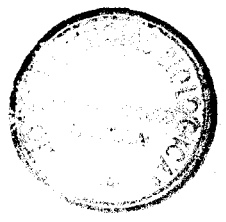


UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
149 206  
21 JUNIO 1992  
Instituto de Estudios de Toxicología  
Alcira de Pite

R.11725



**SINTESIS Y SUPERPRODUCCION DE AMINOACIDOS  
DERIVADOS DEL ACIDO ASPARTICO EN  
*Saccharomyces cerevisiae***

Trabajo realizado en el Departamento de Genética, Facultad de Biología,  
Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
por el Licenciado

**Enrique Martínez Force**

Sevilla, Junio de 1992

TD 548

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
Departamento de Genética  
de la Facultad de Biología  
Sevilla, a los \_\_\_\_\_ días  
del mes de \_\_\_\_\_ de 1992  
El Encargado de

Directora:

Dra. Tahía Benítez Fernández  
Profesora Titular de Genética

**A mis padres**

**A Alicia**

## INDICE

INTRODUCCION.....	1
LOS AMINOACIDOS EN LA ALIMENTACION.....	2
PRODUCCION INDUSTRIAL DE AMINOACIDOS.....	3
METODOS PARA LA DETECCION Y CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS.....	5
BIOSINTESIS DE AMINOACIDOS EN LEVADURAS.....	7
Metabolismo de los aminoácidos derivados del aspártico.....	7
Ruta común de síntesis de metionina y treonina.....	7
Anabolismo y catabolismo de la metionina.....	10
Anabolismo y catabolismo de la treonina.....	13
Regulación de la ruta de síntesis de metionina y treonina.....	13
Regulación de la actividad enzimática.....	14
Regulación de la síntesis enzimática.....	15
MUTANTES SUPERPRODUCTORES DE AMINOACIDOS.....	17
OBJETIVOS DE ESTA TESIS.....	20
MATERIALES.....	21
1. CEPAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
1.1. Nomenclatura genética.....	22
1.2. Cepas utilizadas.....	23
2. PRODUCTOS QUIMICOS.....	25
3. TAMPONES.....	25
3.1. Tampón AT.....	25
3.2. Tampón BT.....	25
3.3. Tampón CPE.....	25
3.4. Tampón CPES.....	27
3.5. Tampón Borato sódico.....	27
3.6. Tampones Fosfato.....	27
3.6.1 Tampón fosfato potásico.....	27
3.6.2 Tampón fosfato sódico 400 mM (pH 7.2).....	27
3.7. Tampón TBE.....	27
3.8. Tampón TE.....	28
3.9. Tampón TESP.....	28
4. MEDIOS LIQUIDOS.....	28
4.1. Medios mínimos.....	28
4.1.1. Medio mínimo (SD).....	28
4.1.2. Medio mínimo con prolina como única fuente de nitrógeno (SDP).....	28
4.1.3. Medios mínimos con una fuente de carbono distinta de la glucosa (SF, SG, SE).....	29
4.2. Medios mínimos con hidroxinorvalina (SDh).....	29
4.3. Medios mínimos con etionina (SDe).....	29
4.4. Medios semi-industriales.....	29
4.5. Medios completos.....	29
4.5.1. Medio completo (YPD).....	29
4.5.2. Medios completos con una fuente de carbono distinta de la glucosa (YPF, YPG, YPE).....	30
4.6. Medios de esporulación.....	30
4.6.1. Medio de esporulación SPO.....	30
4.6.2. Medio de esporulación SPOQ.....	30
5. MEDIOS SOLIDOS.....	30

5.1. Medios mínimos.....	30
5.1.1. Medio mínimo estricto (MM).....	30
5.1.2. Otros medios mínimos.....	31
5.2. Medio completo.....	31
5.3. Medio para micromanipulación.....	31
5.4. Medio de preesporulación (PSP).....	31
5.5. Medios de esporulación.....	31
<b>METODOS.....</b>	<b>32</b>
1. CONDICIONES DE CULTIVO.....	33
1.1. Cultivo discontinuo.....	33
1.1.1. Obtención de precultivos.....	33
1.1.2. Cultivos de 10 a 500 ml.....	33
1.2. Cultivo continuo.....	33
1.2.1. Quimiostato.....	35
-Experimentos de dependencia entre la concentración interna de aminoácidos y la tasa de dilución.....	35
-Obtención del mutante ETHCC8.....	35
1.2.2. Turbidostato controlado por pH.....	35
1.3. Curvas de crecimiento.....	36
2. DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS.....	36
2.1. Células totales.....	36
2.2. Células viables.....	36
3. DETERMINACION DEL PESO DE CELULAS.....	37
3.1. Peso húmedo.....	37
3.2. Peso seco.....	37
4. DETERMINACIONES ANALITICAS.....	37
4.1. Cuantificación de ADP.....	37
4.2. Medida de actividades enzimáticas.....	39
4.2.1. Obtención del extracto semipurificado.....	40
Preparación de extractos crudos.....	40
Precipitación con sulfato de protamina.....	41
Precipitaciones con sulfato amónico.....	41
Conservación del extracto.....	41
4.2.2. Ensayos enzimáticos.....	42
4.2.2.1. Aspartato quinasa.....	42
Reactivos.....	42
Mezcla de reacción.....	42
Unidades de actividad.....	43
4.2.2.2. Homoserina quinasa.....	43
4.2.2.3. Homoserina deshidrogenasa.....	43
4.2.2.4. Treonina deshidrogenasa.....	44
4.2.2.5. Treonina desaminasa.....	44
4.2.2.6. S-adenosil-metionina sintetasa.....	45
4.3. Cuantificación de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	45
4.3.1. Obtención de muestras.....	45
Concentración intracelular.....	45
Concentración extracelular.....	46
4.3.2. Equipo de HPLC utilizado.....	46
4.3.3. Solventes.....	47
4.3.4. Condiciones cromatográficas.....	47
4.3.5. Mezcla derivatizante.....	47
4.3.6. Tratamiento.....	48
4.3.7. Tiempos de retención.....	48



4.4. Cuantificación de S-adenosil-metionina.....	51
4.5. Cuantificación de glucosa.....	52
4.6. Cuantificación de proteínas totales.....	52
En muestras de cultivo.....	52
En extractos crudos.....	52
4.7 Determinación de piruvato.....	52
5. METODOS GENETICOS.....	53
5.1. Obtención de híbridos entre cepas homotáticas y heterotáticas.....	53
5.2. Disección de ascas.....	53
5.3. Caracterización de productos meióticos.....	54
5.3.1. Sexo.....	54
5.3.2. Esporulación.....	54
5.3.3. Auxonografía.....	55
5.3.4. Resistencia a tóxicos.....	55
5.3.5. Otros caracteres.....	55
5.4. Cariotipo.....	56
5.4.1. Preparación de las muestras.....	56
5.4.2. Preparación del gel y teñido.....	56
5.4.3. Equipo utilizado.....	57
5.4.4. Parámetros utilizados en la separación.....	57
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
1. CARACTERISTICAS DE LA CEPA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFI256.....	59
1.1. Características fisiológicas.....	59
1.1.1. Tamaño y volumen celular.....	59
1.1.2. Utilización de fuentes de carbono.....	59
1.2. Características genéticas.....	61
1.2.1. Cariotipo.....	61
1.2.2. Sexo y esporulación.....	63
2. METODO DE CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS.....	63
2.1. Gradientes utilizados.....	63
2.2. Relación entre la intensidad de la reacción de derivatización y la concentración de aminoácidos.....	68
2.3. Estabilidad de los OPA/MCE derivados de aminoácidos.....	68
3. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES SOBRE LA CONCENTRACION INTERNA DE AMINOACIDOS.....	74
3.1. Aminoácidos presentes en los medios de cultivo.....	74
3.2. Consumo de aminoácidos en el medio nutritivo y medios semi-industriales, a lo largo de la curva de crecimiento.....	76
3.3. Cambios en el contenido interno de aminoácidos en función del medio de cultivo.....	79
3.4. Cambios en el contenido interno de aminoácidos con la temperatura.....	81
3.5. Fermentación/respiración: cambios en el contenido interno de aminoácidos.....	84
3.6. Cambios en el contenido interno de aminoácidos con la tasa de crecimiento.....	88
3.7. Variación del rendimiento sustrato/biomasa (Y <sub>sx</sub> ) con la temperatura.....	96
4. SELECCION DE MUTANTES RESISTENTES A ANALOGOS TOXICOS.....	99
4.1. Efectos de la etionina en la estirpe silvestre IFI256.....	99
4.2. Efectos de la hidroxinorvalina en la estirpe silvestre IFI256.....	102

4.3. Efecto de la adición de metionina al medio de cultivo.....	102
4.4. Efecto de la adición de treonina al medio de cultivo.....	105
4.5. Selección de mutantes resistentes a etionina en cultivo continuo controlado por pH.....	107
4.5.1. Valores extremos de pH obtenidos en cultivo discontinuo.....	107
4.5.2. Selección de mutantes resistentes a etionina en cultivo continuo controlado por pH.....	107
4.5.3. Selección de mutantes resistentes a etionina en cultivo continuo.....	109
4.5.4. Selección de mutantes resistentes a hidroxinorvalina.....	110
5. CARACTERIZACION INICIAL DE LOS MUTANTES OBTENIDOS.....	113
5.1. Niveles de resistencia a los análogos.....	113
5.2. Tasa de crecimiento.....	114
5.3. Concentración interna de aminoácidos.....	115
5.4. Cariotipo.....	117
5.5. Sexo y esporulación en los mutantes.....	117
6. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LOS MUTANTES.....	118
6.1. Actividad aspartato quinasa.....	121
6.2. Actividad homoserina deshidrogenasa.....	122
6.3. Actividad homoserina quinasa.....	125
6.4. Inhibición de la homoserina quinasa por L-homoserina, L-treonina o L-metionina.....	128
6.5. Actividad S-adenosil-metionina sintetasa.....	129
7. ESTUDIO DE LA DEGRADACION DE TREONINA.....	133
7.1. Estudio de mutantes carentes de actividad treonina desaminasa anabólica y/o catabólica.....	133
7.2. Estudio de la degradación de treonina en los mutantes superproductores.....	136
7.2.1. Treonina desaminasa o deshidratasa.....	136
7.2.2. Treonina deshidrogenasa.....	137
<b>DISCUSION.....</b>	<b>138</b>
1. Separación de OPA/MEC derivados de aminoácidos.....	139
1.1. Caracterización del método de derivatización.....	139
1.2. Optimización del gradiente de separación.....	141
2. Factores que influyen en el contenido intracelular de aminoácidos.....	142
2.1. Influencia del medio de cultivo.....	142
2.2. Influencia de la temperatura.....	144
2.3. Influencia de la tasa de crecimiento.....	145
2.4. Influencia del metabolismo (fermentativo vs. respiratorio).....	145
2.5. Influencia de la fase de crecimiento (exponencial vs. estacionaria).....	148
3. Aislamiento de mutantes resistentes a análogos tóxicos de aminoácidos y su caracterización.....	148
3.1. Acumulación de aminoácidos e intermediarios en presencia de metionina, treonina, etionina e hidroxinorvalina.....	148
3.2. Multiplicidad y direccionalidad de las mutaciones obtenidas en cultivo continuo o discontinuo en presencia de análogos de aminoácidos.....	149

3.3. Papel de la aspartato quinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina quinasa y S-adenosil-metionina sintetasa en la regulación de los niveles de metionina y treonina.....153

3.4. Regulación de la síntesis enzimática frente a la regulación de la actividad enzimática.....156

3.5. Posible alteración de la configuración de los enzimas.....158

4. Mutantes afectados en la degradación de treonina: relación entre ésta y la acumulación de treonina.....159

**CONCLUSIONES.....161**

**BIBLIOGRAFIA.....164**

**AGRADECIMIENTOS.....174**

## PARAMETROS Y ABREVIATURAS UTILIZADAS.

X	Concentración de biomasa expresada como células/ml*.
$\Delta\bar{S}$	Diferencia entre la concentración de sustrato a tiempo cero y la concentración en el equilibrio (mmoles de glucosa).
$t_r$	Tiempo de residencia (h).
D	Tasa de dilución ( $h^{-1}$ )*.
$\mu$	Tasa de crecimiento ( $h^{-1}$ ).
$Y_{px}$	Rendimiento producto/biomasa (nmoles/ $10^6$ células).
$Y_{sx}$	Rendimiento sustrato/biomasa (mmoles de glucosa/ $10^6$ células).
$Y_{ps}$	Rendimiento producto/sustrato consumido (nmoles/mmoles de glucosa).
$\tau$	Tiempo de generación (h).
$K_i$	Constante de inhibición.
$K_m$	Constante de afinidad por el sustrato.
$V_{max}$	Velocidad máxima de una reacción enzimática.

\*Nota: si el valor es el de equilibrio el símbolo se encuentra bajo un guión.

A	Ala	Alanina	Y	Tyr	Tirosina
R	Arg	Arginina	T	Thr	Treonina
N	Asn	Asparragina	W	Trp	Triptófano
D	Asp	Aspártico	V	Val	Valina
C	Cys	Cisteína			
F	Phe	Fenilalanina			
G	Gly	Glicina			
E	Glu	Glutámico	Hom		Homoserina
Q	Gln	Glutamina	Ado-Met		S-adenosil-metionina
H	His	Histidina	Ado-Eth		S-adenosil-etionina
I	Ile	Isoleucina	Eth		Etionina
L	Leu	Leucina	Ahv		Hidroxinorvalina
K	Lys	Lisina	Cit		Citrulina
M	Met	Metionina			
P	Pro	Prolina			
S	Ser	Serina			

# **INTRODUCCION**

## LOS AMINOACIDOS EN LA ALIMENTACION.

A medida que las formas de vida se van haciendo más y más complejas, parecen depender de su dieta cada vez en mayor grado para el suministro del material orgánico necesario en la formación de sus estructuras. El motivo de ello es simplemente que han perdido algunos de los enzimas que poseen organismos más primitivos. Mientras que organismos procariotas, como *E. coli*, disponen de un suministro completo de enzimas para formar, a partir de materias inorgánicas, todos los aminoácidos, grasas, vitaminas e hidratos de carbono que necesita, el hombre carece de las enzimas necesarias para producir muchos de los aminoácidos, vitaminas y otros productos necesarios, que debe obtener ya elaborados, a través de los alimentos.

El organismo humano puede sintetizar aminoácidos a partir de cetoácidos y  $\text{NH}_3$ . Sin embargo, no todos los cetoácidos se hallan disponibles para la transaminación, nueve de los veinte cetoácidos correspondientes a los veinte aminoácidos proteícos no pueden ser sintetizados por el hombre. En consecuencia, esos nueve aminoácidos deben ser incluidos en la dieta, son los llamados aminoácidos esenciales (His, Phe, Trp, Val, Leu, Met, Thr, Ile y Lys). Una dieta equilibrada debe contener proporciones adecuadas de estos nueve aminoácidos esenciales, así como una cierta cantidad de arginina, que, aunque se sintetiza en el organismo, lo hace a velocidad muy lenta. El requerimiento de aminoácidos en la dieta se incrementa con la gestación, la lactancia y aparentemente en la vejez (Meister 1965).

La metionina, aminoácido esencial para el hombre, otros mamíferos y aves (Daghir. y Sell 1980), es sintetizada "de novo" en la mayoría de las bacterias, hongos y plantas. La mayor parte de la metionina en la dieta deriva de estas últimas. Quizás, ningún aminoácido puede ser considerado más importante que otro, pero la metionina cumple otras funciones además de formar parte de las proteínas. La metionina participa en la iniciación de la traducción del ARNm como aminoácido universal N-terminal. El derivado de la metionina Ado-Met no sólo es un importante agente de la metilación celular sino que también es un precursor de la biosíntesis de poliaminas. El contenido óptimo de metionina en la

dieta es de un 0,26-0,32%, aproximadamente un 2,6% del contenido en proteínas (Kiang y Zimmerman 1980).

Las dietas basadas en harinas de origen vegetal (maíz, arroz o trigo) son deficitarias en aminoácidos esenciales como metionina, lisina, triptófano o treonina (Florentino y Broquist 1974). Estas harinas ampliamente empleadas en los países en vías de desarrollo, provocan malnutrición y la aparición de síndromes como el "kwashiorkor" o el "marasmus" (Kobayashi *et al.* 1990). La producción de aminoácidos es, por tanto, importante desde un punto de vista nutricional, ya que éstos pueden añadirse a las harinas como suplemento alimenticio aumentando su valor biológico (este valor biológico es mayor cuanto más se asemeja la composición de la proteína ingerida a la producida por el organismo) o, simplemente, como potenciadores del sabor (por ejemplo, Glu del que se producen 270.000 toneladas/año). También se utilizan en alimentación animal por razones similares a las anteriormente expuestas, en medicina como ingredientes de infusiones para tratamientos post-operatorios o para suplir deficiencias en pacientes con alteraciones metabólicas (por ejemplo, la treonina se utiliza como base para la fabricación del antibiótico "Azthreonam"), en cosmética, etc... (Yoshida *et al.* 1990).

## PRODUCCION INDUSTRIAL DE AMINOACIDOS.

Los aminoácidos a nivel industrial pueden obtenerse mediante cuatro procesos diferentes (la utilización de uno u otro depende de su rentabilidad): **extracción a partir de hidrolizados de proteínas** (L-Arg/ L-Asn/ L-Cys/ L-Leu/ L-Tyr), **síntesis química** (D, L-Ala/ L-Gly/ D, L-Met/ L-Phe/ D, L-Ser/ L-Thr/ L-Trp/ L-Val), **síntesis enzimática** (L-Ala/ L-Asp/ L-Cit/ L-Cys/ L-Lys/ L-Met/ L-Phe/ L-Trp) y **fermentación** (L-Arg/ L-Glu/ L-Gln/ L-His/ L-Ile/ L-Leu/ L-Lys/ L-Orn/ L-Phe/ L-Pro/ L-Ser/ L-Thr/ L-Trp/ L-Tyr/ L-Val) (Araki 1990, Crueger y Crueger 1989).

De éstos, la fermentación es la que presenta más ventajas: los materiales sobre los que se desarrollan los microorganismos son productos agrícolas baratos (Minoda 1986), se producen formas naturales (L-aa), los microorganismos pueden ser utilizados como

piensos o fertilizantes, y es posible la utilización de mutantes (Momose *et al.* 1983).

Se puede decir que los procesos fermentativos son potencialmente competitivos frente a la síntesis química cuando los llevan a cabo bacterias o, en menor grado, cuando se utilizan eucariotas unicelulares (Vasey y Powell 1984). Las bacterias que se utilizan más frecuentemente para la producción de aminoácidos son *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* y distintas especies de los géneros *Corynebacterium* y *Brevibacterium* (Niederberger 1989, Aida 1986). Entre los microorganismos eucarióticos, se utilizan los del género *Hansenula*, *Candida* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Niederberger 1989).

Aunque los microorganismos procarióticos son mejores para la obtención de aminoácidos que los eucarióticos, no se suele utilizar biomasa de bacterias en alimentación, entre otros motivos, porque provoca rechazo social. En el caso de los aminoácidos utilizados como suplemento nutricional, una alternativa a la adición de aminoácidos purificados es, directamente, la utilización de biomasa de microorganismos que sea rica en aminoácidos. En este sentido, las levaduras tiene la ventaja de que son utilizadas habitualmente en la industria alimentaria y, además, pueden obtenerse en grandes cantidades como subproducto de industrias dedicadas a la fabricación de cerveza, o directamente cultivándolas en metanol, melazas de caña o remolacha (productos de desecho de las industrias azucareras (Spencer y Spencer 1983). Lamentablemente, las levaduras son relativamente pobres en aminoácidos esenciales, por lo que resulta interesante la modificación genética de cepas con el fin de aumentar su contenido en estos aminoácidos.

Por lo tanto, cepas de *Saccharomyces* enriquecidas en aminoácidos (por ejemplo, Met, Lys y Thr) se podrían añadir directamente a los cereales para incrementar su valor nutritivo, de forma que los aminoácidos necesarios no procederían de costosos procedimientos de purificación, pero si formarían parte integral del alimento.



## METODOS PARA LA DETECCION Y CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS.

Para la detección y cuantificación de moléculas se han desarrollado distintos métodos cromatográficos:

1. Cromatografía en papel (PC).
2. Cromatografía en capa fina (TLC).
3. Cromatografía de gases (GLC).
4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

De entre éstos, la cromatografía líquida de alta resolución se ha presentado como la más ventajosa, debido a la gran variedad de técnicas cromatográficas que se pueden utilizar (cromatografía de partición, de adsorción, de intercambio iónico, de exclusión, de afinidad, fase reversa, etc...), a la manipulabilidad de la fase móvil (en GLC no puede manipularse, y en TLC y PC la manipulación de la fase móvil implica la manipulación de la fase sólida), a la no destrucción de la muestra, a la rápida cuantificación de las sustancias separadas y a la selectividad de la fase móvil y estacionaria. Finalmente, la estabilidad de las moléculas a separar no es crítica debido a la rapidez del ensayo (Hogan *et al.* 1982).

Entre las técnicas cromatográficas que pueden ser utilizadas en cromatografía líquida de alta resolución encontramos las siguientes:

- a. Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución, basada en la interacción entre las moléculas cargadas de la fase estacionaria y los solutos e iones de la fase móvil.
- b. Cromatografía de exclusión de alta resolución, la separación se produce según los parámetros fisiológicos de las moléculas y no según sus propiedades químicas.
- c. Cromatografía de fase normal de alta resolución, la retención del soluto está gobernada por interacciones polares entre la fase estacionaria (polar) y la fase móvil.
- d. Cromatografía de fase reversa de alta resolución, en ella la fase estacionaria suele ser inerte (apolar) y las únicas interacciones con el soluto son hidrofóbicas.

e. Cromatografía de afinidad de alta resolución, el soluto es inmobilizado en la fase estacionaria de la columna.

De ellas, la que mayor desarrollo ha tenido es la cromatografía de fase reversa, debido a su versatilidad en las sustancias a separar, como por ejemplo en el análisis de compuestos de tejidos y fluidos fisiológicos o de drogas. De hecho, se estima que el 80% de los trabajos en HPLC se llevan a cabo mediante cromatografía en fase reversa (Gardner y Miller III 1980).

Salvo los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) ninguno de ellos presenta características físicas que permitan la estimación directa de éstos en solución. Esto hace necesario la derivatización de los aminoácidos (Hancock 1984). Se han utilizado distintos compuestos para la derivatización de aminoácidos:

1. Ninhidrina.
2. O-Phthalaldehido (OPA).
3. Fluorescamina.
4. Fenil isotiocianato.
5. Cloruro de dansilo (DNS-Cl).
6. Cloruro de dabsilo (DBS-Cl).
7. Diamino-azo-bence-isotiocianato.

