

111
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

" PRODUCCION DESREGULADA DE ALCOHOL
OXIDASA EN Pichia pastoris "

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
JOSE FABIAN OCEGUERA YAÑEZ

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

AGOSTO DE 1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"PRODUCCION DESRRREGULADA DE ALCOHOL OXIDASA EN *Pichia pastoris*"

realizado por JOSE FABIAN OCEGUERA YAÑEZ

con número de cuenta 8624046-4 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

E. Barzana
Dr. EDUARDO BARZANA GARCIA

Propietario

Amelia María Ochoa
Dra. AMELIA MARÍA OCHOA OCHOA ZEPE FARRES GONZALEZ SARAVIA

Propietario

Carlos Alberto Castillo Pompeyo
BIOLOGO CARLOS ALBERTO CASTILLO POMPEYO

Suplente

René de Jesús Cardenas Vazquez
DR. RENÉ DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ

Suplente

Jose Adolfo Escalante
M. en B. JOSE ADELFO ESCALANTE LOZANOS
FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

DEDICATORIAS

A mis Padres Nancy y Alfonso:

Por que gracias a ellos he logrado lo que hasta ahora soy. A ti mami por que en todo momento has estado para encaminarme y orientarme y sobre todo por creer siempre en mi. A ti papi por tu ejemplo de lucha y coraje por las cosas que se quieren.

Los quiero a ambos.

A ti Iván:

Porque siempre has sido un maestro y un amigo incondicional. A ti Ponchidl te dedico este trabajo especialmente.

A Miriam:

Por que siempre has estado en los momentos cruciales, por tus consejos y por tu cariño. Gracias por todos esos momentos.

A todos mis amigos y amigas en los que me he apoyado siempre y con los cuales he compartido emociones, situaciones, frustraciones, inquietudes, etc.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer especialmente al Dr. Eduardo Bárzana García. Quién además de asesorarme en este trabajo de tesis, en todo momento me proporcionó su ayuda y amistad.

Además agradezco enormemente a los sinodales que participaron en la revisión de éste trabajo por sus valiosos comentarios que ayudaron al enriquecimiento de ésta tesis.

Agradezco al Dr. Guillermo Espinosa y al Sr. José Ignacio Golzarri pertenecientes al Departamento de Física Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto de Física de la UNAM por haber facilitado todo lo necesario para la irradiación de las muestras biológicas.

Agradezco las atenciones prestadas por la Dra. Guillermina Burillo y toda la ayuda proporcionada por el Físico Epifanio Cruz Zaragoza integrantes del equipo del Departamento de Química del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM, para la irradiación de las muestras biológicas.

Este trabajo se realizó con apoyo de la DGAPA-UNAM, a través del proyecto IN207293.

El presente trabajo de tesis se realizó en el Departamento de Alimentos y Biotecnología
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Además se contó con el apoyo del Departamento de Física Aplicada y Tecnología
Avanzada, Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México.

Y con el apoyo del Departamento de Química, Instituto de Ciencias Nucleares,
Universidad Nacional Autónoma de México.

INDICE

Resúmen	1
1. Introducción	2
2. Generalidades	5
2.1 Desasimilación del metanol	6
2.1.1 Oxidación del metanol a formaldehido	6
2.1.2 Oxidación del formaldehido a dióxido de carbono	8
2.1.3 Generación de energía durante la oxidación del formaldehido	9
2.2 Asimilación del metanol	11
2.3 Regulación de la síntesis de enzimas peroxisómicas	11
2.4 Regulación de la actividad enzimática por inactivación	14
2.4.1 Inactivación de la alcohol oxidasa durante la gemación	15
2.4.2 Inactivación de la alcohol oxidasa y catalasa después de la exposición de las células a un exceso de metanol	15
2.4.3 Inactivación degradativa de las enzimas peroxisomales	15
2.5 Mutagénesis	17
2.6 Objetivos	19
3. Materiales y métodos	20
3.1 Fermentación de <i>Pichia pastoris</i>	21
3.2 Determinación del medio para la selección de mutantes	22
3.3 Mutagénesis y aislamiento de mutantes	24

3.4 Identificación de la enzima alcohol oxidasa <i>in situ</i>	25
3.5 Comparación de la actividad de las cepas mutantes aisladas	27
4. Resultados y discusión	28
4.1 Fermentación de <i>Pichia pastoris</i>	28
4.2 Determinación del medio para la selección de mutantes	33
4.3 Mutagénesis	36
4.4 Identificación de la enzima alcohol oxidasa <i>in situ</i>	41
5. Conclusiones	42
6. Perspectivas	44
7. Bibliografía	45

RESUMEN

La enzima alcohol oxidasa es de particular interés como herramienta biotecnológica debido a su relativamente poca especificidad por el sustrato y a que es estable bajo una amplia variedad de condiciones de reacción.

Se ha demostrado que la glucosa reprime la síntesis de dos enzimas indispensables para la asimilación del metanol en levaduras: la alcohol oxidasa y la catalasa. Así, cuando se inoculan las células en un medio que contiene glucosa y metanol, el metanol no es utilizado sino hasta que la glucosa haya sido completamente consumida, observándose una curva de crecimiento diauxico (Sahm, 1977).

En este trabajo se presenta la metodología llevada a cabo para evaluar las diferentes formas de crecimiento de la levadura *Pichia pastoris* en distintos sustratos, un procedimiento para producir mutantes con radiación gama, y la técnica de identificación de la enzima alcohol oxidasa *in situ* por un método cromogénico.

Se aislaron cepas revertientes de *Pichia pastoris* desreprimidas en genes reprimibles por glucosa seleccionándolas por su crecimiento en presencia de 2-desoxiglucosa usando metanol como fuente de carbono alterna.

Además se propone un mecanismo alternativo para la posible producción de mutantes de *Pichia pastoris*, el cual está diseñado en base a que al germinar las ascosporas dan lugar a individuos haploides. Estos son estables cuando se mantienen en un medio rico en nutrientes (Sudbery y Gleeson, 1989). De esta forma se podrían evitar los problemas de complementación de genes ocasionados por la diploidia, así como por recombinación genética inmediata a la irradiación de las levaduras.

INTRODUCCION

Recientemente la importancia de la biotecnología en la producción de enzimas industriales con la idea de crear compuestos saborizantes para la industria alimenticia y de los cosméticos ha venido creciendo rápidamente debido a que los microorganismos o enzimas pueden ser usados en la producción de aditivos aromáticos "naturales", ya sea por síntesis *de novo* o por transformación de compuestos a partir de fuentes naturales (Vandak y Sturdyk, 1993).

Hoy en día las enzimas son comúnmente utilizadas en la producción de diversos productos tales como quesos, aderezos, productos para panadería, jugos, etc. Se utilizan para reducir la viscosidad, mejorar extracciones, llevar a cabo bioconversiones, aumentar separaciones, desarrollar funcionalidad y crear o intensificar sabores. Además, son exitosamente utilizados dentro del marco de la síntesis química de compuestos aromáticos usados para realizar ciertas reacciones regio o estereoespecíficas para producir varios grupos de compuestos con fragancia (lactonas, ésteres, aldehídos, terpenoides y compuestos macrocíclicos) comercialmente importantes la mayoría de ellos (Vandak y Sturdyk, 1993).

El actual interés en la biotecnología y la creencia de que se expandirá considerablemente está basado en tres factores:

- a) La materia prima puede ser obtenida a partir de recursos renovables
- b) Los procesos biotecnológicos parecen ser más económicos que el procesamiento químico de materiales vegetales.
- c) Se está definiendo una amplia variedad de probables productos valiosos mediante métodos biológicos tradicionales y por manipulación genética.

Ciertas mejoras en cepas han promovido la producción de proteínas y péptidos a un nivel comercialmente aplicable. El mejoramiento de cepas es una parte esencial del desarrollo de procesos para la obtención de productos de fermentación microbiana. Esto como una forma de reducir costos desarrollando cepas con producción elevada, que tengan la capacidad de usar

materia prima más barata, no industrializada o con características específicas deseadas tales como propiedades de filtración mejoradas, capaces de producir bajo condiciones particulares de temperatura o tensión de oxígeno, etc. (Rowlands, 1984a).

Entre las técnicas más novedosas, tales como mutagénesis dirigida e ingeniería genética, el método tradicional de mejoramiento de cepas por mutagénesis y selección con base en la medición por titulación directa, conocida como búsqueda aleatoria, desempeña un papel importante debido a que es un procedimiento rentable y efectivo en cuanto a costos (Rowlands, 1984a).

La enzima alcohol oxidasa es de particular interés como herramienta biotecnológica debido a su relativamente poca especificidad por el sustrato y a que es estable bajo una amplia variedad de condiciones de reacción. Se ha sugerido un gran número de usos potenciales para esta enzima. Estos incluyen el uso de la enzima en un ensayo cuantitativo para alcohol, como secuestrante de oxígeno, para esterilizar materiales sensibles a radiación o calor (a través de la liberación de formaldehído) para la producción de compuestos saborizantes y como parte de un sistema para recuperación de etanol (Duff y Murray, 1988).

La glucosa ejerce represión de la síntesis de una variedad de vías enzimáticas relacionadas con la utilización de fuentes alternativas de carbono. Esto es debido a que la glucosa es más fácilmente metabolizable por la mayoría de los organismos y por lo tanto fisiológicamente es más económico para la célula mantener reprimida la síntesis para la asimilación de fuentes de carbono alternas. Esto representa una manera de alcanzar un beneficio competitivo, ya que prefieren tomar la glucosa en primera instancia, posponiendo la asimilación de la fuente de carbono más compleja químicamente.

En este caso, se ha demostrado que la glucosa reprime la síntesis de dos enzimas indispensables para la asimilación del metanol: la alcohol oxidasa y la catalasa. Así, cuando se inoculan las células en un medio que contiene glucosa y metanol, el metanol no es utilizado sino hasta que la glucosa haya sido completamente consumida, observándose una curva de crecimiento diauxico (Sahm, 1977).

Es por esta razón que el principal objetivo de este trabajo es el de obtener cepas mutantes de la especie *Pichia pastoris* capaces de sintetizar ésta enzima aún en presencia de glucosa. La finalidad es obtener un alto desarrollo de biomasa y consecuentemente altos rendimientos en la producción de alcohol oxidasa en tiempos significativamente menores. Para ello se plantea desarrollar una metodología que incluye desde la inducción de mutaciones utilizando radiación gama hasta la detección de la enzima *in situ*.

GENERALIDADES

No obstante que los microorganismos procariontes capaces de crecer en compuestos que poseen un sólo átomo de carbono con un nivel de oxidación entre el metano y dióxido de carbono (los conocidos compuestos de un sólo carbono) son conocidos desde hace ya mucho tiempo, no fué sino hasta 1969 que se aisló el primer organismo eucarionte capaz de crecer en estos compuestos (Ogata et al., 1969).

Se trata de algunas levaduras capaces de crecer en metanol como única fuente de carbono y metilamina como única fuente de nitrógeno. Estas requieren de la presencia de las enzimas alcohol oxidasa y catalasa, que participan en la oxidación inicial del metanol o, durante el crecimiento en presencia de metilamina como fuente de nitrógeno, a la amino oxidasa, enzima clave en el metabolismo aminado (Zwart et al., 1980).

