



# BEB 86

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

VOLUMEN V

NUM. 1

MARZO 1986.

## EDITORIAL

### BIOTECNOLOGIA E INDUSTRIA

*Biología es ciertamente una palabra de moda. Junto con la microelectrónica y los nuevos materiales, parecería ser el regalo divino, que nos permitirá dar un salto cualitativo hacia la productividad y el desarrollo.*

*Tal vez sí. Tal vez no. Pero para lograrlo, ciertamente será necesario cumplir con algunos requisitos previos, de los cuales mencionaremos aquí tres:*

*1) La biotecnología es una combinación de aspectos biológicos e ingenieriles, de los cuales tenemos la persistente tendencia a sobrevalorar los primeros en demérito de los segundos. Es revelador el hecho de que en la planta de insulina de Lilly, 180 de sus 200 empleados trabajan en aspectos relacionados con la separación y purificación del producto. La ingeniería, diseño de equipos, condiciones de operación de la planta y cumplimiento de especificaciones del producto son tan importantes como el desarrollo de un nuevo microorganismo.*

*2) Tenemos una gran heterogeneidad en la distribución del esfuerzo de investigación y desarrollo. Cerca del 90% de la investigación biotecnológica de América Latina se está haciendo en las universidades. Sin embargo, sólo son las empresas las que tienen una percep-*

*ción clara de los requerimientos del mercado, y de las capacidades y potencialidades de su aparato productivo. No es exagerado afirmar que, mientras no logremos que al menos un 25% de nuestros investigadores biotecnológicos estén en la industria, la integración de conocimientos a la producción será muy difícil.*

*3) La biotecnología en América Latina y en particular en México, requiere aumentar su énfasis en la prioridad agua-agricultura. Tenemos poca agua, mal distribuida y contaminada, que hay que aprovechar y reusar. Se requiere detener, o al menos paliar, graves procesos de desertificación, y es necesario desarrollar nuevas variedades de plantas para el desierto y las tierras salinas. Este es un terreno donde, en nuestros países, la biotecnología podría tener un impacto y un beneficio mucho mayor que en la producción de insumos industriales, los cuales, siendo de indudable beneficio y valor demostrativo, tendrán un impacto más reducido en el desarrollo económico y social.*

**DR. MARIO WAISSBLUTH S.**  
*Director del Centro para la  
Innovación Tecnológica de la  
Universidad Nacional Autónoma  
de México.*

# COMITE EDITORIAL

**GUILLERMO ALVAREZ LLERA**  
*Facultad de Medicina*  
*Universidad Nacional Autónoma de México*

**ALFONSO CARABEZ TREJO**  
*Instituto de Fisiología Celular*  
*Universidad Nacional Autónoma de México*

**GUILLERMO CARVAJAL**  
*Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*  
*Instituto Politécnico Nacional*

**ALBERTO HAMABATA**  
*Centro de Investigación y Estudios Avanzados*  
*Instituto Politécnico Nacional*

**JOSE ANTONIO HOLGUIN HUESO**  
*Instituto Nacional de Cardiología*  
*"Dr. Ignacio Chávez"*

**JESUS MANUEL LEON CAZARES**  
*Instituto de Fisiología Celular*  
*Universidad Nacional Autónoma de México*

**ENRIQUE PIÑA GARZA**  
*Facultad de Medicina*  
*Universidad Nacional Autónoma de México*

**SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL**  
*Instituto de Investigaciones Biomédicas*  
*Universidad Nacional Autónoma de México*

**COORDINADOR EDITORIAL**  
**YOLANDA SALDAÑA DE DELGADILLO**  
*Facultad de Medicina*  
*Universidad Nacional Autónoma de México*

**CORRESPONSALES**  
*Serafin Aguado (Morelia, Mich.), Ma. Dolores Alvarez Bruneliere (León, Gto.), Humberto Avila Rodríguez (Durango, Dgo.), Alberto Boveris (Buenos Aires, Argentina), Carlos Corredor (Cali, Colombia), Alfredo Delgado (Monterrey, N.L.), Manuel Escobar L. (Zacatecas, Zac), Jesús R. Garcilaso (Hermosillo, Son.), Ma. Cristina González de Mac Swiney, (Mérida, Yuc.), Ma. Guadalupe Oliva Ruiz (Tampico, Tamps.), Ma. Guadalupe Puga (Querétaro, Qro.), Héctor Reyes Leal (Ciudad Juárez, Chih.), José Alberto Rivera Brechu (México, D.F.), Jesús M. Rodríguez (San Luis Potosí, S.L.P.), Alba Marina Valdez de García (Guatemala, Guatemala, C.A.), Manuel Vázquez T. (Santo Domingo, República Dominicana).*



**FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.**

**DR. FERNANDO CANO VALLE**  
*Director de la Facultad de Medicina UNAM*

**DR. PABLO MORENO SILVA**  
*Secretario General de la Facultad de Medicina UNAM*

**C.P. EDUARDO MUÑOZ GONZALEZ**  
*Secretario Administrativo*

# INDICE

**BEB 86 Vol. V, Num. 1 de marzo de 1986**

## EDITORIAL

*Biotechnología e Industria. Mario Weissbluth S. 1*

## ARTICULOS

*Papel de la Genética Bioquímica y Molecular en el Desarrollo de la Microbiología Industrial. Leticia Paredes, Amelia Farrés y Sergio Sánchez ..... 3*

*α-Amilasa: Bases Bioquímicas y Moleculares para la sobreproducción de la Enzima. Amelia Farrés, Alejandro Azaola, Asunción Céspedes, María Teresa Lucas, Oscar García, Guillermo Aguilar, Lourdes Santana, Ruth Schwartz, Leticia Paredes y Sergio Sánchez . 10*

*Aplicación de la Mutasíntesis para la Producción de Nuevos Antibióticos. Laura Islas, María del Carmen Giraud, Laura Escalante, María Teresa Lucas, Rosa del Carmen Mateos y Sergio Sánchez ..... 19*

*Evolución y Perspectivas de los Sistemas de Ingeniería Genética Destinados a la Producción de Proteínas de Interés Industrial. Amelia Farrés y Sergio Sánchez ..... 24*

**INDICES DE REVISTAS ..... 31**



**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA,**

**DR. HECTOR MAYAGOITIA DOMINGUEZ**  
*Director General*

**DR. JESUS GUZMAN GARCIA**  
*Director Adjunto de Desarrollo Científico*

**DONATIVO PCCBCNA-420864**

# PAPEL DE LA GENETICA BIOQUIMICA Y MOLECULAR EN EL DESARROLLO DE LA MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

Leticia Paredes, Amelia Farrés y Sergio Sánchez. Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Apartado Postal 70228, México, D.F. 04510.

El arte de la fermentación ha sido practicado por la humanidad desde tiempos inmemoriales. Pasteur y sus seguidores iniciaron la época "científica" de la fermentación, al introducir las técnicas de asepsia y cultivos puros. A partir de entonces, se han realizado una serie de avances durante todo lo que va del siglo XX. No obstante, a principios de la década de los setentas, dos grandes microbiólogos industriales, Johnson y Perlman (1, 2), se mostraban pesimistas en cuanto a las perspectivas de la industria de la fermentación. Señalaban la carencia de innovaciones, la falta de mercado para muchos productos desarrollados y el retiro de fondos gubernamentales para el apoyo de la investigación en estas áreas. Contrastaban a su vez, el sombrío panorama de occidente con el notable avance japonés.

La genética, por su parte, puede ser considerada como una ciencia relativamente nueva, ya que si bien sus orígenes se remontan a 1866, año en que Gregor Mendel descifró sus fundamentos, éstos no trascendieron sino hasta su redescubrimiento, ocurrido ya en pleno siglo XX. La tabla I señala algunos de los momentos más importantes en los desarrollos de la industria de la fermentación y de la genética como ciencia. Debe hacerse notar que en la época en la que apareció la mayor variedad de productos en el mercado, especialmente aquellos ni siquiera conocidos previamente como los antibióticos, es cuando surgen los conocimientos acerca de la naturaleza y estructura fina del material genético, así como de su posibilidad de sufrir cambios por mutación. Al final de la lista concerniente a la industria de la fermentación, notamos la aparición de productos que nunca hubiésemos imaginado que los microbios fuesen capaces de producir como la insulina, vacunas y el interferón. Esta realidad ha sido posible, gracias a la introducción de técnicas genéticas como la clonación molecular.

Analizaremos ahora algunas de las aportaciones de las herramientas genéticas, especialmente la mu-

tación, al desarrollo de la industria de fermentación. Quizá valga la pena recordar antes, algunos de los agentes más utilizados en microbiología capaces de producir cambios genéticos (tabla II).

La mutación se utilizó en primera instancia, como un método que permitía incrementar el rendimiento del producto que se deseaba obtener por fermentación. Una de las ventajas que representaba el uso de la mutación es que sólo era necesario conocer el producto y tener una forma de detectarlo, por lo que también se le denominó a esta técnica como mutación-selección. Para ello, resultaba innecesario tener conocimientos sobre bioquímica y fisiología de las vías biosintéticas. Con esta técnica se lograban resultados tan espectaculares en tan poco tiempo, que fue el único sistema empleado durante muchos años (3). Tal vez el caso más ilustrativo en este sentido, sea el del antibiótico penicilina. A su descubrimiento e introducción al mercado se ha adjudicado el desarrollo de la industria de la fermentación ocurrido tras la Segunda Guerra Mundial, pero no es, sin duda, el único factor involucrado. La mutación permitió aumentar considerablemente el rendimiento de este antibiótico especialmente en su fase inicial de introducción, tal como se ve en la figura 1.

A pesar de que en sus inicios la mutación-selección fue un método totalmente aleatorio, cuando se conoció más acerca de las vías de biosíntesis y su regulación, se hicieron intentos para racionalizarlo. Tal evento dio origen a la fusión de la genética y la bioquímica, situación que permitió un avance considerable en el desarrollo de la microbiología industrial al introducir una serie de técnicas nuevas entre las cuales podemos señalar:

- 1.— Aislamiento de mutantes resistentes a la inhibición por análogos. Esta técnica fue diseñada con base en la observación de qué productos finales de diversas vías metabólicas biosintéti-

**TABLA I. DESARROLLO COMPARADO ENTRE LA GENETICA Y LA FERMENTACION**

FECHA	GENETICA	FERMENTACION
Prehistoria hasta 1860's	Selección y domesticación de microorganismos útiles.	Fermentación alcohólica, alimentos, manufactura de levadura, generador de vinagre, técnicas de semiasepsis, fermentación de <i>Aspergillus oryzae</i>
1860		Pasteur: purificación de cultivos y técnicas de asepsia.
1866	Mendel descubre que los factores hereditarios se transmiten en forma cuantitativa.	
1969	Miescher descubre el ADN.	Introducción de la fermentación del ácido láctico, técnicas de aereación en la fermentación líquida, tratamiento de aguas residuales.
1890		
1900	Redescubrimiento de las Leyes de Mendel por Correns, De Vries y Tschermak. Teoría cromosómica de la herencia. Johansen introduce la palabra "gene".	Producción fermentativa de butanol, glicerol y acetona provocada en parte por necesidades derivadas de la primera guerra mundial. Enzimas fungales y bacterianas. Lodo activado.
1920		Producción aeróbica de levadura. Fermentación de sorbosa y ácido glucónico; esterilización de aire con filtro fibroso; mejoramiento de sistemas de aereación y agitación; matraces agitados.
1940	Beadle y Tatum descubren la relación "un gene una enzima".	"Explosión" de la industria fermentativa; producción de penicilina a nivel industrial con cepas obtenidas por procedimientos de mutación-selección. Vitamina B <sub>12</sub> , riboflavina; búsqueda de nuevos antibióticos.
1944	Avery descubre que el ADN es el material que contiene la formación genética. Lederberg descubre sexualidad en bacterias y posibilidades de recombinación.	
1950		Conversión de esteroides, giberelinas.
1953	Watson y Crick descubren la doble hélice del ADN. Descubrimiento del mapeo fino de material genético. Represión enzimática. Mecanismos y enzimas de replicación del material genético.	Avances en instrumentación y control. Producción fermentativa de aminoácidos con cepas mejoradas genéticamente con base en principios regulatorios.
1960	Modelo de operón descubierto por Jacob y Monod. Desciframiento del código genético. Aislamiento del primer gene natural.	Desarrollo de procesos enzimáticos comunes: amilasa, proteasa y otros. Producción fermentativa de nucleótidos con cepas mejoradas genéticamente con base en principios regulatorios. Producción a gran escala de enzimas microbianas utilizando cepas de altos rendimientos obtenidos por mejoramiento genético. Enzimas inmovilizadas.
1970		
1972	Síntesis artificial de un gene.	
1973	Cohen y Boyer describen técnicas de clonación molecular utilizando enzimas de restricción y vehículos moleculares.	
1977	Hopwood describe la fusión de protoplastos en <i>Streptomyces</i> .	
1979	Investigaciones para la utilización práctica de las técnicas de ingeniería genética.	Utilización de cepas obtenidas por fusión de protoplastos para el incremento de rendimientos en la producción de antibióticos.
1982		Insulina humana aprobada y producida comercialmente. Interferones producidos por bacterias usados en pruebas clínicas. Comercialización de la vacuna para el ganado. Comercialización de somatostatina.
1986		

cas eran capaces de ejercer un mecanismo de control por retroregulación sobre su propia formación. El hallazgo de que ciertos análogos de los productos finales podían regular de la misma manera tales rutas biosintéticas y a través de esta acción, inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, permitió disponer de un sistema sencillo de selección de mutantes resistentes al efecto. La caracterización de las mutantes obtenidas ha permitido observar que un buen número de ellas ha perdido la propiedad de responder al mecanismo de control involucrado, traduciéndose en sobreproducción del producto final y frecuentemente en excreción del mismo al medio de cultivo. Tal es el caso para la obtención de mutantes sobreproductoras de L-triptofano en *Corynebacterium glutamicum* (4) (fig. 2). El empleo de análogos ha permitido también la obtención de mutantes de alguno de sus sistemas insensibles a la represión catabólica que diversas fuentes de carbono ejercen sobre los mismos. En este punto debemos mencionar las mutantes aisladas a partir de *Streptomyces phaeochromogenes*, las cuales producen niveles elevados de glucosa isomerasa aún en presencia de concentraciones elevadas de glucosa (5) (fig. 3).