La elección de uno de estos compuestos está basada en las características del método a desarrollar. El tiempo de incubación de la muestra con la sustancia derivatizante es crítica. Salvo para la fluorescamina y el O-ftaldialdehido, este tiempo supera los 20 minutos; asimismo, de ambos derivatizantes la fluorescamina reacciona con el agua, lo que produce ruido en muestras acuosas, como es el caso del contenido interno de aminoácidos. Por lo tanto, la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), con columnas de fase reversa C18 y derivatización precolumna de la muestra mediante O-ftaldialdehido es la más apropiada para la detección y cuantificación de aminoácidos en muestras fisiológicas (Fleury y Ashley 1983, Graser *et al.* 1985).

## BIOSÍNTESIS DE AMINOACIDOS EN LEVADURAS.

*Saccharomyces cerevisiae* sintetiza todos los aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas. En función de la molécula de la que deriva su esqueleto carbonado los aminoácidos pueden agruparse en seis familias (Fig. 1): la familia del oxoglutarato (Glu, Gln, Pro, Arg y Lys); la familia del oxaloacetato (Asp, Asn, Met, Thr e Ile); la familia del piruvato (Ala, Val y Leu); la familia del 3-fosfoglicerato (Ser, Gly y Cys); la familia del corismato o de los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr y Trp) y la familia de la ribosa-5-fosfato (His). Se puede decir que todas las familias menos la del oxoglutarato, que está íntimamente relacionada con el ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA), derivan de la glicólisis.

### Metabolismo de los aminoácidos derivados del aspártico.

El aspártico sirve de esqueleto para la biosíntesis de otros aminoácidos, como asparragina, metionina, treonina e isoleucina (Figs. 1 y 2). Esta última se suele incluir en los aminoácidos derivados del piruvato, pero parte de su esqueleto carbonado proviene de la degradación de treonina.

En procariotas, en Phycomycetes pertenecientes al orden Hyphochytridiales y a la familia Saprolegniaceae, y en plantas verdes la lisina también forma parte de la familia del aspartato sintetizándose por la vía del diaminopimelato (Yoshinaga y Nakamori 1983, Bryan 1980). En levaduras y en Phycomycetes pertenecientes a los ordenes Chytridiales y Blastocladales y a la familia Mucoraceae la lisina se sintetiza vía  $\alpha$ -aminoadipato, ruta biosintética que comienza en  $\alpha$ -cetoglutarato. El hecho de que en procariotas no exista esta vía sugiere que ha podido desarrollarse después de la aparición de los eucariotas (Bhattacharjee 1983).

### *Ruta común de síntesis de metionina y treonina.*

Tanto la biosíntesis de metionina como la de treonina se inician a partir del aspartato, y después de tres pasos enzimáticos se sintetiza homoserina (Fig. 2). A partir de este punto la ruta se

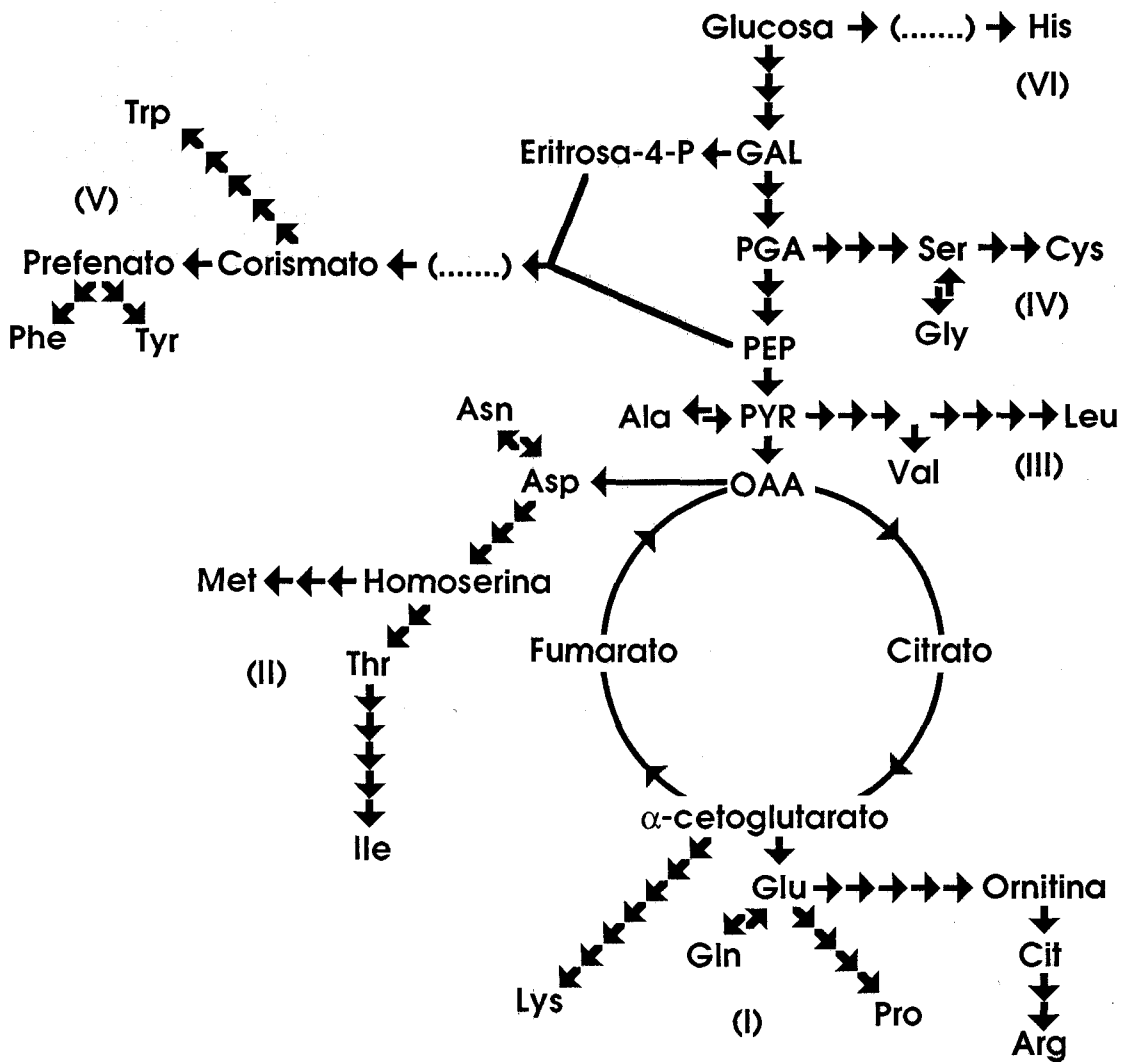


Figura 1. Esquema general de la síntesis de aminoácidos en levaduras. I: familia del  $\alpha$ -cetoglutarato; II: familia del oxaloacetato; III: familia del piruvato; IV: familia del 3-fosfo-glicerato; V: familia del corismato y VI: familia de la ribosa-5-fosfato.

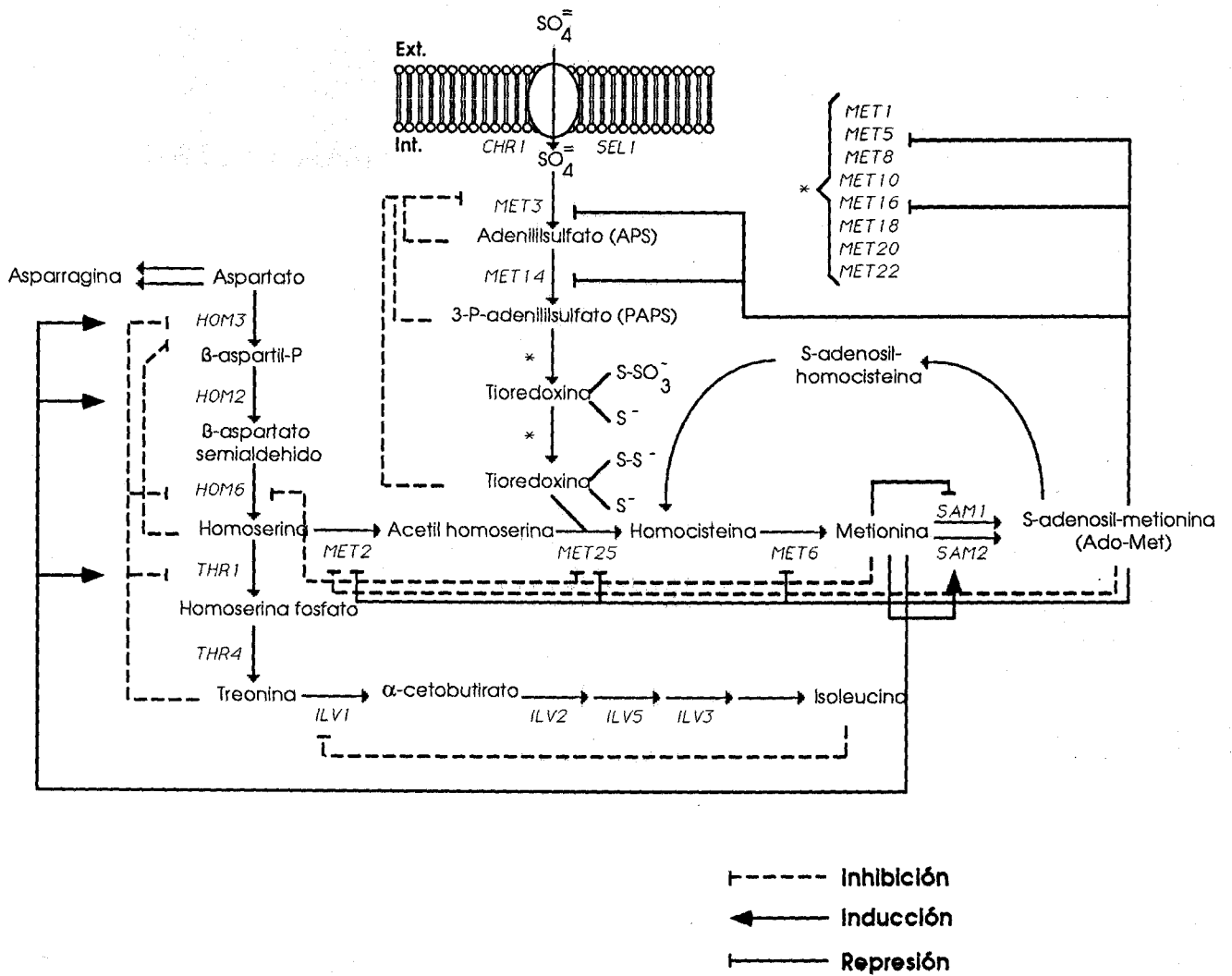


Figura 2. Ruta de biosíntesis de los aminoácidos derivados del aspartato. Los genes que codifican las enzimas implicadas en cada reacción se encuentran en cursiva junto a la reacción en la que se encuentran implicados.

ramifica, por un lado, hacia la síntesis de treonina e isoleucina y, por el otro, hacia la síntesis de metionina.

El primer paso de esta ruta, catalizado por la aspartato quinasa (EC 2.7.2.4), consiste en la activación del aspartato con ATP dando lugar al aspartil-fosfato. En levaduras, las cepas portadoras de una mutación en el gen *HOM3* requieren homoserina o bien simultáneamente treonina y metionina y no presentan actividad aspartato quinasa (de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1966). Este hecho sugiere que dicho gen determina la única aspartato quinasa existente en levaduras (en *E. coli* se han encontrado hasta tres enzimas que presentan actividad aspartato quinasa pero que difieren en su regulación). El gen *HOM3* de levaduras ha sido clonado por complementación de una mutación *hom3*, y secuenciado (Rafalski y Falco, 1987). La secuencia de aminoácidos de la aspartato quinasa, deducida de la de nucleótidos del gen *HOM3*, es homóloga a la de las tres aspartato quinasa presentes en *E. coli*.

La aspartato semialdehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.11) cataliza el segundo paso de esta ruta consistente en la reducción del aspartil-fosfato a aspartato-semialdehído. Esta enzima (un homodímero) está determinada en *Saccharomyces cerevisiae* por el gen *HOM2*.

La homoserina deshidrogenasa (EC 1.1.1.3) cataliza la reducción del aspartato-semialdehído dando lugar a homoserina. En levaduras existe una única actividad homoserina deshidrogenasa, determinada por el gen *HOM6*. El gen *HOM6* de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido clonado a partir de una genoteca de dicho organismo por complementación de la mutación *hom6* (Kim y Lea 1986).

#### *Anabolismo y catabolismo de la metionina.*

La biosíntesis de metionina comienza con la acetilación dependiente de acetyl-CoA de la homoserina produciendo O-acetil-homoserina, esta reacción se lleva a cabo por la homoserina acetiltransferasa (EC 2.3.1.31), codificada por el gen *MET2* (en plantas la ruta de síntesis de metionina parte de la homoserina fosfato y en ella está implicada una molécula de cisteína). La conversión de O-acetil-homoserina a homocisteína mediante

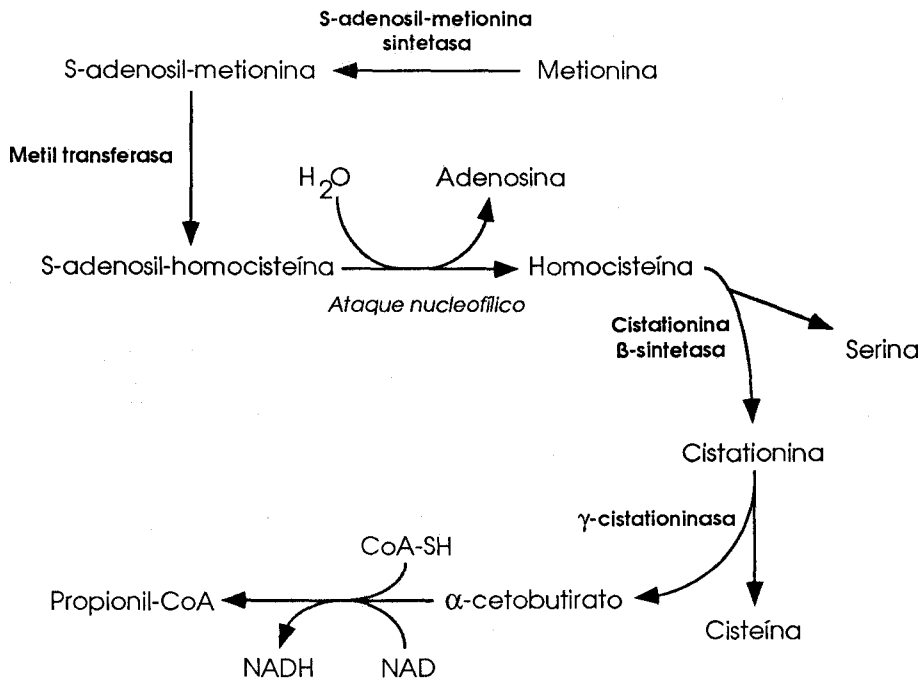
sulfidrilación mediada por tioredoxina se lleva a cabo por la homocisteína (cisteína) sintetasa (EC 4.2.99.10), codificada por el gen *MET25*. La homocisteína es el aceptor del grupo metilo donado por el 5-metil-tetrahidrofolato produciendo metionina en una reacción mediada por la homocisteína metil transferasa (EC 2.1.1.14), codificada por el gen *MET6*.

Ya que la metionina puede ser deletérea la célula prefiere almacenarla en forma de S-adenosil-metionina (Ado-Met). Existen dos isoenzimas, S-adenosil-metionina sintetasa (EC 2.5.1.6), capaces de convertir la metionina en S-adenosil-metionina (el verdadero producto final de la ruta) que están codificadas por los genes *SAM1* y *SAM2*. La producción de Ado-Met requiere un elevado gasto energético (equivalente a 15 ATPs); debido a ello existe un ciclo de recuperación, en el que la S-adenosil-metionina puede ser convertida en S-adenosil-homocisteína, y ésta a su vez en homocisteína, volviendo a incorporarse en la ruta de síntesis de metionina.

La entrada de azufre en la célula y la síntesis de metionina están íntimamente ligadas en *Saccharomyces*. El sulfato extracelular es permeado por al menos dos permeasas distintas, codificadas por los genes *CHR1* y *SEL1*. Una vez dentro de la célula, por la acción de la ATP sulfurilasa (producto del gen *MET3*), con la intervención de ATP, y de la APS quinasa (producto del gen *MET14*) (EC 2.7.7.4 y 2.7.1.25 respectivamente), el azufre es activado mediante dos pasos, produciendo fosfoadenililsulfato (PAPS). Este último, mediante la intervención de un complejo multienzimático (codificado por al menos ocho genes, *MET16*, *MET22*, *MET1*, *MET8*, *MET5*, *MET10*, *MET18* y *MET20*), pasa a sulfito y sulfuro unido a tioredoxina.

La metionina es catabolizada tras ser transformada en Ado-Met (Fig. 3A). Mediante una metil transferasa se obtiene S-adenosil-homocisteína; ésta, mediante una reacción enzimática que implica un ataque nucleofílico del sustrato por el agua, produce adenosina y homocisteína. La homocisteína junto con una molécula de serina, mediante la acción de la cistationina  $\beta$ -sintetasa, producen cistationina, la cual tras dos nuevos pasos enzimáticos produce propionil-CoA. Este puede ser transformado mediante otras tres reacciones en succinil-CoA.

A



B

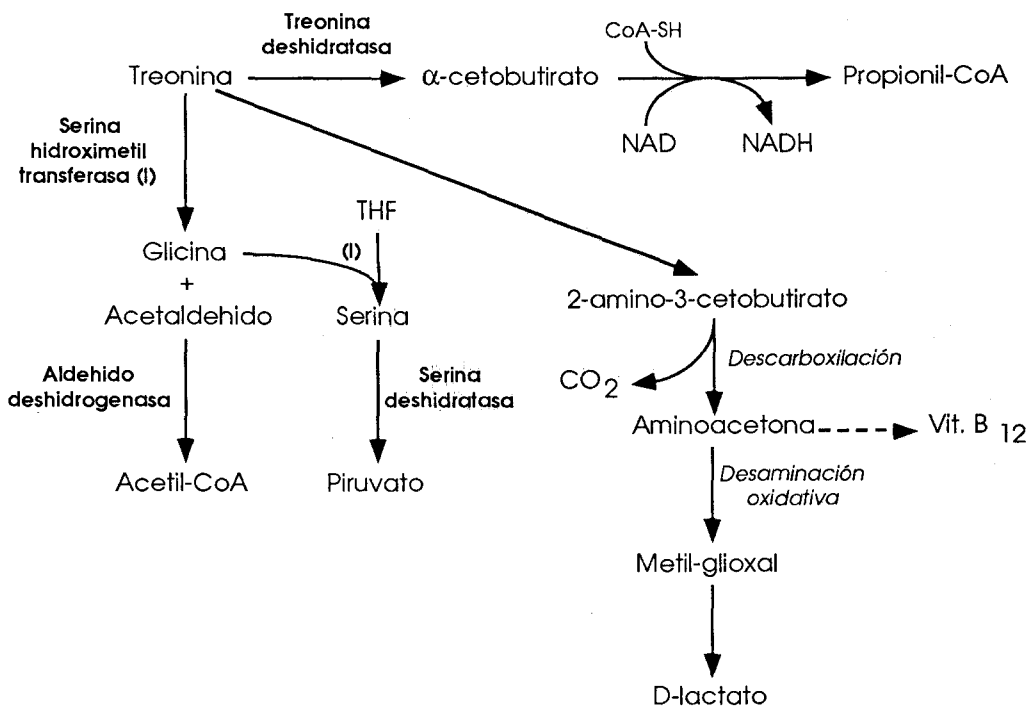


Figura 3. Rutas catabólicas de la metionina (A) y de la treonina (B).



*Anabolismo y catabolismo de la treonina.*

La síntesis de treonina a partir de homoserina se lleva a cabo mediante dos pasos sucesivos: la homoserina es fosforilada por la homoserina quinasa y posteriormente la O-fosfohomoserina es hidrolizada en una reacción catalizada por la treonina sintetasa produciendo treonina (Fig. 2).

La actividad homoserina quinasa (EC 2.7.1.39) está codificada por el gen *THR1*; éste ha sido clonado y secuenciado, encontrándose que existen varios segmentos de la proteína similares a sus isoenzimas bacterianos (Mannhaupt *et al.* 1990a).

La treonina sintetasa (EC 4.2.99.2) cataliza la formación de treonina a partir de homoserina fosfato. En levaduras viene codificada por el gen *THR4* (de Robichon-Szulmajster *et al.* 1966). La enzima es dependiente de piridoxal fosfato. El gen *THR4* ha sido clonado y secuenciado, presentando homología con sus correspondientes en bacterias (Mannhaupt *et al.* 1990b).

Como muestra la figura 3B el catabolismo de la treonina se lleva a cabo mediante tres actividades enzimáticas: la treonina desaminasa (o deshidratasa) anabólica o catabólica (EC 4.2.1.16), que convierte la treonina en  $\alpha$ -cetobutirato; la treonina deshidrogenasa (EC 1.1.1.103), que convierte la treonina en 2-amino-3-cetobutirato o la serina hidroximetil transferasa (SHMT, EC 2.1.2.1), que transforma la treonina en glicina. En la misma figura se muestra el destino final del esqueleto carbonado de la treonina, fundamentalmente es convertida en piruvato, acetyl-CoA y succinil-CoA, por esto la treonina se suele clasificar entre los aminoácidos cetogénicos. La reacción de deshidratación o desaminación de la treonina puede ser llevada a cabo por dos enzimas; la treonina desaminasa "anabólica" (codificada por el gen *ILV1*, primer enzima de la ruta de biosíntesis de la isoleucina) y la L-Ser (L-Thr) desaminasa catabólica (codificada por el gen *CHA*), que capacita a la célula de levadura para crecer en medios con serina o treonina como única fuente de nitrógeno (Ramos y Wiame 1982, Petersen *et al.* 1986a y 1986b).

## Regulación de la ruta de síntesis de metionina y treonina.

La regulación de las rutas metabólicas en levaduras es poco conocida si se compara con los conocimientos que de ella se tiene en bacterias (Henry *et al.* 1984). Tres diferencias fundamentales hacen imposible la comparación entre eucariotas y procariotas en cuanto a la regulación de sus rutas metabólicas: la agrupación del material genético, más compleja, la compartimentación del espacio celular y el almacenamiento de aminoácidos en vacuolas (Niederberger *et al.* 1981).

