

SANTANA, C.; D. SEGURA & S. SÁNCHEZ. Síntesis, función y origen evolutivo de los metabolitos secundarios producidos por microorganismos. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 36:139-158,1994.

RESUMEN: Los metabolitos secundarios de origen microbiano, corresponden a sustancias de naturaleza química variable, formadas principalmente por actinomicetales y algunos hongos, usualmente en la fase tardía de su crecimiento. Una proporción grande de dichos metabolitos posee actividad antibiótica aunque también se les ha empleado como antineoplásicos, pigmentos, herbicidas y surfactantes. Su función se ha relacionado con procesos de patogenicidad bacteriana y diferenciación celular, e igualmente les han sido atribuidos propiedades quelantes, hormonales y de reserva nutricional. Al igual que otros componentes de la célula, los metabolitos secundarios se derivan de metabolitos de bajo peso molecular. Para ello utilizan rutas de biosíntesis específicas, cuyo tráfico es modulado por principios comunes de regulación, que generalmente actúan a nivel de la actividad y de la síntesis de las enzimas involucradas en las mismas. En virtud de ser aparentemente prescindibles, la existencia de estos metabolitos ha generado dificultades para ser explicada en términos evolutivos y se ha sugerido desde su presencia como artefactos de laboratorio, hasta la existencia de un valor adaptativo en el pasado, ya perdido en la actualidad. Hoy en día, la explicación más plausible consiste en atribuir a la síntesis de estos compuestos una ventaja selectiva para el microorganismo productor. Al parecer el surgimiento de rutas tan complejas se ha dado a partir de componentes de vías del metabolismo primario y en la evolución de ellas, los fenómenos de mutación, amplificación y transferencia genética horizontal han desempeñado un papel determinante.

SANTANA, C.; D. SEGURA & S. SÁNCHEZ. Synthesis, function and evolutive origin of microbial secondary metabolites. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 36:139-158,1994.

ABSTRACT: The microbial secondary metabolites are compounds with a wide range of chemical structures, produced mainly by actinomycetales and some fungi, usually in the late growth phase. Although a high proportion of this metabolites are antibiotics, there are also examples with pigment, herbicide and surfactant properties. Its function has been correlated to bacterial pathogenicity and cellular differentiation, however, properties dealing with chelation, hormonal and antitumor activities as well as nutritional reserve have been also reported. As in other examples of cellular compounds, the secondary metabolites are produced from low molecular weight precursors. For this purpose, specific biosynthetic pathways are utilized and regulated by processes which generally affect either the activity or the synthesis of the enzymes involved in it. Considering that secondary metabolites apparently are dispensable compounds, there are difficulties to explain their existence from an evolutionary point of view. Explanations to their existence have gone from laboratory artifacts to those conferring them an adaptative value in the past. It seems that they were maintained due to selective advantages to the producer microorganisms and probably, their sometimes complex biosynthetic pathways, have emerged from primary metabolites and evolved later independently by random mutation, amplification and genetic transfer.

Síntesis, Función y Origen Evolutivo de los Metabolitos Secundarios Producidos por Microorganismos.

CARLA SANTANA, DANIEL SEGURA & SERGIO SÁNCHEZ.

Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F. MEXICO.

INTRODUCCION

Los metabolitos secundarios representan a sustancias de naturaleza química variable, producidas por unas cuantas especies biológicas usualmente en la fase tardía de su crecimiento^{14, 83}. En contraste con los metabolitos primarios, los metabolitos secundarios presentan dificultad para ser integrados a la fisiología general del microorganismo que los produce, es decir, se les toma con frecuencia como productos no esenciales para el crecimiento vegetativo del microorganismo productor. No obstante, se les ha concedido una ventaja competitiva para aquellos sistemas biológicos que los forman^{6, 20}. Como ejemplos de metabolitos secundarios podemos citar a los pigmentos microbianos, diversas hormonas vegetales, toxinas microbianas y los antibióticos. Estos últimos poseen sobre todo una gran importancia práctica desde el punto de vista clínico. No obstante, no todos los metabolitos secundarios con actividad biológica son antibióticos. En un estudio hecho con 600 metabolitos, reportados como efectores fisiológicos y registrados en una base de datos japonesa (The Kitasato Microbial Chemistry, 1990), sólo 290 presentaron antibiosis positiva hacia alguna especie microbiana⁵⁸.

SISTEMAS BIOLÓGICOS QUE PRODUCEN LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

La formación de metabolitos secundarios es característica de diversas especies de bacterias, hongos, plantas e invertebrados. Los actinomicetales posiblemente producen el mayor porcentaje de los mismos ya que de los 6,000 antimicrobianos conocidos un 67% es producido por ellos y de éstos, alrededor del 90% proviene de diversas especies de *Streptomyces*^{7, 18}. Otras bacterias productoras corresponden a algunas especies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, y flavobacterias. Dentro de los hongos capaces de formar metabolitos secundarios destacan los géneros *Penicillium*, *Dactylomyces*, *Phaffia* y *Aspergillus*.

En general, los metabolitos secundarios son formados como familias de compuestos estructuralmente relacionados. Así

por ejemplo, se ha informado que una sola cepa de *Micromonospora* produce 48 diferentes antibióticos del tipo de los aminociclitolos⁷ y se sabe que *Streptomyces erythreus* genera 3 tipos de eritromicina⁷⁰.

VIAS METABOLICAS INVOLUCRADAS EN LA BIOSINTESIS

Al igual que otros componentes metabólicos de la célula, los metabolitos secundarios se derivan de metabolitos de bajo peso molecular⁶⁶. En la Fig. 1 se pueden observar algunos intermediarios y productos finales del metabolismo celular que sirven como precursores de diversos metabolitos secundarios como los antibióticos, colorantes, toxinas y alcaloides³².

Los pasos metabólicos necesarios para formar tales compuestos, como se comprende, variarán según el caso. Así por ejemplo, se ha establecido la necesidad de al menos nueve actividades enzi-

máticas de *S. erythreus* para sintetizar la eritromicina a partir del propionato⁷⁰. Para el caso de la penicilina se requiere de cuatro pasos enzimáticos para formar el antibiótico⁷¹. En otros ejemplos el número de enzimas involucradas puede ser aún mucho mayor. Tal es el caso de la síntesis de tetraciclina por *Streptomyces aureofaciens*³⁴.

Las evidencias de tipo genético y de biología molecular, han permitido establecer que los genes que codifican para la síntesis de muchos metabolitos secundarios, se encuentran organizados en forma de grupos (Tabla 1). Esta forma de organización, como se comprende, ofrece ventajas para la propia regulación de la biosíntesis, pero además, al estar contenida en una sola región de DNA, la información que codifica para estas vías resulta más resistente a la pérdida, por los fenómenos de recombinación. La conservación de esta información genética pudo ser facilitada por un proceso de selección positiva durante la evolución, debido al

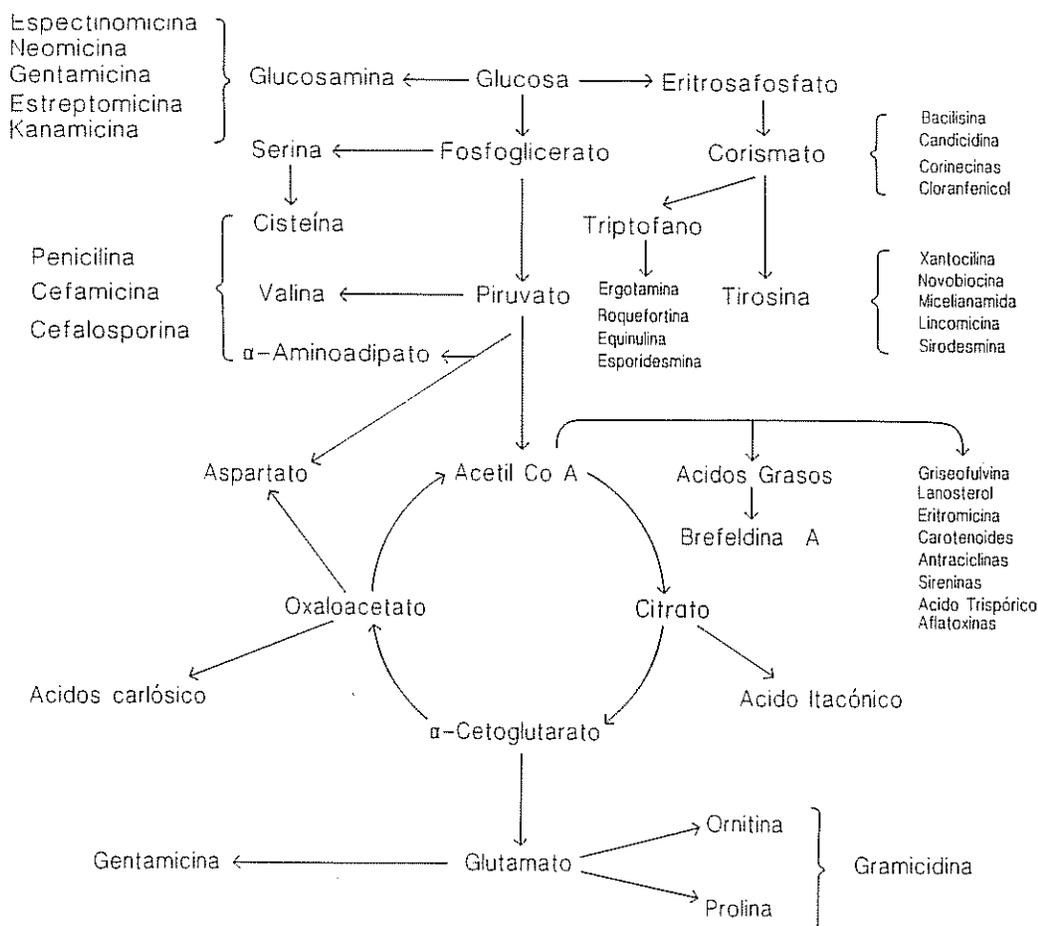


Figura 1. Orígenes biosintéticos de diversos metabolitos secundarios de interés industrial.

papel de algunos metabolitos secundarios en el ecosistema, a través de procesos como la simbiosis o antibiosis⁶.