- 2.— Aislamiento de auxótrofos. La técnica consiste en el aislamiento de cepas con determinados requerimientos nutricionales y ha dado especiales dividendos sobre todo en la producción de aminoácidos. Las mutantes auxotróficas han sido especialmente útiles para la sobreproducción de productos finales de vías ramificadas. Tal es el caso de la producción de L-lisina por mutantes de *Corynebacterium glutamicum* que presentan un bloqueo en la enzima homoserina deshidrogenasa por lo cual el intermediario semialdehído del ácido aspártico se canaliza preferencialmente hacia la síntesis de L-lisina. Mediante esta acción también se evita la retroregulación de la primera enzima de la vía (aspartoquinasa), lo cual permite una mayor producción del aminoácido (6).
- 3.— Aislamiento de idiótrofos. Consiste en el aislamiento de cepas incapaces de formar metabolitos secundarios (idiólitos) como resultado de un evento mutacional. Su utilidad ha sido reportada en especial para el mejoramiento genético de cepas productoras de familias de antibióticos. A manera de ejemplo podemos recordar el problema de la purificación de nistatina. Dicho antibiótico es producido por *Streptomyces noursei* simultáneamente con

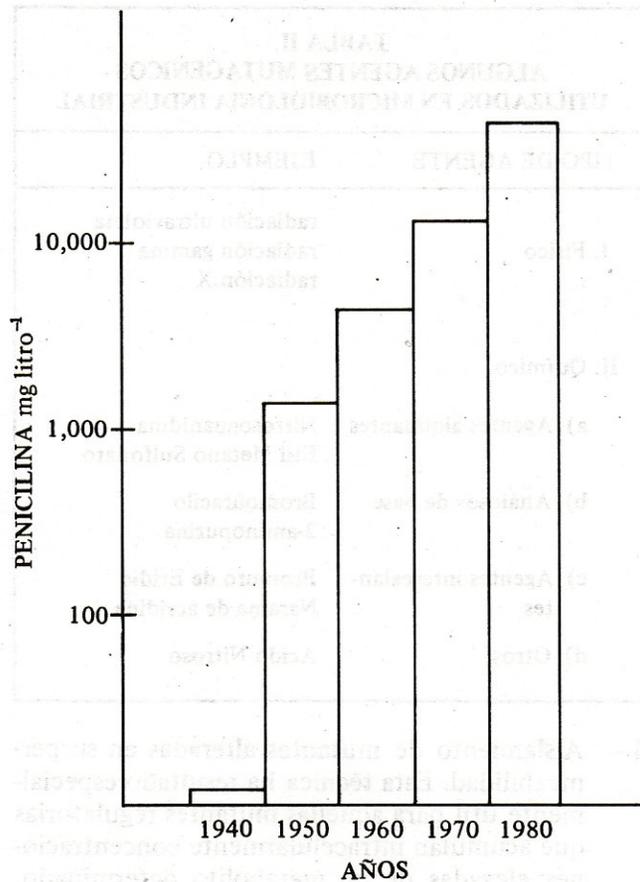


Figura 1. Niveles de producción del antibiótico penicilina en diversas cepas de *Penicillium chrysogenum* que fueron mejoradas genéticamente entre los años de 1940-1980.

cicloheximida por lo cual en la producción comercial de nistatina era necesario contar con diversos sistemas de separación para la obtención del metabolito deseado. Spizek y su grupo (7) lograron el aislamiento de mutantes incapaces de sintetizar cicloheximida (idiótrofos), las cuales formaban concentraciones elevadas de nistatina. La utilización de estas mutantes por la industria fermentativa ha reducido considerablemente los costos de producción del antibiótico. El aislamiento de idiótrofos ha permitido también la síntesis de nuevos metabolitos por un proceso denominado biosíntesis mutacional o mutasíntesis. Este fenómeno fue inicialmente reportado para la biosíntesis de neomicina en *Streptomyces fradiae* (8). Un idiótrofo de esta cepa, incapaz de sintetizar desoxiestreptamina, fue alimentado con diaminociclitol-estreptamina. Como resultado de esta acción, el microorganismo sintetizó un nuevo antibiótico denominado hibrimicina. Otros análogos de antibióticos sintetizados en esta forma son la mutamicina 1, la estreptomutina y la desoxigentamicina.

**TABLA II.**  
**ALGUNOS AGENTES MUTAGENICOS**  
**UTILIZADOS EN MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**

TIPO DE AGENTE	EJEMPLO
I. Físico	radiación ultravioleta radiación gamma radiación X
II. Químico	
a) Agentes alquilantes	Nitrosoguanidina Etil Metano Sulfonato
b) Análogos de base	Bromouracilo 2-aminopurina
c) Agentes intercalantes	Bromuro de Etidio Naranja de acridina
d) Otros	Acido Nitroso

4.— Aislamiento de mutantes alteradas en su permeabilidad. Esta técnica ha resultado especialmente útil para aquellas mutantes regulatorias que acumulan intracelularmente concentraciones elevadas de un metabolito determinado. Un ejemplo muy estudiado es la producción de ácido glutámico por *Corynebacterium glutamicum*. En este caso la permeabilidad se encuentra asociada a la integridad bioquímica de la membrana celular. Se ha encontrado que este microorganismo requiere biotina para su crecimiento y que disminuyendo la cantidad de vitamina se puede incrementar la excreción de ácido glutámico. La biotina regula la relación de ácidos grasos saturados e insaturados de la membrana, con lo cual se modifica la permeabilidad y se facilita la salida del aminoácido al medio de cultivo. Recientemente, Momose y Takagi (9) aislaron mutantes sensibles a la temperatura capaces de excretar grandes concentraciones del aminoácido al medio de cultivo, simplemente incrementando la temperatura de 30°C a 37°C. La importancia práctica de estas mutantes radica en que se evita la adición de compuestos químicos para favorecer la excreción del aminoácido, compuestos que en general son de elevado valor comercial por lo que tienden a aumentar el valor del producto. Adicionalmente, bajo estas circunstancias es posible el empleo de medios de fermentación con fuentes de carbono de origen vegetal, en las cuales el contenido de biotina es inevitablemente elevado.

5.— Mutagénesis localizada. Esta metodología ofrece interesantes perspectivas al microbiólogo industrial al poder inducir de manera localizada en el cromosoma bacteriano, las mutaciones deseadas. Para ello se trata con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina a cultivos bacterianos bajo condiciones de replicación sincronizada. En esta forma se han aislado diferentes mutantes para metabolitos primarios en *Escherichia coli*, simplemente incubando los cultivos por ser mutagenizados por periodos de tiempo variables (10).

Hasta ahora sólo hemos hablado de la mutación refiriéndonos a ejemplos tomados de bacterias, organismos procariontes cuya estructura genética es relativamente sencilla y a eucariontes sencillos como es el caso de *Penicillium chrysogenum*. Sin embargo, no en todos los eucariontes, por sencillos que parezcan, se ha obtenido éxito con esta metodología. Un ejemplo notable lo constituye el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este organismo ha sido el más utilizado en la industria de la

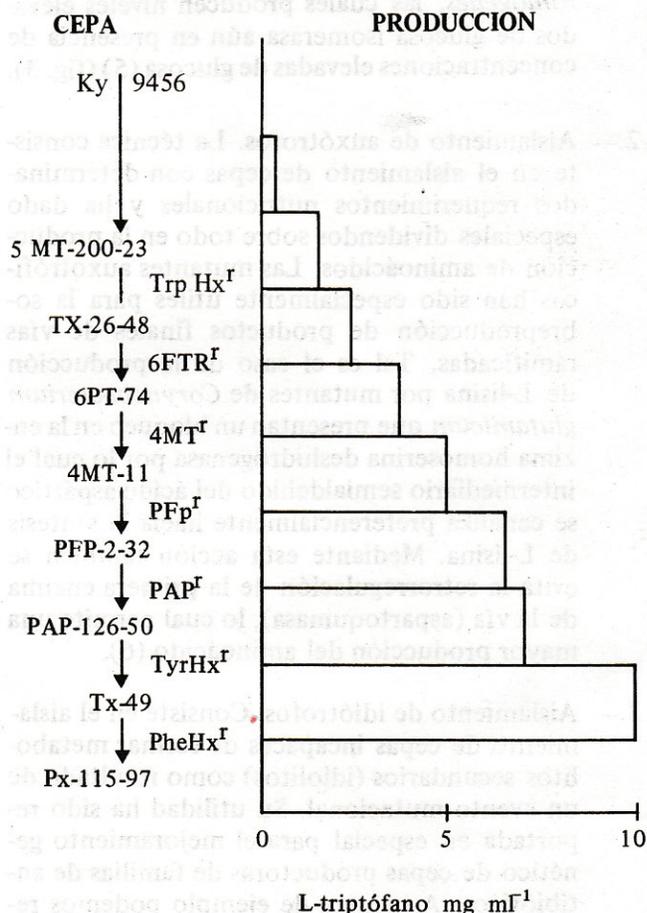


Figura 2. Mejoramiento genético de cepas de *Corynebacterium glutamicum* y su efecto en la producción fermentativa de L-triptófano.

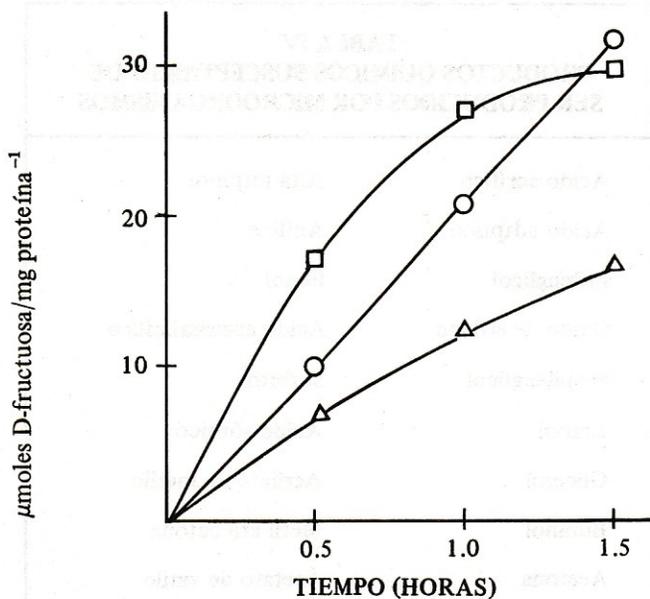


Figura 3. Curva de actividad de la enzima glucosa isomerasa, obtenida a partir de una cepa silvestre de *Streptomyces phaeochromogenes* crecida en presencia de su inductor, suplementado con 0.055 M D-glucosa (Δ) y de 0.018 M glicerol (□). Misma actividad obtenida a partir de la mutante 3-O-metil glucosa<sup>r-1</sup>, crecida en presencia de 0.055 M D-glucosa (○).

fermentación, incluso desde tiempos en que ésta no había alcanzado una categoría científica. Sin embargo, se ha obtenido muy poco avance en la obtención de cepas más útiles para la producción de etanol o de bióxido de carbono con las herramientas genéticas tradicionales (11).

Además de la mutación, los microbiólogos industriales pronto vieron enriquecidas sus herramientas de trabajo al hacer uso de la recombinación genética con fines utilitarios. Para ello, hacían uso de los denominados ciclos parasexuales presentados por algunos microorganismos de interés industrial tales como *Aspergillus* y *Penicillium*. Los resultados fueron poco alentadores por lo que sus esfuerzos se concentraron en idear mecanismos para vencer las barreras interespecíficas de transmisión de información. A ello han contribuido en forma considerable, tanto la ingeniería genética, como la técnica denominada fusión de protoplastos.

La fusión de protoplastos fue utilizada inicialmente en células animales. Su realización fue posible debido al desarrollo de técnicas que permitían la digestión de la pared celular de las células involucradas. Esta acción facilitaba el intercambio de material genético entre las mismas, con la obtención de recombinantes hereditarias de nuevas propiedades. Mediante esta metodología se ha logrado el aislamiento de cepas sobreproductoras de metabolitos de interés comercial así como de microorganismos

capaces de sintetizar compuestos previamente inexistentes (12,13). Ejemplos concretos resultantes de la aplicación de este método son la sobreproducción de penicilina, cefalosporina C y del nuevo antibiótico denominado carbapem (14,15). La fusión de protoplastos sólo permite la transmisión de información en microorganismos o en células vegetales con propiedades similares y parentescos filogenéticos estrechos, condición que limita relativamente su aplicación industrial.

La técnica de clonación molecular o ingeniería genética permite teóricamente vencer cualquier tipo de barreras al intercambio de información, siempre y cuando se utilicen las señales regulatorias adecuadas. Esta metodología ofrece grandes perspectivas para la industria fermentativa, no sólo para la sobreproducción de principios biológicos de interés comercial al aumentar la dosis de los genes que codifican para los mismos, sino que también para la síntesis de metabolitos que nunca antes se habían formado en estos sistemas (16).

El advenimiento de las técnicas de ingeniería genética proporcionaron a la biotecnología, ese impulso que Johnson y Perlman (1, 2), de quienes habíamos hablado en un principio, afirmaban que requería para no estancarse. Superados los temores inicialmente provocados por esta metodología, debidos al uso de genes de resistencia a diversos antibióticos como mecanismo para reconocer la presencia de vehículos moleculares, esta área de investigación recibió entonces un fuerte apoyo. Curiosamente, en algunos países como en los Estados Unidos el soporte para la misma no ha venido de fondos federales como uno esperaría, sino de la propia industria. Tal situación, como se comprende, ha favorecido la creación de un buen número de empresas destinadas al empleo de esta metodología con fines utilitarios (tabla III).

Existe una lista grande de productos que se cree se pueden elaborar ahora por métodos biológicos, en vez de la síntesis química. De entre ellos podemos destacar al acrílico, al ácido salicílico y al edulcorante aspartamo (tabla IV). Asimismo, es posible elaborar productos cuyas fuentes de acceso son difíciles, o escasas, como la insulina humana, los edulcorantes monelina y taumatina que se obtienen de plantas africanas, la somatostatina, la hormona de crecimiento y el interferón. También se podrán fabricar moléculas cuya elaboración implica riesgos para quien las produce, como la vacuna contra el virus de la hepatitis B, al introducir únicamente la proteína antigénica para su producción, sin necesidad de manejar el virus.

**TABLA III.  
COMPAÑÍAS CON INTERESES EN  
INGENIERÍA GENÉTICA**

Compañías surgidas expresamente con interés biotecnológico y en ingeniería genética	
E.U	Biogen, S.A. Cetus Genetech Genex
Europa	Biochem Celltech
México	Genin
Compañías establecidas que han implementado proyectos basados en ingeniería genética	
E.U.	Upjohn General Electric Pfizer Abbott Merck Monsanto DuPont Searle SKF
Europa	Rhone Poulenc ICI Boehringer Hoechst Hoffman La Roche Gist Brocades
Japón	Ajinomoto Kyowa Hakko Kogyo Kanegafuchi Chemical Co.

Sintetizando, podemos afirmar que la genética bioquímica ha jugado un papel importante ya en la etapa científica de la fermentación, al permitir incrementar racionalmente y sobre bases sólidas y seguras, los rendimientos de productos deseados. Esto ha permitido que en un momento dado, un proceso inicialmente incosteable, resulte ahora factible y atractivo.

