



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

SELECCION DE MUTANTES INSENSIBLES A
REPRESION CATABOLICA POR GLUCOSA EN
Streptomyces kanamyceticus

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ELIZABETH PONCE RIVAS



1992



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M en C. Sergio Vaca P.

VOCAL: Dra. Ma. Elena Flores C.

SECRETARIO: Biol. Ramón V. Moreno T.

SUPLENTE: Biol. Irma E. Dueñas G.

Biol. Elías Piedra I.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la supervisión de la Dra. Ma. Elena Flores.

Con afecto y respeto a la Dra.
Ma. Elena Flores C. a quien le
agradezco la asesoría y el apo-
yo que siempre me ha brindado.

A mis padres.

A mis amigos.

A mi hermana.

INDICE GENERAL

	pág.
I. ABREVIATURAS	1
II. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	3
III. RESUMEN	5
IV. INTRODUCCION	6
V. ANTECEDENTES	8
Regulación	
1. Control del metabolismo	9
2. Mecanismos regulatorios	10
2.1. Represión catabólica	11
2.2. Sistema de la fosfotransferasa	13
3. Regulación en otros organismos	16
4. Regulación en Actinomicetos	
4.1. Metabolismo primario	17
4.2. Metabolismo secundario	19
Enzimas Amilolíticas Microbianas	
1. El sustrato: el almidón	23
2. Clasificación	26
3. Distribución, propiedades y modo de acción de las amilasas	
3.1. Endo-amilasas	28
3.2. Exo-amilasas	33
3.3. Enzimas desramificantes	37
3.4. Enzimas productoras de ciclodextrinas	39

4. Amilasas producidas por organismos del género <u>Streptomyces</u>	40
5. Aplicaciones de las amilasas	43
VI . OBJETIVO	45
VII. MATERIALES Y METODOS	46
VIII. RESULTADOS Y DISCUSION	56
IX. CONCLUSIONES	112
X. BIBLIOGRAFIA	114

I. ABRREVIATURAS

μm	micromol
μg	microgramo
2-DOG	2-deoxi-D-glucosa
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
Ag^{+}	ión plata
Alm	almidón
<u>alm</u> ó <u>amy</u>	gen de amilasa
AMPc	adenosin monofosfato cíclico
ATP	adenosin trifosfato
Ca^{+2}	ión calcio
CAP	proteína activadora catabólica
CGTasa	ciclomaltodextrina glucanotransferasa
CRP	proteína receptora del AMPc
Cu^{+2}	ión cobre
Da	dalton
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
Fig.	figura
<u>glic</u>	<u>glicerol</u>
<u>glk</u>	<u>gen de glucosa cinasa</u>
<u>gluc</u>	<u>glucosa</u>
Hg^{+2}	ión mercurio
h	horas
IPNS	isopenicilin-N-sintetasa

Kb	kilobases
KDa	kilodalton
MC	medio completo
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
MM	medio mínimo
mM	milimolar
Ni ⁺²	ión níquel
ORF	marco de lectura abierta
pb	pares de bases
pCMB	para-cloromercurio-benzoato
PEP	fosfoenol piruvato
pH	logaritmo inverso de la concentración de iones hidrógeno
PTS	sistema de la fosfotransferasa
Rf	frente de corrimiento
RNA _m	ácido ribonucléico mensajero

II. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Fuentes de carbono seleccionadas por su capacidad de reprimir la producción de amilasa y de kanamicina en fermentación sólida.

Tabla 2. Metabolitos secundarios cuya producción es suprimida por la glucosa.

Tabla 3. Organismos y enzimas que son reprimidas por ciertas fuentes de carbono.

Tabla 4. Efecto represor de la glucosa y el glicerol sobre la producción específica de la amilasa en la cepa silvestre.

Tabla 5. Producción de amilasa y de kanamicina de las cepas silvestre y mutantes bajo concentraciones represoras de glucosa y glicerol.

Tabla 6. Producción específica de la enzima amilasa a las 24 horas de fermentación bajo diferentes condiciones en las cepas silvestre y mutantes.

Fig. 1. Mecanismo propuesto para la regulación del sistema de transporte de carbohidratos y de la adenilato ciclasa por el PTS en *E. coli* y *S. typhimurium*.

Fig. 2. Estructura de la cadena lineal de las moléculas de amilosa.

Fig. 3. Estructura de los puntos de ramificación de la amilopectina.

Fig. 4. Modelo diagramático de la amilopectina.

Fig. 5. Degradación de almidón por varias amilasas.

Fig. 6. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la α -amilasa.

Fig. 7. Efecto de los iones Ca^{+2} sobre la actividad de la enzima α -amilasa.

Fig. 8. Cromatografía en placa fina de los productos solubles de la acción de la enzima α -amilasa.

Fig. 9. Análisis de carbohidratos producidos por la acción de la α -amilasa por HPLC.

- Fig. 10. Curvas de crecimiento y de pH obtenidas bajo condiciones no represoras de la α -amilasa en la cepa silvestre.
- Fig. 11. Actividad volumétrica de la α -amilasa de la cepa silvestre bajo condiciones no represoras y represoras de glucosa.
- Fig. 12. Curvas de crecimiento y pH obtenidas bajo condiciones no represoras, así como represoras de glicerol en la cepa silvestre.
- Fig. 13. Actividad volumétrica de la α -amilasa bajo condiciones no represoras y represoras de glicerol en la cepa silvestre.
- Fig. 14. Producción de amilasa en las mutantes E, 29 y 41 bajo concentraciones represoras de glucosa y de glicerol.
- Fig. 15. Producción de kanamicina por las mutantes E, 29 y 41.
- Fig. 16. Curvas de crecimiento y de pH obtenidas bajo concentraciones no represoras en la cepa silvestre y mutantes.
- Fig. 17. Actividad volumétrica de la α -amilasa de la cepa silvestre y mutantes bajo condiciones no represoras.
- Fig. 18. Curvas de crecimiento y de pH de la cepa silvestre y mutantes obtenidas en MM/Alm+Glucosa al 2%.
- Fig. 19. Actividad volumétrica de la cepa silvestre y de las mutantes en MM/Alm+Glucosa al 2%.
- Fig. 20. Curvas de crecimiento y de pH de la cepa silvestre y mutantes obtenidas en MM/Alm+Glucosa al 6%.
- Fig. 21. Actividad volumétrica de la cepa silvestre y de las mutantes en MM/Alm+Glucosa al 6%.
- Fig. 22. Producción de amilasa en colonias de la cepa silvestre bajo diferentes concentraciones de glucosa.
- Fig. 23. Curvas de crecimiento y de pH de la cepa silvestre y mutantes obtenidas en MM/Alm+Glicerol al 2%.
- Fig. 24. Actividad volumétrica de la cepa silvestre y de las mutantes en MM/Alm+Glicerol al 2%.
- Fig. 25. Curvas de crecimiento y de pH de la cepa silvestre y mutantes obtenidas en MM/Alm+Glicerol al 6%.
- Fig. 26. Actividad volumétrica de la cepa silvestre y de las mutantes en MM/Alm+Glicerol al 6%.

III. RESUMEN

El metabolismo de una célula está finamente controlado por mecanismos muy diversos. Uno de ellos es la represión catabólica por carbono que se ejerce sobre las enzimas que participan en la asimilación de diversas fuentes de carbono.

Aunque se conoce mucho acerca de la regulación de la expresión genética en bacterias entéricas, el control de la transcripción y traducción en el género Streptomyces no ha sido muy explorado. En hongos y actinomicetes sin embargo, ya han sido aisladas algunas mutantes insensibles a represión catabólica por fuentes de carbono, lo que sugiere que el mismo mecanismo regulatorio descrito para enterobacterias se presente en éstos organismos, no obstante esto aun no se ha confirmado.

El objetivo del presente trabajo fué el estudio de la regulación por fuentes de carbono sobre la síntesis de la enzima amilasa producida por Streptomyces kanamyceticus, así como el aislamiento de mutantes insensibles a tal represión. Los resultados mostraron que la amilasa producida por éste organismo es reprimida por fuentes de carbono como la glucosa y el glicerol. De las 3 mutantes que se lograron aislar, dos de ellas (las mutantes 41 y E) mostraron la capacidad de producir amilasa bajo concentraciones represoras de glucosa y de glicerol, respectivamente, mientras que la tercera (la mutante 29) logró producir una mayor cantidad de amilasa que la cepa silvestre pero sólo bajo condiciones no represoras por lo que su regulación no fué afectada. Asimismo, la enzima producida por S. kanamyceticus mostró tener propiedades similares a las de las amilasas producidas por otros organismos del mismo género, así como con algunas especies del género Bacillus.

IV. INTRODUCCION

En la mayoría de los microorganismos, la síntesis de enzimas catabólicas está regulada por la fuente de carbono. La producción de la α -amilasa, de β -galactosidasa y de agarasa entre otras, son reprimidas por diversas fuentes de carbono. La represión catabólica es un fenómeno regulatorio conocido desde hace muchos años y en enterobacterias, la evidencia experimental parece indicar que el sistema de la fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) juega un papel central mediando el efecto por exclusión del inductor y por la estimulación de AMPc de genes catabólicos. Asimismo, se sugiere que éste mecanismo sea el que se presente también en hongos y actinomicetos.

En el caso específico de la enzima amilasa cuyas aplicaciones comerciales son numerosas, su regulación ha sido poco estudiada en actinomicetos, microorganismos industrialmente importantes por producir una gran cantidad de antibióticos, vitaminas, enzimas e inhibidores enzimáticos.

Bajo éste contexto, el presente trabajo se enfocó al estudio de la regulación por fuentes de carbono sobre la síntesis de la amilasa y al aislamiento de mutantes insensibles.

Los resultados obtenidos mostraron que la mayor actividad de la α -amilasa de la cepa silvestre se obtiene a un pH de 7.0 y a una temperatura de 55°C. Es una enzima metalo-cálcica, de tipo inducible cuyo principal producto de hidrólisis

es la maltosa. Estas características son compartidas con las amilasas producidas por otros Streptomyces como S. thermoviolaceus y S. hygrosopicus, así como con organismos del género Bacillus como B. circulans.

Debido a que el crecimiento de la cepa silvestre de S. kanamyceticus no fué inhibido por la presencia de análogos de glucosa tales como la 2-Deoxi-D-glucosa aun estando en altas concentraciones, la selección de mutantes se realizó por medio de la identificación de halos de hidrólisis de almidón bajo concentraciones represoras de glucosa y glicerol, las dos fuentes de carbono seleccionadas por su capacidad de reprimir la síntesis de la amilasa en la cepa silvestre. Otras fuentes de carbono probadas no tuvieron ningún efecto.

Mediante mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina como agente mutagénico se lograron aislar 3 mutantes, dos de ellas con capacidad de producir amilasa bajo concentraciones represoras ya sea de glucosa (mutante 41) o de glicerol (mutante E) y una tercera (mutante 29) que mostró ser hiperproductora de amilasa pero solo bajo condiciones no represoras por lo que presenta el mismo comportamiento regulatorio que la cepa silvestre, no obstante haber sido seleccionada como insensible a la represión por glucosa y glicerol en fermentación sólida.

V. ANTECEDENTES

Los Actinomicetos son un grupo de microorganismos procariotas, habitantes del suelo y aerobios estrictos, con necesidades nutricionales simples. Este grupo incluye a muchos géneros cuyo desarrollo vegetativo es exclusivamente en forma de micelio. Son Gram + y no forman endosporas. El género Streptomyces es el grupo más importante e incluye a microorganismos que presentan una pared celular característica de bacterias Gram +, rica en lignina, ácido diaminopimélico, glicina y diversos azúcares. Presentan un proceso de desarrollo de colonias que depende de la expresión genética diferencial, tanto en espacio como en tiempo. Las hifas ramificadas del micelio en substrato dan lugar a las hifas aéreas que se transforman en cadenas de esporas maduras que forman la etapa de reposo natural y de dispersión del organismo (Goodfellow, 1976; Williams, 1983; Hopwood, 1988).

Los Streptomyces son microorganismos capaces de producir una gran cantidad de antibióticos, vitaminas, enzimas e inhibidores enzimáticos (Goodfellow, 1984).

Entre las enzimas producidas por éste género se encuentran las enzimas hidrolíticas que incluyen proteasas, nucleasas, lipasas y una variedad de enzimas que hidrolizan diferentes tipos de polisacáridos (Virolle, 1988). Asimismo, se sabe que el 75% de los antibióticos de interés comercial producidos por Actinomicetes se incluyen dentro del género

Streptomyces. Estos compuestos presentan estructuras químicas diversas y vías biosintéticas diferentes, por lo que a éste grupo de organismos se les considera como los principales productores de antibióticos (Umezawa, 1978; Demain, 1981).

REGULACION

1. Control del metabolismo

El metabolismo primario involucra una serie de interacciones enzimáticas mediadoras de las vías catabólica, anfibólica y anabólica, las cuales proveen los intermediarios biosintéticos y energía. Convierten los precursores biosintéticos en macromoléculas esenciales, tales como los ácidos ribonucleicos y desoxirribonucleicos, proteínas, lípidos y polisacáridos. Este tipo de metabolitos son producidos durante la fase de crecimiento o trofofase (Martín, 1980).

En adición a éste tipo de metabolismo general, ciertos grupos taxonómicos son capaces de sintetizar metabolitos especiales, utilizando ya sea las mismas enzimas generales u otras enzimas especiales, producidas bajo condiciones nutricionales específicas. Estos metabolitos secundarios también llamados idiolitos, denominados así por ser producidos normalmente durante la idiofase o fase de producción, no son esenciales para el crecimiento vegetativo del organismo, aunque en la naturaleza probablemente tienen funciones de sobrevivencia.

La diversidad química y estructura poco común de los idiolitos se muestra por las muchas clases de compuestos orgánicos a los que pertenecen. Estos incluyen entre otros a los aminoazúcares, quinonas, cumarinas, epóxidos, glicósidos, macrólidos, lactonas, nucleósidos, terpenoides y tetraciclinas (Martín, 1980; Demain, 1985).

2. Mecanismos regulatorios

El DNA de las células microbianas dicta la síntesis de la maquinaria enzimática. Los microbios a pesar de su genotipo constante son sorprendentemente flexibles en su capacidad de alterar su composición y metabolismo en respuesta a cambios ambientales. El medio no cambia la composición genética de la célula pero afecta marcadamente la expresión fenotípica de los genes. En virtud de los mecanismos regulatorios, las células microbianas generalmente no sobreproducen metabolitos a pesar de las profundas variaciones ambientales.

Las enzimas degradativas normalmente son reguladas por inducción y por regulación catabólica sin embargo, las enzimas biosintéticas que utilizan a los intermediarios metabólicos para la construcción de bloques de macromoléculas, son controladas principalmente por represión por retroalimentación (Wang, 1979).

2.1. REPRESION CATABOLICA

La represión catabólica se refiere a la represión, por fuentes de carbono fácilmente utilizables, de genes que codifican a enzimas de ciertas vías catabólicas. El ejemplo clásico es la represión de β -galactosidasa (operon lac) durante el crecimiento de Escherichia coli en glucosa y lactosa (Wang, 1979; Lewin, 1990).

La represión catabólica es referida históricamente como el efecto glucosa. Sin embargo, otras fuentes de carbono pueden ser tan represivas o aun más represivas que la glucosa y en algunos organismos la glucosa es la fuente de carbono cuyo metabolismo es reprimido. Por ejemplo, en Pseudomonas aeruginosa, el citrato es la fuente de carbono que es favorecida sobre la glucosa y es la que reprime a las enzimas del catabolismo de la glucosa (Wang, 1979).

La represión catabólica ocurre cuando a un organismo se le ofrece una fuente de energía en presencia de otra más fácilmente utilizable como la glucosa. Una consecuencia de la represión catabólica es que puede darse lugar a un crecimiento diáuxico si las 2 fuentes de energía están presentes en el medio al mismo tiempo y si la enzima necesaria para la utilización de una de las fuentes de energía está sujeta a represión catabólica. El primer crecimiento ocurre con la fuente más fácilmente utilizable y después hay una fase temporal antes de que el crecimiento sea reiniciado con la se-

gunda fuente de energía (Wang, 1979; Brock, 1988; Lewin, 1990).

Otro tipo de regulación catabólica es la inhibición catabólica en la cual los productos del catabolismo de una fuente de carbono fácilmente utilizable inhiben la actividad de ciertas enzimas (Wang, 1979).

En *E. coli* y otras bacterias entéricas, los genes que forman el operón sensible al carbono, puede ser regulado positivamente por una proteína activadora catabólica (CAP) o proteína receptora del AMPc (CRP). El CAP es activo en la presencia de AMPc. La unión del CAP-AMPc a la región promotora, permite la iniciación de la transcripción del operón. En presencia de glucosa, la concentración intracelular de AMPc se reduce. Esto hace que el CAP se una incorrectamente a la región promotora, provocando que la transcripción se reduzca a un nivel basal (Martín, 1980; Phaff, 1981; Priest, 1983; Saunders, 1987; Brock, 1988; Lewin, 1990).

El AMPc es sintetizado por la enzima adenilato ciclasa. La reacción usa ATP como sustrato e introduce uniones 3'-5' vía enlaces fosfodiéster. El factor CAP se une al DNA formando un complejo AMP-CAP-DNA. Esta proteína es un dímero de 2 subunidades idénticas de 22,500 Da, el cual puede ser activado por una sola molécula de AMPc.

Existen secuencias consenso para el CAP a las que se le unen una de las subunidades del dímero. El pentámero TGTGA que es altamente conservado en éstas secuencias parece ser el elemento esencial en el reconocimiento.

Algunos sitios de unión contienen una inversión de la secuencia consenso a la que probablemente se le une la segunda subunidad. El CAP se une más fuertemente a sitios que contienen 2 versiones invertidas del pentámero. La jerarquía de afinidades de unión con el CAP pueden ayudar a explicar el por qué diferentes genes son activados por diferentes niveles de AMPc in vivo (Lewin, 1990).

La síntesis de la mayoría, si no es que de todas las enzimas extracelulares de procariontes y eucariontes está sujeto a represión catabólica (Priest, 1983). En la Microbiología Industrial la comprensión de éste mecanismo es de gran importancia ya que muchas de las enzimas con un valor comercial se obtienen de microorganismos en los que se presenta éste fenómeno (Wang, 1979; Phaff, 1981).

2.2. SISTEMA DE LA FOSFOTRANSFERASA (PTS)

En E. coli y en otras bacterias, la síntesis de enzimas catabólicas parece estar regulada por dos procesos distintos: uno llamado represión catabólica, que involucra la inhibición de la síntesis de AMPc y el otro llamado exclusión del inductor que involucra inhibición del transporte del azúcar inductor (Saier, 1989).

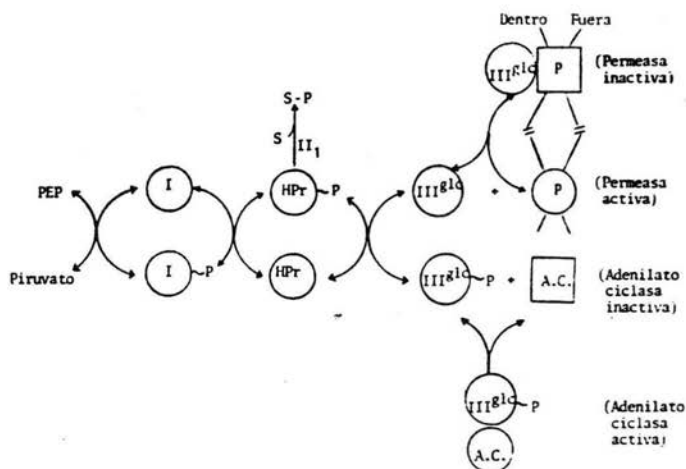


Fig. 1. Mecanismo propuesto para la regulación del sistema de transporte de carbohidratos y de la adenilato ciclasa por el PTS en *E. coli* y *S. typhimurium* (Saier, 1989).

La fosforilación y transporte del azúcar por el sistema de la fosfotransferasa (PTS) requiere de la participación de enzimas solubles unidas a la membrana. Estas proteínas catalizan la transferencia de la molécula fosforilo del fosfoenolpiruvato (PEP) al azúcar substrato. La reacción completa requiere Mg^{+2} y los productos formados son fosfato y piruvato. Dos proteínas solubles, la enzima I y la proteína HPr son las que inician la transferencia del grupo fosforilo. La enzima I une el grupo fosforilo en las posiciones N-1 o N-3 de un anillo de imidazol.

Las enzimas II y II son las proteínas azúcar-específicas del sistema del PTS y se encuentran asociadas con la membrana citoplasmica. La enzima III es una proteína de membrana periférica (proteína regulatoria central), mientras que los complejos de la enzima II son componentes integrales de la mem-

brana que catalizan tanto el transporte como la fosforilación del azúcar dependiente de PEP, además de la translocación de su azúcar-fosfato (Andrews, 1976; Dills, 1980).

De acuerdo al PTS (Fig. 1), si en una célula bacteriana hay suficiente reserva de PEP y se encuentra suspendida en un medio que carece de un azúcar que sea sustrato del PTS como el glicerol, la lactosa, la melobiosa o la maltosa, entonces las proteínas acopladoras de energía de éste sistema, las enzimas I y HPr, así como la III estarán en estado fosforilado y en consecuencia la enzima adenilato ciclasa que normalmente está en forma inactiva, se activará por la unión de la enzima III a su sitio regulatorio alostérico y en consecuencia habrá síntesis de AMPc, mientras que la permeasa también estará en forma activa por lo que habrá transporte del azúcar inductor. Si por el contrario, se tiene un azúcar que si es sustrato del PTS como la glucosa, las enzimas I y HPr (que estarán en forma fosforilada) le pasarán su grupo fosforilo a la enzima II para que catalice la fosforilación del azúcar y como consecuencia la mayor parte de la enzima III estará en forma libre por lo que inactivará a la permeasa provocando que se de la exclusión del inductor y la represión catabólica, ya que la adenilato ciclasa estará en su forma inactiva. El sistema de transporte del azúcar está sujeto a control negativo con la enzima III en estado libre, mientras que la adenilato ciclasa está sujeta a control positivo por la enzima III en forma fosforilada (Saier, 1989).

3. Regulación en otros organismos

En Saccharomyces cerevisiae la actividad de enzimas catabólicas es controlada negativamente por 2 mecanismos, ninguno de los cuales es conocido en detalle. El mecanismo molecular de regulación catabólica por carbono en levaduras difiere del de E. coli en que no involucra AMPc, por lo que bajo condiciones represivas, los niveles de AMPc no bajan como en E. coli sino que son elevados de 2 a 3 veces y promueven la inactivación catabólica de sistemas asimiladores. En las mutantes en las que la actividad de la adenilato ciclasa es nula, los mecanismos de inactivación resultan dañados por lo que las enzimas blanco son disminuídas en su actividad específica. El segundo mecanismo regulatorio actúa a través de la represión en lugar de la inactivación. Dado que las enzimas catabólicas resultan insensibles a represión en mutantes con el gen estructural hexocinasa PII alterado, se sugiere que la proteína hexocinasa PII sea la que intervenga en los mecanismos de represión (Barredo, 1988; Vining, 1988).

En Penicillium chrysogenum se aisló una mutante seleccionada por crecimiento en medio con lactosa en la presencia de concentraciones inhibitorias de D-2-desoxiglucosa. La mutante resultó alterada simultáneamente en la represión catabólica de β -galactosidasa, así como en la enzima isopenicilina-N-sintetasa (IPNS) y biosíntesis de penicilina, lo que sugiere que en éste organismo hay un mecanismo común involucrado en la represión catabólica por D-glucosa de enzimas

catabólicas para la utilización de azúcares (metabolismo primario), así como de enzimas de la vía biosintética del antibiótico (metabolismo secundario) (Revilla, 1986; Barredo et al., 1988).

4. Regulación en Actinomicetos

Es razonable asumir que los principios generales del control metabólico en actinomicetos son similares a los encontrados en otros organismos. Sin embargo, los mecanismos regulatorios muestran diferencias considerables entre los organismos y el modelo para la represión catabólica en bacterias entéricas no provee una base segura a partir de la cual estudiar la regulación de metabolitos secundarios en actinomicetos (Vining, 1988).

