

16  
24j.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"CUAUTITLAN"

OBTENCION DE CEPAS MUTANTES DE B. subtilis  
SOBREPRODUCTORAS DE METIONINA

**FALLA DE ORIGEN**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICO FARMACEUTICO**  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A  
**DELFINO GODINEZ VARGAS**



DIRECTORES DE TESIS:  
DR. JAIME ALVAREZ DE LA CUADRA JACOBS  
Q. F. B. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO DE MEX. OCTUBRE 1989



## **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.

INDICE.

	Pág.
Resumen.	
<b>I.- GENERALIDADES.</b>	(1)
I.A.- Introducción.	(1)
I.A.1.-El papel de metionina en la nutrición animal.	(1)
I.B.-Antecedentes de la producción de aminoácidos por vía microbiana.	(8)
I.B.1.-Producción de metionina por vía microbiana.	(8)
I.C.-Mutantes y su utilización.	(10)
I.D.-Mutantes regulatorias.	(11)
I.E.-Ruta biosintética para metionina en bacterias.	(14)
I.F.-Obtención de mutantes resistentes a análogos tóxicos.	(16)
I.G.-Determinación de metabolitos por el método de complementación auxotrófica.	(21)
<b>II.- OBJETIVOS.</b>	(22)
<b>III.- SELECCION DEL MICROORGANISMO DE TRABAJO.</b>	(23)
<b>IV.- MATERIALES Y METODOS.</b>	(24)
IV.A.-Cepas bacterianas.	(24)
IV.B.-Productos químicos y medios de cultivo.	(24)
IV.C.-Elección de la concentración adecuada de la fuente de carbono para el crecimiento de <i>E. subtilis</i> en medio mínimo.	(25)
IV.D.-Obtención de mutantes resistentes a etionina.	(25)
IV.E.-Evaluación de metionina por el método de complementación auxotrófica.	(26)
IV.E.1.-Técnica para determinar metionina por el método de complementación auxotrófica.	(27)
IV.F.-Obtención de cepas mutantes Et (r), N1 (r).	(28)
IV.G.-Obtención de cepas mutantes Et (r), N1 (r) y Sm (r).	(28)

IV.H.-Determinación de las concentraciones óptimas de nitrógeno y azufre para obtener un mejor rendimiento.	(29)
IV.I.-Obtención de la curva de crecimiento contra producción.	(30)
V.- RESULTADOS.	(32)
V.A.- Obtención de las cinéticas de crecimiento para determinar las concentraciones óptimas de azúcar como fuente de carbono para el cultivo de las cepas de <u>B. subtilis</u> 6633.	(32)
V.B.- Obtención de mutantes de <u>B. subtilis</u> resistentes a los análogos tóxicos.	(32)
V.C.- Determinación de metionina por el método de complementación auxotrófica.	(32)
V.D.- Determinación de la concentración de nitrógeno y azufre para obtener un óptimo rendimiento.	(43)
V.E.- Obtención de la cinética de crecimiento contra producción.	(45)
VI.- DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.	(47)
VII.- REFERENCIAS.	(52)

INDICE DE TABLAS.

	Pág.
TABLA I.- Composición de los ingredientes utilizados como nutrientes en la industria pecuaria de monogástricos.	(4)
TABLA II.- Necesidades de aminoácidos de las aves y grado de suficiencia de diversas fuentes proteicas.	(5)
TABLA III.- Necesidades de proteína y de aminoácidos para aves.	(6)
TABLA IV.- Requerimientos de proteína y aminoácidos para el cerdo.	(7)
TABLA V.- Análogos tóxicos de aminoácidos utilizados en la obtención de mutantes regulatorias.	(20)
TABLA VI.- Procedimiento para la elaboración de los sistemas para la curva patrón de metionina y los sistemas problemas para determinarla en los sobrenadantes.	(27)
TABLA VII.- Susceptibilidad de la cepa 6633 de <i>B. subtilis</i> a etionina.	(36)
TABLA VIII.- Producción y rendimiento de metionina por las cepas silvestre y etionina resistentes.	(38)
TABLA IX.- Susceptibilidad de la cepa MC 3321 de <i>B. subtilis</i> a N1.	(39)
TABLA X.- Producción y rendimiento de metionina por las cepas silvestre, Etionina, etionina- Norlaucina resistentes.	(41)
TABLA XI.- Susceptibilidad de la cepa SG 1612 de <i>B. subtilis</i> a sulfóxido de metionina.	(42)
TABLA XII.- Determinación de las concentraciones óptimas de nitrógeno y azufre para obtener un mejor rendimiento.	(44)

## RESUMEN

En el presente trabajo reporto la obtención de cepas mutantes de B. subtilis sobreproductoras de metionina obtenidas mediante el proceso de mutación con ayuda de análogos de este aminoácido permitiendo por una parte desregular el primer paso de la vía a nivel del sitio alostérico de la aspartocinasa y por otra parte desregular las enzimas sujetas a control genético en beneficio de la sobreproducción del aminoácido en cuestión.

El uso de esta metodología permitió obtener mutantes bacterianas resistentes a etionina y norleucina, que en medio mínimo de Robinson y glucosa al 1% llegaron a producir hasta 172.2 mg/l de metionina.

La producción anterior es consecuencia de alteraciones que sufre la maquinaria enzimática reconociendo al producto final.

## I.- GENERALIDADES.

### I.A.- INTRODUCCION.

#### I.A.1.- EL PAPEL DE METIONINA EN LA NUTRICION ANIMAL.

Sin duda, uno de los elementos más importantes en la alimentación humana y de animales monogástricos, lo constituyen los aminoácidos esenciales, ya que estos no son sintetizados por estos organismos y por tanto, requieren consumirlos en sus dietas.

Como resultado de dietas pobres en estos aminoácidos, se ha encontrado en aves de corral y cerdos, bajas eficiencias de conversión, así como tiempos largos de crianza a mercado muy prolongado (2).

Por otra parte, dietas pobres en metionina, causan en niños cuadros graves de desnutrición, y en animales monogástricos, provoca cuadros de hígado graso y necrosis (3).

En lo que corresponde a alimentos de origen vegetal, la fuente de calorías y parte de la proteína requerida se encuentran normales, pero en lo que respecta a lisina y metionina se encuentran disminuidos. Por lo que se necesitaría para cubrir las necesidades de esos aminoácidos, aumentar la cantidad de alimento base, provocando un desbalance calórico y de nitrógeno (5).

En la explotación masiva de aves y cerdos se formulan dietas en base a los requerimientos de calorías, proteína y aminoácidos esenciales; buscando también que los costos sean los más bajos posibles y una óptima conversión alimenticia. Sin embargo los problemas a los que se enfrentan los criadores en nuestro país no son pocos ya que los alimentos base más usados se restringen a tres, que son sorgo, maíz y salvado; descartándose el segundo

por constituir la base de la alimentación humana en México. Por otra parte, el país no es autosuficiente en la producción de maíz y por tanto se tiene que importar, elevándose con esto el costo de la formulación. El salvado resulta incosteable por su alto costo y dado que existe control sobre el precio de la carne y el huevo, de momento no sería el alimento indicado. El sorgo es el alimento de elección ya que es barato y no es utilizado en la alimentación humana. Aunque no es el ideal, es el más ampliamente usado por los productores (3).

Dado que el sorgo por sí mismo no cubre la totalidad de los requerimientos de proteínas (véase tablas I, II), se hace necesaria la adición de un complemento rico en proteína para cubrir dichas deficiencias. La complementación puede ser de cualquier origen, siempre y cuando se cubran los requerimientos nutricionales, siendo los productos de elección las pastas de soya, ajonjolí, girasol, algodón, dado que tienen la ventaja de ser relativamente baratas, aunque se condiciona la utilización a su disponibilidad.

Por otra parte las formulaciones utilizadas presentan en su composición cantidades superiores a las necesidades de todos los aminoácidos esenciales, con la excepción de lisina y metionina (véase tablas III y IV).

Ante estas condiciones el productor tiene dos alternativas:

- 1.- Aumentar la cantidad de complemento hasta cubrir la deficiencia, aunque el inconveniente es que el costo se puede incrementar hasta en un 180 % y además se provoca un imbalance nitrogenado y calórico.
- 2.- Complementar con los aminoácidos faltantes, en la cantidad



que se requieran, con lo que se podría inclusive reducir la cantidad de proteína hasta en un 9 %. Si se realizara de esta manera se reduciría también el costo de la dieta.

Ante esas alternativas, se aprecia claramente que la segunda es la mejor opción.

