



03021

6 2oj

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

REGULACION NITROGENADA DE LA BIOSINTESIS DE  
ERITROMICINA POR SACCHAROLYPOSPORA ERYTHREA

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A

MA. ELENA DEL CARMEN FLORES CARRASCO

1988

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN



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.

## INDICE

	PAGINA
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....	1
ABREVIATURAS .....	4
RESUMEN .....	5
INTRODUCCION .....	6
ANTECEDENTES	
REGULACION POR NITROGENO DE LA BIOSINTESIS DE LOS ANTIBIOTICOS .....	10
ASIMILACION DE AMONIO .....	14
ERITROMICINA .....	16
BIOSINTESIS DE ERITROMICINA .....	18
GENETICA DE <u>Saccharolypospora erythrea</u> .....	28
OBJETIVO .....	31
MATERIAL Y METODOS .....	32
RESULTADOS .....	40
DISCUSION .....	77
CONCLUSIONES .....	89
BIBLIOGRAFIA .....	91

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	PAGINA
FIGURA 1. Estructura química de las principales eritromicinas producidas por <u>Saccharolypospora erythrea</u> .....	17
FIGURA 2. Vía biosintética de las eritromicinas producidas por <u>Saccharolypospora erythrea</u> .....	20
FIGURA 3. Formación de propionil CoA por la degradación de valina, treonina, isoleucina y metionina.....	22
FIGURA 4. Localización del bloqueo generado por cada uno de los tipos de mutantes <u>ery</u> .....	29
FIGURA 5. Mapa genético de <u>Saccharolypospora erythrea</u> NRRL 2338.....	30
FIGURA 6. Método de selección de las mutantes dereguladas de la biosíntesis de eritromicina del efecto negativo ejercido por el amonio.....	38
FIGURA 7. Perfiles de crecimiento, producción específica de eritromicina y concentración de iones amonio en el medio de cultivo de <u>Saccharolypospora erythrea</u> NRRL 2338 .....	41
FIGURA 8. Crecimiento máximo, producción específica máxima y pH final en función de la concentración de amonio .....	42
FIGURA 9. Efecto de diferentes concentraciones de sulfato y nitrato de amonio .....	43
FIGURA 10. Producción específica de eritromicina en el sistema de células en reposo .....	45
FIGURA 11. Efecto del amonio y cloranfenicol sobre la producción de eritromicina .....	50
FIGURA 12. Crecimiento, producción específica y consumo de amonio en el medio adicionado de propionato ..	51
FIGURA 13. Crecimiento, producción específica y perfiles de actividad de cinasa y carboxilasa .....	54

FIGURA 14. Separación de eritromicinas producidas por <u>S. erythrea</u> NRRL 2338 I .....	55
FIGURA 15. Separación de eritromicinas producidas por <u>S. erythrea</u> CA 340 I .....	57
FIGURA 16. Separación de eritromicinas producidas por <u>S. erythrea</u> NRRL 2338 II .....	58
FIGURA 17. Separación de eritromicinas producidas por <u>S. erythrea</u> CA 340 II .....	60
FIGURA 18. Difusión de la eritromicina producida en los cilindros de agar .....	62
FIGURA 19. Perfiles de actividad de glutamina sintetasa en glicina y amonio .....	65
FIGURA 20. Perfiles de actividad de glutamina sintetasa en ác. glutámico y glutamina .....	67
FIGURA 21. Perfiles de actividad de glutamato sintasa en glicina y amonio .....	69
FIGURA 22. Perfiles de actividad de alanina deshidrogenasa y glutamato deshidrogenasa .....	71
FIGURA 23. Efecto de la adición de metilamina sobre la producción de eritromicina .....	76
TABLA 1. Antibióticos cuya biosíntesis es regulada por amonio .....	11
TABLA 2. Actividad de propionato cinasa y Km hacia propionato .....	24
TABLA 3. Producción específica de eritromicina en diferentes concentraciones de amonio .....	47
TABLA 4. Efecto del amonio sobre las sintetetasas de eritromicina .....	48
TABLA 5. Producción de eritromicina en el sistema de células en reposo .....	52
TABLA 6. Producción de eritromicina por las mutantes insensibles a amonio .....	63

TABLA 7. Niveles de glutamina sintetasa y producción específica de eritromicina .....	68
TABLA 8. Niveles de alanina deshidrogenasa en diferentes fuentes de nitrógeno .....	72
TABLA 9. Actividad de glutamina sintetasa y alanina deshidrogenasa en las mutantes .....	73
TABLA 10. Efecto de los aminoácidos sobre la síntesis de eritromicina .....	75

## ABREVIATURAS

ADH	Alanina deshidrogenasa.
ADP	Adenosina difosfato.
GOGAT	Glutamato sintasa.
GS	Glutamina sintetasa.
MC	Medio completo.
MM	Medio mínimo.
NADH-GDH	Nicotinadenin dinucleótido glutamato deshidrogenasa.
NADPH-GDH	Nicotinadenin dinucleótido fosfato glutamato deshidrogenasa.
NTG	N-metil-N'-Nitro-N-nitrosoguanidina.
SCR	Sistema de células en reposo.

## RESUMEN

La biosíntesis de los antibióticos por los microorganismos es regulada por diversos mecanismos entre los que destaca la regulación nitrogenada. Así encontramos que la producción de cefamicina, leucomicina, penicilina, novobiocina y candihexina por mencionar algunos ejemplos, es regulada por la presencia de iones amonio en el medio de cultivo.

Por otro lado, la eritromicina es un antibiótico macrólido no poliénico que se sintetiza a partir de una molécula de propionil CoA y seis de metil malonil CoA por un mecanismo de condensación similar al de la síntesis de ácidos grasos. Es un antibiótico de gran importancia comercial y es producido por varios microorganismos siendo Saccharolysopora erythraea con el que se han obtenido mejores rendimientos. Se produce en México por varios laboratorios sin embargo no se satisface la demanda teniendo que importarse más de 21 toneladas anuales. Por lo tanto es deseable mejorar el proceso. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue el estudiar la regulación nitrogenada de la biosíntesis de eritromicina en S. erythraea y los resultados obtenidos mostraron que el amonio reprime a las enzimas que participan en la biosíntesis del antibiótico; que la asimilación del amonio procede vía glutamina sintetasa-glutamato sintasa cuando se utilizó glicina como fuente de nitrógeno y a través de NADH-glutamato deshidrogenasa cuando se adicionó 100 mM de cloruro de amonio al medio de cultivo. La síntesis de glutamina sintetasa se reprime por el amonio adicionado, mientras que los niveles de glutamato sintasa obtenidos en cualquiera de las dos fuentes de nitrógeno mencionadas fueron similares. La alanina deshidrogenasa estuvo también presente en los extractos obtenidos al crecer el microorganismo tanto en glicina como en cloruro de amonio. No se encontró correlación alguna entre estas enzimas y la producción de eritromicina, descartándose que pudieran estar actuando como efectores de la regulación catabólica nitrogenada. Por último, se aislaron mutantes insensibles a la represión por amonio que producen más eritromicina que la cepa original.

## INTRODUCCION.

Los microorganismos son capaces de sintetizar una gran variedad de compuestos que son comercialmente importantes. Entre éstos, los antibióticos han atraído el interés por muchos años, inclusive aún en la actualidad. Su diversidad y complejidad, su presencia en cantidades detectables en un número de diferentes especies y el hecho de que todavía no se les puede atribuir una función definida, los han hecho objeto de investigación en numerosos grupos científicos (MALIK, 1982; DEMAIN, 1984).

Como cualquier otro evento realizado por los microorganismos, la biosíntesis de los antibióticos está finamente controlada por diversos mecanismos, algunos como la inhibición o la represión por retroalimentación son los mejor conocidos. Otros han sido poco estudiados, como es el caso de la represión por la fuente de carbono, por la fuente de fosfatos o por la fuente de nitrógeno (MARTIN & DEMAIN, 1980). En este último caso se ha reportado recientemente que el amonio puede ejercer un efecto negativo sobre la producción de muchos antibióticos como la cefalosporina (BRAÑA et al., 1985), la cefamicina, novobiocina, candihexina, ác. fusídico (MARTIN & DEMAIN, 1980; AHARONOWITZ, 1980), cerulenina, bacitracina y leucomicina entre otros (OMURA & TANAKA, 1984). La producción de estos antibióticos se ve disminuída cuando se

adicionan iones amonio al medio de cultivo en concentraciones que van de 2-250 mM.

El mecanismo regulatorio ejercido en todos los casos en que se ha estudiado ha sido represión aunque a diferentes niveles. En la biosíntesis de cefalosporina por Streptomyces clavuligerus y por Cephalosporium acremonium se observó represión de algunas de las enzimas que participan en la síntesis del antibiótico. Por otro lado, en Streptomyces fradiae, microorganismo productor de tilosina, la represión se lleva a cabo a un nivel previo a la biosíntesis de esta. El amonio reprime a las enzimas encargadas de la generación de los ácidos propiónico y butírico, precursores de la tilosina (OMURA et al., 1924b; TANAKA et al., 1985).

A la fecha se desconoce si el amonio per se o un producto de su metabolismo lleva a cabo el efecto represivo. Algunos autores han propuesto que la regulación está mediada por la enzima glutamina sintetasa, ya que se ha observado que cuando existen bajos niveles de esta enzima no hay producción de antibiótico, y por el contrario, condiciones que permiten altos niveles de la glutamina sintetasa son favorables para la producción de estos compuestos (AHARONOWITZ, 1980).

Estos datos indujeron al estudio de la asimilación del amonio y su regulación en estreptomicetos encontrándose que algunos de ellos lo asimilan vía glutamina sintetasa-glutamato sintasa o a través de la glutamato deshidrogenasa; otros carecen de esta última

enzima y la asimilación procede únicamente por la glutamina sintetasa, ya que la alanina deshidrogenasa, al menos en Streptomyces clavuligerus no actúa en la asimilación del amonio como se pensaba (BRAÑA et al., 1986b).

Por otro lado, la eritromicina es un antibiótico macrólido no poliénico de 13 átomos de carbono, cuya síntesis se lleva a cabo mediante la condensación de una molécula de propionil CoA y seis moléculas de metilmalonil CoA. Durante la biosíntesis se incorporan azúcares como la micarosa y la desosamina para generar diferentes intermediarios (CORCORAN, 1981). En lo que se refiere a su regulación se ha reportado que la biosíntesis de eritromicina es reprimida por glucosa (ESCALANTE et al., 1982), sin embargo no existe antecedente alguno sobre la regulación por la fuente de nitrógeno.

Desde el punto de vista comercial, la eritromicina es un antibiótico muy importante, ya que es el de elección contra infecciones producidas por estreptococos, estafilococos y pneumococos, por lo cuál se consumen grandes cantidades anualmente de este compuesto, en diversas presentaciones farmacéuticas. En México, la eritromicina es producida por Laboratorios Fermic y Laboratorios Abbott. Sin embargo, la demanda ha superado la producción y a la fecha se siguen importando cantidades considerables de este antibiótico. En 1986 se importaron 21,877 kg de eritromicina base y sus sales, con un costo de \$886 millones, por lo que resulta deseable aumentar la producción nacional para

cubrir totalmente el mercado. El conocer los mecanismos regulatorios que se ejercen sobre la biosíntesis de eritromicina permitiría aún mejorar, tanto las cepas productoras que actualmente se utilizan a nivel industrial, siguiendo estrategias bien dirigidas para la selección de mutantes o por el otro lado, mejorar los procesos de producción optimizando los medios de cultivo para lograr un mayor rendimiento. Esto se podría lograr manteniendo las relaciones apropiadas de carbono/nitrógeno y de los otros componentes del medio de cultivo.

En este sentido se consideró importante determinar si la biosíntesis de eritromicina en Saccharolypospora erythrea, antes Streptomyces erythreus, era regulada por la fuente de nitrógeno, a que nivel se ejercía el efecto y si éste estaba mediado por la enzima glutamina sintetasa.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo mostraron que la producción de eritromicina es reprimida por el amonio presente en el medio de cultivo, que la regulación se ejerce después que los precursores han sido formados, a través de la represión de las enzimas que participan en la biosíntesis de eritromicina a partir de la eritronólido sintetasa. Se encontró que la glutamina sintetasa no es el efector del fenómeno sino el amonio per se. Además, se aislaron mutantes resistentes a la regulación por amonio con una mayor producción de eritromicina.

## ANTECEDENTES

### REGULACION POR NITROGENO DE LA BIOSINTESIS DE LOS ANTIBIOTICOS.

La producción de los antibióticos está finamente regulada por diversos mecanismos entre los que destaca la represión catabólica por nitrógeno.

Muchos son los ejemplos de antibióticos, como la tilosina, penicilina, cefalosporina, ac. clavulánico, nurseotricina, nanaomicina, leucomicina, espiramicina, cerulenina y candihexina entre otros que son afectados negativamente por la presencia de iones amonio en el medio de cultivo. Las concentraciones que afectan son muy diversas pero se puede decir que van de 10 a 250 mM (Tabla 1).

En todos los casos en los que se ha estudiado más a fondo se ha encontrado que el fenómeno regulatorio que se lleva a cabo es el de represión, ya sea de una o varias enzimas a la vez. En Streptomyces lactamdurans se observó que el amonio reprime a la isopenicilina N sintetasa (ciclasa), la deacetoxicefalosporina C sintetasa (expandasa) y a la isopenicilina N epimerasa (epimerasa). Además se encontró que los niveles intracelulares del tripéptido

TABLA 1. Antibióticos cuya biosíntesis es regulada por amonio.

Antibiótico	Microorganismo productor.	Referencia
Ac. clavulánico	<i>S. clavuligerus</i>	ROMERO et al. 1984.
Antraciclina	<i>S. peucetius</i>	DEKLEVA et al. 1985.
Cefamicina C	<i>S. clavuligerus</i>	BRAÑA et al. 1985.
	<i>S. cattleya</i>	LILLEY et al. 1981.
	<i>S. lactamdurans</i>	CASTRO et al. 1985.
Cefalosporina	<i>A. chrysogenum</i>	SHEN et al. 1984.
Cerulenina	<i>C. caerulens</i>	MASUMA et al. 1982.
Cloranfenicol	<i>S. venezuelae</i>	SHAPIRO & VINING 1985.
Eritromicina	<i>S. erythrea</i>	FLORES & SANCHEZ 1985.
Espiramicina	<i>S. ambofaciens</i>	OMURA et al. 1980b.
Gilvocarcina V	<i>S. arenae</i>	BYRNE & GREENSTEIN 1986.
Leucomicina	<i>S. kitasatoensis</i>	TANAKA et al. 1981.
Lincomicina	<i>S. lincolnensis</i>	YOUNG et al. 1985.
Maridomicina	<i>S. hygrosopicus</i>	OMURA et al. 1980.
Nanaomicina	<i>S. rosa</i>	TANAKA et al. 1984.
Nourseotricina	<i>S. noursei</i>	GRAFE et al. 1977.
Novobiocina	<i>S. niveus</i>	KOMINEK 1972.
Penicilina	<i>P. chrysogenum</i>	SANCHEZ et al. 1981.
Rifamicina SV	<i>N. mediterranei</i>	NI et al. 1984.
Tilosina	<i>S. gradiae</i>	TANAKA et al. 1986.

delta-(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina fueron más bajos en cultivos conteniendo amonio. Por lo tanto, los autores proponen que la mayoría de las enzimas de la vía biosintética de cefamicina están reguladas por amonio en forma coordinada (CASTRO et al., 1985).

En contraste en Streptomyces clavuligerus únicamente se reprimieron la ciclasa y la expandasa en presencia de amonio. Se observó también que los niveles de la primera enzima determinados en un sistema de células en reposo correlacionaron con el grado de regulación ejercido por el amonio (BRANA et al., 1985). Por otro lado SHEN et al. (1984) reportaron únicamente represión de la expandasa en Cephalosporium acremonium.

En los ejemplos anteriores, las enzimas afectadas son propiamente las que participan en la biosíntesis de los antibióticos, sin embargo en la producción de tilosina por Streptomyces fradiae, el amonio afecta la generación de los precursores del antibiótico, los ácidos propiónico y butírico, reprimiendo a las enzimas que los generan por degradación de valina y treonina (TANAKA et al., 1985). La valina deshidrogenasa (OMURA et al., 1983) y la treonina desaminasa (OMURA & TANAKA, 1985) son las enzimas afectadas, por lo tanto el  $\alpha$ -cetoisovalerato y el isobutirato, productos de las reacciones que catalizan las enzimas mencionadas, revirtieron el efecto causado por el amonio. La generación de ácidos grasos de cadena corta a partir de succinato también es afectada por el amonio, indicando que el control

regulatorio no se restringe al metabolismo de compuestos nitrogenados. En Streptovercillium kitasatoensis también se ha reportado represión por amonio de la valina deshidrogenasa afectándose de esta manera la biosíntesis de leucomicina (OMURA & TANAKA, 1985).

Un mecanismo totalmente diferente es el que se presenta en la regulación nitrogenada de la biosíntesis de nurseotricina por Streptomyces noursei. En este caso el amonio controla el cambio entre dos estados metabólicos. En altas concentraciones de amonio, se favorece el catabolismo de aminoácidos y la represión de la NADP-glutamato deshidrogenasa anabólica, a la vez que hay una baja producción de nurseotricina. Por el contrario, en bajas concentraciones de amonio se presenta una alta actividad de GDH y una alta síntesis del antibiótico. Además del amonio, otros factores como la adición de ác. o-aminobenzoico pueden influir en la interconversión entre los dos tipos de metabolismo (GRAFE et al., 1978; 1980; 1981).

Por otro lado, el amonio puede estimular la producción de ciertos antibióticos. Tal es el caso de la biosíntesis de estreptomina por Streptomyces griseus en donde altas concentraciones de amonio adicionados al medio de cultivo provocan una mayor producción del antibiótico. Se ha propuesto que el efecto se debe a una acumulación intracelular de glutamato, lo que permite que haya suficiente aminoácido para que actúe en la donación de grupos amino para la biosíntesis de estreptomina durante la fase

de producción (INOUE et al., 1983).

De acuerdo a estos reportes, el amonio no tiene un sitio definido de acción para ejercer su efecto regulatorio.

#### ASIMILACION DE AMONIO.

La asimilación de amonio en actinomicetos ocurre a través del sistema glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.1.2)/ glutamato sintasa (GOGAT; EC 1.4.7.1) o a través de la glutamato deshidrogenasa (GDH; EC 1.4.1.4) dependiendo de la concentración de los iones amonio en el medio de cultivo.

En Streptomyces venezuelae (SHAPIRO & VINING, 1983), en S. noursei (GRAFE et al., 1977), en Streptomyces cattleya (STREICHER & TYLER, 1981; PARESS & STREICHER, 1985), en S. clavuligerus (AHARONOWITZ, 1978; BRAÑA et al., 1986b) y en Nocardia mediterranei (NI et al, 1984) se ha reportado la presencia del sistema GS/GOGAT.

NADPH-GDH sólo se ha reportado en S. noursei (GRAFE et al., 1977) y NADH-GDH en S. venezuelae (SHAPIRO & VINING, 1983). En S. clavuligerus no se ha detectado actividad con ninguno de los dos compuestos.

Alanina deshidrogenasa (ADH; EC 1.4.1.1), enzima que se ha postulado como vía alterna de asimilación de amonio se ha detectado en S. clavuligerus, Saccharolypospora erythrea, S. venezuelae, y N. mediterranei (AHARONOWITZ & FRIEDRICH, 1980; ROSKOWSKI et al., 1969; SHAPIRO & VINING, 1983; NI et al., 1984). Sin embargo se ha observado en S. clavuligerus que esta enzima no actúa en la asimilación de amonio, ya que mutantes GOGAT<sup>-</sup> no son capaces de crecer en amonio a pesar de tener niveles normales de ADH (BRAÑA & DEMAIN, 1988). Esto confirma que el sistema GS/GOGAT es la única vía de asimilación de amonio en este microorganismo.

