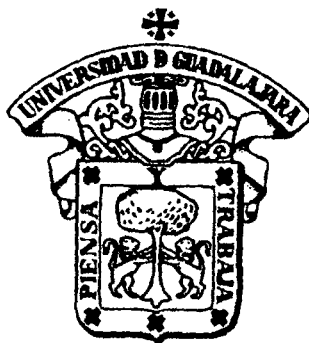


1991-B

080470436

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**"OBTENCION DE MUTANTES DE Escherichia coli,
RESISTENTES A 5-FLUORO-TRIPTOFANO Y
SOBREPRODUCTORAS DE TRIPTOFANO"**

T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

L I C E N C I A D O E N B I O L O G I A

P R E S E N T A

FRANCISCO LEONARDO HERRERA FIGUEROA

GUADALAJARA, JAL., ENERO DE 1996.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

1505/95

**C. FCO. LEONARDO HERRERA FIGUEROA
PRESENTE. -**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "OBTENCION DE MUTANTES DE Escherichia coli, RESISTENTES A 5-FLORURO-TRIPTOFANO Y SOBREPDUCTORAS DE TRIPTOFANO" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis el M.C. José de Jesús Ramírez Córdova.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Las Agujas, Zapopan, Jal., 11 de Diciembre de 1995
EL DIRECTOR


M.C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ

EL SECRETARIO


OCEAN. SALVADOR VELAZQUEZ MAGAÑA

c.c.p.- M.C. José de Jesús Ramírez Córdova .- Director de Tesis.- pte.
c.c.p.- El expediente del alumno.

AEIR/SVM/mahs*

C.U.C.B.A.



DIV. DE CS.
BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

C. Dr. Alfonso E. Islas Rodríguez
Director de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

PRESENTE.

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el pasante Francisco Leonardo Herrera Figueroa. Código numero 080470436 con el título "OBTENCION DE MUTANTES DE *Escherichia coli* RESISTENTES A 5- FLUOROTRIPTOFANO Y SOBREPRODUCTORAS DE TRIPTOFANO".

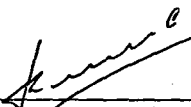
Consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar

ATENTAMENTE

Guadalajara Jal. Diciembre de 1995

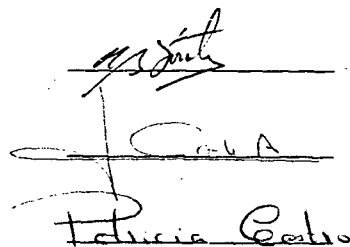
El director de tesis



M. en C. José de Jesús Ramírez Córdova

SINODALES

- 1.- DR. CARLOS BEAZ ZARATE
- 2.- DR. CARLOS ALVAREZ MOYA
- 3.- DRA. PATRICIA CASTRO



INDICE

	Pag.
Portada	i
Lugar de realización y Director	ii
Indice de abreviaturas	iii
Indice de figuras	iv
Indice de tablas	v
I. INTRODUCCION	1
II. HIPOTESIS	17
III. OBJETIVOS	18
IV. MATERIALES Y METODOS	20
Cepa Bacteriana	20
Condiciones de cultivo	20
Valoración del efecto de letalidad de la NTG	20
Ensayo para determinar la concentración mínima inhibitoria	21
Obtención de mutantes resistentes a 5-fluoro-triptofano	21
Cinéticas de crecimiento y producción de triptofano	21
Determinación de glucosa	22
Determinación de triptofano	22
Determinación del rendimiento	23
V. RESULTADOS	24
Determinación de la concentración mínima inhibitoria a 5-FT	24
Obtención de mutantes resistentes a 5-FT	26
Efecto de fenilalanina y tirosina sobre el crecimiento y producción de triptofano	29
Efecto del control del pH sobre el crecimiento y producción de triptofano	38
VI. DISCUSION	46
VII. CONCLUSIONES	50
VIII. BIBLIOGRAFIA	51

1991-B

80071261 b

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



OBTENCION DE MUTANTES RESISTENTES A
5-FLUORO-TRIPTOFANO Y
SOBREPRODUCTORAS DE TRIPTOFANO

T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
L I C E N C I A D O E N B I O L O G I A
P R E S E N T A
F R A N C I S C O L E O N A R D O H E R R E R A F I G U E R O A

GUADALAJARA, JALISCO., ENERO DE 1996

**El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación y
Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C.
(CIATEJ), Bajo la Dirección del Maestro en Ciencias
J. de Jesús Ramírez Cordoba.**

ABREVIATURAS

AS	Antranilato Sintetasa
CMI	Concentración Mínima inhibitoria
°C	Grados Centígrados
DAHHP	3-Deoxi-D-Arabino-Heptulosonato-7-fosfato
DMBA	Dimetil-Amino-Benzaldehído
DNS	Acido Dinitro Salicílico
D.O.	Densidad Optica
5-MT	5-Metil-triptofano
5-FT	5-Fluoro-triptofano
N	Normalidad
NTG	N-metil-N-Nitrosoguanidina

INDICE DE FIGURAS

Fig.1 Vía común de síntesis de los aminoácidos aromáticos

Fig.2 Vía específica de síntesis de triptofano

Fig.3 Esquema del operón de triptofano

Fig.4 Producción de triptofano por mutantes resistentes a 5-FT

Fig.5 Efecto de fenilalanina y tirosina sobre el crecimiento y producción de triptofano por la cepa Beta

Fig.6 Efecto de fenilalanina y tirosina sobre el crecimiento y producción de triptofano por la cepa FT1

Fig.7 Efecto de fenilalanina y tirosina sobre el crecimiento y producción de triptofano por la cepa FT2

Fig.8 Efecto de fenilalanina y tirosina sobre el crecimiento y producción de triptofano por la cepa FT11

Fig.9 Efecto del pH sobre el crecimiento y producción de triptofano por la cepa Beta

Fig.10 Efecto del pH sobre el crecimiento y producción de triptofano por la cepa FT1

Fig.11 Efecto del pH sobre el crecimiento y producción de triptofano por la cepa FT2

Fig.12 Efecto del pH sobre el crecimiento y producción de triptofano por la cepa FT11

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 Microorganismos utilizados en la producción de triptofano

TABLA 2 Costos de producción de algunos aminoácidos

TABLA 3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria a 5-FT

TABLA 4 Crecimiento y producción de triptofano por cepas mutantes resistentes a 5-FT

TABLA 5 Efecto de fenilalanina y tirosina sobre el crecimiento y producción de triptofano

TABLA 6 Efecto del pH sobre el crecimiento y producción de triptofano

INTRODUCCION

Escherichia coli al igual que muchos otros procariotas, posee la capacidad de sintetizar todos los componentes necesarios para su crecimiento y reproducción a partir de precursores simples. Entre los metabolitos más importantes, los aminoácidos y sus vías de síntesis han sido de las más estudiadas desde hace varios años debido a la importante función que desempeñan (Umbarger, 1978).

En condiciones normales este microorganismo no sobreproduce ningún metabolito, es decir, sintetiza únicamente las cantidades necesarias para satisfacer sus diversas necesidades biológicas. Este fenómeno ocurre debido a la existencia de mecanismos regulatorios seleccionados a través de muchos años de evolución biológica y cuya función es evitar el desperdicio de substrato y energía en la producción de metabolitos celulares.

Dado que la biosíntesis de un aminoácido se encuentra modulada por el concurso de mecanismos regulatorios específicos, la alteración natural o artificial de tales mecanismos resulta por lo tanto en la sobreproducción del metabolito. Por lo que respecta al triptofano, es un aminoácido esencial e importante en la dieta humana que requiere ser adquirido a través de los alimentos, ya que su síntesis está restringida a bacterias, plantas y algunos hongos. Es el menos abundante de los aminoácidos y constituye el 1% de la masa promedio de la proteína (Atkinson, 1977).

Vía de biosíntesis del triptofano

La biosíntesis de triptofano se analiza por lo general en 2 etapas:

- 1) La vía común, que culmina con la síntesis del corismato, precursor común de los aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina y tirosina) (fig. 1).
 - 2) La vía específica para la síntesis de cada uno de los aminoácidos aromáticos. (fig.2).
- El mecanismo de control para el flujo de carbono a través de la vía del siquimato es complejo y aun no está completamente entendido. Los genes estructurales que codifican las siete enzimas de la vía están esparcidos por todo el cromosoma de *E. coli* (Wallace y Pittard, 1967).

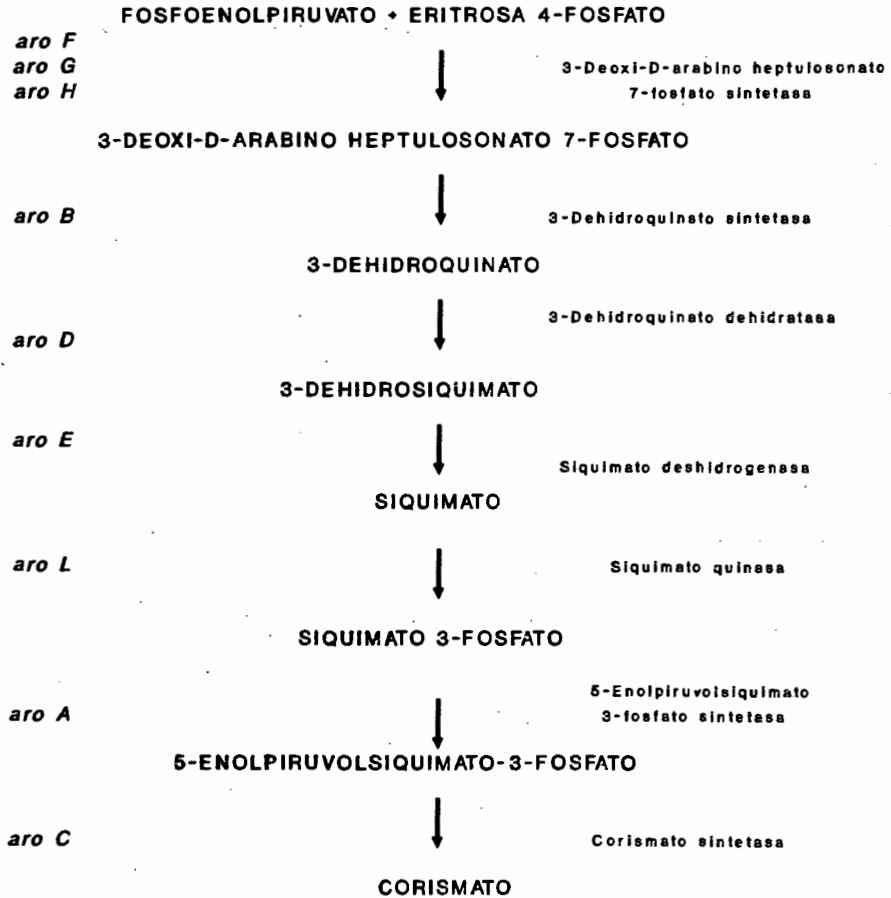
La vía de síntesis de triptofano inicia con la condensación de la eritrosa-4-fosfato y el fosfoenol piruvato para formar el 3-deoxi-D-arabino-heptulosa-7-fosfato (DAHP), esta reacción es catalizada por la DAHP sintetasa (Srinivasan y Sprinson, 1959). Esta enzima controla el flujo de carbono a través de la vía del siquimato y está sujeta a inhibición por producto final, degradación proteolítica específica y control en el nivel de transcripción (Smith y col., 1962; Tribe y Pittard, 1979; Brown y Somerville, 1971).

