de electrones. Consiste en una sola proteína transmembranal que se expresa constitutivamente y es funcional a altas concentraciones de fosfato [van Veen, 1997]. Sin embargo, en *S. granaticolor* el sistema Pit presentó una velocidad de transporte mayor en fase estacionaria que en micelio joven [Lichá *et al.*, 1997], donde la concentración de Pi debería haber disminuido.



**Figura 2.** Representación del sistema Pit en bacterias. Modificado de van Veen, 1997.

En *S. coelicolor* se encontraron dos genes putativos del sistema Pit, denominados PitH1 y PitH2. De los transportadores de fosfato, Pst y PitH2 son regulados por la concentración de dicho ion. De este modo, a bajas concentraciones de fosfato aumenta la transcripción de Pst, mientras que PitH2 presenta una regulación dual, en la que a bajas concentraciones de fosfato la transcripción del gen aumenta pero

después de 2 h su transcripción disminuye a sus niveles basales [Santos-Beneit *et al.*, 2008].

### **2.2.2 Regulación de la expresión de genes por fosfato**

La disponibilidad variable de nutrientes es una situación a la que los *Streptomyces* deben enfrentarse al habitar el suelo, lo que hace indispensable que tengan la capacidad de detectar los niveles de nutrientes en el ambiente. Con ello, las bacterias han desarrollado diferentes sistemas de regulación de respuesta a la disponibilidad de nutrientes, que pueden controlar la expresión de genes involucrados o no en su metabolismo [Hodgson, 2000].

Dentro de la regulación por nutrientes, se ha descrito el efecto del Pi en la expresión de diversos genes involucrados tanto en el metabolismo primario como en el secundario. Sin embargo, poco se sabe acerca de qué mecanismo(s) se lleva(n) a cabo para ejercer esta regulación [Bibb, 2005; Hodgson, 2000; Martín *et al.*, 2012].

Debido a la complejidad de la regulación por fosfato se cree que existe más de un mecanismo de regulación. El más estudiado en *Streptomyces* es el que involucra al sistema de dos componentes PhoR-PhoP.

La proteína PhoR actúa como un sensor con actividad de cinasa ubicado en la membrana con un solo dominio transmembranal y un tramo corto adicional de aminoácidos hidrofóbicos que pueden servir como un punto de interacción de membrana.

PhoP es la proteína que actúa en respuesta al sensor y que funciona como regulador. PhoP contiene un dominio de unión al DNA en el extremo C-terminal que en condiciones de escasez de fosfato controla la transcripción de genes que pertenecen al regulón PHO. Dicho regulón incluye genes involucrados en el metabolismo del fosfato y su

almacenamiento [Hutchings *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2012; Santos-Beneit *et al.*, 2008; Sola-Landa *et al.*, 2003].

En el 2012, Martín y colaboradores definieron los genes regulados por PhoP en *S. coelicolor*, con base en datos de dos estudios transcriptómicos. En el primer estudio, *S. coelicolor* y la mutante  $\Delta phoP$  se cultivaron en un medio con altas concentraciones de fosfato y se comparó la expresión de genes al tiempo cero y después de 7.5 h de incubación, tiempo en el que la concentración de fosfato descendió [Rodríguez-García *et al.*, 2007]. En el segundo estudio se determinó la dinámica en la expresión de genes a lo largo del tiempo en *S. coelicolor* y en la mutante  $\Delta phoP$  en condiciones de escasez de Pi [Nieselt *et al.*, 2010]. Ejemplos de genes activados por PhoP en escasez de Pi son los que codifican para la fosfatasa alcalina (*phoA*), la polifosfato cinasa (*ppk*), para los sistemas de transporte Pst y Pih2, y el gen *afsS* que actúa como activador de la producción de diversos antibióticos como actinorrodina. Por otro lado, dentro de los genes reprimidos se encuentran *glnA*, *glnII*, *amtB* y *glnK*, involucrados en el metabolismo del nitrógeno [Martín *et al.*, 2012].

### 2.2.3 Papel del fosfato en la producción de antibióticos

En condiciones de laboratorio se ha observado que la producción de metabolitos secundarios es baja en medios ricos en nutrientes, al parecer porque su producción no es necesaria si los nutrientes se encuentran en abundancia [Liras *et al.*, 1990]. Martín y Demain (1980) propusieron que la producción de metabolitos secundarios, como los antibióticos, le confiere a los estreptomicetos ventaja sobre otros microorganismos en la competencia por nutrientes.

A lo largo de los años se ha observado el efecto negativo del Pi en la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios que pertenecen a diferentes clases químicas y que tienen poco en común desde un punto de vista biosintético. Ejemplos de tales metabolitos secundarios son antraciclinas, tetraciclinas, macrólidos, ansamicinas, aminoglucósidos, entre otros [Martín *et al.*, 2012].

Algunos ejemplos de antibióticos en los que se ha visto el efecto negativo del Pi en su producción por *Streptomyces* son candidicina en *S. acrimycini* [Asturias *et al.*, 1994], pimaricina en *S. natalensis* [Mendes *et al.*, 2007], y oxitetraciclina en *S. rimosus* [McDowall *et al.*, 1999]. En dichos ejemplos el sistema PhoR-PhoP está implicado en la regulación.

Otros ejemplos son la actinorrodina (Act) y undecilprodigiosina (Red), producidos por *S. lividans* y *S. coelicolor*. La cepa silvestre de *S. lividans* produce pocas cantidades de ambos antibióticos, pero se observó que una mutante carente del gen *phoP* los producen en grandes cantidades en medio mínimo con 5 mM de Pi, y en la cepa complementada con el gen *phoP* en 5 mM de Pi se restauró la regulación [Sola-Landa *et al.*, 2003]. En 2009, Santos-Beneit y colaboradores evaluaron el efecto del Pi en la producción de Act y Red, así como la participación de *phoP* en la regulación en *S. coelicolor* M145. En dicho trabajo observaron que la cepa silvestre produjo un 50% de Act y solo el 4% de Red en un medio complementado con 18.5 mM de Pi, en comparación con lo producido en el mismo medio complementado con 3.2 mM de Pi. Pero observaron que una mutante  $\Delta$ *phoP* no los sobreprodujo, al contrario, la producción de los antibióticos se retrasó y fue más baja que lo producido por la cepa silvestre en un medio complementado con 3.2 mM de Pi.

Esto indica que la regulación por fosfato dependiente de PhoP no tiene el mismo efecto en todas las especies de *Streptomyces*, sugiriendo que la



regulación por fosfato está conformado por un mecanismo más complejo del que podría pensarse.

#### **2.2.4 Almacenamiento del fosfato**

Algunos autores sugieren que la regulación por fosfato no solo está dada por sus niveles extracelulares, sino que sus niveles intracelulares también están implicados [Chouayekh y Virolle, 2002; Liras *et al.*, 1977]. Dentro de la célula hay diferentes compuestos que contienen fosfato en su estructura, tales como los ácidos nucleicos, el ATP, diversos compuestos fosforilados, entre otros. Algunos, como los ácidos teicoicos y el polifosfato, sirven como reserva de Pi en situaciones de escasez [Martín *et al.*, 2012].

En el caso de los ácidos teicoicos, componentes de la pared celular de bacterias Gram positivas, se ha visto que pueden ser remplazados por ácidos teicurónicos que son carentes de Pi, en cultivos de *Bacillus subtilis* con Pi limitado. Por lo que es probable que en *Streptomyces* los ácidos teicoicos también sean usados como reserva de Pi [Martín *et al.*, 2012]

Por otro lado, el polifosfato es quizá el reservorio de Pi de mayor interés debido a la variedad de funciones que se le han atribuido [Achbergerová y Nahálka, 2011; Barbosa de Lima *et al.*, 2003; Kulaev y Kulakovskaya, 2000].

### **2.3 El polifosfato**

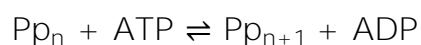
El polifosfato (Pp) es reconocido como uno de los biopolímeros más antiguos [Yamagata *et al.*, 1991] y se encuentra en todo tipo de células [Kulaev y Vagabov, 1983]. Se trata de un polímero lineal no ramificado conformado por monómeros de ortofosfato unidos por un enlace éster

[Kulaev *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 1990] cuya longitud varía desde 3 hasta varios cientos de residuos de fosfato [Kulaev *et al.*, 1999, Kulaev y Kulakovskaya, 2000].

Su contenido en la célula depende del organismo; en plantas y animales se ha encontrado en el orden de microgramos por gramos de peso seco, mientras que levaduras pueden acumular polifosfato en cantidades superiores al 20% de peso seco [Kulaev y Vagabov, 1983].

### 2.3.1 Síntesis del polifosfato

Su biosíntesis se lleva a cabo a partir del fosfato terminal del ATP mediante la reacción catalizada por la polifosfato cinasa (Ppk) [Clark *et al.*, 1986; Mullan *et al.*, 2002; Yalim *et al.*, 2012]:



Su degradación puede darse por la reacción reversa de la Ppk o por la exopolifosfatasa (Ppx) [Gray *et al.*, 2014; Kornberg, 1995; Kulaev *et al.*, 1999]:



En bacterias, la cantidad de Pp celular total depende de la disponibilidad del fosfato en el ambiente [Achbergerová y Nahálka, 2011; Kulaev y Kulakovskaya, 2000] y del estado energético de las células, ya que se ha observado que el Pp se acumula en condiciones de abundancia energética (en la fase exponencial de crecimiento), llegando a un máximo de concentración al final de la fase exponencial, y se degrada en condiciones de pobreza energética (fase estacionaria) [Barbosa de Lima *et al.*, 2003].

El Pp puede encontrarse en la célula en forma de cadenas cortas, cadenas largas y como “gránulos de volutina” [Clark *et al.*, 1986], estos

últimos consisten en cadenas largas de Pp formando complejos con cationes, polihidroxitirato, ácidos nucleicos o proteínas [Kulaev *et al.*, 2004].

En una cepa de *E. coli* faltante de la Ppk se observó que no produce cadenas largas de Pp y no es capaz de llegar a la fase estacionaria de crecimiento [Kornberg, 1995], lo que sugiere que el tamaño en el que se encuentran las cadenas de Pp en la célula está en función de la fase de crecimiento y, a su vez, el tamaño del Pp es importante para la supervivencia de la célula.

### 2.3.2 Funciones

En los últimos años se ha incrementado el interés por el polifosfato debido a las diversas funciones que se le atribuyen en procariontes y eucariontes. A continuación se discuten algunas de estas funciones con especial enfoque en procariontes.

#### ➤ Reservorio de energía

A partir de Pp se puede obtener ATP mediante el ataque nucleofílico del AMP o ADP al último fosfato de la cadena de Pp. En esta reacción puede participar la Ppk [Kornberg, 1995] o el sistema Pp:AMP fosfotransferasa/adenilato cinasa [Kulaev *et al.*, 2004]. Además, el enlace fosfoanhidro del Pp es energéticamente equivalente al del ATP por lo que el Pp puede sustituirlo como sustrato de enzimas que utilizan ATP [Kulaev *et al.*, 2004].

#### ➤ Reservorio de fosfato

Mediante la formación de Pp se pueden acumular grandes cantidades de Pi en la célula. En condiciones de escasez de Pi en el medio, el Pp puede degradarse, mediante la acción de la Ppk o la Ppx, para proporcionar el

Pi requerido por la célula [Kornberg, 1995]. Aunado a esto, almacenar el Pi en forma de Pp le proporciona a la célula una ventaja osmótica. En este sentido, se observó que una cepa de *E. coli* mutada en la Ppk era menos resistente a cambios osmóticos en comparación con la cepa silvestre [Rao y Kornberg, 1996].

➤ Agente quelante

El Pp es un polianión, característica que le permite formar complejos con diversos cationes como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $K^+$ , o con metales pesados, resaltando la importancia del Pp en la detoxificación de este último tipo de cationes. En *Staphylococcus aureus* se observó que el Pp es útil para la quelación de  $Ni^{2+}$ . En *E. coli*, la tolerancia a  $Cd^{2+}$  depende del metabolismo del Pp, es decir, tanto la síntesis como la degradación del Pp por la Ppx son importantes en la detoxificación ya que se ha propuesto que el metal es transportado fuera de la célula como  $MeHPO_4^-$ , y el fosfato usado para formar la sal es obtenido de la degradación del Pp [Kulaev *et al.*, 2004].

➤ Solución amortiguadora de iones alcalinos

En algas y levaduras, el Pp es almacenado en vacuolas. En el caso del alga verde *Dunaliella salina*, puede llegar a almacenar 1 M de Pi en forma de Pp. En pH alcalino, las aminos entran a la vacuola y son neutralizadas por los  $H^+$  liberados de la hidrólisis del Pp [Kornberg, 1995].

➤ Transporte en membrana

El Pp puede formar un complejo con el polímero polihidroxibutirato (PHB) y  $Ca^{2+}$ . El PHB solvata al Pp enroscándose alrededor de él formando una estructura en forma de canal. En condiciones fisiológicas, el Pp se encuentra cargado negativamente lo que favorece su

interacción con iones divalentes como  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ , pero la manera en la que interactúan el Pp y el PHB hacen al canal selectivo para  $Ca^{2+}$ . Este complejo produce cambios en la membrana de células competentes, haciéndolas más rígidas, y hay una correlación entre la concentración del complejo Pp- $Ca^{2+}$ -PHB y la eficiencia de transformación en *E. coli*. Sin embargo, la manera en la que esto favorece a la entrada de DNA sigue sin conocerse [Kornberg, 1995; Kulaev *et al.*, 2004].

➤ Adaptación fisiológica durante el crecimiento y estrés ambiental

En 1996, Rao y Kornberg publicaron un estudio acerca de la importancia del Pp para la supervivencia en la fase estacionaria de crecimiento y en respuesta a diferentes tipos de estrés en *E. coli*. Obtuvieron una mutante deficiente de la enzima Ppk y compararon su comportamiento con la cepa silvestre. Observaron que la mutante no se mantenía viable en la fase estacionaria y solo el 3% de células, en comparación con el 20% de la cepa silvestre, se mantuvo viable a los 10 días de incubación. Además, las colonias de la cepa mutante eran más pequeñas que las de la silvestre. En cuanto a condiciones de estrés, observaron que la mutante era menos resistente, en términos de viabilidad en fase estacionaria de crecimiento, a estrés oxidante por  $H_2O_2$ , a cambio osmótico provocado por la adición de NaCl 2.5 M y a exposición a una temperatura de 55°C.