Se ha asociado el crecimiento de las levaduras metilotrofas en metanol con la proliferación de grandes microcuerpos en las células que albergan a la alcohol oxidasa (AOX) y otras enzimas, incluyendo a la catalasa que se encarga del dañino peróxido de hidrógeno generado por una o mas de las oxidasas. Por esta razón a estos organelos se les denomina peroxisomas (de Duve, 1965).

Se ha observado además que durante el crecimiento exponencial de las levaduras metilotróficas en glucosa es sumamente difícil detectar a estos microcuerpos y, si los hay, su función fisiológica es incierta (Avers, 1971; van Dijken et al., 1975b; Sahm, 1977).

Se ha identificado un número relativamente pequeño de levaduras que comparten dichas características, las cuales reflejan una consistente uniformidad en sus vías metabólicas lo cual permite relacionarlas taxonómicamente (Tabla 1).

2.1.1 Oxidación del Metanol a formaldehído.

Durante el crecimiento de las levaduras y mohos en metanol como única fuente de carbono y energía, el metanol es oxidado a formaldehído por una alcohol oxidasa (EC 1.1.3.13), la cual cataliza la oxidación inicial del metanol y es dependiente de oxígeno como aceptor de electrones.

Esta proteína ha sido purificada a partir de varios microorganismos eucariontes, capaces de crecer en metanol (Tabla 2.1) y está presente en grandes concentraciones durante el crecimiento de las levaduras en metanol (Sahm, 1977).

Tabla 2.1 LEVADURAS Y HONGOS CAPACES DE CRECER EN METANOL (Sahm, 1977)

1. Levaduras

<i>Candida boidinii</i>	<i>Pichia haplophila</i>
<i>C. methanolica</i>	<i>P. lindnerii</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>P. pastoris</i>
<i>Hansenula capsulata</i>	<i>P. pinus</i>
<i>H. glycozyma</i>	<i>P. trehalophila</i>
<i>H. henricii</i>	<i>Torulopsis glabrata</i>
<i>H. minuta</i>	<i>T. methanodomerqui</i>
<i>H. nonfermentans</i>	<i>T. methanolovescens</i>
<i>H. philodendra</i>	<i>T. methanosorbosa</i>
<i>H. polymorpha</i>	<i>T. molischiana</i>
<i>H. wickerhamii</i>	<i>T. nemodendra</i>
<i>Kloeckera sp.</i>	<i>T. nitratophila</i>
	<i>T. pinus</i>

2. Hongos

Gliocladium deliquescens
Paecilomyces varioti
Trichoderma lignorum

La enzima alcohol oxidasa de *Pichia pastoris* tiene un alto peso molecular de aproximadamente 675,000 daltons y esta compuesta por ocho subunidades idénticas con peso

molecular de 80,000 daltons. Cada subunidad tiene ligada no covalentemente una porción de FAD como grupo prostético. La alcohol oxidasa tiene 65 grupos -SH libres por molécula. La temperatura ideal para su actividad enzimática es de 37° C y la energía de activación requerida es de 11.1 kcal/mol. El pH óptimo es de 7.5 siendo inestable a pH ácidos. La enzima puede oxidar una diversidad de alcoholes primarios con cadenas cortas como etanol y propanol (Tabla 2.2) aunque a menor velocidad que el metanol. La presencia de ramificaciones y el aumento de la cadena claramente resultan en una reducción de la actividad (Couderc y Baratti, 1980).

Tabla 2.2. ESPECIFICIDAD DE LA ALCOHOL OXIDASA DE *Pichia pastoris* POR EL SUSTRATO (Couderc y Baratti, 1980)

SUSTRATO	ACTIVIDAD RELATIVA (%)
Metanol	100
Etanol	82
1-Propanol	43
2-Propanol	2
1-Butanol	20
Isobutanol	1.2
Ter-butanol	0
n-Octanol	0

Las actividades fueron obtenidas a partir de datos de consumo de oxígeno. Las concentraciones de oxígeno y alcohol fueron 0.93 mM y 10 mM, respectivamente.

El peróxido de hidrógeno inhibe la actividad enzimática oxidando los grupos -SH. Sin embargo, esta inhibición puede ser reversible por medio de agentes reductores (Couderc y Baratti, 1980).

Debido a que la reacción de oxidación del metanol es esencialmente una reacción bisustrato, la concentración del oxígeno tiene un efecto significativo en la afinidad de la enzima por el sustrato alcohólico. Aunque falta un mayor conocimiento en cuanto a la cinética de la alcohol oxidasa con respecto al oxígeno, se ha demostrado que la alcohol oxidasa aislada de *Pichia pastoris* tiene una baja afinidad por el oxígeno (Couderc y Baratti, 1980). La K_m para el metanol es de 1.4 y 3.1 mM a concentraciones de oxígeno de 0.19 y 0.93 mM. Similarmente, las K_m para el oxígeno son 0.4 y 1.0 mM a concentraciones de metanol de 1 y 100 mM.

Ya que a partir de la oxidación del metanol por la AOX resulta la formación del peróxido de hidrógeno, el cual es dañino para la célula, resulta imperiosa su descomposición. En las levaduras metilótrofas, esto es realizado por la catalasa, cuya concentración esta relacionada con la actividad de la alcohol oxidasa (Sahm, 1977). Se ha reportado además que la catalasa puede entrar en una actividad peroxidativa en la que el metanol es oxidado a formaldehído por el peróxido de hidrógeno formado en la reacción de la alcohol oxidasa (Roggenkamp et al., 1974; van Dijken et al., 1975a).

Algo sumamente claro es que el crecimiento de las levaduras en metanol es estrictamente dependiente de la actividad de la AOX y catalasa, ya que las mutantes que carecen de cualquiera de éstas dos enzimas pierden la habilidad de crecer en metanol (Sahm y Wagner, 1973).

2.1.2 Oxidación del Formaldehído a Dióxido de carbono.

La oxidación del formaldehído por levaduras es llevada a cabo por dos deshidrogenasas dependientes de NAD^+ . La primera enzima en esta secuencia es la formaldehído deshidrogenasa, la cual es estrictamente dependiente de glutatión para su actividad. Esto se debe a que no es propiamente el formaldehído, sino la unión hemimercaptal del formaldehído con el glutatión, el sustrato de esta enzima, formando S-formilglutatión como producto

La otra enzima, la formato deshidrogenasa, presenta una baja afinidad por el formato como sustrato (Kato et al., 1974; van Dijken et al., 1976b), por lo que en un principio se pensó que el sustrato ideal para esta enzima sería el S-formilglutacion. Sin embargo, gracias a investigaciones posteriores se concluyó que la oxidación del formaldehído a dióxido de carbono requiere además de la acción de una S-formilglutación hidrolasa independiente de NAD^+ para su actividad (Veenhuis et al., 1983).

2.1.3 Generación de energía durante la oxidación del formaldehído.

Durante el crecimiento de las levaduras en metanol, se genera NADH por la acción de la formaldehído y formato deshidrogenasas, las cuales son proteínas solubles. Bajo estas condiciones, todo el NADH es generado fuera de la mitocondria. El mecanismo por el cual la mitocondria de estos organismos oxida el NADH citoplásmico es aún un problema sin resolver.

No obstante, mientras que durante el crecimiento de las levaduras se espera un máximo teórico de 3 moles de ATP formados por cada mol de NADH oxidado, dado que el NADH generalmente es generado intramitocondrialmente durante el crecimiento de las levaduras en metanol, la producción de ATP a partir de NADH es de 2 moles de ATP por mol de NADH máximo (Veenhuis et al., 1983).

La figura 2.1 muestra las enzimas involucradas en el metabolismo del metanol:

- 1) Alcohol oxidasa
- 2) Catalasa
- 3) Formaldehído deshidrogenasa
- 4) Formato deshidrogenasa
- 5) Dihidroxiacetona sintetasa
- 6) Dihidroxiacetona kinasa
- 7) Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa
- 8) Fructosa 1,6-bifosfatasa

2.2 Asimilación del Metanol

Ciertos estudios en los perfiles enzimáticos del metabolismo de azúcares fosfatados en las levaduras crecidas con metanol sugirieron que, en contraste con la vía de la ribulosa monofosfato en la cual se forman triosas fosfatadas a partir de hexosas fosfatadas, para estos organismos las hexosas fosfatadas son formadas a partir de triosas fosfatadas.

Esto se elucidó debido a la presencia de concentraciones significativamente elevadas de fructosa 1,6-bifosfatasa durante el crecimiento en metanol (van Dijken et al., 1978). Esto llevó a la formulación de una vía de xilulosa fosfato para la fijación del formaldehído. La reacción clave de este ciclo es una condensación de tipo transcetolasa de la xilulosa 5-fosfato con formaldehído, formando gliceraldehído fosfato y dihidroxiacetona. A la enzima responsable de esta reacción se le ha denominado dihidroxiacetona sintetasa (O'Connor y Quayle, 1980).

La dihidroxiacetona es fosforilada por una trioquinasa y posteriormente se le une gliceraldehído fosfato para formar fructosa 1,6-bifosfato. Por la acción de la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa y fructosa 1,6-bifosfatasa, se forma fructosa 6-fosfato. Una vez llevadas a cabo estas reacciones, se acomodan dos moléculas de fructosa 6-fosfato y una molécula de dihidroxiacetona fosfato para dar lugar a tres moléculas de xilulosa fosfato por reacciones catalizadas por transaldolasa, transketolasa, pentosa fosfato isomerasa y epimerasa. El resultado total del ciclo, es la formación de un mol de triosa fosfato a partir de tres moles de formaldehído por tres moles de ATP (Veenhuis et al. 1983).

2.3 Regulación de la síntesis de enzimas peroxisómicas

En las levaduras, la presencia de microcuerpos y su composición enzimática puede variar considerablemente durante los diferentes estadios del crecimiento en su cultivo y en respuesta a la presencia de fuentes de carbono o nitrógeno específicas en el medio.

Lo que aún no queda claro es el mecanismo por el cual la glucosa ejerce esta represión (Gancedo y Gancedo, 1986).

El sistema responsable para la represión por catabolito debe incluir por lo menos dos elementos:

1) Una señal producida por glucosa. Esta podría ser un metabolito derivado de ella, como la glucosa 6-fosfato, pero además un incremento o decremento en la concentración de algún metabolito regulatorio o un cambio en la conformación de una proteína que se ligue a la glucosa.

2) Una región en el gen controlada por represión catabólica, que puede responder a la presencia o ausencia de alguna señal cuando la glucosa está presente. Este elemento regulante con CIS-función no permitirá la transcripción del gen. Además, pueden existir elementos intermediarios adicionales que actúen de manera secuencial.

La represión catabólica tiene dos posibles mecanismos de acción:

a) En el caso del control positivo, la presencia de glucosa impediría u obstaculizaría la unión de una proteína específica con una secuencia activadora del ADN, siempre y cuando esta unión sea un prerequisite para la transcripción eficiente del gen.

b) En el caso de un control negativo, la presencia de glucosa facilitaría la unión de una proteína al ADN, con lo que se inhibiría la transcripción del gen.

Cuando se transfieren células crecidas en glucosa a un medio que contiene metanol como única fuente de carbono y energía, las actividades de alcohol oxidasa y catalasa aumentan significativamente (Kato et al, 1974; Sahn, 1977).