La cepa silvestre de *E. coli* produce 3 isoenzimas DAHP sintetasas: DAHP sintetasa sensible a fenilalanina, DAHP sintetasa sensible a tirosina y DAHP sintetasa sensible a triptofano (Doy y Brown, 1965). El corismato producto final de la vía, no está involucrado en el control. Las restantes 6 enzimas se sintetizan constitutivamente (Tribe y col., 1976).

Fig. 1 VIA COMUN DE SINTESIS DE LOS AMINOACIDOS AROMATICOS

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

RUTA BIOSINTETICA Y ENZIMAS QUE INTERVIENEN

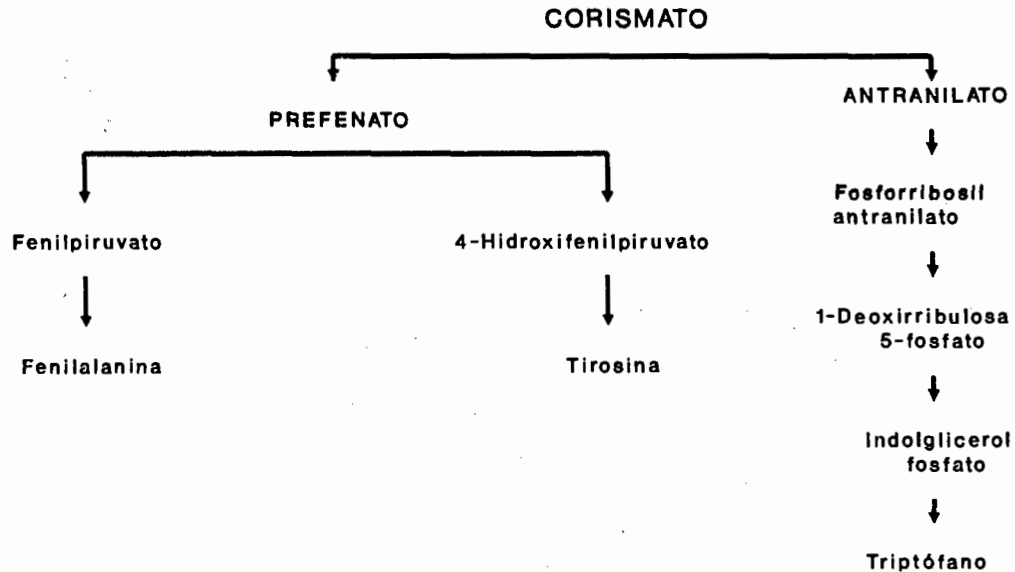


Vía específica de síntesis de triptofano

La biosíntesis de triptofano a partir del corismato procede en todos los organismos de acuerdo al esquema de la figura 2. Entre los diferentes géneros hay una marcada diversidad con respecto a la naturaleza molecular de las enzimas participantes en la vía y sus modos de regulación (Crawford, 1975).

Antranilato Sintetasa: En *E. coli* esta enzima cataliza la conversión de corismato y amonio a antranilato y piruvato. El amonio es generado "in situ" por el rompimiento del enlace amida de la glutamina. El gene que codifica la glutamina aminotransferasa, que canaliza el amonio hacia la síntesis de triptofano, se designa como *trpG*, aunque en realidad corresponde a una enzima bifuncional, que también cataliza la conversión de antranilato a fosforribosil antranilato (Ito y col., 1969; Ito y Yanosfsky, 1969).

Fig. 2 VIA ESPECIFICA DE SINTESIS DE AMINOACIDOS AROMATICOS



Antranilato fosforribosil transferasa: Esta proteína producto del gen *trpD*, es frecuentemente referida como antranilato sintetasa II, porque forma con la antranilato sintetasa un complejo tetramérico I₂-II₂. En *E. coli*, la fosforribosil transferasa es bifuncional; presenta 2 dominios estructurales, uno tiene actividad de amido transferasa y el otro cataliza la condensación de antranilato con el grupo ribosa-5-P del fosforribosil pirofosfato (Nichols y col., 1980). Ambos centros del componente II, son inhibidos por el producto final (triptofano), pero solo en el agregado tetramérico. Esto es atribuible a cambios conformacionales comunicados a todas las subunidades del agregado, después de la unión del triptofano al componente I, producto del gen *trpE*.

Fosforribosil antranilato isomerasa-indolglicerol fosfato sintetasa: El gen *trpC* codifica un polipéptido bifuncional que cataliza dos reacciones secuenciales, de fosforribosil antranilato a 1 (0-Carboxifenilamino) 1-Deoxirribulosa-5-fosfato y la descarboxilación y cerradura del anillo de este intermediario a indol-glicerol fosfato. Los dos centros activos son distintos y no se traslapan (Creighton, 1970). El dominio amino forma la indol glicerol fosfato sintetasa, mientras que el carboxilo del polipéptido forma el dominio isomerasa.

Triptofano sintetasa: Esta enzima es un tetrámero conteniendo dos subunidades alfa y dos subunidades beta. Cada subunidad sola cataliza una reacción parcial: La subunidad alfa producto del gen *trpA*, realiza la conversión reversible de indolglicerol fosfato a indol y gliceraldehído-3-fosfato, mientras que la subunidad beta (*trpB*) cataliza la condensación de indol y serina a triptofano (Miles y Moriguchi, 1979).

Regulación de la síntesis de triptofano

La regulación de la biosíntesis del triptofano en *E. coli* se da mediante dos mecanismos de control:

- 1.- Regulación de la expresión génica
- 2.- Regulación de la actividad enzimática

El primero de los mecanismos se realiza de dos maneras:

- A.- Represión
- B.- Atenuación:

A.- Represión: El operón del triptofano comprende un segmento de 7000 nucleótidos (fig. 3), los 5 genes de la vía se transcriben como un RNA mensajero policistónico, especialmente bajo condiciones de privación del aminoácido.

La iniciación de la transcripción en el promotor del triptofano es regulada por interacciones entre el represor y el operador (Zalkin y Yanofsky, 1974). Si el operador de triptofano, un fragmento de 22 pares de bases es ocupado por el represor, codificado por el gen *trpR*, la RNA polimerasa no puede iniciar la transcripción de los 5 genes estructurales. La unión del represor al operador es controlada por triptofano: Cuando cantidades suficientes de este efector están presentes, las interacciones operador-represor se favorecen; cuando el triptofano está ausente las interacciones represor-operador no ocurren.

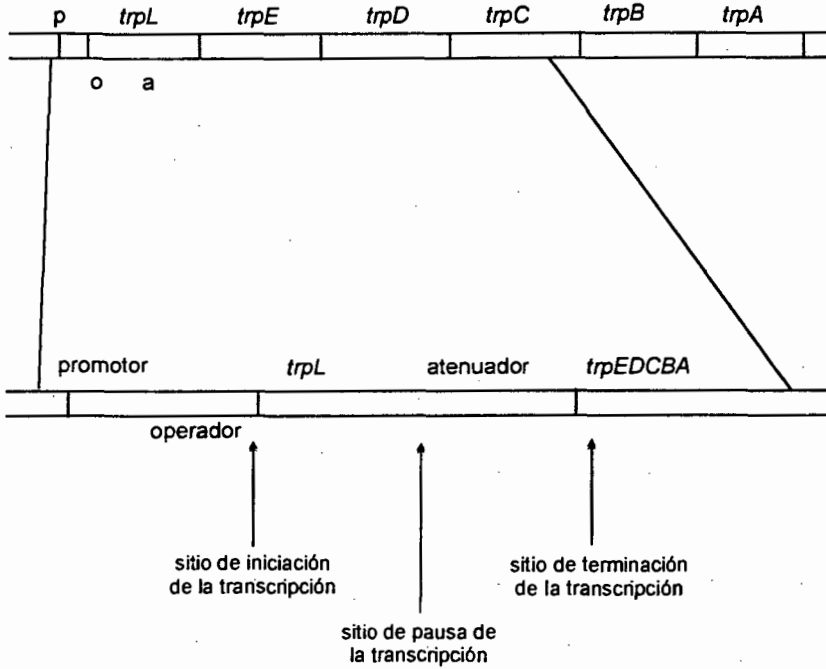


Fig. 3 Esquema del operón de *trp* de *E. Coli* que muestra los genes reguladores y estructurales. La iniciación de la transcripción es controlada en la región promotor-operador. La terminación de la transcripción es regulada en el atenuador (a), en una región de 162 pares de bases, llamada región líder, *trpL*.

B.- Atenuación: Aunque las interacciones represor-operador son cuantitativamente el más importante factor que gobierna la expresión del operón de triptofano, la atenuación funciona como un segundo control que influye fuertemente en la expresión de los genes (Yanofsky, 1981). La RNA polimerasa que inicia la transcripción en el promotor debe cruzar una región líder de 162 nucleótidos (*trpL*) antes de encontrar la secuencia que codifica al primer gen estructural. La región líder contiene un sitio potencial de terminación de la transcripción, proceso que dependerá del estado del tRNA. Cuando el RNAt no está cargado, la transcripción procede hasta el gen *trpE*, produciendo un RNAm policistronico. Cuando las células tienen niveles adecuados de triptofanil RNAt, la transcripción termina en la región líder.

2) Regulación de la actividad enzimática: La antranilato sintetasa es la enzima más regulada por producto final de la vía, en virtud de que posee un sitio de unión específico para triptofano, el efector de la regulación. En *E. coli* la afinidad de la antranilato sintetasa hacia triptofano esta sujeta a modificación genética. Se han caracterizado algunas mutaciones sin sentido que alteran positiva o negativamente los parámetros de unión de triptofano (Pabst y Somerville 1973). Las actividades de glutaminasa y fosforibosil transferasa pueden ser ambas inhibidas por triptofano, debido a que ocurren cambios conformacionales comunicados de la antranilato sintetasa a otros centros catalíticos.

Mutaciones que desensibilizan la antranilato sintetasa con respecto a la inhibición por triptofano, probablemente incrementan la unión de corismato; mutaciones que incrementan la unión de triptofano alostéricamente, disminuyen la de corismato.

Análogos de aminoácidos

Un amplio rango de análogos de aminoácidos han sido sintetizados o aislados en forma natural. Casi ninguna fase del metabolismo del triptofano hubiera podido ser conocida sin el uso de estos. Los análogos han permitido seleccionar mutantes regulatorias, las cuales presentan sobreproducción de aminoácidos.