**TABLA I. COMPOSICION DE LOS INGREDIENTES UTILIZADOS COMO NUTRIENTES EN LA INDUSTRIA PECUARIA DE MONOGASTRICOS (5)**

COMPONENTE	% DE PROTEINA	% DE LISINA	% DE METIONINA.
MAIZ	8.0	0.17	0.27
MAIZ OPACO	10.3	0.40	0.37
SORGO	8.8	0.21	0.21
TRIGO	12.6	0.38	0.33
TRITICALE	14.7	0.48	0.53
SALVADO	15.3	0.61	1.10
PASTA DE SOYA	47.0	3.10	1.74
PASTA DE ALGODON	48.4	1.93	1.48
PASTA DE AJONJOLI	44.2	1.46	1.81
PASTA DE GIRASOL	36.7	1.47	1.32
HARINA DE PESCADO	36.7	1.47	2.36
LEVADURA DE CERVEZA	45.1	3.42	2.53

**TABLA II. NECESIDADES DE AMINOACIDOS DE LAS AVES Y GRADO DE SUFICIENCIA DE DIVERSAS FUENTES PROTEICAS (3).**

AMINOACIDO	NECESIDADES *	% DE SUFICIENCIA			
		SOYA	AJONJOLI	GIRASOL	ALGODON
ARGININA	6.3	112	160	119	165
AROMATICOS	5.8	135	150	118	128
HISTIDINA	1.5	157	151	140	176
ISOLEUCINA	3.5	156	125	128	112
LÉUCINA	5.9	126	120	95	103
LISINA	5.2	121	51	69	79
METIONINA	2.7	60	134	146	72
TREONINA	3.2	113	102	98	97
TRIPTOFANO	1.0	131	163	107	158
VALINA	3.6	147	140	137	140

\* En porciento de la proteina usada.

**TABLA III. NECESIDADES DE PROTEINA Y AMINOACIDOS PARA AVES (5).**

	INICIACION	PONEDORAS Y REPRODUCTORAS.
PROTEINA	19	17
AMINOACIDOS:		
Arginina	1.1	0.9
Aromáticos	1.2	0.9
Histidina	0.7	0.3
Isoleucina	0.6	0.5
Leucina	1.2	1.2
Lisina	0.9	0.8
Metionina	1.2	0.9
Treonina	0.6	0.5
Triptofano	0.2	0.2
Valina	0.7	0.6
En porciento del alimento.		

**TABLA IV. REQUERIMIENTOS DE PROTEINA Y AMINOACIDOS PARA EL CERDO (12).**

	PESO 0-50 Kg	PESO 90-100 Kg.
PROTEINA	27	13
AMINOACIDOS:		
Arginina	0.3	0.2
Aromáticos	1.2	0.6
Histidina	0.3	0.1
Isoleucina	0.8	0.4
Leucina	1.0	0.5
Lisina	1.3	0.6
Metionina	0.8	0.3
Treonina	0.8	0.4
Triptofano	0.2	0.1
Valina	0.8	0.4

En porcentaje de la dieta.

## **I.B.-ANTECEDENTES DE LA PRODUCCION DE AMINOACIDOS POR VIA MICROBIANA.**

Después de la segunda guerra mundial la microbiología industrial empezó a desarrollarse, ya que por esos años se reportó la producción de ácido glutámico por medio de un proceso fermentativo. Años más tarde, reportaron acumulación de aminoácidos en cultivo de E. coli (1).

Con el descubrimiento de cepas de alta productividad de ácido glutámico, en medios que contenían sales de amonio y carbohidratos como fuente de carbono, se estableció la primera industria de fermentaciones para la obtención de aminoácidos (Kinoshita et, al. 1957).

A finales de los años cincuenta Adelberg (1958), reporta la obtención de mutantes de E. coli resistentes a tienilalanina y que excretan fenilalanina y tirosina en el medio en el que se hace crecer bajo condiciones mínimas de nutrientes (4).

En los últimos años han aparecido una gran cantidad de reportes acerca de la obtención de aminoácidos por medio de microorganismos en los que de una u otra manera se les han alterado la maquinaria enzimática que regula la producción de aminoácidos y su síntesis ya no está sujeta a control.

### **I.B.1.-PRODUCCION DE METIONINA.**

Antes de 1984, el aminoácido metionina se producía en el país con tecnología extranjera, a partir de metilmercaptano y ácido cianhídrico, pero a raíz de un accidente que ocurrió en la India por esos años, Unión Carbide dejó de exportar metilmercaptano fuera de los Estados Unidos y esto afectó a

países que como el nuestro, requería de esta materia prima para producir metionina, ocasionando que éste aminoácido pasara a ser un producto de importación y que con esto agudizar más el problema financiero del país.

Es por eso que nosotros estamos interesados en buscar una metodología que nos permita volver a producir metionina, que sea menos riesgosa y más barata para que por lo menos nos ayude a sufragar las necesidades del país.

Como mencionamos anteriormente, en los últimos años han aparecido gran cantidad de reportes de obtención de aminoácidos por vía microbiana. Entre ellos destacan la obtención de metionina por cepas mutantes de E. coli resistentes a norleucina (16). Y de Metilophilus sp resistente a etionina y que además utiliza metanol como fuente de carbono (11, 22).

El planteamiento que nosotros hacemos es que si mutamos los genes de las enzimas regulables por metionina, de tal manera que la enzima ya no reconozca al producto final entonces la maquinaria va a trabajar continuamente sin ninguna restricción.

Para lograr esto nosotros planteamos la obtención de mutantes bacterianas resistentes secuencialmente de análogos tóxicos de metionina con más alta producción.

En la parte final que es lo referente al conjunto de genes que codifican para las enzimas que regulan los pasos finales de síntesis de metionina están también sujetas a un control genético por el producto final el cual, creo que se lleva a cabo de la siguiente manera:

Metionina forma un complejo con la proteína que es producida por el gene met J, y ese complejo es el que bloquea el sitio

operador en el operón de metionina, evitando que prosiga la síntesis de esta. Por lo que al agregar un análogo en presencia de un mutágeno, se busca que selectivamente se altere el sitio operador, o el complejo proteico para que este ya no detenga la síntesis de metionina (2).

#### **I.C. - MUTANTES Y SU UTILIZACION.**

Las mutantes microbianas han probado ser muy importantes para la producción de aminoácidos por procesos fermentativos. Se han hecho considerables esfuerzos para mejorar la productividad de microorganismos utilizados en la producción de aminoácidos por la inducción de varias clases de mutantes que tienen ciertas características especiales. En particular, mutantes auxotróficas y otras mutantes en donde los mecanismos de regulación que controlan la biosíntesis de aminoácidos son alterados por mutaciones, son ahora ampliamente utilizados para la producción comercial (8).

La síntesis de enzimas en microorganismos, está controlada por la información que codifica para la síntesis de proteínas. La regulación metabólica de la formación de enzimas y su actividad ocurre por una de las tres formas siguientes:

- 1.-Represión de la síntesis enzimática por los metabolitos o sus análogos.
- 2.-Inhibición por retroalimentación.- Inhibición de la actividad enzimática por los productos finales.
- 3.-Inducción.- Aceleración en la formación enzimática por el sustrato o sus análogos.

Para la acumulación de aminoácidos se emplean varias clases de



mutantes con diferentes características.

- a) Mutantes defectuosas en la actividad enzimática y que ocasionan que se acumule un cierto producto de interés.
- b) Mutantes que tienen incrementada la actividad enzimática para la biosíntesis.
- c) Mutantes que tienen una modificación en el sistema de transporte para metabolitos, resultando una incrementada acumulación de un producto en particular (2).

#### **I.D.- MUTANTES REGULATORIAS.**

Los mecanismos de regulación juegan un papel bien importante en la economía celular, ya que estos ayudan a evitar el gasto excesivo de materia prima, enzimas y energía. De esos mecanismos dos resultan ser los más importantes en la regulación biosintética (9).

1.-La regulación a nivel enzimático o alostérica.

2.-La regulación de síntesis de las enzimas involucradas en la producción de los metabolitos.

El primer caso se da, cuando la primera enzima involucrada en la vía biosintética es una enzima compleja, y cuenta con un sitio alostérico para el reconocimiento del producto final de la vía, el cual estando presente inhibe la actividad enzimática, evitando con esto la acumulación del producto final.

El esquema anterior se vuelve más complejo cuando la vía metabólica presenta ramificaciones. en este caso se puede presentar una inhibición concertada, en donde son dos o más de los productos finales actúan inhibiendo, en conjunto y no por separado, a la primera enzima de la vía común. Ej. ruta biosintética de los aminoácidos de la familia del ácido aspártico.

en bacterias (20).

