



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INVESTIGACION REALIZADA EN EL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

UNIDAD AGI
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA BIOSINTESIS DE
GENTAMICINA EN *Micromonospora purpurea* NRRL-2953

TESINA QUE PRESENTA

BIOL. LAURA ANGELICA ESCALANTE DAVILA

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE

"ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGIA"

I N D I C E

	PAGINA
RESUMEN.....	i
INTRODUCCION.....	1
GENERALIDADES DE GENTAMICINA.....	4
DESCUBRIMIENTO.....	4
CLASIFICACION.....	4
MICROORGANISMOS PRODUCTORES.....	4
PRESENTACION COMERCIAL.....	4
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	5
IMPORTANCIA CLINICA.....	6
MECANISMO DE ACCION.....	6
MECANISMOS DE RESISTENCIA DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR	8
SITIO ACTIVO DEL ANTIBIOTICO.....	9
MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LOS MICROORGANISMOS PATOGENOS.....	9
GENTAMICINAS SEMISINTETICAS.....	10
ESTRUCTURA QUIMICA Y PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA GENTAMICINA.....	11
BIOSINTESIS DE GENTAMICINA.....	13
BIOSINTESIS DEL ANILLO AMINOCICLITOL O 2-DEOXIESTREP- TAMINA.....	13
BIOSINTESIS DE LAS GENTAMICINAS.....	18
REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE GENTAMICINA.....	21
RETROREGULACION.....	23
REGULACION CATABOLICA POR FOSFATOS.....	26
REGULACION CATABOLICA POR NITROGENO.....	30
REGULACION CATABOLICA POR CARBONO.....	35

	PAGINA
OBJETIVO.....	46
MATERIAL Y METODOS.....	47
RESUTADOS Y DISCUSION.....	62
CONCLUSIONES.....	80
RECOMENDACIONES.....	82
BIBLIOGRAFIA.....	83

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
FIGURA 1 Compuestos y subunidades del complejo C de gentamicina.....	5
FIGURA 2 Rutas biosintéticas de 2-deoxiestreptomina propuestas por Reinhart.....	14
FIGURA 3 Via de biosíntesis de gentamicina.....	17

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
TABLA 1 MICROORGANISMOS SENSIBLES AL ANTIBIOTICO GENTAMICINA.....	7
TABLA 2 ANTIBIOTICOS CUYA BIOSINTESIS ES RETRORREGULADA POR EL PRODUCTO FINAL.....	25
TABLA 3 REGULACION CATABOLICA POR FOSFATOS EN LA BIOSINTESIS DE ANTIBIOTICOS.....	27
TABLA 4 REGULACION CATABOLICA POR NITROGENO EN LA BIOSINTESIS DE LOS ANTIBIOTICOS.....	31
TABLA 5 METABOLITOS SECUNDARIOS CUYA PRODUCCION ES SUPRIMIDA POR GLUCOSA.....	38
TABLA 6 REGULACION CATABOLICA POR CARBONO EN LA BIOSINTESIS DE ANTIBIOTICOS.....	41
TABLA 7 EFECTO DE 2-DEOXI-D-GLUCOSA SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Micromonospora purpurea</i> Y LA FORMACION DE GENTAMICINA.....	70
TABLA 8 EFECTO DE 2-DEOXI-D-GLUCOSA SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Micromonospora purpurea</i> Y LA FORMACION DE GENTAMICINA.....	71

INDICE DE GRAFICAS

	PAGINA
GRAFICA 1 Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de <i>Micromonospora purpurea</i> NRRL 2953, la síntesis de gentamicina y variación de pH; en medio de cultivo II suplementado con diferentes concentraciones de: almidón, maltosa, D-manosa, D-glucosa y sacarosa.....	63
GRAFICA 2 Valores máximos obtenidos en cultivos de <i>M. purpurea</i> , crecida en presencia de los carbohidratos: almidón, maltosa, D-manosa, D-glucosa y sacarosa. Porcentaje de consumo.....	64
GRAFICA 3 Efecto de D-glucosa sobre el crecimiento y la formación de gentamicina en <i>M. purpurea</i>	68
GRAFICA 4 Efecto de la adición de D-glucosa a diferentes tiempos durante la fermentación, sobre la biosíntesis de gentamicina en <i>M. purpurea</i>	74
GRAFICA 5 Efecto de la adición de 2-deoxi-D-glucosa a diferentes tiempos durante la fermentación sobre la biosíntesis de gentamicina en <i>M. purpurea</i> ...	77

RESUMEN

Se sabe que la producción de muchos metabolitos secundarios de interés industrial está sometida a diferentes mecanismos de control y uno de ellos es la regulación por fuente de carbono. Las fuentes de carbono fácilmente metabolizables, las cuales generalmente son utilizadas en las fermentaciones, ejercen efectos inhibitorios o de represión sobre la síntesis o actividad de algunas enzimas catabólicas involucradas en el metabolismo secundario; el efector puede ser la molécula "per se" o bien algún producto derivado de su catabolismo; aunque los detalles moleculares de dicha regulación se desconocen a la fecha.

La gentamicina, antibiótico aminoglucósido de amplio espectro bacteriano, representa uno de los productos farmacéuticos prioritarios en el cuadro básico de medicamentos 1984 en México. Aunque se produce en el país, para satisfacer las necesidades aún se requiere de la importación del 25% del total. Comparada con otros procesos de fermentación, es poco eficiente en cuanto a rendimientos. Uno de los motivos que propician esta baja eficiencia, es el desconocimiento de las enzimas y los mecanismos regulatorios involucrados en su biosíntesis.

De ahí que el objetivo del presente trabajo fuera determinar el efecto que tiene la fuente de carbono sobre la biosíntesis del antibiótico gentamicina, utilizando como modelo la cepa silvestre

de *Micromonospora purpurea* NRRL-2953. Estudios comparativos con una cepa hiperproductora permitirían incrementar la producción, si estas estuviesen sujetas a este mecanismo de control, pues será factible buscar cepas insensibles a regulación catabólica.

Los resultados experimentales muestran que *Micromonospora purpurea* NRRL-2953 crece y produce gentamicina en presencia de almidón, maltosa, manosa, glucosa y sacarosa desde el inicio de la fermentación; al incrementar las concentraciones de estos carbohidratos se observa que glucosa y manosa provocan un efecto de supresión sobre la síntesis del antibiótico, a diferencia de las otras fuentes de carbono. El mayor efecto de supresión se observa con glucosa. Un análogo de este carbohidrato (2-deoxi-D-glucosa) también suprime la formación del antibiótico de manera similar. El efecto de glucosa y del análogo se observan cuando son adicionados durante el inicio de la síntesis (entre las 0 y 60 horas de fermentación); posteriormente se presenta una liberación al efecto, lo cual se advierte al restablecerse la síntesis, alcanzando concentraciones de antibiótico similares a las del control. Dichas observaciones nos llevan a concluir que glucosa "per se" causa un efecto de represión de tipo transitorio en la formación de gentamicina.

INTRODUCCION

Desde el descubrimiento del primer antibiótico aminoglucósido, realizado en 1944 por Waksman, se hizo patente la importancia que tiene este grupo de metabolitos como agentes terapéuticos. A la fecha se han identificado más de 100 compuestos naturales pertenecientes a este grupo de antibióticos; sin embargo, sólo 16 de ellos tienen importancia comercial y terapéutica, los cuales son producidos en 145 industrias farmacéuticas en el mundo. Uno de estos productos es la gentamicina (10, 60).

En México este antibiótico representa uno de los productos farmacéuticos considerados como prioritarios en el Cuadro Básico de la Salud de 1984. Esto se debe a su eficiente actividad terapéutica para el tratamiento de infecciones de las vías urinarias, digestivas, dérmicas y del sistema nervioso central, aunque su uso requiera ciertas restricciones debido a los efectos secundarios que provoca (14). Este metabolito es elaborado a nivel mundial por 22 laboratorios farmacéuticos, en los cuales se producen 32 diferentes presentaciones comerciales; en México es producido por 2 compañías farmacéuticas que son: Beneficiadora e Industrializadora, S.A. de C.V. y Fermic, S.A. de C.V., quienes sólo cubren alrededor del 75% de la demanda nacional, teniéndose que importar el restante 25%.

De acuerdo a los datos obtenidos del Instituto Mexicano de Comercio Exterior, en el periodo 82-83, México importó 334 Kg de sulfato de gentamicina, con un valor aproximado de 142,732 dólares, de los países productores de este antibiótico, que son: Estados Unidos, China, Hungría, Alemania Occidental, Holanda e Italia (77).

La producción fermentativa de gentamicina, llevada a cabo con *Micromonospora purpurea* y/o *Micromonospora echinospora*, es un proceso poco eficiente en cuanto a la cantidad de producto final que se obtiene que es de aproximadamente 1.4 g/l. Esta cifra es baja comparada con la producción de otros antibióticos, tales como la penicilina o cefalosporina, los cuales alcanzan aproximadamente 50 g/l y 20 g/l, respectivamente (13). Uno de los motivos más importantes que provocan esta situación es el desconocimiento de las enzimas y los mecanismos regulatorios involucrados en su biosíntesis y, de hecho, en su producción.

Dentro de los mecanismos que regulan el metabolismo secundario en los microorganismos, están la inducción, la retroregulación y la represión catabólica (17, 20, 21, 46 y 53). Desde el punto de vista industrial la represión catabólica juega un papel importante. La producción de muchos de estos metabolitos está sometida a este tipo de control, que pueden ejercer las fuentes de carbono, nitrógeno, fosfatos y sulfatos utilizados en las fermentaciones. La represión catabólica por carbono y nitrógeno es ejercida por nutrientes fácilmente

metabolizables, como glucosa y/o amonio, ya sea por la molécula "per se" o por algún producto derivado de su metabolismo; por otro lado, si bien los fosfatos en altas concentraciones permiten un buen crecimiento de los microorganismos, también son capaces de reprimir la síntesis de estos metabolitos. Aunque la regulación por sulfatos es poco conocida, se sabe que es ejercida por compuestos y aminoácidos que contienen grupos sulfhidrilo (aparentemente actúa sólo sobre algunas proteasas). Cuando las vías de biosíntesis de estos metabolitos están sujetos a mecanismos de retroregulación, el exceso del producto en el medio de cultivo también reprime la síntesis "de novo" de las sintetetasas implicadas, hasta que se presenta un descenso en su concentración. Otro de los mecanismos regulatorios importantes en las fermentaciones industriales es la inducción, consistente en que compuestos específicos, no necesariamente involucrados con la síntesis del metabolito, son capaces de estimular la producción.

La existencia de alguno de estos mecanismos en cepas industriales puede repercutir fuertemente en la producción de estos metabolitos, por lo tanto, el conocerlos puede permitir el diseño de técnicas de fermentación o de estrategias encaminadas al mejoramiento genético de la producción, lo que ha dado excelentes resultados en los antibióticos antes mencionados. En el caso de gentamicina, tampoco existen reportes de mejoramiento genético del microorganismo productor.

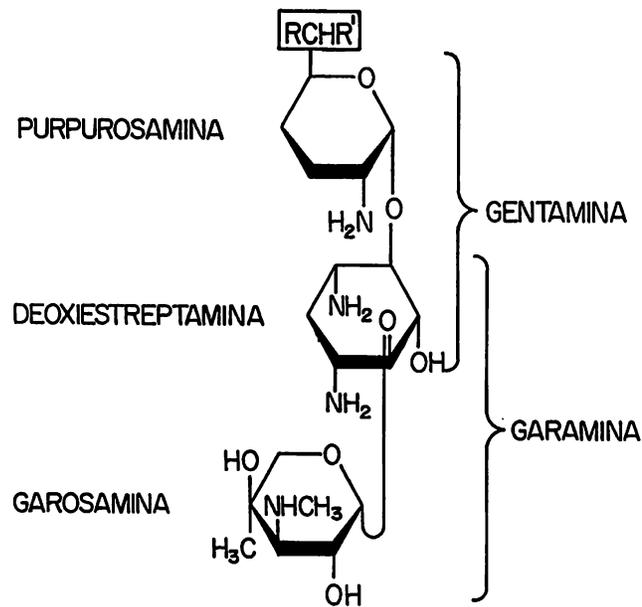
GENERALIDADES DE GENTAMICINA

El descubrimiento y la purificación de gentamicina fue reportado por primera vez en 1963 por Weinstein y cols. (87); estudios posteriores realizados por Cooper y cols. les llevaron a proponer su estructura química en 1969 (59), en base a la cual fue clasificada dentro del grupo de antibióticos aminoglucósidos (1.2.2.2.2) (7).

Este antibiótico es sintetizado por Actinomicetos del género *Micromonospora*, los cuales incluyen las cepas de *Micromonospora purpurea* NRRL-2953, *Micromonospora echinospora* NRRL-2985, *Micromonospora echinospora ferruginea* NRRL-2995, *Micromonospora echinospora pallida* NRRL-2996 y *Micromonospora echinospora echinospora* (61, 87).

El producto que se conoce como gentamicina consiste en una mezcla de tres antibióticos estrechamente relacionados denominados gentamicina C₁, C_{1a} y C₂. Se caracterizan por la presencia de garosamina y purpurosamina, un azúcares poco usuales, los cuales forman uniones glucosídicas con la 2 deoxiestreptamina (anillo aminociclitol); las preparaciones comerciales presentan este complejo en una proporción de 28.3% de C₁, 34.6% de C_{1a} y 37.1% de C₂, como sulfato de gentamicina (Fig.1) (1, 70).

FIGURA 1
 COMPUESTOS Y SUBUNIDADES DEL COMPLEJO C
 DE Gentamicina



		<u>R</u>	<u>R'</u>
GENTAMICINA	C ₁	CH ₃	NHCH ₃
	C _{1a}	H	NH ₂
	C ₂	CH ₃	NH ₂

Este antibiótico posee un espectro de actividad bactericida amplio, pues además de inhibir el crecimiento bacteriano, provoca lisis celular (1, 70, 87); Weinstein ha demostrado que no existen diferencias detectables en cuanto a la actividad biológica entre las gentamicinas del complejo (90). Dentro del grupo de aminoglucósidos es el que posee mayor potencia, además de no inducir fácilmente la formación de factores de resistencia en microorganismos sensibles, incluso cepas que poseen aminoglucósido-acetil-transferasas sólo acetilan uno de los

compuestos de este complejo (71, 89, 91).

Poseen gran importancia clínica y es utilizado principalmente para el tratamiento de infecciones graves provocadas por bacterias gram negativas como *E. coli*, *Proteus*, *Paracolon*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*; aunque es más activo contra microorganismos gram negativos, también actúa contra gram positivos incluyendo *Mycobacterium tuberculosis* (Tabla 1) (14, 29). Sin embargo, se sabe que es neurotóxico cuando se emplean dosis continuas, afectando las funciones cocleares y vestibulares del octavo par craneal y también es nefrotóxico, pues provoca daños significativos a los túbulos renales, a causa de la unión del antibiótico a la corteza renal y a su alto grado de absorción (12, 34, 38). El grado de toxicidad es influenciado por el tamaño de la dosis, la duración del tratamiento, el funcionamiento renal antes y después de la terapia y la combinación con otras drogas; el potencial tóxico de estos compuestos está directamente relacionado con el nivel de concentración en suero (10).

En cuanto al mecanismo de acción de este grupo de antibióticos, se ha establecido que su acción inhibitoria es similar a la de la estreptomycinina y que ambos inhiben la síntesis de proteínas en las bacterias sensibles, como un resultado de la interacción del antibiótico y la subunidad 30S del ribosoma (66), ya sea liberando la formil-metionina-RNA del complejo de

TABLA 1. MICROORGANISMOS SENSIBLES AL ANTIBIOTICO GENTAMICINA.

MICROORGANISMOS		MIC (µg/ml)
G+	<i>Bacillus</i> sp.	0.01-1
	<i>Clostridium</i> sp.	0.125-1
	<i>Corinebacterium</i> sp.	0.125-1
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.125-1
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0.125-1
	<i>Streptococcus</i> sp.	2.4-8
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.03
G-	<i>Escherichia coli</i>	0.25
	<i>Enterobacter</i> sp.	0.06-4
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
	<i>Salmonella</i> sp.	1
	<i>Shigella</i> sp.	2
	<i>Serratia marcescens</i>	0.06-1
	<i>Proteus</i> sp.	0.06-2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.5
	<i>Paracolon</i> sp.	0.06-8
G+	= gram positivos	
G-	= gram negativos	
MIC	= concentración mínima inhibitoria	

iniciación y/o retardando la elongación (68). Aunque se desconoce el mecanismo exacto, se ha observado que también provoca errores en la lectura. Esto se ha demostrado mediante experimentos de incorporación de aminoácidos marcados en *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa*, en presencia de antibiótico, donde inmediatamente se inhibe el crecimiento, los aminoácidos no se incorporan y se estimula la síntesis de DNA; también en presencia de uracilo, gentamicina induce errores en la lectura en sistemas "in vitro", pues estimula la incorporación de isoleucina (1). Le Goffic (41) ha encontrado que existen dos tipos de sitios de unión en la subunidad 50S y uno solo en la 30S del ribosoma; la unión está determinada por el número de grupos amino de los aminoazúcares de este antibiótico y la especificidad de ésta reside en la garosamina de las gentamicinas.

Se ha encontrado que los microorganismos productores de este metabolito son capaces de protegerse contra el efecto de su producto mediante la modificación de los sitios de reconocimiento del antibiótico. Este mecanismo de resistencia a gentamicina en *M. purpurea* ha sido estudiado por Piendl y Buck (66, 92); ellos encontraron que este microorganismo presenta muy alta resistencia, durante la fase de crecimiento, a aminoglucósidos que contienen deoxiestreptamina-4,6-disustituida, además de gentamicina y, que ésta es debida a que los ribosomas 70S se encuentran modificados, principalmente la subunidad 30S.