A pesar de la diversidad química que estos metabolitos presentan, llama la atención que en la mayor parte de los casos sean sintetizados como familias de compuestos. Adicionalmente, la información genética que codifica para la síntesis de tales familias se mantiene altamente conservada en las diferentes especies microbianas que los sintetizan. Un caso interesante ocurre con varios de los genes que codifican para la síntesis de beta-lactámicos en procariotes y eucariotes. En principio, estos genes han sido conservados en grupos en los diferentes sistemas biológicos que los poseen y la secuenciación de varios de ellos a partir de hongos y bacterias (como los pcb A, B, C, y los cef E y F), ha mostrado gran homología al grado de permitir hibridación cruzada entre estos sistemas⁷⁶.

En este mismo contexto, y para el caso de los antibióticos, se ha informado que diversos sistemas microbianos, como una forma de autoprotección, pueden modificar o degradar el compuesto producido. Curiosamente, los genes que codifican para las enzimas de resistencia, con frecuencia forman parte de los grupos que contienen los genes de su biosíntesis. Tal característica se ha utilizado ventajosamente para el aislamiento de cepas sobreproductoras de antibióticos⁵⁵.

FENOMENOS REGULATORIOS QUE AFECTAN LA PRODUCCION

Diversos autores han observado que el inicio del metabolismo secundario en muchos casos puede correlacionarse con condiciones nutricionales que limitan el crecimiento¹⁷. Para la formación de los antibióticos por ejemplo, cuando disminuye la tasa específica de crecimiento de los microorganismos productores, se inicia una segunda fase (idiofase) que corresponde a la etapa de producción del metabolito secundario. Este comportamiento, como se comprende, requiere de la existencia de mecanismos regulatorios que prevengan la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis durante la

TABLA 1
Algunos ejemplos de metabolitos secundarios cuyas vías de síntesis se encuentran organizadas por grupos dentro del genoma.

Ejemplo	Utilización	Tamaño del DNA (kb)
Actinorrodina	Pigmento	32
Bialafos	Herbicida	16
Eritromicina	Antibiótico	35
Estreptomina	Antibiótico	13
Metilnomicina	Pigmento	17
Cefamicina C	Antibiótico	29
Undecilprodigiosina	Pigmento	18

fase de crecimiento exponencial. No obstante en otros casos, puede existir una sobreposición entre las fases de crecimiento logarítmico y la de producción²⁹.

Dentro de los mecanismos regulatorios que han sido descritos como más determinantes para la formación de metabolitos secundarios podemos citar la inducción, la regulación nutricional y la regulación por producto^{20,52}.

Inducción de la biosíntesis. La capacidad de los microorganismos para sintetizar un perfil de enzimas determinado como respuesta a la presencia de sustratos específicos en el medio de cultivo, constituye un mecanismo regulatorio muy eficiente en la biosíntesis y utilización de muchos compuestos. Este fenómeno regulatorio denominado inducción, representa una rápida respuesta de los sistemas biológicos a la administración de nutrientes al medio de crecimiento, o bien es observada como consecuencia de cambios metabólicos intracelulares, que suelen ocurrir durante ciertas fases del crecimiento celular, en especial las relacionadas con la síntesis de metabolitos secundarios. La inducción enzimática ha sido citada entre otros ejemplos, en el control de la biosíntesis de penicilina G y cefalosporina C por los

aminoácidos glutamato y metionina respectivamente^{41, 89}.

Un caso especial de regulación está dado por el factor-A para la síntesis de estreptomycin en *Streptomyces griseus*. El factor-A es un compuesto de bajo peso molecular que por un fenómeno de cascada estimula simultáneamente la formación de antibiótico, la resistencia a estreptomycin y la producción de un pigmento amarillo. La cascada se inicia con la síntesis del factor-A por la expresión del gen *afsA*. Este factor se combina con una proteína de bajo peso molecular (AfsR, Mr=26000), que a su vez actúa como represor del sistema³². Existen alrededor de 40 moléculas de AfsR a que al unirse al factor-A, permiten la expresión de los genes antes mencionados. Este mismo factor ha sido reportado como estimulante de la síntesis de la actinorrodina en *Streptomyces coelicolor* y de la prodigiosina en *Streptomyces lividans*⁵⁴.

Efecto de la fuente de carbono. Un ejemplo de control ampliamente observado en la producción de metabolitos secundarios, está relacionado con la fuente de carbono. Se ha observado que las fuentes de carbono que son eficientemente utilizadas por los sistemas microbianos para el crecimiento, ejercen un efecto negativo sobre la síntesis de estos metabolitos. Dentro de los compuestos reportados como más efectivos para ejercer esta forma de control se encuentra la D-glucosa.

Dependiendo del sistema biológico y del metabolito secundario analizado, además de la glucosa, otras fuentes de carbono también pueden ejercer este efecto. Un caso representativo de esta situación es la represión que presenta el citrato sobre la síntesis de novobiocina en *Streptomyces niveus*³⁹. Finalmente, los polisacáridos y oligosacáridos por su liberación gradual de fuentes de carbono sencillas, generalmente son mejores fuentes de carbono para la producción de dichos metabolitos.

El mecanismo responsable de la represión catabólica en los sistemas microbianos es bastante complejo y diverso⁶⁷. En algunos procariones Gram-negativos como *Escherichia coli* la enzima III

del sistema fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenol-piruvato así como el AMP cíclico representan los mecanismos claves de regulación. No obstante, en algunos Gram-positivos como *Bacillus subtilis*, el sistema PTS parece ser el más importante ante la ausencia de AMP cíclico bajo condiciones normales. Sin embargo, otro Gram-positivo como *S. coelicolor* carece del sistema PTS y los niveles de AMP cíclico no parecen responder a los cambios de la fuente de carbono³⁰. De este modo, el mecanismo de represión por glucosa en *Streptomyces* parece ser distinto a los informados para otros sistemas. La glucosa reprime a nivel transcripcional la expresión de genes relacionados con el transporte de fuentes de carbono como la arabinosa, el glicerol y la galactosa³⁰. Mutantes de *S. coelicolor* resistentes a la acción de un análogo no metabolizable de la glucosa (2-deso-xi-glucosa) resultaron ser resistentes a la represión catabólica por glucosa. La carencia de represión por glucosa en estas mutantes, se ha correlacionado con la pérdida de la enzima glucosa cinasa dependiente de ATP^{30, 73}. Para el caso de eucariotes como *Penicillium chrysogenum*, al menos este último mecanismo parece jugar también un papel relevante en la regulación por glucosa de la síntesis de la penicilina⁴. La síntesis de glucosa cinasa se encuentra codificada por un fragmento de 1.2 Kb (*glk*), cuyo producto es homólogo a los genes *nagC* en *E. coli* y *xylR* en *B. subtilis* y *Lactobacillus pentosus*, que codifican para proteínas regulatorias del metabolismo de carbohidratos¹.

Efecto de la fuente de nitrógeno. Las sales de amonio son las principales fuentes de nitrógeno que interfieren con la síntesis de muy diversos metabolitos secundarios. Dicha acción suele ser proporcional a la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo⁶⁹. Se han establecido las bases bioquímicas de este efecto para algunos ejemplos como es el caso de la cefamicina en *Streptomyces lactamdurans* donde la síntesis de las enzimas ACV sintetasa, ciclasa, expandasa y epimerasa fueron reprimidas por este ión¹¹. La síntesis de tilosina en *Streptomyces fradiae*,

por su parte, es otro ejemplo de proceso sensible al amonio que ha sido estudiado en detalle. En este antibiótico, el amonio reprime las enzimas valina deshidrogenasa y treonina desaminasa, responsables de la síntesis de O-ceto-isovalerato e isobutirato, a su vez precursores de la fracción aglicona (protilonolido) del antibiótico⁵⁷.

Efecto de la fuente de fosfato. El fosfato es esencial para el crecimiento y reproducción de los sistemas microbianos. En el caso de algunos sistemas biológicos la síntesis de metabolitos secundarios es inversamente proporcional a la concentración de fosfato en el medio de cultivo. Dicho efecto se ha estudiado ampliamente en *S. griseus* para el caso de la candicidina donde se ha encontrado que el fosfato suprime la síntesis del antibiótico a través de la represión de la p-aminobenzoato sintetasa, una enzima que forma un intermediario de la vía del p-aminobenzoato a partir del corismato y de la glutamina. La represión por fosfato parece ser específica para la síntesis de RNA mensajero a partir del gen *pabS* ya que si bien la formación de este disminuye en un 95% en cultivos suplementados con 7.5 mM de fosfato, la síntesis total de RNA es estimulada por este compuesto. Se ha clonado un promotor regulado por fosfato, correspondiente a una región cercana al gen estructural *pabS*⁶⁵.

Aún se desconoce el compuesto responsable de mediar la acción del fosfato. No obstante, se ha propuesto que el ATP podría ser el efector primario de la regulación por este compuesto. En el caso de la síntesis de estreptomicina por *S. griseus*, la formación puede ocurrir aún en altas concentraciones de fosfato, pero los compuestos sintetizados son inactivos hasta que puedan ser desfosforilados y excretados por la célula. De este modo, el antibiótico es sintetizado en su forma inactiva con un enlace éster fosfato en la posición 6 del anillo de estreptidina. Su activación ocurre por la acción de una fosfatasa, la cual elimina este ión de la estreptidina. Dicha enzima, es muy sensible a la inhibición por fosfato y sólo se encuentra en los microorganismos

productores de estreptomicina. Su síntesis ocurre únicamente durante la fase tardía del crecimiento microbiano (idíofase), una vez que ha disminuido la concentración de fosfato en el medio.

Se ha observado que elevadas concentraciones de fosfatos incrementan el nivel de adenosina trifosfato intracelular (ATP). Por ello no es posible descartar una acción mediada por la carga energética de la célula tal y como se observa con la biosíntesis de tetraciclina en *S. aureofaciens*¹⁶.

Retroregulación de la biosíntesis. Algunos metabolitos secundarios poseen vías de biosíntesis ramificadas, de tal forma que a partir de un precursor común pueden originarse dos metabolitos finales. En algunos casos dichos productos están representados por un metabolito primario y por otro secundario. Bajo estas condiciones el producto final primario puede retroinhibir la parte común de la vía y en esta forma afectar la síntesis del producto final secundario. Un ejemplo representativo está dado por la retroinhibición que la L-lisina ejerce sobre la enzima homocitrato sintetasa, lo cual se traduce en una disminución en la formación del intermediario O-aminoadipato, precursor inicial de la vía biosintética de la penicilina⁵¹.

