

03062
18/3

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

PRODUCCION FERMENTATIVA DE L-TRIPTOFANO A

PARTIR DE METANOL POR MUTANTES DE

Hansenula polymorpha

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

MA. ELENA DEL CARMEN FLORES CARRASCO

1982



Universidad Nacional
Autónoma

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	5
MATERIAL Y METODOS	25
RESULTADOS Y DISCUSION	33
I. Selección de mutantes hiper productoras de triptofano..	33
II. Cinética de crecimiento y - producción de triptofano -- por la mutante A ₁	44
III. Optimización del medio de - cultivo.....	47
IV. Efecto de tirosina y fenil- alanina sobre la producción de triptofano.....	55
V. Separación del triptofano - del medio de cultivo	57
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	63

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
<u>TABLA 1.</u> Microorganismos capaces de asimilar al metanol	6
<u>TABLA 2.</u> Sensibilidad de <u>Hansenula polimorpha</u> DL-1 a 6 fluorotriptofano.....	35
<u>TABLA 3.</u> Sensibilidad de la mutante 6FTR a 6-fluorotriptofano.....	36
<u>TABLA 4.</u> Sensibilidad de la mutante 7MTR-34-8 a ac. antranílico	39
<u>TABLA 5.</u> Genealogía de las mutantes hiperproductoras de triptofano obtenidas.....	41
<u>TABLA 6.</u> Crecimiento máximo obtenido por las mutantes hiperproductoras de triptofano	45
<u>TABLA 7.</u> Efecto de la concentración de tiamina y biotina sobre la producción de triptofano -- por la mutante A ₁	54
<u>TABLA 8.</u> Recuperación de triptofano comercial disuelto en medio de cultivo por adsorción a carbón activado.....	59
<u>TABLA 9.</u> Recuperación de diferentes cantidades de triptofano disueltas en el medio de cultivo.	60
<u>FIGURA 1.</u> Oxidación de metanol hasta CO ₂	9
<u>FIGURA 2.</u> Asimilación de metanol por la vía de la serina	14
<u>FIGURA 3.</u> Asimilación de metanol por la vía de la ribulosa monofosfato	16
<u>FIGURA 4.</u> Vía de la dihidroxiacetona para la asimilación de metanol por levaduras	17
<u>FIGURA 5.</u> Estructura del triptofano.....	19

<u>FIGURA 6.</u> Vía de biosíntesis de aminoácidos aromáticos	20a
<u>FIGURA 7.</u> Enzimas que participan en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos	20b
<u>FIGURA 8.</u> Curva de sensibilidad de <u>Hansenula polymorpha</u> DL-1 a NTG	29
<u>FIGURA 9.</u> Curva de correlación entre D.O. y peso seco de <u>H. polymorpha</u>	32
<u>FIGURA 10.</u> Producción de triptofano por cada una de las mutantes de <u>H. polymorpha</u>	42
<u>FIGURA 11.</u> Cinética de crecimiento y producción de triptofano por la mutante <u>A₁</u>	46
<u>FIGURA 12.</u> Efecto del metanol sobre el crecimiento y producción de triptofano por la mutante <u>A₁</u>	48
<u>FIGURA 13.</u> Efecto de diversas sales de amonio sobre la producción de triptofano por la mutante <u>A₁</u>	50
<u>FIGURA 14.</u> Influencia del pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de triptofano por la mutante <u>A₁</u>	52
<u>FIGURA 15.</u> Efecto sobre la producción de triptofano por diferentes concentraciones de fenilalanina y tirosina	56

ABREVIATURAS

7AT	7 Azatriptofano
AFT	Antranilato fosforribosiltransferasa
AS	Antranilato sintetasa
ATP	Adenosíntrifosfato
CM	Corismato mutasa
DAH _P	3-Deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato
DAH _{PS}	3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintetasa
D.O.	Densidad óptica
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FAI	Fosforribosil antranilato isomerasa
FDP	Fructosa 1,6 difosfato
F6P	Fructosa 6 fosfato
6FT	6 Fluorotriptofano
GAP	Gliceraldehído 3 fosfato
GSH	Glutati6n reducido
IGS	Indol glicerol fosfato sintetasa
MC	Medio completo
MM	Medio mínimo
7MT	7 Metiltriptofano
NAD	Nicotín adenín dinucleótido oxidado
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NTG	N-metil-N ^t -nitro-N-nitrosoguanidina
PF	Prefenato deshidrogenasa
PFH	Prefenato deshidratasa
PGA	Fosfogliceraldehído
TS	Triptofano sintetasa
TRS	Transaminasa
Xu5P	Xilulosa 5 fosfato

R E S U M E N

El metanol es un sustrato muy abundante que puede ser utilizado para la producción fermentativa de metabolitos, ya que presenta una serie de características muy ventajosas para su uso. Uno de los metabolitos importantes que pueden ser obtenidos de esta manera es el triptofano, un aminoácido esencial que se encuentra en concentraciones bajas en las proteínas de los cereales principalmente. Por estas razones, este trabajo tuvo como objetivo la obtención de mutantes de Hansenula polymorpha hiperproductoras de triptofano utilizando metanol como fuente de carbono y encontrar las condiciones óptimas de producción.

Después de seleccionar una serie de mutantes, la 7MTR-34-8 resistente a 6 fluorotriptofano (6FT), 7 azatriptofano (7AT) y 7 metiltriptofano (7MT) fué capaz de excretar 344.8 mg/l de este aminoácido. A partir de ella se seleccionó la mutante A, resistente a ac. antranílico (750 µg/ml) y que produce 412.5 mg/l siendo éste el máximo rendimiento obtenido en metanol.

Las condiciones óptimas de producción fueron de 2.3 g/l (3% v/v) de metanol, 7.5 mM (0.1% p/v) de sulfato de amonio ó 4.45 mM (0.05% p/v) de fosfato diácido de amonio. Utilizando carbón activado y una mezcla de etanol-amoníaco (10:1) como eluyente se logró un 90% de recuperación del triptofano producido.

I N T R O D U C C I O N

En los últimos años se han reportado una gran cantidad de microorganismos capaces de crecer en metanol como única fuente de carbono y como consecuencia, ha surgido el interés en estudiar la fisiología y bioquímica de la asimilación del metanol, la cuál ha sido desarrollada con gran detalle en la actualidad (ANTHONY, 1980; DALTON, 1980; WAGNER, 1977; TANI, 1978). Esto ha permitido que los estudios dirigidos hacia la utilización del metanol como sustrato en diversos procesos fermentativos hayan ido también en aumento (WAGNER, 1977; OGATA et. al., 1975), ya que el metanol presenta una serie de características muy favorables para su uso en dichos procesos. Así se puede encontrar que el metanol se obtiene con una pureza extraordinaria del 99.8% (VOLFOVA & PILAT, 1974), es infinitamente soluble en agua, no es de difícil manejo y puede ser removido fácilmente del medio de cultivo (YOKOTE, 1974). Además, no se requiere oxígeno para una oxidación preliminar, como es el caso de otros hidrocarburos, minimizándose la transferencia de oxígeno en el medio y la producción de calor durante el crecimiento microbiano (ANTHONY, 1980). Por otro lado, su precio, tanto en Estados Unidos como en algunos otros países entre los que se cuenta a México, es comparable con el de otras fuentes de car-

bono convencionales habiendo sido la producción en este último de 102,750 toneladas durante el año de 1978 (WAGNER, 1977; OLIZAR, 1980).

Hasta la fecha, el metanol se ha utilizado en diversos procesos, de los cuáles, la producción de proteína unicelular ha sido el que mejores resultados ha dado e inclusive se ha llevado a escala industrial, con tal éxito que existe en Inglaterra una planta con una capacidad de producción de 60,000 toneladas de proteína por año - (MULLER, 1976; HARRISON et. al., 1972; SENIOR & WINDASS, 1980).

La producción de metabolitos a partir de metanol también ha llamado la atención (OGATA et. al., 1977) y por ejemplo se ha reportado la producción de serina a partir de este alcohol por Arthrobacter globiformis SK 200, Pseudomonas 3ab y Pseudomonas M531, pero en todos estos casos es necesaria la adición de glicina al medio de cultivo (TANI et. al., 1978; KEUNE et. al., 1976; MORINAGA et. al., 1981a, 1981b). Además, se ha demostrado la producción de ac. glutámico, de vitamina B₁₂, de fenilalanina, tirosina y de valina ó leucina (IZUMI, et. al., 1977; SUZUKI et. al., 1977; OKI et. al., 1973; SHIMIZU & SATO, 1976; TORAYA et. al., 1975).

Dentro de los aminoácidos y vitaminas, un --

metabolito potencialmente importante es el triptofano, un aminoácido esencial que se encuentra en bajas concentraciones en la mayoría de las proteínas, principalmente en la de los cereales, por lo que se ha recomendado la suplementación de la harina de maíz y otros granos con triptofano y lisina para aumentar su relación de eficiencia proteica (ELIAS & BRESSANI, 1972). Por esta razón se considera que este aminoácido llegará a ser importante por esta recomendable suplementación en los alimentos (ANONIMO, - 1978).

Por otro lado, entre los microorganismos que pueden crecer en metanol destacan algunas bacterias como Methylomonas methanophila y entre las levaduras las del género Hansenula, especialmente H. polymorpha, una levadura termotolerante aislada por LEVINE & COONEY (1973) y que presentó un rendimiento de 0.36 g de peso seco por gramo de metanol. Entre las levaduras y bacterias existe una diferencia muy importante al pensar en su utilización dentro de un proceso fermentativo y que es su facilidad de separación. En este aspecto, las levaduras presentan la ventaja de ser más fácilmente separables del medio de cultivo que las bacterias y este hecho aunado a que la cepa silvestre de Hansenula polymorpha DL-1 fué capaz de excretar 5 mg/l de triptofano fué lo que indujo a considerarla como un modelo interesante para la produc

ción de este aminoácido a partir de metanol.

En este sentido se consideró fundamental obtener mutantes de Hansenula polymorpha hiperproductoras de triptofano utilizando metanol como fuente de carbono y - evaluar la producción de este metabolito a partir de una fuente de carbono no convencional abundante como es este alcohol.

A N T E C E D E N T E S

El metanol ha atraído la atención como un sustrato para la industria de las fermentaciones y por lo tanto, se ha estudiado con detalle a los microorganismos que son capaces de asimilarlo, así como las vías metabólicas utilizadas por ellos. Estos estudios se remontan a 1906, año en que Sohngen aisló una bacteria aeróbica que utilizaba metano y que fué caracterizada como Bacillus methanicus. - Esta cepa fué reaislada 50 años más tarde por Dworkin y - Foster (1956) como un microorganismo que utilizaba al metano ó al metanol y se le denominó Pseudomonas methanica. De aquí en adelante se aislaron gran cantidad de microorganismos metilótrofos obligados o facultativos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos (TABLA no. 1), entre los que destacan Pseudomonas, Metilomonas y los géneros de levaduras Hansenula y Kloeckera (TANI et.al., 1978).

ASIMILACION DEL METANOL.

Existen características únicas de las vías metabólicas del metanol, especialmente en los primeros pasos de las vías de asimilación y disimilación, las cuáles se - han estudiado principalmente en bacterias y levaduras.

TABLA NO. 1. Microorganismos capaces de asimilar al metanol.

A) BACTERIAS.

a) Metilotróficas obligadas.

<u>Metilobacter</u>	<u>Metilocistis</u>
<u>Metilococcus</u>	<u>Metilosinus</u>
<u>Metilomonas</u>	

b) Metilotróficas facultativas.

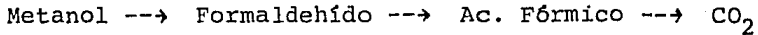
<u>Arthrobacter</u>	<u>Pseudomonas</u>
<u>Bacillus</u>	<u>Rhodopseudomonas</u>
<u>Hipomicrobium</u>	<u>Streptomyces</u>
<u>Protoaminobacter</u>	<u>Vibrio</u>

B) LEVADURAS Y HONGOS.

a) Metilotróficos facultativos.

<u>Candida</u>	<u>Pichia</u>
<u>Hansenula</u>	<u>Torulopsis</u>
<u>Kloeckera</u>	<u>Trichoderma</u>

El metanol puede ser catabolizado hasta dióxido de carbono teniendo como intermediarios al formaldehído y al ac. fórmico, de acuerdo a la siguiente secuencia:



siendo en bacterias oxidado por una metanol deshidrogenasa que in vitro utiliza metosulfato de fenazina como aceptor de electrones. Se ha sugerido al citocromo C como el aceptor in vivo. Esta enzima oxida alcoholes primarios -- con la misma velocidad que al metanol, pero no oxida a alcoholes secundarios (HOU et. al., 1979a, 1979b). Recientemente fué identificada y purificada una alcohol deshidrogenasa unida a nicotín-adenín-dinucleótido (NAD), específica para alcoholes secundarios (HOU et. al., 1981).

En levaduras existe una metanol oxidasa inducible conteniendo flavín-adenín dinucleótido (FAD) como cofactor (SAHM & WAGNER, 1973; TANI et. al., 1972; KATO et. al., 1976). Esta enzima oxida al metanol, alcoholes primarios e isopropanol (3-5% de la actividad para metanol). Otra enzima, la NAD-alcohol deshidrogenasa fué aislada de Candida boidinii que es constitutiva y oxida a otros alcoholes primarios excepto al metanol. También en levaduras se encontró una actividad oxidante de alcoholes secundarios (HOU et.al., 1981). Tanto en levaduras como en bacte

rias, el producto de la oxidación del metanol es el formaldehído.

Tres enzimas diferentes han sido aisladas de -- bacterias para catalizar la oxidación del formaldehído. La más importante es la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión unida a NAD que se encuentra presente en Micrococcus denitrificans, Protaminobacter ruber y Vibrio extorquens (COX & QUAYLE, 1975; OGATA et.al., 1975; JOHNSON & QUAYLE, 1964).

