

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

" EFECTO DE LOS FOSFATOS EN LA PRODUCCION FERMENTATIVA DE
GENTAMICINA EN Micromonospora purpurea NRRL 2953 "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

ANA MARIA OBREGON LEMUS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11
22j
173072
1192



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.

13.-	Consumo de amonio por <u>Micromonospora purpurea</u> en presencia de una concentración alta de K_2HPO_4	50
14.-	Consumo de sacarosa por <u>Micromonospora purpurea</u> en presencia de una concentración alta de K_2HPO_4	51
15.-	Producción volumétrica de gentamicina en un sistema de células en reposo, adicionado de K_2HPO_4	53
16.-	Producción volumétrica de gentamicina en un sistema de células en reposo, adicionado de un inhibidor de síntesis de proteínas (cloranfenicol)	54
16a.-	Producción volumétrica de gentamicina en un sistema de células en reposo, adicionado de K_2HPO_4 y la mezcla de fosfato + cloranfenicol	56
17.-	Adición de K_2HPO_4 a las 48 h de fermentación	57
18.-	Adición de cloranfenicol a las 48 h de fermentación	58
19.-	Adición de cloranfenicol a las 48 h de fermentación	60
20.-	Adición de arsenato de sodio a las 48 h de fermentación	61
21.-	Principales precursores e intermediarios de la vía de biosíntesis de gentamicina	63
22.-	Adición de glucosamina 6P (15 y 30 mM) a las 96 h	64
23.-	Adición de xilosa (1 y 5%) a las 96 h	65
24.-	Adición (15 y 30 mM) a las 96 h	66
25.-	Reversión del efecto negativo del fosfato por la adición de 2-desoxiestreptamina (2-DOS)	67

INDICE DE TABLAS

1.- Sensibilidad de los microorganismos al antibiótico gentamicina	9
2.- Ejemplos de enzimas inactivantes de antibióticos aminoglucósidos	12
3.- Antibióticos aminoglucósidos a los cuales las bacterias han adquirido resistencia alterando los ribosomas	13
4.- Metabolitos no antibióticos cuya biosíntesis es regulada por fosfatos	22
5.- Antibióticos cuya biosíntesis es regulada por fosfato	23
6.- Regulación catabólica por fosfato en la biosíntesis de antibióticos.....	26

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCION	3
3	GENERALIDADES DE GENTAMICINA	6
	3.1 Clasificación y estructura	6
	3.2 Importancia clínica	8
	3.3 Biosíntesis	15
4	REGULACION DE LOS ANTIBIOTICOS POR FOSFATO	20
	4.1 Efecto del fosfato en el metabolismo primario	20
	4.2 Efecto del fosfato en el metabolismo secundario	21
	4.3 Efectores intracelulares	28
5	OBJETIVO	30
6	MATERIAL Y METODOS	31
	6.1 Microorganismos	31
	6.2 Medios de cultivo	31
	6.3 Preparación del inóculo	32
	6.4 Fermentación	34
	6.5 Sistema de células en reposo	35
	6.6 Métodos analíticos	36
	6.6.1 Crecimiento celular	36
	6.6.2 Cuantificación de gentamicina	36
	6.6.3 Determinación de sacarosa	37
	6.6.4 Determinación de fosfato	37
	6.7 Presentación de resultados y reproducibilidad	38
7	RESULTADOS Y DISCUSION	39
	7.1 Efecto de la concentración de fosfato	39
	7.2 Caracterización del efecto regulatorio	52
	7.3 Sitio de acción del fosfato	62
8	CONCLUSIONES	69
9	RECOMENDACIONES	70
10	BIBLIOGRAFIA	71

La gentamicina es un antibiótico aminoglucosido de amplio espectro antibacteriano, el cual representa uno de los productos farmacéuticos prioritarios en el cuadro básico de medicamentos.

Este antibiótico es producido en el país, pero unicamente cubre el 75% de la demanda nacional, por lo que hay que importar el 25% restante.

La producción fermentativa de este metabolito es poco eficiente en cuanto a rendimientos, debido en parte al desconocimiento de los mecanismos regulatorios involucrados en su biosíntesis. Por esta razón es necesario llevar a cabo investigaciones que permitan incrementar los rendimientos que actualmente se obtienen por vía fermentativa. Uno de esos estudios es determinar el efecto de varios factores nutricionales en la formación de este antibiótico.

En cuanto al efecto de los fosfatos se refiere, se conoce que este nutriente ejerce un efecto negativo en la mayoría de los metabolitos secundarios e inclusive en diversos metabolitos primarios (MARTIN, 1989)

En el caso de gentamicina no existen reportes en cuanto al efecto de este nutriente en su biosíntesis, por lo que el objetivo de este trabajo fue el determinar y caracterizar la influencia de los fosfatos sobre la producción de gentamicina utilizando una cepa de Micromonospora purpurea, capaz de crecer y producir el antibiótico de referencia en condiciones de fermentación sumergida.

Para cumplir el objetivo planteado se decidió probar el efecto de la concentración de fosfato de potasio en la biosíntesis de gentamicina, en donde observamos que el fosfato ejerce un efecto negativo en la producción específica del antibiótico a concentraciones mayores de 1 g/l, sin tener efecto alguno en el crecimiento del microorganismo ni en el pH del medio de cultivo.

Por otro lado se decidió determinar si el fenómeno regulatorio presentado correspondía a una inhibición o una represión. Para ello se realizaron varios experimentos, tanto en un sistema de células en reposo como en fermentaciones, los cuales revelaron que se trataba de una represión y no una inhibición. También se llevaron a cabo algunos experimentos con un análogo de fosfato para determinar si el fosfato per se o algún producto de su metabolismo era el efector, encontrándose que con el análogo se obtenía un perfil de respuesta similar al de el fosfato, por lo que podemos pensar que la molécula del fosfato per se es la responsable del efecto manifestado.

Posteriormente se llevaron a cabo estudios con el fin de determinar el posible sitio de acción del fosfato. Para ello se adicionaron a la fermentación varios intermediarios y precursores de la vía de biosíntesis de gentamicina, con el fin de revertir el efecto negativo del fosfato. El único compuesto que logró revertir tal efecto fue el 2-deoxiestreptamina (2-DOS) a una concentración de 200 µg/ml, lo que indica que el sitio de acción de este nutriente se encuentra en pasos anteriores a la formación de este intermediario.

La gentamicina constituye uno de los agentes antimicrobianos mas importantes dentro del grupo de los aminoglucósidos. Esta importancia radica en el gran número de aplicaciones que se le han dado y destaca su uso como agente terapéutico para el control de infecciones gastrointestinales, urinarias, respiratorias y dérmicas causadas por Escherichia coli, Proteus y Pseudomonas (WAGMAN and WEISTEIN, 1980).

La producción fermentativa de gentamicina resulta un proceso poco eficiente en cuanto al rendimiento final del producto, situación debida, entre otros aspectos, al desconocimiento de los mecanismos regulatorios que operan en la biosíntesis de la misma, así como de la poca información existente relacionada con el mejoramiento genético del microorganismo. El incrementar el nivel de producción de gentamicina que se obtiene actualmente por vía fermentativa, permitiría no sólo cubrir la demanda nacional del antibiótico, sino también disminuir los costos tanto de producción como de recuperación del 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 (DOULL and VINIG, 1990). Se ha propuesto que los sistemas que regulan la utilización de nutrientes tienen una doble función; controlar no sólo las vías que proveen a la célula de los materiales esenciales para la formación de macromoléculas, sino también las rutas que dan lugar a la biosíntesis de los antibióticos, con la finalidad de asegurar la sobrevivencia de los microorganismos cuando las condiciones del medio se encuentren restringidas (CHATTERJEE and VINING, 1981).

Una característica del metabolismo secundario es que usualmente, su síntesis ocurre a bajas velocidades específicas de crecimiento de los organismos productores. (WEINBERG, 1974). Los niveles altos de antibióticos o metabolitos secundarios que se producen en medios de cultivos ricos, se obtienen únicamente cuando el crecimiento microbiano ha terminado (MARTIN and DEMAINE, 1980a). El retraso de la producción de los antibióticos después de que la tasa de crecimiento disminuye parece ser un evento genéticamente programado y probablemente tiene implicaciones de sobrevivencia para los microorganismos que los producen. Se sabe que algunos antibióticos poseen funciones de inhibición sobre la síntesis de macromoléculas o de la pared celular en los microorganismos productores (SARKAR and PAULUS, 1972). Dado que la síntesis del antibiótico ocurre después de que el crecimiento ha concluido el organismo productor puede evitar el suicidio (DEMAINE, 1974).

Ante esto, una pregunta interesante es cómo la célula controla la expresión diferencial de la información genética requerida para el crecimiento y por otro lado la requerida para la formación del antibiótico o metabolito secundario.

La biosíntesis de los metabolitos secundarios se realiza a partir de intermediarios o de productos monoméricos del metabolismo primario. Las rutas biosintéticas del metabolismo secundario frecuentemente son ramificadas con reacciones alternativas, pero que finalmente dan lugar al mismo producto. Estas rutas también generan diversas familias de productos.

Si comparamos el número de metabolitos secundarios que han sido aislados con la cantidad de enzimas que actualmente están caracterizadas esta es relativamente baja ya que las primeras enzimas de una ruta biosintética del metabolismo secundario son más difíciles de aislar que aquellas de los últimos pasos de la vía. Sin embargo estudios de purificación están siendo realizados sistemáticamente con la finalidad de conocer más a fondo este tipo de enzimas.

Recientemente experimentos de clonación dan lugar a un mayor conocimiento de esta clase de enzimas (MALPARTIDA et al., 1987). En rutas metabólicas como la de estreptomocina (WALKER, 1979) y de los antibióticos β -lactámicos (JENSEN, 1985) en donde una gran proporción de las enzimas biosintéticas han sido examinadas, permiten concluir que las reacciones catalizadas por éstas son específicas y claramente diferentes de aquellas que intervienen en el metabolismo primario.

Fosfato controla la formación de metabolitos secundarios tanto en bacterias como hongos y en plantas (MARTIN, 1977). La influencia del fosfato en la producción de los antibióticos ha sido conocido por muchos años y que hasta la fecha continúa vigente como una parte importante del conocimiento fisiológico (DOULL and VINING, 1990) y molecular (MARTIN, 1991) del control de la biosíntesis de los antibióticos y de otros eventos metabólicos como la excreción de proteínas y autólisis (GONZALEZ et al., 1990).

Seguido del descubrimiento de nuevos antibióticos, estudios nutricionales revelaron que altas concentraciones de fosfato inorgánico por un lado inhibían la formación de muchos metabolitos secundarios pero por otro lado estimulaban el crecimiento de los microorganismos productores. Generalmente la síntesis de los metabolitos secundarios así como de las estructuras para llevar a cabo la diferenciación celular tienen una estrecha tolerancia a concentraciones de fosfato más bajas que el crecimiento vegetativo de las células productoras. Por ejemplo, aunque el crecimiento de las células procariotas y eucariotas es permitido en rangos de 0.1 a 500 mM de fosfato, el metabolismo secundario es restringido a concentraciones menores de 10 mM.

Los metabolitos secundarios son frecuentemente formados como familias de compuestos relacionados químicamente. A veces se encuentra que algunas proporciones o grupos de las diferentes familias de compuestos son afectadas por el fosfato, sin embargo, la supresión de la biosíntesis de todos los compuestos relacionados es frecuentemente observada a concentraciones altas de fosfato. Cuando una sola cepa es capaz de producir dos o mas antibióticos biogenéticamente no relacionados, la sensibilidad hacia el fosfato de sus respectivas rutas biosintéticas puede ser diferente. Esto parece ser debido a que la expresión diferencial de ciertos genes es en función de la concentración de fosfato. (MARTIN, 1989).

Varios mecanismos de control del fosfato en la biosíntesis de los antibióticos han sido publicadas (MARTIN, 1989). Estas revisiones consideran:

- a) Enzimas involucradas en la biosíntesis de los antibióticos.
- b) Efectores intracelulares responsables de la inhibición o represión.
- c) Mecanismos moleculares que regulan la expresión de los genes que codifican para las sintetetas

3 GENERALIDADES DE GENTAMICINA

3.1 Clasificación y estructura

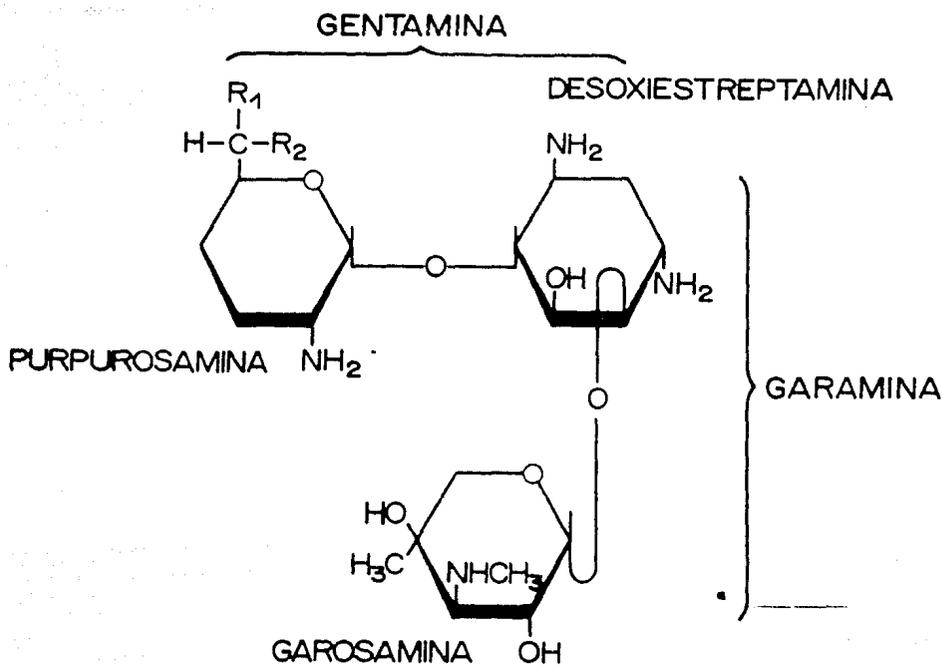
La gentamicina es un antibiótico bactericida del tipo de los aminoglucósidos, descubierto por WAGMAN y WEISTEIN (1980).

Los antibióticos aminoglucósidos se caracterizan por presentar un anillo aminociclohexanol o aminociclitol y se clasifican en función de la estructura química que presentan. Se han establecido 4 clases: los monoaminociclitoles, los que contienen actinamina, los que contienen estreptidina o bluesedina y los que contienen 2-deoxiestreptamina; estos últimos son subdivididos de acuerdo a la posición en la que están los substituyentes en los carbonos 4,5,4/5 y 4/6). De acuerdo a esta clasificación, las gentamicinas han sido incluidas en el grupo de antibióticos aminoglucósidos con 2-deoxiestreptamina 4,6-disustituída (Fig. 1).

Las gentamicinas se caracterizan por poseer dos azúcares poco comunes, un monosacárido del tipo metil-glucósido denominado metilgarosamina; el otro es una piranosa denominada purpurosamina (Fig 1). Al ser sometidas a metanolisis las subunidades de las gentamicinas se separan formando dos tipos de pseudodisacáridos, la garamina (garosamina-deoxiestreptamina) y la gentamina (purpurosamina-deoxiestreptamina) (ABOUD-ZEID and SHEHATA, 1977).

El producto de la fermentación, conocido como gentamicina o complejo de 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 (WEISTEIN et al., 1967). Las gentamicinas C1, C1a y C2 difieren entre sí únicamente en sus contenidos de grupos metilo .

Además de las gentamicinas se han purificado una serie de pseudodisacáridos estructuralmente relacionados, los cuales son producidos por el mismo microorganismo, algunos son intermediarios o modificaciones de otras rutas biosintéticas y presentan también actividad biológica (GLASBY, 1979).



GENTAMICINA	R ₁	R ₂	PM
C ₁	CH ₃	NHCH ₃	477
C _{1a}	H	NH ₂	449
C ₂	CH ₃	NH ₂	463

Fig. 1. Estructura química del complejo de gentamicina C (PEARCE and RINEHART, 1981)

3.2 Importancia clinica

La gentamicina es un antibiótico de amplio espectro antibacteriano. Su acción bactericida es generalmente mas alta que la presentada por otros antibióticos del mismo grupo, como la estreptomina, neomicina, y kanamicina. Actúa contra bacterias Gram (-) como las de los géneros Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Serratia y algunas especies de Proteus y Pseudomonas. En cuanto a bacterias Gram (+) únicamente Staphylococcus aureus y Bacillus subtilis son altamente sensibles a este antibiótico mientras que microorganismos del género Clostridium, Mycobacterium y Corynebacterium son menos sensibles. (Tabla 1).

La acción bactericida de la gentamicina principalmente contra bacterias Gram (-) le ha dado su principal aplicación clínica como es 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, carbencilina y vancomicina, dando como resultado efectos sinérgicos importantes (KIRBY, 1980).

La gentamicina ejerce su acción antibacteriana a través de la inhibición de la síntesis de proteínas (ABOUD-ZEID and SHEHATA, 1977). Este antibiótico es capaz de formar complejos con los ribosomas de los microorganismos sensibles al mismo. Se ha demostrado la existencia de un sitio de unión de alta y baja afinidad para las moléculas de gentamicina tanto en la subunidad 50S como en la 30S. La interacción del antibiótico con la subunidad 30S da como resultado la liberación de la formil-metionina-RNA del complejo de iniciación.

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 mas potentes.