Por otro lado, en una mutante de *Pseudomonas aeruginosa* no productora de Ppk1 se observó que era deficiente en formar biopelícula, en movilidad, en virulencia y en la percepción de quórum. Además, presentó sensibilidad al antibiótico  $\beta$ -lactámico carbenicilina y a desecación [Fraley *et al.*, 2006]. En línea con la resistencia a antibióticos; mediante mutantes de *E. coli* deficientes de Ppk, Ppx, o

deficiente de Ppx y sobreproductora de Ppk, se demostró que el Pp contribuye a la resistencia a espectinomicina debido a que estabiliza a la **proteína responsable de esta resistencia (aminoglucosido 3'-adeniltransferasa)** [Gray *et al.*, 2014]

➤ Chaperona

Son varios los estudios que demuestran la participación del Pp en la adaptación a situaciones de estrés [Fraley *et al.*, 2006; Rao y Kornberg, 1996; ver revisiones: Kornberg, 1995; Kulaev *et al.*, 1999; Kulaev y Kulakovskaya, 2000]. Pero el mecanismo mediante el cual el Pp confiere esta protección seguía siendo una incógnita. Posiblemente, el papel de Pp como chaperona es el determinante en el proceso de adaptación a estrés ambiental. Gray y colaboradores (2014) demostraron en *E. coli* que el Pp actúa como una chaperona global y altamente efectiva que previene el desplegamiento de proteínas y su agregación *in vivo* e *in vitro*. Para ello, evaluaron el papel del Pp como chaperona en estrés oxidante, en respuesta a la exposición de ácido hipocloroso, a antibióticos y a altas temperaturas, este último en comparación con otras chaperonas reportadas que actúan en respuesta a choque térmico. Además, demostraron que el tamaño de la cadena de Pp determina su eficiencia como chaperona, en este sentido, las cadenas largas (en un rango de 200-1300 unidades de Pi) funcionaron como chaperonas más efectivas que cadenas de Pp más cortas.

➤ Componente en la regulación genética

Se han propuesto diferentes procesos de regulación de la expresión de genes donde el Pp desempeña un papel directa o indirectamente. En *S. lividans*, una mutante  $\Delta ppk$  sobreprodujo el antibiótico actinorrodina, lo cual correlacionaba con el aumento en la expresión de *actII-ORF4*,

activador de la vía biosintética de actinorrodina. Con esto se propuso que el Pp participa en la regulación de la producción del antibiótico al proveer Pi endógeno, el cual sería el encargado directo de la regulación [Chouayekh y Virolle, 2002]. Además, la Ppk puede estar involucrada en la regulación de las concentraciones de los nucleótidos trifosfato [Kulaev *et al.*, 2004].

### **2.3.3 El polifosfato como donador de fosfato**

El Pp ha sido considerado como el donador de fosfato más antiguo en los seres vivos. Al encontrarse enzimas que utilizan y sintetizan Pp en organismos alejados filogenéticamente sugiere que el Pp puede seguir siendo importante en la regulación del metabolismo del fósforo durante el desarrollo celular [Kornberg, 1995]. Un ejemplo de enzimas que utilizan Pp como sustrato es la glucosa cinasa (Glc) encontrada en el género *Streptomyces* [Hostalek, 1976; Ruiz *et al.*, 2014].

## **2.4 Las glucosa cinasas**

La glucosa cinasa (Glc) es la primera enzima que participa en la glucólisis, se encarga de fosforilar la glucosa para dar lugar a la glucosa-6-fosfato. Como fuente de fosfato puede utilizar al ATP, polifosfato o ambos, así como ADP [Ruiz *et al.*, 2014]. En 1957, Szymona encontró por primera vez en *Mycobacterium phlei* a una Glc dependiente de ATP y polifosfato. Posteriormente este tipo de enzimas fueron encontradas en otras bacterias como *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Propionibacterium shermanii*, y *C. glutamicum*. Fue en *Microlunatus phosphovorius* en donde por primera vez se caracterizó a una glucosa cinasa que solo utiliza Pp como donador de fosfato [Liao *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2003].

Hostalek y colaboradores (1976) encontraron que *S. aureofaciens* presenta dos actividades de Glk, una dependiente de ATP (ATP-Glk) y otra dependiente de polifosfato (Pp-Glk); la primera presenta la mayor actividad durante la fase logarítmica de crecimiento, mientras que la segunda al final de la misma fase y se mantiene a lo largo de la fase estacionaria. También observaron que la actividad de la Pp-Glk presenta el mismo patrón que la síntesis del metabolito secundario clortetraciclina, por lo que sugirieron que ésta actividad está involucrada en la síntesis de metabolitos secundarios.

En nuestro grupo de trabajo se observó que *S. peucetius* var. *caesius* también presenta ambas actividades de Glk, pero a diferencia de otros estreptomicetos donde se han determinado ambas enzimas, incluida la cepa silvestre, la actividad de Pp-Glk es mayor que la de ATP-Glk (Tabla 2). Además, produce mayor cantidad de antraciclinas (38.7 µg/mg de peso seco, cultivado en medio NDYE con glucosa 100 mM, a las 120 h de incubación) en comparación con la cepa silvestre (8.8 µg/mg) [Ruiz *et al.*, 2014].

De este modo, al igual que en *S. aureofaciens* se piensa que la Pp-Glk podría tener alguna relación con la producción de sus metabolitos secundarios, pues se ha observado un incremento de la producción de antraciclinas cuando se presenta la actividad máxima de la Pp-Glk.



**Tabla 2.** Comparación de las actividades ATP-Glk y Pp-Glk en diferentes cepas de *Streptomyces*

| Cepa de <i>Streptomyces</i>             | Actividad ATP-Glk (U/mg proteína) | Actividad Pp-Glk (U/mg proteína) | Proporción de actividad Pp-Glk/ATP-Glk |
|---|-----------------------------------|----------------------------------|--|
| <i>S. peucetius</i>                     | 344±34.7                          | 44±2.4                           | 0.13                                   |
| <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> | 215±22.7                          | 403±40.2                         | 1.87                                   |
| <i>S. coelicolor</i>                    | 154±21.9                          | 11±0.7                           | 0.07                                   |
| <i>S. lividans</i>                      | 19±3.4                            | 5±0.6                            | 0.30                                   |
| <i>S. thermocarboxydus</i>              | 34±4.3                            | 9±3.2                            | 0.27                                   |

Las cepas *S. peucetius*, *S. peucetius* var. *caesius* y *S. thermocarboxydus* fueron cultivadas en medio NDYE con glucosa 100 mM. *S. coelicolor* y *S. lividans* fueron cultivados en medio NMMP con 50 mM de glucosa. Las actividades se midieron a las 48h de incubación [Ruiz *et al.*, 2014].

### 3. JUSTIFICACIÓN

---

El polifosfato (Pp) tiene un papel primordial en las células que involucra desde su estado energético hasta mecanismos de regulación. A pesar de su importancia, se desconoce si la concentración de fosfato tiene algún efecto sobre su síntesis y en la de antraciclinas en *S. peucetius* y en *S. peucetius* var. *caesius*, por lo que es de nuestro interés estudiar dicho efecto.

Por otro lado, el polifosfato sirve como donador de fosfato en ciertas reacciones metabólicas, como la catalizada por la glucosa cinasa. Dado que la glucosa cinasa dependiente de polifosfato de *S. peucetius* var. *caesius* es más activa que la de la cepa silvestre *S. peucetius* nos interesa conocer la relación de esta actividad con la producción de Pp y antraciclinas, así como determinar si la concentración de Pp puede influir en la dinámica de las actividades de la ATP-Glk y Pp-Glk de ambas cepas.

## 4. HIPÓTESIS

---

Si la concentración de fosfato influye negativamente en la enzima encargada de la producción de polifosfato (Ppk), se espera que al aumentar la concentración de fosfato en el medio disminuya la concentración de polifosfato total en ambas cepas. Aunado a esto, la cepa mutante (*S. peucetius* var. *caesius*) presenta mayor actividad de Pp-Glk, la cual usa al polifosfato como sustrato. Por lo tanto, entre mayor sea la actividad de Pp-Glk menor será la concentración de polifosfato total.

Por otro lado, al verse afectada la producción de polifosfato por altas concentraciones de fosfato en el medio, se espera que también se vea afectada negativamente la actividad de Pp-Glk en ambas cepas, por lo que la actividad de ATP-Glk aumentará para compensar dicha actividad.

Así mismo, si la concentración de fosfato ejerce un efecto negativo en la producción de metabolitos secundarios, es de esperarse que en ambas cepas el fosfato influya negativamente en la producción de antraciclinas. En cuanto a la relación de la concentración intracelular de polifosfato y de antraciclinas, se espera que en condiciones en las que haya baja concentración de polifosfato la producción de antraciclinas sea mayor que en condiciones de mayor concentración de polifosfato intracelular.

# 5. OBJETIVOS

---

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la influencia de la concentración de fosfatos en el medio de cultivo sobre la producción de Pp, las actividades de Pp-Glk y ATP-Glk, así como en la producción de antraciclinas en *S. peucetius* y de su mutante sobreproductora de antraciclinas *S. peucetius* var. *caesius*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

En ambas cepas:

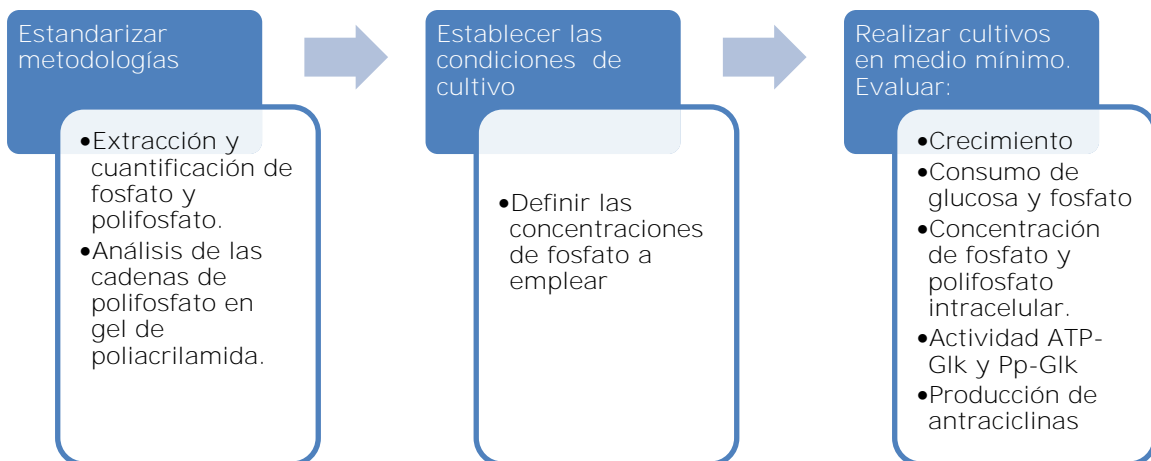
- Definir las concentraciones de fosfato a emplearse en el estudio usando como criterio el crecimiento y la producción de antraciclinas en *S. peucetius* var. *caesius*.
- Determinar la influencia del fosfato en:
  - La concentración de polifosfato intracelular.
  - Las actividades de Pp-Glk y ATP-Glk.
- Evaluar la influencia de la concentración del Pp sobre las actividades ATP-Glk y Pp-Glk.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Con el objetivo de hacer un primer acercamiento en el papel que tiene el fosfato en la producción de polifosfato y en la actividad de las glucosinas de *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius*, se siguió la estrategia experimental mostrada en la Figura 3.

Básicamente la estrategia experimental consistió en establecer y estandarizar las metodologías para la extracción y cuantificación del fosfato y polifosfato intracelular, así como del fosfato remanente en el medio de cultivo.

Una vez teniendo las metodologías estandarizadas se procedió a definir las concentraciones de fosfato a añadir en el cultivo durante el estudio, tomando como base modificaciones en la producción de antraciclina provocadas por la concentración de fosfato.



**Figura 3.** Estrategia experimental. Evaluación del efecto del fosfato en la producción de polifosfato y en las actividades de la ATP-Gik y Pp-Gik de *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius*.

# 7. METODOLOGÍAS

---

## *Medios de cultivo*

*S. peucetius* NRRL B-3826 y *S. peucetius* var. *caesius* NRRL B-5337 se obtuvieron de la colección de cultivos del Departamento de Agricultura USA (Peoria IL). Los medios de esporulación empleados fueron ISP4 modificado (almidón 2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 %, MgSO<sub>4</sub> 0.1 %, CaCO<sub>3</sub> 0.1 %, NaNO<sub>3</sub> 0.26%, FeSO<sub>4</sub> 0.0001%, MgCl<sub>2</sub> 0.0001%, ZnSO<sub>4</sub> 0.0001%, agar 2%) [Madduri y Hutchinson, 1995] para *S. peucetius*, y un medio de esporulación específico para *S. peucetius* var. *caesius* diseñado en el laboratorio (glucosa 1%, almidón 2%, extracto de levadura 0.5%, caseína digerida 0.5%, CaCO<sub>3</sub> 0.1%, agar 2%). Los cultivos líquidos se realizaron en el medio NDYE (glucosa 100 mM, extracto de levadura 0.2%, NaNO<sub>3</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.5 mM, pH 7.3) [Ruiz *et al.*, 2014] con tres concentraciones de fosfato: 0.1, 1 y 20 mM adicionado como K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Para los cultivos se utilizaron 5x10<sup>3</sup> esporas de *S. peucetius* y de *S. peucetius* var. *caesius* y se incubó a 29°C, en agitación orbital a 180 rpm, en matraces bafleados. La toma de muestras se realizó por triplicado a las 24, 36, 48, 60, 72, 96 y 120 h de incubación.

## *Determinación de crecimiento, contenido de proteína, glucosa residual*

El crecimiento se determinó mediante peso seco, para lo cual se filtró 10 mL de muestra en filtros Whatman No. 1 y se secaron a 60°C durante 60 h. La proteína se cuantificó mediante el método de Bradford [Bradford, 1976], utilizando albúmina sérica bovina como estándar. Para cuantificar la glucosa residual se empleó el método de Trinder que utiliza a la enzima glucosa oxidasa [Trinder, 1969].

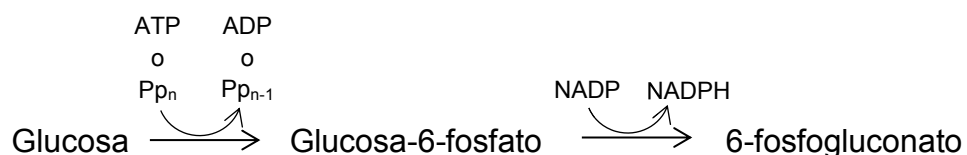
## *Obtención del extracto enzimático citosólico*

El paquete celular colectado de 20 mL de muestra se lavó 2 veces con NaCl 0.85% y fue resuspendido en 1 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 adicionado con glucosa 20 mM e inhibidor de proteasas (cocktail Sigma-Aldrich ®) en una

proporción de 1:1000. Las células fueron sonicadas con tres pulsos de 60 watts de frecuencia durante 30 s dejando reposar 1 min entre cada pulso. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante (extracto enzimático) se conservó y el paquete celular se sometió nuevamente al proceso de sonicación, el proceso se repitió hasta observar la lisis de la mayoría de las células.

#### *Determinación de la actividad enzimática*

La determinación de la actividad Glk se realizó cuantificando la formación de NADPH tomando en cuenta la siguiente reacción acoplada:



donde la fosforilación de la glucosa se lleva a cabo por la glucosa cinasa y la oxidación de la glucosa fosforilada se realiza por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

La reducción de NADP se monitoreó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340nm ( $\epsilon_{\text{NADPH}_{340}} = 6.22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ), para lo cual, se preparó una mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 100 mM (pH 7.5 para medir la actividad de ATP-Glk y pH 8.5 para Pp-Glk),  $\text{MgCl}_2$  250 mM, NADP 5 mM, y el donador de fosfatos: ATP 100 mM para medir ATP-Glk y polifosfato de sodio de aproximadamente 20 residuos de Pi (Sigma-Aldrich ®) 20 mg/mL para medir Pp-Glk. A dicha mezcla de reacción incubada durante 10 min a 42°C se adicionó 50  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático y 4  $\mu\text{L}$  de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), y se determinó la absorbancia cada 20 segundos [Ruiz *et al.*, 2014]. Una unidad de actividad se definió como nmol de NADPH/min\*mg de proteína.