Las levaduras son un grupo más homogéneo con respecto al mecanismo de oxidación del formaldehído. En todas las especies estudiadas se han encontrado formaldehído y formato deshidrogenasas NAD-dependientes (OGATA, 1975). - Estas enzimas son de crucial importancia durante el crecimiento en metanol, ya que la mayor parte del NADH se genera durante la oxidación del formaldehído a dióxido de carbono (HARDER & VAN DIJKEN, 1975a). El formaldehído que en solución está presente como metilenglicol es subsecuentemente oxidado por la formaldehído deshidrogenasa, siendo el sustrato para esta enzima, el hemimercaptal formado espontáneamente entre el metilenglicol y el glutatión. El producto de la reacción es el S-formilglutatión. Este tiol éster es subsecuentemente hidrolizado por la formato deshidrogenasa liberándose CO_2 y regenerándose el glutatión. En estas dos reacciones se genera NADH (FIGURA 1). Es impor-

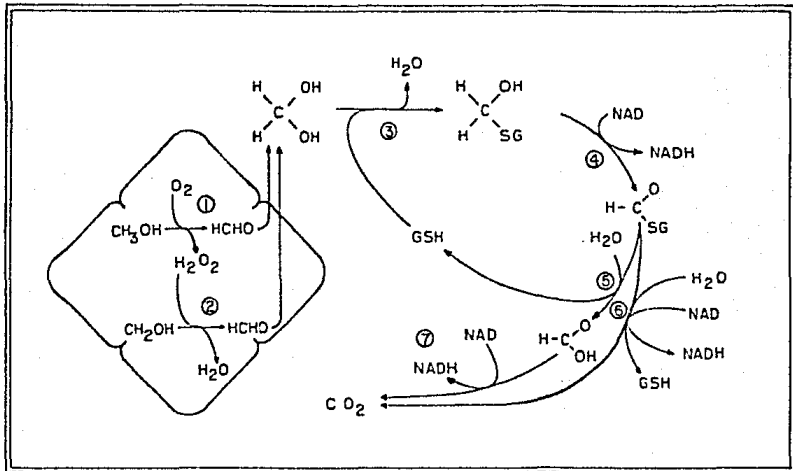


FIG. 1. Representación esquemática de la localización y el mecanismo de oxidación del metanol por levaduras. (1) Alcohol oxidasa; (2) Catalasa; (3) Reacción no enzimática; (4) Formaldehído deshidrogenasa; (5) S-formilglutatió n hidrolasa; (6) Formato deshidrogenasa; (7) Formato deshidrogenasa.

tante hacer notar que el formaldehído y el formato también pueden ser formados en los peroxisomas y excretados al citoplasma como resultado de la acción de la metanol oxidasa sobre el metanol (SAHM, 1975) y vía una acción peroxidativa de la catalasa sobre el mismo compuesto (VAN DIJKEN et. al., 1975a). Cuando tales reacciones ocurren in vivo es - de esperarse que el formato producido de esta manera no - sea oxidado por la formato deshidrogenasa, ya que esta enzima tiene una afinidad muy baja por el formato libre, -- dando como resultado que este compuesto deba ser excretado durante el crecimiento de las levaduras en exceso de - metanol (VAN DIJKEN et. al., 1976).

En levaduras, la alcohol oxidasa y la catalasa están localizadas en unas estructuras denominadas peroxisomas, los cuáles se forman durante el crecimiento en metanol. El cultivo prolongado en presencia de este alcohol resulta en un gradual aumento en el número de peroxisomas a través de la separación de peroxisomas pequeños de los organelos maduros. Durante este crecimiento, asociaciones con retículo endoplásmico son evidentes (VEENHUIS et. al., 1979).

Todas las enzimas antes mencionadas están reguladas por un mecanismo de derrepresión-represión más que por inducción-represión, ya que células crecidas en glucosa no presentan a ninguna de las cuatro enzimas (metanol

oxidasa, catalasa, formaldehído y formato deshidrogenasas) en la fase exponencial pero fueron formadas en la fase es tacionaria tardía sin la adición de metanol. Más aún, las enzimas fueron sintetizadas durante el crecimiento en so rbitol, glicerol, ribosa y xilosa (EGGELING & SAHM, 1978). Además, las enzimas no se encuentran codificadas en la mis ma unidad regulatoria, ya que no presentan un grado de de rrepresión idéntico ó coordinado. Por otro lado, todas se reprimen por glucosa y en presencia de metanol pueden so brellevar la represión catabólica por piruvato, succinato y glicerol (EGLI et. al., 1980).

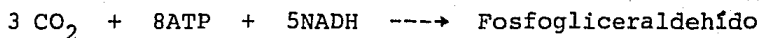
Cuando los microorganismos se transfieren de me tanol a glucosa, estas enzimas y los peroxisomas se degra dan y desintegran rápidamente; se ha sugerido la parti cipación de enzimas proteolíticas. Este mecanismo se ha de finido como inactivación catabólica (HOLZER, 1976). Es im portante hacer notar que la formaldehído y formato deshi- drogenasas, enzimas citoplásmicas no son afectadas por es te proceso indicando que la inactivación bajo estas condi ciones está restringida a enzimas peroxisomales exclusiva mente (EGLI et. al., 1980).

ASIMILACION DEL METANOL EN CARBON CELULAR.

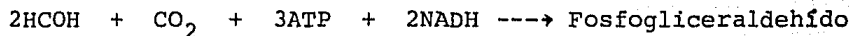
Existen cuatro rutas principales para la asimila

ción del metanol en material celular, difiriendo una de otra en la reacción en que se forma el primer enlace carbono-carbono (QUAYLE & FERENCI, 1978; QUAYLE, 1972; ANTHONY, 1975; COX & QUAYLE, 1975; VAN DIJKEN et. al., 1978; O'CONNOR & QUAYLE, 1979). Si se toman en cuenta variaciones en los detalles, existen por lo menos seis vías diferentes y que son las que se mencionan a continuación:

a) VIA DE LA RIBULOSA BIFOSFATO.

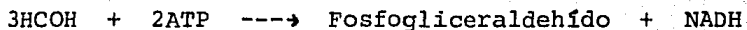


b) VIA DE LA SERINA.

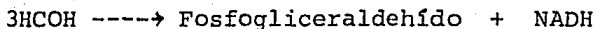


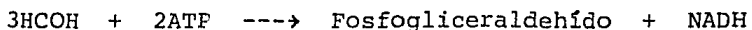
c) VIA DE LA RIBULOSA MONOFOSFATO.

i) VARIANTE ENTNER-DOUDOROFF.



ii) VARIANTE FRUCTOSA BIFOSFATO.



d) VIA DE LA DIHIDROXIACETONA.

La vía de la ribulosa bifosfato o "ruta autotrófica" se ha encontrado en Paracoccus denitrificans en donde el carbono es fijado a nivel de dióxido de carbono, -- siendo la ribulosa bifosfato la molécula aceptora y el producto son dos moléculas de fosfogliceraldehído.

La vía de la serina se ha estudiado principalmente en Pseudomonas 3ab (VAN DIJKEN & HARDER, 1975b), aunque también se ha descrito en Methanomonas methanooxidans y en Streptomyces sp. (LAWRENCE et. al., 1970; KATO et. al., 1977). Las reacciones que se llevan a cabo durante este ciclo se encuentran en la FIGURA 2, siendo las enzimas que se consideran clave para este ciclo y cuya presencia demuestra la asimilación del metanol por esta vía, la malato liasa (malato tiocinasa y la malilCoA liasa), hidroxipiruvato reductasa e isocitrato liasa (KATO et. al., 1977).

La vía de la ribulosa monofosfato también involucra la asimilación a nivel de formaldehído, siendo el aceptor una molécula de ribulosa monofosfato y el producto 3hexulosa 6 fosfato. Tres moléculas de fructosa fosfato derivadas de este producto son rearrregladas para dar un compuesto de 3 carbonos y 3 moléculas de ribulosa monofosfato.

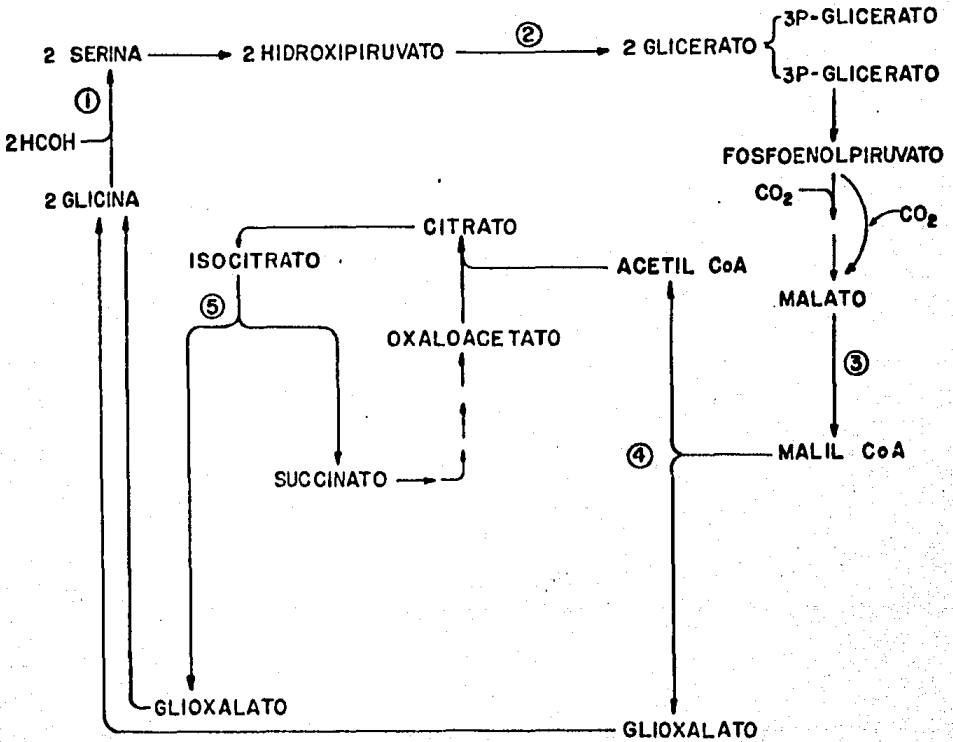


FIG. 2. Vía de asimilación del metanol por la ruta de la serina icl⁺ en metilótrofos. (1) Serina transhidroximetilasa; (2) Hidroxipiruvato reductasa; (3) Malato tiocinasa; (4) Malil-Co-A liasa; (5) Isocitrato liasa.

son regeneradas. En esta ruta hay por lo menos dos secuencias diferentes. En la variante Fructosa Bifosfato se genera una triosa fosfato como producto y en la variante Entner-Doudoroff se forma piruvato. Las bacterias que utilizan al metanol por la vía de la ribulosa monofosfato, --- usualmente tienen un ciclo de los ácidos tricarbóxicos incompleto y son incapaces de usar otras fuentes de carbono diferentes al metanol (FIGURA 3).

En la última ruta, la de la dihidroxiacetona, - también se asimila el metanol a través del formaldehído - que se condensa con xilulosa 5 fosfato para generar dihidroxiacetona y gliceraldehído 3 fosfato. Una de 6 moléculas de triosa formadas es asimilada en material celular, mientras que las 5 restantes son rearrregladas para regenerar 3 moléculas de xilulosa 3 fosfato. Esta vía ha sido - propuesta recientemente para la asimilación de metanol por levaduras (VAN DIJKEN et. al., 1978; O'CONNOR & QUAYLE, - 1979). Las reacciones se presentan en la FIGURA 4.

BIOSINTESIS DE TRIPTOFANO A PARTIR DE METANOL.

El triptofano es un aminoácido aromático cuya estructura se muestra en la FIGURA 5 y que puede ser producido por diversos microorganismos, en donde su vía de biosíntesis

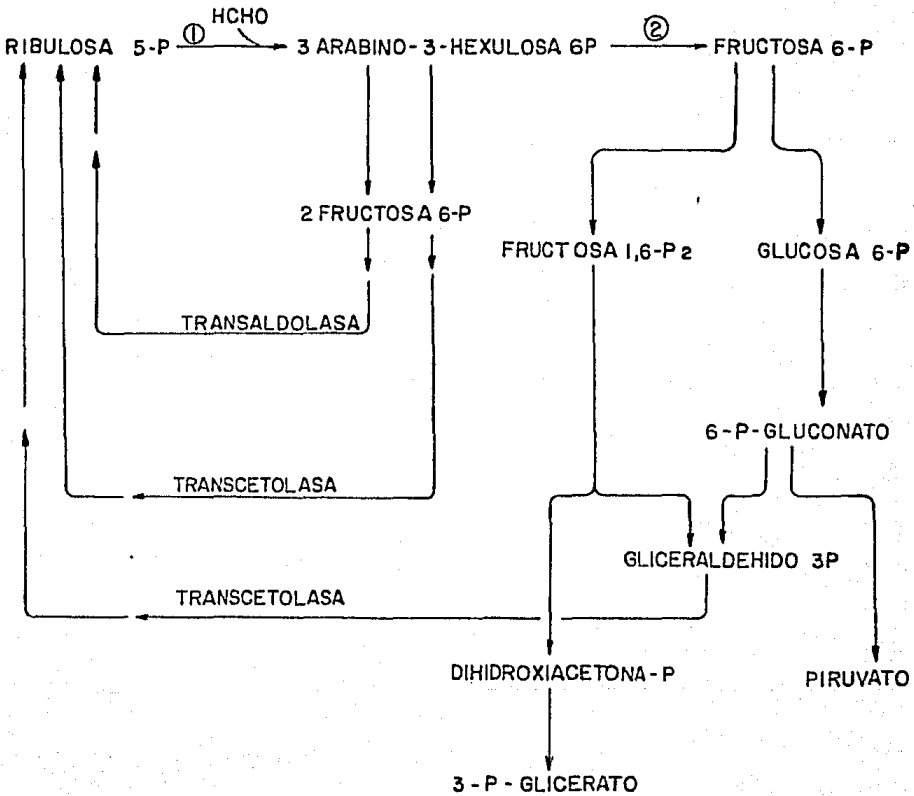


FIG. 3. Asimilación del metanol por la vía de la ribulosa monofosfato en metilótrofos. (1) Hexulosa fosfato sintetasa; (2) Fosfohexulosa isomerasa.