En levaduras, la biosíntesis de aminoácidos se regula mediante dos tipos de controles: el general y los específicos de cada ruta. El **control general** actúa simultáneamente sobre diversos puntos de muchas de las rutas (Hinnebush 1988). Así, en condiciones de "hambre" de un aminoácido, se induce la expresión de una serie de genes de forma que, en conjunto, aumenta la producción de aminoácidos por la célula. Este control depende de un número relativamente alto de genes reguladores positivos y negativos que actúan en cascada, siendo el producto del gen *GCN4* el que interacciona finalmente con secuencias reguladoras situadas delante de los genes sometidos a este control (Hinnebush 1988).

Los **controles específicos** son los que operan sobre una determinada ruta como respuesta a la concentración de ciertos productos intermediarios y/o finales. El control específico se produce tanto a nivel de expresión de los genes, como de actividad enzimática, siendo este último el que parece controlar más fuertemente el flujo de precursores a través de una ruta biosintética (Braus 1991).

### *Regulación de la actividad enzimática.*

Resultados iniciales de de Robichon-Szulmajster *et al.* (1963 y 1964) y posteriormente corroborados por Ramos *et al.* (1991) indican que la aspartato quinasa de levaduras es inhibida alostéricamente por treonina. Además los resultados de de Robichon-Szulmajster indican que esta enzima también es inhibida por homoserina y lisina pero no por metionina (Fig. 2). Por el

contrario, Stadtman *et al.* (1961) y posteriormente Ramos *et al.* (1991) no observaron dicha inhibición por lisina.

No se ha observado inhibición de la actividad aspartato semialdehído deshidrogenasa por ninguno de los compuestos relacionados con la ruta. La homoserina deshidrogenasa es inhibida competitivamente por treonina y metionina (Karassevitch y de Robichon-Szulmajster 1963). Así que la treonina parece ser el principal compuesto que regula el flujo dentro de la ruta común de síntesis de treonina y metionina (Fig. 2).

En la ruta específica de síntesis de treonina el flujo está controlado por inhibición de la homoserina quinasa por treonina ( $K_i = 8.7$  mM) (Fig. 2) y por homoserina, su sustrato ( $K_i = 2$  mM) (Ramos *et al.* 1991, Thèze *et al.* 1974).

Dentro de la ruta específica de síntesis de metionina, la homoserina acetiltransferasa se ve inhibida ligeramente por S-adenosil-metionina y por S-adenosil-homocisteína (Yamagata 1987). Asimismo, la metionina inhibe el flujo de O-acetilhomoserina a homocisteína (reacción catalizada por el producto del gen *MET25*) (Cherest *et al.* 1969). Las inhibiciones de la ruta de reducción del sulfato son, en su mayoría, inhibiciones competitivas y no pueden considerarse inhibiciones por producto final (de Vito y Dreyfuss 1964). Se desconoce si son relevantes en la regulación de la ruta (Fig. 2).

### *Regulación de la síntesis enzimática.*

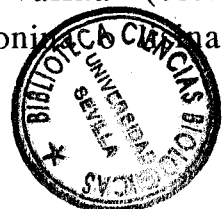
La mayor parte de los estudios sobre la regulación de la ruta biosintética de metionina/treonina se deben a los trabajos realizados por el grupo de de Robichon-Szulmajster (1963-73), el de Surdin-Kerjan (1969-91), el de Mountain (1989-91), y al descubrimiento de la regulación por control general (Schürch *et al.* 1974).

La mayor parte de los trabajos realizados por el grupo de Robichon-Szulmajster se limitaron a la determinación de niveles enzimáticos presentes tanto en células silvestres cultivadas en presencia o ausencia de alguno de los productos finales (treonina o metionina), como en cepas auxótrofas para uno de ellos sometidas a "hambre" del aminoácido en cuestión. Se dice que una enzima se

induce o reprime por un determinado compuesto si la actividad específica de la misma aumenta o disminuye respectivamente en células cultivadas en presencia de dicho compuesto. Los resultados de estas determinaciones no son lo suficientemente concluyentes como para precisar con exactitud el mecanismo que regula la síntesis de cada una de las enzimas pero permiten trazar una visión general de la regulación de esta ruta.

En general se puede decir que si bien a nivel de actividad enzimática la treonina ejerce el papel regulador principal, a nivel de síntesis de las enzimas es la metionina la que cumple este papel regulando la síntesis de cuatro enzimas de la ruta: 1) la actividad aspartato quinasa disminuye de 3 a 7 veces cuando las células se cultivan en presencia de treonina, metionina, lisina u homoserina (de Robichon-Szulmajster *et al.*, 1965); 2) los niveles de aspartato semialdehído deshidrogenasa aumentan 2 veces en presencia de metionina y no se ven afectados por la adición de treonina (de Robichon-Szulmajster *et al.* 1973); 3) la síntesis de homoserina deshidrogenasa disminuye 2 veces cuando las células se cultivan en presencia de metionina pero no en treonina (de Robichon-Szulmajster y Corrivaux, 1964); 4) asimismo, los niveles de homoserina quinasa aumentan por la adición de metionina al medio (de Robichon-Szulmajster *et al.* 1973).

Los resultados obtenidos por Surdin-Kerjan *et al.* (1969-91) y Mountain *et al.* (1991) pueden ser resumidos de la siguiente forma: la regulación transcripcional de los genes de la ruta del aspártico a la homoserina y los implicados hasta la obtención de treonina está bajo el control general de aminoácidos (*HOM2*, *HOM3* y *THR1*) con la excepción de *HOM6* que se expresa de forma constitutiva. El gen *THR4*, que codifica la treonina sintetasa, ha sido secuenciado recientemente (Aas y Rognes 1990) y contiene dos secuencias TGACTC, sugiriendo fuertemente que se encuentra también bajo el control general (en plantas la estimulación de la treonina sintetasa por Ado-Met es de veinte veces según Madison y Thompson 1976). La transcripción de los genes *HOM2*, *HOM3* y *THR1* se ve inducida por la adición de metionina. Esta inducción es mediada por el producto de *GCN4*, posiblemente porque la adición de metionina produce una reducción del contenido interno de valina (este "hambre" induce el control general). La adición de treonina



al medio no conduce a ningún cambio apreciable en los niveles de ninguna de las enzimas anteriormente citadas.

Existe una fuerte represión por metionina a nivel transcripcional (vía conversión a Ado-Met) (Thomas *et al.* 1988) de todos los genes ensayados de la ruta de reducción del sulfato y también en el de la conversión de homoserina en metionina (*MET2*). En todos los genes secuenciados de esta parte de la ruta existen secuencias comunes de activación y posibles secuencias de control negativo. El gen *MET4* parece codificar un regulador positivo (Thomas *et al.* 1990) ya que en mutantes *met4* no se transcriben los genes *MET16*, *MET25*, *MET2*, *MET3*, *MET5* y *MET14*.

La represión por metionina de *MET6* y los pasos siguientes que conducen a la síntesis de Ado-Met no es tan fuerte como la de los pasos iniciales de la ruta de metionina. Esto, presumiblemente, refleja la necesidad de producir Ado-Met cualquiera que sean las condiciones de cultivo (una fuerte represión impediría la síntesis cíclica de Ado-Met). Los genes implicados en la síntesis directa de Ado-Met a partir de metionina, *SAM1* y *SAM2*, se encuentran regulados de forma distinta, ya que mientras que *SAM1* es reprimido por metionina *SAM2* es inducido por metionina.

Por lo tanto, puede hablarse de una regulación (inducción) por control general (mediada por la metionina) de la parte común de las dos rutas y de la específica de treonina, así como una represión por parte de la metionina (en forma de Ado-Met) de los enzimas implicados en su síntesis, salvo la inducción del gen *SAM2* (Fig. 2).

Además, existen relaciones más complejas, la Ado-Met está implicada directamente en la síntesis de espermina (una de las poliaminas), y ésta a su vez induce la treonina desaminasa (codificada por el gen *ILV1*) (Yoshino y Murakami 1981) responsable de la degradación de la treonina. Un exceso de espermina implicaría un elevado gasto de Ado-Met, provocando la degradación de la treonina que a su vez desinhibiría la ruta común de síntesis de metionina y treonina.

## MUTANTES SUPERPRODUCTORES DE AMINOACIDOS.

Se pueden distinguir tres estrategias principales para la superproducción de aminoácidos por microorganismos. La primera

estrategia consiste en la búsqueda de aislamientos naturales que produzcan una apreciable cantidad de aminoácido, que posteriormente serán sometidos a sucesivos pasos de mutagénesis y selección. Esta estrategia en la mayoría de los casos es muy útil y aplicable a cualquier tipo de microorganismo sin conocer su organización genética (Niederberger 1989).

La segunda estrategia puede ser aplicada cuando se conocen los mecanismos de transferencia génica de un microorganismo en particular. Mediante mutaciones diferentes se consiguen diferentes incrementos en la concentración de un determinado aminoácido. Posteriormente estas mutaciones se unen en una misma estirpe mediante métodos clásicos de transferencia génica (Niederberger 1989).

La tercera estrategia es posible gracias a los conocimientos en ADN recombinante. Estas técnicas suelen utilizarse para incrementar la dosis de los genes estructurales de la ruta de síntesis en cuestión, por ejemplo, mediante el uso de plásmidos multicopia portadores de genes estructurales (Niederberger 1989).

El empleo de estas estrategias en *E. coli* ha permitido la obtención de diferentes niveles de producción de treonina. A partir de una cepa silvestre que producía 0,02 gramos de treonina por litro de cultivo (14% de sacarosa) se obtuvieron por mutación simple producciones de 3,2 g/l en un mutante resistente a hidroxinorvalina (análogo tóxico de treonina). La obtención de segundas mutaciones a partir de la cepa resistente a hidroxinorvalina produjo 7,6 g/l en un mutante auxótrofo de metionina, 9,4 g/l en un mutante auxótrofo de isoleucina y 12,2 g/l en el doble auxótrofo metionina-isoleucina. Asimismo, mediante la clonación del operón de treonina (genes *thrA*, *thrB* y *thrC*) de una estirpe resistente a hidroxinorvalina en un plásmido con aproximadamente 20 copias por célula se obtuvo una estirpe que producía 65 g/l (3.250 veces más que la estirpe inicial) (Aida *et al.* 1986). Referente a la producción de metionina por *E. coli* no existen datos comparables, ya que su obtención química o enzimática a copado los mercados de producción (Nakoyama 1986).

El conocimiento de la regulación de una ruta de síntesis suele llevarse a cabo mediante la obtención y caracterización de mutantes desregulados. Frecuentemente, la búsqueda de mutantes

desregulados, para la superproducción de aminoácidos, se realiza mediante el aislamiento de resistentes a análogos tóxicos. La resistencia a un análogo tóxico de aminoácido puede darse a distintos niveles, dependiendo de los efectos producidos por éste: a nivel de transporte (alteración de los sistemas de transporte), en la ruta de síntesis o degradación del aminoácido (alteración de la regulación a nivel de síntesis o actividad de las enzimas implicadas), y/o en la síntesis de proteínas (alteración a nivel de la ARN<sub>t</sub> sintetasa). Tanto la etionina como la hidroxinorvalina son análogos de los aminoácidos esenciales metionina y treonina respectivamente, aunque el primero además es un poderoso veneno (Alix 1982). El hecho de que, la etionina y probablemente la hidroxinorvalina, bloqueen una o más funciones esenciales de la metionina y la treonina en la célula (Stekol *et al.* 1963), y que la mayoría de sus efectos bioquímicos sean revertidos por la adición de metionina o treonina, ha permitido el uso de la resistencia a estos análogos como un método para aislar mutantes que superproducen los correspondientes aminoácidos (Mertz y Spence 1972, Seibold *et al.* 1981, Delgado *et al.* 1982).

Aunque estos mutantes pueden ser aislados por alteración de un solo gen (Delgado *et al.* 1982), diferentes mutaciones en cada uno de los genes, directa o indirectamente implicados en el correspondiente paso de la ruta biosintética, producirían estirpes con diferentes grados de resistencia al análogo tóxico y simultáneamente con diferentes niveles de superproducción de aminoácidos. Además, por selección en cultivo continuo, se podrían aislar estas mutaciones, aisladas, o reunidas en una sola estirpe. Esta estirpe sería capaz de resistir las mayores concentraciones del análogo tóxico y superproducir la mayor concentración del aminoácido.

## OBJETIVOS DE ESTA TESIS.

El proyecto en el que se engloba este trabajo tiene como objetivo último la obtención de cepas industriales de *Saccharomyces cerevisiae* superproductoras de treonina que puedan ser empleadas como biomasa enriquecida en este aminoácido para alimentación humana o animal. Para conseguir este objetivo, se han realizando estudios fisiológicos, bioquímicos y genéticos tanto en cepas de laboratorio de *Saccharomyces cerevisiae*, como en levaduras industriales.

En concreto, en este trabajo se han desarrollado los siguientes apartados:

1. La obtención de un método rápido para la detección y cuantificación de los aminoácidos presentes en *Saccharomyces cerevisiae*.

2. El estudio de los medios y condiciones de cultivo que influyen en la concentración interna de aminoácidos en esta levadura a fin de establecer las condiciones en las que dicha concentración es máxima.

3. La obtención de mutantes superproductores de aminoácidos derivados del aspártico (treonina y metionina) a partir de estirpes industriales de *Saccharomyces cerevisiae* mediante selección con análogos tóxicos de aminoácidos (etionina e hidroxinorvalina).

4. La caracterización bioquímica y/o genética de los mutantes obtenidos.

5. El estudio de los principales enzimas de la ruta de síntesis con el propósito de dilucidar su importancia (aspartato quinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina quinasa y S-adenosil-metionina sintetasa).

6. El estudio de las posibilidades de utilización industrial de mutantes afectados en la ruta de degradación de treonina.



# **MATERIALES**

## 1. CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae*.

### 1.1. Nomenclatura genética.

Como abreviatura de *Saccharomyces cerevisiae* se utiliza “*S. cerevisiae*”.

En la nomenclatura se siguen las recomendaciones elaboradas en la “IV International Conference on Yeasts Genetics” y recogidas en el Yeast Genetics Supplement (Microbial Genetics Bulletin 31, 1969).

Los genes se designan mediante tres letras (que hacen referencia a la actividad metabólica que determinan) y un número. Las mutaciones y los alelos se indican mediante el símbolo del gen afectado y otro número separado del primero mediante un guión. Los alelos cuyo fenotipo sea dominante se escriben con mayúscula; los recesivos, con minúscula. En este trabajo se utilizan las designaciones genéticas siguientes:

- *HIS*, *LEU* y *URA* designan genes de las rutas biosintéticas de los aminoácidos y bases a los que corresponden cada abreviatura. Las mutaciones en estos genes producen auxotrofía para ese aminoácido o base.

- *ILV1* y *CHA* son genes implicados en la degradación de treonina. Mientras que *ILV1* codifica para la treonina desaminasa anabólica, primer enzima de la ruta de síntesis de isoleucina a partir de treonina, *CHA* codifica para la serina (treonina) desaminasa catabólica, enzima que se induce en ausencia de amonio si la única fuente de nitrógeno es treonina o serina. Las cepas portadoras de una mutación *ilv1* son auxótrofas para isoleucina, pero las portadoras de una mutación *cha* sólo expresan el fenotipo en medios carentes de amonio, en el medio mínimo (SD) se comportan como la cepa silvestre.

- *SAM1* y *SAM2* son genes implicados en la síntesis de Ado-Met a partir de metionina. La ausencia del producto de ambos genes provoca auxotrofía para Ado-Met.

- *MAL*, *MEL*, *GAL* y *SUC* son genes implicados en la fermentación de maltosa, melibiosa, galactosa y sacarosa respectivamente.

- *CUP1* es el gen que codifica para una metalotioneína que acompleja cobre. La amplificación de este gen determina resistencia al cobre.

- [*rho*<sup>-</sup>] son mutaciones en el ADN mitocondrial que hacen a las células que las llevan defectuosas en la respiración.

- *a* y  $\alpha$  son alelos del gen *MAT* que determina el sexo.

- *HO* es el gen determinante del homotalismo.

- La letra delta mayúscula ( $\Delta$ ) indica que la mutación del alelo correspondiente es una deleción. Deleciones diferentes de un mismo gen se diferencian por la numeración colocada tras la delta mayúscula.

- El símbolo (::) entre dos alelos indica que la mutación del primer alelo se debe a la inserción del segundo.

Los fenotipos se designan con letra mayúscula inicial:

- *Cyh*<sup>R</sup>, *Eth*<sup>R</sup> y *Ahv*<sup>R</sup> se refieren a mutaciones que dan lugar a resistencia a cicloheximida, etionina e hidroxinorvalina respectivamente.

Los símbolos adicionales que aparecen como superíndices en los fenotipos son: + para los fenotipos silvestres; - para los mutantes; R o S, resistencia o sensibilidad a un inhibidor, respectivamente.

## 1.2. Cepas utilizadas.

En la Tabla 1 se relacionan las cepas no originales utilizadas en esta Tesis y su procedencia, así como las cepas obtenidas durante la realización de esta Tesis. El origen de cada una se especifica dando la cepa de la que procede y el método de obtención. La cepa YNN295 se utilizó como marcador de tamaño en los cariotipos realizados.

TABLA 1. Cepas utilizadas en esta Tesis.

Cepa	Genotipo	Origen
C90	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 his3 leu2 sam1::URA3</i>	CNRS
C95	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 his3 leu2 sam2::URA3</i>	CNRS
CC435 6C	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 his3 leu2 sam1::URA3 sam2::URA3</i>	CNRS
ETHCC1	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO Eth<sup>R</sup></i>	IFI256/S1
ETHCC2	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO Eth<sup>R</sup></i>	IFI256/S1
ETHCC3	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO Eth<sup>R</sup></i>	IFI256/S1
ETHCC4	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO Eth<sup>R</sup></i>	IFI256/S1
ETHCC5	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO Eth<sup>R</sup></i>	IFI256/S1
ETHCC6	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO Eth<sup>R</sup></i>	IFI256/S1
ETHCC7	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO Eth<sup>R</sup></i>	IFI256/S1
ETHCC8	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO Eth<sup>R</sup></i>	IFI256/S2
HNVBC1	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO Ahv<sup>R</sup></i>	IFI256/S3
HNVBC2	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO Ahv<sup>R</sup></i>	IFI256/S3
HNVBC3	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO Ahv<sup>R</sup></i>	IFI256/S3
HNVBC4	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO Ahv<sup>R</sup></i>	IFI256/S3
HNVBC5	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO Ahv<sup>R</sup></i>	IFI256/S3
IFI256	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO</i>	VA
IFI256P	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> HO/HO [rho<sup>-</sup>]</i>	IFI256/E
MMY1	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3D52 Cyh<sup>R</sup></i>	RB
MMY2	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3D52 Cyh<sup>R</sup></i>	RB
REMF5	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	8723c/E
S288C	<i>MAT<math>\alpha</math> SUC2 mal mel gal2 CUP1</i>	YGSC
YNN295		BIO-RAD
8655c	<i>MAT<math>\alpha</math> cha<sup>-</sup></i>	IRCERCIAC
8723c	<i>MAT<math>\alpha</math> ilv1<sup>-</sup></i>	IRCERCIAC
8755c	<i>MAT<math>\alpha</math> cha<sup>-</sup> ilv1<sup>-</sup></i>	IRCERCIAC

E: Mutante espontaneo (esta Tesis).

S: Selección; (S1), en turbidostato con etionina; (S2), en quimiostato con etionina; (S3), en cultivo discontinuo con hidroxinorvalina (esta Tesis).

- BIO-RAD:** Bio-Rad Laboratoires, 1414 Harbour Way South, Richmond, EE.UU.
- CNRS:** Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire d'Enzymologie, Gif-sur-Yvette Cedex, France.
- VA:** Victor Arroyo, Instituto de Fermentaciones Industriales, Madrid.
- RB:** Richard Baley, Solar Energy Research Institute, Golden Co., EE.UU.
- YGSC:** Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, California, EE.UU.
- IRCERIAC:** Institut de Recherches du Centre D'Enseignement et de Recherches des Industries Alimentaires et Chimique, Bruselas.

## 2. PRODUCTOS QUIMICOS.

En la Tabla 2 se relacionan los productos químicos más relevantes utilizados en esta Tesis, su abreviatura y su procedencia.

## 3. TAMPONES.

### 3.1. Tampón AT.

Se prepara a partir del tampón Fosfato potásico 40 mM; además contiene KCl, 0,1 M; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5 mM; EDTA, 2 mM; DTE, 1 mM y L-treonina a una concentración final de 1 mM (Spencer *et al.*, 1984).

### 3.2. Tampón BT.

Se prepara a partir del tampón Fosfato potásico 20 mM además contiene los mismos componentes y concentración que en el tampón AT (Spencer *et al.*, 1984).

### 3.3. Tampón CPE.

Contiene ácido cítrico pH 6 40 mM; fosfato sódico pH 6 120 mM y EDTA-Na<sub>2</sub> 20 mM. Se prepara con agua destilada y desionizada.

TABLA 2. Principales productos químicos utilizados, abreviatura y procedencia de los mismos.

Producto	Abreviatura	Procedencia
Acetonitrilo		Fluka
Acido 2-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperaciny]- etanosufónico (sal sódica)	HEPES	Sigma
Acido adenosin-5'-trifosfórico (sal sódica)	ATP	Sigma
S-adenosil-metionina	Ado-Met	Sigma
Albumina bovina		Sigma
Aminoácidos patrón		Sigma
Ditioeritritol	DTE	Sigma
Ditiotreitol		Sigma
Dodecil sulfato sódico	SDS	Merck
Etilendiaminotetraacetato (sal disódica)	EDTA	Sigma
Etionina	eth	Sigma
Fosfoenolpiruvato	PEP	Sigma
Ftaldialdehido	OPA	Sigma
Helicasa		LIBF
Hidroxinorvalina	ahv	Degussa
D,L-homoserina		Janssen
Lactato deshidrogenasa/Piruvato quinasa	PK/LDH	Sigma
b-mercaptoetanol	MCE	Sigma
Metanol		Probus
Nicotinamida-adenina-dinucleotido, forma oxidada (sal sódica)	NAD <sup>+</sup>	Sigma
Nicotinamida-adenina-dinucleotido, forma reducida (sal sódica)	NADH	Sigma
Propanolol		Probus
Protamina sulfato		Sigma
Proteinasa K		Merck
Tetrahidrofurano		Merck
Trietanolamina sulfato		Merck
Tris (hidroximetil) aminometano	TRIS	Sigma
Zymoliase 20000		Sigma

- Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland (**Fluka**)
- E. Merck AG, Darmstadt, Alemania (**Merck**)
- L'Industrie Biologique Française, Clichy, Francia (**LIBF**)
- Probus, S.A., Badalona, Barcelona (**Probus**)
- Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, E.E.U.U. (**Sigma**)
- Janssen Chimica, Bélgica (**Janssen**)
- Cedido por DEGUSSA A.B.M., Alemania (**Degussa**)

### 3.4. Tampón CPES.

Se prepara a partir del tampón CPE; además contiene D-sorbitol 1,2 M y ditiotreitol 5 mM. Antes de su uso en la preparación de muestras para obtención de cariotipos se añaden 0,2 mg/ml de Zymoliase 20000.