#### *Determinación de antraciclinas*

El paquete celular de 5 mL de muestra se lavó 2 veces con NaCl 0.85% y se resuspendió en 1 mL de una solución de extracción acetona/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 N (4:1). El

paquete celular se sonicó con tres pulsos de 60 watts de frecuencia durante 30 s dejando reposar 1 min entre cada pulso. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C, se colectó el sobrenadante y al paquete celular se le adicionó nuevamente 1 mL de la solución de extracción, se repitió el procedimiento hasta observar al sobrenadante incoloro. La determinación de antraciclinas se realizó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 495nm frente a un blanco de solución de extracción. Para los cálculos de la concentración de antraciclinas se utilizó el coeficiente de extinción  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 220$ , obtenido del producto seco llevado a peso constante a 56°C y 0.03 Torr [Arcamone *et al.*, 1969].

#### *Determinación de consumo de fosfato, fosfato y polifosfato intracelular*

Se colectaron 5 mL de muestra, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se almacenó para cuantificar fosfato residual y el paquete celular para cuantificar fosfato y polifosfato intracelular. El paquete celular se lavó dos veces con agua desionizada. Todos los reactivos empleados para la extracción y cuantificación de fosfato y polifosfato se prepararon con agua desionizada.

Para la extracción de fosfato y polifosfato intracelular, el paquete celular se resuspendió en 1 mL del buffer de extracción (NaCl 1.5 M, EDTA 10 mM y NaF 1.2 mM) [Barbosa de Lima *et al.*, 2003], las células se rompieron como se indicó previamente y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su procesamiento. El polifosfato intracelular obtenido fue analizado de dos formas: en gel de poliacrilamida para estimar el tamaño de las cadenas, como se mostrará posteriormente, y para cuantificar su concentración. El polifosfato se cuantificó como residuos de fosfato, para lo cual 10 µL del extracto se hidrolizaron durante 90 min, por ebullición, con 10 µL de HCl concentrado.

La determinación de fosfato se realizó espectrofotométricamente, la metodología se basa en la formación del complejo fosfomolibdato, constituido por fosfato y molibdeno, el cual puede ser reducido para producir azul de molibdeno que es de color azul intenso. La intensidad del color es proporcional a la concentración de fosfato en la muestra.



A 10  $\mu$ L de muestra se le adicionó 1 mL de la siguiente mezcla de reacción disuelta en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N: molibdato de amonio 0.25%, sulfato de hidracina 0.2%, ácido L(+) ascórbico 1%. La mezcla se incubó a 45°C durante 30 min y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 820nm [Ohtomo *et al.*, 2004]. El polifosfato se determinó por diferencia de concentraciones del fosfato en la muestra sin hidrolizar y después de hidrolizar.

#### *Análisis de las cadenas de polifosfato por electroforesis en gel de poliacrilamida*

Con el objetivo de estimar el tamaño de cadenas que se forman en ambas cepas, catalogándolas como cadenas de tamaño corto, largo y gránulos, se hizo un estudio por electroforesis en gel. Para ello, se prepararon geles de poliacrilamida al 5% (38 x 13.5 x 0.75 cm) utilizando como buffer una solución de Tris 90 mM/Borato 90 mM/EDTA 2.7 mM/Urea 7 M pH 8.3. Como buffer de carga se utilizó una solución de Tris 49.5 mM/borato 49.5 mM/EDTA 1.5 mM/urea 3.85 M con azul de bromofenol 0.03%, xileno-cianol ff 0.06% y glicerol 36%. El buffer de corrida usado fue una solución de Tris 90 mM/borato 90 mM/EDTA 2.7 mM [Clark *et al.*, 1986].

Las muestras que se emplearon fueron las obtenidas en la extracción de polifosfato intracelular sin hidrolizar. De las muestras obtenidas de cada cepa, de cada concentración de fosfato en el cultivo, se hizo una mezcla del triplicado obtenido para cada tiempo de cultivo. La cantidad de muestra que se cargó en los pozos del gel se estandarizó con la concentración de proteína total. En el caso de *S. peucetius* se utilizaron las muestras de los tiempos 24, 48, 72 y 96 h, y se cargaron 0.13  $\mu$ g de proteína total, debido a que esta era la cantidad máxima que se podía cargar de las muestras obtenidas de los cultivos con 0.1 mM de fosfato; para *S. peucetius* var. *caesius* se utilizaron las muestras de los tiempos 24, 36, 72 y 96 h, y se cargaron 0.19  $\mu$ g de proteína total, por el mismo criterio que en la cepa silvestre. Los tiempos de fermentación antes mencionados corresponden a las fases exponencial, pre-estacionaria y estacionaria (72 y 96 h) de crecimiento de cada cepa.

## 8. RESULTADOS

---

Con el objetivo de determinar la influencia de la concentración de fosfato en la producción de antraciclinas y polifosfato, y a su vez en las actividades de las glucosa cinasas de *S. peucetius* y su mutante sobreproductora de antraciclinas *S. peucetius* var. *caesius*, se evaluó el crecimiento, consumo de glucosa y fosfato, concentración de fosfato y polifosfato intracelular, además de las actividades ATP-Glk y Pp-Glk en medio mínimo complementado con tres concentraciones de fosfato.

### *Elección de las concentraciones de fosfato a añadir en los cultivos*

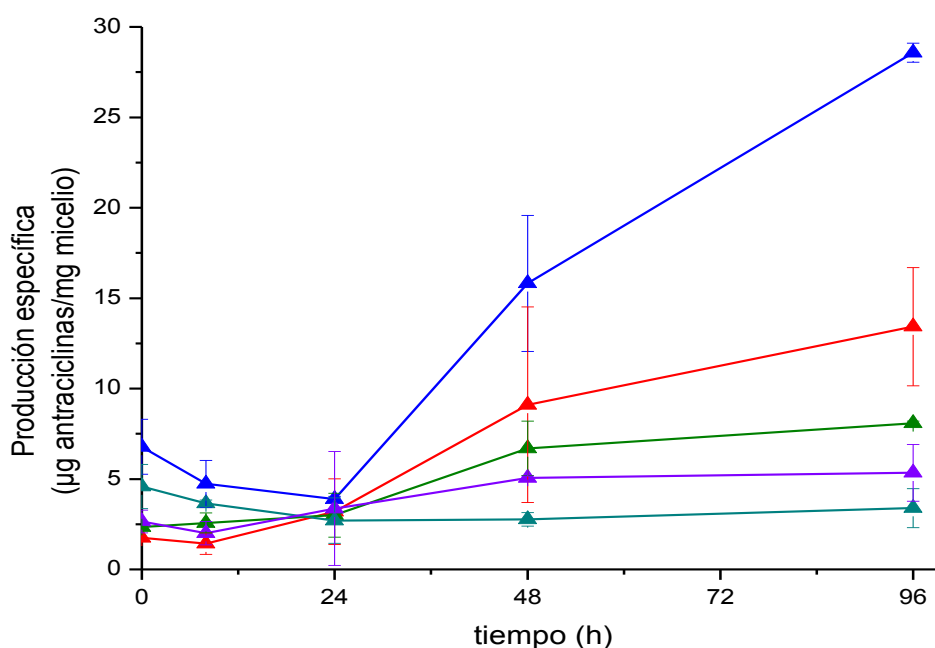
Para iniciar con el presente estudio se eligieron las concentraciones de fosfato a emplear. Para ello, se evaluó la producción de antraciclinas de la cepa mutante *S. peucetius* var. *caesius*, partiendo de micelio, en medio mínimo complementado con 0.1, 1, 10, 20 y 100 mM de fosfato.

Al comparar la producción de antraciclinas en diferentes concentraciones de fosfato (Pi), se observó que al aumentar la concentración de Pi en el medio la producción disminuía (Figura 4). Sin embargo, en la formación de biomasa el fosfato tuvo el efecto contrario. En general, al aumentar el Pi en el medio se favoreció el crecimiento, pero una concentración de fosfato de 100 mM en el cultivo no le permitió al microorganismo crecer (Tabla 3).

En los cultivos con 0.1 y 1 mM de Pi ( $\text{mM}_{\text{Pi}}$ ) no se observó diferencia en la formación de biomasa, por el contrario, al comparar la producción de antraciclinas en ambas concentraciones, en 0.1  $\text{mM}_{\text{Pi}}$  se obtuvo el doble de antraciclinas que en 1  $\text{mM}_{\text{Pi}}$ . Por otro lado, en los cultivos con 20  $\text{mM}_{\text{Pi}}$  se obtuvo la mayor formación de biomasa en comparación con los cultivos complementados con las otras concentraciones de fosfato, y no

hubo producción aparente de antraciclinas. En cuanto que en los cultivos con 10 mM<sub>Pi</sub> el crecimiento fue menor que en 20 mM<sub>Pi</sub> y si hubo producción de antraciclinas. Finalmente, en los cultivos con 100 mM<sub>Pi</sub> no se observó crecimiento ni producción de antraciclinas.

De las cinco concentraciones de Pi en el medio de cultivo que se evaluaron, se eligieron 0.1, 1 y 20 mM debido a que en estas concentraciones el microorganismo creció sin problemas, además de que se observó una marcada influencia del fosfato en la producción del metabolito secundario, con lo cual también se esperaba observar alguna influencia del fosfato principalmente en la producción de polifosfato y en las actividades de las glucosa cinasas.



**Figura 4.** Efecto de la concentración de fosfato en la producción de antraciclinas de *S. peuceetius* var. *caesius*, partiendo de micelio. **A** Producción específica de antraciclinas en medio mínimo complementado con 0.1 mM, 1 mM, 10 mM, 20 mM, y 100 mM de fosfato.

**Tabla 3.** Formación de biomasa en cultivos con diferentes concentraciones de fosfato.

| Concentración de fosfato en el cultivo (mM) | Formación de biomasa a las 96 h (mg/mL) |
|---|---|
| 0.1   | 2.42                                    |
| 1   | 2.31                                    |
| 10  | 3.54                                    |
| 20  | 5.81                                    |
| 100   | 0.14                                    |

Habiendo establecido las concentraciones de fosfato a emplear, se procedió a realizar cultivos con la cepa silvestre *S. peucetius* y con la cepa sobreproductora de antraciclinas *S. peucetius* var. *caesius*, evaluando los parámetros previamente mencionados en la sección de metodología.

*Crecimiento de S. peucetius vs S. peucetius* var. *caesius* en diferentes concentraciones de fosfato en el medio de cultivo

Previamente se observó el efecto del fosfato en *S. peucetius* var. *caesius* partiendo de micelio, pero debido a que se pretendía reducir las posibles variables que podrían ser generadas en el estudio por la diferencia de edades del micelio de ambas cepas, se trataron de homogenizar los cultivos inoculando la misma cantidad de esporas de cada cepa en las diferentes concentraciones de fosfato.

Comparando el crecimiento de la cepa silvestre y mutante en las tres concentraciones de fosfato empleadas, se observó que ambas cepas obtuvieron la biomasa máxima en el medio de cultivo con 1 mM<sub>P<sub>i</sub></sub> (Tabla 4). Sin embargo, los valores de crecimiento máximo (X) de la cepa mutante fueron mayores que los obtenidos en la silvestre. Esto nos podría indicar que la cepa mutante es más resistente que la cepa

silvestre a las modificaciones en la concentración del sustrato en el medio de cultivo.

**Tabla 4.** Datos cinéticos del crecimiento de *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius* en diferentes concentraciones de fosfato.

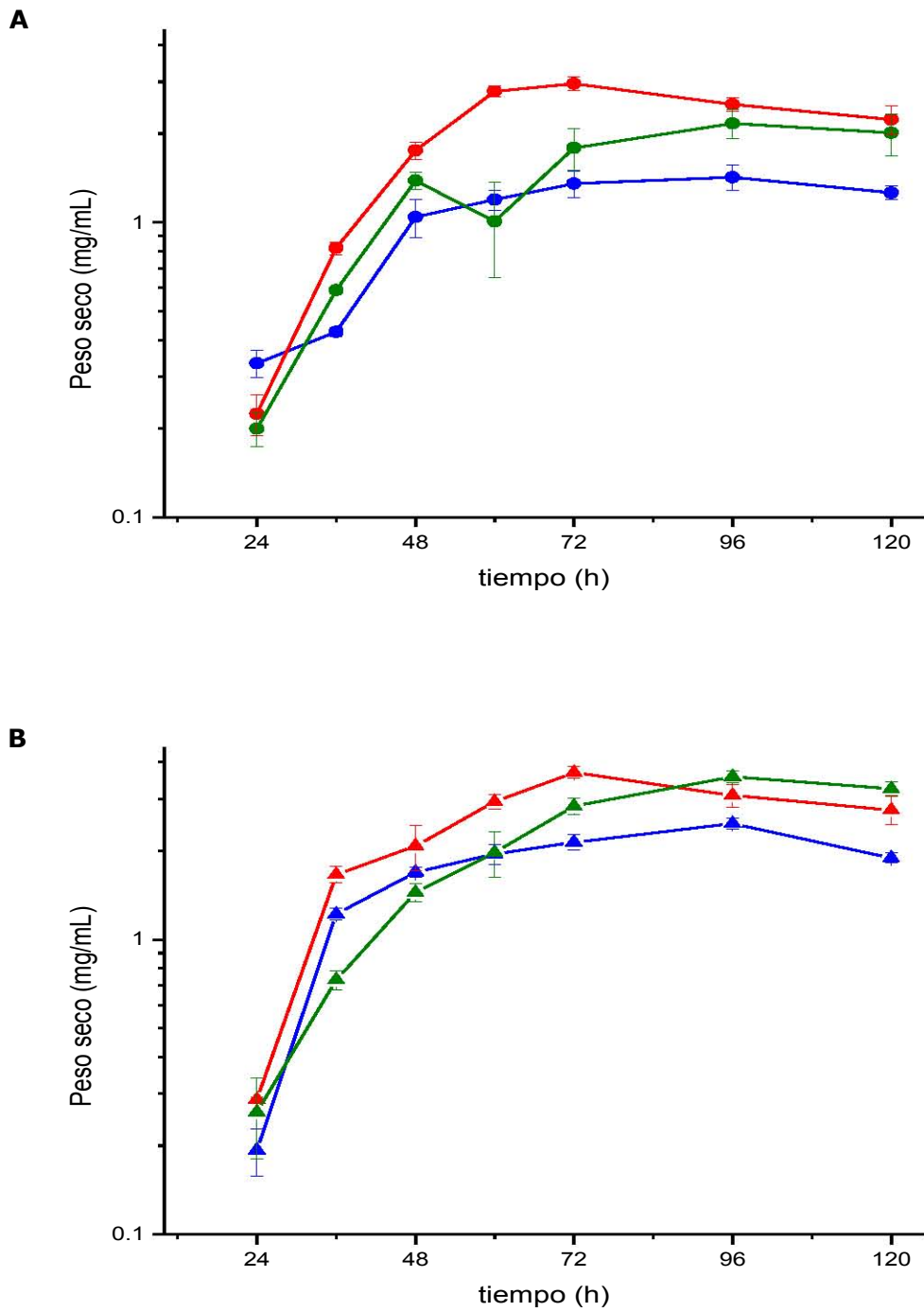
| Determinación   | <i>S. peucetius</i>             |                                 |                                 | <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> |                                 |                                 |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|---------------------------------|---------------------------------|
|   | 0.1 mM <sub>Pi</sub>            | 1 mM <sub>Pi</sub>              | 20 mM <sub>Pi</sub>             | 0.1 mM <sub>Pi</sub>                    | 1 mM <sub>Pi</sub>              | 20 mM <sub>Pi</sub>             |
| <b>μ (t<sup>-1</sup>)</b>                                       | 0.07 ±<br>1.06x10 <sup>-2</sup> | 0.09 ±<br>7.07x10 <sup>-3</sup> | 0.08 ±<br>4.64x10 <sup>-3</sup> | 0.15 ±<br>2.52x10 <sup>-2</sup>         | 0.15 ±<br>5.74x10 <sup>-3</sup> | 0.06<br>±3.52x10 <sup>-3</sup>  |
| <b>X máxima (mg/mL)</b>   | 1.42 ±<br>0.14                  | 2.95 ±<br>0.16                  | 2.17 ±<br>0.25                  | 2.47 ±<br>0.11                          | 3.69 ±<br>0.17                  | 3.57 ±<br>0.17                  |
| <b>Velocidad de consumo de glucosa (mM/h)</b>                   | 0.53 ±<br>0.03                  | 1.43 ±<br>0.16                  | 1.23 ±<br>0.06                  | 1.11 ±<br>0.06                          | 3.05 ±<br>0.12                  | 1.56 ±<br>0.30                  |
| <b>Velocidad de consumo de Pi (mM/h)</b>                        | 0.01 ±<br>9.59x10 <sup>-4</sup> | 0.03 ±<br>9.34x10 <sup>-4</sup> | 0.04 ±<br>1.22x10 <sup>-3</sup> | 0.01 ±<br>9.88x10 <sup>-4</sup>         | 0.04 ±<br>1.92x10 <sup>-4</sup> | 0.04 ±<br>1.03x10 <sup>-2</sup> |
| <b>Consumo neto de Pi (mM)</b>                                  | 0.57 ±<br>0.02                  | 1.71 ±<br>0.02                  | 2.65 ±<br>0.49                  | 0.56 ±<br>0.01                          | 1.71 ±<br>0.02                  | 4.65 ±<br>1.43                  |
| <b>Producción específica de antraciclinas (μg/mg peso seco)</b> | 11.03 ±<br>2.65                 | 6.74 ±<br>1.09                  | 1.45 ±<br>0.66                  | 34.85 ±<br>0.05                         | 32.69 ±<br>0.30                 | 20.35 ±<br>0.63                 |
| <b>Actividad específica máxima ATP-Glk (U/mg proteína)</b>      | 579.51<br>± 23.28               | 605.50<br>± 3.24                | 1321.31<br>± 392.33             | 332.39<br>± 18.93                       | 312.07<br>± 63.41               | 689.94<br>± 26.72               |
| <b>Actividad específica máxima Pp-Glk (U/mg proteína)</b>       | 223.75<br>± 5.90                | 171.55<br>± 29.11               | 285.26<br>± 10.90               | 579.78<br>± 20.61                       | 765.38<br>± 43.14               | 571.56<br>± 23.22               |

