



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS Y NUTRICIONALES Y SU
RELACIÓN CON LA BIOSÍNTESIS DE ACTINORHODINA POR
*STREPTOMYCES COELICOLOR***

DICIEMBRE 2022

TESINA PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIATURA EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA

RODRIGO REYNOSO GUTIÉRREZ

DIRECTOR DE TESINA

DRA. MARIBEL CASTILLO MORALES

Contenido

Planteamiento del problema	3
Justificación	4
Objetivo general	6
Objetivos específicos	6
Hipótesis	6
Marco teórico.....	7
Pigmentos microbiológicos	7
Policétidos	8
Actinorhodina	9
Streptomyces coelicolor	11
Morfología y ciclo de vida.....	12
Arquitectura del genoma	12
Grupos de genes biosintéticos y transportadores.....	15
El grupo <i>act</i>	15
Grupos de genes reguladores.....	22
Gen <i>bldA</i>	23
Región <i>act II</i>	24
Ruta metabólica	27
Primer y precursores	27
Biosíntesis y la cadena de elongación	29
Reducción y primera ciclación	31
Ciclación y aromatización	33
Ajustes y adaptaciones moleculares	35
Parámetros fisicoquímicos y nutricionales en la producción de actinorhodina.....	40
Represión catabólica de carbono	42
Glucosa	43
Xilosa y Rok7b7	44
N-acetil glucosamina (GlcNAc) y DasR	44
Escasez de fosfato y su transcripción regulatoria: el sistema PhoR – PhoP.....	45
Regulación de nitrógeno.....	47
Materiales y metodologías.....	49

Fuentes de carbono	49
Sacarosa y glucosa.....	49
Fuentes de nitrógeno.....	52
Fuente de fosfato	55
Resultados.....	57
Sacarosa y glucosa.....	57
Relación entre la fuente de nitrógeno y la fuente de fosfato.	57
Discusión	59
Conclusiones.....	63
Bibliografía.....	64

Planteamiento del problema

Existen más de 10 mil diferentes de tipos de pigmentos y colorantes sintéticos, los cuales se utilizan en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, textil, entre otras. Tienen el fin de brindarle un valor agregado al producto final, así como mejorar su calidad y sobre todo que sea más atractivo en el mercado.

Dentro de la industria textil, el teñido es responsable del 70% de la contaminación. La complejidad de las moléculas de los colorantes sintéticos tal como el índigo azul, hace que el tratamiento en aguas residuales de este compuesto sea muy difícil de poder remediar, ocasionando diferentes tipos de enfermedades en poblaciones aledañas, funciones fotosintéticas en plantas y dejando un impacto ambiental en múltiples organismos acuáticos. (Pavithra, et al., 2019).

Según datos de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo (UNCTAD) se utilizan hasta 93,000 millones de metros cúbicos de agua durante el teñido, siendo responsable del 20% de la contaminación de aguas residuales globales. (ONU, 2019)

Por otra parte, de acuerdo a Fortune Business Inside para el año 2028, la industria cosmética llegará a valorarse en 415 mil millones de dólares. (Inside, 2021) . Esta creciente demanda ha impulsado la venta de cosméticos falsos que contienen diferentes compuestos y colorantes sintéticos, tales como, formaldehídos, fenoles, naftalenos, ftalatos entre otros, los cuales han sido catalogados como carcinógenos, y además aseguran daños y enfermedades en la piel.

En la industria alimenticia, uno de los rasgos más importantes es el color en alimentos procesados, los cuales en su mayoría de veces son utilizados con fines estéticos. “Rojo 40” y “amarillo 5” son colorantes a base de petróleo muy comunes en la industria; son conocidos por ocasionar reacciones alérgicas como urticaria e inclusive desencadenar ataques de asma en niños. (Bell, 2017)

Los colorantes sintéticos ocasionan múltiples efectos negativos en el ser humano y en diferentes reservorios ambientales. La razón de estudiar los mecanismos de obtención de un pigmento azul (actinorhodina) a través de *Streptomyces coelicolor* ofrece una alternativa positiva de aplicación en las industrias mencionadas.

Justificación

Uno de los colorantes más utilizados – y a su vez más escasos en la naturaleza – a nivel de mercado es el índigo azul. El teñido de jeans en la industria textil y su aplicación en distintas bebidas y alimentos son atractivos para el consumidor y, por lo tanto, son colorantes que se han mantenido permanentes en el mercado a un costo ambiental y de salubridad negativo.

Las rutas sintéticas que el hombre ha tomado para la elaboración de múltiples compuestos químicos – y en este caso colorantes – no son compatibles con lo que la naturaleza ha evolucionado durante miles de millones de años. La naturaleza no es capaz de metabolizar o degradar compuestos químicos que de alguna manera no están familiarizados con ellos o su ambiente, o, en otras palabras, no han tenido el tiempo suficiente para poder adaptarse a ellos.

En su lugar, la naturaleza ha desarrollado sus propios pigmentos y con ellos una infinidad de colores. Antes de que se pudiera tener viabilidad económica en cuanto a la síntesis química de colorantes, los pigmentos que se utilizaban provenían de la naturaleza, en este caso de plantas, – *Indigofera tinctoria*, *Rubia tinctorum*, *Reseda luteola* – animales, – cochinilla, gusano de laca, cañadilla – y de minerales – Zinc, Cadmio, Cobre, Cobalto – por mencionar algunos.

Estos pigmentos naturales presentan distintos problemas, tales como su variación y producción en temporadas, una gran área de cultivo, complejidad en su extracción y sobre todo su escalabilidad. No obstante, en las últimas décadas se han logrado profundizar en pigmentos biosintetizados por microorganismos, tales como bacterias, hongos, microalgas, entre otros, que poseen propiedades o actividades antimicrobianas, antifúngicas, antivirales, antioxidantes, citotóxicas, y antiinflamatorias, así como propiedades antimutagénicas y anticancerígenas. (Singh, 2017).

Dichas propiedades aumentan un valor agregado en el mercado de pigmentos naturales, abriendo un nuevo tipo de pigmento natural en el mercado: un biopigmento. Un estudio de mercado (basado únicamente en colorantes naturales) revela una tasa de crecimiento anual del 10.53% del año 2019 al 2024, valuado en 4.53 mil millones este último. (Arizton Advisory and Intelligence, 2019).

Un organismo específico y en el cual se enfoca este trabajo es *Streptomyces coelicolor*, una bacteria micelial gram-positiva que posee la capacidad de producir una enorme cantidad de productos naturales como antibióticos, antihelmínticos, agentes anticancerígenos e inmunosupresores. Además, cuenta con la secuenciación completa de su genoma, lo cual hace posible que la codificación de proteínas y la información cualitativa y cuantitativa de estos metabolitos sea más asequible. (Hoskisson & van Weze, 2019)

Este microorganismo produce un pigmento de sumo interés para las industrias mencionadas con anterioridad: actinorhodina. Es un antibiótico que ha sido largamente estudiado, encontrando particularmente los grupos de genes que codifican la síntesis de proteínas que hacen posible la producción de estos metabolitos (Nodwell, 2019). Estos metabolitos han sido producidos como respuesta de esta bacteria a la adaptación a su ambiente, y, por lo tanto, él mismo es capaz de metabolizar o degradar estos compuestos.

El redactor puede asumir que, con los avances biotecnológicos a nivel de fermentación y biorreactores, así como de edición genética; en un futuro no distante, los colorantes y pigmentos podrán ser producidos a partir de microorganismos. El que un pigmento sea de origen natural en lugar de ser de origen sintético, hace que el tratamiento de aguas residuales sea más viable y efectivo, así mismo, uno puede deducir que todo lo que circula en la naturaleza puede ser metabolizado y aprovechado por distintos organismos, lo cual involucra el establecimiento de una economía circular biológica. Pero para ello, primero es necesario realizar una reseña sobre los mecanismos necesarios para que actinorhodina pueda ser biosintetizada.

Objetivo general

Realizar una revisión acerca de los mecanismos de producción del pigmento actinorhodina por la bacteria *Streptomyces coelicolor*, analizando el efecto que tienen las variables que afectan el proceso de producción.

Objetivos específicos

- Realizar una revisión bibliográfica acerca de la ruta metabólica de producción del pigmento actinorhodina por la bacteria *Streptomyces coelicolor*.
- Comparar los parámetros fisicoquímicos que afectan la producción del pigmento actinorhodina.
- Analizar el efecto que tienen las variables (fuente de carbono, fuente de nitrógeno, concentración de nutrientes, temperatura y pH) sobre la producción del pigmento bacteriano actinorhodina.

Hipótesis

La variación de la composición y las variables fisicoquímicas del medio de cultivo necesario para el crecimiento *in-vitro* de *Streptomyces coelicolor* afectan los mecanismos de producción del pigmento actinorhodina.

Marco teórico

Pigmentos microbiológicos

Los *pigmentos biológicos* son sustancias químicas biosintetizadas por organismos vivos, las cuales representan un color particular en función de su estructura molecular. Estas sustancias se pueden encontrar en plantas, animales y microorganismos. (Singh, 2017). Los pigmentos naturales han sido estudiados desde hace mucho tiempo, pero en los últimos años han recibido mayor atención debido a los problemas que los colorantes sintéticos presentan en el medio ambiente y la salud humana.

Los pigmentos presentes en microorganismos tienen por nombre *pigmentos microbianos*, *pigmentos microbiológicos* o *biopigmentos*, estos se dividen de acuerdo al tipo de célula o constitución biológica que cada ser vivo presenta.

Además de su función como colorantes y ser usados – generalmente – por la industria alimenticia y la industria farmacéutica (Feng, et al., 2012), tienen distintas funciones que promueven la salud humana, los cuales proveen nutrientes clave y compuestos requeridos por el cuerpo, así como actividades biológicas particulares, tales como propiedades anticancerígenas, antibióticas, antiinflamatorias, e inmunosupresoras. (Singh, 2017).

Una gran cantidad de pigmentos son producidos por bacterias, levaduras, hongos y algas, las cuales incluyen colores como amarillo, rojo, naranja, café, rosa, negro, azul, verde, morado, entre otros. Además, sus estructuras moleculares presentan carotenoides, antraquinonas, flavonoides y tetrapirroles. Ya sea su utilidad en el área médica, área alimenticia, área cosmética o área textil depende de las propiedades de cada uno, por lo que el estudio del microorganismo desde su crecimiento hasta su producción pasando por su biosíntesis y su estudio patogénico es necesario para darle una dirección a su utilidad.

La función biológica de cada uno de estos pigmentos varía de microorganismo a microorganismo; algunas de sus funciones son las siguientes: uso como fuente de energía, agente en el desarrollo de la fotosíntesis, protección contra otros microorganismos, resistencia al estrés ambiental y protección contra la radiación ultravioleta. (Singh, 2017)

Como consecuencia de los distintos microorganismos que producen estos tipos de metabolitos especializados, la tesina únicamente se enfoca en el objeto de estudio: *Streptomyces coelicolor* A (3)2. Esta bacteria produce un pigmento en particular llamado actinorhodina, el cual es un policétido aromático formado por varios complejos proteicos de los cuales hablaremos dentro de su ruta metabólica.

La decisión del porqué realizar una reseña sobre la producción del pigmento actinorhodina (ACT) por parte de *Streptomyces coelicolor* A(3) 2, y no con alguno de los otros microorganismos productores de pigmentos es debido a la gran cantidad de investigaciones, estudios e información que hay sobre esta bacteria micelial, que se muestran a lo largo del siguiente texto.

Policétidos

Los policétidos son una vasta clase de metabolitos especializados sintetizados por células bacterianas y eucariontes, donde poseen un rol fisiológico o son productos comerciales valiosos como antibióticos, materiales activos utilizados por farmacéuticas, pigmentos e inclusive agentes aromatizantes. Muchos tipos de policétidos son biosintetizados por *S. coelicolor*, los cuales involucran pigmentos con coloración amarilla, gris, café, azul, y roja.

Esta familia de compuestos son biosintetizados por una familia de complejos enzimáticos que se llaman sintetasas policétidas (PKS) en una ruta de condensación de acetilos alimentados por ATP y NADPH en su mayoría. Las PKS se subdividen en tipo I, tipo II y tipo III basado en las propiedades mecánicas que les confieren los distintos tipos de proteínas en su cadena creciente. Actinorhodina es sintetizada por PKS tipo II, ya que involucran al precursor malonil-S-CoA:ACP transacilasa (MAT), al complejo cetosintasa (KS) enlazado a un cofactor de longitud de cadena (CLF), a la enzima portadora de acilo (ACP) y a la enzima diferenciadora – de los PKS tipo I – cetoreductasa (KR); además de múltiples proteínas encargados de dar la estructura final al policétido aromático, de las cuales, ahondamos en la sección de la ruta metabólica.

Actinorhodina

Actinorhodina (fig. 1) es un policétido aromático de pigmentación azul biosintetizado por la bacteria filamentosa *Streptomyces coelicolor*. Se caracteriza por presentar un color azul con diferentes matices; este compuesto es derivado de antraquinonas e indigoidinas. *Streptomyces coelicolor* es capaz de sintetizar diferentes isómeros de actinorhodina, los cuales pueden inhibir un gran número de bacterias Gram-positivas.

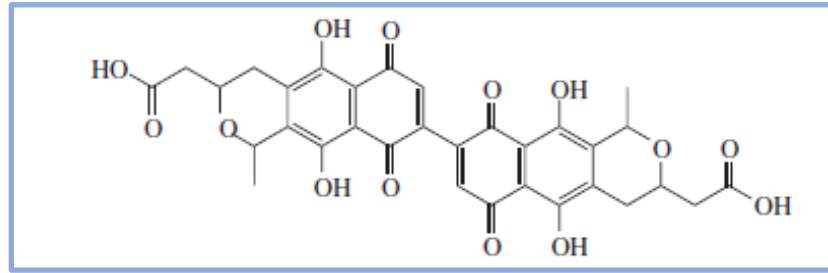


Fig. 1 Actinorhodina

Existen distintas clases estructurales de este pigmento que son producidas por esta cepa en diferentes proporciones. La figura 2 muestra algunas de ellas. (Zhang, et al., 2004)

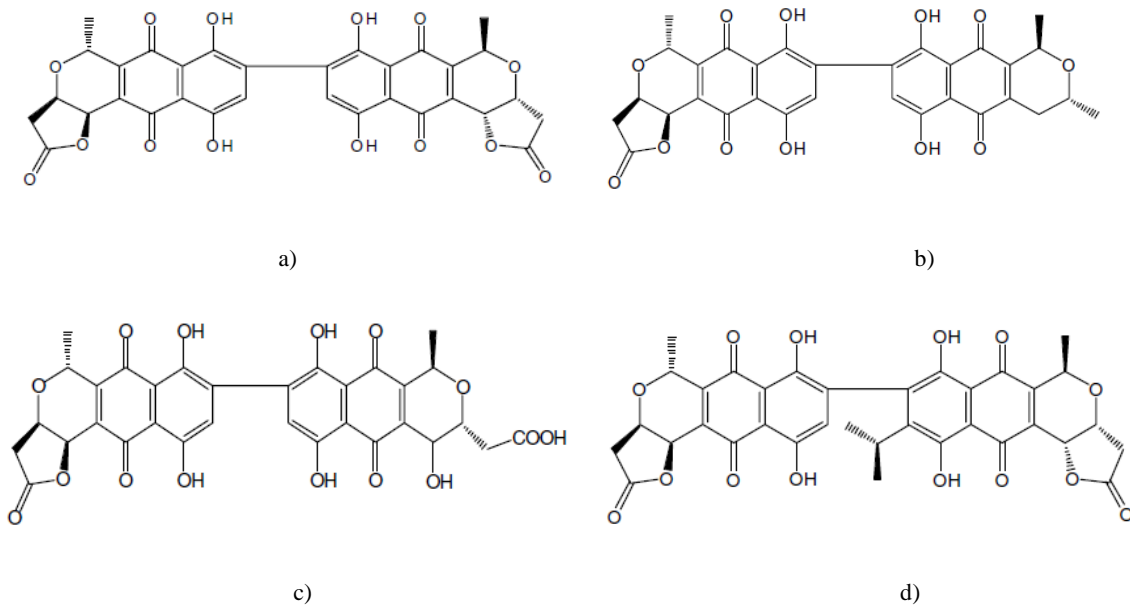


Fig. 2 Estructuras análogas de actinorhodina: a) γ – Actinorhodin b) α – actinorhodina c) ϵ - actinorhodina d) β – actinorhodina (Zhang, et al., 2004)

Este pigmento presenta cuatro características distintivas, una de ellas es que su pigmentación responde al cambio de pH. Esto quiere decir, que al momento de disolverlo en agua y distintos solventes con diferentes valores de pH, su coloración cambia: en una solución ácida presenta una coloración azul y azul fuerte, mientras que una solución básica presenta un color rojo. (Zhang, et al., 2004)

Otra característica importante es que es un agente reductor altamente activo que puede actuar en reacciones de ciclo redox; específicamente, en los grupos quinonas pueden generar electrones que interactúan con oxígeno molecular produciendo aniones radicales superoxidativos (O_2^-). Estos radicales originan otro tipo de especies que reaccionan al oxígeno tal como H_2O_2 , desencadenando una serie de cambios morfológicos en la colonia. (Mak & Nodwell, 2017)

Mak y Nowell, realizaron investigaciones genómicas químicas del efecto antibiótico de actinorhodina demostrando que el pigmento es un bacteriostático potente. Las células afectadas, reaccionan con un cambio significativo en su transcriptoma que involucra la activación de respuestas a estreses oxidativos, daños proteicos, algunos daños al ADN, así como a varias rutas en el metabolismo primario. (Mak & Nodwell, 2017)

Una investigación sugiere la cuarta característica importante, estableciendo que actinorhodina actúa *in vitro* como un organocatalizador de reacciones oxidativas. Los autores sugieren que el pigmento puede matar a bacterias a través de la acumulación de concentraciones tóxicas de H_2O_2 . (Nishiyama, et al., 2014)

Este pigmento ha servido como un ejemplar modelo para la investigación genética y bioquímica de metabolitos especializados. La ruta metabólica de actinorhodina ha sido por largo tiempo estudiada, por lo que se encuentran hasta cierto punto planteada y una reseña exhaustiva se muestra en las siguientes secciones.

Streptomyces coelicolor

Reino: Bacteria

Filo: Actinobacteria

Orden: Actinomycetales

Suborden: Streptomicineae

Familia: Streptomycetaceae

Género: Streptomyces

Especie: *Streptomyces coelicolor*

Streptomyces coelicolor A(3)2 fue en su momento estudiado como un organismo modelo debido a su trazabilidad genética y capacidad de producir los pigmentos mencionados anteriormente, los cuales ayudaban visualmente a diferenciar mutaciones que afectarían la producción de los mismos. En los últimos 25 años, gracias a avances en genética molecular, y las aproximaciones en genómica, proteómica, y entre otras áreas de estudio afines, han sido de gran utilidad en el reconocimiento de grandes grupos de genes para la biosíntesis de varios metabolitos especializados “encriptados” a partir de grupos comunes de precursores derivados del metabolismo primario y la consecuente diferenciación morfológica. (Van Keulen & Dyson, 2014)

Pertenece al género de bacterias *Streptomyces*, las cuales se encuentran dentro de las más abundantes en el suelo. Tiene una gran importancia debido a la extraordinaria variedad de mecanismos extracelulares para su crecimiento, las cuales las hacen cruciales debido a su gran cantidad de procesos metabólicos y biotransformaciones para el suelo (Bentley, et al., 2002) Estos organismos forman parte central en el ciclo natural de carbono y nitrógeno, donde se encuentran involucrados en la degradación como lignocelulosa, quitina, entre otro tipo de residuos insolubles de otros organismos, gracias a que secretan una bastedad de enzimas hidrolíticas. (Chater, et al., 2010).