Weinstein y cols. (90), han demostrado que la toxicidad de la molécula radica en la presencia de los grupos amino, los cuales al ser acetilados pierden sus efectos neurotóxicos, pero también se suprimen sus efectos antibacterianos; lo mismo se observa cuando son alquilados (56), ya que los grupos amino de este antibiótico son los que le confieren actividad al compuesto. Estudios posteriores han mostrado que los "sitios clave" de la molécula son el grupo amino del carbono 3" de la garosamina y el grupo hidroxilo del carbono 4" de la misma, para que esta sea activa (de ahí que sea más activa contra gram negativos); además se observó que la presencia de grupos amino adicionales también suprimen su actividad (7, 70).

Por otro lado, el principal mecanismo de resistencia que desarrollan los microorganismos patógenos hacia este tipo de aminoglucósidos es la inactivación enzimática; la distribución de estas enzimas en bacterias gram negativas es amplia e incluye a grupos que no son de importancia clínica (64, 70, 71).

Se han establecido tres tipos principales de enzimas inactivantes, de las cuales se conocen más de 14; éstas son fosfotransferasas (APH), nucleotidil-transferasas (ANT) y acetil-transferasas (APH). Las enzimas que inactivan gentamicina son principalmente las acetiltransferasas y de éstas se han identificado varios tipos; por ejemplo, las que acetilan el grupo amino del carbono 6', de las cuales se han aislado 4 enzimas diferentes en bacterias de importancia clínica y éstas han sido

clasificadas como AAC (6) I, AAC (6) II, AAC (6) III y AAC (6) IV (el número arábico significa la posición que atacan y el romano la especificidad de la enzima); otras que acetilan el grupo amino del carbono 3 y son tres: AAC (3) I, AAC (3) II y AAC (3) III, también aisladas de bacterias patógenas y finalmente las que acetilan el grupo amino en el carbono 2' que sólo es una: AAC (2) I, aislada de un microorganismo no patógeno (71).

Otros esfuerzos encaminados hacia la búsqueda de antibióticos aminoglucósidos que posean mayor potencia, menor toxicidad y que además no sean inactivados por bacterias de importancia clínica resistentes a estos, han sido la "biosíntesis mutacional" y la síntesis química, cuyos resultados han sido positivos a la fecha. Si bien no se ha logrado obtener productos menos tóxicos, estos son más potentes y no son susceptibles a inactivación enzimática y en la actualidad se encuentran en uso (10, 16, 56, 70, 71, 73).

ESTRUCTURA QUIMICA Y PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS GENTAMICINAS

Los antibióticos aminoglucósidos se caracterizan por presentar un anillo aminociclohexanol o aminociclitol y se clasifican en función de la estructura química que presentan. Se han establecido cuatro clases: los monoaminociclitoles, los que contienen actinamina, los que contienen estreptidina o bluesidina y los que contienen 2-deoxiestreptamina; estos últimos son subdivididos de acuerdo a la posición en la que están los sustituyentes (en los carbonos, 4', 5', 4'/5' y 4'/6'). De acuerdo a esta clasificación, las gentamicinas han sido incluidas en el grupo de antibióticos aminoglucósidos con 2-deoxiestreptamina 4,6-disustituida (7, 73, 83).

Las gentamicinas se caracterizan por poseer dos azúcares poco comunes, un monosacárido metil-glucósido denominado metil-garosamina, el cual está unido al hidroxilo del carbono 6 de la deoxiestreptamina formando una unión glucosídica; el otro es una piranosa denominada purpurosamina, que también forma una unión glucosídica con el carbono 4 del anillo aminociclitol (Fig. 1). Al ser sometidas a metanolisis (HCl-metanol), las subunidades de las gentamicinas se separan formando dos tipos de pseudodisacáridos, la garamina (garosamina-deoxiestreptamina) y la gentamina (purpurosamina-deoxiestreptamina) (1, 73).

En cuanto a la estructura de las gentamicinas C_1 , C_{1a} y C_2 , la diferencia principal radica en el contenido de grupos metilo: la gentamicina C_{1a} contiene dos grupos N-metil, un grupo secundario C-metil y un grupo terciario C-metil; la gentamicina C_2 difiere de la C_{1a} en que posee un grupo N-metil menos y la C_2 en que no posee un grupo secundario C-metil; las gentamicinas C_1 y C_2 son isómeros con polaridades idénticas (1).

Además de las gentamicinas se han purificado una serie de poseudotrisacáridos estructuralmente relacionados; los cuales son producidos por el mismo microorganismo; algunos son intermediarios y otros pudieran ser productos menores o modificaciones de otras rutas biosintéticas y presentan también actividad antibiótica (29, 39, 64, 83, 86, 87).

En cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, se ha establecido que son compuestos básicos, solubles en agua, ligeramente solubles en metanol, e insolubles en etanol; forman cristales prismáticos coloridos dextrorrotatorios, salvo la gentamicina X cuyos cristales son amorfos; algunos compuestos son estereoisómeros del mismo grupo. Los pesos moleculares de las gentamicinas C_1 , C_2 y C_{1a} son de 477, 463 y 449 respectivamente, y sus fórmulas $C_{21}H_{43}N_5O_7$, $C_{20}H_{41}N_5O_7$ y $C_{19}H_{39}N_5O_7$. Se utilizan en la forma de sal como sulfato de gentamicina. Todos estos compuestos son polares y sus polaridades son muy semejantes (1, 29, 43, 83, 86).

BIOSINTESIS DE GENTAMICINA

Biosíntesis del Anillo Aminociclitol

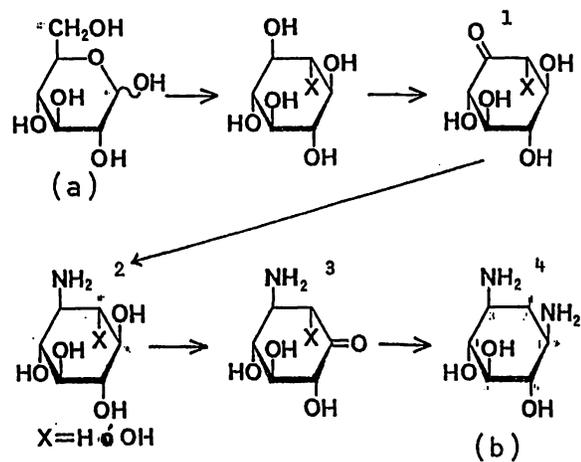
El aminociclitol 2-deoxiestreptamina (2-DOS) es una unidad estructural común en muchos antibióticos aminoglucósidos de gran importancia clínica; sin embargo, es poco el conocimiento que se tiene sobre su biosíntesis y menor aún el que se tiene sobre las enzimas implicadas en ella.

Los primeros estudios encaminados hacia el conocimiento de esta ruta biosintética fueron realizados por Reinhart (73) quien basándose en estudios de incorporación de glucosa radioactiva ($\{^{13}\text{C}-6\}$) en el aminociclitol de neomicina, propuso dos posibles rutas para la biosíntesis de la deoxiestreptamina (Fig. 2). La primera ruta involucra una oxidación y una aminación inicial en el carbono-3 del anillo aminociclitol (el cual deriva del carbono 5 de glucosa), seguida de otra oxidación y aminación en el carbono 1 del mismo (el cual deriva del carbono 1 de glucosa), la segunda alternativa (Fig. 2), presenta una secuencia invertida donde primero tiene lugar una oxidación y aminación en el carbono 1 del anillo, seguida de la oxidación y aminación en el carbono 3.

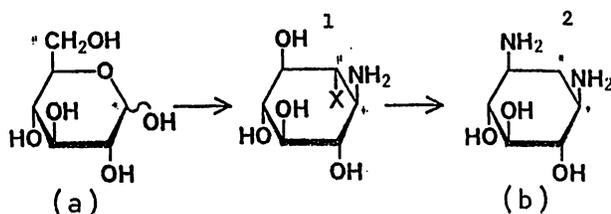
En estudios posteriores efectuados por Chen y Cols. (15) con extractos libres de células de *M. purpurea* y *S. fradiae* (idiotrofos del 2-DOS), sugirieron que deoxi-inososa (2-deoxi-

F I G U R A 2

RUTA BIOSINTETICA DE 2-DEOXIESTREPTAMINA
A PARTIR DE GLUCOSA PROPUESTA POR REINHART



Ruta alterna:



- 1) Oxidación en el carbono 3
- 2) Aminación en el carbono 3
- 3) Oxidación en el carbono 1
- 4) Aminación en el carbono 1

Ruta alterna:

- 1) Oxidación y aminación en el carbono 1
- 2) Oxidación y aminación en el carbono 3

- a) Glucosa
- b) 2-Deoxiestreptamina

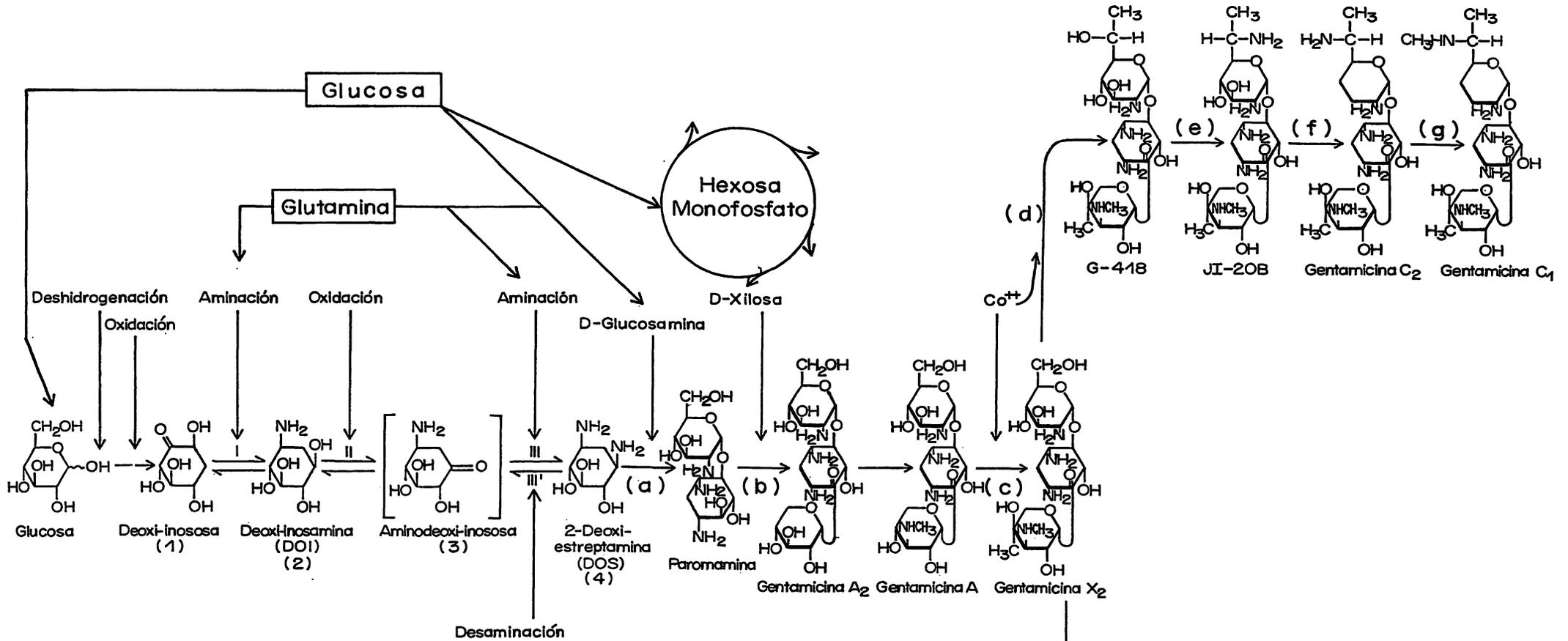
scillo-inososa) y deoxi-inosamina (2-deoxi-scillo-inosamina) podían ser 2 de los precursores de la biosíntesis del 2-DOS; Kase (35) demostró la existencia de uno de estos intermediarios, el del 2-deoxi-scillo-inosamina (DOI) en una mutante de *M. sagamiensis* (idiotrofa de 2-DOS) productora de sagamicina. Sus resultados también sugerían la existencia de un intermediario entre éste y la deoxiestreptamina en este microorganismo concordando con la ruta propuesta por Reinhart (Fig. 2). Por otro lado, Chen y cols. (15) encontraron también que los grupos amino involucrados en la síntesis de esta molécula derivan posiblemente de glutamina.

En estudios más recientes, Suzukake y cols. (80) han demostrado, en extractos de células de *S. fradiae* (productor de neomicina), la existencia de tres reacciones enzimáticas responsables de la síntesis de la deoxiestreptamina a partir de deoxiinososa, las cuales habían sido incluidas en la ruta biosintética propuesta para la síntesis del mismo. Además, comprobaron que el átomo de carbono correspondiente al carbono 5 de la glucosa es el primero en ser oxidado y aminado y el correspondiente al carbono 1 de la glucosa, es el que pasa por la segunda oxidación y aminación para formar el aminociclitol. Estos mismos autores han demostrado que el primer paso en esta ruta corresponde a una reacción de dehidrogenación, precedida por una oxidación de glucosa, lo cual da origen a la deoxi-inososa (Fig. 3), y que las reacciones precedentes son catalizadas por

aminotransferasas que utilizan glutamina como donador del grupo amino. Pasos subsecuentes incluyen la aminación de deoxi-inososa, que da como producto deoxi-inosamina (DOI); la desaminación de la deoxiestreptamina da lugar a la formación de aminodeoxi-inososa, intermediario que es posiblemente originado por la oxidación de DOI y el cual puede finalmente, ser transformado por aminación de 2-deoxiestreptamina.

Por otro lado, purificaron la aminotransferasa demostrando que se trata de una sola enzima de 130,000 daltones, la cual convierte deoxi-inosamina a deoxiestreptamina y además cataliza la aminación de deoxi-inososa y la desaminación de la 2-deoxiestreptamina "in vitro"; se piensa que pudiera tratarse de una α -cetoácido-aminotransferasa ya que presenta una alta actividad de aminotransferencia de glutamina a piruvato. También se obtuvieron parcialmente purificada la actividad de la enzima deoxi-inosamina dehidrogenasa, implicada en la oxidación-aminación de la deoxi-inosamina (Reacc. II y III); ellos sugieren que esta enzima puede estar acoplada a transaminasas (2 \rightarrow 3 \rightarrow 4) involucradas en las reacciones I y III, aunque estas últimas no pudieron ser purificadas. Estos sistemas requieren de NAD⁺, fosfato de piridoxal y glutamina para su actividad, lo cual sugiere que otro tipo de eventos no pueden estar involucrados durante la síntesis (por ejemplo, fosforilación u otros).

FIGURA 3
VIA DE BIOSINTESIS DE GENTAMICINA



- (a) Adición de D-glucosamina
 (b) Adición de D-xilosa, amino-sustitución y N-metilación en C-3"
 (c) C-Metilación con inversión de la configuración en C-4"
 (d) C-metilación en C-6' con inversión en la configuración
 (e) Amino-sustitución en C-6'
 (f) Epimerización en C-6'
 (g) N-Metilación en C-6'
 (h) 3',4'-Deshidroxilación

* Síntesis de otros intermediarios

** Formación de gentamicina C_{2a} estereoisómero de C₂

+ Metionina es el donador de los grupos metilo en las reacciones de C y N metilación.

Biosíntesis de las Gentamicinas

Los primeros investigadores que propusieron la secuencia de la ruta de biosíntesis de gentamicina fueron Testa y Tilley en 1976 (82), mediante estudios de bioconversión en sistemas de células en reposo y analizando cromatográficamente los productos. Demostraron que los compuestos menores que se producían durante la fermentación de este antibiótico (A, A₁, A₂, B, X₂, G-418, JI-20A y JI-20B) podían ser convertidos a las gentamicinas por una mutante de *M. purpurea* incapaz de producirla, ya que acumula paromamina. Posteriormente, estudios realizados por Kase (36) y Odakura (59), utilizando este mismo tipo de sistemas con mutantes de *M. purpurea* y *M. sagamiensis* capaces de acumular diferentes intermediarios de la vía biosintética de gentamicina y sagamicina respectivamente, propusieron algunas modificaciones sobre la secuencia y enzimas involucradas, así como a elucidar algunos mecanismos que regulan la biosíntesis de este grupo de gentamicinas.

Una vez que se ha formado el anillo aminociclitol, la biosíntesis de gentamicina se inicia con la condensación de D-glucosamina a esta molécula, dando lugar a la formación del disacárido denominado paromamina (Fig. 3); la incorporación posterior de una molécula de D-xilosa a este compuesto da origen a la gentamicina A, siendo en este paso en el que se integran las subunidades básicas que darán origen a las gentamicinas. Estudios efectuados con glucosa radioactiva han mostrado que la

glucosamina utilizada durante la síntesis del antibiótico proviene de la glucosa, a través de una reacción de transamidación de la glutamina durante la conversión de fructosa-6-fosfato a glucosamina-6-fosfato, catalizada por la enzima L-glutamina-D-fructosa-6-fosfato aminotransferasa. También se ha demostrado que la D-xilosa deriva de la vía de las pentosas (o hexosa monofosfato) (73). Ya integrado este compuesto es C-metilado en la posición del carbono 4" y una epimerasa invierte su configuración, lo cual da lugar a la conversión de gentamicina A a gentamicina X. A partir de este intermediario la vía de biosíntesis prosigue por dos rutas; la primera conduce a la síntesis del antibiótico JI-20A, por una reacción de amino-sustitución en el carbono 6'; posteriormente una dehidroxilación en los carbonos 3' y 4' convierte este compuesto en gentamicina C1a, el primero de los componentes activos del complejo de gentamicina. En situaciones experimentales algunas mutantes de *M. purpurea* metilan este metabolito en el carbono 6' (N-metilación), dando como producto final sagamicina en muy baja proporción, ante lo cual se ha determinado que las vías de biosíntesis que conducen a la formación de gentamicina y sagamicina son iguales (36, 59).