En otros organismos que presentan vías similares, se tiene que la primera enzima no es una sola, sino un conjunto de isoenzimas, donde cada una es regulable por uno de los productos finales de la vía. Esto también resulta útil en el caso donde uno de los productos finales inhibe después de la ramificación, y el otro producto activa el mismo sitio.

La obtención de cepas hiperproductoras consiste en modificar el sitio alostérico de la enzima que reconoce al producto final, para lo cual se hace necesario la utilización de análogos tóxicos, con la finalidad de bloquear ese sitio sin que el producto final realmente exista. Las mutantes resistentes a esos análogos tienen modificado el sitio alostérico para que no se reconozca ni al análogo ni al producto final y el flujo de materia prima se canalice hacia la producción de dicho metabolito de interés. Esta estrategia ha mostrado ser útil en la producción de cepas mutantes hiperproductoras de metionina (11, 22).

El mecanismo de regulación genética, tiene como finalidad reprimir la síntesis de las enzimas necesarias para producir el aminoácido requerido, mediante la formación de un complejo, que es reconocido por el sitio operador, con lo que se inhibe la expresión de los genes involucrados en la vía biosintética, y no se forman las enzimas necesarias para la síntesis de ese aminoácido (20).

Cuando se evita la formación de ese complejo, el sitio operador queda libre. Este mecanismo resulta ser el más simple,

ya que en realidad existen muchas variantes del mismo.

Por tanto, cuando se produce una mutación en el gene regulador, de tal manera que la proteína resulte modificada o no se produzca, el complejo no se formará o no será funcional, quedando libre el sitio operador, aun en presencia del producto final. Del mismo modo si se bloquea selectivamente el sitio operador, y el complejo represor ya no será capaz de evitar la expresión de los genes estructurales.

### I.E.-RUTA BIOSINTETICA DE METIONINA.

La ruta biosintética de metionina en bacterias, cuenta con un tronco común (figuras 1,2), con lo que al alterar adecuadamente los mecanismos regulatorios en los primeros pasos el beneficio en la producción será para metionina.

El primer paso de la ruta es la formación de aspartil fosfato a partir de aspártico y ATP, esta reacción es catalizada por la enzima aspartocinasa (a) y es el paso limitante de las vías de síntesis de metionina en bacterias(6,9,10,12,13,15,20).

La aspártocinasa, que cataliza la primera reacción irreversible, está sujeta a una regulación alostérica. En ciertas bacterias como *E. coli*, y otras, se presentan tres isoenzimas diferentes, con tres patrones de regulación dependientes cada uno de los tres productos finales que originan: la aspartocinasa I es inhibida por treonina más isoleucina, y reprimida por el primero de ellos, esta enzima contiene además la actividad de homoserina deshidrogenasa; la aspartocinasa II es reprimida por metionina y contiene igualmente actividad de homoserina deshidrogenasa; por último, la aspartocinasa III es inhibida y reprimida por lisina.

Las tres enzimas son además inhibidas por semialdehído aspártico y las isoenzimas I y III son estimuladas por metionina (9).

Por otro lado, en diversas especies de *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, y *Bacillus*, se presenta una sola enzima, para catalizar el primer paso, la cual se ha demostrado, está sujeta a inhibición concertada por lisina más treonina, y ambos aminoácidos por separado tienen sólo un ligero efecto

inhibitorio. En algunos casos se habla de aspartocinasas "perfectas" cuando la inhibición por ambos productos a concentración de 1mM cada uno, es mayor al 80% y concentraciones de 10mM de los aminoácidos por separado inhiben de un 10-15%.

El siguiente paso importante hacia la biosíntesis de metionina, lo constituye el paso de aspártico semialdehído a homoserina, donde esta reacción es catalizada en el caso de *E. coli* por dos diferentes homoserinas deshidrogenasas (b): homoserina deshidrogenasa I (HDHI), su actividad es inhibida por treonina, y su síntesis es reprimida por treonina más isoleucina; homoserina deshidrogenasa II (HDHII), es reprimida por metionina.

La última etapa biosintética hacia metionina lo constituyen, los genes (c), que codifican para los pasos posteriores a la segunda ramificación (figuras II y III), se encuentran en *E. coli*, formando un operón regulado por el producto del gene *met J*.

Esta última etapa la conforman un conjunto de genes que son los encargados de producir las enzimas necesarias que llevan a cabo esos pasos, los genes involucrados son el gene *met A* y produce la enzima que cataliza el paso de homoserina para formar succinil (o acetil) homoserina en presencia de succinil (o acetil) CoA. El siguiente gene involucrado es el *MetB* que codifica para la enzima que va a producir cistationina en presencia de cisteína de donde toma el azufre. Aunque también cabe aclarar que para la producción de esa enzima se requiere también de la participación de los genes *met L* y *met E*; este grupo de tres genes en *E. coli* se sabe que a su vez intervienen en la síntesis de aspartocinasa II, homoserina deshidrogenasa II y

5-10-metilentetrahidrofolato reductasa.

El penúltimo paso de la vía es llevado a cabo por el producto del gene met C el cual forma homocisteína que sólo requiere que exista metilentetrahidrofolato y para que exista éste requiere la cooperación de otros genes como son los genes met F, met H, met E (ver figura III).

Todo el conjunto de genes involucrados en la ruta biosintética de metionina están sujetos a un control genético por un complejo proteico formado por el producto del gene met J y metionina y sus derivados (17, 19, 20).

#### **I.F. -OBTENCION DE MUTANTES RESISTENTES A ANALOGOS TOXICOS.**

El obtener mutantes resistentes a un análogo implica primeramente, que la sustancia análoga sea tóxica para el microorganismo evitando que el microorganismo realice sus funciones vitales y muera, ya que impide la síntesis del metabolito normal. Pero si la bacteria se trata con un mutágeno, esto va a favorecer una modificación en el sitio alostérico de tal manera que ya no exista reconocimiento por el producto final o el análogo, quedando la vía libre de regulación y con esto se favorece la acumulación del producto final (ver tabla V).

FIG.1 RUTA BIOSINTETICA DE LOS AMINOACIDOS DE LA FAMILIA DEL ASPARTATO EN BACTERIAS.

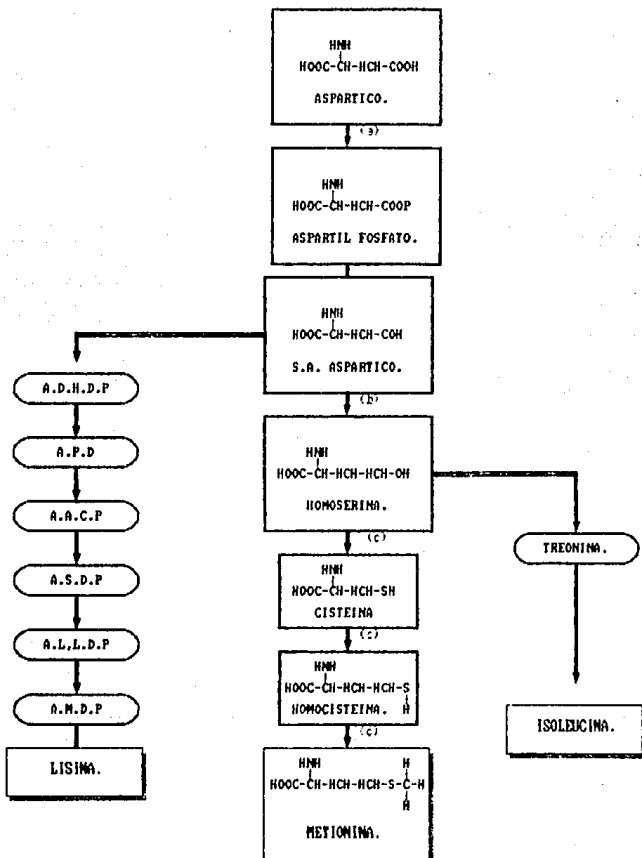
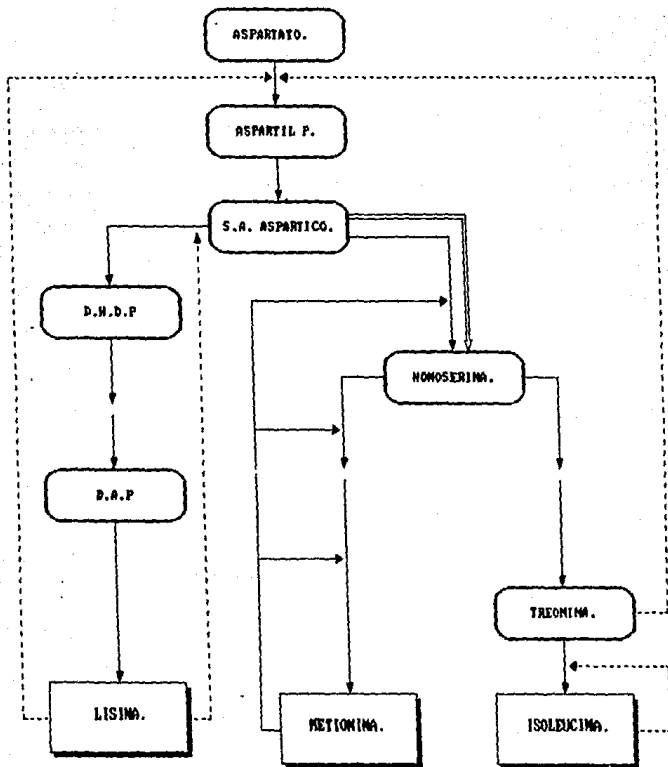