4.1. METABOLISMO PRIMARIO

Aunque existen evidencias de que ciertas fuentes de carbono pueden reprimir las vías catabólicas en *Streptomyces*, no se han llevado a cabo estudios extensivos al respecto (Vining, 1988).

Se sabe que *Streptomyces venezuelae* asimila mezclas de glucosa-lactosa o glucosa-celobiosa en un modelo diáuxico. En la primera, el crecimiento está asociado con la utilización de glucosa y en el segundo el crecimiento se da utilizando las fuentes de carbono alternativas. La asimilación de lac-

tosa es mediada por una β -galactosidasa que es inducida por lactosa y reprimida por glucosa, maltosa o acetato. Dado que la concentración intracelular de AMPc permanece constante durante la pausa diáuxica, cuando aparece la actividad de β -galactosidasa, es poco probable que éste nucleótido sea un efector regulatorio. Conclusiones similares se sacan de los experimentos sobre la asimilación de celobiosa. La adición de AMPc exógeno no revierte el efecto de glucosa (Vining, 1988).

Estudios con Streptomyces coelicolor, el streptomycete mejor caracterizado genéticamente, muestran que la glucosa reprime el transporte de arabinosa y uno de los 2 sistemas de transporte de glicerol (el sistema de transporte activo); mientras que el sistema de glicerol operado por difusión facilitada es inhibido por glucosa. Adicionalmente la glucosa inhibe el transporte de galactosa y fructosa y reprime las enzimas metabólicas involucradas. En una mezcla de fuentes de carbono los niveles de AMPc no variaron durante el crecimiento, concluyéndose que el nucleótido no participa en la represión por glucosa (Hodgson, 1982).

La aparente ausencia de mediación por AMPc es consistente con observaciones de que los streptomycetes no tienen PTS para el transporte de carbohidratos y que es poco probable que el efecto glucosa sea ejercido por el mecanismo visto en entéricas (Vining, 1988). Demain propone que es probable que en lugar de que el AMPc sea el que desempeñe un papel en la represión catabólica por fuentes de carbono, sea la enzima glucosa cinasa o un producto de ésta enzima, tal como una mo-

lécua de glucosa fosforilada, la que esté involucrada en éste fenómeno (Demain, 1985).

Así, mutantes de *S. coelicolor* resistentes a 2-Desoxi-glucosa deficientes en la actividad de glucosa cinasa, mostraron una pérdida pleiotrópica de la represión por glucosa (Hodgson, 1982), sugiriendo que la glucocinasa interviene en la represión por glucosa en éste género, quizá por un mecanismo similar al de *Saccharomyces cerevisiae*.

Entre los genes de vías catabólicas que han sido clonados y caracterizados están el gen de la glucocinasa de *S. coelicolor* así como el del gen para la agarasa (*dag A*), que no solo está sujeto a inducción por los productos de degradación del agar, sino que también a represión por fuentes de carbono preferentes (Vining, 1988).

4.2. METABOLISMO SECUNDARIO

Entre los mecanismos específicos que regulan el inicio de la síntesis de antibióticos se incluyen la represión catabólica por carbono, la regulación metabólica por nitrógeno y la regulación por fosfato (Martín, 1980).

Entre los numerosos reportes de represión catabólica en actinomicetes, mucho es lo que se ha tratado sobre los efectos de la glucosa sobre la biosíntesis de antibióticos (Vining, 1980).

La glucosa que normalmente es una excelente fuente de carbono para el crecimiento, interfiere en la biosíntesis de muchos antibióticos (Martín, 1980).

En uno de los primeros trabajos Gallo y Katz observaron que la glucosa suprime fuertemente la síntesis de actinomicina en *S. antibioticus*, mientras que la actividad de la enzima fenoxazinona sintetasa (la enzima que cataliza la formación del cromóforo) se vió disminuída (Gallo, 1972). Con menos evidencia conclusiva se ha reportado que la glucosa reprime la biosíntesis de puromicina en *S. alboniger* y provoca una represión transitoria en la producción de eritromicina por *Saccharopolyspora erythraea*. Un efecto negativo de la glucosa sobre la biosíntesis de cefamicina en *Nocardia lactamdurans* se ha atribuído en parte a la represión de la deacetocefalosporina C sintetasa. Efectos supresivos de fuentes de carbono preferentes diferentes a la glucosa, han sido observados en cultivos de *S. clavuligerus* productor de cefamicina y en la producción de novobiocina por *S. niveus* (Vining, 1988).

Se ha reportado también que la glucosa reprime la biosíntesis del antibiótico kanamicina que es producido por *S. kanamyceticus*. El fenómeno es debido a la represión de la enzima N-acetil kanamicin amidohidrolasa, aparentemente la última enzima en la vía biosintética de éste antibiótico. Asimismo se ha reportado que el AMPc elimina la represión catabólica por glucosa de ésta enzima (Sato, 1976).

Se ha sugerido que una caída en los niveles de AMPc, en lugar de un incremento sea lo que dispare el metabolismo secundario en Streptomyces. Sin embargo, se requieren de otros estudios que lo confirmen. Asimismo, hay evidencia que sugiere que la glucosa cinasa tiene importancia en la represión no sólo de las vías del metabolismo primario en Streptomyces, sino también del metabolismo secundario sin embargo, existen controversias y la posibilidad no ha sido aún explorada directamente (Vining, 1988).

En actinomicetes el AMPc parece estar involucrado en la diferenciación, en la producción de antibióticos y en la regulación del transporte del glioxalato, pero la correlación de los niveles de AMPc con la velocidad de biosíntesis de enzimas extracelulares no ha sido publicada (Wood, 1984).

Cuando la biosíntesis de un antibiótico es sensible a represión catabólica por carbono, la producción del producto puede ser aumentada por la selección de mutantes insensibles a tal represión (Saunders, 1987).

Otros mecanismos aparte de la regulación catabólica tales como un decremento en el pH o el agotamiento de oxígeno disuelto podrían estar involucrados en la interferencia de la biosíntesis de antibióticos por fuentes de carbono (Martín, 1980).

ENZIMAS AMILOLITICAS MICROBIANAS

En la naturaleza son dos las fuentes de carbono ampliamente distribuidas: el almidón y la celulosa, las cuales mantienen a muchas formas de vida. Estos polímeros están compuestos de unidades de glucosa con diferentes conformaciones anoméricas, de modo que se requieren sistemas enzimáticos diferentes para degradarlos.

Las enzimas con capacidad de hidrolizar las uniones α -glucosídicas del almidón son llamadas enzimas amilolíticas o α -glucanasas y los sustratos son designados como α -glucanos (Vihinen, 1989).

Existen varias enzimas amilolíticas capaces de hidrolizar el almidón o sus productos de degradación. Las amilasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en microbios y plantas como en animales.

Su papel principal en células vivas es producir pequeños oligosacáridos solubles y finalmente glucosa a partir del almidón soluble o coloidal, el cual es incapaz de pasar a través de la membrana celular (Vihinen, 1989).

Las amilasas degradan el almidón hidrolizando las uniones α -glicosídicas entre unidades de glucosa consecutivas. Los productos de las diferentes amilasas son característicos de las enzimas individuales.

1. El sustrato: el almidón

En su estado natural el almidón consiste de gránulos microscópicos, con una estructura interna altamente compleja. A temperatura ambiente estos gránulos son insolubles en agua, pero si el almidón es calentado en una suspensión acuosa a más de 60°C, los gránulos se hinchan y eventualmente se rompen, dispersándose las moléculas de almidón en la solución. La proteína adherida se separa y coagula durante éste proceso. La temperatura requerida para una completa dispersión o gelatinización depende de la fuente de almidón sin embargo, 105-110°C es una temperatura suficiente para la mayoría de los almidones (Norman, 1979).

El sustrato de las amilasas es el almidón, un polímero compuesto de unidades de D-glucosa, que es la principal fuente de energía y carbono en el metabolismo de la mayoría de organismos y es producido principalmente por plantas superiores.

La D-glucosa existe principalmente como 2 formas isoméricas con estructura de anillo (piranosa), la α -D-glucosa y la β -D-glucosa, las cuales difieren una de otra en la orientación de uno de los grupos hidroxilos y un átomo de hidrógeno, ambos unidos al carbono 1.

El almidón no es un compuesto homogéneo, sino una mezcla heterogénea de moléculas con una amplia variación de tamaños moleculares. La mayoría están formados por 2 fracciones dife-

rentes, la amilosa y la amilopectina, las cuales pueden separarse una de otra por la adición de sustancias como el butanol, ya que en presencia de éste se forma un complejo cristalino insoluble con la amilosa, mientras que la amilopectina permanece en la dispersión.

La amilosa (Fig. 2) es un polisacárido esencialmente lineal, compuesto de cadenas de residuos de D-glucosa unidas con enlace glucosídico α -1,4 (Melasniemi, 1990).

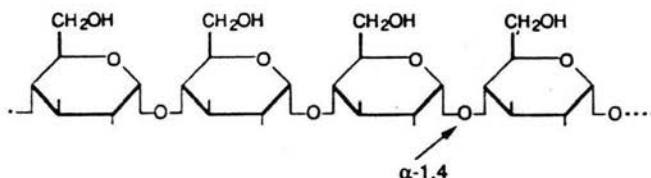


Fig. 2. Estructura de la cadena lineal de las moléculas de amilosa (Melasniemi, 1990).

El grado de polimerización de las cadenas de amilosa varían de 200 a 6000 unidades de glucosa dependiendo de la fuente, pero normalmente van de 1000 a 4400 unidades. Un extremo de la molécula tiene un C-1 hidroxilado (grupo aldehído latente), el cual es llamado extremo reductor.

Por otro lado, la amilopectina (Fig. 3) es una estructura altamente ramificada que consiste de cadenas lineales unidas por enlace α -1,4 conectadas una con otra por enlaces glucosídicos α -1,6 entre el último carbono C-1 de las cadenas y el carbono C-6 dentro de otra cadena. Los residuos de glucosa

en los puntos de ramificación de la amilopectina están 1,4,6-tri-O-substituidos (Norman, 1979; Fogarty, 1980; Vihinen, 1989; Melasniemi, 1990).

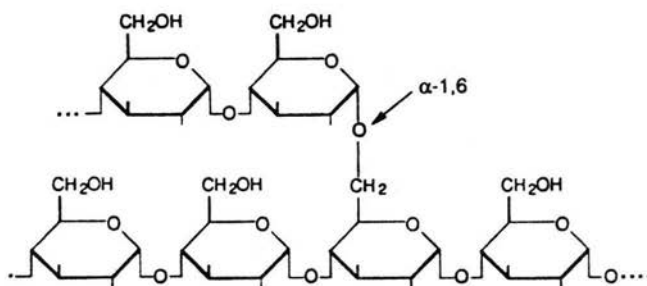


Fig. 3. Estructura de los puntos de ramificación de la amilopectina (Tomado de Melasniemi, 1990).

El grado de polimerización de las unidades de las cadenas lineales en la amilopectina, dependiendo de la fuente, va de 10 a 60. La amilopectina es una de las moléculas más grandes en la naturaleza con un grado de polimerización promedio de más de un millón.

Existen tres tipos de cadenas lineales en la amilopectina (Fig. 4): cadenas A que son aquellas que no llevan ningún sustituyente; las cadenas B que llevan otras cadenas y la cadena C que tiene el único extremo reductor de la molécula (Melasniemi, 1990).

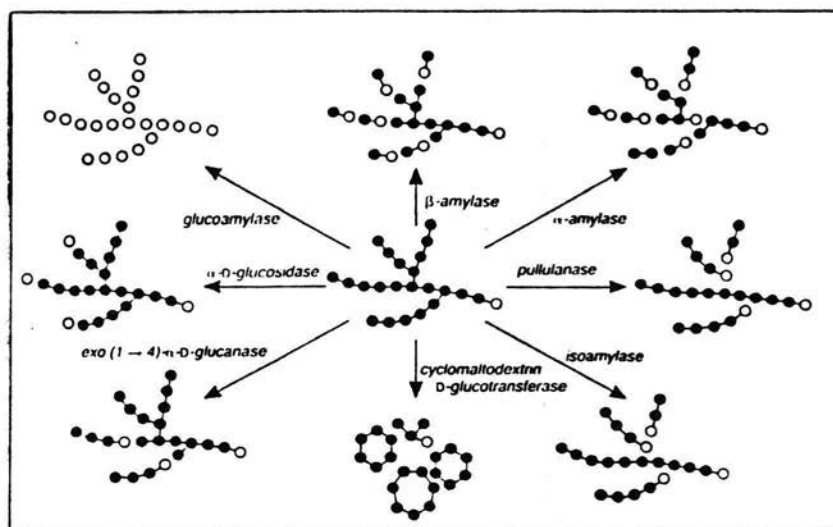


Fig. 4. Modelo diagramático de la amilopectina. Las líneas A, B y C representan diferentes tipos de cadenas lineales (Melasniemi, 1990).

2. Clasificación

Las enzimas amilolíticas con significado comercial de origen microbiano pueden dividirse en las siguientes clases:

2.1. Endo-amilasas

Son generalmente α -amilasas que hidrolizan las uniones α -1,4 y desvían los enlaces α -1,6 en la amilopectina y el glicógeno (Fig. 5).

2.2. Exo-amilasas

Estas enzimas catalizan la hidrólisis sucesiva de productos de bajo peso molecular tales como la glucosa o la maltosa a partir de los extremos no-reductores de la cadena.

a) Amiloglucosidasa (glucoamilasas).

Hidroliza los enlaces α -1,4 y α -1,6 y producen glucosa como producto final del almidón y polímeros relacionados.

b) β -Amilasas.

Hidrolizan los enlaces α -1,4 pero no pueden desviar los enlaces α -1,6 en la amilopectina y el glicógeno.

c) α -Glucosidasas.

Hidrolizan los enlaces glucosídicos α -1,4 y/o 1,6 de oligosacáridos.

d) Otras exo-enzimas.

Hidrolizan los enlaces α -1,4 y no pueden desviar los enlaces α -1,6.

2.3. Enzimas desramificantes

Estas enzimas hidrolizan sólo los enlaces α -1,6

a) Pululanasa

b) Isoamilasa

c) Amilo-1,6-glucosidasa

2.4. Enzimas productoras de ciclodextrinas

Son enzimas que hidrolizan el almidón en una serie de polímeros D-glucosil cíclicos no-reductores llamados ciclodextrinas (Virolle, 1988; Virolle, 1988).

Las enzimas degradadoras de almidón pueden ser clasificadas también en base a los enlaces principales que rompen, ya sea α -1,4 o α -1,6 (Melasniemi, 1990).

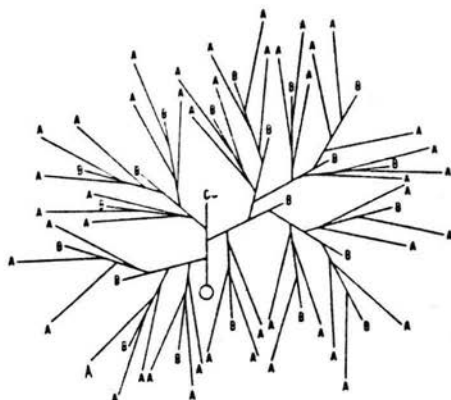


Fig. 5. Degradación de almidón por varias amilasas. (●), residuo no-reductor de glucosa; (○), residuo reductor de glucosa (Melasniemi, 1990).

3. Distribución, propiedades y modo de acción de las amilasas

3.1. ENDO-AMILASAS

A. α -Amilasa

Las α -amilasas (EC 3.2.1.1. 1,4- α -D-Glucan glucanohidrolasa) son endo-enzimas con una amplia distribución en microorganismos. Hidrolizan los enlaces glucosídicos α -1,4 del interior de la cadena en la amilosa, amilopectina y glicógeno. Los enlaces α -1,6 de los puntos de ramificación de la amilopectina no son hidrolizados por la enzima aunque si puede desviarlos. Los productos de hidrólisis formados por las α -amilasas son liberados en una configuración α (Emori, 1990).

Las α -amilasas reducen rápidamente el tamaño molecular del almidón, provocando una reducción rápida de la viscosidad y de la capacidad de tinción con yodo. La hidrólisis prolongada produce normalmente maltosa y maltotriosa y en una etapa final de hidrólisis la maltosa es hidrolizada a maltosa y glucosa (Fogarty, 1980; Melasniemi, 1990).

Las α -amilasas se dividen en dos categorías de acuerdo al grado de hidrólisis del sustrato. Las α -amilasas sacarificantes hidrolizan del 50 al 60% del almidón, mientras que las licueficientes cerca del 30-40% del almidón (Vihinen, 1989). Estas últimas causan una reducción más rápida en la viscosidad del almidón, mientras que las primeras reducen la viscosidad menos rápidamente en relación a la cantidad de grupos liberados. Las α -amilasas licueficientes producen inicialmente dextrinas grandes por un ataque al azar, mientras que las α -amilasas sacarificantes tienen un mecanismo de ataque repetitivo en el que solo uno de los fragmentos formados en el primer encuentro al azar es liberado, mientras que el otro fragmento es reatacado cerca de la nueva terminal formada una o más veces (Vihinen, 1989; Melasniemi, 1990).

Las α -amilasas son enzimas metalo-cálcicas. Contienen al menos un ion de Ca^{+2} por molécula el cual es requerido para la actividad enzimática y la actividad conformacional de la enzima (Melasniemi, 1990). La presencia de iones Ca^{+2} hace a las α -amilasas más resistentes a condiciones desfavorables tales como valores extremos de pH, altas temperaturas, tratamientos con urea o exposición a algunas proteasas. El Ca^{+2}

puede ser removido de las α -amilasas por agentes quelantes como el EDTA.

Metales divalentes tales como el estroncio, bario y magnesio pueden reemplazar la función del Ca^{+2} siempre y cuando la conformación original de la proteína y el sitio activo no sean alterados (Fogarty, 1980). Muchos cationes metálicos, especialmente iones metálicos pesados como cobre, plomo y mercurio; agentes con grupo sulfhidrilo, el EDTA y otros inhiben la acción de las α -amilasas (Vihinen, 1989).

El peso molecular de las α -amilasas varía de 10,000 a 139,000 (Vihinen, 1989); el pH óptimo se encuentra normalmente en la región acídica, en un intervalo que va de pH 4.8 a 6.5. Sin embargo, la mayor estabilidad se da generalmente en un pH cercano a la neutralidad, en el intervalo que va de 5.5 a 8.0 (Fogarty, 1980).

La temperatura óptima de la mayoría de las α -amilasas microbianas conocidas es bastante alta, encontrándose la mayoría en el intervalo de 40-70°C y frecuentemente ésta es más alta que la temperatura óptima de crecimiento de los organismos que las producen (Melasniemi, 1990).

La mayoría de las α -amilasas son enzimas extracelulares, aunque hay algunos microorganismos como *Bacillus* sp. AK-2 que producen enzimas intracelulares. Este género es una rica fuente de α -amilasas así como de otros tipos de amilasas (Vihinen, 1989).

Genética de α -amilasas

Los estudios genéticos sobre la α -amilasa se han llevado a cabo principalmente en el género Bacillus.

El gen que codifica para la α -amilasa, amy E está situado en el cromosoma de B. subtilis en la región 25°. El gen amy E está unido al elemento regulatorio amy R, región que se asocia con las funciones de regulador y promotor de amy E (Vihinen, 1989; Weickert, 1989). La cantidad de α -amilasa producida se ha correlacionado con la cantidad de RNAm por lo que la producción de α -amilasa se regula a nivel transcripcional.

Varios tipos de α -amilasas de B. subtilis han sido clonados y secuenciados (Emori, 1990).

La síntesis de enzimas extracelulares puede ser inducible, parcial o constitutiva dependiendo del microorganismo y de la enzima involucrada. En general, los compuestos que contienen enlaces α -1,4 son inductores efectivos de las amilasas. Las enzimas extracelulares sintetizadas por miembros del género Bacillus parecen ser parcialmente inducibles. Así por ejemplo, la maltotetrosa es el inductor más poderoso de la α -amilasa de B. stearothermophilus y B. licheniformis.

Por otro lado, se ha reportado que la síntesis de α -amilasa en B. subtilis 168 está relacionada con la naturaleza de la fuente de carbono, siendo mayor en medios que contienen lactato o glutamato, pero menor con glucosa que es con la que se obtiene la mayor velocidad de crecimiento. Así también en

B. stearothermophilus y B. subtilis amyloliquefaciens la velocidad de síntesis de α -amilasa está inversamente relacionada con la velocidad de crecimiento del organismo cuando se utilizan almidón, glicerol o glucosa como fuentes de carbono (Fogarty, 1980).

En B. licheniformis se ha reportado que la represión catabólica y la velocidad de crecimiento son los principales factores que controlan la síntesis de amilasa. La formación de la enzima es suprimida por 0.5% de glucosa, efecto que no es revertido por la adición de AMPc. Mutantes de B. licheniformis no son sensibles a la glucosa y no son estimulados por la adición de AMPc (Saito, 1975).

La glucosa reprime la síntesis de α -amilasa en B. subtilis a nivel de transcripción y responde al estado de crecimiento de la célula, así como de la disponibilidad de fuentes de carbono rápidamente metabolizables (Henkin, 1991). La α -amilasa de éste organismo ya sea dentro o fuera de la célula es sintetizada bajo la dirección del mismo gen (Nagata, 1974).

La regulación de la producción de α -amilasa ha sido poco entendida, pero varios fenómenos se relacionan con la regulación, por ejemplo la activación temporal, la represión catabólica, la inducción y la estabilidad del RNAm (Vihinen, 1989).

3.2. EXO-AMILASAS

A. Glucoamilasa

La glucoamilasa (EC 3.2.1.3. 1,4- α -D-Glucan glucohidrolasa) es una exo-enzima que produce D-glucosa por la hidrólisis consecutiva de las uniones α -1,4 del extremo terminal no-reductor de la amilosa, amilopectina y glicógeno. La glucosa liberada tiene una configuración β .

La glucoamilasa es capaz de hidrolizar también las uniones α -1,6 en el almidón, aunque normalmente lo hace a una velocidad menor (Forgarty, 1980). La afinidad de la enzima por su substrato depende de la longitud de la cadena, incrementándose la velocidad de hidrólisis en forma lineal con oligosacáridos mayores a la maltotetrosa.

Las glucoamilasas se encuentran casi exclusivamente en hongos, siendo los principales productores Aspergillus niger y Rhizopus sp. (Norman, 1979).

Los iones polivalentes estimulan la actividad mientras que los iones Cu^{+2} y Ag^{+2} y en menos grado el Ni^{+2} y el Ca^{+2} tienen efectos inhibitorios (Fogarty et al, 1983).

La mayoría de las glucoamilasas tienen una temperatura óptima que cae en el intervalo de 40-60°C y el pH óptimo está en el intervalo ácido que va de 4.5 a 5.0.

Otra enzima, normalmente llamada transglucosidasa (EC 2.4.1.24. 1,4- α -glucan 6- α -glucosiltransferasa) aparece frecuentemente como una impureza en preparaciones de glucoamila-

sa cruda. Esta enzima transfiere residuos glicosil de la posición α -1,4 a la posición α -1,6 produciendo relativamente grandes cantidades de panosa e isomaltosa durante la sacarificación (Melasniemi, 1990).

B. β -Amilasa

La β -amilasa (EC 3.2.1.2. 1,4- α -D-Glucan maltohidrolasa) es una exo-enzima que ataca el penúltimo enlace α -1,4 del extremo terminal no-reductor del almidón para producir maltosa. La amilosa queda convertida casi completamente en maltosa en una configuración β -anomérica. Sin embargo, la enzima no puede hidrolizar los enlaces α -1,6 en la amilopectina ni desviarlos.

La β -amilasa muestra un alto grado de ataque múltiple y en contraste a las α -amilasas endoactivas, las β -amilasas exoactivas producen sólo un ligero decremento en la viscosidad y capacidad de tinción de yodo en las soluciones de almidón, en relación a la cantidad de grupos reductores liberados (Melasniemi, 1990).

