

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**Descripción de un Método de Enriquecimiento Selectivo
para Auxotrofos de Fenilalanina y Tirosina en la
Levadura Hansenula Polymorpha**

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Alicia Cea Bonilla

1977



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.

CLAS. TESIS

ADQ. _____

FECHA 1977

PROC. ml. 97



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE: PROFRA. NATALIA SALCEDO OLAVARRIETA.
VOCAL ; PROFRA. VICTORIA VALLES SANCHEZ
SECRETARIO ; PROFRA. MARTHA ALBORES VELASCO
1ER. SUPLENTE : PROFR. GERARDO KONO YANCO.
2o. SUPLENTE : PROFR. SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones
Biomédicas de la U. N. A. M.

SUSTENTANTE.

ALICIA CEA BONILLA.

ASESOR DEL TEMA

PROFRA. MARTHA ALBORES V.

SUPERVISOR TECNICO

PROFR. SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL.

CON TODO MI CARINO

A MIS PADRES.

A MIS HERMANOS

JOSE ANTONIO
MA. DEL CARMEN

A MIS ABUELITAS

DOÑA ANTONIA Y
DOÑA EUGENIA.

ALICIA

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel

por su atinada dirección durante el
desarrollo de esta tesis, con agradecimiento,

A mis compañeros de laboratorio

por su colaboración y apoyo.

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTA TESIS.

Aa.	Aminoácidos.
Bas.	Bases.
^{14}C .	Isótopo radioactivo del carbono de P.M. 14.
c,b.p.	cuanto baste para,
Ci.	Curie, unidad de radiactividad.
c.p. m.	cuentas por minuto, unidades de radiactividad.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
Fa.	Fenilalanina,
6 FTR	cepa resistente a 6 fluorotriptofano.
FTT	Fenilalanina, Tirosina y Triptofano.
g	gramo
lt.	litro
M	molar,
M.C.	Medio completo,
mg	miligramo
ml	mililitro.
M.M.	Medio mínimo
μ	micras,
μCi	microcurie
μg	microgramo
μM	micromolar
μmola	micromola
min	minutos
N	normal

NH ₄ ⁺	iones amonio
nm	nanometros
P	grupo fosfato
P P O	2,5 Difeniloxazol
t-RNA	ácido ribonucleico de transferencia
r p m	revoluciones por minuto. Cuando se refiere a centrifugación el rotor de la centrifuga tiene 30 cm de diámetro y 45 ⁰ de inclinación.
soln	solución
Tir	tirosina
Trip	triptofano
Vit	vitaminas.

I N D I C E

	PAG.
I. Introduccion	1
II. Generalidades	4
1. Importancia del triptofano y la proteína microbiana en la nutrición.	
2. Generalidades sobre el modelo biológico.	
3. Mutaciones.	
III. Antecedentes del Proyecto	12
1. Producción de Triptofano	
IV. Material y Métodos	18
1. Microorganismos.	
2. Condiciones de cultivo.	
a) Medios	
b) Stocks	
c) Preparación del Inóculo.	
3. Determinación de Proteína.	
4. Determinación del Transporte de tirosina.	
5. Método de Mutagénesis.	
6. Método de Enriquecimiento.	
7. Químicos.	
V. Resultados	29
1. La cepa BT-1.	
2. Transporte de tirosina.	
3. Enriquecimiento de auxótrofos para fenilalanina y tirosina.	
VI. Conclusiones.	45
Bibliografía.	48

CAPITULO I

INTRODUCCION .

La Microbiología Aplicada es la rama de la Biología que implica el uso de microorganismos (células enteras o parte de ellas, como las enzimas) para la obtención de productos de interés práctico a partir de sustratos sencillos.

Siguiendo este enfoque de la Microbiología, nuestro grupo de trabajo tiene como interés específico el estudiar la posibilidad de obtener el aminoácido esencial L-triptofano como un subproducto en la obtención de proteína unicelular a partir de levaduras.

Nuestro interés por ese aminoácido esencial se debe a que, actualmente, sus procesos de producción son ineficientes (39) y también a que es un metabolito de importancia práctica relevante en la industria alimenticia y en la medicina (39).

Además, el triptofano fue el primer aminoácido que probó ser esencial para la nutrición animal (a pesar de que su requerimiento equivale a la quinta parte de lo que se necesita de otros aminoácidos esenciales) y se encuentra en bajas concentraciones en vegetales y cereales de consumo animal y humano (21).

Todas estas causas han elevado su costo, de tal manera que, su utilización es muy limitada (39).

Si este costo de producción bajara significativamente, en el futuro se promovería, de una forma importante, su uso tanto en las industrias mencionadas como en otras áreas de interés práctico.

Buscando nuevas posibilidades para producir L-triptofano a bajo costo, se pretende obtenerlo como un subproducto en la obtención de proteína unicelular y de esta manera, al explotar simultáneamente estos productos en la misma fermentación, abatir sus costos de producción.

El modelo biológico que se utiliza para este fin en nuestro grupo, es la levadura denominada Hansenula polymorpha. La cepa de que partimos fue -- aislada del suelo por Levine y Cooney en 1972, por su capacidad de utilizar m etanol como única fuente de carbono (25).

El motivo de usar esta levadura para producir proteína unicelular es, fundamentalmente, el hecho de que puede utilizar fuentes de carbono muy variadas y algunas de ellas de bajo costo como son las melazas, glucosa, sacarosa, etanol, metanol, ácido cítrico, etc., además de ser termotolerante, - ya que crece hasta una temperatura de 45°C y a valores de pH ácidos, lo - cual evita el problema de contaminación con otros microorganismos (25)'

La estrategia planteada para la obtención de triptofano ha sido esencialmente la selección de mutantes insensibles a los mecanismos de regulación que afectan su biosíntesis para, después, canalizar la mayor concentración posible de ácido corísmico (precursor común de fenilalanina, tiro--sina y triptofano) hacia la biosíntesis específica de L-triptofano. Este - último evento implica la selección de cepas mutantes para la enzima coris--mato mutasa, las que como resultado serán auxótrofas para fenilalanina y ti--rosina, de tal manera que, al bloquear este ca^mino se incremente la produc-

ción de L-triptofano.

El trabajo experimental de esta tesis fue enfocado a la segunda parte de esta estrategia, es decir, al desarrollo de un método de enriquecimiento de auxótrofos para aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina especialmente), en nuestra población celular de Hansenula polymorpha.

CAPITULO II

GENERALIDADES.I, Importancia del triptofano y la proteína microbiana en la nutrición.

Por largo tiempo se pensó que todas las proteínas tenían el mismo valor nutritivo, Sin embargo, hoy en día se sabe que el valor nutritivo de las diferentes proteínas varía de acuerdo con su composición de aminoácidos esenciales, los cuales difieren para cada especie animal. Para el ser humano, son 8 los aminoácidos esenciales: L-fenilalanina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-treonina, L-triptofano y L-valina. La falta de estos aminoácidos en la dieta causa desnutrición y enfermedad.

Los cereales y las verduras carecen invariablemente de uno o más aminoácidos esenciales y así tenemos que al trigo es necesario adicionarle lisina; al maíz, lisina y triptofano; al arroz, lisina, treonina y a las raíces y leguminosas, metionina, lisina y triptofano.

Estos antecedentes determinan la importancia del triptofano para la industria alimenticia y en Medicina (39).

Dado que las fuentes convencionales de aminoácidos, como son las proteínas de origen vegetal y animal no son suficientes para cubrir las nece

sidades que hay de ellos, es necesario buscar fuentes nuevas de alimentos que puedan suplir estas deficiencias,

Los microorganismos, además de producir metabolitos de gran importancia práctica como son los antibióticos, vitaminas, aminoácidos, hormonas, enzimas, etc., también tienen la potencialidad de ser usados como fuente directa de alimentos ya que son especialmente ricos en vitaminas del grupo B y su proteína posee una buena concentración de aminoácidos esenciales, de tal modo que se equipara a proteínas como las del huevo, leche, carne y pescado (9, 21).

Los microorganismos que se utilizan con fines alimenticios deben reunir ciertas características para poder ser consumidos por la especie humana (21):

1. Deben tener requerimientos nutricionales sencillos, es decir, que tengan un óptimo crecimiento en medios que tengan sólo una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y una mezcla basal de sales,

2. Deben crecer rápidamente en sustratos baratos como son las melazas, agua de cocimiento de maíz, almidón, celulosa, bagacillo de caña, etc., con el fin de obtener una buena producción a bajo costo.

3. Las células deben separarse fácilmente del medio en que crecen ya que si los métodos de separación son difíciles, pueden afectar la textura y sabor del producto,

4. Deben ser resistentes a las contaminaciones pues éstas pueden bajar el rendimiento de producto o pueden causar enfermedad o intoxicaciones si los microorganismos son patógenos para el hombre o producen sustancias tóxicas

5. Adicionalmente, deben ser cepas estables, cuyas propiedades fisiológicas y genéticas sean conocidas y manipulables, de tal manera que, puedan aprovecharse en la obtención de cepas con mayor cantidad y calidad mejor en la proteína formada durante la fermentación,

6. Deben usar en una forma eficiente la fuente de energía en que -- crezcan, para que, evitando los desperdicios, se disminuya el precio de producción!

7. Una característica muy importante, si pensamos que sea consumido por diferentes especies animales y por el hombre, es que los microorganismos empleados no tengan propiedades tóxicas o alergénicas para sus consumidores pues estas propiedades causan enfermedades y muerte en ciertos sectores de la población mundial;

Todas estas propiedades enumeradas anteriormente deben contribuir para que los microorganismos sean una fuente alimenticia económica, que esté al alcance de cualquier persona que desee adquirirla (21)!

Las bacterias, hongos y algas reúnen en general estas características para la producción de proteína, aunque son de especial interés las levaduras ya que su contenido de ácidos nucleicos es bajo (6-12%) en comparación con el de las bacterias (8-16%), lo que las hace preferibles ya que durante la degradación de sus bases púricas (Adenina y Guanina), se produce gran cantidad de ácido úrico, el cual, cuando está en exceso en los organismos, se deposita en los músculos como cristales y produce la enfermedad llamada "gota" (34).

2. Generalidades sobre el modelo biológico.

El microorganismo con el que se trabaja en esta tesis es una levadura del género Hansenula,

Algunas levaduras son Ascomycetes unicelulares que se reproducen asexualmente por gemación, fisión binaria o ambas, y además producen ascosporas en una asca desnuda que se origina a partir de un cigoto o partenogénicamente de una sola célula somática. Se encuentran abundantemente en sustratos que contengan azúcares (néctar de flores y en la superficie de algunos frutos). También se encuentran en el suelo, en la leche, en las partes vegetativas de las plantas, etc (1),

Las levaduras poseen una pared celular definida que contiene polímeros de fructosa (levanas) y manosa (mananas) y un núcleo pequeño rodeado de citoplasma. Poseen una gran vacuola y otras inclusiones embebidas en el citoplasma. Poseen gran variedad de formas y algunas veces se adhieren en cadenas formando un pseudomicelio. Son células incoloras que forman colonias blancas, cremosas y algunas de color café. Sus ascosporas son normalmente ovoides y su número es de 4 ó 8 por asca aunque se encuentren en otro número (1).

Hay diferentes géneros de los cuales, el género Hansenula comprende a todas las levaduras ascosporógenas capaces de asimilar los nitratos y sus especies se caracterizan por diferentes propiedades como son la formación de una película en medios líquidos, la formación de un pseudomicelio, por su complementaridad haploide o diploide y por sus propiedades fermentativas. Son levaduras que se reproducen asexualmente por gemación o por gemación acompañada de formación de pseudohifas o hifas verdaderas, con una o cuatro ascosporas por asca y que asimilan el nitrato. Sus esporas son principalmente de forma de sombrero y de tipo saturno y son liberadas al madurar, de las ascas (7).