I. GRUPO GRAM (-)

MIC (µg/ml)

<i>Escherichia coli</i>	0.25
<i>Enterobacter sp.</i>	0.05 - 4.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.0
<i>Proteus sp.</i>	0.05 - 2.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.05
<i>Salmonella sp.</i>	1.0
<i>Shigella sp.</i>	2.0

II. GRUPO GRAM (+)

<i>Bacillus subtilis</i>	0.010 - 1.0
<i>Clostridium sp.</i>	0.125 - 1.0
<i>Corynebacterium sp.</i>	0.125 - 1.0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0.125 - 1.0
<i>Streptococcus sp.</i>	2.4 - 8.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.03

MIC = Concentración mínima inhibitoria

Tabla 1. Sensibilidad de los microorganismos al
antibiótico gentamicina (GLASBY, 1979)

Actúa específicamente sobre el octavo par craneal y es capaz de unirse a la corteza renal causando serios daños en los túbulos renales (KOHLEPP et al., 1966).

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 secundarias no se presentan (WEISTEIN et al., 1966).

Los grupos amino libres de la gentamicina no sólo 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 B. subtilis ATCC 6633, aún en concentraciones de 10 mg/ml (ABOUD -ZEID and SHEHATA, 1977).

Tanto las bacterias Gram (+) como Gram (-) son resistentes a la acción de los antibióticos aminoglucósidos a través de: (a) alteración de los ribosomas (b) disminución en el transporte de los antibióticos y (c) inactivación enzimática. El último mecanismo es generalmente mediado por enzimas de genes codificadas en plásmidos, y se encuentra en la mayoría de las cepas clínicas. (COURVALIN and CARLIER, 1981).

A continuación se detallan estos mecanismos:

(a) Alteración de los ribosomas

Cambios en un solo aminoácido en la proteína de los ribosomas (Tabla 3) dan como consecuencia un ribosoma con afinidad baja hacia los antibióticos (CHANG and FLASK, 1972). Este tipo de mutantes no constituyen un problema en la terapéutica, son raras en casos clínicos y no presentan resistencia cruzada hacia los otros miembros de la familia de los aminoglucósidos

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 (MOUKADDEM, et al., 1986).

(b) Interferencia con el transporte de los antibióticos

El transporte de los aminoglucósidos en la célula es dependiente de energía. Las mutaciones que afectan este sistema de transporte activo, por ejemplo desacoplando la síntesis de ATP al transporte de electrones, dan como consecuencia una disminución en el transporte del antibiótico hacia el interior de la célula. Por esta razón microorganismos anaerobios son resistentes a este tipo de antibióticos. Tal es el caso de cepas de Pseudomonas aeruginosa (BRYAN et al., 1975) que cada día se

encuentran con mayor frecuencia en hospitales en donde se usan grandes cantidades de aminoglucósidos. En estos ecosistemas las mutantes resistentes pueden ser un problema en la terapia con este tipo de antimicrobianos ya que tales cepas son refractarias a los aminoglucósidos.

(c) Detoxificación enzimática de los antibióticos

Modificaciones por enzimas de genes codificados en plásmidos se encuentran en la mayoría de cepas clínicas. Estas enzimas pueden ser divididas en 3 clases dependiendo de la reacción catalizada: fosforilación o adenilación de un grupo hidroxilo y acetilación de un grupo amino son llamadas de acuerdo al sitio que modifican en la molécula del antibiótico.

Este es uno de los principales mecanismos de resistencia que desarrollan los microorganismos hacia la acción de la gentamicina. Las principales enzimas inactivantes de las moléculas de este antibiótico aminoglucósido adenil-(o-nucleotidil)-transferasa son la (AAD), aminoglucósido transferasa (APH) y la aminoglucósido acetiltransferasa (ACC). Esta última es quizá la más difundida entre los microorganismos de mayor importancia clínica (OKACHI, and NARA, 1984). En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos.

Debido a la gran importancia clínica de los aminoglucósidos 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 encaminadas a la obtención de nuevos productos que presenten mejores características sobre los antibióticos naturales, tales como menor toxicidad y mayor actividad biológica. Una de las principales estrategias aplicadas en esta área de investigación es la de la biosíntesis mutacional o mutasíntesis (CLARIDGE, 1983). Esta 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 aminoglucósido 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 aminoglucósidos modificados estructuralmente.

GRAM POSITIVO

ENZIMA			
	<u>Staphylococcus</u>	<u>Streptococcus</u>	G(-)
FOSFOTRANSFERASAS			
APH (8)	-	-	•
APH (8')	•	•	•
APH (2')	•	•	•
APH (8'')	-	-	•
APH (8''')	-	-	•
NUCLEOTIDILTRANSFERASA			
AAD (8)	•	?	-
AAD (4)(4')	•	-	-
AAD (2')	?	-	•
AAD (8'')(8)	•	?	•
ACETILTRANSFERASAS			
AAC (8)	?	-	•
AAC (2')	-	-	•
AAC (8')	•	•	•

APH = aminoglucosido fosfotransferasa
 AAD = aminoglucosido adeniltransferasa
 AAC = aminoglucosido acetiltransferasa

Tabla 2. Ejemplos de enzimas inactivantes de antibióticos aminoglucósidos (COURVALIN and COURLIER, 1981)

ESTREPTOMICINA	(S 12)
ESPECTINOMICINA	(S 5)
NEOMICINA	(S 6)
KANAMICINA	(S 6)
TOBRAMICINA	(S 6)
GENTAMICINA	(L 6)

La proteína modificada en la mutante resistente,
está indicada en el paréntesis

**Tabla 3. Antibióticos aminoglucósidos a los cuales
las bacterias han adquirido resistencia
alterando los ribosomas (DAVIS, 1980)**

En lo que respecta a gentamicina, (ROSI, et al. en 1977) obtuvieron los análogos mutasintéticos 2-hidroxi-gentamicina y 5-deoxigentamicina mediante el aislamiento de mutantes de M. purpurea (DOS⁻). El primero de ellos presento una mayor actividad biológica contra diversas cepas de E.coli, K. 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 de gentamicina C puede dividirse en dos partes: 1) la que permite la formación del grupo aminociclitol 2-desoxiestreptamina (2-DOS), la cual es común para otros microorganismos que sintetizan antibióticos con esta unidad estructural, 2) a la que lleva a la síntesis de las gentamicinas C1, C1a y C2 a partir del precursor 2-DOS (PEARCE and RINEHART 1981).

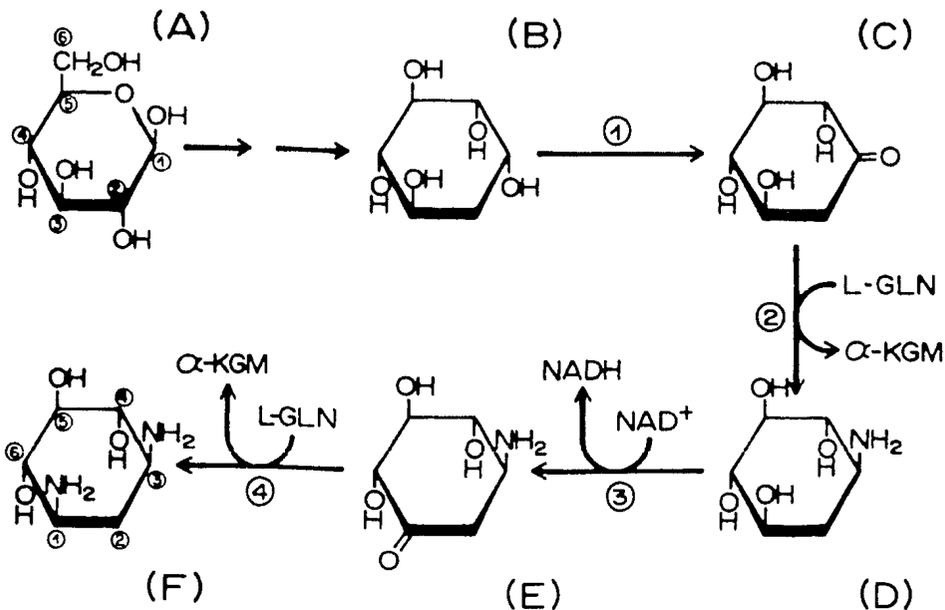
1) Biosíntesis del precursor 2-desoxiestreptamina:

El precursor 2-DOS se sintetiza a partir de D-Glucosa mediante reacciones de deshidrogenación y transaminación formándose intermediarios de inositol en forma similar a como sucede en la síntesis de estreptidina (WALKER, 1979)

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).

La existencia de los intermediarios viboquercitol (B) y su producto de oxidación 2-desoxi-inososa (C), fue demostrada por el grupo de DAUM, (1977). Sus estudios se basaron en experimentos de mutasíntesis, para los cuales utilizaron una mutante idiótrofa de M. purpurea (DOS⁻), bloqueada en una etapa temprana de la biosíntesis del anillo aminociclitol.

En otros estudios de mutasíntesis realizados con mutantes idiótrofas de M. sagamiensis (DOS⁻), se confirmó que el ciclitol 2-desoxi-inosamina (DOI) (D), es intermediario en la síntesis de 2-DOS en un paso posterior a la formación de 2-desoxi-inososa (C), (KASE et al., 1980). Adicionalmente estos investigadores determinaron la cinética de formación del intermediario DOI en una de las mutantes aisladas, bloqueada en un paso entre la conversión de DOI a 2-DOS. La síntesis de DOI tiene lugar en la célula durante la fase tardía del crecimiento logarítmico de la mutante.



- (A) D-glucosa.
 (B) Viboquercitol.
 (C) 2-desoxi-inososa (2,4/3,5-tetrahidroxiciclohexanona).
 (D) 2-desoxi-inosamina (2,4/3,5-tetrahidroxiciclohexilamina).
 (E) Aminodesoxi-inososa.
 (F) 2-desoxiestreptamina (2-DOS).

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

Fig. 2. Ruta biosintética de 2-desoxiestreptamina a partir de glucosa (LUCHÈR, et al., 1989; SUZAKE, et al., 1985)

En relación con la procedencia de los grupos amino de 2-DOS, LUCHER et al., en 1989 realizaron estudios respecto a la enzima L-glutamina: ceto-scylo-inositol aminotransferasa de M. purpurea demostrando que :

a) La enzima presenta una actividad específica baja durante las primeras horas de crecimiento del microorganismo, la cual aumenta progresivamente a medida que transcurre la fase de crecimiento exponencial. Este comportamiento sitúa a la amino transferasa como una enzima típica del metabolismo secundario (MARTIN and DEMAINE 1980a).

b) El producto que resulta de las reacciones de transaminación con L-glutamina como el donador de grupos amino es el ácido alfa-cetoglutarámico.

c) Observaron que el ATP y el Mg(+2) no estimulan la conversión del intermediario DOI a 2-DOS, lo que sugiere que no se forman intermediarios fosforilados como sucede en la síntesis de estreptidina (DEMAINE and INAMINE, 1970).

2) Biosíntesis del complejo de gentamicina C a partir del precursor 2-desoxiestreptamina:

La propuesta de vía de biosíntesis que conduce a la formación del complejo de gentamicina C, fue elaborada por TESTA y TILLEY, en 1976, con base en estudios de bioconversión con sistemas de células en reposo. Para ello utilizaron una mutante idiótrofa de M. purpurea (paromamina), incapaz de sintetizar el antibiótico bajo condiciones normales de fermentación y a la cual le 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 et al., 1972). Mediante este tipo de estudios se logró establecer que la vía biosintética de gentamicina C es ramificada: el antibiótico JI-20A conduce a la formación de la gentamicina C1a y el antibiótico G-418 a la de las gentamicinas C2 y C1.

Esta ruta biosintética fue estudiada también por el grupo de ODAKURA, en 1983, utilizando mutantes de M. sagamiensis 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 con el aminoazúcar D-glucosamina, mediante un enlace glucosídico, para dar lugar a la formación del pseudodisacárido paromamina (G). Este a su vez se condensa con el azúcar D-xilosa para formar el pseudotrisacárido gentamicina A2

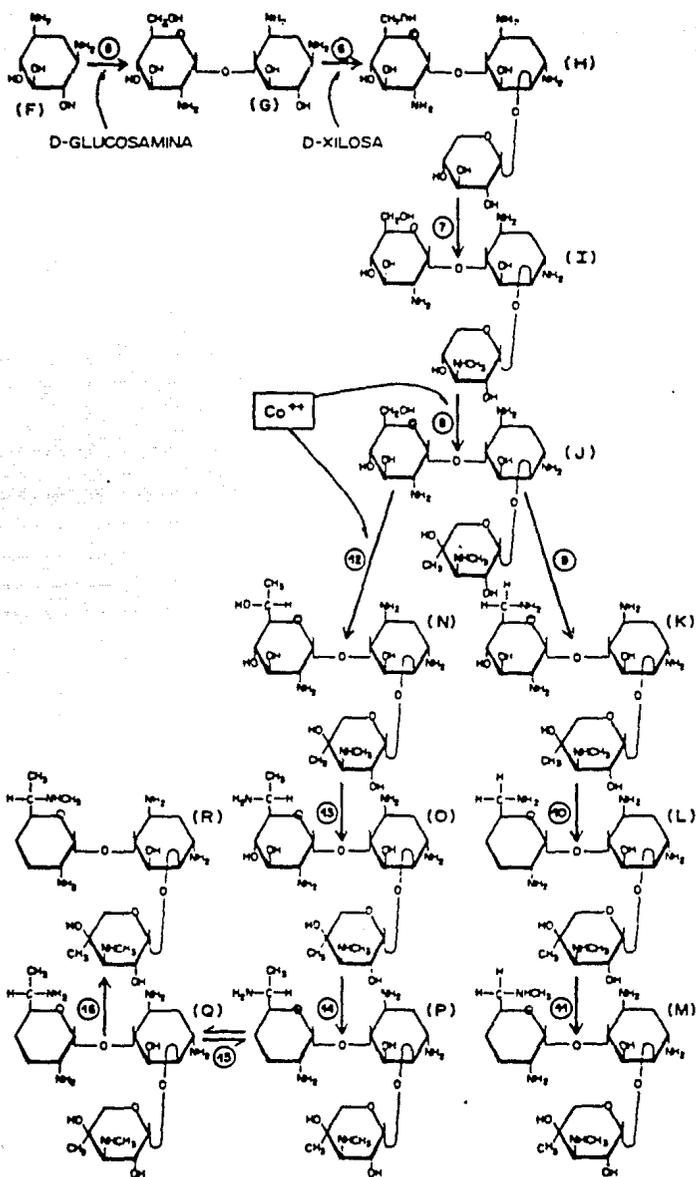


Fig. 3. Ruta biosintética del complejo gentamicina C a partir de 2-desoxiestreptamina.

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 con inversión de la configuración en el C-6'
- 12.- C-metilación con inversión de 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 X2 |
| (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 |

Reacciones e intermediarios de la ruta biosintética del complejo gentamicina C a partir de 2-DOS (TESTA and TILLEY, 1976; PEARCE and RINEHART, 1980 ODAKURA, et al., 1983)

(H) que es la primera unidad estructural del complejo de gentamicina C. Tanto la D-glucosamina como la D-xilosa provienen de la D-glucosa (RINEHART et al., 1976).

La gentamicina A2 (H) se transforma en gentamicina A (I) a través de una reacción de aminación seguida de una N-metilación en el C-3". Posteriormente la gentamicina A2 se convierte en gentamicina X2 (J) mediante una C-metilación con inversión de la configuración en el C-4". En este punto la vía se ramifica en dos, una de ellas da lugar a la síntesis de gentamicina C1a (L) y la otra a la de las gentamicinas C2 (Q) y C1 (R):

a) Biosíntesis de gentamicina C1a a partir de gentamicina X2:

La gentamicina X2 (J) experimenta una aminosustitución en el C-6, para dar lugar a la formación del antibiótico JI-20A, el cual se transforma finalmente en gentamicina C1a (L) mediante deshidroxilación en los carbonos 3 y 4 .

b) Biosíntesis de gentamicina C1 y C2 a partir de gentamicina X2:

La gentamicina X2 (J) a través de una reacción de C-metilación con inversión de la configuración en el C-6". El antibiótico JI-20B experimenta una deshidroxilación en los carbonos 3 y 4 formando la gentamicina C2a (P), la cual se epimeriza en el C-6 para sintetizar la gentamicina C2 (Q). Finalmente ésta se transforma en gentamicina C1 (R) a través de una N-metilación en el C-6.

En estudios realizados por LEE et al., en 1976, comprobaron que tanto las N-metilaciones como las C-metilaciones de los respectivos componentes del complejo C, provienen del aminoácido L-metionina.

Por otro lado ODAKURA et al., en 1983 demostraron que las reacciones de C-metilación requieren del ión cobalto (Co⁺²) para su actividad.

4 REGULACION DE LOS ANTIBIOTICOS POR FOSFATO

4.1 Efecto del fosfato en el metabolismo primario

Los estudios iniciales sobre el mecanismo de regulación por ortofosfato hacían énfasis en su efecto sobre la formación de los precursores de los metabolitos secundarios (MARTIN, 1979). La formación de precursores afecta la biosíntesis de los metabolitos secundarios de manera significativa (DREW and DEMAIN, 1977). aunque existe poca información de ejemplos bien documentados del efecto del fosfato en la formación de estos precursores.

Muchas enzimas centrales del metabolismo primario parecen ser estimuladas por fosfato a través de proveer metabolitos para el intenso crecimiento que se lleva a cabo en la presencia de concentraciones elevadas de fosfato.