Estas enzimas tienen una amplia distribución en plantas superiores. Sin embargo, la β -amilasa ha sido encontrada en algunos microorganismos (Fogarty, 1980).

La mayoría de las β -amilasas microbianas contienen grupos sulfhidrilos esenciales, no requieren iones metálicos para su actividad y algunas son inhibidas por ciclodextrinas. La enzima también es inhibida por iones metálicos pesados como Hg^{+2} , Cu^{+2} y Ag^{+2} (Norman, 1979; Melasniemi, 1990).

El pH óptimo de las β -amilasas microbianas está en el intervalo de pH de 6 a 7.5 y la temperatura óptima está en el intervalo de 37 a 60°C (Melasniemi, 1990).

C. α -Glucosidasa

La α -glucosidasa (EC 3.2.1.20 α -D-Glucosidoglucohidrolasa), conocidas normalmente como maltasa, cataliza la hidrólisis de unidades de glucosa con uniones α -1,4 del extremo terminal no-reductor. Esta enzima actúa preferentemente sobre disacáridos y oligosacáridos que sobre polisacáridos. Los residuos de glucosa liberados por la acción de ésta enzima tienen una configuración α (Norman, 1979; Melasniemi, 1990).

Entre los productores microbianos de α -glucosidasa se encuentran las bacterias, las levaduras y los hongos filamentosos y se producen normalmente junto con otras enzimas amilolíticas (Melasniemi, 1990).

La mayoría son enzimas intracelulares sin embargo, algunas especies producen también la forma extracelular (Vihinen, 1989).

La temperatura óptima de la mayoría de las α -glucosidasas están en el intervalo de 40-55°C y el pH óptimo en el intervalo de 4-7. Su peso molecular varía de 12,000 a 160,000.

Varias α -glucosidasas son activas contra maltosa e isomaltosa, mostrando una actividad inherente α -1,6 como en el caso de las glucoamilasas (Melasniemi, 1990).

Las α -glucosidasas son inhibidas por ciertos carbohidratos como la furanosa, glucosa y iones metálicos pesados.

La isomaltasa (EC 3.2.1.10. dextrin 6- α -D-glucanohidrolasa) es una enzima similar a la α -glucosidasa. Esta enzima degrada sólo los enlaces α -1,6 del extremo no-reductor (Vi-hinen, 1989).

D. Otras exo-amilasas

Las exo- α -glucanasas hidrolizan las uniones α -1,4 cercanas a los extremos no-reductores de moléculas de almidón para producir malto-oligosacáridos de longitud definida y dextrinas límite de alto peso molecular. Los extremos reductores de los productos formados tienen una configuración α .

La exo-amilasa extracelular de Pseudomonas stutzeri produce maltotetrosas a partir de sustratos lineales y ramificados por lo que su acción es sobre el cuarto enlace glucosídico α -1,4 del extremo no-reductor. Tiene un amplio intervalo de pH óptimo que va de 6.5 a 10.5, mientras que la temperatura óptima para la actividad es de 47°C.

Aerobacter aerogenes sintetiza una amilasa productora de maltohexosas a partir del almidón. No es activa sobre ciclo-dextrinas, pululano o maltohexaltol. Una propiedad interesante de ésta enzima es que las β -dextrinas límite son degradadas para producir oligosacáridos ramificados sin embargo, no hidrolizan totalmente la amilopectina a oligosacáridos de bajo peso molecular. El pH óptimo es de 6.8 y la temperatura óptima es de 50°C (Fogarty, 1980).

3.3. ENZIMAS DESRAMIFICANTES

Estas enzimas hidrolizan enlaces α -1,6 en la amilopectina y/o glicógeno y polímeros relacionados.

Se clasifican en 2 grupos:

a) Enzimas desramificantes directas que son las que degradan amilopectinas y/o glicógeno no modificado. Existen 2 tipos de éstas enzimas: la pululanasa y la isomerasa.

b) Enzimas desramificantes indirectas, en las cuales el sustrato debe ser modificado por otra enzima o enzimas antes de que la enzima desramificante indirecta actúe sobre el polímero (Fogarty, 1980). Una de éstas enzimas indirectas es la amilo-1,6-glucosidasa.

3.3.1. **Enzimas desramificantes directas**

A. Pululanasa

La pululanasa (EC 3.2.1.41. α -Dextrin 6-glucanohidrolasa) es una endo-enzima que hidroliza al azar las uniones α -1,6 en el pululano, produciendo inicialmente hexa- y nona-oligosacáridos y finalmente maltotriosa.

Las pululanosas pueden romper los enlaces α -glucano lineal consistente de unidades de maltotriosa unidas por enlaces glucosídico α -1,6. Es un polímero producido por el hongo Aureobasidium pullulans como cadenas grandes compuestas por 480 unidades de maltotriosa (Norman, 1979).

Las pululanosas pueden romper los enlaces α -1,6 tanto de sustratos lineales como de ramificados. El tetrasacárido li-

neal 6²- α -maltosil maltosa es el substrato menor de las pululanasa.

Son producidas por varias bacterias y por plantas. Las pululanasa bacterianas tienen una temperatura y un pH óptimo de alrededor de 50°C y pH 6, respectivamente (Melasniemi, 1990).

La pululanasa se encuentra tanto como una enzima intracelular como extracelular. Su peso molecular varía de 80,000 a 145,000 (Vihinen, 1989).

Algunas pululanasa son estabilizadas por Ca⁺² y algunas son inhibidas por pCMB y algunas por ciclodextrinas (Melasniemi, 1990).

Las isopululanasa (EC 3.2.1.54. pululan 4-glucanohidrolasa) hidrolizan los enlaces glucosídicos α -1,4 del pululano liberando isopanosa como producto principal.

Esta enzima ha sido encontrada en Aspergillus niger y en Arthrobacter globiformis.

Su temperatura óptima es de 30 a 40°C y el pH óptimo es de entre 3.5 y 4 (Vihinen, 1989; Melasniemi, 1990).

B. Isoamilasa

La isoamilasa (EC 3.2.1.68 glicogen 6-glucanohidrolasa) es una exo-enzima que hidroliza a partir del extremo no reductor los enlaces glucosídicos α -1,6 de la amilopectina, glicógeno, varias dextrinas ramificadas y oligosacáridos, más no degrada las uniones α -1,6 del pululano (Vihinen, 1989).

El sustrato más pequeño capaz de ser hidrolizado por la isoamilasa es el 6³- α -maltotriosil-maltotetrosa.

El pH óptimo está en el intervalo de entre 5 y 6.4 mientras que la temperatura óptima generalmente está entre 40 y 52°C (Fogarty, 1980).

3.3.2. **Enzimas desramificantes indirectas**

A. Amilo-1,6-glucosidasa

La amilo-1,6-glucosidasa (EC 3.2.1.33. Dextrin 6- α -D-glucanohidrolasa) es una enzima que remueve residuos de glucosa individuales con uniones α -1,6 unidas a cadenas α -1,4. Estos residuos de glucosa individuales con enlace α -1,6 surgen como resultado de la acción de la 4- α -glucano-transferasa, la cual remueve los residuos de la cadena ramificada a una posición α -1,4 en la otra cadena.

Las amilo-1,6-glucosidasas no son producidas por bacterias, pero sí por levaduras y animales, donde están involucradas en la desramificación del glicógeno (Melasniemi, 1990).

3.4. ENZIMAS PRODUCTORAS DE CICLODEXTRINAS

A. Ciclomaltodextrina glucanotransferasa (CGTasa)

La CGTasa (EC 2.4.1.19. 1,4- α -D-glucan 4- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferasa (ciclizante)) degrada el almidón dando lugar a estructuras ciclicas no-reductoras. Los productos que

contienen 6, 7 u 8 residuos de glucosa unidas con enlace α -1,4 llamados α -, β - y ciclodextrinas son las más comunes.

Estas enzimas han sido encontradas sólo en bacterias, la mayoría en especies del género Bacillus. Son enzimas extracelulares excepto la enzima de B. macerans (Vihinen, 1989; Melasniemi, 1990).

4. Amilasas producidas por organismos del género Streptomyces

En los últimos años han sido clonados los genes que codifican para varias enzimas extracelulares de especies de Streptomyces. Estas incluyen a la endoglicosidasa H, la tirosinasa, la agarasa, la xilanasa y la amilasa.

Algunos de éstos genes proveen material de interés con el cual estudiar la expresión genética en Streptomyces. Además, los genes que codifican para las enzimas extracelulares pueden ser usados para la construcción de vectores de expresión y secreción con el objeto de producir proteínas heterólogas en Streptomyces (Vigal et al, 1991).

El gene de la α -amilasa (amy) de S. griseus IMRU3570 ha sido clonado y secuenciado. El gene amy contiene un marco de lectura abierta (ORF) de 1698 nucleótidos que codifica para una proteína de 566 aminoácidos con un peso molecular de 59,713 Da. Contiene un sitio de inicio de la transcripción de aproximadamente 64 pb hacia arriba del codón de inicio de traducción (ATG) (Vigal et al, 1991).

La secuencia nucleotídica de la región codificadora y regulatoria del gen (*alm*) de *S. limosus* ATCC 19778 ha sido determinada. Los estudios por mapeo S1 de baja resolución sugieren que el gen *alm* se transcribe como un RNAm monocistrónico de 1.8 Kb, pudiéndose originar de un sólo promotor. La secuencia aminoacídica muestra un parecido considerable con las α -amilasas de mamíferos y vertebrados pero no con las de plantas, hongos o con las de origen eubacterial. La secuencia amino-terminal reveló la presencia de un péptido señal típico que precede a la forma madura de la enzima (Long et al, 1987).

La expresión del gene *alm* en *S. limosus* aparentemente es inducida a nivel del inicio de la transcripción por niveles bajos de maltosa o maltodextrinas mientras que el manitol reprime su expresión y la glucosa no tiene efecto. El gen *alm* de éste organismo fué clonado en *S. lividans* y en *S. coelicolor* A3(2), cepas en las que la producción de la amilasa si es reprimida por la glucosa. El gene *alm* de *S. limosus* clonado en éstas cepas también fué inducido por maltosa o maltotriosa. La longitud del transcrito de *alm* fué de 1.8 Kb y el tamaño de 59 KDa, lo que sugiere que *alm* se transcribe como un RNAm monocistrónico (Virolle, 1988).

El gene que codifica para la α -amilasa de *S. griseus* IMRU 3570 también ha sido clonado en *S. lividans*. Este gen contiene un marco de lectura abierta de 1,698 nucleótidos que codifican a una proteína de un peso molecular de 59,713 Da. *S. griseus* es una especie conocida por sobreproducir varias

enzimas extracelulares y en ella se ha detectado la producción de 2 amilasas diferentes, una de 57 KDa y la otra de 50 KDa. Ambas amilasas mostraron la misma secuencia aminoacídica N-terminal, lo que sugiere que las 2 amilasas se forman de un sólo gen. Asimismo se encontró que ésta α -amilasa es procesada en el citoplasma (García-González, 1991).

El gen (amy) que codifica para la síntesis de la α -amilasa de S. hygrosopicus SF-1084 que es usada industrialmente para hidrolizar el almidón a maltosa, ya ha sido aislado y clonado en S. lividans. La secuencia nucleotídica de amy codifica a una proteína de 52 KDa (478 aminoácidos). La secuencia líder de 30 residuos mostró similitudes con los encontrados en otros procariontes sin embargo, el promotor amy no fue similar al de la secuencia consenso encontrada en éstos organismos, asimismo se localizaron al menos 2 sitios puntuales de la transcripción (Hoshiko, 1987).

Por otro lado, en S. hygrosopicus se obtuvieron mutantes desreguladas para la formación de amilasa y de α -glucosidasa por medio de un tratamiento mutagénico seguido por cambios mutuos de nutrientes entre un medio con casaaminoácidos y otro con maltosa/ NH_4^+ (Gräfe et al, 1986).

5. Aplicaciones de las amilasas

Las aplicaciones comerciales de las amilasas son numerosas. La conversión del almidón en productos como azúcares, jarabes y dextrinas forman la parte más importante del procesamiento del almidón. Estos hidrolizados son usados como fuentes de carbono en fermentaciones, como fuentes de dulces y también por sus características físicas en la manufactura de productos alimenticios y de bebidas.

La preparación de hidrolizados de almidón utilizando a las amilasas como catalizadores ha reemplazado en gran parte a las hidrólisis en las que se utilizaba ácido como catalizador. La degradación enzimática del almidón tiene varias ventajas sobre el proceso ácido. Estas son que se obtiene una menor formación de productos secundarios, que las enzimas son más específicas y que por tanto se obtiene un mayor rendimiento. Cada uno de los procesos de la producción de hidrolizados involucra primero la licuefacción del almidón y segundo la sacarificación del producto adelgazado con la enzima deseada (Fogarty, 1980).

Las α -amilasas producen jarabes con alto contenido de maltosa, los cuales tienen muchas aplicaciones en la industria alimenticia por su reducida tendencia a cristalizarse y a hidratarse. Son útiles también en la manufactura de caramelos macizos y para la elaboración de postres helados, así como en la industria del horneado (Norman, 1979).

Las α -amilasas se usan también en la producción de adhesivos, farmacéuticos, detergentes, textiles y papel de revestimiento. Además se utiliza como alimento animal, en la industria de bebidas alcohólicas y del alcohol industrial, en el tratamiento de aguas sucias, etc. (Fogarty, 1980).

Asimismo se utilizan para remover almidón de extractos de fruta, para clarificar la turbidez por almidón en vinos, cervezas y jugos de fruta (Frazier, 1967).

En adición a su importancia como enzimas industriales, las α -amilasas y sus genes son de interés en investigación básica (Virolle y Bibb, 1988).

Las β -amilasas son usadas en la producción de jarabes de maltosa, en la industria del horneado y en la destilación, así como adjunto de fermentaciones para la elaboración de cervezas (Norman, 1979; Fogarty, 1980).

La producción mundial de enzimas amilolíticas en 1977 fué estimada en 610 toneladas de proteína pura, de las cuales 300 tons corresponden a amiloglucosidasa, 300 tons a amilasas bacterianas y 10 tons a amilasas fungales (Fogarty, 1980).

En México específicamente las importaciones de amilasas, proteasas y mezclas de proteasas para el año 1990 tomadas hasta Septiembre tuvieron un valor comercial total de \$663,372.00, siendo un volúmen total de 74,905.4 Kgs (INFOTEC).

VI. OBJETIVO

Estudiar la regulación por fuentes de carbono sobre la síntesis de amilasa por medio del aislamiento de mutantes insensibles a represión catabólica en Streptomyces kanamyceticus.

VII. MATERIALES Y METODOS

1) Microorganismos

El microorganismo que se utilizó durante el desarrollo de éste trabajo fué Streptomyces kanamyceticus ATTC 12853.

Tanto la cepa silvestre como las mutantes fueron mantenidas sobre medio completo (MC), que contiene por litro: 4 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de malta, 4 g de glucosa y 15 g de agar a un pH de 7. Asimismo, fueron mantenidas en tubos eppendorf con extracto de levadura y extracto de malta en las mismas concentraciones anteriores más glicerol al 20%, los cuales se mantuvieron en congelación.

También se utilizó a Bacillus subtilis ATTC 6633 como microorganismo prueba para la detección de kanamicina.

Condiciones de cultivo

Los microorganismos fueron crecidos en medio mínimo (MM), que contiene por litro: 5.1 g de NaNO_3 , 1 g de KH_2PO_4 , 0.4 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.00125 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0025 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5.7 g de amortiguador TES, 20 g de almidón soluble de papa en el caso de MM/Alm y 20 g de agar, a un pH de 7.2.

En todos los casos 100 ml de MM contenidos en matraces Erlenmeyer de 500 ml fueron inoculados con la misma concentración de micelio, el cuál fué precrecido en MC durante 24-48 horas a 29° C y 200 rev.min.⁻¹. Se tomaron muestras de 5 ml cada 24 horas por 5 días para la medición de crecimiento, actividad de amilasa y pH.

2) Selección de fuentes de carbono represoras

Las fuentes de carbono probadas fueron sacarosa, glicerol, galactosa, piruvato, succinato y glucosa.

Se crecieron colonias aisladas de la cepa silvestre de *S. kanamyceticus* sobre cajas con MC más la fuente de carbono a probar en concentraciones desde 1 hasta 10%. Una vez crecidas se sacaron las colonias aisladas con un sacabocados y se pusieron sobre cajas con MM/Alm más la fuente de carbono probada en la misma concentración usada en el MC. Se mantuvieron en frío por una hora y se incubaron a 29°C por un promedio de tres días para poder detectar halos de hidrólisis del almidón alrededor de los cilindros. Por otro lado, las colonias crecidas en MC se pasaron con un sacabocados a cajas preparadas para antibiosis, se difundieron en frío por 24 horas y se incubaron por el mismo tiempo a 29°C para detectar halos de inhibición de crecimiento del organismo prueba.

3) Actividad de α -amilasa

La actividad de la enzima α -amilasa se llevó a cabo por medio de la medición de azúcares reductores liberados de un sustrato polimérico (almidón), con la subsecuente reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para determinar espectrofotométricamente el grado de actividad enzimática, según la metodología descrita por Bernfeld, 1955.

Como sustrato de la reacción se utilizó una mezcla de una solución de almidón soluble al 1% y de un amortiguador PO_4^{-3} , que se prepara ajustando una solución de K_2HPO_4 0.01 M con otra solución de KH_2PO_4 de la misma molaridad, hasta tener un pH de 7.0.

El reactivo DNS contiene por litro: 14 g de NaOH, 7.6 g de 3,5 DNS (hidratado 0.8%), 216 g de tartrato de Na y K, 5.4 g de fenol y 5.9 g de metabisulfito de sodio.

Las muestras de fermentación fueron centrifugadas por 10 minutos a $3,500 \text{ rev. min.}^{-1}$ para separar el micelio del sobrenadante. Para llevar a cabo la reacción se mezclaron 1 ml de amortiguador con 1 ml de solución de almidón. Se incubaron con agitación en un baño maría a 55°C por 5 minutos y se le agregó 1 ml de sobrenadante para iniciar la reacción. Se tomaron muestras de 0.2 ml al tiempo cero y a los 120 min, las cuales se pusieron en tubos que tenían 1.8 ml de agua destilada más 3 ml de reactivo DNS.

Los tubos fueron agitados y hervidos en baño maría por 5 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se lle-

varon al volúmen final de 20 ml con agua destilada, se agitaron en el vórtex y se leyeron en un espectrofotómetro Bausch & Lomb a 550 nm.

Se utilizó una solución estándar de maltosa (1 mg/ml) para hacer la curva estándar que va de 0 a 2.92 $\mu\text{m}/\text{ml}$.

Una unidad de actividad enzimática fué definida como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de azúcar reductor/min/ml de muestra de enzima.

4) Efecto del pH sobre la actividad de la amilasa

Se utilizó el sistema ya descrito para la determinación de la actividad de la enzima, variando el pH de la reacción desde 6 hasta 8.

El tiempo de reacción fué de 30 min a una temperatura de 40°C.

5) Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima

La variable introducida al sistema fué la temperatura, variándose de 30 a 70°C.

El tiempo de reacción fué de 10 min a un pH de 7.0.

6) Efecto del tiempo de reacción y del Ca^{+2} sobre la actividad de la enzima

Se probaron diferentes tiempos de reacción desde 5 hasta 120 min tanto para una mezcla de reacción a la que se le adicionó Ca^{+2} a una concentración de 10 mM, como para una mezcla de reacción normal.

La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 55°C y a un pH de 7.0.

7) Análisis de productos de hidrólisis

Para la obtención de los azúcares producidos por la enzima amilasa, se mezclaron 2 ml de solución de almidón con 2 ml de amortiguador PO_4^{-3} , se incubaron en un baño maría y se le agregaron 2 ml de sobrenadante para iniciar la reacción. El sobrenadante seleccionado para la reacción provenía de un caldo de cultivo de 48 horas de fermentación.

Se tomaron muestras de 0.5 ml de la mezcla de reacción desde tiempo cero hasta 120 min. La reacción se detuvo añadiendo 0.5 ml de acetonitrilo. Las muestras fueron centrifugadas para separar el sobrenadante de los sólidos por 15 min a 4,000 rev.min.⁻¹.

Para la cromatografía en placa fina (TLC) se utilizaron placas de silicagel 60 con un espesor de capa de 0.25 mm. Se

aplicaron 15 μ l de cada muestra. El sistema de solventes utilizado fué butanol:etanol:H₂O (5:3:2).

Como sistema revelador se utilizó metanol:H₂SO₄: vainillina (9:1:0.5%). Una vez preparado se dejó reposar por 24 horas, después se filtró con fibra de vidrio y se asperjó sobre la placa. Se dejó unos minutos en una estufa a aproximadamente 70°C. Como control se utilizó una mezcla de 1 μ l de una solución de glucosa al 5% más 2 μ l de una solución de maltosa al 1%.

Para el análisis en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se tomaron 250 μ l del sobrenadante obtenido previamente, se pusieron en eppendorfs, se congelaron con hielo y acetona y se concentraron en un SpeedVac Concentrator SVC100H por aproximadamente una hora. Una vez secas las muestras se restituyó su volúmen a 100 μ l con agua destilada. El volúmen de inyección al aparato fué de 30 μ l por muestra.

El equipo utilizado para el HPLC fué un sistema de bombeo programable Waters-Millipore modelo 590, un inyector universal U6K, una columna para análisis de carbohidratos Waters-Millipore 4.6*300 mm, un detector de índice de refracción modelo 401 Waters-Millipore y un integrador Varian 4400.

La fase móvil fué acetonitrilo:H₂O (80:20), el flujo de 1.5 ml/min, atenuación 8x. Los estándares usados fueron glucosa Difco (5 mg):maltosa Baker (5 mg), 1:1, inyectándose un volúmen de 50 µl.

8) Detección de la producción de kanamicina

El antibiótico se detectó por bioensayo según la metodología reportada por Ichikawa et al (1971), utilizando a Bacillus subtilis ATCC 6633 como organismo prueba. Como estándar se usó kanamicina comercial Sigma.

B. subtilis fué crecido sobre cajas con medio de anti-biósisis por 24 horas a 29°C. Este medio contiene por litro 6 g de peptona, 3 g de extracto de levadura, 1.5 g de extracto de carne, 4 g de digerido pancreático de caseína, 1 g de glucosa y 1.5 g de agar en amortiguador de PO₄⁻³ 0.01 M pH 8. Un matraz con 20 ml de medio de antibiósisis líquido fué inoculado con una asada del microorganismo crecido sobre las cajas e incubado por 24 horas a 29°C con agitación. Se tomó 1 ml de muestra del cultivo y se completó a 5 ml con agua destilada para medir la densidad óptica (D.O) en un espectrofotómetro a 580 nm. El cultivo anterior de Bacillus se inoculó al medio de antibiósisis a tener una relación de 0.409 de D.O. por cada 100 ml de medio, para posteriormente vaciarse a cajas petri de plástico estériles de 100 x 15 mm, poniendo 15 ml por caja.

Las colonias aisladas de *S. kanamyceticus* de las que se deseaba probar su producción de antibiótico fueron extraídas con un sacabocados. Los cilindros con las colonias se pusieron sobre las cajas de antibiosis preparadas previamente, se mantuvieron en frío por 24 horas para que difundiera el antibiótico y se incubaron a 29°C por 24 horas.

9) Mutagénesis

De una cepa silvestre de *S. kanamyceticus* de 2 ó 3 días de crecida en placa en MC, se tomaron 2 asadas y se inocularon en 50 ml de MC líquido. Se dejó incubando de 24-48 horas a 29°C con agitación (200 rev.min.⁻¹). De ese cultivo se pasaron 3 ml a un matraz de 125 ml que contenía 25 ml del mismo medio anterior y se incubó por otras 24 horas para tener al organismo en fase exponencial de crecimiento.

El micelio fué separado del sobrenadante por centrifugación (10 min a 4,000 rev.min.⁻¹), lavado 2 veces con NaCl 0.85% y resuspendido en 30 ml de MM. Se homogenizó para tomar una muestra de 5 ml para hacer diluciones y platear en cajas con MC (0.5 ml de muestra más 4.5 ml de glicerol al 20%) para tener un control.