La primera especie descrita de este género fue H. anomala, la cual forma una película en el medio líquido, fermenta diferentes azúcares, forma pseudomicelio y produce un éster. Es una especie muy común y puede aislarse de varias fuentes (7).

H. wingei es una especie no fermentativa, heterotálica, con esporas en forma de sombrero.

H. polymorpha fue descrita por Morais y Maia en 1959 (36). Son células haploides, elipsoidales o cilíndricas y existen simples o en pares. Sus colonias son blancas o rosas, suaves, brillantes, cremosas, enteras; Crecen en medios líquidos sin formación de películas. Posee una sola asca no conjugada. La conjugación de las células haploides es generalmente en-

tre una célula y su gena o entre células independientes. Las ascosporas son pequeñas, hemisferoidales, o con extremos estrechos hacia abajo. Existen de 1 a 4 esporas por asca, la cual se rompe al madurar las esporas. Estas esporas son más resistentes al calor que las de las otras especies. Sus ascas son esféricas o esferoidales. Fermenta la glucosa y asimila muy diversas -- fuentes de carbono, así como el KNO_3 , requiere biotina y tiamina para crecer. Crece a 37°C aunque puede hacerla a temperaturas mayores (25,36).

3 . Mutaciones

Partiendo de los recientes avances en Genética Molecular, se sabe en la actualidad que el orden de aminoácidos de las proteínas está especificado por el ordenamiento de tripletas de mononucleótidos de un segmento de la molécula de DNA. La serie de tripletas que codifican para una proteína completa se denomina cistrón o gen.

El orden de los aminoácidos resulta en ocasiones alterado durante la -- síntesis, originándose una proteína anormal. Tal proteína anormal es generalmente el resultado de una mutación. Se produce una mutación cuando una o varias unidades mononucleotídicas del DNA que especifican para una cadena -- polipeptídica determinada, es químicamente alterada o bien es el resultado de una adición o pérdida de nucleótidos en la cadena. En ambos casos la consecuencia es que el orden normal de las tripletas codificadas por el gen, resulta modificado y con ello ocasiona una alteración en el orden de la cadena polipeptídica que codifica.

Las mutaciones pueden inducirse mediante el empleo de agentes físicos y químicos.

Desde 1963 se ha trabajado en la elucidación de las bases moleculares de las mutaciones y la forma en que actúan los diferentes agentes mutagénicos, tanto a nivel de microorganismos (bacterias, hongos, etc.,) hasta los -- sistemas más complejos (como son los sistemas de mamíferos). Aunque, hasta hoy no se ha establecido la relación cuantitativa entre los agentes --

que inducen cambios en un solo gen (mutaciones puntuales) y los que inducen alteraciones cromosómicas visibles, si se ha determinado la correlación entre los agentes físicos y químicos que causan ambos tipos de alteración -- (11, 24).

La investigación de las mutaciones fue resumida por Drake (11) en 3 puntos interrelacionados:

- 1) La deducción de la configuración de la región mutada dentro de = la molécula del DNA.
- 2) Trazar los eventos por los cuales se obtiene la configuración-mutada dentro de la molécula del DNA, entendiendo el evento químico primario y
- 3) Analizar los efectos de la mutación sobre el fenotipo de la población celular resultante (sistema biológico).

En el caso de los microorganismos, la elucidación de las bases moleculares de las mutaciones puntuales se ha facilitado por la naturaleza del sistema y por las grandes poblaciones que facilitan tanto el análisis del material genético como el del sitio y extensión de la alteración del DNA y finalmente su efecto en la progenie resultante.

Las mutaciones puntuales se dividen en dos subtipos principales: sustituciones de pares de bases y cambios de arreglo. Las sustituciones de pares de bases se subdividen en transiciones y transversiones. Las transiciones son cambios de una purina por otra purina diferente y/o de una pirimidina por otra pirimidina distinta. Las transversiones son el cambio de una purina por una pirimidina y viceversa,

Las mutaciones de cambio de arreglo pueden ser de dos tipos: Deleciones y Adiciones. Las deleciones consisten en la pérdida de una o más bases, lo que cambia todo el mensaje posterior al lugar de la mutación. Las adiciones consisten en el aumento de una o más bases con la misma consecuen

cia que las deleciones,

Hay una gran cantidad de sustancias químicas que causan mutaciones puntuales y su modo de acción se ha determinado por pruebas microbiológicas.

Los compuestos que producen sustitución de bases no pueden revertirse por compuestos que producen mutaciones de cambios de arreglo ni viceversa.

También se producen macrolesiones que se detectan por medios citogenéticos como las deleciones, duplicación de cromosomas y transposiciones, siendo estas últimas las que tienen un efecto citogenético más significativo, pues las deleciones generalmente conducen a células no viables.

Para que una mutación se exprese en un fenotipo alterado, el tipo de la mutación y su extensión deben ser tan importantes que causen cambios muy grandes en la proteína para la que codifican. Esta expresión final de la mutación dependerá también de la habilidad de la célula para reparar el daño causado en el DNA, en el cual la célula, por medio de la DNA polimerasa sintetiza el pedazo de DNA adecuado para sustituir al DNA mutado y por medio de una endonucleasa que reconoce al pedazo de DNA "dañado" lo libere de la cadena normal de DNA. Cuando este mecanismo de reparación (el cual varía según la especie) falla, es decir, cuando la endonucleasa es empleada en forma incorrecta, puede conducir a mutaciones puntuales en el sitio dañado del DNA (24).

El modo de acción de algunos agentes mutagénicos se encuentra en la Tabla 1.

TABLA I

MODO DE ACCION DE ALGUNOS AGENTES MUTAGENICOS (24).

CAMBIO QUIMICO	CAMBIO MUTAGENICO	AGENTE
Alteración de bases (cambio químico en las bases del DNA por acción directa del mu- tágeno)	Transición	Hidroxilamina, Metan-sulfonato de etilo, N-metil- N'-nitro-N- nitrosoguanidina Acido nitroso.
Sustitución de bases (incorporación de aná- logos de bases)	Transición	Bromouracilo
Remoción de bases (formación de sitios apurínicos)	Transversión	Metan-sulfonato de etilo.
Formación de dímeros de Timina	Bloqueo de la Du- plicación	Agentes físicos- como luz UV y ra- diaciones,
Inserción de materia- les en el DNA	Delección o Adición Transposiciones	Proflavina ICR 170
Entrecruzamiento de las cadenas del DNA	Delecciones o Adicio- nes, Transposiciones	Acido nitroso, ga- ses mostaza azu- frados y nitroge- nados,

CAPITULO III

ANTECEDENTES DEL PROYECTO.1, Producción de triptofano.

Como se mencionó anteriormente, nuestro grupo está interesado en la obtención de L-triptofano como un subproducto en la producción de proteína unicelular a partir de levaduras.

La obtención de cepas hiperproductoras de este aminoácido se planteó esencialmente por dos caminos secuenciales:

1, La obtención de cepas resistentes a análogos del triptofano, como son el 6 fluorotriptofano, 7 azatriptofano, 5 metiltriptofano, y 7-metiltriptofano, etc., y,

2, La obtención de cepas que tengan afectada su corismato mutasa, en forma tal, que requieren parcialmente fenilalanina y tirosina para -- crecer."

El primer paso se basa en las propiedades que presentan los análogos de los aminoácidos, de competir con el aminoácido por el sitio activo de ciertas enzimas regulatorias de su biosíntesis sobre las que el aminoácido actúa como regulador negativo, es decir, retroinhibe y/o reprime - su síntesis (Fig. 1)."

Los análogos no pueden ser usados en la síntesis de proteínas, pues

la aminoacil t-RNA sintetasa no los reconoce por ser una enzima muy específica (28).

Los análogos actúan sobre las enzimas regulatorias, los que no son tan específicas para su regulación por producto, sino que sustancias pa-recidas a éste, actúan sobre ellas de una forma similar a la del produc-to mismo. La antranilato sintetasa es una enzima de este tipo y los aná-logos del triptofano actúan sobre ella, inhibiéndola, lo que no permite la biosíntesis del triptofano, esencial para la síntesis de proteínas y la célula no puede crecer,

Es por esto que la cepa silvestre no crece en presencia de estos aná-logos del L-triptofano. Cuando una célula se hace resistente a su efecto es decir, es capaz de crecer en un medio que contenga al análogo, se deno-mina Mutante regulatoria,

Para la obtención de las mutantes regulatorias se requiere inocular la cepa silvestre, después de mutagenizarla, en un medio que contenga un análogo del triptofano, de tal manera, que se puedan seleccionar las cepas resistentes, Mutantes con estas características, resistentes a 6 fluoro--triptofano y 7 azatriptofano han sido recientemente aisladas en nuestro laboratorio (M.E. Flores y S.Sánchez. Artículo en preparación), Como re-sultado de este evento mutacional, algunas de ellas fueron capaces de hi-perproducir y excretar L-triptofano al medio de cultivo. En la actuali--dad, se exploran las características regulatorias de la enzima antrani-lato sintetasa en dichas mutantes.

Este mismo efecto se ha reportado en el caso de análogos de otros a-minoácidos, los cuales se hiperproducen al perder su efecto regulador so-bre las enzimas de su propia biosíntesis (19.20),

Adicionalmente, en el 2o. paso y motivo de esta tesis, se piensa ca-nalizar la mayor cantidad del ácido corísmico formado por la célula hacia

la biosíntesis del L-triptofano para mejorar importantemente su producción

Para este caso, se plantea la posibilidad de afectar por mutación, en forma total o parcial, la actividad de la enzima corismato mutasa, la cual utiliza el ácido corísmico como sustrato, al igual que la antranilato sintetasa. Si se obtienen este tipo de mutantes a partir de una mutante regulatoria, se podría predecir que al aumentar la disponibilidad del ácido corísmico para la enzima antranilato sintetasa, aumentaría aún más la producción de L-triptofano.