Las enzimas fosfocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, por ejemplo son estimuladas de dos a tres veces por la adición de fosfato (5 mM) a cultivos de Streptomyces griseus IMRU 3570 (LIRAS et al., 1977).

Recientemente los estudios sobre la regulación por fosfato sugieren que este componente del medio de cultivo cambia el catabolismo de los carbohidratos de la ruta de las hexosas monofosfato a la glicólisis, lo cual podría considerarse cierto por la reducción que se observa de algunos precursores de los antibióticos. Sin embargo, después de muchos años no existe información adicional que apoye esta teoría.

En Streptomyces fradiae, propionil-CoA se forma a través del catabolismo de los aminoácidos valina, treonina y metionina (DOTZLAF et al., 1984). En este microorganismo la valina deshidrogenasa que cataliza la desaminación de valina a α -cetoisovalerato, es regulada por fosfato (MADRY et al., 1979) Estos autores sugieren que el ión afecta la biosíntesis del antibiótico tilosina a través de la inhibición de la degradación de los ácidos grasos y por lo tanto generan una disminución en el suplemento de precursores para la formación del tilonólido; sin embargo en estudios posteriores, se indica que el fosfato principalmente afecta la actividad de enzimas específicas en la formación de la tilosina.

4.2 Efecto del fosfato en el metabolismo secundario

La biosíntesis de un gran número de metabolitos secundarios (Tabla 4) un gran número de antibióticos (Tabla 5) son objeto de regulación por fosfato. Las concentraciones de fosfato inorgánico mayores de 3 a 5 mM son frecuentemente inhibitorias para la producción de metabolitos secundarios de plantas, hongos y bacterias en fermentaciones líquidas, y por otro lado el crecimiento de las células productoras puede ser progresivamente estimulado incrementando la concentración de fosfato por arriba de 300 mM. . Un ejemplo bien conocido de la inhibición por fosfato ocurre en la producción de candicidina por S. griseus IMRU 3570 (MARTIN, 1976).

A. ANTIBIOTICOS

La biosíntesis de varios grupos de antibióticos es especialmente sensible a la regulación por fosfato. Esto incluye a los aminoglucósidos (estreptomina, neomicina, kanamicina, butirosina), tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina), macrólidos (tilosina, eritromicina, oleandomicina), poliénicos (candicidina, anfotericina B, perimicina, micohéptina) y poliéter ionóforos (monesina). Un grupo de antibióticos cuya síntesis es menos sensible a la regulación por fosfato son los β -lactámicos (penicilina, cefalosporina, cefamicina), ya que en estos casos son necesarias concentraciones de fosfato de 25 a 100 mM para observar un efecto inhibitorio (AHARONOWITZ and DEMAIN, 1977).

La biosíntesis de antibióticos que provienen directamente de aminoácidos tienen una tendencia a ser menos sensibles a la regulación por fosfato que los poliketidos y aminoglucósidos. En Streptomyces clavuligerus NRRL 3585, que sintetiza diferentes antibióticos, la biosíntesis de ácido clavulánico (derivado de glicerol y L-ornitina) es muy sensible al fosfato, mientras que la cefamicina (proveniente de L- α -aminoadipato, L-cisteína, y L-valina) no es afectada por 25 mM de fosfato, por lo tanto es posible disociar a cefamicina del ácido clavulánico en este organismo ajustando el nivel de fosfato en el medio. (ROMERO et al., 1984)

METABOLITO

MICROORGANISMO PRODUCTOR

ALGINATO
AFLATOXINA
BIKAVERINA
ACIDO CITRICO
ALCALOIDES
DEL ERGOT
ETILENO
PRODIGIOSINA
PIOCIANINA

Azotobacter vinelandi
Aspergillus parasiticus
Fusarium oxysporum
Aspergillus niger
Claviceps sp. **SD58**
Penicillium cyclopium
Serratia marcescens
Pseudomonas aeruginosa

Tabla 4. Metabolitos no antibióticos cuya biosíntesis es regulada por fosfatos (MARTIN, 1989)

ANTIBIOTICO**ORGANISMO PRODUCTOR**

ACTINOMICINA	<i>Streptomyces antibioticus</i>
ANTRACICLINA	<i>Streptomyces peucetius</i>
BACITRACINA	<i>Bacillus licheniformis</i>
CANDICIDINA	<i>Streptomyces griseus</i>
CEFALOSPORINA	<i>Acremonium chrysogenum</i>
CEFAMICINA	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
CLORANFENICOL	<i>Streptomyces venezuelae</i>
ACIDO CLAVULANICO	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
CLORTETRACICLINA	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
GRAMICIDINA S	<i>Bacillus brevis</i>
KANAMICINA	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>
NEOMICINA	<i>Streptomyces fradiae</i>
NOVOBIOCINA	<i>Streptomyces niveus</i>
POLIMIXINA	<i>Bacillus polymyxa</i>
ESTREPTOMICINA	<i>Streptomyces griseus</i>
TURIMICINA	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
TILOSINA	<i>Streptomyces fradiae</i>
VANCOMICINA	<i>Streptomyces orientalis</i>
VERDAMICINA	<i>Micromonospora grisea</i>
VIOMICINA	<i>Streptomyces sp</i>

MARTIN, J. F., 1989

Tabla 5. Antibióticos cuya biosíntesis es regulada por fosfato (MARTIN, 1989)

B. ENZIMAS DEL METABOLISMO SECUNDARIO CONTROLADAS POR FOSFATO.

El control por fosfato de las fosfatasa (que desfosforilan intermediarios durante la biosíntesis de los aminoglucósidos) ha sido conocida por muchos años (DEMAIN et al., 1983). Se ha demostrado que otras enzimas involucradas en la biosíntesis de estos metabolitos son reprimidas por fosfato (BEHAL et al., 1979).

1. Fosfatasa

Durante la biosíntesis de algunos antibióticos aminoglucósidos como la estreptomina (MILLER and WALKER, 1969), neomicina (MAJUMDAR and MAJUMDAR, 1970) y probablemente otros tipos de antibióticos que son inactivos mientras se encuentren fosforilados, las fosfatasa que los activan pueden estar reguladas negativamente a través de inhibición o de represión por fosfato inorgánico. La formación de estreptomina, que es fuertemente regulada por fosfato involucra al menos 3 reacciones de desfosforilación (DEMAIN and INAMINE, 1970) en la formación del anillo de estreptidina.

MILLER y WALKER reportaron en 1969 que un derivado fosforilado de la estreptomina se acumulaba en cultivos de Streptomyces griseus que habían crecido en altas concentraciones de fosfato. El derivado fosforilado, que contenía un enlace ester-fosfato en la posición 6 del anillo de estreptidina, era biológicamente inactivo.

Por lo anteriormente expuesto, la regulación por fosfato de la síntesis de estreptomina puede ser entendida como un mecanismo protector de la síntesis de proteínas durante la fase de crecimiento en las cepas productoras de estreptomina.

La fosfatasa de S. griseus es una enzima que únicamente se produce en la idiofase, y sólo se presenta únicamente en los organismos productores de estreptomina, pero no en microorganismos no productores. Esta enzima es inhibida pero no reprimida por fosfato.

Las reacciones de defosforilación reprimidas por fosfato ocurren también en otros aminoglucósidos. Derivados fosforilados de neomicina en S. fradiae (MAJUMDAR and MAJUMDAR, 1970) son convertidos en compuestos biológicamente activos por una fosfatasa que es inhibida y reprimida por fosfato inorgánico. Esta enzima es sintetizada en la fase tardía de crecimiento, coincidiendo con la biosíntesis de neomicina y parece que existe una relación directa entre la actividad de la fosfatasa y la

formación de neomicina (MAJUMDAR and MAJUMDAR, 1971a) como se esperaba de una enzima involucrada en el metabolismo secundario (BANDYOPADHYAY and MAJUMDAR, 1974).

Al menos una fosfatasa que es reprimida por fosfato parece estar involucrada en la biosíntesis de butirosina A en Bacillus vitellinus, dado que derivados fosforilados de butirosina A incluyendo butirosina A-6-difosfato, se acumularon en mutantes deficientes de fosfatasa en esta bacteria (SHIRAFUJI et al., 1982).

2. Enzimas Biosintéticas Específicas

Estas incluyen la anhidrotetraciclina oxigenasa (BEHAL et al., 1979), PABA sintasa y algunas enzimas involucradas en la biosíntesis de tilosina (Tabla 6). Otras enzimas reprimidas o inhibidas por fosfato en menor magnitud son: deacetoxicefalosporin C sintasa, "expandasa" de Cephalosporium acremonium 66 y Streptomyces clavuligerus (LUBBE et al., 1985). Además de la expandasa fosfato inhibe la actividad de ciclasa (isopenicilin N sintasa) de S. clavuligerus y la expandasa de S. lactamdurans.

El control del fosfato sobre la producción de tetraciclina, tilosina y candicidina ha sido estudiado en detalle. A continuación se describe el efecto del ión sobre estos antibióticos, principalmente a nivel de las enzimas anteriormente descritas.

a. Anhidrotetraciclina oxigenasa y la formación de tetraciclina.

La anhidrotetraciclina oxigenasa (ATC oxigenasa) cataliza la penúltima reacción en la biosíntesis de las tetraciclinas, en S. aureofasciens ATC oxigenasa se reprime por fosfato, aunque no se ha encontrado efecto del fosfato en la actividad in vitro. Después de que la actividad enzimática se ha manifestado, la adición de fosfato al medio de cultivo primero provoca una disminución de la actividad específica de la ATC oxigenasa, cuando el fosfato se termina los niveles intracelulares de ATC oxigenasa empiezan a incrementarse (BEHAL et al., 1979).

b. PABA Sintasa y la biosíntesis de candicidina.

Los anillos de p-aminoacetofenona y la N-metil-p-aminoacetofenona de la candicidina y otros antibióticos macrólidos poliénicos aromáticos (MARTIN, 1984) se sintetizan a través de la vía de los aminoácidos aromáticos. El precursor inmediato de los anillos aromáticos de candicidina (en S. griseus) y perimicina (en Streptomyces coelicolor var. aminophilus) es el ácido p-aminobenzoico (PABA) (LIU et al.,

ANTIBIOTICO	MECANISMO DE ACCION	SITIO DE ACCION
Cefamicina	Inhibición	Expandasa
Estreptomina	Represión	Ciclasa
		Amidino Transferasa
Neomicina	Represión	Fosfatasa
		Neomicina fosfatasa
Tilosina	Represión	Macrocin metilasa
		Represión
Candicina	Represión	p-aminobenzoato sintetasa
Tetraciclina	Represión	Anhidrotetraciclina oxigenasa
Ergot	Represión	Chanoclavina ciclasa
Cefalosporina	Inhibición	Expandasa

Tabla 6. Regulación catabólica por fosfatos en la biosíntesis de antibióticos (MARTIN, 1989)

1972). En Streptomyces sp., el corismato es convertido a PABA mediante la PABA sintasa, una aminotransferasa que utiliza preferentemente glutamina como donador de grupos amino (GIL et al., 1985). La actividad de PABA sintasa es fuertemente reprimida por fosfato tanto en S. griseus (GIL et al., 1985) como en S. coelicolor var. aminophilus sumado a la pérdida de actividad y producción de candicidina en medios ricos en fosfato. (LIRAS et al., 1977).

c. Tilosina

La ruta biosintética para la formación de tilosina puede dividirse en dos partes (1) formación del tilonido, y (2) formación de los azúcares D-micarosa, D-micaminosa y L-micarosa y el subsecuente ataque a la aglicona. La aglicona es sintetizada de 2 unidades de acetato, 5 de propionato y una de butirato. Utilizando una mutante de S. fradiae que acumula el protonólido, OMURA et al., en 1984 establecieron que la síntesis de la macrolactona era muy sensible al fosfato: una reducción del 50% en la biosíntesis del protonólido se obtenía con la adición de 10 mM de fosfato.

La bioconversión de protonólido a tilosina también es muy sensible al fosfato. Tres enzimas de la segunda parte de la biosíntesis de tilosina (dTDP-D-glucosa-4,6-dehidratasa, dTDP-micarosa sintetasa y la macrocín O-metiltransferasa son enzimas reprimidas por el fosfato.

d. Gramicidin S sintetasa en Bacillus brevis

CHIU et al., (1982) examinaron la respuesta de la enzima gramicidin S sintetasa a las adiciones de fosfato en un cultivo continuo de Bacillus brevis limitado por fosfato. La adición del mismo ocasiona una disminución de la actividad de la enzima, que no se recupera después de que el fosfato extracelular alcanza una concentración por abajo de la inhibitoria (5 mM).

4.3 Efectores intracelulares

La existencia de efectores intracelulares que controlan la diferenciación celular, formación del micelio aéreo, esporulación y la biosíntesis de los metabolitos secundarios parece ser que se encuentra muy distribuida entre los microorganismos (GRAFE, 1989). En esta parte, se revisan algunos efectores intracelulares que han estado implicados en el control por fosfato de la antibioticogénesis principalmente entre los estreptomicetos.

A. AMP cíclico

Lo primero que se investigó en lo relacionado al control del fosfato en la expresión de los genes que codifican para las síntesis de los antibióticos fue el posible juego de los nucleótidos. (MARTIN and DEMAIN, 1977a). Se encontró que la biosíntesis de candicidina en S. griseus era inhibida por ribonucleótidos exógenos, pero no por ribonucleósidos o sus bases, a través de la liberación del fosfato por efecto de nucleotidasas (MARTIN and DEMAIN, 1977b).

El papel del AMPc en la regulación de la formación de los antibióticos en los estreptomicetos fue sugerida por GERSH et al., en 1978, quienes aseguraron que este nucleótido podría revertir el efecto inhibitorio del fosfato. El AMPc ha sido detectado en el género Streptomyces: S. hydrogenans, S. griseus, S. hygroscopicus (GERSH et al., 1978) y S. lactamdurans (CORTÉS et al., 1986). En S. hygroscopicus hay una regulación paralela entre AMPc fosfodiesterasas y fosfatasa durante la fermentación de turimicina (RAGAN and VINING, 1977). TERRY y SPRINGHAM (1981) observaron que la adición de un exceso de fosfato inorgánico a cultivos de S. griseus redujo la producción de estreptomina pero no hubo efecto alguno en el AMPc, y concluyeron que el efecto del fosfato en la biosíntesis de estreptomina no era modulado por AMPc. En S. griseus la inhibición por fosfato en la biosíntesis de candicidina no se revierte al adicionar AMPc, por lo contrario, la inhibición del fosfato se incremento .

Por tanto mientras el AMPc puede estar relacionado en la diferenciación de S. hygroscopicus, muy probablemente no este involucrado en la reversión del efecto inhibitorio de la antibioticogénesis debida al fosfato.

B. ATP y CARGA ENERGETICA

Existen algunas evidencias que sugieren que el ATP o algún nucleótido de adenina (o guanina altamente fosforilado) puede funcionar como efector en la regulación de fosfato en la antibiogenicénesis. Por ejemplo, la concentración de ATP se duplica o triplica después de la adición de fosfato (10 mM) a células productoras de candidicina (MARTIN and MCDANIEL, 1976) antes de la inhibición de la síntesis del antibiótico (el cual es detectado 15 min después de que el fosfato ha sido adicionado).

La limitación de fosfato desacopla la respiración de las células productoras de turimicina (EFFENBERGER et al., 1983) en S. aureofasciens, los niveles de ATP fueron mas bajos en cepas hiperproductoras que en cultivos con bajas producciones (JANGLOVA et al., 1969). Estudios con S. griseus indicaron una disminución rápida en el ATP intracelular justo antes del inicio de la síntesis de candidicina. Igualmente, VU-TRONG et al., en 1980, observaron que la concentración de adenilatos en S. fradiae fue máxima durante la trofófase, disminuyendo rapidamente antes del inicio de la biosíntesis de tilosina, y permanecían en niveles bajos a través de la idiofase. Resultados muy parecidos en las fluctuaciones del contenido de ATP fueron observados por CURDOVA et al., 1976 durante la fermentación de tetraciclinas.

ATKINSON y WALTON, (1967) definieron la carga energética (EC) de una célula como:

$$EC = \frac{ATP + 1/2 ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

Este parámetro define el estado energético de una célula y es muy útil cuándo consideramos el control metabólico por energía. Aunque los niveles de ATP se duplican o triplican después de la adición de fosfato, la carga energética no cambia, esto sucede tanto en S. griseus (MARTIN, et al., 1978) como en S. fradiae (VU-TRONG, et al., 1981). Por tanto, MARTIN, et al., (1978) proponen que el ATP mas que la carga energética, podría ser el efector primario en la regulación por fosfato. Es decir el ATP puede jugar un papel muy importante en el control de la expresión de los genes durante la síntesis de los antibióticos.

5 OBJETIVO

DETERMINAR Y CARACTERIZAR LA INFLUENCIA DE LOS FOSFATOS SOBRE LA PRODUCCION DE GENTAMICINA UTILIZANDO UNA CEPA DE Micromonospora purpurea, CAPAZ DE CRECER Y PRODUCIR EL ANTIBIOTICO DE REFERENCIA EN CONDICIONES DE FERMENTACION SUMERGIDA

6 MATERIAL Y METODOS

6.1 Microorganismos

1).- Micromonospora purpurea NRRL 2953 fue proporcionada por el Agricultural Research Service Culture Collection, Northern Regional Research Laboratories. Cepa de tipo silvestre productora de gentamicina.