Se preparó una solución de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) a una concentración final de 0.1 mg/ml, la cual se agregó al matraz con el micelio. Se dejó incubando

con agitación a 29°C durante 15 horas, después de las cuales el micelio fué lavado 2 veces con NaCl 0.85% para después resuspendirse en 15 ml de MM. Se tomó otra muestra de 5 ml para hacer diluciones y plaquear.

A los 10 ml restantes de MM se le agregó una solución de NTG a una concentración de 5 mg/ml. Esta mezcla se dejó incubando una hora con agitación, después de la cual el micelio se lavó 2 veces más con NaCl y después con una solución de cisteína al 0.1%.

El micelio mutagenizado se resuspendió en MC con glicerol para de ahí hacer diluciones y plaquear sobre cajas con medio completo más la fuente de carbono seleccionada, en la concentración represora.

10) Selección de mutantes

Las colonias mutagenizadas que se crecieron en forma aislada sobre cajas con MC más la fuente de carbono represora fueron probadas tanto para la producción de kanamicina como para la de amilasa por medio de la detección de halos de inhibición del crecimiento de Bacillus, así como de halos de hidrólisis de almidón. Para ello, se pasaron cilindros de agar con las colonias aisladas a cajas con medio de antibiósisis y a otras con MM/Alm más la fuente de carbono seleccionada en concentración represora.

11) Medición de crecimiento

A partir de 5 ml de muestra se separó el micelio del sobrenadante por centrifugación y se lavó 2 veces con H₂O y se resuspendió en 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Se dejó reposar el micelio toda la noche en frío con TCA y posteriormente se centrifugó durante 10 min a 4,000 rev.min.⁻¹. El sedimento fué resuspendido en 0.4 ml de NaOH 0.4 M y agitado en un vórtex. La concentración de proteína se determinó por el método reportado por Lowry et al., 1951.

La curva estándar se corrió al mismo tiempo que las muestras y se preparó utilizando albúmina sérica bovina (Sigma). Los resultados se reportan como mg de proteína por ml de medio.

NOTA DE PRESENTACION:

Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado. Los datos que se presentan son la media de los tres valores. Las desviaciones estándar obtenidas fueron ± 0.002 mg/ml para la concentración de proteínas y ± 0.005 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$ para la actividad enzimática.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSION

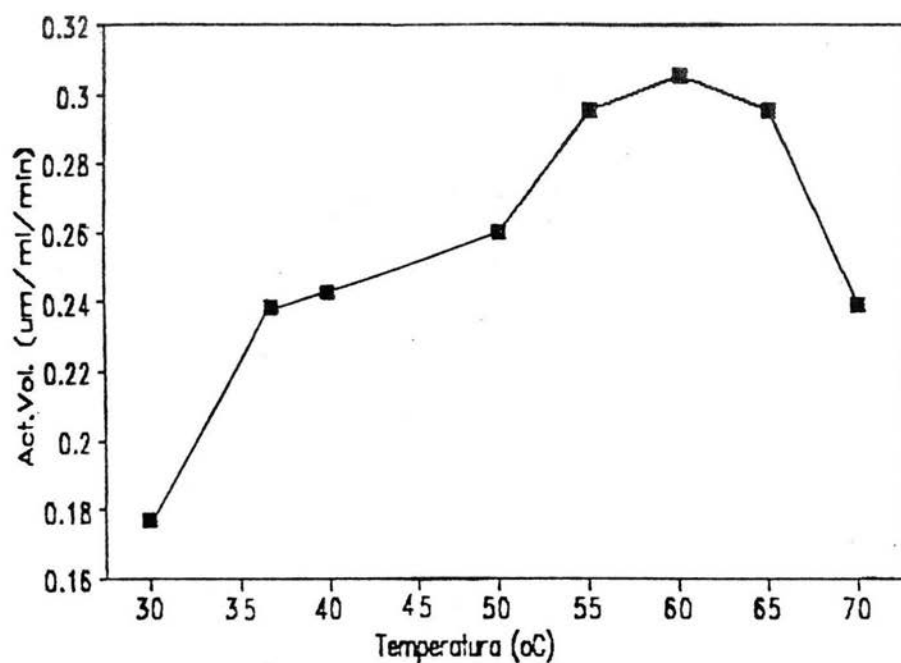
PROPIEDADES DE LA AMILASA DE Streptomyces kanamyceticus

Efecto del pH y de la temperatura

Para determinar el efecto del pH sobre la actividad enzimática se cuantificaron los azúcares reductores liberados en la mezcla de reacción bajo diferentes valores de pH (de 6.0 a pH 8.0). Los resultados mostraron que la enzima mantuvo su actividad en los diferentes pH probados en los 10 min que duró la reacción. Este rango de pH en el que la enzima mostró actividad coincide con el intervalo reportado por Fogarty (1980) para las α -amilasas, ya que éste va de pH 5.5 a un pH de 8.0. El pH al que se decidió trabajar en los experimentos posteriores fué a un pH de 7.0 que es el pH que se ha utilizado para medir la actividad de la amilasa en varios organismos del mismo género y que además queda comprendido dentro del intervalo de pH probado como estable.

En cuanto al efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima, se observó que ésta tendió a incrementarse conforme aumentó la temperatura hasta los 60°C (Fig. 6). A 30°C la actividad registrada fué de 0.18 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$ mientras que a 60°C la actividad casi se duplicó ya que se obtuvo 0.3 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$, que fué la máxima actividad medida. En el rango de 55 a 65°C las variaciones en la actividad enzimática fueron muy pequeñas. Sin embargo, con 70°C, se observó un decremento im-

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA AMILASA



— pH 7.0 - 10 'reac.

Fig. 6.

portante en la actividad, mostrando aproximadamente el mismo valor que el obtenido a 40°C. Así, aunque la temperatura de crecimiento de *Streptomyces kanamyceticus* es de 30°C, la enzima mostró una mejor actividad en el intervalo de 55 a 65°C.

Frecuentemente la temperatura óptima de las α -amilasas son mayores que la temperatura óptima de crecimiento de los organismos que las producen y que éste rango de mayor actividad frecuentemente es entre los 40 y 70°C (Melasniemi, 1990).

Efecto de los iones Ca^{+2} y del tiempo de reacción

Debido a que se ha reportado que las α -amilasas son enzimas metalo-cálcicas y que por tanto requieren los iones Ca^{+2} para la actividad enzimática y la estabilidad conformacional de la enzima (Fogarty, 1990), se probó el efecto de éstos iones sobre la enzima que produce *S. kanamyceticus*. Los resultados se muestran en la Fig. 7 y se puede observar que la presencia de los iones Ca^{+2} en la mezcla de reacción a una concentración de 10 mM permitieron un aumento de la actividad de la enzima en todos los tiempos probados (de 5 a 120 minutos de incubación), en comparación con la obtenida en ausencia de éstos iones.

En cuanto al tiempo de incubación se observa una relación lineal entre la actividad de la enzima y el tiempo a partir de los 30 min de incubación, sobretodo en presencia de iones Ca^{+2} . La actividad en los primeros 30 minutos de incu-

EFFECTO DEL Ca^{++} SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA AMILASA

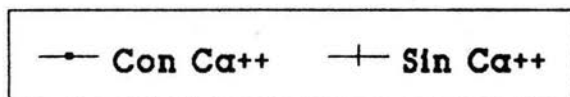
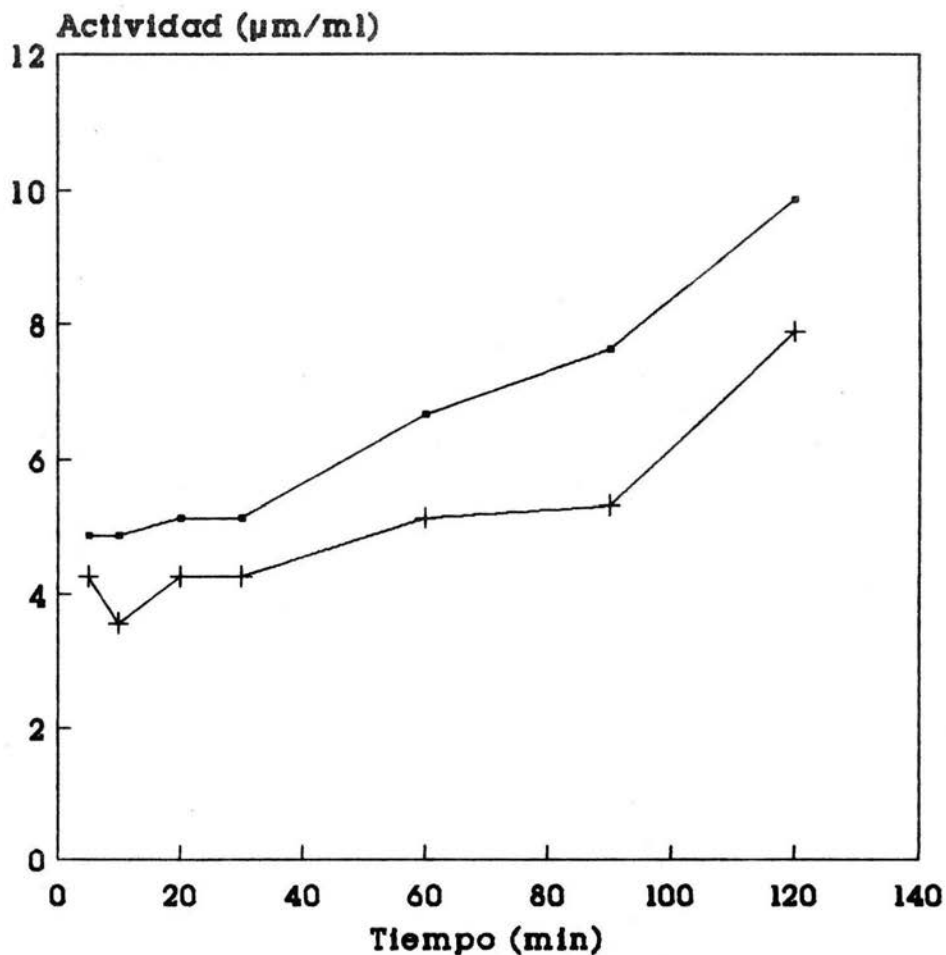


Fig. 7 pH 7.0 y 55 C

bación en presencia de Ca^{+2} se mantuvo alrededor de $5 \mu\text{m/ml}$, mientras que sin Ca^{+2} se observaron mayores fluctuaciones de la actividad en todos los tiempos.

Bajo estas condiciones en los primeros 30 min la actividad se mantuvo alrededor de los $4 \mu\text{m/ml}$, por lo que se observa que si bien las diferencias en cuanto a actividad no fueron muy significativas en los primeros 30 minutos en presencia o ausencia de iones Ca^{+2} , si se observó una mayor estabilidad de la enzima en presencia de éstos iones.

Después de 30 min de incubación, se observó que a medida que el tiempo de incubación aumentó las diferencias en la actividad enzimática se hicieron más significativas y asimismo el efecto del Ca^{+2} se hizo más notorio, sobretodo de los 90 a los 120 min, ya que la actividad en estas condiciones a los 90 min de incubación fué de $7.8 \mu\text{m/ml}$, mientras que en ausencia de iones Ca^{+2} fué de $5.3 \mu\text{m/ml}$. A los 120 min de incubación y en presencia de Ca^{+2} se obtuvo la mayor actividad ($9.9 \mu\text{m/ml}$), mientras que sin Ca^{+2} a éste mismo tiempo se obtuvo $7.9 \mu\text{m/ml}$.

Debido a que a los 120 min de incubación en presencia de Ca^{+2} se obtuvo la mejor actividad enzimática y que la temperatura óptima de la enzima está entre los 55 y 65°C , se decidió trabajar en los experimentos posteriores a 55°C , ya que la actividad dentro de éste intervalo de temperatura no mostró variaciones significativas y de esta manera se evitó la exposición de la enzima a una temperatura mayor por un período prolongado de tiempo, ya que la incubación por 2 horas a

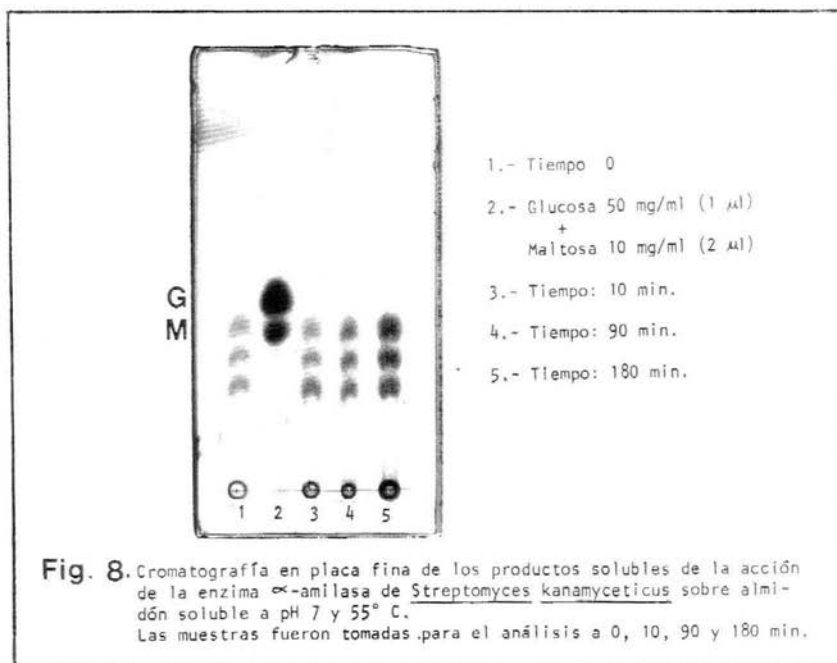
más de 55°C podría provocar la desnaturalización de la enzima.

La presencia de los iones Ca^{+2} en la reacción es importante ya que se ha reportado que en presencia de éstos las α -amilasas no solo son más resistentes a valores extremos de temperatura, sino que también a los de pH, al tratamiento con urea o a la exposición a otras proteasas (Melasniemi, 1990).

Hidrólisis del almidón

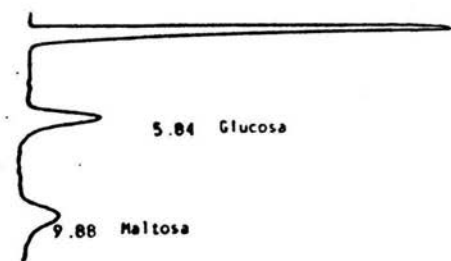
Para determinar cuales eran los compuestos producidos por la acción de la enzima sobre el almidón soluble, se realizó una cromatografía de placa fina (Fig. 8) la cual mostró 3 manchas principales en todos los carriles, incluyendo al que corresponde al tiempo cero (carril 1), por lo que se parte de que en el medio estaban ya presentes estos oligosacáridos aunque en poca cantidad y que éstos se siguieron formando a medida que aumentó el tiempo de incubación.

Una de las manchas detectadas presentó un valor de R_f de 0.35, el cual coincidió con el obtenido para el estándar de maltosa utilizado (carril 2). Las otras 2 manchas detectadas por abajo de la que correspondió a la de maltosa, se sugiere que sean oligosacáridos tales como maltotriosas y maltotetrosas. Todas estas manchas comenzaron a hacerse un poco más fuertes a partir de los 10 minutos de incubación (carril 3) y se intensificaron a los 90 y 120 min, por lo que la maltosa junto con los otros maltooligosacáridos que se observan pare-

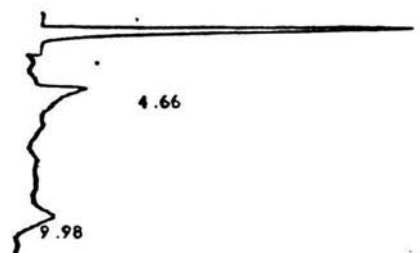


cen ser los principales productos de hidrólisis de la α -amilasa de *S. kanamyceticus*. Sin embargo, también es posible distinguir otra mancha aunque más difusa que las otras a partir de los 90 min de incubación (carril 4) y se hace un poco más notoria a los 180 min (carril 5). El valor de Rf de ésta mancha fué de 0.43, el cual corresponde al Rf que presentó el estándar de glucosa, por lo que la glucosa es otro de los productos finales de la hidrólisis de la α -amilasa, aunque en menor proporción que lo es la maltosa y los maltooligosacáridos. La presencia de glucosa se puede deber sin embargo, a la acción de una maltasa ó a la hidrólisis no enzimática de la maltosa por temperatura.

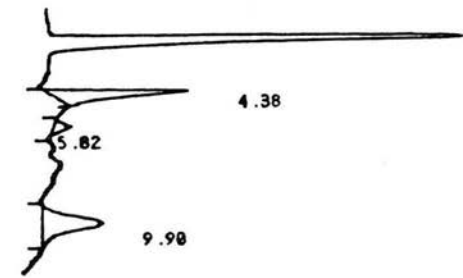
Estos resultados de la cromatografía en placa fina se confirman con los obtenidos con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que se muestra en la Fig. 9, ya que desde el tiempo cero se detectó un pico con un tiempo de elución de 9.98 que corresponde con el estándar de maltosa, pico que se incrementó con el tiempo de incubación. Asimismo se detectó otro pico con un tiempo de elución de 5.84 que corresponde con el estándar de glucosa sin embargo, éste apareció a partir de las muestras de 60 minutos de incubación y sólo se incrementó ligeramente en los demás tiempos. Los maltooligosacáridos que se observan en la cromatografía en placa fina no son detectados por HPLC debido a que el tipo de análisis que se utilizó sólo permite detectar mono- y disacáridos no obstante, es posible distinguir otro pico desde el tiempo cero y seguir su incremento hasta los 180 minutos de la incubación. Si se compara el tiempo de elución de éste pico (4.4 minutos) con los reportados para éste tipo de cromatografía se podría sugerir a que carbohidrato corresponde sin embargo, es necesaria la presencia de estándares que nos permitan confirmar su presencia, como se hizo con la maltosa y la glucosa, carbohidratos de los que se deseaba seguir su producción.



Estándares 50 μ l
 Glucosa:Maltosa
 5 mg:5 mg

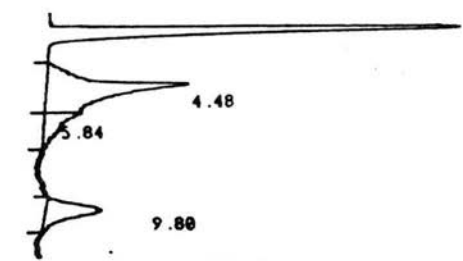


Control. Tiempo cero. Inyección 30 μ l

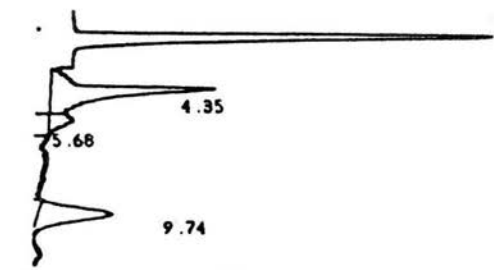


Columna: Carbohydrate Analysis
 Waters-Millipore 4.6 \times 300mm
 Detector: Índice de refracción
 Mod.401 Waters-Millipore
 Integrador: Varian 4400
 Fase móvil: Acetonitrilo:H₂O
 60:20, flujo 1.5 ml/min,
 atenuación 8x

Tiempo de reacción: 60 min.



Tiempo de reacción: 120 min.



Tiempo de reacción: 180 min.

Fig. 9. Análisis de carbohidratos producidos por la acción de la enzima α -amilasa de *S. kanamyceticus* sobre su sustrato a diferentes tiempos de reacción por HPLC.

Comparando algunas de las propiedades de la α -amilasa de Streptomyces kanamyceticus con las de otros microorganismos que las producen, se pueden detectar similitudes:

La enzima producida por S. thermoviolaceus presenta varias características en común con la de S. kanamyceticus; su pH óptimo es de 7.2, requiere de iones Ca^{+2} para tener termoestabilidad, su temperatura óptima es de 55°C y el producto de hidrólisis de la enzima producida por éste organismo es la maltosa (Goldberg, 1990).

S. precox NA-273 produce también una α -amilasa extracelular cuyo pH óptimo está entre 6.0 y 7.0, aunque presenta estabilidad en un rango de pH de 6.0 a 8.0. La temperatura óptima para su actividad es a 40°C y su producto principal de hidrólisis es la maltosa.

Otra α -amilasa que muestra características semejantes es la producida por S. hygrosopicus SF-1084, la cual tiene un pH óptimo de entre 5.0 y 6.0 y una temperatura óptima de 55°C. La presencia de iones Ca^{+2} tiene un efecto estabilizador sobre la enzima y su producto principal de hidrólisis es la maltosa (Vihinen, 1989; Goldberg, 1990).

Otros Streptomycetos en los que los iones Ca^{+2} tienen un efecto activador o estabilizador sobre las α -amilasas que producen son en S. microflavus 3332, S. griseus 4, S. diastaticus 3315 y S. cellulosae 3313 (Vihinen, 1989).

La α -amilasa producida por Micrococcus varians, también de importancia industrial, muestra una mayor actividad en presencia de cationes divalentes como Ca^{+2} o Mg^{+2} y a una

temperatura de 55°C, siendo que la temperatura de crecimiento del organismo es a 30°C. El pH óptimo para la actividad de ésta enzima es pH 7.0 (Adeleye, 1990).

También *M. halobius* ATCC 21727 produce una α -amilasa extracelular cuyo pH óptimo está entre 6.0 y 7.0 y cuya temperatura óptima varía de 50 a 55°C, siendo que la temperatura de crecimiento óptima del organismo es a 30°C. La enzima es de tipo metalo-cálcica.

La α -amilasa producida por *Bacillus subtilis* G63, produce maltotriosa como producto final de hidrólisis y tiene un pH óptimo de entre 6.0 y 7.0, mientras que la temperatura óptima de la enzima es a 50°C. El organismo tiene una temperatura óptima de crecimiento de 30°C.

B. circulans produce asimismo una α -amilasa extracelular cuyo pH óptimo es de 7.0. La temperatura óptima para la actividad de la enzima es 50°C, aunque el organismo crece mejor a 30°C. Produce maltotetrosa y maltopentosa como productos finales y la presencia de iones Ca^{+2} estabiliza la reacción.

La α -amilasa producida por *Acinetobacter* sp. 204-1 es de tipo extracelular. El pH óptimo para su actividad enzimática es a 50-55°C y el pH óptimo es a 7.0. La temperatura de crecimiento del organismo es a 30°C (Vihinen, 1989).

SELECCION DE FUENTES DE CARBONO REPRESORAS

Uno de los métodos usados actualmente para aislar mutantes insensibles a represión catabólica por fuentes de carbono es por medio de la utilización de análogos de esa fuente de carbono en una concentración mínima inhibitoria y en presencia de una fuente de carbono alternativa, debido a que el análogo es capaz de activar el sistema de represión catabólica sin ser metabolizado, por consiguiente el microorganismo no puede utilizar la fuente de carbono alternativa a menos que éste haya perdido sus sistemas de represión de la fuente de carbono utilizada y/o la habilidad de transportar al inhibidor. Así por ejemplo, en Streptomyces coelicolor se han aislado mutantes cuya especie parental es incapaz de crecer en un medio con 100 mM del análogo de glucosa 2-Deoxi-D-glucosa (2-DOG), usando arabinosa y glicerol como fuentes de carbono alternativas (Hodgson, 1982). Sin embargo, en S. kanamyceticus no fué posible la selección de mutantes por éste método debido a que la 2-DOG no reprimió la utilización de las fuentes de carbono alternativas utilizadas (lactosa y almidón), aun cuando se utilizó una concentración de hasta 300 mM de 2-DOG, que es el triple de la concentración utilizada con S. coelicolor. Asimismo se probaron otros 2 análogos de la glucosa, la 3-Metil-D-glucosa y la Metil- α -D-glucopiranosido en concentraciones de hasta 250 mM y 500 mM respectivamente, sin que se observaran efectos represores. Debido a és-

to se decidió realizar la selección de mutantes por el método tradicional. Para ello se probaron diversas fuentes de carbono en concentraciones de hasta 10% para determinar cuales reprimían la síntesis de los metabolitos seleccionados (amilasa y kanamicina) en la cepa silvestre de *S. kanamyceticus* así como la concentración represora para así crecer las colonias mutagenizadas sobre éstos medios y poder detectar aquellas colonias productoras de kanamicina y/o amilasa bajo éstas condiciones.

