



14661
1
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

FALLA DE ORIGEN

Obtención de mutantes hiperproductoras de
L-triptofano, de *Escherichia coli* Q-358 y
Brevibacterium flavum, y su caracterización parcial.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(AREA: MICROBIOLOGIA)**

P R E S E N T A :

Q.F.B. DELFINO GODINEZ VARGAS

**DIRECTORA: Dra. GUADALUPE MIREYA DE LA GARZA AMAYA
COTUTORA: Dra. MARIA TERESA PONCE NOYOLA**

1995



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

El presente trabajo fue desarrollado en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya, en cotutoría con la Dra. María Teresa Ponce Noyola, del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del mismo Centro.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra Mireya de la Garza, por sus doctos consejos, hospitalidad y amistad.

A la Dra Ma Teresa Ponce Noyola por su orientación y ayuda.

Al Dr Roberto Cervantes O., por su valiosa ayuda, sus consejos y orientación.

Al Dr Jaime Alvarez de la Cuadra por algunas cepas y lo más importante su amistad.

Ningún grupo de palabras o calificativo es suficiente para mencionar el agradecimiento que debo a cada uno de mis compañeros del laboratorio 52 del Departamento de Biología Celular:

CLAUDIA Ma GARCIA C.

MAGDA E. REYES L.

SILVIA TENORIO

BLANCA E. OLGUIN.

J. JESUS SERRANO L.

VICTOR R. TENORIO G.

ERASMO NEGRETE A.

J. ESTEBAN MOLINA A.

JOSE D. VILLALBA M.

quienes de múltiples formas y acciones colaboraron al desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIAS.

A MIS PADRES:

Macedonio Godínez Rodríguez

Belem Vargas Escalona

A Vicky.

También dedico este trabajo a todos mis amigos y a todos los que en forma directa o indirecta me han apoyado a continuar en esta actividad.

Haré historia de algunos de los nombres de las gentes que me han acompañado en esta etapa de mi vida y que en mayor o menor medida me ayudaron a llegar hasta aquí. Algunas de estas personas ni siquiera se enterarán de que las recuerdo y otras, que tal vez se busquen aquí no se encontrarán y tal vez se sientan ofendidas pero a ellas les aseguro que no es por mala fe, es sólo mala memoria.

Carmen Izquierdo R.
Ma de Lourdes Ontiveros C.
Ma Luisa Anguiano E.
Carolina Moreno
Patricia Miranda C.
Susana Mendoza E.
Virginia Lara S.
Clara I. Alvarez M.
Enrique Salas T.
Andrés Romero R.
Nacho.
Felipe García H.
Arturo Hernandez O.
Jaime Alvarez de la Cuadra J.
Gerardo Vera
Victor R tenorio G.

INDICE.

	pag.
Resumen	i
Abreviaturas.	ii
1.- INTRODUCCION	1
1.0 Utilización de los microorganismos en procesos industriales.	1
1.1 Importancia del triptofano.	2
1.2 Utilización de mutantes.	3
1.3 Mutantes auxotróficas.	4
1.4 Mutantes regulatorias.	5
1.5 Mutantes de permeabilidad.	6
1.6 Mecanismos que salvaguardan la economía celular.	7
1.7 Vía común de los aminoácidos aromáticos.	14
1.8 Producción de triptofano por microorganismos.	19
2.- OBJETIVOS.	21
3.- MATERIALES Y METODOS.	22
3.1 Cepas y origen de los reactivos.	22
3.2 Medios de cultivo.	23
3.3 Cinética de crecimiento de las cepas de <i>Escherichia coli</i> Q-358 y Q-358-B057.	24
3.4 Cinética de crecimiento vs producción, concentración de azúcar, pH, y absorbancia.	25

3.5	Cinética de crecimiento para la cepa de <i>Brevibacterium flavum</i> 21475.	26
3.6	Obtención de mutantes regulatorias resistentes a 5-metiltriptofano, de las cepas de <i>E. coli</i> Q358-B057 y Q358-B056.	25
3.7	Obtención de mutantes de <i>Brevibacterium flavum</i> auxótrofas a tirosina.	27
3.8	Obtención de mutantes de <i>Brevibacterium flavum</i> 21475 resistentes a 5-metiltriptofano.	28
3.9	Obtención de mutantes de <i>Brevibacterium flavum</i> resistentes a 5-fluorotriptofano y sulfaguanidina.	29
3.10	Determinación de triptofano.	29
3.11	Determinación de azúcar.	
3.12	Determinación de DAHP sintetasa a las cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Brevibacterium flavum</i> .	30
4.-	RESULTADOS.	32
4.1	Cinéticas de crecimiento y pruebas de sensibilidad al análogo 5-MT de las cepas parentales Q-358 y Q-358-B057.	32
4.2	Cinéticas de crecimiento vs producción, de las cepas Q-358, Q358-B057, Q358-B056 y QD-01.	38
4.3	Cinética de crecimiento y obtención de mutantes auxotróficas a tirosina.	40
4.4	Determinación de la enzima DAHP sintetasa en extractos crudos de las cepas de <i>E. coli</i> y <i>B. flavum</i> .	43
5.-	DISCUSION DE RESULTADOS.	46
6.-	CONCLUSIONES.	53
7.-	BIBLIOGRAFIA.	55

RESUMEN.

La demanda de aminoácidos esenciales como triptofano, se abastecía anteriormente por medio de hidrolizados proteicos, a partir de productos ricos en esos componentes como la soya y el trigo.

En la actualidad su demanda se ha incrementado, por lo que es necesario contar con triptofano en forma pura, ya que es un componente esencial en soluciones de transfusión y alimentaciones parenterales.

El presente trabajo reporta la obtención de una cepa mutante de *Brevibacterium flavum* DV-126, que en medio mínimo mineral es capaz de producir 4.8 g/l de triptofano. Esta cepa fue obtenida por mutaciones con nitrosoguanidina, mostrando auxotrofia a tirosina y resistencia 5-metiltriptofano y 5-fluorotriptofano con sulfaguanidina.

También se reportan mutantes de *Escherichia coli* doblemente auxótrofas (tirosina y fenilalanina) y se obtuvieron auxótrofas simples a fenilalanina en la cepa Q-358, que también sobreproducen triptofano.

Cuando se obtienen mutantes regulatorias a análogos de triptofano, activan un sistema degradador. No obstante que sobreproducen más triptofano que la cepa parental su producción no se compara con la cepa DV-126.

LISTA DE ABREVIATURAS.

DAHP = 3-Desoxi-D-arabino-heptuloseonato-7-fosfato.

InGPs= Indol glicerol fosfato sintetasa.

5-FT=5-fluorotriptofano.

5-MT= 5-metilriptofano.

NTG= N-metil-N'nitro-N-nitrosoguanidina.

SG= Sulfaguanidina.

5-MT^r= Resistente a 5-metilriptofano.

5FT^r= Resistente a 5-fluorotriptofano.

5FT^rSG^r= Resistente a 5-fluorotriptofano y resistente a sulfaguanidina.

NAD= Nicotin adenín dinucleótido.

Met⁻= Requiere metionina para crecer.

Tyr R= Gen regulador de tirosina.

Trp R= Gen regulador de triptofano.

Tyr⁻= Requiere tirosina para crecer.

Phe⁻Tyr⁻= Requiere fenilalanina y tirosina para crecer.

umol= micromol.

1. - INTRODUCCION

1.0.-Utilización de los microorganismos en procesos industriales.

La utilización de células de microorganismos, plantas y animales, para la obtención de productos benéficos para el hombre, se llama **BIOTECNOLOGIA**. En la actualidad, una gran cantidad de compuestos orgánicos utilizados en farmacología y en la industria alimentaria, derivan de procesos biológicos bajo control industrial, en los que intervienen microorganismos (1, 7, 27).

Después de la Segunda Guerra Mundial empezó a desarrollarse la microbiología industrial. Por esos años, se aislaron cepas sobreproductoras de ácido glutámico por un método fermentativo (1). Más tarde, se describió la acumulación de aminoácidos en algunos cultivos de *Escherichia coli* (2).

Con el reporte de cepas de alta productividad de ácido glutámico, en medios de cultivo que contenían sales de amonio y carbohidratos como fuente de carbono, se estableció la primera industria de fermentaciones. Posteriormente se describieron mutantes de *Escherichia coli* resistentes a fenilalanina, que excretaban fenilalanina y tirosina en el medio de cultivo, donde se le hacía crecer bajo condiciones mínimas de nutrientes. En los últimos años ha aparecido una gran cantidad de comunicaciones

acerca de la obtención de aminoácidos por medio de microorganismos, a los que de alguna manera tienen alterada la maquinaria enzimática que regula su producción y su síntesis ya no está sujeta a los mecanismos de control biosintético.

1.1 Importancia del triptofano.

El triptofano fue descrito en 1902 por Hopkins y Cole, siendo el primer aminoácido al que se denominó esencial para la nutrición animal y humana (51). *In vivo* el D-triptofano es parcialmente convertido a L-triptofano por medio de una racemasa y su valor nutricional es mucho más bajo que la forma L (29). Es ampliamente usado como componente importante de soluciones de transfusión, en alimentaciones parenterales y además por ser un nutriente primordial para animales y seres humanos (28).

Varios vegetales comestibles como maíz y sorgo son deficientes en triptofano. En México, existe una gran demanda del aminoácido como componente nutricional, teniendo el inconveniente de que se tiene que importar, a un precio de 70 dls por Kg; la demanda mundial es de 2000 toneladas por año (8).

La obtención de triptofano se realiza por varios procesos entre los que destacan:

i) Obtención por síntesis química: por esta vía se generan buenos rendimientos, pero tiene la desventaja de que se desperdicia un 50 % pues en la reacción se forma una mezcla racémica, D y L-triptofano, de donde sólo el isómero L es utilizado.

ii) Obtención por vía microbiana: por medio de esta técnica no se producen rendimientos equiparables a los alcanzados por síntesis química, pero sí se extrae exclusivamente la forma L, que es la utilizada por el hombre y animales. Por este camino existen varias vías, entre las que se encuentran: a) La conversión de precursores como indol, o ácido antranílico en L-triptofano utilizando los microorganismos tal cual (bacterias u hongos), o bien una preparación enzimática de ellos; el factor limitante de este proceso es la disponibilidad de los intermediarios (30). b) Por fermentación directa, que implica la producción de L-triptofano a partir de fuentes de carbono y nitrógeno, que utilizan los microorganismos para su metabolismo (4, 5). Este proceso ofrece las ventajas de que, al igual que la metodología anterior, sólo se produce la forma L; los sustratos son baratos y su disponibilidad esta asegurada, dado que como fuentes de carbono, pueden explotarse desperdicios de la industria azucarera como melazas, o bien, pueden utilizarse compuestos hidrocarbonados derivados del petróleo y como fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas de amonio y en algunos casos urea.

1.2 Utilización de mutantes.

Las mutantes microbianas han probado ser muy importantes para la producción de aminoácidos, por procesos fermentativos. Se han hecho considerables esfuerzos para mejorar la productividad de los microorganismos utilizados en la producción de aminoácidos,

mediante la inducción de varias clases de mutantes que tienen ciertas características fenotípicas importantes (50). En particular, las mutantes auxotróficas y regulatorias, en donde los mecanismos de regulación que controlan la biosíntesis de aminoácidos son alterados (2, 3, 13).

1.2.1 Mutantes auxotróficas.

Una de las estrategias para la obtención de mutantes hiperproductoras de aminoácidos, es el aislamiento de cepas auxotróficas para algún compuesto biosintéticamente relacionado con el aminoácido de interés (49). Este razonamiento es útil para la producción de aminoácidos, ya que algunos de ellos forman parte de familias con tronco biosintético común; tal es el caso de los aminoácidos aromáticos y los de la familia del ácido aspártico (52, 20).

Este mecanismo tiene su fundamento en que al bloquear una de las ramificaciones de la vía, el flujo de materia prima va hacia una de las ramificaciones alternas que no esté bloqueada. Esto es, que al obtener auxotrofia para un aminoácido, el flujo de materia se canalizará a la producción de aquellos compuestos de la misma familia, cuya síntesis no ha sido bloqueada.

Por lo tanto, la ausencia del producto no sintetizado deja de representar un factor de inhibición para la síntesis de los demás productos (53). Por ejemplo, las mutantes auxotróficas de tirosina excretan fenilalanina; al igual que las auxótroficas a ambos

aminoácidos que sobreproducen triptofano (36, 37).