Los cultivos se realizaron en medio mínimo complementado con tres concentraciones de fosfato: 0.1, 1 y 20 mM. μ: velocidad específica de crecimiento, X: biomasa. Se muestra la producción de antraciclinas a las 120 h de fermentación. La actividad máxima de las enzimas en las dos cepas y en cada condición de fosfato se encontró a diferentes tiempos de fermentación (ver el apartado correspondiente).

También se observaron diferencias en cuanto a las fases de crecimiento en ambas cepas. Solo *S. peucetius* en 0.1 mM<sub>Pi</sub> presentó una fase de latencia y la fase estacionaria comenzó a las 48 h, al igual que en 20 mM<sub>Pi</sub>. Mientras que en 1 mM<sub>Pi</sub> la fase exponencial fue más larga, llegando a la fase estacionaria a las 60 h. Por otro lado, *S. peucetius* var. *caesius* en 0.1 y 1 mM<sub>Pi</sub> presentó similitudes en cuanto a las fases de crecimiento, en ambas concentraciones la fase estacionaria se alcanzó a las 36 h, a diferencia de lo que se observó en 20 mM<sub>Pi</sub>, donde la fase exponencial termina a las 48 h y a partir de ahí el crecimiento disminuye pero se mantiene constante hasta las 96 h.

Además, las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) de *S. peucetius* fueron similares en las tres concentraciones de fosfato (Tabla 4), pero a diferencia de lo observado en 1 y 20 mM<sub>Pi</sub>, en 0.1 mM<sub>Pi</sub> se observó una fase de latencia de crecimiento (Figura 5A). Por el contrario, en *S. peucetius* var. *caesius* las  $\mu$  en 0.1 y 1 mM de fosfato fueron iguales ( $0.15 \text{ t}^{-1}$ ), pero en 20 mM disminuyó ( $0.06 \text{ t}^{-1}$ ).

Con esto podemos decir que el efecto de la concentración de fosfato en el medio de cultivo en el crecimiento de las cepas evaluadas principalmente se observa en la producción de biomasa, en donde se observa un aumento de su producción y de velocidad de crecimiento al aumentar la concentración de fosfato en el medio de 0.1 a 1 mM. A altas concentraciones de fosfato el crecimiento disminuye.



**Figura 5.** Efecto de la concentración de fosfato en el crecimiento de *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius*. **A** Curva de crecimiento de *S. peucetius*, **B** Curva de crecimiento de *S. peucetius* var. *caesius*.. Los cultivos se realizaron en medio mínimo complementado con 0.1 mM, 1 mM, y 20 mM de fosfato.

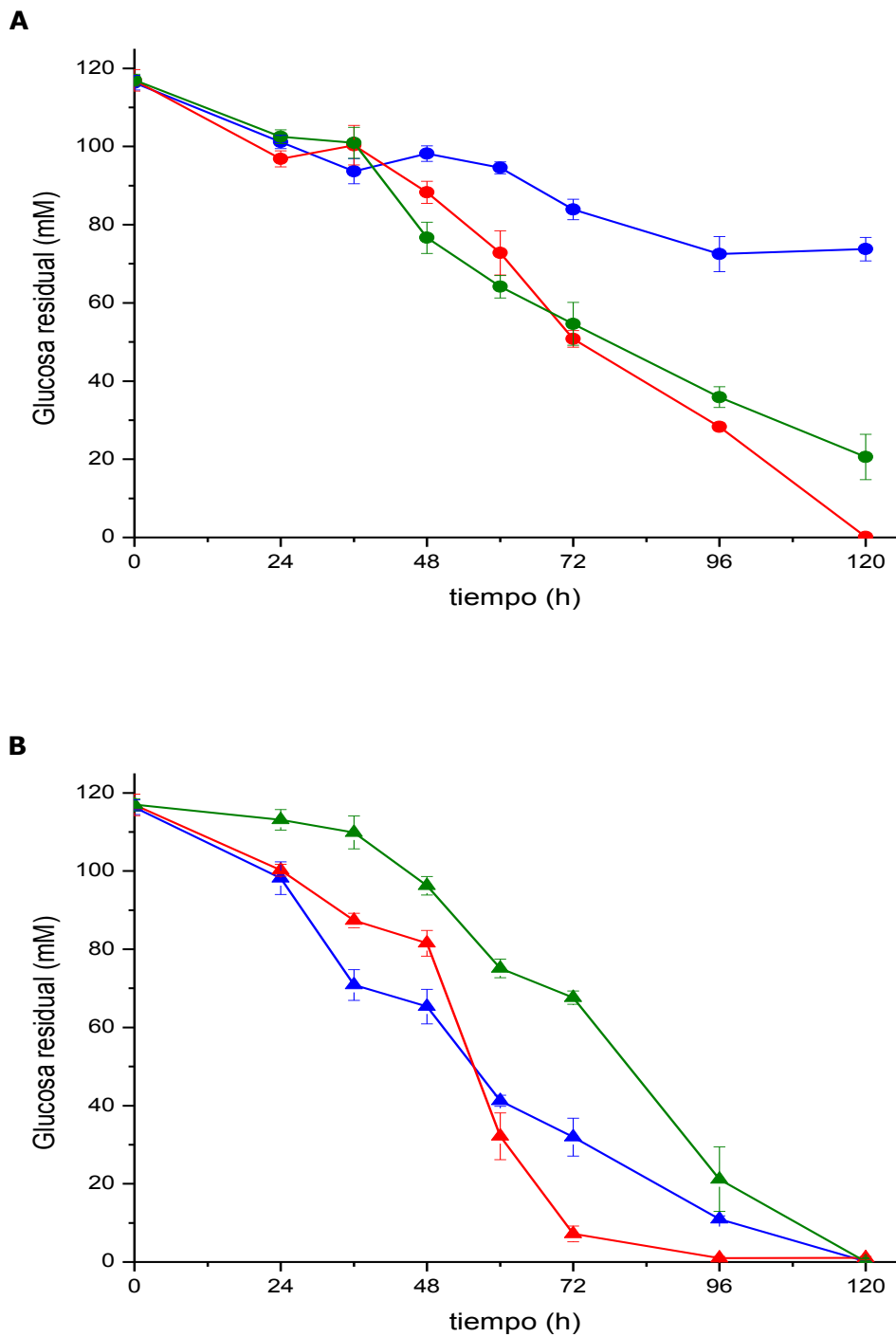
### ***Efecto del fosfato en el consumo de glucosa***

Una manera fácil de observar algún efecto de fosfato en el metabolismo de la glucosa, y así determinar de manera indirecta su posible efecto en las actividades de las glucosa cinasas, es determinando el consumo de glucosa en el cultivo.

En este sentido, *S. peucetius* en 1 mM<sub>Pi</sub>, concentración en la que hubo mayor formación de biomasa, la bacteria consumió toda la glucosa disponible, en cambio en 0.1 mM<sub>Pi</sub>, donde se observó poco crecimiento, a las 120 h consumió cerca del 40% de la glucosa disponible (Figura 6A). Por otro lado, la velocidad de consumo de glucosa en 0.1 mM<sub>Pi</sub> fue menor comparada con la obtenida en 1 mM<sub>Pi</sub> (Tabla 4). Mientras que en 20 mM<sub>Pi</sub> el consumo fue de aproximadamente el 85% en el mismo tiempo (Figura 6A) y la velocidad de consumo ligeramente menor que en 1 mM<sub>Pi</sub> (Tabla 4).

Por el contrario, a las 120 h de incubación *S. peucetius* var. *caesius* consumió toda la glucosa disponible en el medio de cultivo en las tres concentraciones de fosfato (Figura 6B) presentando diferencias en su velocidad de consumo. Por un lado, en 1 mM<sub>Pi</sub>, en donde se obtuvo la mayor producción de biomasa de ambas cepas, el consumo de glucosa en las primeras 48 h fue lento, pero la velocidad de consumo en las posteriores 24 h fue mayor que la de las otras concentraciones de fosfato y que las obtenidas en la cepa silvestre (Tabla 4), terminándose prácticamente toda la glucosa disponible.





**Figura 6.** Efecto del fosfato en el consumo de glucosa de *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius*. **A** Glucosa residual en cultivos de *S. peucetius*, **B** Glucosa residual en cultivos de *S. peucetius* var. *caesius*. Los cultivos se realizaron en medio mínimo complementado con 0.1 mM, 1 mM, 20 mM de fosfato.

En estas mismas 24 h se observó un ligero aumento de formación de biomasa, además, el tiempo en el que se terminó la glucosa coincide con la disminución en la formación de biomasa, lo que podríamos considerar como la fase de muerte (Figura 5B). En 0.1 mM<sub>Pi</sub>, en donde se obtuvo la menor producción de biomasa pero la velocidad de crecimiento fue similar que en 1 mM<sub>Pi</sub>, el consumo se mantuvo a una velocidad constante a lo largo de la fermentación, terminándose la glucosa a las 120 h, al igual que en 20 mM<sub>Pi</sub>. En 20 mM<sub>Pi</sub>, en donde la velocidad de crecimiento disminuyó (Tabla 4), se observó un consumo de glucosa lento en los primeros tiempos de cultivo (Figura 6B), pero presentó una velocidad de consumo ligeramente mayor a la obtenida en 0.1 mM<sub>Pi</sub>.

Estos resultados nos indican que el consumo de glucosa va de la mano con el crecimiento, tanto con la formación de biomasa, como con la velocidad específica de crecimiento. Con esto era de esperarse observar algún efecto del fosfato en las actividades de las glucosa cinasas.

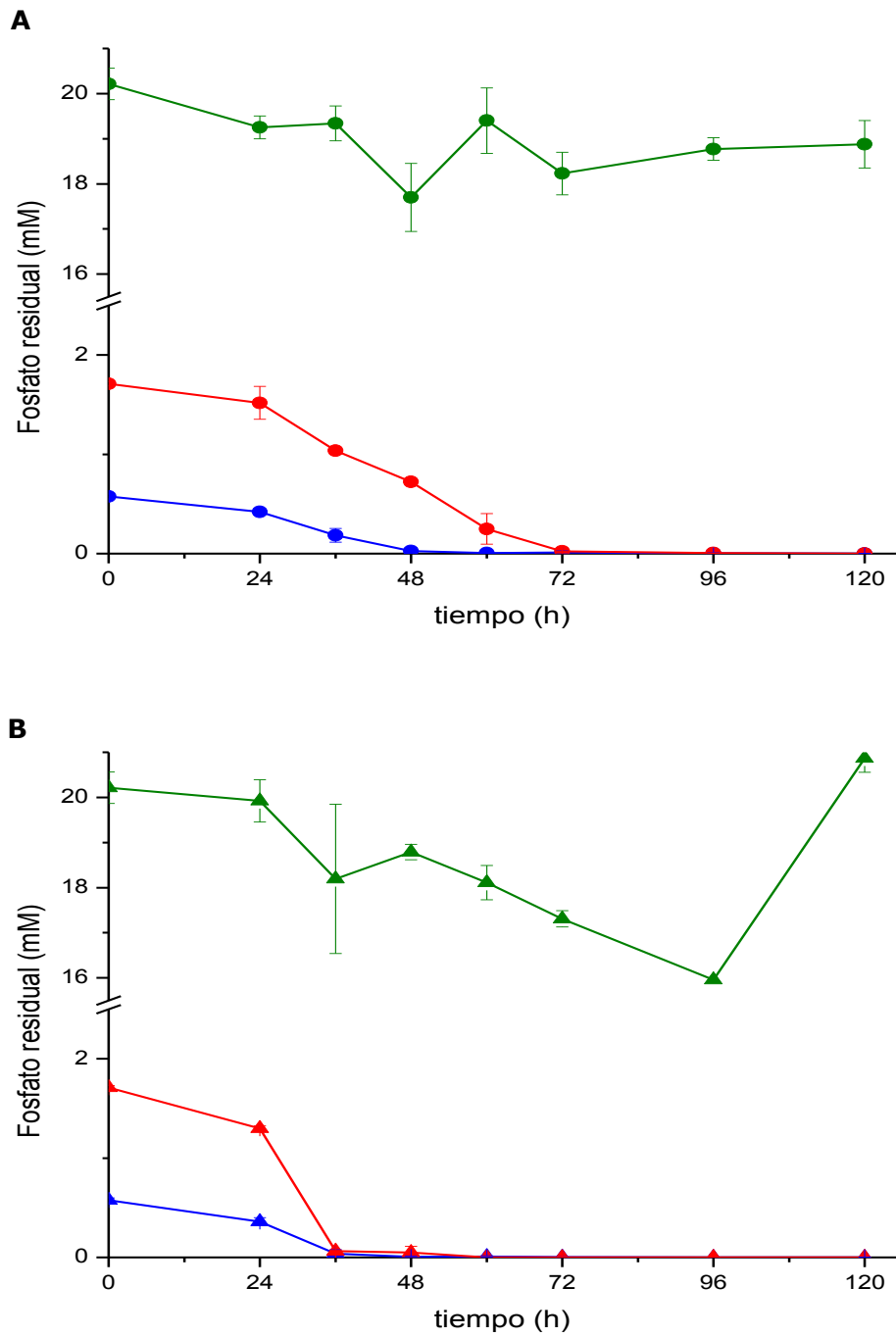
#### ***Efecto de la concentración de fosfato en su consumo y en su concentración intracelular***

Se determinó la concentración de fosfato residual en el medio de cultivo para evaluar si la concentración de fosfato en el cultivo afectaba en su consumo. Además, se determinó su relación con la producción de antraciclinas y la actividad de las glucosa cinasas. Esto último se discutirá en los siguientes apartados.