La regulación de estas enzimas parece ser muy diversa, ya que no en todos los casos sigue el comportamiento reportado para enterobacterias o Bacillus (TYLER, 1978; DEUEL et al., 1970; HASHIMORI et al., 1974). En S. venezuelae, los niveles de GS y ADH fueron relativamente insensibles a cambios en la velocidad de crecimiento y disminución de la fuente de nitrógeno. GDH y GOGAT, por otro lado, mostraron alta actividad en cultivos con alto contenido de amonio y disminuyeron con fuentes de nitrógeno pobres, o cuando la concentración de amonio disminuye (SHAPIRO & VINING, 1983).

GS y GOGAT en S. clavuligerus también son insensibles a la presencia de iones amonio, mientras que ADH es inducida por altas concentraciones de este compuesto. Sin embargo, ADH no actúa en la asimilación del  $\text{NH}_4^+$  por lo que la inducción debe ser inespecífica (BRAÑA et al., 1986b).

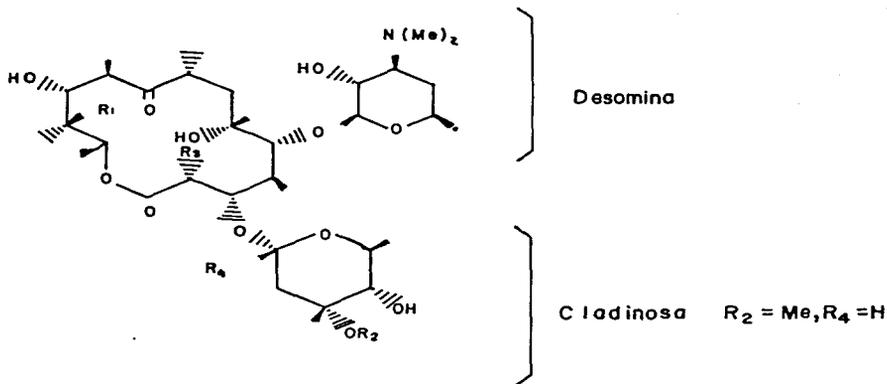
En S. erythrea se ha observado que ADH es inducida también por amonio, por alanina y otros aminoácidos y los niveles de la enzima disminuyen al final de la etapa logarítmica de crecimiento. La glucosa reprime catabólicamente su síntesis y se le ha atribuido un papel importante en la generación de piruvato para la síntesis de eritromicina (ROSKOWSKI et al., 1969).

### ERITRONICINA.

La eritromicina descubierta en 1952 (WELCH et al., 1952) es un antibiótico macrólido no poliélico producido por S. erythrea, antes Streptomyces erythraeus, por Streptomyces griseoplanus, Arrobacter, Micromonospora y Streptomyces olivocromogenes (McGUIRE et al., 1952; THOMPSON & STRONG, 1971; FRENCH et al., 1970; WAGMAN & WEINSTEIN, 1980; HIGASHIDE et al., 1965).

Su estructura química consiste en un anillo lactónico macrocíclico constituido por un átomo de oxígeno y trece átomos de carbono. Además, tiene azúcares no comunes como la desosamina, micarosa y cladinosa (Fig. 1). En realidad, S. erythrea produce 6 eritromicinas cuya composición química es muy similar pero su actividad como antibiótico difiere (OLEINICK, 1975; MARTIN et al., 1975).

FIG. 1. Estructura química de las principales eritromicinas producidas por Saccharolypospora erythrea.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Eritromicina A	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
Eritromicina B	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
Eritromicina C	OH	H	CH <sub>3</sub>	H
Eritromicina D	H	H	CH <sub>3</sub>	H
Eritromicina E	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	O
Eritromicina F	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	H
Eritronólido B	H	--	CH <sub>3</sub>	--

La eritromicina A es la más importante comercialmente ya que es el antibiótico de elección contra infecciones estreptocóccicas, estafilocóccicas y pneumocóccicas, aunque también inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas. Su acción bacteriostática se debe a que interacciona con la subunidad 50 S del ribosoma, impidiendo la continuidad de la síntesis de proteínas (TAUBMAN et al., 1966; TANAKA & TERAOKA, 1966; OLEINICK & CORCORAN, 1969).

La actividad biológica de la eritromicina depende de dos factores que son la acumulación intracelular y la unión a los ribosomas. Los microorganismos Gram-positivos son más sensibles a la eritromicina A que los gram-negativos debido a que acumulan mayores niveles del antibiótico (MAO & PUTTERMAN, 1968). La unión a los ribosomas depende de la estructura del antibiótico y del RNA ribosomal (PETSKA et al., 1976). La lactona intacta y los dos azúcares son requeridos para la actividad biológica (WILHELM et al., 1969). La eritromicina estimula la disociación del peptidil tRNA de los ribosomas, probablemente durante la translocación (MENNINGER & OTTO, 1982).

#### BIOSÍNTESIS DE LA ERITROMICINA.

La biosíntesis de eritromicina es a la fecha conocida y se inicia con la formación de la aglicona conocida como eritronólido,

la cuál surge de la condensación de una molécula de propionil CoA y seis moléculas de metilmalonil CoA (Fig. 2) (CORCORAN 1975; 1977).

La biosíntesis propiamente se inicia con la activación del propionato y la carboxilación del mismo para generar metilmalonil CoA, el otro precursor. El propionato se puede generar del metabolismo oxidativo del piruvato (vía succinato) a través de la siguiente reacción



(1) Metilmalonil CoA mutasa

(2) 2 metilmalonil CoA piruvato transcarboxilasa

También se puede generar por la degradación de los ácidos grasos de número impar de átomos de carbono y del metabolismo de algunos aminoácidos (isoleucina, valina, treonina y metionina) (Fig. 3). En la realidad, la fuente fisiológica de propionato variará de acuerdo a las condiciones experimentales. Sin embargo, en una fermentación con glucosa como única fuente de carbono, la mayor parte del propionato usado para la formación de la eritromicina parece ser derivada de la degradación de aminoácidos de cadena ramificada (BUTTE & CORCORAN, 1963).

La activación del propionato ocurre mediante la acción de la propionato cinasa y la acilfosfotransferasa generándose propionil CoA.

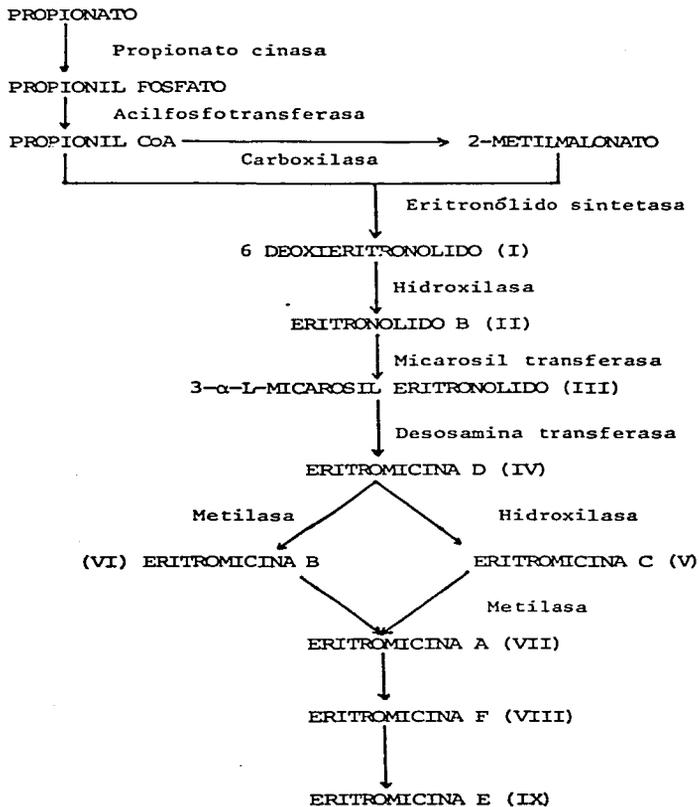


FIG. 2. Vía biosintética de las eritromicinas producidas por Saccharolypospora erythrea.

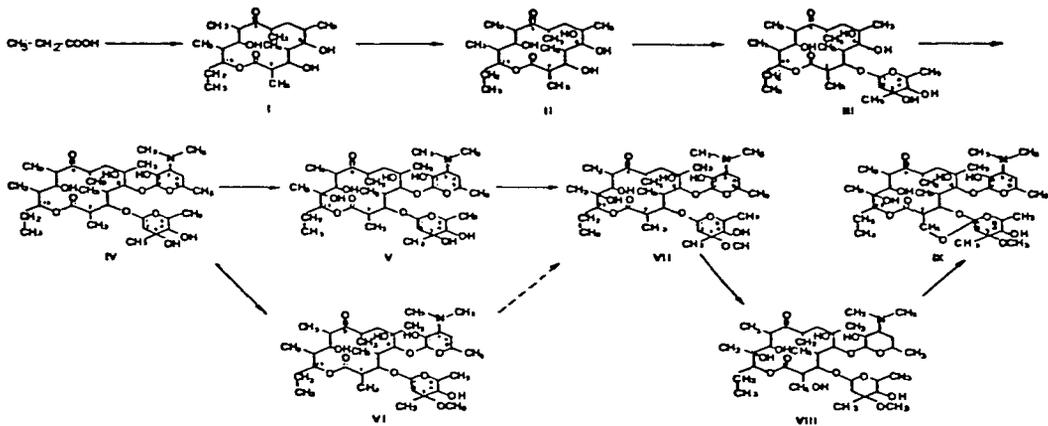


FIG. 2. CONTINUACION.

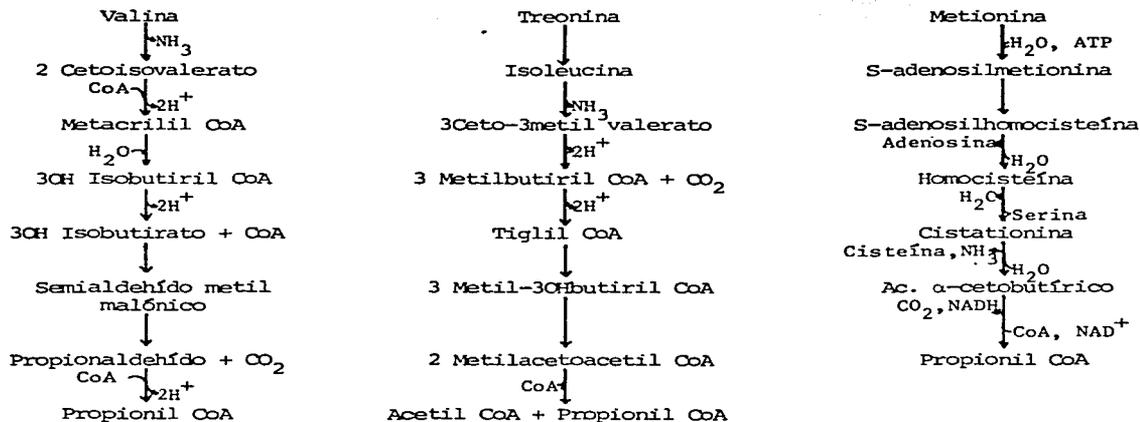


FIG. 3. Formación de propionil CoA por la degradación de valina, treonina, isoleucina y metionina.

Fuente: MARTIN (1981); LEHNINGER (1975).

La propionato cinasa (fosfotransferasa adenosinatrifosfato (ATP): acetato, EC 2.7.2.1) ha sido reportada como el paso limitante en la formación del antibiótico (RACZYNSKA-BOJANOWSKA et al., 1970), ya que mutantes hiperproductoras de eritromicina presentan mayor actividad y un Km menor hacia propionato que cepas de menor producción (Tabla 2) (RACZYNSKA-BOJANOWSKA et al., 1973). Además, la actividad específica de la propionato cinasa se incrementa en las últimas etapas del crecimiento de S. erythrea, exactamente cuando la acumulación de eritromicina ocurre.

El segundo precursor, el metil malonato se puede generar a través de la acción de la propionil CoA carboxilasa (Propionil-CoA, carbodióxido ligasa, EC 6.4.1.3), utilizando propionil CoA, dióxido de carbono y ATP como sustratos. Otra forma de generarlo es a través de la interconversión entre propionil CoA y metilmalonil CoA por una transcarboxilasa. RACZYNSKA-BOJANOWSKA et al. (1970; 1976) han estudiado estas dos rutas de generación de metilmalonato y han descartado a la transcarboxilasa como una enzima importante en la biosíntesis de eritromicina.

La principal forma de generación de metilmalonil CoA es entonces la carboxilación de propionil CoA por la enzima carboxilasa (sensible a avidina), cuya actividad es dependiente del tiempo de fermentación en S. erythrea CA 340. Además, se ha demostrado también que la eritromicina no inhibe la actividad de esta enzima y que presenta un pico máximo de actividad entre las

TABLA 2. Actividad de Propionato cinasa y Km hacia propionato en tres mutantes con diferente nivel de producción de eritromicina.

---

CEPA	Eritromicina	Actividad	Km
I	100%	100%	$5 \times 10^{-4}$
II	30	41	N.D.
III	8	34	$5 \times 10^{-3}$

---

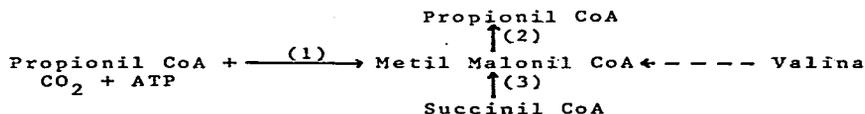
Fuente: RACZYNSKA-BOJANOWSKA et al. (1973).

N.D. No determinado

30-40 horas de fermentación aproximadamente (CORCORAN, 1981).

CORCORAN (1981) ha purificado a esta enzima y ha encontrado que tiene un comportamiento similar al de otras carboxilasas obtenidas de diversas fuentes. La propionil CoA carboxilasa de S. erythrea CA 340 es específica para propionil CoA, requiere ATP y iones magnesio y es inhibida fuertemente por avidina, iodoacetamida y p-cloromercuribenzoato. A diferencia de los resultados obtenidos por RACZYNSKA-BOJANOWSKA et al. (1970), no se encontró activación cuando citrato es añadido al sistema de reacción. Sin embargo la activación por propanol se mantiene.

Por lo que respecta a la formación de metilmalonil CoA a partir de succinil CoA, por la acción de la metilmalonil CoA mutasa (metilmalonil-CoA:piruvato carboxiltransferasa, EC 2.1.3.1), se descarta como una fuente importante de este compuesto, ya que la actividad máxima de esta enzima se presenta en las primeras 24 horas de fermentación para desaparecer posteriormente, mientras que la síntesis de eritromicina es lineal después de las primeras horas de fermentación hasta las 96 horas inclusive (RACZYNSKA-BOJANOWSKA et al., 1970).



(1) Carboxilasa

(2) Transcarboxilasa

(3) Metil malonil CoA Mutasa

El siguiente paso en la biosíntesis de eritromicina por S. erythraea es la condensación de los precursores para formar el 6-deoxieritronólido. Esta reacción se lleva a cabo por la enzima denominada eritronólido sintetasa. La síntesis del anillo puede ocurrir de una manera similar a la biosíntesis de los ácidos grasos saturados a partir de acetato y malonato. Se ha intentado purificar esta enzima que se supone es muy similar a la sintetasa de ácidos grasos (ROSSI & CORCORAN, 1973), inclusive la eritronólido sintetasa es inhibida por cerulenina, un antibiótico inhibidor específico de la sintetasa de ácidos grasos en muchos microorganismos (OMURA, 1976). Recientemente, ROBERTS & LEADLEY (1983) reportaron la síntesis de [3H] tetrahidrocerulenina y su uso en la purificación parcial y ensayo de la eritronólido sintetasa de S. erythraea CA 340. Sin embargo no se han determinado todavía sus características bioquímicas.

El 6-deoxieritronólido es subsecuentemente hidroxilado para formar el eritronólido B. La enzima responsable de esta reacción es la C-6 eritronólido hidroxilasa, cuya actividad ha sido detectada en extractos libres de células. Su actividad es dependiente de la edad del micelio con un máximo entre las 12 y 20 horas de crecimiento. La enzima en forma pura ha mostrado la presencia de, al menos tres componentes proteícos, además del citocromo P448. La actividad de esta enzima es inhibida por el producto de la reacción (CORCORAN, 1981).

La incorporación de los azúcares L-micarosa y D-desosamina a la molécula de eritronólido B no ha sido demostrada en extractos libres de células o en experimentos con micelio intacto, sin embargo, los intermediarios resultado de la incorporación de los azúcares (3- $\alpha$ -micarosil eritronólido y la eritromicina D) se han identificado como precursores de la eritromicina A (Fig. 2).

La hidroxilación de la eritromicina D ocurre por la actividad de la C-12 hidroxilasa que no parece depender del citocromo P448. Es una enzima asociada a la fracción membranosa del micelio y es precipitada por sulfato de amonio a niveles bajos de saturación (0-40%) (CORCORAN & VIGANTAS, 1977).

El último paso para la biosíntesis de la eritromicina A consiste en la metilación de la eritromicina C por la enzima S-adenosil-L-metionina (SAM): eritromicina C(o)-metil transferasa. La metilación en la misma posición de la eritromicina D para formar eritromicina B es llevada a cabo por esta misma enzima. Ambas reacciones son inhibidas por los productos, es decir, eritromicinas B y A (CORCORAN, 1975; CORCORAN & MAJER, 1975; MAJER et al., 1974; 1977).

Acercas de la transformación de la eritromicina B en A, a la fecha permanece en la obscuridad si en realidad ocurre esta reacción, ya que solo MARTIN & GOLDSTEIN (1970) trabajando con mutantes reportan esta reacción; sin embargo los intentos por detectar una C-12 hidroxilasa que utilice como sustrato a la

eritromicina B han sido fallidos (CORCORAN, 1981).

#### GENETICA DE SACCHAROLYPOSPORA ERYTHREA.

El aislamiento de mutantes no productoras ha permitido obtener información acerca de la localización de los genes que codifican para la biosíntesis de eritromicina A por este microorganismo. WEBER et al. (1985) han reportado el aislamiento de 4 tipos de mutantes (A,B,C,D) bloqueadas en la etapa temprana de la biosíntesis (Fig. 4). Las mutaciones ery A bloquean la formación del 6-deoxieritronólido; las mutaciones ery B y ery D causaron la acumulación del eritronólido B y las mutaciones ery C provocaron la acumulación del 3- $\alpha$ -L-micarosil eritronólido. Estos mismos autores han construido un mapa genético muy rudimentario de este microorganismo (Fig. 5) y dos de las mutantes del tipo A mapean consistentemente en la misma región. Por otro lado, datos preliminares con mutantes del tipo B o D no apoyan una localización única para estos genes, aunque es más probable una localización cromosomal (SENO & HUTCHINSON, 1986).

Debido a que se han aislado plásmidos de diferentes tamaños de S. erythrea NRRL 2338, a que éstos pueden aparecer como secuencias integradas en el cromosoma y a que existe alguna homología de secuencias entre los plásmidos, se ha pensado que su aparición se debe a integración frecuente, escisión y rearreglo de un número

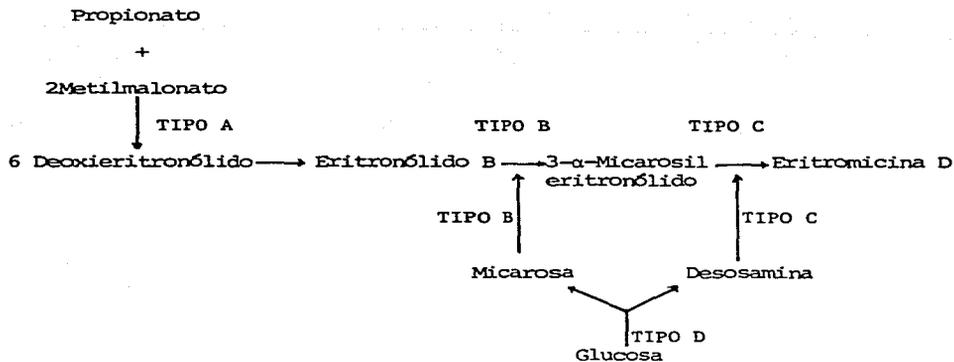


FIG. 4. Localización del bloqueo generado por cada uno de los tipos de mutantes ery.

