

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

03072  
6  
2ej

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

"EFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO EN LA PRODUCCION  
FERMENTATIVA DE GENTAMICINA"

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

P r e s e n t a :

LAURA LUCRECIA ISLAS MURGUIA



## **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 está 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.

## INDICE

	Pag.
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCION.....	4
3. GENERALIDADES SOBRE GENTAMICINA.....	7
3.1 Clasificación, estructura y propiedades.....	7
3.2 Importancia clínica.....	9
3.3 Biosíntesis.....	14
3.4 Fermentación.....	22
3.5 Regulación.....	23
4. REGULACION NITROGENADA.....	27
4.1 Asimilación de amonio.....	27
4.2 Antibióticos sujetos a regulación nitrogenada.....	31
5. OBJETIVO.....	36
6. MATERIAL Y METODOS.....	37
6.1 Microorganismos.....	37
6.2 Medios de conservación.....	37
6.3 Preparación del inóculo.....	38
6.4 Fermentaciones a nivel metraz.....	38
6.5 Sistema de células en reposo.....	39
6.6 Métodos de análisis.....	40
6.6.1 Crecimiento celular.....	40
6.6.2 Cuantificación de gentamicina.....	41
6.6.3 Determinación de amonio.....	42
6.6.4 Determinación de sacarosa.....	42
6.7 Presentación de resultados y reproducibilidad.....	43
7. RESULTADOS Y DISCUSION.....	44
8. CONCLUSIONES.....	81
9. RECOMENDACIONES.....	82
10. BIBLIOGRAFIA.....	89

## LISTA DE TABLAS

	Pag.
1. Clasificación química de los antibióticos aminoglicosídicos...	8
2. Microorganismos sensibles al antibiótico gentamicina.....	11
3. Microorganismos que contienen enzimas inactivantes del antibiótico gentamicina.....	13
4. Crecimiento y producción de gentamicina máximos obtenidos de cultivos de <u>M. purpurea</u> NRRL 2953 en medio completo y medio mínimo suplementado con diferentes sales de amonio.....	48
5. Resultados obtenidos a las 168 hrs de fermentación con la adición de diferentes concentraciones de cloruro de amonio al medio de cultivo.....	53
6. Resultados obtenidos a las 168 hrs de fermentación con la adición de diferentes concentraciones de sulfato de amonio al medio de cultivo.....	58
7. Resultados obtenidos a las 168 hrs de fermentación con la adición de ácido glutámico, glutamina, alanina al medio de cultivo.....	66
8. Efecto de la concentración de cloruro de amonio, ácido glutámico, glutamina en la producción de gentamicina en un sistema de células en reposo de <u>M. purpurea</u> NRRL 2953 en ausencia de cloranfenicol.....	75
9. Efecto de la concentración de cloruro de amonio, ácido glutámico y glutamina en la producción de gentamicina en un sistema de células en reposo de <u>M. purpurea</u> NRRL 2953 en presencia de cloranfenicol.....	76

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
1. Estructura química del complejo gentamicina C.....	10
2. Ruta biosintética de 2-desoxiestreptamina a partir de D-glucosa.....	15
3. Ruta biosintética del complejo gentamicina C a partir de 2-desoxiestreptamina.....	19
4. Vías de asimilación de amonio para la formación de ácido glutámico y glutamina.....	30
5. Curvas de crecimiento de <i>M. purpurea</i> NRRL 2953 y producción de gentamicina en medio completo y medio mínimo suplementado con diferentes sales de amonio.....	45
6. Producciones específicas de gentamicina obtenidas de cultivos de <i>M. purpurea</i> NRRL 2953 en medio completo y medio mínimo suplementado con diferentes sales de amonio.....	47
7. Cinéticas de crecimiento de <i>M. purpurea</i> NRRL 2953, producción de gentamicina, consumo de amonio y PH en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de cloruro de amonio... 50	50
8. Producciones específicas de gentamicina obtenidas de cultivos de <i>M. purpurea</i> NRRL 2953 en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de cloruro de amonio.....	51
9. Cinéticas de crecimiento de <i>M. purpurea</i> NRRL 2953, producción de gentamicina, consumo de amonio y PH en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de amonio... 56	56
10. Producciones específicas de gentamicina obtenidas de cultivos de <i>M. purpurea</i> NRRL 2953 en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de amonio.....	57
11. Producciones específicas de gentamicina máximas obtenidas de cultivos de <i>M. purpurea</i> NRRL 2953 en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de cloruro de amonio y sulfato de amonio.....	59
12. Relación entre el consumo de amonio y la producción de gentamicina en <i>M. purpurea</i> NRRL 2953.....	60
13. Cinéticas de crecimiento de <i>M. purpurea</i> NRRL 2953, producción de gentamicina, consumo de amonio y PH en medio mínimo suplementado con ácido glutámico, glutamina y alanina.....	63
14. Producciones específicas de gentamicina obtenidas de cultivos de <i>M. purpurea</i> NRRL 2953 en medio mínimo suplementado con ácido glutámico, glutamina y alanina.....	64
15. Incrementos obtenidos en la producción específica de gentamicina con la adición de ácido glutámico, glutamina y alanina al medio de cultivo.....	65
16. Efecto de la concentración de cloruro de amonio, ácido glutámico y glutamina sobre la producción de gentamicina en un sistema de células en reposo de <i>M. purpurea</i> NRRL 2953 en ausencia de cloranfenicol.....	70

17. Efecto de la concentración de cloruro de amonio, ácido glutámico y glutamina sobre la producción de gentamicina en un sistema de células en reposo de M. purpurea NRRL 2953 en presencia de cloranfenicol..... 71
18. Producciones de gentamicina máximas obtenidas con la adición de diferentes concentraciones de cloruro de amonio, ácido glutámico y glutamina a un sistema de células en reposo de M. purpurea NRRL 2953 en presencia y en ausencia de cloranfenicol..... 72
19. Incrementos obtenidos en la síntesis de gentamicina con la adición de diferentes concentraciones de cloruro de amonio, ácido glutámico y glutamina a un sistema de células en reposo de M. purpurea NRRL 2953 en presencia y en ausencia de cloranfenicol..... 74
20. Posible mecanismo de estimulación del ácido glutámico en la síntesis de gentamicina como única fuente de nitrógeno en un sistema de células en reposo de M. purpurea NRRL 2953..... 77
21. Importancia de la glutamina en la síntesis de gentamicina..... 79

## LISTA DE ANEXOS

Pág.

1. Analisis de varianza: "Efecto de la concentración de cloruro de amonio en la producción específica de gentamicina a las 168 hrs de fermentación..... 83
2. Analisis de varianza: "Efecto de la concentración de sulfato de amonio en la producción específica de gentamicina a las 168 hrs de fermentación..... 84
3. Analisis de varianza: "Efecto de la adición de ácido glutámico y glutamina al medio de cultivo en la producción de gentamicina a las 168 hrs de fermentación..... 85
4. Analisis de varianza: "Efecto de la concentración de cloruro de amonio en la síntesis de gentamicina en un sistema de células en reposo en presencia y en ausencia de cloranfenicol..... 86
5. Analisis de varianza: "Efecto de la concentración de ácido glutámico en la síntesis de gentamicina en un sistema de células en reposo en presencia y en ausencia de cloranfenicol..... 87
6. Analisis de varianza: "Efecto de la concentración de glutamina en la síntesis de gentamicina en un sistema de células en reposo en presencia y en ausencia de cloranfenicol..... 88

## 1. RESUMEN

La gentamicina es un antibiótico aminoglucosídico de amplio espectro antibacteriano. Debido a su aplicación como agente terapéutico para el control de infecciones graves causadas por *Escherichia coli*, *Mycobacteria* y *Pseudomonas*, dicho antibiótico constituye hoy en día uno de los medicamentos distinguidos como prioritarios en el cuadro básico de salud.

La producción de gentamicina en México cubre únicamente el 75% de la demanda nacional. Por esta razón, resulta necesario realizar investigaciones que permitan incrementar los rendimientos que actualmente se obtienen por vía fermentativa, como por ejemplo, el estudio del efecto que diversos factores nutricionales ejercen sobre la biosíntesis del antibiótico.

En cuanto a la fuente de nitrógeno se refiere, se sabe que el ion amonio regula la biosíntesis de un gran número de antibióticos. Su presencia en el medio de cultivo puede disminuir o en otros casos incrementar, a determinadas concentraciones, la producción de tales metabolitos.

La regulación de la biosíntesis de gentamicina por la fuente de nitrógeno ha sido poco estudiada, de ahí que el objetivo de este trabajo fuera el determinar el efecto que tiene el ion amonio sobre la producción de dicho antibiótico, utilizando como modelo la cepa silvestre *Micromonospora purpurea* NRRL 2953.

La primera estrategia a seguir, fue el diseño de un medio mínimo en el cual el microorganismo fuera capaz de crecer y producir gentamicina. Las fuentes de carbono y nitrógeno seleccionadas fueron sacarosa (1.4%) y cloruro de amonio (40 mM), respectivamente.

Una vez establecida la cinética de producción de gentamicina en el medio mínimo de prueba, se procedió a estudiar el perfil de formación del antibiótico en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de amonio (entre 10 y 200 mM). La producción específica del antibiótico se estimuló como respuesta al incremento de la concentración de la sal en el medio, obteniéndose la máxima estimulación en la concentración de amonio correspondiente a 150 mM. Al aumentar la concentración de la sal a 200 mM, la producción del antibiótico comenzó a decaer. Resultados similares se obtuvieron con la adición de sulfato de amonio al medio de cultivo.

El efecto estimulador del amonio sobre la producción de gentamicina, no es debido ni a incrementos en el crecimiento celular, ni a variaciones en el pH del medio fermentado. Por otro lado se encontró que a mayor producción de gentamicina, mayor cantidad de amonio consumido.



Ya que en la síntesis de 2-desoxistreptamina ocurren dos reacciones de transaminación en las cuales la L-glutamina es el donador de grupos amino más activo, se procedió a investigar si la adición de dicho aminoácido al medio de cultivo repercutía en una mayor producción de gentamicina. Adicionalmente se estudió el efecto del ácido glutámico y la alanina, ya que ambos aminoácidos pueden ser transformados a glutamina en presencia de amonio mediante la acción de las enzimas alanina transaminasa y glutamina sintetasa. Los tres aminoácidos se adicionaron al medio en forma separada junto con el amonio (40 mM) desde el inicio de la fermentación en una concentración equivalente a 10 mM. El ácido glutámico y la glutamina incrementaron la producción específica de gentamicina en un 89 y 103% respectivamente, mientras que con la adición de alanina al medio, no se obtuvo efecto estimulatorio. Se piensa que el ácido glutámico y/o la glutamina pudieran ser los efectores reales de la estimulación por amonio y que la alanina pudiera estar actuando como un inhibidor de la enzima glutamina sintetasa, disminuyendo de esta manera la disponibilidad de glutamina requerida para la síntesis del antibiótico.

Con el fin de estudiar el efecto estimulatorio del ácido glutámico y la glutamina sobre la síntesis de gentamicina como únicas fuentes de nitrógeno, se determinó el perfil de formación del antibiótico en presencia de diferentes concentraciones de estos dos aminoácidos (entre 5 y 10 mM). Para ello se utilizó un sistema de células en reposo al que se adicionó un inhibidor de la síntesis de proteínas, evitando de esta manera que dichos metabolitos pudieran ser utilizados por el microorganismo como fuente de carbono. Paralelamente se llevó a cabo un experimento en el que se probaron diferentes concentraciones de cloruro de amonio (entre 40 y 150 mM) con fines comparativos. La adición de 150 mM de cloruro de amonio al medio, incrementó la producción de gentamicina en 1.5 veces, mientras que con la adición de ácido glutámico y glutamina, estos fueron de 4 y 1.5 veces respectivamente, ya que la mayor estimulación de la producción del antibiótico se obtuvo con la adición de ácido glutámico, se piensa que este aminoácido, además de ser fuente de glutamina, pudiera tener una función adicional en la síntesis del antibiótico, como por ejemplo, servir como aminodador en las reacciones de aminosustitución que ocurren durante la transformación de 2-desoxistreptamina a las gentamicinas que integran el complejo C.

En este experimento también se pudo descartar la posibilidad de que el amonio, el ácido glutámico o la glutamina, pudieran actuar como inductores de la síntesis de gentamicina, ya que cuando se adicionó cloranfenicol al medio, las tres fuentes de nitrógeno estimularon la producción del antibiótico de manera similar.

Los resultados obtenidos de este trabajo nos llevaron a postular que el ion amonio ejerce su efecto estimulatorio a través de la síntesis de ácido glutámico y glutamina, sin embargo es necesario realizar experimentos adicionales que permitan aclarar este punto, tales como:

1.- Estudiar el efecto de la adición de análogos estructurales no metabolizables del amonio, ácido glutámico o glutamina.

2.- Estudiar si existe alguna relación entre los niveles de actividad de las enzimas responsables de la asimilación de amonio para la síntesis de ácido glutámico y glutamina, y la capacidad del microorganismo para producir gentamicina.

3.- Finalmente, confirmar si el ácido glutámico es aminodonador en las reacciones de aminosustitución posteriores a la síntesis de 2-desoxiestreptamina, mediante el aislamiento de mutantes idiótrofas de dicho precursor.

Así pues, los estudios realizados en este trabajo abren la puerta para la realización de nuevas investigaciones en el área.

## 2 INTRODUCCION

Dentro de los antibióticos aminoglicosídicos, la gentamicina constituye uno de los agentes antimicrobianos más importantes y explotados comercialmente. Este antibiótico, denominado también complejo de gentamicina I, es sintetizado por algunas especies de *Micromonospora purpurea* y *Micromonospora echinospora* (ONACHI, R. y NARA, T., 1984).

La importancia de la gentamicina radica en el gran número de aplicaciones que se le han dado, destacando su uso como agente terapéutico para el control de infecciones gastrointestinales, urinarias, respiratorias y de la piel, causadas por *Escherichia coli*, *Proteus*,  *klebsiella* y *pseudomonas* (WAGMAN, G.H. y WEINSTEIN, M.J., 1980). Hoy en día, este antibiótico es empleado a nivel nacional, por 22 laboratorios farmacéuticos para la elaboración de 27 presentaciones comerciales distintas.

La gentamicina es producida en México por tres empresas químico farmacéuticas: FERMIO S.A. de C.V., UPJOHN S.A. de C.V. y Beneficiadora e Industrializadora S.A. de C.V. (Diario Oficial, julio 7, 1988). La producción anual de este producto cubre el 75% de la demanda nacional, teniendo que ser importado el restante 25%. Según datos estadísticos obtenidos de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, México importó en el año de 1989 (enero a diciembre), 328 kg de sulfato de gentamicina con un valor aproximado de 98,876 U.S.D., de los principales países productores de este antibiótico (Alemania Occidental, China, Holanda, Hungría e Italia).

La producción fermentativa de gentamicina resulta un proceso poco eficiente en cuanto al rendimiento final de producto (1.9 g/l aprox.), si lo comparamos con el que se obtiene de la producción de otros antibióticos, como la penicilina (50 g/l) y la cefalosporina (20 g/l) (CRUEGER, W. y CRUEGER, A. 1984). Esta situación es debida, entre otros aspectos, al desconocimiento de los mecanismos regulatorios que operan en la biosíntesis de gentamicina, así como de la poca información existente relacionada con el mejoramiento genético del microorganismo productor. El incrementar el nivel de producción de gentamicina que se obtiene actualmente por vía fermentativa, permitiría no solo cubrir la demanda nacional del antibiótico, sino también disminuir los costos tanto de producción como de recuperación de producto a partir del caldo de fermentación.

Estudios relacionados con los requerimientos nutricionales para la producción de antibióticos, han demostrado que existe una relación entre la limitación de nutrientes y el inicio de la biosíntesis de los antibióticos. Se ha propuesto que los sistemas que regulan la utilización de nutrientes tienen una doble función: controlar no solo las vías que proveen a la célula de los materiales esenciales para la formación de macromoléculas, sino también las vías que dan lugar a la formación de los antibióticos, a fin de proteger a las

especies de microorganismos competentes y asegurar su supervivencia cuando las condiciones del medio se encuentran restringidas (CHATTERJEE, S. y VININA, L.C., 1981).

Factores nutricionales como las fuentes de carbono, nitrógeno y fosfatos, pueden suprimir la producción de los antibióticos impidiendo la síntesis de ciertas enzimas involucradas en sus biosíntesis o inhibiendo sus actividades. En otros casos, un inhibidor o activador deberá ser sintetizado por el microorganismo productor o adicionado al medio de cultivo para que se inicie la síntesis del antibiótico (MARTIN, J.F. y DEMAIN, A.L., 1980).

Así pues, el acoplamiento de la disponibilidad de los precursores primarios para el metabolismo secundario y la expresión de ciertos genes específicos para la producción de los antibióticos es esencial para una biosíntesis efectiva de los mismos (DREW, S.W. y DEMAIN, A.L., 1977).

En lo que se refiere a la fuente de nitrógeno, se sabe que esta regula la síntesis de muchos antibióticos y que la forma como se provee a la célula determina el patrón de formación de enzimas, intermediarios y productos finales (AHARONOWITZ, Y., 1980).

Los átomos de nitrógeno que poseen la gran mayoría de los antibióticos estudiados en sus moléculas, son derivados generalmente de metabolitos primarios, es decir los que son sintetizados durante la fase de crecimiento exponencial (MARTIN, J.F., DEMAIN, A.L., 1980).

Existen dos formas mediante las cuales el nitrógeno llega a formar parte de la molécula de los antibióticos:

- a) A través de reacciones en las que el precursor que contiene el nitrógeno, por ejemplo un aminoácido, es transferido en forma intacta a la molécula del antibiótico.
- b) A través de reacciones en las que solo el átomo de nitrógeno del metabolito primario, es transferido por una reacción específica a un intermediario determinado.

La biosíntesis de antibióticos aminoglucosídicos, entre ellos la gentamicina, es un ejemplo claro que ilustra esta última alternativa.

Los precursores de los antibióticos aminoglucosídicos, son derivados aminados de inositol: 2-desoxistreptamina (2-DOS), estreptidina, actinamina, y bluensidina (WALKER, J.B., 1980; OKACHI, K. y NARA, I., 1984). Estudios recientes han demostrado que el principal donador de grupos amino en las dos reacciones de transaminación involucradas en la síntesis del precursor de la gentamicina (2-DOS), es L-glutamina (SUZAKE, K. y cols., 1985; LUCHER, L.A. y cols., 1989).

Por otro lado, la vía de biosíntesis que conduce a la formación del complejo gentamicina C a partir de 2-10S involucra también tres reacciones de aminosustitución (PEARCE, C.J. y RINEHART, R.L., 1981); sin embargo se desconoce la procedencia de los precursores donadores de estos grupos amino y las enzimas responsables de tales transformaciones no han sido estudiadas hasta la fecha.

Gran parte de la información concerniente al efecto que la fuente de nitrógeno ejerce sobre la biosíntesis de los antibióticos, está relacionada con el amonio. Aunque en la mayoría de los casos se ha detectado un control negativo, se ha visto que la producción de algunos de ellos se estimula al incrementar la concentración del amonio en el medio de cultivo. Los ejemplos más representativos de esta última situación son los de la neomicina (DHAZALI, H. y cols., 1973) y la estreptomicina (INQUE, S. y cols., 1983). Se ha propuesto que el efecto estimulatorio del amonio se debe a que éste permite la acumulación intracelular y por consiguiente una mayor disponibilidad de los aminoácidos que sirven como aminodonadores en las reacciones de transaminación involucradas en sus biosíntesis.

El estudio del metabolismo nitrogenado presentado por los microorganismos productores de metabolitos de interés comercial, como es el caso de la gentamicina, posee una gran importancia tanto en el aspecto aplicado como en el básico, ya que si tomamos en cuenta que el factor principal para la producción de alguna sustancia es el microorganismo mismo, el concimiento y manejo de los factores que influyen sobre su capacidad para sintetizar dicha sustancia, constituyen una herramienta de gran valor para el establecimiento de las bases tecnológicas de su producción a gran escala.

Así pues, tomando en cuenta lo anteriormente citado y considerando el poco trabajo que ha sido publicado en relación a los efectos que diferentes factores nutricionales pueden ejercer sobre la síntesis de gentamicina, consideramos de mucha importancia la realización de esta investigación, esperando que los resultados positivos obtenidos puedan servir tanto para el diseño de estrategias tendientes al mejoramiento de las condiciones de su producción a nivel industrial, como para el establecimiento de las bases para subsecuentes investigaciones en el área.

## 3 GENERALIDADES SOBRE GENTAMICINA

### 3.1 CLASIFICACION, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

La gentamicina es un antibiótico bactericida de tipo aminoglucosídico, descubierta en 1963 por Weinstein y cols. (WAGMAN, G.H. y WEINSTEIN, M.J., 1980). Actualmente representa uno de los productos farmacéuticos distinguidos como prioritarios en el cuadro básico de salud.

Este antibiótico es sintetizado por actinomicetos del género *Micromonospora*, entre los que destacan las siguientes cepas: *M. purpurea* NRRL 2953; *M. echinospora* NRRL 2985; *M. echinospora* var. *ferruginea* NRRL 2995; *M. echinospora* var.  *pallida* NRRL 2996; *M. scabratina* var.  *rubra* ATCC 31435 y *M. scabratina* var.  *sporobea* ATCC 31436 (BERDY, J. y JARAI, M., 1986a).

El producto de fermentación conocido como gentamicina o complejo gentamicina C, consiste en una mezcla de 3 antibióticos estrechamente relacionados (gentamicinas C1, C1a y C2), los cuales no presentan diferencias significativas en cuanto a su actividad biológica (WEINSTEIN, M.J. y cols., 1967).

Además del complejo gentamicina C, los microorganismos citados anteriormente son capaces de sintetizar y acumular en el medio de fermentación otros antibióticos como componentes menores (gentamicinas A, A1, B, C2 y los antibióticos G-418; JI-20A y JI-20B). Todos ellos presentan actividad biológica (GLASSBY, J.S., 1979).

Los antibióticos aminoglucosídicos, llamados también aminociclitolos, se caracterizan por la presencia del grupo aminociclohexanol o aminociclitol, el cual se encuentra unido por enlaces glucosídicos a varios tipos de azúcares y/o aminoazúcares complejos. Los antibióticos aminoglucosídicos pueden clasificarse, de acuerdo a su grupo aminociclitol sustituyente, en 4 grupos principales:

- (1) Los monoaminociclitolos.
- (2) Los que contienen 2-desoxiestreptamina, (2-DOS).
- (3) Los que contienen estreptidina o bluensidina.
- (4) Los que contienen actinamina.

Los antibióticos que contienen el grupo 2-DOS, pueden a su vez ser subdivididos en 3 grupos: Los que contienen el núcleo 4,5-disustituido, los 4,6-disustituidos y los monosustituidos (OKACHI, R. y NARA, T., 1984).

De acuerdo a esta clasificación, el grupo de las gentamicinas se incluye dentro de los que contienen el aminociclitol 2-5OS 4,6-disustituido (Tabla 1).

TABLA 1

CLASIFICACION QUIMICA DE LOS ANTIBIOTICOS AMINOGLUCOSIDOS

GRUPO AMINOCICLITOL	ANTIBIOTICO	M.O. PRODUCTOR
I. 2-desoxiestreptamina		
a) 4-5-disustituido	neomicina paromomicina lividomicina ribostamicina butirosina	<u>S. fradiae</u> <u>S. rimosus</u> forma <u>Paromomycinus</u> <u>S. lividus</u> <u>S. ribosidificus</u> <u>B. circulans</u>
b) 4-6-disustituido	kanamicina nebramicina saldomicina gentamicina	<u>S. kanamyceticus</u> <u>S. tenebrarius</u> <u>S. hofuensis</u> <u>M. purpurea</u> <u>M. echinospora</u>
c) monosustituido	destomicina higromicina B	<u>S. rimofaciens</u> <u>S. hygroscopicus</u>
II. Estreptidina Bluensidina	estreptomomicina bluensomicina	<u>S. griseus</u> <u>S. bluenensis</u>
III. Actinamina	espectinomomicina	<u>S. spectabilis</u>
IV. Monoaminociclitoles	validamicina kasugamicina fortimicina higromicina A	<u>S. hygroscopicus</u> var. <u>limonius</u> <u>S. kasugaensis</u> <u>M. olivasterospora</u> <u>S. hygroscopicus</u> <u>S. noboritoensis</u>

M.O. = microorganismo

Fuente: OKACHI, R. y NARA, T., 1984.

Los sustituyentes de las gentamicinas son 2-aminoazúcares complejos. Uno de ellos es el monosacárido metilgarosamina, unido al radical hidroxilo del carbono 6 del grupo 2-DOS, por un enlace glucosídico. El segundo es la piranosa denominada purpurosamina, que también forma una unión glucosídica con el carbono 4 del anillo aminociclitol (PEARCE, C.J. y PINEHART, R.L., 1981).

Las gentamicinas C1, C1a y C2 difieren entre sí únicamente en sus contenidos de grupos metilo (Fig. 1). Como resultado de una metanolisis (metanol-HCl), las gentamicinas se separan formando dos tipos de pseudodisacáridos, la garosamina (garosamina-2-DOS) y la gentamina (purpurosamina-2-DOS). (ABOU-ZEID, A.A. y SHEHATA, Y.M., 1977).

### 3.2 IMPORTANCIA CLINICA

La gentamicina es un antibiótico de amplio espectro antibacteriano. Su acción bactericida es generalmente más alta que la presentada por otros antibióticos del mismo grupo, como la estreptomycin, neomicina y kanamicina. Actúa contra bacterias Gram (+) como las de los géneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia* y algunas especies de *Clostridium* y *Pseudomonas*. En cuanto a bacterias Gram (-), solo *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* son altamente sensibles a este antibiótico. Otras bacterias Gram (+) menos sensibles son las de los géneros *Clostridium*, *Mycobacterium* y *Corynebacterium* (ALLEN, J.S., 1979). (Tabla 2).

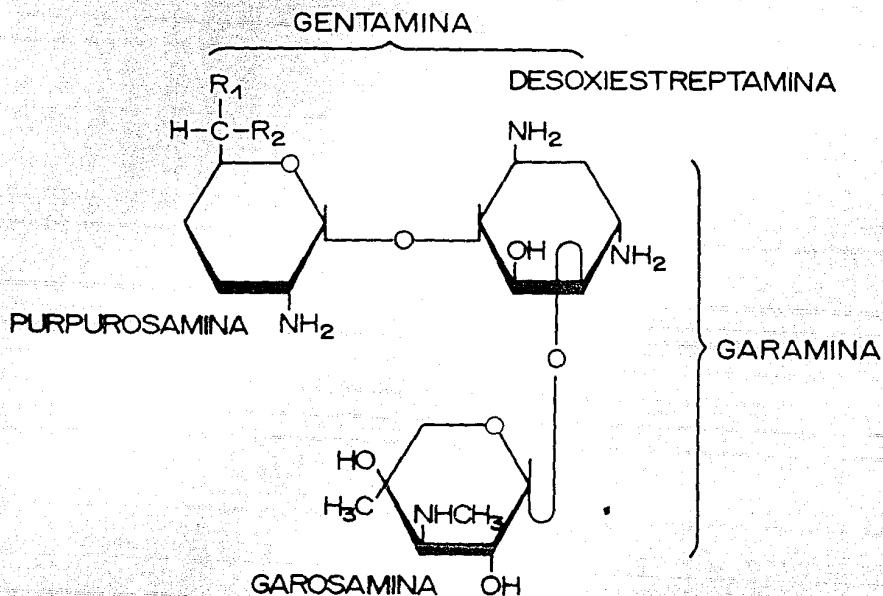
Si bien la gentamicina es efectiva contra microorganismos Gram (+) como Gram (-), son estos últimos los que han dado importancia clínica al antibiótico. Su principal aplicación se encuentra en el tratamiento de infecciones gastrointestinales, urinarias, respiratorias y de la piel. En su uso terapéutico contra infecciones causadas por Gram (+), la gentamicina se utiliza por lo general en combinación con otros antibióticos no aminoglucosídicos, como la Penicilina, ampicilina, carbenicilina y vancomicina, dando como resultado efectos sinérgicos importantes (KIRBY, J.P., 1980).