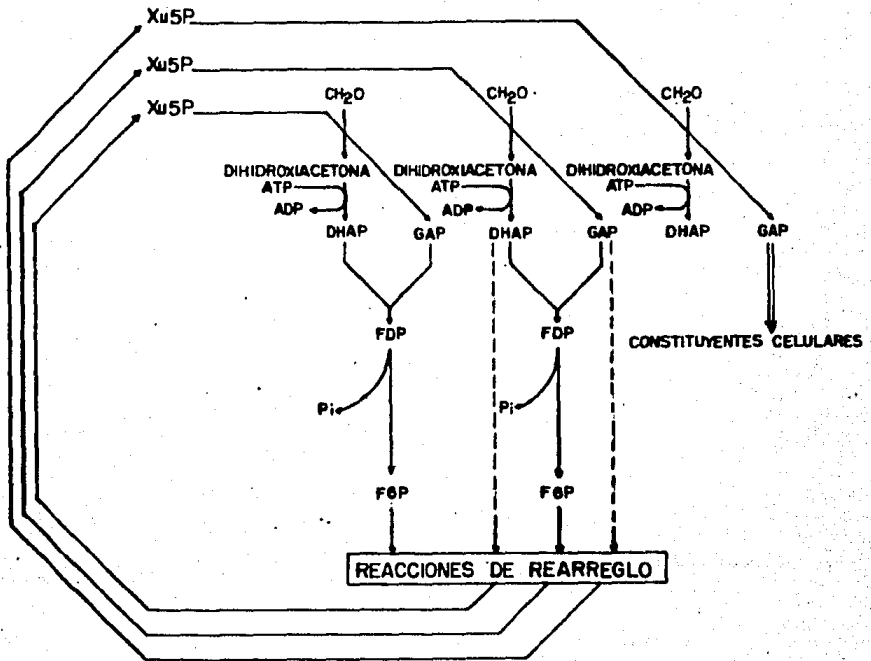


FIG. 4. Vía de la dihidroxiacetona para la asimilación del metanol por levaduras. Abreviaturas: Xu5P, Xilulosa 5 fosfato; DAHP, Dihidroxiacetona fosfato; GAP, gliceraldehído 3 fosfato; FDP, Fructosa-1,6-difosfato; F6P, Fructosa-6-fosfato.

tesis se inicia con la condensación del fosfoenolpiruvato y la eritrosa 4 fosfato para formar un azúcar de 7 carbonos, la 3 desoxi-D-arabino heptulosonato 7 fosfato. Estos dos compuestos son los sustratos iniciales para la biosíntesis del triptofano, así como para la fenilalanina y la tirosina y que tienen que formarse a partir del metanol en el caso de usarse como única fuente de carbono.

La vía de la dihidroxiacetona es la que se ha propuesto para la asimilación del metanol por H. polymorpha, por lo que el gliceraldehído 3 fosfato por esta vía generado, puede ser convertido a fosfoenolpiruvato por las enzimas de la vía glicolítica y por otro lado, la eritrosa 4 fosfato puede ser formada a través de las reacciones de rearreglo que se llevan a cabo durante la regeneración de la xilulosa 5 fosfato.

Posteriormente, el azúcar 3 desoxi-D-arabino-heptulosonato 7 fosfato es transformado en ac. corísmico a través de varios pasos enzimáticos. Este ácido es un intermediario común para los 3 aminoácidos aromáticos ya mencionados.

El ac. corísmico es transformado a ac. antranílico por una enzima clave en la regulación de la biosíntesis de triptofano, la antranilato sintetasa. Posteriormente, el antranilato mediante tres pasos enzimáticos es convertido a triptofano (FIGURAS 6 y 7). Hay que hacer no

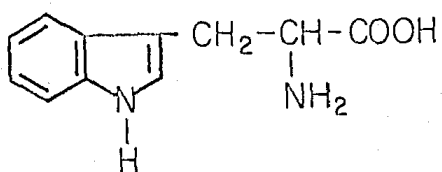


FIG. 5. Estructura del triptofano.

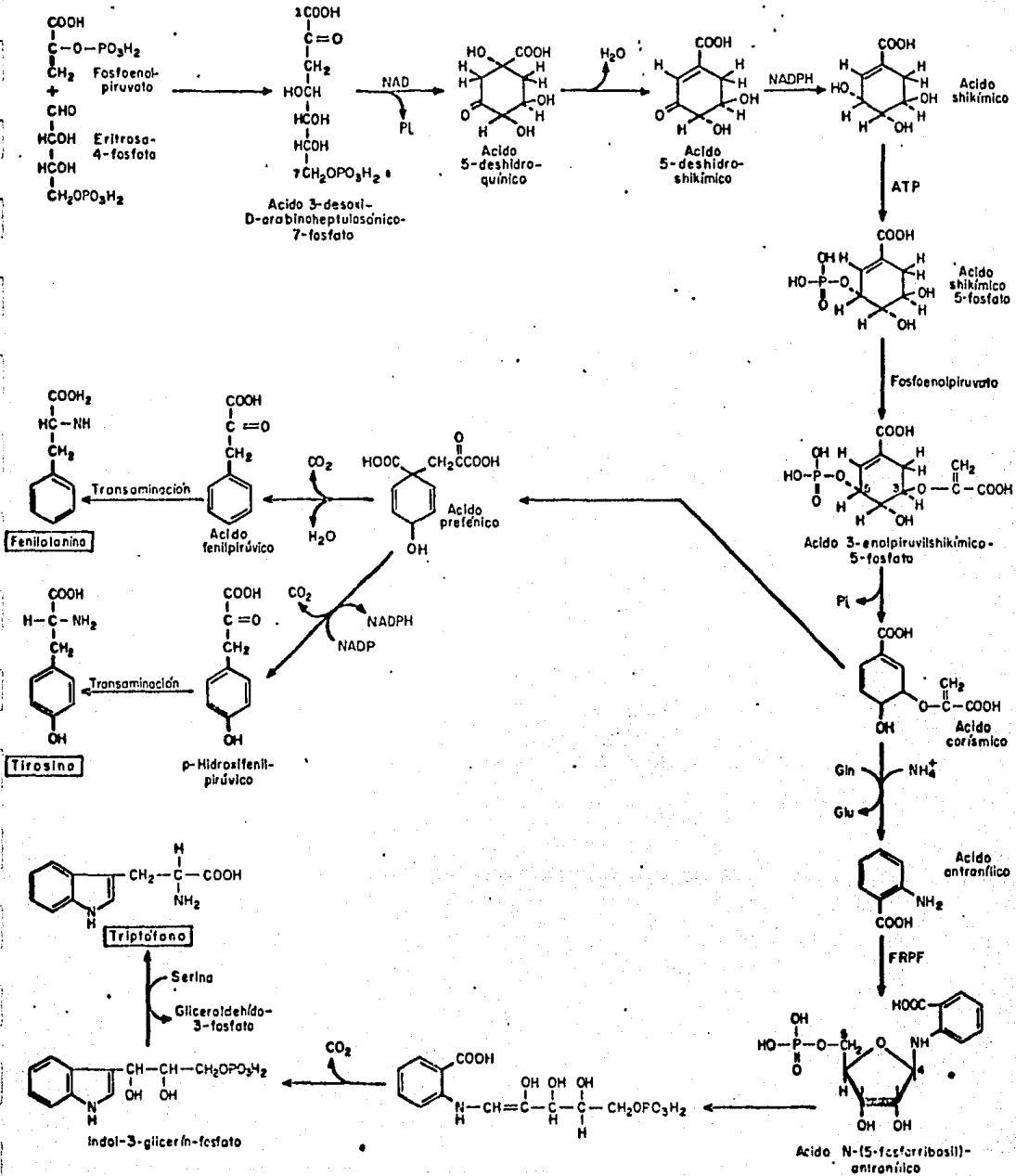


FIG. 6. Vía de Biosíntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptofano por microorganismos.

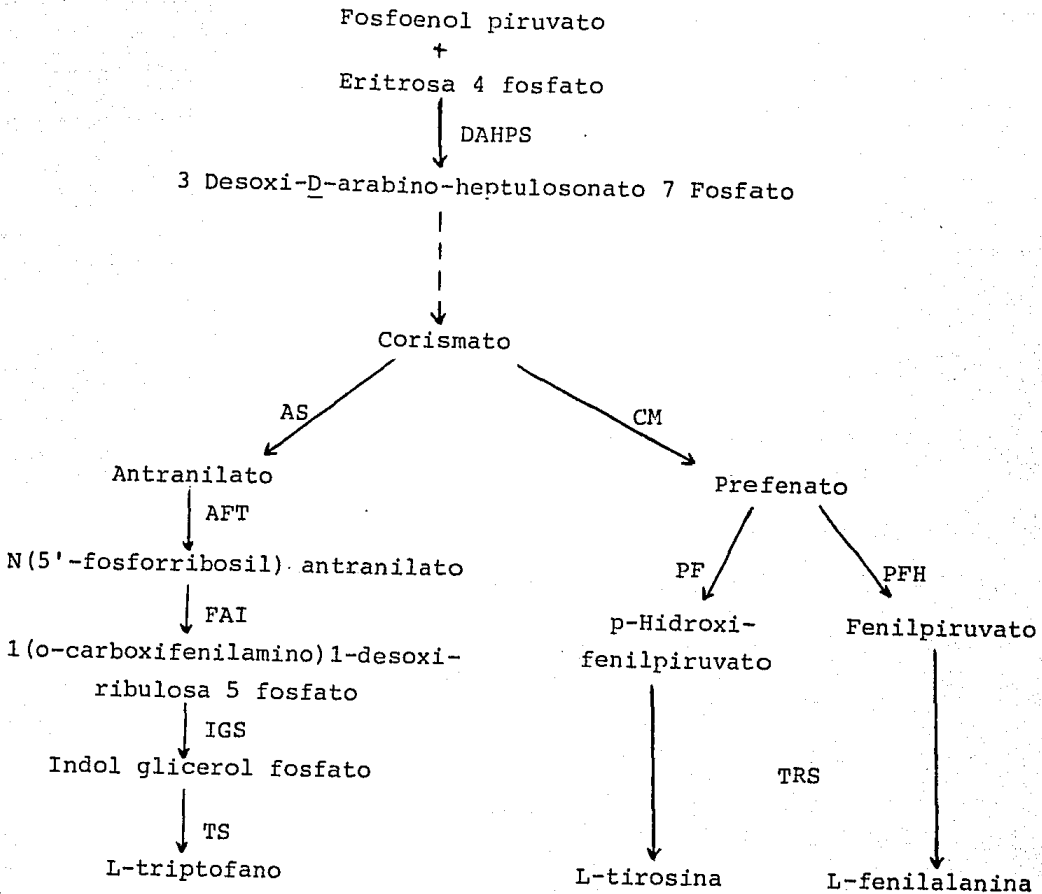


FIG. 7. Enzimas que participan en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos. DAHPS: D-arabino heptulosoⁿato 7 fosfato sintetasa; AS: antranilato sintetasa; CM: corismaⁿto mutasa; AFT: antranilato-fosforribosil transferasa; FAI: fosforribosil-antranilato isomerasa; IGS: indol glicerol fosfato sintetasa; TS: triptofano sintetasa; PF: -prefenato deshidrogenasa; PFH: prefenato deshidratasa y TRS: transaminasa.

tar que para la síntesis de antranilato se requiere glutamina o amonio como donadores del grupo amino y serina en la formación del triptofano a partir de indol por la triptofano sintetasa.

Esta vía biosintética es idéntica para todos los microorganismos a diferencia de los mecanismos regulatorios que varían de forma importante entre ellos y que deben tomarse en cuenta al tratar de sobreproducir un metabolito. Así, en Corynebacterium glutamicum, la DAHP sintetasa es inhibida sinérgicamente por fenilalanina, tirosina y triptofano; la prefenato deshidrogenasa, la primera enzima de la vía terminal de tirosina es débilmente inhibida por L-tirosina y la prefenato deshidratasa es completamente inhibida por fenilalanina y triptofano. Además, - la tirosina estimula la actividad de la prefenato deshidratasa y revierte la inhibición por fenilalanina y triptofano. Por otro lado, la antranilato sintetasa, la primera enzima de la vía de formación de triptofano es inhibida y reprimida por este aminoácido (HAGINO & NAKAYAMA, 1975).

En el caso de Hansenula polymorpha es poco lo que se sabe acerca de los mecanismos regulatorios de la biosíntesis de triptofano y acerca de la organización de los genes que codifican para estas enzimas, pero se pueden inferir a través de los resultados obtenidos para otras levaduras y que son los que se presentan a continua

ción.

La primera reacción de la vía de biosíntesis de aminoácidos aromáticos, la condensación de fosfoenolpiruvato y eritrosa 4 fosfato en DAHP se lleva a cabo en Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe y Hansenula henricii por dos isoenzimas. En los tres casos una de ellas es inhibida por tirosina y la otra por fenilalanina (BRACHER & SCHWEINGRUBER, 1977; BODE & BRINBAUD, 1978a).

