

1994-A

COD. 090088459

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



OBTENCION DE UNA CEPA HIPERPRODUCTORA DE
L-TRIPTOFANO A PARTIR DE E. COLI S-27 AUXOTROFA A
FENILALANINA Y RESISTENTE A 5-METIL-TRIPTOFANO
Y SULFAGUANIDINA.

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
GUADALUPE ADRIANA RAMÍREZ LEON
GUADALAJARA, JALISCO. ABRIL DE 1996

C. DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

PRESENTE

Por éste conducto me permito solicitar a Usted se corran los trámites necesarios para el registro de mi anteproyecto de tesis titulado : OBTENCIÓN DE UNA CEPA HIPERPRODUCTORA DE L-TRIPTOFANO A PARTIR DE *E. COLI* S-27 AUXOTROFA A FENILALANINA Y RESISTENTE A 5- METIL- TRIPTOFANO Y SULFAGUANIDINA.

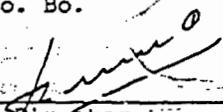
Así mismo , pongo a su consideración al M. en C. José de Jesús Ramírez Córdova como Director de tesis.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para reiterarle mi consideración más distinguida.

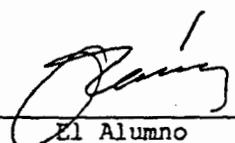
ATENTAMENTE

Guadalajara , - Jal. , a 21 de Febrero de 1995.

Vo. Bo.


El Director

M. en C. Jesús Ramírez Córdova.


El Alumno

Gpe. Adriana Ramirez León.

EXCLUSIVO COMISION DE TESIS

SINODALES

FIRMA ENTERADO Y APROBADO

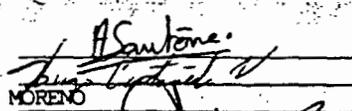
FECHA

1 DRA. ANNE SANTERRE

2 DR. HUGO CASTAÑEDA V.

3 MJC. MARGARITA BONILLA MORENO

SUPLENTE: DR. ALFONSO ISLAS


30 Mayo 1995

29 Mayo

16 Mayo 95.

C. Dr. Alfonso Islas Rodríguez.
Director de la División de CIENCIAS
Biológicas y Ambientales.
Centro Universitario de Ciencias
Biológicas y Agropecuarias.
P R E S E N T E.

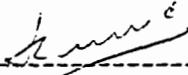
Por medio de la presente , nos permitimos
informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que
realizó la pasante Guadalupe Adriana Ramírez León, código número
90088459 con el título OBTENCION DE UNA CEPA HIPERPRODUCTORA DE L-
TRIPTOFANO A PARTIR DE *Escherichia coli* S-27 AUXOTROFA A
FENILALANINA Y RESISTENTE A 5- METIL TRIPTOFANO Y SULFAGUANIDINA.
Consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de
la misma y la realización de los exámenes profesionales
respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jalisco. Noviembre de 1995.

El Director de Tesis
M. en C. Jesús Ramírez Córdova



SINODALES

- 1- Dra. Anne Santerre
- 2- M. en C. Margarita Bonilla Moreno
- 3- Dr. Alfonso E. Islas (Suplente)

A. Santerre 26/11/95

M. Bonilla 28 NOV 95



OBTENCION DE UNA CEPA HIPERPRODUCTORA DE L-
TRIPTOFANO A PARTIR DE *Escherichia coli* S27
AUXOTROFA A FENILALANINA Y RESISTENTE A 5-
METILTRIPTOFANO Y SULFAGUANIDINA.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Jesús Ramírez Córdova:

Por el apoyo que siempre me brindó para realizar éste trabajo, ya que sin su asesoría no hubiera sido posible el mismo. Además le agradezco el compartir sus conocimientos , experiencias, y paciencia durante todo éste tiempo .

Al Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica del Estado de Jalisco:

Por el apoyo técnico y científico que nos brinda a los estudiantes de Ciencias, dándonos la posibilidad de incursionar en la Investigación así como de desarrollarnos intelectualmente, al compartir experiencias con científicos de calidad que trabajan por el desarrollo de nuestro país.

INDICE

	Pág.
Indice de Abreviaturas	i
Indice de tablas	ii
Indice de figuras	iii
I INTRODUCCION	1
II OBJETIVOS	31
III MATERIAL Y METODOS	34
III.1 Condiciones de cultivo	34
III.2 Efecto de la letalidad de la NTG	34
III.3 Obtención de mutantes auxótrofas	35
III.4 Selección de mutantes dobles auxótrofas	36
III.5 Estabilidad de las cepas auxótrofas	37
III.6 Cinética de crecimiento y producción	37
III.7 Determinación de glucosa	38
III.8 Determinación de L-Triptófano	39
III.9 Análisis estadístico	41
IV RESULTADOS	42
V DISCUSION	61
VI CONCLUSIONES	69
VII ANEXO	71
VIII BIBLIOGRAFIA	72

INDICE DE ABREVIATURAS

AS	Antranilato Sintetasa
°C	Grados centígrados
DAHP	3-Desoxi-D-Arabino-Heptulosonato-7-fosfato
DMBA	Dimetil-Amino-Benzaldehido
DNS	Acido Dinitro Salicílico
M	Molaridad
N	Normalidad
NTG	N-metil-N-Nitrosoguanidina
SG	Sulfaguanidina

INDICE DE FIGURAS

- Fig.1** Vía común de biosíntesis de aminoácidos aromáticos.
- Fig.2** Vía específica de síntesis de los aminoácidos aromáticos.
- Fig.3** Esquema del operon de triptófano y mapa genético de *E.coli* K-12.
- Fig.4** Esquema de Represión.
- Fig.5** Esquema de Atenuación.
- Fig.6** Efecto de la Fenilalanina en el crecimiento y producción de L-triptófano por la cepa S-27
- Fig.7** Efecto de la Fenilalanina y Tirosina en el crecimiento y producción de L-triptófano por la cepa Beta.
- Fig.8** Efecto de la Fenilalanina y Tirosina en el crecimiento y producción de L-triptófano por la cepa Gama.
- Fig.9** Efecto del pH en el crecimiento y producción de L-Triptófano por la cepa S27.
- Fig.10** Efecto del pH en el crecimiento y producción de L-triptófano por la cepa Beta.
- Fig.11** Efecto del pH en el crecimiento y producción de L-triptófano por la cepa Gama.

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1** Tabla de costos de aminoácidos.
- Tabla 2** Efecto de la Fenilalanina y Tirosina en el crecimiento y producción .
- Tabla 3** Efecto de la concentración de aminoácidos en el crecimiento y producción.
- Tabla 4** Efecto del pH en el crecimiento y producción de triptófano.
- Tabla 5** Efecto del pH controlado en el crecimiento y producción de triptófano.

RESUMEN

En *Escherichia coli* la síntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina se lleva a cabo a través de la Vía común del Siquimato; en donde a partir del corismato (último precursor común), se produce una ramificación metabólica que conduce a la síntesis de cada aminoácido. Esta vía está sujeta a mecanismos de regulación. La alteración o remoción de éstos mecanismos de control, se han utilizado con el fin de seleccionar cepas sobreproductoras de triptófano. Con base en lo anterior, en el presente trabajo, se obtuvo la cepa *E. coli* Beta auxótrofa a fenilalanina y a tirosina que sobreproduce triptófano. Esta mutante se obtuvo del tratamiento mutagénico con Nitrosoguanidina a partir de la cepa *E. coli* S27 auxótrofa a fenilalanina.

Se aislaron 4 mutantes dobles auxótrofas a fenilalanina y a tirosina, las cuales fueron valoradas en su crecimiento y producción mediante cinéticas de 24 h en un medio mínimo de cultivo. Se seleccionó a la cepa Beta considerando el rendimiento y producción de triptófano presentado. La cepa Beta mostró un incremento en la síntesis de triptófano del 274% y un aumento en el rendimiento de 3 veces con respecto a la parental *E. coli* S27. De lo anterior, se puede concluir que debido a la condición de doble auxotrofia de la cepa Beta, se canalizó la mayor parte de moléculas de corismato hacia la vía específica de triptófano

INTRODUCCION

Escherichia coli es un bacilo que habita en el tracto intestinal del hombre y otros animales; es un organismo protótrofo, es decir, que tiene la capacidad de producir todos los componentes necesarios para su desarrollo a partir de precursores simples.

Las células de *E. coli* son metabólicamente versátiles, pueden utilizar como fuente de carbono no solamente glucosa sino también otros azúcares, ya que poseen enzimas que convierten éstos carbohidratos en componentes que son aceptados en las vías metabólicas centrales. Así mismo, *E. coli* puede utilizar el amoníaco como fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y otros compuestos nitrogenados.

La síntesis de aminoácidos está coordinada con los requerimientos de la célula, por lo tanto, una disfunción en la producción de algún aminoácido indica un descontrol metabólico.

Los aminoácidos aromáticos fenilalanina y triptófano que son sintetizados por bacterias, plantas, hongos y algas, son aminoácidos esenciales debido a que no los sintetizan los animales y el hombre (Atkinson, 1977).

VIA COMUN DE SINTESIS DE AMINOACIDOS AROMATICOS

Los aminoácidos aromáticos tirosina , fenilalanina y triptófano se sintetizan por la vía común del Siquimato la cual consta de 7 enzimas, a través de ésta el curso del carbono es controlado. La vía inicia con la condensación de la D-eritrosa-4-fosfato y el fosfoenolpiruvato para producir un compuesto de 7 carbonos: 3-desoxi-D- arabino-heptuloso-7 fosfato (DAHP) y fosfato inorgánico, ésta reacción es catalizada por la DAHP sintetasa (Srinivasan y Sprinson, 1959).

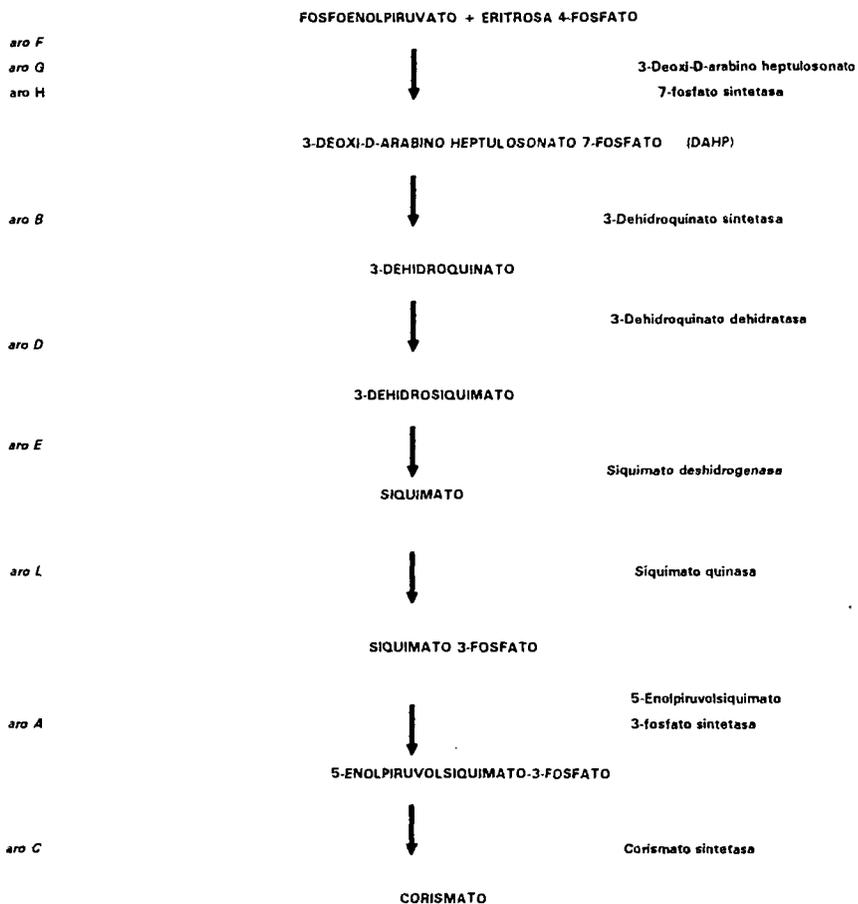
El DAHP se cicla a ácido 5- deshidroquinónico poseedor de un anillo alifático de 6 carbonos, el cual se convierte a ácido siquímico y éste da origen al ácido corísmico después de varias fosforilaciones (fig. 1). A partir del ácido corísmico se produce una importante ramificación metabólica : a) una de las ramas lleva a la síntesis del ácido antranílico y posteriormente a triptófano, b) la otra rama conduce a la formación del ácido prefénico el cual se aromatiza ya sea formando el ácido fenilpirúvico precursor de la fenilalanina o bien sintetizando el ácido p-hidroxifenilpirúvico, precursor de la tirosina (Deeley y Yanofsky, 1981) (fig. 2).

En *E. coli* existen 3 isoenzimas de la DAHP sintetasa :
DAHP (tir), DAHP (fen) y DAHP (trp) siendo todas
retroinhibidas en sus actividades por tirosina, fenilalanina
y triptófano respectivamente (Doy y Brown, 1965).

Fig. 1 VIA COMUN DEL SIQUIMATO DE SINTESIS DE AMINOACIDOS AROMATICOS.