Existe una serie de observaciones que indican que algunos microorganismos productores de antibióticos presentan deficiencias para regular la concentración intracelular de sus precursores. Una consecuencia de este efecto podría ser un incremento notable en la concentración de los mismos cuando la tasa de crecimiento microbiano disminuye. Bajo esta condición, los precursores serían canalizados hacia la síntesis de dichos metabolitos⁴⁷.

ACTIVIDADES Y FUNCIONES DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Es importante hacer una distinción entre la actividad y la función de un metabolito secundario. La actividad biológica es una propiedad intrínseca de la molécula, que en el organismo productor puede cumplir con una función. Sin embargo, muchas de las actividades de los

metabolitos secundarios que se han descubierto y en su mayoría aprovechado para el beneficio del ser humano no necesariamente cumplen con alguna función en el organismo productor; no se descarta el hecho de que estos metabolitos secundarios pueden poseer una actividad que sea útil para el organismo que lo produce.

TABLA 2

Ejemplos de actividades de los metabolitos secundarios de origen microbiano.

Metabolito secundario	Actividad
Penicilina	Bactericida
Bleomicina	Bactericida, antitumoral
Eritromicina	Bactericida
Anfotericina B	Fungicida
Erbstatina	Anticancerígeno
Higromicina	Nematocida
Avermectina	Nematocida, inhibidor de otros invertebrados
Tunicamicina	Antiviral
Sinefungina	Fungicida, antiviral
Daunorrubicina	Antitumoral, bactericida
Bialafos	Herbicida
Ciclosporina A	Fungicida, inmunosupresor
Amicoumacina A	Bactericida, antiinflamatorio
Zearalenona	Hiperestrogénico
Ascofuranona	Antitumoral, activador de macrófagos

Actividades. Los metabolitos secundarios presentan una diversidad muy grande en cuanto a sus actividades y propiedades; no sólo por la variedad tan amplia que existe de los mismos sino porque un mismo compuesto puede tener más de una actividad. En la Tabla 2 se muestran ejemplos de las actividades de algunos

metabolitos secundarios, los cuales, en su mayoría son antibióticos además de poseer otra u otras actividades.

Una proporción muy grande de microorganismos aislados del suelo producen metabolitos secundarios con actividad antibiótica. Los actinomicetos y hongos microscópicos son los que dominan en este campo⁸².

Los antibióticos producidos por los actinomicetos son muy diversos en cuanto a su estructura química, mientras que los producidos por bacterias son comúnmente péptidos. Estos antibióticos peptídicos se han aislado de grupos como los *Bacillus*, bacterias entéricas y *Pseudomonas*. Existen otros antibióticos producidos por bacterias que no son de naturaleza peptídica por ejemplo algunos β -lactámicos y otros metabolitos secundarios como las prodigininas⁸².

Los metabolitos secundarios deben su actividad antibiótica a la capacidad para inhibir procesos metabólicos primarios que son esenciales para el microorganismo. La mayoría actúa como antimetabolito, ya que estructuralmente se asemejan a un metabolito normal permitiéndoles competir por el sitio de unión del mismo e interfiriendo con una actividad vital. Esta actividad antibiótica se puede dividir según el tipo de microorganismo en el que actúe. Así, se puede tener una acción bactericida tal y como ocurre con la vancomicina y la penicilina que inhiben la biosíntesis de la pared celular en bacterias Gram-positivas; o con la esperamicina, la bleomicina, la mitomicina C y la actinomicina D que se unen al DNA e inhiben la transcripción o la replicación del mismo⁴⁸. Otros antibióticos como la estreptomina, la gentamicina y la eritromicina, inhiben a su vez la síntesis de proteínas, a nivel de los ribosomas bacterianos 70S, pero respetando los ribosomas de eucarióticos. Algunos antibióticos como la anfotericina B, poseen propiedades fungicidas. Otros más como la viriplanina, la lantiopeptina y las pumilacidinas son antivirales y actúan en contra del virus del herpes simple (HSV-1)²⁴. La bafilomicina y setamicina, además de ser fungicidas, presentan actividad contra los protozoarios⁶⁰.

Además de esta acción, en muchos metabolitos secundarios se observa actividad hacia organismos pluricelulares como se muestra a continuación:

- Nematocida. Una serie de compuestos producidos por los estreptomicetos, actúan sobre ciertos nemátodos y céstodos como por ejemplo la higromicina, antihelmicina y la destomicina⁶².

- Insecticida. Son agentes no específicos que pueden bloquear la respiración celular o inhibir la síntesis de proteínas en eucariotes. Sin embargo, existen otros como la nikomicina y nucleósidos relacionados que al inhibir la enzima quitina sintetasa, presentan a la vez actividad insecticida y fungicida, esta última debido a su acción contra aquellos hongos de paredes celulares quitinosas²³.

- Toxicidad. Una gran variedad de metabolitos secundarios con actividad antibiótica son además tóxicos para los animales. La toxicidad no siempre resulta de una inhibición de la misma vía metabólica de la que es sujeto un microorganismo. Por ejemplo, la amfomicina interfiere con el transporte a través de membrana de intermediarios mureínicos en bacterias, sin embargo, en células eucarióticas bloquea la glicosilación de las proteínas². La citocalicina es un antibiótico fungicida que provoca, en organismos eucarióticos diferenciados, efectos en la forma celular, movimiento y reproducción debido a su capacidad para bloquear la polimerización de subunidades de actina⁴⁴.

Muchos metabolitos secundarios que son tóxicos caen dentro de una categoría de antibióticos de amplio espectro ya que presentan más de un efecto, tal es el caso de las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*, las cuales además de provocar toxicidad crónica en el hígado, son carcinogénicas⁸².

- Antitumoral. Muchos metabolitos son capaces de intercalarse en el DNA de células que están proliferando rápidamente. Debido a esta propiedad algunos han sido usados como agentes anticancerígenos. Dentro de este grupo existe una serie de compuestos producidos por diferentes especies de *Streptomyces* como las antraciclina y la familia de las bleomicinas⁸¹.

- Farmacológica. Varios metabolitos secundarios poseen actividades farmacológicas específicas en animales, como son la diabetogénica, estrogénica, antiespasmódica, antiinflamatoria, inmunológica, etc; o semejante con ciertas hormonas como es el caso de la insulina o la ACTH. Los alcaloides del ergot por ejemplo, son inactivos contra los microorganismos, sin embargo, tienen diversos efectos farmacológicos tanto en el sistema nervioso central como en el músculo liso³⁸. La zearalenona, producida por varias especies de *Fusarium* es un agente hiperestrogénico⁸². El paxisterol, descubierto en un cultivo de *Penicillium*, tiene una actividad analgésica⁵⁶. La amicoumicina A, producida por *Bacillus pumilus*, fue aislada primeramente como antibiótico y después se encontró que tenía un efecto antiinflamatorio y antiulceroso³⁶. La motilida, un derivado del antibiótico eritromicina, es un competidor de la hormona peptídica gastrointestinal, motilina, y por lo tanto, puede ser útil para modular la actividad contráctil en el tracto gastrointestinal⁵⁸. La lactacistina, tiene actividad de factor neurotrópico; como se sabe, este factor es esencial para la supervivencia y funcionalidad de las células nerviosas⁵⁸. Las ciclosporinas, producidas por especies de *Beauveria*, fueron detectadas por su actividad fungicida y subsecuentemente se descubrió que presentaban también actividad inmunosupresiva⁸². La ascofuranona además de presentar actividad hiperlipidémica y antitumoral es un activador de macrófagos⁴⁵. Una gran variedad de metabolitos secundarios que se han aislado recientemente presentan también actividad inmunoestimulante, tal es el caso de la gludapcina, la cual activa los macrófagos y estimula tanto la producción de anticuerpos como la hipersensibilidad retardada²⁶. La inhibición enzimática es otra actividad farmacológica importante; la mayoría de los metabolitos secundarios que presentan esta actividad son principalmente inhibidores de proteasas; se han encontrado contra pepsina, papaína, tripsina, elastasas, etc.¹⁶; la sangivamicina es un inhibidor de cinasas muy potente⁵⁹.

- Herbicida. Las herbicidinas producidas por *Streptomyces sagonensis*, son un grupo de nucleósidos con una fitotoxicidad selectiva contra plantas dicotiledóneas⁷⁹. El antibiótico bialafos es también un herbicida muy potente, ya que inhibe la enzima glutamato sintetasa en las plantas⁴³. La foxazolina es un inhibidor de la biosíntesis de celulosa⁵⁸.

Otro tipo de actividades que presentan los metabolitos secundarios incluyen:

- Surfactante. Muchos microorganismos producen una variedad de lipopéptidos, lipoproteínas, glicolípidos y lipopolisacáridos con capacidad de cambiar la tensión superficial. Un ejemplo es el lipopéptido surfactina producido por *Bacillus subtilis*⁸².

- Pigmentación. Existe una variedad muy grande de pigmentos producidos por microorganismos. Dentro de ellos destacan, por su importancia comercial, los carotenoides. Como ejemplos de carotenoides podemos mencionar al β -caroteno, la astaxantina y zeaxantina empleados para acentuar la pigmentación de la yema de huevo y la piel de las aves de corral²¹.

Funciones. Ha sido difícil determinar la función o funciones que desempeñan los metabolitos secundarios en el organismo productor debido en parte a que muchos de ellos no confieren una ventaja selectiva aparente. Esto llevó a la generación de diversas hipótesis, desde que los metabolitos secundarios no tenían función y que sólo eran artefactos de laboratorio, hasta pensar que los metabolitos presentan ventajas selectivas individuales⁵. Sin embargo, aunque el debate persiste entre los bioquímicos y los microbiólogos, no es posible aceptar la ausencia de función. Si los metabolitos secundarios no la tuvieran, no podrían haber existido por mucho tiempo, ni con tan gran diversidad, ni tampoco en grandes cantidades; aun cuando el costo metabólico implicado fuera bajo, pues las mutaciones al azar los hubieran llevado a su eliminación⁸⁸. Además, sus complejas vías de biosíntesis, su regulación y organización genética incli-

nan a pensar en un producto natural funcional.