FUENTE: SENO & HUTCHINSON (1986)

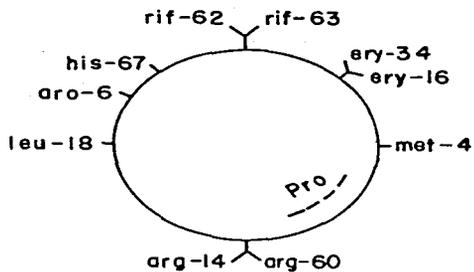


FIG. 5. Mapa Genético de *Saccharolypospora erythrea* NRRL 2338. Las distancias entre las mutaciones son estimado imprecisos.

Fuente: WEBER et al. (1985).

discreto de plasmidos replicándose en forma autónoma (WANG et al., 1982; CZERNICK et al., 1983; SENO & HUTCHINSON, 1986). Estos datos podrían explicar la falta de la localización única de las mutaciones ery B y ery D, aunque para fines prácticos los genes se localizan en el cromosoma.

#### OBJETIVO.

Estudiar la regulación nitrogenada de la biosíntesis de eritromicina en Saccharolypospora erythrea, localizar el sitio de acción del amonio e identificar al efector del fenómeno.

## MATERIAL Y METODOS

Microorganismos: Saccharolypospora erythrea NRRL 2338 y CA 340 cepas silvestres fueron proporcionadas por ARS Culture Collection, U.S. Department of Agriculture, U.S.A. y Abbott Labs., North Chicago, U.S.A. respectivamente.

Condiciones de cultivo: Los microorganismos fueron crecidos en medio mínimo (MM), el cual contiene 20 g de sacarosa, 2.0 g de glicina, 2.5 g de  $K_2HPO_4$ , 5.0 de NaCl, 0.5 g de  $MgSO_4$ , 0.5 g de  $FeSO_4$ , 0.05 g de  $ZnSO_4$ , 1 mg de  $MnCl_2$  y 1 mg de  $CoCl_2$  por cada 1000 ml de solución amortiguadora 0.1 M de ácido 3-(N-morfolino-)propansulfónico (MOPS) pH 7.8. En todos los casos, 50 ml de MM contenidos en matraces erlenmeyer de 250 ml fueron inoculados con 2 ml de micelio precrecido en medio completo (MC; 4.0 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de malta, 4.0 g de glucosa por 1000 ml de solución 0.1 M de MOPS pH 7.0) durante 24 horas. La incubación se llevó a cabo a 29°C con agitación rotatoria (160 rev  $min^{-1}$ ). Se tomaron muestras de 2 ml para la medición de crecimiento, eritromicina, pH y amonio.

Medición del crecimiento: El micelio se lavó dos veces con agua destilada y se resuspendió en dos ml de ac. tricloroacético 0.3 M. Se centrifugó durante 5 min a 6,000 rev  $min^{-1}$  y el sedimento se resuspendió en 1 ml de NaOH 0.4 M. Se agitó vigorosamente y la

concentración de proteína se determinó por el método de Lowry, utilizando albúmina sérica bovina como estándar (LOWRY et al., 1951).

Cuantificación de eritromicina: El antibiótico se cuantificó por bioensayo utilizando Sarcina lutea NRRL B-1018 como microorganismo de prueba, de acuerdo a la metodología reportada por AHARONOWITZ & DEMAIN (1979), utilizando eritromicina comercial Sigma como estándar en un rango de concentraciones de 0.75 a 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Sistema de células en reposo: 30 ml de un inóculo crecido en MC, como ya se especificó anteriormente, se adicionó a 500 ml de MC contenidos en matraces Fernbach e incubados a 29°C con agitación por 24 h. El micelio fue recuperado por centrifugación, lavado con dos volúmenes de agua destilada y resuspendido en 25 ml del sistema de células en reposo, el cual consistió en 500 mg de NaCl y 50 mg de  $\text{MgSO}_4$  por 1000 ml de solución MOPS 0.1 M pH 7.8. El cloranfenicol (50  $\mu\text{g/ml}$ ),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5.4 mg/ml) y la cerulenina (25  $\mu\text{g/ml}$ ) se esterilizaron por filtración a través de membranas Millipore tipo HAWP 02500, y se adicionaron al sistema ya estéril. El micelio se concentró a la mitad del volumen original. La biomasa y la eritromicina se cuantificaron de acuerdo a la metodología antes citada. Cuando se adicionó cloranfenicol, la eritromicina se cuantificó previa extracción del medio con cloroformo.

Medición de las actividades de propionil CoA carboxilasa y propionato cinasa: 500 ml de MC contenidos en un matraz Fernbach

fuern inoculados con 30 ml de micelio precrecido durante 24 horas en el mismo medio. A los diferentes tiempos de incubación a 29°C con agitación, los 500 ml de medio se centrifugaron a 10,000 rev min<sup>-1</sup> a 0°C durante 10 min. El micelio se lavó dos veces con solución amortiguadora de extracción (Tris.HCl 0.05 M pH 8.0 con 10 mM de  $\beta$ mercaptoetanol), se resuspendió en el mínimo volúmen de la misma solución y se rompió el micelio en un homogeneizador Braun durante 40 s a 0°C. Se centrifugó a 15000 rev min<sup>-1</sup> para separar los restos celulares y el sobrenadante se utilizó para las determinaciones enzimáticas.

La actividad de propionato cinasa se determinó de acuerdo a la metodología reportada por RACZYNSKA-BOJANOWSKA et al. (1973). El sistema de reacción estuvo formado por 350  $\mu$ moles de KOH, 350  $\mu$ moles de hidroxilamina, 100  $\mu$ moles de propionato de sodio, 5  $\mu$ moles de ATP, 25  $\mu$ moles de Tris.HCl pH 8.1, 5  $\mu$ moles de MgCl<sub>2</sub> y de 5-6 mg de proteína en un volumen final de un ml. La reacción se inició por la adición de ATP y se incubó a 40°C por 5 a 30 min. El propionil fosfato formado se cuantificó como Fe /propionilhidroxamato.

La actividad de propionil CoA carboxilasa se determinó de acuerdo a la metodología reportada por RACZYNSKA-BOJANOWSKA et al., (1970). El sistema de reacción contuvo 50  $\mu$ moles de Tris.HCl pH 8.0, 1  $\mu$ mol de glutatión reducido, 2  $\mu$ moles de MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ mol de ATP, 25  $\mu$ moles de KHCO<sub>3</sub>, 50  $\mu$ moles de KCl, 0.5  $\mu$ moles de propionil CoA y de 2-6 mg de proteína. La reacción se inició por la adición de ATP y se incubó 15 min a 30°C. La actividad se cuantificó por la

formación de fósforo inorgánico que se cuantificó por el método de JONES (1944).

Preparación de los extractos para las mediciones de GS, GOGAT, GDH

y ADH: El microorganismo se creció por 24 h a 29°C en MC. 30 ml de este cultivo se utilizaron como inóculo de 500 ml de MM contenidos en un matraz Fernbach y éste se incubó a 29°C con agitación rotatoria ( $175 \text{ rev min}^{-1}$ ). A los diferentes intervalos de tiempo, el micelio se recuperó por centrifugación a 0°C, se lavó dos veces con solución amortiguadora de extracción (5 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 mM EDTA y 50 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$  pH 7.4), se resuspendió en el mínimo volumen de la misma solución y se rompió en un homogeneizador Braun por 40 s a 0°C. Después de centrifugar a  $16,000 \text{ rev min}^{-1}$  para eliminar restos celulares, el sobrenadante fue utilizado para las determinaciones enzimáticas.

Determinación de la actividad de glutamina sintetasa: La actividad por la reacción de  $\gamma$ -glutamyl transferasa se llevó a cabo de acuerdo a la metodología reportada por FERGUSON & SIMS (1974). La mezcla de reacción consistió de 0.3  $\mu\text{moles}$  de ADP, 16  $\mu\text{moles}$  de glutamina, 0.014  $\mu\text{moles}$  de arsenato de sodio, 4  $\mu\text{moles}$  de hidroxilamina.HCl, 112  $\mu\text{moles}$  de tris.acetato pH 7.4 y 0.4-0.6 mg de proteína en un volumen final de 0.6 ml. Después del tiempo de incubación (30-90 s a 30°C), se añadieron 0.5 ml de una solución de  $\text{Fe}^{3+}$ /ác. tricloroacético. El precipitado proteico se eliminó por centrifugación y la absorbancia del sobrenadante se midió a 540 nm en un espectrofotómetro Bausch and Lomb Spectronic 21. Un

incremento en absorbancia de 0.035 correspondió a una  $\mu\text{mol}$  de producto.

La actividad por sintetasa se midió en un sistema que consistió de 62  $\mu\text{moles}$  de solución amortiguadora de imidazol pH 7.4, 9  $\mu\text{moles}$  de hidroxilamina.HCl, 0.5  $\mu\text{moles}$  de EDTA, 30  $\mu\text{moles}$  de L-glutamato, 80  $\mu\text{moles}$  de  $\text{MgSO}_4$ , 7  $\mu\text{moles}$  de ATP y 0.8-1.2 mg de proteína en un volumen final de 0.6 ml. Se desarrolló color de la misma manera que cuando se determinó la actividad por transferasa.

Determinación de la actividad de glutamato sintasa: Se utilizó el método de MEERS et al. (1970) y las concentraciones en la mezcla de reacción fueron 5  $\mu\text{moles}$  de glutamina, 5  $\mu\text{moles}$  de 2-cetoglutarato, 25  $\mu\text{moles}$  de Tris.HCl pH 8.0, 0.15  $\mu\text{moles}$  de NADH y 0.8-1.2 mg de proteína en un volumen final de un mililitro. La reacción se inició por la adición de glutamina y el descenso en la absorbancia a 340 nm fue registrado a 25°C.

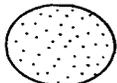
Determinación de la actividad de glutamato deshidrogenasa: Se determinó de acuerdo al método reportado por MEERS et al. (1970). Las concentraciones en la mezcla de reacción fueron 20  $\mu\text{moles}$  de 2-cetoglutarato, 90  $\mu\text{moles}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.5  $\mu\text{moles}$  de NADH o NADPH, 25  $\mu\text{moles}$  de Tris.HCl pH 8.0 y 0.8-1.2 mg de proteína en un volumen final de un mililitro. Se registró el descenso en la absorbancia a 340 nm a 25°C.

Determinación de la actividad de alanina deshidrogenasa: Se realizó de acuerdo al método reportado por ROSKOWSKI et al. (1969). Las concentraciones en la mezcla de reacción fueron 0.5  $\mu$ moles de NADH, 20  $\mu$ moles de piruvato de sodio, 90  $\mu$ moles de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 25  $\mu$ moles de Tris.HCl pH 8.0 y 0.4-0.6 mg de proteína en un volumen final de un mililitro. Se registró el descenso en la absorbancia a 340 nm a 25° C.

Aislamiento de las mutantes insensibles a la represión por amonio:  $10^7$  esporas de S. erythrea fueron mutagenizadas con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) (3 mg/ml) de acuerdo a la metodología reportada por DELIC et al. (1970). Después de una hora de exposición a la NTG se tuvo un 95% de muerte. De las sobrevivientes se obtuvieron colonias aisladas, las cuales se sembraron por estría en MC con 100 mM de cloruro de amonio y se incubaron a 29° C. 24 horas después se cortaron cilindros de agar de cada una de las colonias y se colocaron sobre una capa de medio para bioensayo conteniendo Sarcina lutea. Se mantuvieron las cajas a 4° C durante la noche para permitir la difusión del antibiótico y al cabo de ese tiempo se incubaron a 29° C por 24 h. Se seleccionaron aquellas colonias que presentaron halo de inhibición del crecimiento de S. lutea alrededor del cilindro de agar (Fig. 6).

Preparación de los extractos para la cromatografía en placa fina: El microorganismo fue crecido en MM con glicina (20 mM) o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100 mM) como fuentes de nitrógeno. A las 24, 48 y 72 horas el

ESPORAS MUTAGENIZADAS



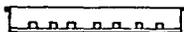
MEDIO COMPLETO



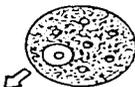
MEDIO COMPLETO CON  
100 mM  $\text{NH}_4\text{CL}$   
INCUBACION A 29°C POR 2-3 DIAS



CILINDROS DE AGAR



BIOENSAYO SARCINA LUTEA



MUTANTE  
DERREGULADA

FIG. 6. Método de selección de las mutantes derreguladas de la biosíntesis de eritromicina del efecto negativo ejercido por el amonio.

micelio se separó del medio (50 ml) y a éste se le ajustó el pH a 9.0 con NaOH 10 N. Se realizaron dos extracciones con cloroformo y se evaporó a sequedad. Los cristales formados se redisolviéron en 1 ml de cloruro de metileno y se aplicaron 10  $\mu$ l a las placas de gel de sílice. Estas se desarrollaron en 2 sistemas de solventes diferentes, cloruro de metileno-metanol-hidróxido de amonio (90:10:1 v/v) y cloruro de metileno-metanol-benceno-formamida (80:20:20:2 v/v) (CORCORAN, 1981). Las placas se revelaron con p-anisaldehído-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-etanol (1:1:20 v/v).

Determinación de amonio: Se realizó en el medio de cultivo previa separación del micelio, de acuerdo al método de WEATHERBURN (1967).

Presentación de los datos y reproducibilidad: Los experimentos mostrados en cada figura fueron repetidos al menos una vez para confirmar reproducibilidad. Además todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado y se presenta la media de los resultados.

## RESULTADOS.

La biosíntesis de eritromicina por S. erythrea creciendo en MM con sacarosa y glicina se inició a partir de las 12 h de fermentación y continuó por 36 horas aproximadamente de una manera asociada al crecimiento. La producción específica empezó a declinar al mismo tiempo que el crecimiento se detuvo. Cuando se sustituyó la glicina por  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , la velocidad de crecimiento de este microorganismo fue ligeramente mayor y la biomasa total también fue mayor, sin embargo la producción de eritromicina fue 4 veces menor con respecto al valor obtenido en glicina (Fig. 7). Al crecer a este microorganismo en diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  se observó que la producción del antibiótico estuvo en función inversa con respecto a la concentración de la sal de amonio, notándose un efecto negativo desde 10 mM. Esta disminución en la biosíntesis del antibiótico no se debió a modificaciones en el pH del medio de cultivo ni a un crecimiento menor como se puede observar en la Fig. 8. Por otro lado, al crecer a S. erythrea en otras sales de amonio (sulfato y nitrato) también se observó un efecto negativo sobre la producción del antibiótico (Fig. 9).

El amonio pudo haber ejercido el efecto negativo por diversas razones. Una de ellas podría ser la estimulación de una enzima que hidrolizara a la eritromicina. Otra sería que estuviera impidiendo de alguna manera la excreción del antibiótico o que actuara

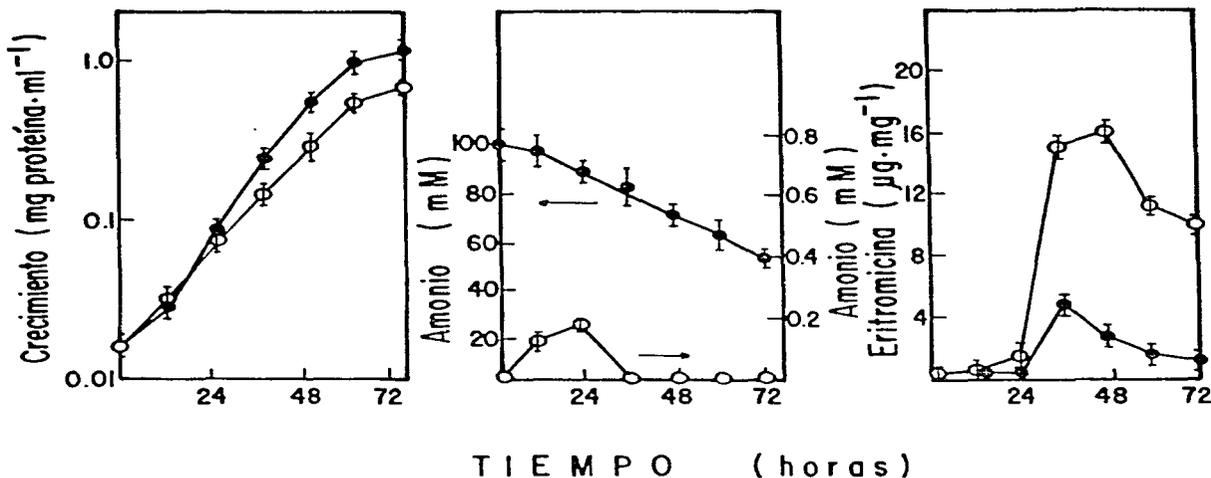


FIG. 7. Perfiles de crecimiento, producción específica de eritromicina y concentración de iones amonio en el medio de cultivo de *Saccharolysopora erythrea* NRRL 2338 adicionado de 20 mM de glicina (○) o 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (●) como fuentes de nitrógeno. El microorganismo fue crecido en MM con agitación ( $160 \text{ rev min}^{-1}$ ) a  $29^\circ\text{C}$ . A los diferentes tiempos se tomaron muestras para la determinación de biomasa, eritromicina y amonio de acuerdo a la metodología antes señalada.

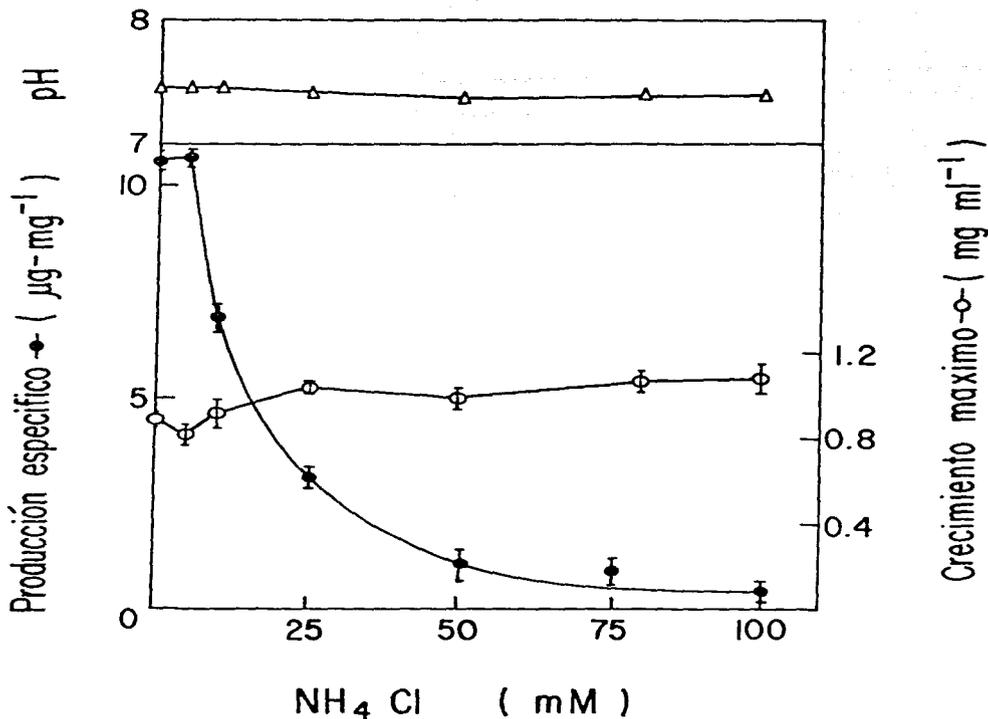


FIG. 8. Crecimiento máximo (o), producción específica máxima (●) y pH final del medio de cultivo de *Saccharolypospora erythroa* NRRL 2338 en función de la concentración de cloruro de amonio.

50 ml de MM con cada una de las concentraciones de cloruro de amonio fueron inoculados con 2 ml de micelio precrecido en MC durante 24 h e incubados con agitación a 29°C. Se reporta el valor de crecimiento, de eritromicina y pH obtenidos a las 48 h de incubación.