La síntesis de estas enzimas puede ser inducida por metanol (Sahn, 1977). La inducción de la síntesis de la alcohol oxidasa y catalasa también se observa en presencia de formaldehído y formato, aunque estos organismos no sean capaces de crecer en estos compuestos.

Otros trabajos han demostrado que estas dos enzimas pueden sintetizarse en ausencia de compuestos de un sólo carbono (Eggeling y Sahn, 1978). Se han encontrado cantidades significativas de estas enzimas en cultivos creciendo exponencialmente en glicerol, ribosa, sorbitol, etc.

En contraste, durante el crecimiento en etanol, la actividad de la alcohol oxidasa no es detectable durante la fase de crecimiento exponencial o estacionaria. Estos resultados indican que en estos organismos la síntesis de estas enzimas puede estar sujeta a un mecanismo de control por represión/desrepresión más que inducción por compuestos de un sólo carbono y represión catabólica.

Cuando se ha crecido a estos organismos en cultivo en quimiostato, con glucosa limitada, a bajos rangos de dilución y en ausencia de metanol, se ha observado la desrepresión de la síntesis de alcohol oxidasa y catalasa. Esto puede considerarse como un caso de síntesis gratuita de enzimas, ya que bajo dichas condiciones de cultivo estas enzimas no tienen una función fisiológica aparente (Eggeling y Sahn, 1980). Ciertos estudios de las cinéticas de las desrepresiones observadas en las síntesis de estas dos enzimas indican que la cantidad a la cual esta desrepresión se expresa depende de la concentración de glucosa en el cultivo (Egli and Fiechter, 1981). Sería de imaginarse que esta glucosa exógena está en equilibrio con los metabolitos intracelulares derivados a partir de la glucosa que inician la puesta en marcha de la represión catabólica de las enzimas peroxisomales. La naturaleza de estos catabolitos es desconocida aún, pero parece que estos son similares, si no es que idénticos, ya que pueden derivarse de una gran variedad de sustratos (glucosa, ribitol, glicerol o etanol). Las concentraciones intracelulares de estos metabolitos están determinadas probablemente por la naturaleza de la fuente de carbono. En contraste, durante el crecimiento en glicerol, ribosa, xilosa y sorbitol la alcohol oxidasa se sintetiza durante el crecimiento exponencial.

El etanol ejerce una represión aún mas fuerte y puede reprimir la síntesis de alcohol oxidasa bajo condiciones limitantes de carbono. La concentración intracelular del represor de la síntesis de alcohol oxidasa podría ser determinado adicionalmente por la disponibilidad de energía intracelular (Veenhuis et al., 1983).

2.4 Regulación de la actividad enzimática por inactivación

Se ha podido apreciar que además del control enzimático por regulación de la producción de enzimas y del control de la actividad enzimática por unión no covalente de ligandos, los organismos también pueden regular sus actividades enzimáticas vía inactivación selectiva.

Switzer (1977), reconoció dos tipos de inactivación:

a) Inactivación por modificación, en la cual la proteína permanece intacta pero pierde actividad debido a un cambio en su estado físico o a la unión covalente de un grupo modificante.

b) Inactivación degradativa, en la cual por lo menos uno de los péptidos es ligado como parte del proceso de inactivación. Una desnaturalización de la proteína puede o no seguir a este tipo de inactivación.

Generalmente el mecanismo de inactivación es poco entendido y en la mayoría de los casos no es conocido qué proceso de desnaturalización de la proteína está involucrado.

En los microorganismos la inactivación de las enzimas puede ocurrir rápidamente cuando son expuestas a un medio que no requiere de la actividad de esas proteínas para el crecimiento. Holzer (1976), ha denominado a este fenómeno como "inactivación catabólica", la cuál incluye ambos procesos reversibles e irreversibles. En 1981 Müller y Holzer, demostraron que la inactivación reversible inicial de la fructosa 1,6-bifosfatasa era debida a la fosforilación de residuos de serina en la proteína. Esta enzima fosforilada subsecuentemente fué degradada por enzimas proteolíticas. En algunos casos, se han obtenido evidencias de que la reaparición de la actividad de la enzima inactiva depende de la síntesis *de novo* de proteínas (Gancedo, 1971; Gancedo y Gancedo, 1986).

En las levaduras, las vacuolas son los principales compartimentos celulares de la actividad proteolítica (Veenhuis et al., 1983), y muy probablemente, las proteínas que serán degradadas en el proceso de desnaturalización deben ser transportadas primero al interior de la vacuola.

Se han detectado hasta ahora seis proteasas intracelulares en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. De éstas, la proteinasa A, proteinasa B y carboxipeptidasa Y están localizadas en la

vacuola; la localización de las otras enzimas, llamadas carboxipeptidasa S y aminopeptidasas I y II aún no está completamente elucidado. Se han encontrado inhibidores endógenos específicos de la proteinasa A, B y carboxipeptidasa Y en el citosol. Estos muestran una gran especificidad hacia las proteinasas y muy probablemente están presentes para evitar proteólisis no deseada, en primera instancia debido a vacuolas permeables (Veenhuis et al., 1983).

2.4.1 Inactivación de la alcohol oxidasa durante la gemación

Un posible mecanismo para la inactivación de la alcohol oxidasa durante la migración de los peroxisomas a las nuevas gemaciones y en células de cultivos de quimiostato limitado podría ser el desacoplamiento del grupo prostético de la enzima (Veenhuis et al., 1983).

2.4.2 Inactivación de la alcohol oxidasa y catalasa después de la exposición de las células a un exceso de metanol.

Cuando se transfieren células que contienen grandes cantidades de alcohol oxidasa a un medio que contiene metanol en exceso, se observa un rápido descenso en la actividad de la alcohol oxidasa y catalasa. Esto está asociado con la excreción de formaldehído y formato al medio de cultivo (Veenhuis et al., 1978). Se ha obtenido evidencia que indica que la inactivación de la alcohol oxidasa y catalasa muy probablemente es causada por una sobreproducción de formaldehído y peróxido de hidrógeno.

2.4.3 Inactivación degradativa de las enzimas peroxisomales

Al transferir células crecidas en metanol a un medio que contenga glucosa o etanol, la síntesis de catalasa y alcohol oxidasa es inhibida completamente. Además se observa una rápida inactivación de las enzimas preexistentes (Bormann y Sahn, 1978; Veenhuis et al., 1978).

Bormann y Sahm (1978), demostraron que en el caso de la alcohol oxidasa el decremento en la actividad específica, estimada en ensayos in vitro, era debido a un decremento en la concentración de la proteína. Sin embargo, la cinética de decremento en la actividad específica de catalasa en el cultivo indicó una dilución de la enzima debido a nuevas células formadas, en lugar de un decremento en la concentración de la enzima.

Los hallazgos de Bormann y Sahm (1978), realizados después de transferir células crecidas en metanol a un medio conteniendo etanol, indicaron que la inactivación de la alcohol oxidasa y catalasa era un proceso dependiente de energía. Más aún, también demostraron (Bormann y Sahm, 1978), que es un proceso irreversible e independiente de síntesis de proteínas.

La cantidad y el rango de degradación de las enzimas peroxisomales en células crecidas con metanol, depende de la naturaleza de la fuente de carbono presente en el medio en el que son subsecuentemente resuspendidas.

La adición de 0.5% de desoxiglucosa (un sustrato que no puede ser metabolizado) a un cultivo de levaduras creciendo exponencialmente en metanol, resulta en un cese inmediato del crecimiento. Sin embargo, la presencia de este compuesto no provoca que los niveles de alcohol oxidasa y catalasa disminuyan en las células debido a degradación o inactivación de las mismas (Veenhuis et al., 1983).

La inactivación de la alcohol oxidasa y catalasa en células crecidas con metanol, que ocurre después de la transferencia de tales células a un medio conteniendo glucosa o etanol, está acompañada por una reducción en el número y volumen de los peroxisomas originalmente presentes en estas células.

El decremento de la actividad enzimática está asociada con la fragmentación de los peroxisomas grandes originalmente presentes en las células a varios organelos de tamaño más pequeño, seguido por la degradación de un gran número de estos organelos.

Invariablemente la degradación de los peroxisomas se inicia con su secuestro del citosol. No se ha observado el desplazamiento de los organelos al interior de la vacuola por un proceso

parecido a la pinocitosis. En la mayoría de las veces, únicamente los peroxisomas grandes son degradados, dejando a los más pequeños sin afectar.

Se ha observado en *Hansenula polymorpha* que la inactivación de la enzima peroxisómica alcohol oxidasa y las enzimas citoplásmicas fructosa 1,6-bifosfatasa, malato deshidrogenasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa ocurre después de la adición de glucosa a células crecidas en metanol. La concentración de AMP cíclico se incrementó a casi dos veces en tres minutos bajo las mismas condiciones.

En extractos crudos de *H. polymorpha* cerca de 20 proteínas son fosforiladas por proteína quinasa dependientes de AMP cíclico, entre ellas la fructosa 1,6-bifosfatasa. No se ha podido detectar fosforilación alguna de la alcohol oxidasa. A partir de este hecho, se concluye que la inactivación de la alcohol oxidasa es independiente de la fosforilación proteica dependiente de AMP cíclico (Hofmann y Polnisch, 1991).

2.5 MUTAGENESIS

La mutagénesis al igual que la recombinación genética son la fuente de toda variación genética; sin embargo, ningún tratamiento puede dar lugar a todos los tipos posibles de mutación. Los mutágenos están divididos clásicamente en dos tipos:

- a) Físicos: luz ultravioleta, radiación gama y rayos X.
- b) Químicos: Etil metano sulfonato (EMS), Nitrosometil guanidina (NTG), y mostazas, como el ICR170, etc.

Sin embargo, para los geneticistas esta división es sumamente artificial. Es mucho más importante distinguir el tipo de mutaciones inducidas, que depende de dos factores; el tipo de daño al ADN causado por el mutágeno, y la acción de las rutas de reparación celulares para ese daño.

La mayoría de los mutágenos producen más de un tipo de daño al ADN, pero el grado al cual producen los distintos tipos de daño depende del mutágeno. De esta manera, por ejemplo, la luz ultravioleta lejana da una gran proporción de dímeros de pirimidina, bases hidroxiladas y

entrecruzamiento de las cadenas de ADN. La radiación ionizante (radiación gama y rayos X) produce un alto grado de rompimiento cromosómico por la formación de radicales libres y el EMS y NTG son agentes alquilantes, produciendo depurinización y mal apareamiento de bases.

Las mismas rutas de reparación pueden ser mutagénicas y no-mutagénicas (libres de errores), dependiendo del mecanismo enzimático involucrado. Las rutas no mutagénicas incluyen a la fotoreparación, reparación por excisión y por recombinación. La ruta mutagénica más conocida es la de SOS en *Escherichia coli*. Esta ruta participa en la reparación mutagénica del daño causado por una variedad de mutágenos físicos y químicos incluyendo a la luz ultravioleta lejana (u.v., 260 nm), radiación ionizante, ausencia de timina, mitomicina C, etc (Rowlands, 1984a).