En una segunda etapa, iniciada en la última década, la genética bioquímica ha desempeñado un papel ciertamente de promotor de la industria fer-

**TABLA IV  
PRODUCTOS QUÍMICOS SUSCEPTIBLES DE  
SER PRODUCIDOS POR MICROORGANISMOS**

Acido acrílico	Alfa terpinol
Acido adíptico	Anilina
Etilenglicol	Fenol
Oxido de etileno	Acido acetilsalicílico
Propilenglicol	Sorbitol
Etanol	Acido sórbico
Glicerol	Acrilato de metilo
Butanol	Metil etil cetona
Acetona	Acetato de vinilo
Citronelal	Acido itacónico

mentativa y de la biotecnología en general al ofrecer:

- posibilidades de elaboración de nuevos productos de alto valor agregado,
- de sustituir en forma económica a ciertos derivados petroquímicos,
- de incrementar en forma aún más eficiente los rendimientos en la producción o facilitar el proceso de aislamiento y purificación del producto sintetizado.

Se anticipa que en los próximos años la genética bioquímica proporcionará aún mayores logros que servirán de base para el engrandecimiento de la microbiología industrial y el auge de la industria fermentativa, logros que finalmente redundarán en beneficios de la propia humanidad.

Para concluir esta revisión, haremos referencia a las Leyes de la Microbiología Industrial, promulgadas por David Perlman en 1979, pero que son igualmente aplicables en 1986 (tabla V).

## REFERENCIAS

- Johnson, M.J. (1971). Fermentation-yesterday and tomorrow. *Chem. Technol.* 1, 338-341.
- Perlman, D. (1974). Prospects for the fermentation industries. *Chem. Technol.* 4, 210-216.
- Atherton, K.T., Byrom, D. y Dart, E.C. (1979). Genetic manipulations for industrial processes.

**TABLA V.  
LEYES DE PERLMAN EN LA MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**

1.- Los microorganismos:	poseen siempre la razón son nuestros amigos los distingue su alta sensibilidad
2.- No hay microorganismos tontos	
3.- Los microorganismos:	pueden hacen cualquier cosa
4.- Los microorganismos son más:	brillantes      que cualquier químico, juiciosos      médico, ingeniero ó energéticos    biólogo
5.- Si cuidamos a nuestros amigos los microbios, ellos se encargarán de nuestro futuro (y así viviremos siempre felices).	

- En: *Microbial Technology: Current State and Future Prospects*. Editores: Bull, A.T., Ellwood, D.C. y Ratledge, C. Cambridge University, Press. Cambridge. pp. 379-405.
4. Hagino, H. y Nakayama, K. (1975). The production of aromatic amino acids using auxotrophic regulatory mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agr. Biol. Chem.* 39, 351-361.
  5. Sánchez, S. y Quinto, M.C. (1975). D-glucose Isomerase: constitutive and catabolite repression resistant mutants of *Streptomyces phaeochromogenes* *Appl. Microbiol.* 30, 750-754.
  6. Nakayama, K. (1976). The production of amino acids. *Process Biochem.* 11, 4-9.
  7. Spizek, J., Malek, I. Dalezilova, L. Vondracek, M. y Vanek, Z. (1965). Metabolites of *Streptomyces noursei* IV. Formation of secondary metabolites by producing mutants. *Folia Microbiol.* 10, 259-262.
  8. Shier, W.T., Rinehart, K.L. Jr. y Gottlieb, D. (1969). Preparation of four new antibiotics from a mutant of *Streptomyces fradiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 63, 198-204.
  9. Momose, H. y Takagi, T. (1978). Glutamic acid production in biotin rich medium by temperature sensitive mutants of *Brevibacterium lactofermentum* *Agr. Biol. Chem.* 42, 1911-1917.
  10. Hohlfeld, R. y Vielmutter, W. (1973). Bidirectional growth of the *E. coli* chromosome. *Nature (London) New Biol.* 242, 130-133.
  11. Office of Technology Assesment (1981). *Impacts of Applied Genetics*. Congress of the United States, Washington, D.C. 331 páginas.
  12. Hopwood, D.A. y Wright, H.M. (1978). Bacterial protoplasts fusion: recombination in fused protoplast of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 162, 307-317.
  13. López Nieto, M.J., García Acha, I. y Martín, J.F. (1981). Penicillin production by recombinant strains of *Penicillium chrysogenum* obtained by fusion of protoplasts. En: *Advances in Biotechnology*. Vol. III. Editores: Vezina, C. y Singh, K. Pergamon Press, Toronto. 57-61.
  14. Elander, R.P. y Chang, L.T. (1979). Microbial culture selection En: *Microbial Technology*, 2nd. ed. Vol. II. Editores: Elander R.P. y Chang, L.T. Academic Press, Inc. New York. pp. 243-302.
  15. Vournakis, J.N. y Elander, R.P. (1983). Genetic manipulation of antibiotic producing organisms. *Science.* 219, 703-708.
  16. Demain, A.L. (1980). The new biology: opportunities for the fermentation industry. *Ann. Reports Ferm. Proc.* 4, 193-208.

# $\alpha$ -AMILASA: BASES BIOQUIMICAS Y MOLECULARES PARA LA SOBREPDUCCION DE LA ENZIMA

Amelia Farrés, Alejandro Azaola, Asunción Céspedes, María Teresa Lucas, Oscar García, Guillermo Aguilar, Lourdes Santana, Ruth Schwartz, Leticia Paredes y Sergio Sánchez. Proyecto Académico de Especialización, Maestría y Doctorado en Biotecnología, UACPyP del CCH, UNAM. Apartado Postal 70228, México, D.F. C.P. 04510.

## I. Definición e importancia práctica de la enzima

La  $\alpha$ -amilasa ( $\alpha$ -1, 4-glucan 4-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1. endo amilasa) es una enzima de gran interés comercial que hidroliza las uniones glucosídicas  $\alpha$ -1,4 de la amilasa, amilopectina y del glucógeno. Su importancia industrial deriva justamente de su capacidad para hidrolizar el almidón, ya que a partir de este sustrato pueden obtenerse diversos productos de hidrólisis como los jarabes maltosados, la dextrosa, la maltosa y otros oligosacáridos de interés para las industrias alimentaria y farmacéutica (Tabla I) (1).

La hidrólisis enzimática del almidón, al ofrecer ventajas relacionadas con las condiciones de reacción y especificidad del catalizador, ha reemplazado casi en un 75% al proceso tradicional de hidrólisis ácida. La degradación con  $\alpha$ -amilasa, al ser un proceso controlado, permite la obtención de productos con la viscosidad, presión osmótica y nivel dulcificante o resistencia a la cristalización deseados (Fig. 1) (2).

La fuente industrial más importante de  $\alpha$ -amilasa está representada por los sistemas microbianos. Muchos son los microorganismos capaces de sintetizar la enzima (Tabla II). Sin embargo, la producida por los géneros *Bacillus* y *Aspergillus* posee gran interés industrial en la actualidad.

Además de su abundancia y bajo costo de producción, la aplicación industrial de  $\alpha$ -amilasa microbiana se encuentra estrechamente relacionada a las propiedades intrínsecas de la misma, como son su termoestabilidad y pH óptimo de acción. Con base en estos criterios, se ha logrado distinguir una serie de  $\alpha$ -amilasas microbianas como las termofílicas, las termolábiles, las ácidas y las alcalinas (1).

Las amilasas termofílicas actúan a temperaturas relativamente altas. Por ejemplo, la enzima obtenida de *B. licheniformis* (3) posee una temperatura óptima de acción a 76°C. Las amilasas termoestables son empleadas dentro de la industria procesadora del almidón para el paso de licuefacción o dextrinización, mediante el cual se producen dextrinas con un promedio de polimerización entre 10 y 12. La etapa dextrinizante puede llevarse a cabo a una temperatura de 90°C hasta por 15 minutos sin destrucción de la enzima, condición que permite asegurar una completa licuefacción del almidón.

Las amilasas termolábiles no son estables al calor por lo cual no pueden ser utilizadas en la licuefacción. Son empleadas en el proceso de sacarificación que permite una mayor hidrólisis de las dextrinas hasta maltosa y maltotriosa. Su temperatura óptima

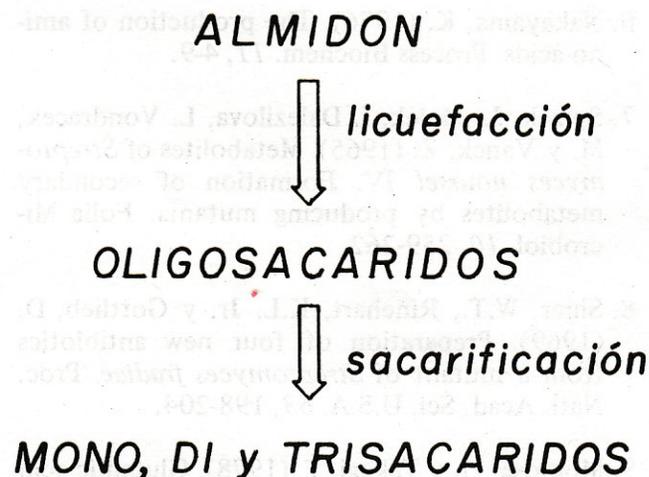


Figura 1. Esquema que muestra los pasos de la hidrólisis del almidón.

**TABLA I.**  
**USOS DE LA  $\alpha$ -AMILASA A NIVEL INDUSTRIAL**

INDUSTRIA	FUENTE DE LA ENZIMA	APLICACION	PROVEEDORES
Panificadora	Hongos y malta	Complementación de la harina	1, 3, 4
Textil	Bacterias	Deshebrado de telas	1, 2, 3, 4
Fotográfica	Hongos	Recuperación de la plata en películas usadas	1, 3, 4
Almidón	Hongos	Producción de jarabe de maíz	1, 3, 4
Farmacéutica	Hongos, bacterias y páncreas	Auxiliar digestivo	1
Papelera	Bacteria	Modificación del almidón para el grosor de las cubiertas de papel.	1, 3, 4
Repostería	Bacterias	Recuperación de residuos de azúcar	3
Cervecería	Malta y bacterias	Producción de cerveza baja en calorías, incrementa la sacarificación.	1, 4
Café y cacao	Hongos	Reducción de concentrados	1, 3, 4
Destilería	Bacterias, hongos y malta	Licuefacción del almidón	1
Lavandería	Bacterias hongos y páncreas	Remoción de manchas de la ropa.	3

Proveedores:	1 Miles Laboratories Inc.	2 Premier Malt
	3 Rohm & Haas Co.	4 Wallerstein Co.

ma de acción generalmente oscila alrededor de los 55°C. Y como fuente de estas enzimas se encuentran principalmente los géneros *Aspergillus* y *Rhizopus*. El proceso de sacarificación puede ser controlado entre 40 y 100 horas, dependiendo del grado de hidrólisis deseado. El grado de sacarificación es expresado como equivalentes de dextrosa (DE), cifra que relaciona los azúcares reductores presentes con el porcentaje en peso de sólidos (1).

Las  $\alpha$ -amilasas en general son estables en un intervalo de pH que va de 5.5 a 8.0 y su pH óptimo de acción oscila entre 4.8 y 6.5. Su estabilidad se incrementa en los valores extremos de pH mediante la adición de iones de calcio. La cepa de *Bacillus acidocaldarius* produce una amilasa acidofílica que posee un valor de pH óptimo para su actividad de

3.5 y una temperatura óptima de 75°C (4). Algunos procesos industriales emplean esta enzima para la hidrólisis del almidón pues en una parte del proceso la mezcla es llevada a valores de pH entre 4 y 5. Las  $\alpha$ -amilasas alcalinas poseen un pH óptimo de actividad por encima de 8.0. Casos representativos de este tipo de amilasas son las obtenidas de *B. alcalofilia* cuya acción puede llevarse a cabo óptimamente a valores de pH de 9.2. Varias especies de *Bacillus* poseen amilasas cuya actividad se lleva a cabo a valores de pH de 10 o más elevados. Generalmente este tipo de amilasas no son termoestables (2). El interés práctico por  $\alpha$ -amilasas alcalinas se ha incrementado con su demanda por la industria de los detergentes. *Bacillus licheniformis* por su parte produce una  $\alpha$ -amilasa cuya acción puede llevarse a cabo en un rango de pH que va de 5 a 8 y también es termoestable (3).

**TABLA II.**  
**MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE  $\alpha$ -AMILASA**

BACTERIAS:	OTROS GENEROS		
Género <i>Bacillus</i> :	<i>Lactobacillus</i>		
<i>B. subtilis</i> <sup>a</sup>	<i>Micrococcus</i>		
<i>B. natto</i> <sup>a</sup>	<i>Pseudomonas</i>		
<i>B. cereus</i>	<i>Arthrobacter</i>		
<i>B. macerans</i>	<i>Escherichia</i>		
<i>B. amyloliquefaciens</i> <sup>b</sup>	<i>Proteus</i>		
<i>B. megaterium</i>	<i>Thermonospora curvata</i>		
<i>B. coagulans</i>	<i>Serratia</i> :		
<i>B. licheniformis</i>	Género <i>Streptomyces</i> :		
<i>B. polymyxa</i>	<i>S. albus</i>		
<i>B. hidroliticus</i>	<i>S. aureofaciens</i>		
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>S. higrscopicus var. augustomycetes</i>		
<i>B. moriquachiensis</i>	<i>S. viridochromogenes</i>		
<i>B. caldolyticus</i>	<i>S. flavus</i>		
<i>B. var. amylosacchariticus</i> <sup>a</sup>	<i>S. tosaensis nov. sp.</i>		
<b>HONGOS:</b>			
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Mucor</i>	<i>Neurospora</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Cephalosporium</i>	<i>Candida</i>	<i>Rhizopus</i>
<p><i>a</i> = Productoras de <math>\alpha</math>-amilasa sacarogénica</p> <p><i>b</i> = Productoras de <math>\alpha</math>-amilasa licuante</p>			

## II Síntesis y regulación

La  $\alpha$ -amilasa es una enzima extracelular cuya síntesis y secreción se encuentra asociada a las condiciones de crecimiento de los microorganismos productores. Algunas especies microbianas tales como *B. licheniformis* y *A. oryzae* (1,3), producen la enzima durante la fase logarítmica. Por el contrario *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* la sintetizan durante la fase estacionaria de su crecimiento (2).

La formación de  $\alpha$ -amilasa se encuentra sujeta a diversos mecanismos reguladores tales como la inducción, la represión catabólica y la represión transitoria. La inducción de la síntesis ha sido reportada en diversas especies microbianas, sin embargo, los estudios más completos han sido desarrollados en el género *Bacillus* (1). La formación de  $\alpha$ -amila-

sa puede ser inducida por diversos polisacáridos como el glucógeno, el almidón y las dextrinas (5). Si bien los monosacáridos sencillos carecen de este efecto, algunos maltooligosacáridos como la maltotetraosa y la maltopentosa pueden también ejercerlo (2).