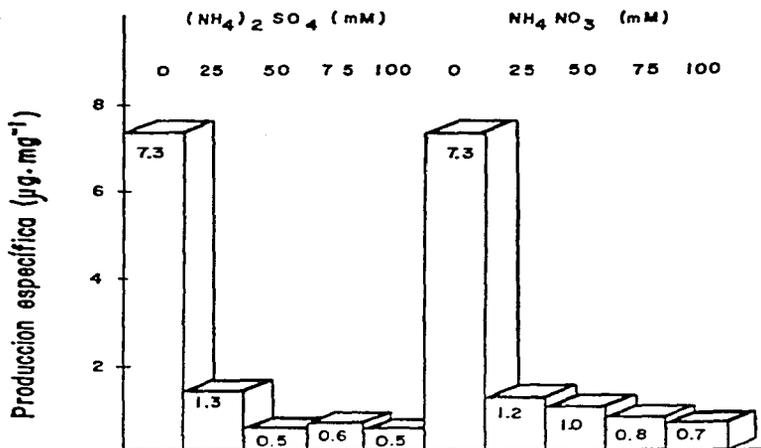


FIG. 9. Efecto de diferentes concentraciones de sulfato y nitrato de amonio sobre la producción específica de eritromicina. 50 ml de MM con la fuente de nitrógeno señalada se inocularon con dos mililitros de micelio precrecido en MC y se incubaron a 29°C con agitación. Se tomaron muestras cada 24 horas y se cuantificó la biomasa y la eritromicina de acuerdo a la metodología antes citada. Se reportan los valores obtenidos a las 48 horas de fermentación.

reprimiendo la síntesis o inhibiendo la actividad de las enzimas que participan en la biosíntesis de la eritromicina o de las que generan a los precursores del antibiótico i.e. ács. propiónico y metilmalónico. Aunque las dos primeras alternativas eran poco probables se hicieron los experimentos pertinentes para descartarlas (datos no mostrados).

En virtud de que el amonio ni estimuló la hidrólisis de la eritromicina ni impidió su excreción, se procedió a discriminar entre las otras posibilidades.

A través de un sistema de células en reposo, en donde el microorganismo ya no crece pero se mantiene viable y es capaz de sintetizar antibiótico, se pudo determinar si el amonio estaba actuando como un inhibidor. Para ésto se creció a S. erythrea en medio completo durante 24 h y se transfirió el micelio al sistema de células en reposo. Bajo estas condiciones, la producción del antibiótico ocurre durante 24 horas por lo que es posible determinar si existía inhibición de las enzimas ya preformadas. En la fig. 10 se observan los resultados obtenidos al adicionar cloruro de amonio (100 mM), cloranfenicol (50 µg/ml), un inhibidor de la síntesis de proteínas o cerulenina (25 µg/ml), un inhibidor de la eritronólido sintetasa. Como era de esperarse, la cerulenina a esta concentración casi no permitió la síntesis de eritromicina (11% con respecto al control). El cloranfenicol, el amonio y la mezcla de ambos afectaron de manera similar la síntesis del antibiótico. Estos resultados indicaron que el microorganismo en el

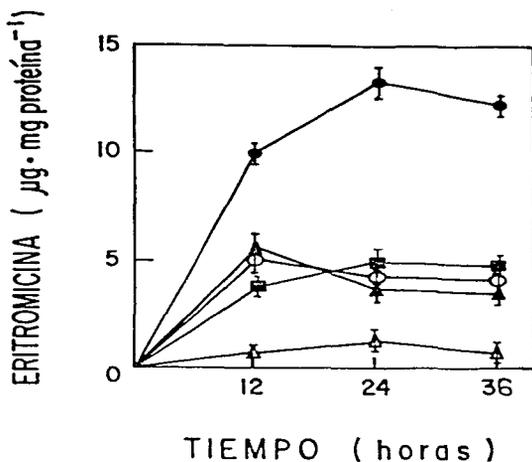


FIG. 10. Producción específica de eritromicina en el sistema de células en reposo adicionado de 100 mM NH<sub>4</sub>Cl (○), 50 µg/ml de cloranfenicol (▲), 25 µg/ml de cerulenina (△), 100 mM de NH<sub>4</sub>Cl + 50 µg/ml de cloranfenicol (■) y el control (●). El micelio obtenido después de 24 h de crecimiento en MC fué recuperado, lavado con dos volúmenes de agua y resuspendido en 25 ml del sistema de células en reposo. Se incubó con agitación a 29°C y se tomaron muestras cada 12 h para las mediciones de biomasa y eritromicina.

sistema de células en reposo todavía es capaz de llevar a cabo síntesis de proteínas, ya que en presencia de cloranfenicol, la síntesis del antibiótico fue menor y fue debida a las enzimas preformadas durante el crecimiento en medio completo. Los resultados obtenidos al adicionar amonio y amonio en presencia de cloranfenicol sugieren que el amonio no inhibió la actividad de las enzimas preformadas, aunque existía la posibilidad de que la concentración adicionada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no fuera la suficiente para afectar totalmente la producción de antibiótico. Esto se descartó adicionando concentraciones de la sal tres veces mayores al sistema de células en reposo. En la tabla 3 se puede observar que concentraciones mayores de 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  tuvieron un efecto negativo similar. Por lo tanto se descartó que el amonio estuviera actuando como un inhibidor de las sintetasas de eritromicina o de las enzimas que forman a los precursores.

Esta alternativa nuevamente se descartó a través de un experimento en donde micelio precrecido en medio completo fue transferido al sistema de células en reposo bajo dos condiciones. El control y otra en presencia de 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; al cabo de 4 horas, se lavó el micelio y se resuspendió en el sistema de células en reposo con cloranfenicol para impedir la síntesis de proteínas de novo. La producción de eritromicina se determinó 6 horas después. Los resultados mostraron que el amonio no permitió la síntesis del antibiótico a pesar de haberlo eliminado del sistema mientras que en el control si hubo producción de eritromicina (Tabla 4).

TABLA 3. Producción específica de eritromicina en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de amonio adicionadas al sistema de células en reposo.

---

	Producción específica µg/mg proteína
Control	9.0±0.5 <sup>1</sup>
25 mM NH <sub>4</sub> Cl	3.9±0.1
50 mM	3.7±0.1
75 mM	3.5±0.2
100 mM	4.0±0.1
200 mM	3.2±0.5
300 mM	4.1±0.3

---

El microorganismo fué crecido en MC durante 18 h a 29°C. Al cabo de ese tiempo el micelio fué lavado dos veces con agua destilada y resuspendido en el sistema de células en reposo. La determinación de eritromicina se realizó a las 12 h después de la transferencia.

<sup>1</sup>Desviación estándar

TABLA 4. Efecto de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100mM) sobre las sintetetasas de eritromicina. El microorganismo fué crecido 18 horas en medio completo y se transfirió al SCR y SCR + 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Al cabo de 4 h se lavó el micelio y se resuspendió en SCR conteniendo 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de clm. La determinación de eritromicina se realizó 6 horas después.

Condición	Producción de eritromicina ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)
SCR	2.08 $\pm$ 0.2 <sup>1</sup>
SCR + $\text{NH}_4\text{Cl}$	0.00

Los resultados son el promedio de experimentos por duplicado.

<sup>1</sup>Desviación estándar.

De igual forma, la adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  o cloranfenicol a un cultivo de S. erythrea creciendo en medio completo y habiendo iniciado la síntesis del antibiótico, permitieron que ésta continuara durante 6 horas más a diferencia del testigo que siguió produciendo hasta las 36 horas de fermentación (Fig. 11). Todos estos resultados indicaron que el amonio no estaba inhibiendo sino que estaba reprimiendo a las enzimas que participan en la biosíntesis de eritromicina o estaba reprimiendo la síntesis del propionato o metilmalonato, los dos principales precursores del eritronólido.

Si el efecto se llevara a cabo por una disminución en la formación de los precursores, las adiciones de propionato o metilmalonato deberían revertir el efecto del amonio. Sin embargo, la adición de 50 mM de propionato de sodio al tiempo cero o a las 24 horas de fermentación a un cultivo crecido en 50 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no revirtió el efecto negativo (Fig. 12). Tampoco la adición de diferentes concentraciones de propionato (20-60 mM) al sistema de células en reposo, en donde se evitaría que el propionato se canalizara hacia metabolismo primario, revirtieron el efecto sobre la producción de eritromicina (Tabla 5). En virtud de estos resultados, el amonio debía actuar sobre las enzimas involucradas en la síntesis del antibiótico directamente.

Las primeras enzimas consideradas como parte de la vía biosintética de eritromicina son la cinasa del propionato y la

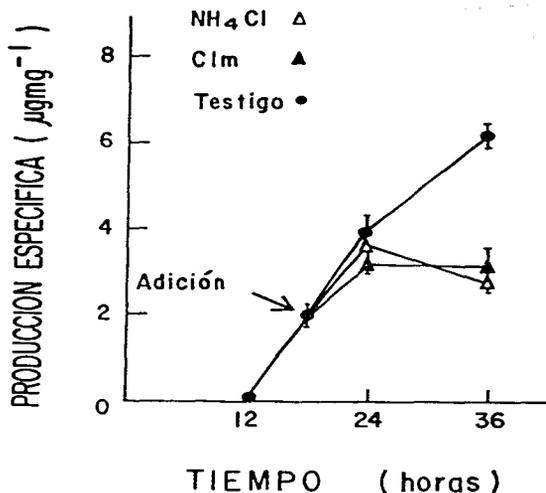


FIG. 11. Efecto del  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100 mM) y cloranfenicol (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) sobre la producción de eritromicina por *S. erythraea*. 200 ml de MC fueron inoculados con 8 ml de micelio precrecido en el mismo medio. Se incubaron con agitación a  $29^\circ\text{C}$  y a las 18 h de crecimiento se adicionaron el cloranfenicol y el cloruro de amonio. Se tomaron muestras a diferentes tiempos para las mediciones de biomasa y eritromicina.

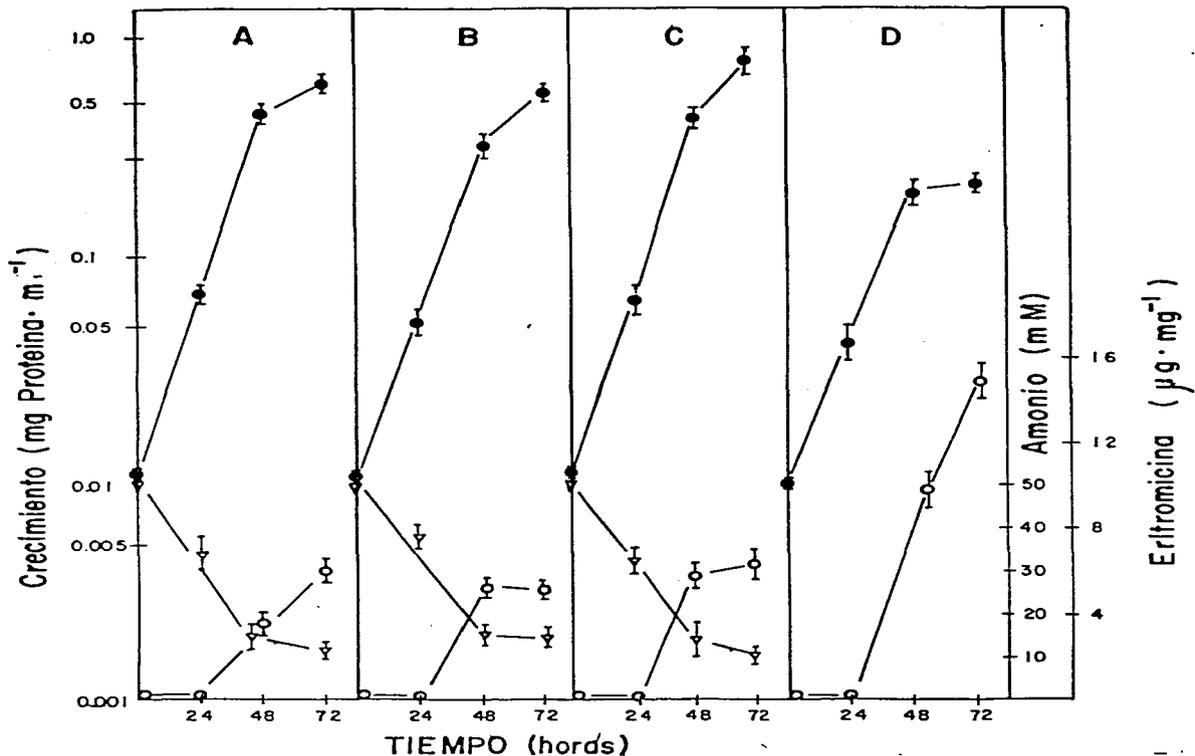


FIG. 12. Crecimiento de *S. erythraea* (●), producción específica de eritromicina (○) y consumo de iones amonio (▼) en el medio de cultivo adicionado de A) 50 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; B) 50 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  + 50 mM de propionato adicionado al tiempo cero; C) 50 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  + 50 mM de propionato adicionado a las 24 h y D) control con 20 mM de glicina. 50 ml de MM con sacarosa como fuente de carbono y la fuente de nitrógeno señalada fueron inoculados con 2 ml de micelio precrecido en MC e incubados con agitación a 29°C. Se tomaron muestras cada 24 horas para las mediciones de crecimiento, eritromicina y amonio de acuerdo a la metodología señalada anteriormente.

**TABLA 5. Producción de eritromicina en el sistema de células en reposo adicionado de diferentes concentraciones de propionato.**

Condición	Producción específica ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)
Control	11.5 $\pm$ 0.2 <sup>1</sup>
20 mM Propionato	9.0 $\pm$ 0.7
40 mM Propionato	15.5 $\pm$ 0.4
60 mM Propionato	13.0 $\pm$ 0.2
$\text{NH}_4\text{Cl}$ 100 mM	4.5 $\pm$ 0.9
$\text{NH}_4\text{Cl}$ + 20 mM Propionato	5.0 $\pm$ 0.5
$\text{NH}_4\text{Cl}$ + 40 mM Propionato	4.8 $\pm$ 0.3
$\text{NH}_4\text{Cl}$ + 60 mM Propionato	4.9 $\pm$ 0.1

El microorganismo fué crecido en MC durante 24 horas con agitación a 29°C. Al cabo del tiempo se lavó el micelio dos veces y se resuspensió en el sistema de células en reposo. Nuevamente se incubó con agitación a 29°C. La determinación de eritromicina se realizó a las 12 horas después de la transferencia.

<sup>1</sup>Desviación estándar.

carboxilasa del propionil CoA (Fig. 2). La primera incorpora un grupo fosfato al propionato para posteriormente generar propionil CoA y la segunda lo carboxila para formar el metilmalonil Co A. Se intentó determinar la actividad de cinasa y carboxilasa en la cepa NRRL 2338 crecida en medio mínimo con glicina como fuente de nitrógeno. Sin embargo no fue posible detectar ninguna de las dos actividades. Por lo tanto se creció al microorganismo en medio completo para aumentar la producción de antibiótico y por consiguiente la actividad de las enzimas. Aún así no se logró detectar actividad de carboxilasa en esta cepa. Ante esta situación, se decidió utilizar la cepa CA 340 cuya producción de eritromicina es 3-4 veces mayor y también es reprimida por amonio. Los resultados se pueden observar en la Fig. 13 y mostraron que ninguna de las dos enzimas fue reprimida por amonio. Por lo tanto el efecto debe situarse sobre las siguientes enzimas de la ruta biosintética de la eritromicina, las cuales debido a la carencia de los intermediarios fue imposible determinarlas.

Sin embargo, indirectamente por cromatografía en placa fina, desarrollando con dos sistemas de solventes se podía observar si alguno de los intermediarios se acumulaba. En el primer sistema de solventes que consistió en cloruro de metileno, metanol e hidróxido de amonio (90:10:1 v/v), se separaron principalmente las eritromicinas A, B, C y D. En la fig. 14 se muestran los resultados obtenidos y se puede observar que en la cepa NRRL 2338 crecida en MM con glicina como fuente de nitrógeno, se detectaron las eritromicinas hasta las 72 h, mientras que cuando el amonio fue

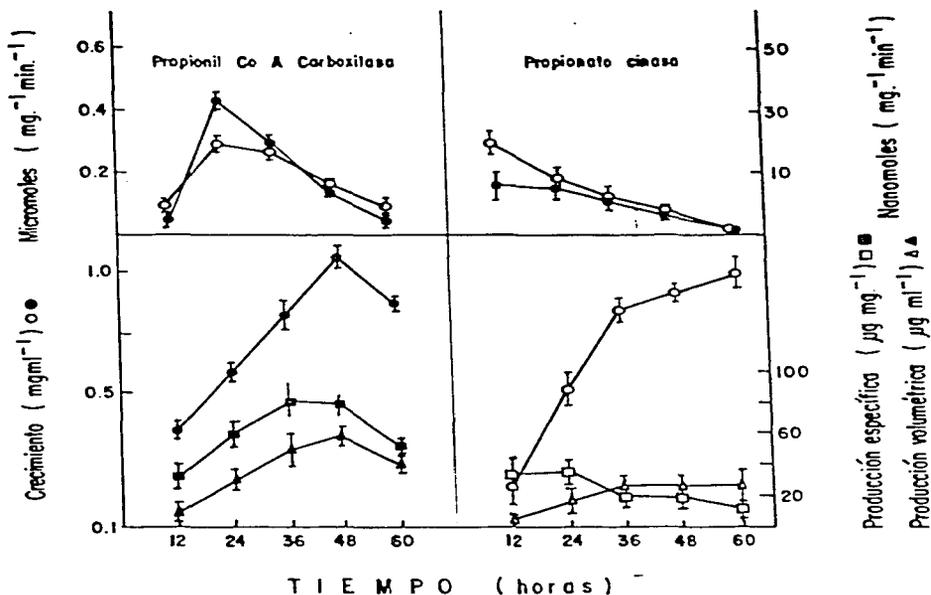


FIG. 13. Cinética de crecimiento de *S. erythraea* CA 340, de producción de eritromicina y perfiles de actividad de propionato cinasa y propionil CoA carboxilasa en medio completo (símbolos cerrados) y medio completo con 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (símbolos abiertos).

200 ml de MC fueron inoculados con 8 ml de micelio precrecido en el mismo medio e incubados a 29°C con agitación. A los tiempos marcados se tomaron muestras de 2 ml para las mediciones de crecimiento y eritromicina y el micelio del medio que quedó se separó por centrifugación y se prepararon los extractos libres de células como se especifica en Material y Métodos.



FIG. 14. Separación de las eritromicinas producidas por S. erythraea NRRL 2338 por cromatografía en placa fina.

- Carril 1 MM a las 24 h de fermentación.  
 Carril 2 MM a las 48 h de fermentación.  
 Carril 3 MM a las 72 h de fermentación.  
 Carril 4 Estándar de eritromicina comercial Abbott.  
 Carril 5 MM con 100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a las 24 h de fermentación.  
 Carril 6 MM con 100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a las 48 h de fermentación.  
 Carril 7 MM con 100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a las 72 h de fermentación.  
 Carril 8 Estándar de eritromicina comercial Abbott.

50 ml de MM para cada condición fueron inoculados con 2 ml de micelio precrecido en MC e incubados a 29°C con agitación. A los tiempos señalados se separó el micelio del caldo de cultivo y el pH de éste se ajustó a 9.8 con NaOH 10 M. Las eritromicinas se extrajeron entonces con 2 volúmenes de cloroformo, el cuál se evaporó a sequedad. Las muestras se disolvieron con 1 ml de cloruro de metileno y se aplicaron 10  $\mu\text{l}$  en las placas de gel de sílice Merck. El sistema de solventes utilizado fué cloruro de metileno, metanol, hidróxido de amonio (90:10:1 v/v) y se revelaron con p-anisaldehído.

EA Eritromicina A  
 EB Eritromicina B

EC Eritromicina C  
 ED Eritromicina D

utilizado, las manchas correspondientes a las eritromicinas disminuyeron notablemente en concentración. Hay que mencionar que las diferentes eritromicinas dan un color característico al revelar con p-anisaldehído, por lo que por su color y por el Rf relativo a eritromicina A se detectaron fácilmente.