2).- Bacillus subtilis ATCC 6633 se adquirió de la American Type Culture Collection, Rockville, Md. 20852, U.S.A el cual se empleó para la cuantificación de gentamicina por el método de difusión en agar (ROSNER and AVIV, 1980)

6.2 Medios de cultivo

a).- Micromonospora purpurea:

Con el fin de asegurar la disponibilidad y estabilidad de la cepa, se preparó una suspensión de esporas en glicerol al 40% (v/v). Para ello se sembró el microorganismo por estría en placas con el medio completo de conservación (MC) (PORTER, 1975), cuya composición es la siguiente:

MEDIO MC

Glucosa	1.0%
Almidón soluble	2.0%
Extracto de Levadura	0.5%
N-2-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 la solución de glicerol al 40% (v/v), en una proporción de 1 ml por 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 (MB) (CEA, 1977), cuya composición es la siguiente:

MEDIO MB

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

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

6.3 Preparación del inóculo

Se sembró una placa conteniendo medio de conservación MC con 0.1 ml de la suspensión de esporas conservadas en glicerol y se incubó a 29°C durante 7 días. Las esporas resultantes se transfirieron estérilmente a 50 ml de medio de crecimiento MI contenidos en un matraz Erlen-Meyer de 250 ml. La composición de este medio, basado en el descrito para el género Micromonospora (PORTER, 1975), es la siguiente:

MEDIO MI

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	7.6

Las esporas se dejaron crecer en este medio a 29°C en una agitadora Corning Stirrer PC-353 a 160 rpm durante 60 h. El cultivo resultante se utilizó como inóculo para todos los experimentos.

6.4 Fermentación

Para estudiar el efecto de los fosfatos en la biosíntesis de gentamicina, se utilizó un medio químicamente definido (MM), basado en el descrito por CARBAJAL (1957), para la producción de antibióticos aminoglucósidos. La composición en g/l es la siguiente:

MEDIO MM

Sacarosa	20.000
$\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$	10.000
NaNO_3	2.000
NaCl	3.000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.200
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.030
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.030
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.010
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.010
CaCO_3	10.000
pH	7.6

Este medio se mantuvo a lo largo de todos los experimentos sin modificaciones; lo único que varió fue la concentración del fosfato de potasio.

La sacarosa se esterilizó separadamente de los otros componentes del medio de cultivo.

Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio.

Los medios fueron inoculados con 4% (v/v) de un cultivo obtenido según se describió en la sección 6.3. La concentración de proteína inicial para todos los experimentos fue de 0.02 mg/ml

Las fermentaciones se llevaron a cabo a 29°C en una agitadora Corning Stirrer PC-353 a 165 rpm durante 144 h., tomando muestras de 2 ml cada 24 h, las cuales se conservaron a -20°C hasta la realización de las determinaciones analíticas correspondientes.

6.5 Sistema de células en reposo

Los experimentos en el sistema de células en reposo se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de los siguientes componentes:

- 1.- Sol. amortiguadora MOPS 0.05M pH= 7.4
- 2.- Sol. concentrada de sales (10X) descritas para el medio MM sin el amonio y el fosfato.
- 3.- Fosfato de potasio dibásico
- 4.- Solución de cloranfenicol al 0.025% (p/v), para tener una concentración final de 50 µg/ml. La adición del inhibidor de síntesis de proteínas fue opcional según se indica en el texto
- 5.- Inóculo obtenido de la siguiente manera:

Se sembró una placa con el medio de conservación MC utilizando 0.1 ml de la suspensión de esporas conservadas en glicerol y se incubó a 29°C durante 7 días. Las esporas resultantes se transfirieron estérilmente a 50 ml de medio de crecimiento MI contenido en un matraz Erlenmeyer de 250 ml.

La incubación se llevó a cabo a 29°C en una agitadora Corning Stirrer PC-353 a 160 rpm durante 60 h. Después de este tiempo, se transfirieron 2.0 ml del inóculo a un segundo matraz Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml del medio mínimo MM y se incubó nuevamente a 29°C y 165 rpm durante 24 h. Las células obtenidas se separaron por centrifugación a 10 000 rpm por 10 min a 4°C en una centrífuga Sorvall RC-5C, y se lavaron estérilmente por 3 veces consecutivas con solución amortiguadora MOPS 0.05M pH=7.5.

El paquete 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 cada 3 h., por espacio de 12 h. A estas muestras se les determinó concentración de proteína total y producción de gentamicina.

6.6 Métodos analíticos

6.6.1 Crecimiento celular

La cuantificación del crecimiento se realizó midiendo la proteína celular formada a diferentes tiempos de cada una de las condiciones experimentales empleadas. Para cada condición se tomaron 2 ml de muestra y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de ácido tricloroacético al 10% (p/v) y se conservó a -20°C por un lapso de 12 h. Después de éste tiempo las muestras se descongelaron y se centrifugaron nuevamente. El paquete celular se resuspendió en 2 ml de una solución de NaOH 0.4 N. Se tomaron alícuotas de 200 μl y se aforaron a 1 ml con agua destilada para después llevar a cabo la técnica de cuantificación de proteína según LOWRY, et al., (1951) utilizando como referencia una solución de albúmina sérica bovina con una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$.

6.6.2 Cuantificación de gentamicina

La cuantificación del antibiótico se realizó mediante el método de difusión en agar, utilizando para ello una cepa de Bacillus subtilis ATCC 6633 como microorganismo de prueba (ROSNER et al., 1980). El inóculo se preparó creciendo el microorganismo en 25 ml de medio completo MB por un lapso de 12 h a 37°C y 160 rpm. La densidad óptica final a 540 nm fué de 2. El bioensayo se realizó en cajas Petri con 10 ml de medio Luria modificado (MBG) conteniendo una proporción de inóculo de 1% (v/v).

MEDIO MBG

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

Las muestras por analizar se colocaron asépticamente sobre el agar utilizando para ello discos estériles de papel analítico Schleidcher & Schuell # 740-E de 1/4 de pulgada de diámetro (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, 5, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$ en sol. amortiguadora de fosfatos pH=8.

Las cajas con las muestras y las soluciones estándar de gentamicina se dejaron difundir por 1 h a 4°C y se incubaron a 29°C por 48 h. Después de este tiempo se midieron los halos de inhibición del crecimiento y se determinó la producción del antibiótico en $\mu\text{g/ml}$.

La cuantificación de gentamicina en los experimentos llevados a cabo en presencia de cloranfenicol se realizaron siguiendo el mismo procedimiento señalado pero utilizando una cepa de Bacillus subtilis PC 194 resistente a cloranfenicol.

La producción específica de gentamicina se calculó dividiendo la producción volumétrica ($\mu\text{g/ml}$) entre la concentración de proteína presente en cada una de las muestras de la fermentación.

6.6.3 Determinación de sacarosa

La determinación de sacarosa se llevó a cabo utilizando 3 μl de muestra y aforando con agua a 2.0 ml. Para después realizar la cuantificación de la sacarosa por el método de Antrona (LOEWUS, 1952).

6.6.4 Determinación de fosfato

Para la determinación de fosfato se utilizó la metodología descrita por SUMMER, 1944. Del sobrenadante de las muestras se tomaron 50 μl y se aforaron a 3.6 ml con agua destilada para llevar a cabo la técnica de análisis de fosfato.

6.7 Presentación de resultados y reproducibilidad

Todos los resultados presentados en las figuras se llevaron a cabo corriendo cada condición por triplicado. Todos los experimentos se repitieron al menos 2 veces con el fin de comprobar reproducibilidad. En las figuras presentadas se muestran las medias de los resultados obtenidos.

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

7 RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Efecto de la concentración de fosfato

Como ya se mencionó, son muchos los antibióticos cuya síntesis está sujeta a regulación por fosfato. En virtud de la poca información existente acerca del efecto del fosfato sobre la biosíntesis de gentamicina (MASUMA *et al.*, 1986) 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 fosfato de potasio.

Al crecer a este microorganismo en diferentes concentraciones de fosfato de potasio se observó que la producción del antibiótico estuvo en función inversa con respecto a la concentración del fosfato, notándose un efecto negativo desde 1.0 g/l (5.7 mM) siendo éste muy marcado después de utilizar 2.0 g/l (11.5 mM) del mismo en donde la producción específica del metabolito disminuyó en más del 50%. Después de este valor, aunque la concentración de fosfato se incrementa por arriba de 2.0 g/l tanto la producción volumétrica como la específica ya no disminuyen (Fig. 4). Este comportamiento también lo encontraron GERSH *et al.*, (1979), donde el fosfato de potasio también afecta negativamente la formación de turimicina a concentraciones por arriba de 5 mM, pero al incrementar ésta la biosíntesis del antibiótico ya no disminuye.

En el caso de gentamicina esta disminución en la biosíntesis del antibiótico no se debió a un crecimiento menor (Fig. 4) ni a las modificaciones en el pH (Fig. 5) del medio de cultivo

En las figuras 6, 7, 8 y 9 se presentan las cinéticas de crecimiento y producción de gentamicina así como el perfil de pH en bajas y altas concentraciones de fosfato de potasio. En estas figuras podemos observar que la producción volumétrica (Fig. 7) del antibiótico disminuye cuando se adicionan 2 g/l de fosfato de potasio. Esta disminución del metabolito con respecto al control (1 g/l) es muy marcada en las primeras 72 h de cultivo ya que después de este tiempo hay una tendencia a alcanzar los niveles del control. Por otro lado, en el caso de la producción específica (Fig. 8) a las 24 h de fermentación no se observa diferencia significativa con respecto al control, quizá esto sea debido a que en este tiempo se alcanzó un mejor crecimiento (Fig. 6) pero a medida que transcurre el tiempo la diferencia en la producción del metabolito se hace más notoria llegando a ser de hasta un 50%

El fosfato se consumió totalmente a las 96 h de fermentación cuando se adicionó al medio en concentración de 0.25 g/l. Por el contrario los medios que contenían 1.0 y 2.0 g/l el consumo de este nutriente no llegó al 100% (Fig. 10). Es importante señalar que aunque el fosfato no se agotó en el medio

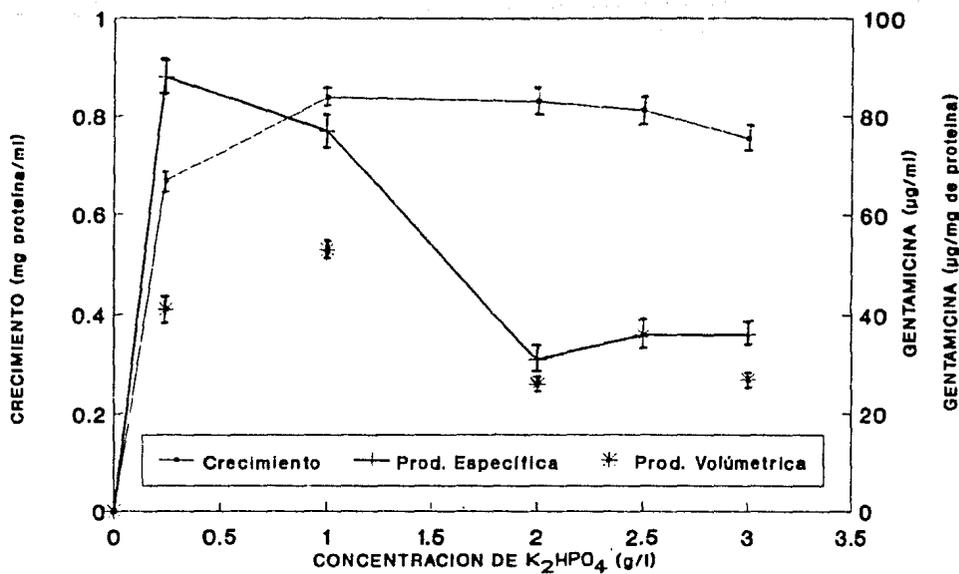


Fig. 4. Efecto de la concentración de fosfato de potasio en el crecimiento máximo de *M. purpurea* NRRL 2953, en la producción específica y volumétrica de gentamicina. Las células fueron crecidas en MM a 29 C.

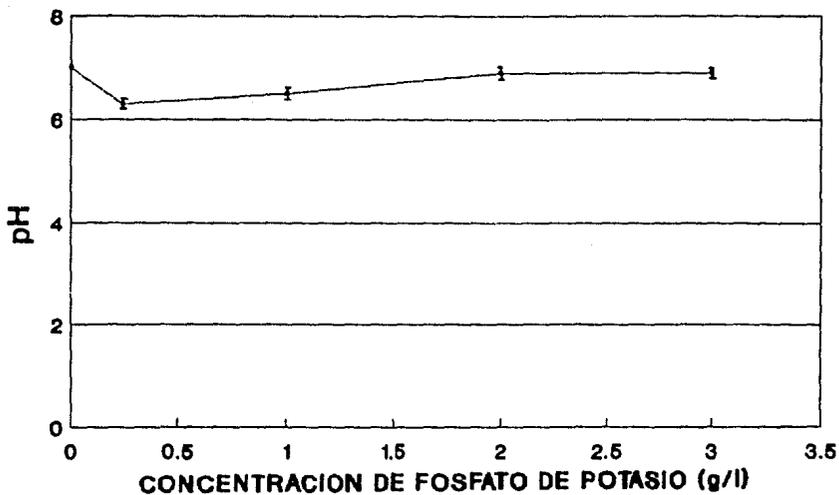


Fig. 5. Efecto de la concentración de fosfato de potasio en el pH final del medio de cultivo.

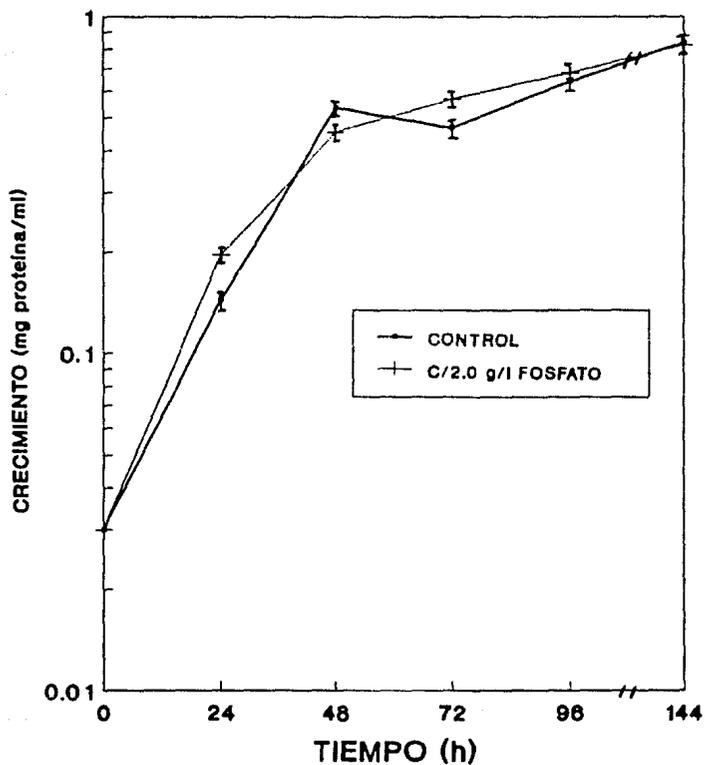


Fig. 8. Cinética de crecimiento de *M. purpurea* NRRL 2953 en presencia de una concentración alta de K_2HPO_4 .

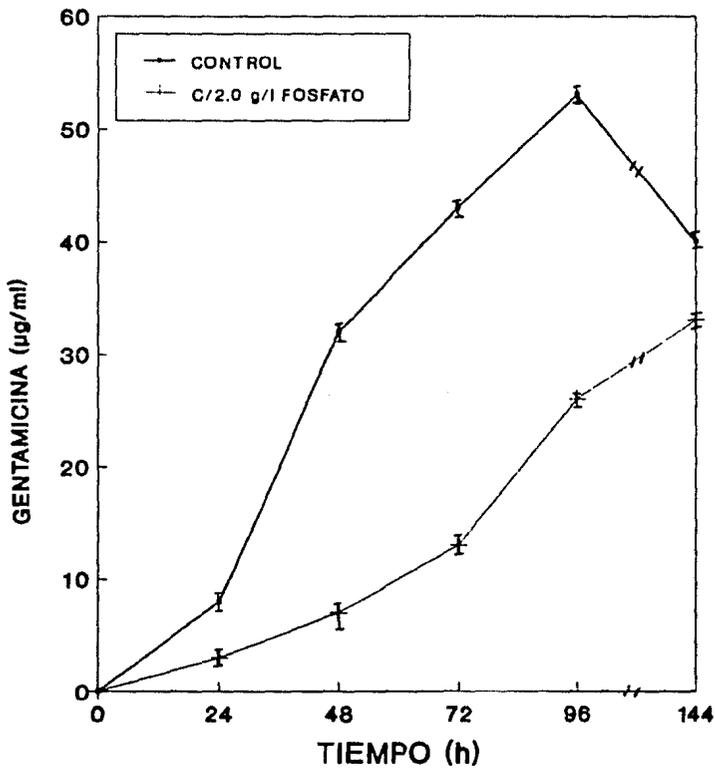


Fig. 7. Cinética de producción volumétrica de gentamicina en presencia de una concentración alta de K_2HPO_4 .