En la segunda ruta, la gentamicina X₂ es convertida en el antibiótico G-418; esta reacción se lleva a cabo por acción de una metilasa, la cual introduce un metilo en el carbono 6' de la gentamicina X₂ (C-metilación) y una epimerasa invierte

posteriormente su configuración; este compuesto forma a su vez al antibiótico JI-20B por amino-substitución del carbono 6'; las reacciones de 6-amino-substitución involucradas en la conversión de gentamicina X₂ al antibiótico JI-20A y del antibiótico G-418 al antibiótico JI-20B, son catalizadas por una sola enzima. Una segunda 3', 4' dehidroxilación, efectuada probablemente por la misma enzima que da origen a la formación de gentamicina C_{1a}, convierte al antibiótico JI-20B en gentamicina C_{2a} y, este es epimerizado dando como resultado la formación de gentamicina C₂, segundo metabolito activo del complejo; se ha demostrado que este paso es reversible. La última reacción que ocurre conduce a la conversión de gentamicina C₂ a gentamicina C₁, por acción de una metilasa la cual introduce un grupo metilo en el carbono 6' de la molécula (N-metilación), dando así origen al tercer componente de este antibiótico. Estas reacciones de 6'-N-metilación también son catalizadas por una sola enzima (36,40).

Los grupos metilo utilizados durante las reacciones de C-metilación y N-metilación durante la síntesis de gentamicina, provienen del aminoácido metionina; esto ha sido demostrado por Lee y Daniels (39, 64) mediante experimentos de incorporación utilizando metionina radioactiva (¹³C-metil-metionina y ²H-metil-metionina).

Se ha observado que el cobalto estimula la síntesis del antibiótico cuando es adicionado al medio de fermentación; estudios posteriores sobre el mecanismo de este ión mostraron que

esto se debía a una activación de los pasos de C-metilación durante la transformación de gentamicina A a X₂ (en C-4") y de gentamicina X₂ a G-41B (en el C-6') (89, 82); los pasos dependientes de cobalto son los involucrados en las reacciones de C-metilación y no así en las reacciones de N-metilación (20, 59).

Regulación de la Biosíntesis de Gentamicina

La biosíntesis de los antibióticos y otros metabolitos secundarios está sujeta generalmente a regulación negativa por factores nutricionales, como son la fuente de carbono, de nitrógeno y los fosfatos principalmente. Se ha demostrado que la síntesis de estos tiene lugar cuando la velocidad específica de crecimiento baja y, que este descenso es provocado por un desbalance de nutrientes al limitarse estas fuentes (20, 51).

Los mecanismos regulatorios que se manifiestan incluyen la represión catabólica por fuente de carbono, por fuente de nitrógeno, por fosfatos y por sulfatos, además de la inducción y la retroregulación. Pueden operar sobre las enzimas involucradas en el metabolismo secundario, ya sea sobre su actividad o a nivel de su formación (17, 20, 46, 53).

Se han propuesto dos modelos para explicar el mecanismo molecular de acción de estos nutrientes sobre la síntesis del metabolito así como el nivel al que tiene lugar. El primero

sugiere que se lleva a cabo por medio de efectores, los cuales serian moléculas de bajo peso molecular y capaces de actuar como correpresores o inhibidores, reprimiendo la formación o inhibiendo la acción de las sintetetasas de los antibióticos; este efector puede ser depletado antes de que ocurra la síntesis del antibiótico. El segundo modelo postula la existencia de un inductor o activador sintetizado por el microorganismo productor, el cual debe estar presente para que pueda iniciarse la síntesis (54).

Aunque es poco el conocimiento de las bases moleculares de estos mecanismos regulatorios, este podría ser extremadamente útil para incrementar los rendimientos en la producción de los antibióticos, mediante vías directas que favorezcan la obtención de cepas altamente productoras, por medio de la remoción selectiva de los puntos críticos en las vías biosintéticas de estos metabolitos.

La regulación de la biosíntesis de gentamicina ha sido muy poco estudiada, al igual que la de otros antibióticos; sin embargo, existen reportes en los cuales es evidente que los factores nutricionales regulan fuertemente el metabolismo secundario; de ahí que sea muy posible que la síntesis de este antibiótico también sea regulada a través de estos mecanismos.

Retrorregulación

Una de las causas por las cuales se obstaculiza la producción de los metabolitos secundarios durante las fermentaciones es porque estos son capaces de suprimir su propia biosíntesis; este fenómeno aunque poco conocido en el metabolismo secundario, ha sido reportado para el caso de varios antibióticos (20, 51, 53).

Estos idiolitos, de la misma forma que los metabolitos primarios son capaces de retrorregular su propia biosíntesis, ya sea inhibiendo o reprimiendo a las sintetetas involucradas en ello (20).

Por otro lado, algunos metabolitos primarios que son precursores de antibióticos o que son productos finales de vías biosintéticas ramificadas, en los cuales una de las ramificaciones conduce a la formación del antibiótico, también están sujetas a este tipo de regulación y son capaces de suprimir la formación del metabolito secundario (4, 22). También se ha mostrado que la concentración de antibiótico capaz de inhibir o reprimir a una cepa productora en particular, es generalmente similar a la que es capaz de producir el mismo microorganismo (53).

Ejemplos específicos de este tipo de eventos regulatorios se han estudiado en los antibióticos cloranfenicol, aurodox, cicloheximida, estafilomicina, ristomicina, puromicina, fungicidina candihexina, ácido micofenólico y eritromicina (51,

78). Estos antibióticos son capaces de suprimir, ya sea los últimos pasos involucrados en su síntesis o incluso, la formación de precursores derivados del metabolismo primario (Tabla 2).

Análogos estructurales de estos antibióticos, que no poseen actividad antimicrobiana, provocan el mismo efecto. Se piensa que en el caso de la síntesis de estafilomicina, ocurre retroregulación por ejercer su acción a nivel de la formación del inductor del antibiótico, porque pequeñas cantidades de éste sólo inhiben la formación del metabolito cuando es adicionado durante la fase de crecimiento. Otro ejemplo interesante es sobre la producción de cefamicinas por Streptomyces clavuligerus, donde la regulación es ejercida por los aminoácidos lisina y treonina, los cuales son capaces de inhibir concertadamente a la aspartoquinasa (primera enzima de la vía que les da origen) y al mismo tiempo, restringen la formación del precursor del antibiótico, el α -aminoadipato. Al ser derregulada esta enzima por mutagénesis, la producción de cefamicina fue incrementada de 6 a 8 veces (4).

Trabajos relacionados con este fenómeno regulatorio que involucren la biosíntesis de gentamicina no han sido reportados; sin embargo, cabe la posibilidad de que el microorganismo productor esté sujeto a este mecanismo, dados los bajos rendimientos en su producción a nivel industrial.

TABLA 2. ANTIBIOTICOS CUYA BIOSINTESIS ES RETRORREGULADA POR EL PRODUCTO FINAL.

ANTIBIOTICO	MICROORGANISMO PRODUCTOR
Cloranfenicol	<u>Streptomyces</u> sp. 3022a <u>Streptomyces venezuelae</u>
Cicloheximida	<u>Streptomyces griseus</u>
A. micofenolico	<u>Penicillium stoloniferum</u>
Aurodox	<u>Streptomyces goldiniensis</u>
Penicilina	<u>Penicillium chrysogenum</u>
Ristomicina	<u>Proactinomyces fructiferi</u> var. <u>ristomycini</u>
Virginiamicina (Estafilomicina)	<u>Streptomyces virginiae</u>
Puromicina	<u>Streptomyces alboniger</u>
Fungicidina	<u>Streptomyces noursei</u>
Candihexina	<u>Streptomyces viridoflavus</u>
Eritromicina	<u>Streptomyces erythreus</u>

Adaptada de Martin 1980 (53).

Regulación Catabólica por Fosfatos

El fosfato inorgánico es uno de los efectores regulatorios importantes en la formación de metabolitos secundarios (52). La influencia de este nutriente en la producción de antibióticos se conoce desde hace muchos años. De hecho, su presencia en los medios de fermentación es crucial, pues a través de estudios nutricionales se ha demostrado que altas concentraciones de fosfato inorgánico inhiben y/o reprimen la formación de muchos antibióticos y por otro lado, estimulan el crecimiento vegetativo, durante el cual es virtualmente consumido (Tabla 3).

Los metabolitos sujetos a este tipo de control se sintetizan únicamente en concentraciones de fosfato inorgánico subóptimas para el crecimiento del microorganismo; se ha determinado que concentraciones en el rango de 0.3 a 300 mM permiten buen crecimiento, pero concentraciones mayores de 10 mM suprimen la síntesis.

Aunque el mecanismo molecular del efecto de fosfato es aún desconocido, el mecanismo enzimático ha sido sugerido para la biosíntesis de cefalosporina, estreptomina, candidina, tetraciclina y tilosina (48, 61); para explicarlo han sido sugeridos los siguientes modelos:

- i) El fosfato favorece el metabolismo primario; esto es cierto tomando en cuenta su papel en los procesos metabólicos celulares, pero una vez que se ha consumido cambia el

TABLA 3. REGULACION CATABOLICA POR FOSFATOS EN LA BIOSINTESIS DE ANTIBIOTICOS.

Antibiótico	Microorganismo Productor	Mecanismo de acción	Sitio de Acción
Cefamicina	<i>S. Lactamdurans</i>	Inhibición	Expandasa Ciclase
Cefalosporina	<i>C. acremonium</i>	Supresión	Expandasa
Estreptomycinina	<i>S. griseus</i>	Inhibición	Estreptomycinina fosfatasa
Neomicina	<i>S. fradiae</i>	Represión	Amidino transferasa
		Supresión	Neomicina fosfatasa
		Supresión	TDP-glucosa 4,6 de- hidratasa
		Supresión	TDP-micarosa sinte- tasa
Tilosina	<i>S. fradiae</i>	Supresión	Macrocin O-metil- transferasa
		Represión	dTDP-glucosa-4,6 dehidratasa
		Represión	dTDP-micarosa sin- tetasa
		Represión	Macrocin metilasa
		Supresión	Valina dehidrogenasa
		Supresión	Metil-malonil-CoA carboxitransferasa
Candicidina	<i>S. griseus</i>	Supresión	Propionil CoA carbo- xilasa
		Represión	p-aminobenzoato sin- tetasa
Tetraciclina	<i>S. aureofaciens</i>	Represión	Anhidrotetraciclina oxigenasa
Ergot*	<i>Claviceps</i> sp.	Represión	Chanoclavina ciclase

*(alcaloide) metabolito secundario también.

Adaptada de Demain 1982 (20).

metabolismo primario y se derreprime el metabolismo secundario. Por otro lado, si durante la fermentación, una vez que se ha iniciado la síntesis, éste es adicionado, el metabolismo cambia restituyéndose los procesos del metabolismo primario (clortetraciclina, viomicina, candicidina, ristomicina, tetraciclina, vancomicina, nistatina y levorina).

ii) El fosfato actúa a través de cambiar las vías catabólicas de los carbohidratos. Esta hipótesis sugiere que al incrementarse la concentración de fosfatos en el medio decrementa la actividad de la vía hexosa-monofosfato y esto favorece la glicólisis; la supresión de la síntesis puede ser causada por limitación de precursores provenientes de HMP o por NADPH (clortetraciclina, tetraciclina, penicilina).

iii) Limita la síntesis de los inductores de las vías biosintéticas de los antibióticos, los cuales son estructuras no relacionadas con los del antibiótico en cuestión y tampoco son precursores o activadores; esto ocurre a través de disminuir la actividad de la vía que le da origen.

iv) Inhibe la formación de precursores del antibiótico, ya sean metabolitos primarios o secundarios.

v) inhibe o reprime las fosfatasas necesarias para la biosíntesis del antibiótico, sobre todo en las vías

biosintéticas en las cuales se encuentran involucrados pasos de fosforilación y desfosforilación e independientemente de que el producto final presente o no grupos fosfatos en su molécula (estreptomina).

vi) Por privación de las células de los metales esenciales, porque el fosfato inorgánico forma precipitados con calcio, magnesio, hierro y otros metales.

En cuanto al efector de estos mecanismos, la mayor parte de evidencias sugieren que pudiera tratarse de adenosin trifosfato (o carga energética adenilada). Sin embargo, otras moléculas no pueden ser excluidas, entre las que pudieran estar los nucleótidos cíclicos como el AMPc, los polifosfatos, los nucleótidos altamente fosforilados, e incluso ATP y la carga energética adenila.

Es muy probable que fosfatos "per se" o tal vez algún otro ortofosfato, actúen por diferentes mecanismos en la supresión de la síntesis de los diversos antibióticos y que estos mecanismos sean mediados por un efector común (adenosin trifosfato, carga energética adenilada, etc..) capaz de controlar la expresión de los genes involucrados en la producción del antibiótico. Asimismo, es posible que el efecto regulatorio se lleve a cabo en dos niveles, inhibiendo rápidamente la actividad de las sintetetas y al mismo tiempo reprimiendo la formación "de novo".

Algunos de estos mecanismos y sus posibles efectores se han

observado en la síntesis de antibióticos peptídicos, aminoglucósidos y macrólidos poliénicos (20, 54).

En cuanto a la síntesis de gentamicina sólo existe un reporte en el cual se utilizó *Micromonospora echinospora echinospora* para determinar el efecto de fosfato sobre la producción del antibiótico en presencia de agentes "atrapadores" (tierra de Kanuma) los cuales regulan la concentración de este en el medio de fermentación. Se mostró que el fosfato afectaba la síntesis, ya que en presencia de estos agentes la concentración de antibiótico alcanzada es 6 veces mayor que en el control (aumenta de 3 a 18 µg/ml) (61). Estudios preliminares en este laboratorio han mostrado la existencia de dicho efecto en la biosíntesis de gentamicina utilizando *M. purpurea*.

Regulación Catabólica por Fuente de Nitrógeno

La producción de muchos metabolitos de interés industrial también es afectada por la presencia y concentración de las fuentes de nitrógeno en los medios de fermentación. Este fenómeno, denominado regulación catabólica por fuente de nitrógeno, es el mecanismo por el cual se regula la utilización de este tipo de nutrientes y generalmente es provocada por sustratos fácilmente metabolizables, como las sales de amonio y algunos aminoácidos (53). Este tipo de regulación no sólo está limitado a la familia de los antibióticos que contienen nitrógeno en su estructura, o que lo involucran durante sus reacciones

TABLA 4. REGULACION CATABOLICA POR NITROGENO EN LA BIOSINTESIS DE LOS ANTIBIOTICOS.

ANTIBIOTICO	MICROORGANISMO PRODUCTOR	SITIO DE ACCION
Cefamicina	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Ciclase Expandasa
Cefalosporina	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Ciclase Expandasa
Tilosina	<i>Streptomyces fradiae</i>	Valina dehidrogenasa
Leucomicina	<i>Streptoverticillium kitasatoensis</i>	Valina dehidrogenasa
Patulina	<i>Penicillium urticae</i>	m-Hidroxibencil alcohol-dehidrogenasa
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Glutamino-sintetasa
Actinomicina	<i>Streptomyces parvulus</i>	Kinurenina-formamidasa II

Adaptada de Demain 1982 (20).

biosintéticas (como las transaminaciones) sino que también se presenta en varios grupos que no lo involucran directamente (Tabla 4) (61).

Se cree que es posible que el efecto que ejercen el amonio y algunos de sus productos sobre la síntesis de los antibióticos se lleve a cabo por los mismos mecanismos involucrados en el control del metabolismo nitrogenado general. Se ha reportado que en algunas vías metabólicas: las del catabolismo de purinas, histidina, transporte de urea, arginina y síntesis de nitrato reductasa, entre otros (30), la enzima glutamino sintetasa juega el papel principal en el mecanismo de control y la glutamina es el efector de dicho fenómeno, la cual indirectamente puede afectar la formación de las enzimas que son reguladas de esta manera, a nivel de transcripción, para lo que se han propuesto varios mecanismos (55).

La evidencia no es concluyente, así se ha mostrado que cepas mutantes de *S. clavuligerus* carentes de glutamino sintetasa permanecen susceptibles al efecto del amonio durante la producción del antibiótico cefamicina, mientras que se observó que se presentó un cambio muy marcado en cuanto a la regulación nitrogenada de la síntesis de la ureasa ocurrida durante el metabolismo primario. También han demostrado que los productos inmediatos de la asimilación de nitrógeno, como son glutamina y alanina, así como las enzimas que median esta asimilación, no se

encuentran involucradas en la regulación y que ésta está regulada por una vía diferente a la descrita para enterobacterias y hongos (21). En estudios realizados sobre el efecto de fuentes nitrogenadas sobre la biosíntesis de eritromicina en *S. erythraeus* tampoco se ha encontrado una relación entre glutamino sintetasa/glutamina y la síntesis del antibiótico; aparentemente, esta regulación es ejercida por otra vía. Por otro lado, en la biosíntesis de penicilina por *P. chrysogenum*, existe una correlación en cuanto al efecto del amonio sobre la actividad de glutamino sintetasa y la producción del antibiótico (76). Se ha observado que estos efectos pueden suprimir o estimular la síntesis de los antibióticos (30).