La represión de la síntesis de enzimas en la presencia de glucosa o fuentes alternativas de carbono fácilmente utilizables es conocida como represión catabólica. La síntesis de  $\alpha$ -amilasa es sensible a represión catabólica por fuentes de carbono que incluyen a la glucosa, al glicerol y al acetato entre otros. La glucosa en concentraciones de 0.5% puede suprimir totalmente la formación de la enzima en *B. licheniformis* (5). Similares resultados han sido obtenidos para *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens* y *A. oryzae* (2). Se ha encon-

**TABLA III.**  
**EMPLEO INDUSTRIAL COMPARATIVO ENTRE LAS AMILASAS OBTENIDAS DE**  
**BACILLUS Y ASPERGILLUS**

INDUSTRIA	FUENTE		APLICACION
	<i>Bacillus</i>	<i>Aspergillus</i>	
Almidón	+		Licuefacción del almidón para producción de glucosa, fructuosa y maltosa.
Molino		+	Modificación de la harina deficiente de amilasa
Alcohol	+	+	Licuefacción del almidón antes de la adición de la malta para la sacarificación.
Alimentos p/hornear		+	Incremento en la producción de carbohidratos fermentables.
Bebidas	+		Preparación de la cebada, licuefacción de los aditivos.
		+	Mejoramiento de la fermentabilidad del grano, modificación de las características de la cerveza.
Papel	+		Licuefacción del almidón sin producción de azúcar para calibración del papel
Textil	+		Deshebrar continuamente a altas temperaturas.
Industria de forrajes	+		Mejoramiento de la eficiencia de filtración del azúcar de caña por rompimiento del almidón en el jugo.
Lavandería y detergentes	+		Mejoramiento en el poder de limpieza en manchas para lavandería con almidón, aditivo en detergentes para lavaplatos.

trado en *B. subtilis* que la glucosa reprime la síntesis de  $\alpha$ -amilasa a nivel de su transcripción (3).

El fenómeno de represión transitoria fue descubierto para  $\alpha$ -amilasa en cultivos de *B. amyloliquefaciens* crecidos en presencia de su inductor, al agregarles glucosa en la fase inicial de su crecimiento estacionario (3). En este ejemplo la adición de glucosa al medio de cultivo, es capaz de retrasar temporalmente la síntesis de la enzima a la vez que se incrementa el crecimiento microbiano.

La  $\alpha$ -amilasa es una enzima extracelular, situación que facilita enormemente su recuperación. El género *Bacillus* y en general las bacterias Gram positivas tienen la capacidad de secretar algunas proteínas al medio extracelular.

El fenómeno de secreción de proteínas es un fenómeno muy complejo, que involucra la presencia de polirribosomas asociados a la membrana celular interna, una secuencia líder o señal en el polipépti-

do que se sintetiza, receptores para dicha secuencia en la membrana y un fenómeno de propulsión de la proteína hacia el exterior.

La secuencia líder en el polipéptido que se sintetiza permite fijar los polirribosomas a la membrana e iniciar la secreción de la proteína. El anclaje de la secuencia líder a la membrana posiblemente involucra el reconocimiento de receptores específicos tal vez de tipo proteico.

El descubrimiento de la secuencia líder lo realizaron Milstein y colaboradores en 1972 (6), al estudiar la traducción *in vivo* de inmunoglobulina de células de mieloma. La secuencia en este ejemplo se encuentra situada en el extremo amino de la proteína y presenta un peso molecular de 3,000. Dicha secuencia es eliminada durante el procesamiento de la proteína mediante la acción de una proteasa específica. Los hallazgos de Milstein fueron subsecuentemente demostrados para otras proteínas de mamíferos y bacterias que son secretadas al medio

extracelular. La longitud de la secuencia en estos ejemplos es variable y tiene un carácter preponderante hidrofóbico. Recientemente se ha demostrado que la  $\alpha$ -amilasa posee también una secuencia líder. Bajo estas condiciones, la enzima es sintetizada y secretada simultáneamente acoplándose a transductores específicos de naturaleza proteica, responsable de la propulsión de la proteína al exterior (2).

### III. Bases moleculares de su producción

El género *Bacillus* es uno de los grupos de bacterias más utilizados para la producción de enzimas extracelulares, debido a que estos microorganismos son capaces de secretar las enzimas al medio de cultivo y no presentan patogenicidad (1). Estas razones, aunadas a su relativa sencillez lo han distinguido como un género ideal para el estudio de la síntesis y la regulación de la enzima extracelular  $\alpha$ -amilasa (2).

Los primeros estudios reportados acerca del gene estructural de las  $\alpha$ -amilasa fueron realizados por Green y Colarusso, quienes reconocieron a dicho gene como un elemento capaz de transmitirse por transformación (7).

Las amilasas producidas por las diferentes especies de *Bacillus* son alélicas y pueden ser distinguidas entre sí por medio de análisis electroforético y de termoestabilidad (8).

Al analizar los niveles de producción de amilasa en varias cepas de *Bacillus*, se detectó que las diferentes cepas producían distintas cantidades de amilasa; por ejemplo, *Bacillus natto* 1212 y *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus* producen mayores cantidades de amilasa que el *Bacillus subtilis* Marburg (9).

El gene estructural para la  $\alpha$ -amilasa ha sido designado *amyE* y el regulador se ha denominado *amyR* o *amyH*. Los genes *amyR* provenientes de *Bacillus subtilis* Marburg 6061, *Bacillus natto* IAM1212 y *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus* han sido denominados *amyR1*, *amyR2* y *amyR3* respectivamente. Los tres *amyR* mencionados anteriormente son genes alélicos. En ausencia de otros genes regulatorios, *amyR1* permite la producción de 10 U/ml de amilasa, mientras que *amyR2* y *amyR3* permiten la producción de 50 U/ml de amilasa (10). Por otra parte, al transformar al *Bacillus subtilis* Marburg con ácido desoxirribonucleico aislado a partir de *Bacillus natto* (11), se detectó la existencia de un gene capaz de regular la tasa de

síntesis de amilasa y de recombinar independientemente del gene estructural para dicha enzima.

Yamaguchi y colaboradores (12) efectuaron el mapeo de la región *amyR-amyE* con base en la caracterización de 28 cepas mutantes defectuosas en la producción de  $\alpha$ -amilasa. Las 28 mutantes fueron caracterizadas con el fin de determinar si la mutación que las hacía malas productoras de amilasa estaba situada en el gene estructural o en el gene regulador. Para ello se basaron en los siguientes criterios:

- sensibilidad a la temperatura
- alteración inmunológica
- producción de material capaz de producir reacción de entrecruzamiento
- capacidad de supresión

Con base en la frecuencia de recombinación entre las cepas mutantes antes mencionadas, Yamaguchi y colaboradores construyeron un mapa (Fig. 2) en el cual el gene *amyR* se encuentra unido a la región terminal del gene estructural *amyE*. La importancia de determinar la posición de los genes reguladores con respecto al gene estructural reside en que al conocer dicha localización es posible determinar el tipo de regulación que es ejercida sobre el gene estructural; es decir, si los genes reguladores se encuentran cercanos al gene estructural, es muy factible que su acción reguladora sea específica sobre el gene estructural al cual se encuentran unidos; en cambio, en los casos en los cuales el gene regulador se encuentra lejano al estructural, es muy posible que dicho gene regulador posea otras funciones adicionales. Al analizar bajo este punto de vista la posición del gene *amyR* con respecto al gene *amyE*, es posible sugerir que la acción de *amyR* sea la de actuar como el promotor del gene *amyE* (12).

La misma figura muestra que los genes *amyR-amyE* se encuentran localizados dentro del cromosoma de *Bacillus subtilis* de la siguiente manera: *amyR - amyE - aroI - narB - dal - purB*.

Gracias a la cercanía existente entre los genes *amyE* y *aroI*, su porcentaje de cotransferencia es de 20-40% aproximadamente, por lo que la detección de transformantes que posean el carácter de *amy* se puede facilitar al seleccionar el marcador *aroI* (1).

Además de *amyR*, existen otros genes que influyen sobre la síntesis de amilasa. Yoneda y colaboradores aislaron una serie de mutantes a partir de la cepa de *Bacillus subtilis* Marburg tratada con nitrosoguanidina, que poseían la característica de incrementar la producción de proteasa y amilasa simultáneamente.

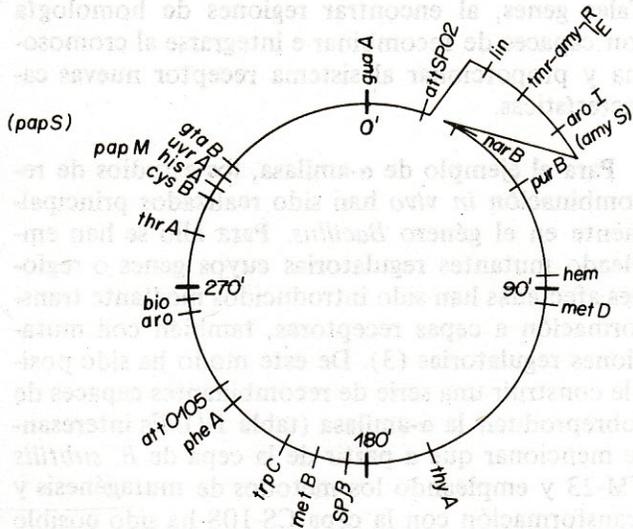


Figura 2. Mapa cromosomal simplificado de *Bacillus subtilis*

El incremento en la producción de dichas enzimas se debió a una mutación localizada lejos del sitio *amyR-amyE* en el cromosoma bacteriano y se designó como *pap* (producción de amilasa y proteasa) (10) (Fig. 2).

Se ha demostrado que la mutación *papM* se encuentra cercana a los genes *uvr*, *glaB* e *hisA* en el cromosoma de *Bacillus subtilis*. Esta mutación parece estar asociada con la pérdida de un componente protéico de la membrana celular (10) y causa además una serie de efectos pleiotrópicos entre los cuales cabe mencionar los siguientes:

- pérdida de flagelo
- pérdida de movilidad
- decremento en enzimas autolíticas
- pérdida de competencia para transformarse
- formación de cadenas celulares
- sobreproducción de levansacarasa
- esporulación en medios nutricionalmente completos.

Al transformar a *Bacillus subtilis* Marburg 6160 con el ácido desoxirribonucleico aislado a partir de una cepa utilizada industrialmente de *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*, se obtuvo una cepa transformante que produjo dos veces más amilasa que la cepa donadora (11). Después de realizar el análisis genético de la cepa transformante (SP 38), se observó que ésta había obtenido los genes *amyR3*, *papS1* y *amyS1* a partir de la cepa donadora. El gene *papS1* estimula más la producción de amilasa y proteasa que el gene *papM*, pero sin presentar las

características pleiotrópicas de este último. Los genes *papS1* pueden ser separados por medio de la transformación. Este hecho sugiere que dichos genes son independientes (11). Los altos niveles de producción de la  $\alpha$ -amilasa obtenidos por la cepa SP 38, indican que la coexistencia de varios genes reguladores en una misma cepa es sinérgico y no aditivo, ya que sus niveles de producción sobrepasan a los de sus cepas progenitoras (11).

El hecho de que *papM* actúe en forma similar a *papS1*, pero posea además una serie de efectos pleiotrópicos podría explicarse de dos formas (10):

- 1.- Por la existencia de dos clases de receptores membranales para los péptidos líderes hidrofóbicos de amilasa y proteasa: uno específico y otro no específico. Una mutación que aumente la actividad del receptor específico incrementaría únicamente la secreción de amilasa y proteasa (*papS1*); sin embargo, una mutación que incremente la actividad del receptor no específico, aumentaría la secreción de otras enzimas extracelulares además de proteasa y amilasa. Este podría ser el caso de *papM* con respecto a la producción de amilasa, proteasa y levansacarasa. Tomando en consideración el hecho de que, en las mutantes con *papM* se ven afectadas algunas funciones celulares tales como competencia y movilidad, cabría postular que la proteína alterada en dichas mutantes podría estar relacionada con las funciones antes mencionadas.
- 2.- Es posible que la formación de una proteína membranal alterada causada por la mutación *papM* desestabilice la estructura de la membrana celular y esto trajera como consecuencia la serie de efectos pleiotrópicos presentados por las cepas que contienen *papM*.

#### IV. Mejoramiento genético de la producción

El mejoramiento genético de un microorganismo con el fin de sobreproducir la  $\alpha$ -amilasa depende básicamente del manejo de todos aquellos principios generales involucrados en la síntesis y regulación de esta enzima. Con este objetivo y basados en tales principios han sido diseñadas y empleadas para diversas metodologías el aislamiento de cepas sobreproductoras de la enzima.

Los reportes sobre mejoramiento genético para la producción de  $\alpha$ -amilasa han utilizado esencialmente las técnicas de mutagénesis y de recombinación genética.

## 1.— Mutagénesis

El proceso de mutagénesis involucra el tratamiento de organismos con agentes químicos o físicos capaces de producir alteraciones en su información genética.

Se han realizado diversos esfuerzos para la obtención de mutantes sobreproductoras de  $\alpha$ -amilasa. Mutaciones en el gene *pap* con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) han permitido la obtención de cepas de *B. subtilis* capaces de producir tres veces más  $\alpha$ -amilasa que la cepa original (10). Bailey y col. (13) encontraron que el empleo de dos o más agentes en un proceso de mutagénesis, incrementa la probabilidad de encontrar una mutante hiperproductora, además de que se logran mutaciones más estables. Estos autores han obtenido cepas *B. coagulans* mediante este procedimiento con NTG y luz ultravioleta que producen más de 2 000 unidades de  $\alpha$ -amilasa por ml de medio de fermentación. Aumentos hasta de 25 veces en el rendimiento de  $\alpha$ -amilasa han sido también reportados en *B. licheniformis* en una serie de 7 pasos con el empleo de rayos gamma, radiación ultravioleta y NTG (2).

Por otra parte, mutantes de *B. subtilis* resistentes al antibiótico tunicamicina produjeron hasta 5 veces más  $\alpha$ -amilasa después de ser tratadas con NTG (2). Este antibiótico actúa contra bacterias gram positivas, levaduras y hongos, interfiriendo con la síntesis de carbohidratos de cadena compleja que forman parte de la pared celular. Con base en que el gene que confiere resistencia a tunicamicina (*tmr*), se localiza en el cromosoma de *B. subtilis* en un lugar muy cercano a los genes *amyR-amyE* (Fig. 2), se ha postulado que esta mutación incrementa la eficiencia de la RNA polimerasa para reconocer el DNA que codifica para la síntesis de  $\alpha$ -amilasa (2).

En esta misma línea de acciones, se ha reportado el aislamiento de mutantes insensibles a represión catabólica a partir de *S. castelli* (14), las cuales resultaron ser mejores productoras de la enzima.

## 2.— Recombinación genética

Los mecanismos de intercambio genético han jugado un papel muy importante en la obtención de microorganismos capaces de sobreproducir metabolitos de interés comercial. En este sentido, las técnicas de recombinación de DNA *in vivo* e *in vitro* han representado herramientas útiles en la consecución de tales objetivos.

Para el primer caso, mediante el proceso de trans-

formación ha sido posible introducir a los sistemas microbianos material genético de origen distinto. Tales genes, al encontrar regiones de homología son capaces de recombinar e integrarse al cromosoma y proporcionar al sistema receptor nuevas características.