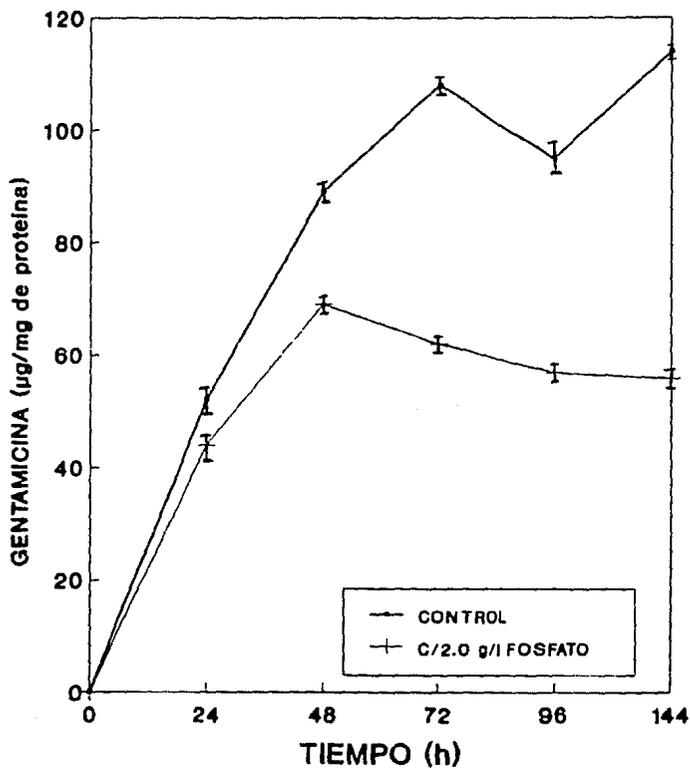


Fig. 8. Cinética de producción específica de gentamicina en presencia de una concentración alta de K_2HPO_4 .

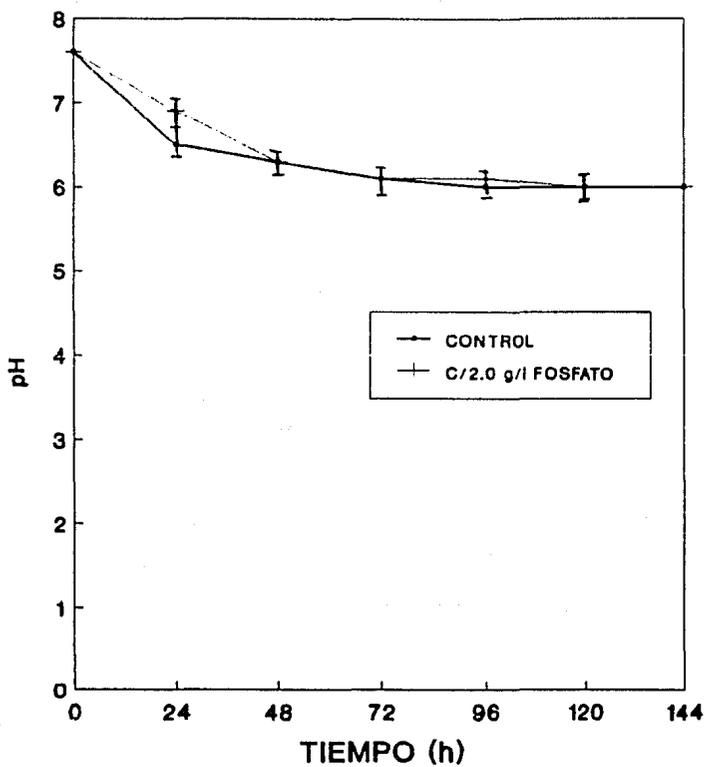


Fig. 9 Perfil de pH en cultivos de *M. purpurea* crecidos en presencia de una concentración alta de K_2HPO_4

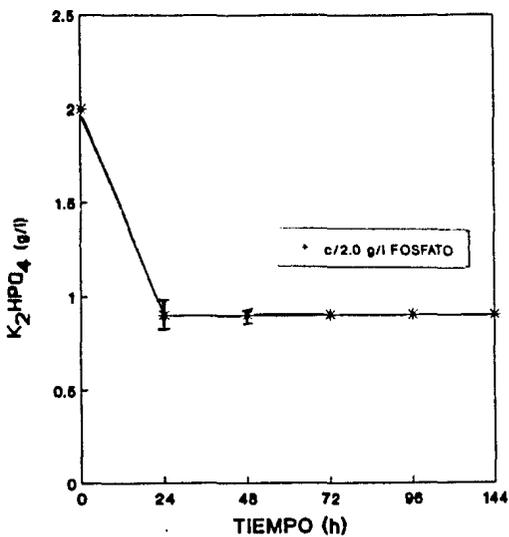
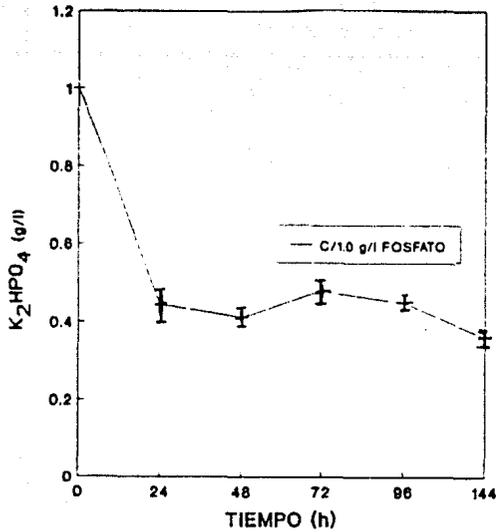
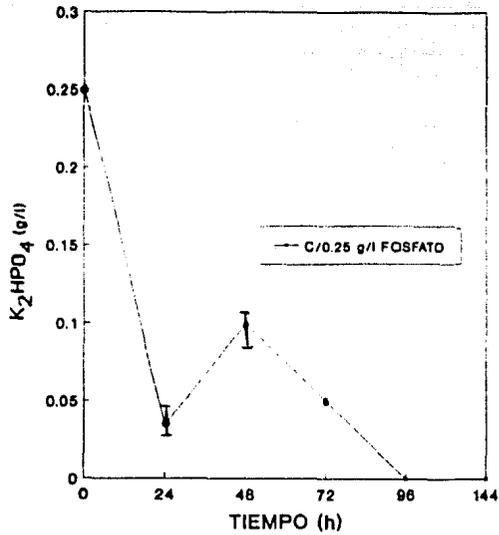


Fig. 10. Consumo de fosfato por *M. purpurea*
 K_2HPO_4

de cultivo en concentraciones mayores de 1 g/l el consumo de fosfato se incrementaba a medida que se aumentaba la concentración de este, encontrándose una correlación inversa entre el consumo de fosfato y la producción del antibiótico es decir a mayor consumo de fosfato menor producción del metabolito (Fig. 11).

Lo mismo ocurre al observar el rendimiento del antibiótico con respecto a la concentración de fosfato. (Fig. 12).

Cabe hacer resaltar, que tanto la sacarosa como el amonio no se agotaron en el medio de cultivo en ninguna de las concentraciones de fosfato utilizadas lo cual significa que el microorganismo no se encontraba limitado por la fuente de carbono ni por la fuente de nitrógeno, (Figs. 13 y 14)

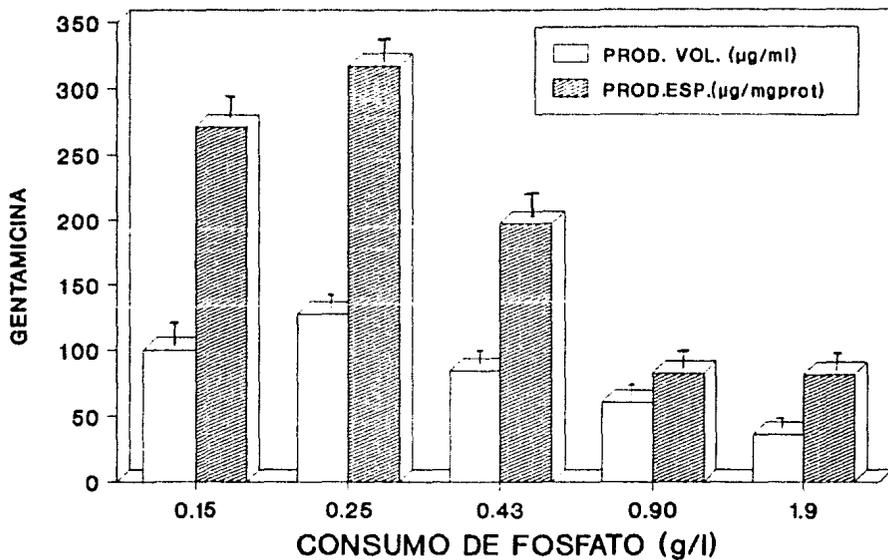


Fig. 11 Relación entre el consumo de fosfato de potasio (K_2HPO_4) y la producción de gentamicina

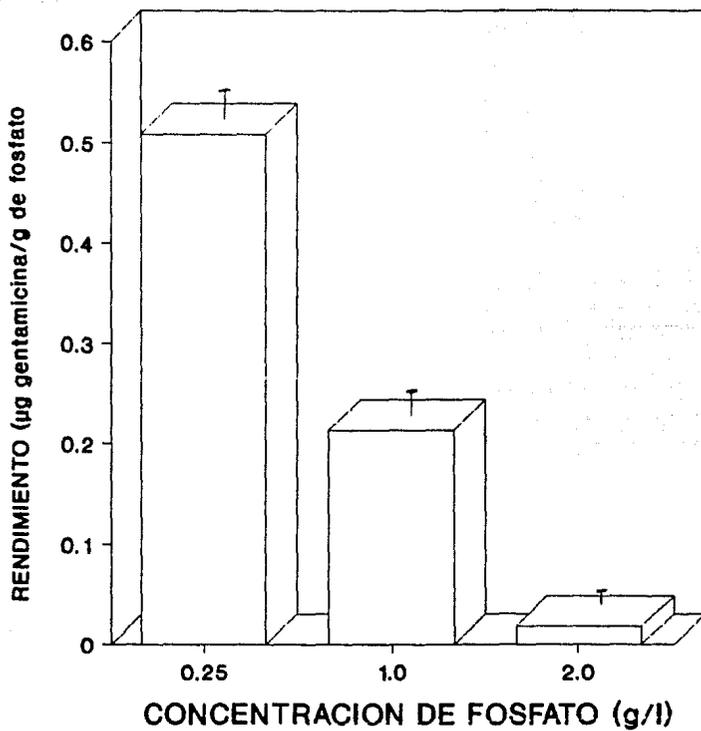


Fig. 12 Efecto de la concentración de fosfato de potasio (K_2HPO_4) en el rendimiento de gentamicina

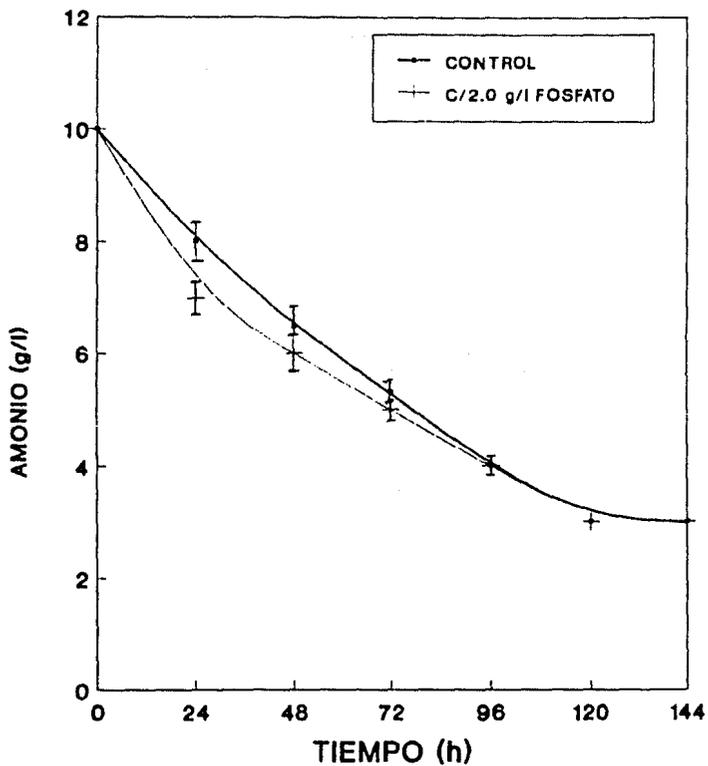


Fig. 13. Consumo de amonio por *M. purpurea* en presencia de una concentración alta de K_2HPO_4

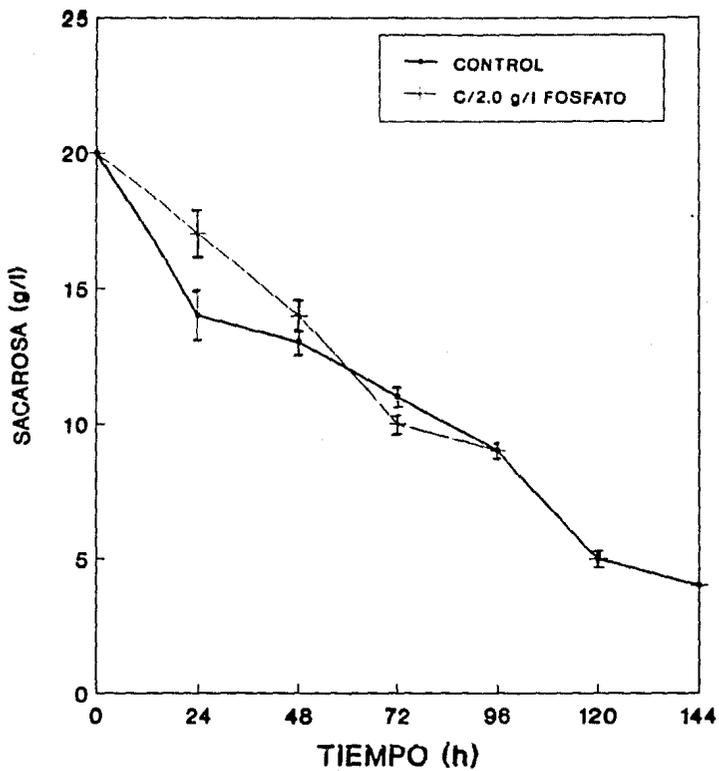


Fig. 14. Consumo de sacarosa por *M. purpurea* en presencia de una concentración alta de K_2HPO_4

7.2 Caracterización del efecto regulatorio

El fosfato pudo haber ejercido el efecto negativo por diversas razones: Por un lado (1) Que estuviera interfiriendo con el consumo de la fuente de carbono como lo postula MERTZ et al., (1973). En la figura 14, se presenta la cinética de consumo de sacarosa en altas y bajas concentraciones de fosfato donde se muestra que con altas concentraciones del nutriente el perfil de consumo del carbohidrato no se ve alterado siendo éste muy parecido al control. Por lo cual podemos pensar que el efecto negativo del fosfato no es a través de la alteración de la asimilación de la fuente de carbono (en este caso sacarosa).

(2) Que actuara reprimiendo o inhibiendo la actividad de las enzimas que participan en la biosíntesis de la gentamicina.

Para profundizar en este sentido contabamos con 2 estrategias: (a) un sistema de células en reposo o (b) una fermentación

a) Efecto del fosfato en un sistema de células en reposo.

A través de un sistema de células en reposo, en donde el microorganismo ya no crece pero se mantiene viable y es capaz de sintetizar el antibiótico se buscó determinar si el fosfato estaba actuando como un inhibidor o un represor. Para esto se creció a M.purpurea en medio MM durante 36 h y se transfirió el micelio al sistema de células en reposo. Bajo estas condiciones, la producción del antibiótico ocurre durante mas de 9 h por lo que es posible determinar si existía inhibición de las enzimas ya preformadas.