La elección de un mutágeno debe basarse en el fenómeno de la especificidad del mutágeno, ya que un mutágeno dado o un tratamiento mutagénico afecta preferencialmente ciertas partes del genoma, mientras que otras partes muy raramente son modificadas. Otro factor de suma importancia es la facilidad de uso del mutágeno y la seguridad del mismo, que de alguna manera están relacionadas. Se debe recordar que todos los mutágenos son potencialmente carcinógenos ya que actúan dañando el ADN, y por lo tanto se deben tomar precauciones efectivas para proteger de este daño al genoma del trabajador (Rowlands, 1984a).

La práctica actual de la búsqueda aleatoria se ha beneficiado grandemente gracias a avances en otras áreas de la ciencia y tecnología y es ahora una actividad muy sofisticada. Los desarrollos en la comprensión de la mutagénesis y reparación del ADN permiten optimizar los procedimientos de mutación para la producción de tipos mutantes deseados. El esclarecimiento de los mecanismos que controlan la expresión genética y la regulación bioquímica de vías metabólicas, permiten el diseño de los procedimientos para la búsqueda de una forma tal que permita la expresión máxima de las mutaciones deseadas. Con el advenimiento de la automatización, robótica y el control con microprocesadores se ha logrado incrementar el número de cepas aisladas que pueden ser procesadas por unidad de tiempo en varios órdenes de magnitud. Todos estos factores contribuyen a incrementar grandemente la probabilidad con la cuál se pueden obtener cepas mejoradas, y hacer de la mutación y selección un procedimiento menos azaroso de lo que el término implica.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Encontrar mutantes de la levadura *Pichia pastoris* capaces de producir la enzima alcohol oxidasa en presencia de glucosa.

Objetivos particulares:

1. Evaluar la forma de crecimiento de *Pichia pastoris* en ambos sustratos (glucosa y metanol) así como los tiempos de asimilación de éstos.
2. Determinar un procedimiento para inducir mutaciones en levaduras utilizando radiación gama.
3. Acoplar un sistema de selección y detección de mutantes de *Pichia pastoris* desreguladas de la enzima alcohol oxidasa.

MATERIALES Y METODOS

En este capítulo se presenta la metodología llevada a cabo para evaluar las diferentes formas de crecimiento de la levadura *Pichia pastoris* en distintos sustratos, un procedimiento para producir mutantes con radiación gama, y la técnica de identificación de la enzima alcohol oxidasa *in situ* por un método cromogénico.

Todos los materiales utilizados son de grado reactivo y adquiridos en casas comerciales (SIGMA, ALDRICH, DIFCO, etc.).

Las etapas seguidas en este estudio se muestran a continuación:

- 3.1 Fermentación de *Pichia pastoris*
- 3.2 Determinación del medio para la selección de mutantes
- 3.3 Mutagénesis y aislamiento de mutantes
- 3.4 Identificación de la enzima alcohol oxidasa *in situ*
- 3.5 Comparación de la actividad de las cepas mutantes aisladas.

3.1 Fermentación de *Pichia pastoris*.

La cepa utilizada en este experimento fué la levadura *Pichia pastoris* ATCC 28485 que es capaz de producir la enzima alcohol oxidasa (EC 1.1.3.13) con una actividad específica de 37 unidades/mg de proteína (Bárzana et al, 1989).

El medio basal utilizado para el crecimiento de la levadura consistió de 6.75 g de "Base de nitrógeno para levadura" (YNB) sin aminoácidos (Difco YNB 0919-15), 12.0 g de KH_2PO_4 , y 2.1 g de K_2HPO_4 en un litro de agua destilada. El pH del medio fué ajustado a 6.0 y esterilizado en autoclave a 125° C durante 15 minutos. A este medio se le agregó: 0.5% (p/v) de glucosa previamente esterilizado, en experimentos de crecimiento en glucosa; 0.5% (v/v) de metanol agregado asépticamente antes de la inoculación para la fermentación con metanol y; 0.5% de glucosa más 0.5% de metanol para observar la forma de crecimiento con las dos fuentes de carbono.

El inóculo fué de una dilución de 1:150 aproximadamente, crecido en medio YPG conteniendo 1% (p/v) de extracto de levadura, 2% de peptona y 1% de glucosa. Este fué centrifugado y lavado dos veces con buffer fosfatos antes de su adición.

La fermentación se realizó en una incubadora New Brunswick Scientific innova 4330 con temperatura controlada a 30° C y 175 rpm durante 60 horas. Las muestras para la construcción de la cinética de crecimiento fueron tomadas bajo condiciones asépticas. El crecimiento fué determinado por la densidad óptica del medio, leyendo absorbancia a 610 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2S y corrigiendo la lectura con un blanco del mismo cultivo.

Las levaduras se separaron de las muestras por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos, tomando el sobrenadante para realizar las siguientes determinaciones analíticas:

La desaparición de la glucosa del medio fué determinada por el método de DNS para azúcares reductores (Miller, 1959).

El consumo de metanol fué medido con un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series utilizando una columna HP-20 M (Carbowax 20 M) y un detector de ionización por flama. Para ello se preparó una curva de calibración preparando diluciones de metanol con medio basal. La temperatura del inyector fué de 120°C, la temperatura del detector fué de 120°C y la de la columna fué de 100°C, operando con un flujo de nitrógeno como gas acarreador.

3.2 Determinación del medio para la selección de mutantes

Se realizaron comparaciones con el crecimiento de la levadura tanto en medio líquido como en medio sólido; para gelificar a este último se le agregó agar 2.0% (p/v). El pH de los medios fué 6.0.

Se utilizó 2-desoxiglucosa como análogo de glucosa en conjunción con las distintas fuentes de carbono como lo muestra la tabla 3.1.

Para determinar el crecimiento en medio líquido, se realizaron pruebas por lote a 30°C, 175 rpm y se muestreó a las 48 y 96 horas del crecimiento de dichas muestras, midiendo su densidad óptica a 610 nm.

Tabla 3.1. COMPOSICION DE LOS MEDIOS PARA EVALUAR LA CAPACIDAD DE ASIMILACION DE *Pichia pastoris*.

<u>Medio Basal</u>	<u>Fuente de Carbono</u>
YNB pH 6.0	Desoxiglucosa (DOG) 0.01% (p/v)
YNB pH 6.0	Glucosa (Glu) 0.5% (p/v)
YNB pH 6.0	Metanol (MeOH) 0.5% (v/v)
YNB pH 6.0	DOG 0.01% + MeOH 0.5%
YNB pH 6.0	DOG 0.02% + MeOH 0.5%
YNB pH 6.0	DOG 0.02 + Glu 0.5%

Para determinar el crecimiento en el medio sólido, se preparó una dilución de 1:10 con células previamente crecidas en medio YPG líquido, lavadas dos veces antes de ser utilizadas, plaqueándose por triplicado las cajas con los distintos medios mencionados en la tabla 3.1.

Las cajas se incubaron durante 48 horas a 30°C y se comparó el crecimiento de la levadura en los distintos medios.

El medio utilizado para la selección de mutantes con producción desregulada de alcohol oxidasa estuvo constituido por medio basal YNB, 0.01% de 2-Desoxiglucosa, más 0.5% de metanol a pH 6.0, adicionando 2.0% de agar bacteriológico.

3.3 Mutagénesis y aislamiento de mutantes

Las irradiaciones con las que se realizó la mutagénesis de las levaduras se llevaron a cabo en el Gamma Beam del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM. Este equipo consiste de varias fuentes de ^{60}Co Cobalto emisoras de radiación gama, controladas por un dispositivo diseñado por el Atomic Energy of Canada, Ltd.

El punto de partida en la obtención de la dosis apropiada para la irradiación de la suspensión de levaduras de *Pichia pastoris* fue determinada a partir del grado de sobrevivencia resultante del tratamiento. Para ello se expusieron viales que contenían una concentración conocida de células por mililitro a distintas dosis de radiación gama, haciendo así un barrido del número de colonias sobrevivientes a una dosis absorbida determinada.

Las levaduras utilizadas para este propósito siempre fueron crecidas en medio YPG aeróbicamente a 175 rpm, 30° C y durante 48 horas. Fueron lavadas dos veces con buffer de fosfatos, recuperadas por centrifugación, y luego resuspendidas en más medio YPG recién preparado antes de introducir las en viales previamente esterilizados. Estas muestras fueron conservadas en refrigeración hasta la irradiación.

Para la elaboración de la curva de mortalidad, las células irradiadas fueron resuspendidas en medio YPG (tomando en cuenta la dilución) y plaqueadas en cajas de petri con medio completo YM-agar (Difco 0712-01) para su total recuperación.

Para el plaqueo de la suspensión de levaduras, se utilizó un asa de vidrio y una tornamesa giratoria; el volúmen del inóculo fué de 0.1 ml en todos los casos. Una vez crecidas las colonias, se realizó el conteo de las mismas, donde cada punto de la curva fué realizado por triplicado.

Una vez identificada una dosis apropiada para lograr una mutagenicidad eficiente, se decidió irradiar las muestras a 300 Krads durante un lapso determinado y en un lugar específico y fijo del Gamma beam, al cual se había efectuado dosimetría con anticipación. Bajo estas condiciones se obtiene una suspensión de levaduras con un porcentaje de letalidad del 99.9.

Los viales conteniendo la solución de levaduras irradiadas se cubrieron con papel aluminio y se almacenaron a 4° C hasta el momento en que fueran resembradas.

La recuperación se realizó tomando las levaduras de los viales, resuspendiéndolas en medio de selección, seguido de plaqueo en cajas conteniendo el mismo medio. Después de un día y medio de incubación a 30°C, se replicaron las colonias en cajas de petri conteniendo medio basal, 1.0% de glucosa, 0.5% de metanol y 2.0% de agar. La replicación se realizó picando las colonias con palillos de madera previamente esterilizados en autoclave de las cajas con medio de selección a las cajas con glucosa y metanol (G-M). A las cajas de G-M se les coloca un papel filtro (Whatman No. 42, 7.5 cm de diámetro) mojado con 0.5 ml del mismo medio, dejándose incubar por la noche a 30°C para realizar el ensayo de detección de AOX *in situ*.

3.4 Identificación de la enzima alcohol oxidasa *in situ*

El método para detectar la alcohol oxidasa *in situ* consiste en replicar las colonias mutagenizadas en un papel filtro, humedeciéndolo con medio para que las colonias se peguen a él, y así trabajar con una réplica idéntica de las colonias que se encuentran sobre el agar. El papel debe colocarse inmediatamente a la inoculación de la caja de petri, con la finalidad de que la colonia se adhiera al papel mientras crece.

Un día después de la inoculación y bajo incubación a 30°C, se retira el papel de la caja de petri y se coloca sobre un embudo Büchner, con las colonias hacia arriba y con ligera succión. Se permeabiliza la pared celular agregando una solución de liticasa (SIGMA Chemical Co., St Louis, USA.) 2 mg/ml en buffer tris-HCl pH 7.5. Se dejan incubar por media hora a 30°C, se lavan las células con buffer de fosfatos y se agregan 15 ml de una solución de 16 mg de ABTS (2,2'-diazino-(3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico), 2.0 ml de metanol y 1 ml de una solución con 288 unidades/ml de peroxidasa de rábano (POD EC 1.11.1.7) en 100 ml de buffer fosfatos. Se deja reaccionar al reactivo durante 30 minutos a 30°C hasta desarrollar un color verde intenso en las colonias que presentan alcohol oxidasa.