La cantidad que se agrega del requerimiento auxotrófico es importante, dado que sólo se debe agregar la cantidad adecuada para soportar el crecimiento bacteriano. Se ha visto que si se adiciona una mayor cantidad, se puede revertir el efecto provocado con la auxotrofia, evitando con ello la sobreproducción del aminoácido de interés.

1.2.2 Mutantes regulatorias.

La obtención de mutantes hiperproductoras en bacterias se consigue también modificando los sitios regulatorios de las enzimas o los del DNA (sitio operador, atenuador o el gen regulador). Esto se realiza mediante el uso de sustancias análogas al producto final de la vía, las que resultan ser tóxicas para el microorganismo, dado que al ser muy semejantes al producto final, son utilizadas en lugar de éste, dando como resultado proteínas defectuosas que no son funcionales (42, 43). Los análogos tienen como finalidad bloquear los sitios regulatorios de las enzimas o mantener la represión de la síntesis de las enzimas de la vía (8). Las mutantes resistentes a esos análogos tienen modificado el sitio alostérico de la enzima o los sitios regulatorios de la síntesis de enzimas de la vía, de tal manera que no reconocen al análogo, pero tampoco al producto final, evitando con ello la inhibición o represión y provocando que el flujo de materia se oriente hacia la producción del metabolito de interés.

1.2.3 Mutantes de permeabilidad.

Frecuentemente el paso limitante en la producción de aminoácidos no es la biosíntesis en sí, sino la excreción del producto.

Este problema se ha resuelto obteniendo cepas con permeabilidad aumentada. Esto se logra alterando la membrana celular, agregando antibióticos o algún surfactante que actúen a ese nivel. Por ejemplo la penicilina, evita que se sintetice la pared celular adecuadamente y provoca que sea más permeable al paso de solutos.

Así mismo, se ha reportado que bacterias productoras de ácido glutámico excretan cantidades importantes de aminoácidos en el medio de cultivo, cuando estas bacterias son cultivadas en bajas concentraciones de biotina y a concentraciones altas de biotina se detiene la excreción de glutámico; dado que la biotina es importante para la síntesis de ácidos grasos de la membrana celular, al crecer en bajas concentraciones de esta vitamina no hay una buena estructuración, por lo que presenta una mayor permeabilidad al paso de solutos (49).

1.3 Mecanismos que salvaguardan la economía celular.

Los mecanismos de regulación juegan un papel muy importante en la economía celular, ya que evitan el gasto excesivo de materia prima, enzimas y energía. De esos mecanismos, tres resultan ser los más importantes en la regulación.

- 1.- La regulación a nivel enzimática o alostérica.
- 2.- La regulación de síntesis de las enzimas involucradas en la producción de metabolitos.
- 3.- La regulación por atenuación, que involucra a secuencias de terminación independientes del factor Rho.

El primer caso se da cuando la primera enzima involucrada en la vía es una enzima compleja y cuenta, además del sitio activo, con un sitio alostérico para el reconocimiento del producto final de la vía, el cual estando presente inhibe la actividad enzimática (Fig. 1), evitando la acumulación del producto final.

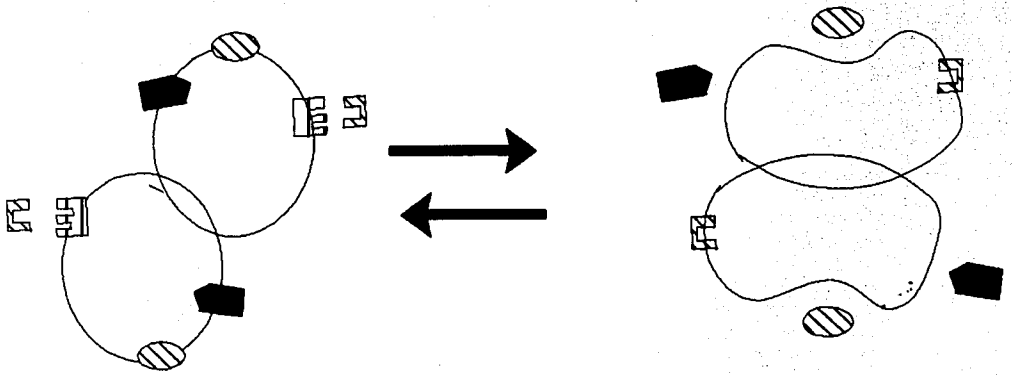
Muchas vías biosintéticas no son tan simples, son vías ramificadas y eventualmente producen más de un producto final. Si bien es cierto que la primera parte de la vía es común para todos los productos finales, la regulación por inhibición por productos finales puede ser por tres diversos mecanismos de inhibición: por isoenzimas, concertada y acumulativa.

La inhibición por isoenzimas se da cuando la primera enzima regulable no es una sólo, sino un conjunto de isoenzimas, donde cada una es regulable por uno de los productos finales de la vía (Fig.2).

Inhibición concertada o retroalimentación multivalente, involucra únicamente a una enzima y se requiere más de un producto final para bloquear la actividad de esa enzima. Por ejemplo la vía de los aromáticos en *Corynebacterium glutamicum*, donde una sola enzima regula el primer paso de la vía y ésta es inhibida en forma concertada por fenilalanina y tirosina. Esto también resulta útil en el caso donde uno de los productos finales inhibe después de la ramificación, y el otro producto activa el mismo sitio (Fig 3).

Inhibición acumulativa: esta regulación se da cuando cada uno de los productos finales que causan una inhibición parcial, se encuentran en exceso y la condición es que esten todos los productos finales para bloquear completamente la enzima.

En el segundo caso, el mecanismo de regulación genética tiene como finalidad reprimir la síntesis de las enzimas necesarias para producir el aminoácido requerido. En presencia del aminoácido, éste se une a un aporrepresor formando un complejo, que es reconocido por el sitio operador, con lo que se reprime la expresión de los genes involucrados en la vía y no hay formación de las enzimas necesarias para la síntesis del aminoácido (47). En ausencia del aminoácido se evita la formación de ese complejo y el sitio operador queda libre; por lo que si se produce una mutación en el gen regulador, de tal manera que el aporrepresor resulte modificado o no se produzca, el complejo no se formará o no será funcional, quedando libre el sitio operador, aún en presencia del producto final (Fig. 4).







-  **ACTIVADOR**
-  **SUSTRATO**
-  **INHIBIDOR (PROD. FINAL)**
-  **SITIO ALOSTERICO .**

Fig . 1 Modelo de regulación de enzimas alostéricas (1).

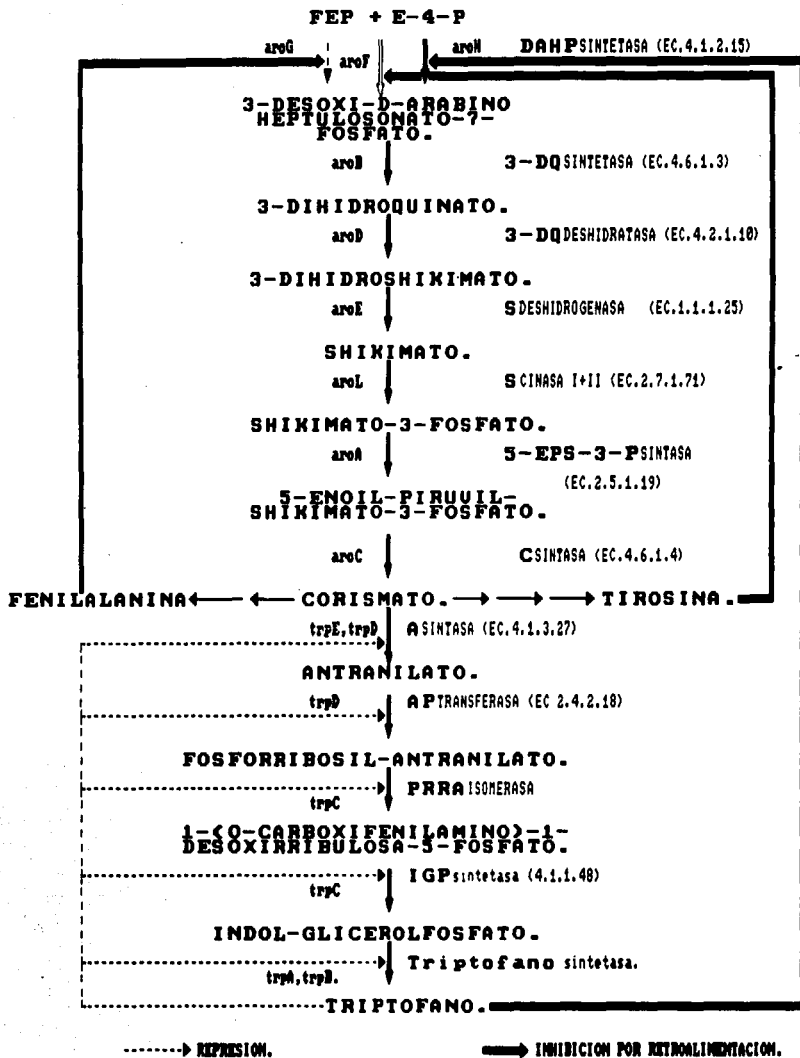


FIG.2 RUTA BIOSINTETICA DE LA FAMILIA DE LOS AMINOACIDOS AROMATICOS EN *Escherichia coli* (5).

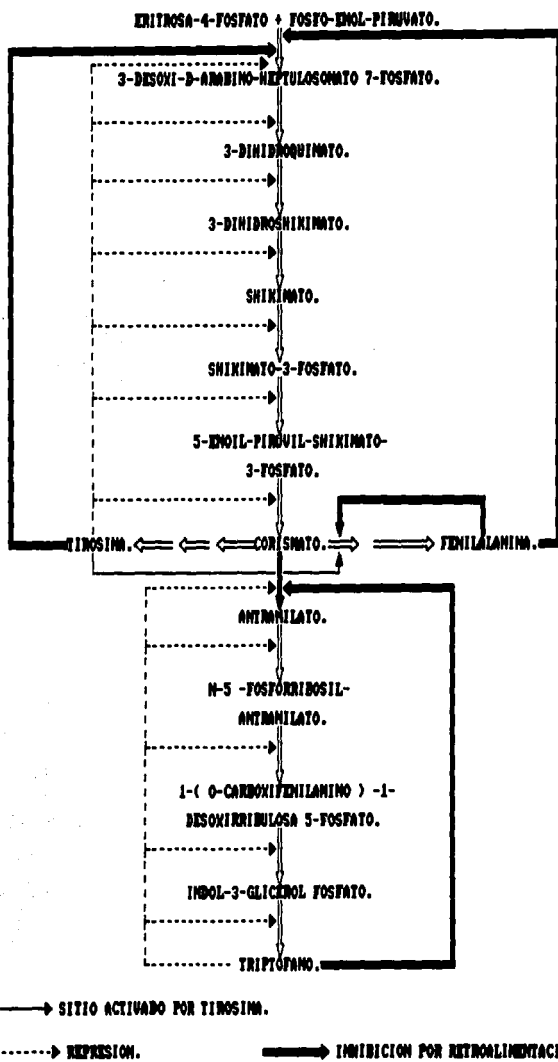


FIG.3 RUTA BIOSINTETICA DE LA FAMILIA DE LOS AMINOACIDOS AROMATICOS EN *Brevibacterium flavum* (28).

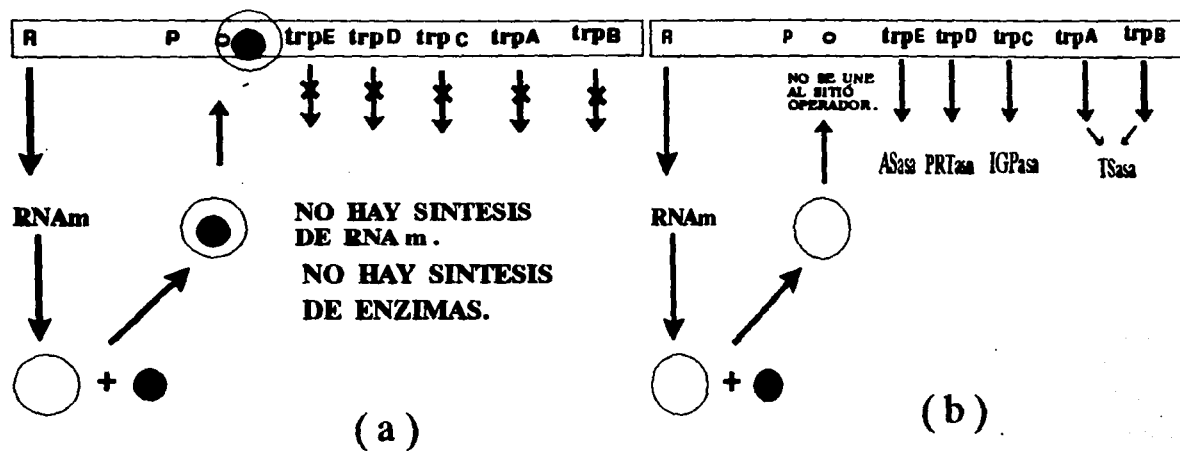


Fig. 4 Operón de triptofano bajo condiciones de represión (a) y en ausencia de represión (b).