En cuanto a los efectos negativos, estos pueden ser provocados por un sólo aminoácido e incidir sobre la producción del antibiótico, como los casos de lisina, triptofano y valina en la síntesis de penicilina (54) candicidina (54) y tilosina (61) respectivamente. En otros casos el efecto se lleva a cabo sobre la síntesis de sus intermediarios (α -aminoadípico, para-amino-benzoico y α -cetoácidos). También pueden afectar el transporte de precursores como el caso de la síntesis de cefalosporina por *Cephalosporium acremonium*, donde cisteína inhibe la entrada de metionina, pero estimula la formación del antibiótico (57). Además pueden ocurrir efectos mediados por los mecanismos de la regulación nitrogenada general (3), en los que altas concentraciones de amonio suprimen la síntesis del metabolito si

están presentes al inicio de la fermentación, por ejemplo en la síntesis de la cefalosporina por *S. clavuligerus*. Esto no ocurre si la adición se lleva a cabo una vez iniciada la síntesis del metabolito, aparentemente porque el ión reprime la formación de las sintetetasas (expansas) que se derreprime al bajar los niveles del mismo (54).

Aunque la mayor parte de la información se refiere a efectos negativos ejercidos por amonio, existen algunos reportes donde se muestra que este ión en altas concentraciones también es capaz de afectar positivamente la síntesis de estos metabolitos (30, 33, 81); sin embargo, se desconocen las bases de esta estimulación.

Se ha observado que en la síntesis de gentamicina cuando están presentes en los medios de fermentación las sales inorgánicas de amonio (hasta 150 mM), los nitratos y algunos aminoácidos son capaces de estimular la producción específica del antibiótico. Se cree que los efectores de dicha estimulación son los aminoácidos glutámico y glutamina, ya que ambos estimulan la síntesis 2 y 6 veces, respectivamente, en relación al efecto que se observa con amonio. Evidencias obtenidas posteriormente han sugerido que pudiera tratarse de una activación más que de cualquier otro fenómeno (inducción), ya que estos aminoácidos son los principales donadores de los grupos amino durante la formación de glucosamina y de 2-deoxiestreptamina, intermediarios de la biosíntesis de gentamicina (80). Sin embargo, se desconoce

aún si existe alguna relación entre las enzimas involucradas en la asimilación de amonio y el efecto estimulador de amonio, glutámico y glutamina.

Regulación Catabólica por Fuente de Carbono

Otro de los mecanismos que gobiernan el metabolismo secundario en los microorganismos, es la regulación catabólica por fuente de carbono. Desde el punto de vista industrial juega un papel muy importante ya que la producción de muchos de estos metabolitos está sujeta a este tipo de control. Las fuentes de carbono utilizadas en las fermentaciones, ejercen gran influencia durante la misma, ya que éstas son capaces hasta de suprimir totalmente la síntesis de estos compuestos (17, 19, 32, 53).

Este mecanismo también está involucrado en la biosíntesis de un gran número de antibióticos; está bien establecido que la biosíntesis de estos productos es inhibida o reprimida por fuentes de carbono fácilmente metabolizables, como la glucosa, citratos, glicerol y otros (17, 20, 32, 46, 53).

La regulación catabólica por fuente de carbono es un mecanismo en el cual la síntesis o la actividad de algunas enzimas catabólicas es reprimida o inhibida por el producto del catabolismo de fuentes de carbono que son rápidamente utilizables o bien por la molécula "per se" (6, 45).

Los compuestos que ejercen represión generalmente son mejores fuentes de carbono que las que no la ejercen. Sin embargo, la represión catabólica ocurre cuando un compuesto se metaboliza tan rápido que el nivel de catabolitos es mayor que el necesario para la síntesis; en estas condiciones las células utilizan la fuente de carbono más para crecer que para producir el metabolito. Esto se observa en medios que contienen glucosa además de otra fuente de carbono, donde la glucosa es utilizada primero sin producción del metabolito; una vez agotada ésta, la fuente no represiva es utilizada para la síntesis del metabolito secundario (19, 45, 52).

La glucosa es usualmente una excelente fuente de carbono para el crecimiento de los microorganismos productores de antibióticos, pero su uso puede no ser recomendable porque interfiere con la biosíntesis del mismo. Esta interferencia con la producción del antibiótico fue inicialmente observada durante la fermentación de penicilina en 1947 y fue originalmente denominada como "efecto glucosa". Sin embargo, posteriormente se observó que éste es un fenómeno común en la producción de muchos metabolitos secundarios y se le nombró regulación catabólica, dada su similitud a los fenómenos que se presentan durante el metabolismo primario (17, 19).

Más adelante se encontró que este efecto también es ejercido por otros carbohidratos que son metabolizados rápidamente, los cuales son capaces, al igual que glucosa, de suprimir la

síntesis, mientras que las fuentes que son lentamente utilizadas incrementan los rendimientos específicos (19, 32).

De la misma forma, se ha encontrado que existe una relación inversamente proporcional entre la concentración de la fuente de carbono supresiva y la síntesis del antibiótico; un ejemplo de ello es la síntesis de cefalosporina por *S. clavuligerus* (el cual no es capaz de crecer en glucosa); este microorganismo utiliza glicerol y/o maltosa para crecer y producir el antibiótico, sin embargo, a medida que se incrementa su concentración en el medio de fermentación, se suprime la síntesis específica del metabolito (2).

Aunque han sido muy amplios los estudios realizados para clarificar los mecanismos moleculares de la regulación catabólica, en su mayoría estos efectos supresivos aún no han sido bien caracterizados. Los resultados tan solo han mostrado que tanto la represión como la inhibición catabólica están involucrados en la regulación del metabolismo secundario y en algunos casos sólo se ha logrado determinar el sitio de acción y el mecanismo regulatorio que ejerce la fuente de carbono sobre la síntesis de algún producto en particular (Tabla 5).

A pesar de que el mecanismo molecular que gobierna la utilización de azúcares y la producción de antibióticos se desconoce, se piensa que este fenómeno pudiera ser similar al descrito por Magasanik durante la utilización secuencial de dos

TABLA 5. METABOLITOS SECUNDARIOS CUYA PRODUCCION ES SUPRIMIDA POR GLUCOSA.

METABOLITO SECUNDARIO	MICROORGANISMO PRODUCTOR
Acido giberelico	<i>Eusarium moniliforme</i>
Aurantina*	<i>Bacillus aurantinus</i>
Bacitracina	<i>Bacillus licheniformis</i>
Benzodiazepina (alcaloides)	<i>Penicillium cyclopium</i>
Butirosina	<i>Bacillus circulans</i>
Candidina	<i>Streptomyces viridoflavus</i>
Candihexina	<i>Streptomyces viridoflavus</i>
Cefamicina*	<i>Streptomyces lactamdurans</i>
Cefem	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Cloranfenicol	<i>Streptomyces</i> sp.
Equinomicina	<i>Streptomyces echiniatus</i>
Enniatina	<i>Eusarium sambucinum</i>
Ergot (alcaloide)	<i>Cleviceps purpurea</i>
Eritromicina	<i>Streptomyces erythreus</i>
Estreptotricinas	<i>Streptomyces lavendulae</i>
	<i>Streptomyces albidoflavus</i>
Fortimicina	<i>Micromonospora</i> sp.
Indolmicina	<i>Streptomyces griseus</i>
Istamicina	<i>Streptomyces tenuimariensis</i>
Kasugamicina	<i>Streptomyces kasugaensis</i>
Mitomicina	<i>Streptomyces verticillatus</i>
Neoviridogriseina	<i>Streptomyces griseoviridus</i>
Novobiocina**	<i>Streptomyces niveus</i>
Prodigiosina	<i>Serratia marcescens</i>
Racemomicinas	<i>Streptomyces racemochromogenus</i>
Siomicina	<i>Streptomyces sioyaensis</i>
Tetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Tilosina	<i>Streptomyces fradiae</i>
Violaceina	<i>Chromobacterium violaceum</i>

* Es suprimido por glicerol.

** Es suprimido por citratos.

Adaptada de Martin 1980 (53).

diferentes fuentes de carbono por enterobacterias, las cuales resultan en un patrón de crecimiento diauxico (32, 64).

Magasanik (44) ha estudiado los efectos que ejerce la glucosa en el metabolismo de la lactosa en cepas inducibles de *Escherichia coli* y ha encontrado que ésta provoca tres tipos de efectos principalmente:

- a) Exclusión del Inductor: la glucosa "per se" interfiere con la entrada del inductor a las células donde el nivel de permeasa es bajo; este efecto es reversible y se logra aumentando el nivel de la permeasa mediante una preinducción, o bien incrementando la concentración del inductor.
- b) Represión Transitoria: La glucosa reprime transitoria pero fuertemente a la β -galactosidasa cuando se adiciona a las células crecidas en otra fuente de carbono, donde, la magnitud y duración del efecto es independiente de la concentración. Este tipo de fenómeno puede ser ejercido por otros compuestos además de glucosa y es provocado por la molécula "per se", por lo cual se advierte que sus efectores son diferentes a otros tipos de represión. Se desconoce la causa de la liberación de las células a la represión transitoria; sin embargo, se efectúa al mismo tiempo en todas ellas y aún pueden ser sensibles al efecto mediante otros compuestos.
- c) Represión Catabólica: La glucosa reprime débil pero permanentemente la formación de la β -galactosidasa durante el

crecimiento balanceado del microorganismo. Este efecto de glucosa no refleja interferencia con el inductor y en mutantes constitutivas la síntesis de la enzima es también reprimida por el carbohidrato. El mismo efecto represivo también se puede observar en presencia de ácido glucónico y glucosa-6-fosfato. Las enzimas que catabolizan dichos compuestos son reprimidas por algún producto del catabolismo de estos o bien por un compuesto cuya concentración depende de estos productos; lo cual puede ser debido a que las vías catabólicas originan el mismo tipo de compuestos, por lo cual el metabolismo de un compuesto con carbono puede causar represión en enzimas degradativas de otros compuestos. Se desconoce cual es el efector de la represión catabólica y si existe un efector específico para la represión del sistema lactosa.

El mecanismo por el cual los azúcares ejercen un efecto inhibitorio sobre la actividad de las sintetetasas de estos metabolitos permanece aún desconocido; sin embargo, en los estudios realizados por Demain y Cols. (18a) en sistemas de células en reposo, para la síntesis de antibióticos β -lactámicos utilizando *C. acremonium*, se ha mostrado que este efecto está directamente relacionado con las enzimas preexistentes y que no se requiere de la síntesis de proteínas "de novo". Lo mismo se ha observado en la síntesis de neomicina y sisomicina, aunque en estos casos aún no se ha podido determinar si pudiera tratarse de represión, ya que los experimentos fueron largos y no se utilizaron inhibidores

TABLA 6. REGULACION CATABOLICA POR CARBONO EN LA BIOSINTESIS DE ANTIBIOTICOS

Antibiotico	Microorganismo Productor	Fuente de Carbono Represiva	Mecanismo de accion	Sitio de Accion
Actinomicina	<i>S. Antibioticus</i>	Glucosa	Represion	Fenoxazinona sintetasa
		Glucosa, glicerol	Represion	Hidroxikinure-ninasa
		Glucosa, glicerol	Represion	Kinurenina formamidasa II
Neomicina	<i>S. fradiae</i>	Glucosa	Represion	Fosfatasa
Puromicina	<i>S. alboniger</i>	Glucosa	Represion	O-demetil-puromicina-metil-transferasa
Kanamicina	<i>S. kanamyceticus</i>	Glucosa, Manosa, Fructosa, Maltosa, Lactosa	Represion	N-acilkana-micina-amido-hidrolasa
Estreptomina	<i>S. griseus</i>	Glucosa, Galactosa, Dextrinas, Manosa	Represion	Mannosido-estreptomina-cinasa
Cefalosporina	<i>C. acremonium</i>	Glucosa, Maltosa, Sacarosa	Represion	Cefalosporina C-acetil-hidrolasa
Cefalosporina C.	<i>A. chrysogenum</i>	Glucosa, Maltosa, Glicerol	Represion	Expandasa
Cefamicina	<i>S. lactamdurans</i>	Glucosa, Glicerol	Represion	α -aminoadipil-cisteinil-valina sintetasa (ACV)
		Glucosa, Glicerol	Represion	Expandasa
Penicilina	<i>P. chrysogenum</i>	Glucosa, Sacarosa, Fructosa, Galactosa	Represion	α -aminodipil-cisteinil-valina-sintetasa (ACV)
		Glucosa, Sacarosa, Fructosa, Galactosa	Represion	Isopenicilina N-sintetasa

Adaptada de Demain 1982 (20)

de síntesis de proteínas (32).

Por otro lado, también se ha demostrado la existencia de represión de las sintetetas del metabolismo secundario (Tabla 6). Ejemplos de ello se muestran para la síntesis de la enzima α -D-manosidasa, que convierte el compuesto manosido-estreptomicina en estreptomicina en *S. griseus*; es reprimida por glucosa (18); o bien la cefalosporina-C-acetilhidrolasa de *C. acremonium*, involucrada en la conversión de cefalosporina C a diacetilcefalosporina C durante la síntesis de cefalosporina, la cual es reprimida por maltosa y sacarosa además de glucosa (3). El mismo efecto ha sido encontrado para la fermentación de puromicina, en la cual la O-demetil-puromicina metil-transferasa, enzima final en la biosíntesis de puromicina, es reprimida por glucosa en *S. albioniger* (67). En *S. antibioticus*, la síntesis de actinomicina también es suprimida por este metabolito al reprimir la formación de la fenoxasinona-sintetasa (23).

Los nucleótidos cíclicos juegan un papel importante como reguladores en diferentes procesos metabólicos, tales como la regulación de la síntesis de enzimas catabólicas inducibles por AMPc (adenosina 3'-5'-monofosfato cíclica). Cuando el microorganismo es depletado de glucosa se ha observado que se presenta un incremento de estos nucleótidos; esto fue descrito por vez primera en *Brevibacterium liquifaciens* y en *Escherichia coli* y ha sido establecido para bacterias gram-negativas (62). Se encontró que este fenómeno involucra la formación de un complejo

entre AMPc y una proteína receptora del mismo (CRP o CAP), el cual se une al sitio promotor de un operón; esta unión estimula la iniciación de la transcripción por una RNA polimerasa. Cuando la glucosa está presente inhibe la adenilato-ciclase, enzima que convierte ATP a AMPc, esto disminuye la concentración de AMPc e inhibe la transcripción por RNA polimerasa de operones sujetos a este control (28, 32, 62).

Estos nucleótidos y CRP han sido reportados en levaduras y en el hongo *Monascus purpureus*; en el género *Bacillus* el fenómeno parece ser independiente de AMPc (19). Estos compuestos no han sido descritos tampoco como reguladores en los procesos metabólicos de microorganismos gram-positivos como los Actinomicetos (19, 32). Se piensa que pudieran ser otro tipo de compuestos fosforilados los efectores en este tipo de microorganismos; sin embargo, existe un reporte en el que se ha mostrado la presencia de AMPc en *Streptomyces*, es en el caso del productor de turimicina, un antibiótico macrólido producido por cepas de *Streptomyces higroscopicus* (24, 25, 26, 27, 28). Gersh y cols. (24) han demostrado que los nucleótidos cíclicos, especialmente AMPc y GMPc están involucrados en la regulación del metabolismo (primario y secundario) y el desarrollo del microorganismo; estos inhiben la germinación pero estimulan el crecimiento, etapa en la cual se encuentran en altas concentraciones. Previamente a la síntesis del antibiótico se presenta un rápido descenso del nucleótido, lo cual pudiera

representar una señal para el cambio metabólico, esta delimita el metabolismo primario del secundario. La producción de este metabolito está sujeta a inhibición por fosfatos, efecto que puede ser revertido por la adición de AMPc y fluoruro de sodio (efector de la adenilil-ciclase) (27). El metabolismo primario y secundario pudieran ser controlados por algún tipo de regulación en el cual el AMPc juega un papel importante (28).

La biosíntesis de prodigiosina, pigmento con características antibióticas producido por *Serratia marcescens*, es reprimido por glucosa. Se ha encontrado que este efecto es revertido por medio de la adición de un inhibidor de la AMPc-fosfodiesterasa (teofilina) y que el posterior incremento en la síntesis del metabolito es debido a un aumento de la concentración celular de AMPc (11); se trata de un metabolito secundario donde el efecto represivo es revertido por un inhibidor implicado en la presencia de este nucleótido, hecho que es relevante para este tipo de metabolitos.

La formación de la N-acil-kanamicina-amidohidrolasa, última enzima involucrada en la biosíntesis de kanamicina en *S. kanamiceticus*, además de ser reprimidas por glucosa lo es por otros carbohidratos como fructosa, lactosa, manosa y maltosa que ejercen el mismo efecto. También se ha encontrado que la represión ejercida por estos carbohidratos sobre esta enzima es revertida mediante la adición de AMPc (79).

Sin embargo, esto no resulta cierto para estudios realizados sobre la producción de nucleótidos cíclicos en relación a otros metabolitos como candidicina (49, 50) y estreptomycinina (72) en *S. griseus* y cefamicina (54) en *S. lactamdurans*, por lo que los mecanismos moleculares que regulan la formación de los antibióticos en estas especies debe ser diferente al que se presenta en las enzimas catabólicas de las enterobacterias, aunque esta posibilidad no puede ser excluida totalmente. En los hongos *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum* productores de penicilina y cefalosporina C respectivamente, tampoco se ha demostrado que el AMPc esté involucrado en su regulación catabólica (53, 54). Por otro lado, Ochi (58) en sus estudios sobre determinación morfológica y fisiológica en *Streptomyces* sp, productor de formicina encontró que este proceso cuando se lleva a cabo, va acompañado principalmente de un incremento de guanosina tetrafosfato (además de otros eventos); este nucleótido, junto con otros factores, es requerido para que se lleve a cabo la diferenciación, además del inicio de la síntesis del antibiótico. Mutantes que no sintetizan este compuesto son incapaces de diferenciarse, pero tampoco producen la formicina. Los resultados tampoco son concluyentes en cuanto a que este metabolito sea el efector molecular de los eventos involucrados en la regulación del metabolismo secundario.