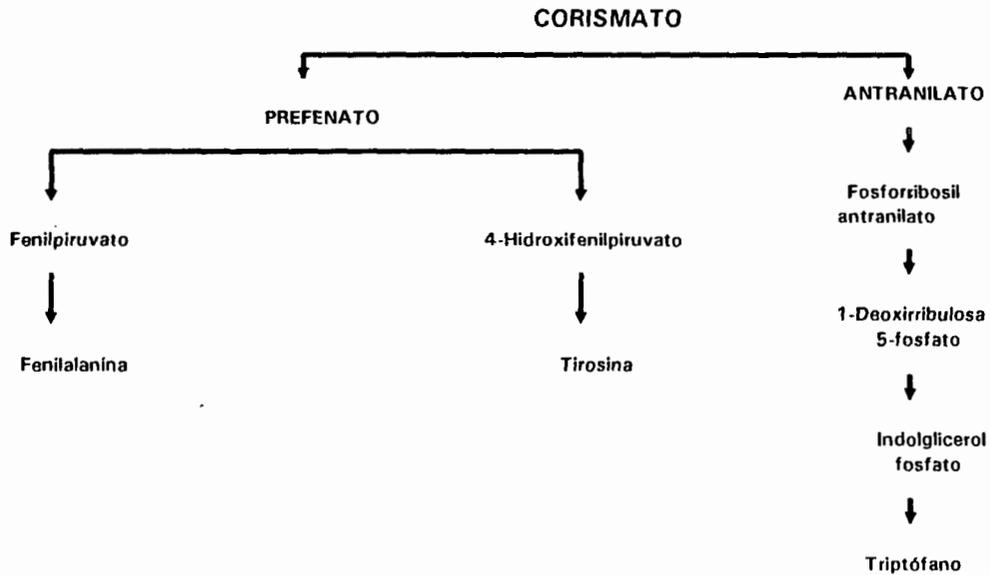
Gene(s) que codifica(n) para las enzimas indicadas

RUTA BIOSINTETICA Y ENZIMAS QUE INTERVIENEN



(Gibson y Pittard, 1968)

Fig. 2 VIA ESPECIFICA DE SINTESIS DE AMINOACIDOS AROMATICOS



La DAHP sintetasa (fen) es inhibida "in vitro" en un 50% por L-fen (McCandliss y col., 1978), la DAHP sintetasa (tir) es inhibida en un 50% por 20 μ M de tirosina (Dusha y Deenes, 1976). La tirosina es un inhibidor competitivo con respecto a fosfoenolpiruvato (Schoner y Herrman, 1976); mientras que la isoenzima DAHP sintetasa (trp) es sólo parcialmente inhibida por triptófano (Pittard y col., 1969). La inhabilidad de triptófano de inhibir totalmente la DAHP sintetasa (trp) asegura un suministro suficiente de corismato para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos.

En células silvestres de *E. coli* el 80% de la actividad de la DAHP sintetasa es llevada a cabo por la isoenzima sensible a fenilalanina (Jensen y Nasser, 1968) y 20% es dada por la enzima sensible a tirosina, habiendo sólo indicios de la DAHP sintetasa de triptófano, ya que ésta es sintetizada en cantidades mucho menores que las otras isoenzimas (Pittard, 1969). Los genes estructurales para éstas enzimas son *aro G*, *aro F* (Brown, 1968) y *aro H* respectivamente (Pittard, 1969). La expresión de *aro F* y *aro G* están controladas por represión con la participación del represor de tirosina (*tyr R*) uniéndose como correpresor tirosina en ambos casos (Brown y Somerville, 1971). La expresión de *aro H* es controlada por represión involucrando el producto del gen *trp R* (Ogino y col., 1982).

BIOSINTESIS DE TRIPTOFANO

El triptófano es el segundo menos abundante de los aminoácidos constituyendo el 1 % de la masa de la proteína. (Nichols y col., 1981). La biosíntesis de triptófano a partir de corismato procede igual en la mayoría de los organismos que lo producen según el esquema de la figura 2. Pero entre los diferentes géneros , es notable la diversidad de los mecanismos biosintéticos empleados por las enzimas de la vía triptófano, así como sus mecanismos regulatorios. En una especie, un paso en particular puede ser catalizado por una proteína producto de un sólo gen, mientras que en otra especie distinta, la misma reacción puede ser catalizada por una proteína multimérica codificada por 2 genes (Crawford, 1975, 1980). Por ejemplo, las variaciones en los mecanismos regulatorios de las enzimas biosintéticas de triptófano en *E.coli* (Ito y Yanofsky, 1966) y *Salmonella typhimurium* (Ito y Yanofsky, 1969), donde el complejo formado por la antranilato sintetasa y antranilato fosforribosiltransferasa es inhibido por triptófano; en contraste, en *Brevibacterium flavum*, la antranilato fosforribosiltransferasa es inhibida por triptófano sin formar el complejo con la antranilato sintetasa (Sugimoto y Shio, 1983).

El operon de triptófano posee 5 genes estructurales, los cuales codifican las enzimas biosintéticas de triptófano a partir de corismato. Estos genes son transcritos como un ARNm policistrónico, el cual es traducido en las enzimas responsables de la síntesis de triptófano (fig. 3) (Sen y Liu, 1990).

ENZIMAS DE LA VIA DE TRIPTOFANO

ANTRANILATO SINTETASA: Llamada también componente I, cataliza la reacción de corismato y amoníaco a antranilato y piruvato. Fisiológicamente, el amoníaco es generado *in situ* por corte del anillo amido de la glutamina, con la intervención de la enzima intermediaria Glutamina-amidotransferasa (glutaminasa), ésta dirige el amoníaco dentro de la síntesis de triptófano y es codificada por el gene *trp G*, mientras que la antranilato sintetasa es codificada por *trp E*.

En *E. coli* y en *S. typhimurium* la glutaminasa es parte de una proteína bifuncional. Los dos dominios de ésta proteína además catalizan la conversión de antranilato a fosforribosil antranilato, mientras que en *Neurospora crassa*, la actividad glutaminasa es parte de una proteína que convierte fosforribosil antranilato a indolglicerol fosfato.

En *E. coli* y *S. typhimurium* la actividad de la glutaminasa y de la fosforribosil transferasa pueden ser inhibidas por triptófano. La antranilato sintetasa es la enzima más sensible a retroinhibición en la vía, debido a que posee un sitio específico de unión al triptófano, el efector fisiológico.

Estos organismos regulan efectivamente la cantidad de corismato que es canalizado hacia la vía biosintética de triptófano. La inhibición de antranilato sintetasa por triptófano es competitiva con respecto a corismato tanto en células silvestres

como en mutantes sin sentido (mutantes que forman proteínas no funcionales debido a la aparición prematura de uno de los tres codones de terminación en el ARNm) (Pabst y col., 1973), donde los sitios de unión al ligando han sido alterados; sin embargo, éste hecho no significa que el corismato y el triptófano son ocupantes alternativos del mismo sitio.

ANTRANILATO FOSFORRIBOSIL TRANSFERASA: Esta enzima es el componente II de la antranilato sintetasa, llamada así porque con ella forma un complejo tetramérico $I_2 II_2$. La fosforribosil transferasa es codificada por el gene *trp D*, la cual carece de la capacidad intrínseca de unir al triptófano por sí mismo. En *E. coli* la fosforribosil transferasa es bifuncional teniendo dos dominios: uno con actividad amido transferasa y el otro cataliza la condensación de antranilato con ribosa 5- fosfato formando un complejo con fosforribosil pirofosfato (Nichols y col., 1980).

La síntesis equimolar de antranilato sintetasa en su componente I y II está gobernada por acoplamiento traduccional (Openheim y Yanofsky, 1980), en éste mecanismo la traducción

del ARNm del gen *trp D* requiere la eficiente traducción del final del ARNm de *trp E*. Esta idea está relacionada con el hecho de que la región intercistrónica *trp E-trp D* se superpone empezando y deteniendo codones.

Los centros catalíticos de la antranilato sintetasa son retroinhibidos por triptófano sólo cuando forman el agregado tetramérico. Esto se atribuye a los cambios conformacionales de todas las subunidades del agregado siguiendo la unión de triptófano al componente I, proteína codificada por el gene *trp E*. El producto del gen *trp D* no tiene capacidad intrínseca de unión al triptófano (Pabst y col., 1973).

FOSFORRIBOSIL ANTRANILATO ISOMERASA-INDOL GLICEROL FOSFATO SINTETASA : En *E. coli* el gen *trp C* codifica para un polipéptido bifuncional cuyos 2 dominios (un dominio indolglícerol fosfato y el otro isomerasa) catalizan 2 reacciones secuenciales:

a) Rearreglo de Amadori- de fosforribosil antranilato a 1-(0-carboxi-fenilamino) 1- desoxiribulosa- 5- fosfato.

b) La descarboxilación y cierre del anillo de éste intermediario a indol glícerol fosfato, el precursor inmediato de triptófano.

Los dos centros activos son distintos y no se traslapan. (Creighton, 1970). En otros organismos esta enzima es monofuncional y es codificada por el gen *trp F*. (Kirschner y col., 1980).

TRIPTOFANO SINTETASA : Esta proteína es codificada por los genes *trp A* y *trp B*. En procariontes ésta enzima es un tetrámero con 2 subunidades α y 2 subunidades β de cadenas idénticas. El tetrámero $\alpha_2\beta_2$ cataliza la conversión de indolglicerol-fosfato y serina a triptófano y gliceraldehido-3-fosfato, cada subunidad cataliza una reacción parcial:

Subunidad α : cataliza la conversión reversible de indol glicerol fosfato a indol y gliceraldehido 3-fosfato.

Subunidad β : lleva a cabo la condensación de indol y serina a triptófano (Miles, 1979).

La triptófano sintetasa de eucariontes primitivos como *Saccharomyces cerevisiae* cataliza las mismas reacciones parciales pero los centros catalíticos están organizados de diferente manera (Zalkin y Yanofsky, 1982).

ESQUEMA DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS ENZIMAS
BIOSINTETICAS DE TRIPTOFANO

GENE	ENZIMA
<i>trp E + trp G</i>	Antranilato Sintetasa
<i>trp D</i>	Fosforribosil Antranilato Transferasa.
<i>trp F</i>	Fosforribosil Antranilato Isomerasa.
<i>trp C</i>	Indolglicerol- fosfato Sintetasa
<i>trp A + trp B</i>	Triptófano Sintetasa.

REGULACION DE LA SINTESIS DE TRIPTOFANO

La biosíntesis de triptófano está regulada por 2 mecanismos de control:

1) REGULACION DE LA EXPRESION GENICA:

- a) Por represión
- b) Por atenuación.

2) REGULACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA:

Por inhibición por producto final (triptófano) principalmente de la antranilato sintetasa (Somerville, 1965).

a) Represión

El operon de triptófano abarca un segmento de 7000 nucleótidos (fig. 3a). Consta de 5 genes estructurales: *trp E-trp G/D-trp C/F - trp B- trp A* (Yanofsky y col., 1981a) , los cuales codifican las enzimas que sintetizan al triptófano a partir de corismato, último precursor común como se acaba de describir. Una proteína represora, producto del gen *trp R* (se encuentra fuera del operon *trp*) (fig. 3b), regula la iniciación de la transcripción. La iniciación de la transcripción en el promotor de *trp* está regulada por la interacción del Represor-Operador; si el operador (un segmento de ADN de 22 pb del promotor) es ocluido por el represor de

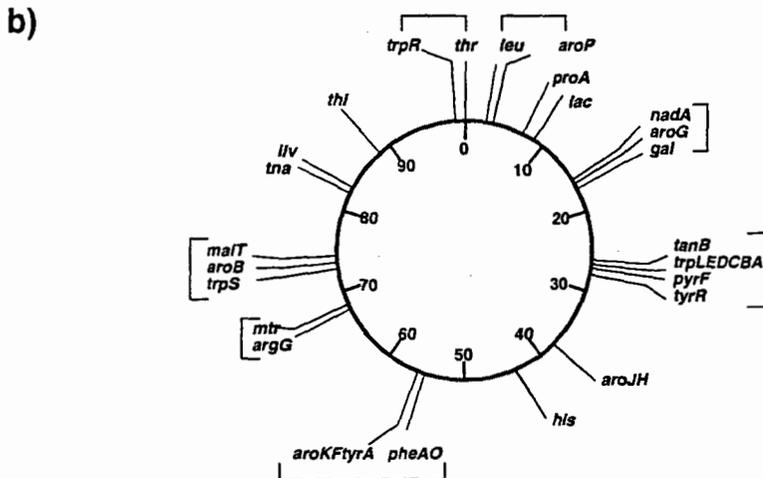
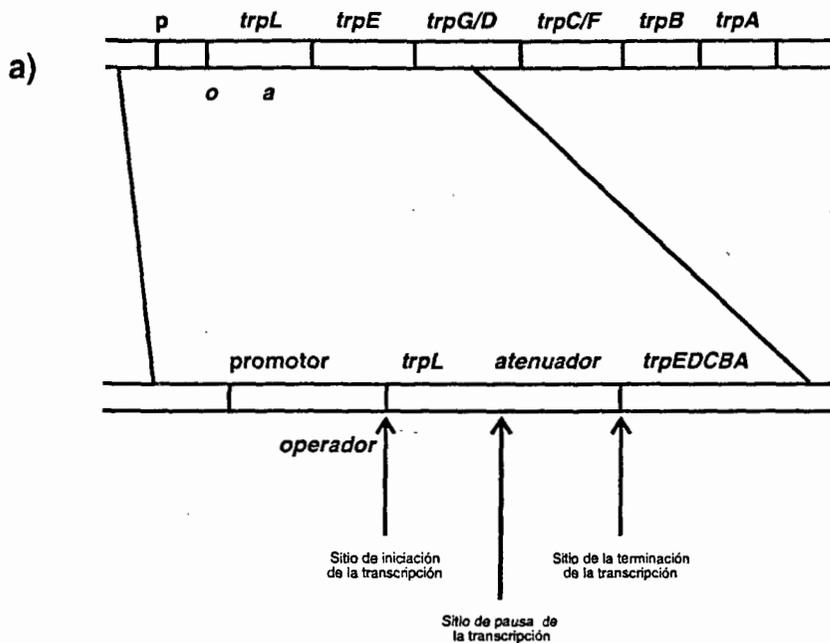


Fig. 3

a) Esquema del operón de *trp* de *E. Coli.*, que muestra los genes reguladores y estructurales. La iniciación de la transcripción es controlada en la región promotor-operador. La terminación de la transcripción es regulada en el atenuador (a), llamada región líder, *trpL*.

b) Mapa genético de *E. Coli K-12* que muestra loci relevantes en éste trabajo.

triptófano (trp R), la ARN polimerasa no puede formar un complejo productivo con el promotor y la transcripción no se efectúa (Zalkin y col., 1974). La unión del represor al operador es controlado por triptófano; cuando hay niveles suficientes de éste efector, la interacción represor-operador se favorece, cuando el triptófano está ausente, la unión represor-operador no ocurre (fig. 4).

b) Atenuación

Además del mecanismo de control por represión, algunos operones microbianos poseen un segundo mecanismo llamado atenuación, el cual influye fuertemente en la expresión de los genes. El operon de triptófano de *E. coli* contiene una región reguladora de la transcripción, el atenuador (Yanofsky, 1971; Platt, 1978), el cual está situado dentro de la región líder (162 nucleótidos) entre el sitio de iniciación de la transcripción y el primer gen estructural *trp E*. (Yanofsky, 1981a).