Morfología y ciclo de vida

Streptomyces es un género de bacterias gram positivas miceliales multicelulares que crecen como hifas vegetativas, y que son divididas a través de paredes transversales. Presentan un ciclo de vida complicado y la capacidad de producir una enorme cantidad de productos naturales como antibióticos, antihelmínticos, agentes anticancerígenos e inmunosupresores. (Hoskisson & van Weze, 2019)

Colonizan el suelo al extender sus redes hifales multigenómicas ramificadas (micelio) con el fin de poder explotar o aprovechar algún nutriente disponible en el suelo. Estas hifas generan paredes transversales sin dividirse y muchos de los cromosomas comparten cada delimitación por este tipo de paredes cruzadas. (Nodwell, 2019)

Por otra parte, dentro de su ciclo de vida, se reproduce otro tipo de célula en forma de filamento que crece en el aire llamadas “hifas aéreas”, las cuáles son alimentadas por muerte celular programada del mismo micelio vegetativo aprovechando y reutilizando las macromoléculas implicadas (Van Keulen & Dyson, 2014). A diferencia de las hifas que generan paredes transversales, las hifas aéreas se someten a un proceso de septación que se encarga de dividir las en compartimentos, donde cada uno contiene un cromosoma; al final estos compartimentos se dividen en esporas y a lo largo de su crecimiento se hacen notar fenotipos tales como una pigmentación. (Nodwell, 2019)

Esta diferencia fisiológica es la etapa del ciclo celular donde la producción de metabolitos especializados o secundarios se hacen notar, los cuales muchos de ellos son antibióticos como respuesta a evitar el crecimiento de otro tipo de microorganismos competitivos.

Arquitectura del genoma

Streptomyces coelicolor A(3)2 M145 presenta un cromosoma lineal con un origen de replicación localizado en el centro (*oriC*) y repeticiones terminales invertidas (TIRs) portando proteínas covalentemente enlazadas en los extremos libres 5'. Contiene 8,667,507 pares de bases (bp) nitrogenadas con un contenido de C + G de 72.12%. (Bentley, et al., 2002)

La densidad de la codificación es mayormente uniforme a lo largo del cromosoma. Casi todos los genes son esenciales para funciones celulares, tales como división celular, replicación, transcripción y traducción de ADN, así como la biosíntesis de aminoácidos están localizados en el núcleo. “En contraste, los genes que codifican funciones no esenciales, como los metabolitos secundarios, exoenzimas hidrolíticas, operones conservados y proteínas de “vesículas de gas” se encuentran en los extremos” (Bentley, et al., 2002). La comparación genómica con otras especies de *Streptomyces* muestran una mayor divergencia en sus extremidades en comparación al núcleo.

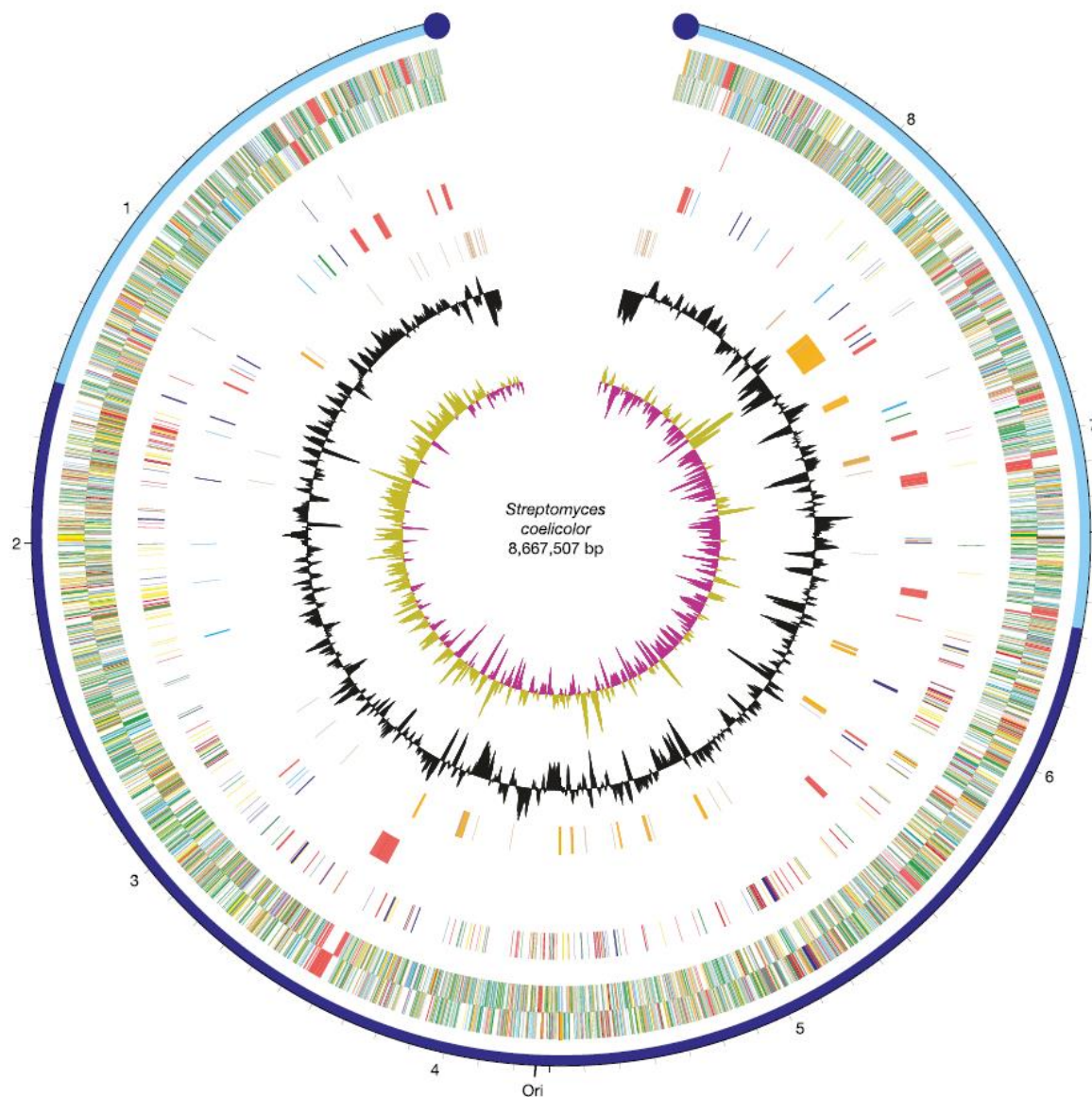


Fig. 3 Representación circular del cromosoma de *Streptomyces coelicolor* (Bentley, et al., 2002)

Este genoma predice la codificación de 7825 proteínas, este gran número refleja tanto la multiplicidad de familias proteicas y una expansión dentro de familias conocidas cuando se comparan con otras bacterias. Muchas de estas familias, están involucradas en la regulación, transporte y degradación de agentes extracelulares.

Bentley y compañía predicen que el genoma tiene un énfasis en la regulación, ya que 965 proteínas (12.3%) están destinadas a esa actividad. Además, reflexionando entre las tantas interacciones que esta cepa tiene en su ambiente natural – el suelo – tiene 614 proteínas (7.8%) enfocadas al transporte, incluyendo 81 permeasas típicas ABC y 141 proteínas enlazadas a ATP. También, predicen 819 proteínas (10.5%) potencialmente de secreción, las cuales les brindan la habilidad de explotar nutrientes en el suelo. Estas últimas, incluyen 60 proteasas, 13 quitinasas, 8 celulasas, 3 amilasas y 2 pectato liasas. (Bentley, et al., 2002)

Antes de que se codificara por completo el genoma de *Streptomyces coelicolor* se sabía que podía sintetizar 5 metabolitos con propiedades antibióticas, tal como la biosíntesis de policétido aromático *actinorhodina*, el llamado “complejo RED” de *prodigioninas oligopirroles*, la espóra de pigmento grisáceo, el pigmento de color café metilomicina, y el ionóforo dependiente calcio (CDA).

La secuencia del genoma revela 18 grupos más que pueden codificar para enzimas características de un metabolismo secundario, los cuales incluyen policétidos sintasas modulares tipo I, así como ambos tipos I y II iterativas (PKSs) de las cuales se hablará posteriormente. Además de incluir péptidos sintetasas no ribosomales (NRPSs), cilasas de terpeno, entre otros. (Bentley, et al., 2002)

La bacteria filamentosa *Streptomyces coelicolor* presenta una gran cantidad de grupos de genes que codifican una variedad de proteínas reguladoras, transportadoras y secretoras. Sin embargo, varias de ellas no las mencionamos ya que no entran dentro de las rutas metabólicas de *actinorhodina*, y muchas de las veces entran como factores directos o indirectos de las mismas, es por ello que en muchos sistemas como el PhoR-PhoP (encargado de la señalización y asimilación de fósforo), el efecto de represión catabólica, o la transcripción de genes como respuesta al exceso de nitrógeno serán abarcados por separado para poder entender los múltiples factores nutricionales que se involucran en la producción del pigmento mencionado.

Grupos de genes biosintéticos y transportadores

Como se ha comentado con anterioridad, actinorhodina ha servido como un modelo ejemplar para la investigación genética y bioquímica de metabolitos especializados, esto involucra experimentos, deducciones y demostraciones en la interrupción de los grupos de genes encargados de biosintetizar las proteínas comisionadas de la síntesis del metabolito. En la siguiente sección se presenta una reseña breve sobre el grupo de genes *act*, encargado de biosintetizar, transportar y regular el policétido aromático.

El grupo *act*

El grupo de genes *act* es una región del cromosoma de *S. coelicolor* compuesta por aproximadamente 25 kilobases (kb) y dividida en ocho regiones en base a las funciones que cada grupo de genes están programados a hacer. Varias de estas regiones codifican proteínas que están directamente o indirectamente relacionadas en la biosíntesis, regulación o transporte de actinorhodina. Este grupo de genes *act* fue completamente clonado en 1984. (F. & Hopwood, 1984)

Hopwood y colegas aislaron y bloquearon ciertos grupos de genes en cepas con mutaciones de *S. coelicolor* y los agruparon en siete clases fenotípicas (*actI-VII*), la capacidad de las diferentes clases de convertir los intermediarios secretados en actinorhodina hizo posible el colocar a los mutantes en una secuencia biosintética. Uno de los mutantes bloqueados tardíamente, se complementó genéticamente y se clonó toda la vía metabólica en un solo fragmento de ADN, la cual le confirió a *Streptomyces parvulus* la capacidad de producir actinorhodina, cuando en sí, esta cepa no producía el pigmento.

Mediante una combinación de complementación genética de los mutantes *act* bloqueados y una inactivación insercional de los genes bloqueados, la localización física y organizacional de los genes *act* fue determinada en una región de 25 kb de DNA dentro del fragmento clonado. Los genes *act* fueron agrupados en tres regiones diferentes: una región regulatoria central (*actII*), flanqueados por genes “primerizos” e “intermediarios” (*actI*, III, IV, VII y VB) por un lado y por genes intermediarios y tardíos (*actVA VI*) por el otro. (Fernández-Moreno, et al., 1992)

En la figura 4 se muestra un esquema que representa el orden y la distancia (kb) de una serie de enzimas que reconocen una secuencia característica de nucleótidos en una molécula (o fragmento) de ADN concreta; esto es, un mapa de restricción de genes del grupo *act* que delimita aproximadamente las ocho regiones de codificación de este fragmento del ADN y, que codifican para las distintas proteínas involucradas en la biosíntesis de actinorhodina: *actVI*, *actVA*, *actII*, *actIII*, *actI*, *actVII*, *actIV* y *actVB*.

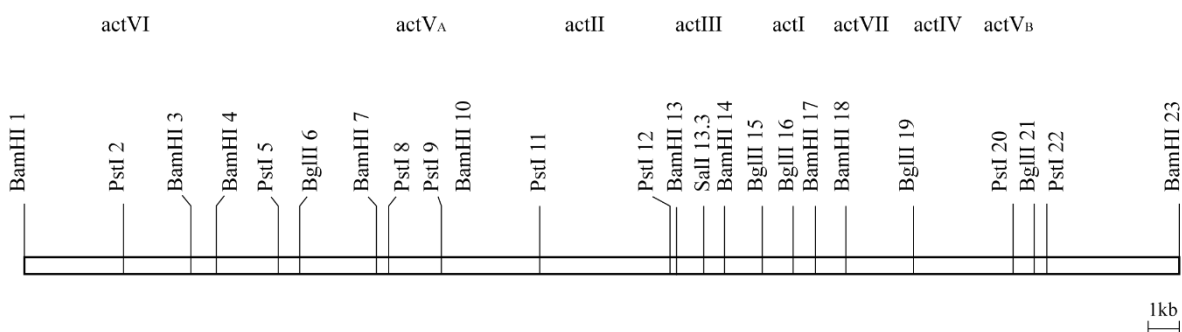


Fig. 4 Mapa de restricción general del grupo de genes *act* con ocho regiones de grupos de *act* I – VII, compuesta por aproximadamente 25 kb. Elaboración propia con el programa Illustrator 2020 versión 24.1

En la presente reseña, se ahonda superficialmente en cada una de estas regiones con el fin de presentar las proteínas o productos de cada una de las mismas y tener una visión más amplia sobre la influencia consecuente en la biosíntesis de actinorhodina.

Regiones: actI, actVII, actIV, actVB

Fernández-Moreno y colegas secuenciaron la región *act* donde delimitaron y caracterizaron las regiones que codifican para distintos productos que están involucrados en la biosíntesis de actinorhodina. La región secuenciada comienza en *BamH* sitio 14 (*actI*) y se extiende en dirección a la derecha para poder incluir la región *actVB* en *SphI* 19.2 El análisis informático de la secuencia de ADN reveló un set de seis marcos de referencia abiertos (ORFs) y su orientación, los cuales se nombraron ORF1-6, respectivamente. El mapa de restricción se presenta en la figura 5.

La caracterización y definición de los límites en un inicio y final de la región a transcribir resulta en un operón que porta seis genes *act*, donde el promotor de *actI* es responsable de la transcripción de *actI*, *actVII*, *actIV* y *actVB*, el cual indica un RNA mensajero que codifica para más de una proteína, esto, es mejor conocido como un mRNA policistrónico.

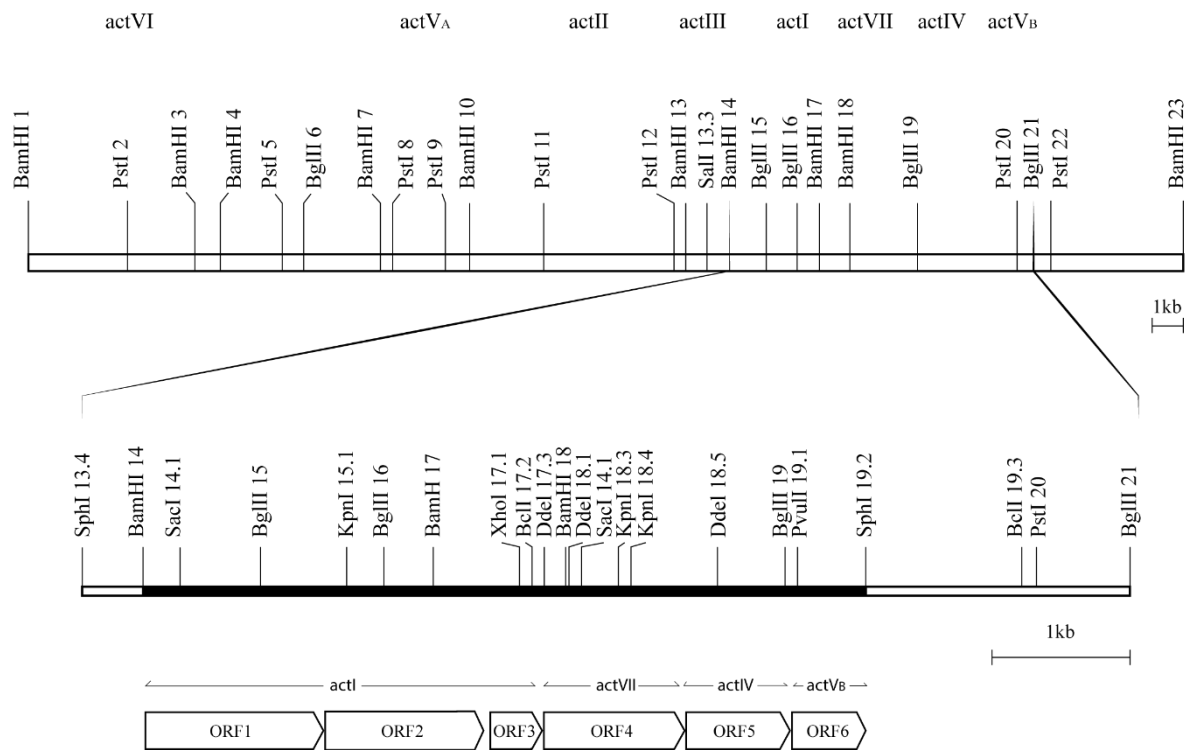


Fig. 5 Mapa de restricción del grupo de genes *act* con locaciones aproximadas de clases de mutantes *act I – VII*. Debajo del mapa de general restricción general, las regiones *actI*, *actVII*, *actIV* y *actVB* son magnificadas, mostrando sitios de restricción relevantes. La región sombreada de negro es la región secuenciada; la organización y dirección de los cuatro marcos de referencias abiertos (*actI*-ORF1, *actI*-ORF2, *actI*-ORF3, *actVII*-ORF4, *actIV*-ORF5 y *actVB*-ORF6) se muestran debajo de la misma. Elaboración propia con información tomada de (Fernández-Moreno, et al., 1992).

Para poder entender las funciones bioquímicas de cada uno de los productos de los ORFs, Fernández-Moreno y colegas, buscaron en las bases de datos disponibles y compararon la secuencia con los productos traducidos a partir de ellas. La región *actI* y los ORF1, ORF2 y ORF3 correspondientes mostraron fuertes similitudes con otros genes, dentro de los cuales, sus productos son conocidos por tener componentes de sintasas de ácidos grasos o sintasas

policétidas de diferentes organismos; las cuales son proteínas involucradas en la síntesis de ácidos grasos. (Fernández-Moreno, et al., 1992)

A partir de estas similitudes, en ORF1 se postularon dos dominios catalíticos principales:

- 1) β -cetoacil sintasa (cetosintasa)
- 2) Dominio de aciltransferasa

Esto implica que ORF1 codifica genéticamente para producir una cetosintasa, por otro lado, debido a sus similitudes encontradas y el traslapo de sus codones de inicio y de parada de ORF2 y ORF1, los autores sugieren que los productos de estos marcos de referencia funcionan en conjunto como una proteína heterodimérica. La cual se dedujo después que, en sí, cetosintasa es una holoenzima (compuesto proteico unido a uno no proteico) con cofactor de longitud de cadena (CLF).

Finalmente – dentro de *actI* – el producto de ORF3 es un polipéptido pequeño, que, debido a su similitud con otras proteínas funcionaría como una proteína transportadora de acilo (ACP). La cual es un cofactor en la maquinaria de biosíntesis de policétidos y ácidos grasos.

De esta manera, la región *act* junto con los productos de sus tres marcos de referencia ORFs 1, 2 y 3 forman un complejo enzimático necesario para la condensación de un grupo acetilo con siete unidades de extensión de malonil para poder producir la estructura principal de la molécula que da lugar a actinorhodina. (Fernández-Moreno, et al., 1992)

Los productos de *actVII* y *actIV* no tuvieron similitudes en la base de datos con otras proteínas, por lo que, mediante experimentos genéticos, las mutaciones se mapearon en ORF4 y ORF5 respectivamente.

Por su parte, experimentos bioquímicos han revelado que el producto secretado por el mutante *actVII* es mutactina – un producto derivado de la ciclación de la cadena policétida. Esto lleva a la conclusión que el producto de ORF4 es necesario para la ciclación correcta del policétido que conduce a la formación (benzo)isocromanequinona (Fernández-Moreno, et al., 1992); un intermediario dentro de la biosíntesis de actinorhodina que da lugar a la primera ciclación de la que se hablará más adelante en el apartado de biosíntesis.

Para poder determinar las propiedades catalíticas específicas de los productos de *actVII* y *actIV*, McDaniel y colegas, obtuvieron un plásmido (pSEK34) que contiene a los PKS mínimos (*actI*) KR (*actIII*) y los genes de *actVII*. La introducción del plásmido en el mutante *S. coelicolor* CH999 resultó en la producción de los policétidos SEK34 y su forma deshidratada de SEK34b. Cada uno de ellos mostraban los característicos anillos de pirona y un anillo aromático reducido, lo cual involucra una condensación intramolecular de aldolasa, esto involucraba el uso de proteínas aromataasa (ARO) y ciclasa (CYC), sintetizadas por los grupos *actVII* y *actIV*, respectivamente, y de las cuales hablaremos más adelante. (McDaniel, et al., 1994)

Región *act III*

En esta región, un fragmento de 1035 bp de *act* se encontró que complementa todos los mutantes conocidos de *actIII*, estos experimentos de clonación mutacional sugirieron que una transcripción estaba contenida en este fragmento de ADN. La fig. 4 muestra el mapa de restricción del grupo *actIII*.