Comparando el consumo de fosfato en ambas cepas se observó que, en general, en ambas cepas al aumentar la concentración de fosfato en el medio de cultivo la velocidad de consumo también aumentó, presentando entre ambas cepas una velocidad de consumo similar (Tabla 4). ***S. peucetius*** cultivado en 0.1 mM<sub>Pi</sub> se terminó el fosfato

disponible en el medio de cultivo en 48 h y en 1 mM<sub>Pi</sub> en 72 h (Figura 7A), en el caso de *S. peucetius* var. *caesius* en 0.1 y 1 mM<sub>Pi</sub> se terminó todo el fosfato disponible a las 36 h de incubación (Figura 7B), en menor tiempo que la cepa silvestre. En tanto que en 20 mM<sub>Pi</sub> se observó que ambas cepas solo consumieron una parte del fosfato disponible, siendo *S. peucetius* var. *caesius* quien presentó un consumo neto de fosfato mayor (de 4.26 mM) comparado con *S. peucetius*, que presentó un consumo neto de fosfato de 2.52 mM (Tabla 4). Sin embargo, ambas cepas en 20 mM<sub>Pi</sub> presentaron rendimientos de producción de biomasa con respecto al fosfato [Y(X/Pi)] similares (Tabla 5), es decir que en ambas cepas crecidas en 20 mM<sub>Pi</sub> la proporción de fosfato consumido destinado para la producción de biomasa fue similar.

De igual forma, también se determinó la concentración de fosfato intracelular libre normalizado con la cantidad de biomasa generada (referido posteriormente solamente como fosfato intracelular) con el fin de evaluar si también tiene relación con la producción de antraciclinas y la actividad de glucosa cinasas.



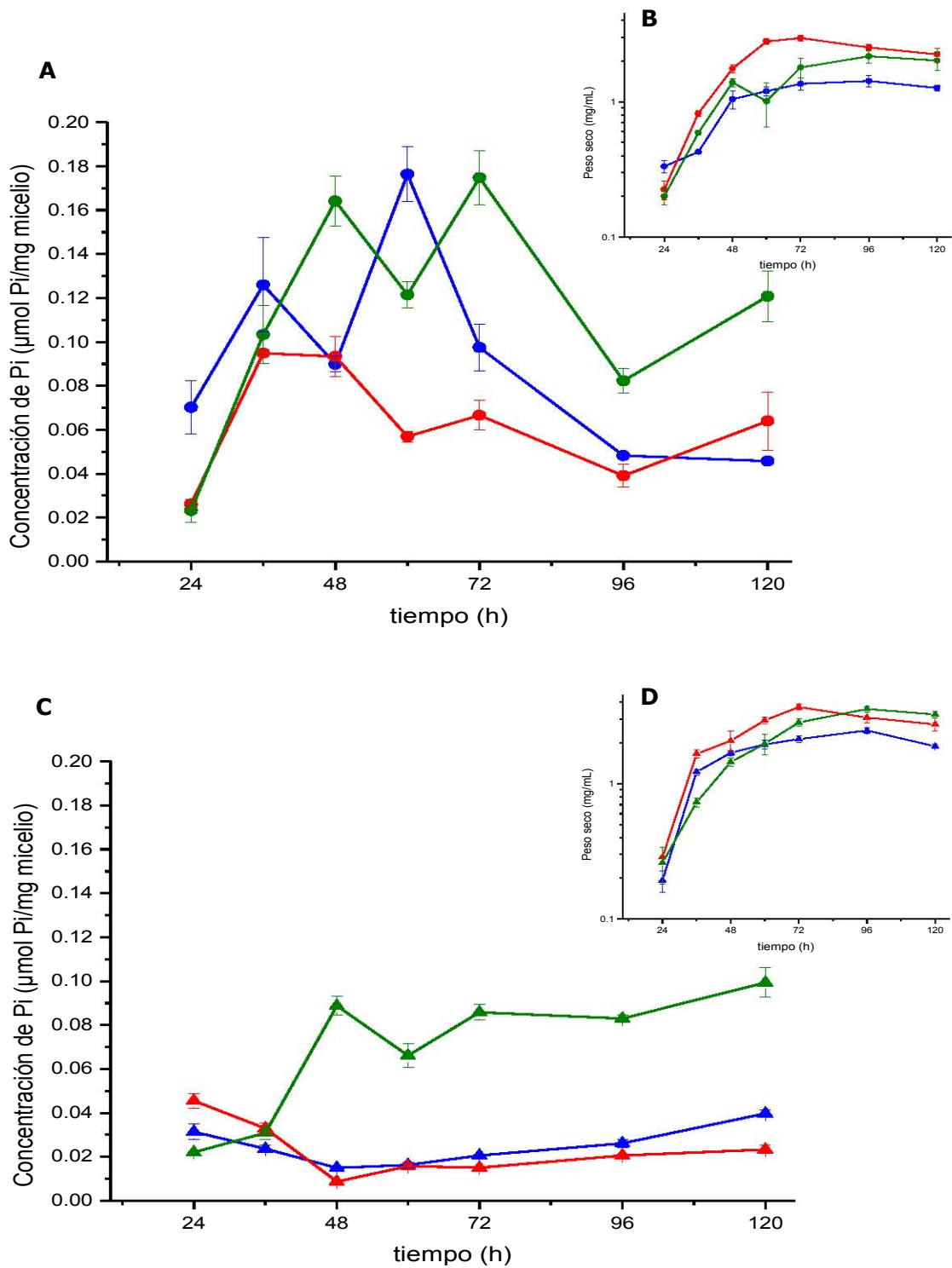
**Figura 7.** Consumo de fosfato por *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius* en cultivos con diferentes concentraciones de fosfato. **A** Fosfato residual en cultivos de *S. peucetius*, **B** Fosfato residual en cultivos de *S. peucetius* var. *caesius*, en medio mínimo complementado con 0.1 mM, 1 mM, 20 mM de fosfato.

**Tabla 5.** Comparación de los rendimientos de la producción de biomasa y antraciclinas con respecto a la glucosa y fosfato consumido por *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius*.

|  | <i>S. peucetius</i>        |                          |                           | <i>S. peucetius</i> var. <i>caesius</i> |                          |                           |
|--|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---|--------------------------|---------------------------|
| <b>Rendimientos</b>                                  | <b>0.1 mM<sub>Pi</sub></b> | <b>1 mM<sub>Pi</sub></b> | <b>20 mM<sub>Pi</sub></b> | <b>0.1 mM<sub>Pi</sub></b>              | <b>1 mM<sub>Pi</sub></b> | <b>20 mM<sub>Pi</sub></b> |
| <b>Y<sub>X/glc</sub><br/>(mg PS/mM)</b>              | 3.25 ±<br>0.16             | 4.77 ±<br>0.80           | 2.69 ±<br>0.42            | 2.35 ±<br>0.11                          | 3.48 ±<br>0.30           | 3.54 ±<br>0.56            |
| <b>Y<sub>X/Pi</sub><br/>(mg PS/mM)</b>               | 249.39 ±<br>33.00          | 174.79<br>±8.91          | 88.15 ±<br>18.57          | 429.73 ±<br>4.90                        | 215.49 ±<br>11.48        | 71.30 ±<br>18.62          |
| <b>Y<sub>Ant/glc</sub> (µg<br/>ant/mM*mg<br/>PS)</b> | 50.87 ±<br>2.79            | 7.12 ±<br>1.33           | 1.69 ±<br>0.71            | 33.56 ±<br>0.48                         | 32.06 ±<br>0.23          | 17.34 ±<br>0.25           |
| <b>Y<sub>Ant/Pi</sub> (µg<br/>ant/mM*mg<br/>PS)</b>  | 775.55 ±<br>170.61         | 229.83 ±<br>48.82        | 79.33 ±<br>17.41          | 1393.11 ±<br>72.82                      | 821.21 ±<br>156.25       | 581.30 ±<br>50.73         |

Rendimientos (Y) calculados en base a los datos obtenido de los cultivos de ambas cepas en medio mínimo complementado con tres concentraciones de fosfato: 0.1, 1 y 20 mM. X: biomasa, PS: peso seco, glc: glucosa, Pi: fosfato, Ant: antraciclinas.

Al cuantificar el fosfato intracelular en *S. peucetius*, en las tres condiciones de fosfato se observaron variaciones en los niveles de fosfato intracelular a lo largo del tiempo de cultivo (Figura 8A). El nivel máximo de fosfato intracelular en 0.1 y 20 mM<sub>Pi</sub> fue similar, mientras que en 1 mM<sub>Pi</sub> se obtuvieron niveles más bajos que en los otros cultivos. Curiosamente, cuando en los cultivos con 0.1 y 1 mM<sub>Pi</sub> se termina el fosfato disponible en el medio, los niveles de fosfato intracelular disminuyen. Además, en 0.1 y 20 mM<sub>Pi</sub> puede observarse dos picos en los niveles de fosfato intracelular que corresponden uno a la fase logarítmica y otro a la fase estacionaria de crecimiento.



**Figura 8.** Concentración intracelular de fosfato en *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius*. **A** Fosfato intracelular y **B** crecimiento (ver figura 5A) de *S. peucetius*, **C** Fosfato intracelular y **D** crecimiento (ver figura 5B) de *S. peucetius* var. *caesius*. Los cultivos se realizaron en medio mínimo complementado con 0.1 mM, 1 mM, 20 mM de fosfato. Datos normalizados con la cantidad de biomasa producida en cada condición de fosfato en el medio de cultivo.

Por otro lado, *S. peucetius* var. *caesius* presentó niveles de fosfato intracelular más bajos (Figura 8B) que la cepa silvestre. En 0.1 y 1 mM<sub>Pi</sub> los niveles de fosfato intracelular fueron similares, en ambos cultivos se observó una disminución de los niveles de fosfato intracelular a las 48h, tiempo en el que ya no había fosfato en el medio de cultivo; posterior a este tiempo, el fosfato intracelular aumentó ligeramente. En cambio, en 20 mM<sub>Pi</sub> los niveles de fosfato intracelular fueron mayores que en las otras condiciones de fosfato, además, se observaron algunas fluctuaciones en los niveles, presentando un pico en la fase pre-estacionaria de crecimiento.

En resumen, comparando ambas cepas en cultivos con 0.1 y 1 mM<sub>Pi</sub>, se observaron diferencias en cuanto a la velocidad de consumo de fosfato. Por otro lado, a pesar de que en los cultivos con 20 mM<sub>Pi</sub> la velocidad de consumo en ambas cepas fue similar, el consumo neto difiere pero va en proporción al crecimiento, es decir, en la cepa silvestre el consumo de fosfato neto fue menor al igual que la formación de biomasa en comparación con la cepa mutante. Otra cosa que hay que resaltar es la diferencia que se observó entre ambas cepas en los niveles de fosfato intracelular, ya que la cepa sobreproductora de antraciclinas presentó niveles visiblemente menores que la cepa silvestre.

### ***Efecto de la concentración de fosfato en la producción de polifosfato***

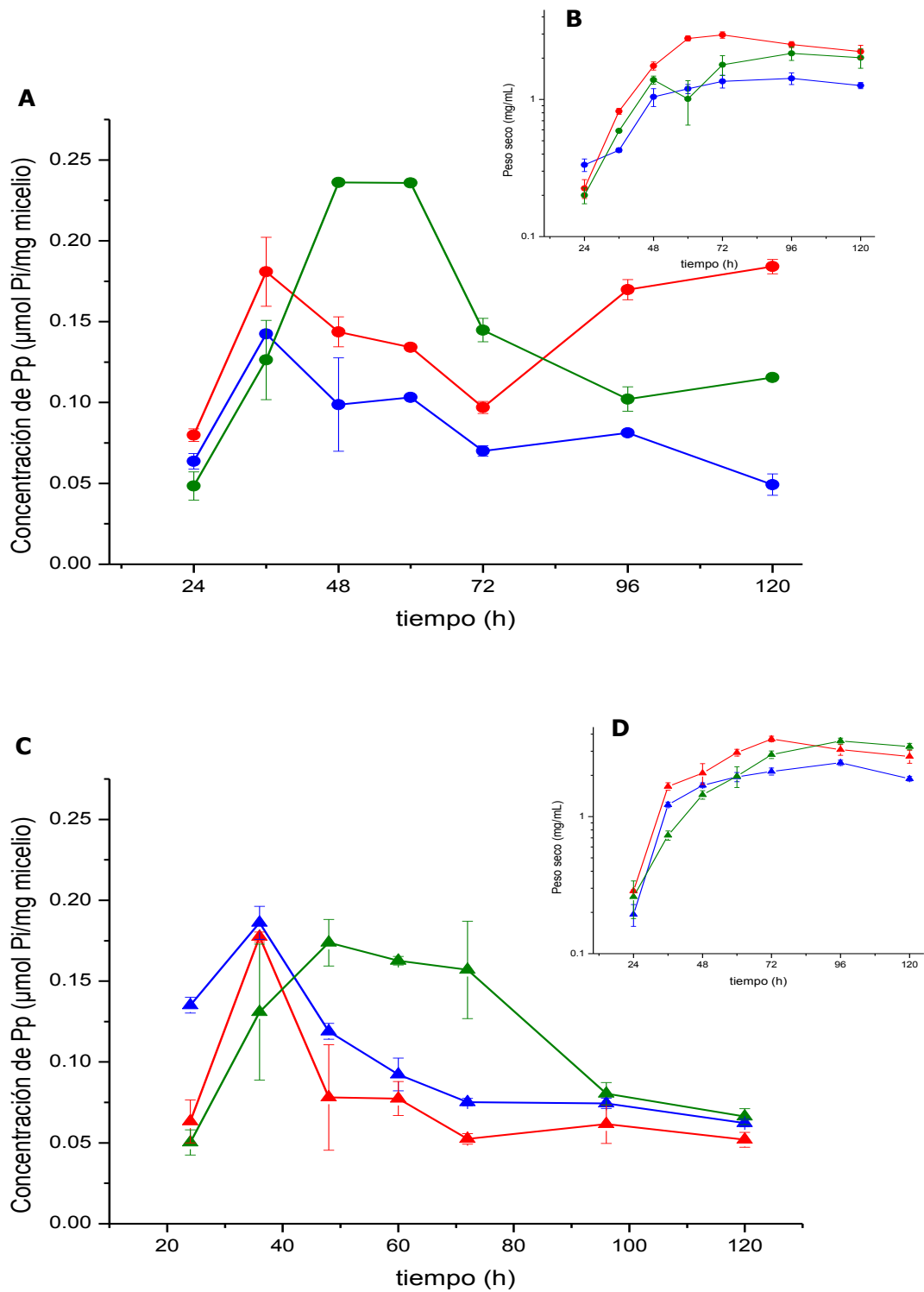
Siendo el polifosfato (Pp) un compuesto que sirve como almacenamiento de Pi [Kornberg, 1995; Kulaev *et al.*, 2004], se pensó que al observar diferencias en los niveles intracelulares de Pi también habría diferencias en la producción de Pp total. Sin embargo, las diferencias en cuanto a la concentración de Pp entre ambas cepas no fueron tan evidentes como lo observado con la concentración de Pi.