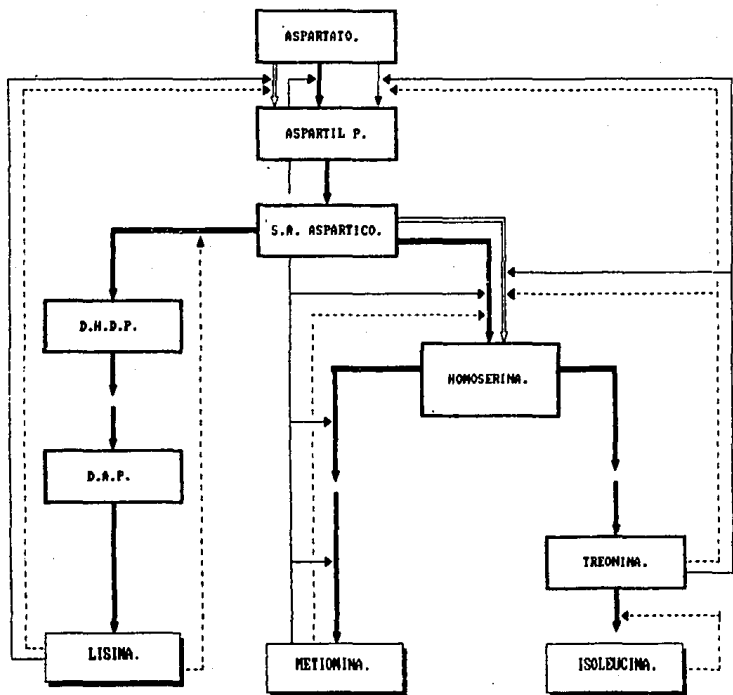
FIG. 2 MECANISMO DE REGULACION DE LA VIA DE SINTESIS DE LISINA Y METIONINA.



BACILLUS.



FIG.2B.MECANISMO DE REGULACION DE LA VIA DE SINTESIS DE LISINA Y METIONINA.

*E. coli.*

regulacion por retroalimentacion -----&gt;

regulacion genetica -----&gt;

TABLA V. ANALOGOS TOXICOS DE AMINOACIDOS UTILIZADOS EN LA OBTENCION DE MUTANTES REGULATORIAS (21).

AMINOACIDO PRODUCIDO	ANALOGO UTILIZADO.
Arginina	Canavanina
Fenilalanina	Beta-Tienilalanina
Histidina	Tiazolalanina
Leycina	Trifluoroleucina
Lisina	2-Aminoetilcisteina
Metionina	Etionina. Norleucina
Treonina	Beta-Hidroxinorvalina
Triptofano	5-metilriptofano
Valina	Alfa-Aminobutirato.

#### **I.H.-DETERMINACION DE METABOLITOS POR EL METODO DE COMPLEMENTACION AUKOTROFICA.**

Para determinar un metabolito de interés, por este método se requiere primordialmente contar con una cepa mutante auxótrofa a ese producto (esto quiere decir que requiere del metabolito para poder crecer). También se requiere contar con un estándar del producto de interés contra el cual vamos a comparar.

La técnica se fundamenta en que si en el medio de cultivo donde queremos hacer crecer la cepa auxótrofa se encuentra el producto de interés, el microorganismo va a crecer en forma proporcional a la cantidad de aminoácido en términos de D.O. a una longitud de onda a la que absorbe esa substancia.

Para poder determinar la cantidad de producto hay que elaborar una curva patrón para lo cual se preparan los sistemas como los mostrados en la tabla VI y se varía la concentración del estándar del metabolito, se determina la D.O a una longitud de onda específica y con los datos se realiza una curva patrón.

Para probar los problemas se opera de manera similar que los sistemas de la curva patrón. la única diferencia es que se sustituye la producto estándar por los sobrenadantes estériles de las cepas que sobreproducen el metabolito, se les determina su D.O a la longitud de onda establecida y se interpolan en la gráfica de la curva patrón determinandose cuanto producto hay en el medio (2).

## II. OBJETIVOS.

- 1.-Obtener cepas mutantes de B.subtilis sobreproductoras de metionina resistentes a análogos de esta.
- 2.-Determinará la concentración adecuada de la fuente de carbono para enriquecer el medio mínimo para que crezcan las mutantes.
- 3.-Estandarizará la técnica de complementación auxotrófica para cuantificar metionina.
- 4.- Determinará las concentraciones óptimas de nitrógeno y azufre para obtener el mejor rendimiento de excreción de metionina.
- 5.-Valoración cuantitativa de las cepas mutantes sobreproductoras de metionina.

### III.-SELECCION DEL MICROORGANISMO.

Por lo ya mencionado, es de vital importancia la cuidadosa selección del microorganismo involucrado en el presente trabajo, que pretende la obtención de cepas hiperproductoras de metionina, utilizando la técnica de mutantes regulatorias. Por lo que es importante tomar en cuenta las siguientes condiciones:

- 1.-Que la vía de síntesis exista en el microorganismo en cuestión.
- 2.-Que los microorganismos tengan un tronco común en las vías de síntesis de metionina.
- 3.-Que los mecanismos de regulación de la vía sean simples y tengan el menor número de enzimas regulables.
- 4.-Que las cepas obtenidas sean estables para que permitan el desarrollo de un proceso técnico y económicamente factible, que compita con los que existen actualmente.
- 5.-Que la cepa con la que se trabaje no sea patógena.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, hemos decidido utilizar la cepa de B. subtilis 6633, que cumple las condiciones requeridas y ofrece la ventaja de no ser patógeno, encontrándose sólo un reporte en el cual B. subtilis provocaba infección, sin embargo es de tomar en cuenta que la persona afectada era un alcohólico y drogadicto.

Otra ventaja que ofrece este microorganismo es que crece en medios simples y sólo requiere de una fuente de carbono, para crecer.

#### IV. MATERIALES Y METODOS.

##### IV.A.-CEPAS BACTERIANAS.

*Bacillus subtilis* 6633.

*Escherichia coli* Q358 met(-L).

Ambas del cepario del laboratorio de Biotecnología de la FES-C.

##### IV.B.-PRODUCTOS QUIMICOS Y BIOLÓGICOS.

a) Aminoácidos (de la serie L), análogos y azúcares (de la serie D), fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. EUA.

b) Las sales orgánicas e inorgánicas, ácidos, bases y solventes son de J.T.Baker, México.

c) Los componentes de los medios de cultivo son fabricados por Bioxon de México, Oaxaca, Oaxaca.

d) La N-metil,N-nitro,N-nitrosoguanidina (NTG) fue adquirida de Aldrich Chemical, Milwaukee WI, EUA.

e.-Medios de cultivo.

Para el crecimiento masivo de la cepa se utilizó el medio de Luria-Bertrani (12).

Para el crecimiento en medio mínimo, se usó el medio de Robinson 10X (que contiene fosfato de potasio monobásico 90 g, sulfato de amonio 25 g, estos dos componentes se neutralizaron con NaOH hasta pH 7.4, sulfato de magnesio 1 g, sulfato de cobre 1 mg, sulfato ferroso 100 mg, cloruro de cobalto 10 mg, cloruro de manganeso 1 mg, aforar a 1 lt. con agua destilada; de este medio se toman 100 ml y se llevan a 1 lt total de medio de concentración IX.

#### IV.C.-ELECCION DE LA CONCENTRACION ADECUADA DE LA FUENTE DE CARBONO PARA EL CRECIMIENTO DE B. subtilis EN MEDIO MINIMO.