En las figuras 15, 16 y 16a se observan los resultados obtenidos al adicionar fosfato de potasio (2.0 g/l), cloranfenicol (50 µg/ml) inhibidor de síntesis de proteínas (control represor) y la mezcla de ambos. Al adicionar el fosfato se observa una ligera disminución (15%) en la síntesis del antibiótico con respecto al control (Fig.15). Esta menor formación en la síntesis del metabolito podía obedecer a que se estuvieran inhibiendo o reprimiendo las sintetetasas que dan lugar al antibiótico. Para conocer si esta disminución en la biosíntesis de la gentamicina era consecuencia de una represión (siempre y cuando hubiera síntesis de de novo de proteínas) se adicionó al sistema un inhibidor de síntesis de proteínas (cloranfenicol). Los resultados se muestran en la Fig.16 en donde observamos que en presencia de cloranfenicol la síntesis del

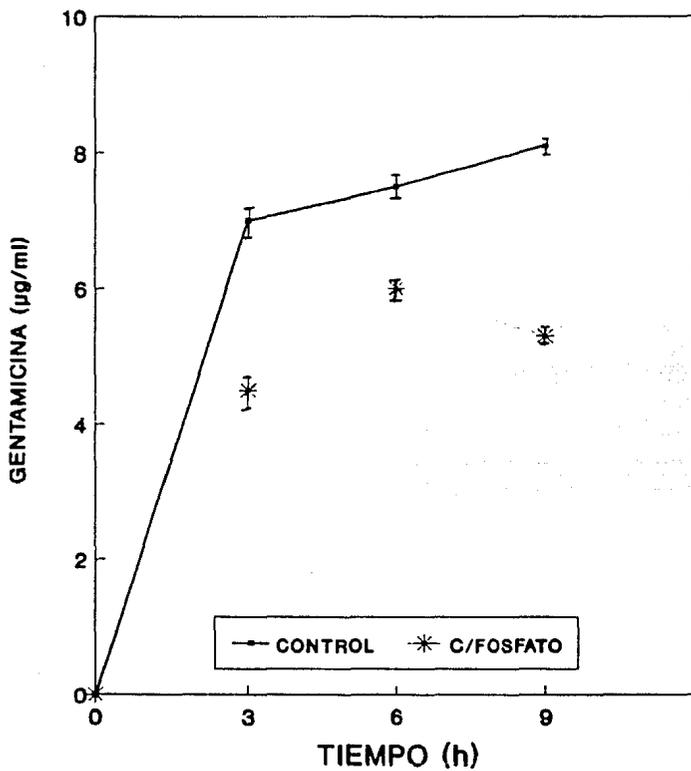


Fig. 15 Producción volumétrica de gentamicina en un sistema de células en reposo, adicionado de K_2HPO_4 (2 g/l). El fosfato se adicionó al sistema desde el inicio de la incubación

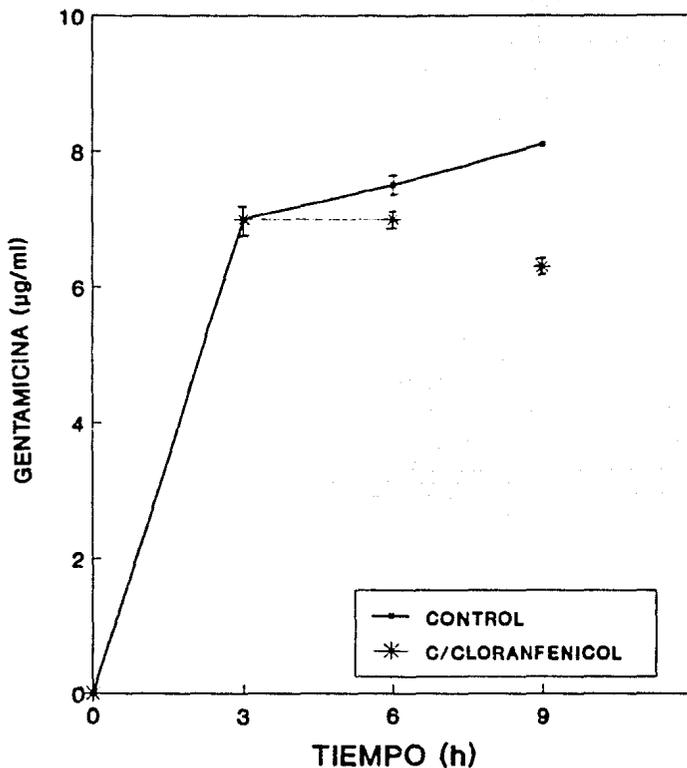


Fig. 16 Producción volumétrica de gentamicina en un sistema de células en reposo adicionado de un inhibidor de síntesis de proteínas (cloranfenicol) a una concentración de 50 µg/ml. El inhibidor fué adicionado desde el inicio de la incubación.

antibiótico fue casi igual a la del control, lo que nos indican que el microorganismo en el sistema de células en reposo no es capaz de llevar a cabo síntesis de proteínas de novo, es decir el metabolito se formó gracias a las enzimas preformadas durante el precrecimiento del microorganismo (fase exponencial).

Algo interesante se observó al adicionar la mezcla de cloranfenicol + fosfato (Fig.16a), ya que la disminución en la formación del antibiótico presentada al agregar únicamente el fosfato no se repitió. Lo anterior quizá fue debido a que el cloranfenicol esté impidiendo la formación de una molécula necesaria para que el fosfato pueda ejercer su acción. Resultados similares fueron encontrados en el caso del antibiótico cefamicina, producido por Streptomyces clavuligerus (HU, et al., 1984) quienes observaron que el efecto negativo del glicerol en un sistema de células en reposo era prevenido por la adición de inhibidores de la síntesis de proteínas como el cloranfenicol ó la estreptomina.

Por otro lado, tampoco se puede asegurar que el fenómeno regulatorio que estábamos observando se trataba de una inhibición, ya que al adicionar el fosfato la pendiente de producción no disminuyó drásticamente como suele ocurrir en otros antibióticos como la candidina en donde la formación del antibiótico en un sistema de células en reposo es inhibida por el fosfato en más de un 50% (MARTIN, et al., 1977) o también en este mismo sistema la eritromicina es fuertemente inhibida (90%) por la cerulenina (FLORES and SANCHEZ, 1985).

Dado que en este caso no se cuenta con un inhibidor específico de la biosíntesis de gentamicina, se prosigió con la segunda estrategia para la caracterización del efecto regulatorio

b) Efecto de la adición de fosfato en una fermentación

De igual se decidió caracterizar el efecto negativo del fosfato en una fermentación. La adición de fosfato o cloranfenicol (a las 48 h) a un cultivo de M. purpurea creciendo en medio mínimo y habiendo iniciado la síntesis del antibiótico, permitieron que ésta continuara durante 24 h más y después se mantuvo constante, a diferencia del control que siguió produciendo hasta las 144 h de fermentación (figs. 17 y 18) con lo cual se piensa que la síntesis del antibiótico ocurrida en esas 24 h fué debida a las enzimas preexistentes. Cabe hacer mención que a las 48 h de cultivo se tiene síntesis de proteínas

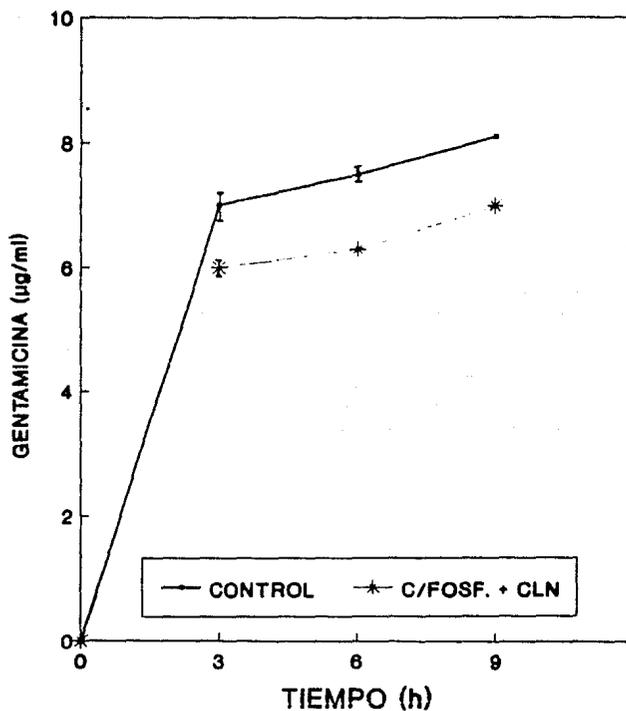


Fig. 16a. Producción volumétrica de gentamicina en un sistema de células en reposo adicionado de K_2HPO_4 (2 g/l) y la mezcla de fosfato (2 g/l) + cloranfenicol (CLN).

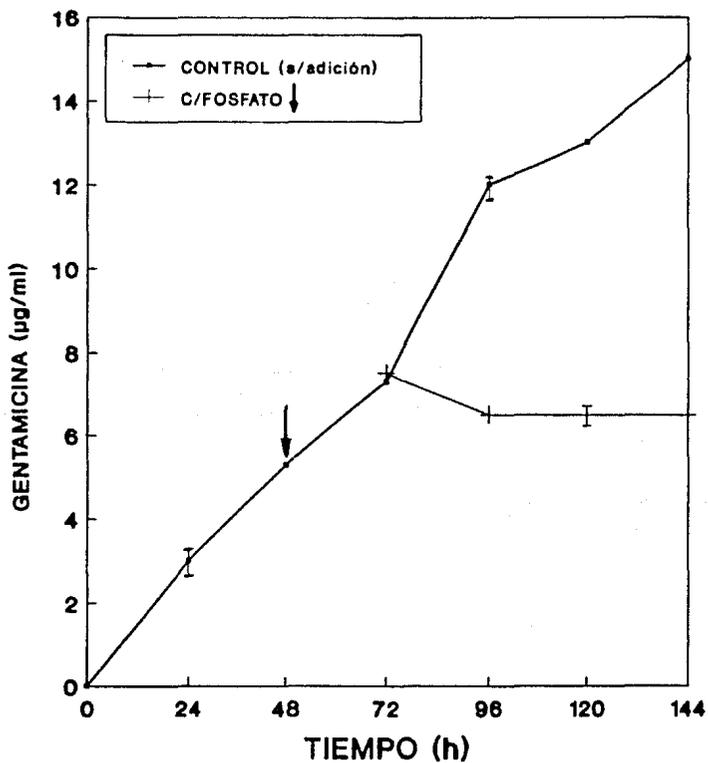


Fig. 17 Efecto de la adición de K_2HPO_4 (2 g/l) en la biosíntesis de gentamicina. El fosfato se adicionó a las 48 h de cultivo.

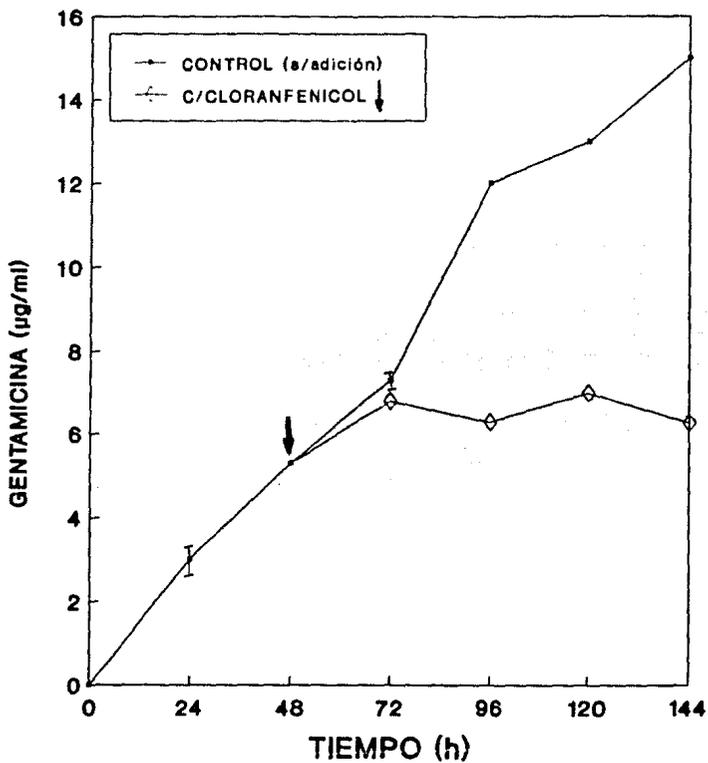


Fig. 18

Efecto de la adición de un inhibidor de la síntesis de proteínas (cloranfenicol) en la biosíntesis de gentamicina. El cloranfenicol (50 µg/ml) se adicionó a las 48 h de cultivo

(recambio de enzimas) ya que al adicionar el cloranfenicol observamos que la formación de proteínas es inhibida, a diferencia del control donde la formación de éstas se mantiene constante (Fig. 19).

Todos estos resultados indican que el fosfato no está inhibiendo sino reprimiendo a las enzimas que participan en la biosíntesis de gentamicina. Ya que si se tratara de una inhibición, al adicionar el efector la formación del metabolito se hubiese detenido es decir la pendiente de producción sería cero (en una inhibición el efecto es inmediato), mientras que en una represión como se inhibe la síntesis de novo de las enzimas la biosíntesis del metabolito puede continuar gracias a las enzimas preformadas hasta que se mantiene constante ya que no se siguen formando mas enzimas. En este caso se observa que esa pendiente de producción duró 24 h (Fig. 17).

EFFECTO DE UN ANALOGO DE FOSFATO EN LA SINTESIS DE GENTAMICINA.

Posteriormente se llevaron a cabo experimentos con la finalidad de determinar si la el fosfato per se mas que algún producto de su metabolismo, era el responsable de la represión de la síntesis de gentamicina. Para ello, se adicionó un análogo de fosfato como lo es el arsenato (que se transporta a la células pero no es metabolizable) (WILSKY and MALAMY, 1980; NAHARRO et al., 1980) a los cultivos del microorganismo,

El efecto del arsenato de sodio sobre la producción del antibiótico se puede observar en la Fig. 20, al adicionarlo a una concentración de 2 g/l a las 48 h de la fermentación este ejerce un efecto muy parecido al fosfato cuando es agregado bajo las mismas condiciones. Por lo que podemos pensar que la molécula del fosfato per se muy posiblemente sea el efector de la represión presentada.

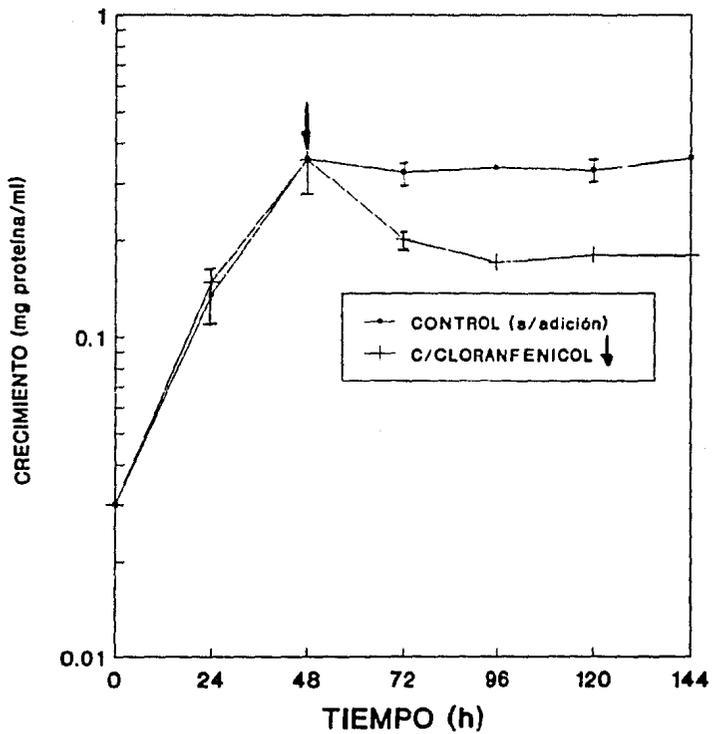


Fig. 19

Efecto de la adición de un inhibidor de síntesis de proteínas (cloranfenicol) en el crecimiento de *M. purpurea*-2953. El cloranfenicol (50 µ/ml) se adicionó a las 48 h de cultivo

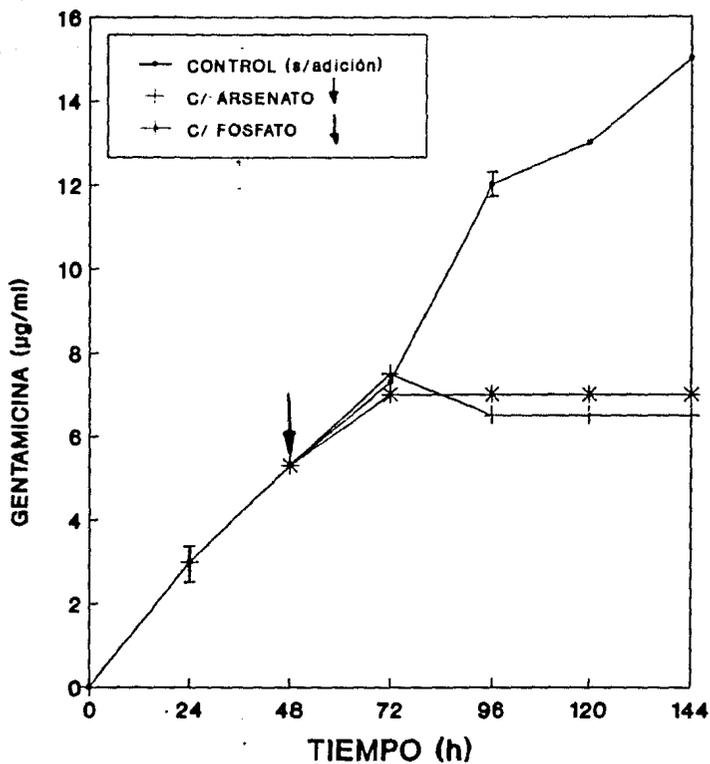


Fig. 20

Efecto de la adición de un análogo de fosfato (arsenato de sodio) en la biosíntesis de gentamicina. Tanto el análogo como el fosfato se adicionaron a las 48 h de cultivo en una concentración de 2 g/l.

7.3 Sitio de acción del fosfato

En otros antibióticos varias han sido las estrategias seguidas para tratar de esclarecer el sitio de acción del fosfato como fueron: medir actividades de enzimas biosintéticas que son limitantes para la formación de antibióticos (MARTIN, 1989), cuantificar actividades de fosfatasas en aquellos casos en que los precursores de ciertos antibióticos aminoglucósidos que necesitan ser desfosforilados por estas enzimas para ser activos (MILLER and WALKER 1969; MAJUMDAR and MAJUMDAR, 1971a). En el caso de la gentamicina no existen precursores fosforilados en la vía de biosíntesis, así que la posibilidad de que el fosfato estuviera reprimiendo fosfatasas era nula, por otro lado existe desconocimiento de las enzimas involucradas en la formación de este antibiótico y poca disponibilidad de intermediarios y precursores en el mercado, por lo que entonces lo único que podíamos llevar a cabo era tratar de revertir el efecto negativo del fosfato adicionando los precursores e intermediarios que teníamos o que pudiéramos conseguir como fue el 2-DOS.