Por otro lado, el considerar una función común a todos los metabolitos secundarios es inconsistente con ciertos hechos, tales como la existencia de una gran diversidad de grupos químicos que muchas veces no corresponden a los grupos encontrados en el metabolismo primario; la complejidad de los mismos y, por tanto, el requerimiento de enzimas muy específicas para cada caso; así como la alta probabilidad de encontrar alguna actividad biológica independiente del organismo productor⁸⁸.

Dentro de las teorías que consideran una función común, se han citado las siguientes:

- Productos de un descarrilamiento en el metabolismo primario. Malik⁴³ propone que la sobreproducción o acumulación de un intermediario del metabolismo primario, cuando el organismo se encuentra bajo estrés fisiológico, induce la activación de un mecanismo secundario hasta ese momento latente, que metaboliza la sustancia acumulada originando un metabolito secundario.

- Productos de limpieza del metabolismo primario: A pesar de su alta eficiencia y especificidad, permiten la formación de pequeñas cantidades de intermediarios o residuos que aparecen de forma modificada como metabolitos secundarios⁸⁸.

- Productos de mecanismos de detoxificación: Remueven intermediarios del metabolismo primario que pueden ser tóxicos para el organismo, cuando están en grandes cantidades⁸⁸. Sin embargo, muchas veces el metabolito secundario es altamente tóxico para el que lo produce; requiriéndose la mayoría de las veces, de la existencia de genes de resistencia regulados coordinadamente con los genes de biosíntesis.

- Productos para el mantenimiento metabólico: Este mecanismo entra en juego una vez que se han agotado los nutrientes en el medio y busca mantener activados los procesos metabólicos primarios. Para ello, la propia maquinaria del metabolismo secundario canaliza a los intermediarios y productos del

metabolismo primario hacia la síntesis de metabolitos secundarios. De esta forma se evita que los primeros se acumulen y frenen la operación de los procesos metabólicos primarios⁹. Este sistema de mantenimiento, permitirá al organismo involucrado el crecer rápidamente cuando llegue su oportunidad.

En la actualidad la idea más aceptada es la de una función individual para cada tipo de metabolito secundario. De acuerdo con Bennett y Bentley⁵: "La carencia de función y la carencia de una función obvia son dos cosas diferentes. Así, la carencia de una función selectiva ... y la carencia de una función esencial ... son también completamente diferentes". "Los metabolitos no necesitan ser esenciales para la viabilidad de la célula para ser de utilidad en la supervivencia del organismo, colonia o especie."

Las funciones hasta ahora planteadas para los metabolitos secundarios son:

- Sustancias de reserva. Se ha observado que el antibiótico citrinina es continuamente sintetizado y degradado en el curso del crecimiento de *P. citrinum*, en el cual se presenta un ciclo entre citrinina extracelular y acetilcoenzima A intracelular con el fin de regular la concentración de ambos compuestos³.

- Precursores de componentes estructurales. Al parecer, la estreptomina es un componente de la envoltura muireínica de *S. griseus*⁷⁸. Debido a que el antibiótico sólo se sintetiza en la idiofase, se podría argumentar que este proceso es la manifestación de que el metabolismo secundario ha sido integrado dentro del metabolismo normal en este organismo en particular y no que esa sea su función principal⁸².

- Agentes quelantes de metales. Entre estos están las sideraminas o sideróforos y los siderocromos; las sideraminas toman, transportan y solubilizan el hierro. Casi todas las cepas estudiadas de *Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora*, producen estos compuestos. Su actividad antibiótica se debe a su capacidad para provocar que otras especies que no los producen queden deficientes de hierro en el medio, tal es el caso del antibiótico

nocardamina¹⁹. Esto lleva a pensar que, probablemente no sólo tienen una función de transportadores de metales en el organismo productor sino que también funcionan como un mecanismo de competencia contra otros microorganismos presentes en el medio en que habitan.

Existen también los antibióticos ionóforos que transportan ciertos iones de metales alcalinos; dentro de este grupo se encuentran los antibióticos macrotetrales, los cuales aumentan la permeabilidad de las membranas al potasio¹⁵. Normalmente las células tienen una alta concentración de potasio y una baja concentración de sodio intracelular. Para ello requieren de un mecanismo que les permita introducir K^+ aun cuando este ión se encuentre en una baja concentración en el medio. Este objetivo se logra con la participación de los antibióticos tetraloides. Una evidencia de que los ionóforos tienen una función de supervivencia bajo estas condiciones, es la capacidad de *S. griseus*, productor de un macrotetrale, para crecer en un medio alto en Na^+ y bajo en K^+ , mientras que una mutante de esa cepa, no productora del compuesto, no puede crecer³⁷.

- Hormonas sexuales. Un ejemplo de estos compuestos es la sirenina producida por el ficomiceto *Allomyces*. La sirenina es formada por el gameto femenino de este microorganismo y actúa como agente quimiotáctico para atraer al gameto masculino¹⁰. La zearalenona, por otra parte, es producida por *Gibberella zeae* (*Fusarium roseum*) y funciona como regulador en la reproducción sexual de este hongo⁸⁶. Finalmente, las sustancias IA, IB, e IC, de naturaleza peptídica, son factores sexuales que permiten la aglutinación en *Saccharomyces cerevisiae*⁶⁸.

- Agentes de diferenciación. La diferenciación microbiana ocurre simultáneamente en los niveles morfológico y bioquímico (metabolismo secundario). Un mismo metabolito secundario puede actuar sobre la diferenciación morfológica y fisiológica del microorganismo que lo produce⁶⁹. Se ha visto por ejemplo, que el ácido 6-metilsalicílico parece estar involucrado en la formación del micelio aéreo de *Penicillium patulum*⁶²; lo

mismo ocurre con las brevianamidas, el asperfenamato y el ácido micofenólico para el caso de *Penicillium brevicompactum*⁸; similarmente, el esporogen-A01, producido por *Aspergillus oryzae*, es un factor esporogénico⁸⁰.

Se ha postulado que en muchos casos, los metabolitos secundarios pueden funcionar como señales intracelulares que unen actividades relacionadas e involucradas en la diferenciación. Así, sustancias llamadas inductores o autorreguladores, son necesarios para que se de la esporulación y la síntesis de antibióticos en algunos estreptomicetos. Un ejemplo muy citado es el factor-A (2S-isocapril - oil - 3S - hidroximetil-g-butiro lactona), requerido por *S. griseus* tanto para su esporulación como para la producción del antibiótico. Las mutantes deficientes en la síntesis del factor-A pierden la capacidad tanto de producir estreptomycinina como de esporular²⁷. En años recientes, se ha informado sobre varios análogos del factor A que funcionan como autorreguladores del metabolismo secundario⁶. Gräfe y col.²⁵ identificaron un inductor de estructura análoga al factor A, que provoca conjuntamente diferenciación del microorganismo y biosíntesis de antraciclinas en *Streptomyces bikiniensis* y *S. cyaneofuscatus*. Algunas veces los autorreguladores poseen de manera simultánea actividad antibiótica y actividad morfogenética. Tal es el caso de la pamamicina, antibiótico ionóforo que en *S. alboniger* induce la formación de micelio aéreo^{40,53}, no obstante, ésto es poco frecuente. Ahora bien, aunque en muchos casos la producción del antibiótico no es obligatoria para que se produzcan los fenómenos morfogenéticos, es importante hacer notar que los antibióticos son producidos en su gran mayoría por microorganismos del suelo que llevan a cabo algún tipo de diferenciación como son los actinomicetos, mixobacterias, hongos, etc., por lo que la existencia de una correlación fisiológica entre la producción del antibiótico y la diferenciación del microorganismo deben de conferir alguna ventaja adaptativa.

- Agentes involucrados en la germinación. Se ha pensado que la

producción y acumulación de antibiótico en las esporas de ciertos microorganismos, tiene como función inhibir la germinación de las mismas bajo condiciones desfavorables, como puede ser la falta de nutrientes en el medio, o bien, una densidad de población alta; manteniendo así, un estado latente y previniendo un crecimiento vegetativo desventajoso¹⁵. Por ejemplo, en *Bacillus brevis*, se ha observado que la presencia en las esporas de gramicidina S, inhibe la fase de germinación^{42,49}. *Streptomyces viridochromogenes* por su parte, produce un antibiótico, el cual es inhibidor de una ATPasa y al parecer es el responsable de mantener en estado latente las esporas^{22,28}. Por otro lado, se ha encontrado que existen metabolitos secundarios que estimulan la germinación, por ejemplo, en *Neurospora crassa* se requiere de la presencia de un sideróforo para que se pueda dar la germinación de las esporas y la formación de conidios³³.

- Como mecanismos de competencia o de defensa del organismo productor. Existe una gran controversia al considerar que muchos metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana desempeñan una función de competencia o defensa en el organismo productor. No obstante, se ha demostrado que diversos microorganismos son capaces de producir antibióticos en medios como el suelo y de exhibir antibiosis en los mismos⁸². Así por ejemplo, *Gliocladium virens* al producir gliovirina en su hábitat natural (el suelo), e inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Pythium ultimum*³⁵, le permite competir por los nutrientes del medio. En otros casos, como en *Serratia marcescens* y *Chromobacterium violaceum*, la producción de prodigiosina y violaceína respectivamente, les evita el ser ingeridas por amibas, ya que en presencia de esos compuestos el protozoario se enquistas o muere. Por el contrario, algunas cepas no productoras de estos compuestos fueron ingeridas por las amibas⁷⁵.

Diversos estudios relacionados con la diferenciación de actinomicetos han demostrado que cuando se agota algún componente del medio de cultivo, estos microorganismos empiezan a

esporular. Para que esto ocurra es necesaria la expresión de diversos genes para la formación de una serie de proteínas relacionadas con el fenómeno de la esporulación. No obstante, al encontrarse estos microbios en un medio de cultivo agotado, es imposible la biosíntesis de los aminoácidos requeridos para la formación de las proteínas de esporulación, por lo cual éstos deben ser obtenidos a partir de las proteínas ya existentes. Es decir, ocurre un fenómeno de redistribución de aminoácidos para la generación de un nuevo perfil proteico. Tal condición puede hacer menos competitivos a los actinomicetales hacia los nutrientes que aun quedan y al mismo tiempo más vulnerables a ser ellos mismos el alimento de otros microorganismos. En este sentido, puede considerarse que la síntesis de antibióticos representa una ventaja competitiva y de defensa a la vez, que generalmente opera al máximo durante la idiofase, no por un desvío propiamente del metabolismo durante esta etapa, tal y como lo sugieren algunas teorías^{46, 87}, sino probablemente porque es en esas condiciones en las que se requiere de su síntesis para fines de defensa y competitividad⁷⁷.