Para el ejemplo de  $\alpha$ -amilasa, los estudios de recombinación *in vivo* han sido realizados principalmente en el género *Bacillus*. Para ello se han empleado mutantes regulatorias cuyos genes o regiones afectadas han sido introducidos mediante transformación a cepas receptoras, también con mutaciones regulatorias (3). De este modo ha sido posible construir una serie de recombinantes capaces de sobreproducir la  $\alpha$ -amilasa (tabla IV). Es interesante mencionar que a partir de la cepa de *B. subtilis* TM-23 y empleando los métodos de mutagénesis y transformación con la cepa CS-108 ha sido posible obtener rendimientos de  $\alpha$ -amilasa de 16,000 unidades/ml en la recombinante denominada T2-N-26. Como se comprende, dicha mutante contiene al menos 6 factores genéticos designados como *amyR3*, *tmr A7*, *amyS*, *papS1*, C-108 y N-26 (11).

Un aspecto que hay que resaltar en este proceso de recombinación de DNA *in vivo* es su limitada aplicación a sistemas biológicos filogenéticamente relacionados. Tal situación resulta, como fue mencionado antes, de la condición de homología genética requerida para el intercambio de información. Actualmente, sin embargo, dicha limitación ha sido superada con el uso de las técnicas de recombinación de DNA *in vitro*, también denominadas de ingeniería genética. Una ventaja adicional que resulta del empleo de esta técnica es la posibilidad intrínseca de obtener microorganismos recombinantes conteniendo varias copias de la información genética deseada.

Dicha metodología consiste inicialmente en la fragmentación del DNA cromosomal del sistema biológico donador de la información genética que se desea clonar. Posteriormente un fragmento de ese DNA es unido o ligado a un vector determinado capaz de replicarse automáticamente en una célula huésped o receptora.

La generación de los fragmentos de DNA cromosomal se puede llevar a cabo con rompimiento mecánico o enzimático. El empleo de enzimas de restricción que cortan el DNA reconociendo secuencias específicas de 4 a 6 pares de bases, es el procedimiento más utilizado.

Los vectores o vehículos moleculares con duplicación autónoma pueden ser los plásmidos y los

**TABLA IV.**  
**EFFECTO DE DIVERSOS GENES SOBRE LA PRODUCCION DE  $\alpha$ -AMILASA**

CEPAS	<i>amyR1</i>	<i>amyR2</i>	<i>amyR3</i>	<i>papS1</i>	<i>amyS</i>	<i>tmr</i>	<i>papM118</i>	Producción amilasa (U/ml)
6160	X							11.4
YN118	X						X	22.3
NA64		X						46.0
YY110		X					X	140.0
B7		X				X		175.0
SP38 <sup>a</sup>			X	X	X			209.0
TM23 <sup>a</sup>			X	X	X	X		1475.0
PP13 <sup>a</sup>			X	X	X	X	X	2532.0

<sup>a</sup> cepas obtenidas por transformacion.

fagos. Los plásmidos son cadenas de DNA circular que pueden estar presentes en una o varias copias por célula. Este número de copias puede incrementarse haciendo uso de ciertos antibióticos hasta constituirse en un 45% del DNA total. Los fagos son partículas virales capaces de recibir y expresar fragmentos de DNA heterólogo hasta de 20 Kb de tamaño.

Empleando esta metodología se han realizado algunos intentos para la obtención de cepas sobreproductoras de  $\alpha$ -amilasa empleando a *E. coli* como cepa receptora (15). Sin embargo, el uso del género *Bacillus* ofrece amplias ventajas al no ser una bacteria patógena, y no sintetizar endotoxinas además, en este microorganismo la enzima es excretada al medio de cultivo. Finalmente, *Bacillus* ha sido empleado industrialmente para la producción fermentativa de  $\alpha$ -amilasa a gran escala (1).

En esta línea de acciones, el DNA cromosomal de *B. amyloliquefaciens* fue aislado y fragmentado con la endonucleasa MboI produciendo fragmentos que fueron separados en un gradiente de sacarosa (tamaño promedio de 2 a 5 Kb). Estos fragmentos

se unieron al plásmido *puB* 110 previamente linealizado con Bam HI, utilizando la enzima ligasa del fago T4. El plásmido híbrido resultante se usó para transformar células competentes de *B. subtilis*, seleccionando las transformantes por su resistencia al antibiótico kanamicina. Las recombinantes sospechosas fueron aisladas por su propiedad para hidrolizar almidón en un medio con yoduro de potasio. Bajo estas condiciones se aisló una recombinante de *B. subtilis* IH6064 la cual fue capaz de producir 2 500 veces más  $\alpha$ -amilasa que la cepa receptora. De esta recombinante se aisló el plásmido híbrido pKTH10 que contiene un inserto de aproximadamente 2.3 Kb con un solo sitio de restricción híbrido Mbl/Bam HI, reconocido por Bam HI (16).

La sobreproducción de  $\alpha$ -amilasa puede explicarse dado que del plásmido pKTH10 se encuentran entre 20 y 50 copias por célula, las cuales pueden duplicarse y expresarse autónomamente. Este mismo grupo de trabajo recientemente trató de incrementar aún más los niveles de producción de  $\alpha$ -amilasa. Para ello, introdujeron por transformación el plásmido pKTH10, en una cepa de *B. subtilis* con alta capacidad de producción de la enzima, al contener las mutaciones regulatorias *amyR*, *amyS* y

*papS*. Sin embargo, los niveles de secreción de  $\alpha$ -amilasa en esta cepa, no superaron a los obtenidos por la expresión del plásmido únicamente (16).

En otros trabajos relacionados con la clonación

molecular del gene que codifica para la enzima  $\alpha$ -amilasa han utilizado a *B. stearothermophilus* (17), como donador de la información genética. Sin embargo, las actividades obtenidas no han superado las reportadas por el grupo de Palva (18).

## BIBLIOGRAFIA

1. Ingle, M.B. y Erickson, R.J. (1978). Bacterial  $\alpha$ -Amylase. *Adv. Appl. Microbiol.* 24, 257-279.
2. Fogarty, W. y Kelly, C.T. (1980). Amylases, Amyloglucosidases and Related Glucanases. En *Microbial Enzymes and Bioconversions*. Editor Rose, A.H. Academic Press. New York pp. 115-170.
3. Saito, N. y K. Yamamoto. (1975). Regulatory Factors Affecting  $\alpha$ -Amylase Production in *B. licheniformis*. *J. Bacteriol.* 121, 848-856.
4. Buonocore, V., Caporale, C., de Rosa M. y Gambacorta, A. (1976). A stable inducible thermoacidophilic  $\alpha$ -amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.* 128, 515-521.
5. Priest, F.G. (1983). Enzyme Synthesis: Regulation and Process of Secretion by Microorganisms. En: *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Ed. W.M. Fogarty. Applied Science Publishers.
6. Milstein, C., et al. (1972). A Possible Precursor of Inmunoglobulin Light Chains. *Nature now Biol.* 239, 117-120.
7. Green, D.M. y Colarusso, L.J. (1964). The Physical and genetic characterization of a transformable enzyme: *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase. *Biochim. Biophys. Acta.* 89, 227-290.
8. Piest, F. (1977). Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev.* 41, 711-753.
9. Francis, J.C. y P.E. Hansche (1971). Directed evolution of metabolic pathways in microbial population. I. Modification of the acid phosphatase pH optimum in *S. cerevisiae*. *Genetics*, 70, 59-73.
10. Yoneda, Y. y Maruo, B. (1975). Mutation of *Bacillus subtilis* Causing Hiperproduction of  $\alpha$ -Amylase and Protease, and its Synergistic Effect. *J. Bacteriol.* 124, 48-54.
11. Yoneda, Y. (1980). Increased Production of Extracellular Enzymes by the Synergistic Effect of Genes Introduced into *Bacillus subtilis* by Stepwise Transformation. *Appl. Env. Microbiol.* 39, 274-276.
12. Yamaguchi, K., Nakata, Y. y Maruo, B (1974). Genetic Control of the Rate of Alpha Amylase Synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 119, 410-415.
13. Bailey, M.J. y Markkanen, P.H. (1975). Use of mutagenic cloning and expression of a *Bacillus coagulans* amylase gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 186, 507-511.
14. Dhawale, M.R. y Ingledew, W.M. (1983). Starch hidrolisis by depressed mutants of *Schwanniomycetes castellii*. *Biotechnol. Lett.* 5, 185-190.
15. Cornelis, P., Digneffe, C. y Willemot, K. (1982). Cloning and expression of a *Bacillus coagulans* amylase gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 186, 507-511.
16. Palva, I. (1982). Molecular Cloning of  $\alpha$ -Amylase Gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its Repression in *B. subtilis*. *Gene* 19, 81-87.
17. Venema, G. (1978). Bacterial Transformation. *Adv. Microbiol Physiol.* 28, 245-331.
18. Palva, I., Sarvas, M., Lehtovaara, P., Sibakov, M. y Kaariainen, L.. (1982). Secretion of *Escherichia coli*  $\beta$ -lactamase from *Bacillus subtilis* by the Aid of Amylase Signal Sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 5582-5586.

# APLICACION DE LA MUTASINTESIS PARA LA PRODUCCION DE NUEVOS ANTIBIOTICOS

Laura Islas, María del Carmen Giraud, Laura Escalante, María Teresa Lucas, Rosa del Carmen Mateos y Sergio Sánchez. Proyecto Académico de Especialización, Maestría y Doctorado en Biotecnología, UACPyP del CCH, UNAM. Apartado Postal 70228, México, D.F. C.P. 04510.

## INTRODUCCION

Los antibióticos son compuestos de complejidad química variable sintetizados solamente por algunos microorganismos generalmente en la fase tardía de su crecimiento. Forman parte de los denominados metabolitos secundarios en virtud de que no presentan ninguna función aparente para el crecimiento y reproducción de los microorganismos que los producen.

Su importancia práctica deriva de su empleo para el control de enfermedades infecciosas en los campos de la medicina y la agricultura principalmente.

Históricamente los antibióticos han mostrado ser altamente benéficos para el hombre. Sin embargo, de los más de 5,000 antibióticos naturales que han sido aislados a la fecha, sólo unos 150 casos han logrado llenar los atributos requeridos para ser introducidos a la clínica (1).

La necesidad de contar con nuevos antibióticos resulta entre otras cosas, de los efectos tóxicos colaterales que algunos de ellos provocan, así como por la aparición periódica de cepas resistentes a los mismos. Además, algunos pacientes también presentan problemas de hipersensibilidad a su empleo.

Tradicionalmente los antibióticos han sido obtenidos de microorganismos seleccionados a partir de muestras de tierra, agua y algunos productos naturales de tipo orgánico como las frutas y las flores (2). De hecho, la mayor parte de los antibióticos de importancia clínica que son empleados en la actualidad han sido obtenidos mediante este procedimiento. Sin embargo, hoy en día la probabilidad de encontrar nuevos principios antimicrobianos empleando esta metodología es muy baja. Por esta razón, ha sido necesario diseñar y ensayar nuevas estrategias para la búsqueda y selección de nuevos antibióticos. Una de ellas, es mediante la modificación química de los antibióticos naturales. Un caso

representativo de este procedimiento es la conversión de lincomicina a clindamicina, antibiótico con menores efectos colaterales y mejor absorción en humanos. La biosíntesis dirigida constituye otra estrategia empleada para el mismo objetivo. Esta resulta de la adición al medio de fermentación de principios químicos que son incorporados por la célula productora a la molécula del agente antimicrobiano. Un ejemplo de este proceso ocurre con la síntesis de las diversas penicilinas, cuya estructura química final va a depender del ácido orgánico que se añada al caldo de fermentación. Otras estrategias combinan el uso de precursores con inhibidores específicos de ciertas actividades enzimáticas de la vía de biosíntesis, tal y como ocurre con la denominada biosíntesis híbrida (3).

En este trabajo revisaremos una estrategia para la obtención de nuevos antibióticos, diseñada por Shier y colaboradores en 1969 (4) y denominada mutasíntesis o biosíntesis mutacional por Nagaoka y Demain en 1975 (5). El concepto involucra la biosíntesis de análogos del producto natural con actividad antibiótica, como resultado de alimentar a mutantes no productoras del antibiótico (idiótrofos) con análogos de aquellos precursores de la vía que las mutantes no pueden sintetizar (mutasíntesis).

## EVENTOS NECESARIOS EN UN PROCESO DE MUTASINTESIS

Los puntos que a continuación se enumeran, representan los principales pasos a seguir para lograr una biosíntesis mutacional.

- 1.— Obtención del idiótrofo.
- 2.— Preparación del mutasintón.
- 3.— Incorporación del mutasintón.
- 4.— Aislamiento y caracterización del nuevo antibiótico.
- 5.— Evaluación biológica del antibiótico mutasintético.

Haremos una breve descripción de tales eventos con el fin de clarificar y resaltar la importancia de cada uno de ellos.

1.— Obtención del idiótrofo. El primer paso involucrado en la biosíntesis mutacional es la obtención del idiótrofo.

Los métodos de mutagénesis empleados para este fin son muy variados pero el criterio que se utiliza comúnmente para seleccionar cepas idiótropas es su incapacidad para sintetizar el antibiótico en ausencia del precursor.

El procedimiento general para la obtención e identificación de idiótropos se describe a continuación: la cepa silvestre se somete a mutagénesis; en este paso se puede utilizar una suspensión de células en su fase logarítmica de crecimiento, o bien una suspensión de esporas. Las mutantes obtenidas se dejan crecer en un medio adecuado y se prueba su capacidad de producción de antibiótico con un bioensayo de difusión en placa, utilizando un microorganismo sensible al mismo; se seleccionan aquellas colonias que no presenten halo de inhibición. A estas colonias, antibiótico negativas, se les determina nuevamente su capacidad para producir el antibiótico, pero ahora en presencia de un precursor de la vía de biosíntesis, seleccionando aquellas que presenten una zona clara de inhibición (idiótropos).

Con frecuencia los idiótropos seleccionados son mutados nuevamente con el objeto de obtener cepas con mejor eficiencia en la incorporación de análogos del precursor de la vía o mutasintón, para la producción del nuevo antibiótico.

2.— Preparación del mutasintón. La gran mayoría de los mutasintones se obtienen por hidrólisis de los antibióticos naturales, tal y como se observa en la tabla I. Otros se preparan por síntesis química como es el caso de la 2-epiestreptamina, 6-epiestreptamina y la 2,6-diepiestreptamina, mediante reacciones de ciclización de nitrohexosaminas (6). Un tercer método empleado para la obtención de mutasintones es a través de la bioconversión, es decir, haciendo uso de los microorganismos para lograr la modificación de los precursores de interés. Casos representativos de este método son los mutasintones 2, 4/3, 5 tetrahidroxiclohexanona y 2, 4, 6/3, 5, penta hidroxiclohexanona, los cuales se obtienen a partir de los precursor-

**TABLA I.**  
**OBTENCION DE DIVERSOS MUTASINTONES**  
**A PARTIR DE ANTIBIOTICOS NATURALES**

MUTASINTON	ORIGEN
Estreptamina	Estreptomina
Estreptidina	Estreptomina
Bluensidina	Bluensomicina
Actinamina	Espectinomina
Hiosamuna	Higromicina
6-O-metil-DOS <sup>a</sup>	N-Acetil-O-metilneomicina
5,6-Di-O-metil-DOS	N-Acetil-O-metilneomicina.