O B J E T I V O

"Determinar el efecto que tiene la fuente de carbono sobre la biosíntesis del antibiótico Gentamicina en la cepa de tipo silvestre *Micromonospora purpurea* NRRL-2953"

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos:

El modelo biológico utilizado para el presente estudio fue el actinomiceto *Micromonospora purpurea* NRRL-2958, cepa de tipo silvestre productora del antibiótico gentamicina (50-60 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Fue proporcionada por el Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Ill, 61604 U.S.A.

La cepa sensible a gentamicina utilizada para las determinaciones de dicho antibiótico fue *Bacillus subtilis* ATCC-6633, proporcionada por la American Type Culture Collection en Rockville, Md, 20852, U.S.A.

Preservación de las cepas

Micromonospora purpurea NRRL-2953 y *Bacillus subtilis* ATCC-6633 fueron conservadas en una solución de glicerol al 80% a -20°C , en viales con capacidad de 1.5 ml, conteniendo 1 ml de suspensión de cada microorganismo.

Medio de esporulación

Para la esporulación de *Micromonospora purpurea* NRRL-2953 se utilizaron placas de medio sólido (69) conteniendo:

Glucosa	1.0 %
Almidón	2.0 %
Extracto de levadura	0.5 %
N-Z-Amina	0.5 %
CaCO ₃	0.1 %
Bacto Agar	1.5 %

Las placas fueron inoculadas por estria y se incubaron a 29 °C por 7 días, al término de los cuales se observa al microorganismo perfectamente esporulado.

Medio de crecimiento del Preinóculo (I):

Este medio está basado en el descrito para este género por Weinstein y cols. (69), el cual consiste de:

Extracto de carne	0.3 %
Triptona	0.5 %
Glucosa	0.1 %
Almidón	2.4 %
Extracto de levadura	0.5 %
CaCO ₃	0.4 %
pH (CaCO ₃)	7.6

Medios de crecimiento y producción de gentamicina (II, III):

El medio de crecimiento y producción de gentamicina utilizado, está basado en el medio descrito por Carbajal

(84), se trata de un medio químicamente definido, específico para la producción de antibióticos aminoglucósidos, el cual fue modificado en el laboratorio (II) y cuya formulación es la siguiente:

	g/lit
Glucosa*	10.00
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10.00
NaNO_3	2.00
K_2HPO_4	1.00
NaCl	3.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.001
CaCO_3	10.00
pH (CaCO_3)	7.6

*Puede ser substituida por otra fuente de carbono.

Este medio se mantuvo a lo largo de todos los experimentos sin modificaciones, como control; sólo se substituyó la fuente de carbono de acuerdo a los requerimientos para cada situación experimental.

También se utilizó para el crecimiento y la producción de gentamicina el medio descrito por Weinstein (69), modificado en el Laboratorio (III):

Extracto de levadura	0.5 %
N-Z-Amina	0.5 %
CaCO ₃	0.4 %
pH (CaCO ₃)	7.6

En este medio se puede variar la fuente de carbono, pero sólo fue utilizado para determinar el efecto de una sustancia, se indicará el caso.

Condiciones de crecimiento.

Preinóculo:

Se preparó una suspensión de esporas de *M. purpurea* en 50 ml de medio de cultivo I, contenido en matraces Erlenmeyer de 250 ml, la cual fue incubada a 29°C con agitación rotatoria a 160 rpm, durante 60 horas.

Inóculo:

Matraces Erlenmeyer, con capacidad de 250 ml conteniendo 50 ml de medio de cultivo II (y/o III) fueron inoculados con 1.5 ml del preinóculo (3%, aproximadamente 0.005 mg ml⁻¹ de proteína a tiempo cero) e incubados a 29°C con agitación rotatoria a 160 rpm durante 192 horas.

Las condiciones de crecimiento se mantuvieron constantes en todas las situaciones experimentales. Cada experimento se realizó por triplicado y fue repetido por lo menos 2 veces.

En cada experimento se tomaron muestras cada 12 y/o 24 horas durante el proceso fermentativo; se les determinó: la variación de pH, contenido de proteína como medida de crecimiento del microorganismo, la producción de gentamicina y el consumo de la fuente de carbono; esto de acuerdo al objetivo de cada experimento.

Estas determinaciones se efectuaron de la siguiente manera.

Determinación de pH

La variación de pH durante cada fermentación efectuada, fue medida utilizando un potenciómetro digital Beckman Modelo 3500, esto en cada muestra obtenida.

Determinación del crecimiento

Para medir el crecimiento del microorganismo durante la fermentación se cuantificó la proteína del pseudomicelio de cada muestra de la siguiente manera:

Las muestras fueron centrifugadas a 8,000 rpm, durante 10 min; se separaron el sobrenadante del paquete micelial, este último fue resuspendido en 1 ml de una solución de ácido tricloroacético 0.6M y congelado durante 12 horas. Posteriormente fueron nuevamente centrifugados a 8,000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en una solución de NaOH 0.4N, en un volumen proporcional a la cantidad de precipitado obtenido. De la suspensión resultante se tomaron alícuotas para determinar el

contenido de proteína. Para ello se utilizó el método descrito por Lowry y cols. (42).

Este método tiene como base la formación de un complejo colorido entre el grupo fenólico de la tirosina de las proteínas (o el grupo aromático en el caso de triptofano, fenilalanina e histidina) y el ácido fosfo-wolfano-molibdico (color oro) que oxida al grupo hidroxilo de la tirosina en condiciones alcalinas. Esto resulta en la formación de un color azul intenso que se puede medir a 595 nm de absorbancia. La concentración de proteína se determina por comparación de una curva estándar de albúmina sérica bovina; se realiza el siguiente cálculo:

$$\text{Proteína } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Estándar } \mu\text{g} \cdot \text{D.O.}_{595} \text{ problema}}{\text{D.O.}_{595} \text{ Estándar}}$$

Las soluciones utilizadas son:

Solución A:

Solución de proteínas	Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 N
Solución de tartrato de sodio y potasio	1 % en agua destilada
Solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.5% en agua destilada

en una proporción de 10:0.1:0.1 (en el orden presentado)

Solución B:

Reactivo de Folin-Cicalteau diluido en agua 1:3 (fenol:agua).

Las alícuotas de las muestras y del estándar son llevadas a un volumen final de 1 ml con agua destilada. Se les adicionan 5 ml de la solución A agitando rápidamente; se dejan reposar durante 10 min y se agregan 5 ml de la solución B, se agita rápidamente y después de dejar reaccionar la mezcla durante 30 min se leen las muestras en un espectrofotómetro a una D.O. de 595 nm; contra un blanco que ha llevado el mismo tratamiento que las muestras.

Determinación de Gentamicina

La gentamicina fue cuantificada por medio de un método biológico utilizando la técnica de difusión en agar, con Bacillus subtilis ATCC 6633 como microorganismo de prueba (91).

La técnica de Difusión de Agar se basa en la medición relativa de la respuesta del microorganismo al antibiótico, comparada a la que presenta ante un estándar, observada como una zona clara de no crecimiento, en el cual el diámetro de la zona de inhibición es proporcional al logaritmo de la concentración del antibiótico (37).

Preparación del microorganismo de prueba

Bacillus subtilis ATCC-6633 fue activado en un medio de cultivo sólido el cual contiene:

Extracto de levadura	1%
Peptona	2%
Glucosa	1%
Bacto Agar	1.5 %

durante un lapso de 24 hs a 37°C, cada vez que se requería para efectuar las determinaciones del antibiótico.

Una vez activados los microorganismos, fueron inoculados en matraces que contenían el mismo medio de cultivo, pero líquido e incubados por un lapso de 6 horas a 37°C con agitación rotatoria de 170 rpm, tiempo en el cual alcanzan una DO_{540} de 2.

Para efectuar el bioensayo se preparó medio luria modificado (8):

Extracto de levadura	0.5 %
Bacto triptona	1.0 %
Cloruro de sodio	0.5 %
Bacto Agar	1.0 %

el cual una vez esterilizado se deja enfriar hasta que alcanza una temperatura de aprox. 40°C; momento en el cual se adiciona el microorganismo de prueba en una proporción de 1:100 (v/v), se homogeniza perfectamente y posteriormente se vierten 10 ml de esta suspensión en cada caja de Petri. Ya solidificado se colocan discos de papel Whatman tipo AA de 6 mm, impregnados con 50 μ l

del sobrenadante de las muestras obtenidas. Se dejan difundir durante 1 hr a 4°C. Las placas se incuban por 36 hs a 29°C, tras lo que se miden las zonas de inhibición del crecimiento. Al mismo tiempo se corre una curva estándar utilizando para ello una solución de sulfato de gentamicina (Sigma) con las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 µg ml

La concentración se calcula con la ecuación:

$$\text{Loge} = m h + \text{Loge}_0$$

donde e corresponde a la concentración de eritromicina, h al diametro del halo de inhibición observado, m al valor de la pendiente de la recta y e₀ al valor de la ordenada al origen; el coeficiente de correlación obtenido es de 0.998.

Se cuantificó la producción volumétrica de gentamicina en el medio de cultivo para cada situación experimental y también se determinaron las producciones específicas del mismo, de la siguiente forma:

$$\text{Producción específica: } \frac{\mu\text{g de antibiótico ml}^{-1}}{\text{mg de proteína ml}^{-1}}$$

$$Pe = \mu\text{g antibiótico (mg proteína)}^{-1}$$

Fuentes de carbono utilizadas:

Las fuentes de carbono utilizadas fueron las siguientes: almidón, ácido succínico, D(+) fructosa, D(+) galactosa, glicerol, D(+) glucosa, D(+) Lactosa, D(+) maltosa, manitol, D(+) manosa, sacarosa y D(+) Xilosa; y un análogo de glucosa: 2-deoxi-D-glucosa.

En cada caso estas fueron disueltas en agua, en el mínimo volumen posible y se rectificó que el valor de pH permaneciera constante con el fin de evitar variaciones en el medio de cultivo; donde la hubo, éste se ajustó a 7.5-7.6 con hidróxido de sodio 1N. Se esterilizaron por separado y fueron adicionadas posteriormente al medio de cultivo, de la forma que se mencionará para cada condición experimental. A los controles se les adicionó agua en la misma proporción, cuidando de no variar la concentración de los demás nutrientes del medio de cultivo.

Determinación de la concentración de las fuentes de carbono.

Para determinar la concentración de las fuentes de carbono, esta se midió enzimáticamente con el reactivo de glucosa oxidasa GOD-Perid (Lakeside), esta técnica se basa en el método descrito por Salomon y col. (75).

Este equipo consta de dos reactivos, una solución estándar de glucosa (9.1 mg/ml) y un amortiguador de fosfatos (100 mmol/l,

pH 7) en el cual se incluyen dos enzimas: la peroxidasa (POD, 0.8 U/ml) y la glucosa oxidasa (GOD, 10 U/ml), además de un cromógeno (ABTS=2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina-ácido sulfónico-(6))-sal diamónica). La enzima glucosa oxidasa reacciona con la molécula de glucosa, oxígeno y agua formando ácido glucónico y peróxido; este último reacciona con el cromógeno, por acción de la enzima peroxidasa dando lugar a la formación del colorante más agua; el producto de esta reacción es colorido (verde) y en función de la intensidad de este se puede determinar la concentración de glucosa. Esto puede cuantificarse finalmente en un espectrofotómetro a una D.O. de 595 nm.

Sólo se determinó la concentración de: almidón, glucosa, manosa, maltosa y sacarosa en algunas situaciones experimentales y esto se llevó a cabo de la siguiente forma: se tomaron alícuotas no mayores de 100 μ l de cada una de las muestras, se les adicionó 2.5 ml del reactivo de glucosa oxidasa y después de agitar se dejaron reaccionar durante 30 min, a temperatura ambiente; posteriormente fueron leídas. Al mismo tiempo, se corren un blanco cuyo contenido es agua más el reactivo y las curvas estándar correspondientes a cada carbohidrato utilizado con concentraciones crecientes de 1 a 100 μ g/ml. En el caso de glucosa y manosa estas se determinaron directamente, pero maltosa, sacarosa y almidón fueron hidrolizadas previamente; para ello se les adicionó 10 μ l de HCl concentrado para obtener un pH de 1.5, posteriormente fueron hervidos durante 15 min en baño

maria, se les ajustó nuevamente el pH a 7 y de ahí se tomaron las alícuotas respectivas. Lo mismo se hizo para preparar las soluciones estándar de cada uno de estos carbohidratos. También se efectuaron diluciones cuando era pertinente.

Para calcular las concentraciones de estos carbohidratos se ajustaron las curvas por mínimos cuadrados (con un coeficiente de correlación de 0.999 y una ordenada al origen menor de 0.001), utilizando la ecuación de la recta $y = m x + b$, para encontrar el valor de "x" ($x = \frac{y-b}{m}$), mediante el cual se obtiene la concentración del problema; donde x corresponde a la concentración del carbohidrato, y al valor obtenido en DO₅₉₅ del mismo, m al valor de la pendiente de la recta y, b al valor de la ordenada al origen.

1. Efecto de diferentes fuentes de carbono en la formación de gentamicina.

(Selección de la fuente de carbono)

El microorganismo fue crecido en presencia de las fuentes de carbono antes mencionadas utilizando para ello el medio de cultivo II, como previamente fue descrito; cada una de éstas fue adicionada al tiempo cero de crecimiento en las siguientes concentraciones: 0.5, 1, 2 y 4%. Se utilizó como control al microorganismo crecido en ausencia de fuente de carbono.

Se tomaron muestras cada 24 horas hasta las 192 horas y se

les determinó: variación de pH, crecimiento del microorganismo, consumo de la fuente de carbono y producción del antibiótico, de la forma que previamente se ha señalado.

2. Efecto de la glucosa en la producción específica de gentamicina.

Se creció al microorganismo como se describió anteriormente, en el medio de cultivo II suplementado con diferentes concentraciones de glucosa, estas fueron: 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 5%.

La adición del carbohidrato se llevó a cabo al inicio de la fermentación cuidando no alterar los volúmenes del medio de cultivo, los controles se mantuvieron constantes. Se tomaron muestras cada 24 horas hasta las 192 horas y a éstas se les determinó la variación de pH, el crecimiento del microorganismo y la producción de antibiótico.

3. Caracterización del efecto de glucosa en la producción de gentamicina

El análogo de glucosa 2-deoxi-D-glucosa y glucosa en concentraciones de 0.5, 1 y 2%, fueron adicionadas al medio de cultivo II, al inicio de la fermentación; el experimento se realizó de la forma previamente descrita utilizando como control al cultivo sin carbohidrato; de la misma manera, se tomaron

muestras para determinar pH, crecimiento del microorganismo y producción de gentamicina.

Por otro lado, tanto el análogo de glucosa 2-deoxi-D-glucosa como glucosa en concentraciones de 0, 0.5, 1 y 2%, fueron adicionados posteriormente al medio de cultivo III, de la manera descrita en el inciso anterior; llevándose a cabo el mismo experimento y determinando los mismos parámetros.

4. Caracterización del fenómeno

a) Efecto de la glucosa adicionada a diferentes tiempos del crecimiento de *Micromonospora purpurea* en la producción de gentamicina.

Glucosa en una concentración de 4% fue adicionada a cultivos del microorganismo a diferentes tiempos de crecimiento. Las adiciones se efectuaron a las 0, 24, 48 y 60 horas; se utilizó como control al microorganismo crecido en el medio de cultivo II, suplementado con una baja concentración del carbohidrato (1%); de la misma manera, los cultivos a los que se les hizo la adición contenían en un principio la misma concentración de glucosa que el control, esto con el objeto de permitir el crecimiento.

Al efectuar las adiciones se procuró no alterar los volúmenes del medio de fermentación, además de cuidar que la concentración final del carbohidrato correspondiera al 5%

(cuantificando el consumo de glucosa por el microorganismo a los diferentes tiempos del crecimiento).

Se tomaron muestras cada 12 horas, salvo después de la adición del carbohidrato, donde se efectuó cada 6 horas. Se determinó tanto la producción de gentamicina como los cambios de pH y el crecimiento del microorganismo.

b) Efecto de 2-deoxi-D-glucosa adicionada a diferentes tiempos del crecimiento de *Micromonospora purpurea* en la producción de gentamicina.

El análogo de glucosa 2-deoxi-D-glucosa, fue adicionado a cultivos de microorganismo a diferentes tiempos del crecimiento en una concentración de 1%; las adiciones se efectuaron a las 0, 24, 48 y 72 horas.

Tanto el control como los cultivos a los que se les adicionó el análogo fueron suplementados previamente con glucosa 1% al tiempo cero; también con el objeto de permitir el crecimiento del microorganismo. El medio de cultivo utilizado fue el medio III y se tomaron las mismas precauciones que en el experimento anterior; lo mismo se llevó a cabo en cuanto a la obtención de muestras y a las determinaciones efectuadas.