En el ensayo para la detección de la alcohol oxidasa in situ se adiciona el metanol y se acopla la enzima peroxidasa de rábano con el cromógeno ABTS reducido. Cuando la AOX esta presente en las celulas, el metanol es oxidado a formaldehido con la intrínseca producción de H₂O₂, el cual es subsecuentemente degradado a agua acompañado de oxígeno gracias a la acción de la peroxidasa. El ABTS reacciona con el oxígeno liberado en la degradación del peróxido, formando el color verde que identifica la presencia de la AOX en las colonias al oxidarse dicho reactivo.

Las colonias que se colorean de verde son entonces identificadas y aisladas de la caja de G-M y resembradas en medio completo YM para su posterior estudio.

La figura 3.2 muestra el método para identificar la enzima alcohol oxidasa presente en las colonias de *Pichia pastaris*.

**Tabla 3.2. METODO DE DETECCION DE AOX
IN SITU EN COLONIAS DE *Pichia pastaris***

1. SE ESPARCEN LAS CELULAS RESUSPENDIDAS EN MEDIO DE SELECCION SOBRE CAJAS DE PETRI CON EL MISMO MEDIO Y SE DEJAN INCUBANDO.
2. 36 HORAS MAS TARDE SE PICAN LAS COLONIAS CRECIDAS A CAJAS DE PETRI CON MEDIO GLU-MeOH.
3. INMEDIATAMENTE SE COLOCA UN PAPEL FILTRO MOJADO CON EL MISMO MEDIO GLU-MeOH DEJANDOSE INCUBAR POR LA NOCHE.
4. BAJO CONDICIONES ASEPTICAS, SE RETIRA EL PAPEL FILTRO DE LAS CAJAS DE PETRI Y SE COLOCA SOBRE UN EMBUDO BÜCHNER CON LAS COLONIAS HACIA ARRIBA.
5. BAJO LIGERA SUCCION, SE PERMEABILIZAN LAS CELULAS CON AYUDA DE UNA SOLUCION DE ENZIMA COMERCIAL "LITICASA" DURANTE 30 MIN.
6. SE ENJUAGA EL PAPEL FILTRO CON BUFFER FOSFATOS.
7. SE AGREGA EL REACTIVO DE ABTS-POD Y SE DEJA INCUBAR LA REACCION POR 30 MIN. A 30° C.
8. LAS CELULAS CON PRODUCCION DE ALCOHOL OXIDASA DESARROLLAN UN COLOR VERDE INTENSO.

3.5 Comparación de la actividad de las cepas mutantes aisladas.

Para evaluar la actividad de alcohol oxidasa que poseía cada una de las distintas colonias aisladas por haber resultado positivas en el ensayo de la alcohol oxidasa, se crecieron en medio basal líquido con metanol o glucosa más metanol durante 48 horas. Y se prepararon extractos libres de células de la siguiente manera:

Se prepararon soluciones de células en buffer de fosfatos pH 7.5 con una absorbancia igual a 1 (\pm 0.01), de las cuales se tomaron 3 ml y se les agregó una solución de tritón X-100 0.1% y glicina 1.0%. Se mantuvieron por 16 horas a 30°C y 210 rpm.

El ensayo se inicia al agregar 0.05 ml de muestra a 2.5 ml del reactivo ABTS-POD, incubándose por 20 minutos a 30°C. La reacción se detiene con 0.2 ml de HCl 6 N y se lee la absorbancia de cada muestra a 420 nm (Chen et al., 1992).

Adicionalmente, estas colonias se crecieron en cajas petri con medio basal gelificado con agar más 0.5 % de metanol y las siguientes concentraciones de glucosa desde 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1% respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Fermentación de *Pichia pastoris*

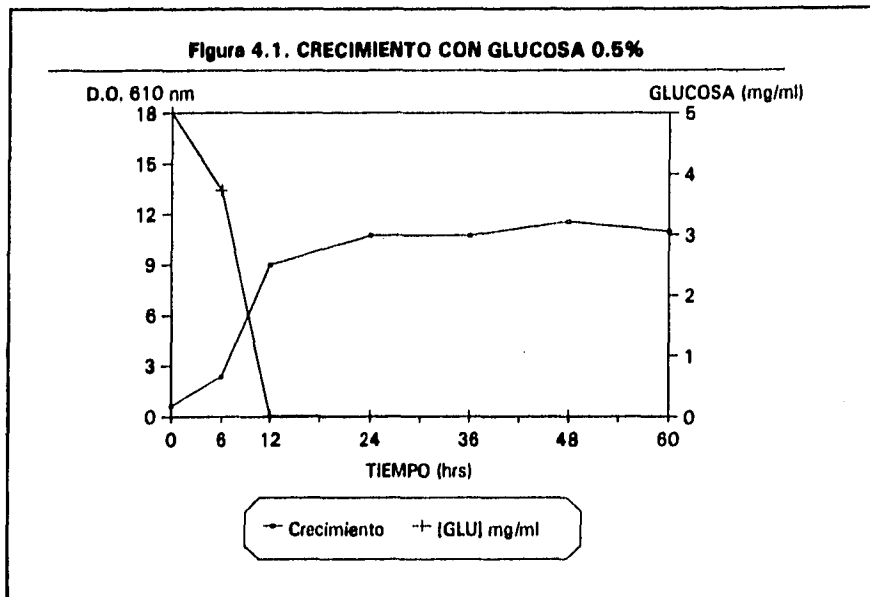
Con el objeto de verificar lo reportado en cuanto al crecimiento de *Pichia pastoris*, se realizaron cinéticas de crecimiento con glucosa, metanol y glucosa más metanol como sustratos. Se determinaron los tiempos de consumo de éstos y la forma del crecimiento de la levadura.

La concentración del sustrato se fijó en 0.5% en todos los casos, debido a que durante el crecimiento con altas concentraciones de metanol se inhibe el crecimiento de las levaduras metilotrofas, probablemente por un exceso de peróxido de hidrógeno o de formaldehído liberado por la reacción de la AOX con el metanol (Veenhuis et. al, 1983; Duff y Murray, 1988).

Las condiciones para el crecimiento como el pH, la temperatura y la agitación estuvieron basadas en trabajos previos (Duff y Murray, 1988; Chen et. al, 1992). Durante el crecimiento en metanol las levaduras requieren de una buena aereación y una temperatura óptima de crecimiento de 30°C (Couderc y Baratti, 1980).

El crecimiento se realizó durante 60 horas, ya que se observó que para ese tiempo se había alcanzado la fase estacionaria del crecimiento.

La figura 4.1 muestra el crecimiento de *P. pastoris* en medio YNB con glucosa tal como se describió previamente (materiales y métodos 3.1).



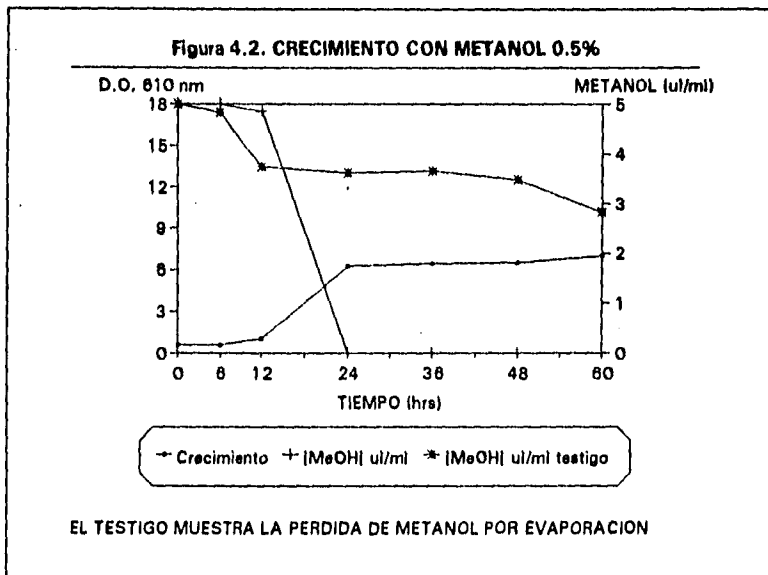
En esta gráfica se puede observar que en el crecimiento de la levadura se producen altos niveles de biomasa además de una rápida asimilación del sustrato. Se puede apreciar que la pendiente del sustrato decrece durante las primeras doce horas del crecimiento, denotando que la glucosa es prácticamente asimilada en su totalidad. Es en este período también cuando la fase exponencial del crecimiento se desvanece para alcanzar la fase estacionaria del mismo.

El crecimiento se mantiene invariante debido a la completa desaparición de la glucosa del medio.

En contraste con lo observado durante el crecimiento en metanol (Fig. 4.2), al crecer a *P. pastoris* en el medio de glucosa, no se presenta fase alguna de adaptación al medio. Es decir, la fuente de carbono y energía se comienza a asimilar en cuanto el inóculo es agregado al medio de cultivo. Asimismo, la densidad celular de la levadura alcanzó un máximo en el intervalo de las 24 a las 48 horas.

El crecimiento obtenido en glucosa como sustrato supera al registrado en metanol hasta por un 90%, lo cual permite afirmar que la glucosa es un sustrato ideal para el crecimiento de este organismo.

En la figura 4.2, se observa el crecimiento en metanol como sustrato. Claramente, el nivel de biomasa es significativamente menor, en relación al obtenido durante el crecimiento en glucosa. Es por esto que es importante encontrar una cepa que durante su crecimiento con glucosa pueda sintetizar la enzima alcohol oxidasa, ya que de ésta manera se obtendrían altos niveles de alcohol oxidasa en un tiempo razonablemente corto.



En ésta gráfica se puede apreciar un periodo de adaptación al medio conteniendo metanol, durante el cual se desreprime la síntesis de las enzimas propias para la asimilación del metanol, i.e. AOX y catalasa. Dicho periodo comienza desde la adición del metanol hasta después de 6 horas en

que el cultivo comienza con un lento crecimiento, y no es sino hasta 12 horas después (toda vez que dichas enzimas se han producido) cuando se dispara el crecimiento exponencial por 12 horas más hasta alcanzar la fase estacionaria del crecimiento. El crecimiento máximo se alcanza a las 24 horas, nuevamente cuando el sustrato ha sido completamente agotado.

También se puede ver que una parte del metanol se evapora, según se muestra en la curva denominada testigo de metanol, lo cual puede resultar en un crecimiento celular limitado.

Coincidentemente Reuss et al. (1975), argumentaron que los bajos valores de biomasa obtenidos en su trabajo eran debidos a pérdidas de metanol por evaporación.