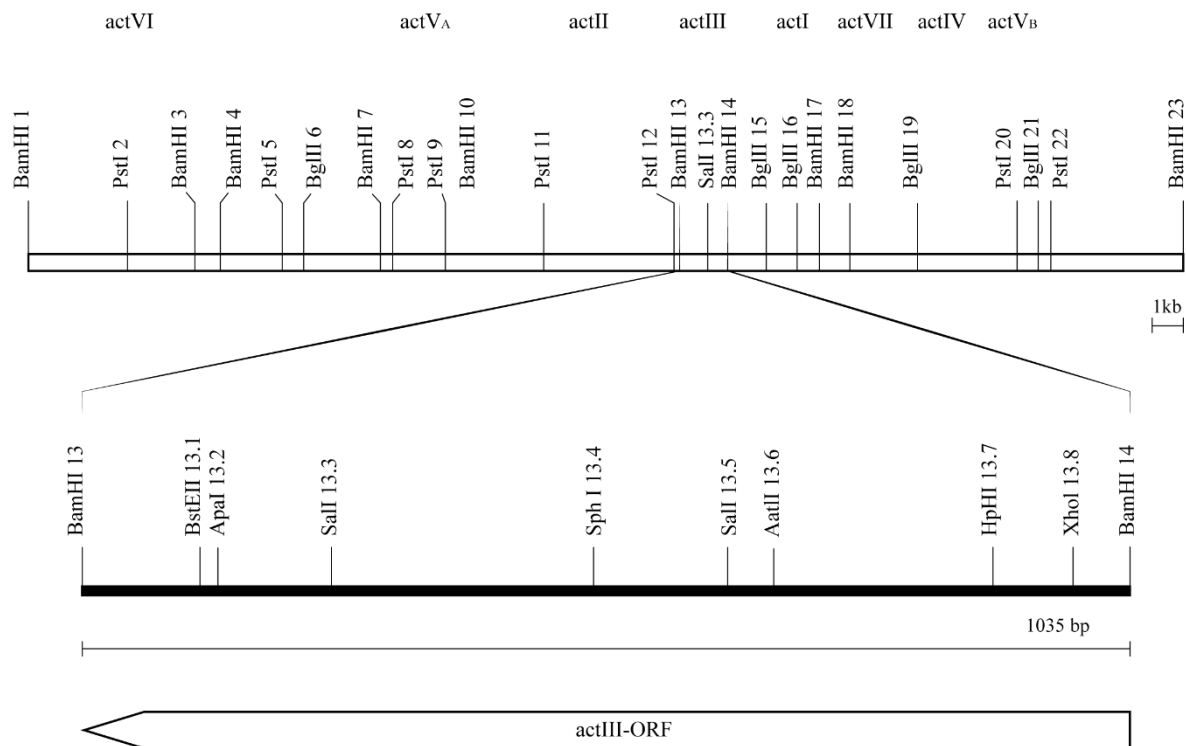


Fig. 6 Mapa de restricción del grupo de genes *act* con locaciones aproximadas de clases de mutantes *act I – VII*. Debajo del mapa de general restricción general, la región *actIII* es magnificada, mostrando sitios de restricción relevantes. La región sombreada de negro es la región secuenciada; la organización y dirección del marco de referencia abierto (*actIII-ORF*) se

muestra debajo de la misma. Elaboración propia con información tomada de (Hallam, et al., 1988) con el programa Illustrator 2020 versión 24.1.

La secuencia fue analizada para potenciales regiones codificadoras de proteínas utilizando el programa FRAME. La cual, empieza en la posición del nucleótido 110 en un codón Adenina Timina Guanina (ATG) y el marco de referencia (RF por sus siglas en inglés) termina en la posición 895 con un codón Timina Guanina Adenina (TGA).

El análisis de la secuencia de aminoácidos deducidos fue comparado en la base de secuencias de proteínas (NBRF por sus siglas en inglés), donde Hallam y colegas, encontraron dos similitudes (Hallam, et al., 1988):

- 1) Ribitol deshidrogenasa de *Klebsiella aerogene*
- 2) Alcohol deshidrogenasa de *Drosophila melanogaster*

Esto implica que la proteína de *actIII* pueda funcionar como una reductasa de policétidos (cetoreductasa) en una etapa tardía de la biosíntesis de actinorhodina. Ambas enzimas son capaces de catabolizar sus reacciones en cualquier dirección.

También hacen énfasis en que los mutantes de *actIII* no se pueden distinguir de los de *actI* en base a pruebas de co-síntesis y que ninguna de las dos clases de mutantes secreta un intermediario biosintético, lo que sugiere que el gen *actIII* funciona en el ensamble de la cadena policétida junto con el producto de *actI*. Lo cual es un paso intermediario en la formación de actinorhodina.

Región act VI

La región *actVI* empieza en el sitio *BamHI 1* con una secuencia de 5.67 kb y, donde a través de análisis computacionales se revelaron seis marcos de referencia abiertos (Fernández-Moreno, et al., 1994), tal y como se muestra en la parte inferior de la figura 7. ORF1 – 4 se transcriben de izquierda a derecha, mientras que ORFA y ORFB se transcriben de derecha a izquierda.

(Taguchi, et al., 2000) aplicó un método para la detección de actinorhodina junto con un análisis de HPLC con el objetivo de analizar si existían interrupciones en cada ORF. La cuantificación por análisis HPLC mostró que las disrupciones de ORFA, ORF3 y ORF4

causan una reducción significativa en la producción de actinorhodina, lo cual sugiere que esos marcos de referencia traducen proteínas que posiblemente catalizan la producción del pigmento. Por otro lado, la interrupción de ORFB dio lugar a una cantidad similar que la cepa salvaje J1501, por lo que no es relevante para la producción de actinorhodina. (Taguchi, et al., 2000)

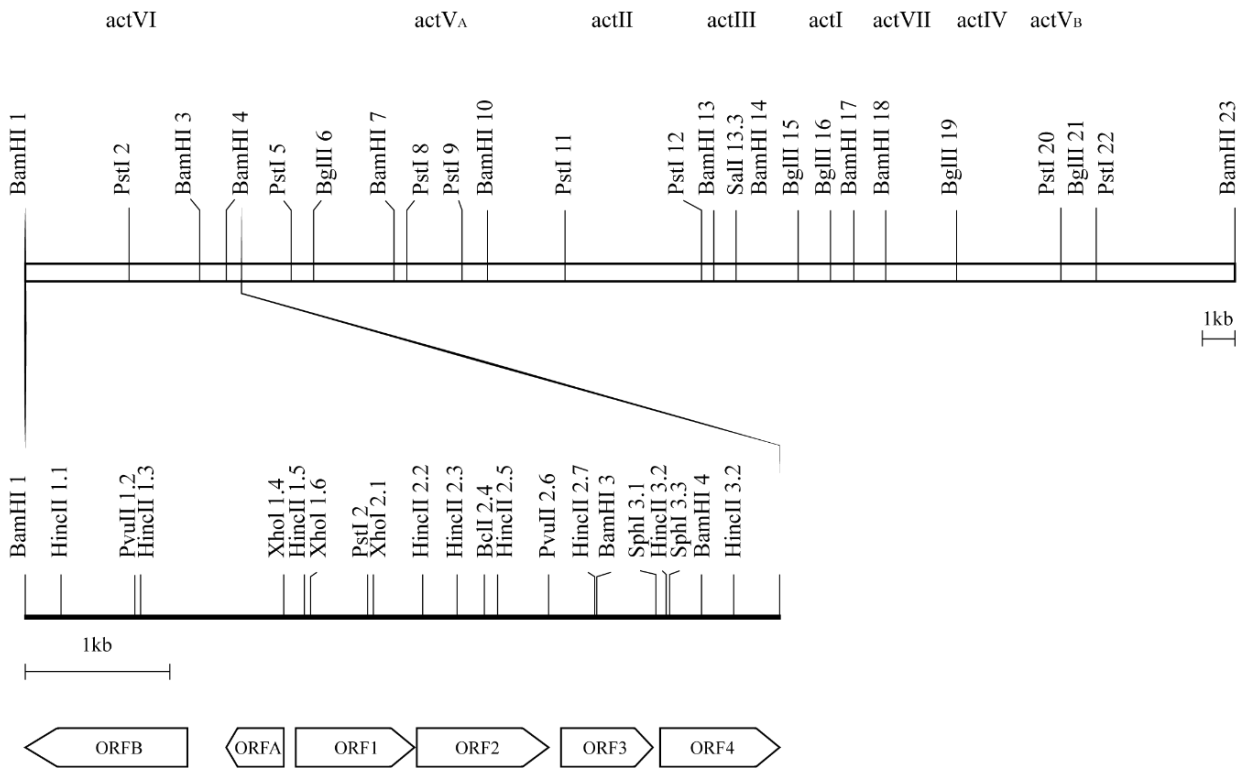


Fig. 7 Mapa de restricción del grupo de genes *act* con locaciones aproximadas de clases de mutantes *act* I – VII. Debajo del mapa de restricción general, las regiones *actVI* es magnificada, mostrando sitios de restricción relevantes. La región sombreada de negro es la región secuenciada; la organización y dirección de los seis marcos de referencias abiertos (*actVI*-ORF1, *actVI*-ORF2, *actVI*-ORF3, *actVI*-ORF4, *actVI*-ORFA y *actVI*-ORFB) se muestran debajo de la misma. Elaboración propia con información tomada de (Fernández-Moreno, et al., 1994) con el programa Illustrator 2020 versión 24.1.

Por su lado, ORF1 presenta una similitud de 56% con la proteína β -hidroxibutil-CoA deshidrogenasa (HACD) (Fernández-Moreno, et al., 1994), la cual pertenece a una familia deshidrogenasas de alcohol de cadena corta. (Taguchi, et al., 2000) al interrumpir ORF1 se produjo ácido 3,8-dihidroxi-1-metiltraquinona-2-carboxílico (DMAC) y aloesaponarin como productos derivados, esto conllevó a proponer que la enzima es relevante para los

ajustes moleculares que se requieren químicamente en los últimos pasos en la producción de actinorhodina.

Respecto a la secuencia de ADN de *actVI*-ORF2 y – ORF4 representan 51% de similitud entre ellos, y de acuerdo a las comparaciones en bases de datos de sus pares de bases revelan grandes similitudes con otros productos y en específico con el dominio de reductasas de enoilo y el sitio de activo de algunas coenzimas deshidrogenasas, las cuales se ven involucradas en los ajustes moleculares en los últimos pasos dentro de la producción del pigmento azul.

Por otra parte, cuando se realizaron mutaciones y en específico se interrumpió ORF2, este marco de referencia produjo un ácido 4-dihidro-9-hidroxil-1metil-10-oxo-3-H-nafto-[2,3-c]-pirano-3-(S)-acético [(S)-DNPA], el cual posteriormente, se caracterizó como un producto intermediario en las etapas finales de la biosíntesis de actinorhodina. (Taguchi, et al., 2000)

Grupos de genes reguladores

Cuando se aísla alguna cepa en específica de su ambiente natural – como en este caso del suelo –, y se cultiva en condiciones de laboratorio, muchos de los genes de la cepa permanecen inactivos, debido a que asemejar las condiciones a su hábitat natural es un tanto difícil. Muchas veces se utilizan diferentes aproximaciones con el fin de poder activar estos grupos al utilizar diferentes medios de cultivo, inducir mutaciones en genes mejorando la transcripción y traducción, sobre expresar genes regulatorios y grupos genes inactivos en diferentes huéspedes.

Los primeros análisis moleculares en grupos de genes reportados por (Liu, et al., 2013) que biosintetizan algunos de los pigmentos de interés, mostraron que usualmente existen grupos de genes reguladores que llegaron a denominarse como “reguladores específicos de vías”, por hacer mención en su alta especificidad en rutas metabólicas. Sin embargo, muchos de estos grupos de genes también tenían un efecto amplio en patrones de transcripción globales, por lo que el término “reguladores situados en grupos” (CSRs por sus siglas en inglés) fue más aceptado dentro de la comunidad científica, y haremos referencia a ellos de esta manera.

Estos reguladores son el principal punto de conexión con una cantidad abundante de sistemas regulatorios generalmente conservados que monitorean la fisiología del organismo, el estado de desarrollo, densidad poblacional y ambiente con el fin de determinar el comienzo y la cantidad de producción de cada antibiótico.

Gen *bldA*

Como ya se mencionó dentro de su ciclo de vida, *S. coelicolor* forma estructuras miceliales multicelulares que crecen como hifas vegetativas a partir de una sola espora, después de dos o tres días el micelio aéreo empieza a crecer, después se subdividen en comportamientos llamados “pre-esporas” y finalmente se separan del micelio para poder repetir el ciclo. Para que el micelio aéreo pueda formarse y llevar a cabo un ciclo de vida natural, además de biosintetizar ciertos metabolitos secundarios hay una serie de genes de crucial importancia llamados *bld* (bald por su término en inglés) (Lawlor, et al., 1987).

El gen en particular *bldA* codifica para una molécula de RNA de traducción, la cual es la única en todo el genoma capaz de traducir un codón raro Uracilo Uracilo Adenina (UUA) – en específico en esta bacteria – al aminoácido leucina. (Hackl & Bechthold, 2015). En el código genético de *S. coelicolor* uno de cada seis codones para leucina (UUA) no contiene residuos de Citosina o Guanina, sin embargo, hay al menos 6 codones diferentes responsables de integrar al aminoácido leucina en la cadena proteica. Por otra parte *S. coelicolor*, contiene 145 codones de Timina Timina Adenina (TTA), los cuales solo pueden ser traducidos en proteínas cuando un gen funcional *bldA* es expresado y por lo tanto una *leu – tRNA^{UUA}* es sintetizada.

Durante un estudio, fueron examinadas varias cepas mutantes de *Streptomyces* en el gen *bldA*, estas mismas no sólo presentaban falta de micelio aéreo y esporulación, sino también la falta de producción de pigmentos y antibióticos, tales como actinorhodina (ACT), undecilprodigiosina (RED) y metilomicina. En el estudio, 110 de varios grupos de genes previstos tenían al menos un gen conteniendo un codón Timina Timina Adenina, mientras que 34 grupos no lo tenían. Esto establece que, dentro del grupo de genes de distintas cepas, TTA es un codón representativo dentro de los grupos de genes que codifican el metabolismo secundario. Inclusive 62 genes que contenían este codón tenían actividades regulatorias

putativas, lo cual hace parecer que el gen *bldA* tiene un rol de suma importancia en la regulación de producción de pigmentos a nivel de transcripción de expresión genética. (Guthrie & Chater, 1990)

En procesos fermentativos a escala industrial, es necesario reconocer los momentos aproximados o exactos dentro del ciclo de vida de la bacteria donde el pigmento es producido. (Hesketh, et al., 2007) realizaron experimentos utilizando análisis proteómicos y transcriptómicos en mutaciones de *S. coelicolor* con el fin de eliminar el gen *bldA*. Al final de la fase de crecimiento y en la fase de transición, alrededor de 100 genes, incluidos muchos genes que codifican proteínas ribosómicas, se transcribieron de una manera diferente y se regularon positivamente en la cepa de tipo salvaje. Esto indica que el proceso de transición es un punto clave para el inicio de traducción del codón UUA y por lo tanto la producción de la molécula *leu* – *tRNA^{UUA}* donde finalmente es expresada en cantidades significativas que provocan cambios morfológicos y cambios en el metabolismo secundario. Esto indica que la molécula *leu* – *tRNA^{UUA}* es necesaria para la traducción a proteína ActII-ORF4 que más adelante explicaremos.

Región *act II*

La región *actII* es un grupo de genes compuesto por cuatro marcos de referencia abiertos (Fig. 2), incluyendo un activador transcripcional y genes que controlan la exportación del pigmento.

La biosíntesis de actinorhodina no solo se ve influenciada por el gen *bldA* y los genes anteriormente mencionados, sino que está determinada por cinco unidades de transcripción en el grupo de genes *act*, específicamente en el marco de referencia abierto *actII*-ORF4. Este marco de referencia es el activador específico de la ruta metabólica para la síntesis de actinorhodina. Fernández-Moreno y su equipo de trabajo descubrieron que el activador de *actII*-ORF4 depende directamente del producto de *bldA* para la traducción de su RNA mensajero (mRNA) a una proteína requerida para la transcripción de los operones del grupo *act*. La presencia del codón raro UUA en *actII*-ORF4 hace que su traducción sea dependiente completamente en la molécula tRNA codificada por el gen *bldA* que hemos visto con anterioridad. (Fernández-Moreno, et al., 1991)

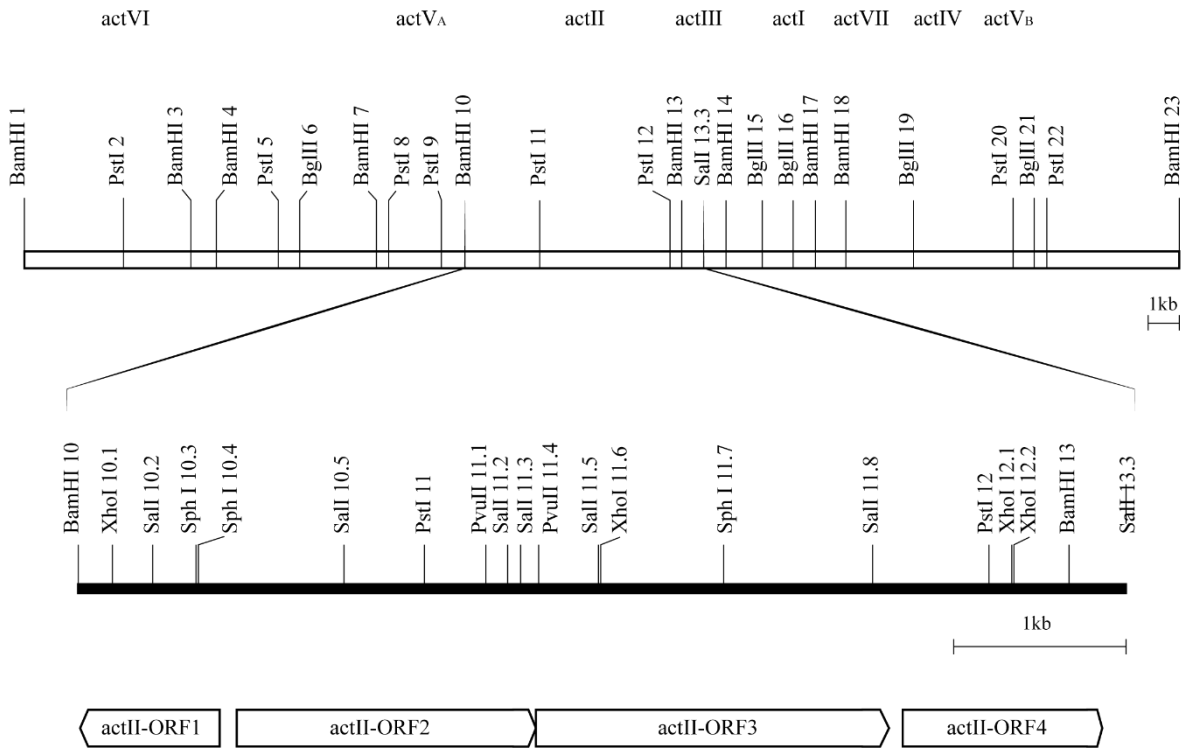


Fig. 8 Mapa de restricción del grupo de genes *act* con locaciones aproximadas de clases de mutantes *act* I – VII. Debajo del mapa de general restricción general, la región *actII* es magnificada, mostrando sitios de restricción relevantes. La región sombreada de negro es la región secuenciada; la organización y dirección de los cuatro marcos de referencias abiertos (*actII*-ORFs) se muestran debajo de la misma. Elaboración propia con información tomada de (Fernández-Moreno, et al., 1991) con el programa Illustrator 2020 versión 24.1.