Por lo que respecta a la antranilato sintetasa, LINGENS (1968) y DOY & COOPER (1966) demostraron que es inhibida por triptofano en Saccharomyces cerevisiae y por otro lado FANTES et. al., (1966) reportaron no haber encontrado represión de las enzimas de la vía de triptofano incluyendo a la antes mencionada. Sin embargo, una derrepresión de 2 a 3 veces de estas enzimas puede ser generada creciendo a la cepa silvestre en presencia de 5 metil triptofano (5MT) ó ac. indol acrílico (MIOZZARI et. al., 1977). Estos compuestos deben su efecto a que causan una limitación de triptofano inhibiendo un paso específico en la biosíntesis del aminoácido. Pero esta derrepresión no parece ser un mecanismo regulatorio importante de la vía, ya que no es específico tan sólo de análogos de triptofano, sino que también ocurre cuando se limita de leucina, histidina o arginina (SCHURCH et. al., 1974).

En el caso de Hansenula henricii, la antranila-

sintetasa es también inhibida y no reprimida por triptofano (BODE & BRINBAUD, 1978b, 1978c). En esta levadura, la enzima fosforribosil transferasa se ha caracterizado por ser inhibida por ac. antranílico (BODE & BIRNBAUD, 1978d). Por lo que respecta a la regulación entre vías, existe -- cierta relación entre histidina y triptofano tanto en -- Hansenula henricii como en Hansenula polymorpha (BODE & BIRNBAUD, 1980; SANCHEZ et. al., 1978a).

Resumiendo podemos decir que las levaduras en general tienen:

- 1) Dos isoenzimas para la actividad de la DAHP sintetasa, una inhibida por tirosina y la otra por fenilalanina.
- 2) La antranilato sintetasa es inhibida pero no reprimida por triptofano.
- 3) La fosforribosil transferasa es la enzima limitante de la vía de biosíntesis de triptofano.
- 4) Existe interrelación entre las vías de histidina y triptofano principalmente.

Con estas bases se puede considerar que es posible la selección de mutantes de H. polymorpha hiperproductoras de triptofano y posteriormente evaluar la producción del aminoácido utilizando metanol como fuente de carbono.

Para cumplir con este objetivo se propuso una estrategia con base en los antecedentes antes mencionados y que se resume en los siguientes puntos:

1. Sensibilidad de la cepa silvestre de H. polymorpha a diferentes análogos de triptofano.
2. Selección de mutantes resistentes a uno de estos análogos.
3. Cuantificación de la producción de triptofano por las mutantes resistentes y selección de la mejor productora.
4. Selección de mutantes resistentes a mayores concentraciones del mismo análogo ó a otros análogos y cuantificación de la producción de triptofano en cada una de ellas.
5. Efecto de fenilalanina y tirosina sobre la producción de triptofano por la mejor mutante obtenida.
6. Optimización del medio de cultivo para la producción de triptofano.
7. Recuperación del triptofano.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

1. REACTIVOS. El extracto de levadura, peptona, glucosa y agar fueron obtenidos de DIFCO. Los análogos de triptofano (7 Metiltryptofano, 6 Fluorotryptofano y 7 Azatryptofano), el ac. antranílico, L-tirosina, L-fenilalanina, L-triptofano, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina y la nistatina fueron adquiridos de SIGMA Chem. Co. El metanol y las sales inorgánicas de BAKER, S.A.

2. MICROORGANISMO. La cepa silvestre de Hansenula polymorpha DL-1 fué obtenida del Instituto Tecnológico de Massachusetts, U.S.A. Esta levadura crece en metanol o glucosa como única fuente de carbono y energía. Los rangos óptimos de temperatura y pH para el crecimiento son de 37-42°C y 4.5-5.5 respectivamente. La TABLA no. 5 muestra la genealogía y otra información pertinente sobre las mutantes obtenidas en este estudio.

3. MEDIOS DE CULTIVO.

a) Para el mantenimiento de la cepa se utilizó el medio completo (MC) para levaduras reportado por FINK (1970) y que contiene en gramos por litro: 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 10 g de glucosa y 15 g de agar.

b) Para los estudios de fermentación se utilizó un medio mínimo (MM) que contiene lo siguiente:

	g/l
Metanol	0.79
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0
KH_2PO_4	1.0
MgSO_4	0.5
$\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
NaCl	0.1
Na_2HPO_4	0.24
Biotina	0.000002
Tiamina	0.0004
*Sol. Sales traza	10.0 ml

*Sol. que contiene en mg/l: 5mg de FeCl_3 , 7mg de ZnSO_4 , 1mg de H_3BO_3 , 1mg de CuSO_4 y 1mg de KI.

Para el medio mínimo sólido se añadieron 15 g de agar por litro de medio. En todos los casos el pH del medio se ajustó a 5.5 con NaOH 1N y el metanol fue adicionado al medio estéril justo antes de inocular.

4. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DE LA CEPA A LOS ANALOGOS DE TRIPTOFANO.

Se sembró una suspensión de la cepa silvestre de H. polymorpha DL-1 o de las mutantes en cajas conteniendo MM adicionado de diferentes concentraciones del análogo (esterilizado por filtración). Se incubaron las cajas a -

(esterilizado por filtración). Se incubaron las cajas a 37°C durante 24-48 horas y se seleccionó la concentración del análogo a la cuál el crecimiento fué nulo (SHIIO et. al., 1973).

5. AISLAMIENTO DE LAS MUTANTES RESISTENTES A LOS ANALOGOS DE TRIPTOFANO.

Se sembró una suspensión de una determinada mutante ó de la cepa silvestre en cajas conteniendo MM con la mínima concentración inhibitoria del análogo seleccionado. Se incubaron las cajas durante 48 horas o más tiempo si era necesario a 37°C y se seleccionaron las colonias que aparecieron al final de este tiempo. Se purificaron las mutantes en cajas conteniendo la misma concentración del análogo y se mantuvieron en el mismo medio hasta probar la producción de triptofano (SHIIO et. al., 1973).

6. AISLAMIENTO DE LAS MUTANTES RESISTENTES A AC. ANTRANILICO.

Se siguió el mismo procedimiento descrito en los incisos 4 y 5 pero usando diferentes concentraciones de ac. antranílico para determinar la sensibilidad y posteriormente seleccionar las mutantes resistentes.

7. MUTAGENESIS.

Se inocularon 10 ml de MM líquido con una suspensión de la cepa o mutante seleccionada e incubaron a -

37°C durante 20-22 horas con agitación (150 rpm). Al cabo de este tiempo se lavaron las levaduras dos veces con agua estéril y se resuspendieron en 9.5 ml de solución amortiguadora de citratos 0.1M pH de 5.5. Se adicionó entonces la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (25 µg/ml) y se tomaron muestras cada 15 minutos. Se sembró en cajas con MC para contar el número de sobrevivientes en cada uno de los tiempos. Se seleccionó el tiempo que provocó un 90-95% de muerte (FIGURA 8) (SANCHEZ & DEMAIN, 1977).

8. CONDICIONES DE FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE TRIPTOFANO.

Se inocularon 50 ml de MM con una suspensión de la cepa o mutante por analizar, ajustando la densidad óptica (D.O.) a 0.1. Se incubó a 37°C con agitación (150 rpm) y se tomaron muestras a diferentes a las cuáles se les determinó el crecimiento por densidad óptica y triptofano por el método de OPIENSKA-BLAUTH (1963).

9. DETERMINACION DEL CRECIMIENTO.

El crecimiento fué estimado por la absorbancia en un colorímetro Bausch & Lomb Spectronic 20 a una longitud de onda de 540 nm.

10. DETERMINACION DE TRIPTOFANO.

El triptofano se determinó en el medio de culti-

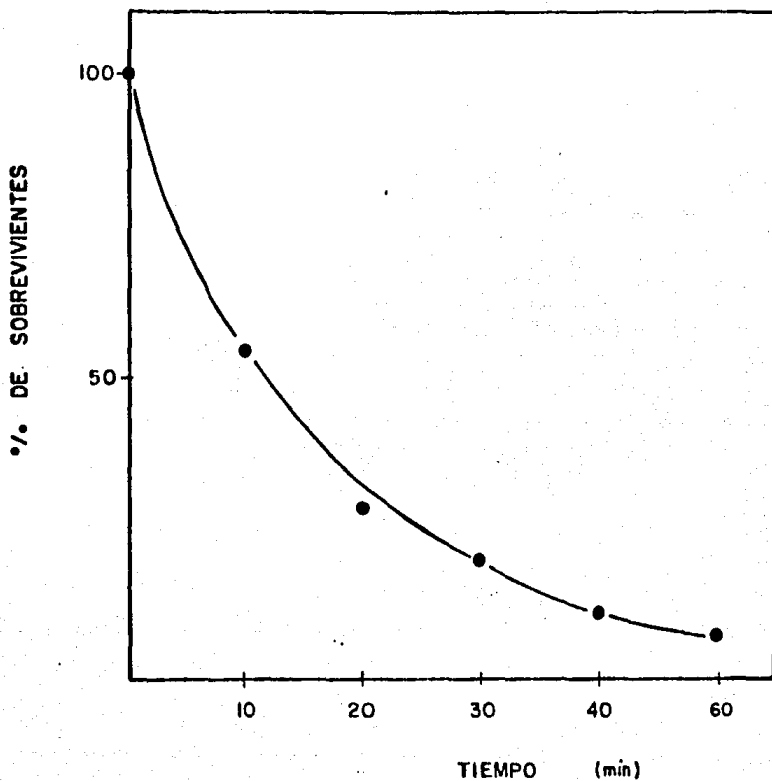


FIG. 8. Curva de sensibilidad de Hansenula polymorpha DL-1 a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) en función del tiempo. La mutagénesis se llevó a cabo en buffer de citratos 0.1 M pH 5.5, a 37°C y sin agitación. La concentración final de la NTG fué de 25 microgramos por mililitro.

vo utilizando el método de OPIENSKA-BLAUTH (1963). Este método consiste de los siguientes pasos:

- Colocar 0.5 ml de muestra en un tubo de ensayo.
- Adicionar 5 ml del reactivo de trabajo*.
- Agitar perfectamente e incubar a 60°C durante 15 minutos.
- Al cabo de este tiempo colocar los tubos en un baño de hielo.
- Leer la absorbancia a 460 nm e interpolar las lecturas obtenidas en una curva estándar obtenida en las mismas condiciones.
- La curva estándar fué realizada con triptofano comercial en un rango de concentraciones de 0-250 ug.

* El reactivo de trabajo consiste en la mezcla de partes iguales de ac. sulfúrico al 80% y anhídrido acético al 10% v/v conteniendo 27 mg de $FeCl_3$ por cada 100 ml de la mezcla.

12. OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE TRIPTOFANO.

La optimización del medio de cultivo se llevó a cabo variando los componentes del medio mínimo en los siguientes rangos de concentraciones. Para metanol se varió de 3.96 hasta 31.0 g/l. Como fuentes de nitrógeno se utilizaron el sulfato, cloruro y fosfato diácido de amonio -

en los siguientes rangos de concentración: 3.75-22.5mM para el sulfato, 9-55 mM para el cloruro y de 4.45 a 26.7 mM para el fosfato. Las concentraciones de tiamina y biotina se variaron de 0.1 a 5 ug/ml. En todos estos casos el pH del medio se ajustó a 5.5 con NaOH 1 N.

13. EFFECTO DEL pH INICIAL DEL MEDIO DE CULTIVO.

Para mantener el pH del medio de cultivo se usaron los fosfatos como solución amortiguadora. H_3PO_4/H_2PO_4 para los valores de 3 y 4; H_2PO_4/HPO_4 para 5, 6 y 7. En ningún caso hubo variación del pH en función del tiempo de fermentación.

14. SEPARACION Y PURIFICACION DEL TRIPTOFANO PRODUCIDO -- POR LAS MUTANTES.

Se colocaron 2.5 g de carbón activado en una columna de vidrio de 2 por 10 cm y se pasó el medio de cultivo a través de él. Se eluyó el triptofano con una mezcla de etanol-amoniaco (10:1).

15. IDENTIFICACION DEL AMINOACIDO PRODUCIDO COMO TRIPTOFANO.

Para la identificación del aminoácido se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina o papel de acuerdo a lo reportado por HAGINO & NAKAYAMA (1975).

16. CURVA DE CORRELACION ENTRE EL CRECIMIENTO POR DENSIDAD OPTICA Y POR PESO SECO.

El crecimiento fué determinado por densidad óptica tal y como se ha descrito en el inciso 9 y el peso seco se cuantificó después de centrifugar a las levaduras y resuspenderlas en un mínimo volumen de agua. Esta suspensión se colocó en una pequeña charola de aluminio y se secó en un horno a 60°C hasta peso constante. En la FIG. 9 se muestra la correlación lineal entre estos dos parámetros.