CARACTERISTICAS DE LA REGION ATENUADORA

1) Contiene una secuencia para la unión al ribosoma (AUG) y un sitio de iniciación para la síntesis de una cadena polipeptídica, el péptido líder (pequeño péptido que contiene un segmento que corresponde a la estructura de terminación, la cual es reconocida por la ARN polimerasa como señal ocurriéndolo así la atenuación).

2) Enseguida posee codones para 14 aminoácidos, entre los cuales se encuentra una batería de 2 codones para triptófano.

3) Después de la serie de codones, se encuentran las señales de terminación de la transcripción .

4) Finalmente, antes del inicio del primer gene estructural (*trp E*), se encuentra una zona con simetría dual, seguida por una secuencia rica en G-C.

Si los niveles de triptófano y el $ARNt^{trp}$ son suficientes, los ribosomas son capaces de sintetizar el péptido líder formándose una horquilla terminadora en el ARNm, por tanto, la ARN polimerasa la reconoce y termina la transcripción en el atenuador (Yanofsky, 1981b). Sin embargo, si bajan los niveles de triptófano y de $ARNt^{trp}$, los ribosomas se detienen en la región de codones en batería de *trp*, ésto evita la formación de la horquilla de terminación del ARN líder ejerciendo un efecto regulatorio; por ello, la ARN polimerasa prosigue con la transcripción hacia el primer gen estructural del operon. (fig. 5)

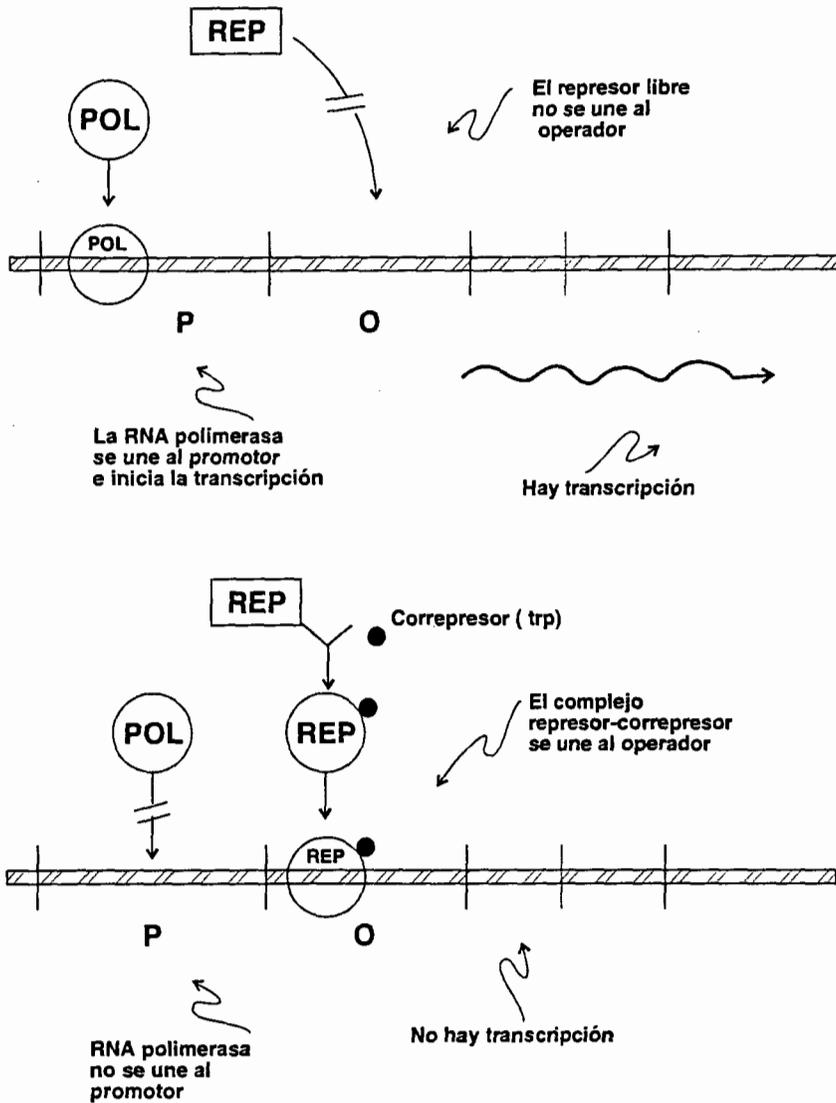


Fig. 4 Esquema que muestra el mecanismo de Represión y sus efectos.
 POL: ARN polimerasa, REP: represor, P: promotor, O: operador

REPORTE DE ANOMALIAS

CUCBA

A LA TESIS:

LCUCBA00471

Autor:

Ramirez Leon Guadalupe Adriana

Tipo de Anomalia:

Errores de Origen: Folios Faltantes: No. 19

Retroinhibición (Inhibición por producto final)

Este mecanismo regulatorio afecta las actividades catalíticas de las enzimas alostéricas de la vía biosintética . La primera enzima de la vía (antranilato sintetasa) es inhibida por triptófano, el producto final. Cuando la célula tiene suficiente triptófano, éste se une al sitio regulatorio de la enzima, alterando la conformación activa de la misma y deteniendo la síntesis de posteriores moléculas de antranilato.

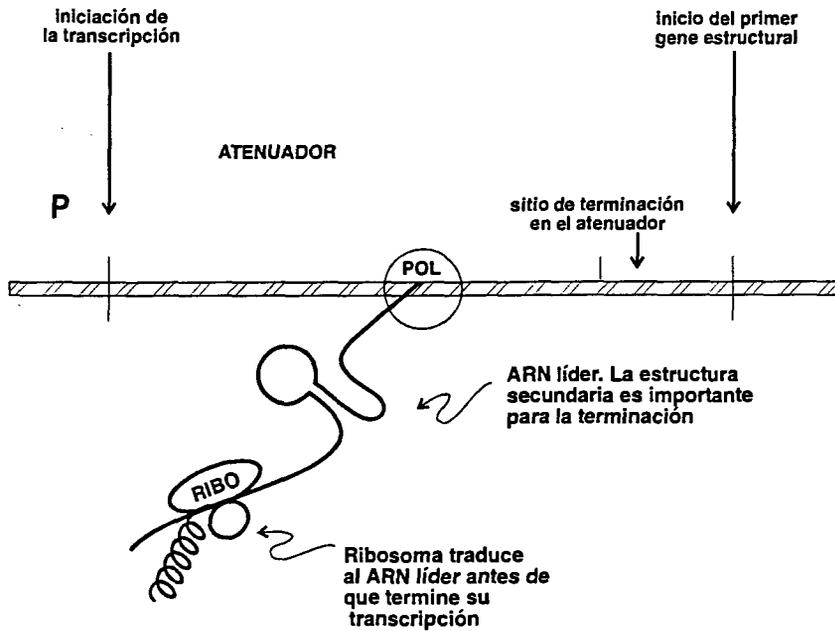


Fig. 5 Representación del mecanismo de la región del atenuador. Antes de que termine la transcripción de la región, el ARN líder formado se empieza a traducir. La zona de codones y en especial, la presencia de codones en batería de triptófano tiene un papel importante en la conformación secundaria del ARN líder, y ésta, a su vez, regula la terminación de la transcripción al final del atenuador o permite que la ARN polimerasa prosiga con el primer gene estructural.

SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOACIDOS DE *Escherichia coli*.

La bacteria además de sintetizar aminoácidos puede tomarlos del medio de manera activa (Kepes y Cohen, 1962). Los sistemas de transporte de aminoácidos están localizados en la membrana citoplasmática y tienen funciones tanto quimiotácticas como de barreras funcionales para mantener un depósito interno de aminoácidos (Anraku, 1975a,b).

Las actividades de los sistemas de transporte son estimuladas estereoespecíficamente por proteínas fijadoras periplasmáticas que actúan como efectores (Anraku, 1968). Existen 20 sistemas de transporte en *E.coli* K-12. El transporte común de fenilalanina, triptófano y tirosina es inhibido por altas concentraciones de histidina, leucina y metionina; dicha actividad está controlada por el gen *aro P* (Brown, 1970, 1971). Los sistemas de transporte en *E. coli* son dependientes de energía y selectivos hacia las vías específicas de aminoácidos. En mutantes de *E. coli* T₃A deficientes de triptofanasa, el sistema de transporte específico de triptófano es estimulado por Mg²⁺ e inhibido por glucosa y piruvato. Boezi y DeMoss (1961) sostienen que la glucosa o el piruvato, al ser utilizados como fuentes de energía; sirven como precursores de un compuesto, el cual inhibe la actividad del sistema responsable de la acumulación de triptófano.

Tres permeasas transportan triptófano del medio al citoplasma: el primero un sistema de transporte general de aminoácidos aromáticos con alta capacidad de transporte y con una amplia especificidad (Brown, 1970; Kuhn y Somerville, 1974). La segunda, un sistema específico para triptófano y ciertos análogos de triptófano y la tercera es una permeasa catabólica (Boezi y DeMoss, 1961).

USOS DE LOS AMINOACIDOS

Los aminoácidos se han utilizado como suplementos alimenticios, tal es el caso del glutamato usado como sasonador y la lisina y D-L-metionina como aditivos en la comida animal.

Un típico ejemplo de uso terapéutico, son los sueros intravenosos de aminoácidos que suministran los nutrientes antes y después de tratamientos quirúrgicos, así como el uso de ornitina y arginina para enfermedades hepáticas.

ANALOGOS DE AMINOACIDOS

Una amplia gama de análogos sintéticos o aislados de la naturaleza se han utilizado con el fin de seleccionar mutantes regulatorias o crear cepas sobreproductoras de aminoácidos.

Los análogos pueden actuar como:

- a) Falsos correpresores impidiendo la transcripción de las enzimas biosintéticas
- b) Falsos inhibidores por producto final de enzimas regulatorias,
- c) El análogo puede incorporarse dentro de la proteína alterando su conformación biológica.

Los análogos de metabolitos generalmente son tóxicos para la célula, son usualmente empleados en organismos silvestres, con el fin de dilucidar los pasos enzimáticos dentro de una vía de síntesis . En muchos casos los blancos

del análogo dentro de la maquinaria metabólica de las células son desconocidas; frecuentemente, algunos procesos llegan a ser inhibidos inmediatamente.

5-METIL TRIPTOFANO (5-MT). Este análogo es degradado por la triptofanasa , enzima que degrada el triptófano a indol, amonio y piruvato (Snell, 1975). El 5-MT funciona como un falso correpresor del operon de triptófano, y como un falso retroinhibidor de la antranilato sintetasa (Moyed, 1960). La hipersensibilidad a 5-MT es una combinación de falsa retroinhibición y falsa represión, disminuyendo la capacidad catalítica para una o varias enzimas biosintéticas de triptófano. Las alteraciones en el gen *trp E*, que reducen la susceptibilidad de la antranilato sintetasa a retroinhibición por triptófano, se han distinguido por aumentar su resistencia a 5-MT (Somerville y Yanofsky, 1965). En mutantes *trp R* , los niveles de las enzimas de triptófano son de 10 a 20 veces más altos que en las células silvestres, aún cuando las células fueron cultivadas en medio con exceso de triptófano; y son distinguidas con facilidad porque ellas excretan triptófano. Los niveles intracelulares elevados de enzimas de triptófano, particularmente antranilato sintetasa, facilitan a las células a seguir canalizando corismato hacia la síntesis de triptófano. Mutantes *trp R* resistentes a 5-MT han sido aisladas en *E. coli* (Ito y Crawford, 1965) y en *S. typhimurium* (Bauerle y Margolin, 1966). La incorporación del 5-MT dentro

de la proteína parece ser específica en las especies. Ha sido reportada la incorporación en *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. (Barlatti y Ciferri, 1970)

SULFAGUANIDINA (SG). Las sulfonamidas son análogos que inhiben a la dihidropteroato sintetasa competitivamente con respecto a p- aminobenzoato, el cual es sintetizado a partir de corismato.

Se han seleccionado mutantes sobreproductoras de triptófano de los géneros *Corynebacterium* y *Brevibacterium* por su resistencia a sulfaguanidina. Esto fue causado por la eliminación parcial del control de la retroinhibición de la antranilato sintetasa en la vía específica de triptófano. (Shiio y col., 1984).

METODOS DE PRODUCCION DE TRIPTOFANO

Hay 4 métodos básicos en la producción de aminoácidos: Extracción, la Fermentación directa, Conversión enzimática y Síntesis Química.