En la cepa CA 340 se detectaron las eritromicinas desde las 24 h, incrementándose en concentración conforme pasaba el tiempo de incubación. En el medio de cultivo de esta cepa aparecen manchas adicionales que no se lograron detectar en la cepa NRRL 2338, probablemente por encontrarse en muy baja concentración. Sin embargo, al adicionar  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en lugar de la glicina, todas disminuyeron en concentración nuevamente (Fig. 15).

En el segundo sistema de solventes (cloruro de metileno-metanol-benceno-formamida, 80:20:20:2.5 v/v), el micarosil eritronólido y el eritronólido E migran más rápidamente que las eritromicinas, por lo que fue fácil detectar la producción de estos compuestos en el medio de cultivo. En la fig. 16 se muestran los resultados obtenidos con la cepa NRRL 2338 crecida en glicina y se puede observar que el eritronólido y el micarosil eritronólido se lograron detectar desde las 48 h de incubación, siendo más clara la mancha correspondiente al primer compuesto. Cuando el microorganismo fue crecido en cloruro de amonio, las manchas correspondientes a estos compuestos disminuyeron notablemente en concentración. Las eritromicinas se desplazaron menos en este sistema de solventes y su separación fue muy deficiente, pero aún

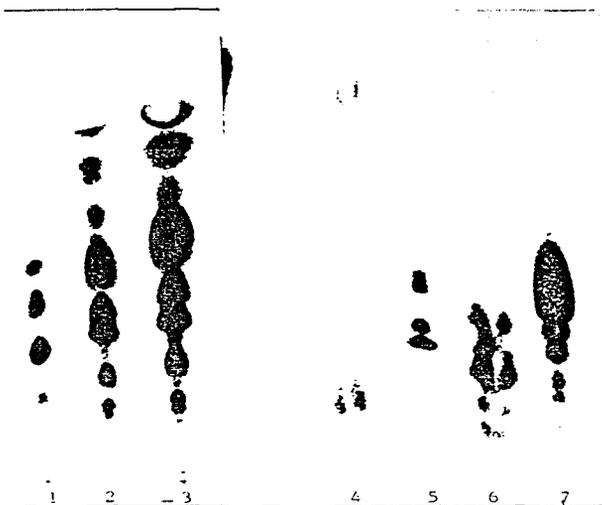


FIG. 15. Separación de las eritromicinas producidas por S. erythraea CA 340 por cromatografía en placa fina.

Carril 1 MM a las 24 h de fermentación.  
 Carril 2 MM a las 48 h de fermentación.  
 Carril 3 MM a las 72 h de fermentación.  
 Carril 4 MM con 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a las 24 h.  
 Carril 5 MM con 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a las 48 h.  
 Carril 6 MM con 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a las 72 h.  
 Carril 7 Estándar de eritromicina comercial.

Condiciones de crecimiento y de extracción idénticos a los de la figura anterior. El sistema de solventes utilizado fue cloruro de metileno-metanol- $\text{NH}_4\text{OH}$  (90:10:1) y revelado con p-anisaldehído.



FIG. 16. Separación de las eritromicinas y otros intermediarios de la biosíntesis producidos por S. erythrea NRRL 2338 por cromatografía en placa fina.

Carril 1 MM a las 24 h de fermentación.  
 Carril 2 MM a las 48 h de fermentación.  
 Carril 3 MM a las 72 h de fermentación.  
 Carriles 4 y 8 Estándar de eritromicina comercial.  
 Carril 5 MM con 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a las 24 h.  
 Carril 6 MM con 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a las 48 h.  
 Carril 7 MM con 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a las 72 h.

Condiciones de crecimiento y extracción de las eritromicinas idénticos que en la fig. 15. El sistema de solventes utilizado fue cloruro de metileno-metanol-benceno-formamida (80:20:20:2.5 v/v) y revelado con p-anisaldehído.

3M Micarosil eritronólido  
 Eb Eritronólido B

así se puede observar que estas no fueron producidas bajo estas condiciones de crecimiento.

En la cepa CA 340, la producción de micarosil eritronólido y del eritronólido B fue mayor y se detectaron desde las 48 h cuando la fuente de nitrógeno fue glicina, mientras que en presencia de amonio, nuevamente se observó una disminución en la producción de estos compuestos. Las eritromicinas en general, también disminuyeron en concentración al adicionar  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al medio de cultivo. Hay que hacer notar que no se observó acumulación de ninguno de estos dos intermediarios cuando S. erythrea fue crecida en la sal de amonio. (Fig. 17).

#### AISLAMIENTO DE MUTANTES INSENSIBLES A LA REPRESION POR AMONIO.

El aislamiento de mutantes insensibles a diversos mecanismos regulatorios ha sido de gran ayuda para comprobar los sitios en los cuales se ejerce el fenómeno (NORMANSELL, 1986). En nuestro caso fue posible el aislamiento de mutantes insensibles a la represión por amonio utilizando la metodología reportada por Martín et al. (1979) para el aislamiento de mutantes de Streptomyces griseus insensibles al efecto de fósforo inorgánico sobre la biosíntesis de candicidina.

El método de selección utilizado se basó en que el

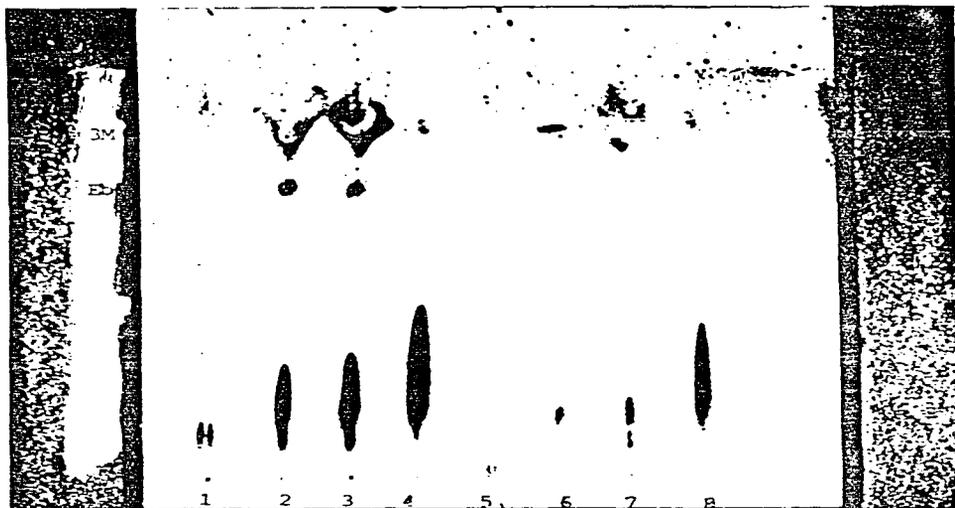


FIG. 17. Separación de las eritromicinas y otros intermediarios de la biosíntesis producidos por *S. erythraea* CA 340 por cromatografía en placa fina.

Carril 1 MM a las 24 h de fermentación.

Carril 2 MM a las 48 h de fermentación.

Carril 3 MM a las 72 h de fermentación.

Carriles 4 y 8 Estándar de eritromicina comercial.

Carril 5 MM con 100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a las 24 h de fermentación.

Carril 6 MM con 100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a las 48 h de fermentación.

Carril 7 MM con 100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a las 72 h de fermentación.

Condiciones de crecimiento y extracción de las eritromicinas idénticos que en la Fig. 15. El sistema de solventes utilizado fue cloruro de metileno-metanol-benceno-formamida (80:20:20:2.5 v/v) y revelado con p-anisaldehído.

3M Micarosil eritronólido

Eb Eritronólido b

microorganismo no producía eritromicina en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a las 24 y 48 h de crecimiento (cilindros 3 y 9; 4 y 10), como se puede observar en la fig. 18. Las mutantes resistentes al efecto presentaron halo de inhibición del crecimiento de Sarcina lutea desde las 24 horas de incubación a diferencia del control que empieza a producir una pequeña cantidad de antibiótico hasta las 72 horas.

De esta manera se aislaron 6 mutantes de S. erythrea NRRL 2338 que fueron capaces de producir eritromicina en presencia de 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , inclusive dos de ellas sintetizaron más antibiótico que la cepa silvestre. Como se puede observar en la tabla 6, cuatro de las mutantes aisladas produjeron una cantidad similar de eritromicina que la cepa original crecida en glicina. Las mutantes IM20 y la IM-42 produjeron 20 y 60% más antibiótico. Este título mayor también fué observado en glicina como fuente de nitrógeno (datos no mostrados). Estas seis mutantes fueron seleccionadas de 3000 colonias probadas lo que representa una frecuencia del 0.0002%.

#### ¿CUAL ES EL EFECTOR DE LA REPRESION POR AMONIO?

La represión nitrogenada ejercida sobre la biosíntesis de muchos antibióticos podría llevarse a cabo por el amonio mismo, a través de alguno de los aminoácidos generados por su asimilación o

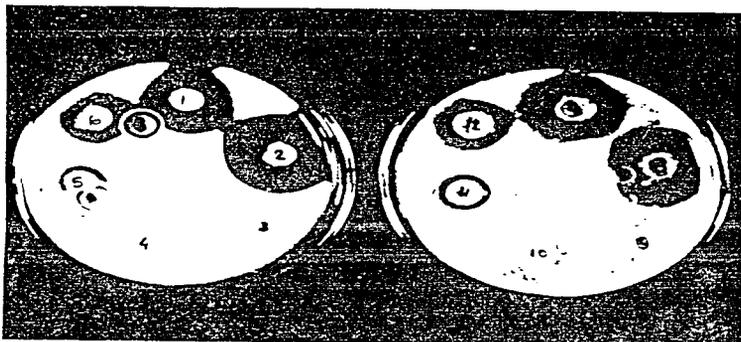


FIG. 18. Difusión de la eritromicina producida en los cilindros de agar en donde fué crecida *S. erythrea*. Medio completo a las 24 h de incubación (6, 12), a las 48 h (1,7) y 72 h (2,8). Medio completo con 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a las 24 h de incubación (3,9), a las 48 h (4,10) y 72 h (5,11).

El microorganismo fué crecido por estría en MC o MC con 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . A los tiempos señalados se cortó un cilindro de agar de la estría y se colocó sobre una placa de medio para bioensayo con *Sarcina lutea*. Estas placas se colocaron a 4°C durante 12 h y posteriormente se incubaron a 37°C por 24 horas y se observaron los halos de inhibición del crecimiento.

TABLA 6. Producción de eritromicina por las mutantes de S. erythrea insensibles a la presión por amonio.

CEPA	Producción específica
NRRL 2338 (Glicina)	100
NRRL 2338 (100 mM NH <sub>4</sub> Cl)	4.1
IM-19 (100 mM NH <sub>4</sub> Cl)	106.0
IM-20 (100 mM NH <sub>4</sub> Cl)	120.0
IM-36 (100 mM NH <sub>4</sub> Cl)	111.5
IM-42 (100 mM NH <sub>4</sub> Cl)	163.0
IM-43 (100 mM NH <sub>4</sub> Cl)	114.0
IM-44 (100 mM NH <sub>4</sub> Cl)	104.0

Los microorganismos fueron crecidos en MM con la fuente de nitrógeno que se especifica. Las determinaciones de eritromicina se hicieron a las 72 horas de fermentación.

inclusive por algunas de las enzimas que participan en ella. Hasta la fecha se ha reportado que la producción de cefamicina, de rifamicina y de tienamicina es alta cuando la actividad de glutamina sintetasa también es alta y viceversa; cuando la fuente de nitrógeno es una sal de amonio en concentraciones mayores de 20 mM, tanto la síntesis de los antibióticos como la de GS son bajas (AHARONOWITZ, 1980; NI et al., 1984; WAX et al., 1982).

En este sentido se determinaron los perfiles de actividad de GS, GOGAT, GDH y ADH en S. erythrea crecida en glicina o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100 mM) como fuentes de nitrógeno.

En la fig. 19 se observa el perfil de la actividad de glutamina sintetasa determinada por los ensayos de transferasa y de sintetasa. En ambos sistemas se presentaron dos picos de máxima actividad, a las 24 y 48 h de fermentación, cuando el microorganismo fue crecido en glicina. En amonio, la actividad de GS fue de 3-4 veces menor en relación a los niveles anteriores.

Ante estos resultados de alta actividad de GS y de alta producción de eritromicina y viceversa pudiera pensarse que se requiere de la presencia de GS para que haya síntesis del antibiótico, tal y como ha sido propuesto por algunos autores (AHARONOWITZ, 1980; NI et al., 1984). Sin embargo, al determinar la actividad de GS y la producción de eritromicina en ác. glutámico y en glutamina como únicas fuentes de nitrógeno, se observó una alta actividad de la enzima y nula producción del antibiótico y baja

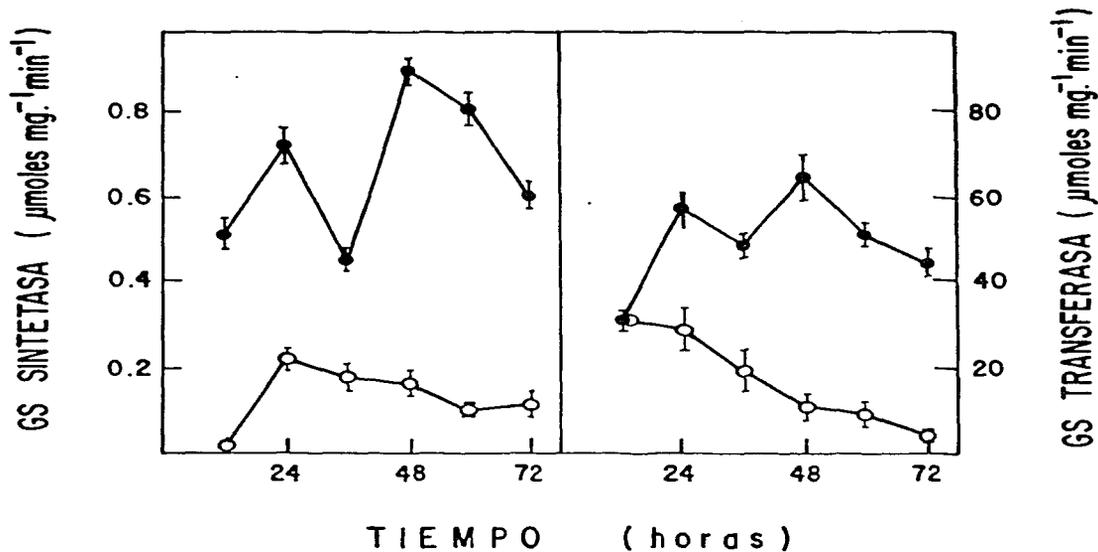


FIG. 19. Perfiles de actividad de glutamina sintetasa (sintetasa y transferasa) de *S. erythraea* crecida en MM con glicina (●) o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (○) como fuentes de nitrógeno.

500 ml de MM contenidos en matraces fernbach fueron inoculados con 30 ml de micelio precrecido en MC y se incubaron con agitación a 29°C. A los tiempos señalados se se paró el micelio por centrifugación, se lavó dos veces con Buffer de extracción y se obtuvieron los extractos libres de células como se especificó en Material y Métodos.

actividad con alto rendimiento respectivamente; una correlación contraria a la anterior (Fig. 20). Lo que sugiere que no se requiere de glutamina sintetasa para que se forme el antibiótico, pero no se puede excluir que la represión por amonio se lleve a cabo a través de esta enzima. Sin embargo, al crecer a S. erythrea en diferentes concentraciones de amonio y determinar la actividad de GS se observó que esta enzima se encontraba en niveles bajos (31% con respecto al control con glicina) desde 10 mM, manteniéndose en este nivel entre 25 y 100 mM, mientras que la producción de eritromicina fue disminuyendo gradualmente conforme aumentaba la concentración de amonio en el medio de cultivo (Tabla 7).

Por lo que respecta a GOGAT, esta enzima no mostró cambios en su perfil al utilizar cualquiera de las dos fuentes de nitrógeno como se puede observar en la fig. 21. Tanto en glicina como en amonio se presentó un máximo de actividad a las 24 h para posteriormente ir disminuyendo conforme avanzaba el tiempo de fermentación.

Se ha reportado que en procariotes como las enterobacterias, la enzima GDH biosintética utiliza NADPH como coenzima (BROWN, 1980). En los actinomicetos se ha encontrado que algunos utilizan NADPH, otros NADH y otros carecen de esta enzima como algunos Bacillus (DESPHPANDE et al., 1981; FISHER & SONENSHEIN, 1977; MAGASANIK, 1982). En este trabajo se encontró que la actividad de GDH en S. erythrea en presencia de NADPH fue 10 veces menor que con

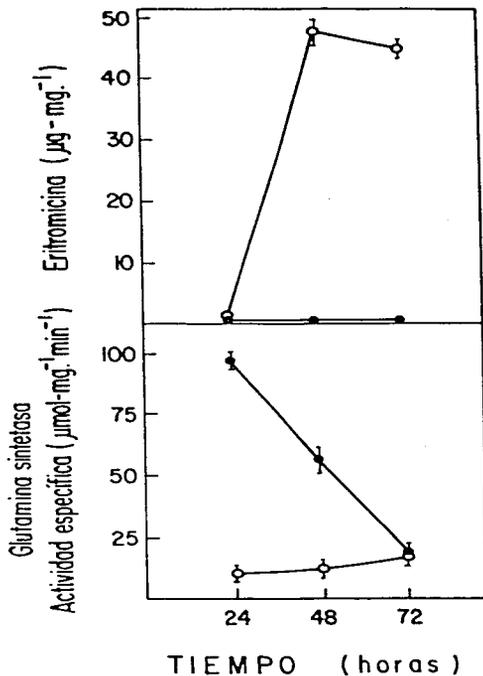


FIG. 20. Perfiles de actividad de glutamina sintetasa (transferasa) de *S. erythraea* NRRL 2338 crecida en 20 mM de ácido - glutámico (O) y 20 mM de glutamina como fuentes de nitrógeno.

500 ml de MM contenidos en matraces Fernbach fueron inoculados con 30 ml de micelio precrecido en MC e incubados con agitación a 29°C. A los tiempos señalados, se separó el micelio por centrifugación y se prepararon los extractos libres de células como ya se especificó.

TABLA 7. Niveles de GS sintetasa y de producción específica de eritromicina obtenidos al crecer a S. erythrea en diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuente de Nitrógeno	GS %	Eritromicina %
Ac. Glutámico 20 mM	144	4.5
Glicina 20 mM	100	100.0
NH <sub>4</sub> Cl 5 mM	111	104.0
10 mM	31	59.0
25 mM	33	26.0
100 mM	37	3.6
Glutamina 20 mM	35	363.0

500 ml de MM contenidos en un matraz Fernbach fueron inoculados con 30 ml de micelio precrecido en MC. A las 24 h de incubación se tomaron muestras para las determinaciones de biomasa y eritromicina. El medio restante se utilizó para la preparación de los extractos libres de células de acuerdo a la metodología antes citada.

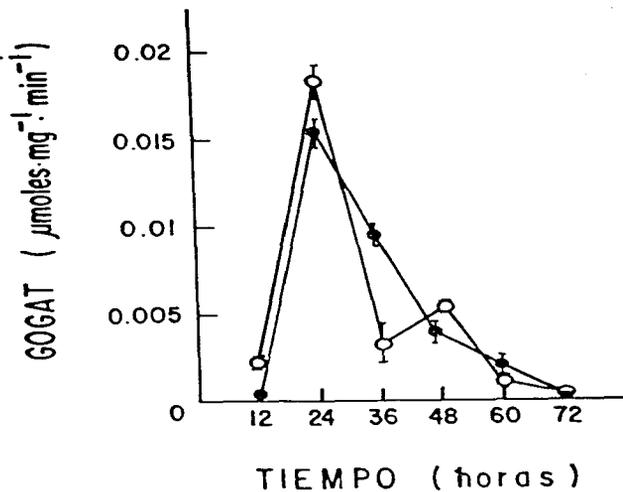


FIG. 21. Perfiles de actividad de GOGAT de *S. erythrea* crecida en MM con glicina (●) ó NH<sub>4</sub>Cl (○) como fuentes de nitrógeno.