En *S. peucetius* se observó un ligero aumento en la concentración de Pp al aumentar la concentración de fosfato en el medio (Figura 9A). Mientras que en *S. peucetius* var. *caesius* se observó que los niveles máximos de Pp fueron similares en las tres condiciones de fosfato en el cultivo (Figura 9B), y a su vez, estos fueron similares que en la cepa silvestre. Pero cabe resaltar que, como se esperaba, los niveles mínimos de Pp en la cepa mutante fueron menores que los obtenidos en la cepa silvestre, siendo en 0.1 y 1 mM<sub>Pi</sub> donde se observaron niveles bajos desde las 60 h, mientras que en 20 mM<sub>Pi</sub> se observaron niveles bajos de Pp desde las 96 h.

En ambas cepas los niveles de Pp total aumentaron en las primeras horas de fermentación y después de llegar al máximo (en la fase pre-estacionaria de crecimiento) comenzaron a descender, dicho descenso fue más rápido en *S. peucetius* var. *caesius*. Tal resultado también se observó en los geles de poliacrilamida (Figura 10). Sin embargo, aquí si observamos diferencias evidentes entre ambas cepas, sobre todo en el tamaño de las cadenas de Pp.

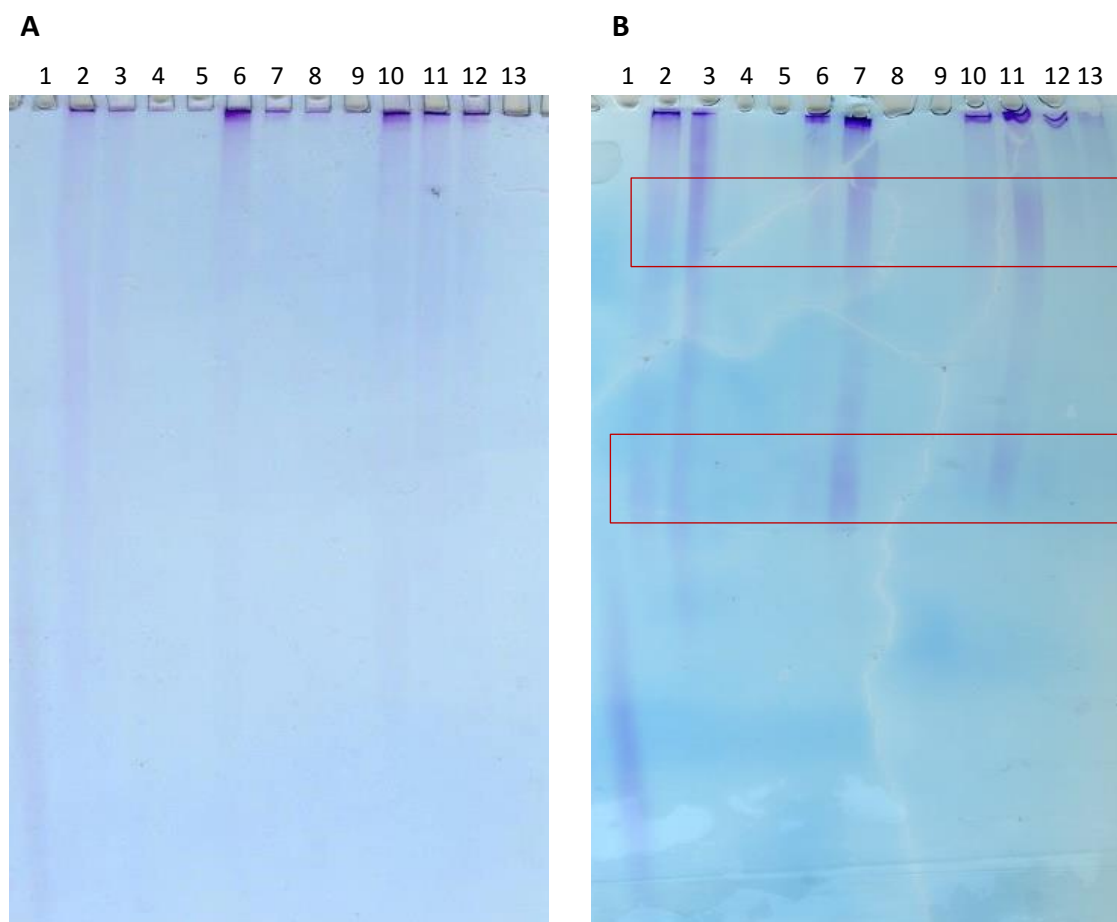
Por un lado, en *S. peucetius* se observó la presencia mayoritaria de agregados de Pp, los cuales no corrieron en el gel de poliacrilamida y se pueden identificar en la parte superior del mismo (Figura 10A). Mientras que en *S. peucetius* var. *caesius*, además de agregados, se observaron otras dos bandas principales (Figura 10B), indicándonos que los agregados de Pp de alguna manera estaban siendo degradados a cadenas de Pp de menor tamaño, mientras que en la cepa silvestre se mantuvieron prácticamente íntegros.





**Figura 9.** Efecto del fosfato sobre la concentración de polifosfato en *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius*. **A** Polifosfato intracelular y **B** crecimiento (ver figura 5A) en *S. peucetius*, **C** Polifosfato intracelular y **D** crecimiento (ver figura 5B) en *S. peucetius* var. *caesius*. Los cultivos se realizaron en medio mínimo complementado con 0.1 mM, 1 mM, 20 mM de fosfato. Datos normalizados con la cantidad de biomasa producida en cada condición de fosfato en el medio de cultivo.

En la cepa sobreproductora de antraciclinas se observó una mayor presencia de cadenas de menor tamaño en el cultivo con 1 mM<sub>Pi</sub> a las 36 h de incubación, comparado con 0.1 y 20 mM<sub>Pi</sub> a ese mismo tiempo de incubación. Dicho fenómeno se relaciona con la actividad Pp-Glk, como se describe posteriormente.



**Figura 10.** Determinación del tamaño de las cadenas de Pp en geles de poliacrilamida. **A:** *S. peucetius*, **B:** *S. peucetius* var. *caesius*. El carril 1 contiene el estándar de Pp de 25 residuos de fosfato. En la figura A, en los carriles 2, 6 y 10 se cargaron las muestras de las 24 h de fermentación, en 3, 7 y 11 las muestras a las 48 h, en 4, 8 y 12 las muestras a las 72 h y, en 5, 9 y 13 las muestras a las 96 h en 0.1, 1 y 20 mM de fosfato, respectivamente. El orden en la figura B es el mismo pero en lugar de las muestras a 48h se usaron las muestras de las 36 h. Para *S. peucetius* se cargaron 0.13 µg de proteína total, para *S. peucetius* var. *caesius* se cargaron 0.19 µg de proteína total.

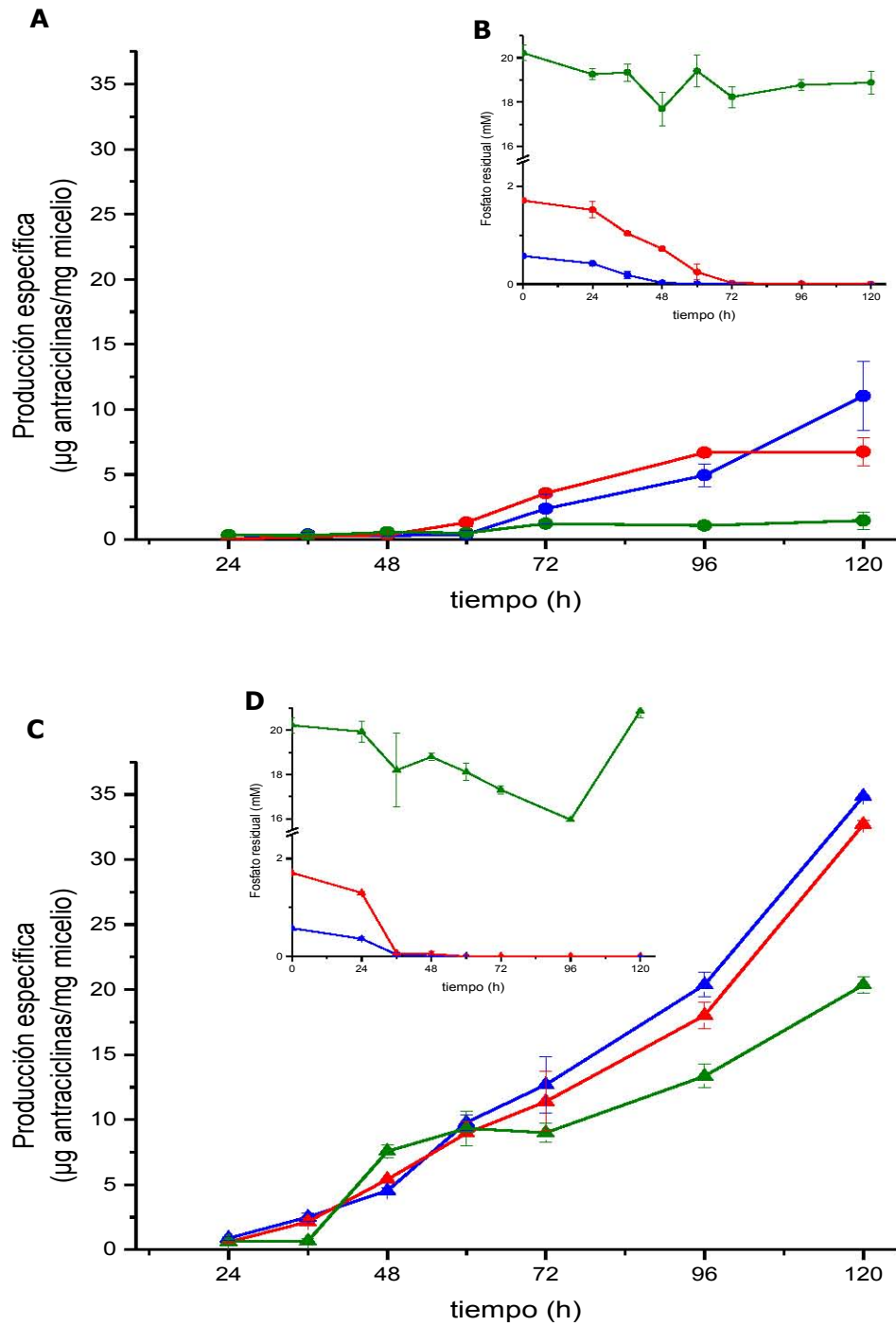
### *Producción de antraciclinas en cultivos con diferentes concentraciones de fosfato*

Previamente se observó el efecto de la concentración de fosfato en la producción de antraciclinas en cultivos que se partieron de micelio. En

esta ocasión en la que los cultivos se partieron de esporas, y teniendo un panorama de cómo la cepa silvestre y la cepa sobreproductora de antraciclinas estaban utilizando el fosfato, se pretende relacionar la producción de antraciclinas con lo observado en el consumo y concentración interna de Pi, así como con la producción de Pp.

Como era de esperarse, la cepa silvestre produjo menor cantidad de antraciclinas (entre 3 y 14 veces menos) que la mutante sobreproductora (Tabla 4). Además, en las tres condiciones de fosfato se observó que la producción de antraciclinas se inició antes en la cepa mutante (36 h de fermentación, Figura 11B) que en la cepa silvestre (60 h, Figura 11A). Cabe mencionar que en los tiempos en que se inicia la producción de antraciclinas en ambas cepas coincide con los tiempos en los que la concentración de Pi en el cultivo es casi nula (Figura 7) y cuando la concentración de Pi y Pp intracelular disminuye (Figura 8 y 9, respectivamente). Además, en la cepa sobreproductora se observó que los niveles de Pi y Pp intracelular (Figura 8B y 9B, respectivamente) fueron similares comparando los cultivos con 0.1 y 1 mM<sub>Pi</sub>, en tales concentraciones de fosfato en el medio también se produjeron similares concentraciones de antraciclinas (Figura 11B). En general, en ambas cepas se observó que a menores concentraciones de Pi y Pp intracelular, la producción de antraciclinas era mayor.

En *S. peucetius* var. *caesius* el efecto de la concentración de fosfato en la producción de antraciclinas no fue tan notorio en los cultivos con 0.1 y 1 mM<sub>Pi</sub>, ya que la producción de antraciclinas fue similar. Adicionalmente, en esta cepa 20 mM de fosfato no fue suficiente para provocar la inhibición total de la producción del metabolito secundario.



**Figura 11.** Efecto del fosfato en la producción de antracilinas en *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius*. **A** Producción de antracilinas y **B** consumo de fosfato (ver figura 7A) en *S. peucetius*, **C** Producción de antracilinas y **D** consumo de fosfato (ver figura 7B) en *S. peucetius* var. *caesius*. Los cultivos se realizaron en medio mínimo complementado con 0.1 mM, 1 mM, 20 mM de fosfato. Datos normalizados con la cantidad de biomasa producida en cada condición de fosfato en el medio de cultivo.

Por otro lado, en la cepa silvestre, a pesar de no producir grandes cantidades de antraciclinas, se observó el efecto negativo del fosfato hacia la producción de estos metabolitos secundarios, generando una inhibición total con 20 mM de fosfato. Esto nos indica que ambas cepas responden diferente a una concentración dada de fosfato.

Al comparar los rendimientos de producción de antraciclinas con respecto al consumo de fosfato (Tabla 5), en ambas cepas se observó una clara disminución del rendimiento al aumentar la concentración de fosfato en el medio. Por otro lado, también se determinaron los rendimientos de producción de antraciclinas con respecto al consumo de glucosa. Nuevamente, en ambas cepas se observó una disminución del rendimiento al aumentar la concentración de Pi en el cultivo. Esto nos indicaría que la cantidad de fosfato y de glucosa consumido en cultivos con mayores concentraciones de Pi no está destinada a la producción de los metabolitos secundarios.