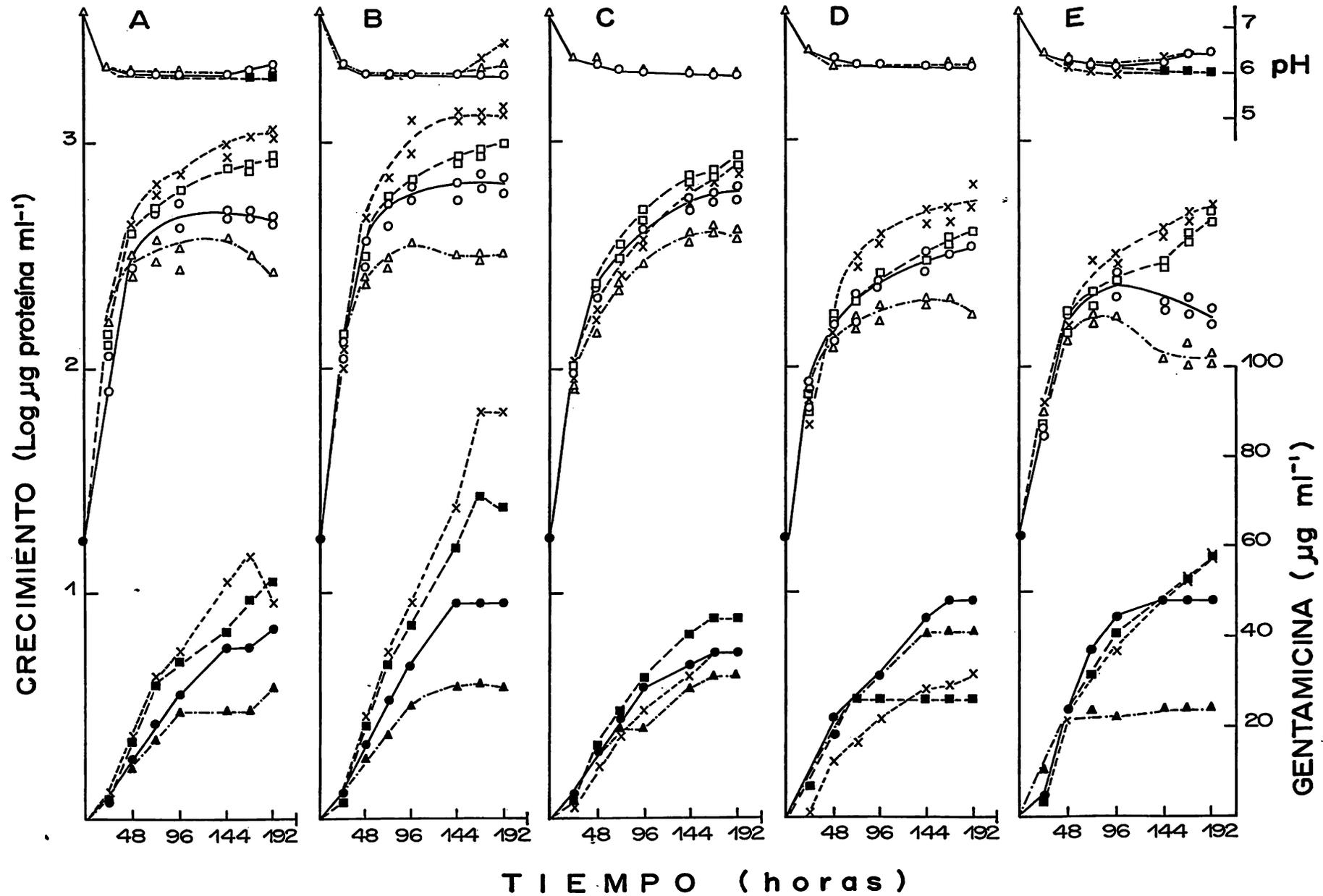
RESULTADOS Y DISCUSION

1. Efecto de diferentes fuentes de carbono en la formación de gentamicina.

En la gráfica 1 se puede observar que bajo las condiciones experimentales previamente mencionadas, *Micromonospora purpurea* NRRL-2953 crece y produce gentamicina. En bajas concentraciones de los carbohidratos el microorganismo empieza a producir el antibiótico desde las 24 horas, esta producción es lineal aproximadamente hasta las 96 horas y, en altas concentraciones de carbohidrato hasta las 168 horas.

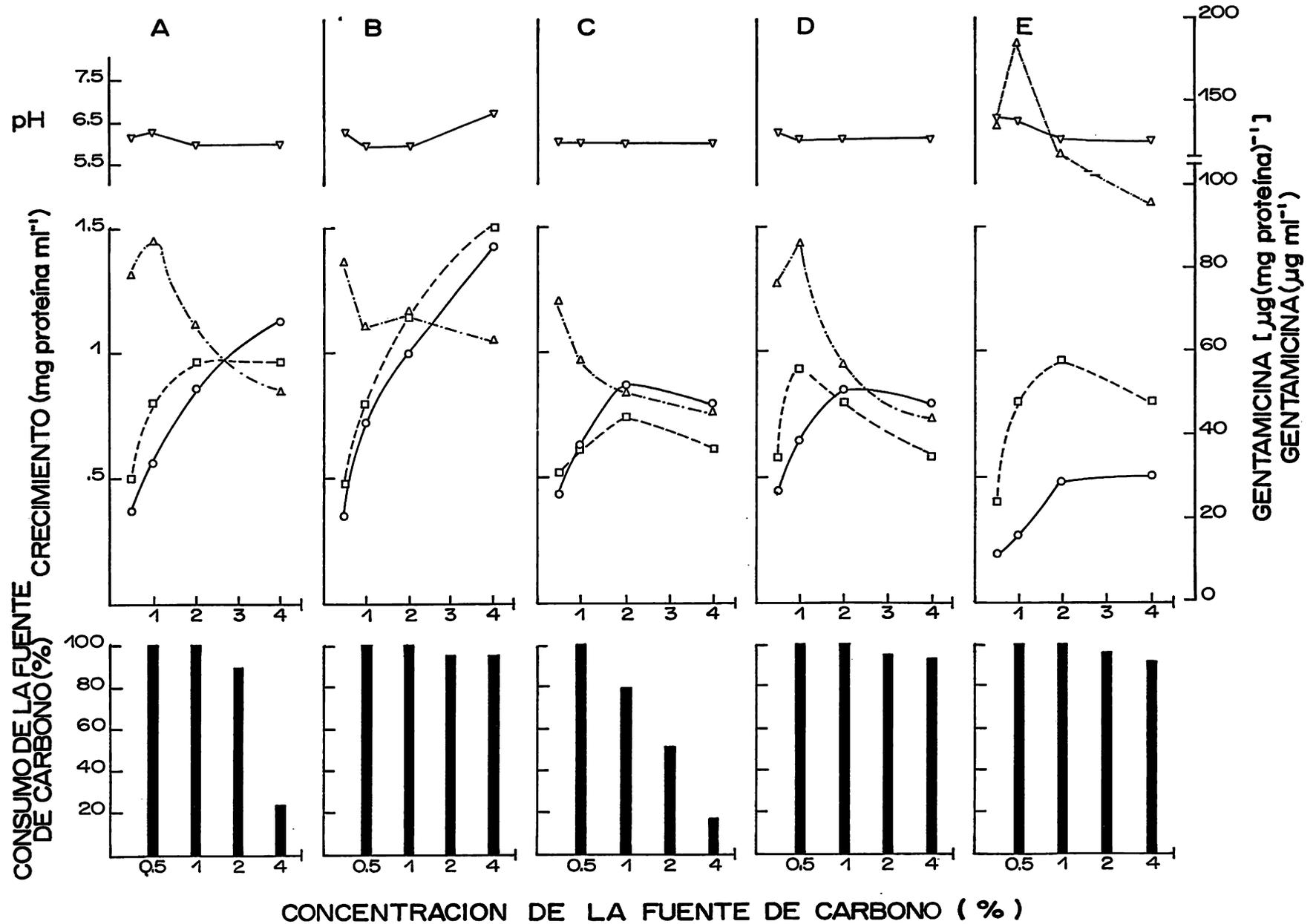
En las gráficas 1 y 2 se presentan los resultados correspondientes al efecto de almidón, maltosa, manosa, glucosa y sacarosa, sobre el crecimiento del microorganismo y la producción del antibiótico; *Micromonospora purpurea* no fue capaz de crecer ni producir el metabolito en presencia de las otras fuentes de carbono probadas, las cuales fueron: fructosa, glicerol, xilosa, manitol, galactosa, lactosa y ácido succínico. Esto pudiera deberse a que posiblemente este microorganismo no posea el sistema enzimático para transportarlos, o bien, que simplemente no los metabolizó aunque sean transportados.

En estas gráficas se puede advertir que en presencia de los carbohidratos almidón, maltosa y sacarosa, se presenta un claro incremento tanto del crecimiento como de la síntesis del



GRAFICA 1.

EFEECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Micromonospora purpurea* NRRL-2953, LA SINTESIS DE GENTAMICINA Y VARIACION DE pH. EL MICROORGANISMO FUE CRECIDO EN EL MEDIO DE CULTIVO II A 29°C CON AGITACION ROTATORIA DE 170 rpm., DURANTE 192 HORAS Y SUPLEMENTADO CON LOS CARBOHIDRATOS: ALMIDON (A), MALTOSA (B), D-MANOSA (C), D-GLUCOSA (D) Y SACAROSA (E); ESTOS FUERON ADICIONADOS AL INICIO DE LA FERMENTACION, EN LAS SIGUIENTES CONCENTRACIONES: 0.5% (Δ), 1.0% (\circ), 2.0% (\square) Y 4.0% (\times). LAS FIGURAS ABIERTAS -- REPRESENTAN EL CRECIMIENTO Y/O LA VARIACION DE pH, LAS FIGURAS CERRADAS REPRESENTAN LA PRODUCCION DEL ANTIBIOTICO.



GRAFICA 2.

VALORES MAXIMOS OBTENIDOS EN CULTIVOS DE *Micromonospora purpurea*, CRECIDA EN PRESENCIA DE LOS CARBOHIDRATOS: ALMIDON (A), MALTOSA (B), D-MANOSA (C), D-GLUCOSA (D) Y SACAROSA (E), A DIFERENTES CONCENTRACIONES (0.5, 1.0, 2.0 y 4.0%). LAS CONDICIONES DE CULTIVO CORRESPONDEN A LAS EXPRESADAS EN LA GRAFICA 1. LOS VALORES REPRESENTADOS SON : pH MAXIMO (▼), CRECIMIENTO MAXIMO (○), PRODUCCION VOLUMETRICA MAXIMA (▲) Y PRODUCCION ESPECIFICA MAXIMA (△). LAS BARRAS REPRESENTAN EL PORCENTAJE DEL CONSUMO DE CADA CARBOHIDRATO EN FUNCION DE LA CONCENTRACION INICIAL UTILIZADA.

metabolito, en función de la concentración de cada sustrato; el mayor efecto se obtuvo con maltosa con una concentración del 4%, donde se alcanza casi el doble de producción. Sin embargo, no sucede lo mismo cuando se utilizan los carbohidratos glucosa y manosa, donde a pesar de que se advierte un incremento en el crecimiento, no sucede lo mismo en cuanto a la síntesis del antibiótico, ya que se presenta una supresión de la formación del metabolito a medida que se incrementan las concentraciones de estos sustratos; además esta supresión es mayor con glucosa, donde a concentraciones muy elevadas (4%), incluso se aprecia un retraso en el inicio de la síntesis, ya que ésta da comienzo hasta las 48 horas de la fermentación (en concentraciones superiores el desfaseamiento es aún mayor). En cuanto al cambio del pH durante las fermentaciones, no se observaron variaciones considerables que de alguna manera pudieran interferir con la formación de este metabolito o con el crecimiento del microorganismo.

En la gráfica 2 se muestran los valores máximos alcanzados a las 192 horas de fermentación de las condiciones ya descritas; en ella también se puede apreciar que los valores de pH al final de todas las fermentaciones son muy similares; lo cual muestra que este parámetro no ocasionó interferencias en la síntesis de gentamicina en cuanto a los efectos provocados por la utilización de los diferentes sustratos probados. Asimismo, se advierte el incremento tanto de la producción del antibiótico como del

crecimiento del microorganismo cuando se adicionan concentraciones mayores de sustrato, en los casos mencionados. Sin embargo, cuando se determina la síntesis específica de éste metabolito se puede observar una relación inversamente proporcional entre el crecimiento y la producción específica del antibiótico. Por otro lado, con glucosa y manosa se advierte además un descenso en la producción volumétrica de este metabolito.

Se observa también el consumo de dichos carbohidratos, donde los porcentajes fueron determinados en función de la concentración inicial utilizada. En todos los casos e independientemente de la cantidad inicial, estos fueron consumidos casi en un 100%, salvo cuando se adicionó almidón al 4%, donde se advierte que el microorganismo sólo utilizó un 25% aproximadamente y manosa, la cual a medida que se incrementa su concentración en el medio de cultivo, disminuye la eficiencia del microorganismo para utilizarla.

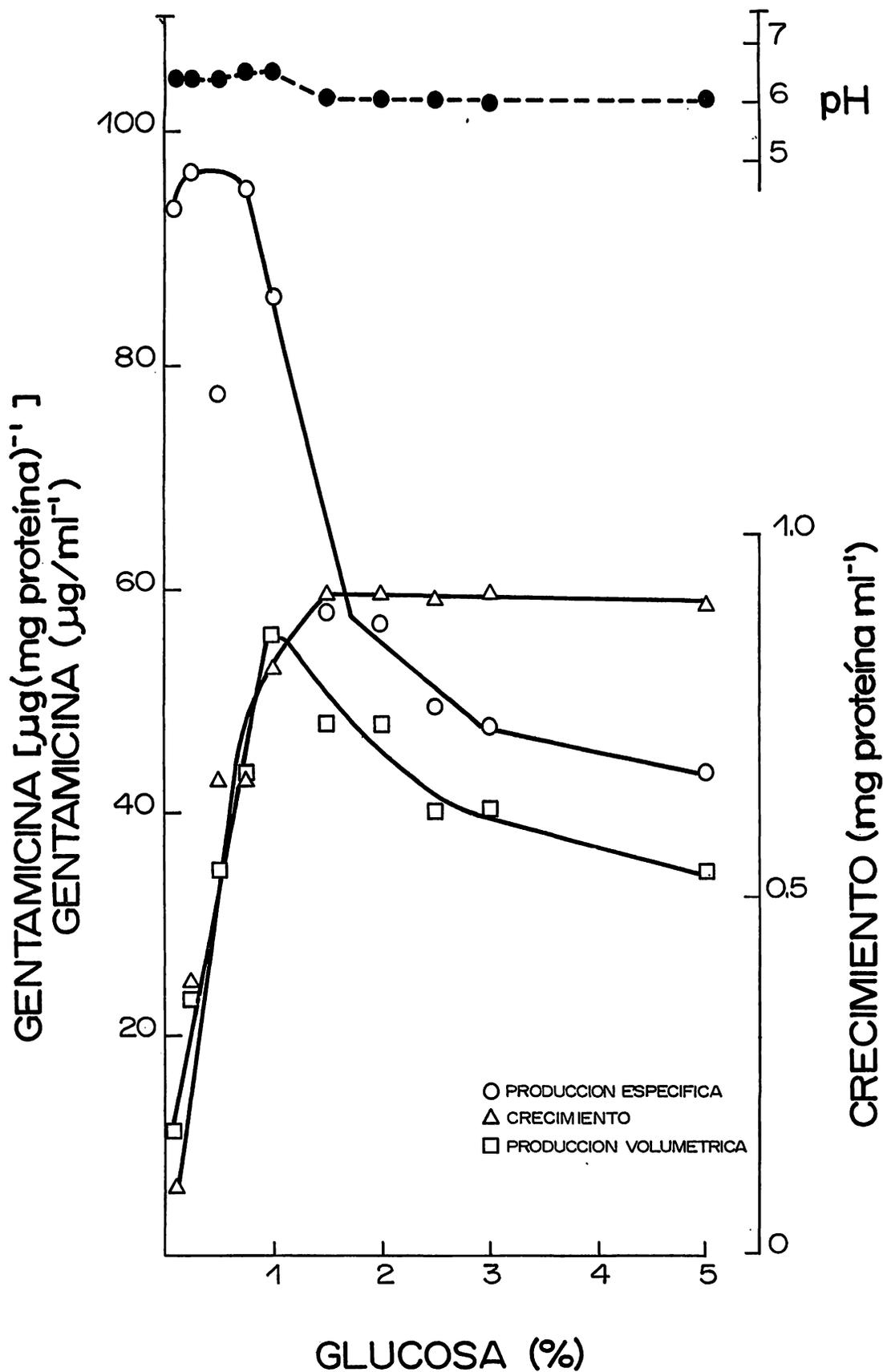
Tal vez los efectos sean similares, cuando se comparan los resultados obtenidos con manosa y glucosa, porque manosa es un isómero de glucosa; pero también pudiera deberse a que a medida que se incrementa su concentración en el medio de fermentación del microorganismo éste ya no es capaz de utilizarlo, pues a diferencia de manosa, glucosa es consumida casi en un 100%.

Como se pudo observar, glucosa y manosa fueron capaces de provocar un efecto supresivo, a diferencia de sacarosa, maltosa y almidón, las cuales además de permitir un buen crecimiento, también permiten la síntesis del antibiótico. Estos resultados son similares a los ya reportados, en los que se muestra que las fuentes de carbono fácilmente metabolizables (como glucosa) aunque son excelentes para el crecimiento del microorganismo, ejercen efectos represivos o inhibitorios sobre las sintetisas del metabolismo secundario; motivo por el cual durante la fermentación de estos metabolitos se utilizan fuentes más complejas de carbono (como los disacáridos u oligosacáridos), o bien, los cultivos son alimentados con bajas concentraciones del carbohidrato (53, 54).

2. Efecto de diferentes concentraciones de glucosa sobre la producción específica de gentamicina.

En la gráfica 3 se observa que el crecimiento del microorganismo fue estimulado conforme se aumentó la concentración de glucosa en el medio de cultivo hasta 1.5%, no sucediendo lo mismo a concentraciones superiores (hasta 5%), donde ya no se observan mayores incrementos. En cuanto a la producción tanto volumétrica como específica del antibiótico se observa una supresión drástica a partir de concentraciones mayores de 1% de este carbohidrato.

En esta gráfica se muestra claramente que la glucosa ejerce



GRAFICA 3.

EFFECTO DE D-GLUCOSA SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Micromonospora purpurea* Y LA FORMACION DE GENTAMICINA. VALORES MAXIMOS OBTENIDOS EN CULTIVOS SUPLENENTADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL CARBOHIDRATO ADICIONADOS AL INICIO DE LA FERMENTACION. CRECIMIENTO MAX. (△), PRODUCCION VOLUMETRICA MAX. (□), PRODUCCION ESPECIFICA MAX. (○) Y pH MAX. (●).

un fuerte efecto supresivo que provoca un descenso de aproximadamente un 75% de la producción específica del antibiótico. Esta acción negativa se empieza a observar en concentraciones de glucosa mayores de 1.5%; donde también se advierte que se presentan retrasos en el inicio de la síntesis del metabolito; como previamente se mostró en la gráfica 1, además de otros resultados obtenidos que no son presentados aquí; e incluso en concentraciones superiores a 5% la supresión es total.