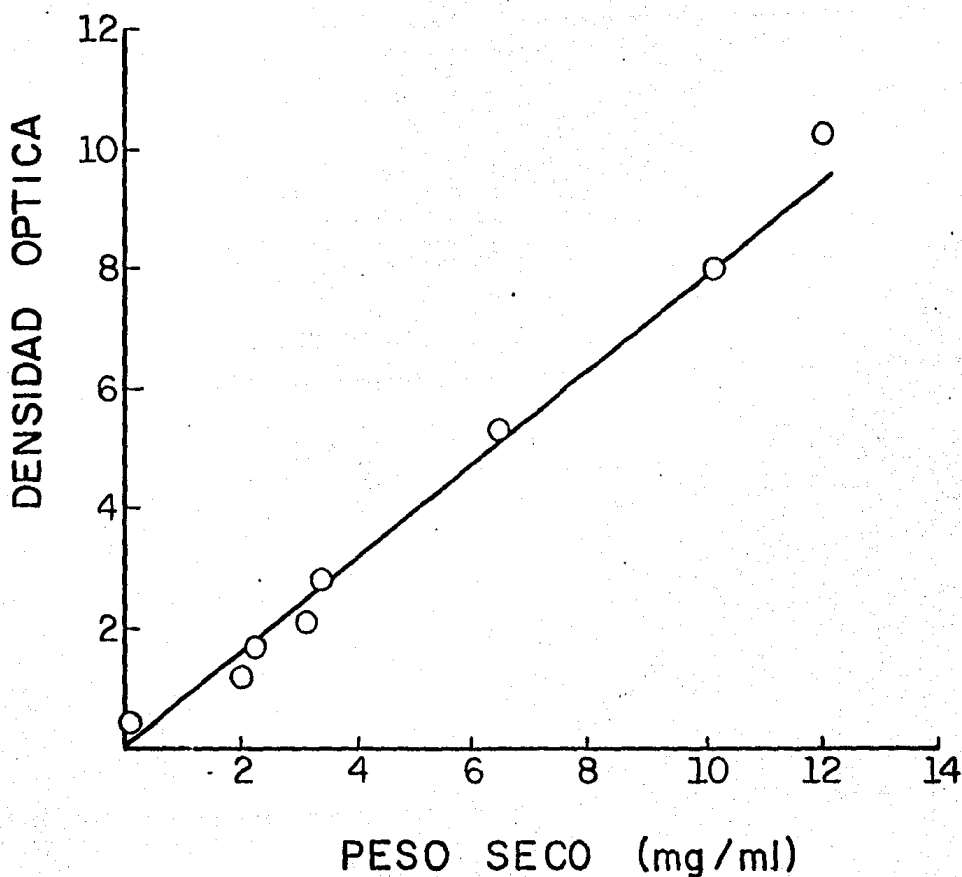


FIG. 9. Curva de correlación entre densidad óptica y peso seco de Hansenula polymorpha. El crecimiento por densidad óptica se determinó por la absorbancia a 540 nm y el peso seco se obtuvo después de eliminar el agua de las muestras a 60°C.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. SELECCION DE LAS MUTANTES HIPERPRODUCTORAS DE TRIPTOFANO.

La selección de las mutantes hiperproductoras de triptofano se inició a partir de la cepa silvestre de Hansenula polymorpha DL-1, la cuál produce 5 mg/l del aminoácido por litro de medio de cultivo. Esto se consideró importante puesto que es necesario que un microorganismo sea capaz, no sólo de producir un metabolito dado sino también de excretarlo.

En principio se estableció la sensibilidad de la Hansenula polymorpha DL-1 a 6 fluorotriptofano (6FT) - y como se puede observar en la TABLA No. 2, 100 µg/ml del análogo inhibieron totalmente el crecimiento de la cepa, siendo esta concentración en la cuál se obtuvieron las primeras mutantes hiperproductoras de L-triptofano. De las mutantes obtenidas, la denominada 6FTR fué la que produjo la mayor cantidad del aminoácido (100 mg/l). El aumento en producción fué de 5 mg en la cepa silvestre a 100 mg/l en la mutante.

Esta mutante (6FTR) resultó ser todavía sensible al mismo análogo pero a concentraciones mayores, siendo la mínima inhibitoria de 750 µg/ml (TABLA No. 3). Se -

TABLA 2. SENSIBILIDAD DE Hansenula polymorpha
DL-1 A 6 FLUOROTRIPTOFANO.

$\mu\text{g/ml}$	Crecimiento relativo
0	+++
20	++
40	+
60	+
80	<u>+</u>
100	-
200	-

Se utilizó MM con prolina (100 $\mu\text{g/ml}$) como fuente de nitrógeno y se sustituyó el metanol por glucosa (1%). El crecimiento se determinó a las 48 horas de incubación a 37°C. Se asignaron +++ a un muy buen crecimiento, ++ a un buen crecimiento, + a un crecimiento medio, + a un crecimiento deficiente y - a un crecimiento nulo.

TABLA 3. SENSIBILIDAD DE LA MUTANTE 6FTR A
6 FLUOROTRIPTOFANO.

$\mu\text{g/ml}$	Crecimiento relativo
0	+++
300	+++
400	++
500	+
600	+
700	\pm
750	-
800	-

Se utilizó MM con prolina (100 $\mu\text{g/ml}$) como -- fuente de nitrógeno y se sustituyó el metanol por glucosa (1%). El crecimiento se determinó a las 48 horas de incubación a 37°C. Se asignaron +++ a un muy buen crecimiento (control), ++ a un buen crecimiento, + crecimiento medio, \pm a un crecimiento deficiente y - a un crecimiento nulo.

obtuvieron en esta concentración 87 mutantes de las cuáles, la M_1 fué la que produjo la más alta cantidad de -- triptofano (178 mg/l). La producción específica fué de - 35.2 mg/D.O.

Al tratar de determinar la sensibilidad de la mutante M_1 a mayores concentraciones de 6FT se observó - que ya era insensible a este análogo aún a 1.5 mg/ml, por lo que se decidió utilizar otro análogo. Esta mutante fué sensible a 7 azatriptofano (7AT) y a una concentración de 500 μ g/ml se seleccionaron 79 colonias resistentes de las que la mutante M_{III} produjo inicialmente más triptofano que la mutante M_1 , pero en ensayos posteriores disminuyó a 180 mg/l. Este descenso se advirtió después de haber - determinado la sensibilidad de la M_{III} a otros análogos y de haber seleccionado a 1000 μ g/ml de 6FT a la mutante - M_{III-48} que produjo 289.6 mg/l y 66.5 mg/D.O. Es importante hacer notar que la M_{III} volvió a ser sensible a 6FT a pesar de provenir de la M_1 que era resistente a este análogo, por lo que la mutación que le confirió la resistencia a 7AT provocó, posiblemente, un nuevo cambio en la antranilato sintetasa que la hizo volver a reconocer a 6FT como un inhibidor.

El siguiente análogo utilizado fué el 7 metil-triptofano (7MT), al cuál fué sensible la mutante M_{III-48} . A una concentración de 250 μ g/ml del análogo crecieron 45

mutantes de las que la de mayor producción fué la denominada 7MTR-34-8 que aumentó de 289.6 a 344.8 mg/l de triptofano y la producción específica de 66.5 a 69.5.

De aquí en adelante la selección de mutantes resistentes a análogos de triptofano se vió muy limitada - porque la mutante 7MTR-34-8 fué insensible a concentraciones menores de 1.5 mg/ml de 7MT, 7AT, 6FT e hidroxamato - de triptofano y cantidades mayores de los análogos fueron muy difíciles de solubilizar sin afectar el pH del medio de cultivo. Por esta razón se procedió a seleccionar mutantes resistentes a ac. antranílico, un intermediario en la biosíntesis del triptofano y que se ha demostrado que inhibe a la enzima fosforribosil transferasa de Hansenula henricii (BODE & BINRBAUD, 1978c), por lo que podría explicarse que inhiba el crecimiento de H. polymorpha, ya que impediría la biosíntesis del triptofano. En la TABLA No. 4 se presenta la sensibilidad de esta levadura a ac. antranílico y a una concentración de 700 µg/ml el crecimiento fué nulo, pero después de sembrar en esa concentración a la población mutagenizada, se obtuvieron una gran cantidad de colonias resistentes, de las cuáles muy pocas aumentaron su producción de triptofano. Se seleccionó a la mutante A₁ que produjo 412.5 mg/l de este aminoácido. Esta mutante fué insensible a mayores concentraciones de ac. antranílico y con ésto se agotaron las posibilidades

TABLA 4. SENSIBILIDAD DE LA MUTANTE 7MTR-34-8
A AC. ANTRANILICO.

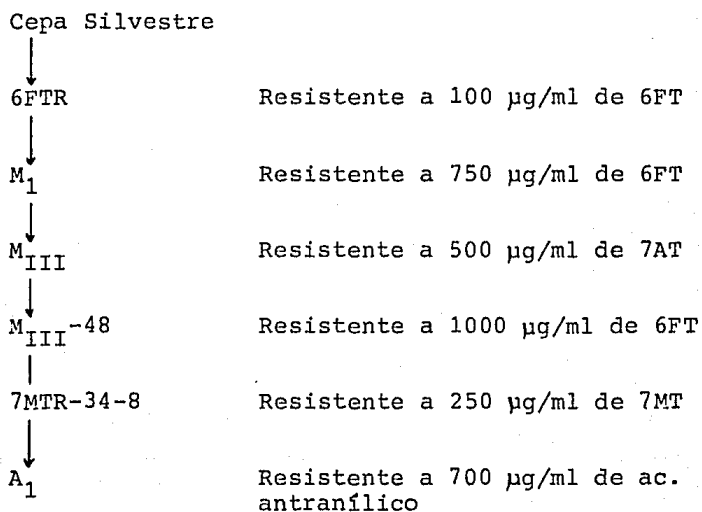
$\mu\text{g/ml}$	Crecimiento relativo
0	+++
100	+++
200	++
400	+
600	\pm
700	-
800	-
1000	-

Se utilizó MM con prolina (100 $\mu\text{g/ml}$) como fuente de nitrógeno y se substituyó el metanol por glucosa (1%). El crecimiento se determinó a las 48 horas de incubación a 37°C. Se asignaron +++ a un muy buen crecimiento, ++ a un buen crecimiento, + a crecimiento medio, \pm a un crecimiento deficiente y - a un crecimiento nulo.

de utilización de los análogos u otros compuestos para la selección de mutantes hiperproductoras. En la TABLA No. 5 se muestra la genealogía completa de las mutantes y en la FIGURA 10 se presenta la producción por mililitro y la específica de cada una de ellas. Como se puede observar, la 6FTR aumentó en 20 veces la producción de triptofano siendo éste el mayor aumento obtenido, ya que en las subsecuentes mutantes fué de 0.7 veces o menor. La producción específica aumenta en forma casi paralela a la producción por mililitro. Al final, con la mutante A₁ la producción aumentó de 5 mg a 412.5 lo que significa un incremento total de 82 veces aproximadamente. Hay que mencionar que no se detectó la excreción de ningún otro aminoácido, al menos por cromatografía en placa fina, lo que no excluye que se produzca algún otro en cantidades muy pequeñas.

En otros casos de producción de triptofano reportados, los rendimientos son mayores que en este trabajo, como cuando se utiliza una mutante resistente a 5-fluorotriptofano (5FT) de Bacillus subtilis que produce 4000 mg/l (SHIHO et. al., 1973) ó una mutante de Corynebacterium glutamicum resistente a diversos análogos de triptofano y cuya producción es de 4900 mg/l. En estos dos casos la fuente de carbono utilizada fué glucosa a una concentración del 10% (HAGINO & NAKAYAMA, 1975). En nuestro caso el rendimiento no es muy grande pero la di-

TABLA 5. GENEALOGIA DE LAS MUTANTES HIPERPRODUCTORAS DE TRIPTOFANO OBTENIDAS.



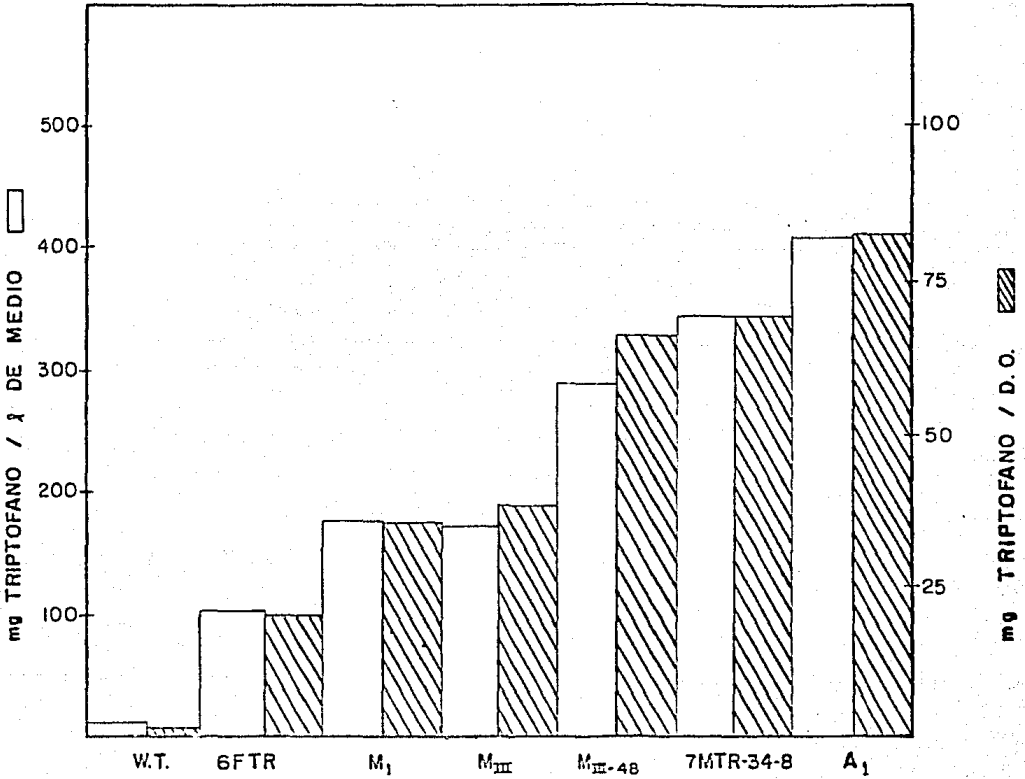


FIG.10. Producción de triptofano de cada una de las mutantes obtenidas. Se utilizó MM adicionado de 23 g/l de metanol y 7.5 mM (1 g/l) de sulfato de amonio. El crecimiento y el aminoácido se determinaron a las 96 horas de fermentación a 37°C con una agitación de 150 rpm.

ferencia está en que la fuente de carbono utilizada es me
tanol y no glucosa que es una mejor fuente de carbono que
este alcohol. A este respecto, sólo un caso se ha reporta
do de producción de triptofano a partir de metanol y se --
utiliza una mutante de Methylomonas methanophilá resis-
tente a 5 metil triptofano (5MT) (SUZUKI et. al., 1977).
La producción alcanzada fué de 200 mg/l del aminoácido, --
siendo este rendimiento menor que el obtenido con H. poly-
morpha A₁. Es importante mencionar que la mutante A₁ pro-
duce 2000 mg/l de triptofano cuando se utiliza glucosa al
8% como fuente de carbono (datos no mostrados), por lo --
que se podría decir que en este azúcar la producción es --
comparable con las antes mencionadas. Esta diferencia en
producción también nos puede indicar que en el caso de --
utilizar metanol, la disponibilidad de los precursores es
tá limitada, ya que aunque en glucosa aumenta mucho el --
crecimiento, la producción específica también es mayor. --
Esto podría resolverse si se seleccionaran mutantes que
tengan una asimilación de metanol más eficiente para que
mayor parte de este alcohol sea canalizado hacia la bio-
síntesis de triptofano y no únicamente a crecimiento.