El crecimiento de un microorganismo en un medio que sólo contiene sales, requiere la adición de una fuente de carbono, que bien puede ser un azúcar.

El procedimiento empleado para analizar cual sería la concentración adecuada de fuente de carbono para el crecimiento de B. subtilis, se realizó de la siguiente manera:

- a) En tres matraces que contenían medio mínimo de Robinson IX, se le agregó glucosa a las siguientes concentraciones 1.0, 3.0, 5.0%.
- b) A otros tres matraces con medio, se les agregaron las mismas concentraciones, pero el azúcar fue sacarosa.
- c) En estos medios se inoculó con el B. subtilis, y de esos matraces inoculados se tomaron muestras cada 2 hrs de 1.0 ml y se les midió la turbiedad en un espectrofotómetro a 590 nm; los matraces se incubaron con agitación a 28 C y 100 rpm. Este procedimiento se llevó a cabo por un lapso de 12 hrs.

#### IV.D.-OBTENCION DE MUTANTES RESISTENTES A ETIONINA.

Para el propósito de obtener mutantes resistentes a etionina, fue necesario conocer la susceptibilidad del B. subtilis 6633 a este análogo tóxico de metionina (ver tabla V). Con este objetivo, se corrió una prueba de mínima concentración inhibitoria (MIC). La prueba anterior tiene como finalidad conocer la concentración a la cual el análogo es tóxico y se pueden obtener las mutantes que sean resistentes a este reactivo.

Una vez que se tenga la concentración adecuada, se prepararon cajas de medio mínimo más glucosa y análogo.

Posteriormente se espatularon 0.1 ml de una suspensión

bacteriana de 24 hrs de B. subtilis 6633, y en el centro de la caja se depositaron 5 mg de NTG; posteriormente las cajas se incubaron a 28 C por un tiempo de 72-96 hrs tiempo requerido para el crecimiento de las cepas resistentes a este análogo.

De las colonias que crecieron se aislaron las que se encontraban más cerca del halo de inhibición del crecimiento. En cajas que contenían los componentes antes mencionados, se resebraron las colonias que mostraron ser resistentes a etionina, la resiembra se llevó a cabo con la ayuda de palillos estériles, una vez sembrada la caja nueva se incubó a 28 C por 24 Hrs (14).

#### IV.E.-EVALUACION DE METIONINA EXCRETADA AL MEDIO.

La evaluación de la capacidad de hiperproducción de metionina en cepas mutantes de B. subtilis resistentes a etionina, se llevó a cabo de la siguiente manera: Las cepas fueron crecidas en medio mínimo con glucosa al porcentaje adecuado, hasta una D.O =1.5 a 2.0. El cultivo así obtenido se centrifuga, y se elimina la pastilla, cantidades variables del sobrenadante estéril se añaden a un tubo y se le agrega la cepa met (-), incubar 24 hrs a 37 C y medir la D.O a 590 nm e interpolar en la curva patrón (Ver tabla VI).



**IV.E.1. TECNICA PARA DETERMINAR METIONINA POR EL METODO DE COMPLEMENTACION AUXOTROFICA.**

- 1.- Medio de Robinson 1X \* . Solución A.
- 2.-Solución de glucosa al 1:0 % . Solución B.
- 3.-Solución de metionina estándar a la concentración de 1.0 mM. Solución C.
- 4.-Suspensión bacteriana de *E. coli* O 358 met (-). Solución D.
- 5.-Agua destilada estéril. Solución E.
- 6.-Sobrenadantes estériles de las mutantes resistentes a los análogos tóxicos, y que se les va a determinar la producción de metionina. Solución F.

**TABLA No. VI. PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACION DE LOS SISTEMAS PARA LA CURVA PATRON DE METIONINA Y LOS SISTEMAS PROBLEMAS PARA DETERMINARLA EN LOS SOBRENADANTES.**

Reactivos.	0	1	2	3	4	5	6	A
Sol. A (ul)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Sol. B (ul)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Sol. C (ul)	-	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	-
Sol. D (ul)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Sol. E (ul)	0.83	0.82	0.81	0.80	0.79	0.78	0.77	0.73
Sol. F (ul)	-	-	-	-	-	-	-	-

ul = Microlitros.

\* Como el medio de Robinson se prepara 10%, es decir concentrado 10 veces con respecto al Robinson 1X .

**IV.F.-OBTENCION DE MUTANTES ETIONINA (r), NORLEUCINA (r).**

La cepa Et (r) con más alta productividad fue sometida a una prueba de sensibilidad a norleucina, la metodología a emplear es similar a la planteada para obtener mutantes etionina (r). la única variante fue el análogo utilizado y las concentraciones que deberán ser mayores.

La prueba de MIC al igual que en el experimento anterior nos permite establecer la concentración adecuada del análogo para seleccionar las mutantes doblemente resistentes.

Una vez que se cuenta con ese dato, el siguiente paso fue que en cajas de medio mínimo más glucosa y la concentración adecuada de norleucina se espatuló 0.1 ml de un cultivo bacteriano de la cepa con más alta producción y que es etionina resistente, posteriormente en el centro de la caja se le adicionaron 5 mg de NTG; incubar a 28 C por 72 a 96 hrs.

Las colonias que resultaron resistentes y sobrevivieron fueron resemebradas en cajas con los mismos ingredientes y por la metodología descrita anteriormente se incubaron a 28 C por 24 Hrs.

Las cepas obtenidas se les evaluó la producción de metionina mediante el procedimiento ya descrito y se seleccionó la de mayor producción.

**IV.G.-OBTENCION DE MUTANTES ETIONINA (r), NORLEUCINA (r) Y SULFOXIDO DE METIONINA (r).**

Nuevamente la cepa con mayor productividad se le practicó un análisis de MIC a sulfóxido de metionina (Sm) para establecer la concentración adecuada para la selección de la mutante resistente

a los tres análogos.

La metodología es similar a la empleada para etionina y además, la variante fué la concentración de análogo utilizadas, que resultaron ser mucho mayores que las anteriormente empleadas. Una vez que se cuenta con el dato de la concentración a la cual se pueden obtener las mutantes resistentes a los tres análogos se realizó lo siguiente: En cajas de medio mínimo se espatularon 0.1 ml de un cultivo bacteriano de 24 hrs de la cepa Et (r), Ni (r), y que es la de mayor producción; el medio contenía además glucosa al 1 % y la concentración adecuada de sulfóxido de metionina, en el centro de la caja se le colocaron 5 mg de NTG y se incubaron a 28 C por 72 a 96 hrs.

Las colonias que lograron sobrevivir fueron re sembradas en cajas que contenían los mismos ingredientes de la misma manera y se incubaron a 28 C por 24 hrs. Una vez que obtuvimos las cepas mutantes de *B. subtilis* resistente a etionina, norleucina, y sulfóxido de metionina se les practicó la prueba para determinar la producción de metionina por la técnica microbiológica.

#### IV.H.-DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE NITROGENO Y AZUFRE NECESARIAS PARA OBTENER UNA OPTIMA PRODUCCION DE METIONINA.

El procedimiento realizado para obtener la cantidad de nitrógeno adecuada, para un óptimo rendimiento de metionina fué el siguiente: La mutante que demostró ser la más eficiente productora de metionina y que es resistente a más de un análogo tóxico, se sometió a crecimiento en medios mínimos que contenían la cantidad de nitrógeno disminuida en un 50 % con respecto al

medio normal, otros con el 100 % arriba del medio normal, y manteniendo la concentración de azufre constante.

Para poder disminuir las concentraciones de nitrógeno se hizo necesario sustituir la fuente de ese componente en el medio normal, dado que este es sulfato de amonio y si disminuimos o aumentamos la cantidad, implícitamente estamos variando la concentración de azufre. El sustituyente fue cloruro de amonio como fuente de nitrógeno en esos medios, dado que éste no influye en la concentración de azufre. Para mantener constante la concentración de azufre y dado que se sustituyó el sulfato de amonio, se utilizó en lugar de éste sulfato de sodio como fuente de azufre alternativa.

Los experimentos antes citados se compararon contra uno que contenía las cantidades de nitrógeno y azufre especificados en el medio de Robinson IX.

De igual manera se corrieron otros experimentos para determinar la concentración de azufre necesaria para obtener una óptima producción de metionina. El procedimiento empleado fue similar al anterior, sólo que aquí se varió la cantidad de sulfato de sodio como fuente de azufre y se mantuvo constante la de cloruro de amonio como fuente de nitrógeno.