Estas cinco unidades de transcripción son completamente dependientes de una proteína llamada ActII-ORF4, la cual contiene 255 residuos de aminoácidos y pertenece a una familia de proteínas llamada Proteínas Regulatorias de Antibióticos en Streptomyces (SARPs por sus siglas en inglés). Esta proteína se encarga de transmitir casi toda la información de la fisiología celular global, así como del tiempo y del nivel de producción de actinorhodina, esto al poder enlazarse a secuencias en los promotores blancos e influir directamente en la transcripción y/o traducción de *actII*-ORF4 e inclusive alterar las propiedades mismas de la proteína. (Liu, et al., 2013)

En el género *Streptomyces*, la región encargada de promover (promotor) la transcripción de genes en el marco de referencia ORF4 codifica para al menos ocho proteínas reguladoras hasta el momento conocidas, las cuáles se resumen y se enlistan en la tabla 1.

AdpA es una proteína reguladora pleiotrópica cuya transcripción es únicamente exitosa en la presencia de un gen *bldA* específicamente en la cepa *Streptomyces griseus*. En múltiples experimentos en esta especie, el gen *bldA* y muchos otros tipos de genes – incluyendo el gen *adpA* – que contenían el codón TTA fueron eliminados o reemplazados con codones UUA que transcriben al aminoácido leucina. Uno de estos experimentos mostró que *bldA* fue muy difícilmente transcrito cuando *adpA* había sido eliminado o reemplazado. Esto resultó en el fenotipo de falta de esporas y de micelio aéreo, y, por ende, la biosíntesis de antibióticos. Esto concluyó que no solo *bldA* activa la traducción de *adpA*, sino que es esencial para la activación de la transcripción de *bldA* a través de una región en la ruta metabólica que funciona como un sistema de retroalimentación y regulación. Esto conlleva a una cascada de activación de genes y por lo tanto a la diferencia morfológica y la activación del metabolismo secundario donde se lleva a cabo la biosíntesis del pigmento azul. (Higo, et al., 2011)

Proteínas reguladoras	Función
AdpA	Regulador pleiotrópico de producción y desarrollo del antibiótico
GlkA	Represor global en respuesta a la represión catabólica de carbono
DasR	Regulador de la respuesta global a <i>N</i> -acetil glucosamina
AfsQ1	Activador que responde al exceso de nitrógeno
ROK7B7	Represor operón xilosa
AfsS	Activador involucrado en la biosíntesis de antibióticos

Tabla 1. Proteínas reguladoras del género *Streptomyces*. Elaboración propia a partir de información encontrada en (Liu, et al., 2013)

Ruta metabólica

Toda biosíntesis de una ruta metabólica requiere del entendimiento desde la información misma que la programa, hasta el producto que sintetiza. Es por ello que previamente, la reseña se enfocó en denotar los grupos de genes específicos que son encargados de portar, sintetizar y regular la producción de actinorhodina.

Como se ve en la sección anterior, *actI*-ORF1 indica la presencia de una cetosintasa (KS) junto con un factor de longitud de cadena (CLF) y *actI*-ORF4 transcribe la enzima involucrada en la biosíntesis del policétido y ácidos grasos: ACP (proteína portadora de acilo) que porta un radical panteteinilo. Estas tres unidades – junto con los precursores que se denotan a continuación – se definen como ‘PKS mínimos’ debido a que son las enzimas mínimas requeridas para el inicio de la síntesis de policétidos. Sin embargo, la estructura de actinorhodina requiere de enzimas adicionales con el fin de dar arreglos moleculares que influyen directamente en su función biológica. Toda esta sección está enfocada en reseñar exhaustivamente cada uno de los pasos por los que pasa el policétido aromático.

Primer y precursores

Toda ruta metabólica requiere de precursores que entran como intermediarios a lo largo de la misma; para que la enzima condensadora (KS) pueda dar inicio a la síntesis, requiere de un precursor llamado malonil-S-CoA:ACP transacilasa (MAT) – que posteriormente se definió también como un PKS mínimo –, el cual es un complejo enzimático que fue decodificado al secuenciar el gen *fabD* de *Streptomyces glaucescens* donde fue descubierta su función y su génesis. (Summers, et al., 1995)

MAT es una proteína codificada como parte del grupo de genes que traduce las proteínas sintasas de ácidos grasos (FAS), la cual está distante del grupo de genes de PKS (en este caso *act*) y su función es catalizar la transferencia de malonilo de CoA al sitio holo-ACP FAS durante la síntesis de ácidos grasos bacterianos. MAT fue aislada anteriormente de extractos de proteína de *Streptomyces* en base a su habilidad de catalizar la transferencia de malonil de CoA a los sitios holo-ACPs de PKS aromáticos (W. & Koshla, 1998). Esto indica una relación entre las rutas metabólicas (primaria) de ácidos grasos y rutas metabólicas (secundaria) de policétidos.

Koshla y colegas, purificaron los PKS mínimos, incluyendo a MAT, y utilizaron un ensayo bioquímico directo donde introdujeron MAT a los PKS mínimos:

La habilidad de que MAT purificado pueda enlazarse al [C^{14}] de malonil-CoA en la ausencia de otras proteínas PKS, junto con la inhabilidad de que estos otros componentes puedan ser reconocidos en la ausencia de MAT, establece que el complejo malonilo-MAT es el primer intermediario covalente de la ruta metabólica. (W. & Koshla, 1998).

En *Streptomyces*, MAT participa en las rutas metabólicas de síntesis de ácidos grasos y de policétidos, donde – en específico – cataliza la transferencia del grupo malonilo hacia el sitio holo-ACP lo que da lugar a un complejo malonilo-S-ACP (Fig. 9). El sitio Ser97 de MAT ataca al grupo carbonilo tioéster de malonilo y subsecuentemente, el sitio His 201 protona a CoA librándolo de malonil-MAT. Finalmente, ACP se enlaza a la superficie del malonil-MAT y el fosfo-panteteinil tiol entra al sitio activo formando el complejo malonilo-S-ACP, el cuál es el segundo intermediario dentro de la síntesis de policétidos. (Keatinge-Clay, et al., 2003)

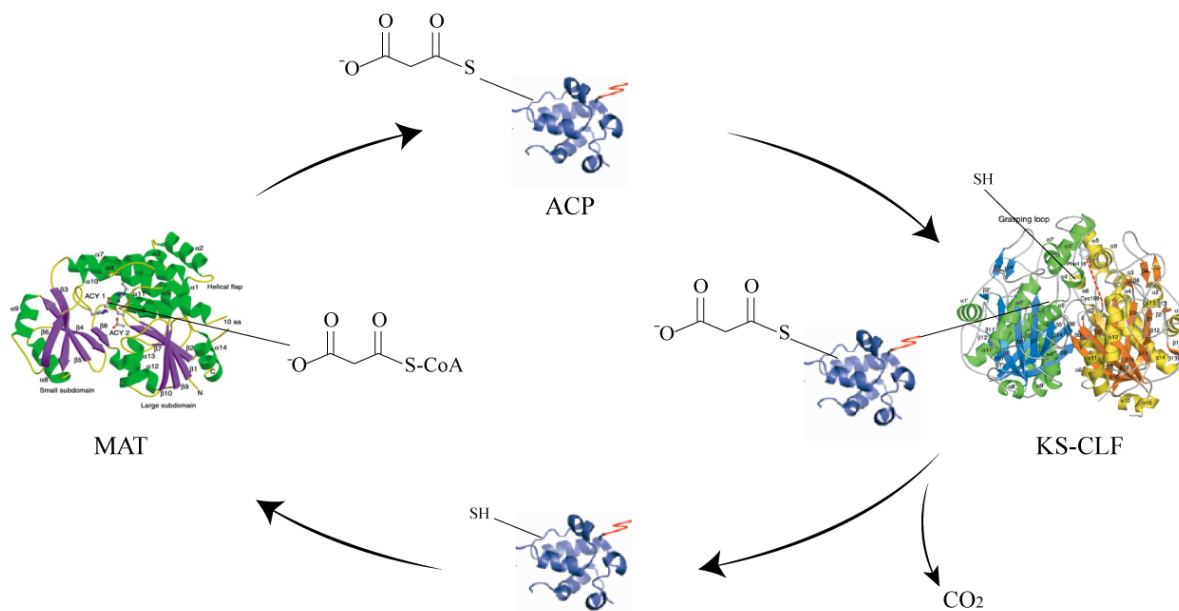


Fig. 9 Representación esquemática de la catálisis y formación del complejo malonilo-S-ACP, con su correspondiente formación del complejo KS-CLF-ACP. Elaboración propia con información tomada de (W. & Koshla, 1998) y (Keatinge-Clay, et al., 2003) con el software Illustrator 2020 versión 24.1.

Consecuentemente, el complejo malonilo-S-ACP se encuentra con una proteína heterodimérica cetosintasa (KS) y su correspondiente cofactor de longitud de cadena (CLF), dando lugar a la catálisis de la descarboxilación del grupo panteteinilo de malonil-S-ACP (Fig. 9). El complejo KS/CLF posee un sitio activo donde el aminoácido cisteína se encuentra con un grupo tiol (S – H) al cual, un grupo acetilo (generado por la descarboxilación) es enlazado mediante un enlace tioéster, esto es conocido como una reacción de condensación (Dreier & Koshla, 2000). Aquí comienza la biosíntesis de la cadena policétida que da estructura a actinorhodina. Con lo que comienza el proceso de biosíntesis de la cadena policétida que da estructura a la molécula de actinorhodina.

Biosíntesis y la cadena de elongación

Cuando el grupo acetilo portado por ACP es enlazado al sitio activo de KS la biosíntesis da inicio, consecuentemente ocurre cierta cantidad de ciclos de elongación de la cadena ocasionadas por CLF, cada una involucra la formación de enlaces C – C entre un malonil-S-ACP nucleofílico y la cadena de policétido creciente enlazada al sitio activo de KS (Fig. 10).

Koshla y Dreier plantearon análisis mecánicos enfocados a los residuos conservados dentro del complejo enzimático KS-CLF para poder deducir y comprobar cómo es que la cadena policétida se va formando durante su síntesis. Concluyeron y definieron un modelo dinámico que establece que el complejo ternario (KS-CLF-ACP) se disocia después de cada ciclo de condensación. La cadena creciente recién sintetizada debe ser desprendida de ACP a KS después de cada condensación. (Dreier & Koshla, 2000)

También denotan que para que la biosíntesis y en esencial el ciclo de condensación sea eficiente, tendría que haber un nuevo ACP con su respectivo radical panteteinilo, y pasar por el ciclo de descarboxilación, condensación y elongación de nuevo, todo esto mientras la cadena creciente del policétido sintetizado se mantiene enlazada a KS. (Dreier & Koshla, 2000)

Este ciclo de condensación depende del tipo de CLF que esté sintetizando la cadena; en el caso de actinorhodina, son necesarias ocho unidades de malonil para poder sintetizar una cadena policétida que contenga 16 carbonos. (Tang, et al., 2003)

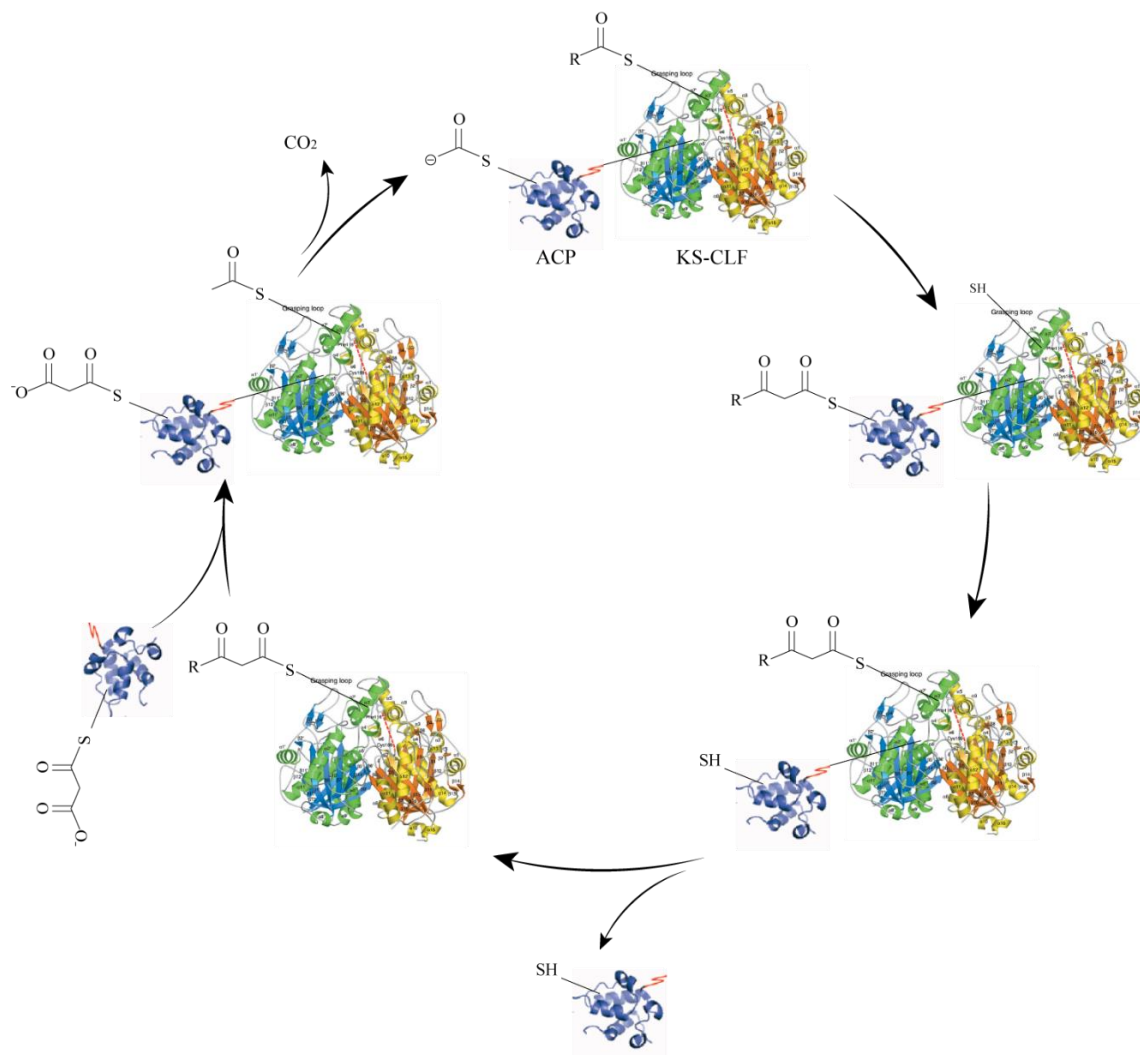


Fig. 10 Representación esquemática del ciclo de condensación dentro de la biosíntesis de la cadena policétida creciente. La elongación de la cadena inicia con la descarboxilación del malonil-S-ACP y secunda su consecuente condensación. El grupo acetilo resultante retorna a KS y el ciclo de condensación ocurre siete veces más para dar lugar a la estructura policétida requerida para formar actinorhodina. Elaboración propia con información tomada de (Tang, et al., 2003) (Keatinge-Clay, et al., 2004) y (Dreier & Koshla, 2000) con el software Illustrator 2020 versión 24.1

Durante la síntesis, el policétido creciente debe mantenerse en un ambiente en donde se prevengan reacciones intramoleculares, debido a que el policétido no reducido es extremadamente reactivo y puede espontáneamente ciclar, es por ello que el heterodímero KS-CLF crea un túnel anfipático, el cual mantiene a la molécula estable y por donde la cadena creciente es extruida. (Keatinge-Clay, et al., 2004)

En este punto de la síntesis, ya existe la columna de carbono, donde consecuentemente se dará paso a la reducción, la aromatización de la cadena y ciclación de la misma; lo cual da lugar a la estructura final de actinorhodina y muchos otros policétidos.

Reducción y primera ciclación

Tal y como se apreció en el apartado de genes biosintéticos y transportadores, basado en secuencias de aminoácidos deducidos, (Hallam, et al., 1988) predijeron que el producto o proteína traducida a partir del grupo genético *actIII* es una cetoreductasa (KR), lo cual implica la catálisis de la reducción de un grupo cetona del intermediario policétido (aún portado por ACP) en la biosíntesis de actinorhodina, KR se enlaza específicamente – en este caso – en el carbono 9 (C-9) de la cadena policétida (Fig. 11).

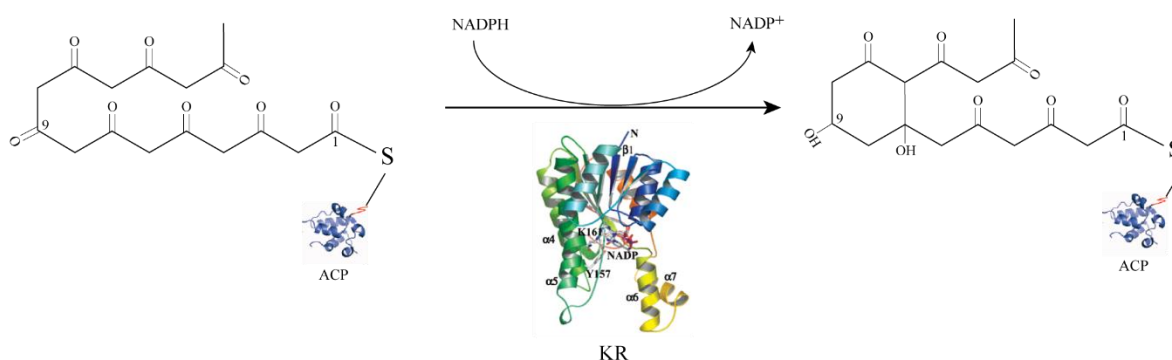


Fig. 11 Representación esquemática de reducción de C-9 y ciclación de C-7 a C-12 mediante el enlace al sitio NADPH de KR. Elaboración propia con información tomada de (Keatinge-Clay, et al., 2004) y (Korman, et al., 2004) con el software Illustrator 2020 versión 24.1.

Las KRs pertenecen a una familia de deshidrogenasa/reductasa de cadena corta (SDR), la cual es una familia larga que utilizan como cofactor a NADPH o NADH y tienen un sitio activo tirosina en el centro del pliegue Rossmann. (Korman, et al., 2004)

Con el fin de tener pruebas que *actIII* realmente produce un KR, (Strohl, et al., 1990) realizaron experimentos y estudios sobre metabolitos secundarios híbridos como respuesta a la clonación de interespecies de genes biosintéticos en *Streptomyces*. Examinaron diferentes respuestas y diferentes policétidos producidos a consecuencia de los mismos. En sus múltiples ensayos, al introducir el gen *actIII* en el mutante *S. galilaeus* 31671 (que produce

un policétido llamado 2-hidroxyaklavinona) resultó en la producción de aklavinona, lo cual indica que este gen codifica una función que resulta en la desoxigenación del C-2 de 2-hidroxyaklavinona.

Por otro lado, cuando la cepa silvestre *S. galilaeus 31133* (que produce naturalmente aklavinona) fue transformada con un plásmido al cual le hacía falta el gen *actIII* e incluía *actI*, *actVII* y *actIV*) el producto resultante fue aloesaponarin II (otro policétido). Esto indicaba que el gen *actIII* de *S. galilaeus 31133* funciona indistintamente con el gen *actIII* de *S. Coelicolor*. (Strohl, et al., 1990)

Aloesaponarin II y aklavinona contienen cadenas policétidas de distintas longitudes, sin embargo, el grupo cetona es reducido en el C-9 a su correspondiente OH, esto argumentaba que la enzima KR “mide” la cadena policétida ensamblada y reduce el carbono correcto.

Estudios estructurales, sugieren que esta mezcla de especificidad y tolerancia es debido a una influencia combinada de interface proteína-proteína entre ACP y KR, además de la preferencia que tiene la cadena policétida de poder enlazarse a lado del sitio de enlace de NADPH de KR, y ser reducido a un alcohol. (Korman, et al., 2004)

Una importante cuestión con respecto a la primera ciclación, – y que previo a los análisis estructurales de KR y NADPH (Korman, et al., 2004) se establecía que el primer anillo aromático del pigmento se formaba después de la reducción del C-9 en OH – Korman y colegas, deducen que KR cicla los carbonos C-7 y C-12 en la cadena policétida. (Korman, et al., 2004).

A partir de una simulación computacional sobre el ensamble de la cadena policétida lineal, es posible físicamente reducir tantos grupos carbonilos como se requieran a parte del famoso C-9, lográndolo sin alterar la forma estructural de la proteína. Este intermediario de actinorhodina presenta una gran flexibilidad, lo cual muestra una pérdida en la regioespecificidad de la región C-9.