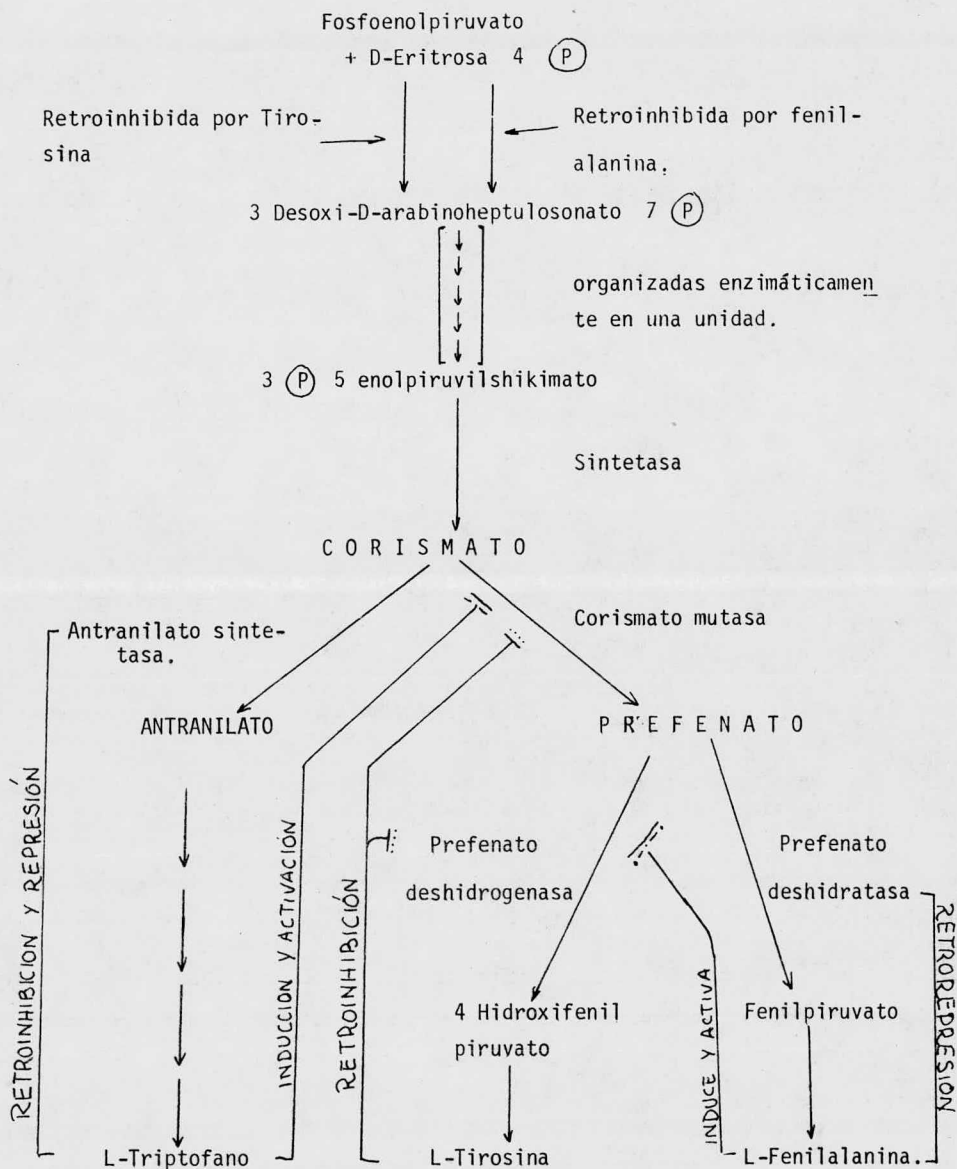
Dado que la utilización del ácido corísmico por la enzima corismato mutasa permite la formación de ácido prefénico, precursor común a la biosíntesis de fenilalanina y tirosina (Fig. 1), es claro que mutantes -- con actividad de corismato mutasa afectada total o parcialmente requerirán también total o parcialmente de dichos aminoácidos. Con estas bases decidimos enriquecer nuestra población celular previamente mutagenizada para dichos auxótrofos, es decir, decidimos buscar auxótrofos para fenilalanina y tirosina.

En los últimos años se han buscado métodos para enriquecer la población de auxótrofos y así tenemos que en 1948, Davis desarrolló un método para enriquecer la población de auxótrofos en bacterias mediante el uso de penicilina (8), Este método es muy útil en el caso de bacterias pero no resulta adecuado para el caso de hongos (29,30,33). En 1959, Moat y Peters hicieron los primeros intentos para usar los efectos antifungales de los antibióticos poliénicos en la selección de mutantes auxotróficas en levaduras (20).

Este tipo de antibióticos tienen la propiedad de formar complejos con los esteroides de la membrana celular provocando cambios considerables en la permeabilidad y su acción selectiva es especialmente fuerte durante el aumento de la actividad metabólica de la célula (10,22,23).

FIGURA I

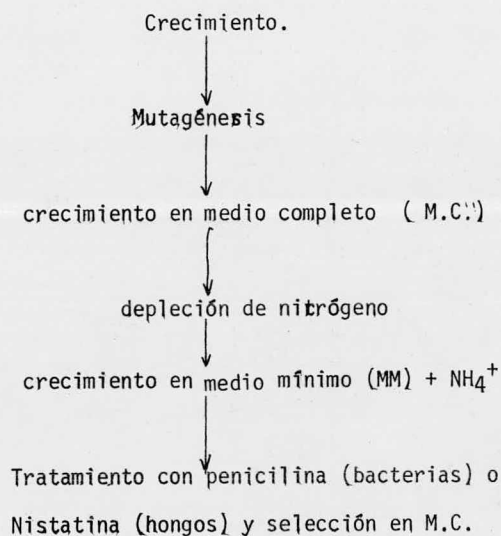
ESQUEMA DE BIOSINTESIS DE LOS AMINOACIDOS AROMATICOS EN -----
Saccharomyces cerevisiae (26).



Esto permite su aplicación en la selección de células auxotróficas de hongos.

Los antibióticos poliénicos han dado resultados positivos cuando se usan para seleccionar mutantes auxotróficos en levaduras (5, 33, 35).siguiendo un esquema de enriquecimiento similar al usado con la penicilina. La nistatina es un antibiótico poliénico que ha servido en la selección de todo tipo de auxótrofos en levaduras.

El esquema que se sigue normalmente para el enriquecimiento por la mayoría de los investigadores que buscan obtener una población específica de auxótrofos en bacterias y levaduras es el siguiente:



Las células, después de la mutagénesis se ponen en M.C. líquido con el fin de que se expresen fenotípicamente las mutaciones inducidas y para fijar la mutación (muy importante en el caso de levaduras, que tienen la capacidad de comportarse como diploides y como haploides),

Se depletan entonces de nitrógeno con el fin de que todas las cepas agoten sus pozas de metabolitos acumulados.

Una vez hecho esto, se crecen en MM con el fin de que la cepa silvestre empiece a reproducirse y es entonces cuando se adiciona el antibiótico, el cual elimina a todas las células que tienen capacidad de crecer dejando así solo la población de células auxótroficas, que no crecen.

Posteriormente, se permite que los auxótrofos crezcan en un medio completo y se procede a la determinación de su requerimiento nutricional (pruebas auxanográficas),

Este tipo de enriquecimiento sirve para la selección de auxótrofos que difícilmente se aislan en una población mutagenizada, como es el caso de algunos auxótrofos de histidina, de aminoácidos aromáticos, etc., Asimismo es útil para realizar estudios metabólicos y para la producción de algunos metabolitos secundarios que sean de interés práctico. Es importante mencionar que el tiempo de tratamiento en cada caso, varía de acuerdo al microorganismo usado, aunque en general, puede decirse que para bacterias, estos tiempos son más cortos,

Cuando el enriquecimiento con nistatina fue practicado en la levadura Hansenula polymorpha se encontró que un 99% de los auxótrofos obtenidos requerían bases púricas o pirimidicas (S. Sánchez y A.L. Demain. Eur. J. of Applied Microbiol, sometido para publicación), característica que también ha sido encontrada en Aspergillus nidulans durante el enriquecimiento de auxótrofos con el antibiótico N-glucosilpolifungina (3).

En la presente tesis será descrito el enriquecimiento obtenido para auxótrofos de fenilalanina y tirosina, al combinar el efecto de nistatina con un medio que específicamente inhibe el crecimiento de auxótrofos de tirosina en la levadura Hansenula polymorpha.

CAPITULO IV.
MATERIAL Y METODOS.

1. Microorganismos.

El modelo biológico que se usa en este estudio es la levadura ---- Hansenula polymorpha que fue aislada por Levine y Cooney, en 1972, a partir del suelo, por su propiedad de utilizar metanol como única fuente de carbono y energía para crecer (25),

La cepa 6 FTR es una mutante regulatoria, seleccionada en el laboratorio recientemente a partir de la cepa silvestre por su propiedad de resistir la inhibición del crecimiento provocada por la presencia en el medio de cultivo de 100 ug/ ml de 6 fluorotriptofano, análogo del aminoácido esencial L-triptofano,

La cepa BT-1 es un auxótrofo para el aminoácido L-tirosina, aislado a partir de la cepa silvestre, por el Dr. Sergio Sánchez en el Instituto Tecnológico de Massachusetts en 1975,

2. Condiciones de cultivo.

a) Medios

Para el crecimiento de la levadura Hansenula polymorpha se utilizaron básicamente dos medios, uno de los cuales es un medio complejo, denominado M.C. y que está compuesto por:

Extracto de Levadura	1 ^o / ₁₀
Peptona	2 ^o / ₁₀
Glucosa	2 ^o / ₁₀

El otro medio es un medio mínimo definido (Tabla 2), denominado M.M. y - que corresponde básicamente al reportado por Fink en 1972 (12).

Durante la caracterización de mutantes auxotróficas, el medio MM se suplementa respectivamente con l- aminoácidos,

TABLA 2

COMPOSICION DEL MEDIO MINIMO PARA Hansenula polymorpha. (12).

Solución ①		Solución ②	
Vitaminas y Elementos Hue11a.		Solución Reguladora de Fosfatos.	
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	50g	KH ₂ PO ₄	87.5 g
NaCl	10g	K ₂ HPO ₄	12.5 g
Tiamina	40mg	H ₂ O bidesti-	
Biotina	0.2mg	lada c.b.p.	1 lt.
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	5 mg		
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	7 mg		
H ₃ BO ₃	1 mg	Solución ③	
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	1 mg	CaCl ₂ . 2 H ₂ O	10 g
KI	1 mg	H ₂ O bidestilada	
H ₂ O bidestilada		c.b.p.	
c.b.p.	1 lt.	c.b.p.	1 lt.

Para el medio M.M. se usa cada solución al 1%

Glucosa al 1%
 (NH₄)₂SO₄ 0.1% (MM-N)
 Prolina 200 µg/ml (MM-P)

(100 µg/ ml), bases nitrogenadas (25 µg/ ml) o con 0.2% de casaminoácidos.

Las vitaminas se utilizan en las siguientes concentraciones finales:

Biotina	2 µg/	ml
Ac. pantoténico	400 µg/	ml
Ac. Fólico	2 µg/	ml
Inositol	2 µg/	ml
Niacina	400 µg/	ml
Ac. p-aminobenzoico	200 µg/	ml
Piridoxina	400 µg/	ml
Riboflavina	200 µg/	ml
Tiamina	400 µg/	ml

Para la preparación de placas, los medios se solidifican con Bacto-agar - al 1.5%. Después de esterilizar el medio es añadido a cajas de Petri (25 ml/ - caja).

Todos los medios se esterilizan en el autoclave a 2.5 atmósferas de presión por 25 minutos. Las bases nitrogenadas se esterilizan en solución por separado del medio. Las vitaminas y la tirosina se esterilizan por filtración en filtros millipore 0.45 µ tipo HA estériles.

b) Stocks

Las cepas se mantienen en tubos de ensayo de 13 x 100 con tapón de rosca - con 3 ml de M.C. sólido e inclinado. Se inoculan por estría y se incuban a 37°

C durante 24 horas.

La cepa BT-1 se mantiene en tubos de MM-N suplementado con L- tirosina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se inocula por estría y se incuba a 37°C durante 48 horas.

c) Preparación del Inóculo

Para la inoculación del medio líquido se toma una asada del stock correspondiente y se resuspende en 10 ml de MM-N. Se incuba a 37°C con agitación (225 rpm) durante 24 horas.

El cultivo obtenido se centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos y se descarta el sobrenadante. Las células se lavan 2 veces con agua bidestilada estéril por centrifugación y se resuspende en 10 ml de agua bidestilada estéril. De la suspensión resultante, se utiliza 1 ml para inocular el matraz con el medio líquido correspondiente.

En el caso de la cepa BT-1 se usan medios suplementados con L- tirosina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Para inocular medios sólidos se hacen suspensiones celulares densas a partir de stock y se siembra en placas 0.1 ml de suspensión de cada placa.

Todos los cultivos líquidos se incuban a 37°C con 225 rpm de agitación y las placas se incuban a la misma temperatura.

El crecimiento en medios líquidos se determina por D.O. a 540 nm en un Fotocolorímetro Bausch & Lomb spectronic 20, o por determinación de proteína por el método de Lowry (26).

El crecimiento en placas se determina cualitativamente cada 24 horas.