Los microorganismos fueron crecidos en estos medios modificados, se obtuvo el sobrenadante y se determinó la cantidad de metionina excretada por la metodología descrita previamente.

#### **IV.1.-OBTENCION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO CONTRA PRODUCCION.**

En 25 ml de medio de Luria se sembró una asada espesa de la

mutante con mayor producción y se incubó en agitación por 24 hrs a 28 C.

Del cultivo anterior se tomaron 10 ml y se adicionaron en 100 ml de medio mínimo de Robinson más 1 % de glucosa. Se tomaron en 2 tubos muestras de 1 ml, uno de ellos se leyó la turbiedad a 590nm en el espectrofotómetro la otra muestra se centrifugó y se separó el sobrenadante, el cual se esterilizó y se refrigeró. El resto del cultivo se mantuvo en agitación a 28 C, 100 rpm se tomaron muestras cada 2 hrs y se repitió el procedimiento de muestreo.

Cuando se observó que la turbiedad tendía a mantenerse constante se paró el experimento, y a los sobrenadantes estériles se les determinó la cantidad de metionina que contenían mediante la técnica microbiológica. Con los resultados obtenidos se elaboró una gráfica de D.O contra tiempo (T); tanto de las D.O del crecimiento del Bacillus como las D.O de las determinaciones de metionina.

Los datos anteriores de crecimiento y producción permiten establecer las cinéticas del proceso productivo.

## V. RESULTADOS.

### V.A.- OBTENCION DE LAS CINETICAS DE CRECIMIENTO PARA DETERMINAR LAS CONCENTRACIONES OPTIMAS DE AZUCAR COMO FUENTE DE CARBONO PARA EL CULTIVO DE LAS CEPAS DE B. subtilis 6633.

Como se aprecian en la figuras 4 y 5 el crecimiento que experimenta el B. subtilis 6633 tiene una tendencia logarítmica y la velocidad de crecimiento no es dependiente de la concentración de azúcar. Y el microorganismo se comporta de igual manera en glucosa que en sacarosa, como no sabemos si el microorganismo agota la cantidad agregada de azúcar, se trabajó con las concentraciones más bajas de azúcar.

### V.B.- OBTENCION DE MUTANTES DE B. subtilis RESISTENTES A ETIONINA.

Para obtener mutantes de B. subtilis resistentes a etionina realizamos un MIC, siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos; encontramos que la concentración adecuada para obtener esas mutantes es de 30 mM de etionina (ver tabla # VII).

### V.C.- DETERMINACION DE METIONINA POREL METODO DE COMPLEMENTACION AUXOTRIFICA.

Mediante la metodología descrita previamente se elaboró una curva patrón para que sobre ella se interpolaran los resultados de densidad óptica de los sobrenadantes problemas.

Los resultados del estándar de referencia fueron graficados y ajustados por regresión lineal (Ver fig. 3).

CURVA PATRON DE METIONINA POR LA TECNICA DE  
COMPLEMENTACION AUXOTROFICA

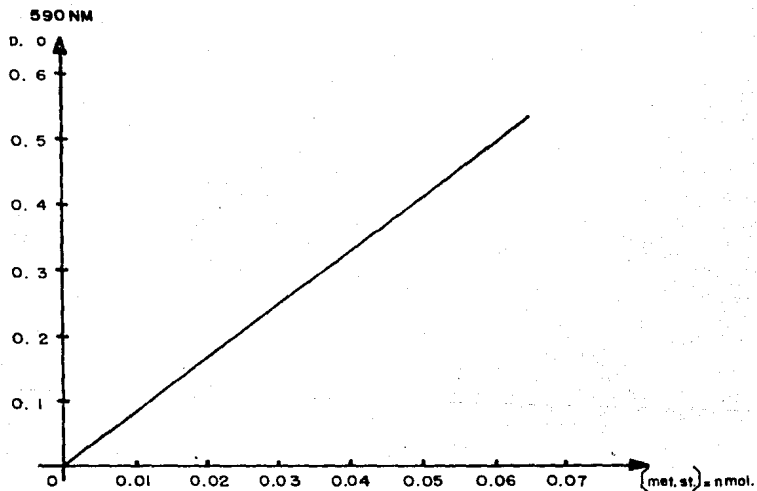


FIG. 3

CURVA DE CRECIMIENTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES  
DE GLUCOSA (1.0, 3.0 Y 5.0 %).

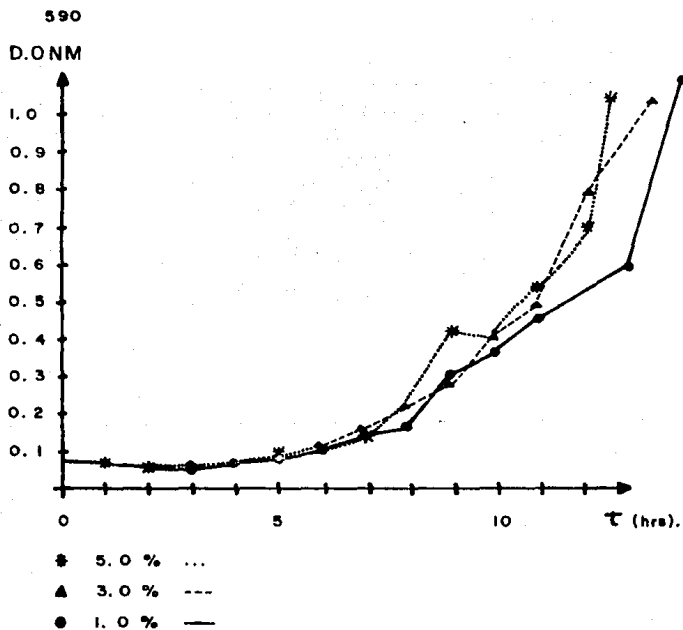


FIG. 4



CURVA DE CRECIMIENTO DE B. SUBTILIS 6633  
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA

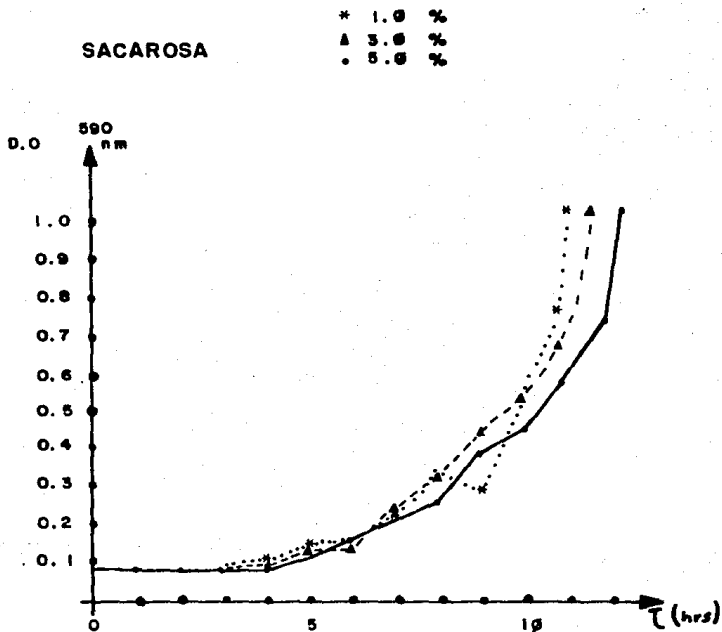


FIG. 5

TABLA VII .SUSCEPTIBILIDAD DE LA CEPA 6633 DE B. subtilis A  
ETIONINA.

-----  
CONCENTRACION DE 0 10 20 30 40 50 60  
ETIONINA (mM).

CRECIMIENTO. + + + ++ + - - - -

-----  
+++ = Crecimiento abundante. - = No hay crecimiento.

++ = Crecimiento evidente.

+ = Poco crecimiento.

Dado que la prueba de susceptibilidad muestra que, a una concentración de 20 mM el crecimiento es muy escaso, cabría pensar que a una concentración de 25 mM ya no hay crecimiento y por tanto utilizando una concentración superior a la cual se inhibe el crecimiento podemos estar seguros de que las cepas que logren crecer ha sido por que han modificado su sitio de reconocimiento hacia metionina y etionina. Por lo que, tomando en consideración lo anterior, para seleccionar las mutantes escogimos una concentración de análogo de 30 mM.

Utilizando esa concentración de análogo y la técnica descrita obtuvimos 30 cepas mutantes las cuales demostramos que eran resistentes al análogo, de esas sólo tres mostraban producir metionina en mayor cantidad que la cepa parental; esto se puso de manifiesto por medio de la técnica microbiológica para determinar metionina (los resultados obtenidos se muestran en la tabla # VIII).