● Halorrepresor ; ○ Aporrepresor ; • Correpresor.
 ASasa , Antranilato sintetasa ; PRTasa ,
 Fosforribosilantranilato Transferasa ; IGPasa ,
 Indol glicerol fosfato sintetasa ; TSasa ,
 Triptofano sintetasa.

El tercer caso es el mecanismo de atenuación. Está dado por la formación de estructuras secundarias dadas por secuencias de un RNAm líder, que varían en ausencia o en presencia de triptofano. Lo anterior provoca que se detenga la traducción de los mensajes necesarios para sintetizar las enzimas que catalizan las reacciones siguientes (54).

1.4 Vía común de los aminoácidos aromáticos.

Los pasos se esquematizan en la Fig. 5. La biosíntesis de los aminoácidos aromáticos comienza con la condensación de fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato para producir 3-desoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato (DAHP) (reacción 1). El DAHP es ciclizado por la remoción de fosfato para producir 5-dihidroquinato (reacción 2). La enzima que cataliza esa reacción requiere de NAD como cofactor; aunque no hay oxidación o reducción neta en la reacción completa, hay un cambio redox interno que afecta al carbono 7 de la DAHP que lo reduce, con oxidación del carbono 6 (carbono 5 y 6 del 5-dihidroquinato), con remoción de agua y una reducción dependiente de NADPH produciendo shiquimato (reacciones 3 y 4). El shiquimato es fosforilado y condensado con otra molécula de fosfoenolpiruvato (reacción 5 y 6), generando un segundo doble enlace y retirando fosfato para producir el compuesto que es el punto de ramificación, corismato (reacción 5 a 7) (29, 52). Este compuesto es una ramificación específica en la vía para la producción de los tres aminoácidos aromáticos, además de p-aminobenzoato, menadiona, ubiquinona y enteroquelina.

Hay tres isoenzimas DAHP sintetasas en *E. coli*; una es inhibida por fenilalanina, otra por tirosina (17, 19, 24) y la tercera por triptofano (9). La represión de la formación de isoenzimas en la vía común aromática se tiene bien estudiada en enterobacterias (8, 10, 24). Un examen minucioso de las isoenzimas en *E. coli* es el realizado por Brown y col. (11) donde revelan que, en adición a la represión específica por

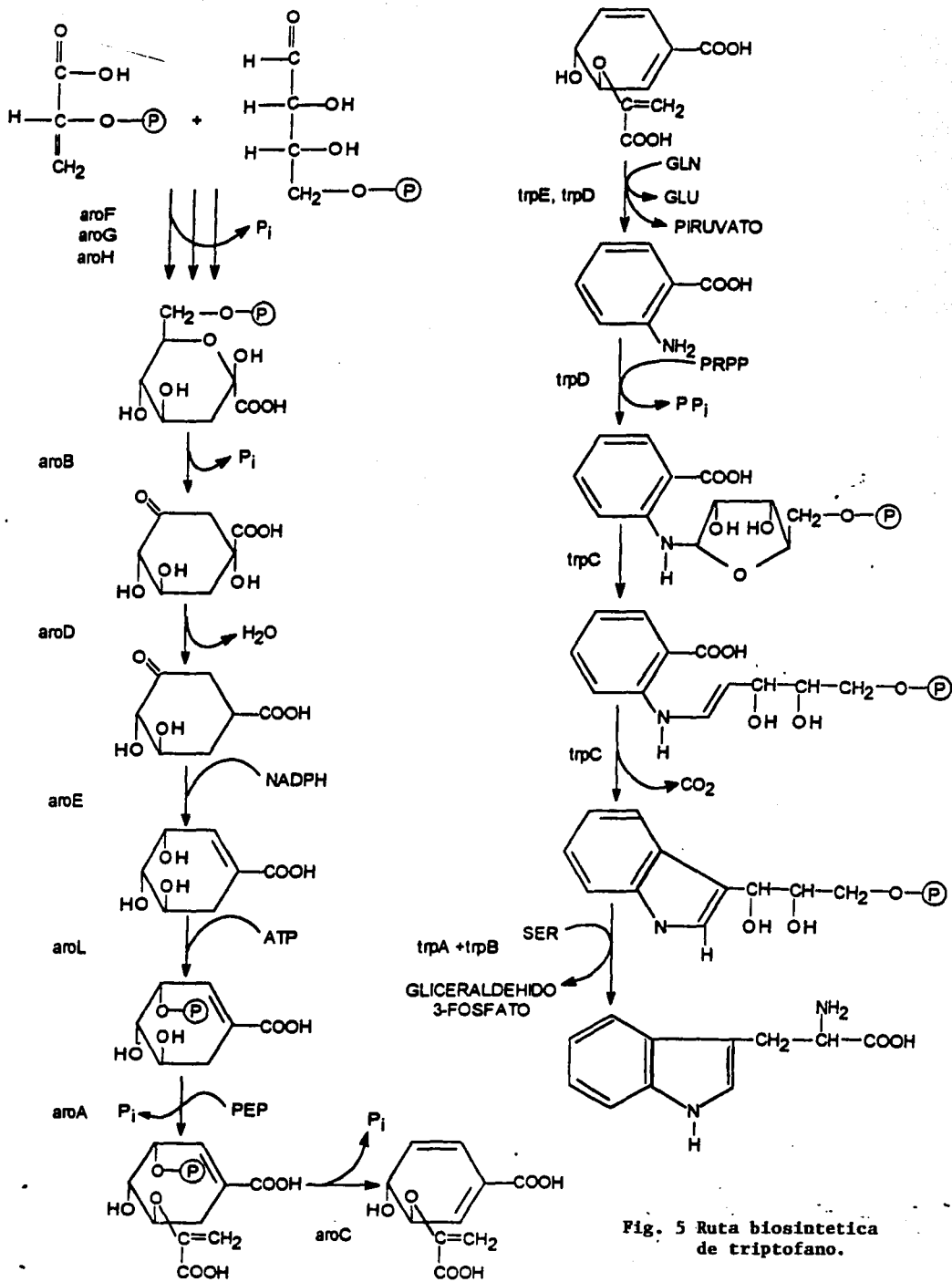


Fig. 5 Ruta biosintetica de triptofano.

triptofano de la DAHP sintetasa que es inhibida por triptofano y la represión específica de tirosina a la enzima inhibible por tirosina, observada por otros autores, se encontró además una inhibición multivalente de la enzima, por fenilalanina más triptofano (12). La represión de las isoenzimas DAHP sintetasa está dada por los loci *trp R* y *tyr R*, respectivamente. El gen *tyr R* codifica para el represor, del regulón *tyr*; ésto fue sugerido por los resultados de Camakaris y Pittard (14), que estudiaron mutantes ámbar y temperatura sensibles (Ts), mutadas en el gene *tyr R*. La represión de la enzima inhibible por fenilalanina, y además la que es regulada por triptofano también involucra la participación de *tyr R* y no sólo *trp R* (12, 14). El gene *phe R* no se ha encontrado en *E. coli*, sólo en *Salmonella typhimurium*, donde se ha visto que no afecta la represión de la enzima que es inhibida por fenilalanina (21). Las otras enzimas, que catalizan los pasos restantes de la vía común de los aromáticos (3-deshidroquinato sintetasa, 3-deshidroquinato deshidratasa, shikimato deshidrogenasa, shikimato quinasa, 5-enoil-piruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa, y corismato sintetasa), no están controladas por el o los productos finales (22, 50).

Por otro lado, en *Brevibacterium flavum* el primer paso de la vía común es una reacción catalizada por una sólo enzima, la cual es inhibida en forma concertada por fenilalanina y tirosina, como se ve en la Fig.3 (40, 44), y su síntesis es débilmente reprimida por tirosina (37, 38, 47). El resto de las enzimas que regulan el flujo de materia son dependientes del crecimiento, al igual que en

enterobacterias (32).

Los genes que catalizan las últimas cinco reacciones se encuentran formando un operón, que es reprimido por el producto final del gene *trp R*, que codifica para un aporrepresor. Esta proteína, en presencia de triptofano, forma un complejo activo que se une al sitio operador del operón, evitando que se lleve a cabo la síntesis de mensajeros que codifican para las enzimas, cuando éstas no se requieren.

Las reacciones posteriores al sustrato común (corismato) para los tres aminoácidos, sobre la vía para triptofano, comienzan con la eliminación de enoilpiruvil acompañada por una glutamina y es catalizada esta reacción por la antranilato sintetasa (15, 16).

El segundo paso en la síntesis de triptofano es la movilidad del fosfato de 5-fosforribosil-1-pirofosfato a la posición número 3 del antranilato, catalizado por la antranilato-fosforribosil-transferasa (45). Ciertos miembros de las enterobacterias tienen las mismas enzimas para la primera y segunda reacción asociadas en un complejo enzimático. La tercera reacción es un rearrreglo de Amadori del fosforribosil-antranilato (PRA), catalizado por la enzima fosforribosilantranilato isomerasa (PRAI).

El cuarto paso es una descarboxilación y ciclización por la enzima indol-glicerolfosfato sintetasa (InGPS). La reacción final es la remoción del glicerolfosfato de la cadena lateral del indol-glicerolfosfato (InGP) y es reemplazado por el grupo alanil traído de la L-serina, reacción catalizada por el complejo enzimático triptofano sintetasa, dando como producto final triptofano.

En *Brevibacterium flavum*, la enzima antranilato sintetasa es inhibida por triptofano y su síntesis también es reprimida por éste (25, 41, 46, 48). Los genes que codifican para las enzimas que catalizan las últimas cinco reacciones y que eventualmente llevan a la formación de triptofano, se encuentran también formando un operón como en enterobacterias (47). No se ha descrito la presencia de un aporrepresor(33).

1.5 Producción de triptofano por microorganismos.

La producción de L-triptofano directamente a partir de azúcares, se ha estudiado en diferentes microorganismos. Se conoce que las bacterias sólo producen la cantidad de aminoácidos que requieren para sobrevivir, no gastan materia ni energía de manera innecesaria. Por lo tanto, sólo las bacterias "enfermas" son las que sobreproducen aminoácidos.

En la tabla I, se muestran las cepas que hasta la fecha se han obtenido para la producción de triptofano, manipulando al microorganismo por mutagénesis y por técnicas de ADN recombinante.

Nuestro interés por producir triptofano por vía microbiana es por que no se cuenta en México con una metodología de este tipo que permita producir triptofano con alto rendimiento. Las industrias pecuaria y farmacéutica tienen que importarlo, lo que implica fuga de divisas para la Nación; si bien es cierto que tal vez las cepas que se obtuvieron en este trabajo no lleguen a igualar la producción de las que han obtenido otros investigadores, abren el camino para que se trabaje con cepas nativas de México en este tipo de procesos. Además se podría favorecer la utilización de melazas y desperdicios de la industria del petróleo en nuestro País.

TABLA I. BACTERIAS HIPERPRODUCTORAS DE TRIPTOFANO.

FUENTE	PRODUCCION DE Triptofano (g/l).	REFERENCIA.
<i>B. flavum</i> Tyr ⁻ Phe ⁻	1.9	35
<i>B. subtilis</i> FF-25 ^a	4.0	36
<i>E. coli</i> ^b	0.08	52
<i>E. coli</i> ^c	5.0	4
<i>E. coli</i> ^d	1.0	5
<i>B. flavum</i> 187 ^e	11.0	42
<i>B. flavum</i> S-225 ^f	19.0	43

a Ade⁻, 5FT^r.

b Thr⁺, trpR363, trpE382, malt384.

c trpAE1, trpR, tnaA, tiene pSC101-trp115 (Tc^rtrp⁺I⁻).

d tna (trp AE1, trp R, tna A)

e Tyr⁻, Met⁻, p-FP^r, 5FT^r, AZ^r.

f Tyr⁻, Met⁻, p-FP^r, 5FT^r, AZ^r, SG^r.

2. - OBJETIVO GENERAL.

OBTENER MUTANTES DE *Escherichia coli* Q-358 Y DE *Brevibacterium flavum* 21475, QUE SEAN HIPERPRODUCTORAS DE TRIPTOFANO.