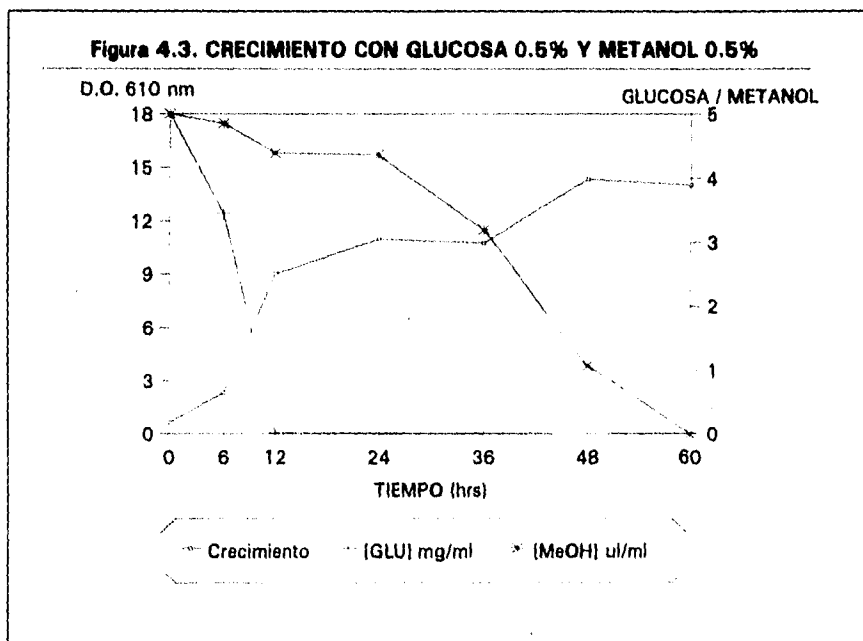
El cultivo continuo de este organismo con metanol fué estudiado por Duff y Murray (1988), agregando el sustrato conforme se asimilaba completamente en un ciclo. De esta forma se pueden evitar las dificultades de inhibición ocasionadas por el metanol, dando como resultado un incremento en la concentración de biomasa a la vez que la producción de alcohol oxidasa y catalasa no se ven disminuidas (Duff y Murray, 1988)

En la figura 4.3 se presenta el crecimiento de la levadura metilotrófica en la mezcla de los dos sustratos (glucosa más metanol). Claramente se aprecia un crecimiento diauxico donde la glucosa es consumida en primera instancia, de manera similar al consumo de glucosa presentado en la figura 4.1, donde no hay fase de adaptación al medio de cultivo. Esto es seguido de un crecimiento exponencial a medida que se asimila rápidamente la glucosa por un periodo de 12 horas, de forma tal que a las 24 horas se alcanza la máxima densidad óptica con glucosa. Dicha turbidez se mantiene invariable por otras doce horas, periodo en el cual la levadura se adapta metabólicamente al metanol. Esto resulta en una producción simultánea de las enzimas y peroxisomas para la asimilación del metanol. Sin embargo, al término de la fermentación, el crecimiento en metanol no resulta ser de la magnitud del que se muestra en la figura 4.2, probablemente debido a pérdidas de metanol por evaporación.

Asimismo, de forma similar a la curva testigo mostrada en la figura 4.2, se puede apreciar la pérdida de metanol por evaporación.

Cabe hacer notar que el metanol no es utilizado sino hasta que la glucosa ha sido completamente asimilada.

La realización de la cinética de crecimiento en ambos sustratos es importante, ya que de esta forma se corrobora que la enzima alcohol oxidasa no es sintetizada en presencia de glucosa no obstante la existencia de metanol en el medio. Toda vez que es necesaria la producción de la enzima alcohol oxidasa para la asimilación del metanol.

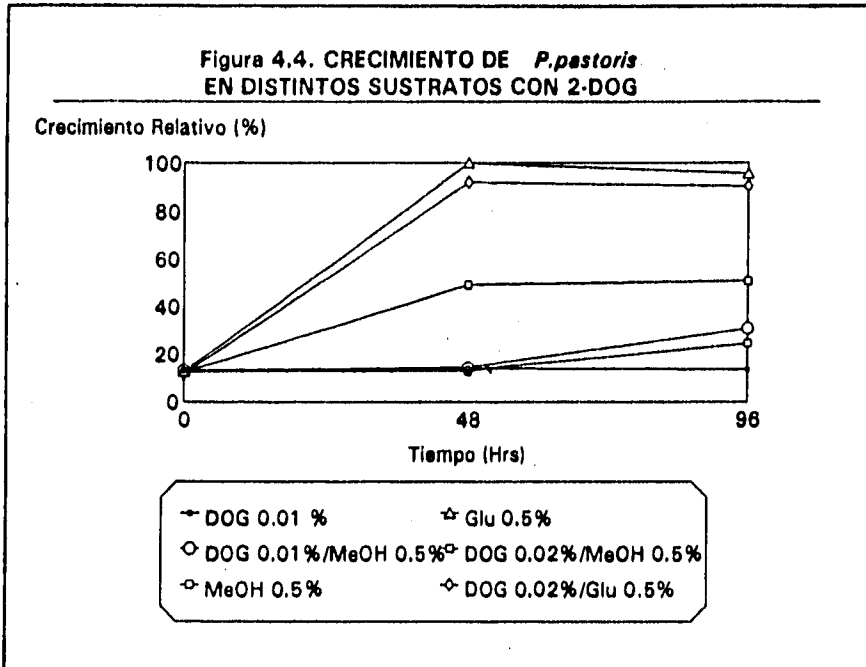


4.2 Determinación del medio para la selección de mutantes

Veenhuis et al. (1983), al agregar 0.5% de 2-desoxiglucosa a un cultivo de *Hansenula polymorpha* creciendo exponencialmente en metanol encontraron que el crecimiento se detiene inmediatamente, concluyendo que el análogo de glucosa induce a la represión catabólica. Y, por otra parte, Sakai et al. (1987), utilizaron un medio selectivo compuesto por metanol adicionando 2-desoxiglucosa con la finalidad de obtener cepas mutantes de *Candida boidinii* productoras de alcohol oxidasa en presencia de glucosa. Las siete colonias aisladas por ellos, fueron capaces de liberarse de la represión catabólica ocasionada por glucosa.

Con la finalidad de obtener un medio selectivo para encontrar mutantes que posean la habilidad de vencer a la represión catabólica ejercida por glucosa, se realizó una comparación con mezclas de los distintos sustratos en los que la levadura metilotrófica es capaz de crecer. Para ello se agregó un análogo de glucosa con la capacidad de reprimir la síntesis de las enzimas necesarias para la asimilación del metanol. Se busca detectar las células que hayan adquirido o incrementado su resistencia en contra de la represión por glucosa.

Figura 4.4. CRECIMIENTO DE *P.pastoris* EN DISTINTOS SUSTRATOS CON 2-DOG



La figura 4.4 muestra la comparación del crecimiento de la levadura *P.pastoris* en distintos sustratos y mezclados con 2-Desoxiglucosa, que es un análogo de glucosa y un fuerte represor de la enzima alcohol oxidasa (Veenhuis et al., 1983, Sakai et. al, 1987; Sudbery y Gleeson, 1989). Así pues, se observa que la glucosa se asimila preferentemente sobre cualquier otro sustrato. Incluso al añadir glucosa más el análogo de glucosa, se puede apreciar que este último no se incorpora a la célula, puesto que el crecimiento no se retarda y es bastante similar al crecimiento que se observa con glucosa únicamente. En todo caso, si la 2-Desoxiglucosa fuera incorporada a la célula, no hay indicio de que fuera asimilada. Por otra parte, el crecimiento obtenido con metanol tal y como se esperaba es la mitad del obtenido con glucosa. Sin embargo al agregar el análogo de glucosa, se observa que éste si es incorporado, ya que se puede apreciar un retardo o aletargamiento en el crecimiento. No es sino hasta después de 48 horas de cultivo cuando las células pueden vencer la represión ejercida por la 2-desoxiglucosa reflejándose en un ligero

• crecimiento que no alcanza los niveles de la muestra crecida en metanol únicamente. Además se puede observar que este aletargamiento celular está íntimamente relacionado con la concentración del análogo, puesto que, al aumentar su concentración en el medio, el crecimiento disminuye a un tiempo determinado.

Únicamente se tomaron muestras en dos tiempos debido a que el objetivo de esta prueba era determinar el nivel de crecimiento alcanzado al final de cada tiempo determinado.

Estos resultados son presentados en porcentaje relativo con el objeto de poder equipararlos con las figuras donde se muestran las fermentaciones.

El cien por ciento a que se hace referencia corresponde al máximo crecimiento obtenido en lote con glucosa a las 48 horas.

Por otra parte, no se encontró crecimiento alguno al crecer las cepas en medio con análogo únicamente.

Debido a que las pruebas en medio líquido usualmente son distintas a las realizadas en medio sólido y a que la recuperación de las levaduras se lleva a cabo en medio sólido, se presentan los resultados de la tabla 4.1. Se observa que en medios gelificados con agar y a las 48 horas de cultivo, el crecimiento se limitó únicamente a los medios que no contenían al análogo de glucosa, salvo el caso del medio constituido por glucosa más 2-desoxiglucosa. Estos resultados y el trabajo realizado por Sakai et al. (1987), con 2-desoxiglucosa para aislar cepas mutantes de *Candida boidinii*, nos impulsó a establecer el medio de selección de mutantes con medio YNB, metanol y el análogo de glucosa 2-desoxiglucosa.

Tabla 4.1. CRECIMIENTO DE *P.pastoris* EN MEDIO SOLIDO CON DISTINTOS SUSTRATOS Y 2-DESOXIGLUCOSA

MEDIO BASAL	FUENTE DE CARBONO	CRECIMIENTO
YNB pH 6.0	-----	-
YNB pH 6.0	Desoxiglucosa (DOG) 0.01%	-
YNB pH 6.0	Glucosa (Glu) 0.5%	+
YNB pH 6.0	Metanol (MeOH) 0.5%	+
YNB pH 6.0	DOG 0.01% + MeOH 0.5%	-
YNB pH 6.0	DOG 0.02% + MeOH 0.5%	-
YNB pH 6.0	DOG 0.02% + Glu 0.5%	+

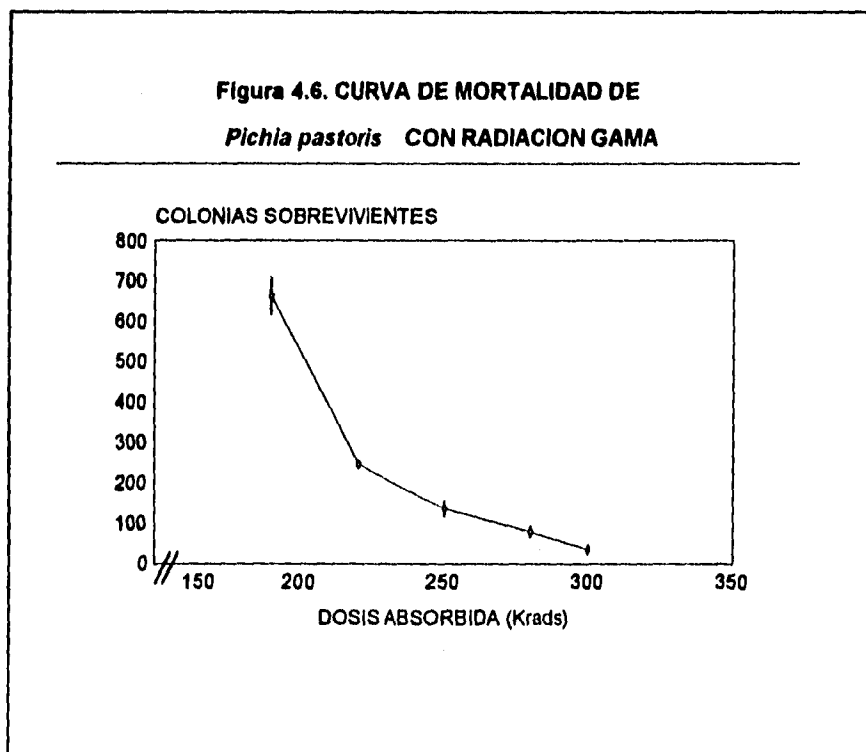
4.3 Mutagénesis

Para la realización de este trabajo, se pensó en utilizar radiación gama debido al alto grado de penetrabilidad que posee este agente físico y al importante daño que puede provocar al genoma celular por rompimiento de cromosomas (Friedl et al., 1993). Esto induce una rápida reparación del ADN por el sistema SOS, el cual es bien conocido como un sistema de reparación mutagénico, promoviendo errores durante la reparación genómica (Rowlands, 1984).