TABLA VIII .PRODUCCION Y RENDIMIENTO DE METIONINA POR LAS  
CEPAS ETIONINA RESISTENTES.

CEPA	PRODUCCION DE METIONINA g/l.	RENDIMIENTO *.
<i>B. subtilis</i>		
6633.	0.0031	0.0310
DJ1224	0.0200	0.2000
MC3321	0.0632	0.6320

\* El rendimiento se define como gramos de metionina producida entre gramos de sustrato consumido, y por 100 para expresarlo en por ciento.

TABLA IX. SUSCEPTIBILIDAD DE LA CEPA MC3321 DE *B. subtilis*  
A NORLEUCINA.

CONCENTRACION DE NORLEUCINA	0	15	25	35	45	55	65	80
--------------------------------	---	----	----	----	----	----	----	----

CRECIMIENTO	++++	+++	++	+	-	-	-	-
-------------	------	-----	----	---	---	---	---	---

El significado de + o - es el mismo que el mostrado en la tabla VI.

Los resultados anteriores demuestran que la cepa MC3321 es la que produce más metionina, de este modo, a esta cepa se le realizó otra prueba de sensibilidad a otro análogo de metionina, norleucina (ver figura IX).

La prueba anterior muestra que para que obtengamos las mutantes resistentes a norleucina y etionina es necesario utilizar una concentración mínima de norleucina de 45 mM.

Por lo que el procedimiento de obtención de mutantes se realizó a una concentración de 50 mM de norleucina.

Con este procedimiento obtuvimos 25 cepas mutantes resistentes a los dos análogos, a los cuales les evaluamos la producción de metionina excretada y encontramos que una de ellas producía más metionina que la cepa parental, y cinco de esas cepas producían metionina, pero la producción no llegaba ni siquiera a ser igual en cantidad a la cepa etionina resistente con mayor producción por lo que las descartamos; en la tabla X, se pueden apreciar las cepas de mayor producción, comparadas con la cepa parental. La evaluación fue hecha mediante la técnica microbiológica descrita anteriormente.

A la cepa de mayor producción, se le practicó una prueba de sensibilidad a un tercer análogo que fue sulfóxido de metionina y se realizó con la metodología descrita anteriormente (ver tabla XI).

TABLA X : PRODUCCION Y RENDIMIENTO DE METIONINA POR LAS CEPAS SILVESTRE, ETIONINA Y ETIONINA-NORLEUCINA RESISTENTES.

CEPA	PRODUCCION DE METIONINA g/l.	RENDIMIENTO %.
<i>B. subtilis</i> 6633.	<0.0031	0.0310
MC3321	0.0630	0.6300
SG1612	0.1722	1.7220

\*

El rendimiento fué definido en la tabla anterior.

TABLA XI: SUSCEPTIBILIDAD DE LA CEPA SG1612 DE B. subtilis A SULFOXIDO DE METIONINA.

---

CONCENTRACION DE SULFOXIDO DE METIONINA.	0	20	40	60	80	100	110	120
--	---	----	----	----	----	-----	-----	-----

CRECIMIENTO.	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
--------------	-----	-----	-----	----	---	---	---	---

---

Parámetros definidos en la tabla VI.



El uso de la metodología anterior nos permitió establecer que la concentración óptima para seleccionar las triples mutantes fue a la concentración de 100 mM de sulfoxido de metionina y esto nos permitió obtener un total de 30 cepas mutantes de las cuales al evaluar la producción de metionina encontramos que ninguna de las mutantes producían metionina, es decir, dejaban de sobreproducir el aminoácido en cuestión.

Por tanto, para continuar con el trabajo, utilizamos la cepa doblemente mutante.

#### **V.D.-DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE NITROGENO Y AZUFRE PARA OBTENER UNA OPTIMO RENDIMIENTO.**

Siguiendo la metodología descrita, encontramos los resultados que se muestran en la tabla XII y en los que se aprecia que el mejor rendimiento se obtiene con el medio de Robinson IX, y que los medios en los que se variaron las concentraciones de nitrógeno y azufre se observa un rendimiento bajo.

TABLA XII.- DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES OPTIMAS DE NITROGENO Y AZUFRE PARA OBTENER UN MEJOR RENDIMIENTO.

CONDICIONES	CONCENTRACION	PRODUCCION	RENDIMIENTO
Nitrógeno Azufre.	50 % (-) constante.	<0.0031 g/L	0.0310
Nitrógeno Azufre.	constante 50 % (-).	0.050 g/L	0.5000
Nitrógeno Azufre.	constante.	0.172 g/L	1.7200
Nitrógeno Azufre.	100 % (+) constante.	0.070 g/L	0.7000
Nitrógeno Azufre.	constante 100 % (+)	0.143 g/L	1.4000

(-) = Disminuido con respecto al medio normal.

(+) = Aumentado con respecto al medio normal.

**V.E.-OBTENCION DE LA CINETICA DE CRECIMIENTO CONTRA PRODUCCION.**

Para obtener la cinética de crecimiento contra producción se realizó con las concentraciones del medio de Robinson IX, y esto nos permitió ver cual era la tendencia entre el crecimiento y la producción ver figura No 6. Y se observa que el rendimiento depende del crecimiento pues si el *B. subtilis* ha crecido poco el rendimiento es bajo. Y si el crecimiento es alto el rendimiento también es alto.

CINETICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE METIOTINA  
DE LA CEPA SG1612 DE B. SUBTILIS Y QUE ES *Et<sup>r</sup>, N1<sup>r</sup>*

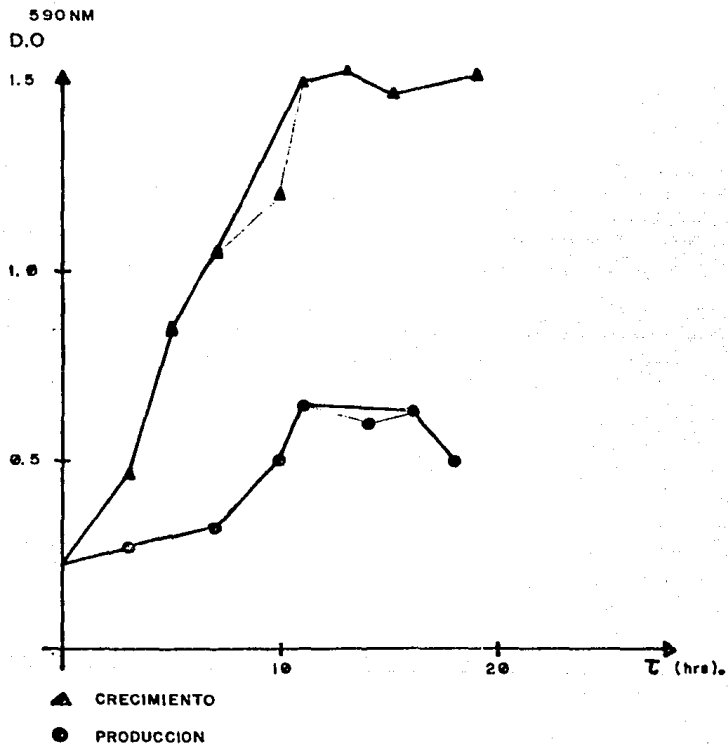


FIG. 6

## VI. DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

Como se puede apreciar claramente en las figura 4 y 5 el crecimiento de *B. subtilis* 6633 tiene un crecimiento tipo logaritmico.

También se aprecia que en el caso de glucosa como fuente de carbono, la velocidad en el crecimiento es mayor cuando se utiliza una mayor concentración de ese producto, y aunque las curvas obtenidas con concentraciones inferiores son muy parecidas el tiempo requerido es más prolongado.

Cuando se usa sacarosa como fuente de carbono, se observa que la curva de crecimiento es similar a las obtenidas con glucosa, y en este caso se obtiene un mejor crecimiento con la concentración más pequeña (1.0 %). Quizas esto se deba a que la sacarosa es un disacárido y para que este puede ser utilizado, tiene que ser desdoblado en glucosa y fructuosa, aumentando con ello la concentración de la fuente de carbono. Y aunque en las concentraciones de 3.0 y 5.0 % ocurre lo mismo, la velocidad de crecimiento se ve afectada por otros factores, entre los que destacan, la concentración de oxígeno dado que este microorganismo es un aerobio estricto y por otra parte, el pH del medio de cultivo.