OBJETIVOS PARTICULARES.

2.1.- Estudiar mutantes de *Escherichia coli* auxótrofas a tirosina y fenilalanina, que sobreproduzcan triptofano.

2.2.- Seleccionar mutantes de *Brevibacterium flavum* auxótrofas a tirosina, que sobreproduzcan triptofano y mutagenizarlas de nuevo para mayor sobreproducción.

2.3.- Seleccionar mutantes de *Escherichia coli* y *Brevibacterium flavum* resistentes a 5-metiltriptofano, que sobreproduzcan triptofano y evaluar los parámetros necesarios para una buena sobreproducción.

2.4.- Seleccionar mutantes de *Escherichia coli* y *Brevibacterium flavum* resistentes además a 5-fluorotriptofano y sulfoguanidina, y caracterizar las variables necesarias para su óptima producción.

2.5.- Evaluar el grado de desinhibición de la enzima DAHP sintetasa de las cepas de *Escherichia coli* y *Brevibacterium flavum* con más alta producción.

3. -MATERIALES Y METODOS.

3.1 CEPAS Y ORIGEN DE LOS REACTIVOS.

Brevibacterium flavum 21475 (silvestre), fue obtenida de la Colección Microbiana del Departamento de Biotecnología, del CINVESTAV I. P. N. y las cepas de *Escherichia coli* fueron del cepario del CIATEJ, Guadalajara Jal.

Escherichia coli Q-358 (silvestre), CIATEJ.

Q-358 (B-057, Tyr⁻-Phe⁻), CIATEJ.

Q-358 (B-054, Trp⁻), CIATEJ.

Q-358 (B-056, Phe⁻), CIATEJ.

Salmonella typhimurium SM18 trp R, Lab. 52, BIOLOGIA CELULAR, CINVESTAV (6).

Todas las sales inorgánicas para la elaboración de los medios de cultivo mínimos fueron de Merck Co., los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano), vitaminas y los análogos de triptofano fueron de Sigma Chemical Co. St Louis Mo. EUA.

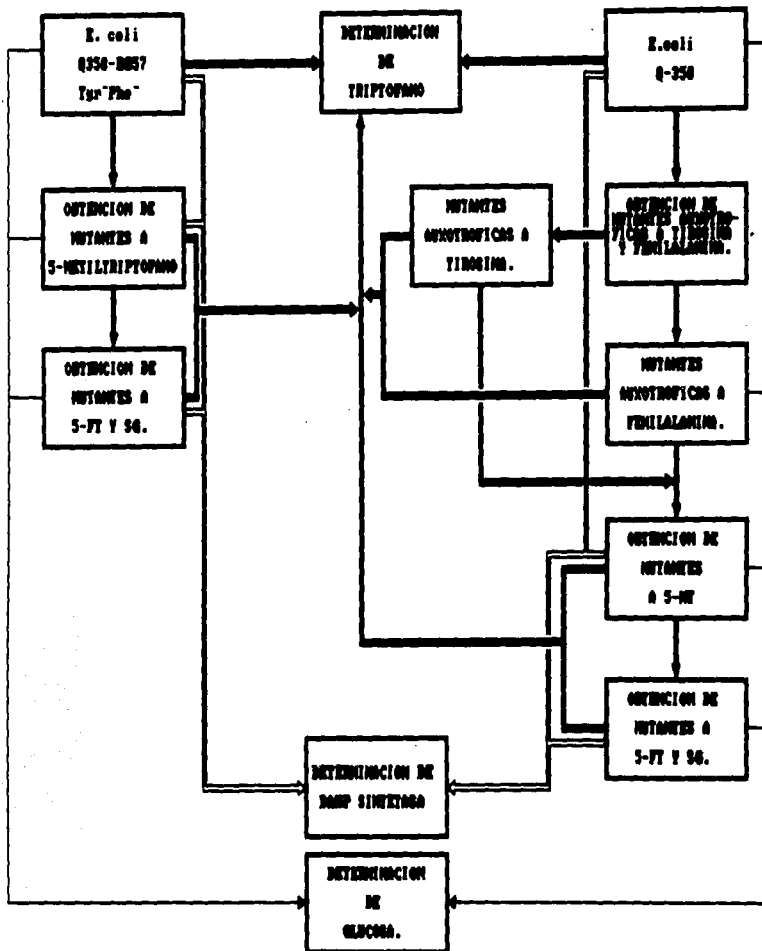
La N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) fué obtenida de Aldrich Chemical, Millwakee WI, EUA.

Los medios comerciales y el agar bacteriológico fueron obtenidos de Bioxon, México.

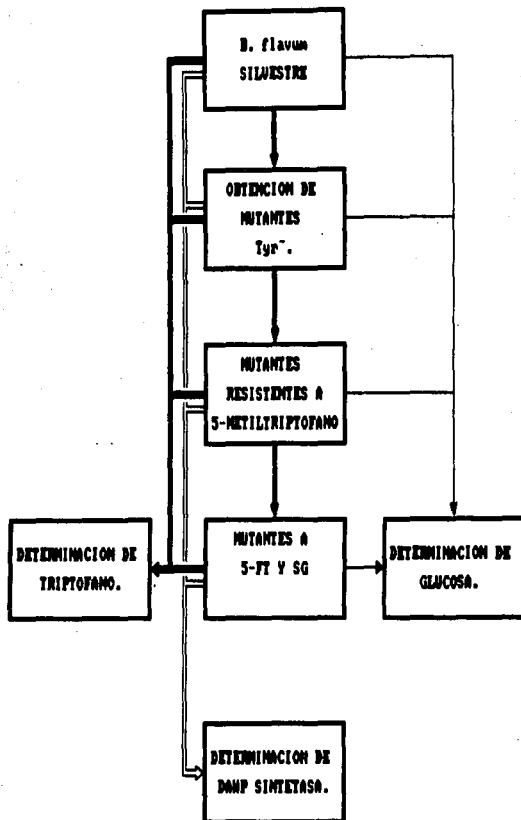
La dextrosa y sacarosa fueron obtenidas de J.T Baker, México.

¹Donadas gentilmente por el Dr Jaime Alvarez de la Cuadra.

CUADRO METODOLOGICO DE LAS CEPAS DE E. coli.



CUADRO METODOLOGICO DE *B. flavum*.



3.2 MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento bacteriano de las cepas de *Escherichia coli* fueron: 1) Luria Bertani (LB), compuesto en g/l: de peptona de caseína 10; extracto de levaduras 5; NaCl 5, para el crecimiento masivo y 2) Davis-Mingioli sin citrato, suplementado con sulfato ferroso como medio mínimo (DM); este medio está compuesto en g/l: por fosfato de potasio monobásico 7.0; fosfato de potasio dibásico 3.0; sulfato de amonio 1.0; sulfato de magnesio 0.1; sulfato ferroso heptahidratado 10 mg/l; se complementa con 10.0 g/l de glucosa esterilizada aparte. Para el crecimiento de cepas auxotróficas, se le adicionan los aminoácidos que requieren en ug/ml.

El medio mínimo para el cultivo de *Brevibacterium flavum* fue el M2, descrito por Shio y cols. (34). Esta constituido en g/l por: glucosa 5.0; sulfato de amonio 1.5; urea 1.5; fosfato de potasio monobásico 3.0; fosfato de potasio dibásico 1.0; sulfato de magnesio heptahidratado 0.01; cloruro de calcio dihidratado 0.001; biotina 30 ug/l; tiamina 100 ug/l.

El medio utilizado para determinar la cantidad de triptofano por las cepas mutantes, fue el M3, también descrito por Shio, et al.(39), el cual consta de los siguientes componentes en g/l: glucosa 100; sulfato de amonio 40; fosfato monobásico de potasio 1.0; sulfato de magnesio heptahidratado 0.4; sulfato ferroso

heptahidratado 0.01; sulfato de manganeso tetrahidratado 0.008; biotina 30 ug/l; tiamina 200 ug/l; agua, c.b.p 1000 ml, el pH de la solución fue de 7.2, y se esteriliza por separado la glucosa a 10 lb /in², durante 15 min; el resto de las sales se esterilizan a 15 lb/in² durante 15 min.

3.3 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LA CEPA DE *Escherichia coli* Q-358 Y DE LA CEPA Q358-B057.

Se cultivaron dos matraces conteniendo 10 ml de medio rico LB, con la cepa de *Escherichia coli* Q-358, y la Q-358 Tyr⁻, Phe⁻; se incubaron a 37° C, durante toda la noche. Al día siguiente, las células fueron cosechadas y lavadas, se inocularon a 0.1 de absorbancia a 590 nm en matraces nefelométricos que contenían 50 ml de medio mínimo D-M, con glucosa al 1, 2, y 5 %. A los matraces donde se inoculó la cepa auxótrofa se les adicionaron 50 ug/ml de tirosina y 50 ug/ml de fenilalanina. Se incubaron en una agitadora rotatoria (New Brunswick Company) a 100 rpm, a 37° C y se tomaron lecturas de absorbancia a 590 nm, cada hora, por 12 horas.

Se graficaron esas lecturas en papel milimétrico y se analizó su crecimiento con respecto a la concentración de fuente de carbono.

3.4 CINETICA DE CRECIMIENTO vs PRODUCCION DE TRIPTOFANO.

De un cultivo de toda la noche en medio LB de las cepas de *E.coli* Q-358, Q358-B057 y Q358-B056 se inocularon 2.5 ml de suspensión bacteriana sin lavar en cada matraz (12 matraces), que contenían medio DM más 1 % de fuente de carbono, para cada cepa. Uno de los 12 matraces fue tomado como tiempo cero. Se le midió la absorbancia a 590 nm y el valor de pH del caldo de cultivo, concentración de azúcar y producción de triptofano. Cada 5 horas se tomaba otro matraz y se le midieron los mismos parámetros. Los resultados obtenidos se graficaron.

3.5 CINETICA DE CRECIMIENTO PARA LA CEPA DE *Brevibacterium flavum* 21475.

Para realizar la cinética de crecimiento se utilizaron dos matraces de 250 ml, con 25 ml de medio M2 con 1 % de glucosa, se inocularon con el 10 % del volumen de una suspensión bacteriana de *Brevibacterium flavum*, cultivada toda la noche en 25 ml de medio LB y se le fue midiendo la absorbancia a 562 nm cada 5 horas.

3.6 OBTENCION DE MUTANTES REGULATORIAS RESISTENTES A 5-METILTRIPTOFANO, DE LAS CEPAS DE *E.coli* Q358-B057 y Q358-B056.

A partir de las cepas auxótrofas que presentaron alta producción, se tomaron células para mutagenizar y obtener las mutantes regulatorias resistentes a 5-metiltriptofano (5MT) y 5-fluorotriptofano (5FT). Primero hubo que obtener una curva de sensibilidad a esos análogos, lo cual se realizó de la forma descrita (20); y para corroborar la concentración a utilizar del análogo, se hizo la prueba en sólido que consiste en que, partiendo de los resultados en medio líquido donde se inhibió el crecimiento, se sembró en cajas de medio mínimo (DM) con requerimientos, 1.5 % de agar, 1 % de glucosa y la cantidad de análogo determinada en líquido.

Una vez que se encuentre la concentración que inhibe el crecimiento, se utilizaron dos estrategias para obtener las mutantes. La primera descrita por Ortega y Aguilar (31), en donde a partir de un cultivo fresco que se encuentre en fase exponencial, se lavan las células y se espatulan 100 ul del cultivo sobre cajas selectivas que contienen una concentración mayor del análogo y posteriormente se adicionan unos cristales de NTG en el centro de la caja y se incuban a la temperatura adecuada. La otra técnica es la de mutagénesis en líquido (3), la cual consiste en que el cultivo fresco en fase exponencial se trata con 50 ug de NTG/ml por

15 min, después se lavan las células para eliminar el mutágeno y son espatuladas sobre medio DM adicionado de 20 ug de tirosina, y fenilalanina-glucosa al 1 %, más el análogo. Se incuban a temperatura óptima. Una vez que crecen las células se prueba su resistencia resemebrándolas en cajas con el medio anterior, posteriormente se seleccionan colonias con ayuda de palillos estériles y se prueba si sobreproducen el triptofano, comparándolas con las cepas ancestrales.