De las 6 diferentes fuentes de carbono probadas en fermentación sólida (sacarosa, glucosa, galactosa, glicerol, piruvato y succinato), sólo la glucosa y el glicerol fueron las que reprimieron la producción de amilasa y de kanamicina.

Las concentraciones que reprimieron la producción de la amilasa fueron 4% de glucosa y 2% de glicerol (Tabla 1), mientras que las concentraciones que reprimieron la producción de kanamicina fueron 2% de glucosa y 5% de glicerol. Estas concentraciones se determinaron en base a la formación o no de halos de inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis* para el caso del antibiótico, así como de halos de hidrólisis del almidón en la enzima. Las otras fuentes de carbono probadas no mostraron reprimir la producción de éstos metabolitos aun estando en concentraciones de hasta 10%.

Fuente de carbono seleccionada	Amilasa	Kanamicina
Glucosa	4 %	2 %
Glicerol	2 %	5 %

Tabla 1. Fuentes de carbono seleccionadas por su capacidad de reprimir la producción de amilasa y de kanamicina en fermentación sólida.

Se sabe que generalmente las fuentes de carbono que soportan una velocidad de crecimiento rápida como la glucosa, son las más efectivas en provocar la represión catabólica de ciertas enzimas (Gallo and Katz, 1972; Wang, 1979).

En la Tabla 2 se observan la gran cantidad de metabolitos secundarios cuya producción es reprimida por la glucosa, incluyendo a la kanamicina y en la Tabla 3 se muestran algunas de las enzimas que son reprimidas catabólicamente por la glucosa y otras fuentes de carbono.

Metabolito secundario	Organismo
Novobiocina	<u>Streptomyces niveus</u>
Actinomicina	<u>S. antibioticus</u>
Bacitracina	<u>S. parvulus</u>
Benzodiacepinas	<u>Bacillus licheniformis</u>
Cefalosporina	<u>Cephalosporium achremonium</u>
Cloranfenicol	<u>Streptomyces sp.</u>
Eritromicina	<u>Sacharopolyspora erythaea</u>
Ergot	<u>Claviceps purpurea</u>
Ac. giberélico	<u>Fusarium moniliforme</u>
Indolmicina	<u>S. griseus</u>
Kanamicina	<u>S. kanamyceticus</u>
Mitomicina	<u>S. verticillatus</u>
Neomicina	<u>S. fradiae</u>
Penicilina	<u>Penicillium chrysogenum</u>
Prodigiosina	<u>Serratia marcescens</u>
Puromicina	<u>S. alboniger</u>
Streptomocina	<u>S. griseus</u>
Streptotricina	<u>S. lavendulae</u>
Tilosina	<u>S. fradiae</u>
Violaceína	<u>Chromobacterium violaceum</u>
Siomicina	<u>S. sioyanensis</u>
Cefamicina	<u>S. clavuligerus</u>

Tabla 2. Metabolitos secundarios cuya producción es suprimida por la glucosa (Martín, 1980).

Enzima	Organismo	Fuente de carbono represora
α -amilasa	<u>Bacillus stearothermophilus</u>	Fructosa
Celulasa	<u>Trichoderma viride</u>	Glucosa, glicerol almidón, celob.
Celulasa	<u>Pseudomonas fluorescens</u>	Galactosa, glucosa, celobiosa.
Proteasa	<u>Bacillus megaterium</u>	Glucosa
Proteasa	<u>Candida lipolytica</u>	Glucosa
Amiloglucosidasa	<u>Endomycopsis bispora</u>	Almidón, maltosa, glucosa, glicerol
Acido poligalacturonico trans-eliminasa	<u>Aeromonas liquefaciens</u>	Glucosa, ácido poligalacturonico
Invertasa	<u>Neurospora crassa</u>	Manosa, glucosa, fructosa, xilosa
Metilen hidroxilasa	<u>Arthobacter sp.</u>	Acetato

Tabla 3. Organismos y enzimas que son reprimidas por ciertas fuentes de carbono (Wang, 1979).

REPRESION CATABOLICA DE LA α -AMILASA

Una vez seleccionadas las fuentes de carbono que reprimen la producción de la amilasa de la cepa silvestre, en fermentación sólida (glucosa y glicerol), se llevó a cabo una fermentación líquida para la medición del crecimiento y de la producción de la enzima en MM/Alm, usando concentraciones represoras de éstas fuentes de carbono (MM/Alm+Glucosa y MM/Alm+Glicerol al 2 y al 6%). Asimismo, la cepa se creció en MM sin almidón, utilizando glucosa o glicerol al 2% como única fuente de carbono.

La Fig.10 muestra el crecimiento de la cepa silvestre bajo concentraciones represoras de glucosa. Con MM/Alm, en las primeras 48 horas de la fermentación se observa un crecimiento de tipo exponencial, en el que la cepa alcanzó una concentración de proteína de 0.19 mg/ml, para después mantener un crecimiento constante hasta el final de la fermentación. El pH bajo éstas condiciones no mostró variaciones significativas, ya que se mantuvo ligeramente por encima del pH inicial que fué de 7.2. Con MM/Alm+Gluc al 2% el crecimiento fué más pronunciado que con MM/Alm en las primeras 24 horas de incubación, puesto que a éste tiempo llegó a 0.2 mg/ml contra 0.05 mg/ml que tuvo en MM/Alm. A las 48 horas se observó un ligero aumento en crecimiento. Sin embargo, después de éste tiempo se observa una caída de la curva por muerte celular, ya que a las 120 horas sólo tuvo 0.07 mg de proteína por ml de medio.

CRECIMIENTO Y pH SILVESTRE

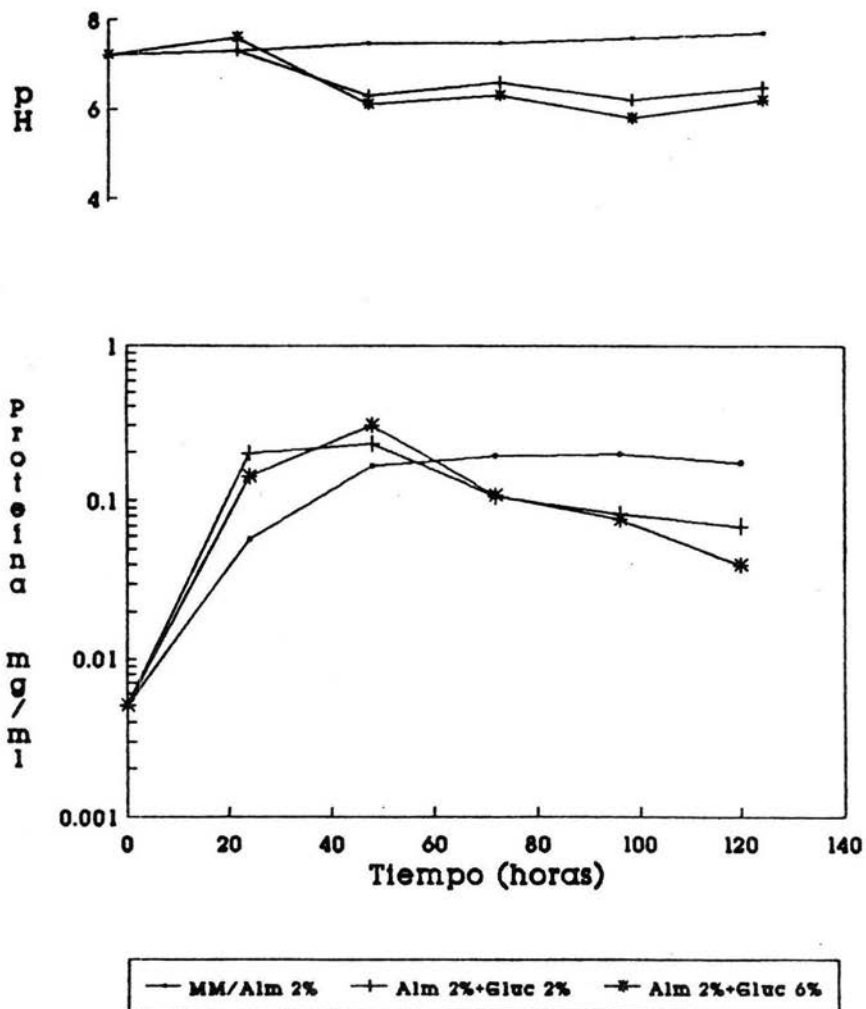


Fig. 10. Curvas de crecimiento
y pH de la cepa silvestre
de *S. kanamyceticus*.

Con MM/Alm+Glucosa al 6% se observa una curva muy parecida a la obtenida con glucosa al 2%, aunque el crecimiento no fué tan grande en las primeras 24 horas. Sin embargo, a las 48 horas de incubación el crecimiento si fué superior al mostrado con glucosa al 2%, así como en ausencia de ésta, ya que llegó a 0.3 mg/ml. A partir de éste tiempo se observa una caída en la concentración de proteína, incluso más pronunciada que en la presencia de glucosa al 2%, ya que llegó a 0.04 mg/ml. En cuanto al pH, se puede observar una ligera caída en los valores de éste después de las 24 horas de incubación en la presencia de glucosa, siendo todavía más pronunciado con glucosa al 6% sin embargo, se mantuvo por arriba de un pH de 6.0.

En cuanto a la producción de amilasa bajo éstas mismas condiciones se puede observar en la Fig. 11 que la glucosa tiene ya un efecto un represor a una concentración de 2% y ésta se acentuó con glucosa al 6%. Sin la fuente de carbono represora se observa una relación lineal entre la actividad de la enzima y el tiempo de fermentación hasta las 72 horas, que es cuando se obtuvo la mayor actividad (0.125 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$) y se mantuvo así hasta el final de la fermentación. Con MM/Alm+Gluc 2%, la actividad disminuyó notablemente en todos los tiempos a excepción de a las 24 horas en donde la actividad fué de 0.045 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$ contra 0.039 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$ con MM/Alm. A las 48 horas de fermentación es cuando se obtuvo la mayor actividad de la enzima con glucosa al 2% (0.049 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$), observándose en las siguientes horas un ligero descenso en la

PRODUCCION DE AMILASA SILVESTRE

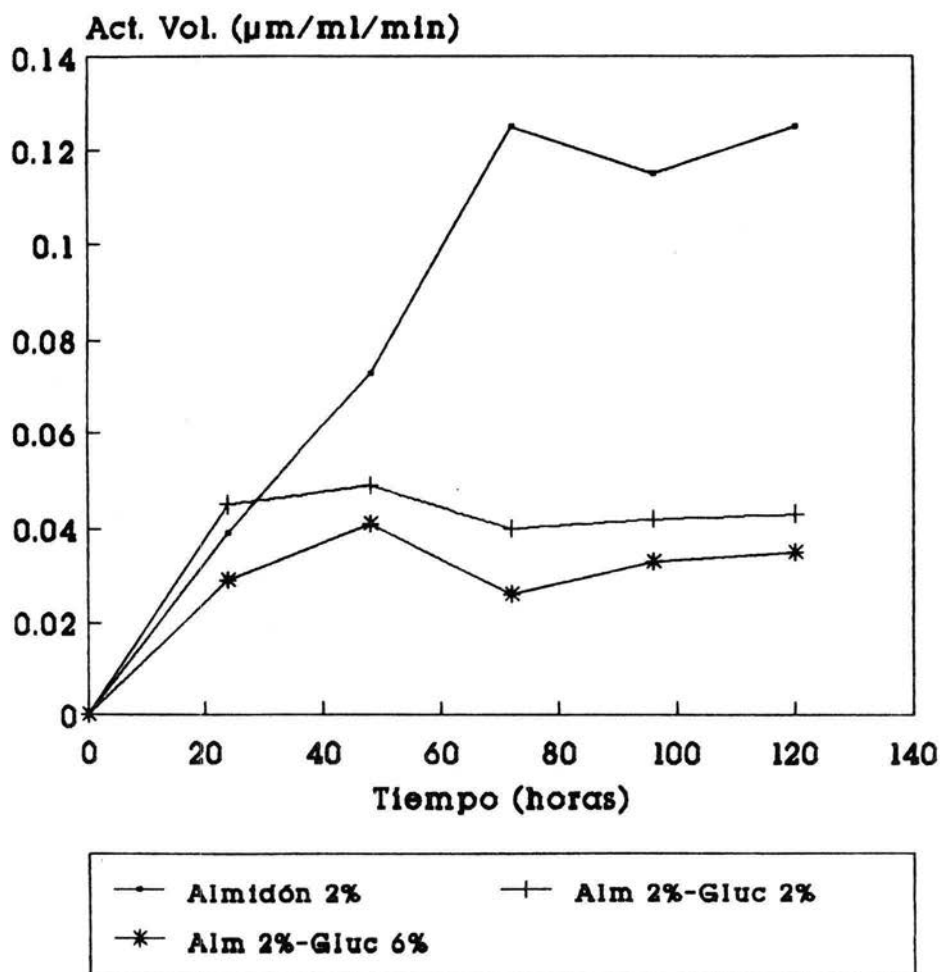


Fig. 11. Actividad volumétrica de la α -amilasa de *S. kanamyceticus* bajo concentraciones represoras de glucosa.

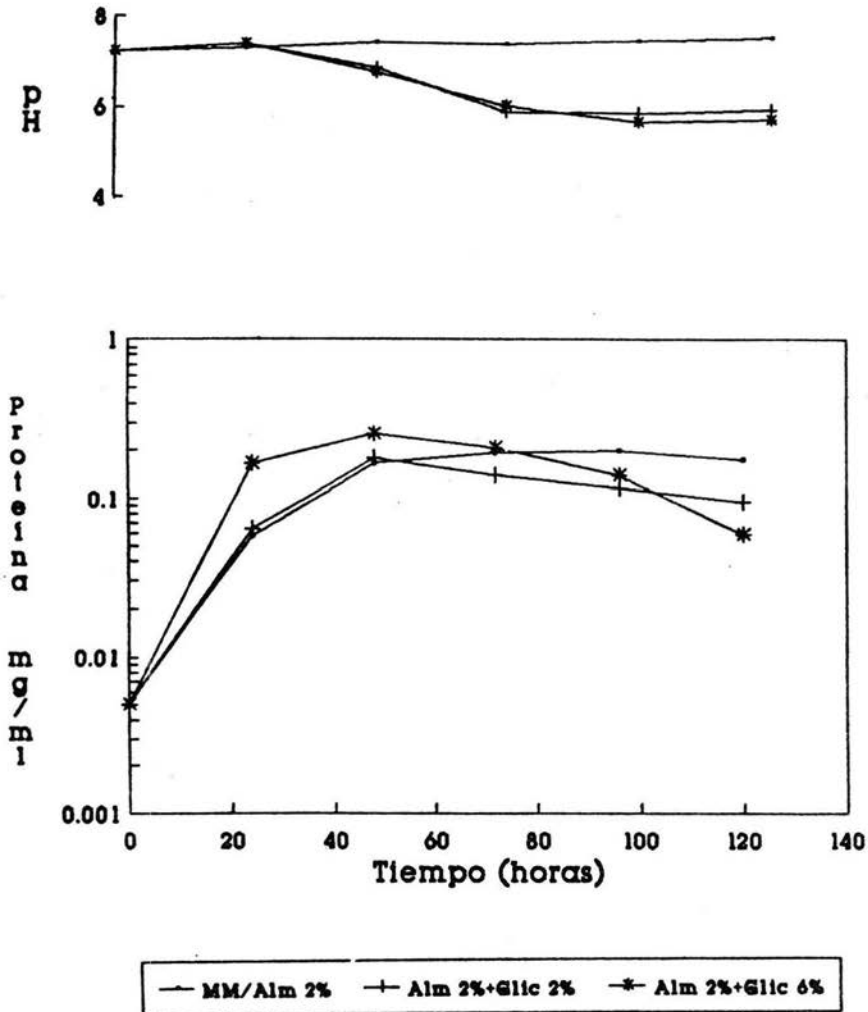
actividad enzimática.

Con MM/Alm+Gluc 6% se observa la misma tendencia que con la curva de glucosa al 2%, aunque los valores fueron menores. En éste caso, la actividad enzimática no llegó a ser mayor que el control ni a las 24 horas de la fermentación ya que la máxima actividad la presentó a las 48 horas, que fué de 0.041 $\mu\text{m/ml/min}$, mientras que con MM/Alm la actividad fué de 0.045 $\mu\text{m/ml/min}$. Las mediciones de la actividad enzimática se realizaron utilizando una curva patrón de maltosa.

Aun cuando la cepa silvestre mostró un mayor crecimiento en las primeras 48 horas bajo condiciones represoras, la enzima no tuvo por ello una mayor actividad, sino que se mantuvo más o menos la misma actividad a lo largo de toda la fermentación, a diferencia de la curva obtenida en MM/Alm en la que se muestra un incremento continuo en la actividad hasta las 72 horas de fermentación, tiempo en el que la actividad volumétrica de la enzima fué 3 veces mayor que con MM/Alm +Gluc al 2% y casi 5 veces mayor que con glucosa al 6%.

En la Fig. 12 se muestra el crecimiento de la cepa silvestre en MM/Alm+Glicerol. Con glicerol al 2% se observa un crecimiento muy semejante al obtenido en MM/Alm pero sólo en las primeras 48 horas de crecimiento en que llega a 0.176 mg/ml, después el crecimiento disminuyó en las siguientes horas hasta tener 0.095 mg/ml a las 120 horas. Con MM/Alm+Glic 6% se observa un mayor crecimiento a las 24 y 48 horas de fermentación en comparación con el control, llegando hasta 0.253 mg/ml a éste último tiempo. Sin embargo, también disminuyó el

CRECIMIENTO Y pH SILVESTRE



**Fig. 12. Curvas de crecimiento
y pH de la cepa silvestre de
S. kanamyceticus.**

crecimiento y a las 120 horas se detectó sólo 0.059 mg de proteína por ml de medio. En cuanto al pH se observó una ligera acidificación del medio con glicerol al 2 y al 6% ya que después de las primeras 24 horas de la fermentación el pH bajó a 6.9 y casi a un pH de 6.0 a las 72 horas, manteniéndose así hasta las 120 horas.

En lo que corresponde a la producción de amilasa (Fig. 13), se observa una disminución de la actividad enzimática en presencia de glicerol en comparación a la obtenida con MM/Alm. Con MM/Alm+Glic 2% la producción a las 24 horas fué mayor que en el control, ya que se obtuvo 0.056 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$ a diferencia de los 0.039 obtenidos con MM/Alm. Sin embargo, la actividad no siguió aumentando de igual forma en las siguientes horas ya que a las 48 horas se detectó la misma actividad que con el control, mientras que para las 72 horas la actividad bajó hasta 0.043 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$ y aumentó sólo ligeramente para las 96 y 120 horas. En la presencia de glicerol al 6% se observa que la actividad también fué un poco mayor que con MM/Alm a las 24 horas de fermentación, la cual mas o menos se mantuvo hasta las 96 horas, ya que para las 120 horas registró un aumento en la actividad, llegando a 0.081 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$.

PRODUCCION DE AMILASA SILVESTRE

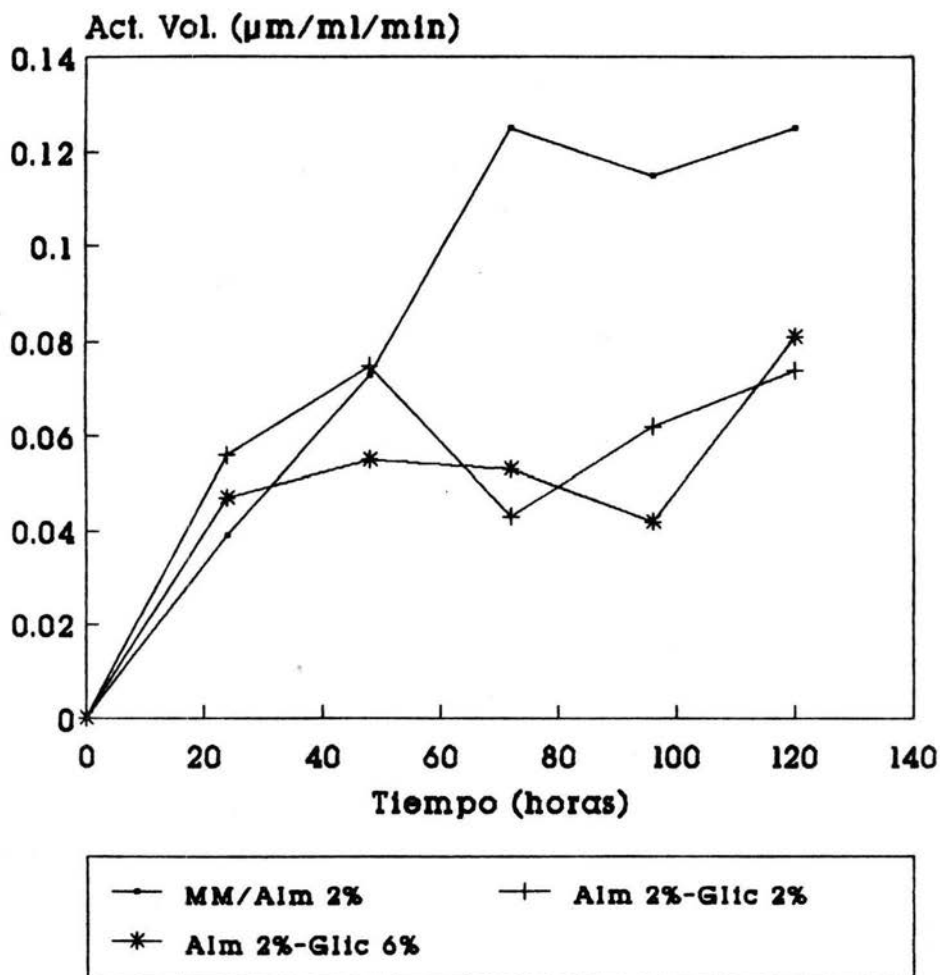


Fig. 13. Actividad volumétrica de la α -amilasa de *S. kanamyceticus* bajo concentraciones represoras de glicerol.

La actividad enzimática de las muestras crecidas en MM con glucosa o glicerol al 2% como únicas fuentes de carbono fué nula lo que sugiere que la enzima producida por *S. kana-mycticus* es una enzima de tipo inducible y que necesita que el almidón, que es el sustrato de la enzima, esté presente en el medio para que se sintetice.

Muchas enzimas catabólicas están en la categoría de inducibles y son inducidas por el sustrato de la enzima. Los sustratos que son de alto peso molecular no pueden entrar a la célula por lo que en lugar de que ésta forma polimérica esté involucrada directamente en el proceso de inducción, se cree que un pequeño nivel de enzima extracelular constitutiva degrade al sustrato de alto peso molecular y que éstos productos de bajo peso molecular sean los que induzcan la síntesis de la enzima al entrar a la célula (Fogarty, 1980).

La existencia de mecanismos tales como la inducción y la represión catabólica en una célula aseguran que las enzimas inducibles sean producidas solo en presencia del sustrato. Si están presentes varios sustratos sólo se producirán las enzimas que actúan sobre el más favorable (Wang, 1979).

Saito et al. (1975) han reportado también que polisacáridos tales como el glicógeno, el almidón, la dextrina y diversos maltooligosacáridos pueden inducir la formación de α -amilasa.

Por otro lado, para determinar cual de las 2 fuentes de carbono que se seleccionaron (glucosa y glicerol) es la que ejerce una mayor represión sobre la producción de la α -ami-

lasa en la cepa silvestre de *S. kanamyceticus*, se determinó el número de veces que la actividad de la enzima disminuyó por unidad de biomasa (no. de veces que disminuyó la producción específica de la enzima) bajo diferentes condiciones represoras, con respecto a la producción específica de la misma enzima obtenida bajo condiciones no represoras (MM/ Alm).