En el caso de glucosa, el microorganismo requiere de más azúcar, pues esta es un monosacárido y la bacteria lo utiliza directamente por que es más sencillo y lo asimila como tal, no así sacarosa que para que pueda ser asimilada tiene que desdoblarla en dos monosacáridos.

Por tanto, dado que no podemos controlar adecuadamente la

concentración de oxígeno en el matraz de cultivo y esta va a influir en el buen crecimiento de nuestro microorganismo para nuestra fase experimental utilizamos matraces del mismo volumen, la misma cantidad de medio y de inóculo y la concentración más baja de fuente de carbono.

Dado que nosotros no teníamos conocimiento de esos Parámetros, realizamos nuestros experimentos utilizando la concentración de azúcar más baja, que es de 1.0 % .

La determinación de metionina, por el método de complementación auxotrófica, el crecimiento tiene una relación lineal con respecto a la concentración, en un rango de 100  $\mu$ M hasta un rango de 600  $\mu$ M, fuera de ese rango su relación ya no es lineal, por lo que sugerimos para sistemas con mayor concentración óptica realizarle diluciones para que los sistemas queden dentro de la zona lineal. Por otra parte podemos decir que éste proceso es específico, bueno sencillo y fácil de realizar si se cuenta con la cepa auxotrofa.

La técnica empleada para la obtención de las cepas mutantes nos permitió obtener un buen número de éstas y aunque algunas de ellas no producían metionina, esto era de esperarse, pues aunque la mutación es selectiva para un sitio específico, puede ser que también hayan mutado en otras regiones de la misma u otra vía y como consecuencia provoquen un bloqueo en la ruta y se estén desviando por otro camino, que no lleva a sintetizar metionina.

Por otra parte también puede ser que la mutación no haya sido tan drástica y que el microorganismo este revertiendo a su estado silvestre, y eso traiga como consecuencia que no se detecte metionina pues la que produce es solo la que requiere

para su metabolismo.

Pero aún con este tipo de contratiempos se obtuvieron mutantes resistentes a etionina y que sobreproducen metionina (63.2 mg/l), mutantes resistentes a etionina y norleucina que producen 172.2 mg/l. Lo cual nos hizo pensar que si obteníamos una mutante resistente a tres análogos de metionina podíamos tener mejores rendimientos de ese aminoácido, pero la práctica nos demostró lo contrario, pues se obtuvieron 30 cepas resistentes a etionina, norleucina y sulfóxido de metionina y ninguna de ellas producía metionina, lo cual nos llevo a pensar que la concentración utilizada para la selección de las mutantes resistentes a los tres análogos fué demasiado drástica, que atrofió completamente algunas enzimas de la vía y provocando con ello el bloqueo de la síntesis de metionina, o que el análogo permite seleccionar otro tipo de mutantes.

Con lo que respecta a las mejores concentraciones de nitrógeno y azufre para obtener el máximo rendimiento de metionina, encontramos que son las utilizadas en el medio de Robinson IX, las más adecuadas. Eso no quiere decir que con un exceso de nitrógeno y/o azufre la bacteria muera, sino que al contrario, entre mayor cantidad de estos componentes haya, se esperaría una mayor cantidad de metionina, pues tanto nitrógeno como azufre forman parte del esqueleto de ese aminoácido. Sin embargo, se requiere mantener la relación C/N que la célula tiene normalmente. Lo que puede estar pasando es que como las limitantes son el oxígeno y la fuente de carbono, estas se agoten y provoquen que el microorganismo esporule y detenga su

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

metabolismo, aún habiendo un exceso de N y S.

Por otra parte, cuando se tienen concentraciones de nitrógeno y azufre disminuidas, si se produce metionina, pero la cantidad puede ser tan pequeña y esta la utilice la bacteria para esporular y por eso se observe que el tiempo de esporulación sea más corto que cuando se crece la bacteria en medio con concentraciones normales.

Tomando en consideración los resultados obtenidos, en las determinaciones de las concentraciones óptimas de nitrógeno y azufre y los resultados arrojados por la cinética de crecimiento contra producción. Podemos especular que la excreción de metionina sigue el comportamiento de un metabolito primario, pues en la figura No 6 se ve que este es excretado a medida que el microorganismo crece, y cuando este entra en fase estacionaria, inclusive disminuye la concentración de metionina, quizás como consecuencia de que el Bacillo requiere nutrientes para mantenerse latente en el estado de espora.

Por tanto, nosotros sugerimos para mejorar la producción obtenida, llevar este proceso a nivel de fermentación donde se pueda manipular adecuadamente la concentración de oxígeno, pH y se le pueda proporcionar más nutrientes para que el microorganismo no deje de crecer y excretar adecuadamente la metionina.

Si se quiere elevar más la producción de metionina excretada antes de llevar el proceso a nivel de fermentadores, sugerimos tratar de obtener mutantes de B. subtilis SG 1612 Et, N1 resistentes, auxótrofos a diaminopimélico, treonina o a ambos, pues como mencionamos anteriormente, la ruta biosintética es una



ruta ramificada y si se bloquea uno de los brazos el flujo de materia se canalizará hacia los caminos que queden libres, trayendo un beneficio en la producción de metionina.

## VII.

REFERENCIAS.

- 1.-Abe, S. and Takayama, K. (1972) Aminoacid Producing Microorganisms; Variety and Clasification. In: The Microbial Production of aminoacids. (Yamada, K. et al, eds ) Kodansha Ltd. Tokyo.
- 2.-Alvarez de la Cuadra, J. Jaime. (1987) Tesis doctoral CINVESTAV pp.106.
- 3.-Avila, E. (1979) Aminoácidos limitantes de algunas fuentes de proteína de origen vegetal en: Memorias de la segunda reunion Proteína-Aminoácidos. FERMEX S.A. México.
- 4.-Adelberg, A. Edward (1958) Selection of Bacterial mutants which excrete antagonists of antimetabolites. Notas. Departament of Bacteriology University of California, Berkeley California pp.326.
- 5.-Cuca, M.; Avila, E. y Pro, A (1980) La alimentación de las aves de corral en: La alimentación de las aves, editado por el colegio de posgraduados de Chapingo. Chapingo México.
- 6.-Cohen, G.N.; Stanier, R.Y. and Le Brass, G. (1969) Journal of Bacteriol. 59:pp. 791-801.
- 7.- Abe, S. (1972) Mutantes and their utilization. Op. cit. Yamada et al.
- 8.- Datta, P.; Dungan, S.M. and Fedelber, R.S (1973) Regulation of aminoacid Byosynthesis of Aspartate Pathway in different microorganisms in: Genetics of industrial microorganisms, vol.I (Vanec, Hostalek and Cudlin. eds.) Elsevier, Amsterdam.
- 9.-Flavin, M. and Slaughter, C. (1976) Biochim Biophys. Acta. 132: pp.400-405.

- 10.-Gray, H. B. and Bernlohr W. R. (1969) Biochim. Biophys. Acta. 179: pp. 248-261.
- 11.- Moirinaga, Y., Tani, Y. and Yamada, H. (1982) Agric. Biol. Chem., 46 (1): 57 - 63.
- 12.-National Research Council (1979) Nutritional requirements of Swine. 8th Ed. NRC. Natl. Acad. Sci. Washington D.C.
- 13.- Patte, J. C.; Truffa, B. P and Cohen, N. G. (1966) Biochim. Biophys. Acta. 128: pp. 426-439.
- 14.- Ortega, M. V. y Aguilar, C. (1973) Molec. Gen. Genet. 125 : pp. 351-358.
- 15.- Patte, J.C.; Zuber, M. and Borne, F. (1972) J. Molec. Biol. 6: pp. 306-315.
- 16.- Rowbury, R.J. (1965) Nature London. 205: pp. 962-963.
- 17.-Shulamyt M. and Eliora, Z. R:(1984) FEMS Microbiology Letters. 23: pp. 125-129.
- 18.- Silhavy, T.J.;Berman, M.L. and Enquist. L. (1984) Experiments with Gene Fusions Cold Spring Harbor Laboratory. Ed. Cold Spring Harbor, New York.
- 19.- These, J.; Margarita, D.; Cohen, G.N.; Borne,F. and Patte, J.C. (1974) J.Bacteriology. 117: pp.125-129.
- 20.- Umbarger, H.E. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: pp. 533-606.
- 21.- Wang, D.I.C., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunnill, P.,Humphrey, A.E. and Lilly, M.D. (1979) Fermentation and Enzyme Technology, Johor, Willey and Sons. New York.
- 22.-Yamada, H.,Morinaga, Y. and Tani (1982) Agric. Biol. Chem.,46 (1): 47-56.