Por lo que respecta a la productividad, en nues
tro caso es de 0.0042 g/l/h, siendo ésta muy baja si se
compara con otras reportadas para la producción de trip-
tofano utilizando no únicamente fermentación sino produc

ción enzimática ó microorganismos con dosis de genes aumentadas y que van desde 0.01 hasta 0.229 g/l/h (AIBA et. al. 1980). Otra vez habría que resaltar que la fuente de carbono utilizada en todos estos casos es glucosa y no metanol.

Por otro lado, el crecimiento de las mutantes obtenidas en este trabajo no se afectó como se puede observar en la TABLA No. 6. Esto es importante porque en muchas ocasiones el crecimiento disminuye a someter a los microorganismos a mutagénesis continuas.

II. CINETICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE TRIPTOFANO POR LA MUTANTE A₁.

La producción de triptofano por la mutante A₁ de Hansenula polymorpha está asociada al crecimiento como era de esperarse. Esto es característico para la biosíntesis de metabolitos primarios, entre los que están incluidos los aminoácidos, las vitaminas y los nucleótidos. Como se puede observar en la FIGURA 11 el triptofano producido se empieza a detectar en el medio de cultivo poco después de las 24 horas, momento en que probablemente la concentración intracelular es tal que permitió que se empezara a excretar este aminoácido. La producción es lineal hasta las 75 horas que es cuando el crecimiento en-

TABLA 6. CRECIMIENTO MAXIMO OBTENIDO POR LAS MUTANTES DE H. polymorpha HIPERPRODUCTORAS DE TRIPTOFANO.

Cepa	Densidad óptica	Peso seco (mg/ml)
Silvestre	5.4	6.8
6FTR	5.0	6.4
M ₁	5.0	6.4
M _{III}	4.5	5.7
M _{III} -48	4.3	5.5
7MTR-34-8	4.9	6.3
A ₁	5.0	6.4

El crecimiento obtenido en MM con metanol se determinó a los 4 días de incubación a 37°C y a 150 rpm. Los datos mostrados son promedios de experimentos por triplicado.

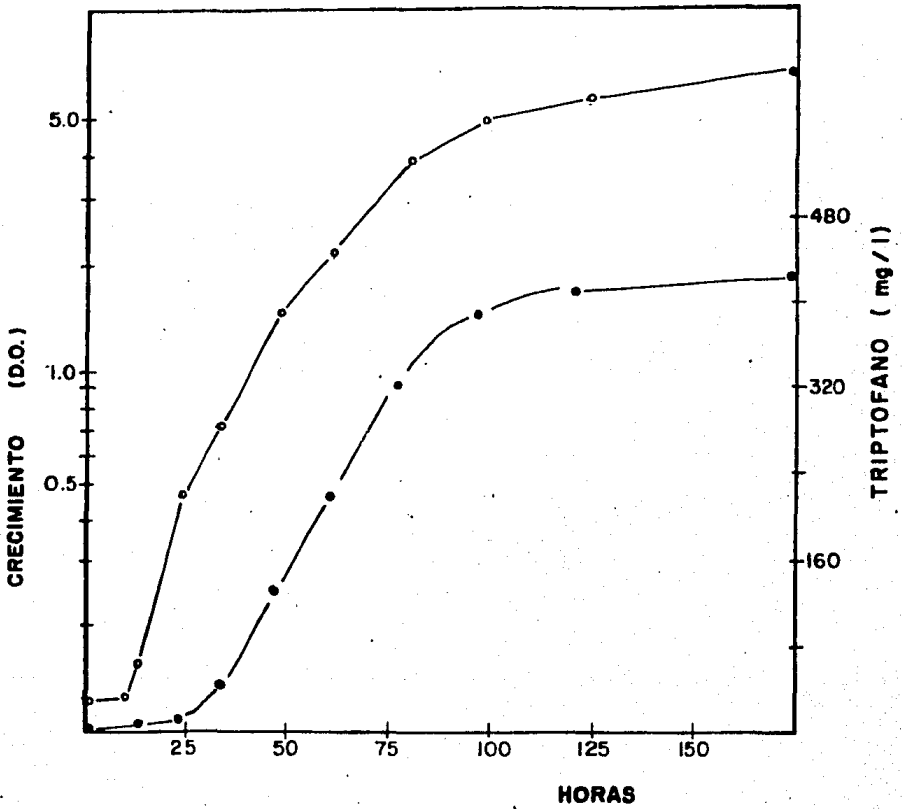


FIG. 11. Cinética de crecimiento (○) y producción de triptofano (●) por la mutante A₁ de Hansenula polymorpha crecida en MM adicionado de 2.3 g/l de metanol y -- 7.5 mM (1g/l) de sulfato de amonio, a una temperatura de 37°C y 150 rpm. Los datos mostrados son el promedio de experimentos por triplicado.

trar en fase estacionaria y se mantiene constante hasta después de 100 horas descartándose con ésto que la degradación del triptofano por este microorganismo sea significativa, como sucede con la producción de otros aminoácidos en donde la degradación disminuye mucho el rendimiento (HERMANN et. al., 1972).

III. OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE TRIPTOFANO POR LA MUTANTE A₁.

La optimización de los principales componentes del medio de cultivo es importante para tener una producción máxima de un metabolito dado por el microorganismo usado. En este caso, los componentes que se variaron fueron la fuente de carbono y nitrógeno, utilizándose tres sales de amonio diferentes.

De metanol se probaron diferentes concentraciones que van desde 7.9 hasta 31 g/l, siendo la producción lineal hasta 23 g/l y descendiendo posteriormente un 39% con respecto a la máxima producción de triptofano. Esta disminución se debe principalmente a una baja en el crecimiento, ya que aumenta también hasta 23 g de metanol y se nota una inhibición del mismo a 31 g/l (FIGURA 12). - Esta inhibición del crecimiento se debe, como ya se mencionó anteriormente, a que en altas concentraciones de me-

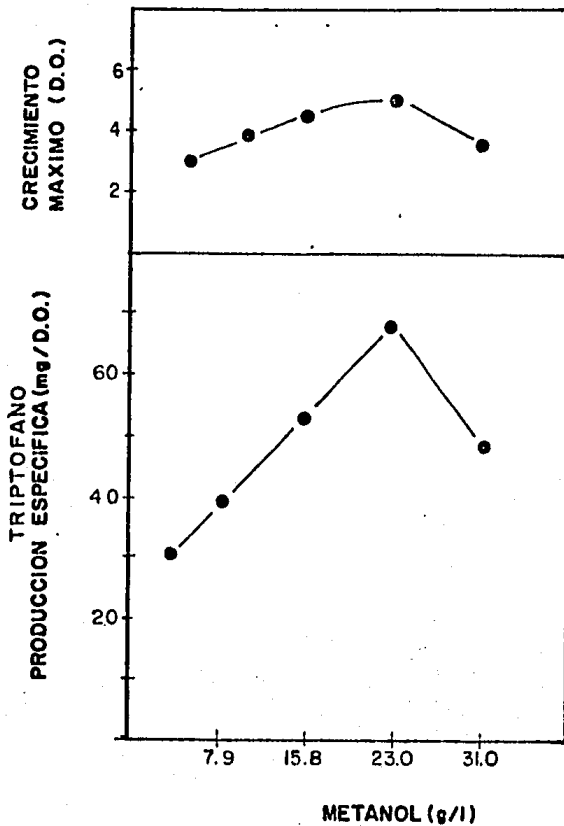


FIG. 12 . Efecto del metanol sobre el crecimiento de H. polymorpha A₁ y la producción de triptofano. El medio de cultivo utilizado fué el MM adicionado de 7.5 mM (1 g/l) de sulfato de amonio. El crecimiento y el triptofano se determinaron a las 96 horas de fermentación a 37°C y 150 rpm. - Los datos mostrados son los promedios de tres repeticiones.

tanol se acumula formaldehído y ac. fórmico que son tóxicos para la levadura (VAN DIJKEN et. al., 1976a, 1976b). Con la obtención de mutantes que asimilasen más rápidamente al metanol ó al formaldehído se podría evitar esta inhibición. Otra posibilidad sería utilizar un sistema de alimentación de metanol para que éste en ningún momento llegara a encontrarse en concentraciones altas.

La fuente de nitrógeno comúnmente utilizada en fermentaciones es una sal de amonio debido a que son las más económicas. En este trabajo se utilizaron el cloruro, sulfato y fosfato diácido de amonio, siendo el comportamiento de la producción de triptofano diferente para cada una de estas sales (FIGURA 13). En presencia de sulfato de amonio, la producción fué máxima en 7.5 mM de la sal, bajando en concentraciones mayores. Cuando se usó el cloruro, la producción fué incrementándose desde 9 -- hasta 37 mM para disminuir en 55 mM. Con el fosfato diácido de amonio, la producción de triptofano presentó un comportamiento diferente al de las otras sales, ya que la máxima producción se obtuvo en la concentración más baja (4.45 mM) y disminuyó a concentraciones mayores. En todos estos casos podríamos tener dos efectos; por un lado el del amonio mismo y en el otro el efecto de los fosfatos. El primero ya se ha observado en Bacillus subtilis -- en donde concentraciones más altas que las utilizadas --

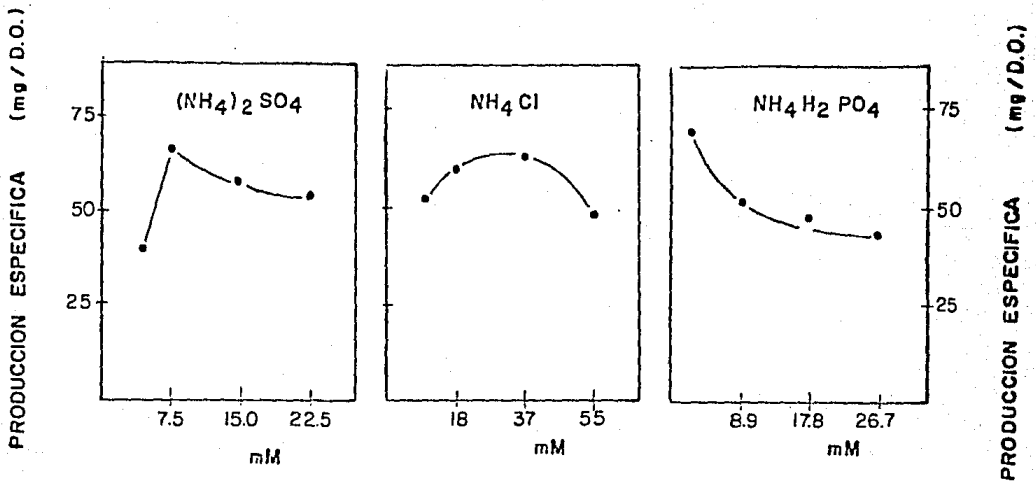


FIG. 13. Efecto de diversas sales de amonio sobre la producción específica de triptofano por la mutante A_1 de *H. polymorpha*. El medio utilizado fué el MM dejando constante la concentración de metanol a 23 g/l. Las determinaciones de crecimiento y triptofano se realizaron a las 96 horas de incubación a 37°C y 150 rpm. Los datos mostrados son los promedios de experimentos por triplicado.

aquí (2%) inhiben la producción de triptofano casi en un 50% (SHIIO et. al., 1973). El nivel en el que actúa el amonio es desconocido.

Los fosfatos también podrían estar regulando la producción de triptofano aunque este tipo de efecto no se ha reportado para metabolitos primarios pero sí existe para metabolitos secundarios (MARTIN et. al., 1977); MARTIN & DEMAIN, 1976).

Otra de las variantes importantes del medio de cultivo es el pH que en este caso no tuvo ninguna influencia sobre la producción de triptofano (FIGURA 14) pero para fines prácticos es muy recomendable utilizar un pH dentro del rango ácido para evitar contaminaciones bacterianas.