### 3.5. Tampón Borato sódico.

Cada 25 mililitros de tampón contienen 618,4 miligramos de ácido bórico, 6,5 mililitros de NaOH 1 M y 18,5 ml de agua bidestilada. El tampón así obtenido presenta un pH de 10 y una concentración final de 400 mM.

### 3.6. Tampones Fosfato.

#### 3.6.1 Tampón fosfato potásico.

Preparado según Gomori (1955).

- Solución A: Fosfato monopotásico, 40 mM.
- Solución B: Fosfato dipotásico, 40 mM.

Las soluciones A y B se mezclan en proporciones adecuadas para obtener un pH de 7,2 (aproximadamente 2 partes de B por cada 1 de A).

El tampón fosfato 20 mM se prepara a partir del 40 mM diluyéndolo a la mitad con agua bidestilada.

#### 3.6.2 Tampón fosfato sódico 400 mM (pH 7.2).

Cada litro de tampón contiene 7,8 gramos de fosfato sódico monobásico y 38,6 gramos de fosfato sódico dibásico  $\cdot 7H_2O$  (o 51,6 gramos de fosfato sódico dibásico  $\cdot 12H_2O$ ).

### 3.7. Tampón TBE.

Contiene Tris 45 mM; ácido bórico 45 mM y EDTA- $Na_2$  1 mM; se prepara con agua destilada.

### 3.8. Tampón TE.

Contiene Tris 10 mM y EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM; se prepara con agua destilada y desionizada y su pH se ajusta a 7,5.

### 3.9. Tampón TESP.

Contiene Tris/HCl pH 8 10 mM; EDTA-Na<sub>2</sub> pH 8 450 mM y SDS 1%. Se prepara con agua destilada y desionizada; antes de su uso debe calentarse a 50°C hasta su perfecta homogeneidad.

## 4. MEDIOS LIQUIDOS.

### 4.1. Medios mínimos.

#### 4.1.1. Medio mínimo (SD).

Contiene "Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulphate" (Difco), 0,17%; glucosa, 2%; sulfato amónico, 0,5%.

Los suplementos requeridos por cada cepa se añaden siempre después de autoclavar el medio a las concentraciones finales indicadas en Sherman *et al.* (1979). Para ello se preparan soluciones concentradas de cada suplemento que se esterilizan mediante filtración o autoclavado según las indicaciones de los mismos autores.

#### 4.1.2. Medio mínimo con prolina como única fuente de nitrógeno (SDP).

La composición es idéntica al medio SD salvo que en vez de sulfato amónico, contiene 0,1% de L-prolina como fuente de nitrógeno (Grenson *et al.* 1970).



#### 4.1.3. Medios mínimos con una fuente de carbono distinta de la glucosa (SF, SG, SE).

En algunos experimentos el medio mínimo se prepara con otra fuente de carbono en vez de glucosa, como fructosa 2% (medio SF), glicerol 3% (medio SG) o etanol 3% (medio SE).

#### 4.2. Medios mínimos con hidroxinorvalina (SDh).

Al medio SDP se añade, después de autoclavarlo, hidroxinorvalina a una concentración final de 0,1 mM (13 µg/ml), 1 mM (133 µg/ml) o 5 mM (665 µg/ml).

#### 4.3. Medios mínimos con etionina (SDe).

Al medio SD se añade, después de autoclavarlo, etionina a una concentración final que varió según el experimento entre 0,05 mM y 50 mM.

#### 4.4. Medios semi-industriales.

Las levaduras se cultivan en melazas (de remolacha), con un 72% de sacarosa, obtenida de la Unión Alcohólica Española S.A. (Granada, España). Estas melazas diluidas veinte veces (3,6% de sacarosa) constituyen el medio M. Ocasionalmente se añade a estas melazas 0,5 mg/l de biotina (medio MB), 0,5 g/l de fosfato diamónico (medio MA), o ambos a la vez (medio MAB).

#### 4.5. Medios completos.

##### 4.5.1. Medio completo (YPD).

Constituido por extracto de levadura (Adsa=Micro, Barcelona), 0,5%; peptona (Difco), 1% y glucosa, 2%. Este medio es una modificación del descrito por Sherman *et al.* (1979).

#### 4.5.2. Medios completos con una fuente de carbono distinta de la glucosa (YPF, YPG, YPE).

En algunos experimentos el medio nutritivo se prepara con otra fuente de carbono distinta de la glucosa, como fructosa 2% (medio YPF), glicerol 3% (medio YPG) o etanol 3% (medio YPE).

### 4.6. Medios de esporulación.

#### 4.6.1. Medio de esporulación SPO.

Constituido por extracto de levadura, 0,1%; acetato potásico, 1%; glucosa, 0,05% (Sherman *et al.* 1979).

#### 4.6.2. Medio de esporulación SPOO.

Tiene la misma composición que el medio SPO, pero la concentración de acetato potásico es de 3% en lugar de 1%.

## 5. MEDIOS SOLIDOS.

### 5.1. Medios mínimos.

#### 5.1.1. Medio mínimo estricto (MM).

Fue preparado a partir de las siguientes cuatro soluciones, previamente autoclavadas, mezclándolas en una proporción (889/1/10/100) en volumen y añadiendo 2% de agar (Adsa-Micro).

a) Sales: 0,7 g/l de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 1 g/l  $KH_2PO_4$ , 0,4 g/l  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0,5 g/l NaCl, 1 g/l  $K_2SO_4$ , 10,5 g/l de ácido cítrico monohidratado y 16 ml/l de KOH 10M. El pH fue ajustado a 6,1 con la adición de KOH.

b) Trazas: una solución conteniendo 10 mg/l de  $H_3BO_3$ , 1mg/l de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 2 mg/l de KI, 4 mg  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 14 mg/l de

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 10 g de ácido cítrico hidratado, 400 mg/l de  $MnSO_4 \cdot H_2O$  y 5 g/l de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ .

c) Vitaminas: una solución conteniendo 250 mg/l de D-biotina, 100 mg/l de tiamina·HCL, 1g/l de inositol, 200 mg/l de D-pantotenato cálcico y 100 mg/l de piridoxina·HCl.

d) Solución de glucosa al 30%.

### 5.1.2. Otros medios mínimos.

Los medios mínimos sólidos SD, SDP, SF, SG, SE, SDh y SDe se prepararon según los apartados anteriores añadiendo además 2% de agar (Analema, S. L., Vigo).

### 5.2. Medio completo.

Se prepara según se describe en el apartado 4.5 pero añadiendo 2% de agar (Analema).

### 5.3. Medio para micromanipulación.

Consiste en medio completo al que se añade agar tipo Adsa=Micro, por ser de mayor pureza que el agar Analema. Con este agar se consigue una mayor transparencia en el medio, lo que facilita la micromanipulación.

### 5.4. Medio de preesporulación (PSP).

Contiene extracto de levadura, 0.8%; peptona, 0.3%; glucosa, 10% y agar 2% (Analema).

### 5.5. Medios de esporulación.

Se preparan según el apartado 4.6. añadiendo 2% de agar (Analema).

## **METODOS**

## 1. CONDICIONES DE CULTIVO

### 1.1. Cultivo discontinuo.

#### 1.1.1. Obtención de precultivos.

Se inoculó una colonia de la cepa que se deseaba cultivar en un matraz de 100 ml con 20 ml de medio mínimo SD, o éste con los requerimientos necesarios para la cepa, y se incubó a 30°C, en un agitador orbital New Brunswick Scientific Co., INC. (modelo G2) a 200 r.p.m., hasta alcanzar la fase estacionaria temprana (aproximadamente  $10^8$  células/ml). Cuando se quiso evitar la aparición de "petites" en un determinado experimento, el preinóculo se realizó en medio SG.

#### 1.1.2. Cultivos de 10 a 500 ml.

Se tomó de un precultivo el volumen necesario para obtener en el nuevo medio una D.O.660 nm (D.O.690 nm en el caso de los medios M, MA, MB y MAB) de 0,05. En el caso de que el medio a inocular no contuviese una fuente de nitrógeno como el sulfato amónico (por ejemplo, el medio mínimo estricto, el medio M, el medio MB, etc...), las células se centrifugaron y se lavaron 2 veces con agua destilada estéril, antes de inocular el medio. El cultivo se incubó a 22, 30 o 37°C con aireación en un agitador, hasta alcanzar la turbidez deseada.

### 1.2. Cultivo continuo.

Los experimentos de cultivo continuo se llevaron a cabo en un fermentador New Brunswick Bio-Flo modelo C30 (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) equipado con un vaso de cultivo de 2 litros, un tanque de alimentación y un tanque de desechos, ambos con capacidad para 15 litros, aireación, agitación magnética y termorregulación. Asimismo, el fermentador se equipó con un electrodo de pH conectado a un controlador automático de pH New Brunswick modelo pH40 (Fig. 4).

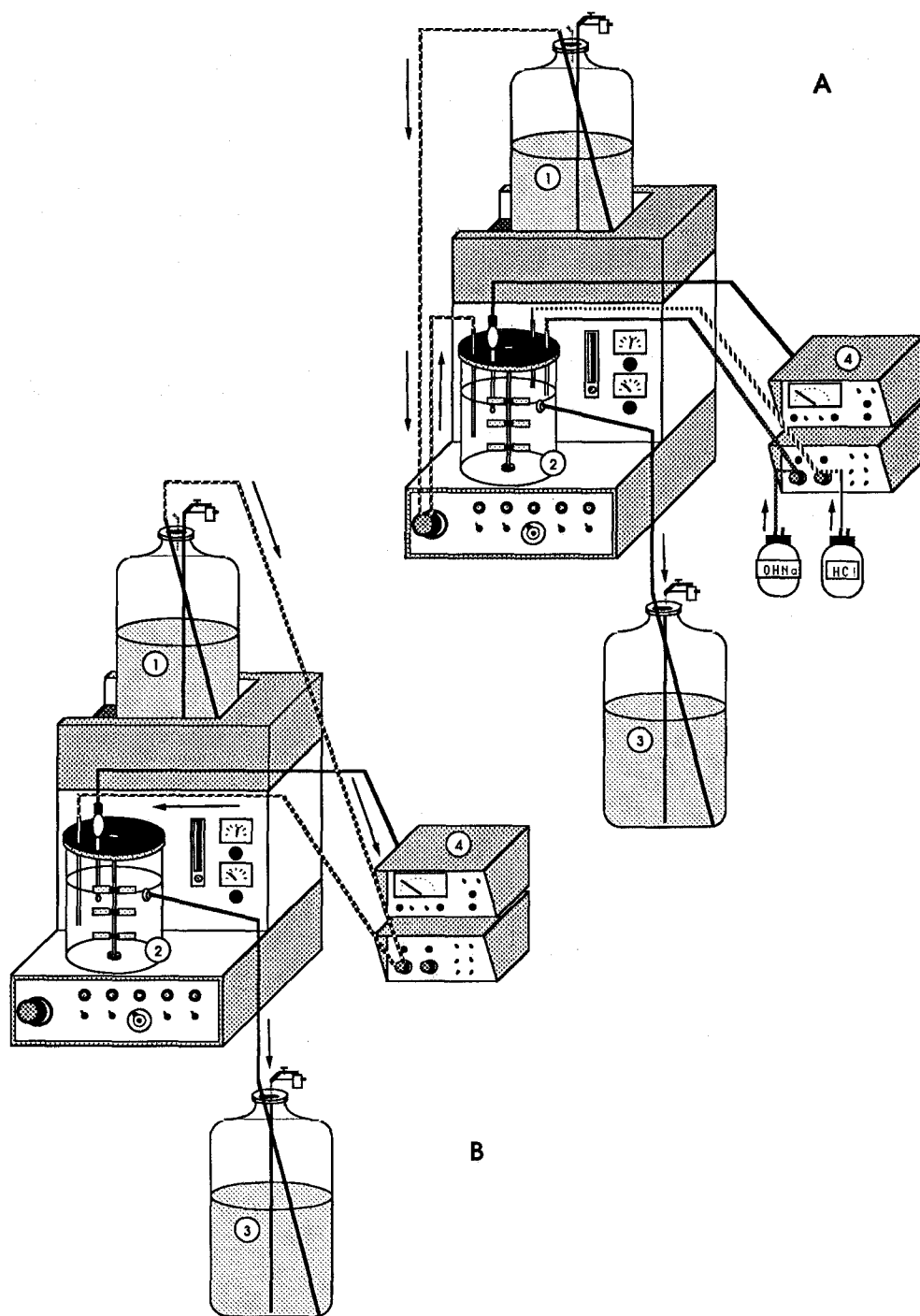


Figura 4. Equipo utilizado en los experimentos de cultivo continuo. A: Quimiostato, el pH se reguló mediante la adición de  $\text{OHNa}$  o  $\text{HCl}$ . B: Turbidostato, el pH se reguló mediante la adición de medio fresco. (1) Tanque de alimentación, (2) vaso de cultivo, (3) tanque de desechos y (4) controlador del pH. Las flechas indican el flujo del medio de cultivo hacia el vaso y su salida de este.

### 1.2.1 Quimiostato.

El cultivo se mantuvo permanentemente a un pH de 3,5 mediante la adición de OHNa por parte de la bomba basificadora del controlador de pH (Fig. 4A).

*Experimentos de dependencia entre la concentración interna de aminoácidos y la tasa de dilución.*

El vaso de cultivo con 1,7 litros de medio mínimo (SD), con la fuente de carbono como sustrato limitante, se inoculó con 10 ml de un cultivo en fase estacionaria temprana ( $10^8$  células/ml). La temperatura se mantuvo a 30°C, agitación magnética (400 rpm) y alta aireación. Para suministrar medio fresco al cultivo se utilizó un depósito de 15 litros de volumen conteniendo 13 litros de medio mínimo (SD). La bomba del fermentador se reguló para dar la tasa de dilución apropiada, D, y los datos correspondientes a cada una de las diluciones se obtuvieron después de cinco veces el tiempo de residencia,  $t_r$ , para asegurar que se había alcanzado la fase de equilibrio (el tiempo de residencia es equivalente a 5 veces el volumen del cultivo, es decir, 8,5 litros) (Pirt 1975).

#### *Obtención del mutante ETHCC8.*

Se utilizó un depósito de 15 litros de volumen conteniendo 10 litros de medio mínimo suplementado con etionina 1 mM (SDe) para suministrar medio fresco al cultivo. La bomba del fermentador se reguló para dar la tasa de dilución apropiada,  $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ , algo menor que la máxima en estas condiciones  $0,23 \text{ h}^{-1}$  ( $\mu < \mu_{\text{máx}}$ ).

### 1.2.2 Turbidostato controlado por pH.

La bomba del fermentador se reguló para mantener una tasa de dilución, D, de  $0,5 \text{ h}^{-1}$  (mayor que la tasa máxima de crecimiento,  $\mu_{\text{máx}}$ , de las estirpes usadas). La bomba se conectó al controlador del pH (Fig. 4B), de forma que al crecer el cultivo, éste acidificaba el medio por debajo de un valor fijado (pHc); como consecuencia, el controlador de pH activó la bomba de nutrientes y el cultivo se

diluyó con medio fresco ( $D > \mu$ ), incrementando el pH. Cuando, después de la dilución, el pH aumentó por encima del  $pH_c$ , el controlador de pH detuvo la bomba de nutrientes ( $D=0$ ).

Se conectó un registrador al controlador de pH para seguir su evolución en el cultivo.

### 1.3. Curvas de crecimiento.

Siguiendo las condiciones de cultivo descritas en el apartado 1.1.2., se inocularon tubos de 20 ml de capacidad que contenían 10 ml del medio utilizado en cada caso. Periódicamente se siguió el incremento de D.O.660 nm (D.O.690 nm en el caso de los medios M, MA, MB y MAB) del cultivo hasta que éste alcanzaba la fase estacionaria tardía.

El crecimiento, expresado como tasa máxima de crecimiento ( $\mu$ ), se determinó a partir del tiempo medio de duplicación (tiempo de generación,  $\tau$ ) durante el aumento exponencial de la turbidez, de acuerdo con la expresión:

$$\mu = \frac{\ln 2}{\tau} \quad (\text{Van Uden 1971})$$

## 2. DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS.

### 2.1. Células totales.

La concentración de células totales se estimó contando el número de células en un microscopio óptico, con una cámara de Thoma (Brand, Alemania).

### 2.2. Células viables.

Se define como célula viable aquella capaz de formar colonia en medio sólido. El número de células viables de un cultivo o una suspensión se determinó sembrando una muestra del mismo en cajas que contenían medio YPD sólido (en aquellas ocasiones en las que se quiso determinar el número de mutantes "petite" de un cultivo se sembró la muestra tanto en YPD como YPG sólido,



[número de petites= número de células en YPD - número de células en YPG]). Se realizaron las diluciones adecuadas para obtener entre 100 y 200 colonias por caja. Tras incubarse durante 2-3 días a 30°C, se contó el número de colonias aparecidas. Para cada determinación se sembraron 3-4 cajas de Petri y se calculó el valor medio.

### **3. DETERMINACION DEL PESO DE CELULAS.**

#### **3.1. Peso húmedo.**

Una muestra de 20 ml de cultivo o una alícuota de una solución concentrada de células se filtró a través de un filtro Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. La diferencia entre el peso del filtro con la biomasa y el peso del filtro se tomó como peso húmedo de las células. El peso húmedo equivale aproximadamente a cuatro veces el peso seco.

#### **3.2. Peso seco.**

El filtro con la biomasa retenida (obtenido como en el apartado anterior) se secó en una estufa a 105°C durante 10 minutos (previamente se había comprobado que tiempos de secado más prolongados no conllevaban una disminución significativa de peso). La diferencia entre el peso del filtro junto con la biomasa tras el secado y el peso del filtro se tomó como peso seco de las células.

### **4. DETERMINACIONES ANALITICAS.**

#### **4.1. Cuantificación de ADP.**

Se realizó mediante el sistema piruvato quinasa (EC 2.7.1.40)/lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27) (PK/LDH) (Spencer y Wedler 1984). En este método la cuantificación se realiza siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm ( $-\Delta D.O.340$ ) que se produce debido al consumo de NADH (Fig. 5).

La concentración milimolar de ADP se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{(A-B) \times V_t}{E \times l \times V_e}$$

- A: D.O.340 antes de desencadenar la reacción.  
 B: D.O.340 una vez transcurrido el tiempo de reacción.  
 V<sub>t</sub>: Volumen total de mezcla de reacción.  
 V<sub>e</sub>: Volumen de muestra utilizada.  
 E: Coeficiente de extinción milimolar del NADH (6,2).  
 l: Paso de luz (1 cm).

En todas las cuantificaciones realizadas, el volumen total de la mezcla de reacción fue de 1 ml, y el volumen de muestra de 50 µl; así que la ecuación anterior quedó reducida a: 3,226 x (A-B). Este método de cuantificación se utilizó para determinar las siguientes actividades en extracto crudos: aspartato quinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina quinasa, treonina deshidrogenasa y treonina desaminasa.

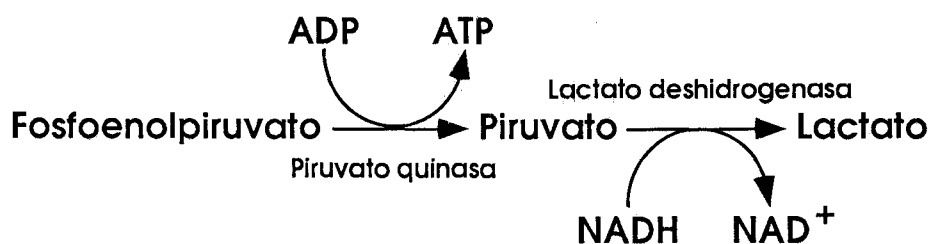


Figura 5. Reacciones acopladas utilizadas para la determinación de ADP. Estas se utilizaron posteriormente para la determinación de actividad aspartato quinasa, homoserina quinasa y treonina desaminasa.

## 4.2. Medida de actividades enzimáticas.

En los siguientes apartados se describen los métodos seguidos para obtener los extractos crudos y ensayar aspartato quinasa (AK, EC 2.7.2.4), homoserina deshidrogenasa (HDH, EC 1.1.1.3), homoserina quinasa (HK, EC 2.7.1.39), treonina desaminasa (TD, EC 4.2.1.16), treonina deshidrogenasa (TDH, EC 1.1.1.103) y S-adenosil-metionina sintetasa (SAMS, EC 2.5.1.6). El ensayo de AK y HK se realizó cuantificando la liberación de ADP mediante el sistema piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa (apartado 4.1) (Fig. 6A y 6B), el ensayo de HDH y TDH se realizó cuantificando la formación de NADH (Fig. 7A y 7B), el ensayo de TD se realizó cuantificando el consumo de NADH (Fig. 7C), mientras que el ensayo de SAMS se realizó cuantificando por HPLC la formación de S-adenosil-metionina.