La gentamicina ejerce su acción antibacteriana a través de la inhibición de la síntesis de proteínas (ABOU-ZEID, A.A. y SHEHATA, Y.M., 1977). Este antibiótico es capaz de formar complejos con los ribosomas de los microorganismos sensibles al mismo. Se ha demostrado la existencia de sitios de unión de alta y baja afinidad para las moléculas de gentamicina tanto en la subunidad 50S como en la 30S. En *Escherichia coli*, cuando estos sitios de unión se encuentran saturados con moléculas de gentamicina, se presenta una distorsión en la estructura de los ribosomas, previniendo totalmente la síntesis de proteínas y como consecuencia ocurre el efecto bactericida del antibiótico (LE GOFFIC, F. y cols., 1980).



Fig. 1

## ESTRUCTURA QUIMICA DEL COMPLEJO GENTAMICINA C



GENTAMICINA	$R_1$	$R_2$	PM
$C_1$	$\text{CH}_3$	$\text{NHCH}_3$	477
$C_{1a}$	H	$\text{NH}_2$	449
$C_2$	$\text{CH}_3$	$\text{NH}_2$	463

Fuente: PEARCE, C.J. y RINEHART, K.L., 1981

TABLA 2  
MICROORGANISMOS SENSIBLES A GENTAMICINA

I. Grupo GRAM (-)	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
<u>Escherichia coli</u>	0.25
<u>Enterobacter sp.</u>	0.06 - 4.0
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	1.00
<u>Proteus sp.</u>	0.06 - 2.0
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	0.05
<u>Salmonella sp.</u>	1.00
<u>Shigella sp.</u>	2.00
<b>II. Grupo GRAM (+)</b>	
<u>Bacillus sp.</u>	0.01 - 1.0
<u>Clostridium sp.</u>	0.125 - 1.0
<u>Corynebacterium sp.</u>	0.125 - 1.0
<u>Micobacterium tuberculosis</u>	0.125 - 1.0
<u>Streptococcus sp.</u>	2.4 - 8.0
<u>Staphylococcus aureus</u>	0.03

MIC = Concentraci3n minima inhibitoria.

Fuente: GLASBY, J.S., 1979.

Existen 2 razones principales por las cuales el uso de la gentamicina como agente terapéutico se encuentra actualmente restringido:

- a) La aparición de efectos secundarios después de repetidas administraciones.
- b) El desarrollo de mecanismos de resistencia por los microorganismos sensibles a este antibiótico.

En cuanto a los efectos secundarios, la gentamicina está considerada, dentro del grupo de los antibióticos aminoglucosídicos, como uno de los agentes neurotóxicos y nefrotóxicos más potentes. Actúa específicamente sobre el octavo par craneal y es capaz de unirse a la corteza renal causando serios daños en los tubulos renales (OHLHEFF, S.J. y cols., 1982; CONTREPOIS, A. y cols., 1985).

Los efectos tóxicos producidos por la gentamicina se deben a la presencia de grupos amino libres en sus moléculas, ya que cuando éstos se encuentran bloqueados por acetilación, las manifestaciones tóxicas no se presentan (WEINSTEIN, M.J. y cols., 1966).

Los grupos amino libres de la gentamicina no solo son responsables de la toxicidad, sino también de la actividad antibacteriana. Por ejemplo, la N-acetilgentamicina no presenta ninguna actividad biológica contra *S. aureus* ATCC 6538P y *E. coli* ATCC 6022, aun en concentraciones de 10 mg/ml (ABOU-ZEID, A.A. y SHEHATA, Y.M., 1977).

Uno de los principales mecanismos de resistencia que desarrollan los microorganismos hacia la acción de la gentamicina, es el enzimático. Las principales enzimas inactivantes de las moléculas de este antibiótico son la aminoglucosido fosfotransferasa (APH), la aminoglucosido adenil-(o-nucleotidil)-transferasa (AAD) y la aminoglucosido acetiltransferasa (AAC). Esta última es quizás la más difundida entre los microorganismos de mayor importancia clínica (OKACHI, R. y NARA, T., 1984). En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos.

Un segundo mecanismo de resistencia que presentan ciertos microorganismos hacia la acción de la gentamicina, es la formación de ribosomas alterados. En estos, el complejo gentamicina-ribosoma resultante, es inestable y puede ser disociado fácilmente en presencia de otras moléculas con carga positiva (MUKADIEM, M. y cols., 1986).

Debido a la gran importancia clínica de los antibióticos aminoglucosídicos en general y a las ventajas que presentan frente a otros grupos de antibióticos, como por ejemplo su gran estabilidad química, se han realizado diversas investigaciones

TABLA 3

## MICROORGANISMOS QUE CONTIENEN ENZIMAS INACTIVANTES DE GENTAMICINA

MICROORGANISMO	ENZIMA	SUSTRATO
<u>Staphylococcus aureus</u>	APH (2")	C1a, C2, C1
<u>Moraxella</u> sp.	AAC (6')-II	C1a, C2
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	AAC (6')-III	C1a, C2
	AAC (6')-IV	C1a, C2
	AAC (3)-I	C1a, C2, C1
	AAC (3)-III	C1a, C2, C1
	AAC (3)-II	C1a, C2, C1
<u>Escherichia coli</u>	AAC (3)-IV	C1a, C2, C1
	AAD (2")	C1a, C2, C1
	AAC (3)-IV	C1a, C2, C1
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	AAC (3)-IV	C1a, C2, C1
	AAD (2")	C1a, C2, C1
<u>Arizona</u> sp.	AAC (3)-IV	C1a, C2, C1
<u>Providencia</u> sp.	AAC (2")	C1a, C2, C1

APH = aminoglucosido-fosfotransferasa

AAC = aminoglucosido-acetiltransferasa

AAD = aminoglucosido-adeniltransferasa

Fuente: OKACHI, R. y NARA, T., 1984.

encaminadas a la obtención de nuevos antibióticos que presenten ventajas sobre los antibióticos naturales, tales como menor toxicidad y mayor actividad biológica. Una de las principales estrategias aplicadas en este área de investigación ha sido la de la biosíntesis mutacional o mutasíntesis (CLARIDGE, C.A., 1963; SHIER, W.T. y cols. 1974; RINEHART, K.L. 1977; NABAOKA, K. y DEMAIN, A.L. 1975). Esta técnica consiste básicamente en el aislamiento de mutantes bloqueadas en la vía de biosíntesis del precursor aminociclitol, por lo cual son incapaces de sintetizar el antibiótico aminoglucosídico correspondiente, a menos que dicho precursor sea adicionado al medio de cultivo. Las mutantes mencionadas son también capaces de utilizar análogos estructurales de tales precursores, dando lugar así a la formación de antibióticos aminoglucosídicos modificados estructuralmente.

En lo que respecta a la gentamicina, ROSI, D. y cols. (1977), obtuvieron los análogos mutasintéticos 2-hidroxi-gentamicina y 3-desoxi-gentamicina mediante el aislamiento de mutantes de *M. purpureus* (D057). El primero de ellos presenta una mayor actividad biológica contra diversas cepas de *E. coli*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter*, resultando también dos veces menos tóxico que la gentamicina.

### 3.3 BIOSÍNTESIS

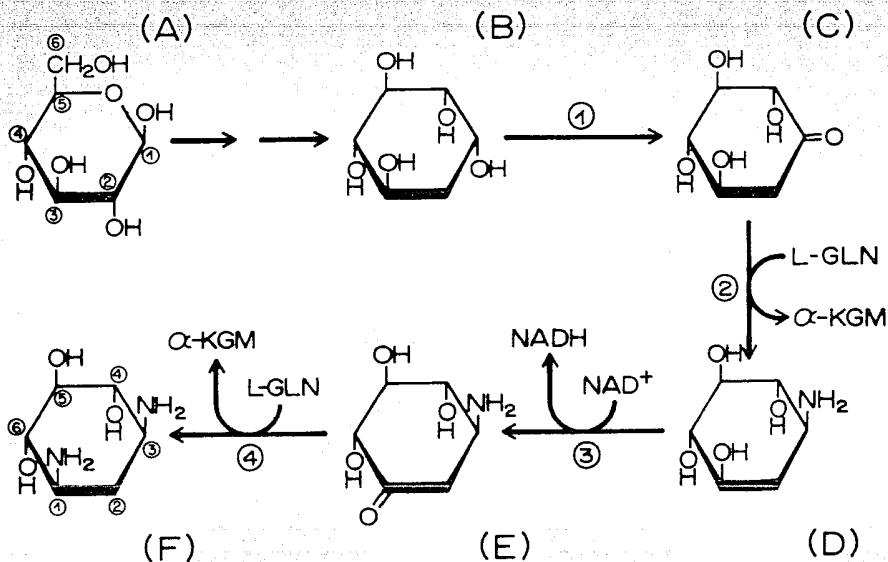
La ruta biosintética que conduce a la formación del complejo gentamicina C, puede dividirse en dos partes: La que permite la formación del grupo aminociclitol 2-desoxiestreptamina (2-D05) y la cual es común para otros microorganismos que sintetizan antibióticos con esta unidad estructural, y la que lleva a la síntesis de las gentamicinas C1, C1a y C2 a partir del precursor 2-D05 (PEARCE, C.J. y RINEHART, K.L., 1981).

#### Biosíntesis del precursor 2-desoxiestreptamina:

El precursor 2-D05 es sintetizado a partir de D-glucosa mediante reacciones de deshidrogenación y transaminación, formándose intermediarios de amino-cicl en forma similar a como sucede en la síntesis de estreptidina (WALKER, J.B., 1978).

Según se muestra en la Fig. 2, el primer intermediario aislado e identificado en esta ruta biosintética es el viboquercitol (B) el cual experimenta una reacción de deshidrogenación (1) seguida de una transaminación (2) para formar los intermediarios 2-desoxi-inososa (C) y 2-desoxi-inosamina (D), respectivamente. Este último intermediario experimenta la misma secuencia de reacciones (3 y 4), para sintetizar la aminodesoxi-inososa (E) y finalmente la 2-desoxiestreptamina (F).

Fig. 2 RUTA BIOSINTETICA DE 2-DESOXIESTREPTAMINA A PARTIR DE D-GLUCOSA.



- (A) D-glucosa.  
 (B) Vibioquercitol.  
 (C) 2-desoxi-inososa (2,4/3,5-tetrahydroxiciclohexanona).  
 (D) 2-desoxi-inosamina (2,4/3,5-tetrahydroxiciclohexilamina).  
 (E) Aminodesoxi-inososa.  
 (F) 2-desoxiestreptamina (2-DOS).

1 y 4: L-Gln-ceto-scyllo-inositolaminotransferasa.  
 3: 2-desoxi-inosamina deshidrogenasa.

Fuentes: LUCHER, L.A. y cols., 1989  
 SUZAKE, K. y cols., 1985

Las primeras investigaciones, encabezadas hacia la elucidación de la ruta metabólica del precursor 2-DOS, fueron realizadas por RINEHART, R.L. y STROSHANE, R.M. en 1976. Mediante estudios de incorporación de D-glucosa ( $^{14}C$ ) en cultivos de *S. fragilis*, productor de neomicina, estas autoras propusieron dos posibles rutas para la biosíntesis de 2-DOS. La primera estableció que el primer par de reacciones de deshidrogenación y aminación tenía lugar en el carbono 3 de la 2-DOS y después en el carbono 1, los cuales provienen de los carbonos 5 y 1 de  $\beta$ -glucosa respectivamente. La segunda opción presentaba la secuencia invertida, el carbono 1 del anillo aminocícitol experimentaba primero las reacciones mencionadas y el carbono 5 del mismo después. Estudios posteriores realizados con *M. lagsanensis* (KASE, H. y cols., 1980), *S. fragilis* (SUZAKE, N. y cols., 1985) y *M. luteus* (LUCHEK, L.A. y cols., 1989), definieron que la primera opción presentada por Rinehart, es la que realmente ocurre en esta ruta biosintética.

Rinehart también estableció que el azúcar  $\beta$ -glucosamina, puede ser incorporado por *S. fragilis* en la síntesis de 2-DOS, vía glucosa y que el nitrógeno del grupo amino de D-glucosamina se pierde durante su conversión a glucosa. La enzima glucosamina 6P-desaminasa, responsable de dicha transformación, se ha aislado de *E. coli* y también se encuentra presente en *S. fragilis* (RINEHART, R.L. y STROSHANE, R.M., 1976).

La existencia de los intermediarios vibioquercitol (B) y su producto de oxidación 2-deso-1-inososa (C), fue demostrada por el grupo de DAUM, S.J. y cols. (1977). Sus estudios se basaron en experimentos de muténesis, para los cuales utilizaron una mutante idiópota de *M. luteus* (1067), bloqueada en una etapa temprana de la biosíntesis del anillo aminocícitol.

En otros estudios de muténesis realizados con mutantes idiópota de *M. lagsanensis* (1067), se confirmó que el ciclitol 2-deso-1-inosamina (DI) es intermediario en la síntesis de 2-DOS en un paso posterior a la formación de 2-deso-1-inososa (C). (KASE, H. y cols., 1980). Adicionalmente, estos investigadores determinaron la cinética de formación del intermediario DI en una de las mutantes aisladas, bloqueada en un paso intermedio entre la conversión de DI a 2-DOS. La síntesis de DI, tiene lugar en la célula durante la fase tardía del crecimiento logarítmico de la mutante.

Existen diversos reportes en la literatura en los que se ha propuesto que las dos reacciones de transaminación que tienen lugar en la síntesis de 2-DOS (reacciones 2 y 4 en la Fig. 2), son catalizadas por una sola aminotransferasa que utiliza preferentemente L-glutamina como donador de grupos amino (WALKER, J.B., 1980). Los dos casos de aminotransferencia en esta vía, son análogos a los que ocurren en la biosíntesis de estreptidina, a diferencia de que en esta última, se han aislado 2 aminotransferasas: La L-glutamina: ceto- $\beta$ -gluc-6P-inositol aminotransferasa, que utiliza preferentemente L-glutamina como

amino donador; y la alanine-N-amidino-2-cetoglyoxilinosamina, que presenta una alta afinidad por L-alanina. Estas enzimas se han purificado de diferentes microorganismos, entre ellos de *S. laticingulis* (WALKER, J.B. y WALKER, M.S., 1969) y de *S. bigrospicus* forma *glebosus* (WALKER, J.B., 1975).

En relación con la procedencia de los dos grupos amino de 2-DOS, SUZARE, I. y cols. (1985), lograron purificar de *S. fragilis* la enzima L-glutamina: ceto-glyoxilinositol aminotransferasa, demostrando que este enzima cataliza ambas reacciones de transaminación a partir de L-glutamina en la síntesis del precursor.

La enzima mencionada fue también aislada de *M. luteus* por LUCHER, L.A. y cols. (1989), quienes aportaron información adicional en cuanto a la fisiología y especificidad de la misma:

a) La enzima presenta una actividad específica baja durante las primeras horas de crecimiento de *M. luteus*, la cual aumenta progresivamente a medida que transcurre la fase de crecimiento exponencial. Este comportamiento sitúa a la aminotransferasa, como una enzima típica del metabolismo secundario (MARTIN, J.F. y DENAIN, A.L., 1980).

b) El producto que resulta de las reacciones de transaminación con L-glutamina como amino donador, es el ácido  $\alpha$ -cetoglutarámico. La formación de este cetoácido en las reacciones mencionadas, favorece la síntesis de 2-DOS desde dos puntos de vista: La ciclización del mismo en la lactama 2-hidro-1-5-cetoprolina, permite la formación de los compuestos aminados de manera prácticamente irreversible (WALKER, J.B. y WALKER, M.S., 1982). Por otro lado, el cetoácido puede ser hidrolizado por la acción de la enzima 2-cetoglutarato-hidrolasa-amidasa, en ácido  $\alpha$ -cetoglutarico y amonio. Estos productos de hidrólisis pueden a su vez ser reutilizados para la síntesis de glutamina, via ácido glutámico. La actividad específica de la amidasa en *M. luteus* es paralela a la presentada por la aminotransferasa durante el crecimiento del microorganismo, por lo que esta es considerada también como una idioenzima.

En cuanto a las reacciones de deshidrogenación que participan en la biosíntesis de 2-DOS (reacciones 1 y 3 en la Fig. 2), existe poca información. SUZARE, I. y cols. (1982) purificaron parcialmente de *S. fragilis* la enzima desoxiinosamino-deshidrogenasa, determinando que esta requiere para su actividad NAD<sup>+</sup> y no NADP<sup>+</sup>. Finalmente, este mismo grupo de investigadores observaron que el ATP y el Mg<sup>2+</sup> no estimulan la conversión del intermediario DOI a 2-DOS, sugiriendo con esto que no se forman intermediarios fosforilados como sucede en la síntesis de estreptidina (DENAIN, A.L. y INAMINE, E. 1970).



### Biosíntesis del complejo gentamicina C<sub>1</sub> a partir del precursor 2-desoxistreptamínico:

La vía de biosíntesis que conduce a la formación del complejo gentamicina C<sub>1</sub> fue propuesta por TESTA, R.T. y TILLEY, R.C. en 1976, en base a estudios de bioconversión con sistemas de células en reposo. Para ello utilizaron una mutante 101ótrofa de *M. PURPUREUS* (paromamina<sup>+</sup>), incapaz de sintetizar el antibiótico bajo condiciones normales de fermentación y a la cual administraron los supuestos precursores determinando su incorporación en los diferentes componentes del complejo. Los productos resultantes de la incubación fueron identificados por técnicas cromatográficas (WAGMAN, G.H. y cols., 1972). Mediante estos estudios se logró establecer que la vía biosintética de gentamicina C es ramificada: el antibiótico JI-20A conduce a la formación de la gentamicina C<sub>1a</sub> y el antibiótico G-418 a la de las gentamicinas C<sub>2</sub> y C<sub>1</sub>.

Esta ruta biosintética fue estudiada también por el grupo de ODAKURA, Y. y cols. (1983), utilizando mutantes de *M. lagamidis* bloqueadas en diferentes pasos de la vía.

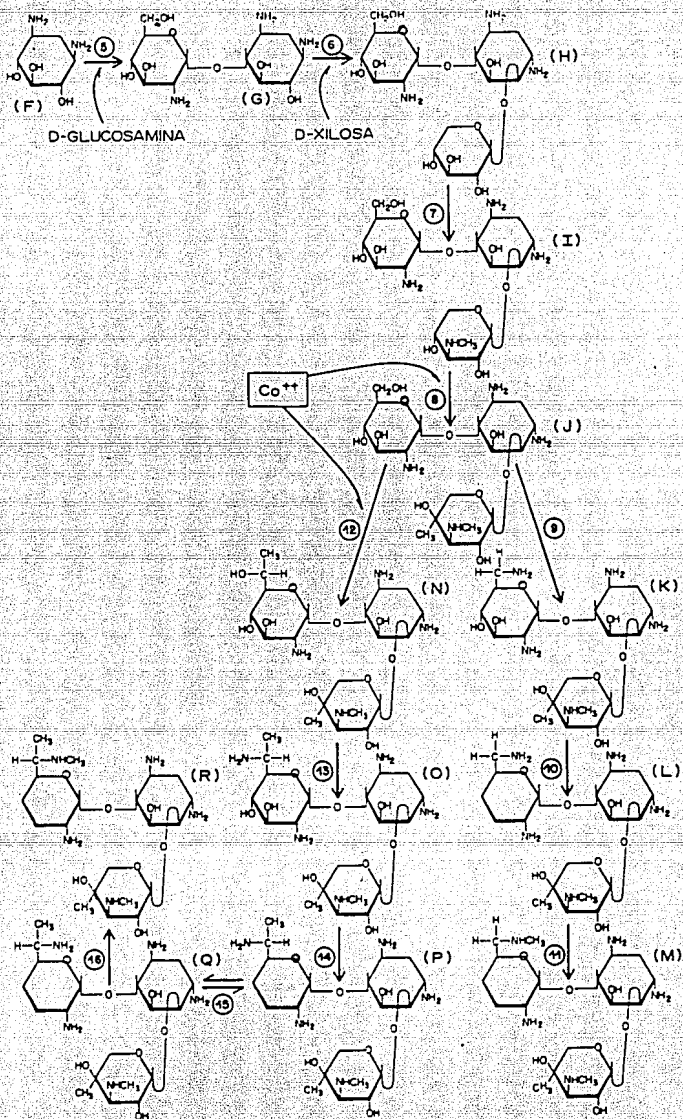
La etapa inicial de la biosíntesis de gentamicina, mostrada en la Fig. 3, comprende la condensación del grupo aminociclitol 2-DOS (F) con el aminoazúcar D-glucosamina, mediante un enlace glucosídico, para dar lugar a la formación del pseudodisacárido paromamina (G) (reacción 5). Este a su vez se condensa con el azúcar D-xilosa para formar el pseudotrisacárido gentamicina A<sub>2</sub> (H) (reacción 6), que es la primera unidad estructural de la cual se derivan las gentamicinas del complejo C. Tanto D-glucosamina como D-xilosa provienen de D-glucosa (RINEHART, K.L. y STROSHANE, R.M., 1976).

La gentamicina A<sub>2</sub> (H) se transforma en gentamicina A (I) a través de una reacción de aminación seguida de una N-metilación en el C-3" (reacción 7). Posteriormente, la gentamicina A<sub>2</sub> se convierte en gentamicina K<sub>2</sub> (J) mediante una C-metilación con inversión de la configuración en el C-4" (reacción 8). En este punto, la vía de biosíntesis se ramifica en dos, una de ellas da lugar a la síntesis de gentamicina C<sub>1a</sub> (L) y la otra a la de las gentamicinas C<sub>2</sub> (Q) y C<sub>1</sub> (R):

#### a) Biosíntesis de gentamicina C<sub>1a</sub> a partir de gentamicina K<sub>2</sub>:

La gentamicina K<sub>2</sub> (J) experimenta una aminosustitución en el C-6' (reacción 9), para dar lugar a la formación del antibiótico JI-20A (K), el cual se transforma finalmente en gentamicina C<sub>1a</sub> (L) mediante deshidroxilación en los carbonos 3' y 4' (reacción 10). La gentamicina C<sub>1a</sub> puede ser transformada a gentamicina C<sub>2b</sub> (sagamicina) (M) a través de una N-metilación en el C-6' (reacción 11). En *M. PURPUREUS*, la sagamicina se obtiene únicamente como subproducto de la fermentación.

Fig. 3 RUTA BIOSINTETICA DEL COMPLEJO GENTAMICINA C A PARTIR DE 2- DESOXIESTREPTAMINA.



**REACCIONES E INTERMEDIARIOS DE LA RUTA BIOSINTETICA DEL COMPLEJO GENTAMICINA C A PARTIR DE 2-DOS, (FIG. 3):**

**REACCION:**

- 5.- Incorporación de D-glucosamina.
- 6.- Incorporación de D-xilosa.
- 7.- Aminosustitución y N-metilación en el C-3"
- 8.- C-metilación con inversión de la configuración en el C-4".
- 9.- Aminosustitución en el C-6'.
- 10.- Deshidroxilación en los carbonos 3' y 4'.
- 11.- N-metilación en el C-6'.
- 12.- C-metilación con inversión en la configuración en el C-6'.
- 13.- Aminosustitución en el C-6'.
- 14.- Deshidroxilación en los carbonos 3' y 4'.
- 15.- Epimerización en el C-6'.
- 16.- N-metilación en el C-6'.

**COMPUESTO:**

- (F) 2-Desoxiestreptamina.
- (G) Paromamina.
- (H) Gentamicina A2.
- (I) Gentamicina A.
- (J) Gentamicina A2.
- (K) Antibiótico JI-20A.
- (L) Gentamicina C1a.
- (M) Gentamicina C2b (sagamicina).
- (N) Antibiótico G-418.
- (O) Antibiótico JI-20B.
- (P) Gentamicina C2a.
- (Q) Gentamicina C2.
- (R) Gentamicina C1.

**Fuentes:** TESTA, R.T. y TILLEY, R.C., 1976.  
PEARCE, C.J. y RINEHART, K.L., 1981.  
ODAKURA, Y. y cols., 1983.

mientras que en *M. farinosus*, este es el producto principal de la ruta biosintética (ODAKURA, Y. y cols., 1983; PEARCE, C.J. y RINEHART, K.L., 1981).

b) Biosíntesis de las gentamicinas C1 y C2 a partir de gentamicina A2:

La gentamicina M2 (J), se transforma en el antibiótico G-418 (N) a través de una reacción de C-metilación con inversión de la configuración en el C-6' (reacción 12), el cual es convertido al antibiótico JI-20B (O) por una aminosustitución en el C-6' (reacción 13). El antibiótico JI-20B experimenta una deshidroxilación en los carbonos 3' y 4' (reacción 14) formando la gentamicina C2a (P), la cual se epimeriza en el C-6' (reacción 15) para sintetizar la gentamicina C2 (Q). Finalmente esta se transforma en gentamicina C1 (R) a través de una N-metilación en el C-6' (reacción 16).

Como ya se mencionó anteriormente, durante la conversión del intermediario gentamicina A2 a las gentamicinas C1, C1a y C2, se llevan a cabo 2 C-metilaciones (reacciones 8 y 12) y una N-metilación (reacción 7). En un estudio realizado por LEE, B.K. y cols. (1976), se comprobó que tanto los N-metil como los C-metil sustituyentes de los respectivos componentes del complejo C, provienen del aminoácido L-metionina. Los experimentos se llevaron a cabo adicionando L-(<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>)-metionina a un cultivo de *M. farinosus* y midiendo la incorporación del radical metilo marcado en el antibiótico. Otros aminoácidos que pueden servir como donadores de grupos metilo, aunque de una manera menos eficiente son glicina y L-serina (KRASNOVA, T.P. y cols., 1979).

Estudios realizados por ODAKURA, Y. y cols. (1983), demostraron que las reacciones de C-metilación, requieren del ion Co(+2) para su actividad. En sus experimentos observaron que en presencia de concentraciones mayores a 50 µg/l de cloruro de cobalto, la producción de gentamicina C1 excede a la de *farinosus* en *M. farinosus*. Por otro lado, se ha reportado que la adición de sales de cobalto o vitamina B<sub>12</sub> a un medio químicamente definido, incrementa considerablemente la producción de gentamicina en *M. farinosus* (ABOU-ZEID, A. y cols., 1976; KRASNOVA, T.P. y cols., 1979).

Las reacciones involucradas en la síntesis de gentamicina son aparentemente reversibles. LEE, B.K. y cols. (1976), observaron que las gentamicinas C1, C1a y C2 marcadas con <sup>14</sup>C, cuando eran incubadas en cultivos de *M. farinosus*, formaban gentamicina M2 y el antibiótico G-418. Sin embargo, no se sabe aún si estos dos compuestos son productos de la degradación enzimática del complejo gentamicina C o si se obtienen mediante un mecanismo de hidrólisis.

### 3.4 FERMENTACION

Existen pocos reportes en la literatura relacionados con los aspectos prácticos de la producción comercial de gentamicina y otros antibióticos aminoglucosídicos, debido a su carácter confidencial; sin embargo, es posible describir algunos procedimientos generales (BERDY, J. y JARAI, M., 1986-b):

La producción fermentativa de gentamicina se lleva a cabo por lo general en cultivos sumergidos utilizando la cepa Micromonospora purpurea NRRL 2953 o mutantes derivadas de la misma.

Los sustratos comúnmente utilizados como fuente de carbono son: almidón, dextrinas, glucosa y otros materiales mas económicos como melazas de caña, ya sean solos o en mezclas. En cuanto a la fuente de nitrógeno, las mas utilizadas son: harina de soya, agua de cocimiento de maiz, harina de semilla de algodón, hidrolizados de caseína, extracto de levadura y sales como sulfato de amonio y nitrato de amonio en una concentración entre 0.3 y 0.7% (p/v). El medio de producción es suplementado con sales minerales, en especial se requiere el cloruro de cobalto en una concentración entre 0.6 y 1.8 ppm, para una producción elevada del antibiótico (OGAKURA, Y. y cols., 1983).

La fermentación en lote se lleva a cabo entre 5 y 7 días a una temperatura de 30 a 35 °C y pH ligeramente alcalino (7.5 a 8). Se ha visto que el pH óptimo para el crecimiento de M. purpurea y el de la producción de gentamicina, son muy similares (GRACHEVA, I.V. y cols., 1976).