En la Tabla 4 se puede observar que a las 24 horas de fermentación en presencia de glucosa al 2%, la cepa silvestre mostró 2.9 veces menos producción específica que la que se presentó en MM/Alm. Esta diferencia en la actividad de la enzima por unidad de biomasa se incrementó en la presencia de glucosa al 6%, ya que la producción específica llegó a ser 3.2 veces menor. Sin embargo, a éste mismo tiempo la producción específica en presencia de glicerol al 6% sólo disminuyó 2.3 veces con respecto al control, por lo que se concluye que la glucosa ejerce un efecto represor mayor que el glicerol sobre la producción de la amilasa en la cepa silvestre y que éste efecto represor se hace más fuerte al aumentar la concentración de la fuente de carbono. Asimismo se observa que en los últimos tiempos de la fermentación disminuye el efecto represor tanto del glicerol como de la glucosa, lo cual se debe a que éstas fuentes de carbono se van consumiendo a lo largo de la fermentación, lo que permite que la enzima se libere de la represión que tanto la glucosa como el glicerol ejercen sobre ella.

	Tiempo de fermentación (hrs)			
	24	48	72	96
MM/Alm 2%	1.0			
Alm+Gluc 2%	2.9	2.0	1.75	1.0
Alm+Gluc 6%	3.2	3.27	2.5	1.37
Alm+Glic 2%	0.8	1.05	2.13	1.1
Alm+Glic 6%	2.3	2.06	2.5	1.9

Tabla 4. Efecto represor de la glucosa y el glicerol sobre la producción específica de la amilasa en la cepa silvestre. Los valores representan el número de veces que disminuyó la producción específica con respecto a la obtenida bajo condiciones no represoras.

Se puede observar también que en la presencia de MM/Alm+Glic al 2% no hay un efecto represor tan notorio como sucede con el glicerol al 6% o con glucosa desde una concentración de 2%. El valor de 0.8 obtenido para las 24 horas de la fermentación en glicerol al 2% indica que no está habiendo represión catabólica en éstas condiciones ya que la producción específica obtenida fué mayor que la mostrada en MM/Alm. Este aumento en la producción específica en la presencia de glicerol se debió a que aunque el crecimiento fué muy parecido en ambas condiciones, la actividad enzimática fué mayor en la presencia de la fuente de carbono alternativa.

AISLAMIENTO DE MUTANTES

Se llevaron a cabo 2 mutagénesis usando N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina como agente mutagénico, según la metodología descrita anteriormente. De aproximadamente 1000 colonias probadas por su producción de amilasa y/o kanamicina bajo concentraciones represoras de glucosa y de glicerol en fermentación sólida, se aislaron 3 mutantes.

La mutante 41 fué aislada por su capacidad de producir amilasa bajo concentraciones represoras de glucosa. Las otras 2 mutantes, la mutante E y la mutante 29 fueron seleccionadas por su capacidad de producir kanamicina bajo concentraciones represoras de glicerol. Al probar si éstas mutantes estaban desreguladas para la producción de ambos metabolitos (amilasa y kanamicina) o sólo para uno de ellos y si además eran capaces de producirlos sólo bajo concentraciones represoras de una de los dos fuentes de carbono seleccionadas (glucosa y glicerol) o para ambas, se observó (Figs. 14 y 15) que mientras que la cepa silvestre fué incapaz de producir ninguno de los 2 metabolitos bajo concentraciones represoras tanto de glucosa como de glicerol, la mutante 41 produjo tanto amilasa como kanamicina pero sólo bajo concentraciones represoras de glucosa. La mutante E por el contrario produjo ambos metabolitos pero sólo bajo concentraciones de glicerol y por último la mutante 29 de la que se aislaron 2 colonias con fenotipo diferente, una con coloración amarilla como la parental y

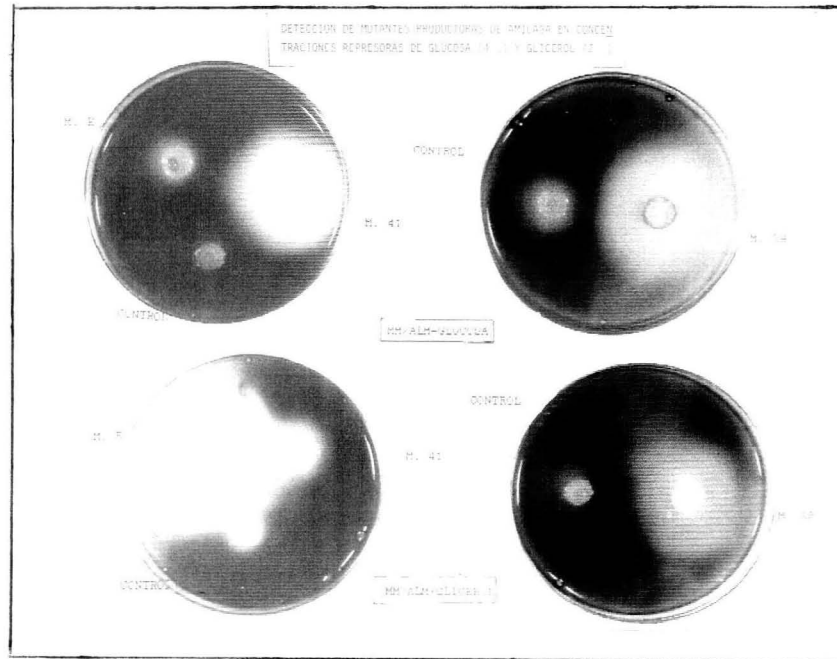


Fig. 14 Producción de amilasa en las mutantes E, 29 y 41 bajo concentraciones represoras de glucosa y de glicerol.

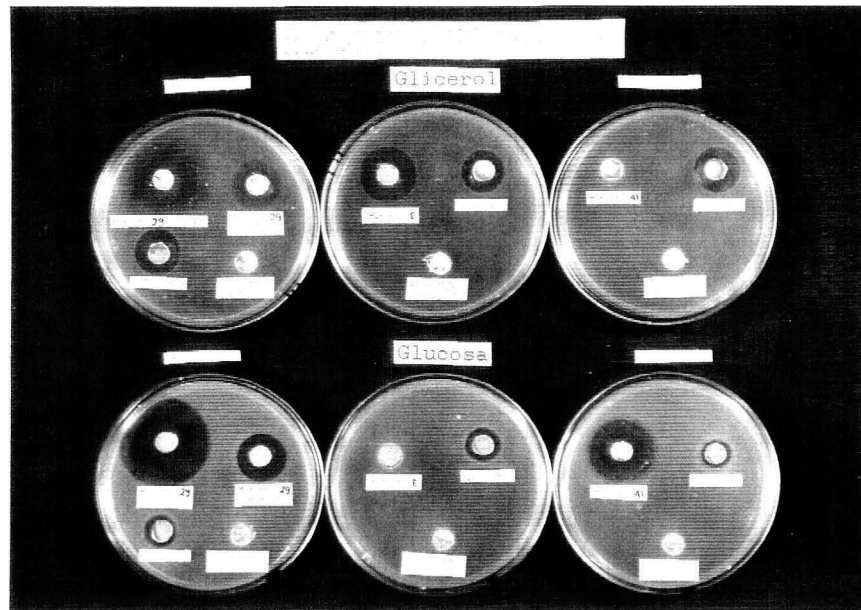


Fig. 15. Producción de kanamicina por las mutantes E y 29 (seleccionadas por glicerol) y mutante 41 (seleccionada por glucosa).

la otra con coloración blanca, ambas colonias fueron capaces de formar tanto halos de hidrólisis de almidón, como halos de inhibición del crecimiento de Bacillus tanto bajo concentraciones represoras de glucosa como de glicerol (Figs. 14 y 15). Sin embargo debido a que los halos producidos por la mutante 29 con fenotipo blanco fueron más claros que los producidos por el fenotipo amarillo, se decidió trabajar sólo con la primera en experimentos posteriores. Todos éstos resultados se resumen en la Tabla 5.

El hecho de que las mutantes sean capaces de producir halos de hidrólisis de almidón como halos de inhibición del crecimiento del organismo prueba bajo concentraciones represoras de las fuentes de carbono seleccionadas en fermentación sólida, sugiere que en éste microorganismo existe un mecanismo de control común involucrado en la represión catabólica por glucosa y glicerol para el metabolismo primario y secundario, como se ha probado que existe en otros microorganismos como Penicillium chrysogenum (Barredo, 1988).

Producción de:	Amilasa		Kanamicina	
	Glucosa	Glicerol	Glucosa	Glicerol
Fuente de carbono en concentración represora				
Slivestre	-	-	-	-
Mutante 41	+	-	+	-
Mutante E	-	+	-	+
Mutante 29	+	+	+	+

Tabla 5. Producción de amilasa y de kanamicina de las cepas silvestre y mutantes bajo concentraciones represoras de glucosa y glicerol.

+ indica que la mutante es capaz de formar un halo de hidrólisis de almidón en una placa o de producir un halo de inhibición de crecimiento en el organismo prueba.

CARACTERIZACION DE LAS MUTANTES

Para comparar la producción de amilasa y el crecimiento de las mutantes con respecto a la cepa silvestre, las colonias fueron crecidas en MM/Alm más 2 concentraciones diferentes de glucosa y/o de glicerol (2 y 6%), dependiendo de la fuente de carbono a la que cada mutante mostró ser insensible al efecto represor en la fermentación sólida realizada anteriormente. La mutante 41 fué crecida sólo en MM/Alm+glucosa,

la mutante E en MM/Alm+glicerol y la mutante 29 y la cepa silvestre en MM/Alm+glucosa y en MM/Alm+ glicerol.

En la Fig. 16 se muestra el crecimiento de las mutantes bajo condiciones no represoras (MM/Alm) y en ella se puede observar que la curva obtenida para la cepa silvestre es muy parecida a la de las mutantes, sobretodo a la de la mutante 29 sin embargo, la mutante E tuvo un crecimiento ligeramente superior al de la silvestre y la mutante 29 en las primeras 96 horas ya que llegó a 0.24 mg/ml, aunque para las 120 horas terminó con 0.12 mg/ml. En cuanto a la mutante 41, ésta tuvo un crecimiento parecido a las otras mutantes hasta las 48 horas sin embargo, después de éste tiempo, sólo siguió creciendo ligeramente, llegando a 0.133 mg/ml a las 120 horas. El pH también fué muy semejante en todas las cepas, puesto que en todas aumentó sólo ligeramente, llegando a un pH final de 8.0.

En las gráficas de producción de amilasa bajo éstas mismas condiciones (Fig. 17), se observa que la cepa silvestre tuvo su máxima producción de amilasa de las 72 a las 120 horas, llegando a 0.125 $\mu\text{m/ml/min}$. De las mutantes, la 41 fué la que produjo menos amilasa en MM/Alm, ya que a lo largo de toda la fermentación se mantuvo alrededor de los 0.09 $\mu\text{m/ml/min}$ y sólo a las 120 horas aumentó a 0.115 $\mu\text{m/ml/min}$, por lo que no superó la producción de la cepa silvestre mas que a las 24 horas de fermentación, donde ésta cepa produjo 0.039 $\mu\text{m/ml/min}$, mientras que la mut. 41 produjo 0.093 $\mu\text{m/ml/min}$.

CRECIMIENTO Y pH ALMIDON 2%

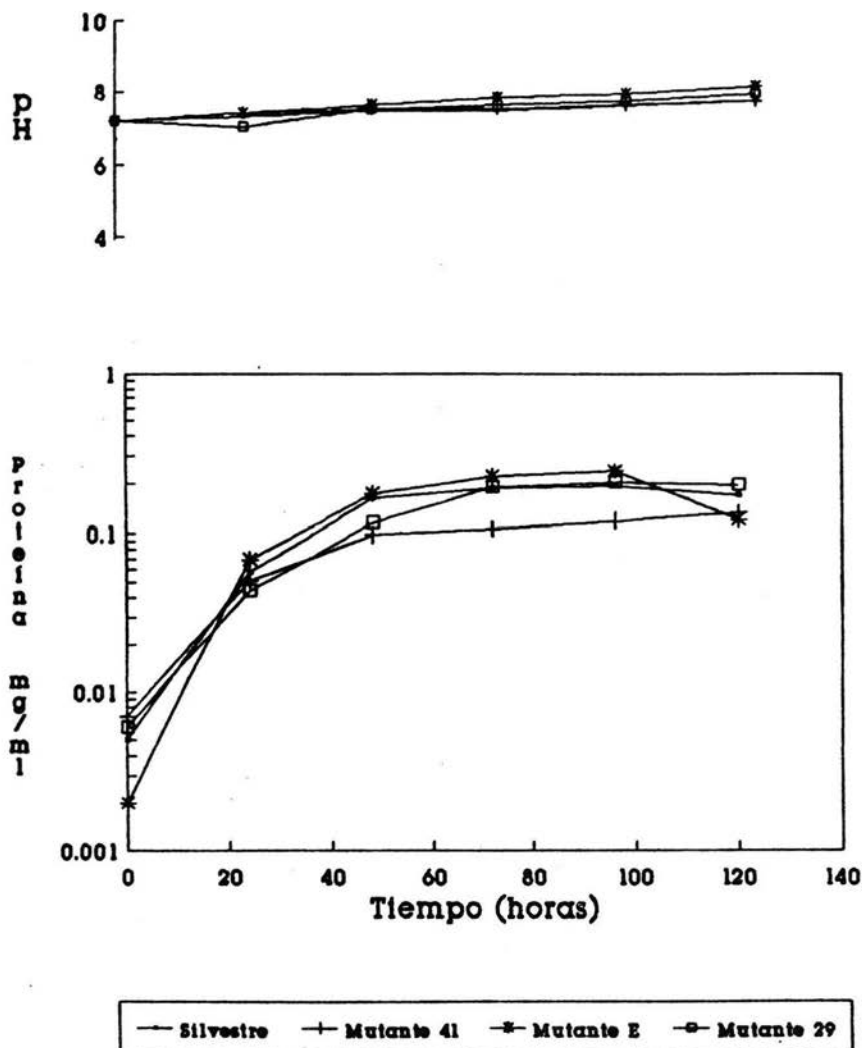


Fig. 16. Curvas de crecimiento
y pH obtenidas en MM/Alm para
la cepa silvestre y mutantes

PRODUCCION DE AMILASA ALMIDON 2%

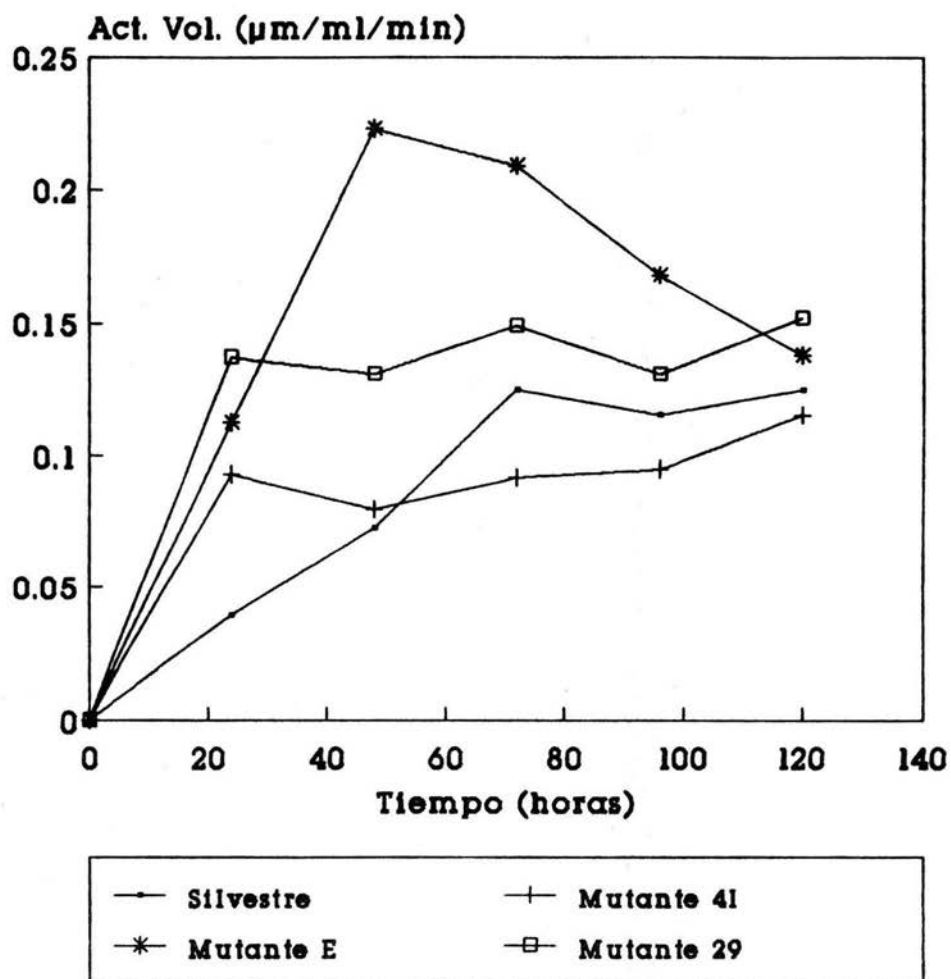


Fig. 17. Actividad volumétrica de la α -amilasa de *S. kanamyceticus* bajo concentraciones no represoras.

La mutante 29 fué la que mostró la mayor actividad de todas las cepas a las 24 horas con $0.137 \mu\text{m/ml/min}$ y a lo largo de la fermentación mantuvo ésta actividad, siendo incluso que a las 120 horas donde se registró la mayor actividad ($0.152 \mu\text{m/ml/min}$).

La mutante E por su parte mostró una gran actividad en las primeras 48 horas, en donde llegó a tener $0.223 \mu\text{m/ml/min}$ sin embargo, ésta actividad decreció un poco en las siguientes horas, ya que a las 120 horas mostró una actividad de $0.138 \mu\text{m/ml/min}$, que fué inclusive un poco menor que la obtenida por la mutante 29 a éste mismo tiempo. Se observa por tanto que a las 24 horas de fermentación la mutante 41 presentó 2.4 veces mayor actividad volumétrica que la cepa silvestre, la mutante E presentó 3 veces mas actividad y la mutante 29 presentó 3.5 veces mayor actividad que la silvestre a éste mismo tiempo. Se observa así, que a pesar que el crecimiento de las cepas fué muy parecido, con excepción de la mutante 41 que no alcanzó el mismo crecimiento que las otras, la producción de amilasa bajo condiciones no represoras fué mayor en todas las mutantes en comparación con la cepa silvestre, sobretodo en la mutante 29.

La cepa silvestre junto con las mutantes 41 y 29 fueron crecidas en MM/Alm+glucosa al 2 y al 6% para determinar la producción de la enzima así como las curvas de crecimiento bajo éstas condiciones. En la Fig. 18 se muestran las curvas de crecimiento con glucosa al 2% y en ellas se observa que las que corresponden a la cepa silvestre y a la mutante 29

CRECIMIENTO Y pH
ALM. 2% + GLUC. 2%

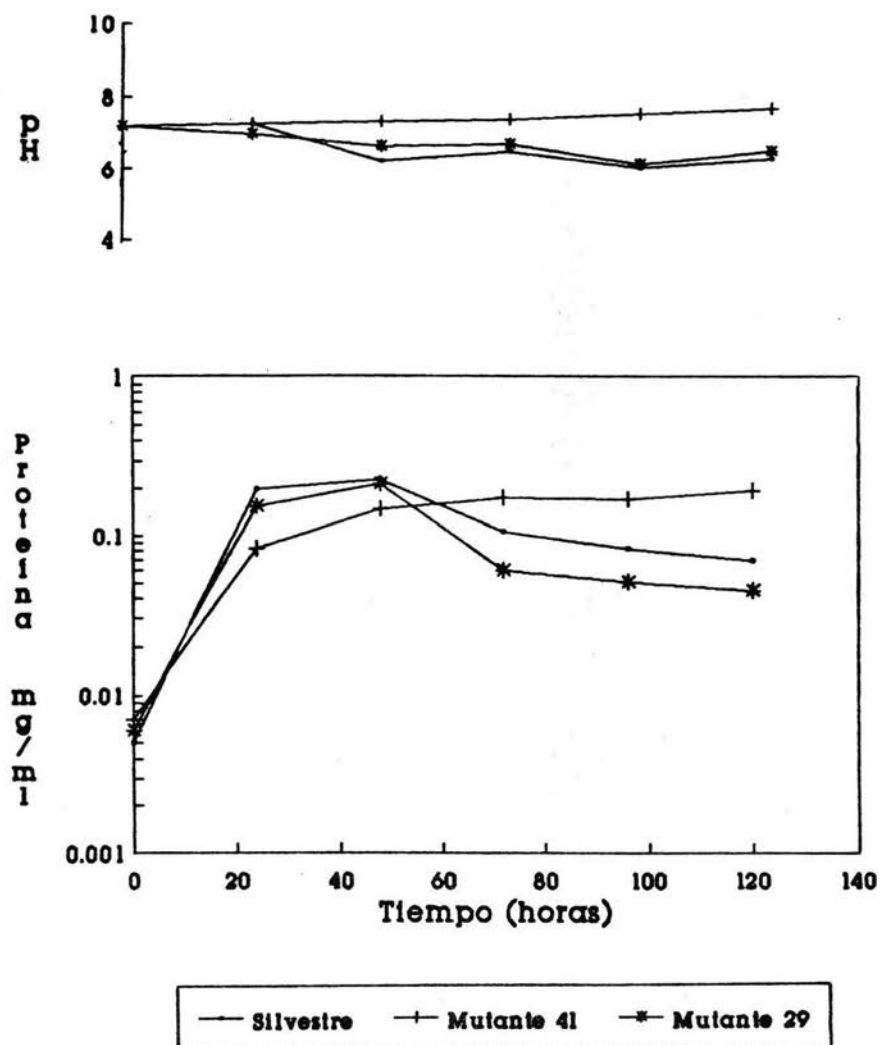


Fig. 18. Curvas de crecimiento y pH en la cepa silvestre y mutantes de *S. kanamyceticus*.

fueron muy semejantes ya que en las primeras 24 horas el crecimiento fué muy rápido. Su valor máximo de crecimiento fué a las 48 horas de la fermentación, ya que llegaron a un promedio de crecimiento de 0.22 mg/ml sin embargo, en ambos casos después de éste tiempo se observó un caída de la curva como resultado de muerte celular; éste decremento fué todavía más notorio en la mutante 29 ya que a las 120 horas de la fermentación presentó 0.045 mg/ml contra 0.07 mg/ml que tuvo la cepa silvestre a éste mismo tiempo. La mutante 41 mostró un comportamiento diferente a las cepas anteriores ya que durante las primeras 24 horas el crecimiento no fué tan pronunciado como con la silvestre y la mutante 29, aún cuando la mutante 41 fué la que tuvo la concentración de proteína inicial más alta sin embargo, a lo largo de toda la fermentación tuvo un crecimiento constante, teniendo su valor máximo a las 120 horas, con 0.194 mg/ml, siendo que a éste tiempo ésta mutante registró una concentración de proteína 3 veces mayor que la cepa silvestre y 4 veces mayor que la mutante 29.

En cuanto al pH se observa que mientras que el pH en la mutante 41 tendió a aumentar a lo largo de la fermentación y llegó hasta un pH de 7.9, en la mutante 29 y en la cepa silvestre los valores de pH disminuyeron después de las 24 horas de fermentación, aunque no llegó a un pH de 6.0.