El experimento se llevó a cabo adicionando algunos de los precursores e intermediarios que juegan un papel relevante en la biosíntesis de gentamicina (Fig. 21) como son: xilosa (1 y 5%), 2-desoxiestreptamina (100 y 200 µg/ml), glucosamina (15 y 30 mM) y glucosamina 6P (15 y 30 mM) con el objetivo de revertir el efecto negativo del fosfato y así poder discernir en que paso(s) de la ruta biosintética se encuentra el sitio de acción de este nutriente.

Estos compuestos se adicionaron a las 96 h de una fermentación a la que previamente se le había adicionado fosfato a las 48 h con la finalidad de que éste ejerciera su efecto negativo. Los resultados se presentan en las Figs. 22-25 donde se muestra que únicamente el 2-DOS (200 µg/ml) fue capaz de revertir el efecto negativo del fosfato (Fig. 25). Este resultado, nos hace pensar que la represión por fosfato podría afectar la(s) enzima(s) que dan lugar a la formación de este compuesto. Lo anterior se confirma por el hecho de que ninguno de los otros precursores logró revertir el efecto negativo, ya que si la xilosa, o la glucosamina 6P lo hubiesen revertido el posible sitio de acción se encontraría después de la formación del 2-DOS. Por otro lado, también el hecho de que la glucosamina tampoco tuviera efecto nos indicó que el fosfato no afecta la formación de la glucosamina 6P.

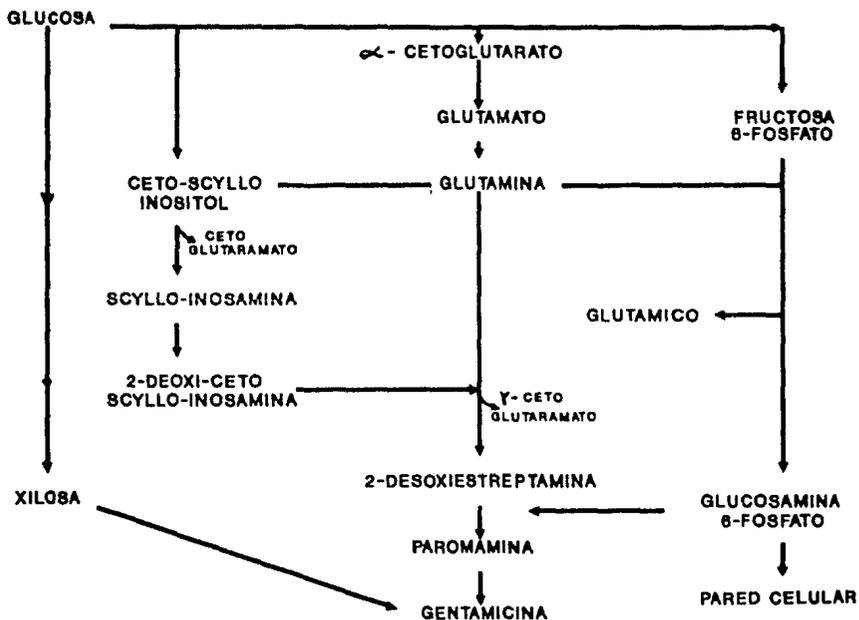
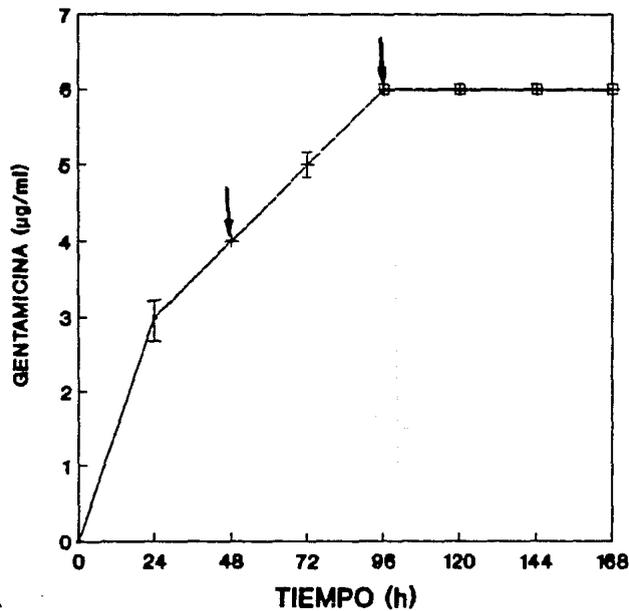
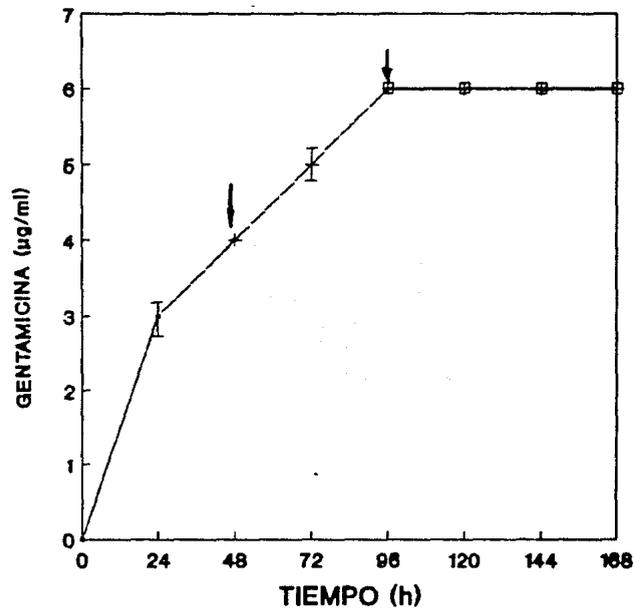


Fig. 21 Principales precursores e intermediarios de la via de biosintesis de gentamicina



—+— C/FOSFATO (48 h) —□— Gc-amina6P 15mM (96)



—+— C/FOSFATO (48 h) —□— Gc-amina6P 30mM (96)

Fig. 22 Adición de glucosamina 6P (15 y 30 mM) con la finalidad de revertir el efecto negativo del fosfato. El fosfato (2 g/l) se agregó a las 48 h y la glucosamina 6P a las 96 h.

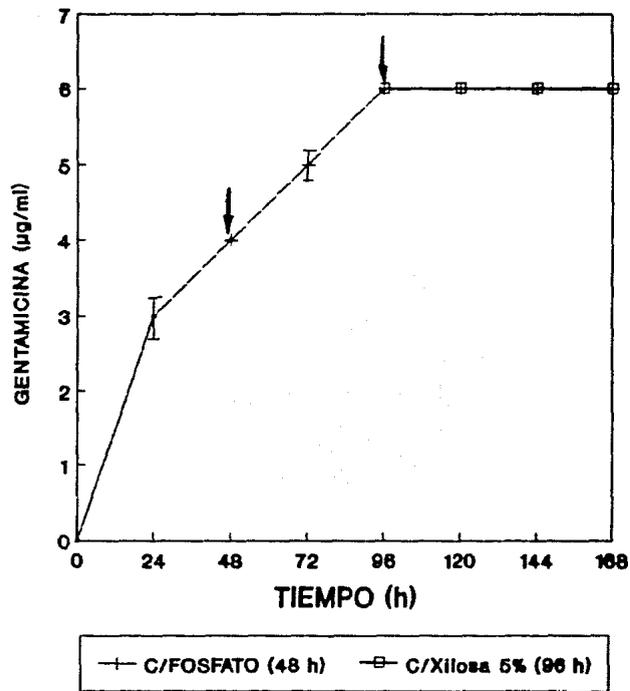
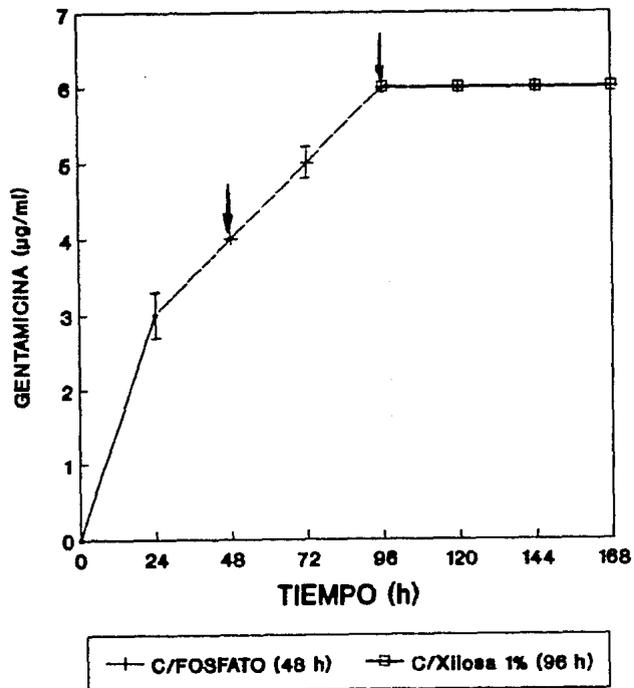
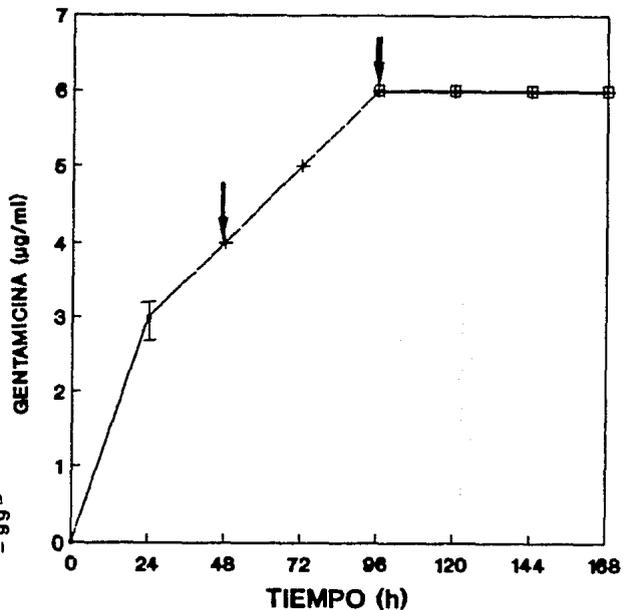
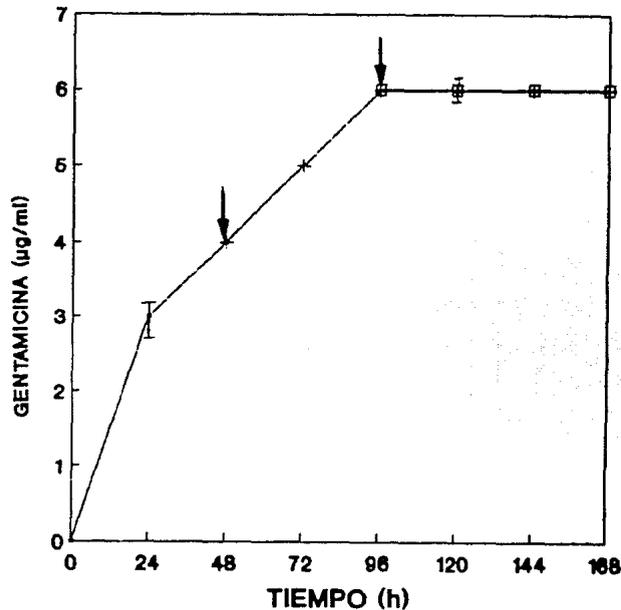


Fig. 23

Adición xilosa (1 y 5%) con la finalidad de revertir el efecto negativo del fosfato. El fosfato (2 g/l) se adicionó a las 48 h y la xilosa a las 96 h.



+ C/FOSFATO (48 h) -□- Gc-amina 15mM (96 h)



+ C/FOSFATO (48 h) -□- Gc-amina 30mM (96 h)

Fig. 24 Adición de glucosamina (15 y 30 mM) con la finalidad de revertir el efecto negativo del fosfato. El fosfato (2g/l) se agregó a las 48 h y la glucosamina a las 96 h

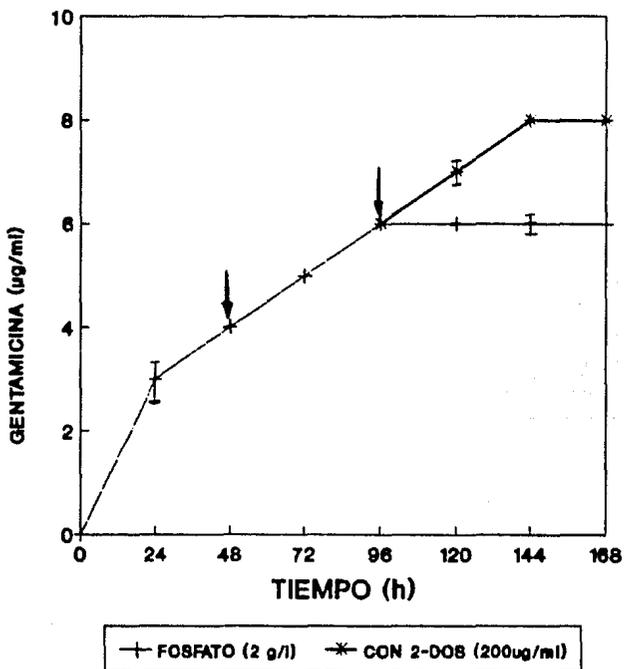


Fig. 25 Reversión del efecto negativo del fosfato con la adición de 2-desoxiestreptamina (2-DOS). El fosfato se adicionó a las 48 h y el 2-DOS a las 96 h

Recientemente LUCHER et al., (1989) publicaron un artículo en el que realizan estudios de caracterización de la enzima L-glutamina: ceto-scylo-inositol aminotransferasa de M. purpurea. Esta enzima típica del metabolismo secundario, transfiere grupos amino de la glutamina al ceto-scylo-inositol para formar scylo-inosamina, intermediario en la formación del 2-DOS (Fig. 21). Por las características descritas de esta enzima y recordando que ya existen ejemplos de acción del fosfato en la regulación de este tipo de aminotransferasas en antibióticos como la estreptomycin (MARTIN, 1989) y candicidina (GIL et al., 1985) no dudamos que la represión ejercida por el fosfato en la síntesis de gentamicina pudiera tener su blanco de acción en esta enzima. Experimentos futuros podrán corroborar o no dicha hipótesis.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

8 CONCLUSIONES

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

- 1.- El fosfato ejerce un efecto negativo sobre la síntesis de gentamicina en Micromonospora purpurea NRRL 2953.
- 2.- Existe una relación inversa entre el consumo de fosfato y la producción de gentamicina, a mayor consumo de fosfato menor es la producción del antibiótico.
- 3.- El mecanismo por medio del cual el fosfato ejerce su acción es a través de una represión.
- 4.- El fosfato per se y no un producto de su metabolismo es el responsable de la acción.
- 5.- El sitio de acción del fosfato se encuentra en pasos anteriores a la formación del intermediario 2-desoxiestreptamina

9 RECOMENDACIONES

1.- Tratar de revertir el efecto negativo del fosfato con glutamina para determinar el sitio exacto de la acción del fosfato, es decir, si la glutamina no revierte este efecto, se podría confirmar nuestra hipótesis de que el sitio de acción de este nutriente pudiera ser reprimiendo a la enzima ya mencionada.

SI EL PRIMER PUNTO SE LLEGASE A CONFIRMAR SE PODRIAN REALIZAR LOS SIGUIENTES EXPERIMENTOS:

2.- Medir la actividad de la enzima L-glutamina: ceto-scylo-inositol aminotransferasa de cultivos crecidos en altas y bajas concentraciones de fosfato y poder así caracterizar de una forma mas precisa el efecto regulatorio.

3.- Medir la actividad de la enzima L-glutamina: ceto-scylo-inositol aminotransferasa y determinar el efecto del fosfato in vitro.

SI GLUTAMINA REVIERTE, EL EFECTO NEGATIVO LA ACCION DEL FOSFATO SE ENCUENTRA EN PASOS ANTERIORES A LA FORMACION DE LA GLUTAMINA.

10 BIBLIOGRAFIA

ABOUD-ZEID, A.A. and SHEHATA, Y. M. (1977). Gentamicins. Zbl. Bakt. II. Abt., Bd. 132:97.

AHARONOWITZ, Y. and DEMAİN, A. L. (1977). Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by Streptomyces clavuligerus. Arch. Microbiol., 115:169.

ATKINSON, D. E. and WALTON, G. M. (1967). Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. J. Biol. Chem., 242:3239.

BANDYOPADHYAY, S. K. and MAJUMDAR S. K. (1974). Regulation between alkaline phosphatase and neomycin formation in Streptomyces fradiae, Antimicrob. Agents and Chemoter., 5: 431.

BEHAL, V., HOSTALEK, Z., and VANEK, Z. (1979). Anhydrotetracycline oxygenase activity and biosynthesis of tetracyclines in Streptomyces aureofasciens. Biotechnology Lett., 1:177.

BEHAL, V., GREGROVA-PRUSAKOVA, J. and HOSTALEK, Z. (1982). Effect of inorganic phosphate and benzyl thiocyanate on the activity of anhydrotetracycline oxygenase in Streptomyces aureofasciens, Folia Microbiol., 27:102.

BRYAN, L. E., VAN DEN ELZEN, H. M. and SHAHRABADI, M. S. (1975). The relationship of aminoglycoside permeability to streptomycin and gentamicin susceptibility of Pseudomonas aeruginosa. In: Microbial Drug Resistance Mitsuhashi and Hashimoto, (Eds). University of Tokyo Press. Tokyo, Japan.

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

CEA, B. A (1977). Descripción de un método de enriquecimiento selectivo para auxótrofos de fenilalanina tirosina en la levadura Hansenula polymorfa. Tesis Q.F.B., Fac. de Química, UNAM. México, D.F. Pp: 20.