Los mecanismos de acción de los análogos de aminoácidos pueden ocurrir a 3 niveles:

- 1).- El análogo, debido a su gran parecido estructural con el metabolito, actúa como un falso correpresor, impidiendo la transcripción de las enzimas biosintéticas y, en consecuencia la síntesis del aminoácido, aun a pesar de que las posas internas de la célula se encuentren con bajos niveles de este.
- 2).- Del mismo modo, el análogo puede actuar como un falso inhibidor por producto final, bloqueando la síntesis del aminoácido por unión a la enzima regulatoria.
- 3).- El análogo puede incorporarse en los péptidos y producir proteínas con baja o nula actividad catalítica. Sin embargo, este mecanismo es menos frecuente. Diferentes géneros, o aun diferentes especies dentro del mismo genero, pueden diferir en su habilidad para incorporar análogos a sus proteínas.

Producción de aminoácidos

El primer reporte de la producción de un aminoácido data de 1908 (Ikeda), en el cual se describe la preparación de glutamato de sodio a partir de algas marinas. Este trabajo condujo a la producción comercial de glutamato de sodio como un agente sasonador, a partir de hidrolizados ácidos de gluten de trigo o proteína de soya. En los siguientes 50 años la producción de aminoácidos fue sinónimo de producción de glutamato.

La producción de aminoácidos utilizando microorganismos fue inicialmente reportada para el ácido glutámico en el año 1957 y posteriormente de otros aminoácidos a través del uso de cepas silvestres o diversos tipos de mutantes de una gran variedad de microorganismos (Tabla 1). Mediante el uso de sistemas biológicos completos la síntesis puede ocurrir a partir de fuentes sencillas de nitrógeno y de carbono, pudiendo producir en forma comercial prácticamente todos los aminoácidos.

Cuando la importancia nutricional de aminoácidos distintos del glutamato fue descubierta, la demanda por estos se incremento y nuevos procesos para su producción fueron desarrollados, los cuales involucraban síntesis química o biológica. En el último caso se encuentran los procesos de producción fermentativa y enzimática.

Hoy en día, todas las clases de aminoácidos pueden ser manufacturados por estos 2 métodos o por hidrólisis clásica y refinamiento de proteínas naturales.

**TABLA 1. MICROORGANISMOS QUE
PRODUCEN TRIPTOFANO A PARTIR DE
PRECURSORES**

MICROORGANISMO	PRECURSOR
<i>Candida sp.</i>	Antranilato
<i>Hansenula anomala silvestre</i>	“ “
<i>Micrococcus varians</i>	“ “
<i>Escherichia coli trp-</i>	“ “
<i>Micrococcus luteus, M. lysodeikticus</i>	3-Indolpiruvato, (E)
<i>Sarcina lutea, Serratia marcescens</i>	“ “ “
<i>Bacillus megaterium</i>	“ “ “
<i>Escherichia coli</i>	“ “ “
<i>Aerobacter aerogenes</i>	“ “ “
<i>Pseudomonas sp.</i>	Acetil DL-trp, (E)
<i>Pseudomonas sp.</i>	D-trp

Usos de los aminoácidos

Los aminoácidos pueden ser usados como aditivos alimenticios, tal es el caso del glutamato, glicina, cisteína, D L-alanina. Otro importante uso es como suplemento alimenticio. El triptofano es un aminoácido esencial, el cual no se encuentra en la proteína vegetal (soya y maíz) en cantidades suficientes para soportar el crecimiento. Al igual que el triptofano, la treonina y lisina son utilizados como suplementos.

Los aminoácidos son usados terapéuticamente para propósitos nutricionales y farmacéuticos. Ejemplo de ello son las aplicaciones intravenosas que se realizan para suplir estos nutrientes antes y después de las operaciones quirúrgicas y, recientemente se realizan investigaciones con el triptofano para padecimientos mentales como la esquizofrenia y del alcoholismo (Bang, 1983).

Producción de triptofano

Los primeros procesos de producción industrial de triptofano se llevaron a cabo por síntesis química (Komachiya, 1961). Sin embargo, un gran número de métodos se desarrollaron durante los últimos años; entre los principales se encuentran: la fermentación directa y los métodos enzimáticos.

La producción de triptofano por fermentación directa se logró en 1972, con el uso de mutantes resistentes a 5-metil-triptofano en bacterias que producen glutamato (Shio y col., 1972), o en *Bacillus subtilis* (Shio y col., 1973). En *Corynebacterium glutamicum* también se han obtenido cepas productoras de triptofano, a partir de mutantes resistentes a análogos seleccionados de auxótrofos a tirosina y fenilalanina (Hagino y Nakayama, 1975). La auxotrofia como un mecanismo que incrementa la producción de triptofano fue reportada por Shio y col., en 1972, al parecer esto está relacionado con una mayor disponibilidad de corismato, precursor común de los 3 aminoácidos. La remoción de una(s) de las vías de los aromáticos, repercute directamente en la elaboración del (o de los) aminoácido(s) restante(s).

En *E. coli* se han utilizado técnicas de DNA recombinante para construir cepas sobreproductoras en la que se manejan varios genes relacionados con la producción de triptofano, tales como: *trpS*, *trpE*, *trpR*, *aroG*, *aroH*, *tyrR*, y *tna* (Tribe y Pittard, 1979; Aiba y col., 1982).

Otro enfoque utilizado para la producción de triptofano a sido el empleo de la triptofanasa, en células de *Proteus retgeri* se han obtenido 90 g/l de triptofano a partir de 60 g/l de indol y 80 g/l de piruvato (Nakazawa y Yamada, 1972). Recientemente se han obtenido notables incrementos en la producción de triptofano en *E. coli* con la aplicación de una triptofanasa que se expresa unas 500 veces más que en la cepa silvestre (Terasawa y col., 1990). Sin embargo, los costos de algunos aminoácidos siguen siendo elevados (Tabla 2), y su producción a gran escala, esta restringida a unos cuantos países desarrollados, por lo que el resto de ellos y la totalidad de los países subdesarrollados tienen que depender de los primeros en el suministro de estos aminoácidos. En nuestro país no existen empresas dedicadas a la producción y comercialización de estos productos, por lo que el desarrollo de un proceso de producción de triptofano propio es de gran importancia para terminar con la dependencia hacia los países desarrollados.

**TABLA 2. NIVELES DE PRODUCCION Y PRECIOS DE
VARIOS AMINOACIDOS OBTENIDOS COMERCIALMENTE**

AMINOACIDOS	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)

HIPOTESIS

En virtud de que la antranilato sintetasa es la única enzima funcional de la vía específica de triptofano. Se espera que una mutación a este nivel provoque una desregulación de la vía, con la subsecuente sobreproducción de triptofano. Es sabido que el 5-Fluoro-triptofano inhibe dicha enzima, por lo que el empleo de este análogo de triptofano nos permitirá seleccionar a las cepas mutantes

OBJETIVO GENERAL

**OBTENER UNA CEPA MEJORADA GENÉTICAMENTE
SOBREPRODUCTORA DE TRIPTOFANO A PARTIR
DE *Escherichia coli***

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- OBTENER A PARTIR DE LA CEPA BETA DE *Escherichia coli*, CEPAS MUTANTES RESISTENTES A 5-FLUORO-TRIPTOFANO Y SOBREPDUCTORAS DE TRIPTOFANO**
- 2.- EVALUAR ALGUNOS DE LOS PARAMETROS QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE TRIPTOFANO**

MATERIAL Y METODOS

Cepa bacteriana. Se utilizó cepa mutante BETA de *Escherichia coli* auxótrofa a fenilalanina y tirosina y resistente a 5-Metil-triptofano y Sulfagunidina (Fen-Tir-,5-MTr SGr), obtenida de la colección de microorganismos del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ).

Condiciones de cultivo. La cepa fue crecida en medio mínimo de Robinson, que contiene por litro: 4 gr de fosfato de potasio monobásico, 2.5 gr de sulfato de amonio neutralizado con NaOH a un pH 7.4, 0.1 gr de sulfato de magnesio y glucosa a una concentración del 1%. Esta se esterilizó por separado de las sales a 1.1 Kg/cm² durante 15 min. Además, los suplementos necesarios fueron agregados a una concentración final de 10 µg/ml.

A menos que otra cosa se indique la temperatura de incubación del microorganismo fue de 37°C y la agitación fue de 200 rpm.

Valoración del efecto de 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 BETA-1 en medio mínimo, hasta alcanzar una densidad 10⁸ cel/ml. A este cultivo se le adicionó 1 ml de una solución de 2 mg/ml de NTG y se incubó durante 5, 10 y 15 min a 37 °C (Sugimoto y Shiio, 1982). Posteriormente, se lavaron las células con medio mínimo sin aminoácidos y se realizó una dilución 1:10,000; de esta suspensión se tomaron 100 µl y se sembraron en cajas de medio mínimo. Una vez que crecieron, las colonias se cuantificaron y los datos obtenidos se usaron para establecer el tiempo de tratamiento que conduce a alrededor de un 10% de viabilidad, el cual fue de 15 min este tiempo se empleo para la obtención de mutantes.

Ensayo para determinar la concentración mínima inhibitoria. Previo a la mutación y selección en presencia del análogo (5-Fluoro-triptofano), se realizó un ensayo para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) del mismo sobre las cepas mutantes.

Se creció un inóculo de 5 ml en medio Robinson hasta alcanzar una densidad óptica de 1.0 a 590 nm. de esta suspensión celular se tomaron 100 μ l para sembrarlos en cajas de medio mínimo que contenían cantidades crecientes del análogo de 200 μ g/ml hasta 1400 μ g/ml con incrementos de 200 μ g.

El mismo procedimiento se realizó para la cepa parental. En las cajas con la menor concentración de análogo en que se observó nulo crecimiento se determinó que correspondía a la concentración mínima inhibitoria y usando esas concentraciones se seleccionaron a los posibles mutantes regulatorios.

Obtención de mutantes resistentes a 5-fluoro-triptofano. Se inoculó la cepa BETA en 10 ml de Robinson más fenilalanina y tirosina (10 μ g/ml) y se incubó por 12 horas; al cabo de este tiempo, se mutó con una solución de NTG (2 mg/ml), se tomaron 2 ml del cultivo, y las células se lavaron 2 veces con medio Robinson.

De esta suspensión se espatularon 50 μ l de células en cajas petri con medio mínimo las cuales contenían 1400 μ g/ml de 5-FT. Las cajas se incubaron de 4 a 5 días a 37 °C, después de lo cual aparecen las clonas mutantes.

Las colonias fueron aisladas y los niveles de producción de triptofano se evaluaron por los métodos que se describen a continuación.

Cinética de crecimiento y producción de triptofano de las cepas mutantes. Se inoculó una asada de cada cepa mutante en 10 ml de medio Robinson con su respectivo aminoácido y se incubó durante 12 horas. Al final de este período, se inocularon 4 ml de este preinóculo en un matraz de 250 ml, conteniendo 40 ml del medio mencionado; además, se adicionaron a los cultivos 40 μ l de rojo fenol (0.1 mg/ml) como indicador de pH. Las cepas fueron crecidas por 24 hr y se tomaron 3 ml de muestra cada 4 hr para

determinar:

- A) El crecimiento, midiendo la densidad óptica a 590 nm.
- B) La glucosa consumida.
- C) El triptofano excretado.