La producción de gentamicina se lleva a cabo en tanques de fermentación con capacidad de 1000 l, conteniendo un volumen total de 600 ml de medio de cultivo inoculado. Las condiciones de agitación y aereación requeridas en el proceso fermentativo, van de 80 a 120 rpm y 0.6 a 0.8 vvm, respectivamente. Se ha determinado que uno de los principales problemas que se presentan durante este proceso fermentativo, es el aumento de la viscosidad en el medio de cultivo al incrementarse la concentración de micelio. La deficiencia de oxígeno disuelto en el medio, repercute en una disminución de la productividad del microorganismo para producir el antibiótico, sin afectar la proporción de los componentes que integran el complejo C (LAZNIKOVA, T.N. y cols., 1978).

Otro problema que se presenta durante la producción fermentativa de gentamicina, es que solo una parte del antibiótico es excretada al medio de cultivo. El mismo fenómeno ocurre durante la producción de otros antibióticos sintetizados por microorganismos del género Micromonospora, tales como sisomicina y verdamicina. Las moléculas de estos antibióticos se encuentran unidas, mediante enlaces iónicos, a la pared celular de los microorganismos productores. Una de las estrategias que se han propuesto para liberar el antibiótico al medio de

cultivo y aumentar así el rendimiento en el proceso fermentativo, es mediante la adición de cloruro de sodio en concentraciones y tiempos de fermentación apropiados, que no afecten el crecimiento del microorganismo (CHUL, S.S. y cols., 1988).

La acumulación de gentamicina ocurre normalmente en la fase tardía del crecimiento logarítmico del microorganismo, o al iniciar la fase estacionaria. Los niveles de producción de este antibiótico son cercanos a 1.9 g/l en 144 hrs de fermentación.

Los métodos más comunes para su detección en el medio de cultivo son por ensayo microbiológico, utilizando un microorganismo sensible al antibiótico (ROSNER, A. y AVIV, H., 1980) o por cromatografía de líquidos de alta resolución (ANHALT, J.P. y cols., 1978; SOUZA, J.D. y OGILVIE, R.I., 1982).

El método comúnmente utilizado para separar la gentamicina del caldo de fermentación, es el de cromatografía de intercambio iónico. Aproximadamente el 55% de la actividad total original presente en el caldo de fermentación se recupera por este procedimiento (ABOU-ZEID, A.A. y SHEHATA, Y.M., 1977).

### 3.5 REGULACION

Aunque la regulación de la biosíntesis de gentamicina ha sido poco estudiada, existen reportes en la literatura de los que es posible deducir algunos de los mecanismos regulatorios que pudieran estar controlando la formación de este antibiótico.

#### Efecto de la fuente de carbono:

Cuando en el medio de cultivo se encuentra presente una fuente de carbono de rápida utilización, ésta o un derivado de su metabolismo interfiere con la formación de los antibióticos, ya sea a través de represión o de inhibición de las síntesis del antibiótico. Tal efecto es liberado una vez que la fuente de carbono se agota en el medio de cultivo (HU BSc, W.S. y DEMAIN, A.L., 1979).

Son muchos los antibióticos cuyas síntesis están sujetas a represión catabólica por la fuente de carbono. Uno de los más estudiados es el ejercido por glucosa en las síntesis de actinomicina (JONES, G.H., 1985) y penicilina (REVILLA, G. y cols., 1986). Un ejemplo de inhibición catabólica ejercida por glucosa es el de la síntesis de cefalosporina C (DEMAIN, A.L. y KENNEL, Y.M., 1978).

En lo que respecta a la biosíntesis de gentamicina, estudios experimentales realizados con la cepa silvestre *M. purpurea* NRRL 2953, han mostrado que al incrementar la concentración de D-glucosa y D-manosa en el medio de cultivo, se produce un efecto

de supresión de la síntesis de gentamicina. Un análogo estructural de la D-glucosa, la 2-desoxi-D-glucosa, es capaz de suprimir la formación del antibiótico de manera similar. El efecto negativo ejercido por la D-glucosa y su análogo se observa cuando éstos son adicionados al medio de cultivo entre las 0 y las 60 horas de fermentación. Se ha propuesto que la D-glucosa PER se causa un efecto de represión catabólica sobre la formación de gentamicina (ESCALANTE L., 1988).

#### Efecto de la fuente de fosfatos:

La regulación por fosfatos se presenta en la biosíntesis de diversos antibióticos ejerciendo un efecto negativo en la mayoría de los casos, ya sea de tipo inhibitorio o represivo. El agotamiento de este nutriente en el medio de cultivo, marca el inicio de la síntesis del antibiótico.

El mecanismo a través del cual el fosfato ejerce su efecto negativo, puede deberse a un incremento de la concentración de ATP en la célula o bien a un control sobre las fosfatasa involucradas en la biosíntesis de intermediarios fosforilados mediante represión o inhibición por producto final (MARTIN, J.F. y DEMAİN, A.L., 1980).

La regulación por fosfatos ha sido detectada en la biosíntesis de tilosina (OMURA, S. y cols., 1984a), en la de candidicina (MARTIN, J.F. y DEMAİN, A.L., 1976) y en la de estreptomicina (WALKER, M.S. y WALKER, J.B., 1971).

Estudios realizados con la cepa M. purpurea NRRL 2953, han mostrado que la biosíntesis de gentamicina también está sujeta a regulación por fosfatos. En una serie de experimentos llevados a cabo en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de fosfato de potasio, se detectó que cuando la concentración de esta sal es mayor a 1 g/l, la producción del antibiótico disminuye considerablemente sin afectar el pH ni el crecimiento del microorganismo productor. Por otro lado, experimentos realizados en sistemas de células en reposo, delimitaron el efecto negativo de la fuente de fosfatos a un fenómeno de represión. El sitio de acción del fosfato en la síntesis de gentamicina, no ha sido aún esclarecido (OBREGON, A.M. y SANCHEZ, S., 1988).

#### Efecto de la fuente de nitrógeno:

Se ha visto que la presencia de iones amonio en el medio de cultivo disminuye la producción de muchos antibióticos. El mecanismo regulatorio estudiado en la mayoría de los casos es el de represión, pero a diferentes niveles. En algunos casos, el amonio actúa sobre las enzimas responsables de su asimilación, disminuyendo de esta forma la disponibilidad de ciertos aminoácidos precursores. En otras ocasiones, el amonio

controla directamente la formación de enzimas específicas, involucradas en la biosíntesis de los antibióticos (AHARONOWITZ, Y., 1980; AHARONOWITZ, Y. y DEMAIN, A.L., 1978).

El ion amonio puede también ejercer un efecto estimulatorio en la biosíntesis de algunos antibióticos, como son los casos de la estreptomina (INDUE, S., y cols., 1983) y la neomicina (OKAZAKI, H. y cols., 1973). Como ya se explicó anteriormente, los antibióticos aminoglucosídicos contienen en sus moléculas un grupo aminociclitol sustituyente, en cuya síntesis están involucradas reacciones de transaminación (WALKER, J.B., 1978 y 1980). Ya que el aminoácido L-glutamina es el principal donador de grupos amino en las reacciones mencionadas, es posible que el amonio estimule la formación de los antibióticos a través de la síntesis de este aminoácido.

En un estudio realizado por ABOU-ZEID, A. y cols. (1976), se determinó la influencia de diferentes aminoácidos en la biosíntesis de gentamicina en *M. purpurea*. La adición de DL-metionina a un medio mínimo resultó en un incremento considerable del antibiótico, ya que tanto los C-CH<sub>3</sub> como los N-CH<sub>3</sub> sustituyentes de la gentamicina, provienen de metionina.

#### Retroregulación:

Otro mecanismo regulatorio que controla la biosíntesis de los antibióticos es el de retroregulación, ya sea a través de inhibición o represión por producto final de las sintetazas responsables de su biosíntesis. Se ha visto que la concentración del antibiótico que es requerida para suprimir su biosíntesis, es muy similar a la que es capaz de producir el mismo microorganismo. Algunos ejemplos de los antibióticos cuyos biosíntesis están sujetos a este tipo de control son: cicloheximida, cloranfenicol, ristomicina, puromicina y penicilina (MARTIN, J.F. y DEMAIN, A.L., 1980). Hasta la fecha, no se han tenido reportes que indiquen que la gentamicina regule su propia biosíntesis.

Ciertos actinomicetos que producen antibióticos aminoglucosídicos, presentan resistencia a sus productos, lo cual hace favorable su producción a gran escala. En un estudio realizado con 200 actinomicetos aislados del suelo, entre ellos diferentes cepas de *M. purpurea*, se detectó que aquellos que presentaron resistencia a sus antibióticos, también fueron buenos productores de los mismos; por el contrario, los sensibles, produjeron en menor proporción sus antibióticos (HOTTA, K. y cols., 1983).

Los mecanismos de detoxificación que emplean los microorganismos contra el efecto de sus productos son de dos tipos: mediante la acción de enzimas inactivantes de las moléculas del antibiótico, y por la presencia de ribosomas alterados por metilación del ARN ribosomal (CUNDLIFFE, E., 1989).



La presencia de enzimas inactivantes se ha detectado en microorganismos que producen neomicina, kanamicina y ribostamicina, ya que se han encontrado derivados N-acetilados, biológicamente inactivos, de estos antibióticos en caldos de fermentación. Adicionalmente se ha demostrado que cepas de *S. Kanamyceticus* y *S. fragilis*, a las que se les han introducido plásmidos que contienen el gen que codifica para la enzima inactivante d'N-acetiltransferasa, incrementan su nivel de producción de kanamicina y neomicina respectivamente, además de presentar una mayor resistencia a sus productos (CRAMERI, R. y DAVIES, J.E., 1986).

En un estudio realizado por PIENDL, W. y BOCK, A. (1982), se determinó que *M. luteopurpurea* no posee actividad de enzimas inactivantes de gentamicina, sin embargo se ha detectado la presencia de ribosomas resistentes a la acción de gentamicina y kanamicina.

El conocimiento de las vías biosintéticas que conducen a la formación de los diferentes antibióticos, así como de los mecanismos regulatorios que operan en las mismas y de la fisiología de los microorganismos productores, ha hecho posible el establecimiento de estrategias encaminadas tanto a su sobreproducción, como a la obtención de nuevos antibióticos que presenten ventajas sobre los naturales (DEMAIN, A.L., 1973; VOURNAKIS, J.N. y ELANDER, R.P., 1983).

La producción de muchos antibióticos se ha logrado incrementar mediante la obtención de: mutantes resistentes a productos tóxicos, ya sean precursores, factores nutricionales o productos finales; mutantes resistentes a iones metálicos que forman complejos con los antibióticos y selección de mutantes auxotróficas de intermediarios biosintéticos, seguida de reversión prototrófica. Otras posibilidades de incrementar la producción de los antibióticos es mediante el uso de técnicas de transformación microbiana, así como de fusión y regeneración de protoplastos (DEMAIN, A.L., 1982).

## 4 REGULACION NITROGENADA

### 4.1 ASIMILACION DE AMONIO

En todos los sistemas biológicos, la utilización de compuestos nitrogenados para la formación de macromoléculas, es esencial para el crecimiento.

Las vías del metabolismo nitrogenado, se pueden dividir en dos clases:

- a) Vías de asimilación necesarias para la utilización de compuestos nitrogenados disponibles en el medio.
- b) Vías biosintéticas necesarias para la producción de compuestos nitrogenados que forman la parte estructural de la célula.

Los pasos específicos de estas rutas metabólicas varían para cada organismo, pero virtualmente en todas las células, los aminoácidos ácido glutámico y glutamina sirven como donadores de nitrógeno en las reacciones biosintéticas. El ácido glutámico, es por lo general el principal donador de grupos amino para la formación de otros aminoácidos, mientras que la glutamina lo es de grupos amido para la síntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas y otros compuestos nitrogenados (UMBARGER, H.E., 1978).

Gran parte de los estudios concernientes a la regulación nitrogenada, se han realizado en bacterias entéricas, en las cuales opera un control general que determina la formación y/o actividad de las enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno para la formación de ácido glutámico y glutamina (AHAPUNOWITZ, Y., 1980).

#### Formación de ácido glutámico y glutamina a partir de amonio:

TYLER, B., (1978), ha resumido el estado actual del conocimiento concerniente a la regulación de la asimilación de amonio en bacterias entéricas. Como resultado de un extenso estudio genético y bioquímico, se ha propuesto la existencia de varios factores que determinan el control de la asimilación de amonio para la síntesis de ácido glutámico y glutamina.

La glutamina es sintetizada en las células por la incorporación de amonio en ácido glutámico mediante una reacción dependiente de ATP, catalizada por la enzima GLUTAMINA SINTETASA (GS), L-glutamato: amonio ligasa, EC 6.3.1.2. Por otro lado, el ácido glutámico puede ser sintetizado por cualquiera de las siguientes reacciones:

a) A partir de la aminación reductiva del ácido  $\alpha$ -cetoglutarico con amonio mediante una reacción reversible catalizada por la enzima GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH), L-glutamato: NADP<sup>+</sup> oxidoreductasa. EC 1.4.1.4.

b) Como resultado del acoplamiento de 2 reacciones enzimáticas catalizadas por las enzimas GLUTAMINA SINTETASA (GS) y GLUTAMATO SINTASA (GGGAT), L-glutamato: NADP<sup>+</sup> oxidoreductasa, 1.4.1.13.

c) A partir de la degradación catabólica de otros aminoácidos.

d) A partir de grupos amino de otros aminoácidos y ácido  $\alpha$ -cetoglutarico por reacciones de transaminación: ALANINA TRANSAMINASA y ASPARTATO TRANSAMINASA entre otras.

Se ha propuesto que en algunos microorganismos, como *N. crassa*, la GS es el blanco principal de la regulación nitrogenada, siendo la glutamina un indicador intracelular del grado de disponibilidad de nitrógeno en la célula. Al mismo tiempo, esta enzima es capaz de regular otras enzimas del metabolismo nitrogenado para favorecer la economía celular (KANAMORI, K. y cols., 1982). Su actividad está regulada por diferentes mecanismos: por su interconversión de la forma activa a inactiva en respuesta a variaciones de la concentración de iones divalentes; por retroinhibición acumulativa de productos finales del metabolismo de glutamina y/o por alteraciones covalentes causadas por adenilación en residuos de tirosina en cada subunidad de la enzima (SHAPIRO, B.M. y STADTMAN, E.R., 1970; FOOR, F. y cols., 1980; PAHEL, G. y TYLER, E., 1979).

La enzima GDH, se encuentra presente en una gran variedad de microorganismos. Por lo general, su actividad es alta cuando el amonio se encuentra disponible en el medio de cultivo en concentraciones elevadas (HIM, C.H. y HOLLOCHER, T.C., 1982). Se ha visto que microorganismos que no presentan actividad de GDH o mutantes GDH<sup>-</sup>, pueden crecer tanto en ausencia de ácido glutámico como en altas y bajas concentraciones de amonio (McCARTHY, C.M. y ALVAREZ, M.E., 1985). Estos hechos sugieren que la GDH no es indispensable para el crecimiento celular y que su actividad puede ser suplida por el sistema GS/GGGAT (BROWN, C.M., 1980).

GGGAT no es el único sistema existente para la formación de ácido glutámico a partir de glutamina. Existen evidencias experimentales de que en el hongo *N. crassa*, la conversión de glutamina en ácido glutámico puede llevarse a cabo también por la acción coordinada de 2 enzimas: En el primer paso, la glutamina experimenta una transaminación con el ácido  $\alpha$ -cetoglutarico para rendir ácido glutámico y ácido  $\alpha$ -cetoglutarámico a través de la participación de la enzima GLUTAMINA-TRANSAMINASA. El ácido  $\alpha$ -cetoglutarámico formado es hidrolizado a ácido  $\alpha$ -cetoglutarico y amonio por la acción de la enzima  $\alpha$ -AMIDASA (CALDERON, J. y cols., 1985). Aparentemente, el propósito de la existencia de la enzima

w-amidasa en el hongo, es que el amonio liberado pueda ser reasimilado por las enzimas GDH y GS para la síntesis de ácido glutámico con la acción conjunta de la enzima GOGAT. Estos estudios sugieren que en el hongo *N. crassa*, la operación de las 5 enzimas mencionadas permite que exista el denominado "ciclo de glutamina", el cual resulta esencial para el crecimiento del microorganismo (CALDERON, J. y MORA, J., 1985).

### Funcion de la enzima alanina deshidrogenasa en la asimilación de amonio.

La enzima ALANINA DESHIDROGENASA (ADH), L-alanina: NAD<sup>+</sup> oxidoreductasa, EC 1.4.1.1, juega también un papel muy importante en la asimilación de amonio. Esta enzima cataliza la reacción de aminación reductiva del ácido pirúvico a partir de amonio para dar lugar a la formación de alanina. Se ha visto que microorganismos que no presentan actividad de GDH, utilizan ADH como vía alternativa para la asimilación de amonio cuando éste se encuentra disponible en concentraciones elevadas (KENEALY, W.R. y cols., 1982).

Se ha detectado actividad de ADH en diversos microorganismos del género *Streptomyces* (FISHER, S.H., 1988). En *S. clavuligerus*, la actividad específica de ADH aumenta proporcionalmente a la concentración extracelular de iones amonio. Mutantes ADH<sup>-</sup> de este microorganismo crecen normalmente en amonio, ya que éste es asimilado vía el sistema GS/GOGAT; sin embargo, son incapaces de crecer en presencia de alanina. La razón por la cual sucede este fenómeno, es que la alanina es un fuerte inhibidor de GS en este microorganismo, de manera que las actividades de ADH y GS, están en cierta forma relacionadas (BRANA, A.F. y cols., 1986).

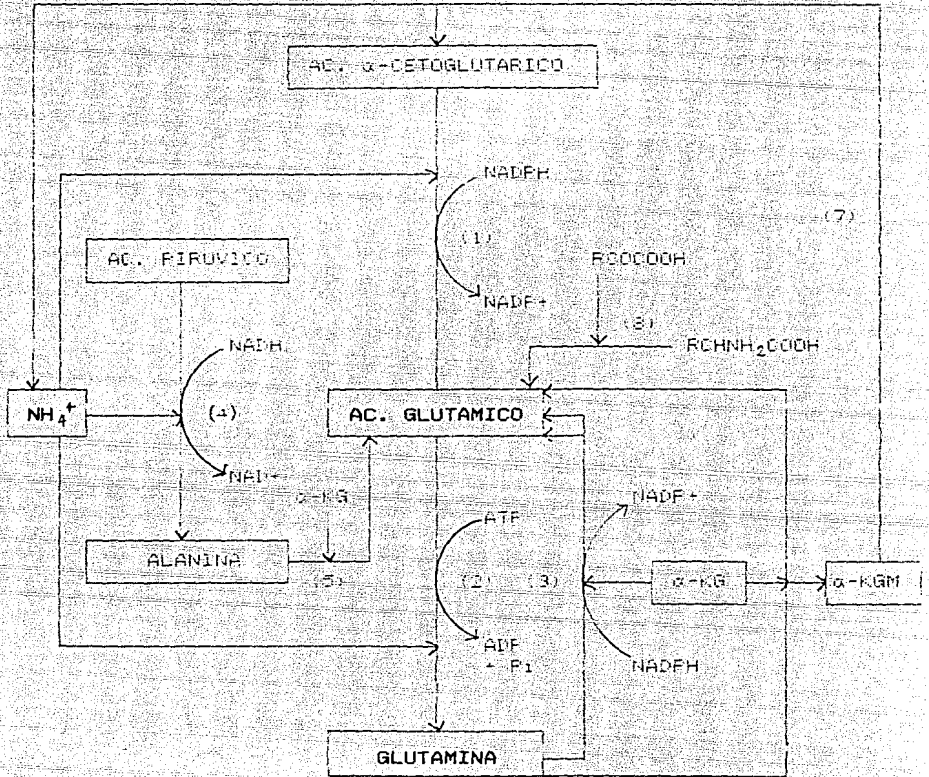
En *S. venezuelae* también se ha detectado actividad de ADH, (SHAPIRO, S. y VINING, L.C., 1983). Se ha visto que la alanina se acumula intracelularmente en el microorganismo bajo condiciones de exceso de amonio siempre y cuando la demanda por el ácido glutámico sea baja. De esta manera, la alanina se conserva en la célula como una reserva de amonio y ácido pirúvico (SHAPIRO, S. y cols., 1985).

Los mecanismos de regulación de la enzima ADH no han sido muy estudiados, sin embargo se sabe que la alanina induce fuertemente la síntesis de la enzima en *S. clavuligerus* (AHARONOWITZ, Y. y FRIEDRICH, C., 1980) y en *S. erythraeus* (ROSKOWSKI, J. y cols., 1969).

En la Fig. 4 se esquematizan las rutas existentes para la asimilación de amonio que dan lugar a la formación de ácido glutámico y glutamina en los microorganismos.

FIGURA 4

VIAS DE ASIMILACION DE AMONIO PARA LA FORMACION DE ACIDO GLUTAMICO Y GLUTAMINA



- (1) Glutamato-deshidrogenasa (GDH).       $\alpha$ -KG = Ac.  $\alpha$ -cetoglutarico  
 (2) Glutamina-sintetasa (GS).           $\alpha$ -KGM = Ac.  $\alpha$ -cetoglutaramico  
 (3) Glutamato-sintasa (GOGAT).  
 (4) Alanina-deshidrogenasa (AHD).  
 (5) Alanina-transaminasa.  
 (6) Glutamina-transaminasa  
 (7) W-amidasa.  
 (8) Otras transaminasas.

Fuentes: Tyler, B., 1978.  
 Brown, C.W., 1980.  
 Kim, C.H. y Hollocher, T.C., 1982.  
 Calderon, J. y cols., 1985.  
 Calderon, J. y Mora, J., 1985.  
 Fisher, S.H., 1988.

## 4.2 ANTIBIOTICOS SUJETOS A REGULACION NITROGENADA

El amonio interfiere con la producción de muchos antibióticos, presentando un efecto negativo en la mayoría de los casos (AHARONOWITZ, Y., 1980). Los mecanismos mediante los cuales ocurre este fenómeno, son muy variados. En algunos casos, el amonio per se o un derivado de su metabolismo, es capaz de reprimir una o varias enzimas involucradas en la biosíntesis de los antibióticos, expresándose el efecto negativo cuando el amonio se adiciona a tiempos tempranos del crecimiento de los microorganismos productores. En otros, el amonio actúa directamente sobre las enzimas responsables de su asimilación, afectando de esta manera la disponibilidad de precursores. Tales precursores pueden ser directamente aminoácidos u otros metabolitos derivados de estos, estableciéndose así un enlace entre el metabolismo primario y el secundario (DREW, S.W. y DEMAIN, A.L., 1977).

El amonio puede interferir también con la entrada a la célula de ciertos precursores presentes en el medio de cultivo, disminuyendo la producción de los antibióticos.

Por otro lado, el efecto negativo causado por el amonio, no se restringe al metabolismo de compuestos nitrogenados, ya que puede afectar, como se mencionará más adelante, la generación de ácidos grasos de cadena corta a partir de succinato (TANAKA, Y., y cols., 1986).

Algunos ejemplos de los antibióticos estudiados, cuyas síntesis están sujetas a regulación por amonio, se mencionan a continuación:

### 1.- Nanaomicina.

Concentraciones mayores a 2 mg/ml (15mM) de sulfato de amonio, afectan significativamente la producción del antibiótico sin presentar cambios apreciables en el crecimiento de Streptomyces rosa. Tal efecto puede ser prevenido con la adición de zeolita, permitiendo una acción amortiguadora en la liberación lenta de iones amonio (TANAKA, Y. y cols., 1984).

### 2.- Tilosina.

El amonio presenta un efecto negativo sobre la producción de tilosina en Streptomyces fradiae. Cuando a un medio mínimo se adiciona sulfato de amonio en una concentración inicial de 50 mM, la producción específica del antibiótico se reduce en un 73% (MURA, S. y cols., 1984a). Otras investigaciones realizadas con este antibiótico han demostrado que el blanco de acción presentado por el amonio, está en el paso anterior a la síntesis del precursor protilonolida (MURA, S. y cols., 1984b). Tal precursor es sintetizado por el microorganismo mediante la

condensación de tres unidades estructurales: acetato, propionato y butirato. TANAKA, Y. y cols. (1986), demostraron que la formación de acetato y propionato a partir de sus precursores valina, treonina y succinato, está regulada por amonio. Por otro lado, VU-TRONG, K y GRAY, P.F. (1987), determinaron que las actividades específicas de las enzimas propionil Co-A carboxilasa y metilmalonil Co-A carbo-iltransferasa, responsables de la formación del precursor protionolida, disminuyen marcadamente cuando el microorganismo es precrecido en altas concentraciones de amonio. Al igual que en el caso de la nanaomicina, la adición de zeolita al medio de cultivo permite la liberación lenta de iones amonio, incrementándose tres veces la producción específica de tilosina (MASUMA, R. y cols., 1983).

### 3.- Cefalosporina.

La producción de cefalosporina es afectada negativamente por altas concentraciones de amonio, ejerciendo su efecto en la fase temprana del crecimiento logarítmico de *Streptomyces clavuligerus*. La adición de cloruro de amonio en una concentración de 40 mM a un cultivo crecido en asparagina, reduce la producción del antibiótico en un 75% (AHARONOWITZ, Y. y DEMAİN, A.L. 1979). Experimentos realizados en sistemas de células en reposo, demostraron que el amonio reprime la isopenicilina N-sintetasa (ciclasa), una de las enzimas involucradas en la formación del antibiótico. Por otro lado, la adición de fosfato de magnesio tribásico (atrapador de iones amonio), previene el efecto negativo causado por el amonio, tanto en la formación de la enzima ciclasa, como en la producción del antibiótico (BRAGA, A.F. y cols., 1985).

### 4.- Cloranfenicol.

Quando se crece *Streptomyces venezuelae* en un medio mínimo con prolina como fuente de nitrógeno, la adición de sulfato de amonio en una concentración de 15 mM durante la fase temprana del crecimiento exponencial, provoca una interrupción en la biosíntesis del antibiótico. Esta se vuelve a iniciar, una vez que se ha consumido el amonio en el medio de cultivo. No se conoce aún el mecanismo a través del cual el amonio ejerce su efecto negativo sobre la síntesis de este antibiótico (SHAPIRO, S. y VINING, L.C., 1983 y 1985).

### 5.- Leucomicina.

Se ha observado que la adición temprana de 1 mg/ml (7.6 mM) de sulfato de amonio a un cultivo de *Streptomyces litasatoensis* con L-lisina como fuente de nitrógeno, disminuye en un 50% la producción específica de leucomicina. Aunque se desconocen las bases bioquímicas de este fenómeno, se piensa que el ion amonio

puede ejercer su efecto a través de la síntesis de los precursores micamínosa, grupo aglicónico y/o cadenas laterales, en cuyas síntesis estén a su vez involucrados los aminoácidos valina y leucina (OMURA, S. y cols., 1980).

#### 6.- Eritromicinas.

La producción de eritromicina por *Streptomyces erythraeus* es reprimida en presencia de elevadas concentraciones de amonio. El máximo efecto se observa con la adición de 100 mM de sulfato de amonio al medio de cultivo, causando un 92% de supresión (FLORES, M.E. y SANCHEZ, S., 1985). En otros estudios relacionados con el efecto que tienen ciertos aminoácidos en la biosíntesis de eritromicina, se determinó que la alanina estimule considerablemente la producción del antibiótico. Apparently, la utilización de este aminoácido para el crecimiento del microorganismo e incremento de eritromicina está asociada con niveles altos de ADH (ROSEKOWSKI, J. y cols., 1969).

#### 7.- Nourseotricina.

Existe una relación entre el metabolismo nitrogenado y la producción de nourseotricina en *Streptomyces noursei*. Se ha encontrado que el ácido o-aminobenzoico (OABA), estimula la producción de este antibiótico mediante la inhibición del catabolismo de aminoácidos. El caso contrario se presenta cuando altas concentraciones de amonio se adicionan al medio de cultivo, en donde se favorece el catabolismo de aminoácidos, como consecuencia una baja producción de nourseotricina. La hipótesis que se ha manejado para explicar este mecanismo, es que una disminución en la disponibilidad de aminoácidos puede evitar la síntesis de ciertos catabolitos nitrogenados capaces de reprimir la biosíntesis del antibiótico (GRAFE, U. y cols., 1977).