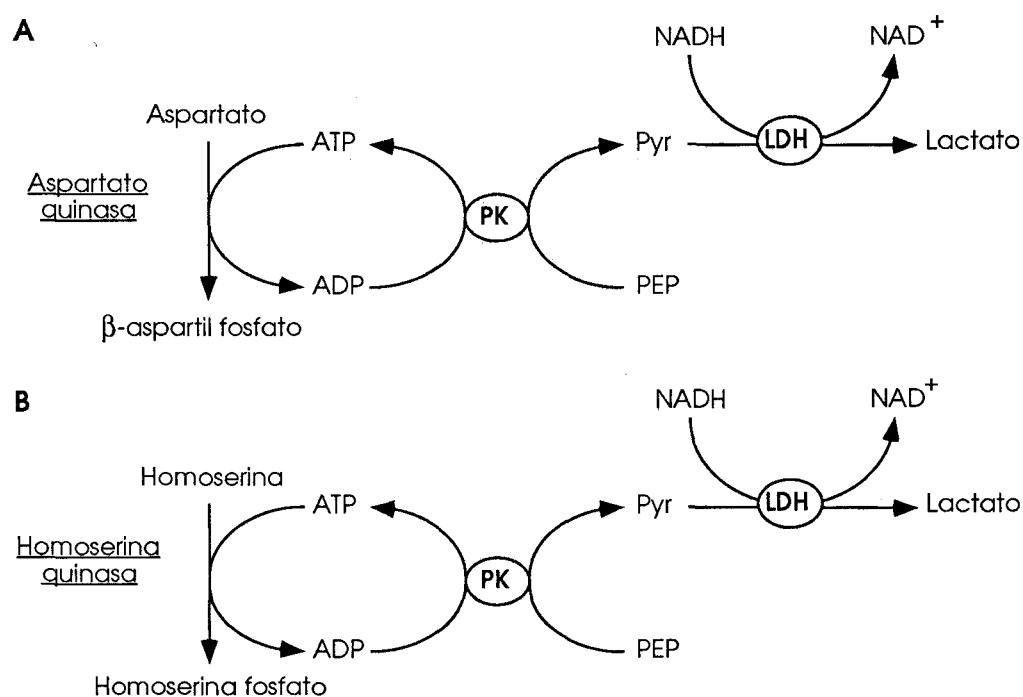


Figura 6. Ensayos empleados para la medida de las actividades enzimáticas aspartato quinasa (A) y homoserina quinasa (B), la detección de actividad se llevó a cabo cuantificando la formación de ADP.

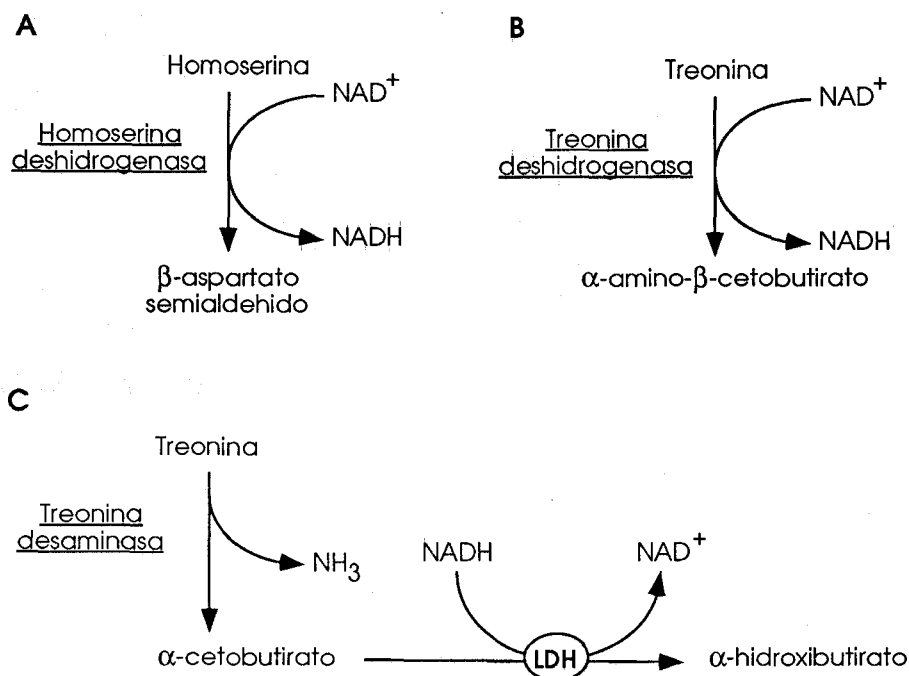


Figura 7. Ensayos utilizados para la determinación de las actividades enzimáticas homoserina deshidrogenasa (A), treonina deshidrogenasa (B) y treonina desaminasa (C). La detección se llevó a cabo cuantificando la formación (A y B) o el consumo (C) de NADH.

#### 4.2.1. Obtención del extracto semipurificado.

La obtención del extracto semipurificado se realizó siguiendo el método descrito por Ramos *et al.* (1991) con modificaciones.

##### *Preparación de extractos crudos.*

A partir de un cultivo en medio mínimo SD y a una densidad óptica a 660 nm (D.O.<sub>660</sub>) entre 0,7 y 0,8 (aproximadamente  $5 \times 10^7$  células/ml), se recogieron las células mediante dos centrifugaciones sucesivas a 5000 x g (6000 rpm en un rotor Beckman JA14) a 4°C y se lavaron en tampón AT. El precipitado así obtenido se resuspendió en 10 ml de tampón AT. Se rompieron las células en un

homogeneizador Braun, modelo MSK; la mezcla de ruptura consistió en la suspensión obtenida anteriormente y 17 ml de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Los residuos celulares se eliminaron del extracto mediante dos centrifugaciones consecutivas a 4°C, la primera de 20 minutos a 8000 x g (aproximadamente 15000 rpm en un rotor Beckman JA20) y la segunda de 2 horas a 105000 x g (50000 rpm en un rotor Beckman 75Ti).

El extracto así obtenido fue utilizado en la mayoría de las caracterizaciones enzimáticas llevadas a cabo. Sólo cuando se indica se utilizó un extracto semipurificado.

#### *Precipitación con sulfato de protamina.*

Al extracto crudo se añadieron 5 mg de sulfato de protamina, (neutralizado a pH=7 con OHNa) por cada gramo de peso húmedo de células de partida. Tras mantener el extracto en agitación suave a 4°C durante 30 minutos, se eliminó el precipitado (ácidos nucleicos y proteínas asociadas a los mismos) mediante centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 8000 x g.

#### *Precipitaciones con sulfato amónico.*

Al sobrenadante, obtenido como se describe en el apartado anterior, se añadió sulfato amónico hasta un 30% de saturación y se mantuvo en agitación suave a 4°C durante 30 minutos, transcurridos los cuales, se eliminó el precipitado (P30) por centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 8000 x g. Al sobrenadante se añadió sulfato amónico hasta un 45% de saturación. El precipitado (P45), obtenido tras agitar y centrifugar en las mismas condiciones utilizadas para la obtención del P30, se resuspendió en 0,6 ml de tampón BT por cada gramo de peso húmedo de células de partida y se dializó dos veces, durante 12 horas cada una, frente a 500 ml del mismo tampón.

#### *Conservación del extracto.*

Tras mantener los extractos a -80°C durante 2 meses no se observó pérdida en la actividad de ninguna de las enzimas ensayadas.

#### 4.2.2. Ensayos enzimáticos.

##### 4.2.2.1. *Aspartato quinasa.*

La actividad aspartato quinasa se ensayó a 30°C cuantificando la liberación de ADP (Fig. 6A) mediante el sistema piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa (PK/LDH) descrito en el apartado 4.1. Para la medida de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 (Kyoto, Japón).

##### *Reactivos*

- Solución A: Hepes, 0,5 M; KCl, 70 mM; ajustado el pH a 7,5 con ClH.
- Solución B: Fosfoenolpiruvato, 45 mM; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,3 M; KCl, 1,8 M.
- Soluciones de:

NADH, 6 mM.

ATP, 50 mM.

L-aspartato 100 mM, neutralizado con OHNa 1 M hasta pH=7,5.

PK/LDH, 700 y 1000 unidades por ml respectivamente.

El NADH, el ATP y el L-aspartato se disolvieron en la solución A; el resto de las soluciones se hicieron con agua bidestilada. Durante la realización de los ensayos todas las soluciones se mantuvieron en un baño de hielo a 0°C, excepto el agua que se mantuvo a 30°C.

##### *Mezcla de reacción*

Se preparó directamente en la cubeta del espectrofotómetro mezclando: Solución A, 200 µl; ATP, 200 µl; Solución B, 100 µl; NADH, 100 µl; PK/LDH, 25 µl; extracto crudo o parcialmente purificado, 50 µl y agua bidestilada, 125 µl (Tabla 3). Tras mantener

la mezcla de reacción en un baño a 30°C durante 2 minutos se inició la reacción añadiendo 200  $\mu$ l de la solución de L-aspartato.

Para cada medida se realizó un control en el que el sustrato (L-aspartato) era sustituido por el mismo volumen de agua bidestilada, dándonos la diferencia la actividad dependiente de sustrato. Cuando se realizaron ensayos de inhibición de la reacción, el volumen del inhibidor se descontó del volumen total de agua destilada y desionizada.

#### *Unidades de actividad*

La actividad aspartato quinasa de un extracto se define como los  $\mu$ moles de ATP transformados en ADP por minuto y mililitro. Las unidades de actividad se calculan según la ecuación desarrollada en el apartado 5.1.3. Como el descenso de absorbancia ( $-\Delta D.O.340$ ) se mantuvo lineal sólo durante los primeros 10 minutos, se tomó como tiempo de ensayo los primeros 5 minutos de reacción.

#### *4.2.2.2. Homoserina quinasa.*

La actividad homoserina quinasa se midió de la misma forma que la actividad aspartato quinasa (apartado 4.2.2.1) excepto que la reacción se inició mediante la adición de 100  $\mu$ l de una solución 20 mM de L-homoserina en vez de L-aspartato (Fig. 6B). Además en la mezcla de reacción (Tabla 3) se utilizaron 100  $\mu$ l de ATP 50 mM y 325  $\mu$ l de agua bidestilada.

#### *4.2.2.3. Homoserina deshidrogenasa.*

La actividad homoserina deshidrogenasa se ensayó cuantificando la producción de NADH como incremento en la D.O.<sub>340nm</sub> (Fig. 7A). La mezcla de reacción se preparó mezclando: Solución A, 200  $\mu$ l; NAD<sup>+</sup>, 100  $\mu$ l; extracto crudo o parcialmente purificado, 50  $\mu$ l y agua destilada y desionizada, 450  $\mu$ l (Tabla 3). La mezcla se incubó durante 2 minutos a 30°C y la reacción se inició con la adición de 200  $\mu$ l de una solución de homoserina 200 mM.

4.2.2.4. *Treonina deshidrogenasa.*

La actividad treonina deshidrogenasa se ensayó de igual forma que la actividad homoserina deshidrogenasa (apartado 4.2.2.3) (Fig. 7B) excepto que la reacción se inició mediante la adición de 200  $\mu$ l de una solución 200 mM de L-treonina (Tabla 3).

	AK	HDH	HK	TDA	TDH
Sol. A	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
ATP	0,2	-	0,1	-	-
Sol. B	0,1	-	0,1	-	-
NADH	0,1	-	0,1	0,1	-
NAD <sup>+</sup>	-	0,1	-	-	0,1
PK/LDH	0,025	-	0,025	0,025	-
H <sub>2</sub> O	0,125	0,450	0,325	0,325	0,450
Extracto	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Sustrato	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2

(Asp 100mM) (Hom 200mM) (Hom 20mM) (Thr 200mM) (Thr 200mM)

TABLA 3. Composición (en mililitros) de las mezclas de reacción utilizadas en los ensayos de las actividades aspartato quinasa (AK), homoserina deshidrogenasa (HDH), homoserina quinasa (HK), treonina desaminasa (TDA) y treonina deshidrogenasa (TDH).

4.2.2.5. *Treonina desaminasa.*

La actividad treonina desaminasa se ensayó cuantificando el consumo de NADH como pérdida de absorbancia a 340 nm (Fig. 7C). La mezcla de reacción se obtuvo mezclando: solución A, 200  $\mu$ l; NADH, 100  $\mu$ l; PK/LDH, 25 ml; extracto crudo o parcialmente purificado, 50  $\mu$ l y agua destilada y desionizada, 325  $\mu$ l. La mezcla se incubó a 30°C durante 2 minutos, transcurridos los cuales se inició la reacción con la adición de 300  $\mu$ l de L-treonina (Tabla 3).



#### 4.2.2.6. *S*-adenosil-metionina sintetasa.

La actividad *S*-adenosil-metionina sintetasa se cuantificó mediante la detección por HPLC (apartado 4.4) de la formación de *S*-adenosil-metionina. La mezcla de reactivos utilizada estaba formada por: 4,2 ml de sulfato de trietanolamina 1M pH 8,2; 0,9 ml de una solución de MgSO<sub>4</sub> 1M; 0,75 ml de una solución de ATP 0,1 M neutralizada con OHNa 4N; y 14 mg de L-metionina (cuando se estudió el efecto de la etionina sobre la *S*-adenosil-metionina sintetasa la mezcla de reacción contuvo 14 mg de etionina). Durante el ensayo se incubó a 30°C un mezcla formada por 0,150 ml de extracto crudo y 0,150 ml de la mezcla de reactivos. Transcurrido el tiempo del ensayo (0, 5, 30, 60 o 120 minutos) se inyectaron en el HPLC 20 µl de la mezcla a fin de cuantificar la *S*-adenosil-metionina.

### 4.3. Cuantificación de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se realizó según Martínez-Force y Benítez (1991).

#### 4.3.1. Obtención de muestras.

A partir de un cultivo que había alcanzado la D.O.660 nm deseada, se extraía una muestra de 20 ml y se centrifugaba a 6000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante y el precipitado resultantes sirvieron para determinar la concentración extracelular e intracelular de aminoácidos respectivamente, según se describe a continuación.

#### *Concentración intracelular.*

Las células del precipitado se lavaron cinco veces con agua destilada y desionizada, y finalmente se resuspendieron en 1/20 del volumen inicial (1 ml). La suspensión de células se mantuvo en un baño a 100°C durante 15 minutos para extraer los aminoácidos del interior de las mismas. A continuación se centrifugó y se filtró el sobrenadante a través de un filtro Millipore de 0,45 µm de

diámetro de poro. El filtrado se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis de los aminoácidos.

#### *Concentración extracelular.*

El sobrenadante se mantuvo en un baño a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, para someter las muestras al mismo proceso descrito anteriormente, y posteriormente se filtró a través de un filtro Millipore de  $0,45\ \mu\text{m}$  de diámetro de poro. Seguidamente el filtrado se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la determinación.

#### 4.3.2. Equipo de HPLC utilizado.

El sistema utilizado consistió en un cromatógrafo Waters equipado con una columna Novapack<sup>TM</sup> C18 de  $18 \times 100\ \text{mm}$ , empaquetada con sílica esférica de  $5\ \mu\text{m}$ , una precolumna  $\mu\text{Bondapack}^{\text{TM}}$  C18 Guard-Pak<sup>TM</sup>, dos bombas (Waters 501 y 510) y un detector ultravioleta-visible Waters, modelo Lambda Max 481.

En aquellos experimentos en los que se utilizaron condiciones isocráticas se utilizó una sola bomba (Waters 501), y los cromatogramas se registraron en un Unicam AR25 Linear Recorder.

Las inyecciones se realizaron utilizando un inyector Rheodyne (modelo 7010) unido a un bucle de  $20\ \mu\text{l}$  (modelo 7012). Como control del sistema de bombas, integrador de datos y almacenamiento de estos se utilizó un ordenador IBM AT con el software "Baseline 810 chromatography workstation". La temperatura se mantuvo constante a  $25^{\circ}\text{C}$  mediante un sistema de control de temperatura Waters (formado por un módulo de control y un horno de columnas).

Los resultados experimentales durante el desarrollo del método se corroboraron mediante el uso de otro cromatógrafo Waters, este consistió en dos bombas Waters (modelo 6000A), un sistema de control Waters 720, un detector Lambda Max 481 y un módulo de procesamiento M730 (impresora/plotter/integrador).

#### 4.3.3. Solventes.

Los solventes que se han utilizado para generar los gradientes tienen la siguiente composición volumen/volumen:

-Solvente A: fosfato sódico 20 mM pH 7,2, 5%; tetrahidrofurano, 1,5%; agua destilada desionizada, 93,5%.

-Solvente B: fosfato sódico 10 mM pH 7,2, 2,5%; acetonitrilo, 55%; agua destilada desionizada 42,5%.

Una vez preparados los solventes, se desgasificaron en un baño de ultrasonidos "Selecta" a 200 watos durante un tiempo total equivalente a 3 minutos/litro.

#### 4.3.4. Condiciones cromatográficas.

En un primer grupo de experimentos se utilizó un solo solvente compuesto (v/v) por 50% de fosfato sódico 40 mM pH 6,5, 22% de metanol, 2% de tetrahidrofurano y un 26% de agua destilada y desionizada.

Un segundo grupo de experimentos se llevó a cabo utilizando un gradiente escalonado, mediante el uso de los dos solventes anteriormente descritos. El programa del gradiente empleado fue el siguiente: a tiempo cero, 0% de solvente B, incrementándose la proporción de B en un 5% cada 1 minuto y 40 segundos hasta alcanzar una concentración final de un 60% de B a los 20 minutos (Tabla 4). Un tercer grupo de experimentos se llevó a cabo mediante un gradiente de tipo complejo (Tabla 4).

Los mejores resultados se obtuvieron por combinación de los gradientes escalonado y complejo (ver Resultados). El flujo del solvente fue en todos los casos de 2 ml/min, y la presión obtenida de 3.000 psi (210 bares).

#### 4.3.5. Mezcla derivatizante.

Se preparó mezclando 4,5 ml de borato sódico 0,4 M pH 10; 0,5 ml de O-ftaldialdehido (OPA) [54 mg de OPA/ml de metanol, mantenido a -20°C y protegido de la luz] y 0,2 ml de  $\beta$ -

mercaptoetanol. La mezcla se filtraba a través de un filtro Millipore de 0,45 mm de diámetro de poro y se mantenía a  $-20^{\circ}\text{C}$  protegida de la luz. Debido a su inestabilidad, durante su uso la mezcla debía mantenerse en hielo a  $0^{\circ}\text{C}$  y se desechaba después de 24 horas. Ya que la inestabilidad se debe al  $\beta$ -mercaptoetanol se pueden añadir cantidades mayores de este compuesto a la mezcla de reacción.

#### 4.3.6. Tratamiento.

A  $25\ \mu\text{l}$  de una muestra de aminoácidos se añadía  $75\ \mu\text{l}$  de mezcla derivatizante. Se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de ser inyectada en el HPLC. Los derivados de aminoácidos obtenidos se detectaron a una longitud de onda de 340 nm.

La reacción de derivatización es diferente para cada uno de los aminoácidos cuando se utilizan mezclas derivatizantes preparadas independientemente. Por este motivo, antes y después de la inyección de un grupo de muestras tratadas con una misma mezcla derivatizante, se derivatizaba e inyectaba una solución patrón que contenía 1250 nmoles/ml de cada aminoácido. Este patrón se preparó diluyendo 2 veces una solución de aminoácidos (Sigma) en HCl 0,1 N.

#### 4.3.7. Tiempos de retención.

La Tabla 5 indica los tiempos de retención obtenidos para cada una de los aminoácidos presentes en la mezcla patrón y para las sustancias no presentes en ésta, pero determinadas en este trabajo.

GRADIENTE ESCALONADO			GRADIENTE COMPLEJO		
Tiempo	%Sol. A	%Sol. B	Tiempo	%Sol. A	%Sol. B
0	100	0	0	100	0
1,39	100	0	0,8	100	0
1,40	95	5			
3,19	95	5			
3,20	90	10			
4,59	90	10	4,2	80	20
5	85	15			
6,39	85	15			
6,40	80	20	6,6	80	20
8,19	80	20			
8,20	75	25	8,5	70	30
9,59	75	25			
10	70	30	10,6	70	30
11,39	70	30			
11,40	65	35			
13,19	65	35			
13,20	60	40	13,3	62	38
14,59	60	40	14,8	60	40
15	55	45	15,4	58	42
16,39	55	45	15,8	57	43
16,40	50	50			
18,19	50	50			
18,20	45	55			
19,59	45	55			
20,00	40	60	20,0	40	60

TABLA 4. Gradientes de tipo "escalonado" y "complejo" empleados.



Compuesto	Tiempo de retención (minutos)
Aspártico	1,14
Glutámico	2,04
Asparragina	6,35
Serina	6,70
Histidina	7,96
Glutamina	8,10
Homoserina	8,37
Glicina	8,60
Treonina	9,04
Citrulina	9,40
Alanina	10,48
Arginina	11,01
Hidroxinorvalina	11,56
Tirosina	12,37
Homocisteína	13,12
Valina	14,45
Metionina	14,67
Etionina	16,00
Isoleucina	16,15
Fenilalanina	16,34
Leucina	16,63
Lisina	16,88
Ornitina	17,10

TABLA 5. Tiempos de retención (en minutos) obtenidos para cada uno de los aminoácidos y sustancias relacionadas mencionadas en esta Tesis.

#### 4.4. Cuantificación de S-adenosil-metionina.

La cuantificación se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El método utilizado fue el gradiente escalonado ya descrito en el apartado 4.3. La presencia de un anillo de adenina en la molécula hace que este compuesto absorba a 260 nm sin necesidad de derivatización. En la separación en HPLC a 260 nm la S-adenosil-metionina presenta un tiempo de retención de 7,4 minutos, no solapando con ningún pico conocido que absorba a 260 nm (Fig. 8A). Tras su derivatización con OPA, la Ado-Met se detectó a 340 nm con parecido tiempo de retención (Fig. 8B).

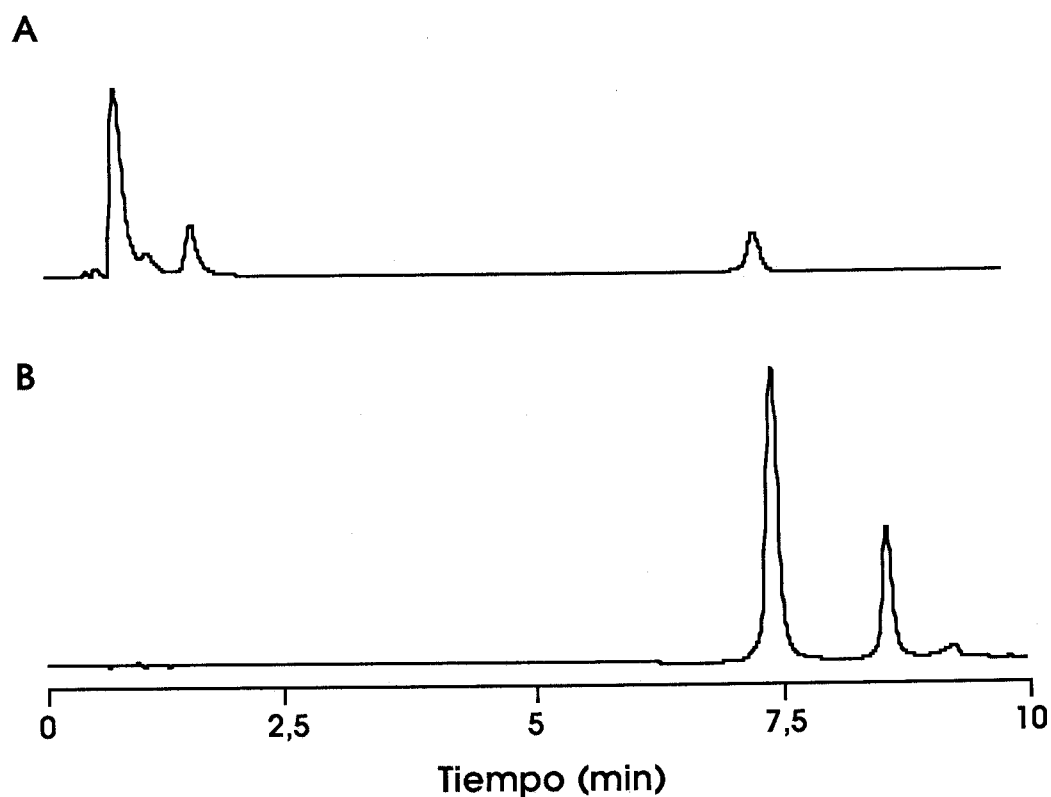


Figura 8. Patrón de S-adenosil-metionina (Ado-Met) resuelto a 260 nm sin derivatización (A) y a 340 nm derivatizado con OPA (B) en una columna de fase reversa C18, con un gradiente escalonado como el descrito en el apartado 4.3 de Métodos.