CHANG, F.N. and FLASK, J.G. (1972). Binding of dihydrostreptomycin to Escherichia coli ribosomes: characteristics and equilibrium of the reaction. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2:294.

CHATTERJEE, S. and VINING, L.C. (1981). Nutrient utilization in actinomycetes. Induction of glucosidases in Streptomyces venezuelae Can. J. Microbiol., 27: 639.

CHIU, C. W.,BERNHARD, T. and DELLWEG, G. (1982). In Peptide Antibiotics-Biosynthesis and Functions. Kleinkauf and Von Dohren, H., (Eds). De Gruyter, Berlin, F.R.G., Pp:149.

CLARIDGE, C.A. (1983). Mutasyntesis and directed biosynthesis for the production of new antibiotics. In: Basic Biology of new developments in biotechnology. Hollander, Laskin and Rogers (Ed). Plenum Press. USA. Pp: 231.

CORTES, J., LIRAS, P., CASTRO, J. M. and MARTIN, J. F. (1986) Glucose regulation of cephamycin biosynthesis in Streptomyces lactamdurans is exerted on the formation of α -aminoadipyl-cysteinyl-valine and deacetoxy-cephalosporin C synthase, J. Gen. Microbiol., 132:1805.

COURVALIN, P. and CARLIER, C. (1981). Resistance towards aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics in bacteria. J. Antimicrobial Chemotherapy, 8(A):57.

CURDOVA, E., KREMEN, A, VANEK, Z. and HOSTALEK, Z (1976). Regulation and biosynthesis of secondary metabolites. XVVIII. Adenylate level and chlortetracycline production in Streptomyces aureofaciens, Folia Microbiol., 21:481.

DAHIEL, W. W. (1988). Bioestadística. 3a edición. Ed. Limusa Pp: 283.

DAUM, S.J., ROSI, D. and GOSS, W.A. (1977). Mutational biosynthesis by idiotrophs of Micromonospora purpurea. II. Conversion of non-amino containing cyclitols to aminoglycoside to new aminoglycoside antibiotics. J. Antibiot., 30:98.

DAVIS, J. (1980). Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams and Wilkins, (Eds). Baltimore-London. Pp: 474.

DEMAIN, A. L. and INAMINE, E. (1970). Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase (α -D-mannosidase) formation. Bacteriol. Rev., 34:1.

DEMAIN, A. L. (1974). How do antiobiotic-producing microorganisms avoid suicide?. Ann. N. Y. Acad. Sci., 235:601

DEMAIN. A. L., AHARONOWITZ, Y., and MARTIN J. F. (1983). Metabolic control of secondary biosynthetic pathways. In: Biochemistry an Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics, Vining, (Ed). Addison-Wesley, Reading, MA.,49

DOTZLAF, J.E., METZGER, L. S. and FOGLESONG, M. A. (1984). Incorporation of aminoacids-derived carbon into ty lactone by Streptomyces fradiae GS14. Antimicrob. Agents. Chemother., 25:216.

DÓULL, J.L. and VINING, L.C. (1990). Nutritional control of actinorhodin production by Streptomyces coelicolor A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. Appl. Microbiol. Biotechnol., 32:449.

DREW, S. W. and DEMAIN, A. L. (1977). Effect of primary metabolites on secondary metabolism. Annu. Rev. Microbiol., 31:343.

EFFENBERGER, W., MULLER, P. J. and BOCKER, H. (1983). Uncoupling of respiration in turymicin fermentations. Z. Allg. Mikrobiol., 23:557.

FLORES, M. E. and SANCHEZ, S. (1985). Nitrogen regulation of erythromycin formation in Streptomyces erythreus. FEMS Microbiol. Letters., 26:191.

GERSH, D., ROMERO, W., BOCKER, H. and THRUM, H. (1978). Variations in cyclic adenosine 3,5-monophosphate and cyclic guanosine 3,5-monophosphate in antibiotic producing strains of Streptomyces hygroscopicus. FEMS Microbiol. Lett., 3:39.

GERSH, D. (1980). Metabolic regulation by cyclic AMP in macrolide antibiotic-producing strains of Streptomyces hygroscopicus, Process Biochem., 15:21.

GIL, J. A., NAHARRO, G., VILLANUEVA, J. R. and MARTIN, J. F. (1985). Characterization and regulation of p-aminobenzoic acid synthase from Strptomyces griseus. J. Gen. Microbiol., 131:1279.

GLASBY, J.S. (1979). Encyclopaedia of Antibiotics. 2a edicion. John Wiley & Sons. N.Y. USA. Pp: 233.

GONZALEZ, M. F., MONTOYA, D., FAREZ, E., ARIAS, J. M. and MONTOYA, E. (1990). Effect of phosphate on antibiotic and extracellular protein production by Myxococcus coralloides D Appl. Microbiol. Biotechnol., 33:78

GRAFE, U. (1989). Autoregulatory secondary metabolites from actinomycetes, In: Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes, Shapiro, (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, chap. 3.

HU, W., BRAÑA, A. F AND DEMAIN, A.L. (1984). Carbon source regulation of cephem antibiotics production by resting cells of Streptomyces clavuligerus and its reversal by protein synthesis inhibitors. Enzyme Microb. Technol., 6:155.

HUNAITI, A. A. and KOLATTUKUDY, P.E. (1984). Source of methyl-malonyl-coenzyme A for erythromycin synthesis: methylmalonyl-CoA mutase from Streptomyces erythreus. Antimicrob. Agents. Chemother., 25:173.

JANGLOVA, Z., SUCHY, J. and VANEK, Z. (1969). Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. VII Intracellular adenosine-5-triphosphate concentration in Streptomyces aureofaciens. Folia Microbiol., 14: 208.

- JENSEN, S. (1985). Biosynthesis of cephalosporins. Crit. Rev. Biotechnol., 3:277.
- KASE, H., IIDA, T., ODAKURA, Y., SHIRAHATA, K. and NAKAYAMA, K. (1980). Accumulation of 2-desoxyscylo-inosamine by a 2-desoxystreptamine-requiring idiotroph of Micromonospora sagamiensis. J. Antibiot., 33:1210-1212.
- KIRBY, J.P. (1980). Microbiological, chemical and clinical findings of aminoglycoside antibiotic research. Process Biochemistry, Oct-Nov.14:23.
- KOHLHEPP, S.J., PLANT, S.B., McCARRON, D.A. and GILBERT, D.N. (1966). Gentamicins does not chelate calcium. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 21: 668-669.
- LEE, B.K., CONDON, R.G., WAGMAN, G.H. and KATZ, E. (1976). Micromonospora produced gentamicin components. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 9: 151-159.
- LIRAS, P., VILLANUEVA, J. R. and MARTIN, J. F. (1977). Sequential expression of macromolecule biosynthesis and candicidin formation in Streptomyces griseus. J. Gen. Microbiol., 102:269.
- LIU, C. M., McDANIEL, L. E. and SCHAFFNER, C. F. (1972). Studies on candicidin biogenesis J. Antibiot., 25:116.
- LOEWUS, F.A. (1952). Improvement in Antrona method for determination of carbohydrates. Anal. Chem., 24(1):219.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin reagent. J. Biol. Chem., 193: 165.
- LUBBE, C., WOLFE, S. and DEMAINE, A. L. (1985). Represion and inhibition of cephalosporin synthetases in Streptomyces clavuligerus by inorganic phosphate Arch. Microbiol., 140:317.
- LUCHER, L.A., CHEN, Y. and WALKER, J.B. (1989). Reactions catalized by purified L-glutamine: keto-scylo-inositol aminotransferase, an enzyme required for biosynthesis of aminocyclitol antibiotics. Antimicrob. Agents. Chemother., 33: 452-459.
- MADRY, N., SPRINKMEYER, R. and PAPE, H. (1979). Regulation of tylosin synthesis in Streptomyces: effects of glucose analogs and inorganic phosphate. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 7:365.
- MADRY, N. and PAPE, H. (1982). Formation of secondary metabolism enzymes in the tylosin producer Streptomyces T59-235. Arch. Microbiol., 131:170.

MAJUMDAR, M.K. and MAJUMDAR S. K. (1970). Isolation and characterization of three phosphoamido-neomycins and their conversion into neomycins by Streptomyces fradiae. Biochem. J., 120:271.

MAJUMDAR, M.K. and MAJUMDAR S. K. (1971). Synthesis of neomycin by washed mycelium of Streptomyces fradiae and some physiological considerations. Folia Microbiol., 16:285.

MAJUMDAR, M.K. and MAJUMDAR S. K. (1971a). Relationship between alkaline phosphatase and neomycin formation in Streptomyces fradiae. Biochem. J., 122:397.

MALPARTIDA, F., HALLAM, S. E., KIESER, H. M., MOTAMEDI, H., and HUTCHINSON, C. R. (1987). Homology between Streptomyces genes coding for synthesis of diferent polyketides used to clone antibiotic biosynthetic genes. Nature, 325:818.

MARTIN, J. F. and DEMAIN, A.L. (1976). Control by phosphate of candicidin production. Biochem. Biophys. Res. Commun., 71:1103.

MARTIN, J. F. and MCDANIEL, L. E. (1976). Biosynthesis of candicidin by phosphate-limited resting cells of Streptomyces griseus. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 3:135.

MARTIN J. F. (1976). Phosphate regulation of gene expression in candicidin biosynthesis. In: Microbiology-1976, Schlessinger, D., (Ed). American Society for Microbiology, Washington, D. C. Pp:548.

MARTIN, J. F. (1977). Control of antibiotic synthesis by phosphate. Adv. Biochem. Eng., 6:105.

MARTIN, J. F., LIRAS, P. and DEMAIN, A. (1977). Inhibition by phosphate of the activity of candicidin synthases. FEMS Microbiol. Letters, 2:173.

MARTIN, J. F. and DEMAIN, A. L. (1977a). Effect of exogenous nucleotides on the candicidin fermentation. Can. J. Microbiol., 23:1334.

MARTIN, J.F. and DEMAIN, A. L. (1977b). Cleavage of adenosine 5-monophosphate during uptake by Streptomyces griseus. J. Microbiol., 23:1334.

MARTIN, J. F., LIRAS, P. and DEMAIN, A.L. (1978). ATP and adenylate energy charge during phosphate-mediated control of antibiotic synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 83:822.

MARTIN, J. F., NAHARRO, G., LIRAS, P. and VILLANUEVA, J. R. (1979). Isolation of mutants deregulated in phosphate control of candicidin biosynthesis. J. Antibiot., 32:600.

- MARTIN, J.F. (1979). Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Adv. Appl. Microbiol.*, 25:147.
- MARTIN, J. F. y DEMAIN, A. L. (1980a). Control of antibiotics biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, 44:230.
- MARTIN, J.F. and DEMAIN, A. (1980b). Control by phosphate of candicidin production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71: 1103-1109.
- MARTIN, J. F. (1984). Biosynthesis, regulation and genetics of polyene macrolide antibiotics. In: *Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology and Practice*, Omura, S., (Ed)., Academic Press, Orlando, Fl. Pp: 405.
- MARTIN, J.F. (1989). Molecular mechanisms for the control by phosphate of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. In *Regulation of secondary metabolism in Actinomycetes*. Shapiro, S. (Ed)., CRC Press Inc. B.R., Florida. Pp: 213-237.
- MARTIN, J. F. (1991). Comunicación Personal
- MASUMA, R., TANAKA, Y., TANAKA, H. and OMURA, S. (1986). Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents. *J. Antibiot.*, 39:1557.
- MERTZ, P. and DOOLIN, L. (1973). The effect of inorganic phosphate on the biosynthesis of vancomycin, *Can. J. Microbiol.*, 19:263.
- MILLER, A. L. and WALKER, J. B. (1969). Enzymatic phosphorylation of streptomycin by extracts of streptomycin-producing strains of Streptomyces, *J. Bacteriol.*, 99:401.
- MOUKADDEM, M., TANGY, F., CAPMAN, M.L. and LE GOFFIC, F. (1986). Effects of cations, polyamines and other aminoglycosides on gentamicin C2. *J. Antibiot.*, 28: 627.
- NAHARRO, G., GIL, J. A., VILLANUEVA, J. R. and MARTIN, J. F. (1980). Study of the molecular mechanism of phosphate control of candicidin biosynthesis using phosphate-deregulated mutants. In: *Advances in Biotechnology* Vezina and Singh (Eds). Pergamon Press Toronto Vol. III. Pp:135.
- ODAKURA, Y., KASE, H. and NAKAYAMA, K. (1983). Sagamicin and the related aminoglycosides: Fermentation and biosynthesis. III. Isolation and characterization of Micromonospora sagamiensis mutants blocked in gentamicin C1 pathway. *J. Antibiot.*, 36:125-130.

OKACHI R. and NARA, T. (1984). The aminoglycosides: Properties, biosynthesis and fermentation. In: Biotechnology of Industrial Antibiotics. Vandame, (Ed). Marcel Dekker, Inc. N.Y. Vol.22 Pp: 329.

OMURA, S., TANAKA, Y., MAMADA, H. and MASUMA, R. (1984). Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids on the biosynthesis of protylosin, a precursor of tylosin aglycone, J. Antibiot., 37:494.

PEARCE, C.J. and RINEHART, K.L. (1981). Biosynthesis of aminocyclitol antibiotics. In: Antibiotics IV. Biosynthesis. Corcoran, (Ed). Springer Verlag. Berlin. N.Y. Pp: 74.

PORTER, J. N. (1975). Cultural conditions for antibiotic-producing microorganisms. In: Methods in Enzymology. (Hash). 43:3.

RAGAN, C. M. and VINING, L. C. (1977). Intracellular cyclic adenosine 3, 5-monophosphate levels and streptomycin production in cultures of Streptomyces griseus. Can. J. Microbiol., 24:1012.

RINEHART, K.L. and STROSHANE, R.M. (1976). Biosynthesis of aminocyclitol antibiotics. J. Antibiot., 39:319.

ROMERO, J., LIRAS, P. and MARTIN, J. F. (1984). Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in Streptomyces clavuligerus. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20:318.

ROSI, D., GOSS, W.A. and DAUM, S. J. (1977). Mutational biosynthesis by idiotrophs of Micromonospora purpurea. I. Conversion of aminocyclitols to new aminoglycoside antibiotics. J. Antibiot., 30: 88-97.

ROSNER, A. and AVIV, H. (1980). Gentamicin bioautography assay vs microbiological disk test. J. Antibiot., 33:600.

SARKAR, N. and PAULUS, H. (1972). Function of peptide antibiotics in sporulation. Nature New Biol., 239:228.

SHIRAFUJI, H., NOGAMI, I., KIDA, and YONEDA, M. (1982). Two alkaline phosphatases from a butirosin A producer Bacillus vitellinus, Agric. Biol. Chem., 46:2465.

SUMMER, B.J. (1944). Determination of inorganic phosphate. Sciences 100:413.

SUZAKE, K., TOKUNAGA, K., HAYASHI, H. and HORI, M. (1985). Biosynthesis of 2-deoxistreptomine. J. Antibiot., 38:1211.

TERRY, J. and SPRINGHAM, D. G. (1981). The effect of inorganic phosphate on cyclic adenosine 3,5-monophosphate and streptomycin-producing cultures of Streptomyces griseus, Can. J. Microbiol., 27: 1044.

TESTA, R.T. and TILLEY, R.C. (1976). Biotransformation, a new approach to aminoglycoside biosynthesis: II Gentamicin. *J. Antibiot.*, 29: 140.

VINING, L. C. (1979). Antibiotic tolerance in producer organisms. *Adv. Appl. Microbiol.*, 25:147.

VU-TRONG, K., BHUWAPATHANAPUN, S. and GRAY, P.P. (1980). Regulatory role of adenylate nucleotide pool and enzymes involved in biosynthesis of tylonolide precursors. 17:519.

VU-TRONG, K., BHUWAPATHANAPUN, S. and GRAY, P. P. (1981). Metabolic regulation in tylosin-producing Streptomyces fradiae: phosphate control of tylosin biosynthesis, Antimicrob. Agents. Chemother., 19:209.

WAGMAN, G.H., MARQUEZ, J.A., BAILY, J.A., COOPER, D., WEISTEINJ., TKACH, R. and DANIELS, P. (1972). Chromatographic separation of some minor components of gentamicin complex. *J. Chromatogr.*, 70: 171.

WAGMAN, G.H. and WEINSTEIN, M.J. (1980). Antibiotics from Micromonospora. *Ann. Rev. Microbiol.*, 34: 537.

WALKER, J. B. (1979). On the development of enzymatic pathways for the biosynthesis of aminocyclitol antibiotics and other idiolites. *Folia Microbiol.*, 24:286

WEINBERG, E. D. (1974). Secondary metabolism; control by temperature and inorganic phosphate. *Dev. Ind. Microbiol.*, 15:70

WEINBERG, E. D. (1978). Secondary metabolism: regulation by phosphate and trace elements. *Folia Microbiol.*, 23:496

WEISTEIN, M.J., WAGMAN, G.H. and TABER, R.T. (1966). Toxicity of acetylated gentamicin and neomycin. *Antibacterial Agents and Chemotherapy*, 1965:227.

WEISTEIN, M.J., WAGMAN, G.H., ODEN, E. H. and MARQUEZ, J.A. (1967). Biological activity of the antibiotic components of the gentamicin complex *J. Bacteriol.*, Vol. 94:789.

WILLSKY, S. and MALAMY, J. (1980). Effect of arsenate on Pi transport in E. coli *J. Bacteriol.*, 144:366.