#### 8.- Penicilina.

El ion amonio afecta negativamente la formación de penicilina G en el hongo *Penicillium chrysogenum*, siendo su acción proporcional a la concentración presente en el medio de cultivo. Estudios experimentales realizados con este microorganismo han permitido delimitar el efecto del amonio sobre la enzima GS, a la vez se ha establecido una correlación directa entre la formación de glutamina y la capacidad del hongo para producir penicilina. Tal situación ha sugerido que la glutamina pudiera participar directamente en la formación de los precursores del antibiótico (SANCHEZ, S. y cols., 1980).



El amonio no solo ejerce un control negativo sobre la biosíntesis de los antibióticos. Se ha visto que la producción de algunos de ellos se ve estimulada al incrementar la concentración de iones amonio en el medio de cultivo. El caso más representativo es el de la estreptomina sintetizada por *Streptomyces griseus* (INOUE, S. y cols., 1983). En este estudio se encontró que concentraciones crecientes de sulfato de amonio, de 2 a 5 mg/l (15 a 37.8 mM), permiten incrementos proporcionales en la producción de estreptomina. Se encontró también que altas concentraciones de amonio favorecen la acumulación intracelular de los aminoácidos L-glutamato y L-glutamina durante la trofofase, mismos que se consumen al iniciar la síntesis de estreptomina. Por otro lado, la adición de estos aminoácidos en forma separada al inicio de la idiofase, estimulan significativamente la producción del antibiótico. A partir de estos resultados se ha sugerido que el amonio ejerce su efecto positivo a través de la síntesis de ácido glutámico y glutamina, ya que como es bien sabido, estos aminoácidos son requeridos en las reacciones de transaminación que conllevan a la formación de los azúcares aminados *cyllig*-inosamina y glucosamina 6-P, intermediarios en la síntesis del antibiótico (WALKER, J.B. y WALKER, M.S., 1969).

Un caso similar ocurre con la síntesis del tripeptido glutatión en *Penicillium chrysogenum*, cuya estructura química es muy similar a la del antibiótico penicilina. Se ha determinado que la producción de glutatión por el hongo se estimula en presencia de concentraciones mayores a 10 mM de cloruro de amonio. Similarmenete, las przas de los aminoácidos ácido glutámico, alanina y glutamina aumentan proporcionalmente al incremento de amonio en el medio de cultivo. Estos aminoácidos estimulan también la síntesis del tripeptido cuando se adicionan a sistemas de células en reposo. Ya que el ácido glutámico puede ser sintetizado a partir de alanina y glutamina mediante la actividad de las enzimas alanina-aminotransferasa y GOGAT respectivamente, se ha postulado que el efecto estimulatorio del amonio en la síntesis del tripeptido, se debe a la formación de ácido glutámico, constituyente estructural del glutatión (SCHWARTZ, R. y cols., 1988).

Existen casos en los que se ha encontrado una relación directa entre las enzimas responsables de la asimilación de amonio y la producción de ciertos antibióticos. En *Cephalosporium acremonium*, se determinó la actividad específica de GDH durante la fase estacionaria de crecimiento de mutantes de baja, mediana y alta productividad de cefalosporina C. Se encontró que niveles altos en la actividad específica de GDH están directamente relacionados con una alta productividad del antibiótico en estos microorganismos. Se ha postulado que las mutantes hiperproductoras de cefalosporina C, poseen una GDH desregulada. Por esta razón, el ácido glutámico se acumula intracelularmente favoreciendo la formación de

cefalosporina al servir como donador de grupos amino en la síntesis de los precursores  $\alpha$ -aminosidílicos, serina y valina (QUEENER, S.W. y cols., 1975).

Como puede deducirse al analizar estos ejemplos, no existe un mecanismo general que explique la forma como el amonio regula la biosíntesis de los antibióticos. El conocimiento de las bases moleculares y bioquímicas de tales mecanismos, es importante desde el punto de vista de su producción a gran escala, ya que podrían diseñarse medios de cultivo favorables para incrementar los rendimientos de estos metabolitos o procedimientos específicos para llevar a cabo los procesos fermentativos, así como obtener microorganismos modificados genéticamente que sean insensibles a dichos efectos regulatorios. Es por esto que la realización del presente trabajo pretende detectar el efecto que ejerce el ion amonio sobre la biosíntesis de gentamicina, lo cual permitirá establecer las bases para mejorar los niveles de producción que se obtienen actualmente de este antibiótico por vía fermentativa.

## 5. OBJETIVO

### Objetivo general:

Determinar y caracterizar el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción fermentativa de gentamicina, utilizando la cepa silvestre *Micromonospora purpurea* NRRL 2953, capaz de crecer y producir el antibiótico de referencia en condiciones de cultivo sumergido.

### Objetivos específicos:

- 1.- Diseñar un medio mínimo capaz de soportar el crecimiento de *M. purpurea* NRRL 2953 y la producción de gentamicina a fin de estudiar la influencia de la fuente de nitrógeno sobre ambos parámetros con un mínimo de interferencias.
- 2.- Estudiar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de sales de amonio al medio de cultivo, sobre la producción de gentamicina.
- 3.- Estudiar el efecto de la adición de ácido glutámico, glutamina y alanina al medio de cultivo, sobre la producción de gentamicina.

## 6 MATERIAL Y METODOS

### 6.1 MICROORGANISMOS

a) Micromonospora purpurea NRRL 2953 fue proporcionada por el "Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratories". Este microorganismo, de tipo silvestre, se empleo para la producción de gentamicina.

b) Bacillus subtilis ATCC 6633 se adquirió de la "American Type Culture Collection", Rockville, Md. 20852, U.S.A. y se empleo para la cuantificación de gentamicina por el método de difusión en agar (ROSNER, A. y AVIV, H., 1980).

### 6.2 MEDIOS DE CONSERVACION

#### a) Micromonospora purpurea:

Con el fin de asegurar la disponibilidad y estabilidad de la cepa, se preparó una suspensión de esporas en glicerol al 80% (v/v). Para ello, se sembró el microorganismo por estría en placas con el medio completo de conservación (M1), cuya composición es la siguiente:

#### MEDIO M1

Glucosa	1.0 %
Almidón soluble	2.0 %
Extracto de levadura	0.5 %
N2-amina	0.5 %
Carbonato de calcio	0.1 %
Agar	1.5 %

El microorganismo se incubó a 29 °C durante 7 días. Las esporas obtenidas se resuspendieron en solución de glicerol al 80% (v/v), en una proporción de 1 ml por cada placa sembrada. La suspensión de esporas se conservó a -20 °C hasta su uso.

#### b) Bacillus subtilis:

Este microorganismo se conservó en tubos inclinados con medio completo M2, cuya composición es la siguiente:

#### MEDIO M2

Extracto de levadura	1.0 %
Peptona	2.0 %
Glucosa	1.0 %
Agar	1.5 %

El microorganismo se resambió cada 3 semanas y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

### 6.3 PREPARACION DEL INOCULO

Se sembró una placa con el medio de conservación M1 utilizando 0.1 ml de suspensión de esporas en glicerol y se incubó a 29 °C durante 7 días. Las esporas obtenidas se transfirieron estérilmente a 50 ml de medio de crecimiento M3, contenidos en un matraz Erlenmayer de 250 ml. La composición porcentual de este medio, basado en el descrito para el género *Micromonospora* (PORTER, J.N., 1975), es la siguiente:

#### MEDIO M3

Extracto de carne	0.3%
Triptona	0.5%
Glucosa	0.1%
Almidón soluble	2.4%
Extracto de levadura	0.5%
Carbonato de calcio	0.4%
pH (CaCO <sub>3</sub> )	7.5

La incubación se llevó a cabo a 29 °C en una agitadora Corning Stirrer PC-353 a 160 rpm durante 60 hrs. El cultivo resultante se utilizó como inóculo para todos los experimentos.

### 6.4 FERMENTACIONES A NIVEL MATRAZ

Para estudiar el efecto de la fuente de nitrógeno en la síntesis de gentamicina, se utilizó un medio químicamente definido (M4), basado en el descrito por CARBAJAL (1957), para la producción de antibióticos aminoglucosídicos. La composición por litro de este medio es la siguiente:

#### MEDIO M4

Sacarosa	24.0 g
NH <sub>4</sub> Cl	2.02 g (40 mM)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5 g
NaCl	5.0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	20.0 mg

ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	50.0 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.0 mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.0 mg
CaCO <sub>3</sub>	3.0 g
pH (CaCO <sub>3</sub> )	7.5

Tanto la sacarosa como el fosfato de potasio se esterilizaron por separado.

Tal como se muestra en la sección de resultados (7), la concentración de cloruro de amonio varió desde 1.01 mg/ml (20 mM) hasta 10.1 mg/ml (200 mM) según el caso. En otros, se sustituyó esta sal por sulfato de amonio en concentraciones similares.

En los experimentos en los que se estudio el efecto de la glutamina, el ácido glutámico y la alanina, se adicionó cada aminoácido en forma independiente al medio de cultivo, en una concentración total de 10 mM desde el inicio de la fermentación. Las soluciones con los aminoácidos se esterilizaron por filtración, utilizando membranas Millipore de 0.45 µ.

Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo un volumen final de 50 ml.

Los medios se inocularon con 5% (v/v) de un cultivo obtenido según se indicó en la sección 6.3. La concentración de proteína inicial en los medios de fermentación inoculados fue de 0.02 mg/ml para todos los experimentos.

Las fermentaciones se llevaron a cabo a 29 °C en una agitadora Corning Stirrer PC-353 a 160 rpm durante 168 hrs, tomando muestras de 2 ml cada 24 hrs y se conservaron a -20 °C hasta la realización de las determinaciones analíticas correspondientes.

## 6.5 SISTEMA DE CELULAS EN REPOSO

Los experimentos realizados en sistema de células en reposo se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de una mezcla constituida por:

- 1.- 14.5 ml de solución amortiguadora MOPS 0.05 M, pH=7.4.
- 2.- 2.5 ml de solución concentrada de sales (10X) con la siguiente composición en g/l: cloruro de sodio, 50; sulfato de magnesio heptahidratado, 5; sulfato ferroso heptahidratado, 0.2; sulfato de cinc heptahidratado, 0.5; cloruro de manganeso tetrahidratado, 0.01; cloruro de cobalto hexahidratado, 0.01 y carbonato de calcio, 30.
- 3.- 3 ml de solución de la fuente de nitrógeno en estudio:

a) Cloruro de amonio: 0.054 g; 0.135 g y 0.202 g, para las concentraciones de 40, 100 y 150 mM respectivamente.

b) Acido glutámico o glutamina: 0.0183 g; 0.0367 g y 0.0734 g, para las concentraciones de 5, 10 y 20 mM respectivamente.

c) Alanina: 0.011 g; 0.0223 g y 0.0445 g, para las concentraciones de 5, 10 y 20 mM respectivamente.

4.- 0.5 ml de solución de cloranfenicol al 0.25% (p/v), para alcanzar una concentración en el medio igual a 50 µg/ml. La adición del inhibidor de síntesis de proteínas fue opcional, según se indica en el texto.

5.- 5 ml de inóculo obtenido de la siguiente manera:

Se sembró 0.1 ml de suspensión de esporas en una placa con el medio de conservación M1 y se incubó a 29 °C durante 7 días. Las esporas obtenidas se transfirieron esterilmente a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio completo de crecimiento M2 y se incubaron a 29 °C en una agitadora Corning Stirrer PC-353 a 160 rpm durante 60 hrs. Después de este tiempo, se transfirieron 2.5 ml del inóculo a un segundo matraz Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio mínimo M4 y se incubó nuevamente a 29 °C y 160 rpm durante 36 hrs. Las células obtenidas se separaron por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C en una centrifuga Sorvall RC-50, y se lavaron esterilmente por 3 veces consecutivas con solución amortiguadora MOPS 0.05 M pH=7.4. El paquete celular resultante se resuspendió finalmente en 5 ml de la misma solución amortiguadora. Esta suspensión sirvió como inóculo para los sistemas de células en reposo.

Los experimentos se llevaron a cabo en agitación a 160 rpm, y 29 °C, tomando muestras de 1 ml a las 0, 2.5, 5, 7.5 y 20 hrs para las determinaciones de proteína y producción de gentamicina.

## 6.6 METODOS DE ANALISIS

### 6.6.1 CRECIMIENTO CELULAR

La cuantificación del crecimiento se determinó mediante la medición de la proteína celular formada a diferentes tiempos de cada una de las condiciones experimentales empleadas. Para cada condición se tomó 1 ml de muestra y se centrifugó a 7,000 rpm, durante 10 min. El paquete celular se resuspendió en un volumen igual de solución de ácido tricloroacético al 10% (p/v) y se conservó a -20 °C por un lapso de 12 hrs. Después de este tiempo, las muestras se descongelaron y se centrifugaron nuevamente. El paquete celular se resuspendió finalmente en 1 ml de solución de NaOH 0.4 N. Se tomaron alícuotas de 200 µl y se aforaron a 1 ml con agua bidestilada para la cuantificación de proteína por el método de LOWRY, O.H. y cols., (1951). Se

utilizó como referencia una solución de albúmina sérica bovina con una concentración de 0.5 mg/ml.

#### 6.6.2 CUANTIFICACION DE GENTAMICINA

La cuantificación del antibiótico se realizó mediante el método de difusión en agar, utilizando la cepa *Bacillus subtilis* ATCC 6633 como microorganismo de prueba (ROSNER, A. y AVIV, H., 1980). El inóculo se preparó creciendo el microorganismo en 10 ml de medio completo M2 por un lapso de 12 hrs a 37 °C y 160 rpm. La densidad óptica a 540 nm alcanzada después de este tiempo de incubación fue igual a 2. El bioensayo se realizó en cajas petri con 10 ml de medio Luria modificado (M5) conteniendo una proporción de inóculo del 1% (v/v).

#### MEDIO M5

Extracto de levadura	0.5%
Triptona	1.0%
NaCl	0.5%
Agar	1.0%

Las muestras por analizar se colocaron asepticamente sobre el agar utilizando para ello discos esteriles de papel analítico Schleidcher & Schuell # 740-E de 1/4 de pulgada de diametro (6.35 mm), con un volumen de 50 µl de muestra por filtro.

Se colocaron de la misma manera filtros con soluciones estándar de gentamicina con las siguientes concentraciones para la obtención de la curva patrón: 0, 20, 30, 50, 75 y 100 µg/ml de solución amortiguadora de fosfatos pH=8.

Las cajas con las muestras y las soluciones estándar de gentamicina se dejaron difundir por 1 hr a 4 °C y se incubaron posteriormente a 29 °C. por 36 hrs. Después de este tiempo de incubación, se midieron los halos de inhibición de crecimiento y se determinó la producción del antibiótico en µg/ml.

La cuantificación de gentamicina en los experimentos llevados a cabo con sistemas de células en reposo en presencia de cloranfenicol, se realizaron siguiendo el mismo procedimiento señalado, pero adicionando a las soluciones estándar de gentamicina 50 µg/ml de cloranfenicol. Las curvas patrón de gentamicina con y sin la adición del inhibidor de síntesis de proteínas, presentaron la misma pendiente.



La producción específica de gentamicina se calculó dividiendo la producción volumétrica obtenida por la concentración de proteína presente en cada una de las muestras fermentadas.

#### 5.6.3 DETERMINACION-DE AMONIO

La cuantificación de amonio libre se llevó a cabo por el método colorimétrico de WEATHERBURN, M.W. y cols., (1967). Para ello se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l de cada una de las muestras fermentadas, utilizando únicamente el sobrenadante. Se realizaron las diluciones adecuadas en agua destilada de manera que la concentración de amonio en las mismas no fuera mayor a 10 mM. Para la realización del ensayo se tomaron alícuotas de 20  $\mu$ l de cada una de las diluciones y se adicionaron las siguientes soluciones:

a) 2.5 ml de solución de nitroprusiato de sodio al 0.005% (p/v) disuelto en fenol al 10% (p/v).

b) 2.5 ml de solución de hidróxido de sodio al 5% (p/v) conteniendo por litro 12 ml de hipoclorito de sodio al 3.5%.

La reacción se llevó a cabo por un lapso de 30 min y se determinó la absorbancia del color desarrollado a 625 nm en un espectrofotómetro Bausch & Lomb modelo Spectronic 21. Se corrió simultáneamente un blanco con agua destilada y una curva patrón con las siguientes concentraciones de cloruro de amonio: 2, 4, 6, 8 y 10 mM.

#### 5.6.4 DETERMINACION DE SACAROSA

La determinación de sacarosa se llevó a cabo por el método de IING, S.V., (1956), previa hidrólisis de las muestras. Para ello se hicieron diluciones 1:20 de cada una de las muestras fermentadas, utilizando únicamente el sobrenadante. Se ajustó el pH de las mismas a 2 con solución de ácido clorhídrico 2N, y se sometieron a hidrólisis en la olla de presión a 15 PSIG (1.055 kg/cm<sup>2</sup>) durante 15 min. Después de este procedimiento se ajustó el pH a 7 con solución de hidróxido de sodio 2N.

La reacción se llevó a cabo en tubos de ensayo con 1 ml de cada dilución, a la cual se le adicionaron las siguientes soluciones:

a) 5 ml de solución alcalina de ferricianuro de potasio cuya composición por litro es la siguiente: carbonato de sodio, 160 g; fosfato de sodio dibásico, 150 g; ferricianuro de potasio, 4 g. Los tubos se mantuvieron en ebullición por 10 min y se enfriaron inmediatamente en baño de hielo.

b) 10 ml de ácido sulfúrico 2N a fin de neutralizar la mezcla. Los tubos se agitaron cuidadosamente hasta la desaparición de vapores.

c) 4 ml de solución de arsenomolibdato que contiene por litro: Molibdato de amonio tetrahidratado, 50 g; ácido sulfúrico concentrado, 42 ml; arsenato disódico, 6 g.

Después de agitar los tubos, se determinó la absorbancia del color desarrollado a 515 nm en un espectrofotómetro Bausch & Lomb modelo Spectronic 21.

Se corrió simultáneamente un blanco con agua destilada y una curva patrón con soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 y 1.4 g/l. Al igual que las muestras fermentadas, las soluciones estándar de sacarosa se sometieron a hidrólisis térmica siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

La concentración de sacarosa en las muestras se calculó de acuerdo a la curva patrón: concentración de sacarosa (g/l) vs D.O. (515 nm).

## 6.7 PRESENTACION DE DATOS Y REPRODUCIBILIDAD

Todos los resultados presentados en las tablas y figuras se llevaron a cabo corriendo cada condición por duplicado. Todos los experimentos se repitieron al menos una vez con el fin de comprobar reproducibilidad. En las tablas y figuras presentadas se muestran las medias de los resultados obtenidos con sus correspondientes intervalos de variación.

En los casos en los que se observó algún efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de gentamicina, se realizaron estudios de análisis de variancia, a fin de demostrar que el efecto observado fuera estadísticamente significativo y no causado por variación experimental (DANIEL, W.W., 1988).

Las curvas patrón correspondientes a las determinaciones de gentamicina, crecimiento celular, amonio y sacarosa, se ajustaron por el método de mínimos cuadrados (DANIEL, W.W., 1988).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1

Para poder cumplir con el objetivo de este proyecto, la primera actividad a seguir fue el diseño de un medio mínimo que fuera capaz de soportar tanto el crecimiento de *M. PURPUREA* como la producción de gentamicina, y que permitiera estudiar la influencia de la fuente de nitrógeno sobre ambos parámetros con un mínimo de interferencias.

El medio mínimo de prueba, cuya composición química se mostró en la sección 6.4, fue diseñado tomando en consideración los requerimientos nutricionales del microorganismo productor (CARBAJAL, F., 1957).

Para conocer el efecto del ion amonio sobre la síntesis del antibiótico, se evaluó la adición de los siguientes compuestos nitrogenados al medio de cultivo: cloruro de amonio, sulfato de amonio y nitrato de amonio, cada uno en una concentración inicial de 40 mM en base al amonio. De acuerdo a la literatura, *M. PURPUREA* es capaz de utilizar las sales de amonio mencionadas para su crecimiento y producción de gentamicina (LAZNIKOVA, T.N. y cols., 1977). En todos los casos se utilizó sacarosa al 2.4% (p/v) como fuente de carbono.

En este experimento no se utilizó fosfato de amonio como fuente de nitrógeno, ya que como se menciona en la sección 3.5, el fosfato ejerce un efecto negativo tanto en el crecimiento de *M. PURPUREA* (HAWAMOTO, I. y cols., 1983), como en la producción de gentamicina, según resultados que se han obtenido de estudios realizados en el laboratorio (ORREGON A.M. y SANCHEZ, S. 1988).

En la Fig. 5 se muestran las cinéticas de crecimiento y producción de gentamicina obtenidas en el medio mínimo conteniendo las diferentes sales de amonio, y se comparan con las obtenidas en el medio completo M3, cuya composición química se mostró en la sección 6.3.

Quando se cultivo *M. PURPUREA* en medio completo, la idiofase se alcanzó a las 76 hrs de fermentación, continuando ésta hasta las 144 hrs, tiempo después del cual el crecimiento comenzó a declinar. La producción de gentamicina en este medio inició en la fase tardía del crecimiento logarítmico a las 72 hrs de fermentación, obteniéndose un máximo de 20 µg/ml a las 144 hrs. Después de este tiempo, la biosíntesis del antibiótico disminuyó coincidiendo con la lisis celular.

Por otro lado, en los cultivos realizados en medio mínimo, se observaron diferencias en las cinéticas de crecimiento de *M. PURPUREA* al utilizar las tres fuentes de nitrógeno analizadas. El crecimiento máximo alcanzado por el microorganismo fue mayor en el medio que contenía nitrato de amonio, menor en el que

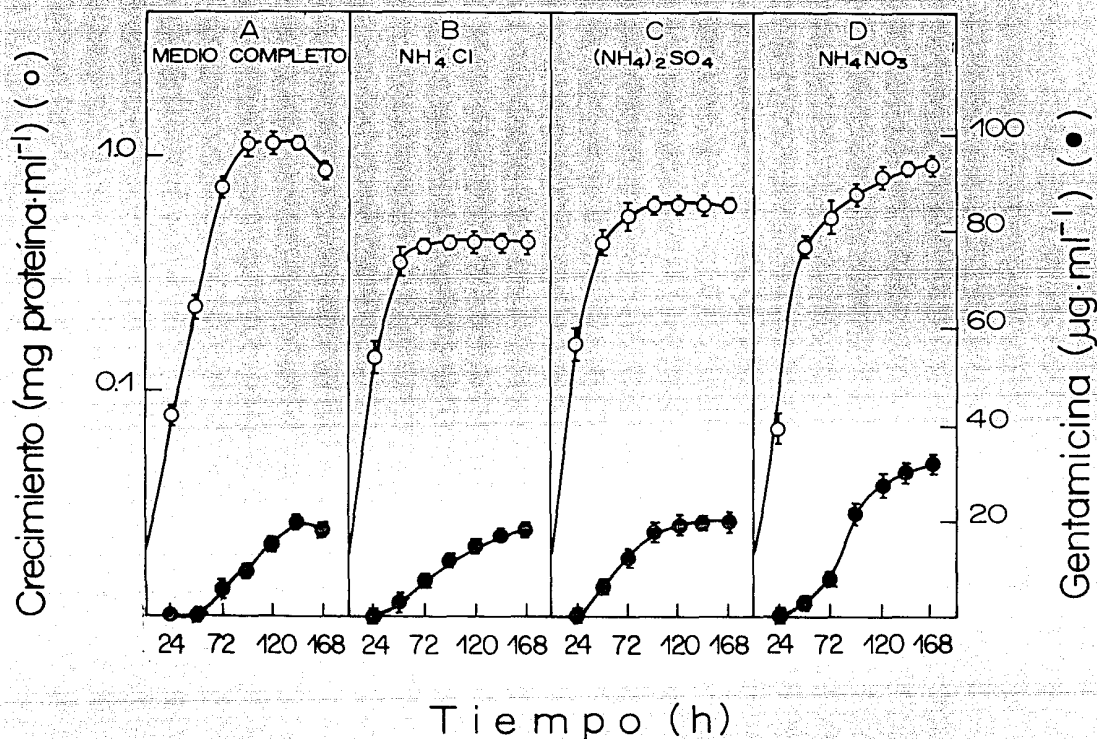


Fig. 5

Curvas de crecimiento de *M. purpurea* NRRL 2953 y producción de gentamicina en: (A) Medio completo y medio mínimo suplementado con (B) cloruro de amonio, 40 mM; (C) sulfato de amonio, 40 mM y (D) nitrato de amonio, 40 mM.

contenia cloruro de amonio. Aunque en los tres casos el crecimiento del microorganismo fue menor al obtenido en el medio completo, no se observó lisis celular.

A diferencia de lo observado en el medio completo, la producción de gentamicina en los medios mínimos inicio desde las 48 hrs de cultivo. La producción mayor del antibiótico se obtuvo en el medio mínimo con nitrato de amonio (22 µg/ml); mientras que las obtenidas en presencia de cloruro de amonio y sulfato de amonio, fueron muy similares a la detectada en el medio completo (24 µg/ml aprox.).

Una de las razones por las cuales en presencia de nitrato de amonio se haya obtenido un mayor crecimiento y la mayor producción de gentamicina en los medios mínimos, pudiera deberse a que tanto el ion amonio como el ion nitrato son asimilados por el microorganismo, ya que de acuerdo a estudios realizados en el laboratorio, este microorganismo es capaz de crecer y producir el antibiótico en el medio mínimo con nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno (RISLER, L. y SANCHEZ, S., 1966).

Debido a las diferencias detectadas en el crecimiento del microorganismo productor, se calcularon las producciones específicas de gentamicina para cada caso. En la Fig. 6 se puede apreciar que la mayor producción del antibiótico por mg de proteína, correspondió al medio que contenía cloruro de amonio como fuente de nitrógeno, siendo éste dos veces mayor al obtenido en el medio completo (Tabla 4).

El hecho de que el crecimiento del microorganismo en los medios mínimos haya sido menor al observado en el medio completo y que el inicio de la biosíntesis del antibiótico haya tenido lugar en tiempos más cortos de fermentación, coincide con las observaciones realizadas por MARLIN, J.P. y IEMAIN, A.L. (1960), quienes postularon que cuando el microorganismo crece en un medio mínimo, el factor que controla el inicio de la biosíntesis del antibiótico es probablemente la deficiencia de uno o más factores de crecimiento. Tal deficiencia afecta el crecimiento y se inicia entonces la biosíntesis del producto por mecanismos que aún no son conocidos; es decir, en un medio mínimo, algunos factores nutricionales se encuentran limitados desde etapas tempranas del crecimiento y esto favorece la producción del antibiótico, situación que no se presenta cuando el microorganismo crece en un medio completo.

Ya que en el medio mínimo con 40 µM de cloruro de amonio se obtuvo una mayor producción específica de gentamicina, comparada con las obtenidas con las otras sales de amonio, se eligió esta condición como modelo para estudiar el efecto del ion amonio en la producción fermentativa del antibiótico.

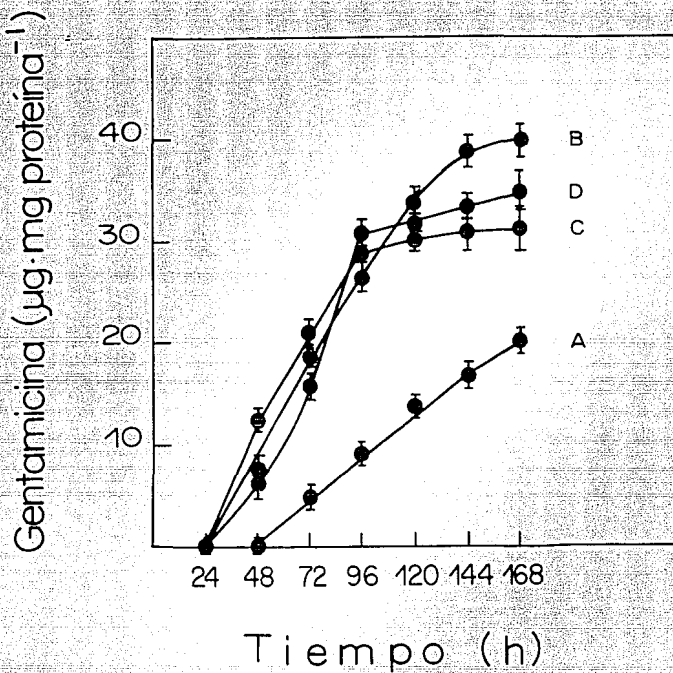


Fig. 6 Producciones específicas de gentamicina obtenidas de cultivos de *M. purpurea* NRRL 2953 en: (A) Medio completo y medio mínimo suplementado con (B) cloruro de amonio, 40 mM; (C) sulfato de amonio, 40 mM y (D) nitrato de amonio, 40 mM.