<sup>a</sup> DOS: desoxiestreptamina

res viboquercitol y mioinositol respectivamente, empleando en el proceso al microorganismo *Acetobacter suboxydans* (7,8).

3.— Incorporación del mutasintón. Una vez obtenidos los mutasintones e idiótropos deseados, el siguiente paso involucrado en la biosíntesis mutacional concierne al estudio de la incorporación del mutasintón. Para ello se crece al idiótrofo en un medio de producción, en presencia del mutasintón en estudio. Si después de terminada la fermentación, se detecta en el medio de cultivo la presencia de algún compuesto capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo de prueba, puede considerarse altamente probable la posibilidad de que se haya formado un antibiótico nuevo. Dicha situación, deberá confirmarse posteriormente mediante el aislamiento y caracterización química del compuesto formado.

Es importante considerar que no todos los mutasintones pueden ser incorporados por el idiótrofo para la producción de nuevos antibióticos. Esto puede deberse a una deficiencia natural en el sistema de transporte del mutasintón en estudio, o bien a que el microorganismo carezca de la maquinaria enzimática adecuada para incorporarlo en un nuevo antibiótico. En otras ocasiones, el mutasintón es incorporado por el idiótrofo, pero el nuevo compuesto sintetizado carece de actividad an-

timicrobiana. Algunos otros mutasintones pueden ser tóxicos al microorganismo productor, como ocurre con la neamina, paromomina, 6-kanosamidina-2-desoxiestreptamina y ribostamicina (9).

Son muchos los mutasintones que han sido estudiados para la producción de antibióticos mutasintéticos por cepas idiótrofes. La mayor parte del trabajo realizado en esta área ha sido con antibióticos aminociclitolos; de éstos se han logrado aislar y caracterizar antibióticos mutasintéticos análogos a neomicina, paramomicina, ribostamicina, butirosina, kanamicina, sisomicina, sagamicina y gentamicina, de los cuales hablaremos más adelante.

#### 4.— Aislamiento y caracterización del antibiótico nuevo. Las técnicas más utilizadas para el aislamiento y caracterización de antibióticos mutasintéticos son: cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión y cromatografía en papel o en capa fina.

Dada la similitud estructural de los antibióticos mutasintéticos con respecto a la de los "naturales", en ocasiones es necesario realizar modificaciones químicas en alguno de ellos para poder identificarlos. Por ejemplo, un idiótrofo de *Streptomyces griseus* que sintetiza estreptomycinina cuando se le suministra exógenamente estreptidina, es capaz de incorporar al mutasintón 2-desoxiestreptidina para sintetizar un antibiótico nuevo denominado estreptomutina A. Tanto la estreptomycinina (antibiótico natural) como la estreptomutina A (antibiótico mutasintético) presentan valores de Rf idénticos. La hidrólisis selectiva de ambos antibióticos para producir los derivados aminociclitolos correspondientes, previa a la cromatografía, permitió distinguirlos e identificarlos (10).

Una vez obtenida una sustancia que posee actividad con un grado de pureza aceptable, el problema siguiente concierne a la determinación de su estructura química. Una nueva estructura, requiere su descripción en términos de sus propiedades físicas y químicas, así como de sus características espectroscópicas, como son:

a) La espectrofotometría en los rangos de luz ultravioleta y visible, cuya información es indicativa del esqueleto molecular (fracciones aromáticas, conjugaciones, etc.).

b) La espectrofotometría en el infrarrojo, cuya información es más indicativa de la presencia individual de funciones químicas: carbonilos, hidroxilos, aminas, nitrilos, etc.

c) La resonancia magnética nuclear (rmn), invaluable en la determinación de estructuras mediante el patrón de fragmentación molecular.

Aunada a esta información, deberá proporcionarse el resultado del análisis elemental.

Aun cuando la información espectroscópica sea coherente con la de una estructura química, será necesaria la preparación de derivados de ésta, que serán indicativos de las funciones químicas presentes, así como la degradación de la estructura mediante reacciones simples, que permitan la caracterización de los productos resultantes, cuya estructura se espera menos complicada.

#### 5.— Evaluación biológica del antibiótico nuevo. Posterior al aislamiento y caracterización del antibiótico nuevo, se realizan los estudios biológicos, que incluyen ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

a) Ensayos *in vitro*: Con ellos se persigue determinar el espectro antibacteriano sobre diversos microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos. Algunos de los antibióticos mutasintéticos estudiados han presentado una actividad importante sobre bacilos multirresistentes, como es el caso de la 2-hidroxigentamicina sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (11).

Los ensayos *in vitro* también incluyen pruebas de susceptibilidad antibacteriana, cuya finalidad es establecer la cantidad mínima del antibiótico bajo prueba que inhiba el desarrollo visible de un microorganismo, mejor conocida como concentración mínima inhibitoria (CMI).

b) Ensayos *in vivo*: Incluyen estudios tanto en animales como en humanos. Los estudios en animales tienen como finalidad la determinación de parámetros como la dosis letal media ( $LD_{50}$ ), que es la medida más común del grado de toxicidad de una droga y el índice terapéutico, que relaciona la dosis letal media con la dosis efectiva media.

Por medio de estudios farmacocinéticos en animales, es posible conocer la absorción,

**TABLA II.**  
**ALGUNOS EJEMPLOS DE ANTIBIOTICOS OBTENIDOS POR MUTASINTESIS**

IDIOTROFOS PARA DESOXIESTREPTAMINA	ANTIBIOTICO NATURAL	MUTASINTON	ANTIBIOTICO MUTASINTETICO
<i>S. fradiae</i>	Neomicina	Estreptamina Epiestreptamina 2,6-Didesoxiestreptamina	Hibrimicinas A1 y A2 Hibrimicinas B1 y B2 6-Desoxineomicinas B y C
<i>M. inyoensis</i>	Sisomicina	Estreptamina Epiestreptamina	Mutamicinas 1, 1a y 1b Mutacinas 4
<i>M. purpurea</i>	Gentamicina	Estreptamina	2-Hidroxigentamicina
<i>M. sagamiensis</i>	Sagamicina	Estreptamina	2-Hidroxisagamicina
<i>S. Kanamyceticus</i>	Kanamicina	2-Epiestreptamina	6-Hidroxi-6'-deamino- 2-epihidroxikanamicina A

excreción, distribución y metabolismo del nuevo antibiótico.

Los estudios en humanos a su vez, indican sobre la seguridad y efectividad del antibiótico nuevo y dan a conocer los efectos colaterales que pudieran presentarse, como alergia inmediata o retardada, o bien, efectos aditivos de sinergismo, potenciación o antagonismo con el uso de otros medicamentos (12).

### ANTIBIOTICOS OBTENIDOS POR MUTASINTESIS

La mayor parte de los antibióticos que han sido obtenidos por la técnica de la mutasíntesis corresponde al grupo de los aminociclitolos (tabla II). En esta tabla han sido incluidos sólo ejemplos en los cuales el idiótrofo ha perdido la capacidad para sintetizar el intermediario desoxiestreptamina (DOS). Sin embargo, hay que mencionar que también se han logrado obtener derivados del grupo de los guanidociclitolos con actividad antibiótica como es el caso de la estreptomutina A (5). En otros casos, el proceso no se ha concluido. tal y como ocurre con un idiótrofo de *Streptomyces erythreus*, el cual produce un compuesto con actividad antibiótica al añadir un análogo del eritronólido al medio de cultivo (13). Sin embargo, este nuevo compuesto aún no ha sido caracterizado química ni farmacológicamente.

### APLICACIONES Y PERSPECTIVAS

La aplicación de la técnica de mutasíntesis es principalmente la obtención de nuevos antibióticos

con el fin de que los compuestos obtenidos tengan mejores características que el antibiótico original. Entre éstas características podemos contar las siguientes:

- a) Que su espectro de acción antimicrobiana sea más amplio,
- b) Que presenten menor número e intensidad de efectos tóxicos y
- c) Que puedan ser utilizados contra microorganismos que a través de su evolución hayan adquirido resistencia a los antibióticos naturales.

En relación a los dos últimos incisos podemos pensar que aunque el efecto antimicrobiano sea menor que el del antibiótico original, el hecho de que cumpla estas características los hace atractivos para ser utilizados contra infecciones microbianas en medicina clínica. La tabla III presenta dos ejemplos de antibióticos obtenidos por biosíntesis mutacional que presentan menor toxicidad que el compuesto natural (11, 14). Asimismo, en la tabla IV podemos observar propiedades de estos dos ejemplos en cuanto a su acción inhibitoria ante diferentes especies microbianas (11,14).

A pesar de que no sabemos hasta qué punto esta técnica ha sido utilizada en los laboratorios industriales, de la información existente podemos inferir, que tiene un gran potencial que puede ser explotado para la obtención de nuevos productos farmacéuticos.

Esta metodología ha sido utilizada en algunos laboratorios de investigación para obtener información acerca de las vías biosintéticas de este grupo de antibióticos, conocimiento que permite, utili-

**TABLA III.**  
**TOXICIDAD DE DOS ANTIBIOTICOS**  
**MUTASINTETICOS CON RESPECTO AL**  
**PRODUCTO NATURAL**

EJEMPLO	LD <sub>50</sub> en ratones (mg/kg)	Toxicidad relativa a la gentamicina
<b>A. Antibiótico mutasintético</b>		
2-Hidroxisagamicina	>250.0	<0.22
2-Hidroxigentamicina	150.0	0.57
<b>B. Antibiótico natural</b>		
Sagamicina	68.3	0.82
Gentamicina	87.0	1.00

**TABLA IV.**  
**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN ANTIBIOTICOS OBTENIDOS POR MUTASINTESIS**  
**EN RELACION A LOS COMPUESTOS NATURALES**

MICROORGANISMO	MINIMA CONCENTRACION INHIBITORIA (µg/ml)			
	2-HIDROXI-GENTAMICINA	GENTAMICINA	2-HIDROXI-SAGAMICINA	SAGAMICINA
<i>Escherichia coli</i>	6	50	12	100
<i>Providencia sp.</i>	50	100	50	> 100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	25	< 1	< 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	> 100	3	1
<i>Staphilococcus aureus</i>	< 1	< 1	< 1	< 1

zando otras técnicas, optimizar los procesos fermentativos para la producción de los antibióticos originales.

## CONCLUSIONES

A través de la información revisada sobre este tópico podemos concluir lo siguiente:

1. La técnica conocida con el nombre de mutasíntesis representa una alternativa para la obtención de nuevos y/o mejores antibióticos.
2. Su establecimiento depende del aislamiento de un idiótrofo adecuado así como de la obtención de uno o varios mutasintones que sean capaces de ser incorporados por la mutante mencionada y formar a partir de ellos nuevos compuestos con actividad antibiótica.

3. Su implementación estará limitada a los nuevos atributos que el antibiótico mutasintético presente, es decir dependerá de las ventajas tanto farmacológicas como económicas que posea sobre los productos naturales.
4. Esta técnica no sólo puede aplicarse al grupo de los aminociclitolos, sino también a otros grupos de antibióticos químicamente no relacionados a otros compuestos con diferente actividad farmacológica.
5. La biosíntesis mutacional también puede emplearse como herramienta para la elucidación de vías de biosíntesis de antibióticos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Vournakis, J.N. y Elander, R.P. (1982). Genetic manipulation of antibiotic producing microorganisms. *Science* 219, 703-708.
2. Lacey, J. (1973). Actinomycetes in soils, composts, and fodders. En: Actinomycetales Characteristics and Practical Importance. Editores: Sykes, G. y Skinner, F. A. Academic Press, New York. pp. 231-251.
3. Omura, S., Ikeda, H., Matsubara, H. y Sadakane, N. (1980). Hybrid biosynthesis and absolute configurations of macrolide antibiotic M-4365 G1. *J. Antibiot.* 33, 1570-1572.

4. Shier, W.T., Rinehart, K. L. y Gottlieb, D. (1969). Preparation of four new antibiotics from a mutant of *Streptomyces fradiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 63, 198-204.
5. Nagaoka, K. y Demain, A. L. (1975). Mutational biosynthesis of a new antibiotic, streptomycin A, by an idiotroph of *Streptomyces griseus*. J. Antibiot. 28, 627-635.
6. Ogawa, S., Rinehart, K. L. Jr., Kimura, G. y Johnson, R.P. (1974) Chemistry of neomycins. XIII. Synthesis of aminocyclitols and amino sugars via nitromethane condensations. J. Org. Chem. 39, 812-821.
7. Rinehart, K.L. (1980). Biosynthesis and mutasynthesis of aminocyclitol antibiotics, pp. 335-370. En: Amino-cyclitol antibiotics. (Rinehart, K.L. and Suami Eds.). ACS Symposium Series No. 125. American Chemical Society. Washington, D.C.
8. Magasanik, B., Franzl, R.E. y Chargaff, E. (1952). The stereochemical specificity of the oxidation of cyclitols by *Acetobacter suboxydans*. J. Amer. Chem. Soc. 74, 2618-2621.
9. Shier, W.T., Shaefer, P.C., Gottlieb, D. y Rinehart, K.L. Jr. (1974). Use of Mutants in the study of aminocyclitol antibiotic biosynthesis and the preparations of the hybrimycin C complex. Biochemistry 13, 5073-5078.
10. Lemke, J.R. y Demain, A.L. (1976). Preliminary studies on streptomycin A. European J. Appl. Microbiol. 2, 91-94.
11. Rosi, D., Goss, G.A. y Daum, S.J. (1977). Mutational biosynthesis by idiotrophs of *Micromonospora purpurea*. I. Conversion of aminocyclitols to new aminoglycoside antibiotics. J. of Antibiot. 30, 89-97.
12. Contrepois, A., Brion, N., Garaud, J., Faurisson, F., Delatour F., Levy, J., Deybach, J. y Carbon, C. (1985). Renal disposition of gentamicin, dibekacin, tobramycin, netilmicin, and amikacin in humans. Antimicrob. Agents Chemoter. 27, 520-524.
13. Claridge Ch. A. (1983). Mutasynthesis and directed biosynthesis for the production of new antibiotics. En: Basic Biology of New Developments in Biotechnology. Editores: Hollander, A. Plenum Press, New York, U.S.A. pp. 231-269.
14. Kitamura, S. Kase, H., Odakura, Y., Iida, T., Shirahata, K. y Nakayama, K. (1982). 2-Hydroxysagamicin: A new antibiotic produced by mutational biosynthesis of *Micromonospora sagamiensis*. J. Antibiot. 35, 94-97.

## EVOLUCION Y PERSPECTIVAS DE LOS SISTEMAS DE INGENIERIA GENETICA DESTINADOS A LA PRODUCCION DE PROTEINAS DE INTERES INDUSTRIAL

Amelia Farrés y Sergio Sánchez. Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Apartado Postal 70228, México D.F. C.P. 04510.