Las curvas de producción de amilasa en la cepa silvestre y la mutante 29 bajo éstas mismas condiciones (Fig. 19), fueron muy similares, mostrando una actividad más o menos constante a lo largo de toda la fermentación ya que la actividad

PRODUCCION DE AMILASA

ALM. 2% + GLUC. 2%

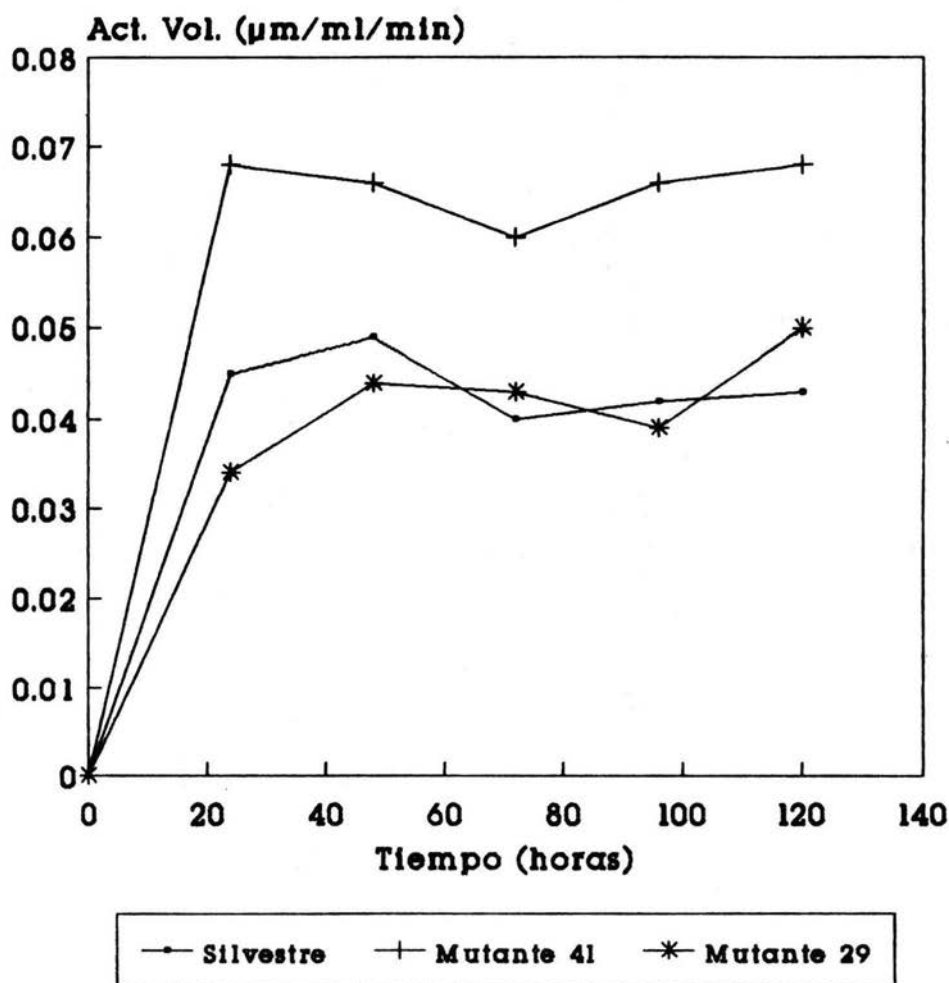


Fig. 19. Actividad volumétrica de la α -amilasa de la cepa silvestre y mutantes en MM/Alm+Glucosa 2%.

fluctuó entre 0.03 y 0.05 $\mu\text{m/ml/min}$. La mutante 41 también presentó una curva de actividad enzimática uniforme, pero los valores registrados fueron mayores (entre los 0.06 y 0.07 $\mu\text{m/ml/min}$), llegando a presentar hasta 1.6 veces mayor actividad volumétrica que la cepa silvestre en las últimas horas de la fermentación y hasta 2 veces más actividad que la mutante 29 a las 24 horas de la fermentación. Estos resultados (Figs. 19 y 20) muestran que la glucosa ejerce un efecto represor sobre la amilasa a una concentración del 2%, siendo menor el efecto sobre la mutante 41.

Al aumentar la concentración de glucosa a 6% (Fig. 20) se observa que tanto la mutante 29 como la cepa silvestre nuevamente muestran un crecimiento muy rápido en las primeras 48 horas de la fermentación, llegando a 0.3 mg/ml, después del cual se observa un decremento gradual en la concentración de proteína, siendo que para las 120 horas se tuvo un crecimiento de 0.063 mg/ml en la mutante 29 y de 0.04 mg/ml en la cepa silvestre. La mutante 41 por su parte aunque mostró la misma concentración de proteína que las otras cepas en las primeras 24 horas de crecimiento, a diferencia de las otras la mutante 41 siguió creciendo en forma constante aunque más lentamente a lo largo de toda la fermentación, mostrando su máximo crecimiento a las 120 horas con 0.287 mg/ml, por lo que la mutante 41 tuvo una concentración de proteína de hasta 4.5 veces más que la presentada en la mutante 29 y de hasta 7 veces más que la cepa silvestre a las 120 horas de fermentación.

CRECIMIENTO Y pH
ALM. 2% + GLUC. 6%

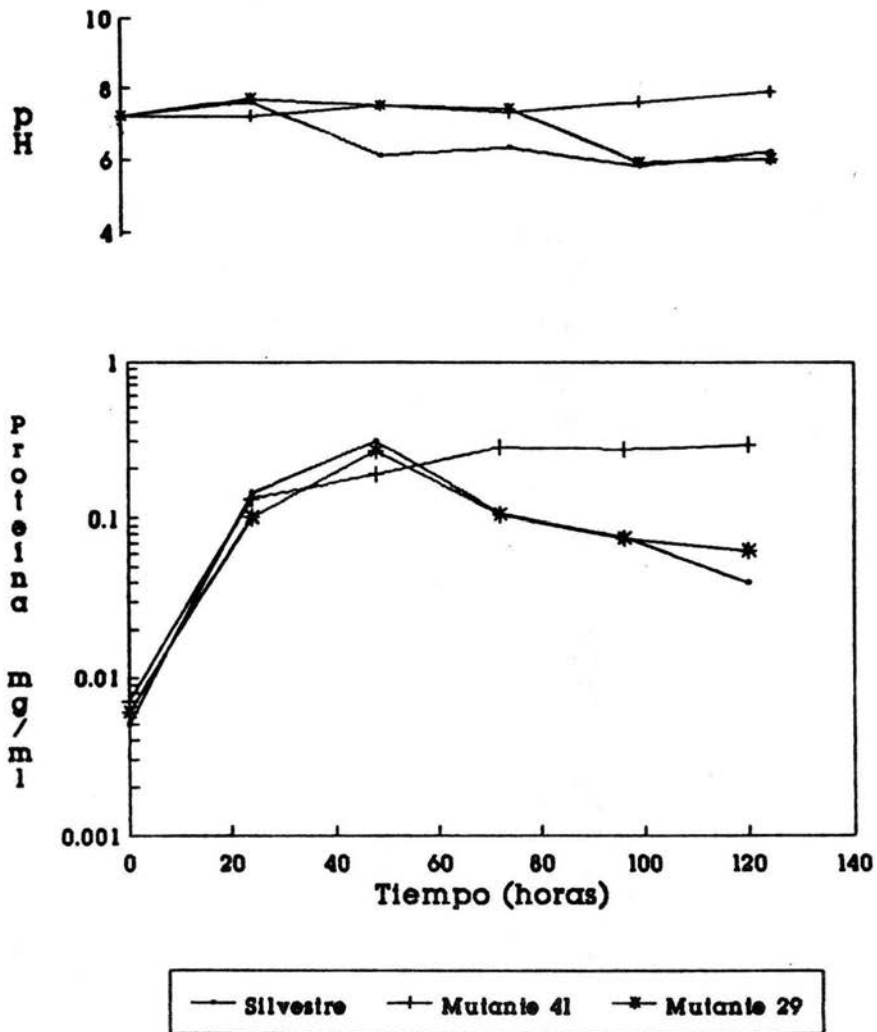


Fig. 20. Curvas de crecimiento y pH en la cepa silvestre y mutantes de *S. kanamyceticus*.

El pH registrado a lo largo de la fermentación para la mutante 41 solo se incrementó ligeramente, quedando en un pH final de 7.9. Con la cepa silvestre se observó que después de las 24 horas el pH cayó hasta cerca de 6.0, manteniéndose así por el resto de la fermentación. La cepa 29 por su parte mostró también una ligera caída del pH pero hasta después de las 72 horas de la fermentación.

Por lo que respecta a la producción de amilasa bajo una concentración de glucosa del 6% (Fig. 21), se observó que el efecto represor de la glucosa sobre la actividad enzimática es más pronunciado con glucosa al 6% que con glucosa al 2%. La cepa silvestre muestra una curva de actividad con variaciones muy ligeras (0.03 a $0.04 \mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$). La mutante 29 mostró una mayor actividad que la cepa silvestre a excepción de a las 48 horas en donde tuvo la misma actividad de la silvestre sin embargo, la mutante 29 siguió aumentando su actividad a lo largo de la fermentación, llegando a $0.057 \mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$ a las 120 horas. Por otro lado, la mutante 41 mostró una mayor actividad que las cepas anteriores en todos los tiempos. A las 24 horas de fermentación tuvo una actividad de $0.074 \mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$, la cual se incrementó hasta casi $0.1 \mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$ mientras que a las 48 horas se incrementó hasta casi $0.1 \mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$, que fué la máxima actividad mostrada. En las siguientes horas la actividad se mantuvo alrededor de los $0.09 \mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$. De éste modo, la mutante 41 mostró una actividad volumétrica de hasta 2.3 veces más que la mutante 29 a las 48 horas de fermentación y de hasta 3.2 veces más actividad que la cepa sil-

PRODUCCION DE AMILASA

ALM. 2% + GLUC. 6%

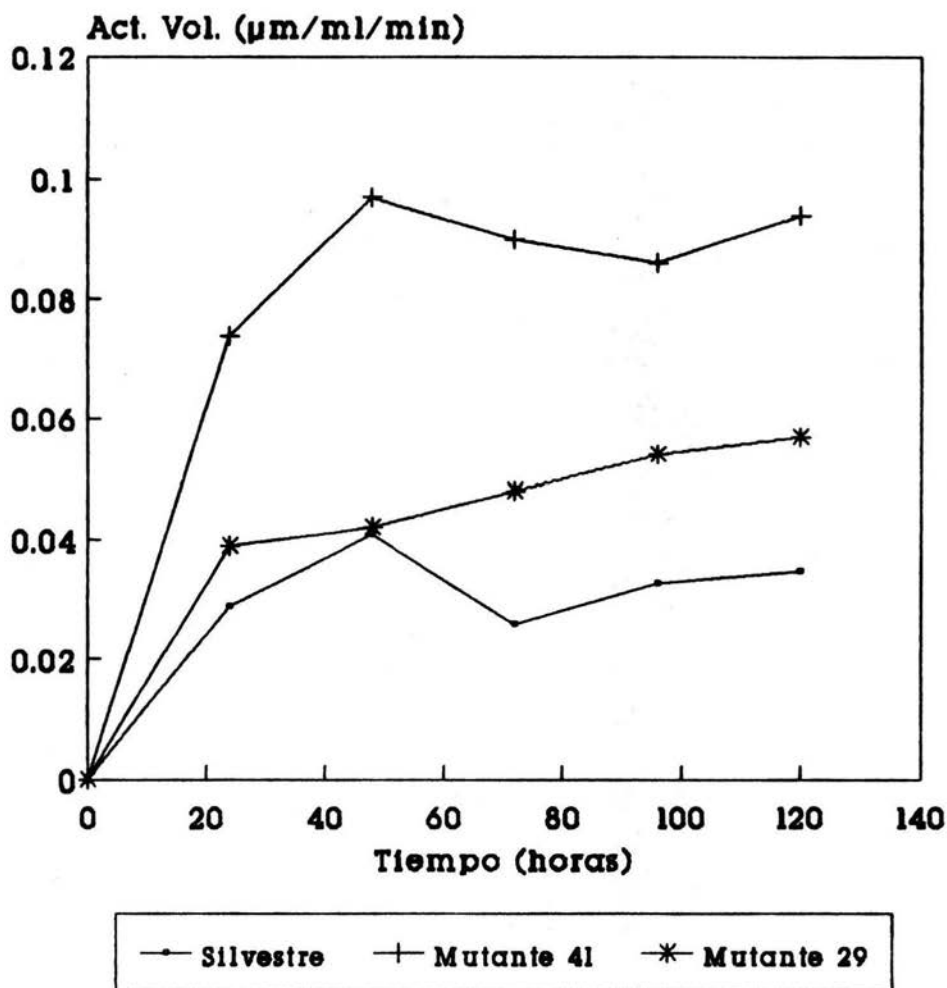


Fig. 21. Actividad volumétrica de la α -amilasa de la cepa silvestre y mutantes en MM/Alm+Glucosa 6%.

vestre a las 72 horas de fermentación.

En general se observa que aunque la mutante 41 fué la que mostró el crecimiento y la actividad enzimática mas baja en MM/Alm 2%, su crecimiento aumentó significativamente al estar en MM/Alm+Glucosa 2%, ya que de tener 0.13 mg/ml de proteína en MM/Alm 2% a las 120 horas de fermentación, ésta aumentó hasta 0.19 mg/ml en presencia de glucosa al 2% y todavía aumentó hasta 0.29 mg/ml con glucosa al 6% a éste mismo tiempo, a diferencia de la cepa silvestre que bajo concentraciones represoras de glucosa tuvo un buen crecimiento pero sólo en las primeras 48 horas ya que después disminuyó considerablemente, siendo además más pronunciado el decremento de la curva en la presencia de una mayor concentración de glucosa. Un comportamiento parecido al de la silvestre se obtuvo con la mutante 29.

En cuanto a la actividad de la enzima se observó un efecto represor de la glucosa sobre la cepa silvestre y la mutante 29 desde una concentración del 2% y ésta se acentuó con 6% de glucosa, mientras que en la mutante 41 la actividad de la amilasa fué incluso mayor en presencia de glucosa al 6% que al 2%, ya que con glucosa al 2% la actividad máxima se registró alrededor de los 0.07 $\mu\text{m/ml/min}$, mientras que con glucosa al 6% ésta fué de alrededor de los 0.09 $\mu\text{m/ml/min}$. Se observa asimismo que la actividad bajo condiciones represoras y no represoras se mantuvo mas o menos en los mismos valores, mostrando por tanto ser una mutante insensible a represión catabólica por glucosa.

Los resultados sugieren que la glucosa, además de tener un efecto represor sobre la producción de la amilasa, también tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de las cepas que no están desreguladas para glucosa como es el caso de la cepa silvestre y parece serlo para la mutante 29. Otros resultados que apoyan el hecho de que el crecimiento también es reprimido por la glucosa se muestran en la Fig. 22, en la que se observa que las colonias de la cepa silvestre que fueron crecidas sobre placas con MM/Alm más concentraciones crecientes de glucosa, no sólo disminuyeron su halo de hidrólisis de almidón sino también su tamaño.

El hecho de que el medio de fermentación se haya acidificado ligeramente en la presencia de glucosa, sobretodo en los últimos tiempos, no parece estar relacionado directamente con la muerte celular que se presentó, ya que esto no impidió que por ejemplo la cepa silvestre y la mutante 29 tuvieran su máximo crecimiento en los tiempos de muestreo en los que el pH estaba cercano a 6.0 (Fig. 18). Asimismo se observa en la Fig. 21 que el crecimiento de la mutante 29 disminuyó aun cuando el pH estaba por arriba de pH 7.0, por lo que el pH no parece ser el responsable directo de la muerte celular que se presentó aunque si pudo haber influido.

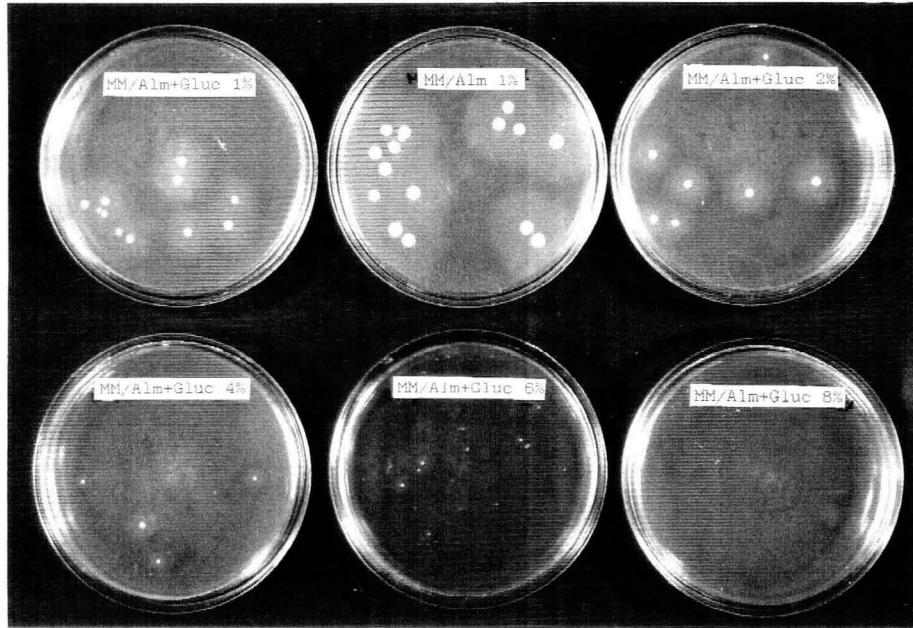


Fig. 22. Colonias aisladas de la cepa silvestre de *S. karnamyceticus* crecidas sobre MM/Alm mas concentraciones crecientes de glucosa (1 a 8%).

Por otro lado, tanto la cepa silvestre como las mutantes 29 y E fueron crecidas bajo 2 concentraciones diferentes de glicerol (al 2 y al 6%) para determinar el comportamiento de la enzima bajo éstas condiciones.

En la Fig. 23 se muestran las curvas de crecimiento de las mutantes y de la cepa silvestre en MM/Alm+Glicerol al 2% y en ellas se observa que tanto la cepa silvestre como la mutante 29 tuvieron su máximo crecimiento a las 48 horas de fermentación con 0.18 mg/ml, para descender en las siguientes horas hasta 0.095 mg/ml en la cepa silvestre y 0.08 mg/ml en la mutante 29. La mutante E por otro lado, mostró un mayor crecimiento que las cepas anteriores en todos los tiempos, ya que aunque la concentración inicial de proteína fué menor, tuvo un crecimiento rápido y logró mantenerse por encima de las concentraciones registradas para las otras cepas en las últimas horas.

El pH en la mutante E mostró un incremento gradual a lo largo de la fermentación, llegando para las 120 horas a un pH de 8.0. La cepa silvestre en cambio, mostró un ligero incremento a las 24 horas, sin embargo después disminuyó hasta un pH de casi 6.0 donde se mantuvo hasta el final de la fermentación. En la mutante 29 el pH descendió desde las 24 horas a un pH un poco por abajo de pH 6.0 y se mantuvo así hasta el final de la fermentación.

CRECIMIENTO Y pH
ALM. 2% + GLIC. 2%

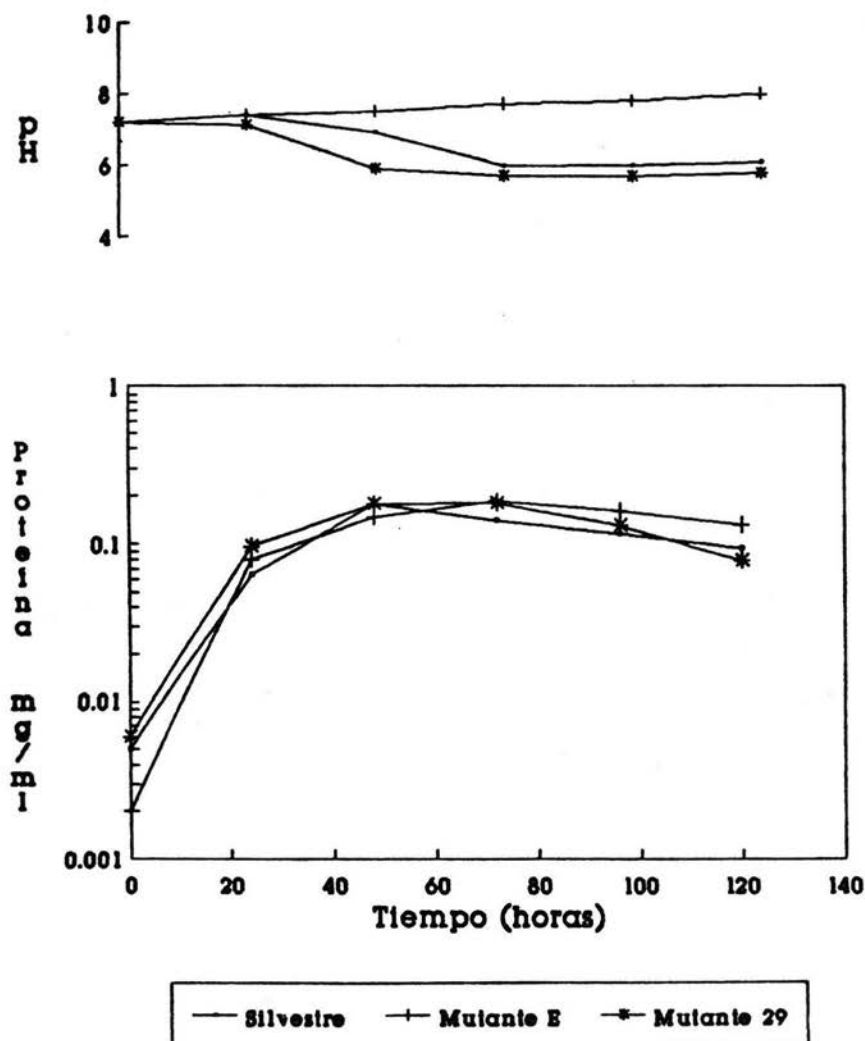


Fig. 23. Curvas de crecimiento y pH en la cepa silvestre y mutantes de *S. kanamyceticus*

En cuanto a la producción de amilasa bajo éstas mismas condiciones, en la Fig. 24 se observa que la cepa silvestre y la mutante 29 presentaron una actividad baja en MM/Alm+glic 2% ya que sus valores fluctuaron entre 0.043 y 0.08 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$, a diferencia de la mutante E cuya actividad más baja que fué a las 24 horas, coincidió con la actividad más alta registrada en las otras cepas en la fermentación. La máxima actividad enzimática registrada en la mutante E fué a las 48 horas de la fermentación con 0.22 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$, después de la cual bajo un poco y se mantuvo alrededor de los 0.18 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$. Por tanto, en MM/Alm+glic 2% la mutante E presentó hasta 4 veces mayor actividad volumétrica que la mutante 29 y la cepa silvestre a las 48 y 72 horas de fermentación, respectivamente, siendo también una de las actividades más altas registradas hasta ahora.