**TABLA 4** Crecimiento y producción máximos obtenidos de cultivos de *M. purpurea* NRRL 2953 en medio completo y medio mínimo suplementado con diferentes sales de amonio.

PARAMETRO	MEDIO COMPLETO	MEDIO MINIMO (M4) CON:		
	M3	NH <sub>4</sub> Cl (40 mM)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (40 mM)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (40 mM)
CRECIMIENTO MAXIMO (mg proteínas/ml)	1.18 ± 0.09	0.45 ± 0.03	0.65 ± 0.05	0.92 ± 0.08
PRODUCCION DE GENTAMICINA (µg/ml)	20.2 ± 1.5	18.0 ± 1.3	20.0 ± 1.5	32.0 ± 2.9
PRODUCCION ESP. GENTAMICINA (µg/mg)	20.6 ± 1.7	40.0 ± 2.0	31.2 ± 1.9	34.8 ± 3.0

Como ya se mencionó en el capítulo 4, son muchos los antibióticos cuyas síntesis están sujetas a regulación por amonio. En virtud de la poca información existente acerca del efecto del ion amonio sobre la biosíntesis de gentamicina, así como de la importancia práctica que implicaría el detectar un fenómeno regulatorio en la síntesis de este antibiótico, se procedió a estudiar el perfil de formación de gentamicina en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de amonio: 20, 40, 100, 150 y 200 mM. Ya que el medio mínimo contenía una concentración de cloruro de amonio de 40 mM, se tomó esta condición como control para comparar la producción del antibiótico con el resto de las concentraciones de amonio mencionadas.

En la Fig. 7 se presentan las cinéticas de crecimiento, producción de gentamicina y consumo de amonio, así como las variaciones de pH contenidas en los medios fermentados para cada una de las concentraciones de cloruro de amonio probadas.

La producción del antibiótico se incrementó al aumentar concentración de cloruro de amonio en el medio de cultivo, obteniéndose la máxima estimulación en la concentración de amonio correspondiente a 150 mM. Al aumentar la concentración de la sal en el medio a 200 mM, la producción del antibiótico comenzó a decaer, obteniéndose una producción similar a la detectada en el medio control. Cuando se utilizó una concentración de amonio menor a la del control (20 mM), la producción de gentamicina también disminuyó. La producción del antibiótico inició a las 48 hrs de fermentación independientemente de la concentración de amonio utilizada y continuó hasta el final de la misma sin llegar a apreciarse una fase de degradación.

El crecimiento de *M. purpurea* también se afectó al incrementar la concentración de cloruro de amonio en el medio de cultivo. Cuando se utilizaron concentraciones elevadas de dicho nutriente (100, 150 y 200 mM), el crecimiento máximo alcanzado por el microorganismo fue mayor al obtenido en concentraciones de amonio menores (20 y 40 mM). Por otro lado, dicho incremento provocó un retraso en la velocidad de crecimiento del microorganismo durante las primeras 24 hrs de fermentación.

Dado que *M. purpurea* aumentó su crecimiento al incrementar la concentración de amonio en el medio de cultivo, respecto al control, se calcularon las producciones específicas de gentamicina para detectar el hecho de que la mayor producción del antibiótico cuantificado se debiera a la existencia de más biomasa produciendo dicho compuesto.

En la Fig. 8 se puede observar que la producción específica de gentamicina también se estimuló como respuesta al incremento de la concentración inicial de cloruro de amonio en el medio, obteniéndose un óptimo en la concentración correspondiente a 150 mM.



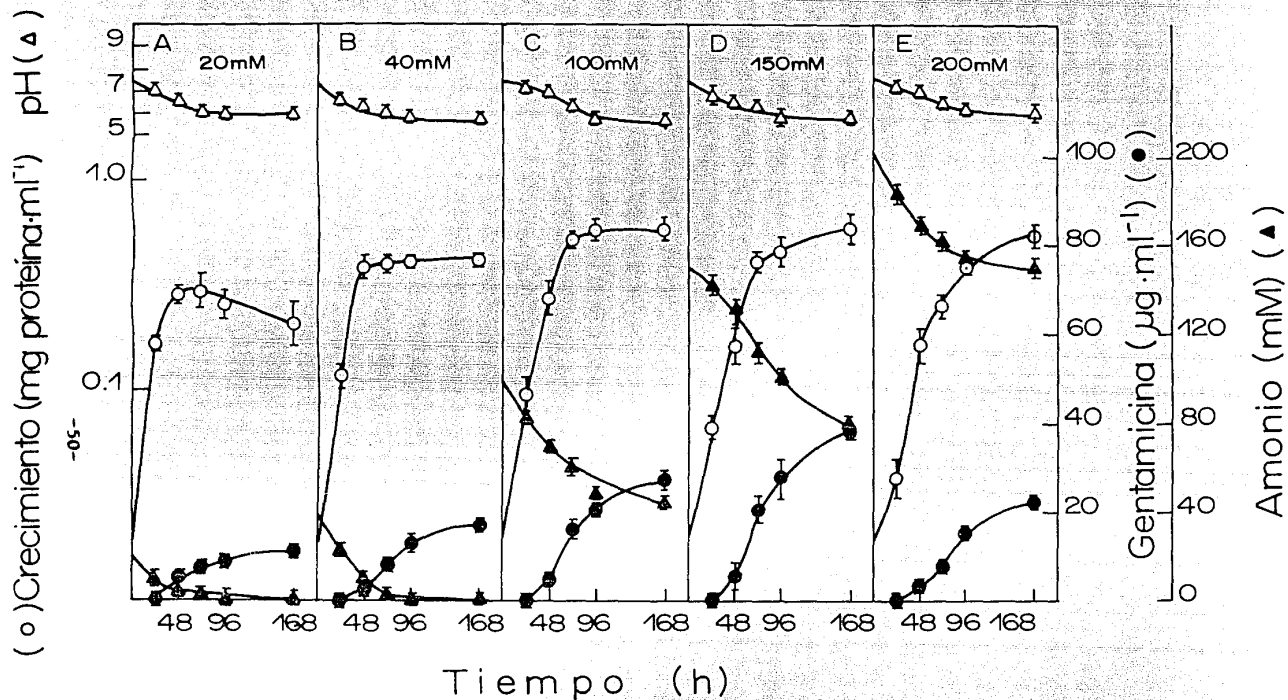


Fig. 7 Cinéticas de crecimiento de *M. purpurea* NRRL 2953, producción de gentamicina, consumo de amonio y pH en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de cloruro de amonio: (A) 20 mM; (B) 40 mM; (C) 100 mM; (D) 150 mM y (E) 200 mM.

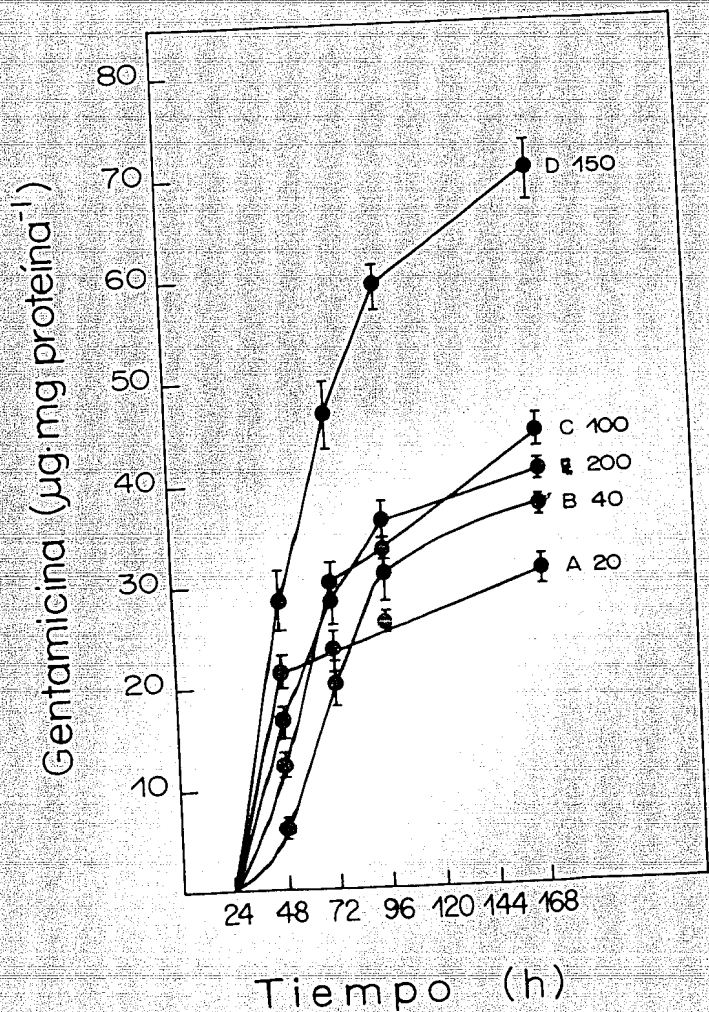


Fig. 8 Producciones específicas de gentamicina obtenidas de cultivos de *M. purpurea* NRRL 2953 en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de cloruro de amonio: (A) 20 mM; (B) 40 mM; (C) 100 mM; (D) 150 mM y (E) 200 mM.

El pH del medio disminuye en todos los casos a lo largo de la fermentación, alcanzando valores cercanos a 6.0 a las 168 hrs de fermentación. Este hecho muestra que el efecto estimulador del amonio sobre la producción de gentamicina no se debió a las variaciones del pH en el medio.

Por otro lado, en la tabla 5, se puede observar que la sacarosa no se agota en el medio de cultivo al término de la fermentación en ninguna de las concentraciones de amonio utilizadas, lo cual significa que el microorganismo no se encontraba limitado por la fuente de carbono para su crecimiento y síntesis de gentamicina. El consumo de sacarosa a las 168 hrs de fermentación fue aproximadamente el mismo cuando se utilizaron las concentraciones de cloruro de amonio de 40, 100 y 150 mM, mientras que con 20 y 200 mM, el consumo del azúcar fue menor. Este hecho pudiera deberse a que 20 mM de cloruro de amonio resulta una concentración de amonio limitante tanto para el crecimiento del microorganismo, como para la producción del antibiótico; mientras que con 100 mM de cloruro de amonio se presenta un efecto negativo sobre la síntesis de gentamicina, afectando quizá de esta manera el consumo de sacarosa.

En un estudio realizado en el laboratorio, relacionado con el efecto de la concentración de diferentes fuentes de carbono sobre la síntesis de gentamicina (CASCALANTE, L., 1983), se observó que la producción del antibiótico se incrementa al aumentar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo de 5 a 20 g/l, por encima de este nivel el grado de fermentación y el nivel de producción de gentamicina ni en el crecimiento máximo alcanzado por el organismo, ni incrementa la concentración de sacarosa de 20 a 40 g/l. Los resultados obtenidos en el trabajo mencionado indican también que la sacarosa no ejerce un efecto negativo sobre la producción de gentamicina como sucede con la adición de otros azúcares al medio de cultivo, específicamente con la adición de glicógeno y fructosa. Por estas razones, consideramos que tanto la fuente de carbono seleccionada como la concentración utilizada de la misma (20 g/l) fueron adecuadas para estudiar el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción del antibiótico.

El amonio se convirtió totalmente a las 96 hrs de fermentación, cuando se adicionó al medio las concentraciones de 20 y 40 mM. En los medios que contenían 100, 150 y 200 M de amonio, el consumo del ión  $\text{NH}_4^+$  llegó al 100% al término de la fermentación. Es importante señalar que en la concentración de amonio de 150 mM, donde se obtuvo la mayor producción de gentamicina, el número de veces de amonio consumido también fue mayor (Tabla 5). Una situación similar se presenta durante la síntesis de estreptomicina al incrementar la concentración de amonio en el medio de cultivo (INOUE, S. y cols., 1983).

**TABLA 5** Resultados obtenidos a las 168 hrs de fermentación con la adición de diferentes concentraciones de cloruro de amonio al medio de cultivo.

PARAMETRO	(NH <sub>4</sub> Cl) mM				
	20	40	100	150	200
CRECIMIENTO MAXIMO (mg proteína/ml)	0.31 ± 0.03	0.45 ± 0.04	0.61 ± 0.005	0.56 ± 0.008	0.54 ± 0.05
PRODUCCION DE GENTAMICINA (µg/ml)	10.3 ± 0.9	17.0 ± 1.0	27.6 ± 2.0	39.3 ± 3.2	22.5 ± 1.3
PRODUCCION ESP. GENTAMICINA (µg/mg)	31.5 ± 1.6	37.5 ± 1.1	44.7 ± 1.2	70.6 ± 5.2	41.6 ± 2.5
CONSUMO DE NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mM) (%)	20.0 100.0 ± 0.0	40.0 100.0 ± 0.0	53.1 53.1 ± 2.5	69.0 46.0 ± 4.0	50.0 25.0 ± 4.0
SACAROSA RESIDUAL (g/l)	11.2 ± 1.5	6.5 ± 0.5	6.6 ± 0.6	2.2 ± 0.7	13.2 ± 1.5
Y (x/s) (mg prot/mol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) a	13.9 ± 1.2	12.3 ± 1.4	11.4 ± 1.1	9.3 ± 0.7	8.1 ± 0.6
Y (P/s) (µg ab/mol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) b	426.0 ± 25.9	425.0 ± 25.0	522.3 ± 50.2	614.0 ± 22.0	330.6 ± 30.0
PH	6.0 ± 0.1	5.9 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.8 ± 0.1	6.0 ± 0.2

- a: Rendimiento molar de crecimiento correspondiente a la fase de crecimiento logarítmico.  
 b: Rendimiento molar de gentamicina a las 168 hrs de fermentación.

Es interesante notar que al consumo de amonio y la síntesis de gentamicina ocurrieron simultáneamente. El mismo fenómeno se ha detectado en la síntesis de otros antibióticos que se estimulan como respuesta al incremento de la concentración de amonio en el medio de cultivo (INOUE, S. y cols., 1933). Este hecho está en contraste con lo observado para otros antibióticos sujetos a represión por amonio, donde la síntesis de los mismos inicia una vez que el amonio se agota en el medio de cultivo (SHAPIRO, S. y VINING, L., 1985).

Ya que el cloruro de amonio fue la única fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo y que esta fue utilizada por el microorganismo tanto para su crecimiento, como para la producción de gentamicina, se calcularon los rendimientos molares de crecimiento  $Y (x/s)$  y de producto  $Y (p/s)$  en base al amonio, a fin de observar la eficiencia del consumo de la fuente de nitrógeno sobre ambos parámetros en estudio. El  $Y (x/s)$  correspondió al incremento en mg de proteína formados por mol de amonio utilizado durante la fase de crecimiento exponencial; mientras que el  $Y (p/s)$  correspondió a los mg de gentamicina producidos durante la fermentación por mol de amonio utilizado (WANG, D.I. y cols., 1977).

Como se muestra en la Tabla 5, el  $Y (x/s)$  disminuyó a medida que se incrementó la concentración de cloruro de amonio en el medio de cultivo. Esto significa que a mayor concentración de amonio, el microorganismo sintetiza un menor número de miligramos de proteína por cada mol de amonio utilizado, es decir, disminuye la eficiencia de utilización de amonio para el crecimiento del microorganismo.

Por otro lado, los valores de los  $Y (p/s)$  calculados mostraron un comportamiento distinto. Cuando el microorganismo creció en 20 y 40 mM de cloruro de amonio, los rendimientos molares de producto fueron muy similares entre sí, pero éstos aumentaron cuando se incrementó la concentración de cloruro de amonio a 100 y 150 mM. El valor del  $Y (p/s)$  mayor se obtuvo para la concentración de 150 mM de amonio, donde se alcanzó también la mayor producción de gentamicina. Esto significa que en esta concentración de amonio, el microorganismo utiliza más eficientemente el sustrato para la producción del antibiótico, ya que éste es capaz de sintetizar un mayor número de microgramos de gentamicina por cada mol de amonio consumido, que en concentraciones del ion menores o mayores.

De estos resultados se puede concluir que bajo concentraciones de amonio menores o iguales a 40 mM, el microorganismo utiliza el sustrato preferentemente para su crecimiento, pero a medida que la concentración de amonio se incrementa hasta 150 mM, dicho nutriente se utiliza con mayor eficiencia para la síntesis del antibiótico.

Con el fin de saber si el efecto positivo obtenido con cloruro de amonio sobre la producción de gentamicina, se debía al ion amonio y no específicamente al cloruro de amonio, se realizaron una serie de experimentos en los que se creció al microorganismo en presencia de sulfato de amonio y se determinaron de manera similar al experimento presentado anteriormente, las cinéticas de crecimiento y producción de gentamicina, así como los perfiles de pH y consumo de amonio a lo largo de la fermentación. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 9.

Al igual que en el caso de cloruro de amonio, tanto la producción volumétrica como específica de gentamicina (Fig. 10), se incrementaron al aumentar la concentración de sulfato de amonio en el medio hasta una concentración de 150 mM. La producción del antibiótico inició a las 48 hrs de fermentación, independientemente de la concentración de amonio utilizada.

Los cambios de pH ocurridos en el medio y el consumo de sacarosa al término de la fermentación, también fueron muy similares a los presentados cuando se utilizó cloruro de amonio como fuente de nitrógeno.

Los resultados obtenidos en cuanto al consumo de amonio también mostraron que el consumo mayor del ion, correspondió a la condición donde se obtuvo la mayor producción del antibiótico (Tabla 6).

Los  $Y_{(x/s)}$  disminuyeron al incrementar la concentración de sulfato de amonio en el medio, mientras que el  $Y_{(p/s)}$  mayor se obtuvo en el medio con 150 mM de sulfato de amonio (Tabla 6).

Con el fin de demostrar que el efecto estimulador causado por el ion amonio sobre la producción específica de gentamicina era significativo, se analizó la variancia utilizando un diseño experimental completamente aleatorio (DANIEL, W.W., 1987). La variable dependiente fue la producción específica de gentamicina obtenida a las 168 hrs de fermentación y la variable independiente o tratamiento fue cada concentración de la sal de amonio probada. Los resultados mostraron que para ambas sales, el efecto de la concentración fue significativo (Anexos 1 y 2).

Los resultados obtenidos de los dos experimentos presentados, muestran que el ion amonio ejerce un efecto estimulador sobre la síntesis de gentamicina hasta una concentración de 150 mM. Tal efecto no es debido ni a incrementos en el crecimiento celular, ni a variaciones en el pH del medio fermentado y es independiente del tipo de sal con la cual se administre el ion al medio de cultivo (Fig. 11). Finalmente se observó que existe una relación entre el amonio consumido y la producción de gentamicina: es decir, a mayor consumo de amonio, mayor rendimiento del antibiótico (Fig. 12).

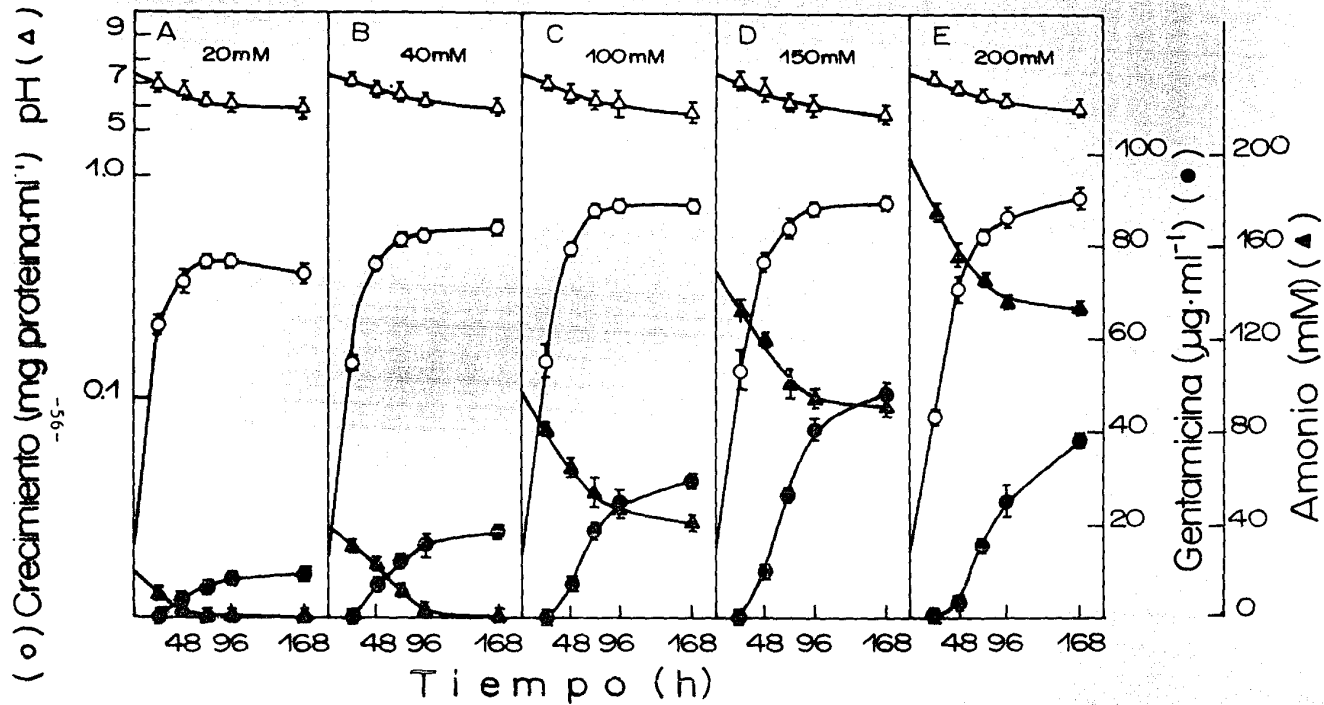


Fig. 9 Cinéticas de crecimiento de *M. purpurea* NRRL 2953, producción de gentamicina, consumo de amonio y pH en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de amonio: (A) 20 mM; (B) 40 mM; (C) 100 mM; (D) 150 mM y (E) 200 mM.

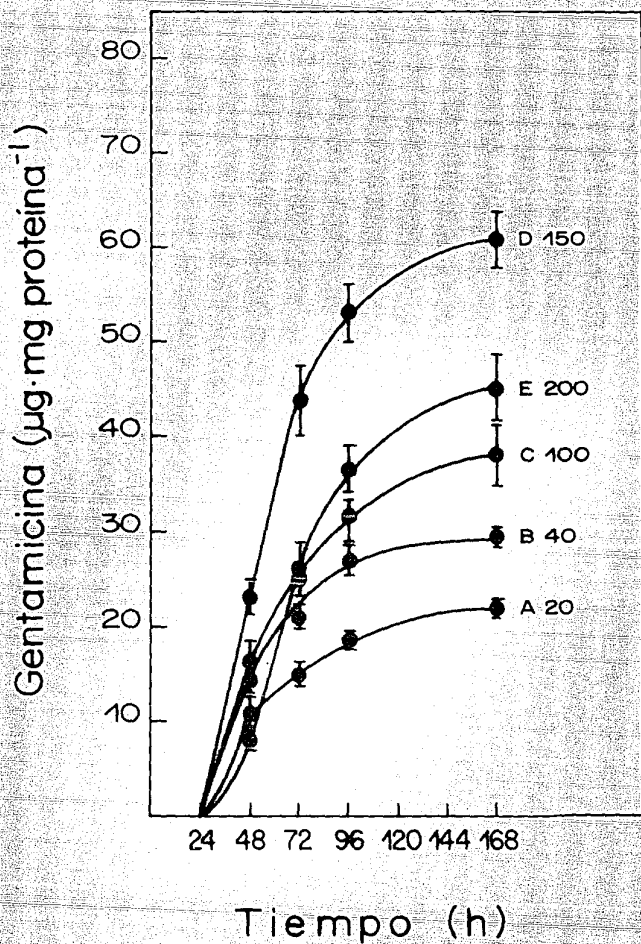


Fig. 10 Producciones específicas de gentamicina obtenidas de cultivos de *M. purpurea* NRRL 2953 en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de sulfato de amonio: (A) 20 mM; (B) 40 mM; (C) 100 mM; (D) 150 mM y (E) 200 mM.



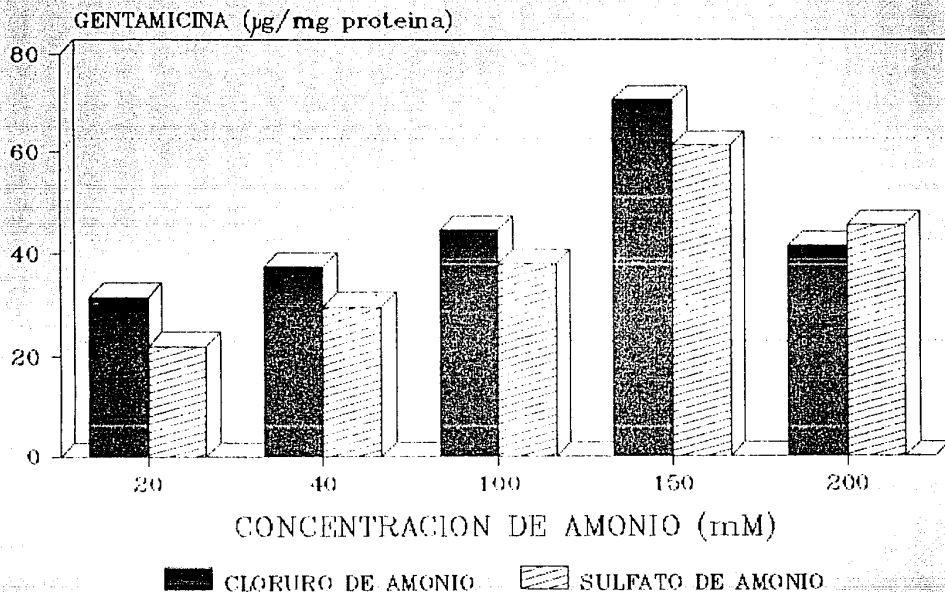
**TABLA 6** Resultados obtenidos a las 168 hrs de fermentación con la adición de diferentes concentraciones de sulfato de amonio al medio de cultivo.

PARAMETRO	[(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] mM				
	20	40	100	150	200
CRECIMIENTO MAXIMO (mg proteína/ml)	0.43 ± 0.02	0.64 ± 0.05	0.78 ± 0.03	0.79 ± 0.03	0.84 ± 0.05
PRODUCCION DE GENTAMICINA (µg/ml)	9.6 ± 0.8	19.0 ± 0.6	30.0 ± 1.9	48.8 ± 2.8	38.5 ± 3.3
PRODUCCION ESP. GENTAMICINA (µg/mg)	22.0 ± 0.5	29.6 ± 1.6	38.0 ± 3.7	61.4 ± 3.8	45.6 ± 4.0
CONSUMO DE NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mM) (%)	20.0 100.0 ± 0.0	40.0 100.0 ± 0.0	54.8 54.8 ± 3.7	76.4 50.9 ± 4.8	64.5 32.3 ± 4.2
SACAROSA RESIDUAL (g/l)	10.5 ± 0.9	7.0 ± 0.5	6.7 ± 0.4	6.5 ± 0.4	12.9 ± 1.1
Y (x/s; (mg prot/mol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) a	22.3 ± 1.8	18.6 ± 1.0	16.5 ± 0.9	13.6 ± 1.0	10.9 ± 0.9
Y (p/z) (µg ab/mol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) b	480.0 ± 37.5	475.0 ± 17.6	509.3 ± 20.1	638.7 ± 30.1	596.9 ± 39.3
pH	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	5.9 ± 0.1	5.8 ± 0.1	6.0 ± 0.1

a: Rendimiento molar de crecimiento correspondiente a la fase de crecimiento logarítmico.

b: Rendimiento molar de gentamicina a las 168 hrs de fermentación.