3. Determinación de proteína.

La proteína se determina por el método de Lowry (26) que se basa en la formación de un complejo colorido entre el grupo fenólico (o aromático- en otros casos como en el del triptofano, fenilalanina e histidina) de la tirosina de las proteínas, y el ácido fosfotungstomolibdico (color oro), que oxida al grupo hidroxilo de la tirosina en condiciones alcalinas, dando un color azul intenso que se puede medir a 625 nm, usándose un estándar

de proteína de albúmina sérica bovina a una concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - (33).

Para la determinación de la proteína, las células se separan del medio por centrifugación a 3500 rpm o por filtración en filtros millipore - 0.45 μ tipo HA; se lavan 2 veces con agua bidestilada estéril y al paquete celular se le añaden 2 ml de ácido tricloroacético (T.C.A.) al 10% - para romper las células y liberar las proteínas. Se agita y se centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y la proteína - precipitada se resuspende en NaOH 1 N H_2O destilada en una proporción de - 0.4 - 0.6 ml respectivamente. El volumen para resuspender depende del tamaño del precipitado. de aquí se toma una alícuota, considerando que si - el volumen final de resuspensión de las células es mayor de 1 ml- la alícuota debe ser de 0.1 ml como máximo. El volumen de la alícuota se afora a 1 ml con agua destilada.

Se adicionan 5ml. de una solución de proteínas que consisten en 3 soluciones:

Solución 1: Na_2CO_3 : 20 g en 1 lt. de NaOH 1 N.

Solución 2: Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado al 1%.

Solución 3: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5%.

Solución

De Proteínas = 98 ml de soln. ① + 1 ml soln ② + 1 ml soln ③

Agitar bien y dejar reposar 10 minutos. Adicionar 0.5 ml de reactivo de Folín Ciocolteau diluido 1.3. Agitar perfectamente y reposar 30 minutos. Leer la densidad óptica (D.O.) a 625 nm contra un blanco de agua, en el colorímetro Bausch & Lomb spectronic 20.

Cálculos:

Concentración

Problema = $\frac{[\text{J}]_{\text{St}} \times \text{D.O. p} \times \text{F. D.}}{\text{D.O. St.}}$

D.O. St.

[] P = Concentración del problema.

[] ST = Concentración del Estándar.

D.O.P = Densidad Optica del problema.

D.O.ST = Densidad Optica del estándar.

F.D. = Factor de dilución de la muestra (Alícuota ÷ ml de la suspensión celular).

$$\text{Concentración en mg/ml} = \frac{\text{Concentración del problema}}{\text{ml de muestra inicial}} \quad (34)$$

4. Determinación del transporte de tirosina.

La entrada de tirosina a la célula se determina por un método radioactivo que consiste en lo siguiente:

En el caso de la cepa silvestre, se crece ésta en 10 ml de MM-N por 20 horas a 37°C. y 225 rpm de agitación. Se separan la células del medio de cultivo por centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos y se lavan 2 veces con agua destilada estéril y se inoculan con 1 ml dos matraces Erlenmeyer de 50 ml con 19 ml de MM-N. Se incuban 2 horas en las mismas -- condiciones de agitación y temperatura. Se toman 10.5 ml de este medio, se filtran en un sistema de filtración múltiple doméstico diseñado por -- Anderson en 1976 (figura 2). (2), sobre filtros millipore 0.45 μ tipo -- HA. Se lavan con MM-N frío y se determina proteína por el método de ---- Lowry.

Se adicionan 0.5 ml de una solución de L Tirosina 14C-tirosina sin marcar (o fría) que tiene una concentración final de 200 μg/ml, y 4 μCi de L- tirosina-U-14C (0.5519 mM).

Esta solución se prepara diluyendo una solución inicial de L- tirosina 14C que tiene 22 μg y 50 μCi en 0.5 ml con 4.5 de agua destilada y de esta solución se toman 0.2 ml se hace una solución de L- tirosina --- fría con una concentración de 330.4 μg/ml, es decir, que tiene 5 mg en - 15.13 ml y de allí se toman 0.3 ml.

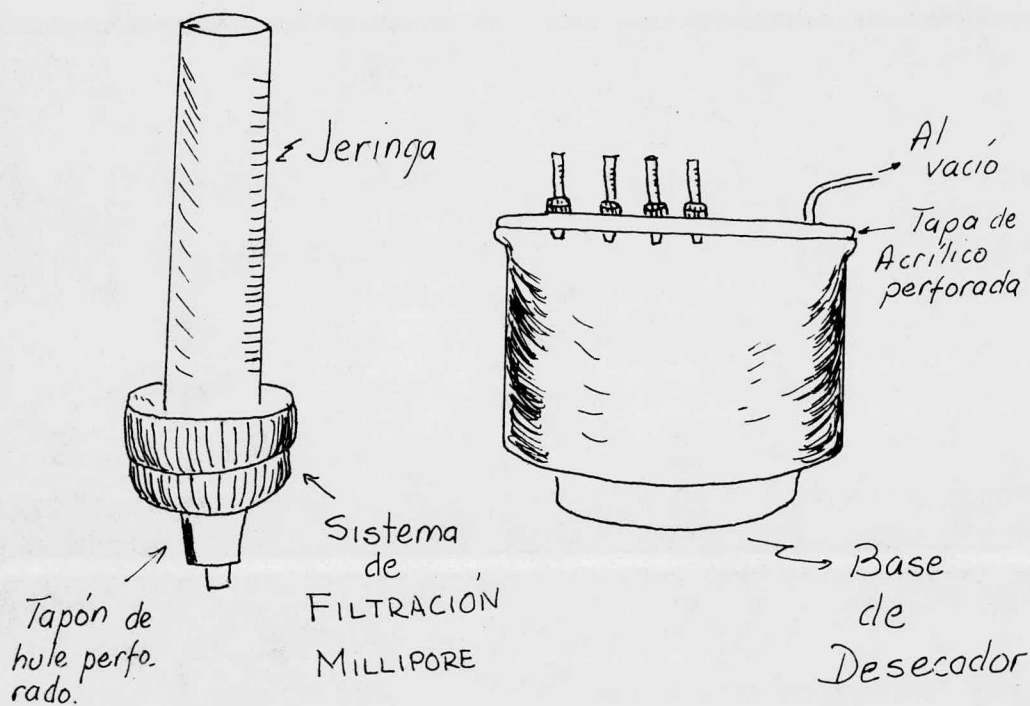


FIGURA 2 (2)

Una vez logrado esto, se mezclan y se adicionan al matraz con 9.5 del inóculo crecido; tomar muestras de 1 ml a los tiempos 1, 2.5 y 10 minutos Filtrar (en el mismo sistema de filtración ya mencionado) y lavar inmediatamente con una cantidad abundante de MM-N helado, con el fin de detener el transporte; pasar a viales que contengan 10ml de Reactivo de Bray o líquido de centelleo (compuesto por:

Naftaleno	60g
P P O	4g
Etilenglicol	20ml
metanol	100ml
Dioxano cbp	1000ml).

Se leen las cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo Nuclear Chicago y graficar cpm vs. tiempo.

La radiactividad específica se determina con un control de 0.5 ml de la solución de L-tirosina-U-¹⁴C- tirosina fría.

Para la determinación del transporte de tirosina en la cepa BT-1, se creció esta cepa en MM-N suplementado de 10 µg/ml de tirosina y después de 24 horas se depleta de este aminoácido por 30 minutos en un medio MM-P y después se hace la determinación del transporte de la manera descrita para la cepa silvestre.

Para medir el efecto de algunos aminoácidos sobre este transporte se crecen las cepas en la forma descrita anteriormente, se lavan y se resuspenden en 5ml de agua destilada estéril. Se inoculan 4 matraces Erlenmeyer de 50 ml con 19 ml de medio correspondiente (según la cepa) con 1ml de suspensión celular. Se incuban 2 horas a 37°C y 225 rpm de agitación y tomar 1ml de muestra para determinación de proteína y al resto adicionar 0.5 ml de la solución de tirosina ¹⁴C- tirosina fría 55.19 µm y 0.5 ml de -

una solución equimolar del aminoácido que se desea probar y se siguen -- los mismos pasos ya descritos en las determinaciones anteriores.

También se probó el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno. Se crece la cepa silvestre en MM-N por 20 horas y después se lavan y resuspenden las células en 3 ml de agua destilada estéril. Se inoculan con 1 ml, 2 matraces Erlenmeyer de 50 ml que contienen MM-N o MM-P (19 ml cada matraz) Se incuban 2 horas a 37°C y 225 rpm de agitación y entonces determinar el transporte de L- tirosina.

NOTA: Desde el momento en que se toma la muestra para proteína, la determinación se hace en condiciones No estériles.

5. Método de Mutagénesis.

Hansenula polymorpha, cepa 6 FTR se crece en un medio M.C. durante 20 a 22 horas a 37°C y 225 rpm de agitación; las células se lavan dos veces con solución reguladora de citratos 0.1 M pH 5.5 estéril y se resuspenden en 13 ml de la misma solución reguladora.

Se toma 1 ml de esta suspensión y se hacen diluciones seriadas en agua destilada estéril. Se siembran en placas de M.C. e incuban a 37°C - durante 48 horas. Se cuenta el número de colonias (blanco inicial).

Se toman 9.5 ml de la suspensión celular y se mezclan con 0.5 ml de N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) con una concentración de 500 µg/ml, el cual actúa como agente mutagénico. Se deja actuar por 20 minutos y se centrifuga.

Se lavan las células 2 veces con agua destilada estéril y se resuspenden en 11 ml de medio M.C. Se toma 1 ml para hacer diluciones seriadas en MM + glicerol al 20% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0.1%. Se siembra de estas diluciones en placas de medio M.C. Se incuban a 37°C y se determina el porcentaje de muertes provocadas por el agente mutagénico.

La solución de NTG se prepara pesando 2.5 mg de NTG y disolviéndolos en 5 ml de solución reguladora de citratos 0.1 M y pH 5.5. Esterilizar por filtración y tomar 0.5 ml para cada 10 ml de medio M.C.

6. Método de Enriquecimiento.

Una vez mutagenizadas las células, se incuban a 37°C y 225 rpm de agitación durante 12 a 15 horas en un matraz cubierto con papel aluminio. Se centrifugan y se divide el paquete celular en dos partes: una se resuspende en MM + glicerol y se congela; la otra, se resuspende en MM + sacarosa al 20% y se incuba una hora. Se adiciona 0.6 ml de una solución de nistatina (100 µg/ml) y se deja actuar por 15 minutos. Se centrifuga y se lava dos veces con agua destilada estéril y se resuspende el paquete celular en 10 ml de MM + glicerol al 20%. Se hacen diluciones en el mismo medio y se siembra en placas de medio M.C. + floxin (10 µg/ml). Se incuban las placas a 37°C durante 2 días.

Se siembra las diluciones en placas de medio M.C. y de la dilución donde se obtengan 60 colonias por placa, se siembran más placas de medio M.C. y MM-N + fenilalanina (FA) + tirosina (Tir) + triptofano (Trip) y se replica en MM-N. Se incuban a 37°C durante 48 horas y se caracterizan los auxótrofos en MM + bases, MM + vitaminas, MM + FA + Tir + Trip y MM + casaminoácidos. De este último medio, se caracterizan los auxótrofos en placas de MM + diferentes aminoácidos (auxanografía).

La solución de nistatina se prepara pesando 2 mg de nistatina y disolviéndolos en 2 ml de metanol. Se toman 0.8 ml y se llevan a 8 ml con etanol y se esterilizan por filtración. Se adicionan 0.6 ml para cada 10 ml de medio M.C.