El mismo año, investigaciones sobre el ensamble de la cadena policétida, deducían de igual manera, que el complejo KS-CLF cicla los carbonos C-7 a C-14 debido a que en el túnel anfipático solo cabría la cadena si estuviera “abrochada”. La última condensación ocasiona que la cadena cicle y sea catalizada por una molécula de agua (WAT1) – que yace en el

agujero del oxianión en el centro del túnel anfipático – y actúa como un ácido normal después de atacar al C-7 al donar un protón al policétido ciclado. (Keatinge-Clay, et al., 2004)

Korman y colegas, continuando con su investigación sobre la regioespecificidad, realizaron ensayos en 20 mutantes de KR e identificaron los residuos necesarios para la interacción del sustrato, para lo cual sugirieron modelos estructurales para la misma reacción. Al igual que (Keatinge-Clay, et al., 2004), deducen que el policétido (sustrato) debe ser dirigido al sitio activo por los residuos de “dirección”, los cuales son hidrofóbicos. En seguida, el policétido debe ser posicionado de tal manera que el C-11 pueda interactuar con T145 a través de un puente de hidrógeno. “Esta interacción puede reducir el pK_a de los protones α de C-12 de tal manera que un protón puede ser abstraído por el agua en el bolsillo unido al sustrato” (Javidpour, et al., 2013) Esto propone que el origen de la ciclación C-7 a C-12 mediante la interacción de T145, con el oxianión C-7 estabilizado por enlaces de hidrógeno mediados por agua al S158 altamente conservado.

La reseña presenta las investigaciones que se dieron a lo largo de casi una década en cuánto a la primera ciclación y la regioespecificidad de la cetoreductasa; el redactor plantea en la figura 11 que la cetoreductasa también cicla C-7 a C-12 y consecuentemente reduce C-9 en un alcohol.

Ciclación y aromatización

Una vez que la primera ciclación ha ocurrido como consecuencia de los PKS mínimos y que la cadena policétida ha sido reducida en C-9, la proteína aromatasas (ARO) producida por *actVII* remueve los dos grupos alcoholes del anillo previamente reducido ocasionando una “aromatización” del mismo (fig. 12).

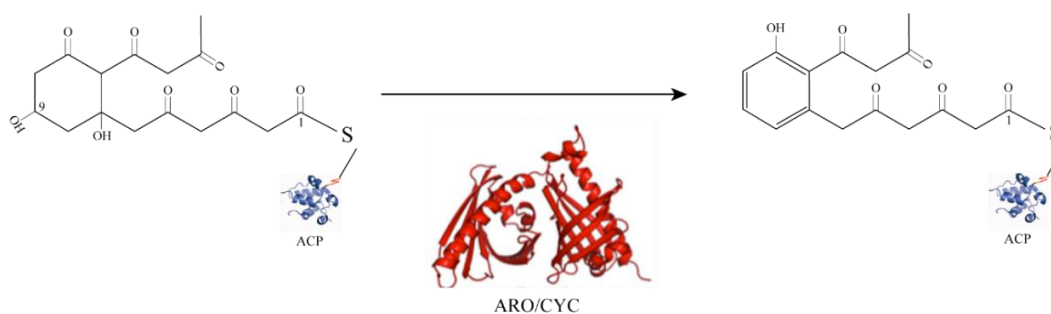


Fig. 12 Representación esquemática de la deshidratación y consecuente aromatización del primer anillo por ARO/CYC. Elaboración propia con información tomada de (Caldara-Festin, et al., 2015) y (McDaniel, et al., 1995) con el software Illustrator 2020 versión 24.1.

Se ha establecido que en realidad la aromatasas es un complejo compuesto por dos proteínas aromatasas/ciclasas (ARO/CYC) y – en específico de las PKSs tipo II – contienen dos dominios. Este complejo traducido de *act* presenta una alta especificidad y únicamente reconoce cadenas de policétidos de máximo 16 carbonos, mientras que otras aromatasas de diferentes grupos de genes pueden reconocer de 8, 16, 18, 20, 22, 24 carbonos.

Este bidominio proteico se puede encontrar tanto en PKSs no reducidas y reducidas. En específico – y en este caso – ARO/CYC cataliza la deshidratación del C9 previamente reducido, seguido de la aromatización del anillo. En respuesta al entendimiento y diferenciación al momento de la ciclación de la cadena policétida en sistemas reducidos y no reducidos por parte del bidominio proteico, se compararon las enzimas StfQ (de bidominio de ciclación de C-7-C12 no reducido) y BexL (de bidominio de ciclación de C-7 – C-12 reducido). (Caldara-Festin, et al., 2015)

Una diferencia clave es la presencia - en el caso BexL y los PKSs de tipo II – de un NADPH dependiente de KR, tal y como lo establecimos en el apartado de reducción. En el sistema reducido el dominio con un extremo que contiene N actúa como una deshidratasa/aromatasas en C-7 a C-12 catalizando la reacción clave en la biosíntesis de policétido aromáticos. (Caldara-Festin, et al., 2015)

Consecuentemente, la enzima ciclasa (CYC) traducida de *actIV* controla una segunda ciclación en los carbonos C-5 a C-14 en la cadena policétida reducida (fig. 13), esto lo logra a través de una condensación aldohólica. CYC de PKSs puede ciclar cadenas no más largas de ocho y nueve policétidos. (McDaniel, et al., 1995)

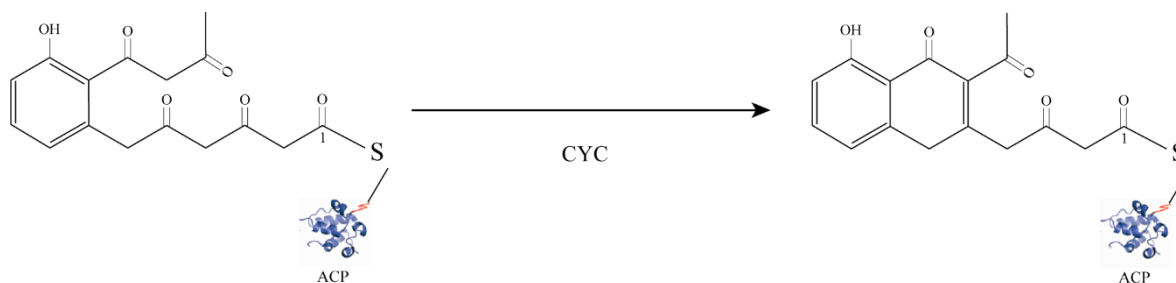


Fig. 13 Representación esquemática de la condensación aldohólica y consecuente ciclación del primer anillo por CYC, la estructura de *actIV*-CYC – al conocimiento del autor – no ha sido reportada. Elaboración propia con información tomada de (Caldara-Festin, et al., 2015) y (McDaniel, et al., 1995) con el software Illustrator 2020 versión 24.1.

Ajustes y adaptaciones moleculares

Una vez que la estructura molecular del octacétido – como es el caso de actinorhodina – ha pasado por los pasos de reducción, ciclación y aromatización de los carbonos correspondientes, una estructura policétida aromática toma forma. En este punto, la producción de los consecuentes policétidos que se pudieran formar es intrínsecamente dependiente de los PKSs transcritos en función de los genes regulatorios.

La molécula de actinorhodina, presenta un problema en la formación del tercer anillo aromático. Varios investigadores han deducido que los productos de *actVI* – en base a similitudes con bases de datos de otras proteínas y caracterizaciones químicas – tienen un rol importante en ajustar y adaptar molecularmente el policétido aromático para poder producir la molécula correspondiente a las necesidades de la bacteria (Taguchi, et al., 2000). Al conocimiento del redactor, no existen investigaciones certeras con respecto a análisis estructurales y funcionales sobre la interacción entre los productos o proteínas deducidas de *actVI* y *actVB* y los sustratos de la policétido aromático. Estos dos grupos de genes son los últimos involucrados en la biosíntesis de actinorhodina

La similitud (53%) que presenta el producto *actVI*-ORF1 con β -hidroxiacil-CoA deshidratasa (HACD) deduce que el producto se involucra en la formación de anillos pirones. Una vez que CYC haya ciclado del C-5 a C-14 se puede deducir que la estructura intermedia o parcial del policétido aromático puede ser reconocida por HACD como un sustrato; al cual reduce el grupo cetona en el C-3 para dar lugar a un alcohol secundario quiral. (Fig. 14)

Para probar esto, (Ichinose, et al., 1999) utilizaron una cepa recombinante *Streptomyces coelicolor* CH999 que porta un plásmido pRM5 (productor DMAC y aloesaponarin II) y donde le introdujeron diferentes combinaciones de los ORF1, 2 y 3 después de CYC. La cepa CH599 pIJ5660 (prM5 + *actVI*-ORF1) produjo (S)-DNPA (precursor en las etapas finales de la biosíntesis de actinorhodina (Taguchi, et al., 2000)) junto con una cantidad significativa de aloesaponarin II. Los datos espectrales que arrojaron el uso de resonancia magnética nuclear (NMR) y espectrometría de masas (MS) encontraron hallazgos que claramente *actVI*-ORF1 codifica para una reductasa que determina la formación del C-3. (Ichinose, et al., 1999)

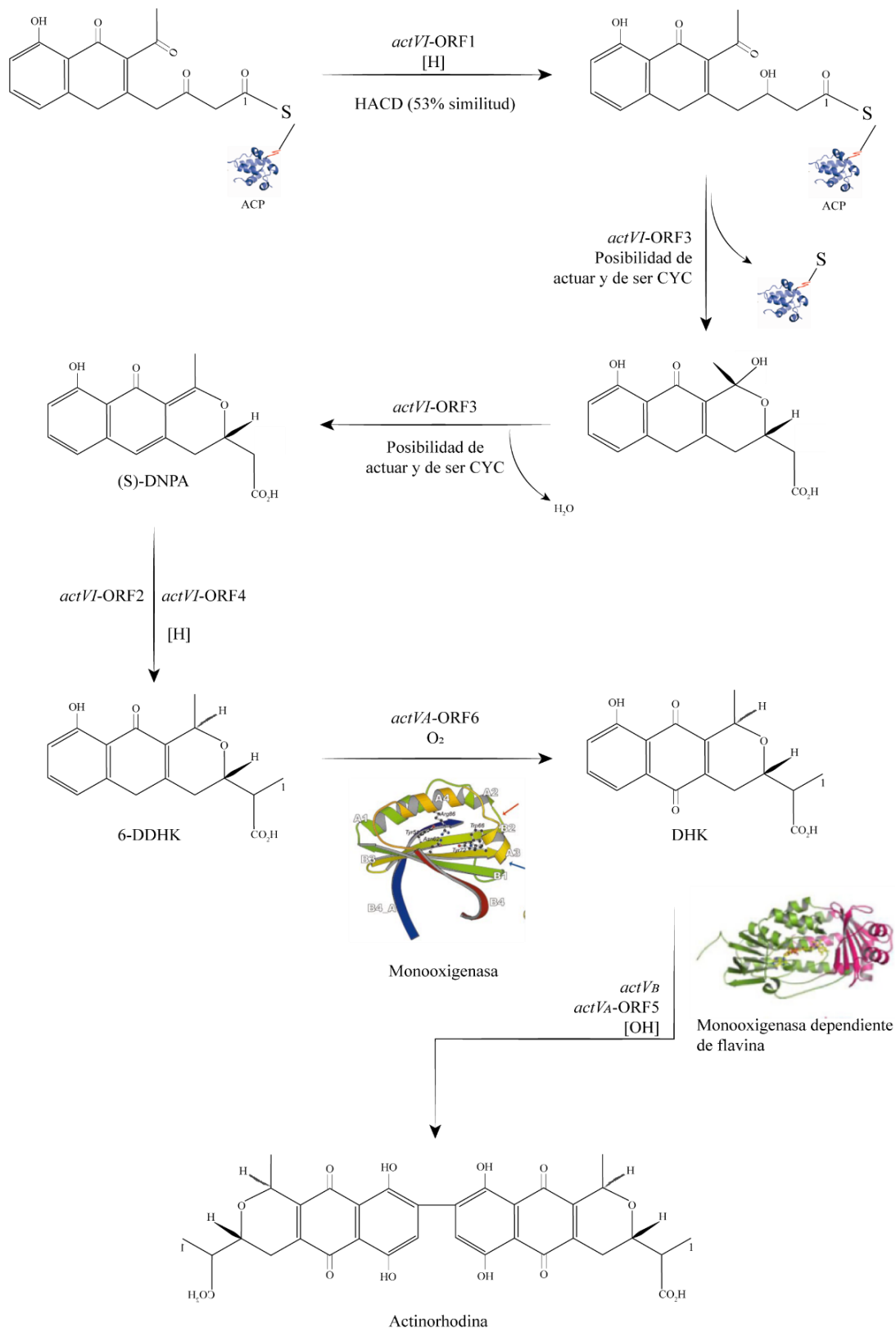


Fig. 14 Representación esquemática de los ajustes y adaptaciones moleculares de las consecuentes deshidrataciones, hidroxilaciones y oxidaciones que actinorhodina requiere para ser biosintetizada. Las estructuras proteicas no mostradas – al conocimiento del redactor – no han sido resueltas. Elaboración propia con información tomada de (Taguchi, et al., 2000), (Ichinose, et al., 1999), (Sciaria, et al., 2003) y (Valton, et al., 2004) con el software Illustrator 2020 versión 24.1.

El siguiente paso dentro de la síntesis sería la formación del grupo funcional hemiacetal y la deshidratación de la misma, la cual se ha podido deducir que es una reacción química espontánea (entre la cetona y el alcohol), como secuencia de la reducción del C-3, sin embargo, no se descarta que su formación pueda ser asistido por enzimas que garanticen la formación eficiente del anillo pirano que es codificado por *actVI-ORF3* (Fig. 14). La interrupción de la primera del proceso, dio como resultado que la cepa produjera el pigmento azul y en su lugar fuera amarillento, pero al exponerlo a la presencia de humo de amoníaco este se tornó azul de acuerdo con lo reportado por (Ichinose, et al., 1999). Una explicación es que el producto puede asistir la ciclación/deshidratación del alcohol, que de otra manera ocurre espontáneamente – pero sin eficiencia –, y con la posibilidad de la presencia de una enzima que se ha intuido pueda estar presente e intervenir en el proceso, modificando las condiciones y aumentando el pH del sistema. El único homólogo secuencial descubierto de *actVI-ORF3* es un grupo de genes biosintéticos completos del grupo granactina (ORF18), el cual también posee un anillo pirano como parte de estructura benzoisocromaquinona (BIQ) (Taguchi, et al., 2000). La mejor explicación hasta el momento, es que esta sea una enzima ciclasa (CYC) que forme el anillo pirano.

Con respecto a *actVI-ORFA*, se ha establecido que es un factor inusual regulatorio, el cual no se involucra directamente en la síntesis de actinorhodina, por el cual, no ahondaremos en esta reseña.

Bajo la similitud de la estructura intermediaria (S)-DNPA con el sustrato supuesto de reductasa de enoilo, (Taguchi, et al., 2000) proponen que este intermediario se reduzca con *actVI-ORF2* en el doble enlace de C-14 y C-15, donde se concluye que consecuentemente ocurra una isomerización para cumplir la estructura insaturada α , β -carbonilo (Fig. 14).

A pesar de cuando se realizaron los ensayos sobre las mutaciones e interrupciones de los ORFs en *Streptomyces coelicolor* CH999, y en este caso se interrumpió ORF4, la cepa si produjo actinorhodina, pero en menor cantidad, lo cual, sugiere que el producto de ORF4 ayuda y favorece la isomerización química del policétido aromático (Taguchi, et al., 2000).

El penúltimo paso dentro de ruta la metabólica que sintetiza actinorhodina es traducido por *actVA-ORF6* y se caracterizó como una monooxigenasa, la cual se encarga de catalizar la oxidación de compuestos fenólicos en la estructura quinona intermediaria en la ruta de síntesis de actinorhodina. 6-desoxidihidrokalafungina (6-DDHK) es oxidada por la catálisis de la monooxigenasa de *actVA-ORF6* a dihidrokalafungina (DHK) (Fig. 14).

La monooxigenasa de *actVA-ORF6* cristaliza como un homodímero y presenta unidades asimétricas con 113 residuos de aminoácidos, dentro de los cuales, los monómeros son estabilizados por una interfase hidrofóbica extensa. El descubrimiento de que ciertas reacciones catalizadas por este tipo de proteínas no requieren metales u otro tipo de cofactores, conlleva a proponer otro tipo de mecanismos proteicos, donde diferentes intermediarios radicales pueden dar forma a muchos productos oxidativos, así como conllevar a especies radicales reactivas de antronas. (Sciaria, et al., 2003)

En el modelo propuesto, la monooxigenasa prefiere oxidar C-6 en lugar de otros carbonos reactivos debido a que solo este carbono no tiene contacto directo con la matriz proteica, donde los demás si tiene contacto a través de fuerzas de Van der Waals o interacciones polares.

Para que pueda ser accesible un ataque por oxígeno molecular, es necesario un desplazamiento significativo de las cadenas aledañas del andamio enzimático rígido. De esta manera, la cavidad del sitio activo actúa como un escudo, dejando solo el carbanión C-6 reactivo y el grupo carboxilo expuesto al solvente. (Sciaria, et al., 2003)

Esta oxidación deja a la dihidrokalafungina (DHK) como el último intermediario en la síntesis del policétido aromático de pigmentación azul.

El último paso para dar lugar a la estructura de actinorhodina conocida, es llevado a cabo mediante una enzima involucrada en reacciones de oxidación en numerosas rutas metabólicas y biosintéticas en varios microorganismos (Fig.14). La enzima se compone por dos unidades: NADPH:flavina oxidoreductasa (transcrita de *actVB*) y monooxigenasa dependiente de un flavín mononucleótido (FMN) (transcrita de *actVA-ORF5*).

Ciertos resultados dentro la interacción entre estos dos componente han dado lugar a argumentos que establecen que estos ORFs están involucrados en transformar DHK en ACT, ya que con la combinación pura de NAD(P)H:flavina oxidoreductasa y monooxigenasa dependiente de un flavín mononucleótido (ActVA – ActVB) se puede catalizar una reacción de hidroxilación usando 1,5-dihidroantraquinona, la cual funciona como un sustrato análogo a una estructura antraquinona. (Valton, et al., 2004)

La oxidación requiere NADH, FMN y oxígeno molecular, ActVB sirve para producción de flavinas reducidas, mientras que ActVA, utiliza estos últimos para activar el oxígeno y oxidar el sustrato. (Valton, et al., 2004)

En función de lo anterior, se planteó el siguiente mecanismo:

En el principio de la reacción, la flavina oxidada (FMN_{ox}) se enlaza a ActVB, donde es reducida por NADH. El FMN_{red} (flavina reducida) resultante se difunde de ActVB y se enlaza estrechamente a ActVA, donde reacciona con el oxígeno. En este paso, se forma un reactivo intermediario, que es usado para hidroxilar el sustrato. (Valton, et al., 2004)

Sin embargo, los datos recabados no demostraron alguna interacción peculiar entre los dos compuestos ActVB y ActVA. Este último paso da lugar al policétido aromático de pigmentación azul llamado actinorhodina (Fig. 14).

Como se planteó en el primer objetivo específico, y se desarrolló a lo largo de la primera sección del presente trabajo, se realizó una reseña exhaustiva sobre la ruta metabólica que presenta *Streptomyces coelicolor* para biosintetizar actinorhodina. Desde el grupo de genes que contienen la información para programar la síntesis del policétido aromático hasta las proteínas traducidas a partir de estos últimos, que portan, sintetizan y regulan esta ruta metabólica. Dentro de las siguientes secciones analizaremos y compararemos – mediante variación de experimentos – los parámetros fisicoquímicos y nutricionales que afectan la producción del pigmento de coloración azul. Todo, con el fin de concluir si existe o no alguna relación entre estos últimos y la producción de actinorhodina.