Para neutralizar la acidez del medio de cultivo, resultante de la fermentación, se ajustó el pH adicionando cada 2 horas cantidades variables de NaOH 2.5 M hasta lograr un color rosado, que corresponde a un pH aproximado de 7.4.

Determinación de glucosa. La determinación de la glucosa consumida durante la cinética de crecimiento y producción se realizó por el método del ácido dinitro salicílico (Miller, 1959), de la siguiente forma: Se tomó 1 ml de muestra de los cultivos y las células se sedimentaron en una centrífuga Eppendorff durante 2 minutos.

Se separó el sobrenadante de la pastilla celular y se adicionaron 0.5 ml del primero a un tubo de ensayo. Posteriormente, se agregaron 1.5 ml de solución de Acido dinitro salicílico (DNS) al 1.5% y se colocaron los tubos en baño maría en ebullición por 5 minutos; se dejó enfriar a temperatura ambiente e inmediatamente se agregaron 8 ml de agua destilada, agitándose hasta que la mezcla se homogenizara. Después se determinó la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer mod. D-7770. La cantidad de glucosa consumida se calculó por extrapolación con una curva estándar de 0.1 - 1.0 mg/ml.

Determinación de triptofano. El análisis de los sobrenadantes del medio de cultivo para la determinación de triptofano se realizó por medio de dos métodos:

- A) **Ensayo calorimétrico de Udenfriend y Peterson (1957) usando el p-dimetilaminobenzaldehído (DMBA).**

Se tomaron 0.5 ml de sobrenadante libre de células y se agregaron a un tubo de ensayo de 13x100 mm; enseguida se adicionaron 2.5 ml de DMBA al 0.5% en 12N de HCl y se incubó por 30 minutos en la obscuridad a temperatura ambiente. Después se agregaron

2.5 ml de alcohol absoluto y de 2 a 3 gotas de nitrito de sodio al 0.2% y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.

La densidad óptica del crómoforo azul resultante fue medida en un espectrofotómetro Perkin Elmer a 620 nm. Los estándares se prepararon de la misma manera y al mismo tiempo, agregando cantidades de una solución de triptofano, desde 20 a 180 $\mu\text{g/ml}$ con incrementos de 20 $\mu\text{g/ml}$.

B) Cromatografía en placa fina:

La cromatografía se realizó sobre placas de celulosa de 20 x 20 cm y 0.1 mm de espesor. Se colocaron alícuotas de 4 μl de la muestra 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 4:1:2. Se dejó correr durante 6 horas a temperatura ambiente. Las placas se secaron a 60 °C durante 1 minuto y enseguida se revelaron con una solución de ninhidrina 0.5% (w/v) en acetona, el color se desarrolló a 60 °C por 5 minutos.

Calculo del rendimiento en el producción de triptofano. El rendimiento (Y p/s): se define como los gramos producidos del metabolito en cuestión entre los gramos del sustrato consumidos de modo que:

$$Y_{p/s} = \frac{\text{gr de triptofano producidos}}{\text{gr de glucosa consumida}}$$

RESULTADOS

Determinación de la concentración mínima inhibitoria a 5-Fluoro-Triptofano

A fin de conocer la concentración mínima de 5-FT con la cual se inhibe el crecimiento de la cepa parental BETA, se cultivó a esta cepa en cajas con medio Robinson en presencia del análogo. La tabla 3 muestra el número de colonias después de 4 días de incubación, en concentraciones de 5-FT de 0 a 1400 $\mu\text{g/ml}$; la inhibición del crecimiento estuvo relacionada con la concentración del análogo, en una concentración de 1200 $\mu\text{g/ml}$, el crecimiento de las colonias fue inhibido casi completamente (solo 12 colonias) mientras que con 1400 $\mu\text{g/ml}$ del análogo, la inhibición del crecimiento bacteriano fue del 100%. Con estos resultados se pudo determinar que la concentración mínima inhibitoria con la cual se inhibe el crecimiento corresponde a una concentración de 1400 $\mu\text{g/ml}$ de 5-FT. Para futuros ensayos se utilizó la concentración de 1400 $\mu\text{g/ml}$, para la obtención de mutantes resistentes a 5-FT.

**TABLA 3 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION
MINIMA INHIBITORIA A 5-FLUORO TRIPTOFANO**

5-FT ($\mu\text{g/ml}$)	NUMERO DE COLONIAS
0-700	> 10 000
800	1000-3000
900	234
1000	45
1200	12
1400	0

Se inocularon 10 000 000 de células en cajas conteniendo el análogo en las cantidades señaladas. Después de 4 días de incubación las colonias se contaron. > Señala la presencia de mas de 10 000 células.

Obtención de mutantes resistentes a 5-FT

La cepa BETA fue sometida a mutagénesis con NTG como se describe en material y métodos. Una vez aisladas y purificadas las colonias, se realizaron cinéticas de crecimiento y producción de triptofano por 24 hr. Los sobrenadantes fueron utilizados para cuantificar el triptofano y la glucosa consumida. La figura 4 muestra los datos de producción de 9 mutantes analizadas, de estas, solo 3 presentaron una producción mayor que la cepa parental. En la tabla 4 se presentan los datos de crecimiento, producción de triptofano y rendimiento de las 3 mejores cepas obtenidas.

La cepa FT2 presentó la mejor producción de triptofano (526.2 $\mu\text{g/ml}$) y el mas alto rendimiento (0.119). Seguido por la cepa FT1 y FT11 con una producción de 367 y 324.3 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, mientras que los rendimientos fueron de 0.104 y 0.078 respectivamente. Al igual que ocurrió con la síntesis de triptofano la cepa FT2 mostró el mayor crecimiento (2.21 D.O.), mientras que en la cepa FT11 se observó la menor formación de biomasa (1.26 D.O.).

Se realizaron ensayos en cromatografía en capa fina de los sobrenadantes del medio de cultivo de las cepas mutantes obtenidas así como de la cepa parental. Todas las cepas mostraron en los cromatogramas una sola banda la cual coincidió con el estándar de triptofano, estos resultados demuestran claramente la condición de doble auxotrofia a fenilalanina y tirosina de las cepas obtenidas.

PRODUCCION DE L-TRIPTOFANO POR MUTANTES RESISTENTES A 5-FLUORO TRIPTOFANO

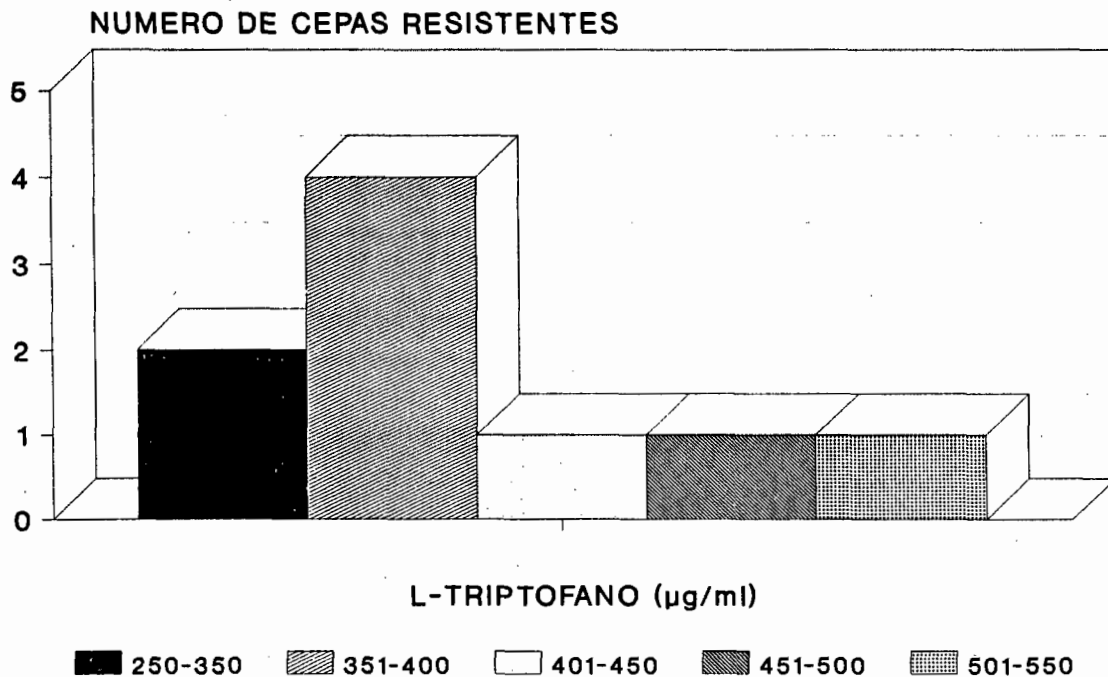


Fig.4 A cada cepa resistente a 5-FT se le determino la producción de triptofano en los sobrenadantes del medio de cultivo después de 24 hr de crecimiento

**TABLA 4 OBTENCION DE MUTANTES RESISTENTES
A 5-FLUORO TRIPTOFANO**

CEPA	CRECIMIENTO (D.O. 590 nm)	L-TRP ($\mu\text{g/ml}$)	GLUCOSA (g/l)	RENDIMIENTO (Yp/s)
FT1	1.86	367.0	3.51	0.104
FT2	2.21	526.2	4.39	0.119
FT11	1.26	324.3	4.15	0.078
BETA	1.50	248.2	4.50	0.082

*Las cepas fueron crecidas durante 24 horas en medio Robinson
suplementado con 10 $\mu\text{g/ml}$ de fenilalanina y tirosina*

Determinación de los parámetros de crecimiento y producción óptimos de las cepas sobreproductoras de triptofano.

Efecto de la fenilalanina y tirosina sobre el crecimiento y producción de triptofano.

Uno de los factores que más fuertemente influyen en el crecimiento y producción de triptofano es la concentración de fenilalanina y tirosina en el medio de cultivo, ya que el fenotipo de la cepa parental es auxótrofa a fenilalanina y tirosina. En la figura 5 se observa el crecimiento de la cepa BETA en tres concentraciones de fenilalanina y tirosina (5, 10 y 15 $\mu\text{g/ml}$). En las tres concentraciones de aminoácidos probadas se observó el mismo patrón de crecimiento. Los cultivos presentaron una fase logarítmica de crecimiento desde las 0 hasta las 12 hr; a partir de ese punto la velocidad específica de crecimiento disminuyó notoriamente (fig. 5). Existe una relación entre el crecimiento y la concentración de fenilalanina y tirosina, la mayor formación de biomasa se observó en los cultivos adicionados con 15 $\mu\text{g/ml}$ de aminoácidos (1.35 D.O.), seguido por la cepa incubada con 10 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en la condición de 5 $\mu\text{g/ml}$ la densidad óptica del cultivo fue de 0.93. Al igual que ocurrió con el crecimiento, se encontró una relación entre la concentración de fenilalanina y tirosina y la producción de triptofano.