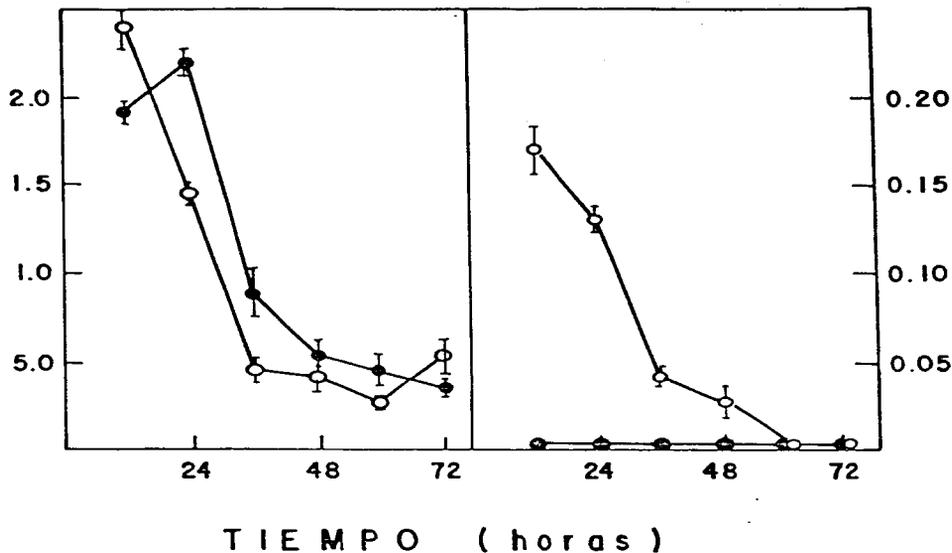
Para la preparación de los extractos libres de células se siguió el procedimiento señalado en la fig. 19.

NADH y ambas sólo se detectaron cuando el cloruro de amonio fue utilizado como fuente de nitrógeno. En la fig. 22 se observa que la actividad de esta enzima presentó un máximo de actividad en las primeras horas de fermentación, llegando a cero a las 60 h, momento en que el microorganismo dejaba de crecer. En glicina no se logró detectar actividad.

La alanina deshidrogenasa ha sido considerada como una vía alterna de asimilación de amonio, tomando en cuenta que puede catalizar la formación de alanina a partir de pirúvico y amonio. En S. erythrea, la enzima NADH-ADH no mostró cambios en su perfil al utilizar glicina o cloruro de amonio como fuentes de nitrógeno, aunque la actividad a las 12 h fue un poco mayor en la sal de amonio (Fig. 22). Estos dos compuestos indujeron inespecíficamente a la ADH, puesto que el verdadero inductor parece ser la alanina, aminoácido con el que se obtuvo la máxima actividad, como se podrá observar en la tabla 8; un valor muy cercano fue obtenido en ác. glutámico. Glutamina, 20 mM y 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y glicina indujeron a un nivel intermedio. En treonina como fuente de nitrógeno se obtuvieron los niveles más bajos.

Aunque no parecía existir relación alguna entre las enzimas que asimilan amonio y el efecto negativo del mismo, se determinaron los niveles de GS y ADH en las mutantes aisladas que eran insensibles a la represión por amonio. Los resultados se muestran en la tabla 9 y se puede observar que no existió ningún cambio en los niveles de GS ni de ADH, lo que sugiere que las mutaciones que

NAD-ADH (  $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  )



NAD-GDH (  $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  )

FIG. 22 Perfiles de actividad de NAD-ADH y NAD-GDH en función del tiempo de crecimiento de *S. erythraea* NRRL 2338 en presencia de 20 mM de glicina (●) y de 100 mM de NH<sub>4</sub>Cl (○).

Para la preparación de los extractos libres de células se siguió el procedimiento descrito para la fig. 19.

TABLA 8. Niveles de ADH obtenidos al crecer S. erythrea en diferentes fuentes de nitrógeno.

	Actividad específica*	%
20 mM L-alanina	4.85 ±0.36 <sup>1</sup>	100
20 mM L-glutámico	4.7 ±0.16	97
20 mM L-glutamina	3.14 ±0.33	65
20 mM NH <sub>4</sub> Cl	3.37 ±0.48	70
100 mM NH <sub>4</sub> Cl	1.5 ±0.52	31
20 mM glicina	2.4 ±0.23	49
20 mM L-treonina	0.58 ±0.19	12

\* Expresada en  $\mu\text{moles}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ .

S. erythrea fué crecida en MM conteniendo la fuente de nitrógeno indicada. 500 ml de medio contenidos en matraces fernbach fueron inoculados con 30 ml de micelio precrecido en MC durante 24 h. A las 24 h de fermentación se prepararon los extractos libres de células como ya se especificó.

<sup>1</sup> Desviación estándar.

TABLA 9. Actividad de GS (sintetasa) y ADH en las mutantes de *S. erythrea* insensibles a la represión por amonio de la biosíntesis de eritromicina.

CEPA	GS*	ADH*
NRRL 2338	0.16 ± 0.08 <sup>1</sup>	2.23 ± 0.14
M-20	0.11 ± 0.06	1.82 ± 0.33
M-44	0.25 ± 0.01	2.74 ± 0.26
M-36	0.15 ± 0.01	1.64 ± 0.24
M-42	0.24 ± 0.03	2.76 ± 0.10

\* Expresado en  $\mu\text{moles mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ .

500 ml de MM con 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , se inocularon con 2 ml de una suspensión de esporas ( $10^7$ ) de cada una de las cepas utilizadas. Se incubaron a 29°C con agitación. A las 24 h de fermentación se separó y lavó el micelio y se prepararon los extractos libres de células como se especificó en Material y Métodos.

<sup>1</sup> Desviación Estándar.

ocasionaron la insensibilidad al amonio no estuvieron relacionadas con algún cambio en los niveles de estas enzimas.

Otra alternativa era que el amonio estuviera actuando a través de algún aminoácido, producto de su metabolismo. En virtud de que en altas concentraciones de amonio, la actividad de GS es baja, se esperaba que los niveles de glutamina fueran bajos y los de glutámico altos. En caso de que el amonio actuara a través de glutamina, la adición de este aminoácido debería revertir el efecto del amonio y por el otro lado, la adición de ac. glutámico debería tener un efecto negativo si éste fuera el efector. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10 y se puede observar que ninguno de los aminoácidos adicionados revirtió el efecto del amonio, sin embargo la adición de glutámico tuvo un efecto negativo, similar al del amonio. Esto sugiere que el amonio pudiera estar actuando a través de los niveles de ac. glutámico. Sin embargo, la adición de metilamina, un análogo no metabolizable de amonio, a las 12 horas de fermentación provocó una disminución del crecimiento y a una concentración de 100 mM redujo la síntesis de la eritromicina a los mismos niveles que se obtuvieron al adicionar amonio (Fig. 23).

TABLA 10 Efecto de diversos aminoácidos sobre la síntesis de eritromicina en el sistema de células en reposo.

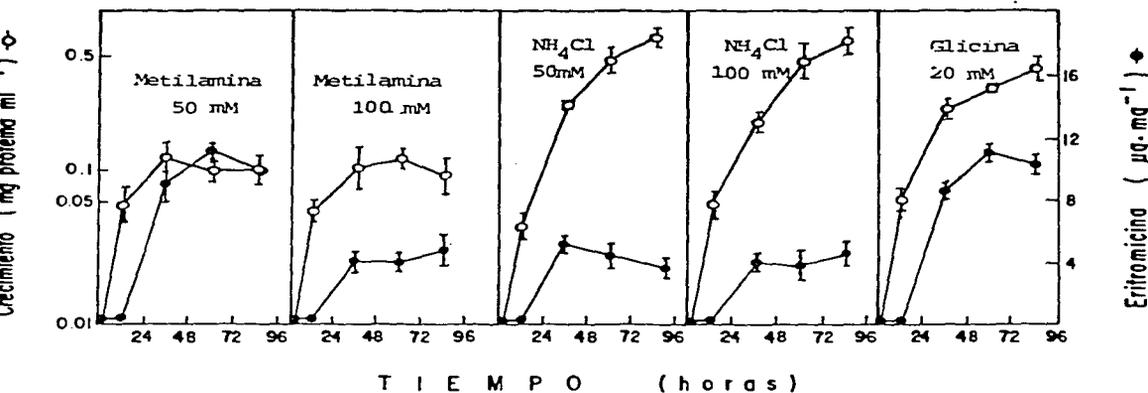
	PRODUCCION ESPECIFICA ug/mg	
	MC → SCR <sup>1</sup>	MC + NH <sub>4</sub> → SCR <sup>2</sup>
CONTROL	11.0 ± 0.5*	0.0
VALINA <sup>3</sup>	17.0 ± 0.7	0.0
ISOLEUCINA	16.0 ± 0.1	0.0
METIONINA	5.0 ± 0.9	0.0
TREONINA	12.0 ± 1.1	0.0
AC. SUCCINICO	8.5 ± 0.4	0.0
AC. GLUTAMICO	6.8 ± 0.2	0.0
GLUTAMINA	12.0 ± 0.5	0.0
NH <sub>4</sub> Cl	5.0 ± 0.4	0.0

<sup>1</sup>El microorganismo fue crecido en MC durante 24 h. Se recuperó el micelio, se lavó dos veces y se resuspendió en el sistema de células en reposo.

<sup>2</sup>El microorganismo fue crecido en MC + 100 mM NH<sub>4</sub>Cl durante 24 h. Se recuperó el micelio, se lavó dos veces y se resuspendió en el sistema de células en reposo. Las determinaciones de biomasa y de eritromicina se hicieron 10 horas después de la transferencia.

<sup>3</sup>Los aminoácidos se adicionaron a una concentración final de 20 mM.

\* Desviación estándar.



G. 23. Efecto de la adición de metilamina (50 y 100 mM) al medio de cultivo a las 12 horas sobre el crecimiento de *S. erythraea* NRRL 2338 sobre la producción de eritromicina.

1 ml de MM se inocularon con 2 ml de micelio precrecido en MC y se incubaron a 29°C con agitación. A las 12 h se adicionó la metilamina y se continuó la toma de muestras para las mediciones de crecimiento y eritromicina por la metodología antes descrita.

## DISCUSION

La represión catabólica nitrogenada es un fenómeno regulatorio que afecta la síntesis de diversos tipos de macromoléculas (MAGASANIK, 1982; MARZLUF, 1981; OMURA & TANAKA, 1985). La biosíntesis de los antibióticos no escapa a este mecanismo y son muchos los ejemplos que se pueden citar a este respecto (Tabla No. 1). En nuestro caso, la producción de eritromicina por Saccharolypospora erythrea es afectada negativamente por la presencia de iones amonio en el medio de cultivo y los resultados obtenidos con el sistema de células en reposo indicaron que este compuesto no actuaba a través de inhibición, ya que no afectaba totalmente la síntesis de la eritromicina en este sistema aún en presencia de cloranfenicol donde actuaría únicamente sobre las enzimas preformadas. La cerulenina, un antibiótico inhibidor de la sintetasa de ácidos grasos y que inhibe también la síntesis de algunos antibióticos macrólidos (OMURA, 1976), afectó casi totalmente la producción del antibiótico. Por otro lado, la eliminación del  $\text{NH}_4\text{Cl}$  del sistema no restituyó la síntesis de la eritromicina como ocurrió al quitar la cerulenina del sistema de células en reposo para la síntesis de candidicina en donde sí estaba actuando como un inhibidor (MARTIN & MCDANIEL, 1977).

Además, la adición de amonio o de cloranfenicol, tanto al

sistema de células en reposo como a un cultivo que ya inició la síntesis de eritromicina permitieron que ésta continuara por cierto tiempo para después detenerla. Esto pudo deberse a que el cloranfenicol y el amonio impidieron la síntesis de novo de las enzimas que participan en la biosíntesis de eritromicina; no afectaron a las ya existentes y por eso continuó la síntesis por un cierto tiempo en estas condiciones. Resultados similares fueron obtenidos por LIRAS et al. (1977) al estudiar la regulación por fosfatos de la síntesis de candidicina por Streptomyces griseus.

Una vez establecido que el amonio reprimía la síntesis de la eritromicina, se intentó conocer a que nivel se llevaba a cabo el efecto. Si la represión se ejercía sobre la síntesis de los precursores, la adición de propionato o de los aminoácidos cuya degradación lo generan, debía haber revertido el efecto negativo, sin embargo esto no sucedió ni en la fermentación normal ni en un sistema de células en reposo. Hay que mencionar que en el caso de la regulación por nitrógeno de la biosíntesis de tilosina, en donde amonio reprime la degradación de valina y treonina para generar propionato, la adición de los aminoácidos o del propionato mismo revirtieron el efecto negativo del amonio, restableciéndose la síntesis del protilonólido (TANAKA et al., 1986). Por lo tanto, los resultados obtenidos en S. erythraea sugirieron que el amonio no estaba actuando a este nivel.

Entonces, el blanco de regulación debía estar situado directamente sobre las enzimas que sintetizan al antibiótico. La

propionato cinasa y la propionato carboxilasa son consideradas como las primeras enzimas de la ruta biosintética (CORCORAN, 1981) y por lo tanto susceptibles de ser el blanco de la regulación. Sin embargo, al determinar los niveles de estas enzimas en el micelio de S. erythrea CA 340 crecido en MC con y sin amonio, no se observaron diferencias en los niveles de estas enzimas. Ya que estos resultados se obtuvieron con la cepa CA 340 cabría la posibilidad de que no fueran válidos para la cepa NRRL 2338, pero la producción de eritromicina en la cepa CA 340 también fue reprimida por amonio y además se ha observado que las dos cepas utilizadas están relacionadas genéticamente (SENO & HUTCHINSON, 1986).

El amonio, entonces, debía actuar sobre las siguientes enzimas de la vía (ver fig. no. 2). Debido a que no fue posible conseguir los intermediarios (eritronólido B, micarosil eritronólido, eritromicinas B, C, o D) no fue posible medir la actividad de alguna de estas enzimas pero a través de la cromatografía en placa fina se pudo observar que todos los intermediarios de la biosíntesis de eritromicina disminuyeron en concentración al crecer a S. erythrea NRRL 2338 o CA 340 en presencia de cloruro de amonio. En el caso de que el amonio hubiera reprimido únicamente a la eritronólido sintetasa, entonces no se hubiera detectado producción del micarosil eritronólido y se observó claramente que la mancha correspondiente a este compuesto disminuyó en concentración en lugar de desaparecer, cuando el amonio fue utilizado como fuente de nitrógeno. Estos resultados se observaron tanto en la cepa NRRL

2338 como en la CA 340 siendo más claros los resultados con la segunda cepa. Por lo tanto, el amonio reprimió la síntesis de todas las enzimas que participan en la biosíntesis de eritromicina, afectando de esta manera la producción de todos los intermediarios en forma coordinada. Si los genes que codifican para estas enzimas estuvieran organizados en un operón, como se ha reportado para la biosíntesis de otros antibióticos (MALPARTIDA & HOPWOOD, 1984; FEITELSON et al., 1985; CHATER & BRUTON, 1985) sería lógico pensar que se regularan de manera coordinada, pero hasta la fecha no hay evidencia suficiente para afirmar que los genes de la biosíntesis de eritromicina están organizados en un operón en Saccharolypospora erythrea (WEBER et al., 1985; WANG et al., 1982; STANZAK et al., 1986).

En S. fradiae y en Streptoverticillium kitasatoensis, el amonio reprime a la valina deshidrogenasa y en el primer microorganismo además afecta a la treonina desaminasa (TANAKA et al., 1984; TANAKA et al., 1981). Ambos microorganismos producen antibióticos macrólidos similares a la eritromicina, sin embargo el blanco de regulación en estos microorganismos es diferente al encontrado en S. erythrea. Por otro lado, CASTRO et al. (1985) han reportado también represión y de manera coordinada sobre las enzimas que participan en la síntesis de la cefamicina C en Streptomyces lactamdurans, a diferencia de los resultados reportados con S. clavuligerus en donde sólo se reprimen la expandasa y la ciclasa (BRANA et al., 1985). Por lo tanto no existe un solo sitio sobre la síntesis de los antibióticos que sea el

blanco de la acción del amonio.

El aislamiento de mutantes derreguladas ha sido de gran importancia para poder confirmar a que nivel se ejercen los mecanismos regulatorios, así como para establecer la localización de la mutación en un mapa genético (NORMANSELL, 1986). MARTIN et al. (1979) aislaron mutantes resistentes de S. griseus a la represión por fosfatos y demostraron que la enzima p-aminobenzoico sintetasa era el blanco de la regulación.

A través de la metodología descrita en material y métodos, se logró la selección de mutantes resistentes a la regulación por amonio de la síntesis de la eritromicina. Debido a que la frecuencia de aparición fue de 0.002% se podría pensar que la localización de las mutaciones fue cromosomal, lo cual concuerda con la localización de algunos de los genes involucrados en la biosíntesis de eritromicina obtenida por WEBER et al. (1985), por lo que la región que regula la expresión de estos genes también estaría localizada en el cromosoma.

Hay que hacer notar que dos de las mutantes obtenidas como insensibles a la represión por amonio, producen más eritromicina que la cepa original, lo que indica que el cambio producido en ellas, ahora permitió una mayor expresión de los genes involucrados en la síntesis del antibiótico. Por lo tanto sería interesante conocer si cepas de mayor producción son todavía sensibles a la represión catabólica nitrogenada y en caso de serlo, una estrategia

para aumentar su producción sería el aislamiento de mutantes insensibles a este efecto.

Una pregunta que surgió desde el inicio de este trabajo fue si el amonio per se era el que llevaba a cabo el efecto o era un producto de su metabolismo o si el efecto estaba mediado por GS. Algunos autores se inclinan por esta última alternativa, ya que el amonio afecta de igual manera los niveles de GS y de los antibióticos (AHARONOWITZ, 1980; WAX et al., 1982). Por lo tanto se determinaron en S. erythrea, los niveles de GS, GDH y ADH para establecer si el efecto se llevaba a cabo a través de alguna de estas enzimas y además conocer como se llevaba a cabo la asimilación del amonio en glicina y amonio como fuentes de nitrógeno, ya que la información existente al respecto, en actinomicetos, era muy diversa.

Los resultados obtenidos mostraron que glutamina sintetasa estuvo presente cuando se adicionó glicina como fuente de nitrógeno. Esto probablemente debido a que la cantidad de amonio generada a partir del aminoácido fue muy pequeña, aunque se logró excretar una cierta cantidad al medio de cultivo. Por el contrario, en altas concentraciones de amonio se observó una disminución en la actividad específica de GS, lo que sugiere que este ión afecta la síntesis de la enzima. Resultados similares han sido obtenidos con S. noursei, S. cattleya y N. mediterranei, en donde se obtuvieron bajos niveles de esta enzima en altas concentraciones de amonio (GRAFE et al., 1977; PARESS & STREICHER, 1985; NI et al., 1984).

Por otro lado, existen reportes de que en S. clavuligerus y en S. venezuelae, el amonio no regula la síntesis de GS (BRAÑA et al., 1986a; SHAPIRO & VINING, 1983). De aquí la importancia de saber que enzimas estaban presentes en S. erythrea en cada una de las dos fuentes de nitrógeno utilizadas y posteriormente poder correlacionarlas con la producción de eritromicina.

En virtud de que en 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , existieron bajos niveles de GS, la asimilación de amonio debió ocurrir a través de la glutamato deshidrogenasa, ya que los niveles de esta enzima fueron altos bajo estas condiciones de crecimiento. Además, en glicina no estuvo presente la GDH, como era de esperarse, si esta enzima se sintetiza únicamente cuando existen concentraciones altas de amonio en el medio de cultivo. Por lo tanto, se puede inferir que la asimilación de amonio en S. erythrea, se lleva a cabo a través de GS/GOGAT o a través de NADH-GDH dependiendo de la concentración de amonio o de la fuente de nitrógeno utilizada en el medio de cultivo.