Estos resultados nos demuestran que la producción de antraciclinas en *S. peucetius* y en *S. peucetius* var. *caesius* es susceptible a la regulación por fosfato. A pesar de que se desconoce el mecanismo molecular mediante el cual se lleva a cabo la regulación por fosfato, con los datos obtenidos en este estudio podemos afirmar que en las dos cepas evaluadas la concentración intra y extracelular de Pi, así como la concentración intracelular de Pp, influyen en la producción de antraciclinas.

#### ***Efecto del fosfato en la actividad de las glucosa cinasas***

Dado que la actividad de Pp es afectado por la concentración de Pi, y a su vez, el Pp es sustrato de la Glk, se planteó la hipótesis de que se podría afectar la actividad de la Pp-Glk al modificar la concentración de Pi en los cultivos. Aunado a esto, dado que en *S. peucetius* var. *caesius*

se observó que la Pp-Glk es más activa que la ATP-Glk [Ruiz *et al*; 2014], se pensó que al modificar la actividad de la Pp-Glk se podría modificar la de la ATP-Glk debido a que podría haber algún efecto de compensación de las actividades de ambas enzimas.

En este sentido, al medir la actividad de las glucosa cinasas se comprobó que en la cepa mutante la Pp-Glk presenta niveles más altos de actividad que la ATP-Glk (Figura 12B), con excepción en los cultivos con 20 mM<sub>Pi</sub> donde la ATP-Glk fue más activa. Por el contrario, en la cepa silvestre la actividad predominante fue la ATP-Glk (Figura 12A) en todas las condiciones de Pi en el cultivo.

En *S. peucetius* la actividad Pp-Glk fue baja durante el cultivo, la actividad máxima se observó en etapas tempranas de crecimiento y disminuyó entre 2 y 7 veces a las 120 h de incubación, donde la mayor disminución se observó en los cultivos en 20 mM<sub>Pi</sub>. En esta cepa se observó que a 20 mM<sub>Pi</sub> los niveles intracelulares de Pp eran mayores en comparación a los cultivos con 0.1 y 1 mM<sub>Pi</sub>, lo que podría ser consecuencia de que la Pp-Glk presenta menor actividad a 20 mM<sub>Pi</sub>. Por otro lado, la ATP-Glk presentó mayor actividad que la Pp-Glk, la mayor actividad de ATP-Glk se observó en los cultivos con 20 mM<sub>Pi</sub> (1321.31 U/mg proteína, 60 h de incubación), mientras que la menor actividad se obtuvo en los cultivos con 0.1 mM<sub>Pi</sub> (579.51 U/mg proteína, 36 h de incubación).

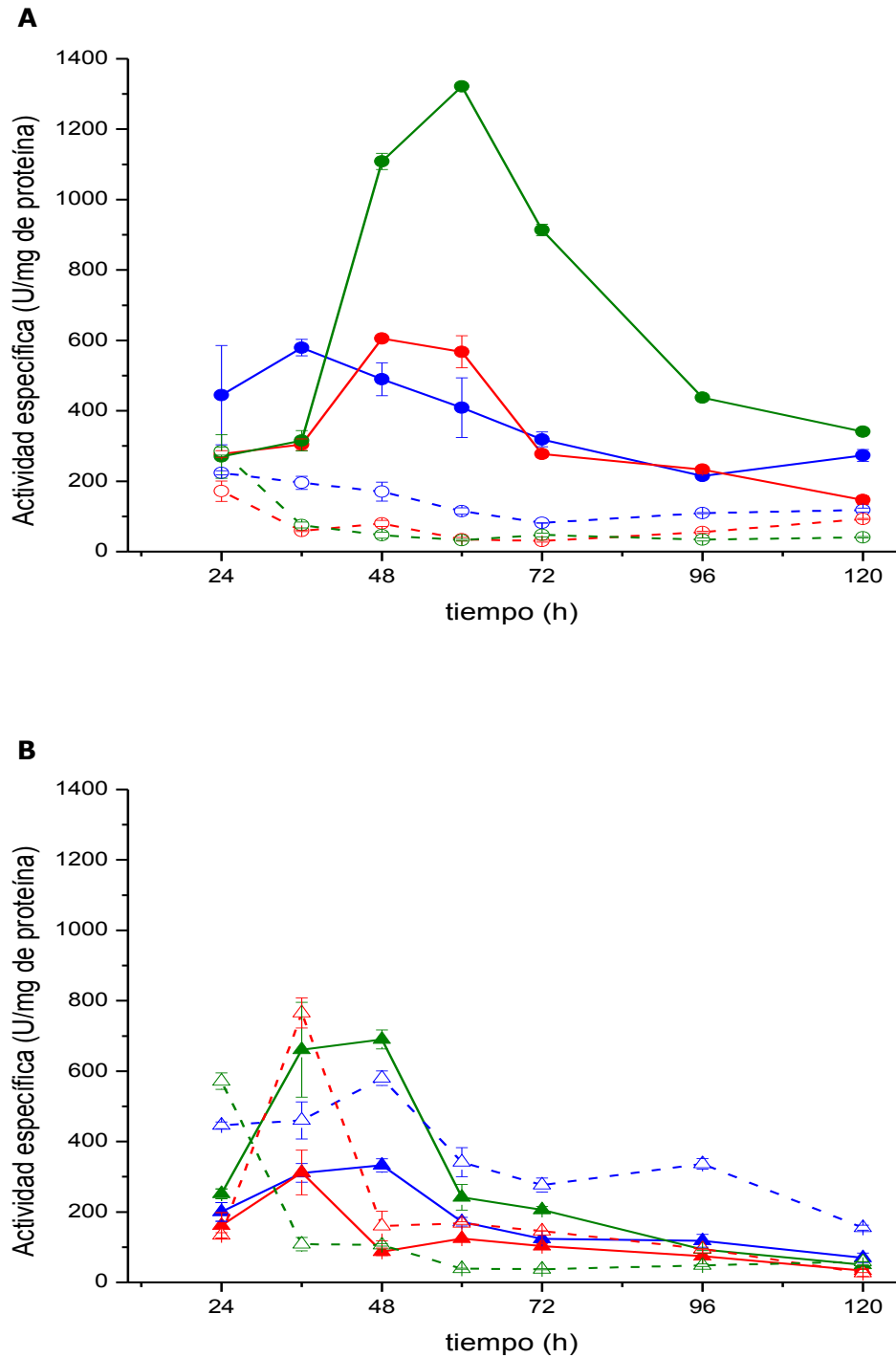
En cuanto a *S. peucetius* var. *caesius*, la actividad Pp-Glk fue mayor que la ATP-Glk en los cultivos con 0.1 y 1 mM<sub>Pi</sub>. En 0.1 mM<sub>Pi</sub> la actividad Pp-Glk se mantuvo cercano a 500 U/mg de proteína hasta las 48 h de incubación. En cambio, en 1 mM<sub>Pi</sub> la actividad máxima (765.38 U/mg de proteína) se presentó a las 36 h de incubación y a partir de las 48 h la producción se mantuvo baja, inclusive menor que la observada en 0.1

mM<sub>Pi</sub>. Es interesante observar la coincidencia entre la presencia de cadenas de Pp de menor tamaño en los cultivos con 0.1 mM<sub>Pi</sub> a las 36 h de incubación (Figura 10B), y el mayor pico de actividad Pp-Glk en esa misma concentración (Figura 12B). Por otro lado, en 20 mM<sub>Pi</sub> la actividad máxima Pp-Glk se presentó a las 24 h, después de este tiempo la actividad se mantuvo baja. Por el contrario, la actividad ATP-Glk en 20 mM<sub>Pi</sub> fue mayor que en los cultivos con 0.1 y 1 mM<sub>Pi</sub>. En las tres condiciones de Pi la actividad ATP-Glk disminuyó a las 60 h de incubación.

Comparando las actividades máximas de la ATP-Glk, se observó que con el aumento de Pi en el medio, la actividad en ambas cepas aumentó (Tabla 4). Mientras que la producción Pp-Glk tuvo un comportamiento diferente.

En *S. peucetius*, la producción máxima de Pp-Glk disminuyó, de 223.75 a 171.55 U/mg de proteína, al cambiar la concentración de Pi en el medio de 0.1 a 1 mM, pero se obtuvo la producción máxima en 20 mM<sub>Pi</sub> (285.26 U/mg de proteína), aunque cabe resaltar que en 20 mM<sub>Pi</sub> la producción de Pp-Glk se mantuvo más baja desde las 36 h que lo observado en las otras condiciones de Pi.

En cuanto a la Pp-Glk de *S. peucetius* var. *caesius*, su producción máxima aumentó, de 579.78 a 765.38 U/mg de proteína, al disminuir la concentración de Pi en el medio de 0.1 a 1 mM, y disminuyó al modificar la concentración de Pi a 20 mM. Sin embargo, la producción de Pp-Glk en 0.1 mM<sub>Pi</sub> se mantuvo más alta desde las 48 h y la producción en 20 mM<sub>Pi</sub> se mantuvo más baja desde la 36 h, en comparación con la producción obtenida en las otras condiciones de Pi.



**Figura 12.** Efecto del fosfato en las actividades de las glucosa cinasas. **A** Actividad ATP-Glc (círculo cerrado, línea continua) y Pp-Glc (círculo abierto, línea punteada) de *S. peuceitius*, **B** Actividad ATP-Glc (triángulo cerrado, línea continua) y Pp-Glc (triángulo abierto, línea punteada) de *S. peuceitius* var. *caesius*. Los cultivos se hicieron en medio mínimo complementados con 0.1 mM, 1 mM, 20 mM de fosfato.



Además, se observó que hay relación entre la actividad Pp-Glk y la concentración de Pp, ya que en ambas cepas cultivadas en  $20 \text{ mM}_{\text{Pi}}$  se observó que mientras la actividad era baja, la concentración de Pp se mantenía alta. Por otro lado, *S. peucetius* var. *caesius*, cepa que presentó actividad alta de Pp-Glk, produjo cadenas cortas de Pp (Figura 10B), mientras que *S. peucetius*, que presentó actividad baja de Pp-Glk, no produjo cadenas cortas de Pp (Figura 10A).

Con esto podemos decir que el Pi tuvo un efecto positivo en la actividad de ATP-Glk de ambas cepas. Por el contrario, el Pi tuvo un efecto negativo en la actividad de Pp-Glk, y la concentración de Pp y el tamaño de las cadenas de Pp tienen relación con la actividad de la Pp-Glk obtenida.

## 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

---

El Pi es un compuesto importante para las células que al estar presente en abundancia en el medio favorece el crecimiento de bacterias, como es el caso de *S. griseus* en 10 mM<sub>Pi</sub> [Liras *et al.*, 1977]. Sin embargo, no hay una concentración de Pi definida a partir de la cual se vea el efecto en el crecimiento. Por ejemplo, en *S. lincolnensis*, en un medio de cultivo con 14.4 mM de fosfato su crecimiento no se vio afectado [Young *et al.*, 1985], pero en *S. coelicolor* su crecimiento aumentó al modificar la concentración de Pi de 3.2 a 18.5 mM [Santos-Beneit *et al.*, 2009]. En nuestro caso, al aumentar la concentración de Pi de 0.1 a 1 mM observamos un incremento en la biomasa, pero en 20 mM<sub>Pi</sub> la formación de biomasa en *S. peucetius* disminuyó y en *S. peucetius* var. *caesius* se retrasó el crecimiento. Algo parecido se observó en el actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* en donde se determinó que hasta una concentración de 29.41 mM<sub>Pi</sub> se favorecía el crecimiento, pero a concentraciones superiores había un decremento en la formación de biomasa [Zhihua *et al.*, 2006].

En el presente estudio se observó que el incremento de la concentración de Pi de 0.1 a 1 mM tuvo un efecto positivo en el crecimiento de *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius*, además, se observó un efecto negativo en la producción del metabolito secundario evaluado, como ya se había reportado para este género. Dicho efecto parece llevarse a cabo de forma indirecta al favorecer de alguna manera la utilización de glucosa para la formación de biomasa a costa de la producción de antraciclinas (Tabla 5). De acuerdo con esta hipótesis, se observó que la velocidad del consumo de glucosa aumentó al incrementar la concentración de Pi en el medio de cultivo (Tabla 4). Tal comportamiento fue observado previamente en *S. griseus*, en donde

además de que el Pi favoreció el crecimiento y la utilización de glucosa, también se observó el efecto negativo en la producción de estreptomina [Hockenhuil *et al.*, 1954; Shirato y Nagatsu, 1965] y candicidina [Liras *et al.*, 1977].

El hecho de que *S. peucetius* var. *caesius* consuma más rápido la glucosa en comparación con *S. peucetius* y que no se vea reflejado en el rendimiento de producción de biomasa con respecto a la glucosa consumida (Tabla 5), podría apoyar la hipótesis de que esta mutante canaliza la glucosa para la producción de antraciclinas; en cambio *S. peucetius* utiliza la glucosa para la producción de proteínas [Ruiz *et al.*, 2014].

Al determinar el consumo de fosfato en 0.1 y 1.0 mM<sub>Pi</sub>, fue notorio que la mutante lo utilizó a tiempos tempranos del cultivo (36 h contra 48 y 72 h de la silvestre), aunque la velocidad de su consumo, así como la concentración consumida fue similar. Por el contrario, al usar 20 mM de fosfato, solamente se observa un consumo parcial del fosfato por ambas cepas. En *S. coelicolor* también se reportó que a altas concentraciones de fosfato (18.5 mM) no se consumía todo el sustrato disponible [Santos-Beneit *et al.*, 2008].

Comparando los niveles intracelulares de fosfato en ambas cepas, *S. peucetius* var. *caesius* presentó una menor acumulación, lo cual sugiere su utilización para diversos procesos metabólicos. Además, hay relación entre el hecho de que esta cepa presente menor Pi intracelular y sea sobreproductora de antraciclinas. Con esto podríamos corroborar la hipótesis de que tanto el Pi extracelular como el intracelular tienen un papel en la regulación por fosfato [Chouayekh y Virolle, 2002; Liras *et al.*, 1977].

Al buscar una correlación entre la concentración de fosfato extracelular y la producción de Pp en la cepa mutante observamos que, contrario a lo que esperábamos, en el cultivo con 20 mM<sub>Pi</sub> la concentración de Pp intracelular era mayor en comparación con los cultivos con menor concentración de fosfato en el cultivo. Esto podría indicarnos que, en dado caso que la Ppk sea inhibida por Pi como se observó en *S. coelicolor* [Martín *et al.*, 2012], puede ser que los requerimientos energéticos de la células al reproducirse sean un factor más importante y determinante en la síntesis del Pp. En este sentido, sería interesante cuantificar los niveles de adenilatos (AMP, ADP y ATP) en ambas cepas para tener una visión global de cómo afecta el estado energético en la producción de Pp en los *Streptomyces* estudiados.

Similar a lo observado con el Pi intracelular, hay relación entre los niveles de Pp y la producción de antraciclinas, sugiriendo que el Pp contribuye a la regulación de la producción de dichos metabolitos, posiblemente al proveer fosfato endógeno [Chouayekh y Virolle, 2002].

Además, detectamos una mayor presencia de cadenas de Pp de menor tamaño durante la fase logarítmica de crecimiento. Dicha producción coincidió con un pico máximo de actividad de Pp-Glk, lo cual puede explicar la generación de cadenas de Pp de menor tamaño, al estar degradando cadenas de mayor tamaño. La cepa silvestre no generó cadenas de Pp cortas.