7. Químicos.

Todos los aminoácidos y bases así como la nistatina y la NTG se ob tuvieron de Sigma Chemical Co. La tirosina ^{14}C marcada uniformemente se obtuvo de New England Nuclear Co. y los demás productos químicos se obtuvieron de Merck S.A. El P P O del líquido de centelleo fue un obse--- quio del Dr. Rafael Palacios.

CAPITULO V
RESULTADOS.

1. La cepa BT-1

Esta cepa es una mutante de Hansenula polymorpha que fue aislada - por el método de enriquecimiento de Snow (32) en el que después de la mutagénesis, hay una depleción de nitrógeno, tratamiento con nistatina y siembra en placas para determinar su requerimiento nutricional.

Como puede verse en la Tabla 3, esta cepa es capaz de crecer en -- MM-N suplementado con L-tirosina pero no es capaz de hacerlo en medio - MM-M. Sorprendentemente, cuando se decidió conservarla en medio M.C., - la cepa no creció. Se sembró entonces en medio M.C. suplementado con L-tirosina y tampoco creció. Sin embargo, la cepa creció muy bien en MM-N y L-tirosina en presencia de bases y vitaminas, mientras que, en presencia de casaminoácidos, su comportamiento era igual que en medio M.C. -- (Tabla 3).

El efecto del medio M.C. no se observa en el caso de la cepa sil--vestre ni cuando se usan auxótrofos para L-arginina, L-metionina, L-histidina, L-prolina (las cuales pueden por lo tanto, conservarse en me--dio M.C.).

TABLA 3

EFFECTO DE BASES, VITAMINAS Y AMINOACIDOS SOBRE
EL CRECIMIENTO DE UN AUXOTROFO DE TIROSINA DE
LA LEVADURA *Hansenula polymorpha*.

Condiciones	Crecimiento en placas a 37° ^a	
	Auxótrofo BT-1	Silvestre
MM ^b	---	+
MM + Tir ^c	+	+
M.C. ^d	---	+
M.C. + Tir	---	+
MM + Tir + Casaminoácidos	---	+
MM + Tir + Vitaminas	+	+
MM + Tir + Bases	+	+

^a Observación hecha a las 48 horas de incubación

^b Medio Mínimo adicionado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y glucosa

^c L- Tirosina

^d Medio compuesto por peptona, extracto de levadura y glucosa

Tratando de profundizar un poco más en el motivo de esta inhibición se inoculó la cepa en placas de MM-N + L-tirosina y cada uno de los 19 aminoácidos proteicos restantes, (como se explicó en Material y Métodos) usando como controles MM-N y MM-N + L-tirosina. Además, con el fin de saber si la inhibición del crecimiento de la cepa era a nivel de entrada de la tirosina, se inocularon placas de MM-P adicionadas de L-tirosina y cada uno de los 19 aminoácidos usando como controles MM-P y MM-P + L-tirosina. Este último se hizo pues existen reportes de que los iones NH_4^+ inhiben la entrada de los aminoácidos en levaduras a nivel de su permeasa para aminoácidos generalizada (16,17) . Los resultados se encuentran en la Tabla 4 y en ellos se observa que los aminoácidos L-aspártico, L-cisteína, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-metionina, L-serina y L-treonina previenen el crecimiento de la cepa BT-1 y que este efecto se ve revertido por la ausencia de iones NH_4^+ en el medio con excepción del caso de la histidina (Tabla 4).

2. Transporte de tirosina

Para saber si los aminoácidos que inhiben el crecimiento de la cepa BT-1 afectan normalmente la entrada de tirosina en la cepa silvestre, se montó una técnica de determinación del transporte de L-tirosina por un método radiactivo (descrito en Material y Métodos). Se hicieron controles para medir la eficiencia del aparato y determinar la radiactividad específica que fue de 8.8×10^6 c.p.m./ μmola .

Como puede observarse en la Figura 3, la entrada de L-tirosina ^{14}C a la célula en su fase logarítmica de crecimiento (2 a 4 horas) es una función lineal del tiempo.

Debido a que los iones NH_4^+ afectan el transporte de varios aminoácidos en levaduras (16,17) , se decidió ver si afectaba la entrada de

EFFECTO DE DIFERENTES AMINOACIDOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN
AUXOTROFO DE TIROSINA

Condiciones	Crecimiento en placas a 37° ^a	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	Prolina
MM ^b	—	—
MM + Tir ^c	+	+
MM + Tir + Alanina	+	+
MM + Tir + Arginina	+	+
MM + Tir + Aspártico	—	+
MM + Tir + Asparagina	+	+
MM + Tir + Cisteína	—	+
MM + Tir + Fenilalanina	+	+
MM + Tir + Glicina	+	+
MM + Tir + Glutámico	+	+
MM + Tir + Glutamina	+	+
MM + Tir + Histidina	—	—
MM + Tir + Isoleucina	—	+
MM + Tir + Leucina	—	+
MM + Tir + Lisina	+	+
MM + Tir + Metionina	—	+
MM + Tir + Prolina	+	+
MM + Tir + Serina	—	+
MM + Tir + Treonina	—	+
MM + Tir + Triptofano	+	+
MM + Tir + Valina	+	+

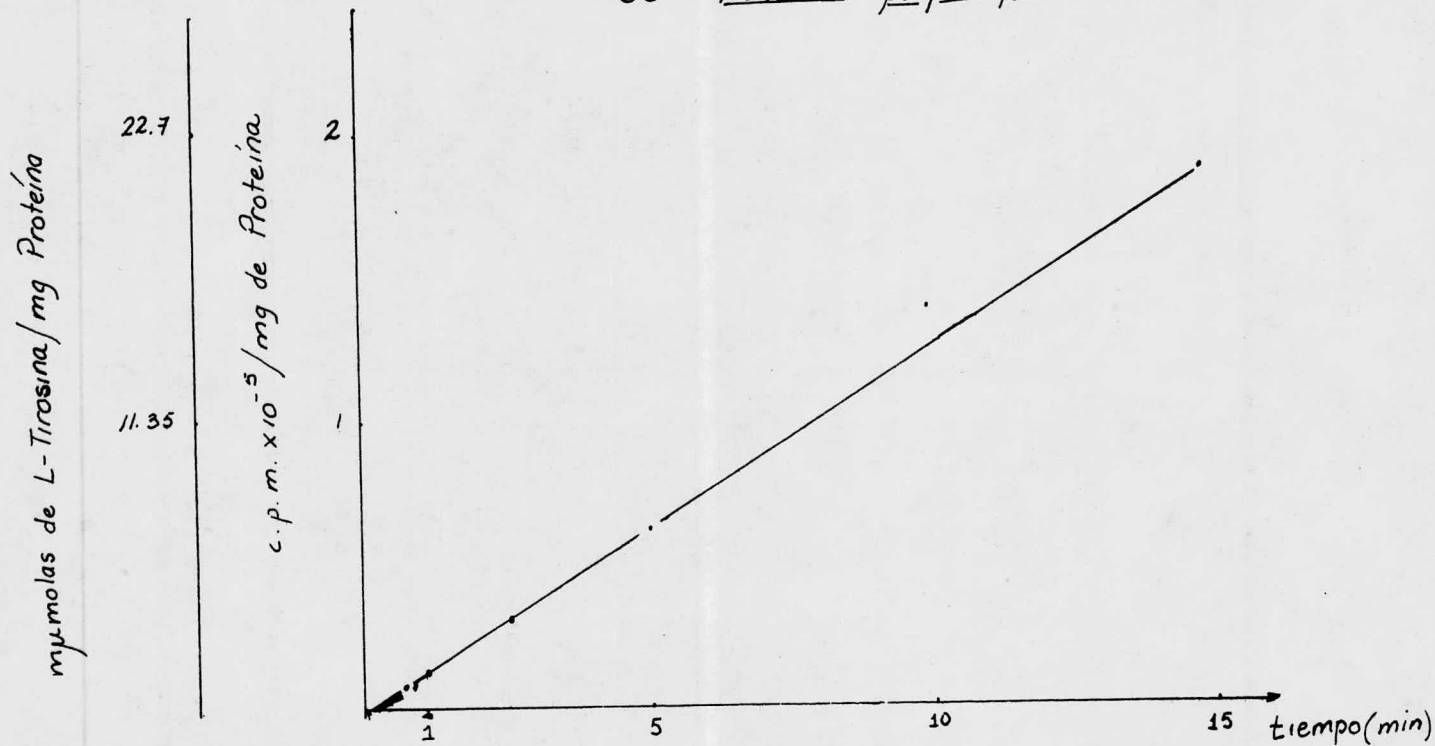
^aObservación hecha a las 48 hrs. de incubación

^bMedio mínimo adicionado de NH₄ y dextrosa

^cL- Tirosina

FIGURA 3

TRANSPORTE DE L-tirosina EN LA CEPA SILVESTRE
DE Hansenula polymorpha



Radioactividad Específica 8.8×10^6 c.p.m./ μmola
MM + Glucosa 1% + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%

L-tirosina en la cepa silvestre de Hansenula polymorpha.

En la figura 4 se observa que el transporte de L-tirosina ^{14}C aumenta hasta seis veces en ausencia de iones NH_4^+ .

Con los resultados obtenidos, se decidió probar el efecto de los aminoácidos L-histidina, L-leucina y L-metionina sobre el transporte de L-tirosina ^{14}C , así como el efecto de L-prolina, L-arginina y L-triptofano.

En la figura 5 se observa que L-prolina no inhibe el transporte de L-tirosina; que la L-histidina y L-arginina, lo inhiben un 44% mientras que L-leucina, L-metionina y L-triptofano lo inhiben de un 80 a un 90%.

Basados en estos resultados se decidió observar cómo se encuentra el transporte de L-tirosina ^{14}C en la cepa BT-1 y después el efecto de los aminoácidos que inhiben su crecimiento en medio MM-N + L-tirosina.

El primer experimento que se planteó fue el de determinar el transporte de L-tirosina con diferentes tiempos de depleción de tirosina, ya que debido a que es un auxótrofo para L-tirosina y por lo tanto se crece en medio MM-N + L-tirosina, ésta puede impedir la entrada de L-tirosina ^{14}C , al encontrarse en cierta concentración dentro de la célula. Al depletar de L-tirosina, la célula agota su poza y entonces, la nueva tirosina (tirosina ^{14}C) puede entrar libremente y podemos medir en forma óptima cualquier efecto que presenten los aminoácidos que se deseen probar.

Se hizo determinación del transporte a los 0, 30, 60 y 120 minutos de depleción de L-tirosina siguiendo el método descrito en Material y Métodos.

Los resultados de este experimento están en la Figura 6 y basados en ellos, se decidió depletar 30 minutos en MM-P.