Hace un poco más de diez años empezaron a aparecer los resultados de manipulaciones genéticas que utilizaban una serie de metodologías conocidas genéricamente como recombinación de ácidos nucleicos, *in vitro*, ingeniería genética o clonación molecular. Estas técnicas permitían intervenciones directas sobre el genoma de los organismos, dando

lugar a modificaciones controladas de los mismos, a diferencia de las logradas con la genética clásica, fundamentalmente aleatorias. Se abrían así muchas posibilidades en varios terrenos: en el básico, un mejor conocimiento sobre la estructura y funcionamiento del genoma, tanto de procariontes como de eucariontes; en el aplicado, la modificación de pro-

cesos y obtención de numerosos productos a partir de seres vivos alterados genéticamente.

Las expectativas que generó esta serie de métodos provocaron repercusiones en todos los terrenos: político, legal, económico, religioso. Un término que empezó a usarse fue el del "inicio de la revolución biológica". Las posibilidades de transformación a voluntad de los organismos vivos atrajeron tanto a científicos como a inversionistas y surgieron numerosas compañías que querían comercializar una gama enorme de productos obtenidos por las nuevas técnicas biológicas. Uno de los fenómenos bursátiles más sobresalientes lo constituyó la introducción al mercado de las acciones de la compañía Genentech, registrada en 1980. La compañía entonces no ofrecía un solo producto a la venta y el primero con su marca (hormona del crecimiento humana) apareció hasta noviembre de 1985. Sus ventas actuales son de cien millones de dólares al año, pero esperan ganar diez veces más en 1990. Su valor en el mercado bursátil continúa en ascenso.

A una década de distancia de la fundación de esta compañía, indiscutiblemente líder en el campo, puede hacerse un análisis de las aportaciones y realidades que ha traído esta metodología mediante el análisis de la evolución de los sistemas y productos de interés. Los avances han sido constantes, y el mayor crecimiento acerca de la organización genómica y el avance en técnicas como purificación de proteínas, secuenciación automática de las mismas, secuenciación de ácidos nucleicos y síntesis química de polinucleótidos han incrementado incluso las posibilidades de manipulación.

Sin embargo, la comercialización de productos ha sido lenta. La realidad ha demostrado que para llegar a la introducción de un producto al mercado es necesario un gasto aproximado de 90 millones de dólares y el término medio es de 4 a 7 años. Se requiere de un largo proceso de pruebas clínicas y de procedimientos legales como patentes, licencias y autorización de Ministerios de Salud. Inclusive, existen productos cuyas pruebas clínicas o de campo han resultado un éxito, pero su mercado aún no justifica la construcción de una planta para producirlos. Tal situación se deriva con frecuencia del temor manifestado por diversos grupos, que consideran que la diseminación en el ambiente de productos obtenidos por ingeniería genética constituye un peligro para el equilibrio ecológico. Acciones como éstas son peligrosas para el futuro de la investigación en el campo, pues pueden provocar la retirada de fuentes de financiamiento, ante el peligro

de no llegar a la etapa de comercialización y obtención de ganancias (1, 2).

A continuación se analizarán los avances registrados en el desarrollo de sistemas que permiten la producción de proteínas por fermentación, especialmente de aquéllas de interés para el sector farmacéutico, pues son las de mayor valor agregado.

## 1. Herramientas de la Ingeniería Genética

La clonación molecular es posible gracias a una serie de descubrimientos realizados antes del año de 1977, relacionados con la estructura del DNA, con los mecanismos de formación de proteínas, así como con la biología de virus y plásmidos y sus mecanismos de incorporación a la célula y finalmente, con la enzimología de los ácidos nucleicos. Las herramientas necesarias para llevar a cabo un experimento de recombinación *in vitro* se señalan en la tabla I.

Entre ellas, cabe destacar a las enzimas de restricción del tipo II, nucleasas que reconocen secuencias específicas, generalmente de 4 a 6 pares de bases. De esta manera es posible cortar el DNA en forma específica y reproducible, en la actualidad se conocen alrededor del millar de enzimas de este tipo, pues prácticamente todos los microorganismos las producen para degradar el DNA extraño. Esto proporciona amplias posibilidades de tipos y sitios de corte. Las otras enzimas señaladas no se usan en todos los casos, pues sus funciones son muy diversas. La que sí es fundamental es la ligasa, pues es la enzima que permitirá la unión entre los dos fragmentos de DNA: el heterólogo o pasajero y el vehículo molecular.

Los vehículos moleculares son fundamentalmente plásmidos o virus. Pueden encontrarse libres o integrados al genoma. Pueden aislarse, autorreplicarse y contienen sitios para cortes con enzimas de restricción, en los que se podrá insertar el DNA heterólogo. Es deseable que estos vehículos contengan marcadores genéticos que permitan reconocer su presencia y mejor aún si gracias a ellos se puede detectar la incorporación del DNA pasajero. Una de las estrategias más empleadas es la inactivación de alguna función del vehículo tras la introducción del DNA, como alguna resistencia a antibióticos u otra actividad enzimática fácilmente detectable. Algunos de los más empleados se señalan en la tabla II. las moléculas recombinantes se introducirán a la célula hospedera por técnicas de transformación o transducción, según el tipo de vehículo de que se trate.

**TABLA I.  
HERRAMIENTAS USADAS  
EN INGENIERIA GENETICA**

**I ENZIMAS**

- a) Endonucleasas inespecíficas
- b) Exonucleasas
- c) Endonucleasas de restricción tipo II
- d) Transferasa terminal
- e) Transcriptasa terminal
- e) Transcriptasa reversa
- f) Ligasa
- g) Cinasas
- h) Fosfatasa alcalina

**II VEHICULOS**

- a) plásmidos      b) virus      c) cósmidos

**III PASAJEROS**

- a) DNA cromosomal cortado enzimáticamente
- b) DNA cromosomal cortado mecánicamente
- c) Transposones o fragmentos de los mismos
- d) Otros plásmidos o fragmentos de los mismos
- e) Fragmento del genoma viral
- f) DNA complementario obtenido por acción de transcriptasa reversa
- g) DNA sintético: oligo o polinucleótidos

**IV METODOS DE TRANSFORMACION**

- a) Permeabilización con tratamiento iónico (CaCl<sub>2</sub>)
- b) Transformación de protoplastos
- c) Transducción
- d) Transfección
- e) Inducción de estado de competencia natural

**V METODOS DE SELECCION DE RECOMBINANTES**

- a) Inactivación insercional
- b) Inducción de actividad enzimática
- c) Hibridización de ácidos nucleicos
- d) Detección de proteínas por métodos inmunológicos

La célula hospedera, a su vez, debe reunir ciertas características para su empleo. Es deseable que no posea o tenga bajos niveles de enzimas de restricción. Deberá permitir el establecimiento del vehículo, en forma libre o integrada a su propio cromosoma, así como reconocer la presencia de los marcadores contenidos en el vehículo. Finalmente, son deseables bajos niveles de recombinación para man-

tener la autonomía del vehículo y bajos niveles de proteasas, para impedir la destrucción del producto proteico.

Un aspecto fundamental es el reconocimiento y selección de las cepas recombinantes que hayan adquirido el gene de interés. Este puede expresarse o no, de acuerdo al tipo de estrategia de clonación empleada y a las barreras que puedan expresarse a nivel de replicación, transcripción, traducción, procesamiento y modificación de un mensaje. Los métodos de reconocimiento variarán de acuerdo a si se espera o no la producción de una proteína con actividad. Las técnicas de hibridación DNA-DNA ó DNA-RNA permiten la detección de genes o fragmentos de los mismos, aún si no son transcritos. Si se espera la producción de proteína, ésta puede detectarse por complementación de funciones, como un requerimiento nutricional por ejemplo, o por métodos inmunológicos (3).

Algunas de las características que debe reunir un mensaje en un vehículo para que se llegue a formar la proteína activa son:

- a) Integridad del gene que se desea expresar.
- b) Orientación y lectura "en fase" a partir de un promotor propio o del vehículo.
- c) Presencia de las señales regulatorias requeridas para transcripción y traducción de un mensaje, como por ejemplo promotores, regiones de unión al ribosoma, y la región de terminación o de poliadenilación. En este sentido se ha trabajado mucho para el diseño de vehículos que proporcionen cada vez un mejor nivel de eficiencia.
- d) Compatibilidad con la RNA polimerasa de la cepa receptora en términos de reconocimiento de señales regulatorias.
- e) Si se desea la excreción de una proteína, presencia de la secuencia líder necesaria.
- f) Adicionalmente, debe señalarse que los genes de eucariontes presentan intrones que no son reconocidos por los sistemas de procariontes y que carecen de los sistemas enzimáticos para llevar a cabo el procesamiento del mensaje. En este sentido, los procariontes no son hospederos adecuados para genes de eucariontes si éstos presentan intrones y entre los mismos eucariontes pueden llegar a presentarse variaciones que impidan la formación de una proteína activa.
- g) Algunas proteínas de eucariontes requieren de glicosilación para manifestar actividad, aunque ésto no siempre es indispensable. La necesidad de glicosilación para la actividad

**TABLA II.**  
**ALGUNOS EJEMPLOS DE PLASMIDOS USADOS EN LOS DIFERENTES**  
**SISTEMAS BIOLÓGICOS**

PLASMIDOS	PROPIEDADES DE INTERES
I <i>E. coli</i> pBR 322	Permite selección por inactivación insercional (tetraciclina y ampicilina) 14 copias por célula.
pBR 329	Tres marcadores genéticos e incremento en el número de copias.
pGJ 53	Vehículo de reemplazo que permite la selección directa de colonias recombinantes
pHV 33	Confiere las resistencias a ampicilina y tetraciclina provenientes de pBR 322 y la de cloranfenicol de pC 194, por lo que es bifuncional entre <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> .
II <i>B. subtilis</i> pC 194	Proviene de <i>S. aureus</i> ; confiere resistencia a cloranfenicol. Pocas copias y no permite inactivación insercional.
pBD 64	Confiere resistencia a kanamicina que puede ser cortada al cortar con Bgl II. También confiere resistencia a cloranfenicol, mayor número de copias.
III <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YEp 24	Confiere resistencia a ampicilina proveniente de pBR 322 y el gene URA 3 de <i>S. cerevisiae</i> , así como el origen de replicación del plásmido 2 u. Tres sitios únicos de corte, se mantiene como episoma.
YIp 33	LEU 2 de <i>S. cerevisiae</i> y resistencia a ampicilina, se integra al genoma.
IV <i>Streptomyces</i> pIJ 702	Resistencia a tiostreptón y expresa tirosinasa, amplio rango de especies hospedadas. Tres sitios únicos de restricción.
pIJ 61	Plásmido de gran tamaño que otorga resistencia a neomicina y tiostreptón sólo se expresa en <i>S. lividans</i> 66.

de la proteína debe ser considerada para resolver entre un hospedero eucarionte o uno procarionte (4,5).

## 2. Evolución de los sistemas de clonación.

Por muchos años, la enterobacteria *Escherichia coli* representó el modelo de estudio real para di-

versos fenómenos genéticos, por lo que era el microorganismo más conocido en cuanto a mapa genético, variedad de mutantes, fagos, plásmidos, sistemas enzimáticos, fenómenos de restricción y modificación. De tal manera, no resulta extraño que fuese el primer sistema de aceptación de información heteróloga y el que esté mejor desarrollado en cuanto a número y tipo de vehiculos. En él se

clonó el primer producto de posible interés comercial, la somatostatina en 1977. Algunas de sus ventajas y desventajas comparadas con otros sistemas de microorganismos se presentan en la tabla III. El desarrollo de otros sistemas se vió impulsado, en parte, por la falta de idoneidad de *E. coli*, especialmente para trabajar a escala industrial.

En la misma tabla puede apreciarse la diferencia de niveles de desarrollo de estos sistemas. Un primer problema lo constituye la selección u obtención de mutantes para receptoras con propiedades como las indicadas anteriormente, así como el de-

sarrollo de vehículos, tanto virales como plásmidos. Han debido estudiarse los métodos de transformación más adecuados para cada caso, y los problemas de estabilidad y producción a gran escala. En todos los casos presentados hay aún muchas mejoras por hacer, en todos los puntos referidos (6-9).

### 3. Productos de interés industrial obtenidos por ingeniería genética.

Las primeras moléculas recombinantes obtenidas resultaron en la construcción de los primeros vehículos moleculares, uniendo diferentes marcadores

**TABLA III.**  
**ALGUNAS PROPIEDADES DE LOS SISTEMAS DE CLONACION DE LOS MICROORGANISMOS MAS UTILIZADOS**

SISTEMA	PROPIEDADES
<i>Escherichia coli</i>	<p>Es el sistema mejor desarrollado en cuanto a número y tipo de vehículos. Incluyen fagos, plásmidos y cósmidos.            Sistemas de regulación bien conocidos permiten manipulación y sobreproducción.            Gram positivo. Las proteínas sólo alcanzan el espacio periplásmico.            Posible producción de endotoxinas.            Problemas para cultivarse a gran escala porque no alcanza alta densidad.            Gran variedad de cepas receptoras adecuadas.            Incapaz de glicosilar proteínas y eliminar intrones;            Transformable por inducción de competencia con CaCl<sub>2</sub></p>
<i>Bacillus subtilis</i>	<p>Carece de plásmidos propios que confieran características seleccionables, por lo que el desarrollo de vehículos (plásmidos y virus) ha sido lento y poco versátil.            Sistemas de regulación no del todo conocidos y más estrictos que en <i>E. coli</i>.            Gram positivo. Permite recuperar proteínas del medio de cultivo al ser secretadas.            No presenta problemas su producción a gran escala.            Pocas cepas receptoras adecuadas. Alta producción de proteasa normalmente.            Incapaz de glicosilar proteínas y eliminar intrones.            Transformable naturalmente, pero integra fácilmente información a genoma.            Para plásmidos es más adecuado el método de protoplastos.</p>
<i>Streptomyces</i>	<p>Presenta problemas el desarrollo de vehículos, tanto plásmidos como virus, por la gran variedad de especies que conforman el género. Los rangos de aplicación son variables.            Sistemas de regulación casi desconocidos y muy peculiares, por alto contenido de guaninas y citosinas.            Transformable por formación de protoplastos o por mediación de liposomas.            En otros aspectos, similar a <i>Bacillus subtilis</i>.</p>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<p>Al ser eucarionte, puede glicosilar proteínas (aunque no necesariamente con los mismos azúcares) y procesar intrones (aunque puede hacer errores).            Su capacidad de secreción de proteínas es parcial, probablemente por acumulación en organelos.            Transformable por método de protoplastos o por inducción por iones.            La estabilidad de las recombinantes variará según el tipo de plásmido usado.            Regulación no del todo conocida.            No presenta problemas de producción a gran escala.            Carece de virus que puedan usarse como vehículos.</p>

con orígenes de replicación. A continuación, se clonó una molécula pequeña, formada por 14 aminoácidos solamente: la somatostatina, cuya aplicación comercial era dudosa. Sin embargo, los resultados de este experimento permitieron enfocar las baterías a moléculas más prometedoras en el terreno económico y la primera fue la insulina humana.