3.7 OBTENCION DE MUTANTES DE *Brevibacterium flavum* 21475 AUXOTROFAS A TIROSINA.

En la obtención de mutantes auxótrofos a tirosina se utilizó la siguiente metodología. A un cultivo de toda la noche de *Brevibacterium flavum* 21475, se le resemebró en medio LB y se llevó hasta una absorbancia de 0.6 - 0.8 a 562 nm. Posteriormente 15 ml del cultivo se transfirieron a un tubo de centrifuga, se le agregaron 0.75 mg/ml de NTG, y se incubaron a 30°C por 15 min; se lavaron las células, se centrifugaron, y se resuspendió el paquete celular en KCl al 0.2 %; el procedimiento de lavado se repitió dos veces más y se dejaron las células dos horas en medio M2 con glucosa. Transcurrido el tiempo, las células fueron lavadas y resuspendidas en amortiguador de fosfatos a pH 7.4, y se espatularon 100 ul de la suspensión bacteriana en cajas de M2 adicionados de glucosa al 1 %, 20 ug/ml de tirosina y 20 ug/ml de

fenilalanina, se incubaron a 30°C de 5 a 7 días, tiempo que tardan en aparecer las cepas mutantes con algún defecto nutricional en los aminoácidos aromáticos. Las mutantes que aparecen se resiembran sobre cajas que contienen los dos aminoácidos, sólomente un aminoácido o sobre medio mínimo y glucosa.

3.8 OBTENCION DE MUTANTES DE *Brevibacterium flavum* RESISTENTES A 5-METILTRIPTOFANO.

El proceso de obtención de mutantes resistentes a 5MT se utilizó la técnica descrita (35). Partiendo de un cultivo en fase exponencial, se mezcló con 0.75 mg de NTG/ml y se puso en agitación por 15 min, luego se eliminó el mutágeno por centrifugación, se realizaron dos lavados con KCl al 0.2 % y finalmente se resuspendió en amortiguador de fosfatos. Cien microlitros de cultivo bacteriano se espatularon sobre cajas de medio M2 adicionado de glucosa al 1%, 20 ug de tirosina y 800 ug/ml 5MT; se incubaron a 30°C por 6-7 días tiempo que tardan en aparecer las cepas resistentes al análogo, posteriormente estas cepas se transfirieron a cajas con análogo para rectificar su resistencia al 5MT.

3.9 OBTENCION DE MUTANTES DE *Brevibacterium flavum* RESISTENTES A 5-FLUOROTRIPTOFANO Y SULFAGUANIDINA.

Para la obtención de mutantes resistentes a 5FT, se utilizó básicamente la metodología para obtener las mutantes resistentes a 5MT.

Las condiciones bajo las cuales se obtuvieron las mutantes fueron una concentración de 5FT de 100 ug/ml, y 1 mg/ml de sulfoguanidina (SG). Se incubaron a 30°C por 6-7 días, tiempo que tardan en aparecer las mutantes.

3.10 DETERMINACION DE TRIPTOFANO.

La determinación de triptofano se realizó por medio de dos técnicas, una cualitativa, por cromatografía en papel, siguiendo el protocolo de Merck Co, utilizando como disolventes n-butanol, ácido acético, acetona y agua en una relación 35:35:10:20 y como revelador una solución de ninhidrina al 0.1 %.

La otra técnica fue cuantitativa y es la prueba de complementación auxotrófica. Se utilizaron la cepa Q358 Trp⁻, que sólo crece en presencia de triptofano e indol; y la cepa de *Salmonella typhimurium* SM 18, que sólo crece en presencia de triptofano y no en presencia de indol o de otros precursores como el ácido antranílico; la metodología utilizada es una modificación

de la descrita por Godínez et al (20). El protocolo es el mismo lo que cambia es la cepa auxotrófica.

3.11 DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES.

En la determinación de azúcar consumida para analizar el rendimiento, se siguió la técnica descrita por Dubois et al (18). Se preparó una curva estándar entre 10 a 100 ug/ml de glucosa.

3.12 DETERMINACION DE DAHP SINTETASA.

Las células de *E.coli* y *B. flavum* fueron cultivadas en medio mínimo DM y M2 respectivamente, enriquecidos con fenilalanina y tirosina a una concentración de 30 ug/ml y una concentración de fuente de carbono de 2 %. Se incubaron a la temperatura óptima de cada bacteria durante 24 h, después se cosecharon y lavaron con amortiguador de fosfatos; se resuspendieron en Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4. *E. coli* fue sonicada a 18 micrones, se le dieron 6 pulsos de 1 min cada uno y descanso de 30 seg, en un sonicador MSE, serie PB-781 y *B. flavum* fue sonicado a 18 micrones, dándole 15 pulsos por tiempos de 1 min cada uno y descansos de 30 seg, en el mismo sonicador. Posteriormente se centrifugaron a 8000 x g por 30 min, se obtiene el sobrenadante y es el que se utiliza como extracto enzimático.

La determinación de DAHP sintetasa se realizó siguiendo la metodología descrita por Golub y col.(21); que consiste en poner a reaccionar: 0.5 micromoles (μmol) de tris-HCl pH 7.5, 0.5 μmol de eritrosa-4-fosfato, 0.5 μmol de fosfoenolpiruvato, y 300 μl de extracto enzimático, se afora a 1 ml con agua bidestilada.

La mezcla anterior se incuba a 30°C , por 10 min, posteriormente la reacción se detiene al adicionar 0.4 ml de ácido tricloroacético al 10 %. La mezcla se filtra, y se le adicionan 0.25 ml de una solución de ácido peryódico 0.025 M, se incuba la reacción a 37°C por 30 min. La reacción oxidativa con ácido peryódico se detuvo por adición de 0.5 ml de arsenito de sodio al 2 % en HCl 0.5 M . A la mezcla de incubación se añadieron 2 ml de ácido-2-tiobarbitúrico al 0.3 % y fue calentada a 100°C por 8 min. La absorbancia de la mezcla fue determinada a 549 nm. Para calcular la actividad enzimática se utilizó el coeficiente de extinción de DAHP de 4.5×10^4 litro/Mol cm a 549 nm.

4. - RESULTADOS.

Escherichia coli:

4.1 Cinéticas de crecimiento y pruebas de sensibilidad al análogo 5MT de la cepas Q-358 y Q358-B057.

En las Figs. 6 y 7 se hace un análisis comparativo de las diferentes concentraciones de fuente de carbono (glucosa). Los resultados revelan que las concentraciones de sustrato probadas no son un factor determinante del crecimiento de estas cepas.

Se observa en la Tabla II el resultado de la prueba de sensibilidad a 5MT por las cepas parentales de *E. coli* (Q-358 y Q358-B057).

Para obtener las mutantes resistentes al análogo 5MT, se utilizó la concentración de 800 ug/ml, porque es la concentración que produce el 100 % de muerte bacteriana. Bajo estas condiciones se lograron aislar 300 mutantes resistentes a 5MT, de esas cepas sólo 30 producían cantidades apreciables de triptofano.

Para proseguir con el trabajo se seleccionó la mutante con más alta producción, que se designó QD-01.

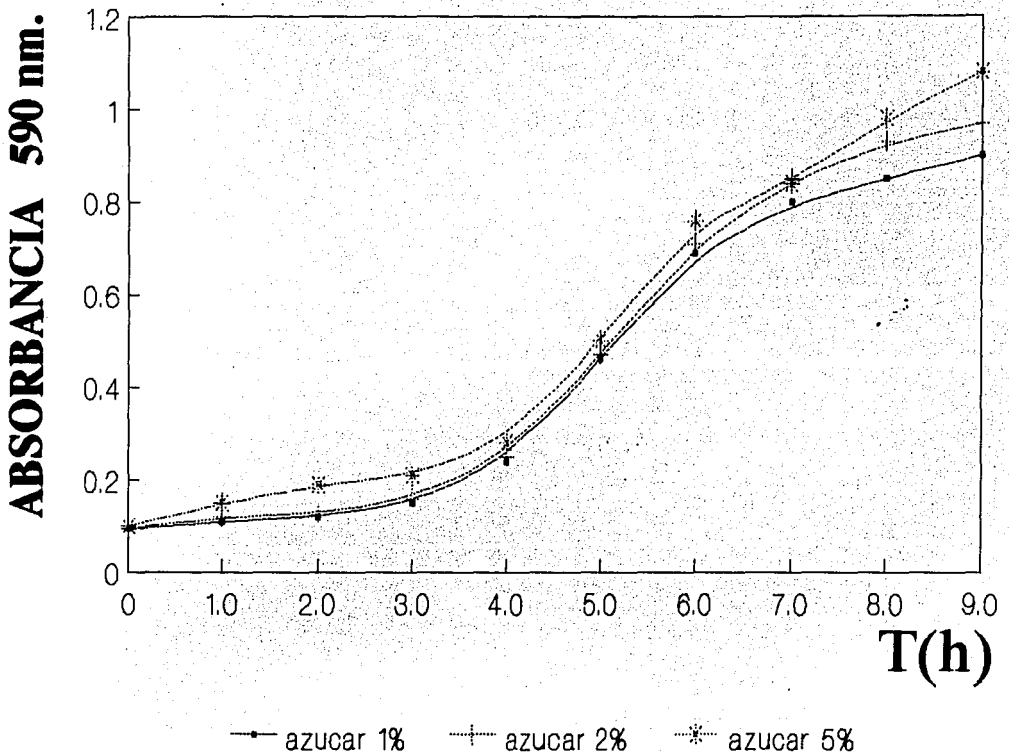


Fig. 6 *Cinética de crecimiento de la cepa de E.coli Q-358, sobre medio mínimo suplementado con 1, 2 y 5 % de glucosa como fuente de carbono.*

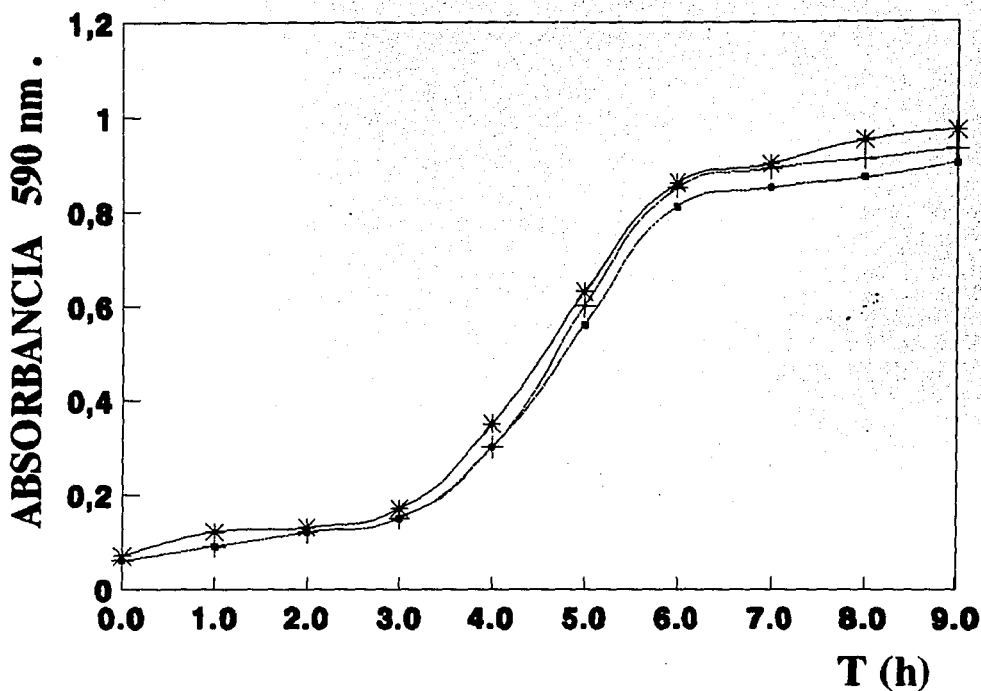


Fig. 7. Cinética de crecimiento de la cepa Q358-B057 de *E. coli*, en medio mínimo suplementado con glucosa al 1 (—), 2(+) y 5 (—) % además de 30 ug/ml de tirosina y fenilalanina, en agitación a 37 C.

TABLA II. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *E. coli* Q-358 Y Q358-B057, POR 5-METILTRIPTOFANO^a.