Posteriormente, se decidió medir el efecto de los aminoácidos L-as

FIGURA 5

Transporte de L-tirosina en la cepa silvestre de H. polymorpha

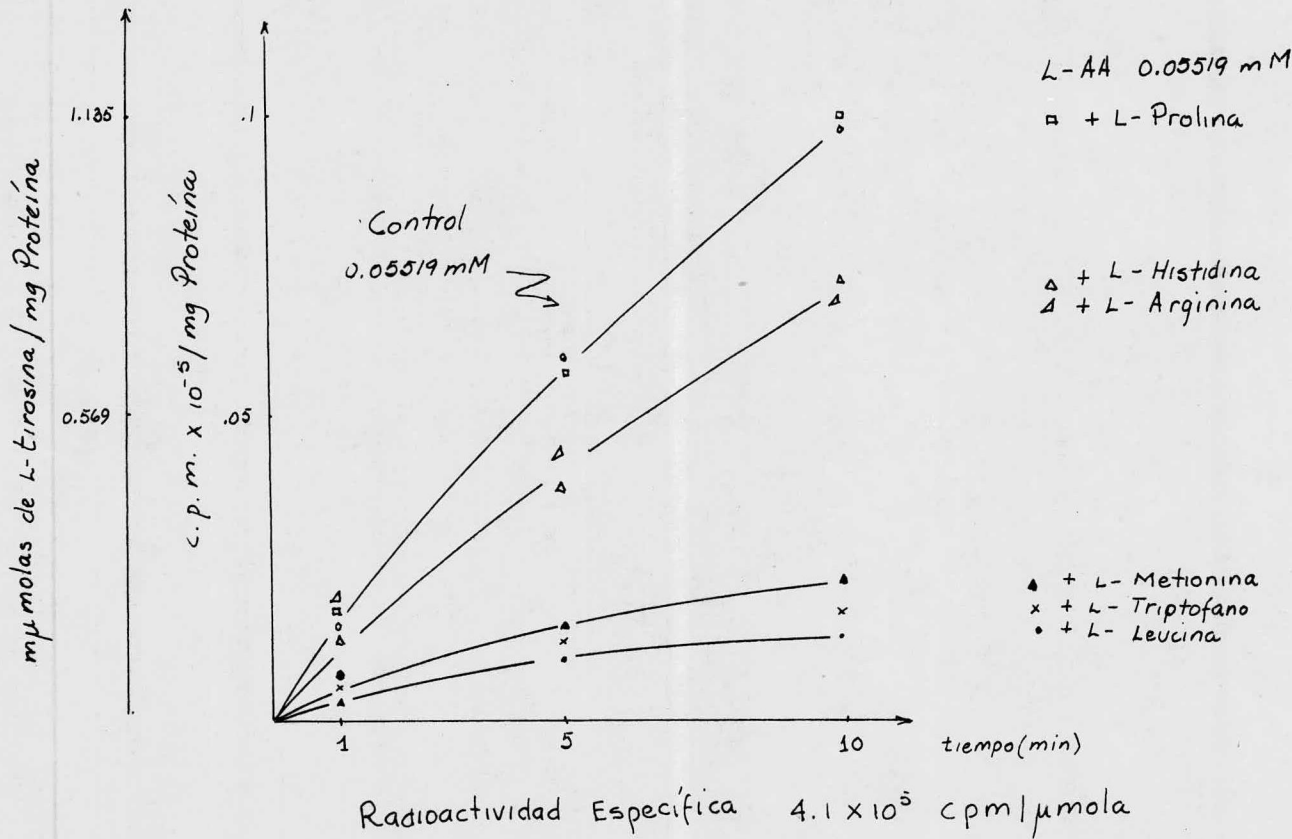


FIGURA 4

Transporte de L-tirosina en la cepa silvestre de *H. polymorpha*

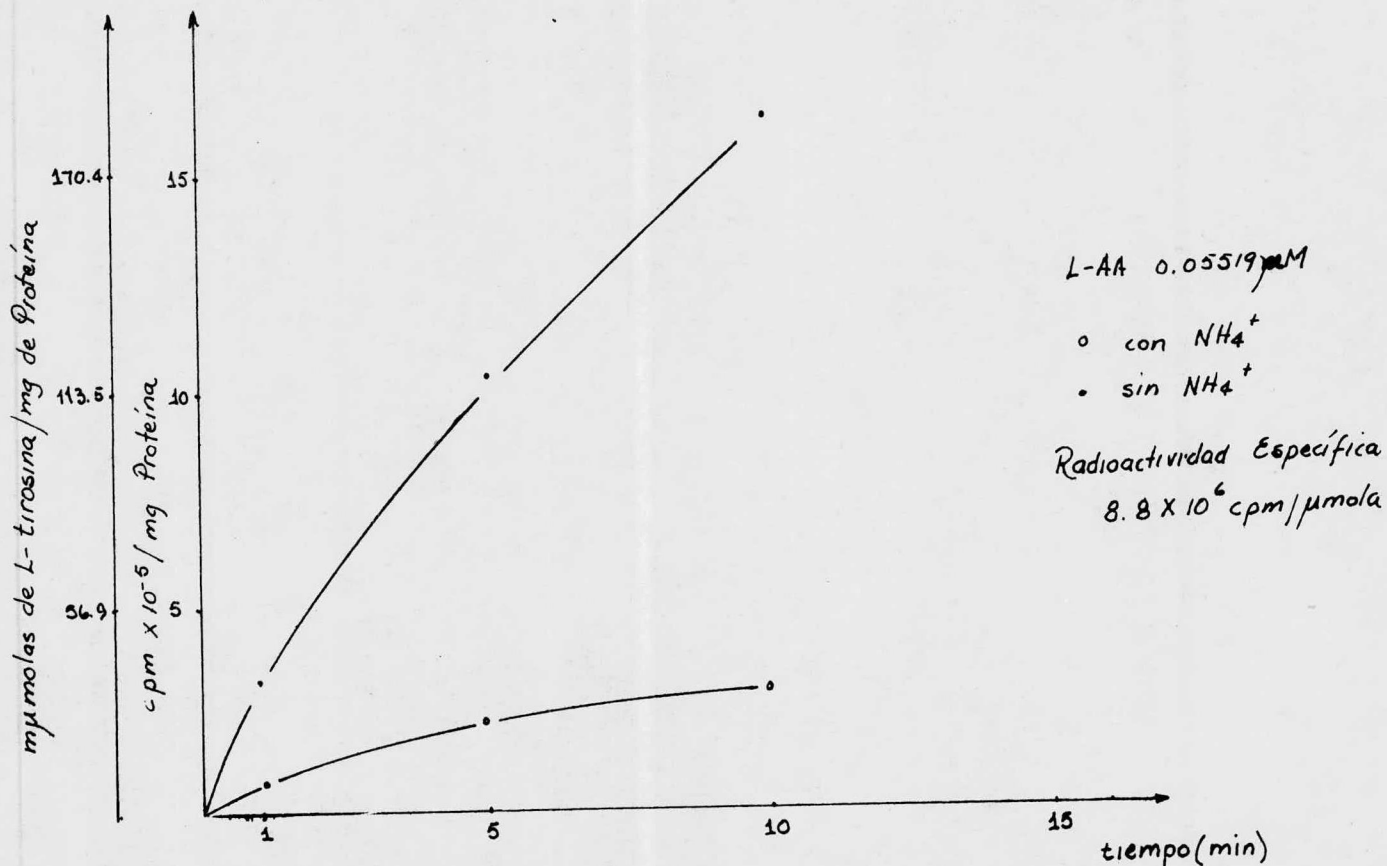
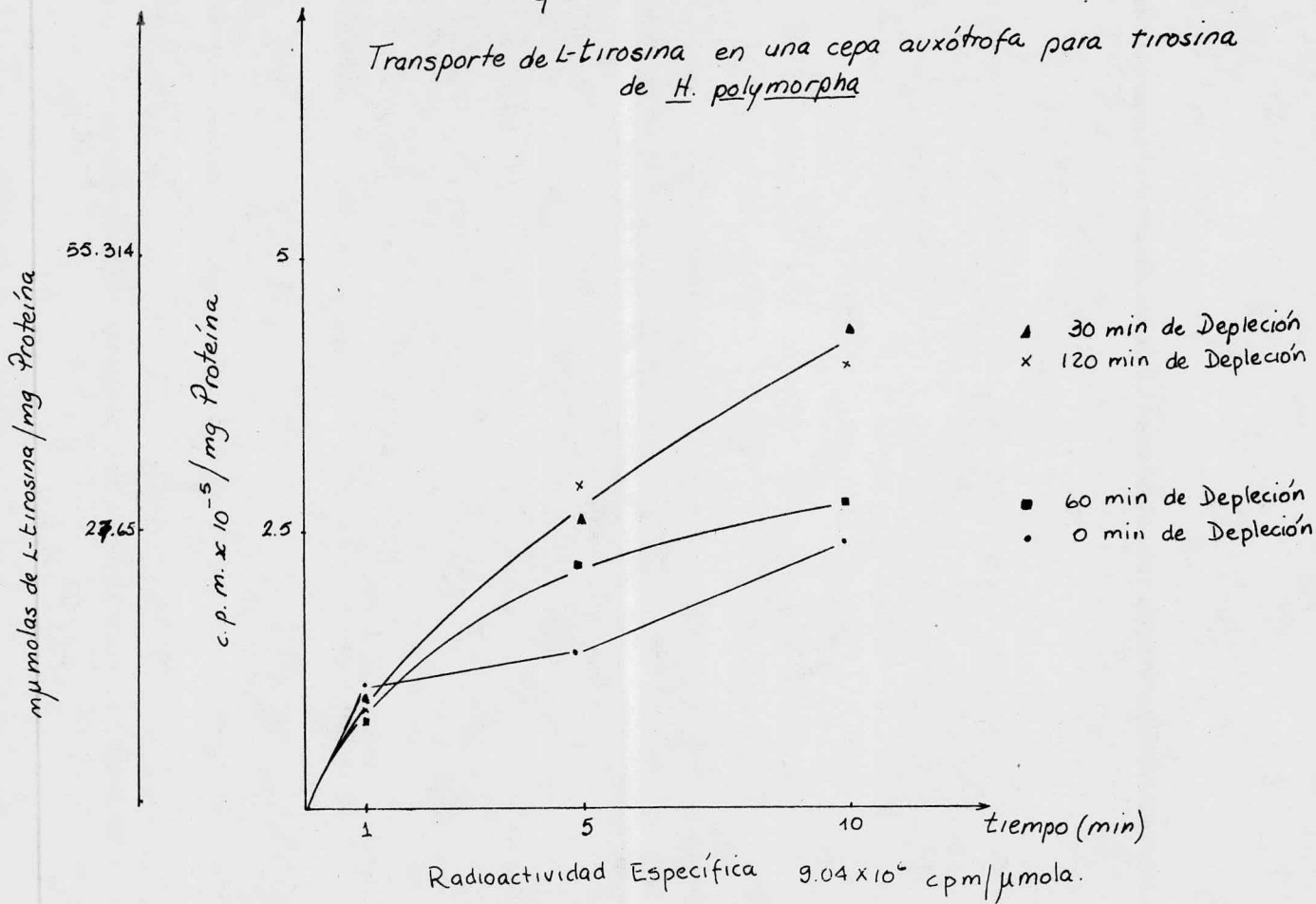


FIGURA 6

Transporte de L-Tirosina en una cepa auxótrofa para tirosina de H. polymorpha



pártico, L-cisteína, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-metionina, L-serina y L-treonina sobre el transporte de L-tirosina 14_C depletando - 30 minutos de L-tirosina.

En la figura 7 se observa que el L-aspártico inhibe un 10% el transporte de L-tirosina; que la L-metionina lo inhibe un 66%, L-leucina un -- 77% y los demás aminoácidos entre un 85 a un 95%, lo que explicaría la - inhibición del crecimiento producida por estos aminoácidos en la cepa -- BT-1.

3. Enriquecimiento de auxótrofos para fenilalanina y tirosina

Basados en el comportamiento de la cepa BT-1 en M.C. se pensó establecer un método de enriquecimiento y selección para auxótrofos de fenilalanina y tirosina, combinando el enriquecimiento por nistatina descrito por Snow (33) con el medio que inhibió selectivamente el crecimiento de la cepa BT-1 (auxótrofa para un aminoácido aromático). El esquema propuesto para el nuevo método de enriquecimiento se encuentra en la figura 8.

Previamente se determinó la concentración necesaria de nistatina para obtener el enriquecimiento óptimo de auxótrofos (Figura 9).

Los resultados de combinar el medio M.C. y el enriquecimiento con - nistatina empleando la cepa regulatoria 6 FTR se encuentran en la Tabla 5.

Como puede observarse, cuando el cultivo no se enriqueció, no se detectaron auxótrofos.