Hay que hacer notar que a diferencia de enterobacterias, la actividad de GDH biosintética en S. erythrea fué mayor con NADH que con NADPH. En este sentido, este microorganismo se comporta como S. venezuelae, en donde no se detectó actividad con NADPH (TYLER, 1978; SHAPIRO & VINING, 1983). Por el contrario, la GDH de S. noursei utiliza NADPH como coenzima y S. clavuligerus carece de ella (GRAFE et al., 1977; AHARONOWITZ & DEMAINE, 1979). Por lo que resultó difícil extrapolar los datos reportados en otros

actinomicetos, en cuanto a la forma de asimilación del amonio y lo mismo puede decirse en lo que respecta a la regulación de estas enzimas, ya que algunos de ellos se comportan como enterobacterias y otros como Bacillus (TYLER, 1978; MAGASANIK, 1982; DEUEL et al., 1970; DESHPANDE et al., 1981).

Los resultados hasta ahora indicaban que en glicina había niveles mayores que en amonio, tanto de GS como de eritromicina, mientras que en 100 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , los niveles de GS disminuían a la par que la producción de antibiótico. Por lo tanto parecía estar relacionada la presencia de GS para que se sintetizara la eritromicina. Creciendo al microorganismo en glutámico o glutamina se esperaban niveles de enzima mayores que en glicina y más bajos que en amonio respectivamente y por lo tanto los niveles de eritromicina debían estar relacionados. Sin embargo, al adicionar glutámico como única fuente de nitrógeno, la producción de eritromicina fue nula, mientras que en glutamina inclusive se detectó antibiótico 12 horas antes. Estos resultados concuerdan con el reporte de ROSZKOWSKI et al. (1969) quienes encontraron que la sustitución del 25% de la fuente de nitrógeno por ácido glutámico provocó una disminución de la síntesis de eritromicina, mientras que la glutamina la estimuló. Estos resultados sugirieron que no es indispensable la presencia de glutamina sintetasa para que haya síntesis de antibiótico, aunque no se descarta la posibilidad de que exista un gene regulador común para ambas o que únicamente respondan por mecanismos diferentes a la presencia del amonio.

encontrado en alanina). Esta inespecificidad en la inducción podría explicarse por un lado, a que el glutámico y la glutamina pudiesen generar alanina por transaminación, siendo realmente ésta la que indujera a la ADH. Sin embargo, la alanina tendría que acumularse intracelularmente, lo que resultaría difícil si se toma en cuenta que el microorganismo estaba creciendo exponencialmente y canalizaría los aminoácidos hacia la síntesis de proteínas. Una manera de descartar esta posibilidad sería a través de análogos no metabolizables de ac. glutámico y de glutamina para demostrar que estos aminoácidos inducen directamente o no. Esto se realizará en un estudio más profundo de la ADH de S. erythrea que se iniciará próximamente.

La otra alternativa sería que esta enzima actuara sobre todos estos aminoácidos generando los cetoácidos correspondientes y en especial en el caso de la valina formaría el 2 ceto isovalerato que posteriormente generaría propionil Co A. Resultaría interesante, en este aspecto conocer si también isoleucina o metionina inducen y/o si la ADH puede utilizarlos como sustratos. Hay que mencionar que los intentos por detectar la actividad de valina deshidrogenasa en S. erythrea, de acuerdo a la metodología reportada por OMURA et al.. (1983) para S. fradiae, fueron infructuosos. Por lo que ADH pudiera tener como función el actuar sobre estos aminoácidos y por lo tanto ser de gran importancia para la biosíntesis de eritromicina tal y como ha sido propuesto (AHARONOWITZ, 1980).

Hasta ahora el amonio parecía ser el candidato idóneo para

ejercer la represión y ésto se confirmó al utilizar la metilamina. Este compuesto ejerció el mismo efecto que el cloruro de amonio y el ser un análogo no metabolizable indica que no se requiere que el amonio sea convertido a algún aminoácido para actuar. En Chlamydomonas reinhardtii, el amonio como tal también es el correpresor de la regulación de la nitrato reductasa (FRANCO et al., 1984). Por otro lado, BRAÑA & DEMAÏN (1988) encontraron que la represión por amonio de la síntesis de la cefalosporina en S. clavuligerus no está mediada ni por glutamina ni por alanina por lo que es probable que el amonio per se sea el efector.

Independientemente de que el amonio sea el efector o no, los resultados obtenidos resultan interesantes, tomando en cuenta de que existe un efecto regulatorio negativo del amonio sobre la biosíntesis de eritromicina y sobre todo el hecho de que las mutantes insensibles a la regulación por este compuesto producen más antibiótico que la cepa original. Por un lado, habría que estar alerta en el sentido de que mutantes hiperproductoras pueden presentar todavía represión por amonio y por lo tanto, la adición de sales de amonio al medio de cultivo industrial podría estar disminuyendo la productividad del microorganismo, desfasando la producción o simplemente disminuyéndola. Por otro lado, el aislamiento de mutantes insensibles a este efecto a partir de mutantes hiperproductoras, podría resultar en un incremento en la producción de la eritromicina y probablemente de otros antibióticos regulados de esta manera.

Desde el punto de vista de la ciencia básica, las mutantes también tienen su importancia, ya que mapeando las mutaciones que generaron la insensibilidad a la represión por amonio se podría saber si existe una zona regulatoria adyacente a los genes de la biosíntesis de eritromicina, o si está sobre un gene diferente pero que es importante para la expresión del metabolismo secundario. Aunque en este aspecto, falta todavía información sobre la genética de los actinomicetos, no está lejano el día en que se tenga un mapa completo de S. erythrea así como la localización exacta de los genes de la biosíntesis de eritromicina y sus zonas regulatorias.

#### CONCLUSIONES.

- El amonio ejerce un efecto negativo sobre la síntesis de eritromicina por Saccharolypospora erythrea.
- El amonio ejerce su efecto a través de represión.
- El efector del fenómeno es el amonio per se.
- El amonio se asimila a través de GS y GOGAT o NADH-GDH dependiendo de la concentración del amonio en el medio de cultivo de S. erythrea.
- El Amonio reprime la síntesis de GS.
- La enzima GOGAT no es afectada por la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo.
- La enzima NADH-GDH sólo esta presente cuando se utilizan altas concentraciones de amonio como fuente de nitrógeno.
- La enzima GDH utiliza NADH como coenzima.
- La enzima ADH esta presente en cultivos de S. erythrea creciendo en glicina o amonio.

- La enzima ADH es inducida inespecíficamente por amonio, glicina, glutamina y ac. glutámico.

- La carboxilasa del propionil CoA y la cinasa del propionato no son reprimidas por amonio.

- La represión ocurre sobre todas las enzimas que participan en la biosíntesis de eritromicina a partir de la eritronólido sintetasa.

## BIBLIOGRAFIA

- AHARONOWITZ, Y. 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. Ann. Rev. Microbiol. 34, 209-233.
- AHARONOWITZ, Y. 1978. Regulatory interrelationships of nitrogen metabolism and cephalosporin biosynthesis. In: Genet. of Industrial Microorganisms. Sebek O. and K. Laskin (Eds.). American Soc. for Microbiol. pp. 210-217.
- AHARONOWITZ, Y. and C.G. FRIEDRICH. 1980. Alanine dehydrogenase of the  $\beta$ -lactam antibiotic producer Streptomyces clavuligerus. Arch. Microbiol. 125, 137-142.
- AHARONOWITZ, Y. & A.L. DEMAİN. 1979. Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in Streptomyces clavuligerus. Can. J. Microbiol. 25, 61-67.
- BRANA, A.F. and A.L. DEMAİN. 1986. Nitrogen control of antibiotic biosynthesis in actinomycetes. In: Nitrogen Source Control of Microbial Processes. Sanchez, S. (Ed.). CRC Press. U.S.A. En prensa.
- BRANA, A.F., PAIVA, N. and A.L. DEMAİN. 1986a. Pathways and regulation of ammonium assimilation in Streptomyces clavuligerus. J. Gen. Microbiol. 132, 1305-1317.
- BRANA, A.F., WOLFE, S. and A.L. DEMAİN. 1986b. Relationship between nitrogen assimilation and cephalosporin synthesis in Streptomyces clavuligerus. Arch. Microbiol. 146, 46-51.
- BRANA, A.F., WOLFE, S. and A.L. DEMAİN. 1985. Ammonium repression of cephalosporin production by Streptomyces clavuligerus. Can. J. Microbiol. 31, 736-743.
- BROWN, C.M. 1980. Ammonium assimilation and utilization in bacteria and fungi. In: Microorganisms and nitrogen sources. Payne, J.N. (Ed.). Wiley and Sons. U.S.A. p. 511-535.
- BUTTE, J.C. and J.W. CORCORAN. 1963. The origin of propionate, used by Streptomyces erythreus for erythronolide A synthesis. Fed. Proc. 22, 355.
- BYRNE, K.M. and M. GREENSTEIN. 1984. Nitrogen repression of gilvocarcin V production in Streptomyces arenae 2064. J. Antibiot. 39, 594-600.
- CASTRO, J.M., LIRAS, P., CORTES, J. and J.F. MARTIN. 1985. Regulation of  $\alpha$ -aminoadipyl-cysteinyl-valine, isopenicillin N synthetase, isopenicillin N isomerase and deacetoxycephalosporin C synthetase by nitrogen sources in Streptomyces lactamdurans. Appl.

Microbiol. Biotechnol. 21, 32-40.

CHATER, K.F. and L.J. BRUTON. 1985. Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered. EMBO J. 4, 1892-1893.

CORCORAN, J.W. 1981. Biochemical mechanisms in the biosynthesis of the erythromycins. In: Antibiotics IV. Corcoran, J.W. (Ed.), Springer-Verlag, New York, pp. 132-174.

CORCORAN, J.W. 1975. S-adenosylmethionine erythromycin C O-methyltransferase. Methods in Enzymol. XLIII, 487-497.

CORCORAN, J.W. and M. VIGANTAS. 1977. Hydroxylation steps in erythromycin biogenesis. Fed. Proc. 36, 663.

CORCORAN, J.W. and J. MAJER. 1975. Erythromycin D, a key intermediate in the biogenesis of erythromycin. Fed. Proc. 34, 589.

CZERNICK, P. KAUC, L., KUTNER, M. and A. PIEKAROWICZ. 1983. Isolation and characterization of Streptomyces erythreus plasmids. Acta Microbiol. Pol. 32, 327-337.

DEKLEVA, M. L., TITUS, J.A. and W.R. STROHL. 1985. Nutrient effects on anthracycline production by Streptomyces peucetius in a defined medium. Can. J. Microbiol. 31, 287-294.

DELIC, V., HOPWOOD, D.A. and E.J. FRIEND. 1970. Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in Streptomyces coelicolor. Mut. Res. 9, 167-182.

DEMAIN, A.L. and A.F. ERANA. 1986. Control of cephamycin formation in Streptomyces clavuligerus by nitrogenous compounds. In: Regulation of secondary metabolite formation. Kleinkauf, H., von Döhren, H., Dornauer, H. and G. Nesseman (Eds.). VCH, Germany, pp. 77-88.

DEMAIN, A.L. 1984. Biology of antibiotic formation. In: Biotechnology of Industrial Antibiotics. Vandamme, E.J. (Ed.). Marcel Dekker Inc., New York, pp. 33-42.

DESHPANDE, K.L., KATZE, J.R. and J.F. KANE. 1981. Effect of glutamine on enzymes of nitrogen metabolism in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 145, 768-774.

DEUEL, T.F., GINSBURG, A., YEH, J., SHELTON, E. and E.R. STADTMAN. 1970. Regulation of glutamine synthetase from Bacillus subtilis by divalent cations, feedback inhibition and L-glutamine. J. Biol. Chem. 245, 5195-5205.

ESCALANTE, L., LOPEZ, H., MATEOS, R.C., LARA, F. and S. SANCHEZ. 1982. Transient repression of erythromycin formation in Streptomyces erythreus. J. Gen. Microbiol. 128, 2011-2015.

- FEITELSON, J., MALPARTIDA, F. and D.A. HOPWOOD. 1985. Genetic and Biochemical characterization of the red gene cluster of Streptomyces coelicolor A3(2). J. Gen. Microbiol. 131, 2431-2441.
- FERGUSON, A.R. and A.P. SIMS. 1974. The regulation of glutamine metabolism in Candida utilis: The role of glutamine in the control of glutamine synthetase. J. Gen. Microbiol. 80, 159-171.
- FISHER, S. H. and A.L. SCHEIN. 1977. Glutamine-requiring mutants of Bacillus subtilis. Biochem. Biophys. Res. Comm. 79, 987-995.
- FLORES, M.E. and S. SANCHEZ. 1985. Nitrogen regulation of erythromycin formation in Streptomyces erythreus. FEMS Microbiol. Lett. 26, 191-194.
- FRANCO, A.R., CARDENAS, J. and E. FERNANDEZ. 1984. Ammonium (methylammonium) is the corepressor of nitrate reductase in Chlamydomonas reinhardtii. FEBS Lett. 176, 455-456.
- FRENCH, J.C., HOWELLS, J.D. and L.E. ANDERSON. 1970. Erythromycin Process. U.S. Patent 3,551, 294.
- GRAFE, U., BOCKER, H. and H. THRUM. 1977. Regulative influence of o-aminobenzoic acid on the biosynthesis of nourseothricin in cultures of Streptomyces noursei JA 3890 b. Z. Allg. Mikrobiol. 17, 201-209.
- GRAFE, U., BOCKER, H., PEINHARDT, G. and H. THRUM. 1978. Regulative influence of o-aminobenzoic acid on the biosynthesis of nourseothricin in cultures of Streptomyces noursei JA 3890b. III. Change of redox state of nicotinamide-adenine-dinucleotides in the presence of amino benzoic acids. Z. Allg. Mikrobiol. 18, 479-486.
- GRAFE, U., STENDEL, A., BOCKER, H. and H. THRUM. 1980. Regulative influence of o-amino benzoic acid (OABA) on the biosynthesis of nourseothricin in cultures of S. noursei JA 3890b. V. Effect of OABA on cytochrome levels and amino acid transport. Z. Allg. Mikrobiol. 20, 185-194.
- GRAFE, U., BOCKER, H. and H. THRUM. 1981. Nitrogen catabolite regulation of streptothricin biosynthesis by Streptomyces noursei JA 3890b. In: Advances in Biotechnology, Vol. 3. Fermentation Products. Vezina, C. and K. Singh (Eds.), p. 193-198. Pergamon Press, Toronto.
- HASHIMORI, A., MATSUNAGA, A., SAMEJIMA, T. and Y. NOSOH. 1974. Purification and properties of glutamine synthetase from Bacillus stearothermophilus. Biochim. Biophys. Acta 350, 461-474.
- HIGASHIDE, E., HASIGAWA, T., SHIBATA, M., MIZUNO, K., IMANISHI, M. and A. MUJAKE. 1965. Studies on Streptomyces. Simultaneous production of oleandomycin and chromomycins by Streptomyces olivochromogenes No. 69895. J. Antibiot. 18, 26-37.

INOUE, S., NISHIZAWA, Y. and S. NAGAI. 1983. Stimulatory effect of ammonium on streptomycin formation by Streptomyces griseus growing on a glucose minimal medium. J. Ferment. Technol. 61, 7-12.

JONES, S.B. 1944. A method for the colorimetric determination of phosphorus. Sci. 100, 413-414.

KOMINEK, K. 1972. Biosynthesis of novobiocin by Streptomyces niveus. Antimicrob. Agents and Chemother. 1, 123-134.

LEHNINGER, A.L. 1975. In: Biochemistry. 2nd. Ed., Worth Pub., New York, pp. 567-578.

LILLEY, G., CLARK, A.E. and G.C. LAWRENCE. 1981. Control of the production of cephamycin C and thienamycin by Streptomyces cattleya NRRL 8057. J. Chem. Tech. Biotechnol. 31, 127-134.

LIRAS, P., VILLANUEVA, J.R. and J.F. MARTIN. 1977. Sequential expression of macromolecule biosynthesis and candidin formation in Streptomyces griseus. J. Gen. Microbiol. 102, 269-277.

LOWRY, O.H., ROSENBOUGH, N.J., FARR, A.L. and R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

MALIK, V.S. 1982. Genetics and biochemistry of secondary metabolism. Adv. in Appl. Microbiol. 28, 27-115.

MAJER, J., MARTIN, J.F., EGAN, R.S. and J.E. CORCORAN. 1977. Antibiotic glycosides. 8. Erythromycin D, a new macrolide antibiotic. J. Am. Chem. Soc. 99, 1620-1622.

MAGASANIK, B. 1982. Genetic control of nitrogen assimilation in Bacteria. Ann. Rev. Genet. 16, 135-168.

MALPARTIDA, F. and D.A. HOPWOOD. 1984. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a Streptomyces antibiotic and its expression in a heterologous host. Nature London 309, 462-464.

MAD, J.C.H. and M. PUTTERMAN. 1968. Accumulation in gram-positive and gram-negative bacteria as a mechanism of resistance to erythromycin. J. Bacteriol. 95, 1111-1117.

MARTIN, J.F., LOPEZ-NIETO, J., CASTRO, J.M., CORTES, J., ROMERO, J., RAMOS, F.R., CANTORAL, J.M., ALVAREZ, E., DOMINGUEZ, M.G., BARREDO, J.L. and P. LIRAS. 1984. Enzymes involved in beta-lactam biosynthesis controlled by carbon and nitrogen regulation. In: Regulation of secondary metabolite formation. Kleinkauf, H., von Dohren, H., Dornauer, H. and G. Nessemann (Eds.). VCH, Germany, pp. 41-75.

MARTIN, J.F. 1981. Biosynthetic pathways of secondary metabolites in industrial microorganisms. In: Biotechnology. Rehm H.V. and G.

- Reed (Eds.). Vol. 1. Microbial Fundamentals. Verlag-Chemie. Berlin, pp. 212-218.
- MARTIN, J.F., NAHARRO, G., LIRAS, P. and J.R. VILLANUEVA. 1979. Isolation of mutants deregulated in phosphate control of candidicin biosynthesis. *J. Antibiot.* 32, 600-606.
- MARTIN, J.F. and A.L. DEMAIN. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* 44, 230-251.
- MARTIN, J.F. and L.E. McDANIEL. 1977. Specific inhibition of candidicin biosynthesis by the lyogogenic inhibitor cerulenin. *Biochem. Biophys. Acta* 411, 186-194.
- MARTIN, J.F., LIRAS, P. and A.L. DEMAIN. 1977. Inhibition by phosphate of the activity of candidicin synthases. *FEMS Microbiol. Lett.* 2, 173-176.
- MARTIN, J.R., EGAN, R.S., GOLDSTEIN, A.W. and P. COLLUM. 1975. Extension of the erythromycin biosynthetic pathway. Isolation and structure of erythromycin E. *Tetrahedron* 31, 1985-1989.
- MARTIN, J.R. and F. GOLDSTEIN. 1970. Final steps in erythromycin biosynthesis. *Proc. Int. Congr. Chemother.*, 6th. Vol. 2, pp. 112-116.
- MARTIN, J.R. and W. ROSENBROOK. 1967. Studies on the biosynthesis of the erythromycins. II. Isolation and structure of a biosynthetic intermediate, 6-deoxyerythronolide B. *Biochemistry* 6, 435-439.
- MARZLUF, G.A. 1981. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiol. Rev.* 45, 437-461.
- MASUMA, R., TANAKA, Y. and S. OMURA. 1982. Enhancement of cerulenin production by a natural zeolite, an ammonium ion-trapping agent. *J. Antibiot.* 35, 1184-1193.
- MCGUIRE, J.M., BUNCH, R.L., ANDERSON, R.C., BOAZ, H.E., FLYN, E.H., POWELL, H.M. and J.W. SMITH. 1952. Ilotycin a new antibiotic. *Antibiot. Chemother.* 2, 281-283.
- MEERS, J.L., TEMPEST, D.W. and C.M. BROWN. 1970. Glutamine (amide): "2-oxoglutarate aminotransferase oxido-reductase (NADP)", an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64, 187-194.
- MENNINGER, J.R. and D.P. OTTO. 1982. Erythromycin, carbomycin and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 21, 811-818.
- MIDDELHOVEN, W.J. 1977. Isolation and characterization of methyl-ammonium resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with relieved nitrogen metabolite repression of allantoinase, arginase,

and ornithine transaminase synthesis. J. Gen. Microbiol. 100, 267-269.