- Agentes simbióticos. Algunas plantas son capaces de establecer simbiosis con hongos productores de antibióticos, los cuales al parecer protegen de manera indirecta a las mismas en contra de microorganismos patógenos. Tal es el caso de algunos hongos micorrizales ectotróficos productores del antibiótico dia-tetrina, que confieren resistencia a la raíz de pino contra la infección por *Phytophthora cinnamomi*, microorganismo patógeno para la planta⁵⁰.

Los antibióticos juegan también un papel muy importante en la simbiosis entre microorganismos y nemátodos. Por ejemplo, las bacterias del género *Xenorhabdus* sp. establecen simbiosis con nemátodos que son parásitos de insectos. Las bacterias viven en el tracto del nemátodo, cuando éste infecta al insecto, las bacterias son liberadas, cumpliendo con dos funciones muy importantes, matar al insecto y producir antibióticos que impiden que el insecto sea atacado por bacterias que producen putrefacción como las

del género *Proteus* y otras y así, el nemátodo pueda nutrirse y reproducirse; sin esta simbiosis, el ciclo del nemátodo no se completa⁶¹.

Con esta variedad de posibles funciones, es lógico pensar que muchas veces un metabolito secundario puede llegar a desempeñar más de un papel en el organismo productor, o bien, un mismo metabolito lo hace de una manera en un organismo y de otra muy diferente en otro. Debido a la gran variedad de metabolitos secundarios existentes, es de esperarse que muchas otras funciones posibles todavía no hayan sido descubiertas.

TEORIAS SOBRE EL ORIGEN EVOLUTIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

La observación de que la producción de metabolitos secundarios puede ser prescindible en cultivos mantenidos en el laboratorio, es decir su síntesis puede alterarse como consecuencia de una mutación sin que se afecte de manera aparente la fisiología del microorganismo, ha generado dificultades para entender qué fuerza evolutiva ha permitido su existencia. Como ya fue mencionado, originalmente se les relacionó con un estado de desorden del metabolismo y en este sentido se les consideró como compuestos generados en condiciones anormales, productos de un ciego evolutivo con una posible función en el pasado, pero perdida en la actualidad, o bien, como subproductos de las reacciones del metabolismo primario⁵. Todas estas explicaciones suponían que, dada su dispensabilidad, estas moléculas no cumplían con función alguna en el microorganismo productor, lo cual como hemos visto, es discutible. Los conocimientos generados en torno a su biosíntesis, regulación y genética, han permitido argumentar en contra de estas primeras teorías, sugiriendo que su producción no es un artefacto de laboratorio y que efectivamente son producidos en la naturaleza.

Una teoría que trata de explicar el origen evolutivo de los metabolitos secundarios es la propuesta por Zänher⁸⁸, quien considera que el metabolismo

secundario constituye un espacio para el juego evolutivo; siendo la evolución un proceso lento movido por el balance entre el incremento en la variación generada por la mutación y su disminución por la selección natural, la existencia de un "espacio" para llevar a cabo esa variación sin las restricciones existentes para la modificación de procesos esenciales, como los del metabolismo primario, podría representar una ventaja y la posible razón de ser de este tipo de compuestos. La única limitación para ese juego evolutivo sería el no interferir con aspectos básicos para el microorganismo productor. Así, cualquier compuesto generado por la evolución gracias a esa mayor posibilidad de variación y experimentación en el metabolismo secundario, podría pasar a formar parte de aspectos básicos de la bioquímica de la célula al adquirir un valor adaptativo. Una objeción que puede encontrarse a esta teoría consiste en que la existencia de ese costoso espacio sólo puede entenderse como consecuencia de la selección natural y no para enfrentarla; Zähler³⁸ no explica qué fuerza evolutiva mantiene rutas biosintéticas de "experimentación" tan complejas, hasta encontrar un valor adaptativo a la nueva invención.

Otra explicación de la posible razón de ser de estos compuestos es la formulada por Davies¹³, quien propone que los metabolitos secundarios podrían haber existido desde el principio de la evolución bioquímica al ser sintetizadas inicialmente por condensaciones químicas en ausencia de enzimas. En apoyo a esta posibilidad está el hecho de que ciertos aminoácidos que forman parte de la estructura de antibióticos peptídicos, pero no de las proteínas, han sido detectados en algunos meteoritos¹². Algunos de estos compuestos podrían haber desempeñado un papel en las reacciones primitivas como efectores o cofactores de diversas reacciones químicas, estabilizando las conformaciones activas o catalizando reacciones implicadas en procesos como la replicación, la transcripción y la traducción. Estos metabolitos posiblemente no eran muy eficientes y fueron reemplazados posteriormente, cuando evolucionaron

polipéptidos más funcionales. No obstante, estas pequeñas moléculas retuvieron su capacidad de interactuar funcionalmente con los sitios activos de las superestructuras macromoleculares modernas en los que originalmente llevaron a cabo su papel. Un ejemplo de esto sería la evolución del sistema de traducción, en el que algunos de los actuales antibióticos podrían haber funcionado como precursores evolutivos de las modernas proteínas ribosomales. Las siguientes observaciones podrían apoyar esta hipótesis¹³:

- Las constantes de disociación antibiótico-ribosoma pueden ser muy fuertes y comparables a las de algunas enzimas a sus sustratos.

- El RNAr en su historia evolutiva ha conservado dominios vitales, dichos dominios esenciales del RNAr 16S han sido identificados y corresponden a los sitios de unión de algunos antibióticos.

- En extractos libres de células, la adición de antibióticos inhibidores de síntesis de proteínas frecuentemente la estimulan.

- Es posible obtener mutantes dependientes de antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas, o bien, estimulación del crecimiento en organismos productores de este tipo de compuestos al realizar adiciones exógenas del antibiótico⁷².

De acuerdo con esta teoría, al evolucionar los modernos sistemas bioquímicos estas moléculas sintetizadas originalmente en forma abiótica, fueron reemplazadas en su función original. La adquisición posterior de nuevas funciones biológicas permitió su continuidad al constituir la presión selectiva para el surgimiento, por un fenómeno de retroevolución, de las rutas que permitirían su biosíntesis. Así, la teoría de Davies¹³, explica un posible papel evolutivo de este tipo de metabolitos así como la razón de ser de algunas de sus actividades biológicas actuales, como relictas de sus funciones ancestrales, aunque para Stone y Williams⁷⁷, el que Davies recurra a la adquisición de una nueva ventaja adaptativa para la continuidad en la producción de estos compuestos hace que su teoría

pueda ser ignorada, pues el desarrollo evolutivo de los modernos antibióticos tuvo que comenzar de cero en el momento en que surgieron los sistemas enzimáticos que los sustituyeron en la función original planteada por Davies¹³. Por otro lado es difícil explicar por qué la síntesis de estos compuestos en muchas ocasiones es específica a una sola cepa, cuando de haber desempeñado un papel importante en la evolución prebiótica su producción debería estar más ampliamente distribuida en la naturaleza o al menos entre taxa filogenéticamente relacionados. Cabe hacer notar que existe muy poca correlación entre la producción de un antibiótico y los agrupamientos taxonómicos a pesar de que se han utilizado para estos fines características fenotípicas como los patrones de antibiosis o resistencia a antibióticos⁶³. Además, la gran diversidad de metabolitos secundarios difícilmente puede explicarse atribuyendo a cada uno de ellos un papel en la evolución temprana de la vida.

Para diversos autores^{48,77,82}, la única explicación plausible para el origen evolutivo de los metabolitos secundarios consiste en que su síntesis confiera una ventaja selectiva para el organismo productor, pues esto permitiría explicar su complejidad bioquímica y genética. Se debe considerar además que la ventaja conferida podría ser diferente en cada caso. Así, con respecto al origen de una ruta del metabolismo secundario, Vining⁸³ considera probable que los diferentes genes que la integran surjan por amplificación génica a partir de uno o pocos genes del metabolismo primario, seguida de mutaciones al azar, permitiendo así la aparición de copias alteradas de enzimas con capacidad de actuar sobre compuestos del metabolismo primario y como consecuencia, favorecer la generación de un producto anormal puesto que las rutas biosintéticas del metabolismo secundario parten de precursores del metabolismo primario, (ver figura 1). Si el nuevo producto no posee valor adaptativo el grupo de genes originado por un proceso de este tipo debería contener tanto genes funcionales como no funcionales, sin embargo en todos los casos estudiados los

agrupamientos únicamente contienen genes estructurales, genes de resistencia y factores de regulación funcionales, lo que implica una selección sobre la función y confirma su producción en la naturaleza. Nuevos fenómenos de amplificación y mutación podrían agregar nuevos pasos enzimáticos en una vía llegando gradualmente a productos con un mayor valor adaptativo. Así, observando las diferencias en la capacidad de unión al blanco o actividad fisiológica del producto final y de los intermediarios de una ruta biosintética se podrían obtener evidencias de esta hipótesis.

Un caso en el que se observa un incremento en la actividad fisiológica a lo largo de una ruta biosintética es el de la vancomicina. Este antibiótico glicopeptídico contiene uniones entre las cadenas laterales de 3 de sus aminoácidos que generan una hendidura en la molécula. Un péptido lineal sin los entrecruzamientos, que podría ser su precursor biosintético y evolutivo, se une de manera más débil al blanco de la vancomicina. La adquisición gradual de los entrecruzamientos en la molécula pudo haber incrementado su valor adaptativo⁷⁷. Sin embargo, fenómenos como los de la coevolución en los que ante el surgimiento de un compuesto con mayor capacidad de interacción con el blanco, se genera por selección natural un blanco alterado menos sensible a la acción de la nueva molécula y así sucesivamente, podrían dificultar la búsqueda de evidencias experimentales que apoyen esta hipótesis, ya que la unión de los precursores biosintéticos del compuesto se debería probar también sobre los precursores evolutivos del actual receptor, los cuales no se conocen.