Cuando se mutagenizó y se seleccionó en medio M.C., se observó la - aparición de algunos auxótrofos para aminoácidos pero ninguno requiere - aminoácidos aromáticos. Cuando se enriqueció pero se seleccionó en medio M.C. se obtuvo un ligero enriquecimiento para auxótrofos de aminoácidos

TABLA 5

ENRIQUECIMIENTO OBTENIDO PARA AUXOTROFOS DE AMINOACIDOS
AROMATICOS CON RESPECTO A DIFERENTES CONDICIONES DE
SELECCION

Condición	Selección	No. de colonias probadas	AUXOTROFOS						Enriquecimiento para auxótrofos de aromáticos %
			No. //	%	tipo ^e				
					AA	Vit	Bas	FTT	
Control	M.C. ^a	250	0	--	--	--	--	--	0
NTG ^b	M.C.	400	10	2,5	6	0	4	0	0
NTG-MC-N ^c	M.C.	720	15	2,08	9	0	6	2	0,278
NTG-MC-N	M-FTT	360	16	4,45	16	0	0	16	4,45

^aCorresponde a un medio sólido formado por peptona, extracto de levadura y glucosa

^bN-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

^cCélulas mutagenizadas, crecidas en M.C. líquido y enriquecidas con nistatina.

^dCorresponde a un medio mínimo sólido adicionado de Fenilalanina, Tirosina y Triptofano.

^eAA = aminoácidos, Vit = vitaminas; Bas = bases; FTT = fenilalanina, tirosina y triptofano.

FIGURA 7

Transporte de L-tirosina en una cepa auxótrofa para tirosina de *H. polymorpha*

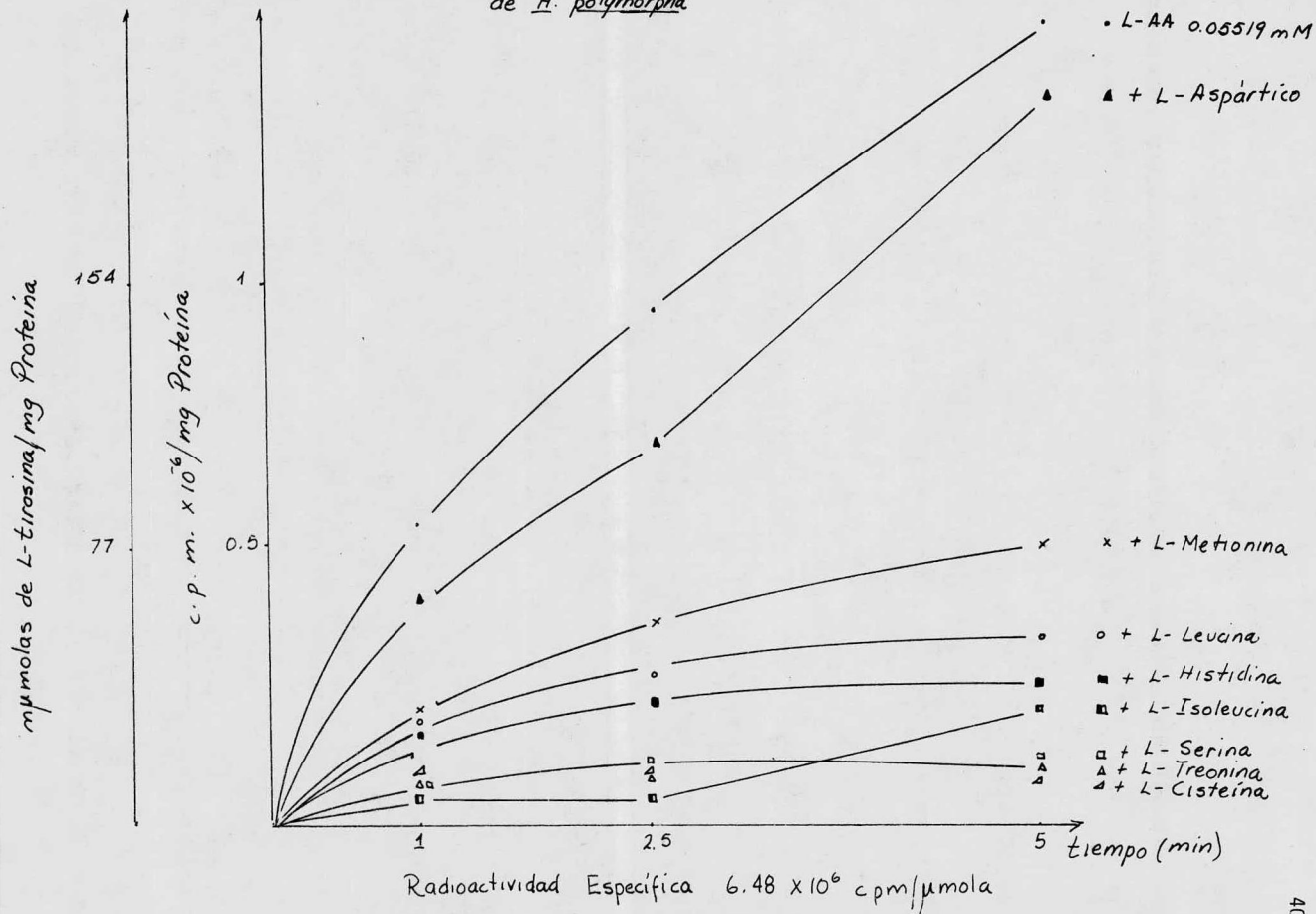
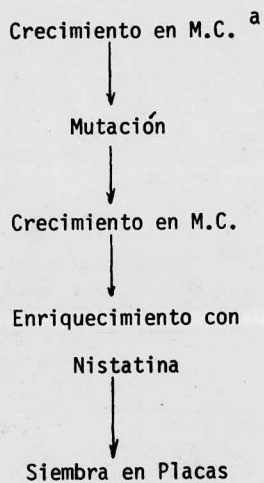
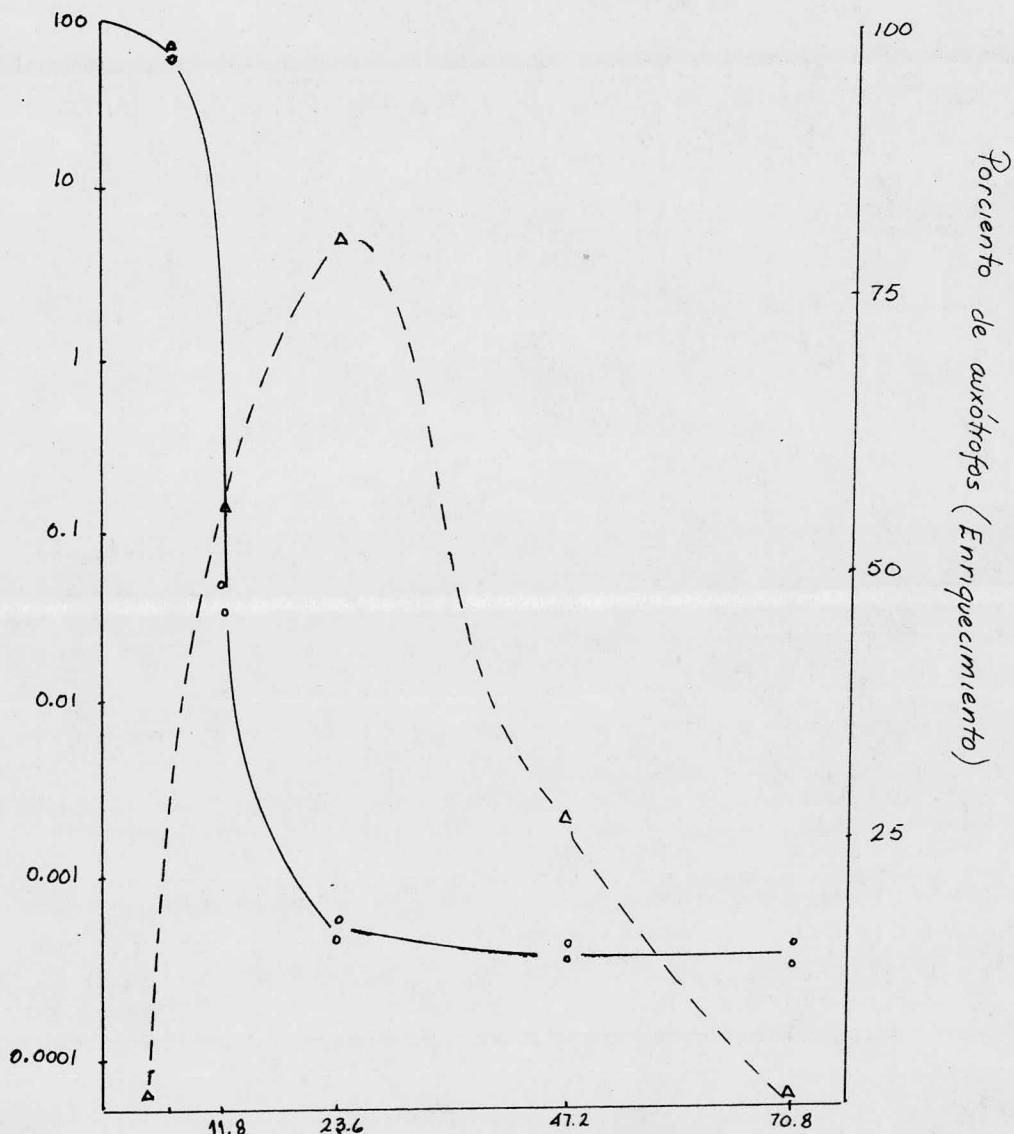


FIGURA 8

ESQUEMA PROPUESTO DE MUTACION, ENRIQUECIMIENTO Y SELECCION

^aMedio líquido compuesto por peptona, extracto de levadura y glucosa.

FIGURA 9



Concentraciones de Nistatina (Unidades USP/ml)
 Efecto de diferentes concentraciones de Nistatina en la viabilidad de la cepa 6-FTR (o) y en el enriquecimiento de mutantes auxotróficas (Δ)

aromáticos, mientras que, si las células enriquecidas (mutagenizadas, crecidas en medio M.C. y tratadas con nistatina) se sembraban en placas de medio MM-N adicionado de L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptofano, se obtenía un aumento de casi 20 veces en el porcentaje de auxótrofos para aminoácidos aromáticos.

Se procedió entonces a hacer la caracterización fenotípica de estos nuevos auxótrofos y se encontraron los resultados de la Tabla 6, en la cual es importante notar que el 75% de estos auxótrofos requieren tirosina para crecer y el resto son dobles auxótrofos para fenilalanina y tirosina.

La producción de L-triptofano en estas cepas no se determinó, pero experimentos simultáneos han demostrado que dobles auxótrofos (cepa 5) para fenilalanina y tirosina derivados de la cepa 6 FTR producen el doble de triptofano que su cepa padre y son capaces de excretarlo al medio de cultivo (M.E. Flores y S. Sánchez. Artículo en preparación).

FENOTIPOS OBTENIDOS EN LOS AUXOTROFOS AISLADOS
PARA AMINOACIDOS AROMATICOS^a

Crecimiento ^b								Cepa	% de Aromáticos
MM	Fa	Trip	Tir	Fa,Tir	Fa,Trip	FTT	MC		
--	--	--	+	+	--	+	--	Tir ⁻	75
--	--	--	--	+	--	+	<u>+</u>	Fa ⁻ , Tir ⁻	25

^aObservación hecha a las 48 horas de incubación a 37°C

^bMM= medio mínimo; Fa= fenilalanina; Tir= tirosina; Trip= triptofano

FTT= Fenilalanina,tirosina y triptofano; MC= medio compuesto por peptona,glucosa y extracto de levadura.