Parámetros fisicoquímicos y nutricionales en la producción de actinorhodina

Los pigmentos microbiológicos son consecuencia de la activación y regulación de genes donde se ven involucradas distintas proteínas regulatorias – que se ven traducidas o no –, en función a la respuesta dictada por el ambiente natural que las rodea; en otras palabras, los pigmentos microbiológicos pueden producirse como consecuencia de su ciclo de vida, en respuesta a bioindicadores, así como nutrientes y parámetros fisicoquímicos del ambiente en el que se encuentran. Existen distintos estudios sobre cuáles son los nutrientes y parámetros fisicoquímicos en los que *Streptomyces coelicolor* biosintetiza u optimiza la producción de actinorhodina y cuáles son las rutas metabólicas o procesos involucrados en la misma. Los factores nutricionales claves que afectan la producción de pigmentos y generalmente metabolitos especializados por parte de los microorganismos son las fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y fuentes de fosfato.

Para poder denotar el tipo y la cantidad de factor nutricional necesario para la producción u optimización de la producción de actinorhodina (y de cualquier metabolito secundario) es preciso realizar diferentes aproximaciones para poder estudiar estos fenómenos. Una de las aproximaciones más comunes ha sido el utilizar diseños de experimentos, diseños factoriales y superficie de respuesta para que, en función de diferentes concentraciones o cantidades de nutriente agregados a los agregados a los medios de cultivo de distintas fuentes nutricionales, puedan ser cuantificadas a través de análisis estadísticos.

Optimizando el medio de cultivo mediante metodologías estadísticas (Elibol & Mavituna, 1998) y de superficies de respuesta (Elibol, 2004), se ha reportado a la sacarosa como fuente de carbono de suma importancia proveyendo un buen equilibrio osmótico en la célula (entre el citoplasma y el medio), resultando en un cambio de volumen de la bacteria y previniendo el exceso de agua en ella. Cuando la sacarosa es excluida de un medio de cultivo, no se lleva a cabo la síntesis de actinorhodina y se ha supuesto que funciona como un activador de sistemas enzimáticos responsables de la biosíntesis del pigmento azul. Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado exactamente su aprovechamiento y catabolismo. Lo cual se analiza en el apartado de materiales y métodos respecto a las fuentes de carbono sacarosa y glucosa.

Otro factor de suma importancia y del cuál enfatizamos más adelante es el compuesto GlcNAc, el cual es una fuente de nitrógeno y carbono que forma parte de la pared celular bacteriana y es monómero de la quitina, un polímero abundante en la naturaleza; cuando este amino azúcar es agregado en medios de cultivos sólidos ricos en nutrientes – como (R2YE) – en concentraciones iguales o mayores a 10 mM en R2YE ocasiona la detención del desarrollo bacteriano, y la producción del pigmento azulado. Mientras que en medios de cultivo pobres en nutrientes desencadena una producción de actinorhodina y otros tipos de antibióticos y pigmentos. (Rigali, et al., 2008). Lo cual se analiza en el apartado de materiales y métodos respecto a las fuentes de carbono N-acetil glucosamina.

Por otro lado, se ha investigado el efecto que han tenido las fuentes de nitrógeno en la producción de actinorhodina; para poder indagar si la producción de actinorhodina está sujeta a la inhibición catabólica de nitrógeno, ha sido necesario cultivar a *S. coelicolor* en una variedad de fuentes de nitrógeno con alguna fuente principal de carbono. Nitrato de sodio y prolina han sido dos de las fuentes probadas que permiten la producción del policétido aromático, mientras que la producción de actinorhodina es sensible a ser inhibida por la presencia de amoníaco. (Hobbs, et al., 1990). Esto se analiza y profundiza más adelante en el apartado de Materiales y métodos. De igual manera, las altas concentraciones de glutamato decrecen la tasa a la cual actinorhodina es producida, sugiriendo que limitar la cantidad de nitrógeno en el medio es de vital importancia para la expresión completa de los genes biosintéticos. (Doull & Vining, 1990). Lo cual se analiza y profundiza más adelante en el apartado de Materiales y métodos.

Para poder estudiar qué tanto es aprovechado cada uno de los nutrientes mencionados anteriormente, se debe analizar el efecto que tiene el entorno del crecimiento microbiano y qué tanto se diluye los nutrientes – a diferentes concentraciones – encontrados en el mismo. (Melzoch, et al., 1997) utilizaron un biorreactor quimiostato para estudiar la producción de actinorhodina para mantener el cultivo continuo en función de la dilución de nutrientes que la *S. coelicolor* que requirió, los autores concluyen que el microorganismo no presentó un metabolismo de flujo extenso – lo cual permitió establecer que no biosintetizaba (en mayor cantidad) metabolitos secundarios bajo la presencia de exceso de nutrientes –, instaurando

que la mayor tasa de producción de actinorhodina presentaba cuando las condiciones de carbono (glucosa) y nitrógeno (cloruro de amonio) son limitadas en el medio de cultivo.

De igual manera, el efecto del fosfato como fuente nutricional en medios de cultivo estandarizados con glucosa y nitrato, y con concentraciones ≥ 1 mM de fosfato resultaron en la inhibición de producción del antibiótico, siendo este su punto óptimo (Hobbs, et al., 1990). Las concentraciones de cualquier fuente de nitrógeno en forma de amonio se han reportado como inhibitorias para la producción de actinorhodina, sin embargo, cuando fosfato 1mM se agregó, su inhibición se retarda hasta alcanzar concentraciones de 1 mM hasta 50 mM. Esto indicó que el metabolismo secundario de *S. coelicolor* es controlado por ambos nutrientes y que existe una relación entre ellos. (Hobbs, et al., 1990). Así mismo, con concentraciones de fosfato con 5mM con almidón a 5% y 60mM de glutamato, la producción del pigmento azul inicia cuando la concentración de fosfato se había terminado. Cuando se utilizaron concentraciones de 10 o 15 mM de fosfato hubo presencia del mismo durante 4 días indicando que no había sido utilizado donde a su vez, durante ese tiempo ya existía presencia de actinorhodina (Doull & Vining, 1990). Esto indicó que estos nutrientes presentan un control multifuncional en el proceso de producción del policétido aromático, e inclusive que es parte del parte del proceso de tasa a la cual el microorganismo crece.

La variación que existe en función del aprovechamiento de los nutrientes anteriormente mencionados está relacionada directamente con ciertos sistemas metabólicos encontrados en muchas bacterias, como lo son la represión catabólica de carbono, la respuesta de transcripción a genes en presencia de nitrógeno y el sistema encargado de metabolizar fósforo. Durante la siguiente sección, se describen y se relatan los descubrimientos existentes sobre la relación entre los nutrientes y dichos sistemas.

Represión catabólica de carbono

La mayoría de las bacterias pueden usar sustratos selectivos a partir de una mezcla de diferentes fuentes de carbono, en presencia de varias o algunas de ellas previenen la expresión y frecuentemente la actividad de enzimas que impiden el uso de sustratos secundarios. Esta regulación, que controla la expresión de genes involucrados en el consumo y utilización de fuentes de carbono alternativas se llama represión catabólica de carbono (CCR). Este

mecanismo de conservación protege a la célula al promover el uso de nutrientes que soportan altas tasas de crecimiento y consecuentemente limitan la expresión de genes que no son esenciales para el mismo, evitando que se gaste energía en la maquinaria de síntesis proteica (Ruiz-Villafán, et al., 2021). En ambientes naturales logran generar una competencia, ya que al seleccionar fuentes de carbono específicas se determina el ciclo celular, así como la necesidad de producir metabolitos especializados.

CCR también afecta a las proteínas involucradas en la diferenciación morfológica como los genes *bld*, que están implicados en la formación de las hifas aéreas. Cuando se cultivan microorganismos mutantes faltantes del gen *bldA*, *bldG*, *bldH* y *bldK*, con manitol o glicerol llevan a cabo su ciclo de vida correcto y presentan buena esporulación. (Ruiz-Villafán, et al., 2021)

En las siguientes fuentes de carbono se explica brevemente su función y su relación con la CCR y la biosíntesis de actinorhodina

Glucosa

La glucosa es una de las fuentes de carbono preferida para el crecimiento de *Streptomyces*, sin embargo, a concentraciones elevadas, interfiere con la producción de metabolitos secundarios y su diferenciación morfológicas, es por ello, que limitar a tasas bajas la inducción de este factor es de suma importancia. La glucosa quinasa (GlkA) es la proteína encargada de empezar el catabolismo de glucosa al fosforilarla en glucosa 6-fosfato y tiene la labor global de regular la represión catabólica de carbono. (fig. 15) (Romero-Rodríguez, et al., 2017)

En cepas mutantes que tenían la falta del gen *glkA* (que traduce a GlkA) ni la glucosa o cualquier otra fuente de carbono utilizable ejercían CCR en ellas. Algunas de estas cepas mutantes podían utilizar glicerol, arabinosa, fructosa, galactosa (Angell, et al., 1992) y otro tipo de fuentes de carbono como galactosa y glicerol (Kwakman & Postma, 1994) en la presencia de glucosa.

La ruta directa por la cual la glucosa controla los reguladores que se enlazan a *actII-ORF4* aún no ha sido elucidada (fig. 15), sin embargo, en base a lo comentado previamente, se pudo establecer que la proteína GlkA es la que está directamente involucrada en CCR y es

responsable de múltiples efectos visibles en las características de la cepa. GlkA es una enzima que presenta una función regulatoria directa y pertenece a un grupo de enzimas que desencadenan una serie de funciones en regulación genética. (Ruiz-Villafán, et al., 2021)

Xilosa y Rok7b7

Una fuente de carbono altamente abundante en el ambiente natural de *S. coelicolor* es la xilosa derivada de plantas, donde a través de análisis transcriptómicos y proteómicos sugirieron que la proteína Rok7b7 – la cual es un regulador perteneciente a una familia de proteínas llamada ROK que son ampliamente encontradas en actinomicetos y que generalmente son asociadas al control y aprovechamiento de carbono en el metabolismo – actúa como represor del operón adyacente *xylFGH* encargado de transportar a xilosa (fig. 15) (Swiatek, et al., 2013), visto de otra manera, regula y promueve la producción de actinorhodina, a través del enlace directo al gen *actII-ORF4* que hemos comentado con anterioridad.

Este sistema de regulación activado por XylFGH, ha sido reconocido como el único sistema transportador de azúcar independiente de GlkA. Además, una serie de análisis en mutantes faltantes del gen *rok7b7* mostraron la falta de micelio aéreo, una regulación negativa en la producción de antibióticos y mostraron una mejora en la CCR (Swiatek, et al., 2013). Esto reafirma la relación entre este gen y la señalización de muchos de los factores involucrados en la activación de la ruta metabólica del pigmento azul.

N-acetil glucosamina (GlcNAc) y DasR

Los sustratos que actúan como GlcNAc provienen a partir de la muerte celular o partir de la degradación de quitina encontrada en el ambiente. Cuando la GlcNAc es liberada por autólisis se reincorpora a la célula aledaña y se fosforila por el sistema de transporte fosfotransferasa (PTS), consecuentemente ocurre una desacetilación, lo cual deja a GlcN-P como una molécula de señal para el regulador DasR dándole un efecto alostérico (fig. 15). DasR es una proteína regulatoria de naturaleza represora que actúa directamente en la región promotora de *actII-ORF4* donde influye directamente en qué tanto o cuando se produce

actinorhodina. (Liu, et al., 2013) Al momento que la GlcN-P se enlaza de manera alostérica a DasR, estabiliza la presión ocasionando una regulación positiva en la producción de actinorhodina.

Escasez de fosfato y su transcripción regulatoria: el sistema PhoR – PhoP

Tal y como se describió arriba, existen experimentos con resultados similares en donde en la presencia de concentraciones altas de fosfato se inhibe la producción de diferentes antibióticos – entre ellos actinorhodina – no solo en *S. coelicolor*, sino también en diferentes especies de *Streptomyces* (Romero-Rodríguez, et al., 2018), estos antibióticos presentan diferentes grupos funcionales lo cual implica un efecto en común a través de sus diferentes rutas metabólicas. El efecto que transmite fosfato a través de su alimentación ha sido propuesto como un mecanismo regulatorio compuesto por dos partes llamado: sistema PhoR – PhoP o regulon Pho (fig. 15).

El hecho de que el fósforo se encuentre como una limitante dentro del medio en el que la bacteria crece, hace que se active un metabolismo secundario después de la fase estacionaria del ciclo de vida. PhoR es una quinasa sensorial incrustada en la membrana que señala la escasez de fosfato en el ambiente, cuando esta falta de fosfato activa el ya mencionado sistema Pho, donde PhoR dona su grupo fosfato a PhoP, que es un regulador de respuesta que se enlaza al ADN, el cual consecuentemente, es el encargado de controlar la transcripción de genes que pertenecen al regulon *pho* (gen) al enlazarse a sus cajas PHO (fig. 15). (Rodríguez-García, et al., 2009)

El sistema PhoR – PhoP no actúa directamente en los promotores de genes que biosintetizan actinorhodina, en lugar de, PhoP se enlaza a la región promotora de *afsS* y realiza la transcripción de la proteína reguladora global AfsS, que compete directamente con el represor proteico AfsR. Estas dos últimas proteínas están clasificadas dentro de la familia proteica reguladora de antibióticos (SARPs) y están involucrados positivamente en la biosíntesis de actinorhodina. (Santos-Beneit, et al., 2009). La AfsS activa la expresión de *actII-ORF4* y el PhoP está indirectamente relacionado con la biosíntesis del policétido aromático (fig. 15).

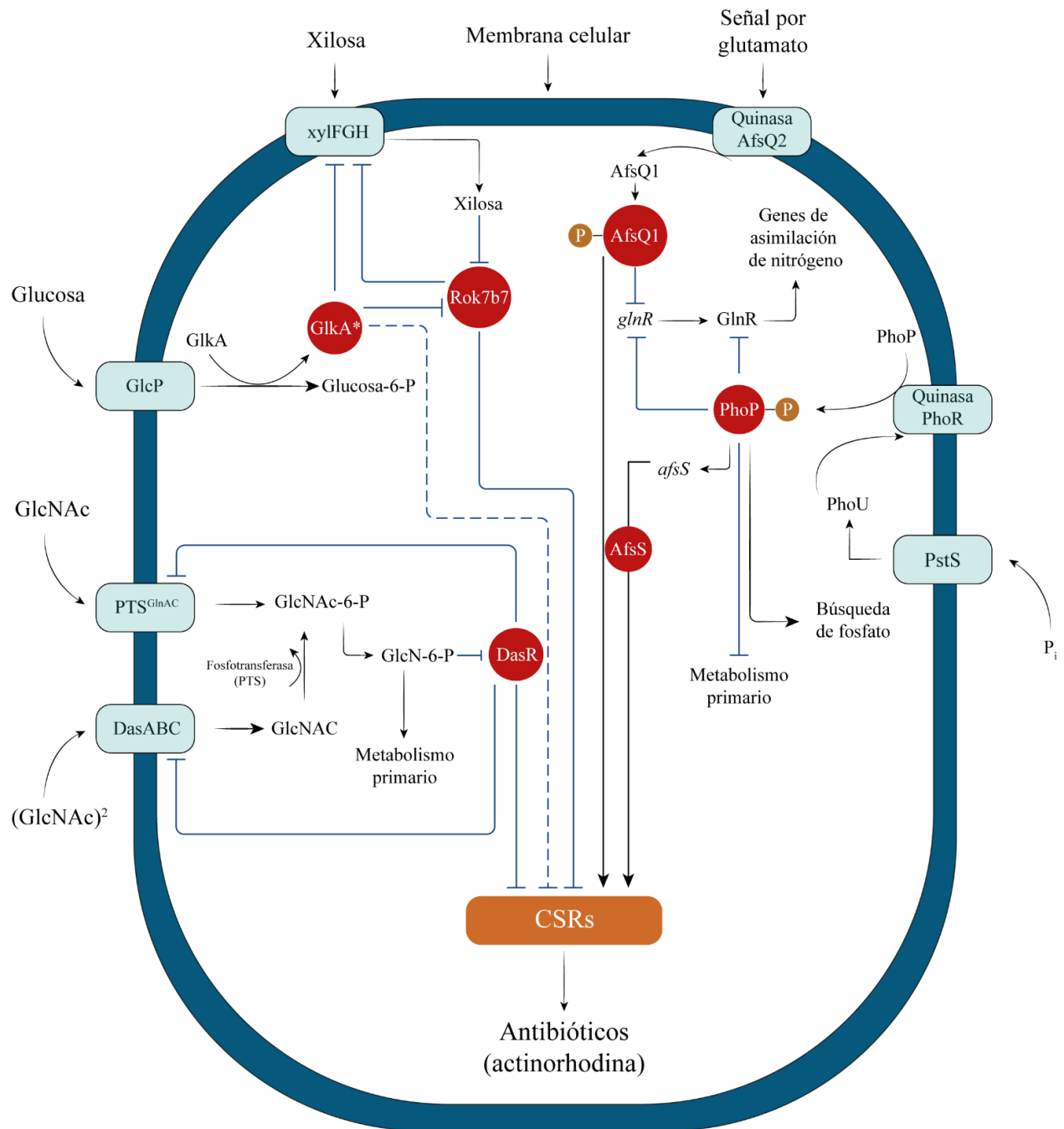


Fig. 15 Reguladores sensitivos a las fuentes nutricionales y su comunicación cruzada en la producción de antibióticos (actinorhodina) en *S. coelicolor*. El diagrama resume las rutas metabólicas mediante las cuales la disponibilidad de los nutrientes: carbono, nitrógeno y fosforo influyen en la expresión de reguladores situados en grupos (CSRs) que conllevan a la biosíntesis de numerosos antibióticos, incluyendo actinorhodina. Los círculos rojos indican los reguladores transcripcionales en función de señales dadas por los diferentes nutrientes. Las líneas y flechas continuas son rutas conocidas y las líneas punteadas son rutas desconocidas. Flechas indican activación y las barras indican represión. Diagrama de elaboración propia con información tomada de (Liu, et al., 2013) y (Romero-Rodríguez, et al., 2018), mediante el software Illustrator 2020 versión 24.1

Regulación de nitrógeno

Las bacterias – al igual que en el carbono – presentan una preferencia en las fuentes de nitrógeno, a esta preferencia se le conoce como represión de nitrógeno. Existe una proteína reguladora principal en la asimilación y regulación de nitrógeno que se llama GlnR (fig. 15), a través de estudios genómicos se ha logrado que el establecimiento de su enlazamiento a sitios no canónicos esté condicionado por la disponibilidad de nitrógeno. (Romero-Rodríguez, et al., 2018). Estos estudios también han denotado su gran plasticidad de la proteína lo cual, no solo le permite ser participe del metabolismo primario, sino también le permite controlar genes encargados del metabolismo secundario en reguladores específicos de genes (CSRs).

En específico, existe un sistema de dos componentes que se encargan de la asimilación de nitrógeno y su regulación en el metabolismo secundario. Uno de ellos es AfsQ1 que funge como represor de los genes encargados de la asimilación de nitrógeno del metabolismo primario y es un activador de muchos genes estructurales y regulatorios (CSRs) en la biosíntesis de antibióticos incluyendo *actII-ORF4* (Liu, et al., 2013) y el otro componente es la quinasa histidina AfsQ2 (fig. 15). El sistema AfsQ1/AfsQ2, compite con GlnR para enlazarse a sus sitios objetivos, donde este primero, actúa como represor del metabolismo de nitrógeno (Wang, et al., 2013). A la proteína AfsQ2, es posible que lo active una señal relacionada con el abundante aminoácido glutamato presente en la naturaleza y mediante ello active una fosforilación que depende completamente en la activación de AfsQ1. (Romero-Rodríguez, et al., 2018).

El objetivo de este trabajo ha sido realizar una reseña exhaustiva sobre de los mecanismos de producción del pigmento actinorhodina por la bacteria *Streptomyces coelicolor*, analizando el efecto que tienen las variables que afectan el proceso de producción.

Tal y como se ha planteado en esta sección, existen ciertas proteínas que se encuentran involucradas en la activación, regulación y represión de ciertos genes, y las cuales, están directamente relacionadas con las fuentes de nutrientes disponibles para el metabolismo primario y secundario de *S. coelicolor*, tales como carbono, nitrógeno y fósforo. Además, el involucramiento de parámetros fisicoquímicos como temperatura y pH también tienen una

función – menos investigada de acuerdo a los artículos encontrados – demostrada más a detalle en la sección de materiales y metodologías.

La reseña ha sido gracias a décadas de investigación en específico de esta bacteria ya que se ha utilizado como modelo para poder estudiar y entender mejor los mecanismos mediante los cuales se producen los metabolitos secundarios.