Un ejemplo de una ruta del metabolismo secundario en la que existen evidencias de su origen a partir de enzimas del metabolismo primario lo constituye la biosíntesis de los denominados policétidos, un grupo muy diverso de metabolitos cuya biosíntesis presenta una gran similitud con la de los ácidos grasos y que se diferencia de ésta en la gran variedad de grupos acilo que pueden ser incorporados y en su diferente grado de reducción del grupo β -ceto en cada

incorporación. La comparación de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos indica que la policétido sintasa (PKS) y la sintasa de ácidos grasos (FAS) comparten un origen evolutivo. Sin embargo, las similitudes son mayores entre el gen de PKS y el de FAS de diferentes especies que dentro de la misma especie lo que sugiere que la o las copias extra a partir de las cuales evolucionaría el nuevo metabolito no se generaron a partir de un gen del mismo microorganismo por amplificación sino que se adquirieron probablemente por un fenómeno de transferencia genética horizontal⁶³. Entre antibióticos derivados del corismato como el cloranfenicol y la candidicina también se han encontrado evidencias del origen de los genes biosintéticos de estos compuestos en genes del metabolismo primario, y de manera similar a lo observado en el caso de la PKS probablemente se originaron por transferencia interespecies⁶³.

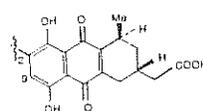
De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la hipótesis de Záhner⁶⁸ de que estas modificaciones deberían llevarse a cabo en un espacio diferente al del metabolismo primario, probablemente es correcta únicamente en cuanto a que el primer paso para la evolución de una ruta biosintética es la generación de los nuevos genes a partir de un fenómeno de amplificación o transferencia genéticas. Sin embargo, no es aceptable su idea de que el metabolismo secundario existe en espera del enfrentamiento con la selección natural y no como su consecuencia.

Los fenómenos de transferencia genética horizontal, es posible que hayan estado involucrados no solamente en la aparición de una nueva ruta del metabolismo secundario sino en la modificación de una ya existente para la generación de nuevos metabolitos. Un ejemplo lo constituyen los antibióticos β -lactámicos. El análisis y comparación de la secuencia de 5 genes de la isopenicilina N sintetasa de *Streptomyces* sp. y de varios géneros de hongos, ha llevado a la conclusión de que los genes biosintéticos de la cefalosporina probablemente surgieron en las bacterias y más tarde fueron transferidos a los hongos, donde evolucionaron de manera separada. El origen bacteriano de estos

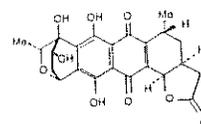
genes ha sido sugerido fundamentalmente por la carencia de intrones en los mismos. Una situación similar ha sido observada con la penicilina N expandasa de hongos, apoyando ésto la idea de una transferencia horizontal del grupo de genes que codifican para la porción principal de la ruta de biosíntesis de la cefalosporina a los hongos, donde posteriormente evolucionaron genes tales como el de la acil-CoA:IPN aciltransferasa, que permitieron la aparición de diferentes antibióticos del grupo de los β -lactámicos en 2 grupos de microorganismos con relaciones filogenéticas muy lejanas⁶⁴.

Existen ejemplos de cómo, una vez que ha surgido una ruta biosintética para la producción de un metabolito secundario, ésta se puede modificar para la generación de nuevos compuestos con un posible incremento en su valor adaptativo. Uno de ellos, caracterizado incluso a nivel molecular, lo constituyen los antibióticos actinorrodina y granaticina, formados respectivamente por *S. coelicolor* y *S. violaceoruber*. Estos dos compuestos pertenecen al grupo de los policétidos. La mitad de la molécula de la actinorrodina y la aglicona de la granaticina se derivan de unidades precursoras idénticas (una de acetyl-CoA y siete de malonil CoA) (Fig. 2).

Figura 2. Comparación de la estructura química de la actinorrodina y la granaticina.



Actinorrodina



Granaticina

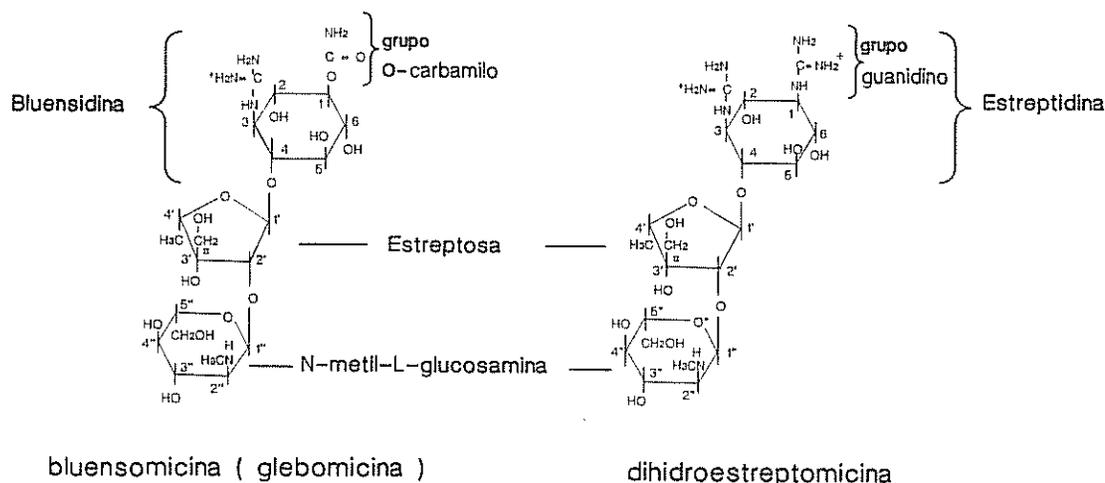
Las policétido sintasas (PKS) de estos dos microorganismos se codifican por agrupamientos de genes con 5 marcos de lectura abiertos para actinorrodina y 6 para granaticina y se piensa que están muy relacionados, ya que la organización de los genes dentro del agrupamiento es prácticamente idéntica y muestran de un 70 a un 75% de identidad en su secuencia nucleotídica⁷⁴. Incluso los genes de la PKS de actinorrodina pueden ser sustituidos por sus homólogos del sistema de granaticina como lo demuestra la complementación de mutantes del primero con los genes clonados de la PKS del segundo⁷⁴. Esto sugiere que uno de estos antibióticos se originó del otro probablemente a través de unas cuantas mutaciones.

Adicionalmente, la clonación e introducción de estos genes en estreptomicetos productores de un antibiótico diferente (la medermicina), ha permitido obtener nuevos antibióticos híbridos como las mederrodinas A y B31. De una manera similar un solo evento natural de transferencia genética horizontal podría originar un nuevo metabolito y conferir a este nuevo arreglo, alguna ventaja adaptativa y ser mantenido por la selección natural.

Walker y Walker⁸⁴ sugirieron una posible relación evolutiva entre los antibióticos bluensomicina, producida por *S. hygroscopicus glebosus* y la estreptomycinina, formada por *S. griseus*, dado el gran parecido existente entre ambos compuestos (Fig. 3).

Como puede ser observado en esta figura, la bluensomicina difiere de la dihidroestreptomycinina únicamente en la sustitución de un grupo carbamilo del primero (bluensidina) por un guanidino en el segundo (estreptidina). Estos mismos autores⁸⁴, demostraron también que extractos libres de células de un microorganismo productor de bluensomicina pueden catalizar igualmente varios pasos enzimáticos de la ruta de la estreptomycinina. En *S. griseus* la formación del grupo guanidino de la molécula de estreptidina, ocurre a través de 5 pasos enzimáticos a partir de un grupo hidroxilo del inositol. Posteriormente se forma un segundo grupo guanidino de manera similar al primero. En *S. hygroscopicus glebosus* el primer grupo guanidino se sintetiza de manera similar a la ruta de estreptomycinina, pero en lugar de dar origen a un segundo guanidino, se cataliza una carbamilación para formar bluensidina. Originalmente se pensó que el segundo

Figura 3. Estructura química de la bluensomicina y la dihidroestreptomycinina.



grupo guanidino de la estreptomina podría formarse por las mismas enzimas que el primero, sin embargo Walker y Walker⁸⁴, demostraron que su síntesis requiere de 5 enzimas adicionales diferentes a las primeras. La notable simetría de la ruta biosintética de los dos grupos guanidinos de la estreptidina, llevó a estos autores a proponer una hipótesis sobre su origen evolutivo. De este modo, el antibiótico progenitor sería la bluensomicina (cuya actividad antibiótica es menor) o un antibiótico similar, con una ruta biosintética para un solo guanidino. Más tarde, por amplificación génica y posterior divergencia, se originarían las enzimas adicionales necesarias para la síntesis del segundo guanidino, generando de esta manera un antibiótico más potente. Hay que hacer notar además, que el grupo guanidino es químicamente más estable que el O-carbamil éster. Como se comprende, la confirmación de esta hipótesis requerirá comparar las secuencias de los genes de las rutas de síntesis de bluensomicina y estreptomina respectivamente, sin embargo, es probable que las relaciones evolutivas entre estos dos antibióticos tengan una explicación cercana a la propuesta por Walker⁸⁵. Con respecto a las fuerzas evolutivas que permiten el mantenimiento de este tipo de rutas biosintéticas con más de 20 genes involucrados, el mismo autor considera que estos compuestos deben cumplir con un papel adicional a su función como antibióticos, ya que el organismo blanco sólo necesitaría generar por mutación una sola cinasa, hidrolasa o acetilasa para evitar la actividad de estos productos. Su explicación consiste en atribuir a estos dos compuestos y a los intermediarios de su biosíntesis, funciones de almacenamiento de carbono, fósforo, nitrógeno y energía como reserva. Estas moléculas podrían ser rápidamente asimiladas únicamente por el organismo productor durante periodos de escasez de nutrientes y diferenciación, como lo demuestra la capacidad de los microorganismos productores para crecer utilizando de manera preferente algunos de los intermediarios de estas rutas como fuentes primarias de carbono y energía; de esta manera la estreptomina tendría

mayor capacidad de almacenamiento de nitrógeno, con una inhibición más efectiva del crecimiento de microorganismos competidores que los intermediarios de su síntesis y que el antibiótico ancestral bluensomicina. Este mayor valor adaptativo constituiría la fuerza evolutiva que empuja la evolución de estas rutas biosintéticas. Igualmente, esto podría explicar la existencia de grupos de antibióticos relacionados tanto desde el punto de vista estructural como probablemente también evolutivo (aminoglucósidos, policétidos, etc.).