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

Durante el presente trabajo se demuestra que es posible obtener un método de aislamiento selectivo para auxótrofos de aminoácidos aromáticos, específicamente para tirosina en la levadura Hansenula polymorpha, mediante la combinación del enriquecimiento con nistatina con un medio capaz de inhibir específicamente su crecimiento.

Esta inhibición es producida por la acción de los aminoácidos L-aspartico, L-cisteína, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-metionina, L-serina y L-treonina como se probó durante el desarrollo de esta tesis. Esta inhibición podía deberse a dos causas:

1. Que estos aminoácidos inhibieran la entrada de L-tirosina a la célula (competencia por alguna permeasa).
2. Que tuvieran un efecto regulatorio sobre alguna vía de biosíntesis de los mismos aminoácidos aromáticos, porque las enzimas de la vía sean sensibles a regulación por estos metabolitos.

Efectos similares han sido reportados por Grenson y otros investigadores (6, 13, 14, 15, 32) a nivel de transporte y Guerzoni, Carsio-tis, etc., a nivel regulatorio (4, 18).

Aparentemente todos los aminoácidos inhibidores del crecimiento -- tienen un efecto a nivel de transporte, aunque la histidina también pudiera tener un efecto regulatorio, ya que posee un precursor común con la biosíntesis de L-triptofano y de bases púricas (5 fosforibosilpirofosfato) y cuya desviación hacia una de estas vías está regulada por -- la concentración del producto final de las vías relacionadas (17, 26, 38).

El mecanismo por el que se regula una vía metabólica por un metabolito que pertenece a otra vía distinta se conoce como Regulación entre Vías (Cross Pathway Regulation o Metabolic Interlock). (4).

Las ventajas que este nuevo método de enriquecimiento selectivo -- ofrece sobre el método tradicional de enriquecimiento (6, 33), en el cual es necesaria una depleción de nitrógeno previa al enriquecimiento con nistatina se muestran en la Tabla 7. Como es posible observar, hay una reducción del tiempo invertido de casi 5 veces para la obtención de los auxótrofos deseados, lo cual reduce la posibilidad de contaminaciones por otros microorganismos; además el enriquecimiento obtenido es -- considerablemente mayor (111 veces con este método).

Finalmente, de estos resultados puede esperarse que este tipo de -- procesos sirva para obtener cualquier clase de mutantes auxotróficas, -- únicamente buscando los inhibidores específicos del crecimiento de las mutantes deseadas, los que no afecten al resto de la población celular. Por ejemplo, la inhibición específica producida por citrulina en el crecimiento de auxótrofos de L-prolina en Neurospora crassa cuando se crece en arginina (30), podría permitir el enriquecimiento de auxótrofos de prolina combinando el tratamiento por nistatina con un medio de crecimiento que contenga L-citrulina + L-arginina.

TABLA 7

ESQUEMAS DE MUTACION, ENRIQUECIMIENTO Y SELECCION EN FUNCION DEL TIEMPO
QUE REQUIEREN PARA REALIZARSE

<u>ESQUEMA I</u>	Tiempo (hrs)	<u>ESQUEMA II</u>	Tiempo (hrs)
Crecimiento en M.C. ^a	20	Crecimiento en M.C.	20
↓ Mutación		↓ Mutación	
Crecimiento en M-FTT ^b	96	↓	
↓ Depleción de nitrógeno	25	Crecimiento en M.C.	18
↓ Crecimiento en MM + NH ₄	12	↓	
↓ Tratamiento con Nistatina		Tratamiento con Nistatina	
↓ Siembra en placas de M-FTT		↓ Siembra en placas de M-FTT	
	Total 153 Hrs.		Total 38 Hrs.
2 auxótrofos para aromáticos de 500 células estudiadas		16 auxótrofos para aromáticos de 360 células estudiadas	

a: medio líquido compuesto por peptona, extracto de levadura y glucosa

b: medio mínimo adicionado de NH₄, Fenilalanina, Triptofano y Tirosina

BIBLIOGRAFIA

1. Alexopoulos C.J.
"Introductory Mycology" 2nd. Edition. John Wiley & Sons
Inc. New York 1962, 245-254.
2. Anderson S.V., C.M. Berg y J.J. Rossi
"An Inexpensive Membrane Filtration Manifold"
Ann. Biochem. 69, 655-656 (1976).
3. Bal, J., E. Balbin & N.J. Piemazek.
"Method for Isolating Auxotrophic Mutants in
Aspergillus nidulans". J. Gen. Microbiol. 84, 111-116 (1971).
4. Carsiotis M., P. Jones & A. Wesseling.
"Cross Pathway Regulation: Histidine-mediated control of Histidine,
Tryptophan and Arginine Biosynthetic Enzymes in N. crassa".
119, 893-898. (1974).
5. Cook K.A.
"Regulation of Aromatic Metabolism in Fungi: Selection of Mutants of
the Yeast Rhodotorula mucilaginosa with nystatin".
J. Gen. Microbiol. 85, 29-36 (1974).
6. Crabeel M. & M. Grenson
"Regulation of Histidine uptake by specific feedback inhibitions of
two histidine permeases in S. cerevisiae"
Eur. J. Biochem. 14, 197-204 (1970).
7. Cook A.H.
"The Chemistry and Biology of Yeast" Edited by A.H.
Cook. Academic Press Inc. pág. 37-38 (1958).
8. Davis B.D.
"Isolation of biochemically deficient mutants bacteria with
penicillin". J. Amer. Chem. Soc. 70, 4267-4271 (1948).
9. Demain A.L.
"Microbial Production of Food Aditives"
Symp. Soc Gen. Microbiol. XXI, (1971).
10. Ditchburn P., & K.D. Mac Donald.
"The differential effects of nystatin on growth of auxotrophic and
prototropic strains of Aspergillus nidulans".
J. Gen. Microbiol. 67, 299-306 (1971).

11. Drake, J.W.
"The Molecular Basis of Mutation"
Sn Francisco Holden-Day, pág. 27, (1970).
12. Fink G.R.
"The biochemical genetics of Yeast"
Methods in Enzymol. XVII, parte A, 59-78 (1970).
13. Gits J.J., M. Grenson.
"Multiplicity of the amino acid permeases in Saccharomyces cerevisiae: III. Evidence for a specific methionine-transporting system" Biochim & Biophys. Acta 135, 507-516 (1967).
14. Grenson M., M. Mousset, J.W. Wiame & J. Bechet.
"Multiplicity of the amino acid permeases in S. cerevisiae I. Evidence for a specific arginine-transporting system"
Bioch. & Biophys. Acta 127, 325-338 (1966).
15. Grenson M.
"Multiplicity of the amino acid permeases in S. cerevisiae II. Evidence for a specific lysine-transporting system"
Bioch. & Biophys. Acta 127, 339-346 (1966).
16. Grenson M., C. Hou & M. Crabeel.
"Multiplicity of the amino acid permeases in S. cerevisiae IV. Evidence for a general amino acid permease". J. Bacteriol. 103, 770-777 (1970).
17. Grenson M., C. Hou.
"Ammonia inhibition of the general amino acid permease and its suppression in NADP specific glutamate dehydrogenase less mutants of S. cerevisiae". Bioch. & Biophys Res. Comm. 48, 749-756 (1972).
18. Guerzoni E.
"Physiological and Enzymatic Aspects of Histidine mediated control of the Tryptophan Pathway". Arch. Mikrobiol. 86, 57-68 (1972).
19. Hagino H. & K. Nakayama
"L- Tyrosine Production by analog. resistant mutants derived from a Phenylalanine auxotroph of Corynebacterium glutamicum".
Agr. Biol. Chem. 37, 2013-2023 (1973).
20. Hagino H. & K Nakayama.
"The biosynthetic control in aromatic amino acids producing mutants of C. glutamicum". Agr. Biol Chem. 39, 351-361, (1975).

21. Jnanendra K. Bhattacharjee.
"Micoorganisms as potential sources of Food"
Adv. in Appl. Microbiol. Academic Press Inc, New Yor
139-161 (1970).
22. Kinsky, S.C., S.A. Luse & L.L.M. Van Deenen.
"Interactions of polyene antibiotics with natural and
artificial membrane systems". Fed. Proc. 25, 1500-1510.
(1966).
23. Lampen J.O., P.M. Arrow, Z. Borowska & L. Laskin.
"Location and role of sterol at nystatin binding sites"
J. Bacteriol. 84, 1152-1160 (1962).
24. Legator M.S.
"Chemical Mutagens"
Ann. Rev. of Medicine 23, 4130428 (1972).
25. Levine D.W. & C.L. Cooney
"Isolation and characterization of a thermotolerant-methanol-
utilizing yeast". Appl. Microbiol. 26, 982-990 (1973).
26. Lingens E., W. Goebel & H. Uessler
"Regulation der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren in
S. cerevisiae". J. Biochem. 1, 363-374 (1967).
27. Lowry O.H., N.J. Rosebrough., A.L. Farr & R.J. Randall
"Protein measure with the Folin phenol reagent" J. Biol.
Chem. 193, 265-275 (1951).
28. Lucas-Lenard J., F. Lipmann.
"Protein Biosynthesis"
Ann. Review of Biochem. (1971).
29. Mac Donald, K.D.
"The selection of auxotrophs of *Penicillium chrysogenum*
with nystatin". Genet. Res. 11, 327-330 (1968).
30. Moat A.G., N. Peters, Juan & A.M. Srb.
"Selection and Isolation of auxotrophic yeast mutants
with the aid of antibiotics", J. Bacteriol. 7, 673-677 (1959).
31. Mora J., R. Salceda and S. Sánchez.
"Regulation of arginase activity by intermediates of the
arginine biosynthetic pathway in *N. crassa*". J. Bacteriol.
110, 870-877 (1972).

32. Sánchez S., L. Martínez, J. Mora.
"Interactions between amino acid transport systems" in N. crassa". J. Bacteriol. 112, 276-284 (1972).
33. Snow R.
"An enrichment method for auxotrophic mutants using the antibiotic nystatin". Nature, London 211, 206-207 (1966).
34. Tietz N.W.
"Química Clínica Moderna"
Nueva Editorial Interamericana. 1ª. Edición (1972), 193-194.
35. Thouvenot, D.R. & C.M. Bourgeois
"Optimisation de la selection de mutants de Saccharomyces cerevisiae par la nystatine". Ann. de l'institut Pasteur 120, 617-629.
36. Wickerham, L.J.
"Hansenula polymorpha de Morais et Maia".
The Yeasts. A taxonomic study. pág: 296-299.
37. Wills C. & J. Phelps.
"A technique for the isolation of yeast alcohol dehydrogenase mutants with altered substrate specificity" Arch. Biochem Biophys. 167, 627-637 (1975).
38. Wyngaarden J.B. & D.M. Ashton.
"The regulation of phosphoribosyl pyrophosphate amido transferase by purine ribonucleotides: a potential feedback control of purine biosynthesis" J. Biol. Chem. 234, 1492-1496 (1959).
39. Yamada K., S. Kinoshita et al.
"The microbial production of aminoacids".
Kodensha Ltd. Tokyo (1972).
40. Young J.D., J.W. Gorman, J.A. Gorman & R.M. Bock.
"Indirect selection for auxotrophic mutants of S. cerevisiae using the antibiotic netropsin". Mut. Res. 35, 423-428 (1976).

**ESTE TRABAJO SE IMPRIMIO EN LOS TALLERES
DE GUADARRAMA IMPRESORES, S. A. AVENIDA
CUAUHTEMOC 1201, COL. VERTIZ NARVARTE
MEXICO 13, D. F., TEL. 559-22-77 CONTRES LINEAS.**