#### 4.5. Cuantificación de glucosa.

La cuantificación de glucosa se realizó en un Analizador de Glucosa YSI27 (Yellow Spring Instruments, Yellow Spring, OH, USA) inyectando, con una microjeringuilla, 25  $\mu$ l de la muestra diluida.

#### 4.6. Cuantificación de proteínas totales.

##### *En muestras de cultivo*

La cantidad de proteína total se determinó según el método descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando albúmina bovina como patrón.

##### *En extractos crudos*

La concentración de proteínas existentes en los extractos crudos se determinó según el método descrito por Bradford (1976), utilizando albúmina bovina como patrón.

#### 4.7 Determinación de piruvato.

Se utilizó la determinación de piruvato para cuantificar la actividad serina (treonina) desaminasa codificada por el gen *CHA*, que cataboliza la formación de una molécula de piruvato a partir de una de serina. Asimismo se utilizó este ensayo para la determinación de  $\alpha$ -cetobutirato a partir de treonina mediante la acción tanto de la treonina desaminasa anabólica como de la serina (treonina) desaminasa catabólica.

Se mezclaron 0,1 ml de piridoxal fosfato 0,5 mM, 0,5 ml de una solución formada por tampón fosfato potásico 0,2 M pH 8,0 y EDTA 2 mM, un volumen de extracto crudo y agua destilada y desionizada hasta completar un volumen de 0,9 ml. Se incubó la mezcla a 37°C durante 5 minutos. Para desencadenar la reacción se añadieron 0,1 ml de L-serina (previamente calentada a 37°C) y se incubó la mezcla resultante otros 5 minutos a 37°C.



La reacción se detuvo con la adición de 0,5 ml de ácido tricloroacético al 10%. Tras 10 minutos en hielo se centrifugó para eliminar cualquier precipitado que se hubiera formado; se mezcló 0,5 ml de la mezcla resultante con otros 0,5 ml de 2,4 dinitro-fenil-hidracina al 0,033%; la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Una vez transcurridos los 5 minutos se añadieron 2 ml de OHNa 2M. Después de añadir el OHNa 2M se leyó la densidad óptica a 520 nm durante los primeros cinco minutos.

En el tubo control, se añadió el ácido tricloroacético a la mezcla antes de la adición del sustrato (Ser). Los micromoles de piruvato formados por mililitro de mezcla y por minuto se obtuvieron al multiplicar la densidad óptica obtenida por 0,74.

## 5. METODOS GENETICOS.

### 5.1. Obtención de híbridos entre cepas homotáticas y heterotáticas.

Se trató biomasa esporulada de la cepa homotática IFI256 con helicasa (2 mg/ml) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación ocasional para digerir la mayoría de las ascas, provocando la liberación de las esporas. Se recogieron las esporas y se resuspendieron en YPD. Asimismo, se obtuvieron suspensiones de  $10^8$  células por mililitro de MMY1 y MMY2 (*MAT $\alpha$  ura3 $\Delta$ 52 Cyh<sup>R</sup>* y *MAT $\alpha$  ura3 $\Delta$ 52 Cyh<sup>R</sup>*). Las suspensiones de la cepa homotática y heterotática se mezclaron en una proporción 1 a 3 y se permitió el cruzamiento incubando la mezcla a 28°C durante 3 o 4 horas. Se sembraron diluciones de la mezcla en medio mínimo sólido con cicloheximida (5 mg/ml) (la resistencia a cicloheximida es dominante) y se incubaron a 28°C. Las colonias obtenidas son probablemente híbridas, ya que la cepa homotática es sensible a cicloheximida y la cepa heterotática (MMY1 o MMY2) es incapaz de crecer en medio mínimo.

### 5.2. Disección de ascas.

Para digerir las paredes de las ascas, éstas se trataron con helicasa (Johnston y Mortimer 1959). Se suspendió una pequeña

cantidad de biomasa esporulada en una gota de una solución de 5 mg/ml de helicasa sobre un trozo de papel de parafina colocado dentro de una caja de Petri vacía y estéril. Se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos. Posteriormente, se extendió una porción de la gota con un asa sobre una caja de medio para micromanipulación. La disección del asca se llevó a cabo mediante un micromanipulador (Lawrence Precision Machines, California, USA) fijado a un microscopio invertido Nikon (modelo MS) y dotado de una microaguja de cristal.

### 5.3. Caracterización de productos meióticos.

#### 5.3.1. Sexo.

Para determinar el sexo de una cepa, ésta se cruzó con las cepas indicadoras MMY1 ( $\alpha$ ) y MMY2 (a). Se sembró un césped de  $10^7$  células de cada una de las cepas indicadoras sobre cajas de YPD. Estas cepas, además de ser de distinto sexo, debían tener auxotrofías complementarias a las cepas cuyo sexo se quería determinar. Las cajas se incubaron durante 48 horas a 30°C.

Sobre cajas de medio nutritivo se sembraron las cepas de sexo desconocido en trazos paralelos espaciados 1 cm. Se recogió biomasa de cada una de las cepas indicadoras con el canto de sendas tablillas de madera y se sembraron en trazos perpendiculares a los primeros. Se obtuvo así una red en cuyos nudos tenían lugar los cruzamientos en el caso de que las cepas fueran de sexo contrario. El crecimiento de un diploide en un nudo de la malla indicó que la cepa era de sexo contrario a aquella por la que se cruzó.

#### 5.3.2. Esporulación.

Se transfirió con un palillo estéril biomasa de la cepa que se deseaba esporular a una caja de medio de preesporulación, incubándose durante 24 horas a 30°C. La biomasa obtenida se transfirió, mediante réplica en terciopelo, a una caja con medio de esporulación que se incubó durante al menos 4 días a 22°C.

En otras ocasiones la cepa, después de ser cultivada a 30°C en YPD durante 24 horas, se inoculó en un matraz de 25 ml conteniendo 10 ml de medio SPOQ y se mantuvo al menos 4 días a 22°C.

### 5.3.3. Auxonografía.

La presencia de esporas auxótrofas entre las derivadas de la cepa original se determinó replicando las colonias aparecidas tras incubación de 3-4 días a 30°C en YPD, a cajas con medios mínimo e YPD. Aquellas que no crecieron en medio mínimo SD, se replicaron a medio mínimo suplementado con 500 mg/l de casaminoácidos, lo que limitaba el estudio a sólo auxotrofías de aminoácidos. La determinación concreta del aminoácido requerido se realizó mediante el test de Holliday (Sherman *et al.* 1979), probando el crecimiento en cajas con medio mínimo SD suplementado (50 mg/l de cada aminoácido) con distintas combinaciones de aminoácidos tomados de 4 en 4.

### 5.3.4. Resistencia a tóxicos.

La resistencia a análogos tóxicos de aminoácidos (etionina e hidroxinorvalina) se estudió en las esporas obtenidas sembrando en medio mínimo con los análogos etionina e hidroxinorvalina (SDe y SDh respectivamente) a una concentración final de 5 mM.

### 5.3.5. Otros caracteres.

Los mutantes "petite" se determinaron mediante réplica a cajas de medio YPG, que contenían una fuente de carbono (glicerol) no fermentable.

La agregación celular (microfloculación) y las formas anómalas de las células se determinaron mediante observación al microscopio.

## 5.4. Cariotipo.

### 5.4.1. Preparación de las muestras.

Se inocularon 10 ml de YPD con 0,1-0,2 ml de un preinóculo realizado previamente en el mismo medio de cultivo y se incubaron a 30°C durante 24 horas con agitación. Transcurrido este tiempo el cultivo se encuentra en fase estacionaria.

El cultivo se centrifugó durante 5 minutos a 1.500 x g, tras los cuales se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 5 ml de EDTA 50 mM pH 8 y se centrifugó. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en 0,5 ml del tampón CPES con Zymoliase 20000. La suspensión se mantuvo a 28°C y se mezcló cuidadosamente con 0,5 ml de una solución de tampón CPE con un 1% de agarosa (de bajo punto de fusión) que había sido mantenida líquida a 55°C.

Esta mezcla se vertió en los moldes, obteniéndose tras la gelificación bloques de 1 x 2 x 0,1 cm. Los bloques se colocaron en un tubo estéril, se cubrieron con tampón CPE y se mantuvieron durante 4 horas a 28°C sin agitación. Durante ese tiempo el enzima lítico digiere las paredes celulares. Transcurrido este tiempo el tampón se eliminó y se añadieron 5 ml de tampón TESP al cual se le había añadido previamente 1 mg/ml de proteinasa K. Las muestras se incubaron a 50°C durante unas 12 horas eliminándose el tampón tras la desproteinización. Los bloques de agarosa se lavaron a 50°C tres veces con 5 ml de tampón TE sin agitación. Estos lavados se siguieron de otros seis con el mismo tampón pero a temperatura ambiente.

### 5.4.2. Preparación del gel y teñido.

El gel empleado se preparó a partir de tampón TBE (0,5x) con un 0,9% de agarosa y se vertió en el molde. Las muestras se introdujeron en los pocillos del gel, que posteriormente fueron sellados con tampón TBE (0,5x) con un 0,9% de agarosa.

Una vez terminada la separación el gel se tiñó durante 20 o 30 minutos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml de agua destilada), después se lavó con agua destilada entre 5 y 15 minutos. Los geles

se fotografiaron con una cámara Polaroid MP4 con película tipo 667, un filtro Kodak Wratten 22A y una iluminación inferior de luz ultravioleta de 300 nm procedente de un transiluminador Fotodyne 3-3002 (New Berlín, WI, USA).

#### 5.4.3. Equipo utilizado.

Se utilizó un sistema CHEF-DRII de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). Este constaba de un modulo de control, una fuente de electroforesis, un programador de pulsos, una cubeta de electroforesis (con seis electrodos) y un circuito de refrigeración que mantuvo la cubeta a una temperatura constante de 14°C durante la separación.

#### 5.4.4. Parámetros utilizados en la separación.

La separación de cromosomas se realizó a 200 voltios durante 28 horas; en las 16 primeras horas el campo eléctrico pulsó cada 60 segundos y durante las 12 restantes cada 120 segundos (comunicación personal de Antonio Carballo Codón).

## **RESULTADOS**

## 1. CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA DE *Saccharomyces cerevisiae* IFI256.

### 1.1. Características fisiológicas.

#### 1.1.1. Tamaño y volumen celular.

Ya que uno de los objetivos de esta Tesis es la determinación del contenido interno de aminoácidos, ha sido necesario conocer el volumen medio celular a fin de expresar la concentración en forma molar. Para ello se realizaron fotografías (Fig. 9A) en un microscopio Nikon Biophot con 10.000 aumentos, y a partir de estas fotografías se realizaron unas 200 determinaciones del eje mayor y menor de la levadura, obteniéndose para ambos ejes los siguientes valores medios: eje mayor 3  $\mu\text{m}$  y eje menor 1,8  $\mu\text{m}$ , con una desviación típica de 0,13. El volumen medio celular se calculó a partir de la fórmula:

$$V = 4/3 \cdot \pi \cdot a \cdot b^2$$

donde a es el eje mayor y b el eje menor. Este volumen medio celular fue de 40,71  $\mu\text{m}^3$ .

Asimismo, diversos autores han encontrado una relación entre el coeficiente superficie/volumen (S/V) (Kocková-Kratochvílová 1990) y el grado de ploidía de las levaduras. Si este coeficiente es superior a 1,5 las células son generalmente haploides, una coeficiente entre 1,0 y 1,5 indica diploidía, y valores inferiores a 1,0 triploidía o poliploidía. La superficie media celular se calculó a partir de la fórmula:

$$S = 8,89 \cdot b \cdot (a^2 + b^2)^{1/2}$$

La relación S/V calculada fue de 1,4, indicando que la cepa es al menos diploide.

#### 1.1.2. Utilización de fuentes de carbono.

A fin de caracterizar la estirpe IFI256 se ha estudiado la utilización de distintas fuentes de carbono por esta cepa. Las fuentes de carbono utilizadas han sido principalmente fuentes

fermentable/respirables como glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa y maltosa, o sólo respirables como glicerol, etanol y lactato.

Las tasas de crecimiento, obtenidas en medios mínimos, completo (YPD) y semi-industriales (M, MA y MB) aparecen reflejadas en la tabla 6.

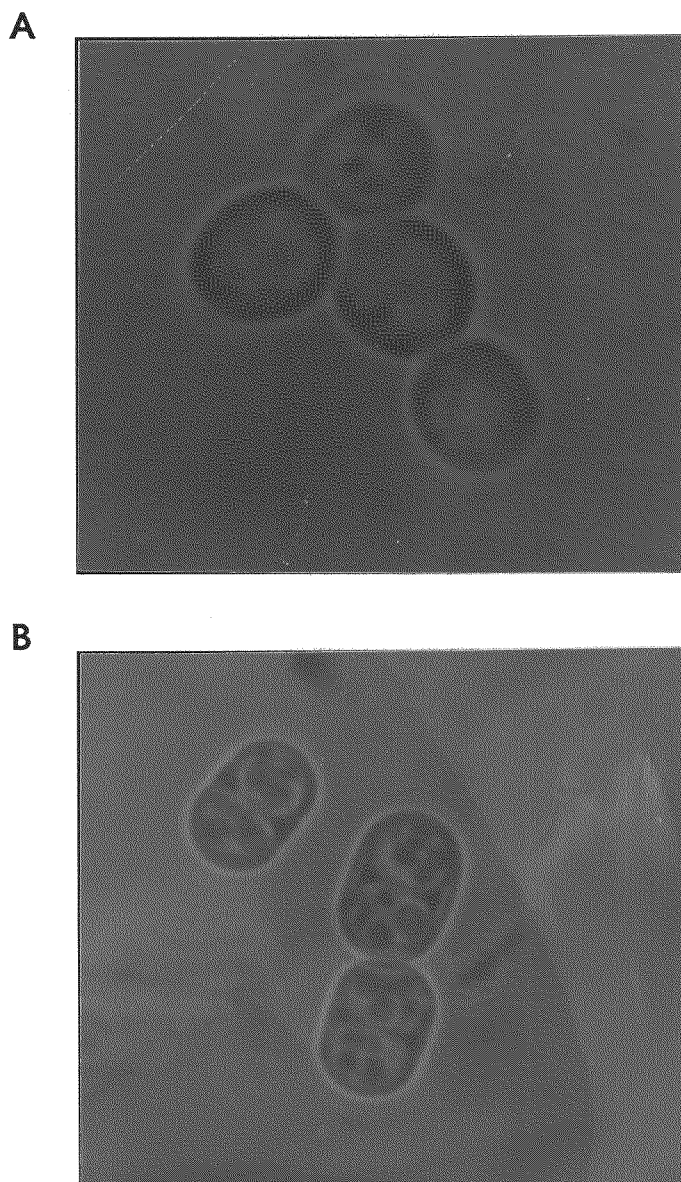


Figura 9. Fotografías de IFI256 creciendo en SD (A) y una vez esporulada formando diadas en un 95% (B).



Medio		Fuente de carbono	Tasa de crecimiento ( $h^{-1}$ )
SD	F/R	Glucosa	0,29
SF	F/R	Fructosa	0,29
SGa	F/R	Galactosa	0,28
SS	F/R	Sacarosa	0,28
SM	F/R	Maltosa	0,21
SG	R	Glicerol	0,12
SE	R	Etanol	0,12
SL	R	Lactato	0,09
YPD	F/R	Glucosa	0,39
M	F/R	Sacarosa	0,11
MA	F/R	Sacarosa	0,14
MB	F/R	Sacarosa	0,11

TABLA 6. Tasas de crecimiento ( $h^{-1}$ ) de la estirpe silvestre IFI256 en función de la fuente de carbono del medio. (F/R), sustrato fermentable y respirable; (R), sustrato respirable.

## 1.2. Características genéticas.

### 1.2.1. Cariotipo.

El polimorfismo en el número y la longitud de los cromosomas en las levaduras es suficientemente alto como para permitir la identificación de estirpes mediante electroforesis de campo pulsante. Se ha estudiado el cariotipo de la estirpe de *Saccharomyces* IFI256 ya que podría ser utilizado como señal de identidad. Su dotación cromosómica se ha comparado con la de la estirpe haploide YNN295, obteniéndose el cariotipo mostrado en la figura 10. Como se observa en esta figura, la estirpe IFI256 muestra un elevado polimorfismo. Mientras que las estirpes de origen genético (YNN295 y S288C) muestran quince bandas que corresponden a dieciséis cromosomas, IFI256 muestran un total de veintiuna, indicando además de un elevado polimorfismo en sus cromosomas una posible aneuploidía o poliploidía para alguno de ellos.

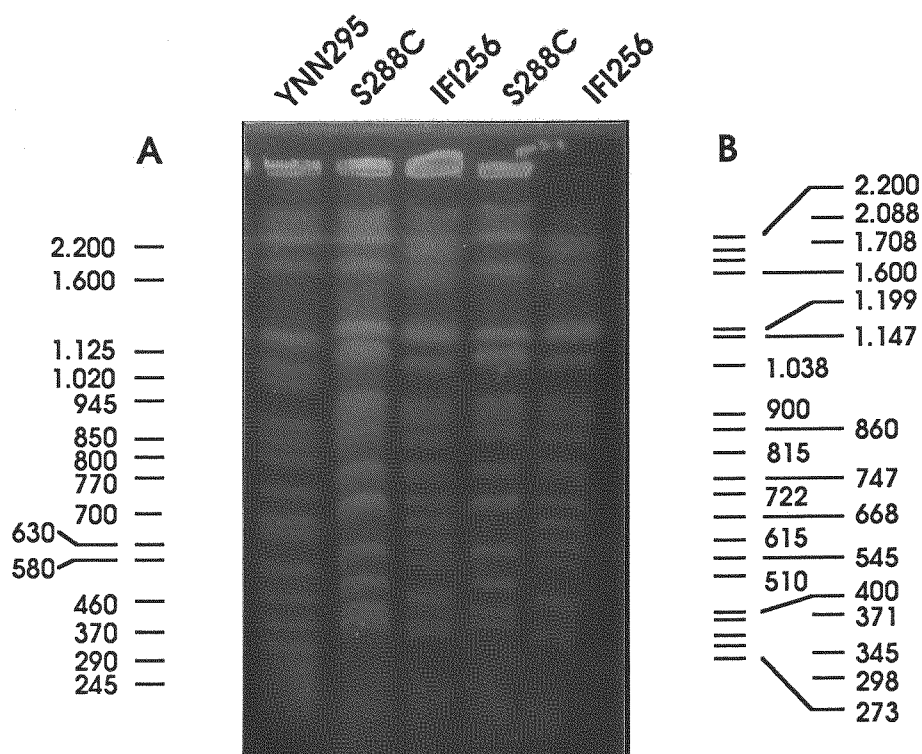


Figura 10. Cariotipo de la estirpe industrial de *Saccharomyces cerevisiae* IFI256, y de las estirpes genéticas S288C y YNN295 (usada como marcador de tamaño). (A) Patrón de tamaños de los cromosomas de la estirpe YNN295. (B) Tamaños calculados para los cromosomas de la estirpe IFI256.

### 1.2.2. Sexo y esporulación.

El sexo de la estirpe se comprobó como se describe en el apartado 6.3 de Métodos. Con ninguna de las cepas indicadoras se obtuvo reacción sexual. Después de estos resultados se intentó la obtención de híbridos forzosos entre la cepa IFI256 y MMY1 o MMY2 como se describe en Métodos 5.1, sin obtener resultados positivos.

Cuando la cepa se esporuló cultivándola primero en medio de preesporulación (PSP) y seguidamente en medio de esporulación (SPO), se obtuvo un 95% de esporulación pero las ascas formadas presentaban siempre sólo dos esporas (diadas) (Fig. 9B) (Nakaseko *et al.* 1984). Asimismo las esporas obtenidas eran capaces de esporular. Estas características coinciden con las descritas en 1972 por Grewal y Miller para las cepas que denominaron apomícticas, en comparación a la apomixis de las plantas (ausencia de formación de gametos). En la literatura se han descrito condiciones de cultivo que optimizan la esporulación, obteniéndose una mayor proporción de tetradas frente a diadas y triadas. Entre éstas, destacan medios de esporulación con una concentración superior de acetato (3-3,5% en lugar del 0,1%) (Bilinski y Miller 1980), con sulfato de zinc (25  $\mu\text{g/ml}$ ) (Bilinski *et al.* 1983), con solventes como el propanolol (8  $\mu\text{M}$ ) que reducen la aparición de productos meióticos diploides (Sora y Bianchi 1982) o choques térmicos. Con la cepa IFI256 se utilizaron todas estas condiciones sin obtener resultados favorables, es decir, la formación de tetradas. Tras las pruebas anteriores la esporulación (con un 99% de eficacia) de IFI256 y los mutantes obtenidos a partir de ella se indujo cultivándola en primer lugar en YPD como medio de preesporulación y posteriormente en SPOQ (medio de esporulación con una concentración superior de acetato).