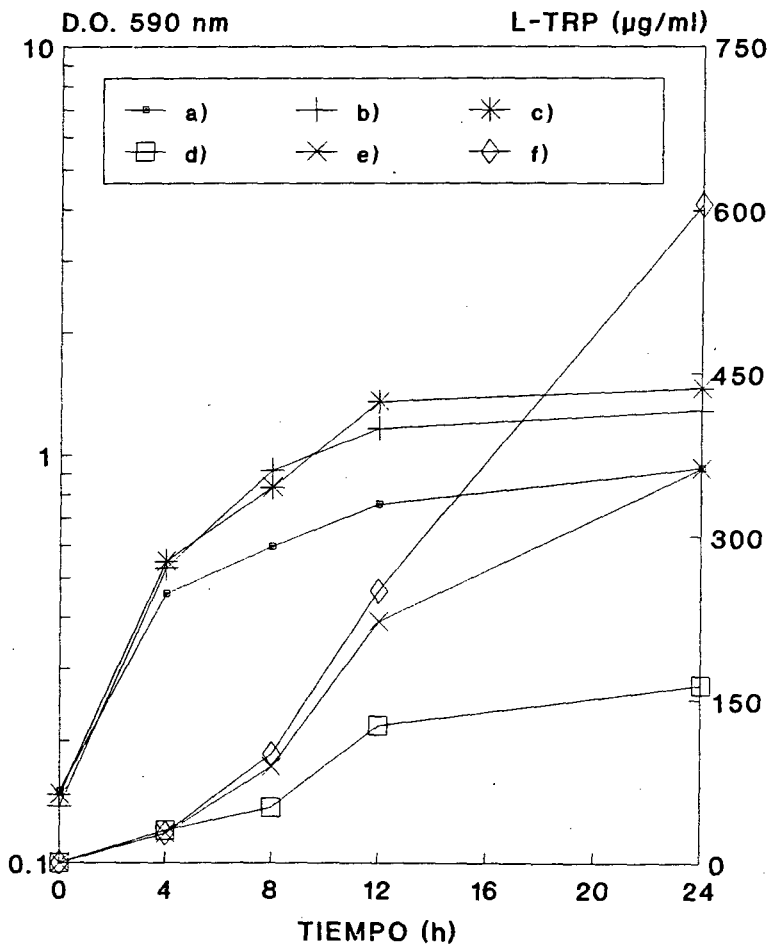


Fig.5 Efecto de fenilalanina y tirosina sobre el crecimiento y la producción de L-trp por la cepa Beta. Las células se cultivaron como se describe en Material y Métodos. Cada 4 hr se tomaron muestras para medir el crecimiento (a,b,c) y la producción de triptofano (d,e,f) en presencia de 5 (a,d), 10 (b,e) y 15 (c,f) µg/ml de fenilalanina y tirosina

La mas alta síntesis de triptofano se dio en los cultivos suplementados con 15 $\mu\text{g/ml}$ de fenilalanina y tirosina (605 $\mu\text{g/ml}$), y a una concentración de 10 y 5 $\mu\text{g/ml}$ la producción del aminoácido alcanzó los 362 y 163 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (tabla 5). Al analizar la gráfica podemos concluir que la etapa donde ocurre la mayor síntesis de triptofano es en las ultimas 12 hr del ensayo, mientras que en las primeras 12 hr se alcanzaron las más altas densidades celulares. La figura 6 y la tabla 5 muestran el efecto de fenilalanina y tirosina sobre el crecimiento de la cepa FT1 en las 3 concentraciones de aminoácidos indicadas. La cepa mutante presentó una fase de crecimiento constante durante las 24 hr de cinética, donde las concentraciones mas altas de suplemento (15 y 10 $\mu\text{g/ml}$) incrementaron la producción de biomasa obteniendo 2.72 y 2.08 densidades ópticas respectivamente; y a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ el crecimiento celular disminuyó notablemente a 0.831 D.O. Respecto a la producción de triptofano se observa en la gráfica que a partir de las 12 horas de cinética se hace evidente el efecto de la alta concentración de fenilalanina y tirosina en el medio de cultivo, de tal manera que al cabo de 24 hr de incubación la concentración de triptofano fue de 448, 303 y 131 $\mu\text{g/ml}$, con 15, 10 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de suplemento respectivamente (tabla 5). Al observar la gráfica se puede concluir que las altas concentraciones de fenilalanina y tirosina favorecen tanto el crecimiento celular como la producción de triptofano. La cepa FT2 presentó un comportamiento muy interesante en lo que respecta al crecimiento y la producción de triptofano (fig. 7).

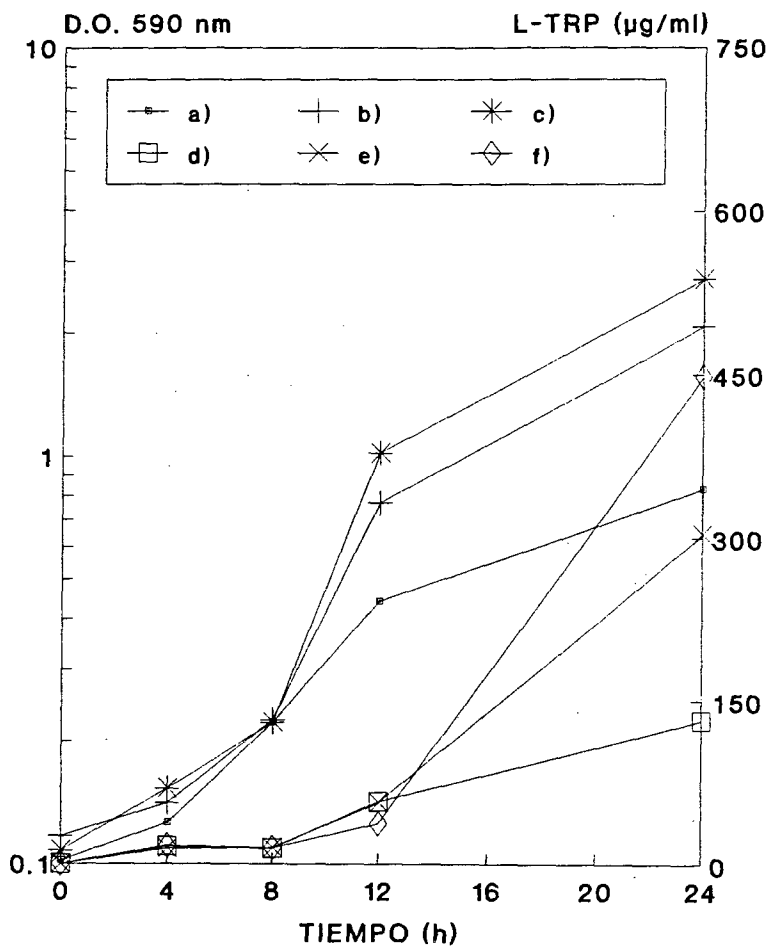


Fig.6 Efecto de fenilalanina y tirosina sobre el crecimiento y producción de L-trp por la cepa FT1. Las células se cultivaron como se describe en material y métodos. Cada 4 horas se tomaron muestras para medir el crecimiento (a,b,c) y la producción de triptofano (d,e,f) en presencia de 5 (a,d); 10 (b,e) y 15 (c,f) µg/ml de fenilalanina y tirosina

En las 3 condiciones probadas esta cepa presentó una fase logarítmica de crecimiento de las 0 a 8 hr seguida por una fase de notable disminución en el crecimiento, la cual continuó hasta el final del ensayo. A una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ de suplemento el crecimiento celular alcanzó 1.33 D.O. seguido por la cepa cultivada con 10 $\mu\text{g/ml}$ (1.72 D.O.) y la mas alta densidad celular fue observada en los cultivos con 15 $\mu\text{g/ml}$ de fenilalanina y tirosina (1.96 D.O.) (tabla 5). El mismo efecto proporcional de la concentración de aminoácidos observado en el crecimiento, se manifestó en la síntesis de triptofano. La mas alta velocidad de síntesis de triptofano sucedió a partir de las 8 hr de cinética en los cultivos suplementados con 15 $\mu\text{g/ml}$ de fenilalanina y tirosina produciendose 757 $\mu\text{g/ml}$ del aminoácido; en los cultivos con 10 $\mu\text{g/ml}$ de suplemento la síntesis de triptofano fue constante desde las 4 hr hasta el final del ensayo, secretandose 512 $\mu\text{g/ml}$ del aminoácido; a diferencia de la cepa incubada con 5 $\mu\text{g/ml}$ de fenilalanina y tirosina donde a partir de las 12 hr de cinética la sobresíntesis de triptofano alcanzó los 206 $\mu\text{g/ml}$ y se mantuvo en ese estado hasta el final de la prueba. En la gráfica de la figura 8 se muestran los efectos que surten las 3 condiciones de suplemento sobre la cepa FT11. Como puede observarse la cepa mutante presenta patrones similares de crecimiento celular y producción de triptofano a las cepas anteriores, esto es, a menor concentración de fenilalanina y tirosina menor producción de biomasa y de triptofano; a mayor concentración de suplemento, mayor crecimiento celular y síntesis de triptofano.

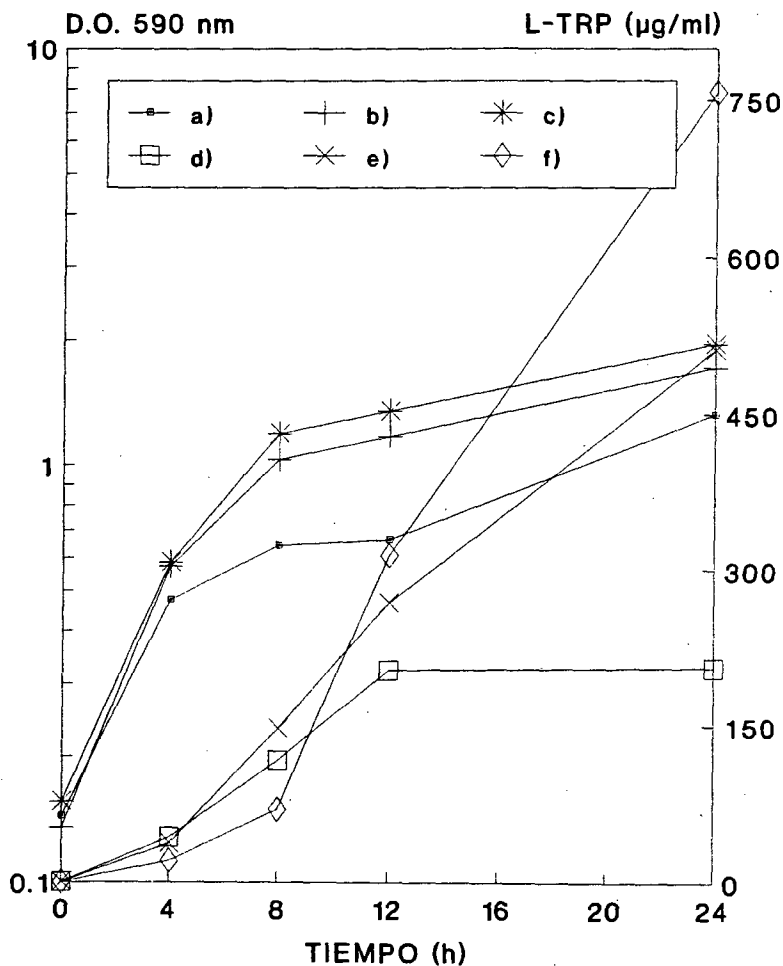


Fig.7 Efecto de fenilalanina y tirosina sobre el crecimiento y la producción de L-trp por la cepa FT2. Las células se cultivaron como se describe en Material y Métodos. Cada 4 hr se tomaron muestras para medir el crecimiento (a,b,c) y la producción (d,e,f) en presencia de 5 (a,d) 10 (b,e) y 15 (c,f) µg/ml de fenilalanina y tirosina.