El surgimiento de mecanismos de resistencia en los microorganismos blanco no necesariamente implica la existencia de funciones adicionales para los antibióticos como propone Walker⁸⁵, sino que incluso podría constituir la fuerza evolutiva que lleva al surgimiento de tan complicadas rutas; los fenómenos de coevolución propuestos por Vining⁸³ en los que ante el surgimiento de un antibiótico el microorganismo blanco "responde" con un mecanismo de resistencia y el microorganismo productor a su vez genera una modificación en el antibiótico original, con la repetición de este proceso varias veces podría haber generado vías cada vez más complejas.

Otro aspecto concerniente a la evolución de los metabolitos secundarios es el referente a las llamadas "actividades biológicas enigmáticas" (actividades farmacológicas específicas en animales), Vining⁸³ les da explicación en términos de relaciones evolutivas, de manera que las actividades que algunos metabolitos secundarios tienen en organismos superiores serían consecuencia de sus similitudes funcionales con algunos procesos llevados a cabo en los microorganismos. Dichas similitudes existirían por su evolución a partir de procesos ancestrales comunes. Este autor considera además que la idea de Davies¹³ sobre el posible papel de los metabolitos secundarios en la evolución temprana de la vida, podría explicar el que un compuesto tenga actividades tan diferentes en organismos no relacionados por haber conservado su capacidad de interactuar con los sitios activos involucrados en estos procesos. Sin

embargo, sería de esperarse que de ser esta la razón, estas actividades se encontrarían más ampliamente distribuidas en los diversos taxa, por lo que tal vez sea más lógica su explicación a través de analogías en vez de recurrir a la homología de los procesos involucrados en el organismo productor y en los animales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado en parte por el Proyecto IN204993-UNAM, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM.

REFERENCIAS

1. ANGELL, S.; E. SCHWARTZ & M.J. BIBB. 1992. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*: its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* 6:2833-2844.
2. BANERJEE, D. K.; M.G. SCHER & C.J. WAECHTER. 1981. Amphomycin: effect of the lipopeptide antibiotic on the glycosylation and extraction of dolichylmonophosphate in calf brain membranes. *Biochemistry* 20:1561-68.
3. BARBER, J.; A.C. CHAPMAN, T.D. HOWARD & G. TEBB. 1988. Recycling of polyketides by fungi: the degradation of citrinin by *Penicillium citrinum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:387-91.
4. BARREDO, J.L.; E. ALVARES, J.M. CANTORAL, B. DIEZ & MARTÍN, J.F. 1988. Glucokinase deficient mutant of *Penicillium chrysogenum* is derepressed in glucose catabolite regulation of both betagalactosidase and penicillin biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1061-1067.
5. BENNETT, J. W. & R. BENTLEY. 1989. What's in a Name? -Microbial Secondary Metabolism. *Adv. Appl. Microbiol.* 34:1-28.
6. BEPPU, T. 1992. Secondary metabolites as chemical signals for cellular differentiation. *Gene* 115:159-165.
7. BERDY, J. 1974. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv. Appl. Microbiol.* 18:309-406.
8. BIRD, B. A. & I.M. CAMPBELL. 1982. Disposition of mycophenolic acid, brevianamide A, asperphenamate, and ergosterol in solid cultures of *Penicillium brevicompactum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:345-48.
9. BU'LOCK, J. D. 1961. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. *Adv. Appl. Microbiol.* 3:293-342.
10. CAMPBELL, I. M. 1984. Secondary Metabolism and microbial Physiology. *Adv. Microb. Physiol.* 25:1-60.
11. CASTRO, J.M.; P. LIRAS, J. CORTES & J.F. MARTÍN. 1985. Regulation of alfa-aminoacidipil-cysteinil-valine, isopenicillin N synthetase, isopenicillin N isomerase and deacetoxycephalosporin C synthetase by nitrogen sources in *Streptomyces lactamdurans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21:32-36.
12. CRONIN, J.R.; S. PIZZARELO & D.P. CRUIKSHANK. 1988. Organic matter in carbonaceous chondrites planetary satellites asteroids and comets p. 819-857. In: J.F. KERRIDGE & M.S.A. MATTHEWS (eds.), *Meteorites and the Early Solar System*. University of Arizona Press, Tucson, Arizona.
13. DAVIES, J. 1990. What are Antibiotics? Archaic Functions for Modern Activities. *Mol. Microbiol.* 4:1227-1232.
14. DEMAIN, A.L. 1976. Genetic regulation of fermentation organisms. *Stadler Symp. University of Missouri, Columbia.* 8:41-45.
15. DEMAIN, A. L. & J.M. PIRET. 1981. Why Secondary Metabolism? p. 363-366. In: D. SCHLESSINGER (ed.), *Microbiology* 1981. American Society for Microbiology, Washington, DC.
16. DEMAIN, A. L. 1983. New applications of microbial products. *Science* 219:709-14.
17. DEMAIN, A.L.; Y. AHARONOWITZ & J.F. MARTIN. 1983. Metabolic control of secondary biosynthetic pathways. p. 49-72. In: L. VINING (ed). *Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics*. Addison-Wesley Publishing Co. Reading, MA.
18. DEMAIN, A.L. 1988. Actinomycetes: What have you done for us lately?. p. 19-25. In: Y. OKAMI, T. BEPPU AND H. OGAWARA (Eds.), *Biology of Actinomycetes '88'*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

19. DEMAIN, A. L. 1989. Functions of Secondary Metabolites. I. Perspectives with Industrial Microorganisms. p. 1-11. In: C. L. HERSHBERGER, S.W. QUEENER AND G. HEGEMAN (eds.), *Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
20. DOULL, J.L. & L.C. VINING. 1990. Physiology of antibiotic production in actinomycetes and some underlying control mechanisms. *Biotech. Adv.* 8:141-158.
21. DZIEZAK, J. D. 1987. Applications of food colorants. *Food Technology*. April:78-88.
22. EATON, D. & J.C. ENSIGN. 1980. *Streptomyces viridochromogenes* spore germination initiated by calcium ions. *J. Bacteriol.* 143:377-382.
23. FIEDLER, H.P.; R. KURTH, J. LANGHARIG; J. DELZER & H. ZÄHNER. 1982. Nikkomycins: microbial inhibitors of chitin synthase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 32:271-80.
24. FRANCO, C. M. M & L.E.L. COUTINHO. 1991. Detection of Novel Secondary Metabolites. *C. Rev. Biotechnol.* 11:193-276.
25. GRÄPE, U.; G. REINHARDT; W. SCHADE; I. ERITT; W.F. FLECK & L. RADICS. 1983. Interspecific inducers of cytodifferentiation and anthracycline biosynthesis from *Streptomyces bikiniensis* and *Streptomyces cyaneofuscatus*. *Biotechnol. Lett.* 5:591-96.
26. HALL, M. J. 1989. Microbial Product Discovery in the Biotech-Age. *Biotechnology*, 7:427-30.
27. HARA, O. & T. BEPPU. 1982. Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus* - the role of A-factor. *J. Antibiot.* 35:349-58.
28. HIRSCH, C. F. & G.C. ENSIGN. 1978. Some properties of *Streptomyces viridochromogenes* spores. *J. Bacteriol.* 134:1056-1063.
29. HIRSCH, C.F. 1981. Regulation of secondary metabolism in microorganisms. p. 356-362. In: D. SCHLESSINGER (Ed.), *Microbiology 1981*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
30. HODGSON, D.A. 1982. Glucose repression of carbon source uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen. Microbiol.* 128:2417-2430.
31. HOPWOOD, D. A. & K.E. CHATER. 1989. Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. p. 129-150. In: D. A. HOPWOOD, CHATER, K. F. (eds.), *Genetics of Bacterial Diversity*, Academic Press, New York.
32. HORINOCHI, S. & T. BEPPU. 1984. Production in large quantities of actinorhodin and undecylprodigiosin induced by afsB in *Streptomyces lividans*. *Agric. Biol. Chem.* 48:2131-2133.
33. HOROWITZ, N. H.; G. CHARLANG; G. HORN & N.P. WILLIAMS. 1976. Isolation and identification of the conidial germination factor of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 127:135-40.
34. HOSTALEK, Z.; M. BLUMAVEROVA & Z. VANEK. 1979. Tetracycline antibiotics. In: *Secondary Products of Metabolism*. A.H. ROSE (Ed.). Academic Press, New York. p. 294-354.
35. HOWELL, C. R. & R.D. STIPANOVIC. 1983 Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens* and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Can. J. Microbiol.* 29:321-324
36. ITOH, J.; S. OMOTO; T. SHOMURA; N. NISHIZAWA & S. MIYADO. 1981. Amicoumacin-A, a new antibiotic with strong anti-inflammatory and antiulcer activity. *J. Antibiot.* 34:611-13.
37. KANNE, R. & H. ZÄHNER. 1976. Comparative studies on intracellular potassium and sodium concentrations of wild-type and a macrotetralide negative mutant of *Streptomyces griseus*. Metabolic products of microorganisms, *Z. Natureforsch. Teil C* 31:115-117.
38. KOBEL, H. & J.-J. SANGLIER. 1986. Ergot alkaloids. p. 569-609. In: H.-J. REHM, G. REED. WEINHEIM (eds.), *Biotechnology Vol. 4.*, Series VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
39. KOMINEK, L.A. 1979. Biosynthesis of novobiocin by *Streptomyces niveus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1:123-134.
40. KONDO, S.; K. YASUI; M. NATSUME; M. KATAYAMA & S. MARUMO. 1988. Isolation, physico-chemical properties and biological activity of pamamycin-607, an aerial mycelium-inducing substance from *Streptomyces alboniger*. *J. Antibiot.* 41:1196-1204.
41. LARA, F.; R.C. MATEOS; G. VAZQUEZ & S. SANCHEZ. 1982. Induction of penicillin biosynthesis by L-glutamate in *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105:172-175.
42. LAZARIDIS, I.; M. FRANGOU-LAZARIDIS; F.C. MACCUISH; S. NANDI & B. SEDDON. 1980. Gramicidin S content and germination and outgrowth of *Bacillus brevis* Nagano spores. *FEMS Microbiol. Lett.* 7:229-32.
43. LEA, T. J.; R.K. JOY; J. L. RAMOS & M.C. GUERRERO. 1984. The action of 2-amino-4-(methylphosphinyl)-butanoic acid (phosphinothricin) and its 2-oxo-derivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants. *Phytochemistry* 23:1-6.
44. LIN, S.; J.A. WILKINS; D.H. CRIBBS; M. GRUMET & D.C. LBN. 1981. Proteins and complexes that affect actin-filament assembly and interactions. *Cold Spring Harbor Symp. Q. Biol.* 46:625-632.
45. MAGAE, J.; J. HAYASAKI; Y. MATSUDA; M. HOTTA & T. HOSOKAWA. 1988. Antitumor and antimetastatic activity of an antibiotic, ascofuranone, and activation of phagocytes. *J. Antibiot.* 41:959-965.
46. MALIK, V. S. 1980. Microbial secondary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 5:68-72.
47. MALIK, V. 1983. Chloramphenicol. p. 293-309. In: L.C. VINING (Ed.), *Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics*, Addison-Wesley Publishing Co. Reading, MA.
48. MAPLESTONE, R. A.; M.J. STONE & D.H. WILLIAMS. 1992. The evolutionary role of secondary metabolites - a review. *Gene* 115: 51-57.
49. MARAHIEL, M. A.; W. DANDERS; M. KRAUSE & H. KLEINKAUF. 1979. Biological role of gramicidin S in spore functions. Studies on gramicidin S-negative mutants of *Bacillus brevis* ATCC 9999. *Eur. J. Biochem.* 99:49-55.