## 2. METODO DE CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS.

### 2.1. Gradientes utilizados.

Inicialmente se ensayaron diferentes condiciones isocráticas (un solo solvente) (Carlomagno *et al.* 1985), con varias soluciones acuosas con diferentes concentraciones de metanol y un tampón

fosfato 0,3 M a diferentes valores de pH. Los cromatogramas obtenidos bajo estas condiciones no mostraron una buena separación de los aminoácidos y se observaban aminoácidos asociados, por ejemplo, Thr aparecía asociada con Gly o Ala. La figura 11 muestra los resultados obtenidos con una mezcla derivatizada de aminoácidos patrones cuando la composición del solvente fue 50% de fosfato sódico 40 mM pH 6,5, 2% de tetrahidrofurano y 22% de metanol, siendo con este método con el que se obtuvieron los mejores resultados bajo condiciones isocráticas.

Puesto que no se obtuvieron buenos resultados utilizando diferentes condiciones isocráticas, el paso siguiente fue la utilización de un gradiente formado por la mezcla de dos solventes. Los solventes utilizados fueron acetato sódico 1 mM (solvente A) y 60% de acetonitrilo (solvente B), o los descritos en Métodos (fosfato sódico/agua/tetrahidrofurano, solvente A, y fosfato sódico/agua/acetonitrilo, solvente B), que dieron los mejores resultados.

Uno de los gradientes utilizados fue escalonado, variando, como se indicó en Métodos, desde el 100% de A y el 0% de B hasta un 40% de A y un 60% de B. Bajo estas condiciones, la separación de los aminoácidos es muy buena, especialmente la de aquellos aminoácidos cuya señal aparece con un tiempo de retención entre 0 y 13 minutos. La figura 12 muestra los resultados obtenidos usando el gradiente escalonado con muestras de una mezcla de aminoácidos patrones derivatizados (Fig. 12A) y muestras del contenido interno de aminoácidos de la estirpe de *Saccharomyces* IFI256 (Fig. 12B). El gradiente escalonado también se muestra en estas figuras.

En un intento de optimizar la separación de los aminoácidos, se utilizó un gradiente diferente, usando los solventes ya descritos y mezclándolos de forma que las concentraciones variaron entre 100% de A y 0% de B hasta 40% de A y 60% de B. Sin embargo, esta vez el gradiente formado no fue escalonado sino más complejo, de forma que los aminoácidos que aparecen pasados los primeros 13 minutos se separasen mejor. La figura 13 muestra el cromatograma obtenido cuando se uso una mezcla de aminoácidos patrones derivatizados (Fig. 13A) o muestras del contenido interno de aminoácidos de la estirpe de *Saccharomyces* IFI256 (Fig. 13B). El perfil del gradiente también se muestra en la misma figura. Esta vez la separación de



Figura 11. Separación de los OPA derivados de aminoácidos patrón (50 nmoles de cada aminoácido) en condiciones isocráticas. Solvente (v/v): 50% fosfato sódico 40 mM pH 6,5; 22% metanol; 2% tetrahidrofurano y 26% agua destilada y desionizada. Flujo: 2 ml/min. Tamaño de la muestra 20  $\mu$ l.

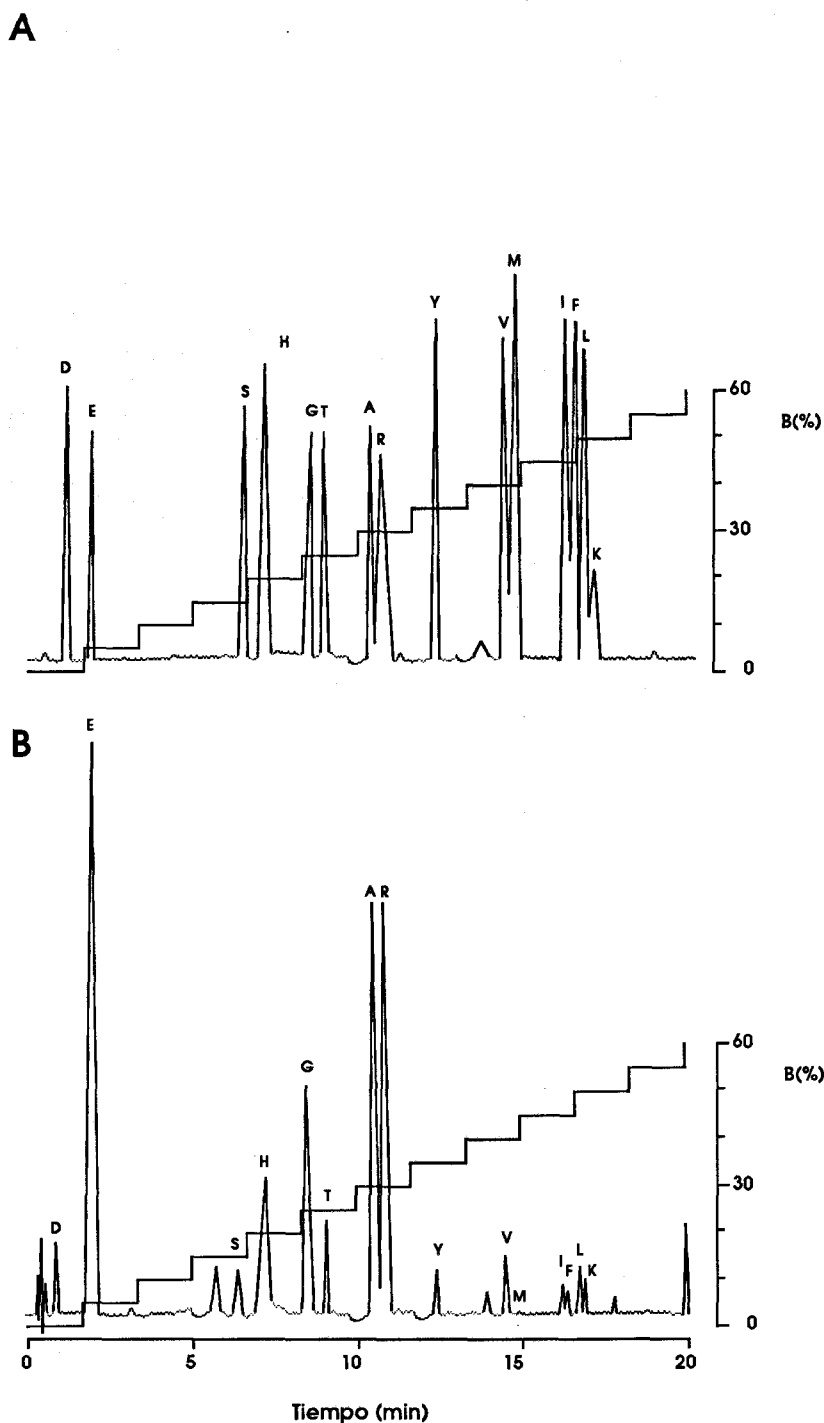


Figura 12. Separación de los OPA derivados de aminoácidos en un gradiente "escalonado". Solventes (v/v): A, 5% fosfato sódico 400 mM pH 7,2, 1,5% tetrahidrofurano y 93,5% agua destilada y desionizada; B, 2,5% fosfato sódico 400 mM pH 7,2, 55% acetonitrilo y 42,5% de agua destilada y desionizada. Flujo: 2 ml/min. Muestra: 20  $\mu$ l. 12A: mezcla de aminoácidos patrón (50 nmoles). 12B: contenido interno de aminoácidos de la estirpe IFI256. Los experimentos se repitieron cinco veces con desviaciones medias de 2,0-2,1% de la señal.

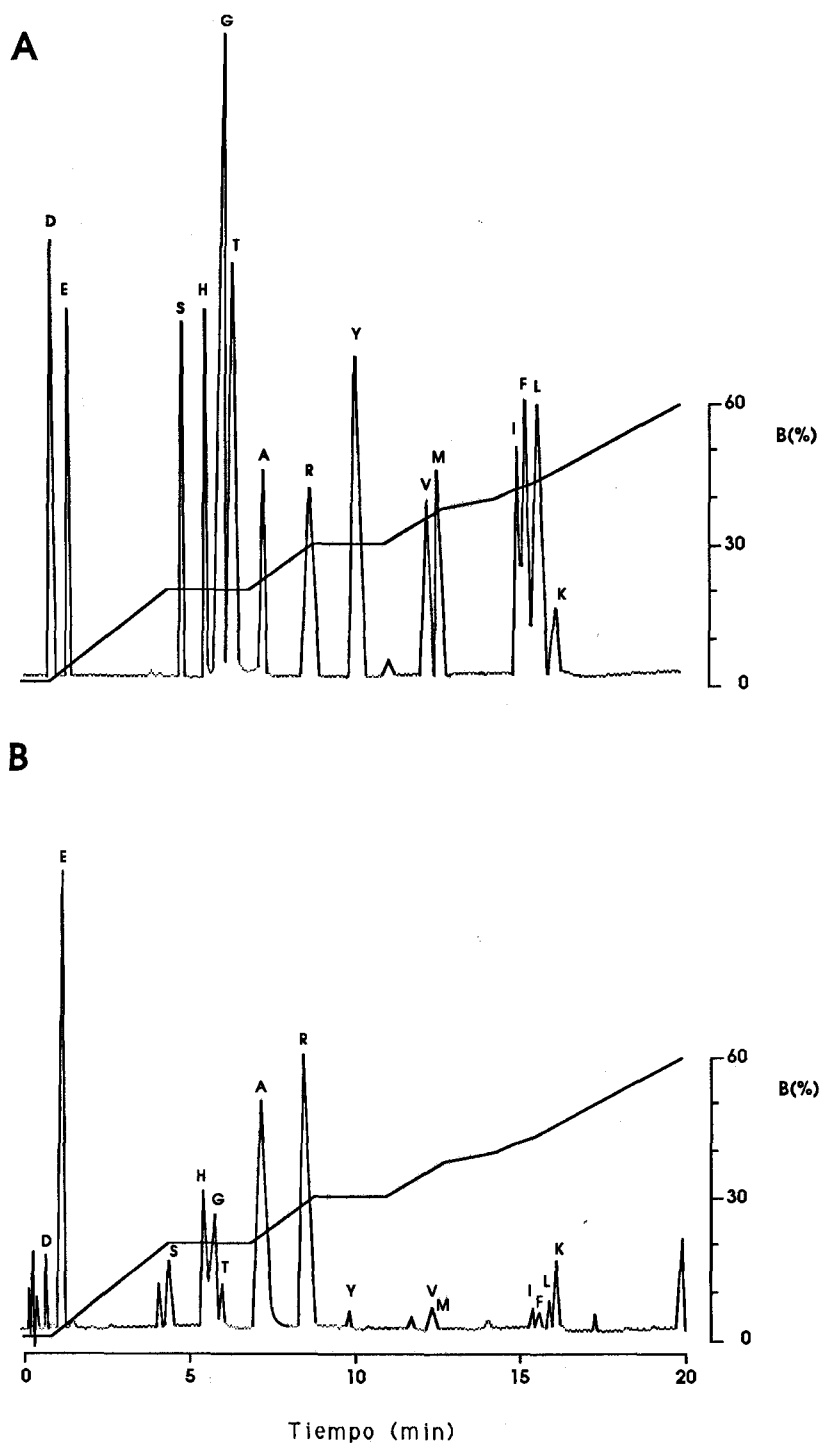


Figura 13. Separación de los OPA derivados de aminoácidos en un gradiente “complejo”. Los solventes y condiciones son los mismos de la figura 12. 13A: mezcla de aminoácidos patrón (50 nmoles). 13B: contenido interno de aminoácidos de la estirpe IFI256. Los experimentos se repitieron cinco veces con desviaciones medias de 2,0-2,1% de la señal.

los aminoácidos que aparecen en los primeros 12 minutos es casi tan buena como la obtenida con el gradiente escalonado. Además, los aminoácidos que aparecen entre los 12 y los 16 minutos se separaron mejor bajo estas condiciones que cuando se usaron gradientes escalonados (Figs. 12A y 12B). Cuando se usó un gradiente escalonado en los primeros 10 minutos seguido por un gradiente complejo durante los últimos 6 minutos la separación de los aminoácidos fue óptima (Fig. 14A y 14B).

## **2.2. Relación entre la intensidad de la reacción de derivatización y la concentración de aminoácidos.**

Se ha estudiado la intensidad de la reacción de derivatización para cada aminoácido en particular, así como la posible existencia de una relación lineal entre la concentración de aminoácidos y la intensidad de la respuesta del aminoácido (área de pico) usando cantidades de aminoácidos patrón que variaron entre 1 y  $10^6$  pmoles (Fig. 15).

En todos los casos existe una buena linealidad entre la concentración del aminoácido y el área del pico integrada, aunque el grado de intensidad de la reacción de derivatización varió enormemente entre los diferentes aminoácidos. Los aminoácidos se clasificaron en seis grupos basados en la intensidad de la respuesta. Los grupos I (Lys), II (Val, Ile), III (Asp) y IV (Glu, Ala, His) dieron las menores intensidades de respuesta; el grupo V (Ser, Thr, Tyr) dio respuestas mayores, y finalmente el grupo VI (Gly, Arg, Phe, Leu, Met) dio la respuesta de mayor intensidad (Fig. 15).

## **2.3. Estabilidad de los OPA/MCE derivados de aminoácidos**

Algunos autores han demostrado que los OPA/MCE derivados de aminoácidos son inestables examinándolos en presencia del reactivo OPA/MCE antes y después de inyectarlos en la columna del HPLC (Schuster 1979, Cooper *et al.* 1984) o en el ambiente del solvente de la columna del HPLC (Cooper *et al.* 1984). En todos los casos la inestabilidad se ha medido por comparación de la respuesta fluorescente (Hancock 1984, Joseph y Marsden 1986).



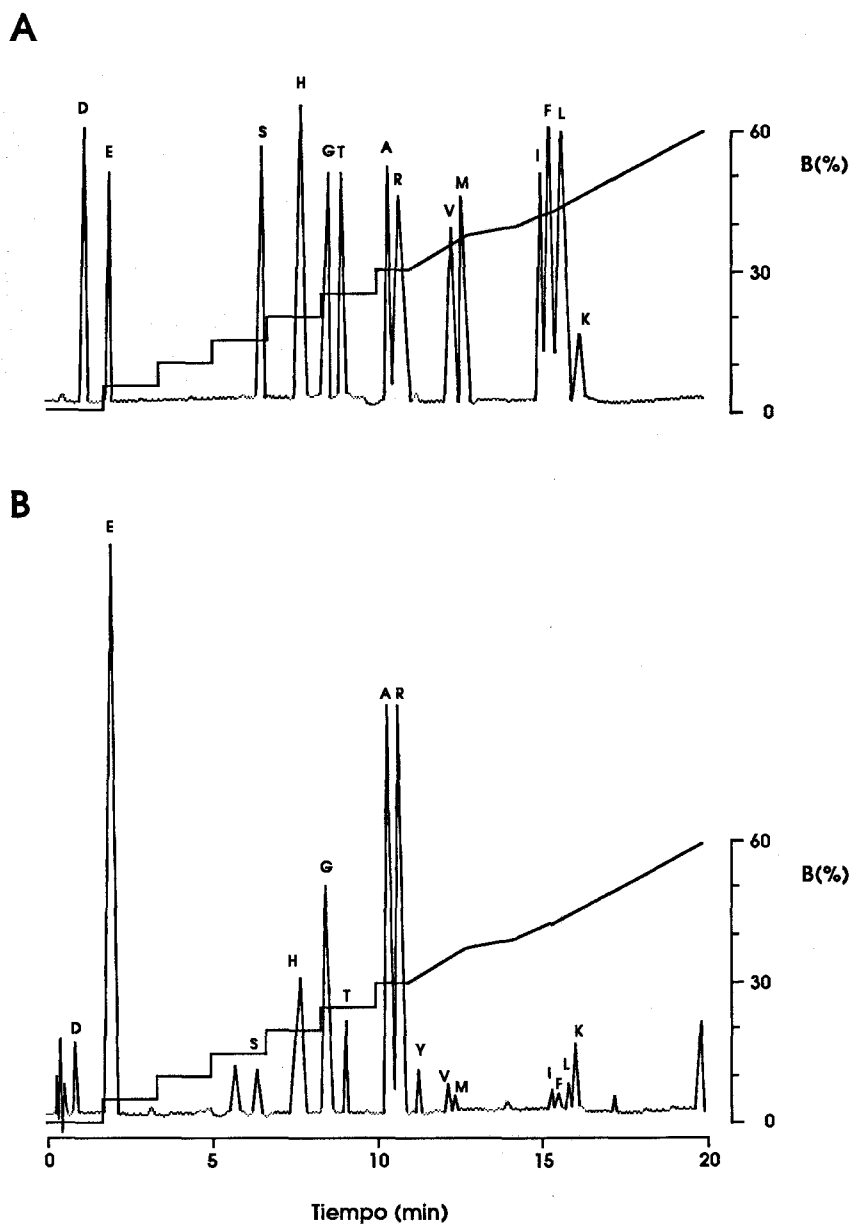


Figura 14. Separación de los OPA derivados de aminoácidos en un gradiente mixto “escalonado-complejo”. Los solventes y condiciones son los mismos de la figura 12. 14A: mezcla de aminoácidos patrón (50 nmol). 14B: contenido interno de aminoácidos de la estirpe IFI256. Los experimentos se repitieron cinco veces con desviaciones medias de 1,9-2,0% de la señal.

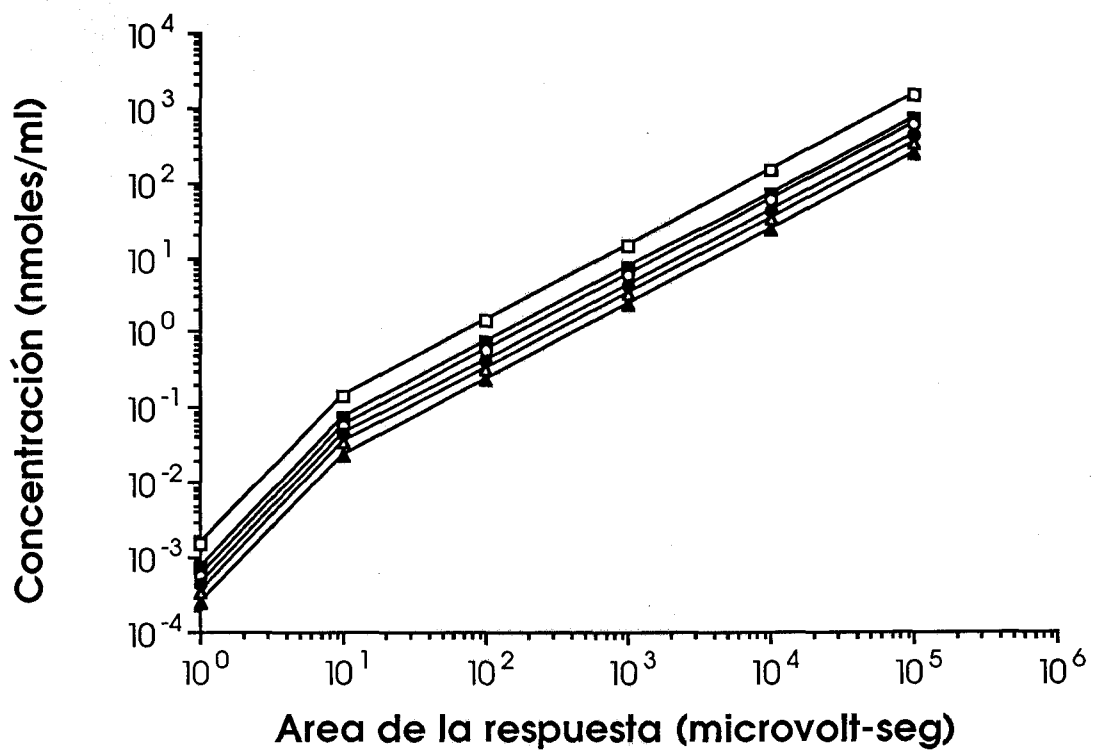


Figura 15. Curvas de calibrado para los OPA derivados de aminoácidos patrón ( $10^{-4}$ - $10^4$  nmoles/ml). Se emplearon las condiciones de la figura 14. Cada punto corresponde al valor medio de ocho repeticiones, con una desviación media de 2,3% de la señal. (□) grupo I: Lys; (■) grupo II: Val, Ile; (○) grupo III: Asp; (●) grupo IV: Glu, Ala, His; (△) grupo V: Ser, Thr, Tyr y (▲) grupo VI: Gly, Arg, Phe, Leu, Met.

Durante esta tesis, la señal de los aminoácidos derivatizados se detectó a una longitud de onda de 340 nm. Cuando se estudió la estabilidad de los derivados OPA/MEC de los aminoácidos, las muestras se retuvieron entre 2 y 30 minutos antes de ser inyectadas en la columna del HPLC. La mayoría de los derivados mostraron una alta estabilidad, con ligeras variaciones entre ellos. De acuerdo con la estabilidad observada, los aminoácidos se clasificaron en cinco grupos (Fig. 16). La mayor estabilidad fue la del grupo I (Val, Lys) ya que la absorbancia permaneció constante, independientemente del tiempo que las muestras fueron retenidas antes de ser inyectadas. El grupo II (Asp, Ile) mostró una disminución de entre el 0 y el 15% de la respuesta, mientras que el grupo III (His, Phe, Glu, Tyr) mostró un decremento de entre el 15 y el 30% de la señal. El grupo IV (Met, Leu, Thr) varió entre el 30 y el 50%. Finalmente, el grupo V (Arg, Ser, Ala, Gly) mostró variaciones del 50% o más. La figura 16 muestra la intensidad de la respuesta de los distintos grupos de aminoácidos frente al tiempo de retención antes de la inyección. Hay que tener en cuenta sin embargo que el tiempo de retención dentro de la columna del HPLC varía para cada aminoácido. Por ello la figura 17 muestra la respuesta frente al tiempo de retención antes de la inyección más el tiempo de retención dentro de la columna del HPLC (entre 1 y 16 minutos, dependiendo de cada aminoácido en particular).

Dado que las muestras normalmente se inyectaban después de 1,5 minutos de derivatización con el reactivo, y que, por otra parte el tiempo máximo de retención de un aminoácido fue de 16 minutos, en la práctica apenas se observó variación en la respuesta de los aminoácidos derivatizados (con la excepción de los aminoácidos pertenecientes al grupo V) puesto que las muestras fueron retenidas en total, entre 2 y 17 minutos (Fig. 16).