3. Caracterización del efecto de D-glucosa en la producción de gentamicina.

Con el objeto de determinar si D-glucosa "per se", más que algún producto derivado de su metabolismo, era el responsable de la supresión de la síntesis de gentamicina, se adicionó un análogo no metabolizable del mismo a los cultivos del microorganismo.

El efecto de 2-deoxi-D-glucosa sobre el crecimiento del microorganismo y la producción del antibiótico se puede observar en las Tablas 7 y 8. *Micromonospora purpurea* fue crecida en el medio mínimo II en concentraciones crecientes del análogo (0, 0.5, 1 y 2%) utilizando como control las mismas concentraciones de glucosa en dicho medio, en la Tabla 7 se muestran los resultados; como era de esperarse y de acuerdo a los resultados

TABLA 7. EFECTO DE 2-DEOXI-D-GLUCOSA SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Micromonospora purpurea* Y LA FORMACION DE GENTAMICINA.

FUENTE DE CARBONO	CONCENTRACION DE LA F.C.* (%)	CRECIMIENTO MAXIMO mg ml ⁻¹	PRODUCCION MAXIMA µg ml ⁻¹	PRODUCCION ESPECIFICA µg(mg prot) ⁻¹
Glucosa	0	0.0053	0	0
	0.5	0.46	35	76.09
	1.0	0.653	56	85.76
	2.0	0.843	48	56.94
2-Deoxi-D-Glucosa	0	0.0053	0	0
	0.5	0.023	0	0
	1.0	0.023	0	0
	2.0	0.023	0	0

El microorganismo fue crecido en el medio de cultivo II, las condiciones de cultivo son las mencionadas en Materiales y Metodos.

*F.C.= Fuente de carbono.

TABLA 8. EFECTO DE 2-DEOXI-D-GLUCOSA SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Micromonospora purpurea* Y LA FORMACION DE GENTAMICINA.

FUENTE DE CARBONO	CONCENTRACION DE LA F.C.* (%)	CRECIMIENTO MAXIMO mg ml ⁻¹	PRODUCCION MAXIMA μg ml ⁻¹	PRODUCCION ESPECIFICA μg(mg prot) ⁻¹
Glucosa	0	0.244	6.2	25.41
	0.5	0.436	37.5	86.01
	1.0	0.512	37.5	73.24
	2.0	1.028	34	33.07
2-Deoxi-D-Glucosa	0	0.244	6.2	25.41
	0.5	0.245	0	0
	1.0	0.255	0	0
	2.0	0.225	0	0

El microorganismo fue crecido en el medio de cultivo III, las condiciones de cultivo son las mencionadas en Materiales y Metodos.

*F.C.= Fuente de carbono.

mostrados anteriormente, a medida que se incrementa la concentración del carbohidrato aumenta el crecimiento, la síntesis del antibiótico también se incrementa pero hasta 1% y en 2% se presenta una disminución. Cuando se adiciona el análogo el crecimiento es mínimo, comparado con el control y la producción es nula. También, para ambos casos, se llevó a cabo una fermentación sin fuente de carbono, para demostrar que el microorganismo no crece ni produce el antibiótico en estas condiciones y que además los componentes del medio tampoco interfieren en la observación de estos efectos, los resultados se pueden observar en esta tabla.

Al presentarse una supresión en el crecimiento del microorganismo se muestra que efectivamente se estuvo trabajando con un análogo no metabolizable, requisito necesario para efectuar dicho experimento; sin embargo, no se puede apreciar el efecto que tiene sobre la síntesis del antibiótico y tampoco permite concluir en cuanto a que sea o no la molécula de glucosa "per se" el efector de dicho comportamiento; ante lo cual el microorganismo fue crecido bajo las mismas condiciones pero en el medio de cultivo III, que es un medio completo; los resultados se muestran en la Tabla 8.

Se puede observar que aunque se trate de un medio completo al ser suplementado con glucosa se presenta el mismo efecto de supresión, pero a diferencia de los resultados mostrados en la

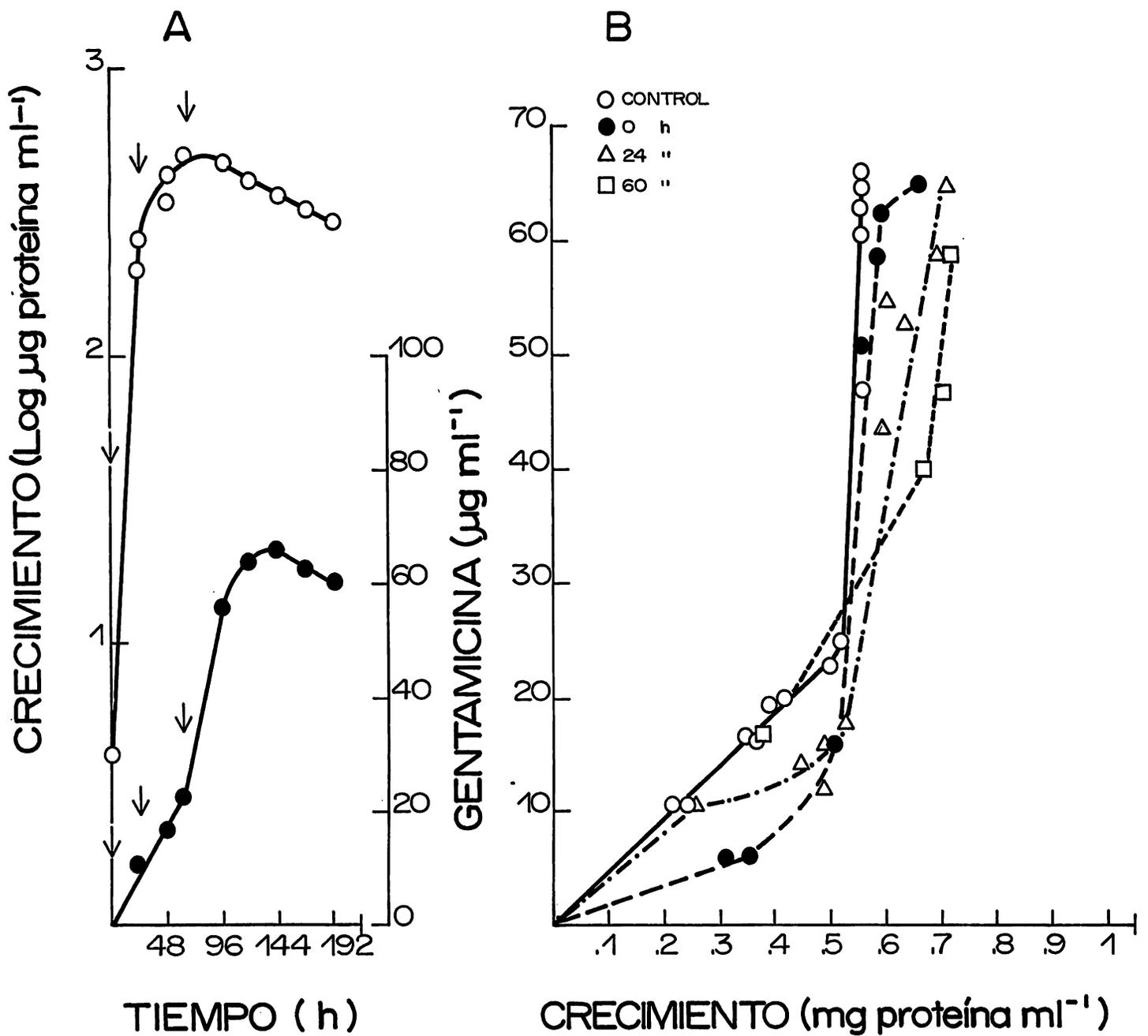
Tabla 7, el microorganismo crece y produce gentamicina en ausencia de dicho carbohidrato, pero en una baja proporción. En presencia del análogo se observa que aunque el microorganismo alcanza un leve crecimiento, no hay síntesis del antibiótico. Esto pudiera sugerir que la molécula de glucosa "per se" es el efector de la supresión observada.

4. Caracterización del Fenómeno.

a) Efecto de la adición de glucosa a diferentes tiempos de la fermentación, sobre la biosíntesis de gentamicina en *Micromonospora purpurea*.

Con el fin de visualizar el efecto que ejerce la glucosa sobre la síntesis del antibiótico ésta fue adicionada a diferentes horas del crecimiento, tomando en cuenta que la síntesis del metabolito es paralela al crecimiento. Los resultados se observan en la gráfica 4.

La D-glucosa en una concentración final de 5% fue adicionada a los cultivos del microorganismos a las 0, 24 y 60 horas de crecimiento; para ello se utilizó como control al microorganismo crecido en una baja concentración del carbohidrato (1%), situación en la cual no se presenta dicho efecto (gráfica 4-A). Los cultivos a los cuales se les adicionó glucosa, también estaban suplementados con la misma concentración del sustrato, pues como se había mencionado con anterioridad el microorganismo



GRAFICA 4.

EFFECTO DE LA ADICION DE D-GLUCOSA A DIFERENTES TIEMPOS DURANTE LA FERMENTACION, SOBRE LA BIOSINTESIS DE GENTAMICINA EN *Micromonospora purpurea*. SE UTILIZO MEDIO DE CULTIVO II, EN LAS CONDICIONES PREVIAMENTE DESCRITAS. A - CONTROL, (○) LA CINETICA DEL CRECIMIENTO, (●) PRODUCCION DE GENTAMICINA. B - CAMBIOS OBTENIDOS EN LA FORMACION DE GENTAMICINA ADICIONANDO D-GLUCOSA A LOS TIEMPOS DE INCUBACION 0, 24 Y 60 HORAS (↓).

no crece en ausencia de fuente de carbono; para ello se determinó la concentración de glucosa antes de efectuar la adición y se llevó a una concentración final de 5% al momento de llevarla a cabo.

Cuando la glucosa fue adicionada al inicio del cultivo (0 hs) y durante la fase de crecimiento (24 hs), una vez que ha comenzado la síntesis se observó un fuerte retraso en la formación del antibiótico, lo mismo que cuando fue adicionada a las 60 horas, donde este efecto puede apreciarse claramente. También se puede observar que una vez que ha pasado el efecto de la adición de glucosa, se presenta un cambio en la pendiente con respecto a la del control, restableciéndose posteriormente y alcanzado finalmente los mismos títulos de antibiótico.

En la gráfica 4-B se presentan los niveles de gentamicina alcanzados en relación al crecimiento observado; en ella se muestra que cuando la adición de glucosa se realiza a las 60 horas de fermentación el efecto supresivo del carbohidrato sobre la síntesis del antibiótico no es tan marcada como lo es al adicionarla a las 24 horas, en la que el crecimiento está en plena fase exponencial. Finalmente, los niveles de gentamicina alcanzados al final de la fermentación (192 horas) son muy similares en todos los casos, no así el crecimiento. Cabe señalar que la adición de glucosa efectuada a las 60 horas tiene efecto sobre el crecimiento pues al adicionar nueva fuente de carbono cuando está terminando la fase exponencial se vuelve a estimular el crecimiento, no así la producción como se muestra al

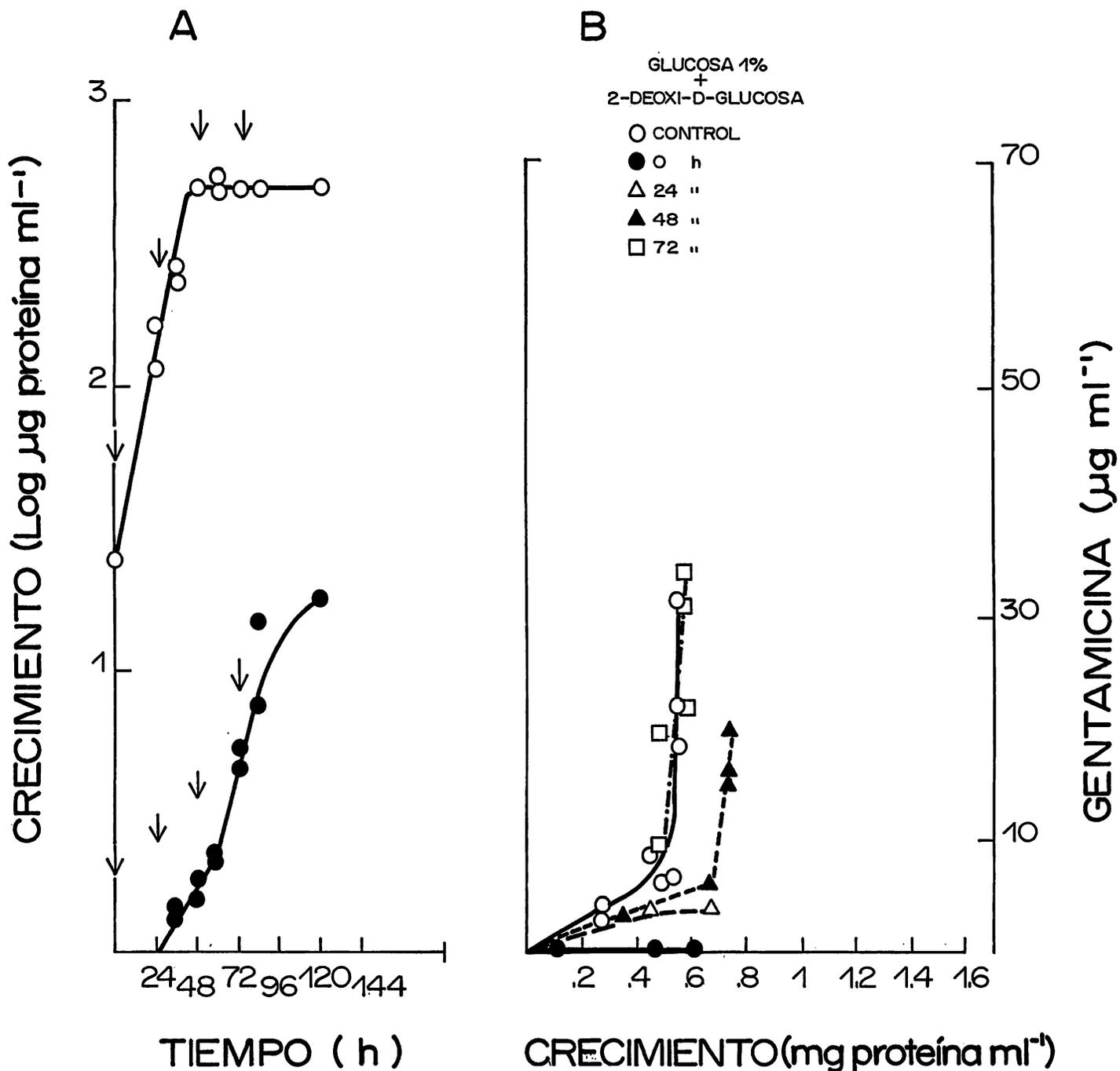
comparar los resultados contra el control (sin adición).

Cuando la adición se realiza a las 0 horas se observa buen crecimiento comparado con el control, pero se presenta un mayor efecto supresivo de la glucosa sobre la síntesis del antibiótico. Un efecto similar sucede cuando esto se lleva a cabo a las 24 horas de crecimiento.

b) Efecto de la adición de 2-deoxi-D-glucosa a diferentes tiempos de la fermentación, sobre la biosíntesis de gentamicina en *Micromonospora purpurea*.

Un efecto similar al anteriormente descrito se observa cuando en vez de adicionar glucosa a los diferentes tiempos de la fermentación se adiciona el análogo en una concentración de 1%, esto se llevó a cabo a las 0, 24, 48 y 72 horas, utilizando para ello el medio de cultivo III suplementado con 1% de glucosa, de la misma manera que se explicó en el inciso anterior y por las causas mencionadas.

En estas condiciones de crecimiento la producción del antibiótico comienza a las 36 horas y es ligeramente menor que cuando se utiliza el medio de cultivo II, como se puede observar en la gráfica 5A. Cuando el análogo fue adicionado al inicio del cultivo (0 hs), se advierte que se suprime totalmente la síntesis (Gráfica 5B), de la misma manera que cuando se adiciona a las 24 horas. A las 48 horas, momento en el cual ha comenzado la



GRAFICA 5.

EFEECTO DE LA ADICION DE 2-DEOXI-D-GLUCOSA A DIFERENTES TIEMPOS DURANTE LA FERMENTACION, SOBRE LA BIOSINTESIS DE GENTAMICINA EN *Micromonospora purpurea*. SE UTILIZO MEDIO DE CULTIVO III, EN LAS CONDICIONES PREVIAMENTE DESCRITAS. A - CONTROL, (○) LA CINETICA DEL CRECIMIENTO Y (●) LA PRODUCCION DE GENTAMICINA. B - CAMBIOS OBTENIDOS EN LA FORMACION DE GENTAMICINA ADICIONANDO 2-DEOXI-D-GLUCOSA A CONCENTRACION DE 1% EN LOS TIEMPOS DE INCUBACION 0, 24, 48 Y 72 HORAS (↓).

producción de gentamicina, la adición del análogo también es capaz de suprimir la síntesis; sin embargo, se observa que se restablece nuevamente, aunque no alcanza los mismos títulos que en el control. Cuando se adiciona el análogo a las 72 horas de la fermentación, este no es capaz de afectar ni la síntesis ni el crecimiento.