La dosis ideal de irradiación de la levadura *P. pastoris* fué encontrada a partir de un barrido de la exposición del caldo de levaduras a distintas dosis de radiación gama, según se observa en la figura 4.6 que reporta el número de colonias sobrevivientes contra la dosis de exposición. Se puede observar que la dosis ideal para la búsqueda de levaduras con el genotipo mutante de

nuestro interés ocurre a 300 Krads, donde la dosis es suficiente para provocar una alta mortandad de 99.9% en la población, rango en el que existe mayor probabilidad de que el genoma de las colonias sobrevivientes haya sido afectado sensiblemente y que la reparación de éste no sea tan fiel al genotipo original.

El criterio utilizado para irradiar las muestras a esa dosis esta basado en que es la máxima dosis absorbida en la cual se pueden obtener colonias sobrevivientes de la levadura *Pichia pastoris*.



Las colonias sobrevivientes a la irradiación fueron recuperadas de los viales en cajas de petri con medio sólido conteniendo 2-desoxiglucosa y metanol. Las colonias capaces de crecer en el medio de selección, fueron resembradas en medio sólido G-M (formado por glucosa y metanol)

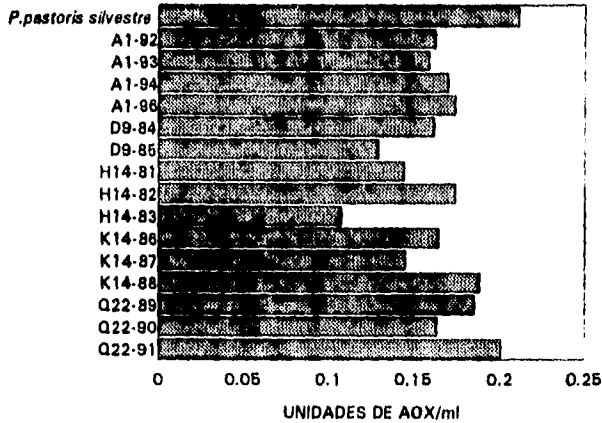
realizándoseles el ensayo de AOX *in situ*. Las 200 colonias que resultaron positivas al ensayo fueron sembradas individualmente en medio completo YM agar. Cada cepa aislada con este sistema de selección fué crecida tanto en medio líquido G-M como con metanol.

Con el objeto de determinar la actividad de AOX en las distintas colonias aisladas por haber resultado positivas en el ensayo de la alcohol oxidasa, fueron crecidas en medio basal líquido con metanol o glucosa más metanol durante 48 horas. Esto permitió evaluar la actividad de alcohol oxidasa que posee cada una, tanto en presencia de glucosa como sin ésta.

De las aproximadamente 1000 colonias obtenidas resistentes a 2-desoxiglucosa (presumiblemente mutantes desreprimidas de glucosa), ninguna mostró actividad de AOX en medio líquido en presencia de glucosa. Estas cepas pudieron liberarse de la represión catabólica por 2-desoxiglucosa para poder asimilar el metanol en presencia del análogo de glucosa y muy probablemente de la represión catabólica por glucosa. Desafortunadamente, estas colonias reversionaron su capacidad de desrepresión por glucosa después de un número reducido de 3 resiembras en medio sólido.

En la figura 4.7 se puede observar una comparación de actividad de distintas cepas aisladas por haber resultado positivas en el ensayo de detección de la alcohol oxidasa *in situ*. Esto se hizo al crecer las distintas cepas aisladas en metanol únicamente como fuente de carbono para poder diferenciar la producción de la enzima alcohol oxidasa. Por ejemplo, la cepa numero H14-83 disminuyó la actividad de la AOX hasta casi un 50% en comparación con la cepa silvestre aunque en la mayoría el descenso era mínimo

Figura 4.7. ACTIVIDAD DE AOX EN CEPAS MUTANTES
AISLADAS DE *Pichia pastoris*



Para investigar la insensibilidad a la represión catabólica de AOX en *P. pastoris*, se crecieron en medio sólido a la cepa silvestre y a las cepas mutantes en pequeñas concentraciones de glucosa y se mantuvo constante la concentración de metanol. La actividad de alcohol oxidasa no fué detectada en ninguna de las cepas. Esto demostró que el metanol por si mismo podría no ser un factor esencial para la expresión de la AOX en presencia de glucosa en estas cepas.

Se aislaron cepas revertientes de *Pichia pastoris* desreprimidas en genes reprimibles por glucosa seleccionándolas por su crecimiento en presencia de 2-desoxiglucosa usando metanol como fuente de carbono alterna.

Posiblemente dichas mutaciones fueron recesivas y por lo tanto a través de las pocas resiembras efectuadas, el caracter se perdió gracias a la recombinación genética. Otra explicación podría ser que los sistemas de reparación en estos organismos es tan eficaz que a lo largo de la

selección de mutantes el daño al ADN fué reparado, suficientemente como para recuperar la regulación catabólica ejercida por glucosa.

Por otra parte, el efecto de mutaciones confiriendo resistencia a 2-desoxiglucosa en la actividad del promotor de AOX ha sido investigada. La expresión de la AOX en tales mutantes no es reprimida por glucosa pero es dependiente de la presencia de metanol. Estos resultados sugieren que la expresión de AOX esta sujeta a un doble control: represión por glucosa e inducción por metanol. La primera se libera en las mutaciones resistentes a 2-desoxiglucosa, pero permanece un requerimiento para la segunda (Sudbery y Gleeson, 1989).

Cregg y Madden (1988), generaron mutantes de AOX⁻ en *Pichia pastoris* por rompimiento del gen y demostraron que hay dos genes estructurales para la AOX en este organismo, ambos deben ser destruidos para generar un fenotipo de metanol⁻. Esto indica que es necesario obtener una doble mutante, es decir, hay que dañar dos zonas del genoma de *Pichia pastoris* en forma simultánea para poder obtener el fenotipo de interés

Tomando en cuenta que el promotor de la AOX es bastante potente (De Hoop et al.,1991), es de esperarse que en vez de obtener un incremento en la producción de la enzima, se obtenga una disminución en la producción de ésta, debido a que el tratamiento mutagénico lo puede afectar. Como es el caso de nuestros resultados.

A continuación se propone un mecanismo para la posible producción de mutantes de *Pichia pastoris*:

- Inducción de ascoesporas de la levadura. Esto se puede lograr preparando un medio que contenga acetato como la principal fuente de carbono. Este puede ser el medio de McClary (Acetato de potasio 1.0%, extracto de levadura 0.25%, glucosa 0.1%).
- Exterminación de las células vegetativas existentes en el medio con esporas. El tratamiento con calor a 60°C podría ser una opción viable, otra sería el agregar dietil eter al medio con esporas, entre muchas otras.

- Una vez lograda la obtención de ascosporas, se deben mantener en un medio rico en nutrientes donde se pueden mantener estables, es decir donde no se apareen. Por ejemplo el medio YPG (Extracto de levadura 1%, pectina 2% y glucosa 1%).
- Exposición de la suspensión de esporas a la dosis de radiación gama de 300 krads.
- Realizar el método de selección de mutantes aquí descrito.

Este método está diseñado en base a que al germinar las ascosporas dan lugar a individuos haploides. Estos son estables cuando se mantienen en un medio rico en nutrientes (Sudbery y Gleeson, 1989). De esta forma se podrían evitar los problemas de complementación de genes ocasionados por la diploidia, así como por recombinación genética inmediata a la irradiación de las levaduras.

4.4 Identificación de la enzima alcohol oxidasa *in situ*

El método de visualización usado para detectar colonias con producción de alcohol oxidasa está basado esencialmente en el método de Eggeling y Sahn (1980). Ellos utilizaron quitosano para la permeabilización de las células. Sin embargo y como ellos mismos lo mencionan en su trabajo, el quitosano presenta problemas incluso interfiriendo en la formación del complejo cromogénico cuando las células no son completamente lavadas de este reactivo. En el ensayo propuesto en este trabajo utilizamos enzimas líticas de la pared y membrana celulares para evitar este problema y como una manera de ser más específicos en la permeabilización celular.

Este método, se ha aplicado exitosamente para aislar mutantes con represión alterada de alcohol oxidasa por glucosa en *Hansenula polymorpha* (Eggeling y Sahn, 1980) y para el aislamiento de una cepa mutante de la levadura *Candida boidinii* A5 productora de alcohol oxidasa en un medio que contiene glucosa (Sakai et al., 1987).

CONCLUSIONES

Durante el crecimiento con glucosa se observa una alta producción de biomasa. Sin embargo no hay producción de alcohol oxidasa.

Se observó un crecimiento lento y escaso en metanol. Para que la levadura *Pichia pastoris* pueda desarrollarse en este medio es necesaria la desrepresión de las enzimas degradadoras del sustrato, lo cuál resulta en un retardo del crecimiento celular.

Al inocular células de *Pichia pastoris* a un medio conteniendo glucosa y metanol, el metanol no fué utilizado hasta que la glucosa desapareció completamente del medio, observándose una curva de crecimiento diauxico.

Pequeñas concentraciones de glucosa (1 mg/ml) reprimen la síntesis de la alcohol oxidasa en presencia de metanol (5 µl/ml).

La 2-desoxiglucosa claramente inhibió el crecimiento de la levadura al utilizarla conjuntamente con metanol. Sin embargo, en este caso no permitió la detección de mutantes insensibles a represión catabólica de alcohol oxidasa por glucosa.

La dosis de radiación gama de 300 krads si afecta al genoma celular de la levadura. No obstante un análisis del porcentaje de revertientes es necesario para mejorarla.

Se acopló la utilización de 2-desoxiglucosa con el ensayo enzimático del reactivo ABTS-POD para detectar la presencia de alcohol oxidasa en colonias de *Pichia pastoris*.

Claramente se mejoró la permeabilización de la pared celular de levaduras utilizando enzimas líticas (Líticas).

Ya que no se pudo lograr el objetivo principal de este trabajo, se sugiere otra metodología para la posible obtención de mutantes de *Pichia pastoris* desreguladas en su producción de alcohol oxidasa.

PERSPECTIVAS

Es recomendable realizar un estudio detallado de la fermentación de la levadura utilizando un inóculo crecido en metanol y observar que sucede con la AOX durante el crecimiento de las células en medio conteniendo glucosa más metanol. Con ello se buscaría conocer si la actividad específica de AOX preexistente se mantiene, aumenta o disminuye y su consecuencia en el crecimiento celular.