Al aumentar la concentración de glicerol a 6% (MM/Alm+glic 6%), las curvas de crecimiento resultantes (Fig. 25) mostraron mayores diferencias entre sí que con glicerol al 2%. La cepa silvestre tuvo un mayor crecimiento que las mutantes E y 29 en las primeras 48 horas (0.25 mg/ml) sin embargo, para las 72 horas la concentración de proteína medida fué muy parecida a la de las mutantes, teniendo para las 120 horas 0.06 mg/ml. La mutante 29 por otro lado, mostró su máximo crecimiento a las 72 horas de fermentación con 0.17 mg/ml, disminuyendo ligeramente para las 120 horas. Por último la mutante E que por comenzar con una cantidad inicial de proteína menor que la de las otras cepas, no logró el

PRODUCCION DE AMILASA

ALM. 2% + GLIC. 2%

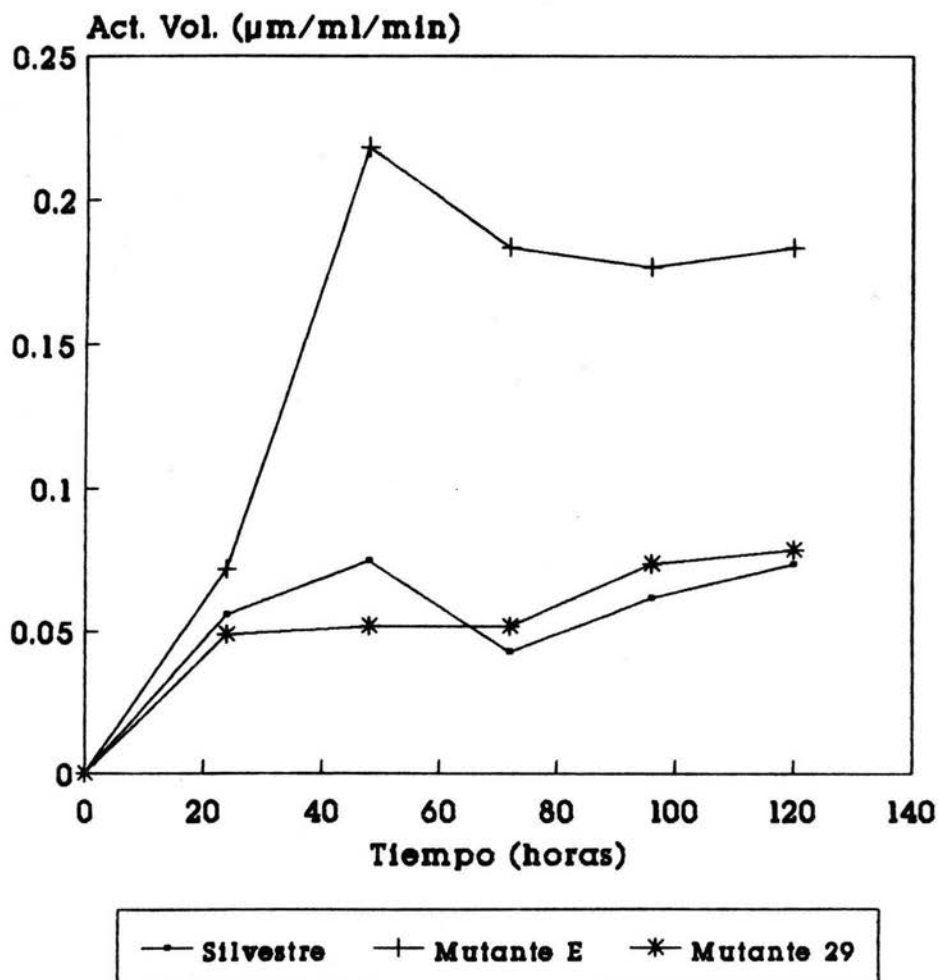


Fig. 24. Actividad volumétrica de la α -amilasa de la cepa silvestre y mutantes en MM/Alm+Glicerol 2%.

CRECIMIENTO Y pH
ALM. 2% + GLIC. 6%

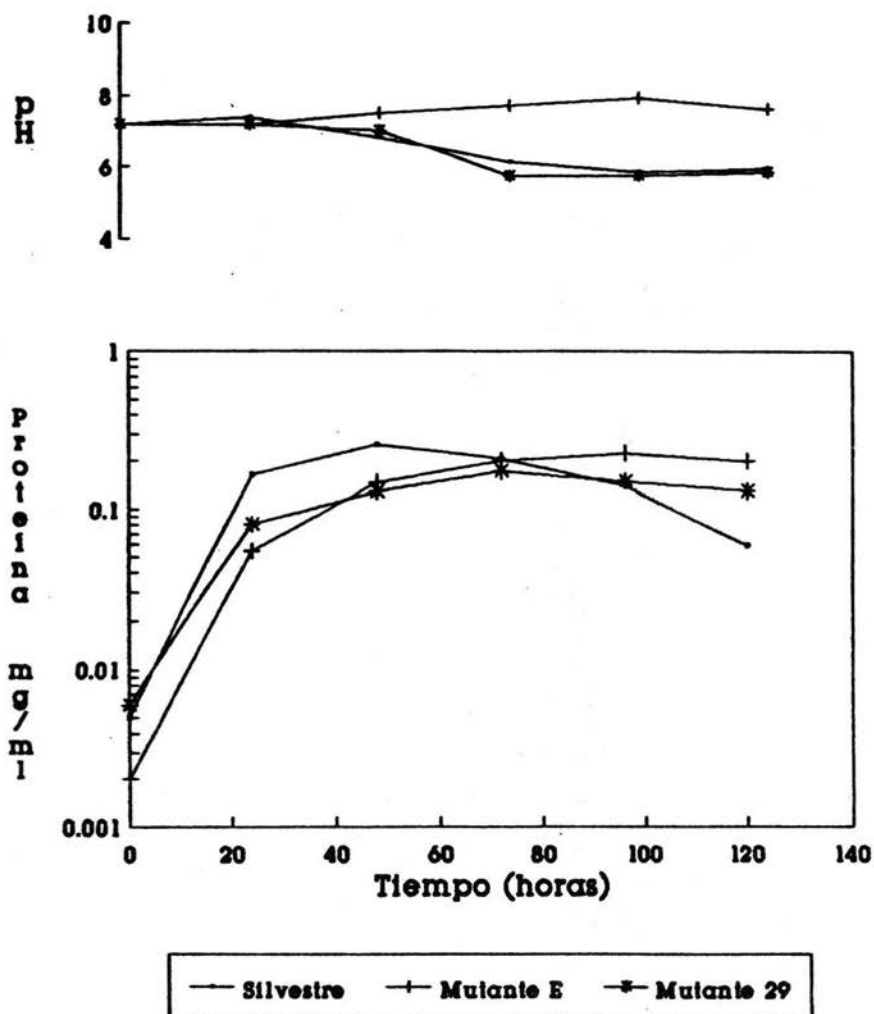


Fig. 25. Curvas de crecimiento y pH en la cepa silvestre y mutantes de *S. kanamyceticus*

crecimiento observado en la cepa silvestre en las primeras 48 horas, tuvo un crecimiento constante a lo largo de toda la fermentación, llegando a su crecimiento máximo a las 72 horas con 0.22 mg/ml. En cuanto al pH se observa que tanto en la mutante 29 como en la silvestre el pH cayó ligeramente con respecto al valor inicial de 7.2, quedando de las 72 a las 96 horas con valores muy cercanos a pH de 6.0. Con la mutante E en cambio se observó un ligero incremento en el pH, llegando a un pH de casi 8.0.

Bajo éstas mismas condiciones en la Fig. 26 se muestran las curvas de producción de la amilasa y se puede observar que la actividad enzimática en la cepa silvestre se mantuvo en todos los tiempos entre 0.04 y 0.05 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$ con excepción del último tiempo de muestreo donde se registró una actividad de 0.08 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$.

La mutante 29 también mostró una actividad baja, aunque se mantuvo por arriba de los valores obtenidos con la cepa silvestre, ya que fluctuaron entre los 0.07 y 0.09 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$. La mutante E que en las primeras 24 horas de la fermentación mostró una actividad parecida a la registrada a ese mismo tiempo en la mutante 29, mostró un gran aumento en la actividad durante las siguientes 24 horas, ya que llegó a 0.225 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$. En las siguientes horas continuó aumentando aunque más lentamente, mostrando su actividad máxima a las 120 horas de la fermentación con 0.27 $\mu\text{m}/\text{ml}/\text{min}$. Por tanto, la mutante E mostró una actividad volumétrica de hasta 3.4 veces la de la mutante 29 a las 72 horas de la fermentación y de hasta 6

PRODUCCION DE AMILASA

ALM. 2% + GLIC. 6%

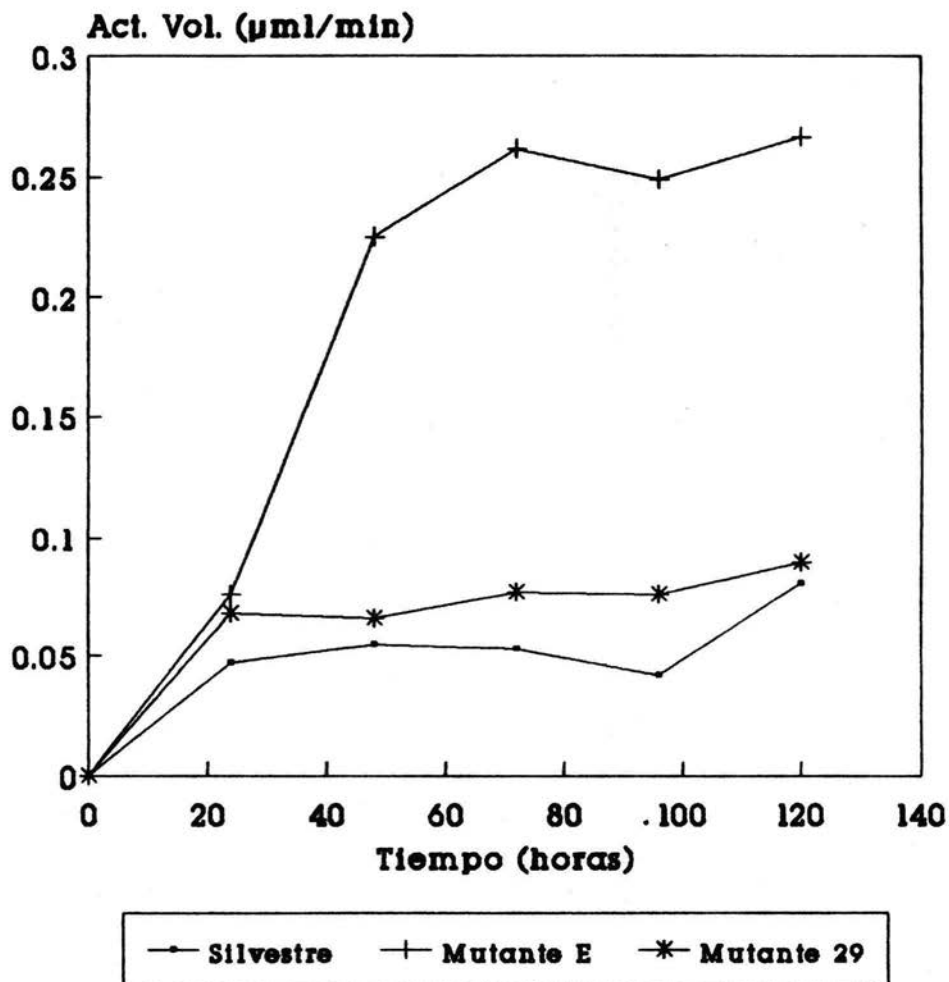


Fig. 26. Actividad volumétrica de la α -amilasa de la cepa silvestre y mutantes en MM/Alm+Glicerol 6%.

veces la de la cepa silvestre a las 96 horas.

El glicerol por tanto, ejerce un efecto represor sobre la producción de la enzima amilasa en la cepa silvestre, principalmente en concentraciones altas (6 %).

La mutante E en cambio mostró ser una cepa insensible a la represión catabólica por glicerol ya que no sólo fué capaz de mantener la actividad mostrada bajo condiciones no represoras (MM/Alm), sino que en los últimos tiempos de la fermentación en presencia de glicerol, superó esos valores, lo que fué más notorio con glicerol al 6%.

Con lo que respecta a la mutante 29 que se seleccionó por su capacidad de formar halos de hidrólisis de almidón sobre las placas de agar tanto bajo concentraciones represoras de glucosa como de glicerol, ésta mostró un comportamiento muy parecido al de la silvestre en cuanto a crecimiento y producción de amilasa bajo las diferentes condiciones represoras probadas. Sin embargo, a diferencia de la cepa silvestre, la mutante 29 registró 4.6 veces más actividad por unidad de biomasa que la primera bajo condiciones no represoras (MM/Alm 2%), ya que a las 24 horas de fermentación tuvo un valor de $3.1 \mu\text{m}/\text{mg}/\text{min}$ contra $0.67 \mu\text{m}/\text{mg}/\text{min}$ que registró la cepa silvestre a éste mismo tiempo (Tabla 6). Esta diferencia se debió al hecho de que aunque el crecimiento fué muy parecido en ambas cepas, la producción de amilasa fué considerablemente mayor en la mutante 29 que en la cepa silvestre a este mismo tiempo, mostrando así ser una mutante hiperproductora de amilasa, no obstante presentar el mismo comporta-

miento regulatorio que la cepa silvestre. El hecho de que en la presencia de glicerol al 6% esta mutante mostrara una actividad específica 2.9 veces mayor que la cepa silvestre se debió a una disminución en el crecimiento de la mutante y no a un aumento en la actividad volumétrica de la enzima, ya que ésta fué muy parecida en ambas cepas.

Con lo que respecta a las otras mutantes, se observa que bajo condiciones no represoras las mutantes E y 41 tuvieron una actividad específica mayor que la de la cepa silvestre a las 24 horas de fermentación, lo que se debió a un aumento en la actividad volumétrica de la amilasa producida por las mutantes con respecto a la registrada para la cepa silvestre sin embargo, los valores fueron solo la mitad de los mostrados por la mutante 29. Bajo condiciones represoras la mutante 41 mostró una actividad específica 3.6 veces mayor en la presencia de glucosa al 2 %, mientras que la mutante E mostró hasta 4.8 veces mayor actividad específica en la presencia de glicerol al 6%. Esto se debió a que el crecimiento de las mutantes fué menor que en la silvestre pero la actividad volumétrica fué mayor.

	Silvestre	Mut. 41	Mut. E	Mut. 29
	$\mu\text{m}/\text{mg}/\text{min}$			
MM/Alm 2%	0.672	1.824	1.623	3.114
Alm+Glucosa 2%	0.228	0.819	-	0.221
Alm+Glucosa 6%	0.206	0.565	-	0.386
Alm+Glicerol 2%	0.875	-	0.9	0.505
Alm+Glicerol 6%	0.288	-	1.382	0.84

Tabla 6. Producción específica de la enzima amilasa a las 24 horas de fermentación bajo diferentes condiciones en las cepas silvestre y mutantes.

Por tanto, las mutantes 41 y E, a diferencia de la cepa silvestre, mostraron tener la capacidad de sintetizar amilasa aun bajo concentraciones represoras de glucosa y de glicerol, respectivamente, mientras que la mutante 29 fué capaz de producir mas amilasa que la silvestre y que las otras mutantes pero sólo en MM/Alm 2%.

El aislamiento y estudio de éstas mutantes resulta entonces una contribución al conocimiento de los mecanismos regulatorios involucrados en la regulación por fuentes de carbono en Streptomyces kanamyceticus y con ello en el género Streptomyces. Constituye además un punto de partida para la realización de estudios posteriores con éste microorganismo.

IX. CONCLUSIONES

- La enzima amilasa producida por la cepa silvestre de Streptomyces kanamyceticus mostró su mayor actividad en el intervalo de temperatura de 55 a 65°C y mostró ser estable en el intervalo de pH de 6.0 a 8.0.
- La presencia de iones Ca^{+2} en la mezcla de reacción aumentó la actividad y la estabilidad de la enzima.
- La amilasa mostró ser una enzima de tipo inducible cuyos principales productos de hidrólisis fueron la maltosa y 2 oligosacáridos, probablemente maltotriosas y maltotetrosas.
- La amilasa producida por S. kanamyceticus mostró propiedades similares a las amilasas producidas por otros organismos del género Streptomyces como S. thermoviolaceus y S. higroscopicus, así como con algunas especies del género Bacillus.
- La glucosa y el glicerol reprimieron la producción de amilasa y de kanamicina en fermentación sólida.

- La producción de amilasa en medio sólido fué reprimida por glucosa al 4% y por glicerol al 2%, mientras que la producción de kanamicina fué reprimida por glucosa al 2% y por glicerol al 5%.

- A través de la formación de halos de hidrólisis de almidón es posible aislar mutantes insensibles a la represión catabólica por glucosa o glicerol.

- En las fermentaciones líquidas la glucosa ejerció un efecto represor mayor que el glicerol sobre la producción de amilasa en la cepa silvestre de S. kanamyceticus.

- La mutante 41 mostró ser insensible a la represión catabólica por glucosa para la producción de la enzima amilasa en fermentación líquida, mientras que la mutante E mostró ser insensible a la represión catabólica por glicerol.

- La mutante 29 en cambio mostró ser una mutante hiperproductora de amilasa ya que registró hasta 4.6 veces más actividad por unidad de biomasa que la cepa silvestre sin embargo, presentó el mismo comportamiento regulatorio que la cepa silvestre.

X. BIBLIOGRAFIA

- Adeleye, A. I. (1990) Purificación and properties of α -amylase from Micrococcus varians. J. Basic Microbiol. 30(10): 717-722.
- Andrews, K. J. and Lin, E. C. (1976) Selective advantages of varios bacterial carbohydrate transport mechanisms. Fed. Proceed. 35(10): 2185-89.
- Barredo, J. L., Alvarez, E. (1988) Glucokinasa deficient mutant of Penicillium chrysogenum is derepressed in glucose catabolite regulation of both β -galactosidase and penicillin biosynthesis. Antimicrob. Agents Chemother. 32(7): 1061-67.
- Bernfeld, P. (1955). Amylases, alpha and beta. Methods in Enzymology. 1, 149-158.
- Bróck, T.D. and Madigan, M.T. (1988) Biología de microorganismos. 5a. ed. Prentice Hall. New Jersey, E.U.A. pp. 173-200.
- Demain, A.L. (1985) Control of secondary metabolism in Actinomycetes. In: Goodfellow, M. (ed.) Sixth Int. Symp. on Actinomycetes Biology. U.S.A. pp: 215-225.
- Demain, A.L. y Solomon, N.A. (1981) Microbiología Industrial. Investigación y Ciencia. 62:11-20.
- Dills, S.S., Apperson, A. et al (1980) Carbohydrate transport in bacteria. Microbiol. Rev. 44(3):385-418.
- Emori, M., Takagi, M. et al (1990) Molecular Cloning, nucleotide sequencing and expression of the Bacillus subtilis (natto) IAM1212 α -amylase gene, wich encodes an α -amylase structurally similar to but enzymatically distinct from that of B. subtilis 2633. J. Bacteriol. 172(9):4901-4908.
- Fogarty, W.M. (1980) Amylases, amyloglucosidases and related glucanases. In: Rose, A.H. (Ed.) Microbial Enzymes and Bioconversions. Economic microbiology. Vol. 5 Academic Press London. pp. 115-170.
- Frazier, W.C. (1967) Food Microbiology. 2a ed. McGraw-Hill. Book Company. U.S.A.

- Gallo, M. and Katz, E. (1972) Regulation of secondary metabolite biosynthesis: catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J. Bacteriol.* 109(2):659-667.
- García-González, M.D., Martín, J.F. et al (1991) Characterization, expression in *Streptomyces lividans*, and processing of the amylase of *Streptomyces griseus* IMRU 3570: two different amylases are derived from the same gene by an intracellular processing mechanism. *J. Bacteriol.* 173(8): 2451-2458.
- Goldberg, J.D. and Edwards, C. (1990) Purification and characterization of an extracellular amylase from a thermophilic streptomycete. *J. Appl. Bacteriol.* 69(5): 712-717.
- Goodfellow, M.H. and Cross, T. (1984) *The Biology of Actinomycetes*. Academic Press, London. pp. 94-95.
- Goodfellow, M.H. and Gray, T.R.G. (1976) *Actinomycetes in the ecology of soil bacteria* (Parkinson, D. and Gray, T.R.G. Eds.) Liverpool University Press.
- Gräfe, U., Bormann, E.J. et al (1986) Mutants of *Streptomyces hygroscopicus* deregulated in amylase and α -glucosidase formation. *Biotechnol. Lett.* 8(9):615-620.
- Hodgson, D.A. (1982) Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-DOG. *J. Gen. Microbiol.* 128:2417-30.
- Henkin, T.M., Grundy, F.J. et al (1991) Catabolite repression of α -amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* lac I and gal R repressors. *Molec. Microbiol.* 5(3):575-584.
- Hopwood, D.A. (1988) Understanding the genetic control of antibiotic biosynthesis and sporulation in *Streptomyces*. In: Okami, Y. (Ed.) *Biology of Actinomycetes '88*. Japan. Scientific Societies Press, Tokyo. pp. 3-10.
- Hoshiko, S., Makabe, O. et al (1987). Molecular cloning and characterization of the *Streptomyces hygroscopicus* α -amylase gene. *J. Bacteriol.* 169(3):1029-36.

- Ichikawa, T., Date, M. et al (1971) Improvement of kasugamycin-producing strain by the piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol.* 16:218-224.
- Lewin, B. (1990) *Genes IV*. Oxford University Press and Cell Press. U.S.A. pp. 259-263.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N.J. et al (1951) *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Martín, J.F. and Demain, A.L. (1980) Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* 44:230-251.
- Mazieres, N., Peire, M. and Penasse, L. (1981). Interspecific recombination among aminoglycoside producing streptomycetes. *J. Antibiot.* 34, 544-550.
- Melasniemi, H. (1990) The α -amylase-pullulanase of *Clostridium thermohydrosulfuricum*. Academic Dissertation in General Microbiology. Helsinki. 88 pp.
- Nagata, Y., Yamaguchi, K. and Maruo, B. (1974) Genetic and biochemical studies on cell bound α -amylase in *Bacillus subtilis* Marburg. *J. Bacteriol.* 119(2):425-30.
- Norman, B.E. (1979) The application of polysaccharide degrading enzymes in the starch industry. In Berkeley, R.C.W. (Ed.) *Microbial Polysaccharases*. Academic Press, London. pp. 339-376.
- Phaff, H. J. (1981) *Microorganismos industriales. Investigación y ciencia.* 62,22-37.
- Priest, F.G. (1983) Enzyme synthesis: Regulation and process of secretion by microorganisms. In Fogarty, W. M. (Ed.) *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science Publishers. England. Chapter 7. pp. 319-366.
- Revilla, G. Ramos, F.R. et al (1986) Glucose represses formation of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine and isopenicillin N synthetase but not penicillin acyltransferase in *Penicillium chrysogenum*. 168(2):947-52.
- Saier, M.H. Jr. (1989) Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microbiol. Rev.* 53(1):109-120.

- Saito, N. and Yamamoto, K. (1975) Regulatory factors affecting α -amylase production in Bacillus licheniformis. J. Bacteriol. 121(3):848-56.
- Satoh, A. Ogawa, H. and Satomura, Y. (1976) Regulation of N-acetylkanamycin amidohydrolase in the idiophase in kanamycin fermentation. Agr. Biol. Chem. 40(1):191-96.
- Saunders, V.A. and Saunders, J.R. (1987) Microbial Genetics Applied to Biotechnology. Macmillan Publishing Company. New York.
- Umezawa, H. and Okanishi, M. (1978) Plasmids involved in antibiotic production in Streptomycetes. In: Freerksen, E., Tarnok, I. et al. Genetics of the Actinomycetes. Stuttgart Gustav Fischer Verlag. pp. 19-38.
- Vigal, T., Gil, J.A. et al (1991) Cloning, characterization and expression of an α -amylase gene from Streptomyces griseus IMRU 3570. Mol. Gen. Genet. 225(2):278-288.
- Vihinen, M. and Mantsala, P. (1989) Microbial Amilolytic Enzymes. In: Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 24(4):329-417.
- Vining, L.C. and Doull, J. L. (1988) Catabolite repression of secondary metabolism in Actinomycetes. In: Okami, Y. (Ed.) Biology of Actinomycetes '88. Japan Scientific Societies Press. Tokio. pp. 400-411.
- Virolle, M.J. and Bibb, M.J. (1988) Cloning, characterization and regulation of an α -amylase gene from Streptomyces limosus. Molec. Microbiol. 2(2):197-208.
- Wang, D.I., Cooney, Ch. L. et al (1979) Fermentation & Enzyme Technology. John Wiley & Sons. U.S.A. pp. 1-56.
- Weickert, M.J. and Chambliss, G.H. (1989). Genetic analysis of the promoter region of the Bacillus subtilis α -amylase gene. J. Bacteriol. 171(7): 3656-66.
- Williams, S.T., Goodfellow, M. et al (1983) Numerical classification of Streptomyces and related genera. J. Gen. Microbiol. 129:1743-1813.
- Wood, W.E., Newbauer, D.G. and Stutzenberger, F.J. (1984) Cyclic AMP levels during induction and repression of cellulase biosynthesis in Thermomonospora curvata. J. Bacteriol. 160(3):1047-54.