Por otro lado, las levaduras en general requieren tiamina y biotina para su crecimiento y aunque utilizan concentraciones muy bajas, pueden influir de forma importante en una fermentación que depende fundamentalmente del crecimiento y la excreción. Es por esta razón que se determinó si estas vitaminas estaban en las concentraciones adecuadas a través de la producción de triptofano. Los rangos de concentración fueron desde 0.1 hasta 5 µg por ml de medio de cada una de ellas, dejando la otra a una concentración constante. Los datos mostraron que los mejores rendimientos se obtuvieron en 1.0 µg/ml de bioti-

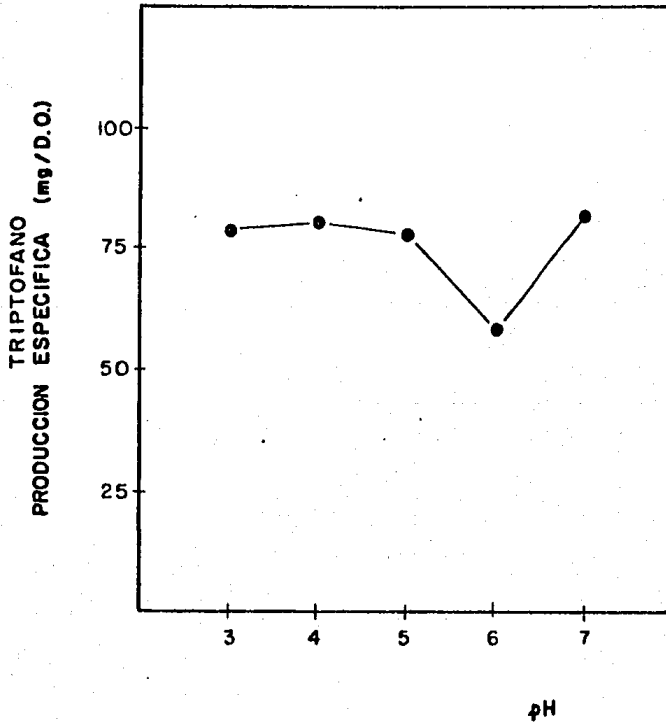


FIG. 14. Influencia del pH inicial del medio de cultivo (MM) sobre la producción específica de triptofano por la mutante A_1 . La concentración de metanol utilizada -- fué de 23 g/l y 7.5 mM (1 g/l) de sulfato de amonio. -- Las determinaciones de crecimiento y producción se hicieron a las 96 horas de incubación a 37°C y a 150 rpm.

na y 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de tiamina (TABLA No. 7).

Otros compuestos que pudieran estar limitando en este caso no el crecimiento sino la producción de triptofano son la glutamina y la serina, ya que en la vía de biosíntesis de este aminoácido se utiliza la primera para la formación de antranílico a partir de corísmico y la segunda para la síntesis de triptofano utilizando indol por la triptofano sintetasa. La serina y la glutamina se adicionaron al medio de cultivo a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ de cada una de ellas. Al determinar el triptofano producido se observó que no había un aumento significativo en la producción específica a diferencia del crecimiento que sí se vió incrementado, ya que en primer caso subió de 5.5 de densidad óptica a 6.2 para glutamina y a 6.3 para serina.

En resumen, la concentración óptima de metanol para la producción de triptofano fué de 2.3 g /l (3% v/v). Las mejores fuentes de nitrógeno fueron el sulfato y el fosfato diácido de amonio a una concentración de 7.5 y 4.45 mM (0.1 y 0.05% p/v) respectivamente. El pH no influye de manera determinante sobre la producción y la serina y la glutamina no son limitantes para la misma. Además, las concentraciones óptimas de tiamina y biotina fueron 0.25 y 1.0 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

TABLA 7. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE TIAMINA Y BIOTINA SOBRE LA PRODUCCION DE TRIPTOFANO -- POR LA MUTANTE A₁.

Concentración (µg/ml)	Crecimiento (D.O.)	Producción específica (mg/D.O.)
BIOTINA ^a .		
0.1	4.5	50.5
0.25	5.0	52.3
1.0	5.7	66.0
3.0	5.1	58.6
5.0	5.6	59.1
TIAMINA ^b .		
0.1	5.8	63.8
0.25	5.5	62.0
1.0	5.7	60.7
3.0	5.8	61.0
5.0	5.6	59.0

Los experimentos se realizaron por triplicado en MM con metanol e incubaron a 37°C con agitación- (150 rpm). Las determinaciones de crecimiento y triptofano se realizaron a los 4 días de fermentación.

a La concentración de tiamina se mantuvo constante a 4 µg/ml.

b La concentración de biotina se mantuvo constante a 0.2 µg/ml.

IV. EFECTO DE LA TIROSINA Y FENILALANINA SOBRE LA PRODUCCION DE TRIPTOFANO POR LA MUTANTE A₁.

La fenilalanina y la tirosina inhiben la primera enzima de la vía de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, la DAHP sintetasa, de la que existen dos isoenzimas, cada una de ellas regulada por uno de los dos aminoácidos. Es por esta razón que fué importante saber si fenilalanina y tirosina al adicionarse al medio de cultivo e inhibir a la enzima antes mencionada, iban a disminuir la disponibilidad de los precursores hacia la producción de triptofano. En la FIGURA 15 se puede observar que conforme aumenta la concentración de estos dos aminoácidos, la producción específica disminuye hasta 23 mg/D.O. desde 150 µg/ml de cada uno de ellos. Esto significa una inhibición de la producción de 62% aproximadamente en esas concentraciones; aunque las intracelulares no son tan altas como las adicionadas, este experimento si nos indica que la DAHP sintetasa es inhibida por fenilalanina y tirosina y que la producción de triptofano por esta mutante se podría aumentar seleccionando un doble auxótrofo para fenilalanina y tirosina para poder controlar la concentración de estos dos aminoácidos exógenamente ó seleccionando mutantes resistentes a análogos de ellos que tengan una DAHP sintetasa no regulada. Estos dos enfoques se han ya aplicado en la obtención de mutantes hiperproductoras

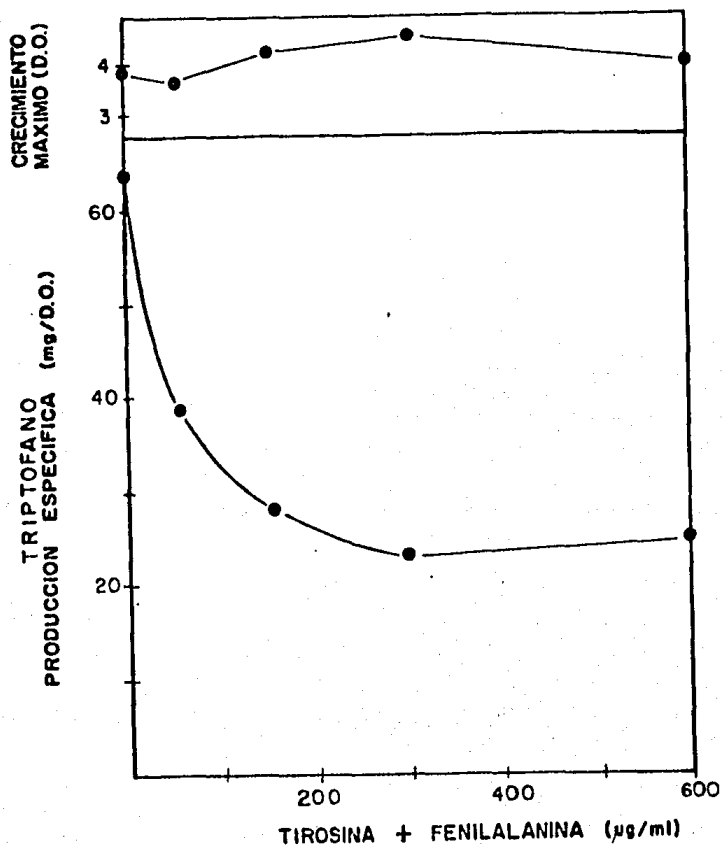


FIG. 15. Inhibición de la producción de triptofano por la mutante A_1 por diferentes concentraciones de fenilalanina + tirosina adicionados al medio de cultivo. Se utilizó el MM con metanol (23g/l) y sulfato de amonio 7.5 mM (1 g/l); los aminoácidos se adicionaron en concentraciones equivalentes y fueron esterilizados por filtración. Las determinaciones de crecimiento y producción se hicieron a las 96 horas de incubación a 37° y 150 rpm.

tanto en C. glutamicum como con Brevibacterium glutamicum. La producción de triptofano aumenta de 4.9 a 12 g/l después de la selección de mutantes resistentes a diferentes análogos de fenilalanina y tirosina del primer microorganismo mencionado (HAGINO & NAKAYAMA, 1975). En el caso de H. polymorpha se seleccionó un braditrofo para los dos aminoácidos mencionados y la producción de triptofano aumentó de 5 a 28 mg/l (SANCHEZ & DEMAIN, 1978).

V. SEPARACION DEL TRIPTOFANO DEL MEDIO DE CULTIVO.

Dentro de cualquier proceso fermentativo es importante la separación del producto del medio de cultivo y es en la mayoría de los casos una de las operaciones limitantes, principalmente por su costo y los bajos rendimientos obtenidos. En nuestro caso, la separación del triptofano representaba un problema especial ya que en la literatura no existen reportes al respecto a excepción de una patente (US PATENT OFF. No. 3, 385762), en donde se reportaba la separación del triptofano por adsorción en carbón activado y posteriormente su elución con etanol caliente, dando un rendimiento de recuperación de 70-80%. Al tratar de repetir este proceso bajo las condiciones reportadas, se obtuvo un porcentaje de triptofano recuperado muy bajo, por lo que se decidió mo

dificar el método original cambiando el eluyente de etanol caliente a una mezcla de etanol-amoniaco (10:1). Con esto se logró aumentar el porcentaje de recuperación a 87.5-90.

La elución es el paso limitante de este proceso ya que al utilizar un volúmen menor no se obtiene la misma recuperación, obteniéndose un óptimo de 100 ml ya que con 200 ml, la cantidad adicional de triptofano desorbido aumenta en un porcentaje muy bajo (TABLA No. 8). En lo que se refiere a la adsorción del triptofano en el carbón activado no hay ningún problema, ya que éste tiene una capacidad de retención de aproximadamente de 160 mg de triptofano por gramo de carbón activado, resultando otra vez que para eluir esta cantidad se requiere un volúmen mayor de la mezcla de etanol-amoniaco para obtener un buen porcentaje de recuperación (TABLA No. 9).

De acuerdo al objetivo planteado al inicio de este trabajo se obtuvo una familia de mutantes de Hansenula polymorpha hiperproductoras de triptofano utilizando los análogos de triptofano, de los cuáles el que mejores resultados rindió fué el 6 fluorotriptofano. Con la mutante A₁ se logró una acumulación de triptofano en el medio de cultivo de 412.5 mg/l utilizando metanol como fuente de carbono. Esto significa un aumento en la producción de la cepa silvestre a la mutante A₁ de 82 veces aproximadamente, siendo la productividad de 0.004 g/l/h. Esta es baja

TABLA 8. RECUPERACION DE TRIPTOFANO COMERCIAL DISUELTO EN MEDIO DE CULTIVO POR ADSORCION A CARBON ACTIVADO.

Volúmen de eluyente (ml)	Recuperación (%)
50	56.2
100	87.5
200	90.0

50 ml de MM conteniendo 100 mg de triptofano comercial fueron pasados a través de una columna de 2 por 10 cm conteniendo 2.5 g de carbón activado y el aminoácido - fué eluído con los volúmenes mostrados de una mezcla - etanol-amoníaco (10:1).

TABLA 9. RECUPERACION DE DIFERENTES CANTIDADES DE TRIP-
TOFANO DISUELTAS EN EL MEDIO DE CULTIVO.

Triptofano adsorbido (mg)	Recuperación (%)
40	90
80	78
120	75
160	71
200	65
300	48

50 ml de medio mínimo conteniendo las diferentes cantidades de triptofano comercial fueron pasados a través de una columna de 2 por 10 cm conteniendo 2.5 g de carbón activado y se aluyó con 100 ml de la mezcla de etanol-amoniaco. (10:1).

si se compara con las productividades obtenidas con otros microorganismos y con otros métodos, pero hay que resaltar el hecho de que en ningún caso se ha utilizado al metanol como fuente de carbono sino a la glucosa. Por estas razones se considera que fué importante la obtención de las mutantes hiperproductoras de H. polymorpha, ya que a excepción del reporte con M. methanolophila (SUZUKI et. al., 1977), no se había hecho nada en lo que respecta a la producción de triptofano a partir de metanol utilizando una levadura.

Este proceso de producción de triptofano, en general se muestra promisorio, pero utilizando metanol como fuente de energía, ya que este aminoácido puede ser producido por otros métodos y obtenerse mejores rendimientos.

C O N C L U S I O N E S

1) Es factible la producción de triptofano por - Hansenula polymorpha utilizando metanol como fuente de carbono.

2) A través del uso de los análogos de triptofano y ac. antranílico se pudo obtener una familia de mutantes de H. polymorpha hiperproductoras de triptofano, habiendo sido el 6 fluorotriptofano el análogo que mejores resultados dió.

3) La mutante A_1 , resistente a 6 fluorotriptofano, 7 azatriptofano, 7 metiltriptofano y ac. antranílico, fué la que presentó una mayor acumulación de triptofano en el medio de cultivo (412.5 mg/l); el aumento en producción fué de 82 veces y la productividad resultó ser de 0.004 g/l/h.

4) El metanol a concentraciones mayores de 23 g por litro inhiben el crecimiento de la mutante A_1 .

5) Altas concentraciones de las sales de amonio utilizadas (cloruro, sulfato y fosfato diácido) inhiben la producción de triptofano por la mutante A_1 .