La fermentación microbiana ofrece la ventaja de producir L-isómeros de aminoácidos biológicamente útiles; se han utilizado cepas como *Escherichia coli* (Shiio y col., 1973), *Brevibacterium flavum* (Shiio y col., 1982) y *Corynebacterium glutamicum* (Hagino y Nakayama, 1975) para la producción de triptófano. Los procesos de fermentación son subclasificados en a) Fermentación directa: métodos que utilizan glucosa u otro azúcar como única fuente de carbono empleando células de tipo silvestre o mutantes.

b) Adición de precursores: Proceso microbiológico que involucra además de la fermentación del azúcar, la conversión de precursores a aminoácidos.

La hiperproducción de aminoácidos por mutantes auxótrofos, usualmente involucra la pérdida parcial o total de la retroinhibición y/o represión de las enzimas regulatorias, por la falta de los aminoácidos que actúan como efectores. El primer uso de mutantes regulatorias fue en la producción de treonina por *E. coli* y *Brevibacterium flavum* siendo éstas resistentes a un análogo de treonina (α -amino- β -

hidroxivalerato) (Shiio y Nakamori, 1970). En cuanto a la producción de triptófano, se han utilizado análogos como 5 Metil-triptófano y Sulfaguanidina para aislar cepas sobreproductoras, seleccionadas por su elevada resistencia a estos análogos, tal es el caso de la mutante regulatoria *E. coli* S27 auxótrofa a fenilalanina y resistente a 5-MT y SG, la cual produce 0.5 g/l de triptófano. (Ramírez, 1994)

Los métodos de extracción requieren la purificación de aminoácidos de las proteínas hidrolizadas, mientras que en las síntesis químicas se forman usualmente mezclas racémicas o diastereoisómeras de los aminoácidos. Algunos aminoácidos que no tienen enantiómeros, como la glicina, o que pueden ser convertidos de formas D- a L- por los animales, por ejemplo, metionina o alanina; o que son difíciles de obtener por fermentación como fenilalanina y triptófano son producidos por síntesis química. (Komachiya, 1961)

Los métodos enzimáticos consisten en la utilización de un enzima purificada normalmente inmovilizada a un soporte, la cual sintetiza un producto particular a partir de un sustrato definido. Se han utilizado enzimas cristalizadas que catalizan la síntesis de un aminoácido, aparentemente por una reacción reversa de eliminación de la enzima catabólica. Tal es el caso de la triptofanasa cristalina de *E. coli* y *Proteus rettgeri* (Yamada y col., 1972b) que catalizan la síntesis de

L-triptófano por una reacción reversa de α,β - eliminación.
(Nakazawa y Enei, 1972).

Se han aislado del excremento cepas bacterianas que poseen enzimas intracelulares, las cuales hidrolizan asimétricamente a D-L-5 indolmetilhidantoina a formas levógiras de triptófano.

La mejor de éstas cepas convirtió 10 mg/ml de 5-indolmetilhidantoina a 7.4 mg/ml de L-trp en una producción molar del 82% (Sano, y col., 1977).

JUSTIFICACION

A pesar de los notables incrementos en la producción de triptófano, los costos del triptófano al igual que de otros aminoácidos siguen siendo elevados (tabla 1), y su producción a gran escala, está restringida a unos cuantos países desarrollados, por lo que el resto de ellos tienen que importar los productos a fin de satisfacer sus necesidades. En nuestro país actualmente existe dependencia hacia el extranjero en el suministro de triptófano, por lo que la implementación de un proceso de producción propio es una necesidad prioritaria. En base a lo anterior, en éste trabajo se plantean como objetivo general y particulares los siguientes:

TABLA 1. NIVELES DE PRODUCCION Y PRECIOS DE
VARIOS AMINOACIDOS OBTENIDOS COMERCIALMENTE

AMINOACIDO	PRODUCCION ANUAL mundial en toneladas	VIA*	PRECIO USD/Kg	VENTAS miles USD
LISINA	73,000	M	\$ 3.0	\$ 220,000
METIONINA	75,000	Q	\$ 4.5	\$ 330,000
FENILALANINA**	300	M,E	\$ 81.0	\$ 25,200
TRIPTOFANO	200	M,Q,E	\$ 69.0	\$ 13,800

*M: *microbiana*, Q: *química*, E: *enzimática*.

** *Racemato*

FUENTE: CHEMICAL MARKETING REPORTER (1994)

II OBJETIVO GENERAL

OBTENER UNA CEPA SOBREPDUCTORA DE TRIPTOFANO A PARTIR DE
Escherichia coli S-27 AUXOTROFA A FENILALANINA Y RESISTENTE
A 5 METIL-TRIPTOFANO Y SULFAGUANIDINA.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Obtener una cepa auxótrofa a tirosina y fenilalanina partir de una cepa auxótrofa a fenilalanina de *E. coli* S-27.
- 2) Determinar el efecto de fenilalanina y tirosina sobre el crecimiento y producción de triptófano.
- 3) Analizar el efecto del pH sobre el crecimiento y producción de triptófano.

HIPOTESIS

En virtud de la doble auxotrofia a Fenilalanina y a Tirosina de la cepa obtenida a partir de *E. coli S-27*, se espera que el corismato, precursor común para la biosíntesis de los tres aminoácidos aromáticos, se canalice exclusivamente hacia la única vía funcional de aminoácidos aromáticos; la vía de síntesis de triptófano, lo que repercutirá en un aumento en la producción de éste aminoácido.

III MATERIAL Y METODOS

MICROORGANISMO. Se utilizó la cepa *E.coli* S-27 auxótrofa a fenilalanina obtenida en el Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica del Estado de Jalisco (CIATEJ A.C.) cuyo fenotipo es **Fen-5MTrSGr** (Ramírez, 1994).

CONDICIONES DE CULTIVO. Se creció la cepa *E. coli* S-27 en medio Robinson que contiene por litro 4 g de fosfato de potasio monobásico, 2.5 g de sulfato de amonio a pH 7.4; 0.1 g de sulfato de magnesio y glucosa a una concentración del 1 % (ésta se esterilizó por separado a 1.5 Kg/cm₂ durante 15 min) además de los suplementos necesarios de aminoácidos fenilalanina y tirosina (SIGMA Chemical Co.) a una concentración de 10 µg/ml. A menos que otra cosa se indique, la temperatura de incubación fue de 37° C y la agitación de 200 rpm.

VALORACION DEL EFECTO DE LA LETALIDAD DE LA N-metil-N-Nitrosoguanidina (NTG). Para determinar el tiempo óptimo de incubación con el mutágeno necesario para obtener una mortalidad cercana al 90%, se realizó un ensayo en el que se crecieron 4 ml de una suspensión celular de la cepa S-27 en medio mínimo, hasta alcanzar una densidad de 10⁸ células/ml. A éste cultivo se le adicionó 1 ml de una solución de NTG

(2mg/ml) y se incubó durante 8,10,12 y 15 min a 37° C. Posteriormente, se lavaron las células con medio Robinson y se realizó una dilución 1:10,000, de ésta suspensión se tomaron 100 μ l y se sembraron en cajas con medio mínimo. Una vez que las colonias crecieron, se cuantificaron y los datos obtenidos se utilizaron para establecer el tiempo de tratamiento que conduce alrededor de un 10% de viabilidad, el cual fue de 15 min, éste tiempo se empleó para la obtención de mutantes auxótrofos a tirosina.

Se han aislado mutantes auxótrofos a distintos aminoácidos utilizando nitrosoguanidina como agente mutagénico en organismos como *Rhizobium japonicum* (Zlotnikov, 1983), *Escherichia coli* (Allderberg, 1965), *Corynebacterium glutamicum* (Hagino y Nakayama, 1975), *Brevibacterium flavum* (Shio y col., 1973) y en *Hansenula polymorpha* (Sánchez, Cea y Flores, 1978).

OBTENCION DE MUTANTES AUXOTROFICAS. El pH óptimo para la mutagénesis con N-metil-N-nitrosoguanidina en *E. coli* es considerado que es de 5.5 a 6.0 (Allderberg y col., 1965), ya que las condiciones alcalinas hacen ineficiente la mutación.

Se inculó una asada de *E. coli* S-27 en 10 ml del medio Robinson durante 12 h., de dicha suspensión se tomó 1 ml y se agregó a otro tubo con 4 ml de medio dejándose crecer 3 h, tiempo al cual se agregaron 500 μ l del mutágeno NTG y se incubó 15 min. Las células se lavaron 2 veces con medio

mínimo; se agregó 1 ml de medio y se homogeneizó. Estas células se incubaron 3 h en medio sin fenilalanina. Enseguida, para el aislamiento de mutantes auxótrofos, se usó el proceso de enriquecimiento de la población de auxótrofos con penicilina (Davis, 1948), adicionando 500 μ l de una solución del antibiótico en una concentración de 100,000 UI/ml, se incubó de 1.5 a 2 h para provocar lisis celular, ya que la penicilina inhibe la última etapa de síntesis de la pared celular, impidiendo la formación de enlaces entre las cadenas de peptidoglucanos (Strominger, 1973). Las células no lisadas se colectaron por centrifugación lavando 2 veces, 4 ml de éste medio se agregaron a un medio adicionado con fen-tir incubándose durante 14 h.

SELECCION DE MUTANTES DOBLES AUXOTROFAS. Las células provenientes del tratamiento mutagénico se espatularon en cajas con medio Robinson enriquecidas con fenilalanina y tirosina, después de realizar las diluciones adecuadas se sembraron aproximadamente por caja de 200 a 400 colonias. Las colonias crecidas se aislaron y se sembraron en cajas con medio Robinson adicionados con cada uno de los siguientes suplementos: a) fen, b) tir, c) tir-fen y d) sin aminoácidos. Una vez que se identificaron a las posibles auxótrofas a fenilalanina y tirosina se repitió el mismo proceso hasta tener la seguridad de que efectivamente eran dobles auxótrofos.

Para valorar el rendimiento de las cepas se realizaron cinéticas de crecimiento y producción .

ESTABILIDAD DE LAS CEPAS AUXOTROFAS. Una vez comprobada la auxotrofia de las mutantes, se realizaron pruebas para determinar el grado de estabilidad de la mutación, midiendo el número de células revertantes al fenotipo silvestre. Las cepas auxótrofas se resembraron cada 7 días en cajas de medio Robinson con su suplemento (fen-tir); de la misma forma, se resembraron en cajas con medio Robinson sin dicho suplemento. La aparición de las colonias en cajas de medio Robinson sin aminoácido, sirvió como indicador de reversión de las bacterias al fenotipo silvestre. Este mismo proceso se realizó en medio líquido, durante el crecimiento del inóculo para las cinéticas de crecimiento y producción.

CINETICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE TRIPTOFANO. Se inoculó una asada de cada una de las cepas en 10 ml de medio Robinson con su respectivo aminoácido incubándose 12 h . Después de éste período se inocularon 4 ml del preinóculo en un matraz con 40 ml de medio Robinson suplementado con el aminoácido y 40 μ l del indicador de pH Rojo Fenol (0.1 mg/ml) (Ramírez, 1994).

Se valoraron diferentes concentraciones de los aminoácidos fen y tir (5, 10 y 15 $\mu\text{g/ml}$) y diferentes pH (6.5, 7.0 y 7.4). Las cepas se crecieron 24 h y se tomó una muestra cada 4 h para determinar:

- a) La población midiendo la densidad óptica a 590 nm
- b) La glucosa consumida
- c) Concentración de triptófano.

Se ajustó el pH con una solución de NaOH 2.5 M cada 2 h para neutralizar la acidez del medio (debida al crecimiento) y restaurarlo a su valor inicial aproximado de 7.4. En los casos en que se determinó el efecto de los distintos valores de pH se utilizó un amortiguador de fosfatos 0.1 M.

DETERMINACION DE GLUCOSA. La cuantificación de la glucosa consumida durante la cinética de crecimiento y producción se realizó por el método del Acido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

Se tomó 1 ml de cada muestra de la cinética de crecimiento, y se centrifugó 2 min, se separó el sobrenadante de la pastilla celular y de éste se agregaron 0.5 ml a un tubo de ensayo. Después se agregaron 1.5 ml de DNS al 1.5 % al tubo dejándolo en baño maría en ebullición 5 min. Posteriormente se dejó enfriar y se agregaron 8 ml de agua destilada, después se homogeneizó y se leyó a 510 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Mod. D-7770.

La cantidad de glucosa consumida se calculó comparándola con una curva estándar. Los estándares se prepararon con cantidades de 0.1 a 1 g/l de glucosa, siguiendo el mismo procedimiento.

La ecuación de la recta para calcular cantidad de glucosa :

$$x = \frac{y + 0.0341285956}{0.515820643} \times \text{dilución}$$

y un coeficiente de correlación de 0.997185

DETERMINACION DE TRIPTOFANO. La determinación de triptófano se calculó empleando 2 métodos:

- A) Ensayo colorimétrico de Underfriend y Peterson (1957) utilizando el p-dimetilaminobenzaldehido (DMBA).
- B) Cromatografía en placa fina.

A) Ensayo colorimétrico del DMBA: Se tomaron 0.5 ml del sobrenadante libre de células y se agregaron a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm conteniendo 2.5 ml de DMBA al 0.5% en HCl 12 N . La mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y en la obscuridad.

Enseguida se añadieron 2.5 ml de alcohol absoluto y de 2 a 3 gotas de nitrito de sodio al 0.2% y se dejó incubar 30 min. La densidad óptica que resultó del cromóforo azul se leyó en un espectrofotómetro a 620 nm . Los estandares fueron preparados de la misma manera y al mismo tiempo, agregando cantidades conocidas de una solución de triptófano, desde 20 hasta 180 $\mu\text{g/ml}$.