Estudios acerca de la cantidad mínima de glucosa necesaria para reprimir la síntesis de alcohol oxidasa en *Pichia pastoris* así como la inactivación catabólica de la enzima en presencia de glucosa son las próximas investigaciones a seguir en este proyecto.

Dado que la reacción de oxidación del metanol llevada a cabo por la enzima alcohol oxidasa es esencialmente una reacción bisustrato, la concentración del oxígeno tiene un efecto significativo en la afinidad de la enzima por el sustrato alcohólico, por lo cual se debe hacer una cinética del crecimiento del microorganismo cuantificando oxígeno.

No obstante la utilización de enzimas líticas de la pared celular para permeabilizar células es un método confiable y rápido, otras alternativas deben tomarse en cuenta para reducir los costos, por ejemplo: detergentes, solventes orgánicos, etc.

Bibliografia

- Avers C.J. 1971. Peroxisomes of yeast and other fungi. *Subcellular Biochemistry*. 1:25-37
- Barzana E., Karel M. and, Klivanov A.M.1989. Enzymatic Oxidation of Ethanol in the Gaseous Phase. *Biotechnol. Bioeng.* 34:1178-1185
- Bormann C. and Sahm H. 1978. Degradation of microbodies in relation to activities of alcohol oxidase and catalase in *Candida boidinii*. *Archives of microbiology*. 117:67
- Couderc R. and Baratti J. 1980. Oxidation of Methanol by the Yeast *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase. *Agric. Biol. Chem.* 44:2279-2289
- Chen J.C., Naglak T.J., and Wang H.W. 1992. An Amperometric Alcohol Sensor Based on Chemically Permeabilized Methylophilic Microorganisms. *Biotechnol. Prog.* 8:161-164
- Childs R.E. and Bardsley W.G. 1975. The Steady-State Kinetics of Peroxidase with 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as Chromogen. *Biochem. J.* 145:93-103
- De Duve C. 1965. The separation and characterization of subcellular particles. *Harvey Lecture Series*. 59:49
- De Hoop M.J., Cregg J., Keizer-Gunnink I., Sjollema K., Veenhuis M. and Ab G. 1991. Overexpression of alcohol oxidase in *Pichia pastoris*. *Febbs Letters*. 291:299-302
- De Mot R. and Verachtert H. 1987. Regulation of the amylase secretion by the yeast *Filobasidium capsuligenum* and a 2-deoxy-D-glucose resistant mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:258-262
- Duff S.J.B. and Murray W.D. 1988. Production and application of methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* 31:44-49
- Duff S.J.B., Murray W.D., and Overend R.P. 1991. Oxygen and temperature effects on acetaldehyde-induced catabolite inactivation in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:82-86
- Duine J.A. and Frank J. 1981. In "Proceedings of the Third International Symposium on Microbial Growth on C1 Compounds" (H. Dalton, ed.). p. 31. Heyden and Son Ltd., London.
- Eggeling L. and Sahm H. 1978. Derepression and Partial Insensitivity to Carbon Catabolite Repression of the Methanol Dissimilating Enzymes in *Hansenula polymorpha*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5:197-202
- Eggeling L. and Sahm H. 1980. Direct Enzymatic Assay for Alcohol Oxidase, Alcohol Dehydrogenase, and Formaldehyde Dehydrogenase in Colonies of *Hansenula polymorpha*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:268-269

- Eggeling L. and Sahm H. 1980. Regulation of Alcohol Oxidase Synthesis in *Hansenula polymorpha*: Oversynthesis During Growth on Mixed Substrates and Induction by Methanol. Arch. Microbiol. 127:119-124
- Egli T. and Fiechter A. 1981. Theoretical Analysis of Media Used in the Growth of Yeasts on Methanol. Journal of General Microbiology. 123:365-369
- Ellis S.B., Brust P.F., Koutz P.J., Waters A.F., Harpold M.M., and Gingeras T.R. 1985. Isolation of Alcohol Oxidase and Two Other Methanol Regulatable Genes from the Yeast *Pichia pastoris*. Mol. Cell. Biol. 5:1111-1121
- Friedl A.A., Beisker W., Hahn K., Eckardt-Schupp F. and Kellerer A.M. 1993. Application of pulsed field gel electrophoresis to determine gamma-ray induced double strand breaks in yeast chromosomal molecules. Int. J. Radiat. Biol. 63:173-181
- Gancedo C. 1971. Inactivation of fructose-1,6-diphosphatase by glucose in yeast. Journal of Bacteriology. 107:401
- Gancedo J.M. and Gancedo C. 1986. Catabolite repression mutants of yeast. FEMS Microbiol Rev. 32:179:187
- Giuseppin M.L.F., van Eijik H.M.J., and Bes B.C.M. 1988. Molecular Regulation of Methanol Oxidase Activity in Continuous Cultures of *Hansenula polymorpha*. Biotechnol. Bioeng. 32:577-583
- Grigorov I., Aleksieva P., Djerova A., Sheremetska P., and Tchobanov B. 1983. Selection of Gamma-Ray Mutants from a Strain of *Humicola lutea* 72, Producing Acid Proteases. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:355-357
- Hofmann, K.H. y Polnisch, E. 1991. Catabolite inactivation, Cyclic-AMP and protein phosphorylation in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. Antonie Van Leeuwenhoek international journal of general and molecular microbiology.
- Holzer H. 1976. Catabolite inactivation in yeast. Trends in Biochemical Sciences. 1:178
- Janssen F.W. and Ruelius H.W. 1968. Alcohol oxidase, a flavoprotein from several Basidiomycetes species; Crystallization by fractional precipitation with polyethylene glycol. Biochim. Biophys. Acta. 151:339-342
- Kato N., Kano M., Tani Y. and Ogata K. 1974. Enzyme system for methanol oxidation in yeasts. Agricultural and Biological Chemistry. 38:111
- Mäkinen K.K. and Tenovuo J. 1982. Observations on the Use of Guaiacol and 2,2'-Azino-di(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid) as Peroxidase Substrates. Analytical Biochemistry. 126:100-108

- Miller G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.Chem.* 31:426
- Müller D. and Holzer H. 1981. Regulation of fructose 1,6-bisphosphatase in yeast by phosphorylation/dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 103:926
- Murray W.D., Duff S.J.B. and Beveridge T.J. 1990. Catabolite inactivation in the Methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2378-2383
- Novak S., D'Amore T. and Stewart G.G. 1990. 2-Deoxy-D-glucose resistant yeast with altered sugar transport activity. *Febs Letters.* 269:202-204
- O'Connor M.L. and Quayle J.R. 1980. Pentose phosphate-dependent fixation of formaldehyde by methanol-grown *Hansenula polymorpha* and *Candida boidinii*. *Journal of General Microbiology.* 120:219
- Ogata K., Nishikawa H., and Ohsuji M. 1969. A yeast capable of utilising methanol. *Agricultural and Biological Biochemistry.* 33:1519
- Ohta K., Hamada S. and Nakamura T. 1993. Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Biol.* 59:729-733
- Reuss, M., Grieser, J., Reng H.G. and Wagner F. 1975. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 1:295
- Roggenkamp R., Sahm H. and Wagner F. 1974. Microbial assimilation of methanol induction and function of catalase in *Candida boidinii*. *Federation of European Biochemical Societies Letters.* 41:283
- Rowlands R.T. 1984a. Industrial strain improvement: rational screens and genetic recombination techniques. *Enzyme Microb. Technol.* 6:290-300
- Rowlands R.T. 1984b. Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme Microb. Technol.* 6:3-10
- Sahm H. 1977. Metabolism of Methanol by Yeasts. *Adv. Biochem. Eng.* 6:77-103
- Sahm H. and Wagner F. 1973. Microbial Assimilation of Methanol; The Ethanol- and Methanol-Oxidizing Enzymes of the Yeast *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.* 36:250-256
- Sakai Y. and Tani Y. 1986. Formaldehyde Production by Cells of a Mutant of *Candida boidinii* S2 Grown in Methanol-limited Chemostat Culture. *Agric. Biol. Chem.* 50:2615-2620
- Sakai Y., Sawai T. and Tani Y. 1987. Isolation and Characterization of a Catabolite Repression-Insensitive Mutant of a Methanol Yeast, *Candida boidinii* A5, Producing Alcohol oxidase in Glucose-Containing Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1812-1818

- Sudbery P.E. and Gleeson M.A.G. 1989. Genetic manipulation of methylotrophic yeasts. En Molecular and Cell biology of Yeasts. Walton, E.F. and Yarranton, G.T. Ed. Blackie and Son Ltd. p. 304-329
- Switzer R.L. 1977. The inactivation of microbial enzymes in vivo. Annual Review of Microbiology. 31:135
- Tani Y., Sakai Y. and Yamada H. 1985. Isolation and Characterization of a Mutant of a Methanol Yeast, *Candida boidinii* S2, with Higher Formaldehyde Productivity. Agric. Biol, Chem. 49:2699-2706
- Tani Y., Sawai T. and Sakai Y. 1988. Production of Catalytic Cells for Formaldehyde Production and Alcohol Oxidase by a Catabolite Repression-Insensitive Mutant of a Methanol Yeast, *Candida boidinii* A5. Biotechnol. Bioeng. 32:1165-1169
- Tschopp J.F., Brust P.F., Cregg J.M., Stillman C.A. and Gingeras T.R. 1987. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. Nucl. Acids Res. 15:3859-3877
- Vandak, D. y Sturdik, E. 1993. Biocatalytical synthesis of flavor compounds important for practice. Chemicke listy. 87:709-718.
- Van Dijken J.P., Otto R. and Harder W. 1975a. Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by catalase purified from methanol-grown *Hansenula polymorpha*. Archives of Microbiology. 106:221
- Van Dijken J.P., Veenhuis M., Kreger-van Rij N.J.W. and Harder W. 1975b. Microbodies in methanol assimilating yeast. Archives of Microbiology. 102:41
- Van Dijken J.P., Otto R. and Harder W. 1976. Growth of *Hansenula polymorpha* in a methanol-limited chemostat. Physiological responses due to the involvement in methanol metabolism. Archives of Microbiology. 111:137-144
- Van Dijken J.P., Harder W., Beardsmore A.J. and Quayle J.R. 1978. Dihydroxyacetone: An intermediate in the assimilation of methanol by yeasts?. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters. 4:97
- Vedvick T.S. 1991. Gene expression in yeast *Pichia pastoris*. Current Opinion in Biotechnology. 2:742-745
- Veenhuis M., Zwart K.B. and Harder W. 1978a. Degradation of peroxisomes after transfer of methanol-grown *Hansenula polymorpha* into glucose- containing media. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters. 3:21
- Veenhuis M., van Dijken J.P. and Harder W. 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. Adv. Microbiol. Physiol. 24:1-82

- Ward J.F. 1990. The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *Int. J. Radiat. Biol.* 57:1141-1150
- Zimmermann F.K. and Scheel I. 1977. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Resistant to Carbon Catabolite Repression. *Molec. gen. Genet.* 154:75-82
- Zwart K.B., Veenhuis M., van Dijken J.P. and Harder W. 1980. Development of amine oxidase-containing peroxisomes in yeasts during growth on glucose in the presence of methylamine as the sole source of nitrogen. *Archives of Microbiology.* 126:117