Materiales y metodologías

En esta sección mostramos la variación en materiales y metodologías utilizadas en diferentes experimentos mostrados a lo largo de diferentes artículos de investigación, con el fin de denotar la relación existente entre los parámetros fisicoquímicos y nutricionales en la biosíntesis de actinorhodina de los cuales se habló previamente en el marco teórico.

Fuentes de carbono

Sacarosa y glucosa

De acuerdo con lo mencionado por (Elibol & Mavituna, 1998), los medios de cultivo utilizados son los siguientes:

1. Medio definido: 10g de glucosa, 5 g de NaCl, 5 g de Na₂SO₄, 4.5g NaNO₃, 2g de K₂HPO₄, 1.2g de Base Tris, 1g de MgSO₄ heptahidratado y 0.0178g ZnSO₄ heptahidratado adicionando un litro de solución salina.
2. Medio complejo: 3g de extracto de levadura, 5g de peptona, 3g de extracto de malta, 10g de glucosa y 340g de sacarosa por litro.

La tabla 2 muestra experimentos utilizando el medio complejo con las variaciones mostradas de sacarosa mostradas en la misma con un pH = 6.2. Los valores mostrados de actinorhodina fueron determinados después de 48 hrs de fermentación.

Sacarosa (g/litro)	Actinorhodina (mg/l)
30	0
90	49
125	183
210	250
340	324
390	179
450	185

Tabla 2. Concentración de actinorhodina (mg/l) en función de variaciones en concentraciones de sacarosa (g/litro). Tabla realizada a partir de interpretación gráfica de (Elibol & Mavituna, 1998).

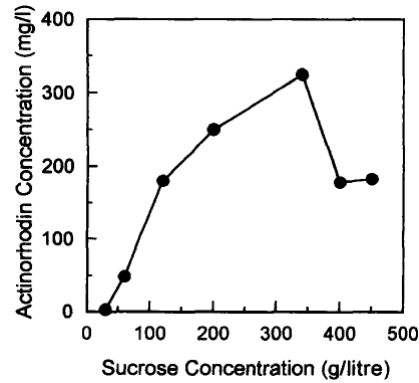


Fig. 16 Variación de la concentración máxima de actinorhodina con diferentes concentraciones de sacarosa iniciales en un medio complejo libre de glucosa.

En otra variación experimental, bajaron la concentración de 10g a 5g de glucosa a las mismas condiciones descritas con anterioridad, en este caso, las variables medidas cuantitativamente – en función del tiempo – y que se describen en la tabla 3 son: pH, concentración de glucosa (g/litro), concentración de sacarosa (g/litro), concentración de actinorhodina (mg/litro). (Elibol & Mavituna, 1998)

Tiempo (h)	Glucosa (g/litro)	Sacarosa (g/litro)	pH	Actinorhodina (mg/litro)
0	8.5	8.5	5.9	0
25	6	8.45	5.5	0
50	4.2	7.7	5.3	0
100	2.5	7.5	5.1	0
125	1	7.65	4.9	0
150	0	7.4	5	4.9
200	0	7.7	7.5	9.3
250	0	7.6	7.7	50.5
350	0	7.8	8	115.1
400	0	7.9	7.9	127.3
500	0	8	7.8	149.5
550	0	8.1	7.9	150.9
700	0	8.3	7.5	145.3

Tabla 3. Concentraciones y medidas de las variables de sacarosa (g/litro), glucosa (g/litro), pH y producción de actinorhodina (mg/litro) en función del curso del tiempo del cultivo. Tabla realizada a partir de los datos mostrados en la gráfica de (Elibol & Mavituna, 1998).

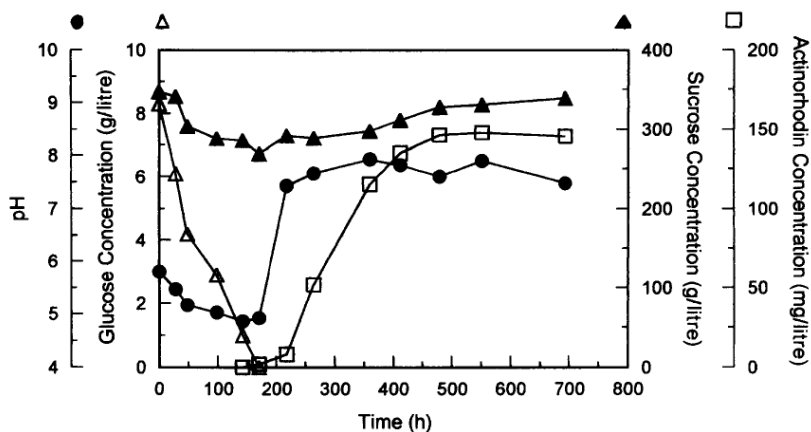


Fig. 17 Tiempo del curso del cultivo con 5g/l de glucosa en el medio complejo

En otro experimento se eliminó la glucosa del medio complejo. A continuación, se muestran los valores cercanos a las mismas condiciones descritas con anterioridad, en este caso, las variables medidas cuantitativamente se muestran en la tabla 3.

Tiempo (h)	Glucosa (g/litro)	Sacarosa (g/litro)	pH	Actinorhodina (mg/litro)
0	3	8.5	6.4	0
12	3	8.0	6.3	0
24	3.2	7.5	5.3	0
36	1.7	7.2	6	0
48	0	6.5	6.5	0
144	0	5.9	6.9	0
156	0	6.1	7.4	4.9
204	0	7	6.8	50.5
256	0	7.1	6.9	193.1
348	0	7.3	6.9	203.4
490	0	7.8	6.8	210.3
685	0	8	6.9	244.7
832	0	8.2	6.8	324
956	0	8.1	6.9	320.1
1000	0	8.2	7	322.3

Tabla 3. Concentraciones y medidas de las variables de sacarosa (g/litro), glucosa (g/litro), pH y producción de actinorhodina (mg/litro) en función del curso del tiempo del cultivo sin la adición extra de glucosa en el medio complejo. Tabla realizada a partir de los datos mostrados en la gráfica de (Elibol & Mavituna, 1998).

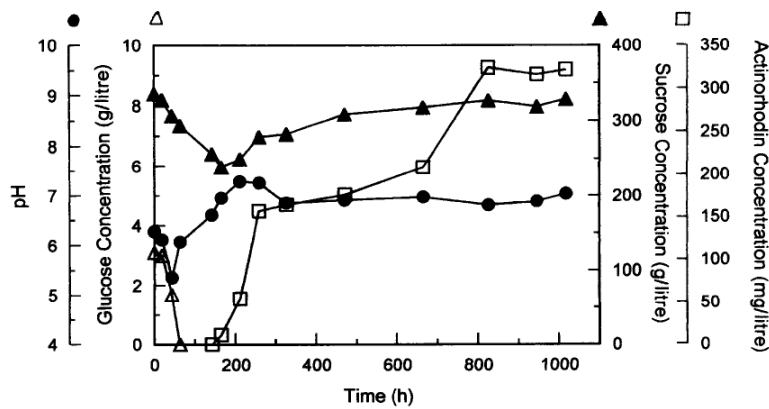


Fig. 18 Tiempo del curso del cultivo en el medio complejo libre de glucosa

Fuentes de nitrógeno

Hobbs y compañía establecieron experimentos a partir de la cepa *S. coelicolor* 1147 que contiene plásmidos SCP1 Y SCP2. Para el crecimiento bacteriano utilizaron el medio basal para esta bacteria filamentosa (HMM): 2g de glucosa, 5 g de NaCl, 5 g de Na₂SO₄, 4.5g NaNO₃, 2g de K₂HPO₄, 1.2g de Base Tris, 1g de MgSO₄ heptahidratado y 0.01g ZnSO₄ heptahidratado adicionando 1M de solución salina con pH ajustado a 7.2. Los cultivos fueron cultivados en matraces de 250 ml con 100 ml del medio a 30°C y 200 rpm. Estimaciones en la concentración de biomasa fueron medidas por densidad óptica en un espectrofotómetro a 450 nm. (Hobbs, et al., 1990)

Además, al medio de cultivo descrito añadieron aminoácidos y fuentes de nitrógeno inorgánicas a una concentración de 50mM con respecto al nitrógeno que se muestran en la tabla 4. La producción de pigmento, se midió después de 116 h.

Fuente de nitrógeno (50mM)	Tiempo medio de duplicación de cultivo	Actinorhodina $\left(\frac{\mu g}{mg * células}\right)$	Undecilprodigiosina $\left(\frac{\mu g}{mg * células}\right)$
Cloruro de amonio	7.3	0	5
Leucina	7.8	0	18
Prolina	9.3	46	39
Glicina	8.5	0	35
Glutamina	7.6	0	19
Nitrato de sodio	13.4	50	60
Nitrato de amonio	7.5	0	25

Tabla 4. Efectos de las fuentes de nitrógeno en el tiempo medio de duplicación de cultivo y en la producción de actinorhodina y undecilprodigiosina. Tabla tomada a partir de los resultados de (Hobbs, et al., 1990)

Por otra parte, actinorhodina fue completamente inhibido solamente a concentraciones de amonio por encima de 75mM. Al reducir las concentraciones a 1mM tuvo un efecto notorio en la producción de actinorhodina, en el que la concentración de amonio requerida para la inhibición fue incrementada de 1mM a más de 50mM.

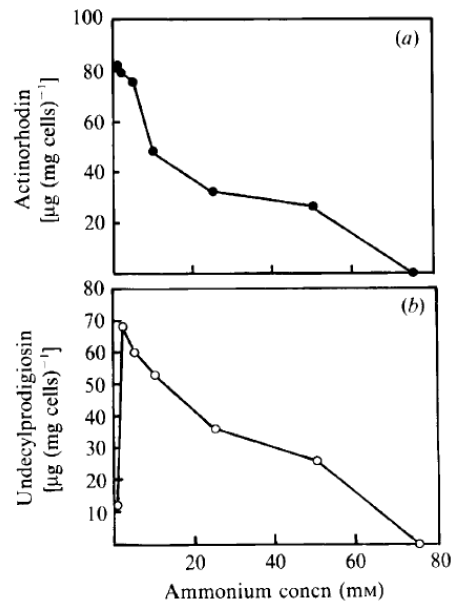


Fig. 19 Efecto de la concentración de fosfato en la producción de actinorhodina y undecilprodigiosina (Hobbs, et al., 1990)

Amonio (mM)	Actinorhodina $\left(\frac{\mu g}{mg * células}\right)$
1	85
2	80
5	77
10	50
24	36
52	35
75	0

Tabla 5. Datos sobre el efecto de la concentración de amonio en la producción de actinorhodina con 1mM de fosfato en el medio HMM. Tabla realizada a partir de los datos de (Hobbs, et al., 1990).

En otra publicación, Doull y Vining, variaron la concentración de glutamato (tabla 6) en un medio basal que contenía 5% de almidón con fosfato limitado a 2.5 mM y las concentraciones de glutamato entre 30 y 75 mM (Doull & Vining, 1990)

Concentración de glutamato		Producción de actinorhodina	
Inicial (mM)	Comienzo de la idiofase (mM)	Tiempo de inicio (h)	Tasa específica inicial $\left(\frac{\mu g/mg}{h}\right)$
30	2	52	1.5
45	9	54	1.2
60	14	64	0.7
75	26	64	0.05

Tabla 6. Datos sobre el efecto de la variación de concentración glutamato suplementado con fosfato limitado. Tabla tomada a partir de los resultados de (Doull & Vining, 1990)

Fuente de fosfato

Hobbs y colegas, también examinaron el efecto de fosfato en la producción de pigmentos actinorhodina y undecilprodigiosina por la cepa *S. coelicolor* 1147. Al igual que utilizaron el medio basal (HMM) para el estudio de los efectos de nitrógeno, utilizaron el mismo medio con nitrato como única fuente de nitrógeno. De acuerdo a sus resultados (tabla 5), las concentraciones de fosfato por arriba de 24mM inhibieron por completo la producción de actinorhodina y la producción de la misma, aumento con concentraciones de fosfato hasta en un punto de 0.38mM. La concentración óptima de producción de actinorhodina fue de 1mM. Los pigmentos se midieron después de 72 h y las determinaciones fueron a partir de cultivos duplicados. (Hobbs, et al., 1990)

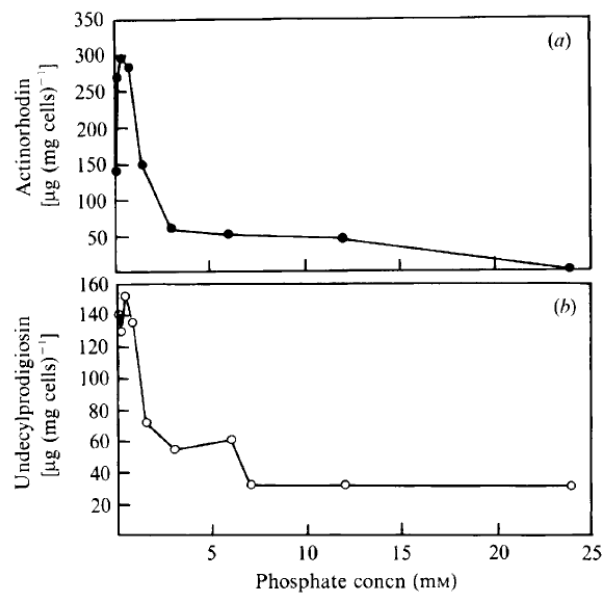


Fig. 20 Efecto de la concentración de fosfato en la producción de actinorhodina y undecilprodigiosina (Hobbs, et al., 1990)

Fosfato (mM)	Actinorhodina $\left(\frac{\mu g}{mg * células}\right)$
0	148
0.38	260
1	300
1.5	270
2	150
3	65
5.5	55
12	50
24	0

Tabla 7. Datos sobre el efecto de la concentración de fosfato en la producción de actinorhodina en el medio HMM. Tabla realizada a partir de los datos de (Hobbs, et al., 1990).

Doull y Vinig variaron la concentración de fosfato de 3 a 15 mM con almidón al 5% y una concentración de glutamato en exceso a 60 mM (Doull & Vining, 1990)

Concentración de fosfato			Producción de actinorhodina	
Inicial (mM)	Comienzo de la idiofase (mM)	de la	Tiempo de inicio (h)	Tasa específica inicial $\left(\frac{\mu g/mg}{h}\right)$
3	0		48	1.5
6	1.2		51	1.7
9	3.7		51	2
12	5.6		52	2.2
15	6.5		52	1.3

Tabla 8. Datos sobre el efecto de la variación de concentración glutamato suplementado con fosfato limitado. Tabla tomada a partir de los resultados de (Doull & Vining, 1990)

Resultados

Sacarosa y glucosa

El carbohidrato sacarosa no estimula la producción de actinorhodina, sin embargo, en el medio complejo la sacarosa toma un rol importante en síntesis de actinorhodina. Una concentración de sacarosa mayor o menor a 340g resultó en una menor concentración de actinorhodina (tabla 2 y fig. 16). El resultado de 324mg/l (en ausencia de glucosa) de concentración del antibiótico es 108 veces mayor que al utilizar el medio definido. (Elibol & Mavituna, 1998)

Los autores concluyen que el compuesto sacarosa, aparte de mantener un balance osmótico entre el citoplasma y medio alrededor, también suponen que pudo haber actuado como inductor o activador de sistemas enzimáticos que son responsable de la biosíntesis de actinorhodina. (Elibol & Mavituna, 1998)

Las figuras 16 y 17, muestran de igual manera una relación entre las condiciones óptimas de pH y la producción de actinorhodina en función del cambio de glucosa, es decir, el pH aumenta – y en específico en la fig. 16 – cuando toda la glucosa se ausenta del medio. El que el pH esté entre 6.5 y 7.5 indica un aumento significativo en la producción de actinorhodina. (Elibol & Mavituna, 1998)

Relación entre la fuente de nitrógeno y la fuente de fosfato.

La producción de actinorhodina es extensamente sensitiva a amonio. Se utilizó amonio – a pesar de no producir actinorhodina (tabla 5) –, debido a que otros datos han demostrado que la tasa de crecimiento no está relacionada con la capacidad represora que el nitrógeno exhibe en sus rutas metabólicas. En sus resultados ellos sugerían que el amonio es un controlador con gran peso sobre la producción de actinorhodina y en sí, en el metabolismo secundario, y además sugieren que sus sistemas están relacionados entre ellos. (Hobbs, et al., 1990)

Una reducción en la concentración de fosfato es capaz de liberar un tanto en la represión de amonio en la producción del pigmento azul, sin embargo, cuando la concentración de fosfato es elevada la producción de actinorhodina no es liberada al reducir la concentración de amonio (fig. 18 y 19). (Hobbs, et al., 1990)

Doul y Vinig, llegaron a conclusión cercana, en donde argumentaban que fosfato y glutamato (tabla 6 y 8) controlan negativamente la producción de actinorhodina. Durante el crecimiento exponencial en presencia excesiva de los dos nutrientes, actinorhodina no es producida, sin embargo, el agotamiento o reducción de estas fuentes. También denotan que la biosíntesis del pigmento inicia cuando el crecimiento exponencial concluye. (Doull & Vining, 1990)

Encontraron que altas concentraciones de glutamato inhiben la producción de actinorhodina, esto sugiere que la limitación de nitrógeno es necesaria para la total expresión de los genes que biosintetizan el pigmento azul. (Doull & Vining, 1990)

Discusión

Al iniciar la presente investigación, el planteamiento resalta la gran problemática ambiental y social que presenta la síntesis de pigmentos y colorantes sintéticos, y una alternativa que ofrece el redactor es la posibilidad de utilizar biopigmentos que biosintetizan numerosos organismos en la naturaleza. La bacteria micelial *Streptomyces coelicolor* es uno de ellos, la cual ofrece una gama amplia de pigmentos, los cuales son subproductos de las diversas condiciones ambientales que lo rodean, uno de esos pigmentos de los cuales se presenta una reseña extensa es el policétido aromático actinorhodina.

Actinorhodina es biosintetizada a través de varios grupos de genes involucrados en la traducción de numerosas proteínas transportadoras, catalizadoras y reguladoras; tal y como se planteó en la hipótesis, el presente trabajo muestra que en efecto la variación de la composición y las variables fisicoquímicas del medio en el cual se reproduce *Streptomyces coelicolor* afectan los mecanismos por los cuales el pigmento azul es producido, sin embargo, no de la manera esperada.

Las variables fisicoquímicas y – en específico – las nutricionales, son las que tienen mayor relevancia al momento de influir en la biosíntesis del policétido aromático. Todo esto a través de reguladores transcripcionales (Liu, et al., 2013), y en concreto, proteínas reguladoras encargadas de transcribir grupos de genes específicos que, a su vez, transcriben las proteínas involucradas en la síntesis del policétido aromático.

Tal y como se pudo apreciar en el apartado de ‘parámetros fisicoquímicos y nutricionales en la producción de actinorhodina’, se estableció que el comienzo de la biosíntesis del pigmento de interés en *S. coelicolor* A(2)3 está en función de las señales externas e ingresos de nutrientes por la membrana plasmática (fig. 15), donde se ven regulados por la represión catabólica de carbono (CCR) (Ruiz-Villafán, et al., 2021), la escasez y búsqueda de fosfato a través del sistema de transcripción regulatorio PhoR – PhoP (Romero-Rodríguez, et al., 2018), (Rodríguez-García, et al., 2009), (Santos-Beneit, et al., 2009), y el sistema de represión de nitrógeno (Liu, et al., 2013), (Wang, et al., 2013), (Romero-Rodríguez, et al., 2018).

Tal y como se aprecia en la figura 14, las proteínas regulatorias o los reguladores transcripcionales (tabla 1 y figura 15), son activados o reprimidos en función de la cantidad de nutrientes o señales transferidos a través de la membrana plasmática, los cuales, a su vez, activan o reprimen los reguladores situados en grupos (CSRs), es decir, no solo regulan la cantidad o la tasa a la cual se producen antibióticos, sino que también influyen en la gran cantidad de sistemas regulatorios que tiene la bacteria filamentosa donde se monitorea su fisiología celular, su estado de desarrollo y su densidad poblacional (Liu, et al., 2013).