La ecuación de la recta para calcular la cantidad de triptófano fue:

$$x = \frac{y + 3.610959 \times 10^{-2}}{8.285617 \times 10^{-3}} \quad (2)$$

x = cantidad de triptófano ($\mu\text{g/ml}$)

y = densidad óptica de la muestra a 620 nm.

Con un coeficiente de correlación de 0.99822.

B) Cromatografía en placa fina: Se realizó sobre placas de celulosa de 20 x 20 cm y 0.1 mm de espesor (Merck). Se colocaron alícuotas de 5 μl de la muestra y los estándares (fen, tir y trp) con una jeringa de 10 μl con 1 cm de separación una de otra. Una vez que las muestras se secaron, se colocó la placa en una cámara de vidrio conteniendo 50 ml de una mezcla de n-butanol, ácido acético y agua en una proporción de 4:1:2. Se dejó correr durante 6 h a temperatura ambiente. Las placas se secaron a 60 °C durante 1 minuto y en

seguida se revelaron con una solución de ninhidrina 0.5% (w/v) en acetona, el color se desarrolló a 60 °C por 5 minutos.

DETERMINACION DEL RENDIMIENTO (Y p/s). Se define como los gramos producidos del metabolito (trp) entre los gramos de substrato (glucosa) consumidos.

$$Y \text{ p/s} = \frac{\text{gramos de aminoácido sintetizado (trp)}}{\text{gramos de substrato consumido (glucosa)}}$$

(Ozilgen, M., 1988)

ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó la prueba ANOVA para confirmar la significancia de los resultados utilizando el programa Excell 5.0.

IV RESULTADOS

OBTENCION DE MUTANTES DOBLES AUXOTROFAS

Después de la mutación con NTG conforme se describió en Material y Métodos, se revisaron aproximadamente 500 colonias de las cuales se aislaron 4 mutantes dobles auxótrofas a fenilalanina y tirosina obtenidas de la cepa parental S-27 cuyo fenotipo es Fen- 5MTr SGr. La frecuencia de mutación corresponde al 0.8%.

Las cepas se nombraron con las letras griegas: *Alfa*, *Beta*, *Gama* y *Delta*, mismas que después de numerosas resiembras no presentaron reversión al fenotipo parental.

SELECCION DE MUTANTES SOBREPDUCTORAS DE L-TRP

Se realizaron cinéticas de crecimiento y producción de triptófano en medio Robinson suplementadas con 10 µg/ml de fenilalanina y tirosina a pH 7.4 como se describe en Material y Métodos.

Las cepas *Alfa*, *Gama* y *Delta*, presentaron producciones de triptófano inferiores a la cepa parental S-27 (tabla 2), sólo la cepa *Beta* mostró un aumento en la formación del aminoácido (445.1 µg/ml), lo que significó un incremento del 74.8% con respecto a la cepa parental. En lo que respecta al crecimiento, en todas las cepas dobles auxótrofas se observó una disminución en la capacidad de desarrollar biomasa en comparación con la cepa S-27; entre las cepas auxótrofas a

TABLA 2. Producción de L-Trp y crecimiento de las cepas auxótrofas a fenilalanina y tirosina

CEPA	L-TRP ($\mu\text{g/ml}$)	D.O. (590 nm)	* GLUCOSA (g/l)	Yp/s
ALFA	217.3	2.4	5.7	0.038
BETA	445.1	2.6	8.5	0.052
GAMA	201.1	2.4	4.7	0.064
DELTA	245.3	2.5	8.0	0.031
S-27	254.5	3.6	6.6	0.039

Las cepas fueron crecidas en medio Robinson durante 24 h a pH 7.4, suplementadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de fenilalanina y tirosina; al tiempo final se evaluó el crecimiento, el triptófano producido, la glucosa consumida y el rendimiento Yp/s por los métodos descritos en Material y Métodos.

fenilalanina y tirosina, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento en las 4 mutantes analizadas. Contrariamente a lo que ocurrió con la producción de triptófano, el mejor rendimiento Yp/s se presentó en la cepa *Gama* (0.064), seguido de la cepa *Beta* con un Yp/s de 0.052, las cepas *Alfa* y *Delta* mostraron un Yp/s de 0.038 y 0.031 respectivamente, el cual fue inferior a la cepa *S27* (tabla 2). Se seleccionaron a las cepas *Beta* y *Gama*, la primera por presentar la más alta producción de triptófano y a la segunda por tener el mejor rendimiento, ambos parámetros superiores a la parental *S-27*.

El análisis en cromatografía en placa fina del medio de cultivo de la cepa *S-27*, mostro 2 bandas las cuales coincidieron con los estandares de triptófano y tirosina, mientras que por el contrario, en los sobrenadantes del medio de cultivo de las cepas *Alfa*, *Beta*, *Gama* y *Delta*, se observó sólo una mancha, misma que presento un Rf idéntico al estandar de triptófano, éstos resultados evidencian claramente la condición de doble auxotrofia de las 4 cepas mutantes obtenidas a partir de la cepa parental *S-27* auxótrofa a fenilalanina.

DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION

1) Efecto de la concentración de fenilalanina y tirosina:

Se analizó el efecto de la fenilalanina y tirosina sobre el crecimiento y producción de triptófano, se realizaron cinéticas en matraces como se describe en Materiales y Métodos, variando únicamente la concentración de éstos aminoácidos: 5, 10 y 15 $\mu\text{g/ml}$.

La cepa S-27 auxótrofa a fenilalanina, no mostró diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento, en las 3 concentraciones de fenilalanina probadas (tabla 3). El perfil de la cinética de crecimiento mostro una fase logarítmica de las 0 a las 8 horas, a partir de éste tiempo el crecimiento disminuyó ligeramente y se mantuvo así hasta el final de la cinética (24 h), sin presentar fase estacionaria.

La producción de triptófano por la cepa parental S27 estuvo parcialmente asociada al crecimiento, ya que la síntesis del aminoácido aumentó con la formación de la biomasa en las tres concentraciones de fenilalanina (fig. 6).

La producción de triptófano por la cepa parental obtenida en las tres condiciones probadas no fue significativamente distinta.

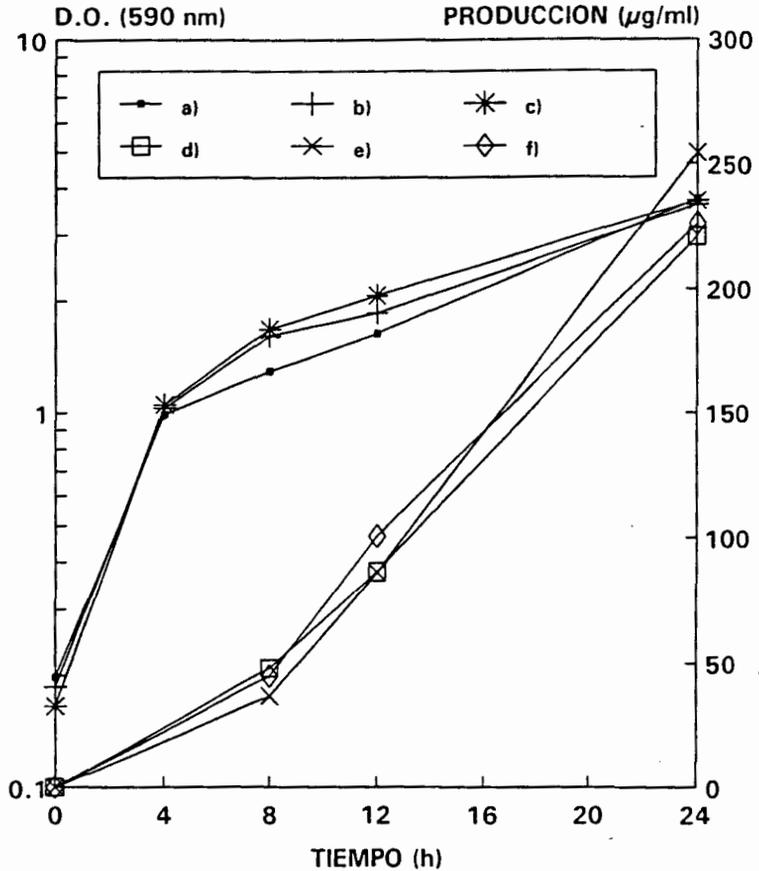
La concentración óptima de fenilalanina por la cepa S-27, para la síntesis de triptófano fue de 10 $\mu\text{g/ml}$ con un rendimiento $Y_{p/s}$ de 0.036 (tabla 3).

TABLA 3. Efecto de la concentración de aminoácidos en la producción y crecimiento.

CEPA		TRIPTOFANO ($\mu\text{g/ml}$)	D.O. (590 nm)	*GLUCOSA (g/l)	Yp/s
S-27	a)	221.1	3.72	5.8	0.038
	b)	254.4	3.61	7.0	0.036
	c)	226.0	3.70	7.1	0.032
BETA	a)	179.0	1.37	2.0	0.090
	b)	180.0	3.32	2.8	0.064
	c)	404.1	3.27	7.3	0.055
GAMA	a)	197.0	1.36	2.7	0.073
	b)	133.0	1.91	3.0	0.044
	c)	170.0	1.91	5.8	0.029

*Las cepas se cultivaron en medio Robinson a pH 7.4 a diferentes concentraciones de fenilalanina y tirosina: a) 5, b) 10 y c) 15 $\mu\text{g/ml}$. *glucosa consumida, Yp/s: rendimiento.*

Fig. 6 EFECTO DE LA FENILALANINA EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE L-TRP POR LA CEPA S-27.

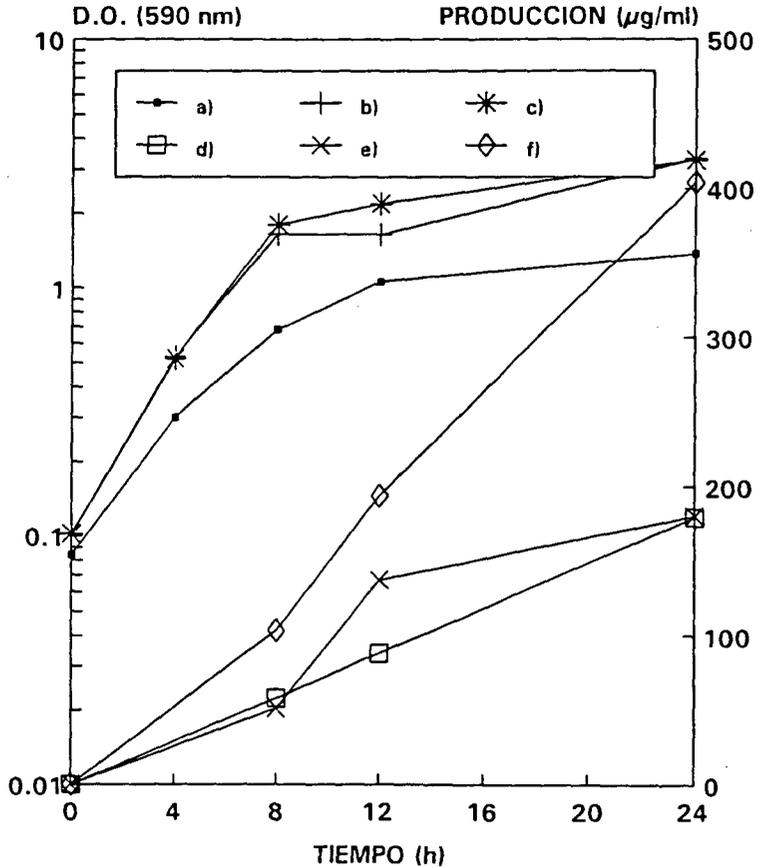


La cepa se creció en medio Robinson a pH 7.4 como se describe en Material y Métodos. Se tomaron muestras cada 4 h para medir crecimiento (a,b,c) y producción de triptófano (d,e,f) a distintas concentraciones de fenilalanina y tirosina: 5 (a,d), 10 (b,e) y 15 (c,f) µg/ml

El mayor rendimiento por ésta cepa se obtuvo en los cultivos suplementados con 5 $\mu\text{g/ml}$, teniendo un Y_p/s de 0.038 (tabla 3).

La cepa *Beta* presentó una etapa de crecimiento logarítmico desde las 0 h hasta las 8 h, a partir de este tiempo el crecimiento disminuyó sensiblemente hasta el final de la cinética, en las tres concentraciones de fenilalanina y tirosina (fig. 7). El crecimiento fué ligeramente menor en el cultivo suplementado con 5 $\mu\text{g/ml}$ de los aminoácidos. La formación de biomasa estuvo asociada a la síntesis de triptófano como se observa en la gráfica de la fig. 7.

**Fig. 7 EFECTO DE LA FENILALANINA Y
TIROSINA EN EL CRECIMIENTO Y
PRODUCCION DE L-TRP POR LA CEPA BETA.**



La cepa se cultivó en medio Robinson a pH 7.4 como se describe en Material y Métodos. Se tomaron muestras cada 4 h para medir crecimiento (a,b,c) y producción de triptófano (d,e,f) a distintas concentraciones de fenilalanina y tirosina : 5 (a,d), 10 (b,e) y 15 (c,f) µg/ml

La mejor producción de triptófano (404.1 $\mu\text{g/ml}$) se obtuvo a una concentración de 15 $\mu\text{g/ml}$ de fenilalanina y tirosina. Esta síntesis representa un 58.8% más producción de triptófano con respecto a la cepa parental S-27.