Es claro que la glucosa "per se" provoca este efecto mientras no sea metabolizada, hasta que alcanza una concentración tal que permite la síntesis, porque este efecto se observa de la misma manera al utilizar el análogo, salvo que al ser no metabolizable interfiere permanentemente cuando se adiciona a tiempos muy tempranos de la fermentación, más no así cuando es adicionado a tiempos posteriores donde incluso ya no tiene efecto (72 horas); la posterior liberación pudiera deberse a que utilizó la glucosa que se adicionó previamente.

Los resultados obtenidos muestran que glucosa ejerce su efecto sólo cuando es adicionada a los cultivos a edades tempranas, cuando se inicia la formación de las sintetetasas del metabolismo secundario; esto sugiere que el carbohidrato está ejerciendo un efecto represor más que inhibitorio. La cinética de éste efecto es muy similar a la encontrada en *Escherichia coli* por Perlman y cols. en 1969 (65), donde la glucosa "per se" provoca una represión transitoria en la síntesis de la enzima β -galactosidasa.

Magasanik (44) estudiando los efectos que ejerce la glucosa en el metabolismo de lactosa, encontró que esta ejerce principalmente tres tipos de efectos. En el primer caso denominado "Exclusión del inductor", la glucosa evita la entrada del inductor a la célula, esto implide la inducción del operón de la lactosa. El segundo caso "Represión Transitoria", reprime fuerte pero transitoriamente a la enzima β -galactosidasa; cuando este control se termina la síntesis de enzima se restablece con la misma pendiente que en el control. En el tercer caso reprime la formación de la enzima β -galactosidasa; débil pero de manera permanente; este efecto de glucosa no refleja interferencia con el inductor y en mutantes constitutivas la síntesis de la enzima es también reprimida por el carbohidrato.

En los primeros dos casos es la molécula de glucosa "per se" la que provoca este efecto. En el último, este efecto es provocado por algún producto derivado del catabolismo de la glucosa.

Resultados similares sobre la represión de las enzimas involucradas en la síntesis de otros metabolitos secundarios, por este carbohidrato, han sido reportados (Tabla 6) (20). Sin embargo, los mecanismos por los cuales la fuente de carbono afecta la síntesis de los metabolitos secundarios aún no se conocen.

CONCLUSIONES

La regulación por fuente de carbono tiene un papel muy importante en la síntesis de muchos metabolitos secundarios como los antibióticos, que son de gran interés industrial.

Dadas las características de la gentamicina, su síntesis tan reducida y, las necesidades que de este antibiótico se tienen actualmente en México, es de gran interés estudiar los mecanismos que regulan su producción, ya que este conocimiento aunado a mejoras genéticas y a manipulaciones de las condiciones de fermentación, permitirán incrementar sus rendimientos.

En base a los resultados experimentales obtenidos hasta el momento se puede concluir que:

- a) Glucosa ejerce un efecto represivo en la síntesis del antibiótico gentamicina en *Micromonospora purpurea* NRRL 2953; inclusive en bajas concentraciones (>1.5%) en los medios de cultivo logra suprimir la producción específica de este metabolito; este efecto se presenta durante la fase de crecimiento del microorganismo, ya que las sintetetasas del antibiótico están presentes desde el momento que se inicia el crecimiento.
- b) Un efecto supresivo similar se observa al adicionar un isómero de glucosa, que es manosa, a la fermentación de gentamicina.

- c) Es la molécula de glucosa "per se" la que provoca dicho efecto, ya que la adición de 2-deoxi-D-glucosa, análogo no metabolizable de este carbohidrato, a cultivos del microorganismo provocó el mismo efecto que glucosa.

- d) La posterior reanudación de la síntesis del antibiótico, alcanzando la misma producción que el control, sugiere que se puede tratar de un fenómeno similar al de Represión Transitoria.

- e) El responsable de la reanudación posterior de la síntesis pudiera ser algún producto del catabolismo de glucosa o tal vez algún otro metabolito que actúe como inductor del sistema de formación de las sintetetasas del antibiótico, el cual de alguna manera se "inactiva" en presencia de determinadas concentraciones de glucosa.

RECOMENDACIONES

A pesar del tiempo transcurrido entre el descubrimiento de los antibióticos, su industrialización a gran escala y la selección de mutantes hiperproductoras, el conocimiento que se ha adquirido sobre los mecanismos que regulan su producción, a la fecha, realmente ha sido muy escaso ya que estos programas de selección han sido efectuados de una manera empírica.

Se ha demostrado que durante los procesos de selección de mutantes hiperproductoras de algún metabolito, muchas veces, estos mecanismos regulatorios no son eliminados, de ahí que aún estas mutantes se vean afectadas por las fuentes nutricionales utilizadas para las fermentaciones industriales.

Esto muestra la importancia de caracterizar el fenómeno represivo que se ha observado en el microorganismo que se utilizó para el presente estudio.

Para ello:

- a) Es necesario comparar los resultados obtenidos con la cepa de tipo silvestre con la cepa hiperproductora para determinar si el fenómeno también se presenta de la misma manera en esta última.
- b) Si éste fuese el caso, cabría la posibilidad de mejorar genéticamente al microorganismo hiperproductor buscando mutantes insensibles a la represión catabólica y de esta forma incrementar la producción.

BIBLIOGRAFIA

1. Abou-Zeid, A.A. and Shehata, Y.M. 1922. Zbl. Bakt. II. Abt., Bd. 132:97-108.
2. Aharonowitz, Y. and Demain, A.L. 1978. Antimicrob. Ag. and Chemother. 14:159-164.
3. Aharonowitz, Y. 1980. Ann. Microbiol. 34:209-233.
4. Aharowitz, Y., Mendelovitz, S., Ben-Artzi, H. and Magal, N.M. 1986. En: Regulation of Secondary-Metabolite Formation. Proceeding of the Sixteenth Workshop. Conferences Hoechst. H. Kleinkauf eds. VCH, Verlagsgesellschaft. Federal Republic of Germany. Vol. 16 p. 80-101.
5. Anraku, Y. 1980. En: Microorganisms and Nitrogen Sources. Ed. by J.W. Payne. John Wiley and Sons, Ltd. New York. p. 9-33.
6. Bacon, C.W., Robbins, J.D. y Burdick, D. 1925. Appl. Microbiol. 25:61-67.
7. Berdy, J. 1974. Adv. Appl. Microbiol. Vol. 18:309-406.
8. Booth, C. 1971. En: Methods in Microbiology. Academic Press ed. 4:80-91.

9. Brown, C.M. 1980. En: Microorganisms and Nitrogen Sources. Ed. by J.W. Payne. John Wiley and Sons, Ltd., New York. p. 511-535.
10. Claridge, C.A. 1979. En: Economic Microbiology. Secondary Products of Metabolism. Ed. by A.H. Rose. Academic Press, New York, Vol. 3, p. 151-238.
11. Clements-Jewery, S. 1976. Separatum Experientia, 32:421.
12. Centrepois, A., et al. 1985. Antimicrob. Ag. Chemother. Vol. 27; 4:520-524.
13. Crueger, W. and Crueger, A. 1984. En: Biotechnology. Ed. by T.D. Broock. Sinauer Associates Inc. Sunderland, M.A., p. 9-48, 49-53, 98-103.
14. Cuadro Básico de Medicamentos 1984. Sector Salud. Por el Consejo de Salubridad General. p. 254.
15. Chen, Y. and Walker, J.B. 1977. Biochem. Bioph. Res. Comm. 77;2:688-692.
16. Daum, S.J., Rosi, S. and Goss, W.A. 1977. J. Antibiot. Vol. 30; 1:98-105.
17. Demain, A.L. 1976. Stadler Symp. Vol. 8. University of Missouri, Columbia, p. 41-55.
18. Demain, A.L. and Inamine, E. 1970. Bacteriological Reviews. 34:1-19.

- 18a. Demain, A.L. and Kennel, Y.M. 1978. J. Ferment. Technol. Vol. 56; 4:323-328.
19. Demain, A.L., Kennel, Y.M. and Aharonowitz, Y. 1979. En: Microbial Technology, Society for General Microbiology, Symposium 29. Society for General Microbiology, Ltd (eds.) Great Britain. p. 163-185.
20. Demain, A.L. 1982. En: Overproduction of Microbial Products. V. Krumphanzl (eds.). Academic Press, New York. FEMS Symposium No. 13. p. 3-20.
21. Demain, A.L. and Braña, A.F. 1984. En: Regulation of Secondary Metabolite Formation. Proceedings of the Sixteenth Workshop Conferences Hoechst. H. Kleinkauf eds. VCH, Verlagsgesellschaft. Federal Republic of Germany. Vol. 16 p. 77-88.
22. Drew, S.W. and Demain, A.L. 1977. Ann. Rev. Microbiol. 31:343-356.
23. Gallo, M. and Katz, E. 1972. J. Bacteriol. 109:659-667.
24. Gersh, D., Römer, W., Bocker, H. and Thrum, H. 1978. FEMS. Microbiology Letters. 3:39-41.
25. Gersh, D., Römer, W. and Krügel, H. 1979a. Separatum Experientia. 35:749.
26. Gersh, D. 1979b. FEMS. Microbiology Letters. 6:343-347.

27. Gersh, D., Skurk, A. and Römer, W. 1979. Arch. Microbiol. 121:91-96.
28. Gersh, D. 1980. Process. Biochemistry. p. 21-24.
29. Glasby, J.S. 1972. En: Encyclopedia of Antibiotics. Ed. by John Wiley and Sons, New York, 2nd. Ed. p. 233-235.
30. Gräfe, V. 1982. En: Overproduction of Microbial Products. FEMS Symposium No. 13. Ed. by V. Krumphanzl. Academic Press, New York. p. 63-75.
31. Hinnen, A. and Nuesch, J. 1976. Antimicrob. Ag. Chemother. 9:824-830.
32. Hu BSc., W.S. and Demain, A.L. 1972. Process Biochemistry, 14:2-6.
33. Inoue, S., Nishizawa, Y. and Nagai, S. 1983. J. Ferment. Technol. 61; 1:7-12.
34. Kardos, N., Eichholz, A. and Schaffner, C.P. 1981. J. Antibiot. Vol. 34; 1:103-113.
35. Kase, H., et al. 1980. J. Antibiot. 33, 1210-1212.
36. Kase, H., Odakura, Y. and Nakayama, K. 1982. J. Antibiot. 35:1-9.
37. Kavanagh, F. 1975. En: Methods in Enzimology. Vol. XLIII:55-69.

38. Kohlhepp, S.J., Plant, S.B., McCarron, D.A. and Gilbert, D.N. 1982. Antimicrob. Ag. Chemother. Vol. 21; 4:668-669.
39. Lee, B.K., et al. 1975. J. Antibiot. 28;2:163-166.
40. Lee, B.K., et al. 1976. Antimicrob. Ag. Chemother. 9, 11:151-159.
41. Le Goffic, F., Capmau, M.L., Tangy, F. and Caminade, E. 1980. J. Antibiot. Vol. 33; 8:895-899.
42. Lowry, O.H., et al. 1981. J. Biol. Chem. 193:265-275.
43. Maehr, H. and Schaftner, C. 1962. J. Chromatog. 30:572-578.
44. Magasanik, B.P. 1961. En: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26:249.
45. Magasanik, B.P. 1970. En: The Lactose Operon. J.R. Beckwith and D. Zipser (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory. pp. 189-219.
46. Malik, V.S. 1980. TIBS. 4645:68-72.
47. Martin, J.F. 1976. En: Microbiology. Ed. by D. Schlessinger. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 548-552.
48. Martin, J.F. 1977. Adv. Biochem. Eng. 6:105-127.
49. Martin, J.F. and Demain, A.L. 1977. J. Bacteriol. Vol. 132; 2:590-595.

50. Martin, J.F. and Demain, A.L. 1977. Can. J. Microbiol., 23:1334-1339.
51. Martin, J.F. 1978. En: Antibiotics and Other Secondary Metabolites. Biosynthesis and Production. FEMS-Symposium, No. 5. Ed. by R. Hutter. Academic Press, New York. p. 19-37.
52. Martin, J.F. 1979. En: Antibiotics and Other Secondary Metabolites: Biosynthesis and Production. R. Hutter, et al (eds.). Academic Press. London. 3:2-33.
53. Martin, J.F. and Demain, A.L. 1980. Microbiol. Rev. 44; 2:230-251.
54. Martin, J.F., et al. 1986. En: Regulation of Secondary Metabolite Formation. Proceedings of the Sixteenth Workshop Conferences Hoechst. Ed. by H. Kelinkauf, et al. VCH. Verlagsgesellschaft. Federal Republic of Germany. Vol. 16. p. 43-75.
55. Marzluf, G. 1981. Microbiol. Rev. 437-461.
56. Nara, T. 1978. Annual Reports on Fermentation Processes. Vol. 2:223-265.
57. Nüesch, J., Hinnen, S. Liersch, H. and Treichler, H.J. 1976. Second International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Ed. by K. McDonald. p. 451-472.
58. Ochi, K. 1986. J. Gen. Microbiol. 132:2621-2631.

59. Odakura, Y., Kase, H. and Nakayama, K. 1983. J. Antibiot. 36; 125-130.
60. Okami, Y. 1986. En: Regulation of Secondary Metabolite Formation. Proceedings of the Sixteenth Workshop Conferences Hoechst. Ed. by H. Kleinkauf, et al. VCH Verlagsgesellschaft. Federal Republic of Germany. Vol. 16, p. 327-354.
61. Ōmura, S. and Tanaka, Y. 1986. En: Regulation of Secondary Metabolite Formation. Proceedings of the Sixteenth Workshop Conferences Hoechst. Federal Republic of Germany. p. 305-331.
62. Pastan, I. and Adhya, S. 1976. Bacteriol. Rev. Vol. 40; 3:527-551.
63. Pateman, J.A. and Kinghorn, J.R. 1976. En: The Filamentous Fungi. Vol. II: Biosynthesis and Metabolism. Ed. by J.E. Smith and D.R. Berry. Great Britain. p. 159-237.
64. Pearce, C.J. and Rinehart, K.L. 1981. En: Antibiotics Biosynthesis. W. Corcoran (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Vol. 4, p. 74-100.
65. Perlman, L.R., De Crombrughe, B. y Oastan, I. 1969. Nature 223:810-812.
66. Piendl, W. and Bock, A. 1982. Antimicrob. Ag. Chemother. Vol. 22; 2:231-236.

67. Fogell, B.M., Sankaran, L., Redshaw, P.A. and McCann, P.A. 1976. En: Microbiology 1976. D. Schessinger (ed.) American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp, 543-547.
68. Fogwizd, S.M. and Lerner, S.A. 1984. En: Handbook of Microbiology. Growth and Metabolism. Ed. by A.I. Lasking and H.A. Lechevalier. CRC Press Inc. United States. International Standard Book, Vol. VI, p. 299-316.
69. Porter, J.N. 1925. En: Methods in Enzimology. Vol. XLIII:3-23.
70. Price, K.E., Godfrey, J.C. and Kawaguchi, H. 1922. En: Structure-Activity. Relationships Among the Semisynthetic Antibiotics. Ed. by D. Perlman. Academic Press, New York. p. 239-355.
71. Price, K.E., Godfrey,, J.C. and Kawaguchi, H. 1922. Ibid. p. 357-395.
72. Ragan, C.M. and Vining, L.C. 1928. Can. J. Microbiol. 24:1012-1015.
73. Rinehart, K.L. and Stroschane 1926. J. Antibiot. 29; 4:319-337.
74. Rossi, D., Goss, W.A. and Daum, S.J. 1922. J. Antibiot. Vol. 30; 1:88-97.

75. Salomon, L.L. and Johnson, J.E. 1952. Analytical Chemistry. 31; 3:453-456.
76. Sánchez, S. et al. 1980. En: Advances in Biotechnology. Ed. by L.C. Vining and K. Singh. Pergamon Press, Toronto, Canada. Vol. 3p. 147-153.
77. Sánchez, S., Flores, M.E. y Mateos, R.C. 1984. En: Caminos en la Biología Fundamental. J. Martuscelli, et. al. (eds.) UNAM. 129-139.
78. Sánchez, S.E., et. al. 1984. Bases microbianas para la producción fermentativa de antibióticos. En prensa.
79. Satoh, A., Ogawa, H. and Satomwa, Y. 1974. Agricultural and Biological Chemistry, 40:191-196.
80. Suzukake, K. et. al. 1985. J. Antibiot. 38, 9:1211-1218.
81. Tanaka, Y., Masuma, R. and Ōmura, S. 1984. J. Antibiot. 37; 11:1370-75.
82. Testa, R.T. and Tilley, B.C. 1974. J. Antibiot. 29:140-146.
83. Umezawa, H. 1978. En: Index of Antibiotics from Actinomycetes. University Park Press (ed.). Baltimore. II:417-419.
84. U.S. Patent. 2,808,364. 1952. Carvajal, F.

85. Vining, L.C. and Chatterjee, S. 1982. En: Overproduction of Microbial Products. V. Krumphanz (eds.). Academic Press, New York. FEMS Symposium No. 13. p. 35-46.
86. Wagman, G.H., et. al. 1968. J. Chromatog. 34:210-215.
87. Wagman, G.H., et. al. 1972. J. Chromatog. 70:171-172.
88. Wagman, G.H. and Weinstein, M.J. 1980. Ann. Rev. Microbiol. 34:537-557.
89. Waitz, J.A. 1974. En: Developments in Industrial Microbiology. Proceedings of the Thirty-First General Meeting of the Society for Industrial Microbiology. Washington, D.C., Vol. 16:161-174.
90. Weinstein, M.J., Wagman, G.H. and Taber, R.I. 1965. Antimicrob. Ag. Chemother. 227-231.
91. Weinstein, M.J., Wagman, G.H., Oden, E.M. and Marquez, J.A. 1962. J.A. J. Bacteriol. Vol. 94, 3:789-899.
92. Wolfgang, P. and Bock, A. 1982. Antimicrob. Ag. Chemother. p. 231-236.