La glucosa cinasa es la única enzima reportada en *S. peucetius* y en la cepa sobreproductora de antraciclinas *S. peucetius* var. *caesius* que utiliza al Pp como sustrato. Llamó la atención que, contrario a lo observado en otros estreptomicetos y en la cepa parental, en un medio mínimo con 1 mM<sub>Pi</sub> la cepa sobreproductora de antraciclinas presenta una mayor actividad de Pp-Glk que de ATP-Glk [Ruiz *et al.*, 2014]. En

1976, la Pp-Glk de *S. aureofaciens* 8425, cepa sobreproductora de clortetraciclina (CTC), también causó interés debido a que su actividad era mayor que la de ATP-Glk, y la formación del metabolito secundario presentaba la misma tendencia que la actividad de Pp-Glk, es decir, tanto la actividad de la enzima como la producción de CTC comenzaban al mismo tiempo y sus gráficos se empalman, por lo que los autores propusieron que la Pp-Glk podría estar relacionada con la producción de CTC [Hostalek *et al.*, 1976]. Con estos antecedentes se consideró que posiblemente en *S. peucetius* var. *caesius* la Pp-Glk podría estar relacionada en la producción de antraciclinas. Sin embargo, en este estudio no se observó alguna relación clara entre la actividad Pp-Glk y el inicio de la producción de antraciclinas.

En 1976, Curdová y colaboradores observaron que en cultivos con 0.46 mM<sub>Pi</sub>, la cepa de *S. aureofaciens* sobreproductora de CTC presentó niveles de adenilatos 10 veces más bajos que los observados en la cepa silvestre. Además, observaron que al cultivar a la cepa silvestre en cultivos con 1.46 mM<sub>Pi</sub> los niveles de adenilatos aumentaron, mientras que la carga energética y la producción de CTC se abatieron. En relación a lo anterior y a que tanto el contenido energético de la célula como el Pi disponible influyen en la producción de Pp, es decir, al disminuir la carga energética y al haber Pi disponible se promueve la producción de Pp [Achbergerová y Nahálka, 2011; Barbosa de Lima *et al.*, 2003; Kulaev y Kulakovskaya, 2000], se consideró que al modificar la concentración de Pi en los cultivos de *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius* lograríamos modificar las concentraciones intracelulares de Pp y con ello la actividad Pp-Glk, y esto relacionarlo con la producción de antraciclinas.

En línea con la hipótesis planteada, se observó que el aumento de la concentración de fosfato en el cultivo propició un ligero aumento en la producción de Pp y una disminución tanto en la producción de antraciclinas como en la actividad de la Pp-Glk de ambas cepas. Esto podría sugerir que la producción de antraciclinas y la de Pp-Glk son reguladas de la misma forma por el Pi.

Además, en ambas cepas, pero en especial en *S. peucetius* var. *caesius* en cultivos con 0.1 y 1 mM<sub>Pi</sub>, los niveles de Pp nunca se observaron tan bajos como los de Pi intracelular. Dada la importancia del Pp para la célula [Kornberg, 1995; Kulaev y Vagabov, 1983; Kulaev *et al.*, 1999; Kulaev *et al.*, 2004] podría pensarse que el fosfato intracelular en la cepa sobreproductora de antraciclinas es utilizado para compensar la pérdida de polifosfato metabolizado por la Glk y otras posibles enzimas que puedan utilizarlo como sustrato.

Contrario a lo observado con la Pp-Glk, la actividad ATP-Glk en ambas cepas aumentó con el incremento de Pi en los cultivos, sugiriendo que ambas enzimas son reguladas por Pi de forma diferente. Posiblemente el Pi ejerció un efecto positivo en los niveles de adenilatos, como lo reportaron Curdová y colaboradores en *S. aureofaciens*, y esto sea el causante del incremento en la actividad ATP-Glk. En este sentido faltaría cuantificar los niveles de ATP, ADP y AMP en las condiciones empleadas en este estudio para corroborar el efecto del Pi en los niveles de adenilatos.

Hasta el momento no hay un reporte que establezca un mecanismo molecular en *Streptomyces* para la relación del metabolismo de glucosa y fosfato, pero con los datos obtenidos podemos decir que la influencia del Pi en el consumo de glucosa puede estar relacionada con la actividad de las glucosa cinasas.

## 10. CONCLUSIONES

---

En el presente trabajo fue claro que en *S. peucetius* y *S. peucetius* var. *caesius* el fosfato ejerció un efecto positivo en la producción de biomasa lo cual está relacionado con el consumo de glucosa, e influyó en las actividades de ambas glucosa cinasas.

Mientras que en ambas cepas el fosfato tuvo un efecto positivo en la actividad de la ATP-Glk, se observó un efecto contrario en la actividad de la Pp-Glk.

El efecto del fosfato sobre la actividad de la Pp-Glk no tiene una relación directa con la producción de polifosfato. A pesar de que la cepa sobreproductora de antraciclinas presentó mayor uso de polifosfato para la fosforilación de glucosa, no hubo una diferencia evidente de los niveles intracelulares del polímero en ambas cepas. Colateralmente, puede observarse la producción concomitante de polifosfato de cadena de menor tamaño, posiblemente resultado de la degradación del polímero de mayor tamaño durante la fosforilación de glucosa.

La concentración de fosfato tuvo un efecto negativo en la producción de antraciclinas en ambas cepas. Tanto el fosfato como el polifosfato intracelular tienen un papel en la regulación de la producción de antraciclinas, pero es más evidente la relación entre la concentración de fosfato intracelular y la producción de dichos metabolitos secundarios.

# 11. REFERENCIAS

---

Achbergerová L, Nahálka J (2011). Polyphosphate – an ancient energy source and active metabolic regulator. *Microb Cell Fact.* 10:63. doi: 10.1186/1475-2859-10-63.

Aguena M, Yagil E, Spira B (2002). Transcriptional analysis of the *pts* operon of *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics.* 268:518-524.

Alves A M C R, Euverink G J W, Bibb M J, Dijkhuizen I (1997). Identification of ATP-dependent phosphofructokinase as a regulatory step in the glycolytic pathway of the actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Appl Environ Microbiol.* 63:956-961.

Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P (1969). Adriamycin, 14-Hidroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng.* 11:1101-1110.

Asturias J A, Martín J F, Liras P (1994). Biosynthesis and phosphate control of candicidin by *Streptomyces acrimycini* JI2236: effect of amplification of the *pabAB* gene. *J Ind Microbiol.* 13:183-189.

Barbosa de Lima M A, do Nascimento A E, de Souza W, Fukushima K, de Campos-Takaki G M (2003). Effects of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. *Brazil J Microbiol.* 34:363-372.

Bibb M J (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol.* 8:208-215.hu

Bowden G H W (1996). Actinomyces, *Propionibacterium propionicus*, and *Streptomyces*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology.* 4th



edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Chapter 34.

Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.

Chater K F (1989). Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Trends Genet.* 5:372-377.

Chater K F, Biró S, Lee K J, Palmer T, Schrempf H (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev.* 34:171-198.

Chouayekh H, Virolle M J (2002). The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol.* 43:919-930.

Clark J E, Beegen H, Wood H G (1986). Isolation of intact chains of polyphosphate from "*Propionibacterium shermanii*" grown on glucose or lactate. *J Bacteriol.* 168:1212-1219.

Demain A L (2000). Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnol Adv.* 18:499-514.

Demain A L (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 41:185-201.

Díaz M, Esteban A, Fernández-Abalos J M, Santamaría R I (2005). The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*. *Microbiology.* 151:2583-2592.

Fabret C, Feher V A, Hoch J A (1999). Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. J Bacteriol. 181:1975-1983.

Fraley C D, Rashid H, Lee S S K, Gottschalk R, Harrison J, Wood P J, Brown M R W, Kornberg A (2006). A polyphosphate kinase 1 (*ppk1*) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. PNAS. 104:3526-3531.

Gray M J, Wholey W, Wagner N O, Cremers C M, Muller-Schickert A, Hock N T, Krieger A G, Smith E M, Bender R A, Bardwell J C A, Jakob U (2014). Polyphosphate is a primordial chaperone. Mol Cell. 53:689-699.

Hockenull D J D, Fantes K H, Herbert M, Whitehead B (1954). Glucose utilization by *Streptomyces griseus*. J Gen Microbiol. 10:353-370.

Hodgson D A (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. Adv Microb Physiol. 42:47-238.

Hostalek Z, Tobek I, Bobyk A y Kulayev S (1976). Role of ATP-glucokinase and polyphosphate glucokinase in *Streptomyces aureofaciens*. Folia Microbiol. 21:131-138.

Hutchings M I, Hoskisson P A, Chandra G, Buttner M J (2004). Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2). Microbiology. 150:2795-2806.

Kornberg, A (1995). Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. J Bacteriol. 177:491-496.

Kulaev I, Vagabov V (1983). Polyphosphate metabolism in microorganisms; Adv Microb Physiol. 24:83-171.

Kulaev I, Vagabov V, Kulakovskaya T (1999). New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *J Biosc Bioeng* 88: 111-129.

Kulaev I, Kulakovskaya T (2000). Polyphosphate and phosphate pump. *Annu Rev Microbiol* 54: 709-734.

Kulaev I, Vagabov V, Kulakovskaya T (2004). The biochemistry of inorganic polyphosphates. 2nd ed. John Wiley & Sons. ISBN: 0-470-85810-9.

Liao H, Myung S, Percival Y (2012). One step purification and immobilization of thermophilic polyphosphate glucokinase from *Thermobifida fusca* YX: glucose-6-phosphate generation without ATP. *Appl Microbiol Biotechnol*. 93: 1109-1117.

Lichá I, Benes I, Janda S, Hostalek Z, Janáček K (1997). Characterization of phosphate transport in *Streptomyces granaticolor*. *Biochem Mol Biol Int*. 41: 431-437.

Liras P, Villanueva J R, Martín J F. (1977). Sequential expression of macromolecule biosynthesis and candicidin formation in *Streptomyces griseus*. *J Gen Microbiol*. 102: 269-277.

Liras P, Asturias J A, Martín J F (1990). Phosphate control sequences involved in transcriptional regulation of antibiotic biosynthesis. *Trends Biotechnol*. 8: 184-189.

Madduri K, Hutchinson C (1995). Functional characterization and transcriptional analysis of the *dnrR*<sub>1</sub> locus, which controls daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*. *J Bacteriol*. 177: 1208-1215.

Martín J F, Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Smith M C M, Ellingsen T E, Nieselt K, Burroughs N J, Wellington E M H (2012). Transcriptomic studies of phosphate control primary and secondary

metabolism in *Streptomyces coelicolor*. Appl Microbiol Biotechnol. 95:61-75.

McDowall K J, Thamchaipenet A, Hunter I S (1999). Phosphate control of oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* is at level of transcription from promoters overlapped by tandem repeats similar to those of the DNA-binding sites of the OmpR family. J Bacteriol. 181:3025-3032.

Mendes M V, Tunca S, Anton N, Recio E, Sola-Landa A, Aparicio J F, Martín J F (2007). The two-component *phoR-phoP* system of *Streptomyces natalensis*: inactivation or deletion of *phoP* reduces the negative phosphate regulation of piramicin biosynthesis. Metab Eng. 9:217-227.

Mullan A, Quinn J, McGrath J (2002). A nonradioactive method for the assay of polyphosphate kinase activity and its application in the study of polyphosphate metabolism in *Burkholderia cepacia*. Anal Biochem. 308:294-299.

Nieselt K, Battke F, Herbig A, Bruheim P, Wentzel A, Jakobsen O M, Sletta H, Alam M T, Merlo M E, Moore J, Omara W A, Morrissey E R, Juarez-Hermosillo M A, Rodríguez-García A, Nentwich M, Thomas L, Mudassar I, Legaie R, Gaze W H, Challis G L, Jansen R C, Dijkhuizen L, Rand D A, Wild D L, Bonin M, Reuther J, Wohlleben W, Smith M C M, Burroughs N J, Martín J M, Hodgson D A, Takano E, Breiting R, Ellingsen T E, Wellington E M H (2010). The dynamic architecture of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. BMC Genomics. 11:10. doi: 10.1186/1471-2164-11-10.

Ohtomo R, Sekiguchi Y, Mimura T, Saito M, Ezawa T (2004). Quantification of polyphosphate: different sensitivities to short-chain

polyphosphate using enzymatic and colorimetric methods as revealed by ion chromatography. *Anal Biochem.* 328: 139-146.

Olukoshi E R, Packter N M (1994). Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. *Microbiology.* 140: 931-943.

Prescott L M, Harley J P, Klein D A, (1990). *Microbiology.* 2nd edn. W.C. Brown Publishers. Dubuque.

Rao N N, Kornberg A (1996). Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 178: 1394-1400.

Rodríguez- García A, Barreiro C, Santos-Beneit F, Sola-Landa A, Martín J F (2007). Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a  $\Delta$ *phoP* mutant. *Proteomics.* 7: 2410-2429.

Ruiz B, Rodríguez R, Aguilar G, Gosset G, Sánchez S (2014). Glucose kinases from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 6061-6071.

Sánchez S y Demain A L (2013). Valuable products from microbes. En: *Industrial Microbiology: Microbes in Process.* Neelam M (Ed.). Capítulo 3. Nova Science Publishers. ISBN: 978-1-63117-127-7.

Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Franco-Domínguez E, Martín J F (2008). Phosphate-dependent regulation of the low- and high- affinity transport systems in the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology.* 154: 2356-2370.

Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Martín J M (2009). Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and

AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. Mol Microbiol. 72:53-68.

Shirato S, Nagatsu C (1965). Fermentation studies with *Streptomyces griseus*. Carbohydrate sources for the production of protease and streptomycin. App Microbiol. 13:669-672.

Sola-Landa A, Moura R S, Martín J F (2003). The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. PNAS. 100:6133-6138.

Sprusansky O, Stirrett K, Skinner D, Denoya C, Westpheling J (2005). The *bkdR* gene of *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and encodes a transcriptional regulator of branched-chain amino acid dehydrogenase complex. J Bacteriol. 187:664-671.

Tanaka S, Lee S, Hamaoka K, Kato J, Takiguchi N, Nakamura K, Ohtake H, Kuroda N (2003). Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium, *Microlunatus phoshovorius*. J Bacteriol. 185:5654-5656.

Tarkka M and Hampp R (2008). Secondary metabolites of soil *Streptomyces* in biotic interactions In: Karlovsky P. Secondary metabolites in soil ecology. Volume 14. Chapter 6. 107-126.

Trinder P (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann Clin Biochem. 6:24-33.

van Veen H W (1997). Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. Antoine van Leeuwenhoek. 72:299-315.

Yalim I, Doruk T, Avican U, Tunca S (2012). Deletion of polyphosphate kinase gene (*ppk*) has a stimulatory effect on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Turk J Biol. 36:373-380.

Yamagata Y, Watanabe H, Saitoh M, Namba T (1991). Volcanic production of polyphosphates and hexokinase as studied by molecular modeling and site-directed mutagenesis. J Bio Chem. 35: 13157-13164.

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

Zhihua J, Chen X, Peilin C (2006). Effects of glucose and phosphate on spinosad fermentation by *Sacharopolyspora spinosa*. Chinese J Chem Eng. 14:542-546.