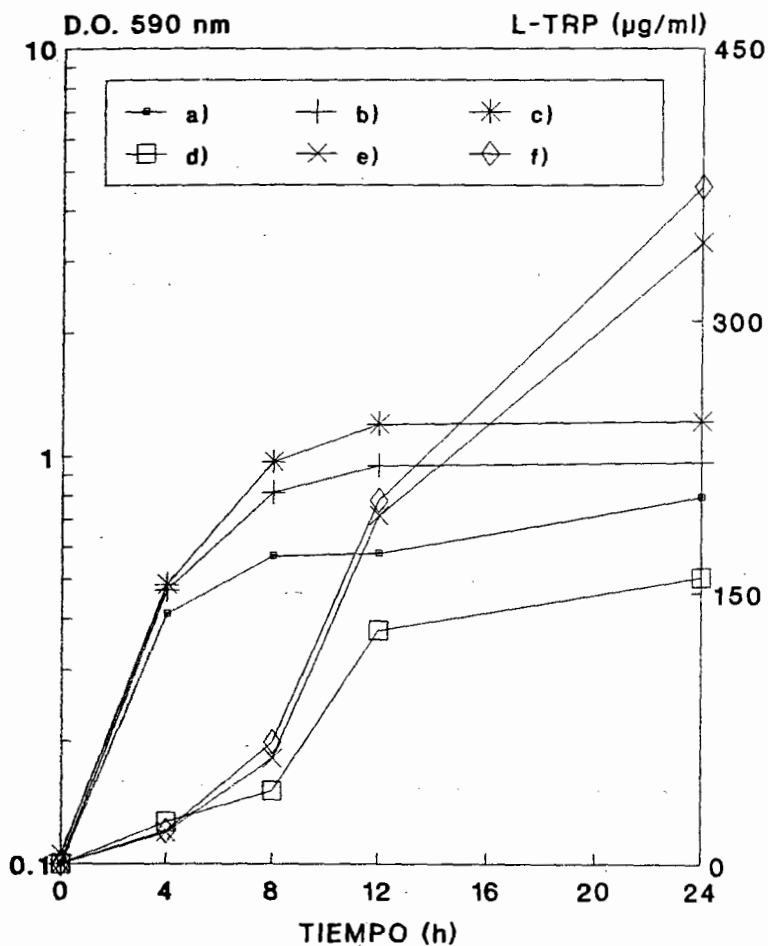


Fig.8 Efecto de fenilalanina y tirosina sobre el crecimiento y producción de L-trp por la cepa FT11. Las células se cultivaron como se describe en Material y Métodos. Cada 4 hr tomaron muestras para medir el crecimiento (a,b,c) y la producción de triptofano (d,e,f) en presencia de 5 (a,d) 10 (b,e) y 15 (c,f) µg/ml de fenilalanina y tirosina

Los resultados de ambas determinaciones fueron inferiores a las cepas anteriormente analizadas (tabla 5). En lo que respecta al consumo de glucosa como fuente de carbono, se puede apreciar en la tabla 5 en términos generales, que este no fue superior al 50% ; los mas altos rendimientos fueron alcanzados por la cepa FT1 a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de fenilalanina y tirosina (0.25) y con 5 $\mu\text{g/ml}$ fue de 0.21, seguido por la cepa FT2 con un rendimiento de 0.15 a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de suplemento. Así mismo se resumen los datos de crecimiento, producción, glucosa consumida y rendimiento de las cepas mutantes analizadas, en las distintas concentraciones de aminoácidos utilizadas. Por último es preciso mencionar que la cepa FT2 obtuvo un incremento del 25% en la producción de triptofano con respecto a la cepa parental bajo una concentración de 15 $\mu\text{g/ml}$ de fenilalanina y tirosina.

TABLA 5 EFECTO DE FENILALANINA Y TIROSINA SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE TRIPTOFANO

CEPAS		CRECIMIENTO (D.O. 590 nm)	L-TRP ($\mu\text{g/ml}$)	GLUCOSA* (g/l)	RENDIMIENTO (Yp/s)
BETA	a	0.93	163.4	2.5	0.06
	b	1.28	362.5	5.0	0.07
	c	1.35	605.2	6.7	0.09
FT1	a	0.83	131.9	0.6	0.21
	b	2.08	303.4	1.2	0.25
	c	2.72	448.3	4.5	0.09
FT2	a	1.33	206.0	4.1	0.05
	b	1.72	512.0	3.4	0.15
	c	1.96	757.8	5.4	0.14
FT11	a	0.79	158.5	1.9	0.08
	b	0.97	342.5	4.0	0.08
	c	1.22	373.9	5.1	0.07

Las cepas fueron crecidas en medio Robinson durante 24 horas, bajo 3 concentraciones de fenilalanina y tirosina: a) 5; b) 10; c) 15 $\mu\text{g/ml}$. Finalizada la incubación se cuantificó: crecimiento, producción de triptofano, glucosa consumida () y rendimiento.*

Efecto del pH sobre el crecimiento y producción de triptofano.

Otro de los factores analizados fue el efecto del pH; para ello, las cepas fueron crecidas en 3 condiciones distintas de pH, 6.5, 7.0 y 7.4. El ajuste de pH se realizó cada 2 horas mediante la adición de NaOH durante las primeras 12 horas.

La figura 9 muestra el efecto del pH sobre la cepa parental BETA en las 3 condiciones de pH examinadas, en los 3 casos se observó una fase de crecimiento logarítmico durante las primeras 8 hr, a partir de ese punto, la formación de biomasa se vio afectada por el pH, donde la mas alta densidad celular fue alcanzada a un pH de 7.0 (3.66 D.O.), seguida por los cultivos con un pH de 7.4 (2.14 D.O.) y de 1.5 D.O. en los cultivos con un pH de 6.5 (tabla 6).

La mas alta producción de triptofano fue obtenida por los cultivos crecidos a un pH de 7.4 (418 $\mu\text{g/ml}$); con un pH de 7.0 la formación del aminoácido disminuyó a 399 $\mu\text{g/ml}$, seguido por los cultivos con un pH de 6.5 en los que se cuantificaron 248 $\mu\text{g/ml}$ del aminoácido. En la figura 10 se puede observar el efecto del pH sobre el crecimiento de la cepa FT1. La fase logarítmica de crecimiento se presentó desde el inicio hasta las 8 hr del ensayo, seguida por una fase con una velocidad de crecimiento lenta pero sostenida hasta el final de la cinética. Los cultivos presentaron ligeras diferencias para la formación de biomasa en las 3 condiciones de pH analizadas, la mas alta densidad celular se presentó en los cultivos condicionados a un pH de 7.0 (2.4 D.O.) seguida por los cultivos con un pH de 7.4 y 6.5 respectivamente.

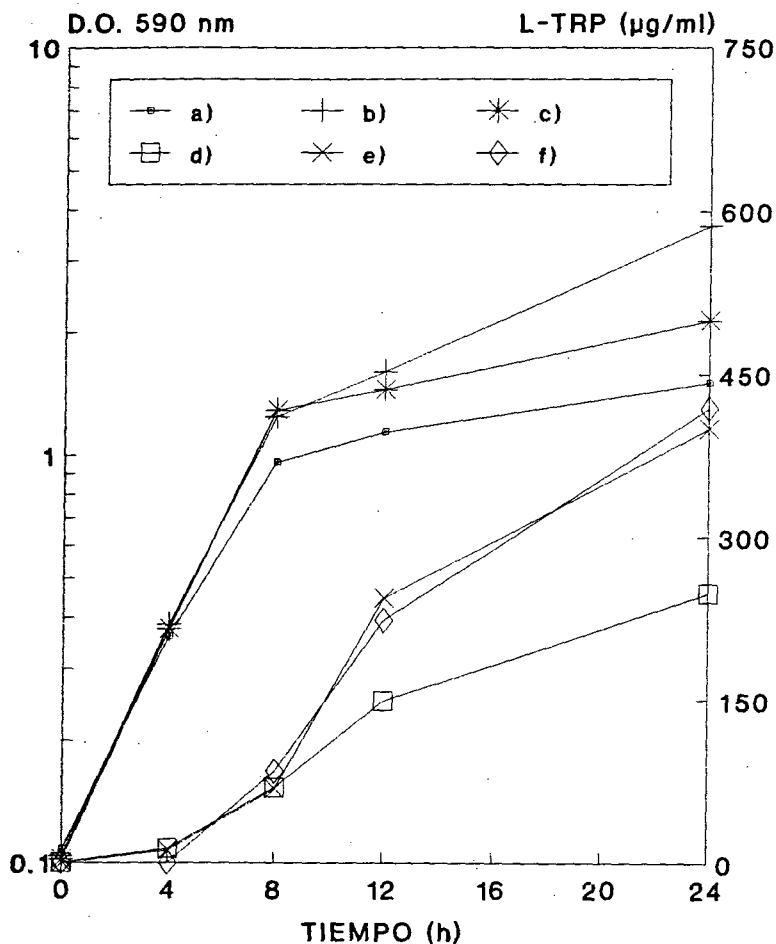


Fig.9 Efecto del pH del medio sobre el crecimiento y producción de L-trp por la cepa Beta. Las células se cultivaron como se describe en Material y Métodos. Cada 4 hr se tomaron muestras para medir crecimiento (a,b,c) y la producción de triptofano (d,e,f); bajo 3 condiciones distintas de pH (a,d) 6.5, (b,e) 7.0 y (c,f) 7.4.