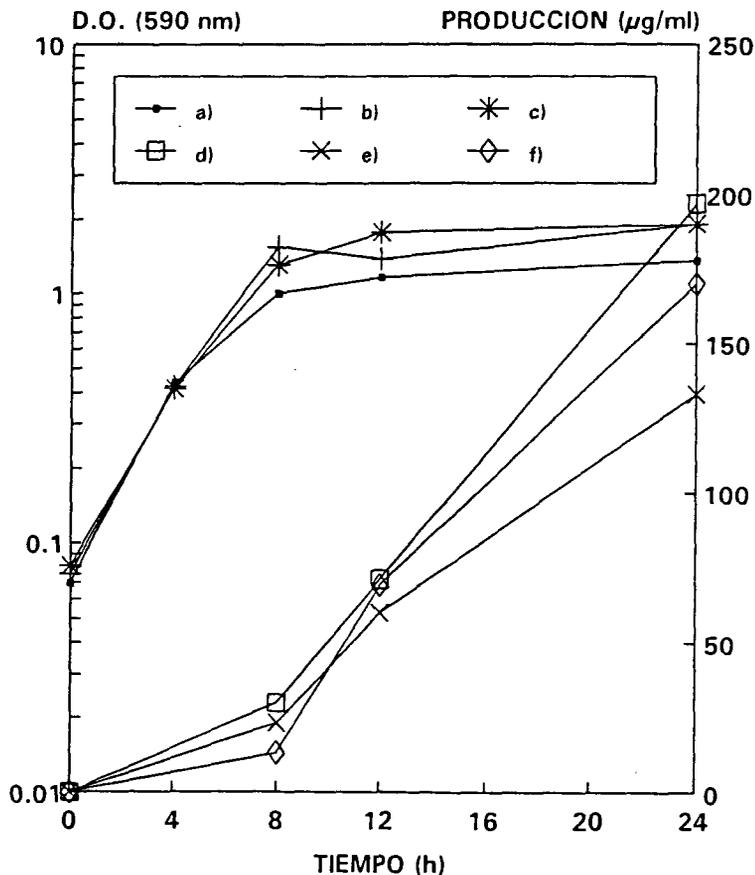
La cepa Beta doble auxótrofa presentó un alto rendimiento Y_p/s (0.090) en el cultivo con 5 $\mu\text{g/ml}$, ya que al haber un reducido crecimiento, por consecuencia, repercutió en un bajo consumo de glucosa del medio.

Como se observa en la fig. 7, la síntesis de triptófano por la cepa Beta estuvo asociada al crecimiento, ya que éstos factores aumentaron concomitantemente en el cultivo con 15 $\mu\text{g/ml}$ de suplementos. También fue posible apreciar una nula diferencia en la producción de triptófano en los cultivos con 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de los aminoácidos, sin embargo, la diferencia de suplemento afectó notablemente el crecimiento de ésta cepa (tabla 3).

El crecimiento de la cepa Gama fué muy pobre (tabla 3), como consecuencia, la producción de triptófano fué escasa, ya que como se observa en la fig. 8 ambos parámetros están parcialmente asociados.

La cepa Gama presentó su mayor síntesis de triptófano cuando se cultivó con 5 $\mu\text{g/ml}$ de los suplementos, así mismo, en ésta condición presentó su mayor rendimiento Y_p/s de 0.073, evidentemente debido al escaso consumo de glucosa (2.7 g/l) (tabla 3).

**Fig. 8 EFECTO DE LA FENILALANINA Y
Y TIROSINA EN EL CRECIMIENTO Y
PRODUCCION DE L-TRP POR LA CEPA GAMA.**



La cepa se creció en medio Robinson a pH 7.4 como se describe en Material y Métodos. Se tomaron muestras cada 4h para medir crecimiento (a,b,c) y producción de triptófano (d,e,f) a distintas concentraciones de fenilalanina y tirosina: 5 (a,d), 10 (b,e) y 15 (c,f) µg/ml.

La mejor producción de triptófano por la cepa *Gama* (197 $\mu\text{g/ml}$), no superó la producción de la cepa parental, representando el 77.4% de la síntesis de S-27. La escasa producción de ésta cepa se relaciona con la incapacidad de crecimiento que presenta.

La gráfica de la fig. 8 muestra el crecimiento de la cepa *Gama* con 5 $\mu\text{g/ml}$ de suplementos en donde se presenta una fase logarítmica desde las 0 h hasta las 12 h, en éste tiempo, la formación de biomasa no tuvo incrementos significativos hasta el final de la cinética.

Efecto del control del pH en la producción y crecimiento :
Se analizó el crecimiento y la síntesis de triptófano variando las condiciones de pH, realizando cinéticas como se describe en Material y Métodos.

El crecimiento de la cepa S-27 fué muy similar en las tres condiciones de pH analizadas, el crecimiento inició desde las 0 h y continuó hasta las 24 h, sin observarse fase estacionaria. (fig. 9). La producción de triptófano inició después de 4 h de incubación y continuó hasta las 24 h, excepto en los últimos cultivos con pH 6.5, en donde la síntesis del aminoácido, disminuyó sensiblemente después de las 12 h, alcanzando a las 24 h una producción de 114 $\mu\text{g/ml}$.

La mejor condición para la síntesis de triptófano se obtuvo en los cultivos con pH 7.0 (219 $\mu\text{g/ml}$), esto mismo se observó con el rendimiento (0.045), mientras que el rendimiento más bajo se presentó en la condición con pH 6.5 (0.018) (tabla 4)

La cepa Beta se vio afectada en mayor grado por pH ácidos, dado que cuando se creció a pH 6.5, mostró una escasa síntesis de triptófano así como una disminución notable en el crecimiento. En la figura 10, se observa una fase logarítmica de crecimiento

desde las 0 h hasta las 12 h, en éste tiempo, la velocidad de crecimiento disminuyó hasta el final de la cinética, excepto en los matraces con pH 6.5, en los cuales los cultivos alcanzaron su fase estacionaria a las 12 h.

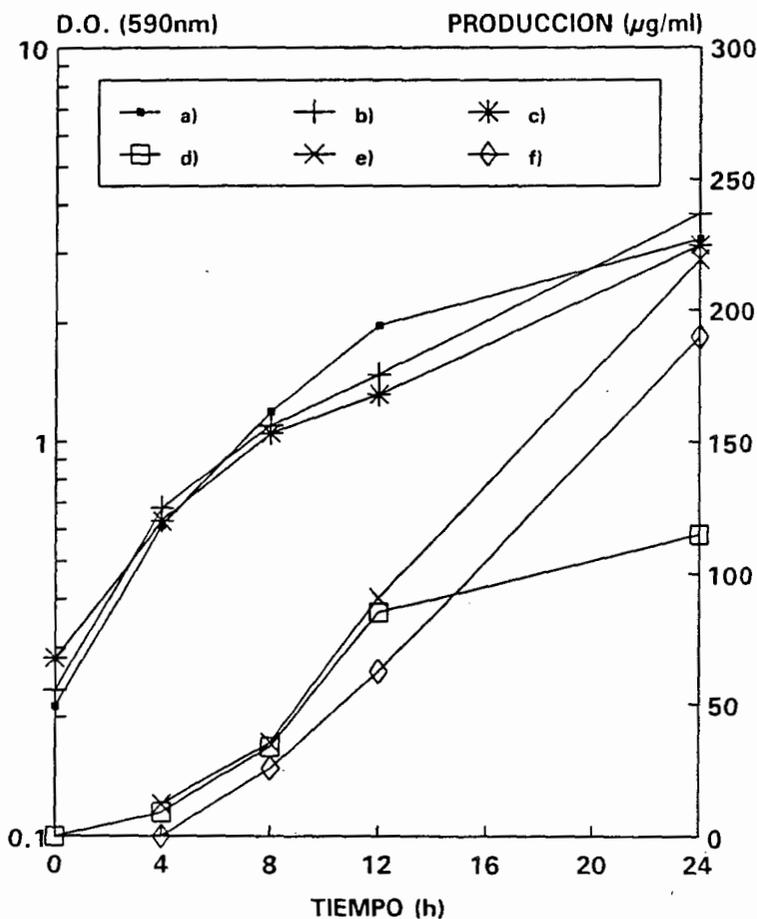
La síntesis de triptófano en la condición con pH 7.0 y 7.4 fué la más adecuada; la producción del aminoácido inició desde las 4 h y se mantuvo durante toda la cinética; por el contrario, en los cultivos con pH 6.5 se observó una fuerte disminución en la formación del aminoácido a partir de las 12 h, en ésta condición se obtuvo la más baja producción de triptófano y el más bajo rendimiento (80.9 $\mu\text{g/ml}$) (0.010) respectivamente.

TABLA 4. Efecto del pH en el crecimiento y producción de triptófano.

CEPA		L-TRP ($\mu\text{g/ml}$)	D.O. (590 nm)	*GLUCOSA (g/l)	Yp/s	pH f
S-27	a)	114.7	3.26	6.2	0.018	4.47
	b)	219.2	3.78	4.8	0.045	4.95
	c)	189.8	3.14	6.0	0.031	5.45
BETA	a)	80.9	2.43	8.9	0.010	4.66
	b)	191.2	3.42	4.2	0.045	4.81
	c)	207.1	3.11	4.8	0.043	5.11
GAMA	a)	139.5	1.45	8.3	0.017	5.31
	b)	218.5	1.57	7.2	0.030	5.40
	c)	176.7	1.51	7.3	0.024	6.10

Se realizaron cinéticas de crecimiento y producción de triptófano en medio Robinson como se describe en Material y Métodos. Las cepas fueron cultivadas a diferentes pHs: a) 6.5, b) 7.0 y c) 7.4. Se ajustó el pH del medio cada 2 h durante las primeras 12 h.

Fig. 9 EFECTO DEL pH EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE L-TRP POR LA CEPA S-27.



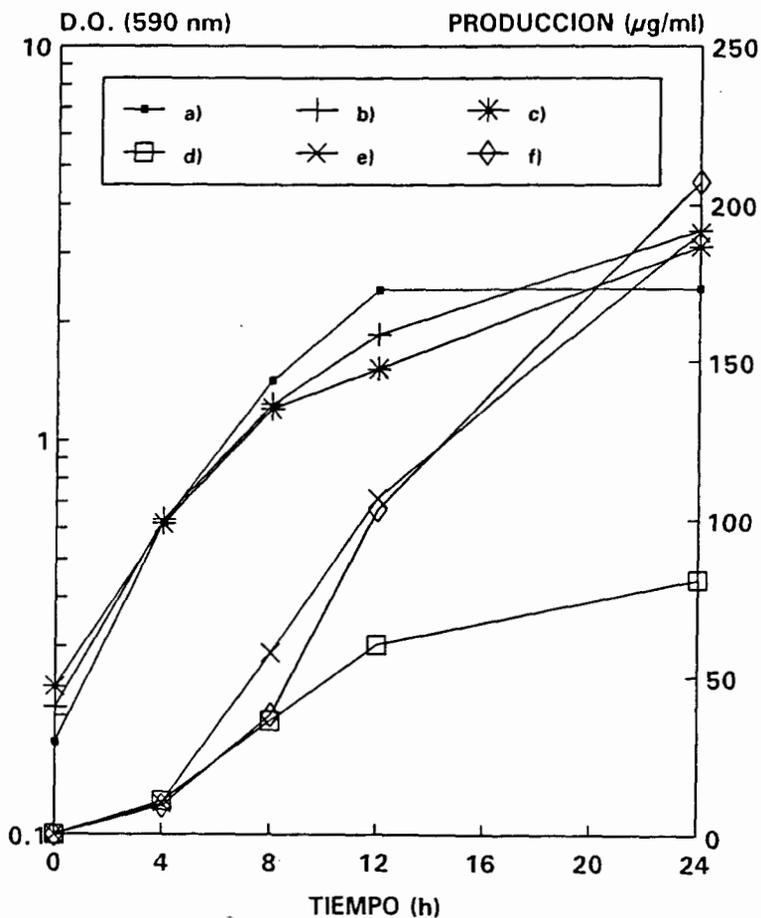
La cepa se creció en medio Robinson suplementado con 10 µg/ml de fenilalanina y tirosina. Cada 4 h se tomaron muestras para medir crecimiento (a,b,c) y producción de triptófano (d,e,f). Las células fueron incubadas en distintas condiciones de pH: 6.5 (a,d), 7.0 (b,e) y 7.4 (c,f). El ajuste de pH se realizó cada 2 h durante las primeras 12 h.

La formación de biomasa por la cepa *Gama* no mostró diferencias estadísticamente significativas, en las tres condiciones de pH. El crecimiento de ésta cepa fue limitado como ya se observó en otros casos. La síntesis de triptófano en esta cepa, estuvo directamente relacionado con el crecimiento (fig.11).

El mejor rendimiento de las tres cepas fue observado en la cepa *Gama* con un Y_p/s de 0.033 cuando se incubó a pH neutro; de la misma manera, en ésta condición se obtuvo la mejor producción de triptófano por la cepa con una síntesis de 218.5 $\mu\text{g/ml}$ (tabla 4).