En comparación de los numerosos estudios que se han realizado para poder desentrañar estos mecanismos de regulación, hace tiempo ya se veían resultados de esta índole. En el apartado de ‘resultados’, podemos apreciar distintos artículos que denotan resultados similares. A pesar de aún no tener claro el sistema mediante el cual la glucosa influye en la producción de actinorhodina, (Elibol & Mavituna, 1998) obtienen una producción óptima de actinorhodina cuando se limita la concentración de glucosa en el medio de cultivo, la cual se puede argumentar, qué, a través de la glucosa quinasa (GlcA) regula la transcripción de uno de los reguladores situados en grupos (CSRs) directamente relacionados en la biosíntesis del policétido aromático.

Otro nutriente que tiene una labor de la misma relevancia es la N-acetil glucosamina (GlcNAc); donde en experimentos cualitativos (Rigali, et al., 2008), se ha podido apreciar que al momento de agregar este nutriente a concentraciones mayores a 10 mM en un medio rico en nutrientes la producción del pigmento a simple vista es menor; esto puede argumentarse – de igual manera – que la entrada de GlcNAc reprime la función de DasR (fig. 15) (Liu, et al., 2013).

Por otro lado, la regulación de nitrógeno (fig. 15) muestra que la activación del sistema AfsQ1/AfsQ2 es regulada mediante la presencia de glutamato, donde (Hobbs, et al., 1990) concluyen que la producción de actinorhodina es regulada negativamente por la presencia excesiva de este nutriente (tabla 6). Esto clarifica que, de alguna manera, la producción del pigmento azul está directamente relacionada con la cantidad de glutamato presente mediante AfsQ2 y su respectiva fosforilación activando o reprimiendo los respectivos reguladores situados en grupos incluyendo *actII*-ORF4.

A pesar de que el fosfato influye de una manera un tanto indirecta en la activación de CSRs y en específico de *actII-ORF4*, la mayor relevancia o importancia para la consecuente biosíntesis de actinorhodina es que el fosfato se encuentre como una limitante cuando la bacteria se encuentra en su idiofase a través del sistema de PhoR-PhoP (fig. 15) (Rodríguez-García, et al., 2009). Y esto, claramente se puede apreciar en la inhibición y disminución en la producción del pigmento azul de acuerdo a los resultados de (Hobbs, et al., 1990) y (Doull & Vining, 1990).

Por otro lado, distintos artículos han demostrado que existe una relación entre la fuente de nitrógeno y la fuente de fosfato (Doull & Vining, 1990), (Hobbs, et al., 1990). La relación existente radica en que las proteínas PhoP y AfsQ1 se encargan de regular la transcripción del gen *glnR*, cuya proteína (GlnR) se encarga de transcribir los genes que asimilan el nitrógeno (fig. 15) tanto en el metabolismo primario como en el secundario (Santos-Beneit, et al., 2009), (Rodríguez-García, et al., 2009). Qué tanto se transcriba está en función de la presencia de glutamato (fuente de nitrógeno) o fosfato en el ambiente señaladas por las proteínas correspondientes (fig. 15).

Toda esta regulación en la biosíntesis de actinorhodina es debido a que estas proteínas reguladoras (AfsQ1, AfsS, DasR, GlkA y Rok7b7) se enlazan a los promotores de *actII-ORF4* (fig. 21) y transcriben su RNA respectivo. A su vez, el gen *bldA* y su molécula tRNA son indispensables dentro de la traducción de *actII-ORF4* debido al codón raro UUA que contiene (Hackl & Bechthold, 2015). Esta molécula de tRNA se ve altamente producida en la fase estacionaria del ciclo de vida de la célula, haciéndose responsable de proveer el mensaje correcto (mRNA) para su traducción correcta a la proteína ActII-ORF4. Consecuentemente, esta proteína – que forma parte de las Proteínas Regulatorias de Antibióticos en Streptomyces (SARPs) –, es fundamental para dar señalización y transcribir los genes *act*, donde se traducen las sintetasas policétidas mínimas (PKSs) y las demás proteínas involucradas en las ciclaciones, reducciones y adaptaciones moleculares que dan lugar a actinorhodina (fig. 21).

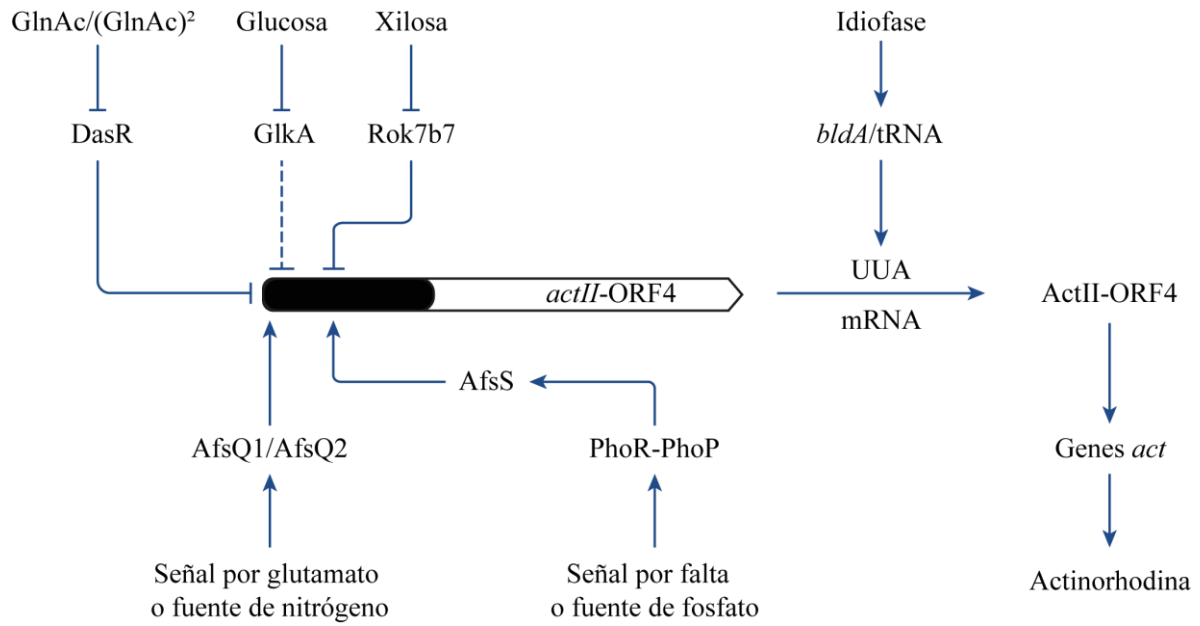


Fig. 21 Señales de entrada generales influenciando la expresión de *actII-ORF4* y su consecuente traducción y activación de los genes *act*. Elaboración propia con información tomada de (Santos-Beneit, et al., 2009), (Rodríguez-García, et al., 2009), (Liu, et al., 2013), (Wang, et al., 2013) y (Romero-Rodríguez, et al., 2018) con el programa Illustrator 2020 versión 24.1.

Conclusiones

La hipótesis planteada en este trabajo de investigación fue establecer la variación y composición de distintas variables fisicoquímicas y como afectan al medio en el cual se reproduce *Streptomyces coelicolor*, con el fin de biosintetizar el policétido aromático actinorhodina. Claramente, se observa que la hipótesis se cumple y por lo tanto el trabajo de investigación valida que las distintas fuentes nutricionales en función de su disponibilidad en el medio influyen directa e indirectamente en la producción del pigmento azul.

Los parámetros nutricionales y fisicoquímicos tienen una influencia en la producción de actinorhodina. Las diferentes fuentes nutricionales tanto de carbono, como de nitrógeno y fósforo están relacionadas directa e indirectamente con una serie de circuitos biológicos que dictan desde la información de los genes necesarios que se transcriben y expresan hasta el inicio y término de la biosíntesis del policétido aromático.

Cada una de las investigaciones y artículos consultados en el presente trabajo, muestran resultados similares en el aprovechamiento y producción del pigmento azul a bajas tasas de asimilación de nutrientes. La cantidad y la tasa a la cual un nutriente es aprovechado por *Streptomyces coelicolor* indica una serie de regulaciones por las proteínas transcripcionales que se encargan de activar o reprimir ciertos genes – tal como *actII-ORF4* – con el fin de activar las sintetasas policétidas mínimas y los demás marcos de referencia del grupo *act* que dan lugar a la biosíntesis de actinorhodina.

Bibliografía

Angell, S., Schwarz, E. & Bibb, M. J., 1992. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *molecular microbiology*, Volume 19, pp. 2833 - 2844

Arizton Advisory and Intelligence, 2019. *Natural Dyes Market - Global Outlook Forecast 2019-2024*, s.l.: s.n.

Bartel, P. L. et al., 1990. Biosynthesis of anthraquinones by interspecies cloning of actinorhodin biosynthesis genes in *Streptomyces*: Clarification of actinorhodin gene functions. *Journal of Bacteriology*, pp. 4816-4826.

Bell, B., 2017. *Healthline*. [Online] Available at: https://www.healthline.com/nutrition/food-dyes#TOC_TITLE_HDR_9 [Accessed 2021].

Bentley, S. D. et al., 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, Volume 417, pp. 141-147.

Caldara-Festin, G. et al., 2015. Structural and functional analysis of two di-domain aromatase/cyclase from type II polyketide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp. 6844-6851.

Chandni, G., Sourav, B. & Das, A., 2012. Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* an evaluation of its antimicrobial, antioxidant and dyeing potentials. *Malaysian Journal of Microbiology*, pp. 116-122.

Chater, K. F. et al., 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews*, pp. 171-198.

Christie, R. M., 2015. *Colour Chemistry*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

Doull, J. L.-. & Vining, L. C., 1990. Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Applied Microbiology Biotechnology*, Volume 32, pp. 449-454.

Dreier, J. & Koshla, C., 2000. Mechanistic Analysis of a Type II Polyketide Synthase. Role of Conserved Residues in the β -Ketoacyl Synthase-Chain Length Factor Heterodimer. *Biochemistry*, Volume 39, pp. 2088 - 2095.

Elibol, M., 2004. Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 with response surface methodology. *Process Biochemistry*, Volume 39, pp. 1057-1062.

Elibol, M. & Mavituna, F., 1998. Effect of sucrose on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Process Biochemistry*, 33(3), pp. 307-311.

F., M. & Hopwood, D. A., 1984. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a Streptomyces antibiotic and its expression in heterologous host. *Nature*.

Feng, Y., Shao, Y. & Chen, F., 2012. Monascus Pigments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27 Octubre, pp. 1421-1440.

Fernández-Moreno, M. A., Caballero, J. L., Hopwood, D. A. & Malpartida, F., 1991. The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the bldA tRNA gene of Streptomyces. *Cell Press*, pp. 769-780.

Fernández-Moreno, M. A. et al., 1992. Nucleotide sequence and deduced functions of a set of cotranscribed genes of Streptomyces coelicolor A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. *The Journal of Biological Chemistry*, Volume 267, pp. 19278 - 19290.

Fernández-Moreno, M. A. et al., 1994. DNA sequence and functions of the actVI region of the actinorhodin biosynthetic gene cluster of Streptomyces coelicolor A3(2). *The American Society of Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 269, pp. 24858-24863.

Guthrie, E. P. & Chater, K. F., 1990. The Level of a Transcript Required for Production of a Streptomyces coelicolor Antibiotic Is Conditionally Dependent on a tRNA Gene. *American society for microbiology*, pp. 6189-6193.

Hackl, S. & Bechthold, A., 2015. The gene bldA, a regulator of morphological differentiation and antibiotic production in Streptomyces. *ArchPharm*, pp. 1-8.

Hallam, S. E., Malpartida, F. & Hawkwood, D. A., 1988. Nucleotide sequence and deduced function of a gene involved in a polyketide antibiotic synthesis in Streptomyces coelicolor. *Gene*, pp. 305-320.

Hesketh, A. et al., 2007. New pleiotropic effects of eliminating a rare tRNA from Streptomyces coelicolor, revealed by combined proteomic and transcriptomic analysis of liquid cultures. *BMC Genomics*.

Higo, A., Horinouchi, S. & Yasuo, O., 2011. Strict regulation of morphological differentiation and secondary metabolism by a positive feedback loop between two global regulators AdpA and BldA in Streptomyces griseus. *Molecular microbiology*, pp. 1607-1622.

Hobbs, G. et al., 1990. Pigmented antibiotic production by Streptomyces coelicolor A3(2): kinetics and the influence of nutrients. *Journal of General Microbiology*, Volume 136, pp. 2291-2296.

Hoskisson, P. A. & van Weze, G. p., 2019. Streptomyces coelicolor. *Trends in microbiology*.

Hoskisson, P. A. & van Weze, G. p., 2019. Streptomyces coelicolor. *Trends in microbiology*.

Ichinose, K. et al., 1999. Proof that the ACTVI region of Streptomyces coelicolor A3(2) is involved in stereospecific ring formation in the biosynthesis of actinorhodin. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*, Volume 9, pp. 395-400.

Inside, F. B., 2021. *Globe News Wire*. [Online] Available at: <https://www.globenewswire.com/en/news-release/2021/09/15/2297232/0/en/Cosmetics-Market-Size-to-Hit-USD-415-29-Billion-by-2021-2028-Rising-Awareness-Regarding-Health-Hygiene-and-Grooming-to-Augment-Industry-Growth-Says-Fortune-Business-Insights.html>

[Accessed 2021].

Javidpour, P. et al., 2013. The determinants of activity and specificity in actinorhodin type II polyketide ketoreductase. *Chemistry and biology*, Volume 20, pp. 1225-1234.

Keatinge-Clay, A. T. et al., 2004. An antibiotic factory caught in action. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(9), pp. 888-893.

Keatinge-Clay, A. T. et al., 2003. Catalysis, specificity, and ACP docking site of *Streptomyces coelicolor* Malonyl-CoA:ACP transacylase. *Structure*, Volume 11, pp. 147-154.

Korman, T. P., Hill, J. A., Vu, T. N. & Tsai, S.-C., 2004. Structural analysis of actinorhodin polyketide reductase: cofactor binding and substrate specificity. *Biochemistry*, pp. 14529-14539.

Kwakman, J. H. J. M. & Postma, P. W., 1994. Glucose Kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 176(9), pp. 2694 - 2698.

Landrain, T., Adenis, M., Blache, J. & Boissonat, G., 2018. *Use of Actinorhodin and the derivatives thereof as a colouring agent*. Francia, Patent No. WO 2018/138089 A1.

Lawlor, E. J., Baylis, H. A. & Chater, K. F., 1987. Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, pp. 1305-1310.

Liu, G. et al., 2013. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and molecular biology reviews*, pp. 112-143.

Mak, S. & Nodwell, J. R., 2017. Actinorhodin is a redox-active antibiotic with a complex mode of action against Gram-positive cells. *Molecular microbiology*, pp. 597-613.

Manonmani, N. & K., D. & H., 2015. Prodigiosin and its potential applications. *Journal of Food Science and Technology*.

McDaniel, R., Ebert-Koshla, S., Hopwood, D. A. & Koshla, C., 1994. Engineered biosynthesis of novel polyketides: actVII and actIV genes encode aromatase and cyclase, respectively. *Journal of American Chemical Society*, Volume 116, pp. 10855-10859.

McDaniel, R., Ebert-Koshla, S., Hopwood, D. A. & Koshla, C., 1995. Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic units. *Nature*, Volume 375, pp. 549-554.

Melzoch, K., Teixeira De Mattos, M. & Neijssel, O., 1997. Production of actinorodin by *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in chemostat culture. *Biotechnology and bioengineering*, Volume 54, pp. 577-582.

Meurer, G. & Hutchinson, C. R., 1995. Functional Analysis of Putative b-Ketoacyl:Acyl Carrier Protein Synthase and Acyltransferase Active Site Motifs in a Type II Polyketide Synthase of *Streptomyces glaucescens*. *Journal of bacteriology*, pp. 477-481.

Neil R., W., Peter C., F. & Finian J., L. a. G. P. C. S., 2007. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews Microbiology*, pp. 887-899.

Nishiyama, T. et al., 2014. Natural low-molecular mass organic compounds with oxidase activity as organocatalysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(48), pp. 17152-17157.

Nodwell, J. R., 2019. Microbe profile: *Streptomyces coelicolor*: a burlesque of pigments and phenotypes. *Microbiology Society*, pp. 953-955.

Nodwell, J. R., 2019. Microbe profile: *Streptomyces coelicolor*: a burlesque of pigments and phenotypes. *Microbiology Society*, pp. 953-955.

ONU, 2019. *Nticias ONU*. [Online] Available at: <https://news.un.org/es/story/2019/04/1454161> [Accessed 2021].

Pavithra, K. G., Kumar, P. S., Jaikumar, V. & Rajan, P. S., 2019. Removal of colorants from wastewater: A review on sources and treatment strategies. *Journal of industrial and engineering chemistry*, pp. 1-19.

Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A., 2002. *Microbiología*. Quinta ed. Madrid: McGRAW-HILL.

Rigali, S. et al., 2008. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO reports*, 9(7), pp. 670-675.

Rodríguez-García, A., Sola-Landa, A., Apel, K. & Santos-Beneit, F. M. J. f., 2009. Phosphate control over nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: direct and indirect negative control of *glnR*, *glnA*, *glnII* y *amtB* expression by the response regulator PhoP. *Nucleic Acids Research*, 37(10), pp. 3230-3242.

Romero-Rodríguez, A. et al., 2018. Interplay between carbon, nitrogen and phosphate utilization in the control of secondary metabolite production in *Streptomyces*. *Springer Nature*, Volume 11, pp. 761-768.

Romero-Rodríguez, A. et al., 2017. Carbon catabolite regulation in *Streptomyces*: new insights and lessons learned. *World Journal of Microbial Biotechnology*, p. 33:162.

- Ruiz-Villafán, B. et al., 2021. Carbon catabolite regulation of secondary metabolite formation, an old but not well-established regulatory system. *Microbial biotechnology*, Volume 0, pp. 1-15.
- Santos-Beneit, F. et al., 2009. Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. *Molecular Microbiology*, 72(1), pp. 53-58.
- Sciaria, G. et al., 2003. The structure of ActVA-Orf6, a novel type of monooxygenase involved in actinorhodin biosynthesis. *European Molecular Biology Organization*, 22(2), pp. 205-215.
- Singh, O. V., 2017. *Bio-pigmentation and biotechnological implementations*. Pittsburgh: Wiley Blackwell.
- Strohl, W. R. et al., 1990. Expression of polyketide biosynthesis and regulatory genes in heterologous streptomyces. *Journal of industrial microbiology*, pp. 163-174.
- Summers, R. G. et al., 1995. Malonyl-Coenzyme A: Acyl Carrier Protein acyltransferase of *Streptomyces glaucescens*: a Possible link between fatty acid polyketide biosynthesis. *Biochemistry*, pp. 9389-9402.
- Swiatek, M. A. et al., 2013. The ROK-family regulator Rok7b7 pleiotropically affects xylose utilization, carbon catabolite repression and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 195(6), pp. 1236-1248.
- Taguchi, T. et al., 2000. Chemical characterization of disruptants of *Streptomyces coelicolor* A3(2) *actVI* genes involved in actinorhodin biosynthesis. *The Journal of Antibiotics*, 53(2), pp. 144-125.
- Tang, Y., Tsai, S.-C. & Koshla, C., 2003. Polyketide Chain Length Control by Chain Length Factor. *American Chemical Society*, Volume 125, pp. 12708-12709.
- Valton, J., Filisetti, L., Fontecave, M. & Niviere, V., 2004. A two-component flavin-dependent monooxygenase involved in actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *The American Society of Chemistry and Molecular Biology*, 279(43), pp. 44362-44369.
- Van Keulen, G. & Dyson, P. J., 2014. Production of specialized metabolites by *Streptomyces coelicolor*. In: *Advances in applied microbiology*. s.l.:Elsevier Inc, pp. 217-266.
- Venil, C. K. & P., L., 2013. An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin. *Electronic Journal of Biology*, Julio, pp. 49-61.
- W., C. C. & Koshla, C., 1998. Purification and in vitro reconstitution of the essential protein components of an aromatic polyketide synthase. *Biochemistry*, Volume 37, pp. 2084-2088.

Wang, R. et al., 2013. Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnRn *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 87(1), pp. 30-48.

Williamson, N. R. et al., 2005. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amylypyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for the undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Molecular microbiology*, pp. 971-989.

Zhang, H., Jixun, Z., Su, K. & Zhang, Y., 2004. A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*: Characteristics of blue pigment and identification of a novel compound, k-actinorhodin. *Food Chemistry*, pp. 186-192.