Fig. 11 Producciones específicas de gentamicina máximas obtenidas de cultivos de *M. purpurea* NRRL 2953 en medio mínimo suplementado con diferentes concentraciones de cloruro de amonio y sulfato de amonio.



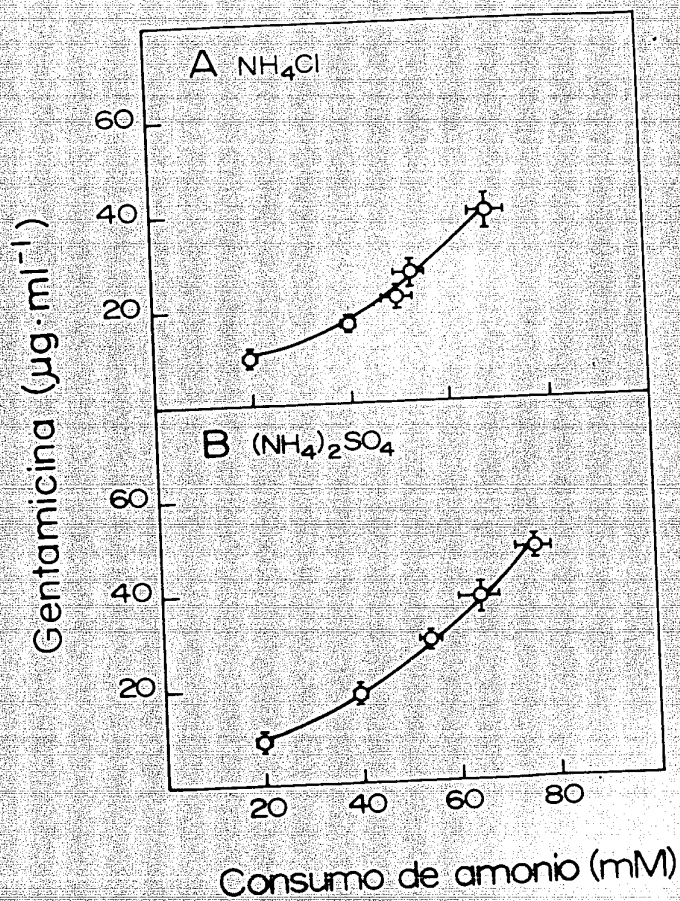


Fig. 12 Relación entre el consumo de amonio y la producción de gentamicina en M. purpurea NRRL 2953.

De acuerdo a otros estudios realizados en el laboratorio, la adición de otras fuentes inorgánicas de amonio al medio de cultivo, tales como hidróxido de amonio y nitrato de amonio, estimularon la síntesis de gentamicina de manera similar (ISLAS, L. y SANCHEZ, S., 1986).

Una de las razones por las cuales al incrementar la concentración de amonio en el medio de cultivo, se estimula la producción de gentamicina, pudiera ser a través de la síntesis y acumulación intracelular de ciertos aminoácidos. En la síntesis de 2-desoxiestreptamina, intervienen dos reacciones de aminotransferencia, las cuales son catalizadas por una sola enzima que utiliza preferentemente L-glutamina como aminodador, (PEARCE, C.J. y FINEHART, K.L., 1981); mientras que en la síntesis de otros antibióticos aminoglucosídicos como la estreptomina, las aminotransferasas involucradas en su biosíntesis son menos específicas, ya que otros aminoácidos como el ácido glutámico y la alanina, pueden servir también como donadores de grupos amino (WALKER, J.B., 1975).

Por otro lado, en la síntesis del complejo gentamicina C a partir de 2-DOS, existen tres pasos enzimáticos de aminosustitución (pasos 7, 9 y 13 de la Fig. 3), los cuales no han sido estudiados hasta la fecha y se desconoce la procedencia de estos grupos amino (ODAKURA, Y., y cols., 1985).

Adicionalmente, se sabe que en un gran número de microorganismos, la concentración de amonio presente en el medio de cultivo afecta directamente la actividad de las enzimas responsables de su fijación a ácido glutámico, glutamina y alanina (GDH, GS, GGAT y ADH) (FISHER, S.H., 1988).

A pesar de que el aminoácido glutamina ha sido identificado como el aminodador más activo en las reacciones de transaminación involucradas en la síntesis de 2-DOS en *M. luteus*, (LUCHE, L.A., et al., 1989), la alanina y el ácido glutámico pueden ser convertidos a glutamina en presencia de amonio, mediante la acción de las enzimas alanina transaminasa y glutamina sintetasa (TYLER, B., 1978).

Por esta razón se decidió probar el efecto de la adición de los aminoácidos glutamina, ácido glutámico, y alanina al medio de fermentación en la producción de gentamicina.

El experimento se realizó en el medio mínimo M4 con 40 mM de cloruro de amonio, ya que como se mostró en la Fig. 7, bajo esta condición de crecimiento, el microorganismo consume al término de la fermentación el 100% del amonio adicionado al medio de cultivo, ya que al aumentar la concentración de la sal en el medio a 150 mM, aumenta también el consumo de amonio y el nivel de producción de gentamicina, debido probablemente a que el microorganismo es capaz de sintetizar una mayor cantidad de glutamina requerida para la síntesis del antibiótico, supusimos que

al adicionar exógenamente los aminoácidos glutamina, ácido glutámico y alanina al medio de cultivo con 40 mM de cloruro de amonio, tendríamos un nivel de producción similar al obtenido al crecer al microorganismo en 150 mM de cloruro de amonio.

Los aminoácidos fueron adicionados al medio en forma separada, en una concentración de 10 mM desde el inicio de la fermentación. En la Fig. 13, se muestran las cinéticas de crecimiento, producción de gentamicina y consumo de amonio, así como las variaciones de pH obtenidas en los medios fermentados para cada una de las condiciones probadas.

La adición de ácido glutámico y glutamina al medio de cultivo, provocó un retraso de 24 hrs en el inicio de la síntesis de gentamicina, con respecto al control sin aminoácidos; sin embargo, la producción del antibiótico se incrementó 1.62 y 2.54 veces respectivamente a las 168 hrs de fermentación. Por otro lado, la producción de gentamicina en el medio suplementado con alanina, inició a las 48 hrs de cultivo, sin llegar a detectarse un incremento en el título del antibiótico al finalizar la fermentación.

El crecimiento de *M. Purpurea* disminuyó con respecto al control con la adición de ácido glutámico y alanina al medio de cultivo y aumento con la de glutamina. Estos cambios en el crecimiento repercutieron en los rendimientos del antibiótico por mg de proteína sintetizada. Según se muestra en la Fig. 14 las producciones específicas de gentamicina máximas alcanzadas con la adición de ácido glutámico y glutamina fueron muy similares entre sí (72.4 y 77.9  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína respectivamente), lo cual correspondió a incrementos del 89% y 103% para cada caso con respecto al control (Fig. 15). La adición de alanina al medio de cultivo, no repercutió, como en los dos casos anteriores, en una estimulación de la producción específica de gentamicina. El título detectado a las 168 hrs de fermentación fue de 34.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína, muy similar al obtenido en el control (38.3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína) (Tabla 7).

Tal y como se esperaba, los niveles de producción específica de gentamicina obtenidos con la adición de los aminoácidos glutamina y ácido glutámico al medio mínimo con 40 mM de cloruro de amonio, fueron muy cercanos al obtenido en el medio mínimo con 150 mM de cloruro de amonio (Tabla 5). Una posible explicación por la cual, la adición de alanina al medio no incrementó la producción de gentamicina, se menciona más adelante.

Con el fin de demostrar que los incrementos detectados en la producción específica de gentamicina con la adición de ácido glutámico y glutamina al medio, eran estadísticamente significativos, se realizó un análisis de varianza, utilizando para ello el modelo de arreglo experimental sencillo (DANIEL, W.W., 1987). Los resultados indicaron que ambos aminoácidos ejercieron un efecto estimulatorio sobre la producción específica

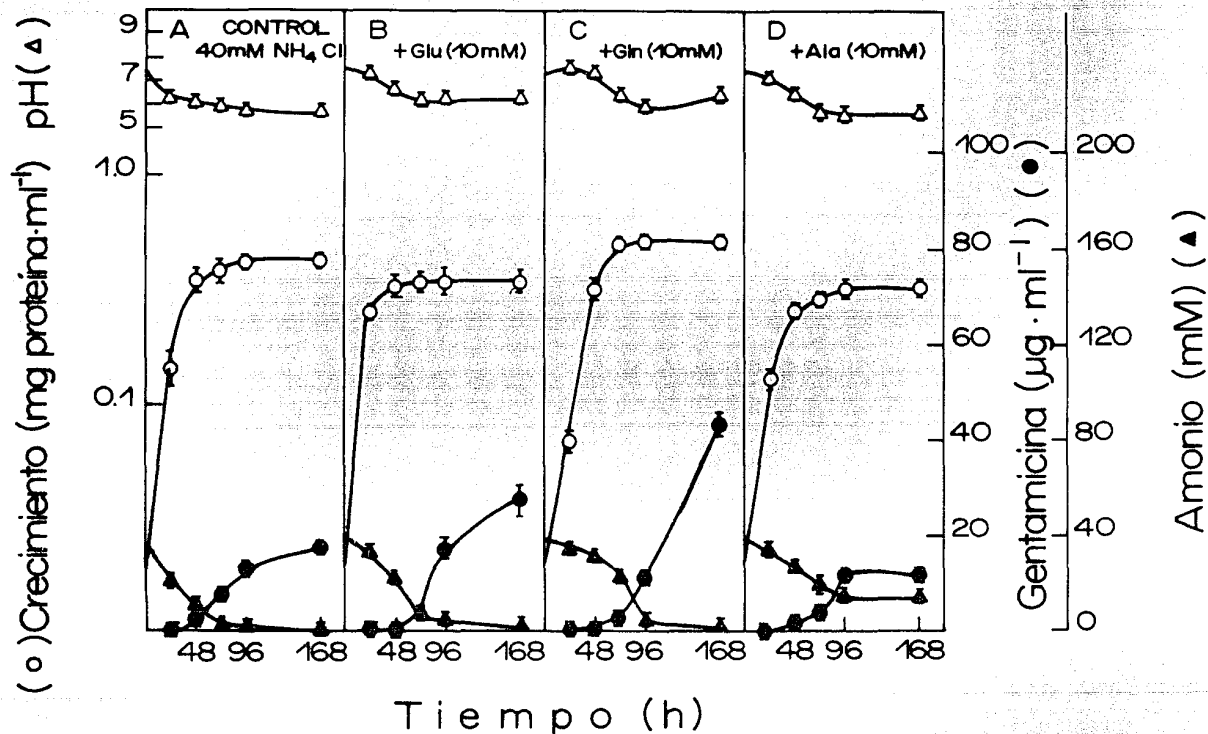


Fig. 13 Cinéticas de crecimiento de *M. purpurea* NRRL 2953, producción de gentamicina, consumo de amonio y pH en medio mínimo con 40 mM de cloruro de amonio, suplementado con: (B) ácido glutámico (10 mM); (C) glutamina (10 mM) y (D) alanina (10 mM). (A) Control sin adición de aminoácido.

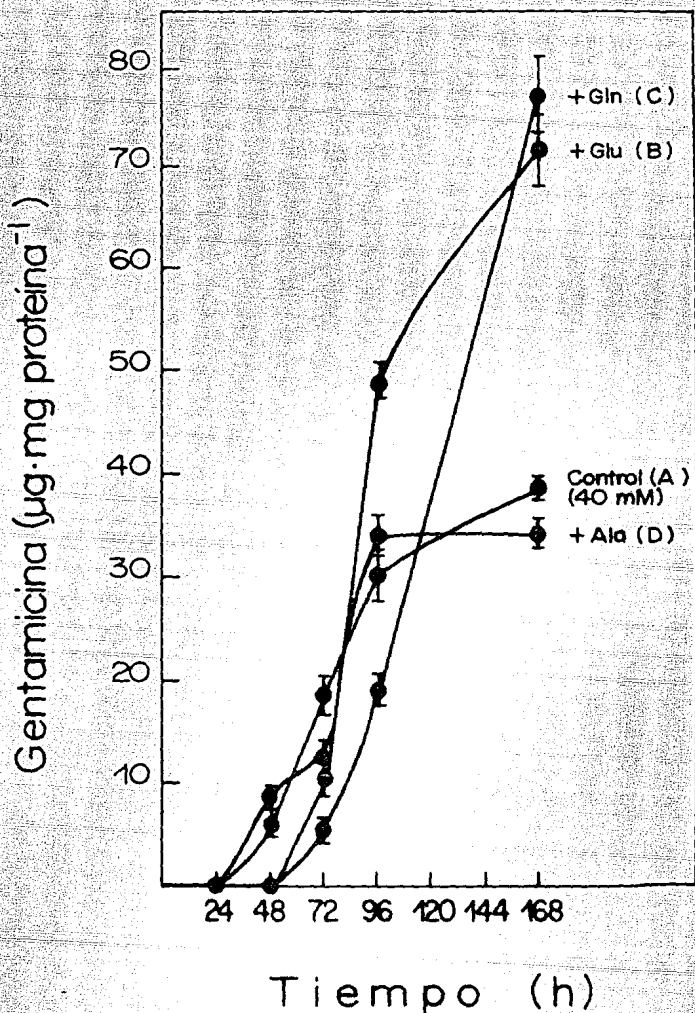
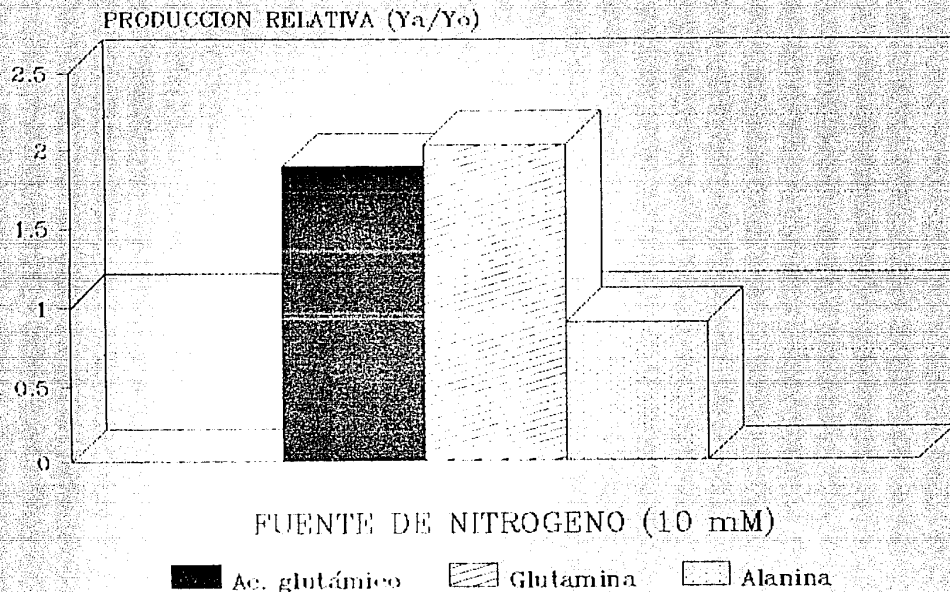


Fig. 14 Producciones específicas de gentamicina obtenidas de cultivos de *M. purpurea* NRRL 2953 en medio mínimo con 40 mM de cloruro de amonio, suplementado con (B) ácido glutámico (10 mM); (C) glutamina (10 mM) y (D) alanina (10 mM). (A) Control sin adición de aminoácido.

Fig. 15 Incrementos obtenidos en la producción específica de gentamicina con la adición de ac. glutámico, glutamina y alanina al medio de cultivo.



$Y_a$  = Producción específica de gentamicina ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) obtenida con la adición de ac. glutámico, glutamina o alanina al medio.  
 $Y_o$  = Producción específica de gentamicina ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) obtenida sin adición de aminoácido.



**TABLA 7** Resultados obtenidos a las 168 hrs de fermentación con la adición de ácido glutámico, glutamina y alanina al medio de cultivo.

PARAMETRO	CONTROL NH <sub>4</sub> Cl (40 mM)	+ GLU (10 mM)	+ GLN (10 mM)	+ ALA (10 mM)
CRECIMIENTO MAXIMO (mg proteína/ml)	0.46 ± 0.01	0.39 ± 0.06	0.57 ± 0.02	0.38 ± 0.02
PRODUCCION DE GENTAMICINA (µg/ml)	17.5 ± 0.4	28.5 ± 2.0	44.5 ± 2.1	12.0 ± 1.3
PRODUCCION ESP. GENTAMICINA (µg/mg)	38.3 ± 1.6	72.4 ± 4.2	77.9 ± 6.7	34.5 ± 2.7
CONSUMO DE NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mM) (%)	40.0 100.0 ± 0.0	39.3 98.3 ± 0.1	38.8 97.5 ± 0.1	25.3 63.1 ± 0.9
Y (x/s) (mg Prot/mol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) a	12.6 ± 0.8	20.1 ± 2.5	30.4 ± 3.7	20.3 ± 1.7
Y (p/s) (µg ab/mol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) b	437.5 ± 10.2	724.3 ± 60.1	1,145.4 ± 54.5	475.9 ± 42.6
pH	5.9 ± 0.1	6.4 ± 0.2	6.6 ± 0.2	5.8 ± 0.1

a: Rendimiento molar de crecimiento correspondiente a la fase de crecimiento logarítmico.

b: Rendimiento molar de gentamicina a las 168 hrs de fermentación.

de gentamicina, ya que las medias de cada uno de los tratamientos en estudio presentaron una diferencia significativa en la variable de respuesta (Anexo 3).

En relación al consumo de amonio, puede observarse en la Fig. 13 que dicho nutriente se consumió casi totalmente en los medios que contenían ácido glutámico y glutamina, mientras que en el medio suplementado con alanina, el consumo de amonio llegó solamente al 63% al término de la fermentación. Cabe señalar que la adición de los aminoácidos al medio provocó un consumo del amonio más lento en las primeras horas de fermentación. Mientras que en el medio control se había consumido cerca del 50% del amonio inicial a las 24 hrs de cultivo, en los medios suplementados con ácido glutámico, glutamina o alanina, el consumo de dicho nutriente alcanzó solamente un 12% aproximadamente en los tres casos. Es importante señalar que a diferencia de lo ocurrido en el control, en presencia de ácido glutámico y glutamina, el consumo de amonio continuó una vez que el microorganismo alcanzó su fase estacionaria de crecimiento, sin embargo la mayor estimulación del antibiótico con la adición de estos dos aminoácidos, se observó una vez que el amonio se agotó en el medio de cultivo. Este hecho sugiere que cuando *M. luteus* alcanza su máximo crecimiento, el amonio residual disponible en el medio de cultivo sigue siendo utilizado por el microorganismo para producir gentamicina, probablemente a través de la síntesis de nuevos precursores. Este fenómeno no se observó con la adición de alanina al medio.

Con el fin de conocer el efecto de la adición de los tres aminoácidos al medio en el consumo de amonio y consecuentemente en el crecimiento del microorganismo y la producción del antibiótico, se calcularon los rendimientos molares de crecimiento ( $Y_{x/y}$ ) y de producto ( $Y_{p/y}$ ) en base al amonio. En la tabla 7 se puede observar que los  $Y_{x/y}$  fueron mayores en presencia de los tres aminoácidos que en ausencia de estos. Tal hecho sugiere que los metabolitos fueron utilizados por el microorganismo para su crecimiento.

Por otro lado, los rendimientos molares de producto también se incrementaron con la adición de ácido glutámico y glutamina al medio respectivamente, mientras que el  $Y_{p/y}$  obtenido con la adición de alanina, fue muy similar al obtenido en el control.

Ya que los  $Y_{p/y}$  se incrementaron con la adición de ácido glutámico y glutamina al medio, que el amonio se agotó en el medio de cultivo al final de la fermentación en ambos casos, es posible concluir que tanto el amonio como estos dos aminoácidos, fueron utilizados por el microorganismo y que su adición al medio favoreció la producción de gentamicina.

De los experimentos presentados puede concluirse que tanto el ácido glutámico como la glutamina estimulan la producción de gentamicina cuando se utilizan en el medio de cultivo junto con el cloruro de amonio y que muy posiblemente, el efecto

estimuladorio observado al incrementar la concentración del amonio en el medio, se deba a una acumulación intracelular de estos dos metabolitos.

Ya que el ácido glutámico puede ser transformado a glutamina por el microorganismo mediante la actividad de la enzima GS, es probable que este aminoácido estimule también la síntesis de gentamicina mediante su conversión a glutamina, aunque no se descarta la posibilidad de que cualquiera de estos dos aminoácidos o inclusive el amonio pudieran jugar un papel como inductores de una o mas síntesis involucradas en la biosíntesis del antibiótico.

Resultados similares a los presentados fueron encontrados por el grupo de INOUE, S. y cols (1983), quienes postularon que la estimulación de estreptomycinina por el ion amonio se debía a la acumulación intracelular de ácido glutámico y/o glutamina. Adicionalmente estos investigadores encontraron que el suministro de cualquiera de los dos aminoácidos mencionados al medio, ya sea en la trofofase o en la idiofase, resulta en un incremento considerable de la producción del antibiótico.

Otra observación que refuerza esta hipótesis es el hecho de que la adición de alanina al medio de cultivo no haya repercutido en un incremento sobre la producción de gentamicina. Se ha reportado que este aminoácido es un fuerte inhibidor de la enzima GS en varios microorganismos, entre ellos *Streptomyces* (BRANA, A.F. y cols., 1986) y *Mycobacterium* (ALVAREZ, M.E. y MCCARTHY, C.M., 1984); de manera que la presencia de alanina en el medio de cultivo pudo haber repercutido en una baja disponibilidad de glutamina, necesaria no solo para el crecimiento del microorganismo, sino también para la síntesis de gentamicina. Otra posible explicación podría ser que *Mycobacterium* no presente actividad de la enzima alanina transaminasa, por lo cual la alanina no pueda ser convertida a ácido glutámico y consecuentemente a glutamina, como sucede en el caso de *Streptomyces* (BRANA, A.F. y cols., 1986).

Una vez detectado el efecto estimuladorio del ácido glutámico y la glutamina junto con el amonio sobre la producción específica de gentamicina, se decidió investigar si estos dos aminoácidos, por si mismos, eran capaces de provocar el mismo efecto.

Adicionalmente se estudió si la estimulación de la síntesis de gentamicina causada por el amonio, el ácido glutámico y la glutamina, se debía o no a un fenómeno de inducción.

A fin de evitar efectos sobre el crecimiento, se decidió utilizar en este experimento un sistema de células en reposo que no permitiera el crecimiento del microorganismo, pero al mantenerse viable, fuera capaz de sintetizar el antibiótico.

El inóculo se obtuvo preincubando a *M. purpuræ* en el medio M4 por un lapso de 36 hrs. y de acuerdo a estudios realizados por el grupo de LUCHER, L.A. y cols. (1983) en este tiempo, la producción del antibiótico no ha iniciado y por otro lado, la enzima L-Gln: catonoglyllo-inositol aminotransferasa, muestra su máximo de actividad.

Las células cosechadas fueron transferidas a un medio libre de fuente de carbono, al cual se adicionaron diferentes concentraciones de cloruro de amonio (40, 100 y 150 mM); ácido glutámico (5, 10 y 20 mM) o glutamina (5, 10 y 20 mM). Paralelamente se corrió un control sin fuente de nitrógeno, a fin de considerar la cantidad de gentamicina que el microorganismo es capaz de sintetizar a expensas de sus reservas intracelulares.

Para poder distinguir si las fuentes de nitrógeno en estudio estaban actuando o no como inductores de la síntesis de gentamicina, se adiciono al medio cloranfenicol (50 µg/ml). Bajo estas condiciones, el microorganismo no efectúa síntesis de  $^{14}C$  de proteínas, de manera que en el caso de que el amonio o alguno de los aminoácidos presentes en el medio actuara como inductor, se detectaría una escasa producción de gentamicina, debida únicamente a la existencia de enzimas sintetizadas durante la preincubación del microorganismo.

El experimento se llevo a cabo por un lapso de 20 hrs y se tomaron muestras periódicamente para la determinación de biomasa y gentamicina.

Las cinéticas de producción de gentamicina obtenidas sin y con la adición de cloranfenicol al medio se muestran en las Figs. 14 y 17 respectivamente. Como puede observarse, en ambos casos la síntesis del antibiótico se incrementó con respecto al tiempo a medida que se incrementó la concentración de las tres fuentes de nitrógeno en el medio.

En este experimento no fué necesario calcular las producciones específicas de gentamicina, ya que no se detectaron cambios significativos en la cantidad de biomasa cuantificada en los diferentes tiempos de muestreo (0.25 mg de proteína/ml aprox.).

Con los resultados de producción de gentamicina obtenidos a las 20 hrs de incubación, se construyó una gráfica en relación a la concentración de la fuente de nitrógeno. En la Fig. 18 se muestra que al aumentar la concentración de las tres fuentes de nitrógeno en el medio, la producción de gentamicina se incrementa independientemente de la presencia del inhibidor de síntesis de proteínas. Tales incrementos fueron estadísticamente significativos, según el estudio de análisis de varianza realizado (Anexos 4, 5 y 6).

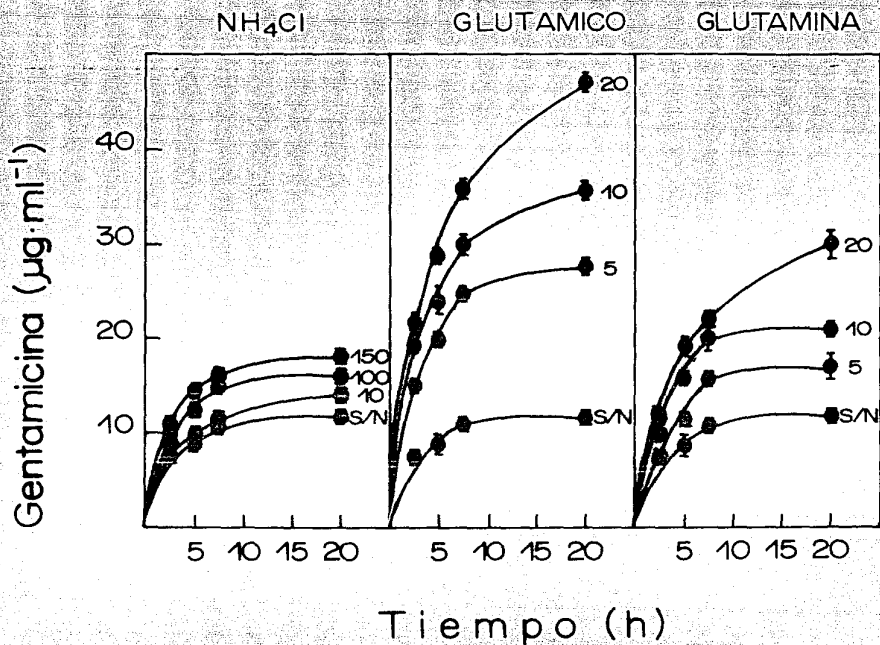


Fig. 16 Efecto de la concentración de cloruro de amonio, ácido glutámico y glutamina sobre la producción de gentamicina en un sistema de células en reposo de *M. purpurea* NRRL 2953 en ausencia de cloranfenicol.

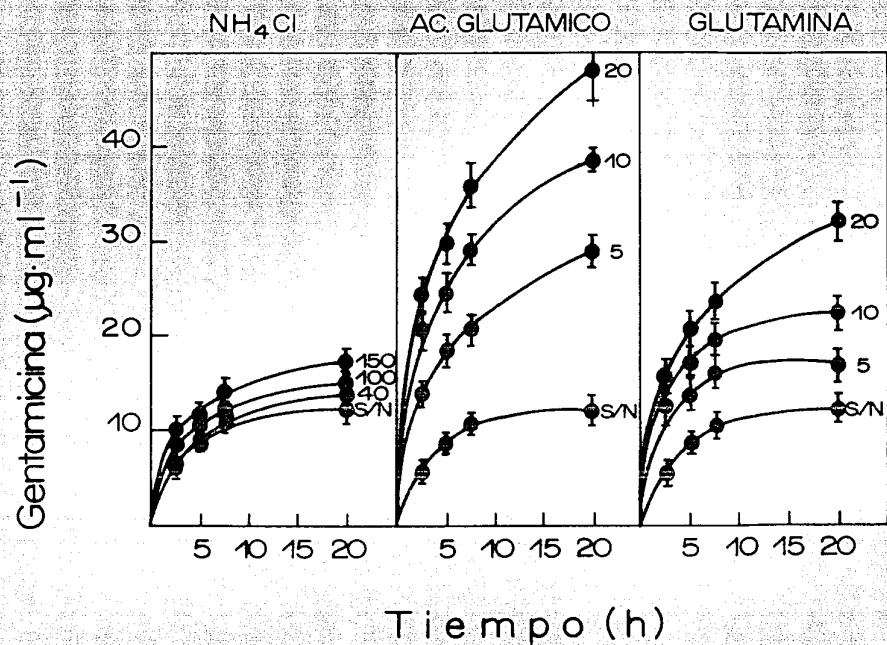


Fig. 17 Efecto de la concentración de cloruro de amonio, ácido glutámico y glutamina sobre la producción de gentamicina en un sistema de células en reposo de *M. purpurea* NRRL 2953 en presencia de cloranfenicol.