CONCENTRACION (ug/ml).	Q-358	Q358-B057
0.0	+++++	+++++
50.0	+++++	+++++
100.0	+++++	+++++
200.0	++++	++++
300.0	++++	++++
400.0	++	++++
500.0	+/-	+++
600.0	-	+/-
700.0	-	-
800.0	-	-
900.0	-	-
1000.0	-	-

+++++ **Crecimiento abundante.**

+++ **Poco Crecimiento.**

+/- **Casi no hubo crecimiento.**

- **Ausencia de crecimiento.**

a **En medio DM glucosa con SMT.**

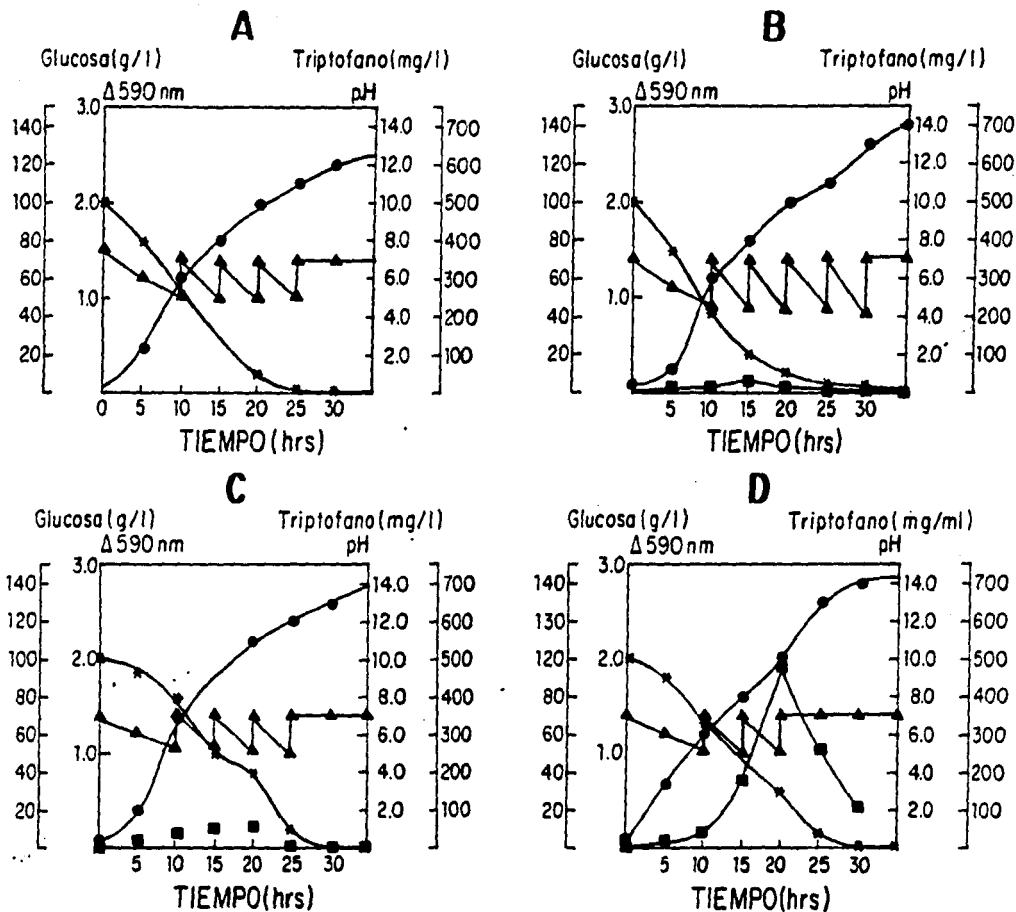


Fig. B Cinética de crecimiento y producción de las cepas de *Escherichia coli* (A) Q-358; (B) Q358-B057; (C) Q358-Q001; (D) Q358-B056. Crecidas en medio MD complementado con glucosa al 1% y 50 ug/ml de fenilalanina y tirosina, para la cepa B y C, y 50 ug/ml de fenilalanina para la cepa D. ● Crecimiento, ▲ pH, × Glucosa, ■ Triptofano producido. -

TABLA III. PRODUCCION DE TRIPTOFANO POR LAS CEPAS DE *Escherichia coli*.

CEPA	FENOTIPO	PRODUCCION (mg/l)	RENDIMIENTO %
<i>E. coli</i> :			
Q-358	-	0.0	0
Q358-B057	Tyr ⁻ , Phe ⁻	30.0	0.2
QD-01	Tyr ⁻ , Phe ⁻ ; 5MT ⁺	55.0	0.92
Q358-B056	Phe ⁻	400.0	4.0
JA-1	Phe ⁻ , 5MT ⁺	290.0	2.9
JA-2	Phe ⁻ , 5MT ⁺	250.0	2.5
JA-11	Phe ⁻ , 5FT ⁺	230.0	2.3

El rendimiento se define como gramos de triptofano producido por gramos de sustrato consumido.

El triptofano fue determinado por medio de la técnica de complementación auxotrófica usando la cepa de *Salmonella typhimurium* SM-18 trp⁻.

4.2 Cinéticas de crecimiento vs producción de las cepas Q-358, Q358-B057, Q358-B056 y QD-01.

La Figura 8 muestra la relación entre crecimiento, pH, consumo de sustrato y producción:

A) la cepa Q-358 no produce triptofano, utilizando todo el sustrato para su crecimiento.

B) la cepa Q358-B057, produce una pequeña cantidad de triptofano, pero se puede apreciar en la Figura 8 que cuando se empieza a agotar la glucosa, utiliza el triptofano.

C) la cepa mutante resistente a 5MT derivada de Q358-B057, que más sobreproduce triptofano es la cepa QD-01. También se observa que se obtienen mutantes resistentes a la represión catabólica para el sistema degradador de triptofano. En estas mutantes su triptofanasa se activa en presencia de glucosa.

D) la cepa Q358-B056 auxótrofa a fenilalanina es la que más produce triptofano. Se trató de mejorar su producción sin mucho éxito, dado que al someterla a mutagénesis en presencia de los análogos de triptofano se observó el mismo efecto que con la cepa Q358-B057, nuevamente se activa la triptofanasa; lo que provoca una disminución marcada en cuanto a la producción de triptofano de 400 a 200 mg/l.

Los resultados de producción y rendimiento se muestran en la Tabla III. Donde se observa que si hay sobreproducción de triptofano, pero la cantidad era muy pequeña como para ser utilizada en un proceso fermentativo.

Estos resultados indican que para los fines que se persiguen,

E. coli no es el modelo más adecuado, aunque genéticamente se conozca mucho de ella.

Brevibacterium flavum:

4.3 Cinética de crecimiento y obtención de mutantes auxotróficas a tirosina.

En la curva de crecimiento de *B. flavum* silvestre, en el medio M2 más glucosa como fuente de carbono, se observa que tiene una fase lag de casi 10 h (Fig 9). Para abatir esa fase lag tan larga la cepa tuvo que ser adaptada al medio mineral y agregarle factores de crecimiento como biotina y tiamina.

Se manejaron 120 mutantes candidatas a tener requerimiento de tirosina, pero sólo 4 colonias resultaron positivas y dos de ellas fueron sobreproductoras de triptofano. Se trabajó con la cepa DV.1 porque en medio M3 produce más triptofano que la silvestre y con la mutante DV.3 que también requiere tirosina.

Además se obtuvieron 70 mutantes que, adicionalmente de ser Tyr⁻, fueron resistentes a 5MT; de ellas, 30 produjeron más triptofano que la silvestre. Los resultados de producción se muestran en la Tabla IV. De esas mutantes resistentes a 5MT se observó que al probar sí producían triptofano, en el medio de cultivo se formaba un precipitado blanco (que no era triptofano), y dieron positiva la prueba de triptofano. Por lo anterior se tuvo que centrifugar para eliminar ese componente y poder determinar triptofano en el sobrenadante. Debido a esta interferencia esas mutantes se desecharon y sólo se conservó la DV-12.

Con la cepa DV-12 de *B. flavum* 5MT, se prosiguió el trabajo

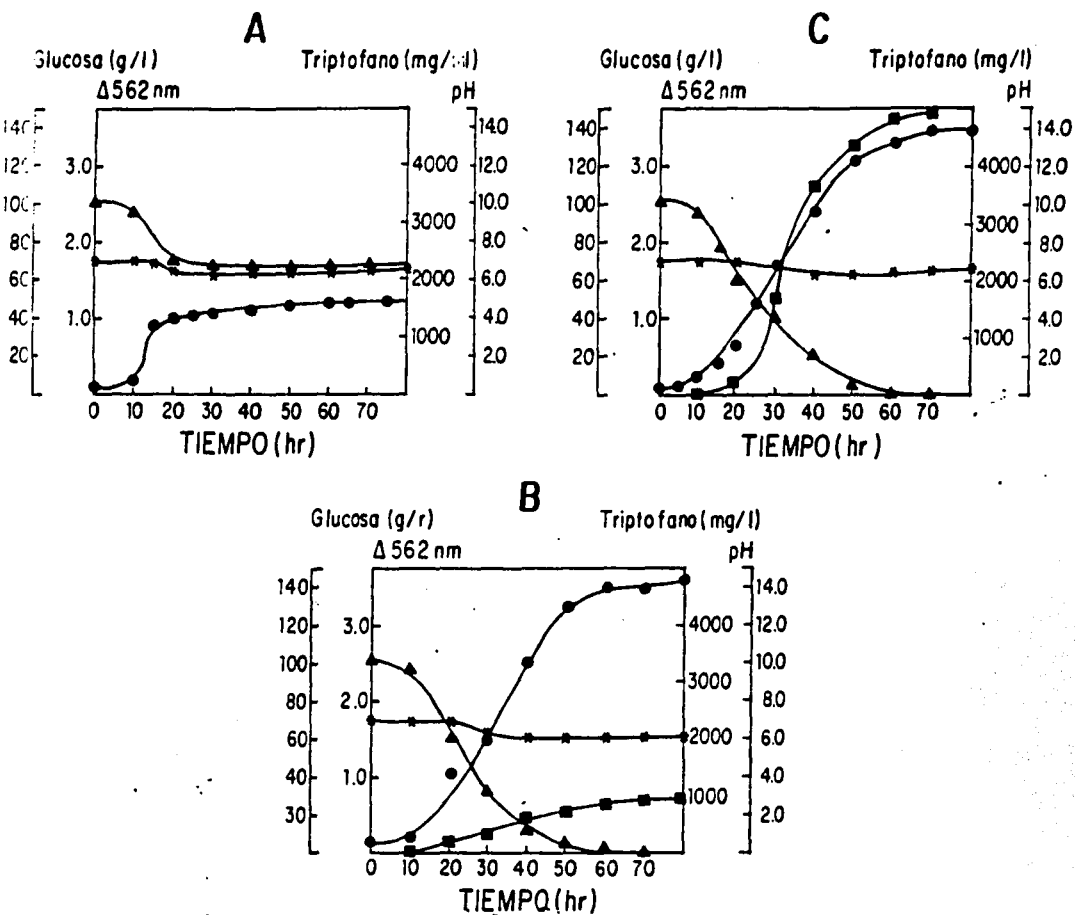


Fig 9 Cinética de crecimiento y producción de las cepas de *Brevibacterium Flavum* (A) Silvestre; (B) DV-12; (C) DV-125; Crecidas sobre medio M3, complementado con 50 ug/ml de tirosina y glucosa al 10% ● Crecimiento, * pH ▲ Glucosa, ■ Triptofano producido.

TABLA IV. PRODUCCION DE TRIPTOFANO DE LAS CEPAS DE *Brevibacterium flavum* .

CEPAS	FENOTIPO	PRODUCCION (mg/l)	RENDIMIENTO %
<i>B. flavum</i> :			
21475	Silvestre	0.0	-
DV-1	Tyr ⁻	590.0	1.18
DV-12	Tyr ⁻ , 5MT ⁺	920.0	1.8
DV-13	Tyr ⁻ , 5MT ⁺	700.0	1.4
DV-14	Tyr ⁻ , 5MT ⁺	600.0	1.2
DV-121	Tyr ⁻ , 5FT ⁺ , SG ⁺	850.0	1.7
DV-124	Tyr ⁻ , 5FT ⁺ , SG ⁺	2000.0	4.0
DV-129	Tyr ⁻ , 5FT ⁺ , SG ⁺	2600.0	5.2
DV-125	Tyr ⁻ , 5FT ⁺ , SG ⁺	3900.0	7.8
		* 4800.0	9.6

* Producción de la cepa DV-125, en un fermentador de 2 litros.

siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. Se obtuvieron 300 mutantes resistentes a 5FT y SG. Los resultados de sobreproducción de triptofano fueron positivos para 70 cepas tomando como referencia la cepa ancestral; las cepas que más sobreproducen se muestran en la Tabla IV. Se puede apreciar que la cepa que más produce triptofano es la DV-125, que en fermentador de 2 litros produce 4800 mg/l de triptofano. Las condiciones de fermentación fueron las siguientes: 400 rpm, pH 7, glucosa 50 g/l, 1 vvm de aire, el volumen de fermentación 1.5 l y la temperatura de fermentación 30 °C.