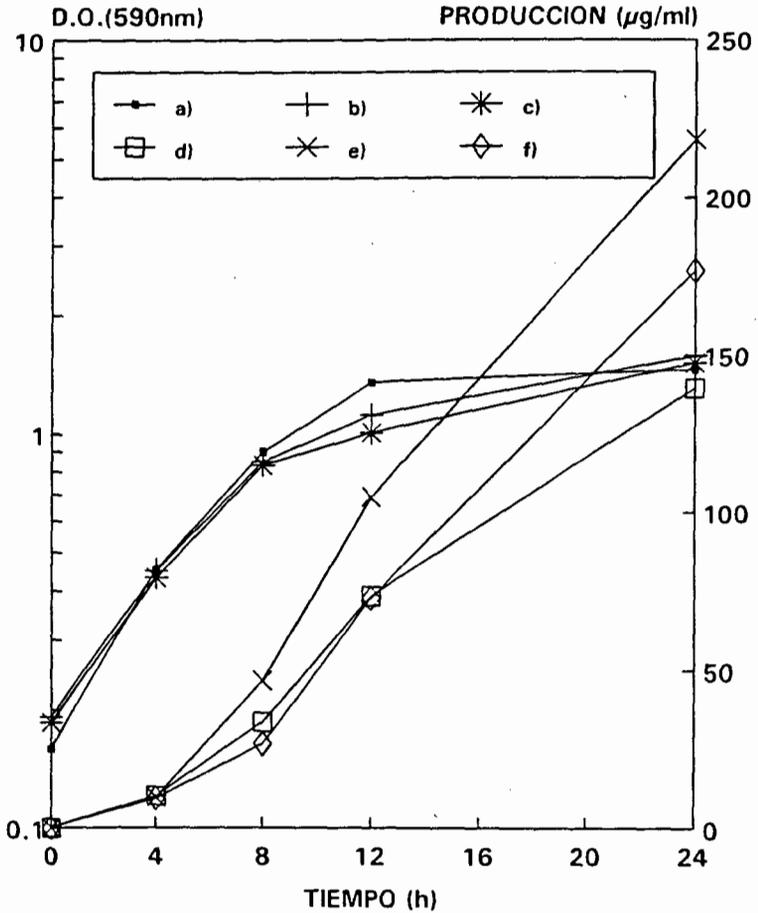
De las pruebas realizadas con las cepas seleccionadas, sobresale la cepa *Beta* por presentar la mejor producción de triptófano, en comparación con la mutante *Gama* así como con la parental *S-27*.

Fig. 10 EFECTO DEL pH EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE L-TRP POR LA CEPA BETA.



La cepa se creció en medio Robinson suplementado con 10 µg/ml de fenilalanina y tirosina. Se tomaron muestras cada 4 h para determinar el crecimiento (a,b,c) y producción de triptófano (d,e,f). Las células fueron incubadas en diferentes condiciones de pH: 6.5 (a,d), 7.0 (b,e) y 7.4 (c,f). El ajuste de pH se realizó cada 2 h durante las primeras 12 h.

Fig. 11 EFECTO DEL pH EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE L-TRP POR LA CEPA GAMA.



La cepa se creció en medio Robinson suplementado con 10 µg/ml de fenilalanina y tirosina. Se tomaron muestras cada 4 h para medir el crecimiento (a,b,c) y producción de triptófano (d,e,f). Las células fueron incubadas en distintas condiciones de pH: 6.5 (a,d), 7.0 (b,e) y 7.4 (c,f). El ajuste de pH se realizó cada 2 h durante las primeras 12 h.

Por éstas razones, la cepa Beta se seleccionó con respecto a la Gama ya que ésta última mostró dificultades para el crecimiento a pesar de tener buenos rendimientos.

Efecto del pH sobre la producción de triptófano y el crecimiento:

Se realizaron cinéticas de crecimiento y producción con medio Robinson como se describe en Material y Métodos, las cepas fueron cultivadas en un amortiguador de Fosfatos 0.1 M a distintos pHs: 6.0, 6.5, 7.0 y 7.4

La síntesis de triptófano por la cepa Beta estuvo fuertemente relacionada con el crecimiento. El pH óptimo fue 7.4, bajo ésta condición el microorganismo produjo 861.5 $\mu\text{g/ml}$ de triptófano y mostro un rendimiento $Y_{p/s}$ de 0.093, así mismo, la cepa parental S-27 sintetizó más triptófano a pH 7.4, pero su síntesis fue casi la cuarta parte de la obtenida por la cepa Beta doble auxótrofa (tabla 5). En la tabla tambien se puede observar que el crecimiento de la cepa S-27 no está asociado a la síntesis de triptófano, ya que la mayor D.O. fue a pH 6.0 (tabla 5).

Tabla 5. Efecto del pH controlado en el crecimiento y producción de triptófano.

CEPA		L-TRP ($\mu\text{g/ml}$)	D.O. (590 nm)	*GLUCOSA (g/l)	Yp/s	pH f
S-27	a)	47.8	5.46	8.2	0.006	3.9
	b)	47.8	3.45	8.8	0.005	4.6
	c)	114.4	3.86	9.1	0.013	4.9
	d)	230.5	4.46	9.9	0.023	5.7
BETA	a)	52.3	2.56	7.8	0.007	4.4
	b)	87.4	2.70	8.3	0.011	4.7
	c)	501.9	2.92	8.8	0.057	5.6
	d)	861.5	3.06	9.3	0.093	6.3

Se realizaron cinéticas de crecimiento y producción con medio Robinson como se describe en Material y Métodos. Las cepas fueron cultivadas en un amortiguador de fosfatos 0.1 M a distintos pHs: a) 6.0, b) 6.5, c) 7.0 y d) 7.4.
**Glucosa consumida, Yp/s;rendimiento, pH f; pH final.*

V DISCUSIONES

La cromatografía en placa fina mostró claramente la condición de doble auxotrofia de las cepas obtenidas *Beta* y *Gama*, en donde su capacidad para sintetizar fenilalanina y tirosina se anuló debido a la lesión a través de la mutación con NTG.

El incremento en la producción de triptófano por la cepa *Beta* con respecto a la parental *S-27* podría deberse:

1.- A un incremento en la disponibilidad de corismato, el precursor común para la síntesis de los tres aminoácidos aromáticos, aparentemente este metabolito se canalizó hacia la única vía funcional de síntesis, en éste caso la del triptófano.

2.- La falta de los dos principales efectores (fenilalanina y tirosina) dentro del esquema biosintético de los aminoácidos aromáticos, indujo una parcial liberación de la regulación tanto a nivel de represión enzimática como por inhibición por producto final. De ésta manera las DAHP sintetasas sensibles a fenilalanina y tirosina no fueron inhibidas por sus respectivos efectores, asegurando así, un suministro suficiente de corismato hacia la vía específica del triptófano. En cuanto a la represión enzimática, la ausencia

de los correpresores de *tyr R* (fenilalanina y tirosina) impidieron la expresión de los genes que codifican para la síntesis de las DAHP sintetasas sensibles a fenilalanina y a tirosina (Brown y Somerville, 1971).

3.- En lo que respecta a la vía específica de triptófano, es posible que los parámetros de unión del triptófano a la Antranilato sintetasa hayan sido alterados por la mutación, de esta manera el corismato compite con el triptófano, impidiendo así la inhibición de la enzima, aunque cabe aclarar que los sitios de unión de estas dos moléculas dentro de la enzima, no son los mismos.

INFLUENCIA DEL pH DEL MEDIO

La regulación del pH tanto interno como externo, es de vital importancia para el adecuado funcionamiento de la maquinaria metabólica de *E. coli*. La cepa *Beta* doble auxótrofa a fenilalanina y tirosina, presentó deficiencias de crecimiento a pH bajos (menores de 7.0), dado que las condiciones externas ácidas, interfieren en las funciones de la membrana tal como lo es la formación de un gradiente de pH transmembranal. (REF) Probablemente ésta mutante es más sensible a pHs inferiores al neutro que la cepa parental, inhibiéndose el crecimiento como ya se ha descrito en previos estudios de Gale y Epps (1942).

La acidez alcanzada al final de la cinética (24 h), es similar en las tres condiciones de cultivo y muestra una relación directa con la capacidad de crecimiento (fig. 9)

La reducción del crecimiento en la cepa Beta cultivada a pH 6.5, se debe probablemente a que ésta condición provoca stress por bajos pHs, donde la célula mantiene un pH interno que afecta directamente la formación de biomasa. Esta característica de mayor sensibilidad, tal vez se deba al hecho de que posee una lesión (provocada por la mutación con NTG) que disminuye la síntesis de enzimas y proteínas que se incrementan en respuesta a shock por pH bajos en el medio externo.

En contraste, en la cepa parental S-27, el crecimiento no se afectó por éstas condiciones ácidas, ya posee un genotipo similar al de la cepa silvestre, dado que *E. coli* habita en el intestino de los vertebrados donde está expuesta a un ambiente ácido, debido a los procesos digestivos.

Cuando se mantuvo controlado el pH del medio con un amortiguador de fosfatos, la cepa Beta presentó una óptima síntesis de triptófano a pH 7.4. Dicha producción por ésta cepa doble auxótrofa, es casi 4 veces más alta que la obtenida por la parental S-27 (tabla 5); éste incremento en la

síntesis con un valor de pH probado anteriormente, se debe a que la cepa aumentaba la acidez del medio y al ajustar el pH, la célula debía recuperarse a la nueva condición, además del error experimental implícito durante el ajuste.

En lo concerniente a la síntesis de triptófano, el pH del medio de 6.0 y 6.5 tanto en la cepa Beta como en la parental, influyó directamente en la producción. Una probable razón a éstos resultados es que cuando las células están fermentando azúcares a éstos pHs, están sujetas a stress por los productos de fermentación, habiendo modificación de el pH intracelular así como modificaciones en las funciones de la célula, como lo es la formación de triptófano. Estudios previos en *E. coli* (Konings, 1983) y en otros microorganismos apoyan ésta hipótesis (Schuldinder y Padan, 1982).

La razón de la alta síntesis de triptófano por la cepa Beta, es que la célula mantuvo controlado el pH interno sin sufrir cambios drásticos en el gradiente de pH de la membrana y posiblemente a pHs externos inferiores a 7.4 no se mantuvo la homeóstasis del pH interno-externo. Se han obtenido resultados similares en cepas silvestres de *E. coli* sometida a stress por bajos pHs (Taglicht et al., 1987; Neirdhart y VanBogelen, 1984; 1987).

Experimentos de Hickey y Hirshfield (1990) en *E. coli* y *S. typhimurium* donde se someten las células a cambios de pH (5.0 a 7.0), el pH externo de 5.0 declina el pH interno concomitantemente con el crecimiento hasta en un 72% , así también , la cepa Beta declinó un 71% su biomasa al crecerla a pH 6.5 con respecto al crecimiento obtenido a pH 7.4 .

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE FENILALANINA Y TIROSINA EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE TRIPTOFANO.

Se observó que en la cepa Beta la concentración de fenilalanina y tirosina en el medio estuvo vinculada directamente con la síntesis de triptófano . La condición de doble auxotrofia, obliga a la cepa a utilizar éstos suplementos del medio para crecer y para sintetizar mayor cantidad de moléculas de triptófano de las que requiere para su desarrollo.

Se advirtió que la mayor síntesis de triptófano por la cepa Beta se obtuvo al cultivarla con 15 $\mu\text{g/ml}$ de los aminoácidos, ya que la célula dispuso de suficientes metabolitos para su crecimiento y por consecuencia, para la producción de triptófano, ya que la ruta específica de éste aminoácido está desregulada.

La condición de doble auxotrofia de la cepa Beta , no afecta significativamente el crecimiento con respecto a la parental S-27; no obstante , supera la síntesis de triptófano cuando se mantiene en condiciones óptimas.

PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

Los logros obtenidos hasta ahora con mutantes de *Escherichia coli* en la producción de triptófano son limitados si se compara con otros organismos como *Corynebacterium glutamicum* y *Brevibacterium flavum*. Evidentemente, éstas especies poseen los caracteres genéticos favorables para la síntesis de triptófano; por otro lado, el desconocimiento de los mecanismos alternativos en la regulación de la síntesis de triptófano, repercuten en el rendimiento y producción de este aminoácido en *E. coli*. Sin embargo, en mi opinión en el caso de la cepa Beta se puede incrementar el rendimiento y producción de triptófano mejorando los siguientes aspectos:

- 1) La utilización de Ingeniería genética en *Escherichia coli* ofrece, sin duda alguna, la mejor alternativa para la producción. Se ha utilizado la tecnología de ADN recombinante en *E. coli* (Aiba y col., 1982; Tribe y Pittard, 1979) aunque todavía no se han podido seleccionar cepas con buenos rendimientos a escala industrial, debido a que aún se desconocen los mecanismos alternos en la regulación. También se han utilizado técnicas de Ingeniería genética para la producción de triptófano en *Corynebacterium glutamicum* obteniéndose excelentes resultados (Ikeda, 1992), sin embargo,

E. coli tiene la ventaja con respecto a *Corynebacterium* y *Brevibacterium*, de que se pueden emplear con ella una gran variedad de vectores para la transferencia de genes específicos de la vía.

2) Otro aspecto de importancia además del mejoramiento genético, es la optimización en las condiciones de cultivo, tales como el control del pH, la concentración de fenilalanina y tirosina, el aumento en el tiempo de las cinéticas, etc., factores que indudablemente repercuten en el incremento en el rendimiento y producción de triptófano.

VI CONCLUSIONES

1) La auxotrofia a fenilalanina y tirosina en la cepa *Beta* provocó sobreproducción de triptófano. En adecuadas condiciones de cultivo, la cepa *Beta* mostró un incremento en la síntesis de triptófano del 274% con respecto a la parental *S-27*.

2) La concentración de fenilalanina en la cepa *S-27* fue crucial para la síntesis de triptófano, cantidades del aminoácido mayores que 10 $\mu\text{g/ml}$ provocaron inhibición de la formación de triptófano. Por el contrario, el mejor crecimiento y producción de triptófano en la cepa *Beta* se obtuvo en 15 $\mu\text{g/ml}$ de fenilalanina y tirosina.

3) El pH fue un factor fundamental en la producción de triptófano. Tanto en la cepa parental *S-27* como en la cepa *Beta*, la síntesis de triptófano fue drásticamente inhibida en pHs bajos, no así, el crecimiento, el cual mostró un rango más amplio de acción.

4) En tres de las 4 cepas doble auxótrofas analizadas no se encontraron mejoras en la producción de triptófano con respecto a la parental *S-27*.

5) Este trabajo aporta un procedimiento para la creación de un organismo sobreproductor de triptófano a nivel nacional; tanto el mejoramiento genético como la optimización del proceso en el futuro, repercutirán en un incremento en la producción de triptófano.