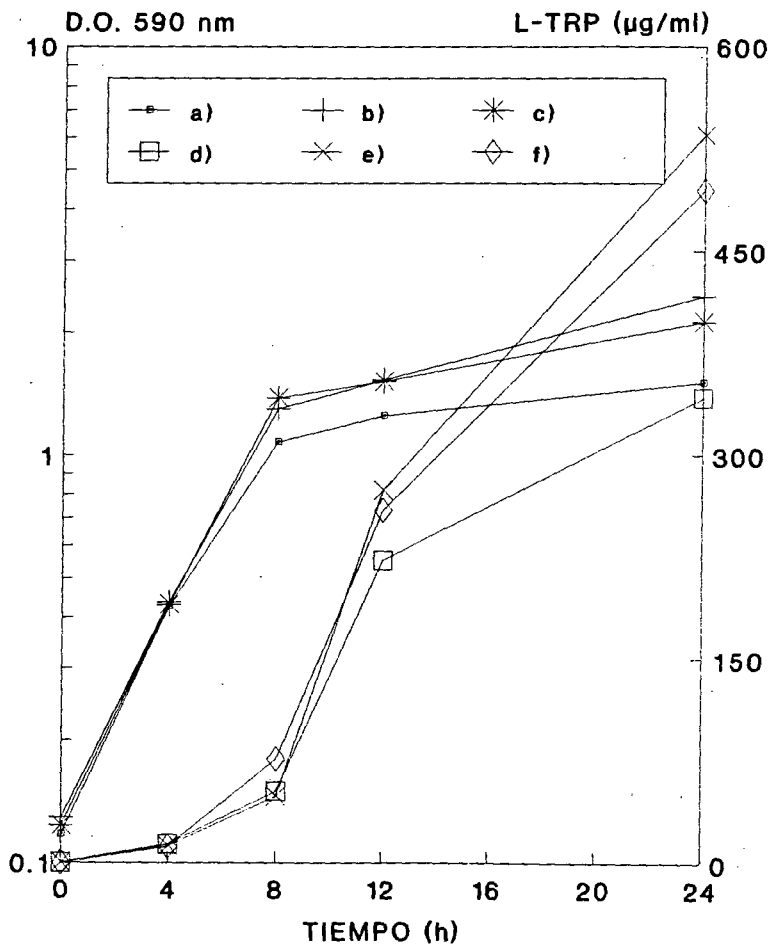


Fig.10 Efecto del pH del medio sobre el crecimiento y producción de L-trp por la cepa FT1. Las células se cultivaron como se describe en Material y Métodos. Cada 4 hr se tomaron muestras para medir el crecimiento (a,b,c) y la producción de triptofano (d,e,f). Bajo 3 condiciones distintas de pH (a,d) 6.5, (b,e) 7.0 y (c,f) 7.4

La síntesis de triptofano se vio incrementada a partir de las 8 hr del ensayo y fue afectada favorablemente en los cultivos condicionados a un pH 7.0 sintetizando 534 $\mu\text{g/ml}$ del aminoácido. Los cultivos con un pH de 7.4 y 6.5 disminuyeron su producción a 494 y 342 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (tabla 6). Al igual que la cepa anterior, las mas altas densidades celulares se alcanzaron en las primeras 8 hr, mientras que la síntesis de triptofano se incrementó significativamente después de ese tiempo.

La cepa FT2 presentó alta formación de biomasa (fig. 11) en las 3 condiciones de pH analizadas representadas por un crecimiento exponencial durante las primeras 8 hr de la prueba.

A partir de las 8 hr de cinética, los cultivos incubados a un pH de 6.5 alcanzaron un alto crecimiento celular (3.78 D.O.), seguidos por los cultivos con un pH de 7.0 (2.7 D.O.) y la menor densidad por los cultivos con un pH de 7.4 (tabla 6). El efecto que ejerció el pH sobre la producción de triptofano, fue exponencial en los cultivos sometidos a un pH de 7.0 y 6.5 sintetizando 632 y 624 $\mu\text{g/ml}$ de triptofano respectivamente y en menor cantidad en los cultivos con un pH de 7.4 (554 $\mu\text{g/ml}$). En la gráfica se puede observar que no existe una relación concreta entre determinado pH de un cultivo y la producción de biomasa y de triptofano.

La figura 12 muestra el efecto del pH sobre el crecimiento y producción de triptofano de la cepa FT11 en las 3 condiciones de pH analizadas, la fase logarítmica de crecimiento inició a las 0 hr y continuo hasta las 8 hr, a partir de este tiempo el crecimiento disminuyó sensiblemente y se mantuvo así hasta el final del ensayo.

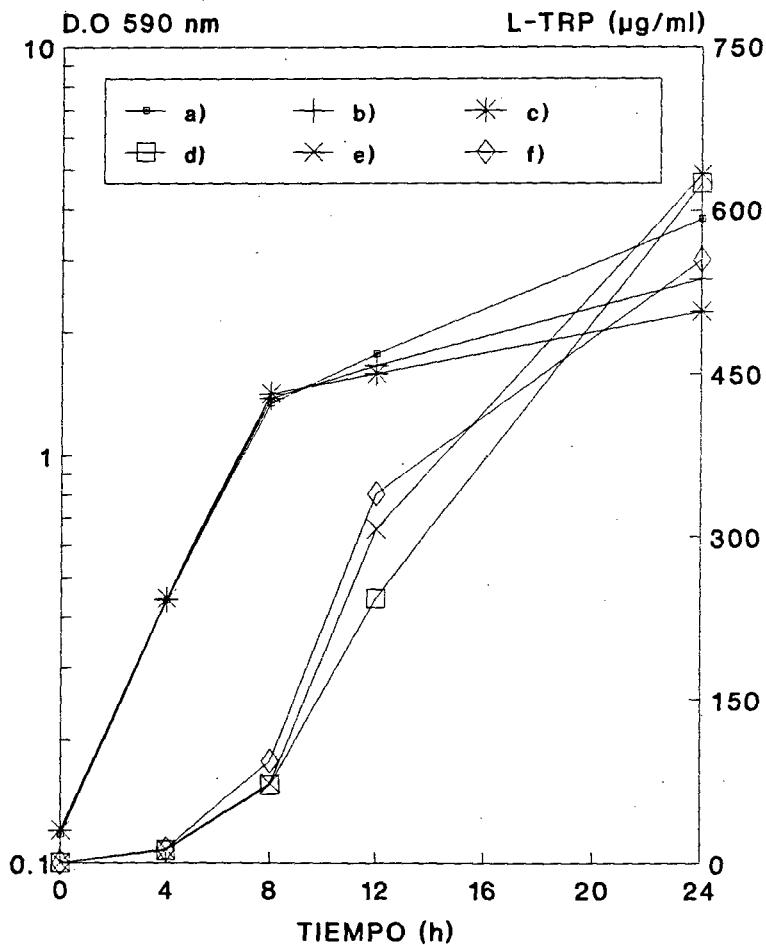


Fig.11 Efecto del pH del medio sobre el crecimiento y producción de L-trp por la cepa FT2. Las células se cultivaron como se describe en Material y Métodos. Cada 4 hr se tomaron muestras para medir el crecimiento (a,b,c) y la producción de triptofano (d,e,f). Bajo 3 condiciones distintas de pH (a,d) 6.5, (b,e) 7.0 y (c,f) 7.4

El mayor nivel de crecimiento lo obtuvieron los cultivos incubados con un pH de 7.4 (1.63 D.O.), seguidos por los cultivos con un pH de 7.0 y de 6.5 finalmente. Sin embargo, los mas altos niveles de producción de triptofano los obtuvieron los cultivos condicionados a un pH de 6.5 sintetizando 354 $\mu\text{g/ml}$ y de 315 y 306 $\mu\text{g/ml}$ del aminoácido con un pH de 7.4 y 7.0 respectivamente. Los mejores rendimientos bajo las diferentes condiciones de pH fueron obtenidos por la cepa FT2 cultivada con un pH de 7.4 y de 7.0 (0.13 y 0.12) respectivamente, seguido por la cepa FT1 con un pH de 6.5 (0.11). En la Tabla 6 se muestra en resumen los datos de crecimiento, producción, consumo de glucosa y rendimiento de las cepas mutantes resistentes a 5-fluoro-triptofano a diferentes concentraciones de pH.

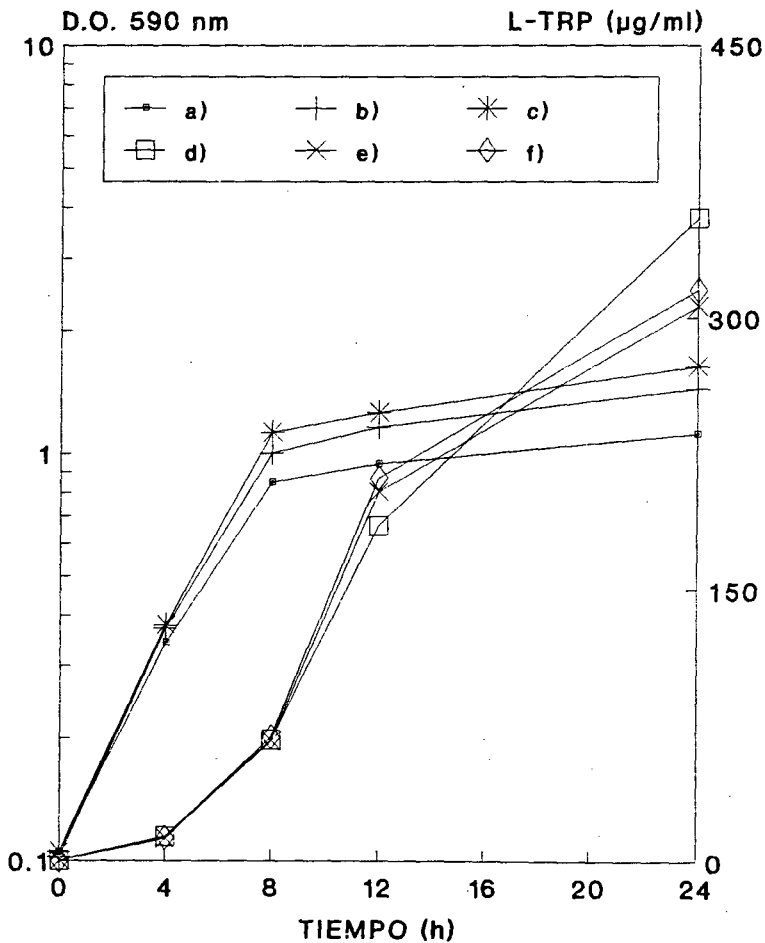


Fig.12 Efecto del pH del medio sobre el crecimiento y producción de L-trp por la cepa FT11. Las células se cultivaron como se describe en Material y Métodos. Cada 4 hr se tomaron muestras para medir el crecimiento (a,b,c) y la producción de triptofano (d,e,f). Bajo 3 condiciones distintas de pH (a,d) 6.5, (b,e) 7.0 y (c,f) 7.4

TABLA 6 EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE TRIPTOFANO

CEPA		CRECIMIENTO (D.O. 590 nm)	L-TRP ($\mu\text{g/ml}$)	GLUCOSA* (g/l)	RENDIMIENTO (Yp/s)
BETA	a	1.51	248.24	3.0	0.082
	b	3.66	399.60	7.1	0.056
	c	2.14	418.44	6.0	0.069
FT1	a	1.50	342.11	3.1	0.110
	b	2.46	534.72	5.8	0.092
	c	2.12	494.12	4.5	0.109
FT2	a	3.78	624.69	6.2	0.100
	b	2.7	632.16	5.0	0.160
	c	2.25	554.20	4.1	0.135
FT11	a	1.11	354.77	3.6	0.098
	b	1.44	306.77	5.2	0.058
	c	1.63	315.15	5.3	0.059

Las cepas fueron crecidas en medio Robinson con fenilalanina y tirosina a 15 $\mu\text{g/ml}$, durante 24 horas el ajuste de pH se realizó cada 2 horas bajo 3 condiciones distintas: a) 6.5, b) 7.0 y c) 7.4. Al finalizar la incubación se determinó: crecimiento, producción de triptofano, glucosa consumida () y rendimiento.*

DISCUSION

La aplicación de la auxotrofia data de 1950, en cepas de *E. coli* auxótrofas a fenilalanina (Davis, 1950) cuyo reconocido mecanismo induce a la sobreproducción de aminoácidos y está relacionado con una mayor disponibilidad de corismato, precursor común de los aminoácidos aromáticos; la falta de aminoácidos en el sistema metabólico de la célula desencadena la alteración en la regulación, que normalmente se ejerce sobre la DAHP sintetasa, enzima regulatoria de la vía común, con el resultante incremento en la sobreproducción de corismato.