4.4. Determinación de la enzima DAHP sintetasa en extractos crudos de las cepas de *E. coli* y de *Brevibacterium flavum*.

La determinación de la actividad enzimática tenía como finalidad observar qué tanto se había logrado desinhibir la DAHP sintetasa con el tratamiento a los diferentes análogos de triptofano. Los resultados se resumen en la Tabla V. Estos muestran que en la mutante de *E. coli* B-057 la actividad de la enzima se conserva parcialmente en presencia de los tres aminoácidos, debido quizás a que una de las isoenzimas, la que es inhibida directamente por triptofano, se encuentra fuera de control por el producto final como consecuencia del proceso mutagénico al tratarla.

TABLA V. DETERMINACION DE LA ENZIMA DAHP SINTETASA, EN LAS CEPAS DE E. coli Q-358, B-057, B-056 Y DE B. flavum 21475.

CEPAS	ADICIONES	ACTIVIDAD (U/min)	% INHIB.
<u>E. coli</u> Q-358	-	35	-
	Tyr, Phe, Trp 1 mM	0	100
<u>E. coli</u> B-057	-	38	-
	Tyr, Phe, Trp 1 mM	25	48.2
<u>E. coli</u> B-056	-	39	-
	Tyr, Phe, Trp 1 mM	0	100
<u>B. flavum</u> 21475	-	29	-
	Trp 1 mM	28	-
	Tyr, Phe, Trp 1 mM	0.3	99
<u>B. flavum</u> DV-12	-	30	-
	Trp 1 mM	26	-
	Tyr, Phe, Trp 1 mM	0	100
<u>B. flavum</u> DV-125	-	29	-
	Trp 1 mM	28	-
	Tyr, Phe, Trp 1 mM	0.2	99.9

La actividad se define como umoles de producto producido, por mg de proteína, por minuto.

Por lo tanto, la cepa mutante presenta actividad similar a la observada bajo condiciones de desinhibición en la cepa Q-358.

En lo referente a *Brevibacterium flavum* hay inhibición en las cepas mutantes, al igual que en la cepa silvestre, sólo en presencia de los tres aminoácidos. La DAHP sintetasa en este microorganismo no es inhibida por triptofano. En este caso la inhibición es por tirosina y fenilalanina, de forma sinérgica ya que por separado el efecto inhibitorio es muy pobre.

Por lo anterior, podemos decir que sólo ha sido modificado el sitio alostérico para triptofano de esta cepa.

5.- DISCUSION DE RESULTADOS.

La obtención de triptofano a partir de microorganismos, despertó el interés de varios grupos de investigación a fines de los años 60 y principios de los 70. Esto fue como consecuencia de un incremento en la demanda de este aminoácido, tanto por la industria pecuaria como por la industria farmacéutica.

La realización del presente trabajo tiene el objeto de contribuir en la búsqueda de un método que nos permita sobreproducir triptofano, dado que en México no se produce triptofano y la demanda se cubre importándolo o utilizando hidrolizados protéicos. En otros países, han descrito mutantes que producen este aminoácido por medio de fermentación directa a partir de azúcares (4, 5, 28, 29, 35, 36, 42, 43, 52). Además en nuestro país se cuenta con subproductos de la industria azucarera (melazas) y derivados del petróleo que se pueden reutilizar como fuentes de carbono para microorganismos y no sólo obtener triptofano sino también algunos otros metabolitos de interés industrial.

En el presente trabajo se compara la producción de triptofano de las cepas *Escherichia coli* Q358 y *Brevibacterium flavum* 21475. Para lograr nuestro objetivo dichas cepas se sometieron a mutagénesis con NTG, para disminuir o eliminar los mecanismos regulatorios que controlan la biosíntesis de triptofano y otros aminoácidos aromáticos (3, 26).

En las Figs. 6 y 7 las curvas típicas de utilización de

glucosa como sustrato, a diferentes concentraciones de fuente de carbono, son muy parecidas por lo que podemos concluir que, en el caso de glucosa, la concentración de ésta no influye en el crecimiento. Cuando se determinó glucosa residual se vió que este sustrato no es totalmente utilizada y que el crecimiento se detiene por acidificación del medio.

La mutante auxotrófica Q358-B057 y las mutantes resistentes a 5MT, como se observa en la Tabla III, producen más triptofano que la cepa silvestre Q358 y que la ancestral auxótrofa a fenilalanina y tirosina. El problema de estas cepas mutantes es que a la par de la resistencia a 5MT se activa un sistema degradador de triptófano (ver Fig. 8D), el cual a concentraciones altas de glucosa en la cepa ancestral es reprimido, pero al obtener resistencia al análogo de triptofano, aún en concentraciones altas de glucosa, no se reprime la triptofanasa y el microorganismo utiliza triptofano como fuente de carbono.

Por el contrario, con la cepa silvestre de *B. flavum* no hay producción de triptofano, pero la mutante auxotrófica a tirosina, produce 600 mg/l a nivel de matraz agitado y las mutantes resistentes a 5MT producen casi el doble de triptofano con respecto a su cepa ancestral y 2.5 veces más que la mejor productora de *E. coli*. Luego si comparamos la cepa que produce más triptofano de *B. flavum* con la cepa que más produce de *E. coli*, nos encontramos que la cepa mutante DV-125 de *B. flavum* produce 12 veces más triptofano que la mutante de *E. coli*.

Las mutantes de *E. coli* Q358-B057 resistentes a 5MT, mostraron tener desinhibida la DAHP sintetasa como se muestra en la Tabla V, lográndose que la enzima trabaje en presencia de triptofano y 5MT. Pero la sobreproducción de triptofano es pobre, aunque más elevada que la cepa ancestral, como lo muestra la Tabla III.

Las cepas de *E. coli* presentan un sistema degradador de triptofano (triptofanasa) el cual se activa cuando empieza a agotarse el sustrato. De esta manera, si la determinación se hace en fase exponencial tardía es factible que el microorganismo utilice el triptofano como fuente de carbono y no se logre detectar en el sobrenadante. Estos resultados son similares a los ya reportados por Hiraga et al (23), donde se describe que ese sistema es regulado catabólicamente. Los mismos autores describen que mutantes resistentes a 5-MT pueden ser resistentes a la represión catabólica. Lo anterior explica el por qué si determinamos la producción de triptofano en fase exponencial tardía, no hay producción de triptofano puesto que la bacteria lo ha utilizado para su crecimiento.

Lo mismo puede verse con la cepa QD-01 que produce en 7 h, 55 mg/l de triptofano; pero si la determinación se hace a las 10 h de fermentación, disminuye la producción y a las 16 h de fermentación ya no hay producción de triptofano. Este mismo comportamiento se observó con las otras cepas que tenían menor producción de triptofano, y también con una cepa de mayor producción (Q358-B056). Cabe destacar que esta cepa puede

incrementar su producción variando los parámetros de fermentación, aunque se necesita desperdiciar sustrato para no activar la triptofanasa. Comparando la máxima producción con la reportada por otros autores observamos que todavía su rendimiento es bajo, aclarando que los trabajos reportados se realizaron utilizando técnicas de ADN recombinante en una cepa de *E. coli* Tna^A (4, 5), la cual carece de triptofanasa.

La evaluación de la producción de triptofano por cromatografía en papel, permitió hacer un tamizado de las cepas mutantes; y la técnica de complementación auxotrófica nos permitió cuantificarlo utilizando las cepas *E. coli* Trp⁻ y *Salmonella typhimurium* Trp⁻. La técnica de complementación auxotrófica es una buena técnica y rápida de desarrollarse. Es específica, dado que no utiliza intermediarios que pudieran interferir en la cuantificación. Otra ventaja es que no requiere de equipo sofisticado y al no contar con equipo HPLC es una buena solución, ya que sólo se requiere la cepa y un estándar de referencia.

Las curvas patrón, para las cepas *E. coli* Trp⁻ y *Salmonella typhimurium* Trp⁻ muestran en un intervalo de 0 a 600 ug de triptofano/l de medio, un comportamiento de proporcionalidad con el crecimiento; por encima de esas concentraciones las cepas se saturan y la relación ya no es lineal. Ambas cepas fueron examinadas en cuanto a su crecimiento en presencia de ácido antranílico, indol y triptofano, para desechar que se estuvieran detectando precursores en lugar del producto terminal. Por tal razón se decidió trabajar con *Salmonella typhimurium* Trp⁻, que sólo

requiere triptofano. Por lo que creemos que es un buen método, mejor que las técnicas colorimétricas, dado que esas técnicas determinan algunos de esos intermediarios como indol o ácido antranílico.

Las cepas utilizadas no muestran reversión al sembrarse en medio mínimo sin triptofano.

Antes de empezar el presente trabajo se tenían los antecedentes de que *E. coli* es el microorganismo mejor conocido genéticamente, de ahí la importancia de utilizarla como cepa hiperproductora. Hiraga et al (23), habían descrito la obtención de mutantes operador constitutivas, en *E. coli* K-12, por resistencia a 5-metiltriptofano, pero ellos no reportan producción de triptofano por esas cepas.

Intentamos obtener una cepa Tna A⁻ sin éxito. Esto tal vez se debió a que el gene Tna A⁻ se encuentra en una zona donde hay genes indispensables y las mutantes obtenidas no son viables. Sólo hay una cepa *E. coli* Tna A⁻ descrita por el Dr. Yanofsky, no se describe como se obtuvo y es la que han utilizado en los trabajos anteriores sin mucho éxito.

Estos resultados indicaban que aunque *E. coli* genéticamente es muy conocida, para el fin que perseguíamos no era la más indicada. Aiba et al. (4), trabajando con la cepa de *E. coli* obtenida por Yanofsky y utilizando ingeniería genética obtienen como producción máxima 5.0 g/l, producción que es superada por cepas mutantes regulatorias de *Brevibacterium* (36, 37, 42). Por ello se optó por cambiar de microorganismo y decidimos utilizar *B. flavum* 21475,

porque esta cepa se conoce como productora de aminoácidos, además de no ser patógena. Esta cepa para crecer requiere biotina, tiamina y no produce triptofano.

Como lo muestran los resultados, rápidamente se observó el cambio. La producción se incrementaba drásticamente de 0 a casi 600 mg/l, en matraz agitado. Esto tal vez debido a que la regulación de la biosíntesis de triptofano en el primer paso de la vía es realizado por una enzima, la cual a su vez es regulada en forma concertada por tirosina y fenilalanina; y cuando se elimina alguno de los aminoácidos que inhiben a la enzima, esta inhibición es inferior al 30 % (38).

Cuando se obtuvieron mutantes resistentes a análogos de triptofano se observó un incremento en la producción. Pero el consumo de sustrato no era el óptimo, lo que nos llevó a probar si el pH, la agitación o el oxígeno pudieran estar afectando la fermentación. Encontramos que el medio no se acidifica muy rápido como ocurre en *E. coli* y que, al incrementar la agitación, no mejoraba el crecimiento. El oxígeno se suministró burbujeando aire filtrado a través de un cartucho de fibra de vidrio previamente esterilizado. Con este dispositivo se logró incrementar la producción de la cepa aunque no eran condiciones estandarizadas, por lo que se procedió a estandarizar esas condiciones en un fermentador.

No obstante que *B. flavum* no acidifica el medio muy rápido como *E. coli*, requiere un pH de 7 para tener buena producción. Encontrando que sí se deja acidificar el cultivo se produce

fenilalanina, en lugar de triptofano durante la fermentación.

No hubo un incremento en actividad de DAHP sintetasa en las cepas mutantes Tyr⁻ de *B. flavum* que fueron tratadas con los análogos de triptofano. Aunque también se observa que las cepas de *E. coli* no se encuentran desinhibidas. Sólo las derivadas de *E. coli* Q358-B057, tienen desinhibida la DAHP sintetasa. Lo anterior se explica por la presencia de tres isoenzimas, donde cada una es regulada por uno de los productos finales. Por el contrario, en el género *Brevibacterium*, la única DAHP sintetasa es sólo regulada por tirosina y fenilalanina. Si bien es cierto que *E. coli* Q358-B057 tiene más desinhibida su DAHP sintetasa, esto no se refleja en la producción, porque a la par se activa la triptofanasa y hay degradación del triptofano. No así en *Brevibacterium*, dado que al no haber triptofanasa que degrade triptofano éste se acumula en el caldo de cultivo.

6. -CONCLUSIONES.