VII ANEXO

PREPARACION DE REACTIVOS

DMBA (p-dimetilaminobenzaldehido) al 0.5% : Se disuelven 0.5 g de DMBA en ácido clorhídrico 12 N y se afora a 100 ml.

DNS (Acido dinitrosalicílico): Se disuelven en agua destilada 10 g de hidróxido de sodio, 10 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico; 200 g de tartrato de sodio y potasio, 2 g de fenol y 0.5 g de metabisulfito de sodio y se afora a 1 l.

NITRITO DE SODIO al 0.2% : Se disuelven 0.2 g de nítrito de sodio en 100 ml de agua destilada.

NTG (Nitrosoguanidina) : Se prepara a una concentración de 2 mg/ml disolviendo en 95% de etanol absoluto y 5% de agua.

ROJO FENOL : Se prepara a una concentración de 0.1 mg/ml en agua destilada.

VIII BIBLIOGRAFIA

Aiba S., Tsunekawa, H. and Imanaka, T. (1982) New approach to tryptophan production by *Escherichia coli*: Genetic manipulation of composite plasmid in vitro. Appl. Environ. Microbiol. 43: 289-297.

Alldelberg, E.A., Mandel, M. & Chen, C.C.C. (1965) Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N-nitroso-guanidine in *Escherichia coli* K-12. Biochemical and Biophysical Research Communications 18, 788-795.

Anraku, Y. (1968) Transport of sugars and amino acids in bacteria. III. Studies on the restoration of active transport. J. Biol. Chem., 243, 3128-3135

Anraku, Y. (1975a) On the roles of binding proteins in the membrane transport and cellular homeostasis of amino acids. In Proceedings of the 1st Intersectoral Congress of IAMS, Vol.1 (T. Hasegawa, ed.), Science Council of Japan, Tokyo, pp. 563-572.

Anraku, Y. (1975b). Membrane transport and metabolic regulation. In Modern Biological Sciences, Vol. 5 (R. Sato and Nishizaka, eds). Iwanami Shoten, Tokyo, pp. 17-53 (in Japanese)

Atkinson, D.E. (1977) Cellular Energy Metabolism and Its Regulation. Academic Press, New York.

Barlatti, S., and Ciferri, O. (1970) J. Bacteriol. 101, 166-172.

Bauerle, R.H., and Margolin, P. (1966) A mutational enzyme complex in the tryptophan pathway of *Salmonella typhimurium*: comparison of polarity and pseudopolarity mutations. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 203-214.

Boezi, J.A., and DeMoss, R.D. (1961) Properties of tryptophan transport system in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta 49, 471-484.

Brown, K.D. (1968) Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. Genetics 60, 31-48.

- Brown, K.D. (1970). Formation of aromatic amino acid pools in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **104**, 177-188.
- Brown, K.D. (1971). Maintenance and exchange of aromatic amino acid pool in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **106**, 70-81.
- Brown, K.D. and Somerville, R.L. (1971) Repression of aromatic amino acid biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **108**, 386-399.
- Crawford, I.P. (1975) Gene rearrangements in the evolution of the tryptophan synthetic pathway. *Bacteriol. Rev.* **39**, 87-120.
- Crawford, I.P. (1980) Comparative studies on the regulation of tryptophan synthesis. *Crit. Rev. Biochem.* **8**, 175-189.
- Creighton, T.E. (1970) N-(5'-phosphoribosyl) antranilate isomerase-indol-3-ylglycerol phosphate synthetase of tryptophan biosynthesis. *Biochem. J.* **120**, 699-707.
- Davis, B.B. (1948) Isolation of Biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin. *Journal of the American Chemical Society* **70**: 4267-4272.
- Deeley, M.C. and Yanofsky, C. (1981) Nucleotide sequence of the structural gene for tryptophanase of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **147**, 787-796.
- Doy, C.H. and Brown, K.D. (1965) Control of aromatic biosynthesis: the multiplicity of 7-phospho-2-oxo-3-deoxy-D-arabino-heptonate-D-erythrose-4-phosphate lyase (pyruvate-phosphorylating in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta* **104**, 377-389.
- Dusha, I., and Deenes, G. (1976) Purification and properties of tyrosine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase of *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta* **438**, 536-573.
- Gale, E., and Epps, H. M. (1942) The effect of the pH of the medium during growth on the enzyme activities of bacteria (*Escherichia coli* and *Micrococcus lysodieticus*) and biological significance of the changes produced. *Biochem. J.* **36**, 600-619.
- Gibson, F. and Pittard, J. (1968) Pathways of Biosynthesis of Aromatic Amino Acids and Vitamins and Control in Microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, **32**: 465.
- Hagino, H., and Nakayama, J. (1975) L-Tryptophan production by analog-resistant mutants derived from phenylalanine and tyrosine double auxotroph of *Corynebacterium glutamicum*. *Agr. Biol. Chem.* **39**, 343-349.

Hickey, E.W., and Hirshfield, I.N. (1990) Low-pH-Induced Effects on Patterns of Protein Synthesis and on Internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Appl. Env. Microbiol. Vol. 56 (4), 1038-1045.

Ikeda, M., and Katsumata, R. (1992) Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain. Appl. Environ. Microbiol. 58 (3): 781-785.

Ito, J., and Crawford, I.P. (1965). Regulation of enzymes of the tryptophan pathway in *Escherichia coli*. Genetics 52, 1303-1316.

Ito, J., and Yanofsky, C. (1966) The nature of anthranilic acid synthetase complex of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 241, 4112-4114.

Ito, J., and Yanofsky, C. (1969) Anthranilate synthetase, an enzyme specified by the tryptophan operon of *Escherichia coli*: comparative studies on the complex and the subunits. J. Bacteriol. 97(2), 734-742.

Jesen, R.A. and Nasser, D.S. (1968) Comparative regulation of isoenzymic 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate synthetases in microorganisms. J. Bacteriol. 95, 188-196.

Kepes, A. and Cohen, G.N. (1962). Permeation . In The bacteria, Vol.4 (I.C. Gunsalus and R.Y. Stanier, eds), Academic Press, New York, pp. 179-221.

Komachiya, Y. (1961) Citado en : Amino acids: Biosynthesis and genetic regulation (Herrman, K.M. and Somerville R.L. eds.) pp 351-378. Addison-Wesley Publishing Company 1983.

Konings, W.N. and Veldkamp, H. (1983) Energy transduction and solute transport mechanisms in relation to environments occupied by microorganisms. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 34, 153-186.

Kuhn, J., and Somerville, R.L. (1974) Mutant Strains of *Escherichia coli* K-12 that use D-amino acids. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68, 2482-2484.

McCandlis, R.J. and Herrman, K.M. (1978) Iron, an essential element for biosynthesis of aromatics compounds. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 4810-4813

Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426-428.

- Miles, E.W. (1979) Tryptophan synthetase: Structure, function, and subunit interaction. *Advances in Enzymology* Vol. 49, 127-186.
- Miozzari, G., F. and Yanofsky, C. (1978) Translation of the leader region of the *Escherichia coli* tryptophan operon. *J. Bacteriol.* 133, 1457-1466.
- Moyed, H.S. (1960) False feedback inhibition: inhibition of tryptophan biosynthesis by 5-methyltryptophan. *J. Biol. Chem.* 235, 1098-1102.
- Nakasawa, H., Enei, H., Okumura, S., Yoshida, H., and Yamada, H. (1972) Enzymatic preparation of L-Tryptophan and 5-hydroxy-L-tryptophan. *FEBS, Lett.* 25(1), 43-45.
- Neidhardt, F.C., and VanBogelen, R. A., and Vaugh, V. (1984) The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 18; 295-329.
- Neidhardt, F.C., and VanBogelen, R.A. (1987) Heat shock response, In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C. , 1334-1345.
- Nichols, B.P. Miozzari, G.F., van Cleemput, M., Bennett, G.N., and Yanofsky, C. (1980). Nucleotide sequences of the *trp G* regions of *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium* and *Serratia marcescens*. *J. Mol. Biol.* 142, 503-517.
- Nichols, B.P., Blumenberg, M., and Yanofsky, C. (1981) Comparison of the nucleotide sequence of the *trp A* and sequences immediately beyond the *trp* operon of *Klebsiella aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli*. *Nucl. Acids. Res.* 9, 1743-1755.
- Ogino, T., Garner, C., Markley, J.L., and Herrmann, K.M. (1982) Biosynthesis of aromatic compounds: ¹³C NMR spectroscopy of whole *Escherichia coli* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 79, pp 5828-5832.
- Olzigen, M. (1988) Kinetics of amino acid production by over-producer mutant microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 10, 110-114.
- Openheim, D.S. and Yanofsky, C. (1980) Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Genetics* 95, 785-795.

Pabst, M.J., Kuhn, J.C., and Somerville, R.L. (1973) Feedback regulation in the antranilate aggregate from wild type and mutant strains of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 248, 901-914.

Pittard, J., Camakaris, J., and Wallace, B.J. (1969) Inhibition of 3- Deoxy-D-arabinoheptulosonic acid-7-phosphate synthetase (trp) in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 97, 1242-1247.

Platt, T., (1978) in The Operon (eds Miller, J & Reznikoff, W.) 268-302 (Cold Spring Harbor, New York)

Ramírez, J. (1994) Tesis de Maestría. Instituto de Investigación en Biología Experimental.

Sanchez, S., Cea, A. Y Flores, M.E. (1978) Selective enrichment of aromatic amino acid auxotrophs in *Hansenula polymorpha*. Appl. Environ. Microbiol. 35, 228-230.

Sano, K., Yokozeki, K., Eguchi, C., Kagawa, T., and Noda, I. (1977) Enzymatic Production of L-Tryptophan from L-and DL-5 Indolylmethylhydantoin by Newly Isolated Bacterium. Agric. Biol., Chem., 41(5), 819-825.

Sen, A.k., and Liu, W. (1990) Dynamic Analysis of Genetic Control and Regulation of Amino Acid Synthesis: The Tryptophan Operon in *Escherichia coli*. Biotech. and Bioeng., Vol. 35 pp 185-194.

Schoner, R. and Herrman, K.M. (1976) 3- Deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase. J. Biol. Chem. 251, 5440-5447.

Schuldiner, S., and Padan, E. (1982) How does *Escherichia coli* regulate internal pH? In A.N. Martonosi (ed), Membranes and transport, vol. 1. Plenum Publishing Corp., New York, 65-73.

Shio, I., Ishi, K., and Yokozeki, K., (1973) Production of L-Tryptophan by 5-Fluorotryptophan Resistant Mutants of *Bacillus subtilis*. Agr. Biol. Chem., 37(9) 1991-2000.

Shio, I., Sugimoto, S., and Kawamura, K. (1982) Production of L-Tryptophan by azaserine-resistant mutants of *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. 46 (7): 1849-1854.

Shio, I., Sugimoto, S., and Kawamura, K., (1984). Production of L-Tryptophan by Sulfonamide -resistant Mutants. Agric. Biol. Chem., 48(8), 2073-2080.

Snell, E.E. (1975) Tryptophanase: structure catalytic activities, and mechanism of action. Adv. Enzymol. 42: 287-333.

- Srinivasan, P.R. and Sprinson, D.B. (1959) 2-keto-3-deoxy-D-arabino-heptonic acid 7-phosphate synthetase. J. Biol. Chem. 234, 716-722.
- Somerville, R.L., and Yanofsky, C. (1965) Studies on the regulation of tryptophan biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 11, 747-759.
- Strominger, J.L. (1973) The Actions of Penicillin and other Antibiotics on Bacterial Cell Wall Synthesis. Johns Hopkins Med. J., 133:63-81.
- Sugimoto, S., and Shiio, I. (1983) Regulation of Tryptophan Biosynthesis by Feedback Inhibition of the second step Enzyme, Anthranilate Phosphoribosyl transferase, in *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. 47, 2295-2305.
- Tribe, D. E. and Pittard, J. (1979) Hiperproduction of tryptophan by *Escherichia coli*: Genetic manipulation of the pathways leading to tryptophan formation. Appl. Environ. Microbiol. 38: 181-190.
- Taglicht, D., Padan, E., Oppenheim, A.B., and Schuldiner, S. (1987) An alkaline pH shift induces the heat shock response in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169, 885-887.
- Underfriend, S., and Peterson, R.E. (1957) Assay of aromatic amino acids. III Tryptophan. Methods Enzimol. 3: 613-614.
- Yamada, K., Kumagai, H., Kashima, N., Torii, H., Enei, H., and Okumura, S. (1972a) The microbial production of amino acids. Halsted Press, New York.
- Yamada, H., Yoshida, H., Udawa, T. (1972b) Proceedings of the Annual Meeting of Agricultural Chemical Society of Japan. pp 104.
- Yanofsky, C. (1971) Tryptophan biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Am med. Assoc. 218, 1026-1035
- Yanofsky, C., Platt, T., Crawford, I.P., Nichols, B.P., Christie, G.E., Horowitz, H., van Cleemput, M., and Wu, A.M. (1981a) The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. Nucl. Acids Res. 9, 6647-6668.
- Yanofsky, C., (1981b) Attenuation in the control of expression of bacterial operons. Nature Vol. 289 pp 751-758.
- Zalkin, H., and Yanofsky, C., and Squires, C.L. (1974) Regulated in vitro synthesis of *Escherichia coli* tryptophan operon messenger ribonucleic acid and enzymes. J. Biol. Chem. 249, 465-475.

Zalkin, H., and Yanofsky, C. (1982) Yeast gene TRP5: structure, function, regulation. J. Biol. Chem. 257, 1491-1500.

Zlotnikov, B. Chateur, M., Khmelnitsky, M. (1984) A note on the isolation of the auxotrophic mutants of *Rhizobium japonicum*. Journal of Appl. Bacteriol. 56: 173-174.