6) El proceso de separación descrito es eficiente ya que se logra una recuperación entre 80 y 90% del triptofano acumulado en el medio de cultivo.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Aiba, S., Imanaka, T. and H. Tsunekawa. 1980. Enhancement of tryptophan production by E. coli as an application of genetic engineering. Biotech. Letts. 2-12, 525-530.
- 2) Anónimo. 1978. Future for tryptophan. Process Biochemistry 13-5, 1.
- 3) Anthony, C. 1980. Methanol as substrate: theoretical aspects. In: Hydrocarbons in Biotechnology. Edited by Heyden, Institute of Petroleum, London.
- 4) Anthony, A. 1975. Assimilation of C_1 -compounds. Biochemical J. 146, 289-292.
- 5) Bode, R., Bottcher, F. and D. Birnbaud. 1980. Isolation and characterization of anthranilate-excreting mutants of Hansenula henrici. Cell. & Mol. Biology 26, 615-620.
- 6) Bode, R. and D. Birnbaud. 1978a. Die enzyme der biosynthesen aromatischer aminosäuren bei Hansenula henrici: 3-desoxy-D-arabino-heptulosaure-7-phosphat (DAHP)-synthase. Biochem. Physiol. Pflanzen. 172, 233-243.
- 7) Ibid. 1978b. Die enzyme der biosynthese aromatischer - aminosäuren bei Hansenula henrici: Hemmung der antranilat synthase durch tryptophan und tryptophan-derivate. Biochem. Physiol. Pflanzen. 172, 255-261.
- 8) Ibid. 1978c. Charakterisierung der antranilat-synthase. Biochem. Physiol. Pflanzen. 172, 245-253.
- 9) Ibid. 1978d. Die enzyme der biosynthese aromatischer - aminosäuren bei Hansenula henrici: Antranilar-phosphoribosyl pyrophosphate-phosphoribosil-transferase. Zentbl. All. Mikrobiol. 18, 559-566.
- 10) Bracher, M. and M.E. Schweingruber. 1977. Purification of the tyrosine inhibitable 3-desoxy-D-arabino-heptulosaure-7-phosphat synthase from Schizosaccharomyces pombe. Biochim. Biophys. Acta 485, 446-451.
- 11) Cox, R.B. and J.R. Quayle. 1975. Biochem. J. 150, 567-571.

- 12) Dalton, H. 1980. Oxidation of hydrocarbons by methane monooxygenases from a variety of microbes. Adv. in -- Appl. Microbiol. 20, 71-87.
- 13) Demain, A.L. 1971. Microbial production of food additives. Symposia of the Society for General Microbiology. No. XXI, p. 77-101.
- 14) van Dijken, J.P., Harder, W., Berdmore, A.J. and J.R. Quayle. 1978. Dihydroxyacetone: An intermediate in -- the assimilation of methanol by yeasts? FEMS Microbiol. Letters 4, 97-102.
- 15) van Dijken, J.P., Gostra-Demkes, G.J., Otto, R. and W. Harder. 1976. S-formyl-glutathione: The substrate for formate dehydrogenase in methanol-utilizing yeasts. - Arch. Microbiol. 111, 77-83.
- 16) van Dijken, J.P., Otto, R. and W. Harder. 1975a. Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by catalase purified from Hansenula polymorpha. Arch. Microbiol. 106, 221-226.
- 17) van Dijken, J.P. and W. Harder. 1975b. Growth yields of microorganisms on methanol and methane. Theoretical study. Biotech. Bioengg. 17, 15-30.
- 18) Doy, H. & A. Cooper. 1966. Aromatic biosynthesis in yeast. The synthesis of tryptophan and regulation of this pathway. Biochim. Biophys. Acta 127, 302-310.
- 19) Dworkin, M. and J.W. Foster. 1956. A methanol-assimilating bacteria. J. Bacteriol. 72, 646-652.
- 20) Eggeling, L. and H. Sahn. 1978. Derepression and partial insensitivity to carbon catabolite repression of methanol dissimilating enzymes in H. polymorpha. Eur. J. Appl. Microbiol. 5, 197-202.
- 21) Egli, T.H., van Dijken, J.P., Veenhuis, M. Harder, W. and A. Fiechter. 1980. Methanol metabolism in yeast: Regulation of the synthesis of catabolic enzymes. Arch. Microbiol. 124, 115-121.
- 22) Elías, G. y R. Bressani. 1972. Mejoramiento tecnológico de la calidad proteica del maíz. Tecnol. de Alim. (Mex) Marzo-Abril, 70-86.
- 23) Fantes, P.A., Roberts, L.M. and R. Huetter. 1976. Free

- tryptophan pool and tryptophan biosynthetic enzymes - in Saccharomyces cerevisiae. Arch. Microbiol. 107, - 207-214.
- 24) Fink, G. 1970. The biochemical genetics of yeasts. - Methods in Enzymology. Vol. 17-A, p: 59-78.
 - 25) Hagino, H. and K. Nakayama. 1975a. L-tryptophan production by analog-resistant mutant derived from a - phenylalanine and tyrosine auxotroph of Corynebacterium glutamicum. Agr. Biol. Chem. 39-2, 343-349.
 - 26) Ibid. 1975b. The biosynthetic control in aromatic -- aminoacid producing mutants of Corynebacterium glutamicum. Agr. Biol. Chem. 39-2. 351-361.
 - 27) Harder, W. and J.P. van Dijken. 1975. Microbial growth on C₁-compounds. The Society of Fermentation Technology, Osaka, Japan. 155-198. In. Microbial Growth on C₁ compounds.
 - 28) Harridon, D.E.F., Topiwara, H. and G. Hamer. 1972. - Yield and productivity in single-cell protein production from methane and methanol. Proc. IV Fermentation Technol. Today, 491-495.
 - 29) Herman, M., Thevenet, N.J., Coudert-Maratier, M.M. and P. Vandecasteele. 1972. Consequences of lysine oversynthesis in Pseudomonas mutants insensitive to feedback inhibition. Lysine excretion or endogenous induction of a lysine-catabolic pathway. Eur. J. Biochem. 30, - 100-106.
 - 30) Holzer, H. 1976. Catabolite inactivation in yeasts. - Trends in Biochem Sci. 1, 178-181.
 - 31) Hou, C.I., Patel, R., Laskin, A.I., Barnabé, N. and - I. Marczak. 1981. Substrate specificity and stereospecificity of nicotinamide adenine-dinucleotide-linked - alcohol dehydrogenases from methanol-grown yeasts. - Appl. Environm. Microbiol. 41-3, 829-832.
 - 32) Ibid. 1979a. Microbial oxidation of gaseous hydrocarbons. Appl. Environm. Microbiol. 38, 131-142.
 - 33) Ibid. 1979b. Identification and purification of a nicotinamide adenine-dinucleotide dependent secondary - alcohol dehydrogenase from C₁-utilizing microbes. - - FEBS Letters 101, 179-183.

- 34) Izumi, Y., Asano, Y., Tani, Y. and K. Ogata. 1977. Formation of valine and leucine by analog resistant mutants of an obligate methylotroph, Methylomonas aminofaciens. J. Ferment. Technol. 55-5, 452-458.
- 35) Johnson, P.A. and J.R. Quayle. 1964. Microbial growth on C₁-compounds. Biochem. J. 93, 281-285.
- 36) Kato, N., Tsuji, K., Ohashi, H., Tani, Y. and K. Ogata. 1977. Two assimilation pathways of C₁-compounds in Streptomyces sp. No. 239 during growth on methanol. - Agr. Biol. Chem. 41-1, 29-34.
- 37) Kato, N., Omori, Y., Tani, Y. and K. Ogata. 1976. Alcohol oxidases of Kloeckera sp. and Hansenula polymorpha. Catalytic properties and subunit structures. Eur. J. Biochem. 64, 341-350.
- 38) Keune, H., Sahn, H. and F. Wagner. 1976. Production of L-serine by methanol utilizing bacterium Pseudomonas 3ab. Eur. J. Appl. Microbiol. 2, 175-184.
- 39) Lawrence, A.J., Kemp, M.B. and J.R. Quayle. 1970. Synthesis of cell constituents by methane-grown Methylococcus capsulatus and Methanomonas methanoxidans. - Biochem. J. 116. 631-639.
- 40) Levine, D.W. and C.L. Cooney. 1973. Isolation and - - characterization of a thermotolerant methanol-utilizing yeast. Appl. Microbiol. 26-6, 982-990.
- 41) Lingens, F., Goebel, W. and H. Vessler. 1968. Biochem. Z. 346, 357-362.
- 42) Ibid. 1967. Eur. J. Biochem. 1, 363-370.
- 43) Martin, J.F. and A.L. Demain. 1976. Control by phosphate of candidicin production. Biochem. Biophys. Res. Comm. 71-4, 1103-1109.
- 44) Martin, J.F., Liras, P. and A.L. Demain. 1977. Inhibition by phosphate of the activity of candidicin synthases. FEMS Microbiol. Lett. 2, 173-176.
- 45) Miozzari, G., Niederberger, P. and R. Hutter. 1978. - Tryptophan biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae: Control of the flux through the pathway. J. Bacteriol. 134-1, 48-59.
- 46) Morinaga, Y., Yamanaka, S. and K. Takinami. 1981a. -

- L-serine by methanol-utilizing bacterium Pseudomonas MS-31. Agr. Biol. Chem. 45-6, 1419-1424.
- 47) Ibid. 1981b. L-serine production by temperature-sensitive mutants of methanol-utilizing bacterium Pseudomonas MS-31. Agr. Biol. Chem. 45-6, 1425-1430.
 - 48) Muller, F. 1976. Methanol assimilating yeasts for SCP production, their special requirements on pilot and - large scale fermenters. Fifth International Fermentation Symposium. Berlin. p. 477.
 - 49) O'Connor, M.L. and J.R. Quayle. 1979. J. Gen. Microbiol. 113, 203-209.
 - 50) Ogata, K., Tani, Y. and N. Kato. 1975. Proc. Int. Symp. Microbial Growth on C₁ compounds. Tokyo, p. 99.
 - 51) Oki, T., Kitai, A., Kouno, K. and A. Ozaki. 1973. J. Gen. Microbiol. 19, 79-83.
 - 52) Olizar, M.K. 1980. Anuario estadístico del Mercado Mexicano, 1979=1980. p. 25-26.
 - 53) Opienska-Blauth, J., Charezinski, M. and H. Berbec. 1963. A new rapid method of determining tryptophan. - Anal. Biochem. 6, 69-76.
 - 54) Quayle, J.R. and T. Ferenci. 1978. Evolutionary aspects of autotrophy. Microbiol. Rev. 42, 251-278.
 - 55) Quayle, J.R. 1972. Metabolism of C₁-compounds. Adv. in Microbial Physiol. 7, 119-140.
 - 56) Ruban, E.L. and L.B. Lobyreva. 1966. Biosynthesis of tryptophan by yeasts of the genus Hansenula. Appl. - Biochem. Microbiol. 1, 51-53.
 - 57) Sahn, H. and F. Wagner. 1973. Microbial Assimilation of methanol: The ethanol and methanol oxidizing enzymes of the yeast Candida boidinii. Eur. J. Biochem. 36, 250-256.
 - 58) Sánchez, S., Cea, A. and M.E. Flores. 1978a. Selective enrichment of aromatic amino acids auxotrophs in Hansenula polymorpha. Appl. and Environm. Microbiol. 35-2, 228-230.
 - 59) Sánchez, S. and A.L. Demain. 1978b. Tryptophan excretion by a braditroph growing in methanol. Appl. and

- Environm. Microbiol. 35-2, 459-461.
- 60) Sánchez, S. and A.L. Demain. 1977. Enrichment of auxotrophic mutants in Hansenula polymorpha. Eur. J. Appl. Microbiol. 4, 45-49.
 - 61) Schurch, A., Miozzari, J. and R. Hutter. 1974. Regulation of tryptophan biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae: Mode of action of 5-methyl-tryptophan and 5-methyl-tryptophan-sensitive mutants. J. Bacteriol. 117-3, 1131-1140.
 - 62) Senior, P.J. and J. Windass. 1980. The ICI Single cell protein process. Biotechnology letters 2-5, 205-210.
 - 63) Shiio, I., Ishii, K. and K. Yokoseki. 1973. Production of L-tryptophan by 5-fluorotryptophan resistant mutants of Bacillus subtilis. Agr. Biol. Chem. 37-9, 1991-2000.
 - 64) Shiio, I. and S. Nakamori. 1970. Microbial production of L-threonine. Production by alfa-amino-beta hidroxyvaleric acid resistant mutants of glutamate producing bacteria. Agr. Biol. Chem. 34-3, 448-456.
 - 65) Shimizu, S. and K. Sato. 1976. Biosynthesis of vitamins, specially vitamin B₁₂ by methanol-utilizing bacteria. Fifth Int. Fermentation Symposium, Berlin.
 - 66) Suzuki, M., Berlund, M., Uden, A. and C.G. Heden. - 1977. Aromatic amino acid production by analog-resistant mutants of Methylomonas methanolophila 6R. J. Ferment. Technol. 55-5, 466-475.
 - 67) Tani, Y., Kato, N. and H. Yamada. 1978. Utilization of methanol by yeasts. Adv. in Appl. Microbiol. 24, 165-186.
 - 68) Tani, Y., Miya, T., Nishekawa, H. and K. Ogata. 1972. The microbial metabolism of methanol. Part I: Formation and crystalization of methanol oxidizing enzyme in methanol-utilizing yeasts Kloeckera sp. No. 2201. Agr. Biol. Chem. 36, 477-485.
 - 69) Toraya, T., Yongsmith, B., Tanaka, A. and S. Fukui. - 1975. Appl. Microbiol. 30, 477-485.
 - 70) Veenhuis, M., Keizer, I. and W. Harder. 1979. Characterization of peroxisomes and their development after the transfer the cells into methanol containing media. Arch. Microbiol. 120, 167-175.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 71) Volfová, O. and P. Pilát. 1974. Studies on methanol-oxidizing yeasts. *Folia Microbiológica* 19, 249-256.
- 72) Yokote, Y., Sugimoto, M. and S. Abe. 1974. Yeasts utilizing methanol as a sole carbon source. *J. Ferment. Technol.* 52-4, 201-204.
- 73) Wagner, F. 1977. Methanol: a fermentation substrate. *Experientia* 33, 110-113.