Mecanismos de resistencia a 5-fluoro-triptofano.

En 1965, Ito y Crawford describieron la aplicación de 5-FT, análogo de triptofano, como herramienta para seleccionar mutantes que tenían la particularidad de sobreproducir a este aminoácido. Desde entonces, el uso de análogos ha sido la principal estrategia que se ha empleado para la obtención de mutantes con capacidad de producir niveles elevados de aminoácidos. Debido a su parecido estructural del 5-FT con el triptofano, aquel actúa como un falso correpresor y un falso coinhibidor por producto final; esto permite seleccionar mutantes alterados en la regulación.

El proceso mutagénico inicial con NTG y la subsecuente aplicación de 5-FT alteran los mecanismos regulatorios de la síntesis de triptofano, sobreproduciendo este, y al ser acumulado intracelularmente es secretado al medio, posiblemente mediante un proceso de expulsión que es activado energéticamente por una ATPasa localizada en la membrana bacteriana, por un mecanismo similar al que ocurre con los metales pesados (Silver, 1989).

Así mismo, la resistencia al análogo permitió seleccionar mutantes con incrementada actividad en la antranilato sintetasa, la cual fue desregulada por el evento mutagénico, con la subsecuente sobreproducción de triptofano.

Dichos resultados sugieren la presencia de al menos 2 mecanismos de control, los cuales aparentemente fueron alterados o removidos por las mutaciones sucesivas a las que fueron sometidas las cepas de *E. coli*.

1.- El primero es, sobre la DAHP sintetasa. Esta enzima alostérica es controlada por el mecanismo de represión enzimática y por el de inhibición por producto final, en la que fenilalanina y tirosina actúan como correpresores y como inhibidores de la actividad enzimática. Al no estar presentes estos 2 aminoácidos en el esquema metabólico de la célula, trae como consecuencia la liberación de la represión y de la inhibición con el resultante aumento de corismato. Por otro lado la alta producción de triptofano observada en concentraciones de 15 $\mu\text{g/ml}$ de fenilalanina y tirosina por la cepa FT-2, nos sugiere una insensibilidad a inhibición de la DAHP sintetasa por sus productos finales (fenilalanina y tirosina).

2.- Las mutaciones de resistencia a los análogos 5-MT y 5-FT desensibilizan a la primera enzima de la vía específica del triptofano y única sujeta a regulación, la Antranilato Sintetasa, de tal manera que el sitio regulatorio dentro de la enzima ya no es reconocido por su efector (triptofano) lo que ocasiona un aumento en la síntesis de triptofano.

Efecto de fenilalanina y tirosina sobre la producción de triptofano.

Los resultados del presente trabajo ponen de manifiesto que los mutantes resistentes a 5-FT obtenidos, sobreprodujeron triptofano y este fue sintetizado preferentemente en altas concentraciones de fenilalanina y tirosina (15 $\mu\text{g/ml}$) efectores que regulan la biosíntesis del precursor común, el corismato. Tanto la cepa parental BETA como las cepas mutantes derivadas de esta, mostraron una mayor síntesis de triptofano en altas concentraciones de fenilalanina y tirosina (15 $\mu\text{g/ml}$), este resultado nos indica una posible alteración en la enzima DAHP sintetasa la cual le permitió tolerar concentraciones de aminoácidos elevadas a diferencia de lo observado con las cepas antecesoras de estas (Ramírez y col, 1994), las cuales fueron inhibidas en presencia de 15 $\mu\text{g/ml}$ de fenilalanina. Evidentemente estas cepas poseen una DAHP sintetasa con una mayor sensibilidad a inhibición a fenilalanina que la observada con las cepas obtenidas en este trabajo.

Efecto del pH sobre la producción de triptofano.

Las condiciones óptimas de pH para la mayor producción de triptofano no fueron claramente determinadas, pero se observó que existe un rango entre 7.0 y 7.4 en el que le son más favorables, tal comportamiento presupone la flexibilidad o capacidad del microorganismo para adaptarse al medio en el que se reproduce, aunado a la concentración óptima de suplemento suministrado que fue de 15 $\mu\text{g/ml}$.

Los resultados observados en las cepas mutantes FT2 y FT11 demuestran que no existe una relación precisa entre el pH de los cultivos y el crecimiento y síntesis de triptofano, evidentemente estas cepas poseen una gran capacidad adaptativa para desarrollarse entre ambientes cambiantes de pHs ácidos (6.0) y alcalinos (8.0), (Tabor, 1985; Bang, 1983). Sin embargo la cepa parental BETA al igual que la cepa FT1 no mostraron el mismo patrón de tolerancia a pH de 6.5, en estas condiciones tanto el crecimiento como la síntesis de triptofano se vieron inhibidas, la acidificación del medio observada muy probablemente este afectando el pH interno de la célula, a pesar de que *E. coli* posee mecanismos que amortiguan cambios de pH (Booth, 1985), desconocemos cual o cuales son los mecanismos que indujeron la tolerancia a pH de 6.5 de las cepas FT2 y FT11 en comparación con lo observado por las cepas BETA y FT1, probablemente algún cambio a nivel de la permeabilidad de la membrana o mas directamente alguna mutación en los genes clave de la vía de síntesis de triptofano, lo cual le permitió a la célula sintetizar enzimas que funcionan en un rango de pH mas amplio.

CONCLUSIONES

1.- Los análogos de aminoácidos permitieron seleccionar mutantes que se encuentran alterados en la regulación de la vía de triptofano, lo que repercutió en la sobreproducción de este.

2.- La concentración de fenilalanina y tirosina fue crítica para la síntesis de triptofano, cantidades de estos aminoácidos inferiores a 15 $\mu\text{g/ml}$ disminuyen tanto el crecimiento como la producción.

3.- El pH fue un factor fundamental en la síntesis de triptofano durante las cinéticas de producción; el pH óptimo para la síntesis de triptofano fue entre 6.5 - 7.4 para la cepa FT2, mientras que para la cepa parental BETA el rango de pH fue un poco más estrecho entre 7.0 y 7.4.

BIBLIOGRAFIA

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

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

Bang, W-G. Lang, S. Sahm, H. Wagner, F. (1983). Production of L-tryptophan by *Escherichia coli* cell. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXV, pp. 999-1011.

Booth, I. R. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria *Microbiol. Reviews.* 49 (4) :359-378.

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.

Creighton, T. E. (1970). N-(5'-phosphoribosyl) antranilate isomerase-indol-3-ylglycerol phosphate synthetase of tryptophan biosynthesis. *Biochem. J.* 120: 699-707.

Davis, B. D. (1950). Citado en: Amino acids: Biosynthesis and genetic regulation (Herrmann, K.M. and Somerville, R.L. eds) pp 405-429. Addison-Wesley Publishing Company. 1983.

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*. *Biochim. Biophys. Acta* 104: 377-389.

Hagino, H. and Nakayama, J. (1975). L-tryptophan production by analog-resistant mutants derived from a phenylalanine and tyrosine double auxotroph of *Corynebacterium glutamicum*. *Agr. Biol. Chem.* 39: 343-349.

Ikeda, K. (1968). Citado en: Amino acids: Biosynthesis and genetic regulation. (Herrman, K.M. and Somerville R. L. eds.) pp 405-429.

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

Ito, J and Yanofsky, C. (1969). Antranilate 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.

Ito, J.; Cox, C. E.; and Yanofsky, C. (1969). Anthranilate synthetase, an enzyme specified by the tryptophan operon of *Escherichia coli*: purification and characterization of component I. *J. Bacteriol.* 97 (2) : 725-733.

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

Miles, E. W. and Moriguchi, M. (1979). *Advances in Enzimology* vol. 49 pp. 127-186, John Wiley and Sons, New York.

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

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.

Nichols, B. P.; van Cleemput, M. and Yanofsky, C. (1980). Nucleotide sequences of the *trpG* regions of *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium* and *Serratia marcescens*. *J. Mol. Biol.* 142: 503-517.

Pabst, M. J. 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.

Ramirez, C. J. (1994). Tesis de Maestria. Aislamiento y caracterización de mutantes de *Escherichia coli* sobreproductoras de triptofano.

Shio, I.; Ishii, K. and Nokozeiki, K. (1973). Production of L-tryptophan by 5-fluorotryptophan resistant mutants of *Bacillus subtilis*. *Agr. Biol. Chem.* 37 (9): 1991-2000.

Shio, I.; Sato, H. and Nakagawa, M. (1972). L-tryptophan production by 5-methyl tryptophan-resistant mutants of glutamate-producing bacteria. *Agr. Biol. Chem.* 36: 2315-2322.

Silver, S., G. Nucifora, L. Chu y T. K. Misra (1989). Bacterial resistance ATPases: Primary pumps for exporting toxic cations and anions. *Trends in Biochemical Sciences.* Vol. 14, pp. 76-80.

Smith, L. C.; Ravel, J. M. and Sheve, W. (1962). The control of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthesis by phenylalanine y tyrosine. *J. Biol. Chem.* 237: 3566-3570.

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.

Sugimoto, I. and Shiio I. (1982). Tryptohan Synthase and production of L-Tryptophan in regulatory mutants. *Agric. Biol. Chem.* 46 (11): 2711-2718

Tabor, C. W. and Tabor, H. (1985). Polyamines in microorganisms. *Micro. Rev.* 49 (1) : 81-99.

Teresawa, M.; Kurusu, Y. and Yukawa, H. (1990). L-tryptophan production by the application of high expressed tryptophanase in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry International* 25: 181-190.

Tribe, D. E. and Pittard, J. (1979). Hyperproduction of tryptophan by *Escherichia coli*: Genetic manipulation of the pathways leading to tryptophan formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 181-190.

Tribe, D. E.; Camakarıs, H. and Pittard, J. (1976). Constitutive and repressible enzymes of the common pathway of aromatic biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: Regulation of enzymes synthesis at different growth rates.

Umbarger, H.E. (1978). Amino acid biosynthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 533-606.

Udenfriend, S.; and Peterson, R.E. (1957). Assay of aromatic amino acids. III Tryptophan. *Methods Enzymol.* 3: 613-614.

Wallace, B.J.; and Pittard, J. (1967). Genetic and biochemical analysis of the isoenzymes concerned in the first reaction of aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 93: 237-244.

Yanofsky, C. (1981). Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* 289: 751-758.

Zalkin, H. and Yanofsky, C. (1974). Regulated in vitro synthesis of *Escherichia coli* tryptophan operon messenger ribonucleic acid and enzymes. *J. Biol. Chem.* 249: 465-475.