50. MARX, D. H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. II. Production, identification and biological activity of antibiotics produced by *Leucopaxillus cerealis* var. *piceina*. *Phytopathology*. 59:411-417.
51. MASUREKAR, P. & A.L. DEMAIN. (1972). Lysine control of penicillin biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* 18:1045-1048.
52. MATEOS, R.C.; R. SCHWARTZ, & S. SANCHEZ. 1983. Bioquímica de los antibióticos. *Bol. Educ. Bioquím.* 2:3-8.
53. McCANN, P. A. & B.M. POGELL. 1979. Pamamycin: a new antibiotic and stimulator of aerial mycelium formation. *J. Antibiot.* 32:673-78.
54. MIYAKE, K.; T. KUZUYAMA; S. HORINOCHI & T. BEPPU. 1992. The A-factor-binding protein of *Streptomyces griseus* negatively controls streptomycin production and sporulation. *J. Bacteriol.* 172:3003-3008.
55. MURAKAMI, T.; H. ANZAI; S. IMAI; A. SATOH; K. NAGAOKA & CH.J. THOMPSON. 1986. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 203:42-50.
56. NAKANO, H.; M. HARA; Y. YAMASHITA; K. ANDO & K. SHUTO. 1988. Paxisterol, a new analgesic sterol without anti-inflammation activity from *Penicillium*. *J. Antibiot.* 41:409-410.
57. OMURA, S.; Y. TANAKA; H. MAMADA & R. MASUMA. 1984. Ammonium ion suppresses the biosynthesis of the tylosine aglycone by interference with valine catabolism in *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.* 37:1362-1366.
58. OMURA, S. 1992. The expanded horizons for microbial metabolites. *Gene* 115:141-145.
59. OSADA, H.; T. SONODA; K. TSUNODA & K. ISONO. 1989. A new biological role of sangivamycin, inhibition of protein kinases. *J. Antibiot.* 42:102-106.
60. OTOGURO, K.; A. NAKAGAWA & S. OMURA. 1988. A 16-membered macrolide antibiotic; identification and nematocidal activity. *J. Antibiot.* 41:250-252.
61. PAUL, V. J.; S. FRAUTSCHY; W. FENICAL & K.H. NEALSON. 1981. Antibiotics in microbial ecology. Isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* sp. *J. Chem. Ecol.* 7:589-597.
62. PEACE, J. N.; C.D. BARTMAN; D.L. DOERFLER & I.M. CAMPBELL. 1981. 6-Methylsalicylic acid production in solid cultures of *Penicillium patulum* occurs only when an aerial mycelium is present. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:1407-1412
63. PHILLIPS, L. & E.H. WELLENGTON. 1992. The distribution of DNA sequences hybridizing with antibiotic production and resistance gene probes within type strains and wild isolates of *Streptomyces* species. *J. Antibiot.* 45: 1481-1491.
64. QUEENER, S. W. 1990. Molecular biology of penicillin an cephalosporin biosynthesis. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 34: 934-948.
65. REBOLLO, A.; J.A. GIL; P. LIRAS; J.A. ASTURIAS & J.F. MARTIN. 1989. Cloning and characterization of a phosphate-regulated promoter involved in phosphate control of candicidin biosynthesis. *Gene* 79:47-58.
66. ROSE, A.H. 1979. Production and industrial importance of secondary products of metabolism. p. 1-33. In: A.H. ROSE (Ed.), *Secondary Products of Metabolism*. Academic Press, New York.
67. SAER, M.H. 1991. A multiplicity of potential carbon catabolite repression mechanisms in prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *New Biologist* 3:1137-1147.
68. SAKURAI, A.; S. TAMURA; N. YANAGISHIMA & C. SHIMODA. 1977. Structure of peptidyl factor, alpha substance-IA, inducing sexual agglutinability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* 41:395-398.
69. SANCHEZ, S.; L. PANIAGUA; R.C. MATEOS; F. LARA & J. MORA. 1981. Nitrogen regulation of penicillin G biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. p. 147-154. In: C. VEZINA Y K. SINGH (Eds.), *Advances in Biotechnology*. Pergamon Press, Toronto.
70. SANCHEZ, S.; R.C. MATEOS; L. ESCALANTE; J. RUBIO; H. LOPEZ; A. FARRÉS & M.E. FLORES. 1984a. Regulation of erythromycin formation in *Streptomyces erythreus*. p. 343-355. In: L. ORTIZ, L.F. BOJALIL Y V. YAKOLEFF (Eds.), *Biological, Biochemical, and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. Academic Press, Inc. New York.
71. SANCHEZ, S.; M.E. FLORES & R.C. MATEOS. 1984b. Aspectos Bioquímicos y regulatorios de la biosíntesis de penicilina. p. 129-139. In: J. MARTUSCELLI, R. PALACIOS Y G. SOBERON (Eds.), *Caminos de la Biología Fundamental*. U.N.A.M., Mexico.
72. SATOH, A.; H. OGAWA & Y. SATOMURA. 1975. Role and regulation mechanism of kanamycin acetyltransferase in kanamycin biosynthesis. *Agric. Biol. Chem.* 39:2331-2336.
73. SENO, E.T. & K.F. CHATER. 1983. Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 129:1403-1413.
74. SHERMAN, D.; K. EUNG-SOO; M.J. BIBB & D.A. HOWWOOD. 1992. Functional replacement of genes for individual polyketide synthase components in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) by heterologous genes from a different polyketide pathway. *J. Bacteriol.* 174:6184-6190.
75. SINGH, B. N. 1945. The selection of bacterial food by soil amoebae, and the toxic effects of bacterial pigments and other products on soil protozoa. *Br. J. Exp. Pathol.* 26:316-325.
76. SMITH, D.J.; M.K.R. BURNHAM; J.H. BULL; J.E. HODGSON; J.M. WARD; P. BROWNE; J. BROWN; B. BARTON; A.J. EARL & G. TURNER. 1990. β -Lactam antibiotic biosynthetic genes have been conserved in clusters in prokaryotes and eukaryotes. *EMBO J.* 9:741-747.

77. STONE, M.J. & D.H. WILLIAMS. 1992. On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). *Molecular Microbiol.* 6:29-34.
78. SZABO, I.; A. PENYIGE; G. BARABAS; G. SZABO G. & Z. DINYA. 1989. Production of a streptomycin-Park nucleotide complex by *Streptomyces griseus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:58-62.
79. TAKIGUCHI, Y.; H. YOSHIKAWA; A. TERAHARA; A. TORIKATA & M. TERAO. 1979. Herbicidins F and G, two new nucleoside antibiotics. *J. Antibiot.* 32:862-867.
80. TANAKA, S.; K. WADA; M. KATAYAMA & S. MARUMO. 1984. Isolation of sporogen-A01, a sporogenic substance, from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* 49:3189-3191.
81. TSUKAGOSHI, S.; T. TAKEUCHI & H. UMEZAWA. 1986. Antitumor substances. p.509-530. In: H.-J. REHM, G. REED. WEINHEIM (eds.), *Biotechnology, Vol. 4. Series VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.*
82. VINING, L. C. 1990. Function of Secondary Metabolites, *Ann. Rev. Microbiol.* 44:395-427.
83. VINING, L. 1992. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity. *Gene* 115:135-140.
84. WALKER, J. B., & M.S. WALKER. 1982. Enzymatic synthesis of streptomycin as a model system for study of the regulation and evolution of antibiotic biosynthetic pathways. p. 271-281. In: K. KRUMPHANZL (ed.), *Overproduction of Microbial Products*, Academic Press, New York.
85. WALKER, J. B. 1990. Possible evolutionary relationships between streptomycin and bluensomycin biosynthetic pathways: detection of novel inositol kinase and o-carbamoyl transferase activities. *J. Bacteriol.* 172:5844-5851.
86. WOLF, J. C. & C.J. MIROCHA. 1977. Control of sexual reproduction in *Gibberella zeae* (*Fusarium roseum* "Graminearum"). *Appl. Environ. Microbiol.* 33:546-550.
87. WOODRUFF, H. B. 1966. The physiology of antibiotic production: the role of the producing organism. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 16:22-46
88. ZÄHNER, H. 1979. What Are Secondary Metabolites?. *Folia Microbiol.* 24:435-443.
89. ZHANG, J.-Y.; G. BANKO; S. WOLFE & A.L. DEMAINE. 1987. Methionine induction of ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium*. *J. Ind. Microbiol.* 2:251-254.