NI, L., CIJUN, L., ZHIKUN, J. and C. RUISHEN. 1984. A positive correlation between rifamycin SV biosynthesis and the activity of glutamine synthetase. Acta Microbiol. Sinica 24, 217-223.

NORMANSELL, I.D. 1986. Isolation of Streptomyces mutants improved for antibiotic production. In: Antibiotic Producing Streptomyces, Volume IX. The Bacteria: A Treatise of Structure and Function. Day, L.E. and S.W. Quener, (Eds.), Academic Press, New York, pp. 95-118.

OLEINIK, N.L. 1975. The erythromycins. Antibiotics (N.Y.) 3, 396-419.

OLEINIK, N.L. and J.W. CORCORAN. 1969. Two types of binding of erythromycin to ribosomes from antibiotic-sensitive and -resistant Bacillus subtilis 148. J. Biol. Chem. 244, 727-735.

OMURA, S. and Y. TANAKA. 1985. Biosynthesis of tylosin and its regulation by ammonium and phosphate. In: Regulation of secondary metabolite formation. Kleinkauf, H., von Dohren, H., Dornauer, H. and G. Nessemann (Eds.). VCH, Verlagsgesellschaft, Weinheim, FRG, p. 305-332.

OMURA, S., TANAKA, Y., MAMADA, H. and R. MASUMA. 1984a. Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids on the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. J. Antibiot. 37, 494-502.

OMURA, S., TAKI, A., MATSUDA, K. and Y. TANAKA. 1984b. Ammonium ion suppress the amino acid metabolism involved in the biosynthesis of protylonolide in a mutant of Streptomyces fradiae. J. Antibiot. 37, 1362-1369.

OMURA, S., TANAKA, Y., MAMADA, H. and R. MASUMA. 1983. Ammonium ion suppresses the biosynthesis of tylosin aglycone by interference with valine catabolism in Streptomyces fradiae. J. Antibiot. 36, 1792-1794.

OMURA, S., TANAKA, Y., KIATO, C., TANAKA, H. and Y. IWA1. 1980a. Stimulation of leucomycin production by magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation. Antimicrob. Agents Chemother. 18, 691-695.

OMURA, S., TANAKA, Y., TANAKA, H., TAKAHASHI, Y. and Y. IMAI. 1980b. Stimulation of the production of macrolide antibiotics by magnesium phosphate and related insoluble materials. J. Antibiot. 33, 1568-69.

OMURA, S. 1976. The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. Bacteriol. Rev. 40, 681-697.

- PARESS, P. and S.L. STREICHER. 1985. Glutamine synthetase of Streptomyces cattleya. Purification and regulation of synthesis. J. Gen. Microbiol. 131, 1903-1910.
- PESTKA, S.J., VINCE, R., LeMAHIEU, R., WEISS, F., FERN, L. and J. UNOWSKY. 1976. Induction of erythromycin resistance in Staphylococcus aureus by erythromycin derivatives. Antimicrob. Agents Chemother. 2, 128-130.
- RACZYNSKA-BOJANOWSKA, K., RAFALSKI, A and OSTROWSKA-KRYSIAK. 1976. Carboxylation of propionyl-CoA in erythromycin biosynthesis. Acta Biochimica Pol. 17, 331-338.
- RACZYNSKA-BOJANOWSKA, K., RUCZAJ, Z., SAWNOR-KORSZYNSKA, D. and A. RAFALSKI. 1973. Limiting reactions in activation of acyl units in biosynthesis of macrolide antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 3, 162-167.
- RACZYNSKA-BOJANOWSKA, K., RUCZA, Z., OSTROWSKA-KRYSIAK, B., ROSKOWSKI, J. GAWOROWSKAMICHALIK, J. and SAWNOR-KORSZYNSKA. 1970. Precursors and control in erythromycin biosynthesis. Acta Microbiol. Pol. Ser. B. 2, 103-110.
- ROBERTS. G. and P.F. LEADLEY. 1983. 3H -tetrahydrocerulenin, a specific reagent for radio labeling fatty acid synthases and related enzymes. FEBS Lett. 159, 13-16.
- ROMERO, J., LIRAS, P. and J.F. MARTIN. 1984. Dissociation of cephamycin and clavulanic biosynthesis in Streptomyces clavuligerus. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 20, 318-325.
- ROSSI, A. and J.W. CORCORAN. 1973. Identification of a multienzyme complex synthesizing fatty acids in the actinomycete Streptomyces erythreus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 597-602.
- ROSZKOWSKI, J., RAFALSKI, A. and K. RACZYNSKA-BOJANOWSKA. 1969. Alanine and alanine dehydrogenase in Streptomyces erythreus. Acta Microbiol. Pol. Ser. B. 1, 59-63.
- SANCHEZ. S., PANIAGUA, L., MATEOS, R.C., LARA, F. and J. MORA. 1981. Nitrogen regulation of penicillin G biosynthesis in Penicillium chrysogenum. Adv. in Biotechnol. 3, 147-154.
- SENO, E.T. and C.R. HUTCHINSON. 1985. The biochemistry of tylosin and erythromycin: Model systems for studies of genetics and biochemistry of antibiotic formation. In: Antibiotic Producing Streptomyces, Vol. IX, The Bacteria: A treatise of structure and function. Day, L.E. and S.W. Queener (Eds.). Academic Press, New York, pp. 231-279.
- SHAPIRO, S. and L.C. VINING. 1985. Effect of ammonium on chloramphenicol production by Streptomyces venezuelae in batch and continuous culture. Can. J. Microbiol. 31, 119-123.

SHAPIRO, S. and L.C. VINING. 1983. Nitrogen metabolism and chloramphenicol production in Streptomyces venezulae. Can. J. Microbiol. 29, 1706-1714.

SHEN, Y.-Q., HEIM, J., SOLOMON, N.A. and A.L. DEMAIN. 1984. Repression of beta-lactam production in Cephalosporium acremonium by nitrogen sources. J. Antibiot. 39, 813-821.

STANZAK, R., MATSUSHIMA, P., BALTZ, R.H. and R.N. RAO. Cloning and expression in Streptomyces lividans of clustered erythromycin biosynthetic genes from Streptomyces erythreus. Bio/Technology 6, 229-232.

STREICHER, S.L. and B. TYLER. 1981. Regulation of glutamine synthetase activity by adenylation in the Gram-positive bacterium Streptomyces cattleya. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 229-233.

SUNNER, J.B. 1944. A method for the colorimetric determination of phosphorus. Sci. 100, 413-414.

TANAKA, Y., TAKI, A., MASUMA, R. and S. OMURA. 1986. Mechanism of nitrogen regulation of protyloxonolide biosynthesis in Streptomyces fradiae. J. Antibiot. 39, 813-821.

TANAKA, Y., MASUMA, R. and S. OMURA. 1984. Control of ammonium ion level for efficient nanaomycin production. J. Antibiot. 37, 1370-1375.

TANAKA, Y., TAKAHASHI, Y., MASUMA, R. and S. OMURA. 1981. Enhancement and cultural characteristics of leucomycin production by Streptoverticillium kitasatoensis in the presence of magnesium phosphate. Agr. Biol. Chem. 45, 2475-2481.

THOMPSON, R.M. and F.M. STRONG. 1971. Identification of erythromycin A in culture of Streptomyces griseoplanus. Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 213-216.

TYLER, B. 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Ann. Rev. Biochem. 47, 1127-1162.

WAGMAN, G.H. and M. J. WEINSTEIN. 1980. Antibiotics from Micromonospora. Ann. Rev. Microbiol. 34, 537-557.

WANG, Y.G., DAVIES, J.E. and C.R. HUTCHINSON. 1982. Plasmid DNA in the erythromycin producing microorganism, Streptomyces erythreus NRRL 2338. J. Antibiot. 35, 335-342.

WAX, R., SYNDER, L. and L. KAPLAN. 1982. Inactivation of GS by ammonium shock in the Gram-positive bacterium Streptomyces cattleya. Appl. Environm. Microbiol. 44, 1004-1006.

WEBER, J.M., WIERMAN, C.K. and C.R. HUTCHINSON. 1985. Genetic analysis of erythromycin production in Streptomyces erythreus. J.

Bacteriol. 164, 425-433.

WELCH, H., RANDALL, W.A., REEDY, R.J. and J. KRAMER. 1952. Bacterial spectrum of erythromycin, carbomycin, chloramphenicol, aureomycin and terramycin. Antibiot. Chemother. 2, 693-699.

WEATHERBURN, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem. 39, 971-974.

WILHELM, J.M., OLEINICK, N.L. and J.W. CORCORAN. 1969. Interaction of antibiotics with ribosomes. Antimicrob. Agents Chemother. 00, 236.

FEM 01992

# Nitrogen regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*

(Erythromycin: ammonium concentration)

Ma. Elena Flores <sup>a,\*</sup> and Sergio Sánchez <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Escuela de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, and <sup>b</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, México

Received 11 July 1984

Revision received 29 October 1984

Accepted 30 October 1984

## 1. SUMMARY

Erythromycin formation decreased in *Streptomyces erythreus* as a function of the ammonium concentration present in the medium. Total inhibition of synthesis was obtained with 100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  but medium pH and culture growth were not significantly affected. A similar effect was obtained with  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  or  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  indicating that ammonium ion probably repressed formation of antibiotic.

## 2. INTRODUCTION

The regulation of secondary metabolite biosynthesis by nitrogen has received much attention [1-5]. Erythromycin is an antibiotic and a secondary metabolite formed by strains of *S. erythreus* at the end of trophophase [6]. Cultures of this microorganism grown with glycine as nitrogen source produce more antibiotic than cells grown in the presence of ammonium [7]. We have measured

growth and antibiotic production in *S. erythreus* NRRL B-2338 at various levels of ammonia, in a medium which eliminates pH variation. The evidence obtained indicated that ammonium suppressed antibiotic formation probably through a repressive action.

## 3. MATERIAL AND METHODS

### 3.1. Organism and cultivation

*S. erythreus* NRRL B-2338 wild strain was kindly supplied by the ARS Culture Collection, U.S. Department of Agriculture, Peoria, IL, U.S.A.

All cultures were grown in a minimal medium (MM) containing 2 g sucrose, 0.2 g glycine, 250 mg  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 500 mg  $\text{NaCl}$ , 50 mg  $\text{MgSO}_4$ , 50 mg  $\text{FeSO}_4$ , 5 mg  $\text{ZnSO}_4$ , 0.1 mg  $\text{MnCl}_2$  and 0.1 mg  $\text{CoCl}_2$  per 100 ml of 0.1 M 3-(*N*-morpholino) propanesulphonic acid (MOPS) buffer (Sigma) pH 7.8. For mycelial propagation and antibiotic formation, approx.  $10^8$  spores were inoculated into MM (50 ml) contained in a 250-ml erlenmeyer flask and incubated at 29°C on a rotary shaker (160 rev · min<sup>-1</sup>). 2 ml of this seed culture were inoculated into the same medium (50 ml) in a 250-ml erlenmeyer flask and incubated under the

\* To whom correspondence should be sent at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, México 20, D.F. 04510 México.

conditions described above. At desired times, 2-ml samples were withdrawn for determinations of growth, pH and erythromycin formation.

### 3.2. Resting-cell system studies

Cells were grown for 24 h at 29°C in a complex medium (CM) composed of 0.4 g yeast extract, 0.4 g dextrose and 1.0 g malt extract per 100 ml of distilled water. Mycelium was harvested, washed with 2 vols. of sterile distilled water and resuspended in 50 ml of a resting-cell system (RC). The RC contained 50 mg of NaCl and 50 mg of  $MgSO_4$  per 100 ml of 0.1 M MOPS buffer pH 7.8. Chloramphenicol ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), ammonium chloride ( $5.4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) and cerulenin ( $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) were filter-sterilized through a Millipore membrane type HAWP 02500 before addition.

### 3.3. Assay of erythromycin

At specified intervals, the production of antibiotic was determined by a disc-agar plate technique as previously described [6].

### 3.4. Growth determination

Samples of mycelia were harvested, washed with 2 vols. of distilled water and placed in 2 ml of 0.3 M trichloroacetic acid. After centrifugation, the pellet was resuspended in 1 ml of 0.4 M NaOH, mixed thoroughly and its protein concentration was determined by the Lowry method using bovine serum albumin as standard [8].

## 4. RESULTS

*S. erythreus* NRRL B-2338 produced erythromycin when grown in MM at 29°C (Fig. 1). Production started after 18 h of incubation and continued linearly for approx. 60 h. Supplementation of the MM with a high ammonium concentration resulted in a marked decrease in antibiotic formation (Fig. 1).

Several fermentations containing different concentrations of  $NH_4Cl$  were tested for growth and erythromycin formation. Antibiotic levels were proportionally reduced depending on the ammonium concentration present in the culture medium (Fig. 2). Growth and pH values were not

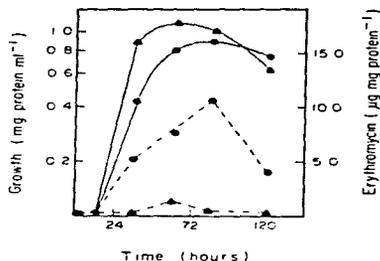


Fig. 1. Growth and specific erythromycin formation as a function of time in the presence (▲) or absence (●) of 100 mM  $NH_4Cl$ . Solid lines represent growth. Broken lines represent erythromycin formation.

significantly affected. The decrease in antibiotic production observed was not affected by the type of ammonium salt. Maximum effect was obtained with the chloride form. The addition of different concentrations of organic nitrogen sources (glycine,

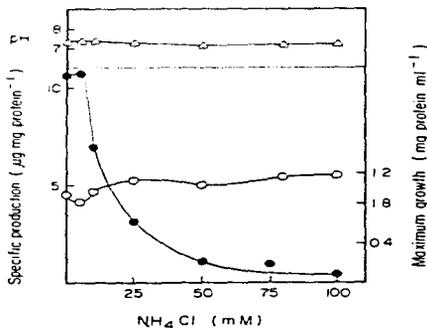


Fig. 2. Effect of different  $NH_4Cl$  concentrations in maximum growth (○), final pH value (△) and maximum antibiotic production (●) of cells grown for 48 h in MM.

Table 1

Effect of different ammonium salts on erythromycin production

All ammonium salts and amino acids were added at the beginning of the fermentation at a 40 mM concentration. *S. erythraeus* was grown in MM and antibiotic titre was determined after 72 h incubation

Ammonium salt	Relative antibiotic production (%)
None	100
NH <sub>4</sub> Cl	0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	7
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	21
Glycine	100
Leucine	99
Glutamine	120

leucine, glutamine) did not reduce erythromycin production (Table 1).

Ammonium could exert its negative effect either by an inhibitory or a repressive action. To discriminate between these, an RC was used. This allows a determination of de novo erythromycin synthesis for more than 24 h. The presence of cerulenin, which inhibits macrolide antibiotic production [9], considerably reduced the formation of antibiotic, whereas addition of 100 mM am-

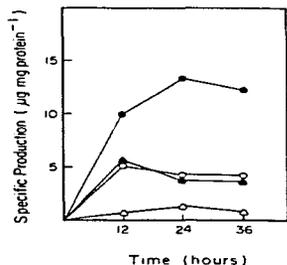


Fig. 3. Synthesis of erythromycin by resting cells as a function of time: Control (●), in presence of 50 µg·ml<sup>-1</sup> chloramphenicol (○), 100 mM NH<sub>4</sub>Cl (▲) and 25 µg·ml<sup>-1</sup> cerulenin (△). Micro organisms were grown in CM during 24 h and then transferred to the RC.

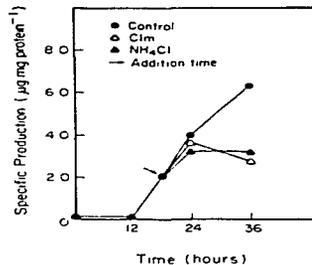


Fig. 4. Effect of 100 mM NH<sub>4</sub>Cl and chloramphenicol (Clm) on erythromycin biosynthesis. Cultures were grown on CM on a rotary shaker. NH<sub>4</sub>Cl and Clm were added at 18 h of fermentation.

monium chloride or chloramphenicol resulted in a lesser reduction of erythromycin production (Fig. 3). Antibiotic titre by resting cells was not affected by higher concentrations of NH<sub>4</sub>Cl (not shown).

Ammonium salt was added to a culture when it was already producing antibiotic. The addition of 100 mM NH<sub>4</sub>Cl did not immediately affect synthesis so that erythromycin biosynthesis proceeded during 6 h (Fig. 4). Similar results were obtained with cultures treated with chloramphenicol, a protein synthesis inhibitor.

## 5. DISCUSSION

The results obtained show an inverse relationship between ammonium concentration in the growth medium and the ability of *S. erythraeus* to produce erythromycin. This effect was produced regardless of the ammonium salt being used, but maximum inhibition occurred with 100 mM NH<sub>4</sub>Cl concentration. Similar effects of ammonium on the production of other streptomycete-derived antibiotics have been reported [1,10,11].

If ammonium acted by inhibiting erythromycin-forming enzymes, then ammonium added to a resting-cell suspension, which is producing because

of preformed enzymes, should immediately stop erythromycin synthesis, as happened when cerulenin was added. Cerulenin is a specific inhibitor of the condensing subunit of fatty acid synthetase and the biosynthesis of fatty acids is comparable to polyene and non-polyene antibiotic biosynthesis [12-14]. Therefore, cerulenin also inhibited erythromycin biosynthesis in the RC. Ammonium ions or chloramphenicol did not have the same effect, although they inhibited production of antibiotic more than in control cultures.

Ammonium itself does not suppress cephalosporin formation if cells already possess the enzyme systems needed for antibiotic production [11]. However, addition of 100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  to a culture whose erythromycin production had started allowed antibiotic biosynthesis to continue for only 6 h, thus affecting the final titre.

Ammonium repression of erythromycin biosynthesis is supported by the fact that chloramphenicol decreased antibiotic production in an identical way with  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . The phenomenon of catabolic nitrogen repression has been reported to affect many catabolic enzymes, including histidase and urease, where enzyme concentration is dependent on ammonium ion concentration in the medium [15]. This could also occur with erythromycin-forming enzymes; however, the possibility that these ions affect a previous step necessary for secondary metabolism expression is not excluded. Further studies to elucidate the biochemical basis of ammonium effect are in progress.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. A.L. Demain and A. Farrés for their critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- [1] Aharonowitz, Y. and Demain, A.L. (1979) *Can. J. Microbiol.* 25, 61-67.
- [2] Grafe, U., Bosker, H. and Thrum, H. (1982) in *Advances in Biotechnologies* (Vezina, C. and Singh, K. Eds.), pp. 193-198. Pergamon, Toronto.
- [3] Omura, S., Tanaka, Y., Takahashi, Y., Iwai, Y. and Kitao, C. (1980) *Antimicrob. Ag. Chemother.* 18, 691-695.
- [4] Sanchez, S., Paniagua, L., Mateos, R.C., Lara, F. and Mora, J. (1981) in *Advances in Biotechnologies* (Vezina, C. and Singh, K. Eds.), pp. 147-154. Pergamon, Toronto.
- [5] Lara, F., Mateos, R.C., Vazquez, G. and Sanchez, S. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 172-178.
- [6] Escalante, L., Lopez, H., Mateos, R.C., Lara, F. and Sanchez, S. (1982) *J. Gen. Microbiol.* 128, 2011-2015.
- [7] Smith, R.L., Bungas, H.R. and Pittenger, R.C. (1962) *Appl. Microbiol.* 10, 293-296.
- [8] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- [9] Omura, S. (1981) *Methods Enzymol.* 520-532.
- [10] Grafe, U., Bosker, H. and Thrum, H. (1977) *Z. Allg. Mikrobiol.* 17, 201-209.
- [11] Masuma, R., Tanaka, Y. and Omura, S. (1982) *J. Antibiot.* 35, 1184-1193.
- [12] Martin, J.F. and McDaniel, L.E. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 411, 186-194.
- [13] Omura, S. and Takeshima, H. (1974) *J. Biochem.* 75, 193-195.
- [14] Omura, S. (1976) *Bacteriol. Rev.* 40, 681-697.
- [15] Tsler, B. (1978) *Annu. Rev. Biochem.* 47, 1127-1162.