Los resultados anteriores permiten concluir lo siguiente:

1.- *Escherichia coli* Tyr⁻, Phe⁻, produce triptofano en medio mínimo suplementado con 50 ug/ml de tirosina y fenilalanina más glucosa como fuente de carbono al 1 %; pero esa hiperproducción es muy baja para utilizar la cepa a nivel industrial. La cepa parental Q-358 no produce triptofano.

2.- Cuando la cepa Q358-B057, es tratada con 5-metiltriptofano, se logra un incremento en la hiperproducción, pero conforme se acaba el sustrato el triptofano es utilizado como fuente de carbono.

3.- La obtención de mutantes resistentes a 5-metiltriptofano permite también obtener mutantes resistentes a la represión catabólica del sistema triptofanasa.

4.- Para los fines deseados *Escherichia coli* no es el modelo ideal aunque genéticamente sea bastante conocida.

5.- La determinación de triptofano por complementación auxotrófica mostró ser la más adecuada para la determinación de triptofano, porque las técnicas colorimétricas determinan triptofano e indol y nuestra técnica no determina indol, sólo triptofano.

6.- *Brevibacterium flavum* fue la cepa que mejores resultados nos dió. Dado que sólo con auxotrofia a tirosina su producción superó 6 veces más a la producción de *E. coli*.

7.- La producción de la cepa anterior se logró incrementar grandemente como lo muestran los resultados, cuando fue tratada con los análogos de triptofano y sulfaguanidina. Es una cepa estable

genéticamente.

8.- Los niveles de DAHP sintetasa como lo muestran los resultados se encuentran más elevados en las cepas de *E. coli* que en las cepas de *B. flavum*. Esto puede ser porque en *Brevibacterium* la DAHP sintetasa es regulada por tirosina y fenilalanina, y los análogos utilizados no actúan entonces sobre la enzima. El ligero incremento en actividad es debido a que la cantidad de tirosina adicionada al medio de cultivo decrece con el desarrollo bacteriano, disminuyendo la inhibición enzimática.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- ABE, S and TAKAYAMA, K (1972) Amino acid producing microorganisms: variety and classification. in: The microbial production of aminoacids. Yamada, K. et al., eds. Kodansha Ltd. Tokyo. pp 1-33.
- 2.- ADELBERG, E. (1958) Selection of bacterial mutants which excrete antagonists of antimetabolites. J. Bacteriol. 76:326.
- 3.- ADELBERG, E. A., MANDEL, M. and CHEIN CHIN CHEN, G. (1965) Optimal conditions by N-metil-N'-nitro-N- nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. Biochem and Biophys. Res. Comm. 18:788-795.
- 4.- AIBA, S., IMANAKA, T. and TSUNEKAWA, H. (1980) Enhancement of tryptophan production by *Escherichia coli* as an aplication of genetic engineering. Biotech. Lett. 2:525-530
- 5.-AIBA, S, TSUNEKAWA, H. and IMANAKA, T. (1982) New approach to tryptophan production by *Escherichia coli* : Genetic manipulation of composite plamids in vitro. Appl. Environ. Microbiol. 43: 285-296.
- 6.- ALVAREZ DE LA CUADRA, J., DE LA GARZA, A. M. and ORTEGA, M. V. (1986) Biochemical and genetic characterization of L- glutamate transport and utilization in *Salmonella typhimurium* LT-2 mutants. Biochem. Gen. 24:195-205.
- 7.- ALVAREZ DE LA CUADRA, J. J (1993) Producción de aminoácidos por vía microbiana. En: La BIOTECNOLOGIA HOY. ED. CONACYT. pp.43-54.
- 8.- BOGOSIAN, G., BERTRAND, K. and SOMERVILLE, R. (1981) Trp repressor protein controls its own structural gene. J. Mol. Biol. 149:821-825.

- 9.- BROWN, K. D. and DOY, C. H. (1966) Control of three isoenzymic 7-phospho-2-oxo-3-deoxy-D-arabino-heptonate-D-erythrose-4-phosphate lyase of *Escherichia coli* W and derived mutants by repressive and "inductive" effects of the aromatic amino acids. *Biochem Biophys Acta* **118**:157-172.
- 10.- BROWN, K.D. (1968) Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in *Escherichia coli* K12. *Genetics* **60**: 31-48.
- 11.- BROWN, K. D. (1970) Formation of aromatic amino acid pools in *Escherichia coli* 3 K-12. *J. Bacteriol.* **104**:177-188.
- 12.- BROWN, K. D. and SOMERVILLE, R. L. (1971) Repression of aromatic amino acid biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **108**: 386-399.
- 13.- CAIRNS, J., OVERBANGH, J. and MILLER S. (1988) The origin of mutants. *Nature (London)* **335**: 142-145.
- 14.- CAMAKARIS, H. and PITTARD, J. (1973) Regulation of tyrosine and phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: Properties of the *tyrR* gene product. *J. Bacteriol.* **115**:1135-1144.
- 15.- CRAWFORD, I. (1975) Gene rearrangements in the evolution of the tryptophan synthetic pathway. *Bacteriol. Rev.* **39**: 87-120.
- 16.- CRAWFORD, I. (1989) Regulation of tryptophan biosynthesis. *Ann. Rev. Microbiol.* **43**: 567-600.
- 17.- DOY, C. H. and BROWN, K. D. (1965) Control of aromatic biosynthesis: The multiplicity of 7-Phospho-2-Oxo-3-Deoxy-D-arabino-heptonate-D-erythrose-4-phosphate-lyase (pyruvate-Phosphorylating) in *Escherichia coli* W. *Biochem. Biophys. Acta* **104**:377-389.

- 18.- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K, REBERS, P. A. and SMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **23**:350-356.
- 19.- GIBSON, F. and PITTARD, J. (1968) Pathways of biosynthesis of aromatic amino acids and vitamins and their control in microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **32**: 465-492.
- 20.- GODINEZ, V. D. (1989) Obtención de mutantes de *Bacillus subtilis* sobreproductoras de metionina. Tesis de Licenciatura FES-CUAUTITLAN UNAM.
- 21.- GOLUB, E., ZALKIN, H. and SPRINSON, D. B. (1970) Aromatic amino acid. In: *Methods in enzymology*. Sidney P. Colowick and N.O Kaplan., Eds. Academic Press New York Vol. **XVII**. pp 349-415.
- 22.- GONCHAROFF, P. and NICHOLS, B.P. (1984) Nucleotide sequence of *Escherichia coli* *pabB* indicates a common evolutionary origin of p-aminobenzoate synthetase and anthranilate synthetase. *J. Bacteriol.* **159**: 57-62.
- 23.- HIRAGA, S. (1969) Operator mutants of the tryptophan operon in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **39**: 159-179.
- 24.- HU, C. and SPRINSON, D. (1977) Properties of tyrosine-inhibitable 3-deoxy-D-arabinoheptulosonic acid-7-phosphate synthase from *Salmonella*. *J. Bacteriol.* **129**:177-183.
- 25.- LARGEN, M. and BELSER, W.L. (1975) Tryptophan biosynthetic pathway in the *Enterobacteriaceae*: Some physical properties of the enzymes. *J. Bacteriol.* **121**: 239-249.
- 26.- LUBIN, M. (1962) Enrichment of auxotrophic mutant populations by recycling. *J. Bacteriol.* **83**:696-697.

- 27.- MILSTEIN, M. M. S. (1989) Historia de la biotecnología. Ciencia y Desarrollo CONACYT XIV:19-32
- 28.- NAKAYAMA, K. (1982) Amino acids. In: Industrial Microbiology. Prescott and Dunn's, Eds. 4th. Gerald Reed. Avi. Publishing CO., 10C. pp.748-801.
- 29.- NAKAYAMA, K. (1990) The tryptophan. In: Comprehensive Biotechnology. Murray-Moo-Young, Eds. Pergamon Press Vol. 3 pp 621-633.
- 30.- NAKAZAWA, H., ENEI, H. and OKUMURA, S. and YOSHIDA, H and YAMADA, H. (1972) Enzymatic preparation of L-tryptophan and 5-hydroxy-L-tryptophan. FEBS Lett. 25:43-45.
- 31.- ORTEGA, M. V. and AGUILAR, C. (1973) Biochemical and genetic characterization of a mutant of *Salmonella typhimurium* defective in locus for glutamate deshydrogenase activity. Mol. Gen. Genet. 125: 351-358.
- 32.- PABST, M.J., KUHN, J.C. and SOMERVILLE, R.L. (1973) Feedback regulation in the anthranilate aggregate from wild type and mutant strains of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 248: 901-914.
- 33.- SANO, K. and MATSUI, K. (1987) Structure and function of the trp operon control regions of *Brevibacterium lactofermentum*, a glutamic-acid-producing bacterium. Gene 53:191-200.
- 34.- SEN, K. A. and LIU, W. (1990) Dynamic analysis of genetic control and regulation of amino acid synthesis: The tryptophan operon in *Escherichia coli*. Biotech. and Bioeng. 35:185-194.
- 35.- SHIIO, I., MIYAJIMA, R. and NAKAYAWA. (1972) Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. J. Biochem. 72: 1447-1455.

- 36.- SHIIO, I., SATO, H. and NAKAGAWA, M. (1972) L-Tryptophan production by 5-methyltryptophan-resistant mutants of glutamate-producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **36**:2315-2322.
- 37.- SHIIO, I., ISHI, K. and YOKOZCKI, K. (1973) Production of L-tryptophan by 5-fluorotryptophan resistant mutants of *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* **37**:1991-2000.
- 38.-SHIIO, I., SUGIMOTO, S. and MIYAJIMA, R. (1974) Regulation of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthetase in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* **75**:987-997.
- 39.- SHIIO, I and SUGIMOTO, S (1978) Altered regulatory mechanisms for tryptophan synthesis in fluorotryptophan-resistant mutants of *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* **83**:879-886.
- 40.- SHIIO, I. and SUGIMOTO, S. (1979) Two components of chorismate mutase in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* **86**:17-25.
- 41.-SHIIO, I and SUGIMOTO, S. (1981) Regulation at metabolic branch points of aromatic amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 2197-2207.
- 42.-SHIIO, I., SUGIMOTO, S. and KAWAMURA, K. (1982) Production of L-tryptophan by azaserine-resistant mutants of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **46**:1849-1854.
- 43.- SHIIO, I., SUGIMOTO, S. S. and KAWAMURA, K. (1984) Production of L-tryptophan by sulfonamide-resistant mutants. *Agric. Biol. Chem.* **48**:2073-2080.
- 44.- SIMPSON, R. and DAVIDSON, B. (1976) Studies on 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthetase (phe) from *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* **70**:493-500.

- 45.- SUGIMOTO, S., NAKAGAWA, M., TSUCHIDA, T and SHIIO, I. (1973) Regulation of aromatic amino acid biosynthesis and production of tyrosine and phenylalanine in *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. **37**:2327-2336.
- 46.- SUGIMOTO, S. and SHIIO, I. (1977) Enzymes of tryptophan synthetic pathway in *Brevibacterium flavum*. J. Biochem. **81**:823-833.
- 47.-SUGIMOTO, S. and SHIIO, I. (1982) Tryptophan synthase and production of L- tryptophan in regulatory mutants. Agric. Biol. Chem. **46**:2711-2718.
- 48.- SUGIMOTO, S and SHIIO, I. (1983) Regulation of tryptophan biosynthesis by feedback inhibition of the second-step enzyme, anthranilate phosphoribosyl-transferase, in *Brevibacterium flavum* Agric. Biol. Chem. **47**:2295-2305.
- 49.- TERAZAWA, M., INUI, M., UCHIDA, Y., KOBAYASHI, M., KURUSU, Y. and YUKAWA, H. (1991) Application of the tryptophanase promoter to high expression of the tryptophan synthase gene in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **34**: 623-627.
- 50.- TERUI, G. (1972) Tryptophan: The microbial production of amino acids. Yamada, et al., Eds. Kodansha Ltd. Tokyo. pp. 515-532.
- 51.- TRIBE, D.E., CAMAKARIS, H. and PITTARD, J. (1976) Constitutive and repressible enzymes of the common pathway of aromatic biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: regulation of enzyme synthesis at different growth rates. J. Bacteriol. **127**: 1085-1097.
- 52.-TRIBE, D.E. and PITTARD, J. (1979) Hyperproduction of tryptophan by *Escherichia coli*: Genetic manipulation of the pathways leading to tryptophan formation. Appl. Environ. Microbiol. **38**: 181-190.

53.- UMBARGER, E. H. (1978) Amino acid biosynthesis. Ann. Rev. Biochem. 47:533-606

54.- YANOFSKY, C. (1988) Transcription attenuation. J. Biol. Chem. 263: 609-612.