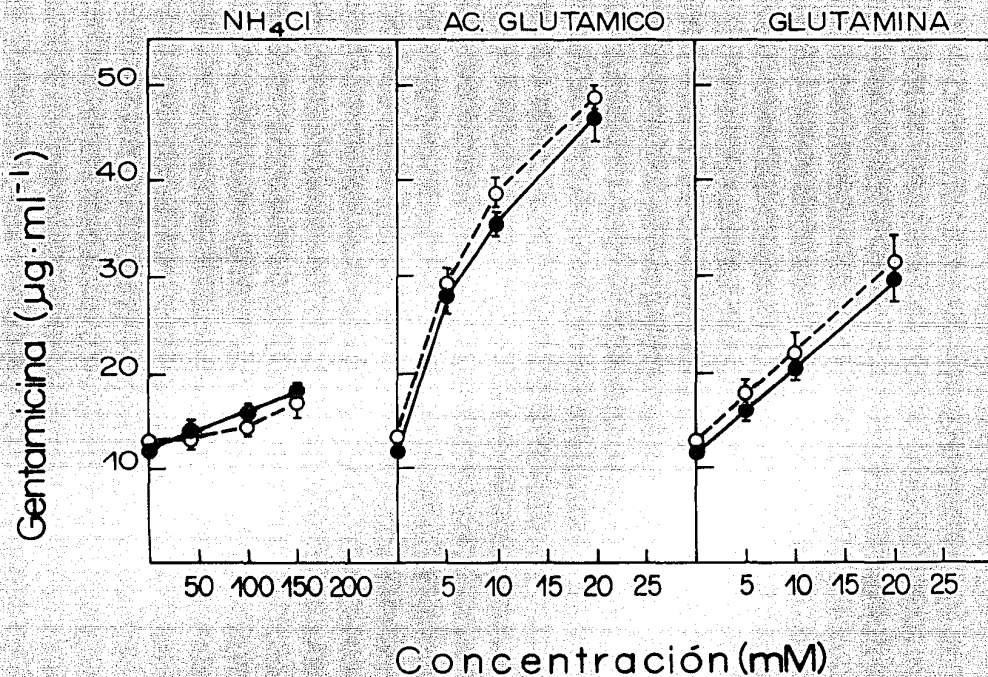


Fig. 18 Producciones de gentamicina máximas obtenidas con la adición de diferentes concentraciones de cloruro de amonio, ácido glutámico y glutamina a un sistema de células en reposo de *M. purpurea* NRRL 2953.

(●—●) sin cloranfenicol; (○---○) con cloranfenicol, 50 µg·ml<sup>-1</sup>

En la Fig. 19, se muestran las producciones de gentamicina relativas al control sin fuente de nitrógeno, obtenidas de las diferentes condiciones experimentales empleadas. La adición de 150 mM de cloruro de amonio al medio incrementó la producción de gentamicina en 1.5 veces, mientras que con la adición de ácido glutámico o glutamina, los incrementos fueron de 4 y 2.5 veces respectivamente (Tabla 8). Resultados similares se obtuvieron cuando se adicionó cloranfenicol al medio (Tabla 9), lo cual nos permitió descartar la posibilidad de que el amonio, el ácido glutámico o la glutamina pudieran ejercer un efecto inductor sobre la síntesis del antibiótico.

Los resultados obtenidos de este experimento mostraron que aunque el amonio presentó un efecto estimulador sobre la producción de gentamicina, este fue mínimo comparado con el obtenido con la adición de ácido glutámico o glutamina como únicas fuentes de nitrógeno, lo cual sugiere que los aminoácidos mencionados pudieran ser los efectores reales de la estimulación por amonio observada en experimentos anteriores. Sin embargo, es necesario aclarar que dichos resultados no fueron del todo los esperados, ya que si la glutamina es requerida por el microorganismo para la síntesis de D-glucosamina y 2-DOS, precursores de gentamicina, se pensaba que dicho aminoácido tendría un efecto estimulador mayor o al menos similar al del ácido glutámico, ya que este tendría que ser transformado a glutamina para ejercer su efecto estimulador.

El hecho de que en presencia de ácido glutámico se haya obtenido una mayor estimulación de la síntesis de gentamicina, pudiera explicarse, de acuerdo al mecanismo postulado en la Fig. 20, de la siguiente manera:

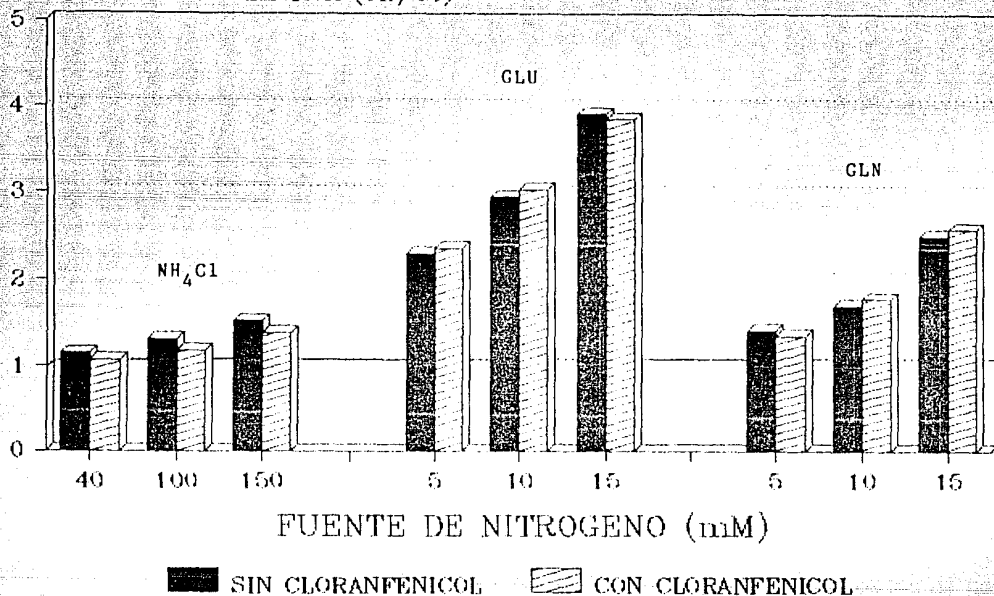
LUCHER, L.A. y cols., (1982) demostraron en estudios *in vitro* que el ácido glutámico es inactivo como donador de grupos amino en la síntesis de 2-DOS, por lo cual su papel como estimulador de la síntesis de gentamicina podría darse en un paso posterior al de la síntesis de este precursor; como por ejemplo en las reacciones de aminosustitución responsables de las transformaciones de los intermediarios gentamicina A2, G-418 y X2 a gentamicina A. JI-20A y JI-20B respectivamente (ver pasos 7, 9 y 13 de la Fig. 3). Sin embargo, esta hipótesis tendría que demostrarse observando si la adición de ácido glutámico a cultivos de mutantes de *M. purpurus* DOS, estimula la producción de gentamicina. Tales mutantes son incapaces de sintetizar el antibiótico a menos que se les proporcione exógenamente el precursor 2-DOS (ROSE, D. y cols., 1977), por lo cual cualquier efecto estimulador observado por la fuente de nitrógeno, sería en un paso posterior al de la síntesis del precursor.

Por otro lado, de acuerdo a la literatura, la presencia de ácido glutámico en el medio, repercute en una mayor actividad de la enzima GS en diversos microorganismos (SHAPIRO, B.M. y STADTMAN, E.R., 1970), permitiendo así la acumulación intracelular de glutamina. Al servir este aminoácido como



Fig. 19 Incrementos obtenidos en la síntesis de gentamicina con la adición de diferentes concentraciones de cloruro de amonio, ac. glutámico y glutamina a un sistema de células en reposo de *M. purpurea* NRRL 2953.

PRODUCCION RELATIVA ( $Y_n/Y_0$ )



Y<sub>n</sub> = Producción de gentamicina ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtenida con la adición de cloruro de amonio, ac. glutámico o glutamina al medio.  
 Y<sub>0</sub> = Producción de gentamicina ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtenida sin adición de fuente de N.

TABLA B

Efecto de la concentración de cloruro de amonio ac. glutámico y glutamina sobre la producción de gentamicina en un sistema de células en reposo en ausencia de cloranfenicol.

FUENTE NITROGENO (mM)	GENTAMICINA (a) ( $\mu\text{g/ml}$ )	PRODUCCION RELATIVA (b)
<b>NH<sub>4</sub>CL</b>		
0	12.2 $\pm$ 0.4	1.00
40	14.0 $\pm$ 1.1	1.15
100	16.0 $\pm$ 1.7	1.31
150	18.6 $\pm$ 0.2	1.52
<b>GLU</b>		
0	12.2 $\pm$ 0.4	1.00
5	27.9 $\pm$ 1.2	2.29
10	35.8 $\pm$ 1.5	2.94
20	47.6 $\pm$ 1.4	3.91
<b>GLN</b>		
0	12.2 $\pm$ 0.40	1.00
5	17.2 $\pm$ 1.50	1.41
10	20.6 $\pm$ 1.48	1.69
20	30.3 $\pm$ 2.50	2.49

- (a) Producción volumétrica de gentamicina obtenida a las 20 hrs. de incubación, en ausencia de cloranfenicol.
- (b) Producción relativa de gentamicina calculada dividiendo la producción volumétrica obtenida a las 20 hrs de incubación de cada una de las concentraciones de las fuentes de nitrógeno, por la producción de gentamicina obtenida en el control sin fuente de nitrógeno.

TABLA 9

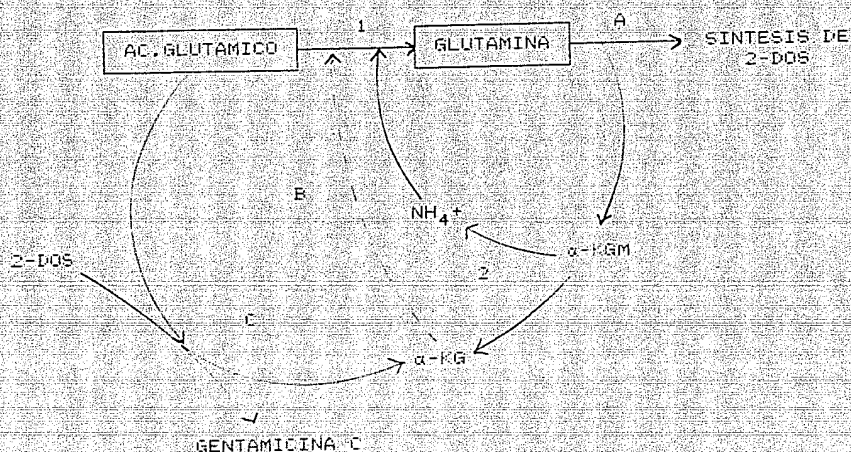
Efecto de la concentración de cloruro de amonio, ac. glutámico y glutamina sobre la producción de gentamicina en un sistema de células en reposo en presencia de cloranfenicol.

FUENTE NITROGENO (mM)	GENTAMICINA (a) ( $\mu\text{g/ml}$ )	PRODUCCION RELATIVA (b)
<b>NH<sub>4</sub>CL</b>		
0	12.6 $\pm$ 1.3	1.00
40	13.5 $\pm$ 0.6	1.07
100	14.9 $\pm$ 0.5	1.18
150	17.2 $\pm$ 1.5	1.30
<b>GLU</b>		
0	12.6 $\pm$ 1.3	1.00
5	29.7 $\pm$ 1.8	2.35
10	38.2 $\pm$ 1.0	3.03
20	48.6 $\pm$ 5.0	3.85
<b>GLN</b>		
0	12.6 $\pm$ 1.3	1.00
5	17.0 $\pm$ 1.2	1.35
10	22.4 $\pm$ 1.5	1.77
20	32.5 $\pm$ 1.2	2.57

- (a) Producción volumétrica de gentamicina obtenida a las 20 hrs. de incubación, en presencia de cloranfenicol.
- (b) Producción relativa de gentamicina calculada dividiendo la producción volumétrica obtenida a las 20 hrs de incubación de cada una de las concentraciones de las fuentes de nitrógeno, por la producción de gentamicina obtenida en el control sin fuente de nitrógeno.

FIGURA 20

POSIBLE MECANISMO DE ESTIMULACION DEL ACIDO GLUTAMICO EN LA SINTESIS DE GENTAMICINA COMO UNICA FUENTE DE NITROGENO EN UN SISTEMA DE CELULAS EN REPOSO.



- 1 Glutamina sintetasa (GS)
- 2 2-cetoglutaramato-hidrolasa-amidasa ( $\omega$ -amidasa)
- A Pasos enzimáticos de aminosustitución que tienen lugar durante la síntesis de 2-DOS por la acción de la enzima L-Gln: cetoglucilg-inositol aminotransferasa (pasos 1 y 4 de la Fig. 2).
- B Estimulación de la desaminación de la GS por acumulación intracelular de ac.  $\alpha$ -cetoglutarico ( $\alpha$ -KG).
- C Pasos enzimáticos de aminosustitución involucrados en la síntesis del complejo gentamicina C a partir de 2-DOS (pasos 7, 9 y 13 de la Fig. 3).

2-DOS = 2-desoxiestreptamina  
 $\alpha$ -KG = ac.  $\alpha$ -cetoglutarico  
 $\alpha$ -KGM = ac.  $\alpha$ -cetoglutaramico

amino donador para la síntesis de 2-DOS, se libera el ácido  $\alpha$ -cetoglutarámico, el cual es hidrolizado por la enzima 2-cetoglutarámico-hidrolasacemidasa. Para rendir ácido  $\alpha$ -cetoglutarámico y amonio, (WALKER, J.B. y WALKER, M.S., 1982). Los productos de dicha actividad enzimática tendrían entonces un doble efecto: por un lado el ácido  $\alpha$ -cetoglutarámico se acumula intracelularmente ya que la actividad de la enzima GDH no es requerida por el microorganismo por disponer de suficiente ácido glutámico en el medio, producto de su actividad. La acumulación de ácido  $\alpha$ -cetoglutarámico estimula la desadenilación de la enzima GS, permitiendo a esta permanecer en su forma activa. (FOOR, F., y cols., 1980). y por otro lado el amonio liberado de la hidrólisis del ácido  $\alpha$ -cetoglutarámico, es utilizado como sustrato por la GS para sintetizar mas glutamina a partir del ácido glutámico proporcionado al microorganismo en el medio. Sin embargo se desconoce si la GS de *M. luteus* está regulada por adenilación, aunque este tipo de mecanismo regulatorio opera en la GS de otros actinomicetos del género *Streptomyces* (FISHER, S.H., 1988), como por ejemplo en *S. cattleya* (STREICHER, S.L. y TYLER, B., 1981).

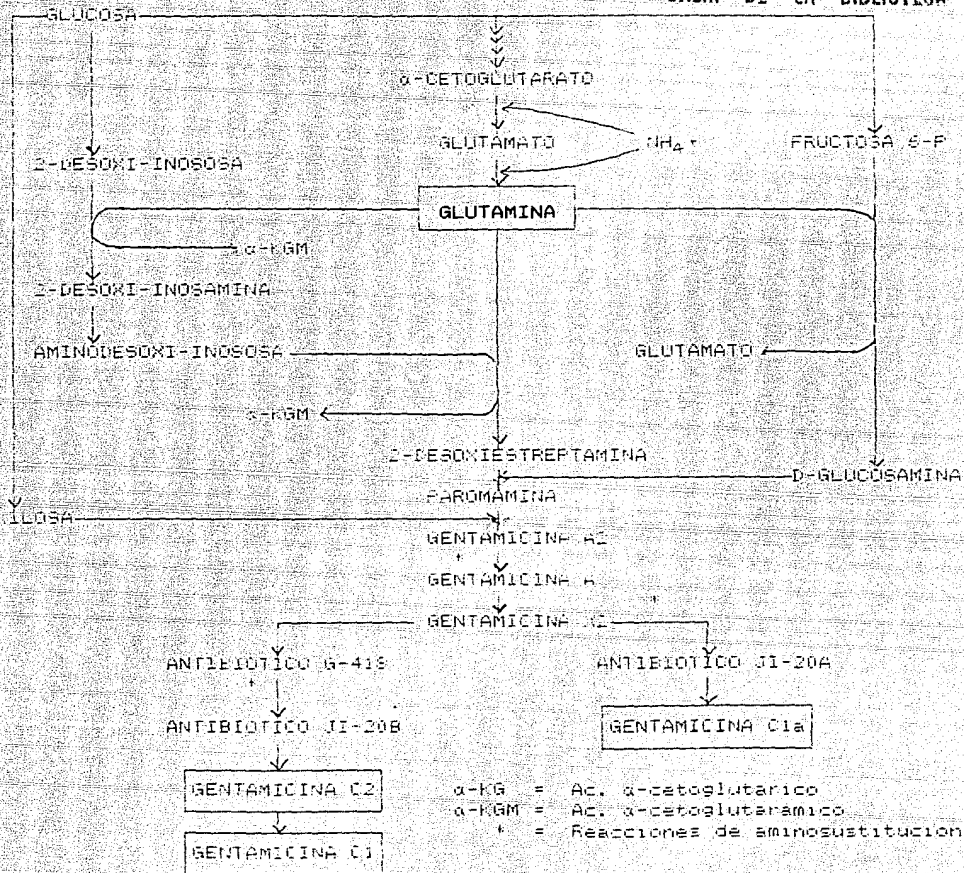
Los resultados obtenidos de este trabajo, nos permitieron establecer que existe un efecto positivo del amonio sobre la síntesis de gentamicina. Ya que el ácido glutámico y la glutamina estimularon también la producción del antibiótico, se planteó la posibilidad de que uno o ambos aminoácidos pudieran ser los factores reales de tal estimulación. Con el fin de confirmar esta hipótesis, se están realizando experimentos en el laboratorio relacionados con el efecto de la adición al medio de cultivo de análogos estructurales no metabolizables de dichos aminoácidos sobre la producción de gentamicina (GONZALEZ, R. y SANCHEZ, S., 1990).

En la Fig. 21, se muestra un diagrama en el que se enfatiza la importancia de la glutamina en la síntesis de gentamicina. Cuando este aminoácido es utilizado por el microorganismo para la síntesis de D-glucosamina, se libera ácido glutámico, el cual puede ser reutilizado por el microorganismo para sintetizar mas glutamina a partir del amonio presente en el medio de cultivo. Por otro lado, como ya se mencionó anteriormente, el ácido  $\alpha$ -cetoglutarámico liberado durante la síntesis de 2-DOS, es hidrolizado en ácido  $\alpha$ -cetoglutarámico y amonio. Tales productos a su vez pueden volver a ser asimilados por el microorganismo para sintetizar ácido glutámico mediante la actividad de la enzima GDH; posteriormente a glutamina, para lo cual se requiere una molécula adicional de amonio. Estas observaciones nos permiten comprender una de las posibles razones por las cuales el amonio estimula la síntesis de gentamicina.

FIGURA 21

IMPORTANCIA DE LA GLUTAMINA EN LA SINTESIS DE GENTAMICINA

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA



Fuentes: Wegman, G.H. y cols., 1972.  
 Testa, R.F. y Jilley, R.C., 1976.  
 Finehart, H.L. y Stroschne, R.M., 1976.  
 Odakura, Y. y cols., 1983.  
 Suzuki, H. y cols., 1985.  
 Lucher, L.A. y cols., 1989.

Por otro lado, es posible que las enzimas GDH y GS jueguen un papel primordial en este microorganismo para una adecuada producción de gentamicina. Resultados experimentales preliminares obtenidos en el laboratorio nos permitieron observar que *M. LEBURGENSIS* presenta una elevada actividad de GS, cercana a 5  $\mu\text{moles}/\text{mg}\cdot\text{min}$  (actividad de sintetasa) en la fase temprana de su crecimiento (exponencial), aun en elevadas concentraciones de amonio (ISLAS, L. y SANCHEZ, S., 1986). Aunque este fenómeno no ocurre en la mayoría de los microorganismos, especialmente en bacterias entericas, en las cuales la GS presenta muy baja actividad bajo condiciones de exceso de amonio (SHAPIRO, E.M. y STADTMAN, E.R., 1970), se ha visto que en algunos actinomicetos, como por ejemplo en *Streptomyces clavuligerus*, la actividad de la GS, tanto transferasa como sintetasa, se incrementa al aumentar la concentración de iones amonio en el medio de cultivo de 10 a 100 mM (BRAGA, A.F. y cols., 1986). Dentro de este contexto, sería interesante investigar si existe una relación entre la actividad de la GS en *M. LEBURGENSIS* y su capacidad para sintetizar gentamicina, y si la adición de inhibidores de esta enzima, repercuten en una baja producción del antibiótico. Experimentos relacionados con este tema se están llevando a cabo actualmente en el laboratorio (GONZALEZ, R. y SANCHEZ, S., 1990).

El hecho de haber encontrado un efecto estimulador de la fuente de nitrógeno sobre la síntesis de gentamicina, resulta interesante desde varios puntos de vista. Por un lado, podrían diseñarse medios de cultivo que permitieran una producción elevada de gentamicina a nivel industrial optimizando la concentración inicial de sales de amonio y fuentes de nitrógeno complejas, ricas en su contenido de ácido glutámico y glutamina, como por ejemplo la harina de soya; o bien obtener mutantes hiperproductoras del antibiótico, como por ejemplo aquellas capaces de sobrerproducir los aminoácidos mencionados. Por otro lado, debido a la similitud que existe entre la ruta biosintética de la gentamicina y las de otros antibióticos del mismo grupo (Tabla 1), es predecible que la producción de algunos de éstos, sea regulada de la misma manera. Por lo tanto el presente trabajo, abre las puertas para la realización de nuevas investigaciones relacionadas en el área.

## 8 CONCLUSIONES

De los resultados experimentales obtenidos de este proyecto, se concluye lo siguiente:

- 1.- *M. purpurea* NRRL 2953 es capaz de crecer y producir gentamicina en un medio mínimo con cloruro de amonio, sulfato de amonio o nitrato de amonio como únicas fuentes de nitrógeno.
- 2.- La producción de gentamicina se incrementa al aumentar la concentración de amonio en el medio de cultivo, obteniéndose la máxima estimulación en la concentración de amonio correspondiente a 150 mM. Tal efecto estimulador no es debido ni a incrementos en el crecimiento celular, ni a variaciones en el pH del medio fermentado y es independiente del tipo de sal con la cual se administre el ion al microorganismo.
- 3.- Existe una relación entre el amonio consumido por el microorganismo y la producción de gentamicina: a mayor consumo de amonio, mayor producción del antibiótico.
- 4.- En concentraciones de amonio menores o iguales a 40 mM, el microorganismo utiliza el sustrato preferentemente para su crecimiento, pero cuando la concentración de amonio se incrementa hasta 150 mM, dicho nutriente se utiliza con mayor eficiencia para la síntesis del antibiótico.
- 5.- El ácido glutámico y la glutamina estimulan la producción de gentamicina cuando se adicionan al medio de cultivo junto con el amonio desde el inicio de la fermentación. La adición de los aminoácidos al medio provoca un consumo más lento del amonio en las primeras horas de fermentación. Ambos aminoácidos son utilizados por el microorganismo para su crecimiento y para la producción de gentamicina.
- 6.- La adición de alanina al medio desde el inicio de la fermentación no incrementa la producción de gentamicina y provoca un menor consumo de amonio por el microorganismo.
- 7.- Tanto el cloruro de amonio, como los aminoácidos ácido glutámico y glutamina estimulan la síntesis de gentamicina cuando se adicionan a un sistema de células en reposo como únicas fuentes de nitrógeno. El efecto estimulador es mayor en presencia de ácido glutámico y menor en presencia de cloruro de amonio.
- 8.- El efecto estimulador del amonio, el ácido glutámico y la glutamina sobre la síntesis de gentamicina no es debido a un fenómeno de inducción.



## 9. RECOMENDACIONES

1.- Determinar cuál es el efector real de la estimulación de la síntesis de gentamicina causada por el amonio mediante el uso de análogos estructurales no metabolizables del amonio, del ácido glutámico y de la glutamina.

2.- Determinar si el ácido glutámico es utilizado por *M. purpureus* como aminodador en las reacciones de aminosustitución posteriores a la síntesis de 2-desoxistreptamina, mediante el aislamiento de mutantes idiótrofos de dicho precursor.

3.- Estudiar si existe alguna relación entre los niveles de actividad de las enzimas responsables de la asimilación de amonio para la síntesis de ácido glutámico y glutamina (GS, GDH, y GOGAT), y la capacidad de *M. purpureus* para producir gentamicina.

4.- Ya que la glutamina es requerida por *M. purpureus* como precursor para la síntesis de gentamicina, estudiar los mecanismos regulatorios que operan sobre la actividad de la enzima GS en este microorganismo.

5.- El presente trabajo es parte de un proyecto más amplio realizado en el laboratorio, relacionado con la influencia que tienen otros factores nutricionales sobre la biosíntesis de gentamicina, como son las fuentes de carbono y fosfatos. Por esta razón, los resultados obtenidos complementan la información requerida para la realización de un nuevo proyecto cuyo objetivo sea optimizar medios de cultivo complejos que permitan mejorar la producción de este antibiótico para su producción a gran escala.

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE CLORURO DE AMONIO EN LA PRODUCCION ESPECIFICA DE GENTAMICINA A LAS 168 HRS DE FERMENTACION.

## DATOS:

NIVEL (NH <sub>4</sub> Cl) (mM)	REPLICA GENTAMICINA (µg/mg)				MEDIA
20	32.8	29.6	32.9	30.8	31.5
40	38.7	36.5	36.5	38.1	37.5
100	45.4	46.1	43.6	43.8	44.7
150	74.0	76.0	66.6	65.7	70.6
MEDIA	47.7	47.1	44.9	44.6	46.1

## TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA:

FUENTE	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	CUADRADO MEDIO
NIVELES	3,557.3	3	1,185.70
ERROR	96.8	12	8.06
TOTAL	3,654.1	15	

3,557.3 es la varianza debida a los niveles.

96.8 es la varianza del error debida a factores aleatorios.

$$V_0 = 1,185.7/8.06 = 147.1$$

Para  $\alpha = 0.05$ ,  $F(12,3) = 3.49$  y  $147.1 > 3.49$

La prueba es SIGNIFICATIVA y las medias de los tratamientos en estudio ARROJAN DIFERENCIA en la variable de respuesta.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SULFATO DE AMONIO EN LA PRODUCCION ESPECIFICA DE GENTAMICINA A LAS 168 HRS DE FERMENTACION.

## DATOS:

NIVEL (NH <sub>4</sub> CL) (mM)	REPLICA GENTAMICINA (µg/mg)				MEDIA
20	21.4	22.5	21.9	22.2	22.0
40	31.2	30.3	28.4	27.9	29.6
100	32.9	32.5	40.5	35.0	35.2
150	51.3	52.5	65.3	56.3	61.4
MEDIA	36.7	37.1	39.0	35.4	37.1

## TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA:

FUENTE	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	CUADRADO MEDIO
NIVELES	3,513.40	3	1,171.10
ERROR	92.14	12	7.67
TOTAL	3,605.5	15	

3,513.4 es varianza debida a los niveles

92.14 es la varianza del error debida a factores aleatorios

$$V_0 = 1,171.4/7.67 = 152.7$$

Para  $\alpha = 0.05$ ,  $F(12,3) = 3.49$  y  $152.7 > 3.49$

La prueba es SIGNIFICATIVA y las medias de los tratamientos en estudio ARROJAN DIFERENCIA en la variable de respuesta.