El desarrollo de este producto hasta su introducción al mercado en 1982 consumió alrededor de 1000 años-hombre. El proceso fue hecho por Genentech, quien vendió la licencia para su producción a la compañía Eli Lilly, principal distribuidora de la hormona a nivel mundial. A pesar de todo el esfuerzo, las complicaciones derivadas del proceso de purificación, así como otros factores, no le confieren competitividad en precio con la insulina porcina, por lo que las ventas de insulina recombinante, con valor de 30 millones de dólares, sólo corresponde al 10% del mercado. Esta experiencia resultó fundamental en la evaluación de los procesos que valía la pena desarrollar con estas técnicas de recombinación, pues resultó evidente que sólo productos con alto valor agregado garantizarían la recuperación de la inversión. Compañías grandes, como Monsanto y DuPont, empezaron a absorber a las pequeñas en problemas financieros. Es importante destacar en este punto algunos aspectos en los que incidió el éxito de esta metodología en el terreno legal. Se hizo necesaria la creación de un sistema normativo y de patentes para proteger derechos sobre organismos vivos y los métodos de producción de los mismos. El primer caso fue la patente otorgada a Chakrabarty sobre una bacteria destinada a la eliminación de contaminación por hidrocarburos (10). Por otra parte, fue necesario normar en algunos casos las relaciones entre el mundo universitario y la industria, terreno en el que aún subsisten problemas, especialmente ante la diferencia en cuanto a los métodos de evaluación del personal. Uno de los éxitos de Genentech radica en que permite a su personal desarrollarse en un ambiente académico, al permitir la publicación de resultados, mientras mantienen su compromiso con la empresa al ser accionistas simultáneamente (1).

La etapa de pruebas clínicas o de campo, así como los problemas referentes a la explotación del producto o el proceso en términos legales, han constituido hasta ahora los principales cuellos de botella para la introducción de un producto al mercado. En la tabla IV se presentan algunos de los péptidos considerados inicialmente con mayor potencial de mercado. Algunos están ya comercializándose. Otros, como el interferón, la molécula que mayores expectativas había generado, han per-

didado atractivo tras demostrarse en pruebas clínicas su poca eficacia como anticancerígeno. Afortunadamente, la misma metodología ha permitido la obtención y evaluación de productos no considerados hace unos años, como los que se muestran en la tabla V. Se han obtenido resultados realmente estimulantes con varios de ellos, especialmente con la interleucina 2 en el terreno de la lucha contra el cáncer y contra algunas enfermedades inmunológicas. Sin embargo, el mercado más promisorio, del orden de dos mil millones de dólares para la próxima década, es el de las enfermedades cardiovasculares, destacando aquí el activador de plasminógeno tipo tisular, que ha desplazado en pruebas clínicas a urocinasa y estreptocinasa. Su introducción al mercado se espera en dos años más y esta perspectiva ha generado un nuevo auge bursátil de empresas biotecnológicas (1, 2, 10).

Este éxito se explica pues las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en los países desarrollados y no dejan de tener importancia en los subdesarrollados. En éstos, sin embargo, la mortalidad provocada por infecciones sigue siendo muy alta y puede verse que la producción de vacunas, salvo las que afectan al primer mundo, ha perdido interés, ante la falta de poder adquisitivo de quienes padecen paludismo, amibiasis y otras enfermedades. Quizá sea en este terreno hacia donde convendría dirigir los esfuerzos de las naciones afectadas por estos problemas y que cuentan con recursos para hacer investigaciones en este campo.

#### 4. Perspectivas

La ingeniería genética ofrece las posibilidades de obtener prácticamente cualquier proteína, ya sea de origen procarionte o eucarionte, por sistemas de fermentación.

Falta aún por recorrer camino en el desarrollo de vectores y cepas adecuadas, especialmente en los microorganismos utilizados tradicionalmente por la industria de fermentación, como *Saccharomyces*, *Bacillus* y *Streptomyces*. La producción eficiente de proteínas en dichos sistemas dependerá del conocimiento detallado de los mecanismos de regulación y modificaciones pre o post traduccionales en todos los casos, así como de los sistemas de excreción. Logros en este terreno permitirán, por ejemplo, la producción de anticuerpos monoclonales a partir de levaduras, de lo que existe ya algún reporte y que disminuiría muchísimo el costo de producción de los mismos, hasta ahora elaborados por cultivo de células animales.

Deben también superarse los problemas legales y de animadversión de la opinión de algunos sectores

**TABLA IV.**  
**PRODUCTOS A OBTENERSE POR TECNICAS DE INGENIERIA GENETICA CON MAYOR**  
**POTENCIAL DE MERCADO EN 1981.**

PRODUCTO	USO
Interferones: alfa, beta, gamma <sup>a</sup>	Anticancerígeno
Factor de crecimiento celular	Prevención de enfermedades virales
Insulina <sup>b</sup>	Anticancerígeno
Hormona del crecimiento <sup>b</sup>	Tratamiento de diabetes
Urocinasa y Estreptocinasa	Tratamiento de enanismo
Vacuna contra Hepatitis B <sup>a</sup>	Cicatrización
Vacunas contra enfermedades tropicales	Agentes trombolíticos
Angiotensina	Combatir infección
Neuropéptidos que regulan producción de hormonas sexuales	Combatir infecciones diversas
Oxitocina	Tratamiento hipertensión
Factor VIII <sup>a</sup>	Anticoncepción
	Anticoncepción e inducción parto
	Tratamiento de hemofilia

<sup>a</sup> En 1986 ya se encuentran en etapa de pruebas clínicas.

<sup>b</sup> En 1986 ya se encuentran en el mercado.

hacia estas técnicas, pues se corre el riesgo, como ya se ha dicho, de perder capacidad de financiamiento. Por otra parte, los países del tercer mundo deben también estudiar estos aspectos, pues una corriente fuerte de científicos de países en los que existen obstáculos para la explotación de los productos recombinantes apoya la idea de exportar inmediatamente a aquellos países en los que aún no hay regulaciones específicas, para ir acumulando ganancias así. Existe entonces el peligro de sufrir la introducción de productos que no sean suficientemente seguros o suficientemente efectivos, pero que alcanzarán altos precios y sangrarán las economías locales.

Las posibilidades de obtención de productos parecen, no obstante, muy amplias y parecen apoyar el optimismo de quienes han invertido dinero en estas compañías. Estamos indudablemente, empujando a cosechar los frutos de la revolución biológica.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Hamilton, J.O. (1986). Biotech's first superstar. *International Business Week* 2941; 68-72.
2. Genetic Technology News. (1986). Vol. 6 (1-4).
3. Rodríguez, R.L. y Tait, R.C. (1983). *Recombinant DNA Techniques: An Introduction*. Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Mass.; 236.
4. Carrier, M.J., Nuget, M.E., Tacon, W.C.A. y Primrose, S. (1983). High expression of cloned genes in *E. coli* and its consequences. *Trends in Biotechnol.* 1(4); 109-113.
5. Abelson, P. (1983). *Biotechnology: An Overview*. *Science* 219 (4585); 611-613.
6. Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. y Schrempf, II. (1985). *Genetic Manipulations of Streptomyces: A Laboratory Manual*. The John Innes Foundation, Norwich; 356.
7. Botstein, D., Falco, S.C., Stewart, S.E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchcomb, D., Struhl, K. y Davis, R. (1979). Sterile Host Yeasts (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* 8; 17-24.

**TABLA V.**  
**PRODUCTOS A OBTENERSE POR TECNICAS DE INGENIERIA GENETICA**  
**CON MAYOR POTENCIAL DE MERCADO EN 1986.**

PRODUCTO	USO
Factores de crecimiento celular	anticancerígeno
Linfocinas	anticancerígeno
–interleucina 2 <sup>a</sup>	
Inmunotoxinas	
–factor de necrosis tumoral (TNF) <sup>a</sup>	anticancerígeno
–contra cáncer de pecho <sup>a</sup>	
Inhibina	anticonceptivo masculino y femenino
Vacuna contra malaria	combatir infección
Vacuna contra herpes genital	combatir infección
Vacuna contra SIDA	combatir infección
Relaxina	dilatación cuello uterino en el parto
Proteína del esmalte dental	prevención de caries
Activador del plasminógeno tipo tisular (tPA) <sup>a</sup>	agente trombolítico
Apolipoproteínas	prevención de enfermedades cardiovasculares tanto por formación de trombos como por hipertensión
Proteína C	
Superóxido dismutasa	
Angiotensinas	

<sup>a</sup> Se encuentran en etapa de pruebas clínicas

8. Inouye, M. (Ed) (1983). *Experimental Manipulation of Gene Expression*. Academic Press, New York; 315.

9. Ganesan, A.T., Chang, S. y Hoch, J. (1982). *Molecular cloning and gene regulation in Bacilli*.

Academic Press, New York; 359.

10. Office of Technology Assessment. (1981). *Impacts of Applied Genetics*. Congress of the United States, Office of Technology Assessment, Washington; 331.

## INDICES DE REVISTAS

### MUNDO CIENTIFICO

LA RECHERCHE... revista en castellano

sumario n.º 56 VOL. 6, MARZO 1986

**244 EL IMPERIO MARITIMO DE LOS CRETENSES**, por Robin Häg.  
*¿Dominaron los cretenses las islas del mar Egeo? A veces, los historiadores lo dudan, pero los arqueólogos no, puesto que han descubierto indicios de la influencia cretense en las Cícladas. Pero ¿cómo puede evaluarse su naturaleza exacta.*

**254 CÓMO CANTAN LOS PÁJAROS**, por Michel Delsaut.  
*Los pájaros gorjean, ululan, chirrían...; estas distintas prestaciones vocales tienen su origen en mecanismos extraordinariamente complejos.*

**264 LA CATARATA**, por Otto Hockwin.  
*La catarata no es solamente la consecuencia ineluctable del envejecimiento, sino una enfermedad de orígenes múltiples. Su comprensión conducirá a la puesta a punto de terapéuticas capaces de prevenir esta penosa forma de las facultades visuales.*

**276 LOS ANILLOS DE LOS PLANETAS**, por André Brahic.  
*Objetos fascinantes, desde ahora los anillos de los planetas están a nuestro alcance gracias a las sondas espaciales. Un verdadero viaje al país de las maravillas que nos ayuda a comprender mejor la formación del sistema solar.*

**290 J. COMAS SOLÀ: ASTRÓNOMO DE POSICIÓN**, por Antoni Roca.  
*La obra científica de una gran personalidad y sus aspectos polémicos.*

**304 EL TRIGO HÍBRIDO SALE DEL LABORATORIO**, por Michel Rousset.  
*El aumento de rendimiento del trigo a la luz de los últimos avances en el laboratorio.*

**310 LA IRRESISTIBLE ASCENSIÓN DE LA TERAPÉUTICA GENÉTICA**, por Marcel Blanc.  
*El fin de la utopía del injerto de un gen.*

**314 UNA FAMILIA PARA EL GRAN PANDA**, por Marcel Blanc.  
*El parentesco del gran panda con los osos y las últimas investigaciones morfológicas.*

**318 LA CAO EN EL AUTOMÓVIL**, por Hervé Le Tellier.  
*La concepción asistida por ordenador permite crear y ensayar inmediatamente un nuevo modelo de automóvil antes de la propia realización de un prototipo. Un arma esencial para los fabricantes, en un momento en que la competencia es particularmente dura.*

**336 EL EXAFS: VER EL ENTORNO DE LOS ÁTOMOS**, por Pierre Lagarde.  
*La técnica de análisis por rayos X fácil de poner en práctica el EXAFS, permite conocer la estructura a la escala atómica de sistemas complejos y mal organizados.*

**344 DEL SILENCIO AL CAOS ACÚSTICO: LAS BIFURCACIONES DE UN CLARINETE**, por Christian Maganza.  
*¿Es posible oír un clarinete emitir una nota sin que nadie sopla?*

**348 LOS ESTILOS REGIONALES DEL ARTE PREHISTÓRICO**, por Ann Sieveking.  
*El estudio de las diferencias del arte prehistórico y la información sobre la estructura social.*

# INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

*El BEB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la bioquímica y en áreas afines. Está dirigido a profesores y estudiantes no especializados, por lo que se sugiere que la presentación de los trabajos se ajuste a sus lectores y sea simple explícita y didáctica. Serán bienvenidas las contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones. Solicitamos a los autores se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial.*

## I. ARTICULOS DE REVISION

- 1) *El manuscrito no debe exceder de 12 cuartillas escritas a máquina a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 golpes por renglón.)*
- 2) *Se aceptarán como máximo 6 figuras o tablas. La limitación en el número de figuras, tablas y referencias obliga a los autores a que seleccionen aquellas realmente importantes e informativas. Numere las figuras con números arábigos y las tablas con números romanos. Adicione las leyendas y pies de figuras en una hoja aparte. Considere que las figuras y tablas serán reducidas de tamaño, aproximadamente a 1/2 o 1/4 de la hoja carta, las letras o números más pequeños, una vez hecha la reducción no deben ser menores a los 2 mm.*
- 3) *Sugerimos un máximo de 10 referencias tanto específicas como lecturas recomendadas. Cada referencia debe contener: nombre(s) del autor(es), año entre paréntesis, título del artículo, nombre de la revista, volumen a cursiva y el número de la primera y última páginas. Ejemplos:*

- a) *Miller, C.O. (1982). Cytokinin Modification of Mitochondrial Function. Plan Physiol, 69, 1274-1277.*
- b) *Larkins, B.A., Pearlmutter, N.L. y Hurkman, W.J. (1979). The mechanism of zein synthesis*

*and deposition in protein bodies of maize endosperm. En The Plant Seed. Development, Peservation, and Germination, Editores: Rubenstein, I., Phillips. R.L., Green, C.E. y Gengenbach, B.G. Academic Press. New York. pp. 49-55.*

- 4) *Evite hasta donde sea posible los pies de páginas. Las abreviaturas poco comunes utilizadas en el texto deberán, enlistarse en la primera página.*

## II. OTRAS COMUNICACIONES

- 1) *El tema de las otras comunicaciones puede ser muy variado; desde resúmenes de artículos interesantes, relevantes o significativos, información de tipo general, bolsa de trabajo, etc.*
- 2) *El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera muy explícita.*
- 3) *El manuscrito debe ser de una o cuatro cuartillas de longitud, escritas en máquina a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 golpes por línea).*
- 4) *Se aceptarán un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto. En casos en que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o tabla.*

*Los manuscritos serán leídos por dos revisores, uno de ellos familiarizado con el tema y el otro ajeno al mismo. Las correcciones y sugerencias se comunicarán al primer autor.*

*Envíe el original y dos copias de los manuscritos a la Dra. Yolanda Saldaña de Delgadillo. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Apdo. Postal 70-159, Delegación Coyoacán, 04510 México, D.F., o al Dr. Alberto Hamabata, Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apdo. Postal 14-740, 07000 México, D.F. o bien a través del corresponsal BEB.*