**ANEXO 3 EFECTO DE LA ADICION DE AC. GLUTAMICO Y GLUTAMINA AL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCION ESPECIFICA DE GENTAMICINA A LAS 168 HRS DE FERMENTACION.**

**DATOS:**

CONDICION	GENTAMICINA ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )			
	REPLICAS			
CONTROL $\text{NH}_4\text{Cl}$ (40 mM)	38.1	39.1	39.7	36.1
+ GLU (10 mM)	75.8	68.1	76.2	69.4
+ GLN (10 mM)	87.0	78.5	75.0	71.2

**TABLAS DE ANALISIS DE VARIANZA:**

**1.- ADICION DE ACIDO GLUTAMICO:**

FUENTE	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	CUADRADO MEDIO
NIVEL GLU	2.325.62	1	2.325.62
ERROR	60.73	6	10.2
TOTAL	2.386.35	7	

$V_0 = 229.8$  para  $\alpha = 0.05$ ,  $F(6,1) = 5.99$   
 $229.8 > 5.99$  SI HAY EFECTO

**2.- ADICION DE GLUTAMINA:**

FUENTE	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	CUADRADO MEDIO
NIVEL GLN	3.136.32	1	3.136.32
ERROR	143.9	6	23.99
TOTAL	3.280.22	7	

$V_0 = 130.7$  para  $\alpha = 0.05$ ,  $F(6,1) = 5.99$   
 $130.7 > 5.99$  SI HAY EFECTO

**ANEXO 4 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CLORURO DE AMONIO EN LA SINTESIS DE GENTAMICINA A LAS 20 HRS DE INCUBACION EN UN SISTEMA DE CELULAS EN REPOSO.**

**DATOS:**

NH <sub>4</sub> Cl (mM)	N I V E L E S		TOTALES	MEDIAS
	CLORANFENICOL 0	(µg/ml) 50		
0	12.56 12.56 12.56 11.50	13.82 13.82 11.45 11.45	99.18	12.4
40	12.38 14.36 14.36 14.34	13.80 13.80 12.50 13.80	109.94	13.7
100	14.28 17.55 17.55 14.94	14.50 15.00 14.50 15.70	124.02	15.5
150	18.80 18.80 18.45 18.45	15.90 15.90 18.50 18.50	143.30	17.9
TOTALES MEDIAS	243.50 15.21	232.94 14.55	476.40	14.8

**TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA:**

FUENTE	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	CUADRADO MEDIO
NIVEL NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	137.50	3	45.80
NIVEL CLN	4.68	1	4.68
(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /CLN)	1.07	3	0.35
RESIDUO	27.95	24	1.16
TOTAL	171.20	31	

- A) NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: V<sub>0</sub> = 39.48: para α = 0.05, F(24,3) = 3.01 39.48 > 3.01  
 B) CLN : V<sub>0</sub> = 4.03: para α = 0.05, F(24,1) = 4.26 4.03 < 4.26  
 C) (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/CLN): V<sub>0</sub> = 0.92: para α = 0.05, F(24,3) = 3.01 0.92 < 3.01

Por consiguiente, el amonio tiene efecto sobre la producción de gentamicina, independientemente de la adición de cloranfenicol.

## ANEXO 5

## EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ACIDO GLUTAMICO EN LA SINTESIS DE GENTAMICINA A LAS 20 HRS DE INCUBACION EN UN SISTEMA DE CELULAS EN REPOSO.

## DATOS:

N I V E L E S			TOTALES	MEDIAS
GLU (mM)	CLORANFENICOL (pg/ml)			
	0	50		
0	12.58	13.82	99.18	12.4
	12.58	13.82		
	12.58	11.45		
	11.50	11.45		
5	28.10	28.08	230.48	28.8
	29.20	28.08		
	26.32	31.30		
	28.10	31.30		
10	37.10	37.30	296.40	37.0
	37.10	37.30		
	34.60	39.20		
	34.60	39.20		
20	46.30	42.90	385.30	48.1
	49.20	45.90		
	47.40	50.40		
	47.40	55.40		
TOTALES	494.50	516.90	1,011.40	31.6
MEDIAS	30.90	32.30		

## TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA:

FUENTE	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	CUADRADO MEDIO
NIVEL GLU	5,441.80	3	1,813.90
NIVEL CLN	15.73	1	15.73
(GLU /CLN)	4.34	3	1.44
RESIDUO	125.70	24	5.23
TOTAL	5,587.60	31	

- A) GLU :  $V_0 = 346.80$ ; para  $\alpha = 0.05$ ,  $F(24,3) = 3.01$  346.80 3.01  
 B) CLN :  $V_0 = 3.00$ ; para  $\alpha = 0.05$ ,  $F(24,1) = 4.26$  3.00 4.26  
 C) (GLU/CLN):  $V_0 = 0.27$ ; para  $\alpha = 0.05$ ,  $F(24,3) = 3.01$  0.27 3.01

Por consiguiente, el ac. glutámico tiene efecto sobre la producción de gentamicina, independientemente de la adición de cloranfenicol.

ANEXO 6 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLUTAMINA EN LA SINTESIS DE GENTAMICINA A LAS 20 HRS DE INCUBACION EN UN SISTEMA DE CELULAS EN REPOSO.

DATOS:

N I V E L E S			TOTALES	MEDIAS
GLN (mM)	CLORANFENICOL (µg/ml)			
	0	50		
0	12.58	13.82	99.18	12.4
	12.58	13.82		
	12.58	11.45		
	11.50	11.45		
5	15.90	15.90	136.76	17.1
	15.90	18.08		
	18.50	18.08		
	18.50	15.90		
10	21.14	23.70	172.40	21.5
	21.14	23.70		
	18.50	21.14		
	21.90	21.14		
20	32.40	31.50	251.20	31.4
	32.40	31.50		
	28.10	33.60		
	28.10	33.60		
TOTALES	321.12	338.38	659.30	20.6
MEDIAS	20.07	21.14		

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA:

FUENTE	SUMA CUADRADOS	GRADOS LIBERTAD	CUADRADO MEDIO
NIVEL GLN	1.576.80	3	525.60
NIVEL CLN	7.59	1	7.59
(GLN/CLN)	5.81	3	1.93
RESIDUO	59.90	24	2.33
TOTAL	1.646.10	31	

- A) GLN :  $V_0 = 225.50$ ; para  $\alpha = 0.05$ ,  $F(24, 3) = 3.01$   $225.50 > 3.01$   
 B) CLN :  $V_0 = 3.25$ ; para  $\alpha = 0.05$ ,  $F(24, 1) = 4.26$   $3.25 < 4.26$   
 C) (GLN/CLN) :  $V_0 = 0.82$ ; para  $\alpha = 0.05$ ,  $F(24, 3) = 3.01$   $0.82 < 3.01$

Por consiguiente, la glutamina tiene efecto sobre la producción de gentamicina, independientemente de la adición de cloranfenicol.

10 BIBLIOGRAFIA

- Abou-Zeid, A.A., Wahab, A.S. y Salem, H.M. (1975). Influence of some compounds on gentamicin formation by *Micromonospora PURPUREA*. J. Appl. Chem. Biotechnol. 26: 318-322.
- Abou-Zeid, A.A. y Shehata, Y.M. (1977). Gentamicins. Zbl. Bakt. II. Abt., Bd. 132: 97-108.
- Aharonowitz, Y. y Demain, A.L. (1979). Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. Can. J. Microbiol. 25: 61-67.
- Aharonowitz, Y. (1980). Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. Ann. Rev. Microbiol. 34: 209-233.
- Aharonowitz, Y. y Friedrich, C.G. (1980). Alanine dehydrogenase of the  $\beta$ -lactam antibiotic producer *Streptomyces clavuligerus*. Arch. Microbiol. 125: 137-142.
- Alvarez, M.E. y McCarthy, C.M. (1984). Glutamine synthetase from *Mycobacterium avium*. Can. J. Microbiol. 30: 353-359.
- Anhalt, J.P., Sancilio, F.D. y McCorkle, T. (1978). Gentamicin C-component ratio determination by high pressure liquid chromatography. J. of Chromatography. 153: 489-493.
- Berd, J. y Jaraí, M. (1986-a). *Micromonospora* produced aminoglycoside antibiotics: Chemistry and Microbiology. Process Biochemistry. Junio: 92-100.
- Berd, J. y Jaraí, M. (1986-b). *Micromonospora* produced aminoglycoside antibiotics: Chemistry and Microbiology. Part. II. Process Biochemistry. Agosto: 103-106.
- Braña, A.F., Wolfe, S. y Demain, A.L. (1985). Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. Can. J. Microbiol. 31: 737-743.
- Braña, A.F., Paiva, N. y Demain, A.L. (1986). Pathways and regulation of ammonium assimilation in *Streptomyces clavuligerus*. J. of General Microbiology. 132: 1305-1317.
- Brown, C.M. (1980). Ammonium assimilation and utilization in bacteria and fungi. En: Microorganisms and nitrogen utilization sources. Payne, J.N. Ed. Wiley & Sons, USA. Pp. 511-535.
- Calderón, J., Morett, E. y Mora, J. (1985). w-Amidase pathway in the degradation of glutamine in *Neurospora* CLASSES. The J. of Bacteriol. 161: 807-809.
- Calderón, J. y Mora, J. (1985). Glutamine cyclase in *Neurospora* CLASSES. J. of General Microbiology. 131: 3237-3245.



Carbajal, F. (1957). U.S. Patent 2,808,364.

Claridge, C.A. (1983). Mutagenesis and directed biosynthesis for the production of new antibiotics. En: Basic biology of new developments in biotechnology. Ed: Hollander, A., Laskin, A.I. y Rogers, F. Plenum Press, USA. Pp: 231-269.

Contrepois, A., Brion, N., Gerand, J., Faourisson, F., Delatour, F., Levy, J., Daybach, J. y Carbon, C. (1985). Renal disposition of gentamicin, dibekacin, tobramycin, netilmicin and amikacin in humans. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 27: 520-524.

Cramerl, R. y Davies, J.E. (1986). Increased production of aminoglycosides associated with amplified antibiotic resistance genes. The J. of Antibiotics. 39: 128-135.

Crueger, W. y Crueger, A. (1984). Biotechnology. Ed: Brock, T.D. Sinauer Associates Inc. Sunderland, M.A., Pp. 9-48; 49-53; 98-103.

Cundliffe, E. (1989). How antibiotic-producing organisms avoid suicide. Ann. Rev. Microbiol. 49: 207-238.

Chatterjee, S. y Vining, L.C. (1981). Nutrient utilization in actinomycetes. Induction of glucosidases in Streptomyces vevexuslae. Can. J. Microbiol. 27: 639-645.

Chul, S.S., Byung, W.A., Sang, H.L., Sung, U.K. y Song, H.B. (1982). Liberation of sisomicin from cells by sodium chloride. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 37-38.

Daniel, W.W. (1988). Biostatística. 3a edición. Ed. Limusa. Pp. 283-349.

Daum, S.J., Rosi, D. y Goss, W.A. (1977). Mutational biosynthesis by idiotrophs of Micromonospora burures. II. Conversion of non-amino containing cyclitols to aminoglycoside antibiotics. The J. of Antibiotics. 30: 98-105.

Demain, A.L. y Inamine, E. (1970) Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase ( $\alpha$ -D-mannosidase) formation. Bacteriological Reviews. 35M. 34: 1-19.

Demain, A.L. (1973). Mutation and the production of secondary metabolites. Adv. Appl. Microbiol. 16: 177-202.

Demain, A.L. y Fennel, r.M. (1978). Resting-cells studies on carbon-source regulation of  $\beta$ -lactam antibiotics biosynthesis. J. Ferment. Technol. 56: 323-328.

Demain, A.L. (1982). Overproduction of microbial metabolites and enzymes due to alteration of regulation. Adv. Biochem. Engin. 1: 113-139.

Drew, S.W. y Demain, A.L. (1977). Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 343-356.

Escalante, L. (1988). Efecto de la fuente de carbono sobre la biosíntesis de gentamicina en *Micromonospora purpurea* NRRL 2953. Tesis para obtener el diploma de Especialización en Biotecnología. (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

Fisher, S.H. (1988). Nitrogen assimilation in *Streptomyces*. En: *Biology of Actinomycetes*. Ed. Okami, Y; Beppu, T; Ogawara, H. Japan Scientific Societies Press. Pp. 47-51.

Flores, M.E. y Sánchez, S. (1985). Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythraeus*. *FEMS Microbiology Letters* 26: 191-194.

Floor, F., Rauveny, Z. y Magazanik, B. (1980). Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by the PII protein in *Klebsiella aerogenes*. En: *Biochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 2636-2640.

Glasby, J.S. (1979). *Encyclopaedia of Antibiotics*. 2a edición. John Wiley & Sons. N.Y. USA. Pp: 233-235.

González, R. y Sánchez, S. Regulación por nitrógeno de la producción de gentamicina. Resultados presentados en el XVIII Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. San Luis Potosí, S.L.P. Nov. 1980.

Gracheva, I.V., Laznikova, T.N. y Orlova, N.V. (1976). Significance of pH for growth of gentamicin producer biosynthesis of antibiotic. *Antibiotiki*. 21: 102- 105.

Grafe, U., Bocker, H. y Thrum, H. (1977). Regulative influence of o-aminobenzoic acid on the biosynthesis of nourseothricin in cultures of *Streptomyces noursei* JA 38906. II. Regulation of glutamine synthetase and the role of glutamine synthetase/glutamate synthase pathway. *Z. Allg. Mikrobiol.* 17: 201-209.

Hotta, K., Takahashi, A., Okami, Y. y Umezawa, H. (1983). Relationship between antibiotic resistance and antibiotic productivity in actinomycetes which produce aminoglycoside antibiotics. *The J. of Antibiotics*. 36: 1789-1791.

Hu Esc. W.S. y Demain, A.L. (1979). Regulation of antibiotic biosynthesis by utilized carbon sources. *Process Biochem.* 14: 2-6.

Islas, L. y Sanchez, S. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción fermentativa de gentamicina. Resultados presentados en el XVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C., Xalapa, Ver. Nov. 1986.

Inoue, S., Nishizawa, Y. y Nagai, S. (1983). Stimulatory effect of ammonium on streptomycin formation by *Streptomyces griseus* growing on a glucose minimal medium. *J. Ferment. Technol.* 61: 7-12.

Jones, G.H. (1985). Regulation of phenoxazinone-synthase expression in *Streptomyces antibioticus*. *J. of Bacteriology.* 163: 1215-1221.

Kanamori, K., Legerton, T.L., Weiss, R.L. y Roberts, J.D. (1982). Effect of the nitrogen source on glutamine and alanine biosynthesis in *Neurospora crassa*. *The J. of Biological Chemistry.* 257: 14168-14172.

Kase, H., Iida, T., Odakura, Y., Shirahata, K. y Nakayama, K. (1980). Accumulation of 2-deoxyxylorinosamine by a 2-deoxystreptamine-requiring idiotroph of *Micromonospora sasamizensis*. *The J. of Antibiotics.* 33: 1210-1212.

Kawamoto, I., Oka, T. y Nara, T. (1983). Carbon and nitrogen utilization by *Micromonospora* strains. *Agr. Biol. Chem.* 47: 203-215.

Kenealy, W.R., Thompson, T.E., Schubert, K.R. y Zeikus, J.G. (1982). Ammonia assimilation and synthesis of alanine, aspartate and glutamate in *Methanospirillum* *barleri* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. of Bacteriology.* 150: 1357-1365.

Kim, C.H. y Hollocher, T.C. (1982). <sup>13</sup>C-Isotope studies on the pathway of ammonia assimilation in *Bacillus megaterium* and *Escherichia coli*. *J. of Bacteriology.* 151: 358-366.

Kirby, J.F. (1980). Microbiological, Chemical and Clinical findings of aminoglycoside antibiotic research. *Process Biochemistry.* Oct/Nov: 14-23.

Kohlepp, S.J., Plant, S.B., McCarron, D.A. y Gilbert, D.N. (1982). Gentamicin does not chelate calcium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 21: 668-669.

Krasnova, T.P., Bukin, Y.N., y Orlova, N.V. (1979). Investigation of the role of some methylation systems components in cobalamin dependent biosynthesis of gentamicin by *Micromonospora purpurea* culture. *Antibiotiki.* 24: 808-815.

Laznikova, T.N., Gracheva, I.V., y Orlova, N.V. (1977). Effect of different forms of nitrogen on gentamicin biosynthesis by *Micromonospora purpurea* var. *violacea* 1935. *Antibiotiki.* 22: 579-581.

Laznikova, T.M., Krasnova, T.R., Lipina, E.V. y Orlova, N.V. (1978). Dependence of component composition of gentamicin complex on cultivation conditions of *Micromonospora purpurea* var. *violacea* 1935. *Antibiotiki*, 23: 499-503.

Le Goffic, F., Capman, M.L., Tany, F. y Caminada, E. (1980). Have deoxystreptamine aminoglycoside antibiotics the same binding site on bacterial ribosomes? - *The J. of Antibiotics*, 33: 895-899.

Lee, B.K., Condon, R.G., Wagman, G.H. y Katz, E. (1976). *Micromonospora* produced gentamicin components. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 9: 151-159.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 165-275.

Lucher, L.A., Chen, Y. y Walker, J.B. (1989). Reactions catalized by purified L-glutamine: keto-cyclo-inositol aminotransferase: an enzyme required for biosynthesis of aminocyclitol antibiotics. *Antibacterial Agents and Chemotherapy*, 33: 452-459.

Martin, J.F. y Demain, A.L. (1976). Control by phosphate of candidicin production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71: 1103-1109.

Martin, J.F. y Demain, A.L. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological Reviews*, 44: 230-251.

Mazuma, F., Tanska, Y. y Omura, S. (1983). Ammonium ion-derepressed fermentation of tylosin by the use of a natural zeolite and its significance in the study of biosynthetic regulation of the antibiotic. *J. Ferment. Technol.*, 61: 607-614.

McCarthy, C.M. y Alvarez, M.E. (1985). Influence of nitrogen source and growth status on glutamine synthetase activity in *Mycobacterium avium*. *Can. J. Microbiol.*, 31: 211-213.

Moukaddem, M., Tany, F., Capman, M.L., Le Goffic, F. (1986). Effects of cations, polyamines and other aminoglycosides on gentamicin C2. *The J. of Antibiotics*, 39: 136-140.

Nageoka, K. y Demain, A.L. (1975). Mutational biosynthesis of a new antibiotic streptomycin A by an idiotroph of *Streptomyces scabies*. *The J. of Antibiotics*, 28: 617-625.

Obregon, A.M. y Sanchez, S. Efecto de los fosfatos en la producción fermentativa de gentamicina en *Micromonospora purpurea* NRRL 2953. Resultados presentados en el 4o Congreso de Especialización, Maestría y Doctorado en Biotecnología de la UADP del CCH. UNAM, Mayo 30, 1988.

Odakura, Y., Kase, H. y Nakayama, K. (1983). Sagamicin and the related aminoglycosides: Fermentation and biosynthesis. III. Isolation and characterization of *Micromonospora sagamiae* mutants blocked in gentamicin C1 pathway. The J. of Antibiotics, 36: 125-130.

Okachi, R. y Nara, T. (1984). The aminoglycosides: Properties, biosynthesis and fermentation. En: Biotechnology of Industrial Antibiotics, Ed: Vandance, E.J. Marcel Dekker, Inc. N.Y. Vol. 22. Pp: 329-365.

Okazaki, H., Ono, H., Yamada, K., Beppu, T. y Arima, K. (1973). Relationship among cellular fatty acid composition, amino acid uptake and neomycin formation in a mutant strain of *Streptomyces fradiae*. Agr. Biol. Chem. 37: 2319.

Omura, S., Tanaka, T., Kiteo, C., Tanaka, H., Iwai, Y. (1980). Stimulation of magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 18: 691-695.

Omura, S., Tanaka, Y., Manada, H. y Masuma, R. (1984a). Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids on the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. The J. of Antibiotics, 37: 494-501.

Omura, S., Taki, A., Matsuda, K. y Tanaka, Y. (1984b). Ammonium ions suppress the amino acid metabolism involved in the biosynthesis of protonolide in the biosynthesis of protylonolide in a mutant of *Streptomyces fradiae*. The J. of Antibiotics, 37: 1362-1369.

Pahel, G. y Tyler, B. (1979). A new Gln A-linked regulatory gene for glutamine synthetase in *E. coli*. En: Genetics, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4544-4548.

Pearce, C.J. y Rinehart, K.L. (1981). Biosynthesis of aminocyclitol antibiotics. En: Antibiotics IV, Biosynthesis, Ed: Corcoran, J.W. Springer Verlag, Berlin, N.Y. Pp: 74-100.

Piendl, W. y Bock, A. (1982). Ribosomal resistance in the gentamicin producer organism *Micromonospora purpurea*. Antimicrobial and Chemotherapy, 22: 231-236.

Porter, J.N. (1975). Cultural conditions for antibiotic-producing microorganisms. En: Methods in Enzymology, Ed. Hesh, J.H. 43: 3-23.

Queener, S.W., McDermott, J. y Radue, A.B. (1975). Glutamate dehydrogenase specific activity, and cephalosporine C synthesis in the M8650 series of *Cephalosporium acremonium* mutants. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 7: 646-651.

Beylla, G., Ramos, F.R., López-Nieto, M.J., Alvarez, M.E. y Martín, J.F. (1986). Glucose represses formation of S-(L- $\alpha$ -aminocidipil)-L-cysteinyl-D-valine and isopenicillin N synthase but not penicillin acyltransferase in *Penicillium chrysogenum*. J. of Bacteriology, 168: 947-952.

Rinehart, K.L. y Stroehane, R.M. (1976). Biosynthesis of aminocyclitol antibiotics. The J. of Antibiotics, 39: 319-333.

Rinehart, K.L. (1977). Mutasynthesis of new antibiotics. Pure and Appl. Chem, 49: 1361-1384.

Rosi, D., Goss, W.A. y Daum, S.J. (1977). Mutational biosynthesis by idiotrophs of *Micromonospora purpurea*. I. Conversion of aminocyclitols to new aminoglycoside antibiotics. The J. of Antibiotics, 30: 88-97.

Rosner, A. y Aviv, H. (1980). Gentamicin bioautography assay vs microbiological disk test. The J. of Antibiotics, 33: 600-603.

Roszkowski, J., Rfalski, R. y Pacznaska-Bojanowska, K. (1969). Alanine dehydrogenase in *Streptomyces erythreus*. Acta Microbiologica Polonica, 18: 59-68.

Sánchez, S., Paniagua, L., Mateos, R.C., Lara, F. y Mora, J. (1980). Nitrogen regulation of penicillin G biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. Adv. in Biotechnology, Vol. III. Ed. Vezina, C. y Singh, K. Pergamon Press, Toronto, Canada. Pp. 147-154.

Schwartz, R., Lucas, M.T., Escalante, L., Vázquez, G. y Sánchez, S. (1988). Glutathione formation in *Penicillium chrysogenum*: Stimulatory effect of ammonium. J. of General Microbiol. 134: 1117-1121.

Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R. (1970). The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 24: 501-524.

Shapiro, S. y Vining, L.C. (1983). Nitrogen metabolism and chloranphenicol production in *Streptomyces venezuelae*. Can. J. Microbiol. 29: 1706-1714.

Shapiro, S. y Vining, L.C. (1985). Effect of ammonium on chloranphenicol production by *Streptomyces venezuelae* in batch and continuous cultures. Can. J. Microbiol. 31: 119-123.

Shapiro, S., Vining, L.C., Laycock, M., McInnes, A.G. y Walter, J.A. (1985). Pathway of ammonium assimilation in *Streptomyces venezuelae* examined by amino acid analyses and  $^{15}\text{N}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. Can. J. Microbiol. 31: 629-634.

Shier, W.T., Schaefer, P.C., Gottlieb, D. y Rinehart, L. (1974). Use of mutants in the study of aminocyclitol antibiotic biosynthesis and the preparation of the hibrimicin C complex. *Biochemistry*, **13**: 5073-5077.

Souza, J.D. y Ogilvie, R.I. (1982). Determination of gentamicin components, C1a, C2 and C1 in plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J. of Chromatography*, **232**: 212-218.

Streicher, S.L. y Tyler, B. (1981). Regulation of glutamine synthetase activity by adenilation in the Gram-positive bacterium *Streptomyces cattleya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1: 229-233.

Suzake, K., Tokunaga, K., Hayashi, H. y Hori, M. (1985). Biosynthesis of 2-deoxystreptamine. *The J. of Antibiotics*, **38**: 1211-1218.

Tanaka, Y., Masuma, R. y Omura, S. (1984). Control of ammonium ion level for efficient nanaomycin production. *The J. of Antibiotics*, **37**: 1370-1375.

Tanaka, Y., Taki, A., Masuma, R. y Omura, S. (1986). Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *The J. of Antibiotics*, **39**: 813-821.

Testa, R.T. y Tilley, B.C. (1976). Biotransformation, a new approach to aminoglycoside biosynthesis: II Gentamicin. *The J. of Antibiotics*, **29**: 140-146.

Ting, S.V. (1958). Rapid colorimetric methods for simultaneous determination of total reducing sugar and fructose in citrus juices. *Agric. and Food Chem.*, **4**, 3: 363-366.

Tyler, B. (1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.*, **47**: 1127-1162.

Umbarger, H.E. (1978). Amino acid biosynthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, **47**: 533-606.

Vournakis, J.N. y Elander, R.P. (1983). Genetic manipulation of antibiotic-producing microorganisms. *Science*, **219**: 702-708.

Vu-Trong, K. y Gray, F.P. (1987). Influence of ammonium on the biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**: 590-593.

Wagman, G.H., Marquez, J.A., Baily, J.A., Cooper, D., Weinstein, J., Tkach, R. y Daniels, P. (1972). Chromatographic separation of some minor components of gentamicin complex. *J. Chromatogr.*, **70**: 171-172.

Wagman, G.H. y Weinstein, M.J. (1980). Antibiotics from *Micromonospora*. Ann. Rev. Microbiol. 34: 537-557.

Walker, J.B. y Walker, M.S. (1969). Streptomycin biosynthesis. Transaminations involving and inosidiamines. Biochemistry. 8: 763-770.

Walker, M.S. y Walker, J.B. (1971). Streptomycin biosynthesis separation and substrate specificities of phosphatases acting on guanidino-deoxy- $\alpha$ -D-glucosyl-inositol phosphate and streptomycin-(streptidino) phosphate. J. Biol. Chem. 246: 7034-7040.

Walker, J.B. (1975). L-glutamine: Keto- $\alpha$ -D-glucosyl-inositol aminotransferase. Methods in Enzymology. 43: 439-443.

Walker, J.B. (1978). Biosynthesis of aminocyclitols and guanidinocyclitols. En: Cyclitols and phosphoinositides. Ed: Wells, M.W. y Eisenberg, F. Academic Press, N.Y. Pp: 423-438.

Walker, J.B. (1980). Biosynthesis of aminoglycoside antibiotics. En: Develop. Indust. Microbiol. Eds: Underkofler, L.A. y Wulf, M.L. Soc. Indust. Microbiol. Virginia, U.S.A. 21: 105-113.

Walker, J.B. y Walker, M.S. (1982). Enzymatic synthesis of streptomycin as a model system for the study of the regulation and evolution of antibiotic biosynthesis pathways. En: Overproduction of microbial products. Ed. Krumphanz, V., Sikyta, B. y Vanek, L. Pp: 271-281.

Wang, D.I.C., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunnill, P., Humphrey, A.E. y Lilly, M.D. (1979). Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley & Sons, U.S.A. Pp 75-81.

Weatherburn, M.W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Analytical Chemistry. 39: 971-974.

Weinstein, M.J., Wagman, G.H. y Taber, R.I. (1966). Toxicity of acetylated gentamicin and neomycin. Antibacterial Agents and Chemotherapy. 1965: 227-231.

Weinstein, M.J., Wagman, G.H., Oden, E.E. y Marquez, J.A. (1967). Biological activity of the antibiotic components of the gentamicin complex. J. of Bacteriology. 94: 789-790.