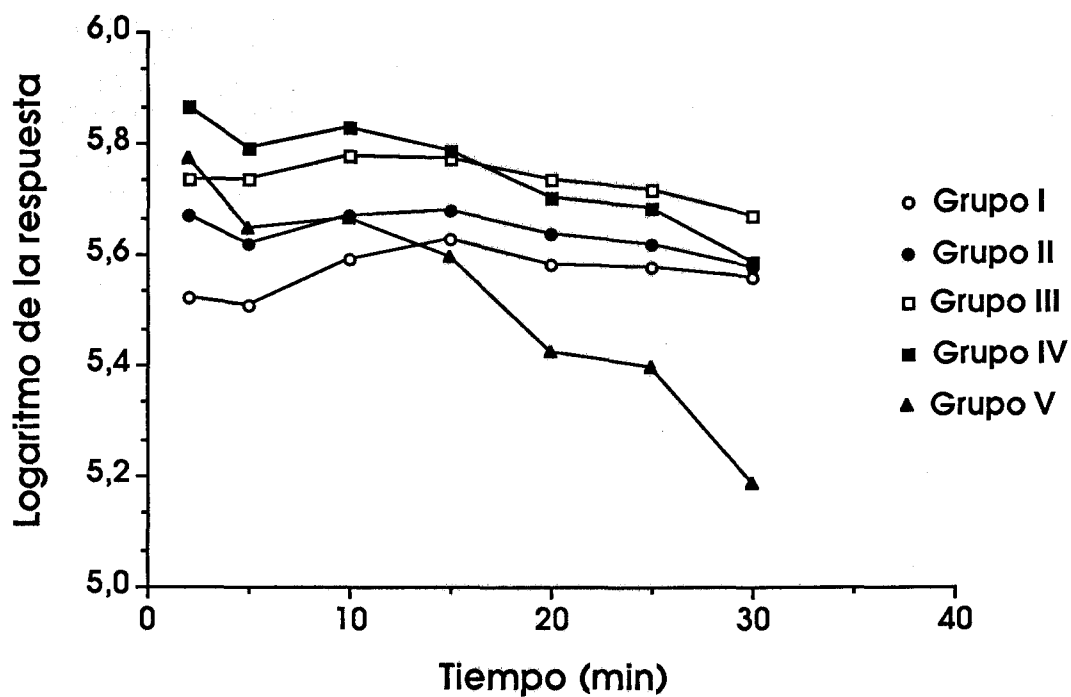


Figura 16. Estabilidad de los OPA derivados de aminoácidos patrón (50 nmoles de cada aminoácido) medida como área de pico obtenida frente al tiempo de derivatización antes de su detección. Cada punto es la media de 14 experimentos con una desviación media del 2,7% de la señal. (○) grupo I: Val, Lys; (●) grupo II: Asp, Ile; (□) grupo III: His, Phe, Glu, Tyr; (■) grupo IV: Met, Leu, Thr y (▲) grupo V: Ser, Gly, Arg, Ala.

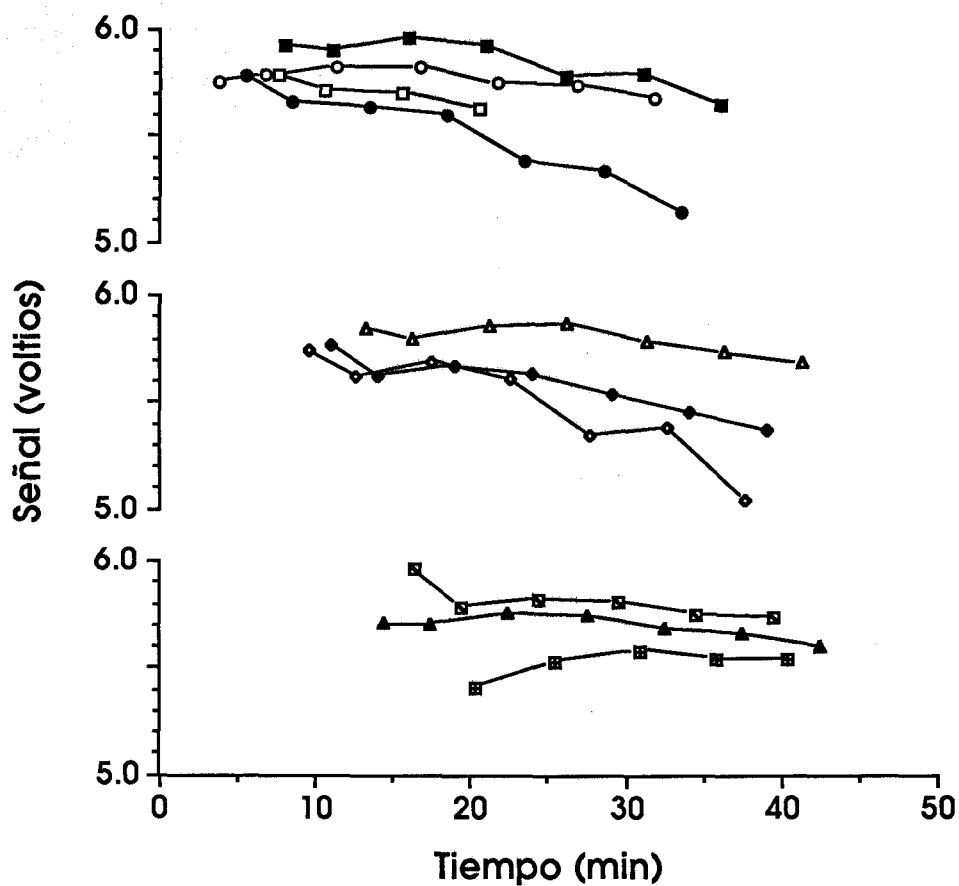


Figura 17. Estabilidad de los OPA derivados de aminoácidos patrón (50 nmoles de cada aminoácido) frente al tiempo de derivatización más el de retención. Cada punto es la media de 14 experimentos con una desviación media de 2,7% de la señal. (O) Asp, Glu; (●) Ser; (□) His, Gly; (■) thr; (◊) Ala; (◐) Arg; (Δ) Tyr; (▲) Val, Met; (▣) Ile, Phe, Leu y (⊞) Lys.

### 3. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES SOBRE LA CONCENTRACION INTERNA DE AMINOACIDOS.

#### 3.1. Aminoácidos presentes en los medios de cultivo.

Antes de comenzar los estudios sobre la influencia de distintos factores sobre el contenido intracelular de aminoácidos, se determinó el contenido en aminoácidos de los distintos medios a utilizar. Como muestran la tabla 7 y la figura 18, mientras que en los medios mínimos no se detectaron aminoácidos, los valores fueron sustancialmente altos en los medios nutritivos de laboratorio y en medios semi-industriales. De hecho, la concentración de algunos aminoácidos, como tirosina y alanina, fue mayor en melazas que en el medio nutritivo de laboratorio.

	YPD	SD	M
Asp	0,50	-	0,64
Glu	1,40	-	0,93
Ser	0,80	-	0,88
His	0,16	-	0,14
Gly	1,05	-	0,50
Thr	0,51	-	0,16
Ala	1,62	-	2,41
Arg	1,01	-	1,03
Tyr	0,28	-	0,62
Val	0,82	-	0,78
Met	0,23	-	0,01
Ile	0,81	-	0,87
Phe	0,71	-	0,08
Leu	1,32	-	0,52
Lys	0,05	-	0,02

TABLA 7. Concentración (mM) de aminoácidos en el medio de cultivo (medio nutritivo, YPD; medio mínimo, SD y medio semi-industrial, M) antes de ser inoculado. -: no detectado. Los resultados mostrados en la tabla son la media de cinco experimentos, las desviaciones medias variaron entre 1,90-2,09% de la señal detectada por HPLC.

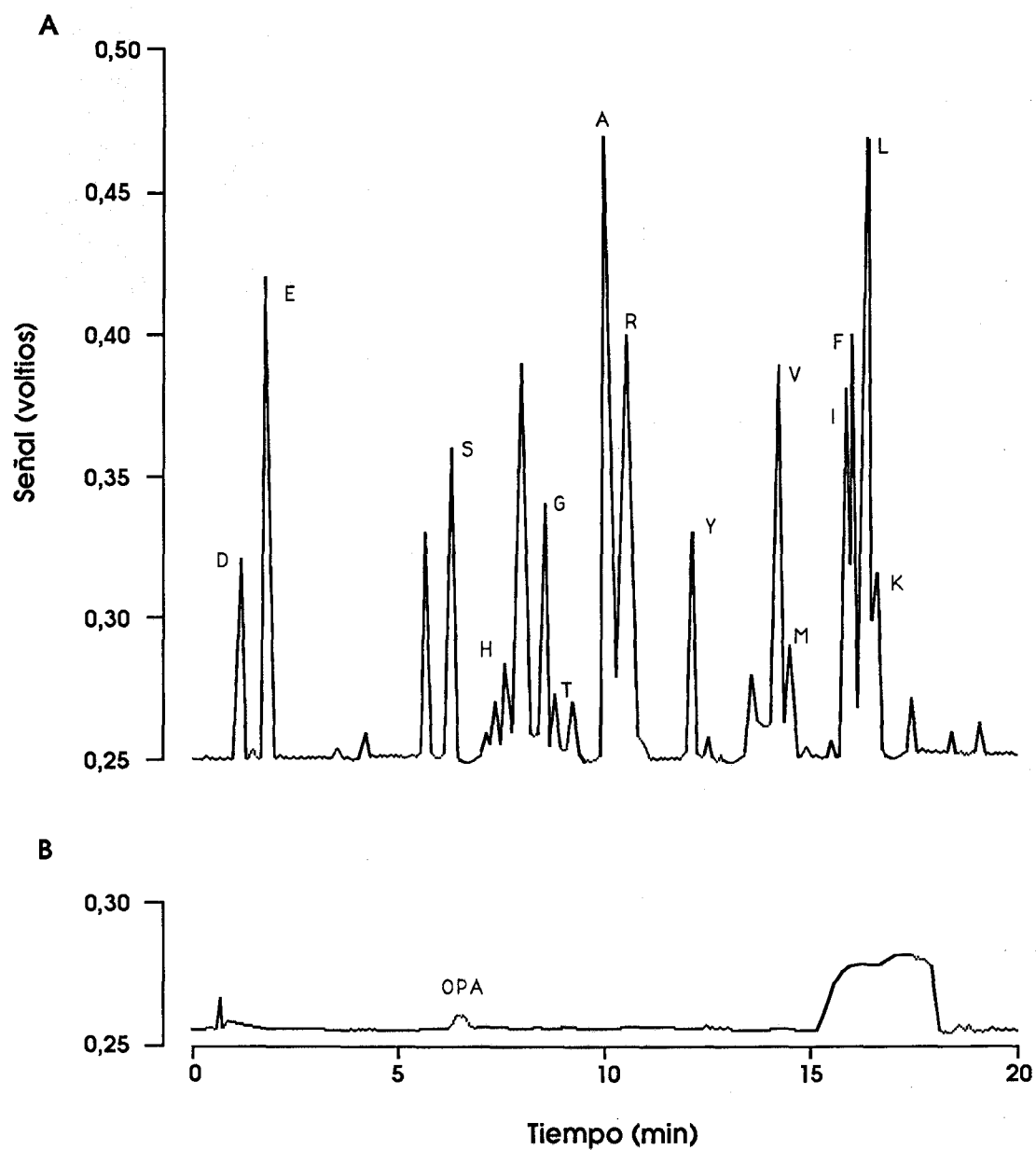


Figura 18. Cromatogramas de los aminoácidos presentes en el medio nutritivo, YPD (A), y en el medio mínimo, SD (B). Las condiciones cromatográficas son las mismas de la figura 14.

### 3.2. Consumo de aminoácidos en el medio nutritivo y medios semi-industriales, a lo largo de la curva de crecimiento.

Tras los resultados obtenidos en el apartado anterior se estudiaron las posibles variaciones en el consumo de aminoácidos presentes en el medio, a lo largo de la curva de crecimiento, cuando la estirpe silvestre IFI256 se cultivó en YPD, en melaza (M) o en melaza suplementada con amonio (MA). Como muestran la tabla 8 y la figura 19, mientras que algunos aminoácidos del medio son consumidos de forma constante durante el crecimiento del cultivo (Ej: Thr, Met o Ser), otros no empiezan a ser incorporados hasta que el cultivo entra en fase estacionaria, una vez agotada la fuente de carbono pero no la de nitrógeno. Los datos obtenidos en melazas fueron análogos a los obtenidos en YPD, con la salvedad de las diferencias observadas entre las melazas suplementadas con amonio y sin suplementar (Tabla 8). El hecho de que en melazas suplementadas con amonio el consumo (al final de la fase exponencial) sea más rápido que en las no suplementadas puede deberse a la compartimentalización existente en *Saccharomyces* (el almacena-miento en vacuola podría provocar una escasez de aminoácidos en el citoplasma y por lo tanto incrementar la entrada de aminoácidos por transportadores específicos).

A la vista de los resultados obtenidos, mostrados en éste y el apartado anterior, los experimentos se llevaron a cabo en medio mínimo, evitando así la entrada de aminoácidos presentes en el medio de cultivo. De todas formas la similitud del comportamiento de las levaduras creciendo en medio nutritivo y semi-industrial (melazas) hacen aconsejable la inclusión de los datos obtenidos en medio rico para estudios de interés aplicado, tales como la obtención de biomasa enriquecida en aminoácidos.

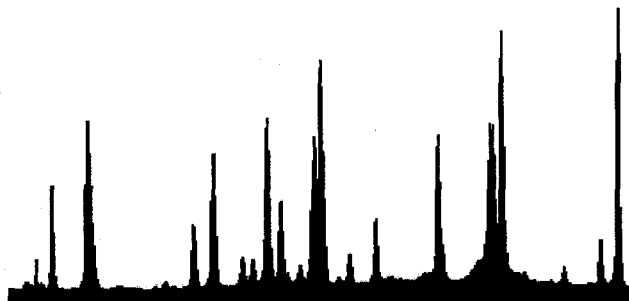


	YPD(0)	YPD(1,2)	YPD(1,9)	M/MA
Asp	0,50	0,30 (60)	0,016 (3,2)	4,5
Glu	1,40	0,90 (64)	0,003 (0,2)	4,36
Ser	0,80	0,38 (48)	0,011 (1,4)	4,90
His	0,16	0,09 (56)	0,002 (1,3)	5,61
Gly	1,05	1,03 (98)	0,027 (2,5)	4,95
Thr	0,51	0,13 (25)	0,003 (0,4)	5,13
Ala	1,62	1,26 (77)	0,005 (0,3)	5,45
Arg	1,01	0,80 (79)	0,006 (0,6)	4,56
Tyr	0,28	0,23 (82)	0,046 (16)	5,87
Val	0,82	0,58 (71)	0,019 (2,3)	6,77
Met	0,23	0,08 (35)	0,031 (13)	4,90
Ile	0,81	0,44 (54)	0,010 (1,2)	4,34
Phe	0,71	0,52 (73)	0,008 (1,1)	4,20
Leu	1,32	0,85 (64)	0,016 (1,2)	4,10
Lys	0,05	0,03 (60)	0,001 (2,0)	4,80

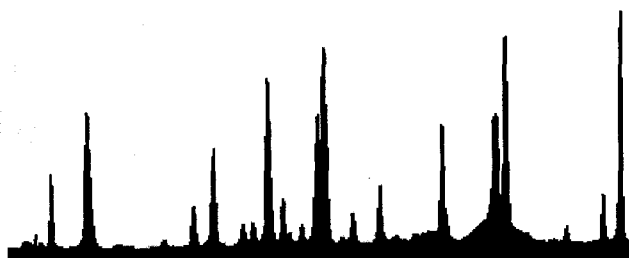
TABLA 8. Concentración (mM) de aminoácidos en el medio de cultivo (medio nutritivo, YPD) antes de ser inoculado [YPD(0)], una vez terminada la fase exponencial [YPD(1,2)] y una vez alcanzada la fase estacionaria tardía [YPD(1,9)], en paréntesis se muestra el porcentaje residual al considerar como 100 el valor de YPD(0). M/MA: relación entre los aminoácidos presentes en melazas y melazas suplementadas con amonio cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 1,2. Los resultados mostrados en la tabla son la media de tres experimentos, las desviaciones medias variaron entre 1,85-2,10% de la señal detectada por HPLC.

A

I



II



III



B

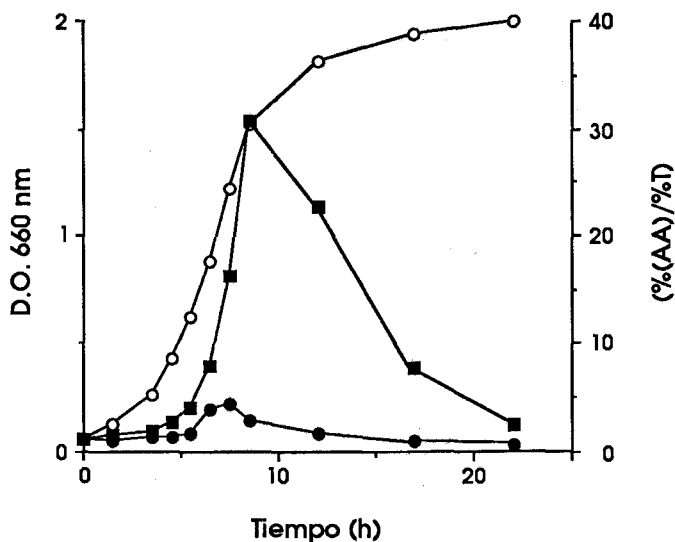


Figura 19. Consumo de aminoácidos en medio rico YPD. A: Cromatogramas del medio sin inocular (I), cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 1,2 (II) y cuando alcanzó una densidad óptica de 1,9 (III). B: Consumo de aminoácidos en función del tiempo expresado como concentración de un determinado aminoácido presente en el medio frente a la transmitancia del cultivo (%AA/%T). Se representan la cinética de consumo de treonina y de glicina, ya que ambas son los casos extremos, la treonina se incorpora de forma constante durante el crecimiento mientras que la glicina no se incorpora hasta que el cultivo no alcanza el principio de la fase estacionaria. (○): Densidad óptica a 660 nm; (●): treonina y (■): glicina.

### 3.3. Cambios en el contenido interno de aminoácidos en función del medio de cultivo.

Las estirpes no isogénicas de *Saccharomyces cerevisiae*, S288C (cepa de laboratorio) e IFI256 (cepa industrial), se cultivaron a 30°C y se determinó la concentración intracelular de aminoácidos en medios con una fuente de carbono fermentable (glucosa: YPD y SD; sacarosa: melazas) frente a medios con una fuente de carbono respirable (glicerol: YPG y SG), y en medios mínimos (SD y SG) frente a medios nutritivos de laboratorio (YPD e YPG) o semi-industriales (M, MA, MB y MAB) (Tabla 9).

A pesar de su fondo genético no isogénico bajo las condiciones utilizadas, el comportamiento de ambas estirpes fue casi idéntico. Sólo variaron los valores absolutos de la concentración intracelular de aminoácidos: ambas estirpes presentan concentraciones similares de la mayoría de los aminoácidos, excepto el aspártico y la treonina cuya concentración fue ligeramente superior y la metionina que fue menor en la estirpe S288C. Ante el comportamiento similar de ambas estirpes los experimentos, por su carácter aplicado, se continuaron con la estirpe industrial IFI256.

La tabla 9 muestra la concentración interna de aminoácidos de la cepa IFI256 en la zona media de la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente  $4 \times 10^7$  células por mililitro) y creciendo en diferentes medios de cultivo. Cuando comparamos los datos obtenidos en medio rico con glucosa (YPD) con los obtenidos en glicerol (YPG) se observa que en YPD la concentración intracelular de la mayoría de los aminoácidos es mayor que en YPG (excepto Glu y Ala). Esta variación es más significativa cuando comparamos los medios mínimos (SD y SG), donde además de aspártico, glutámico y alanina, la concentración de tirosina, valina y lisina es mayor en el medio SG. La concentración de aminoácidos en el medio nutritivo fue entre 2 y 5 veces mayor que en medio mínimo.

Con respecto a las melazas, con la excepción de la treonina y la arginina, la concentración de aminoácidos fue sustancialmente mayor en medio suplementado con amonio (MA) que sin suplementar (M), lo que podría explicarse con los resultados de la tabla 7, y muy similar a los valores obtenidos con melazas

suplementadas con amonio y biotina (MAB). Las concentraciones intracelulares más altas se obtuvieron en medio semi-industrial suplementado con amonio, excepto la arginina y la metionina cuyas mayores concentraciones se obtuvieron en YPD.

	YPD	YPG	SD	SG	M	MA	MB	MAB
Asp	5,76	5,80	1,67	3,21	1,42	6,86	1,85	9,12
Glu	101	128	34	85,9	58,6	132,3	41,4	157
Ser	8,57	2,91	1,45	0,86	5,51	15,9	6,07	14,3
His	25,1	24,9	11,4	11,4	16,4	17,49	13,1	13,8
Gly	9,08	2,91	7,83	3,82	8,87	20,2	8,42	13,2
Thr	11,7	5,86	2,18	1,75	7,89	3,32	10,1	3,39
Ala	42,9	53,1	20,3	38,3	25,9	53,1	18,6	35,6
Arg	46,4	11,6	24,5	10,2	30,5	6,55	15,3	7,55
Tyr	0,74	0,43	0,87	1,31	2,79	11,2	0,82	7,21
Val	6,30	5,12	2,14	2,41	1,49	7,89	3,47	5,66
Met	0,96	0,96	0,20	0,21	0,70	0,37	0,13	0,46
Ile	2,57	0,51	0,64	0,46	1,73	12,7	3,22	17,2
Phe	4,02	3,30	0,82	0,51	1,82	7,81	2,72	8,48
Leu	4,15	1,81	1,06	0,71	2,14	7,48	1,51	7,16
Lys	2,01	1,58	0,98	1,14	1,04	2,24	0,71	2,13

TABLA 9. Concentración intracelular (mM) de aminoácidos de la estirpe de levaduras IFI256 creciendo en YPD, YPG, SD, SG, M, MA, MB y MAB a 30°C. Los resultados mostrados en la tabla son la media de cinco experimentos, las desviaciones medias variaron entre 1,90-2,09% de la señal detectada por HPLC.

### 3.4. Cambios en el contenido interno de aminoácidos con la temperatura.

La cepa IFI256 se cultivó en medio mínimo SD a tres temperaturas diferentes 22°, 30° y 37°C. Se tomaron muestras periódicamente y se determinaron el consumo de glucosa, el crecimiento (D.O.660 nm y número de células) y la concentración intracelular (mM) de aminoácidos (Tabla 10).

Las variaciones de la concentración interna (mM) a lo largo de la curva de crecimiento fueron mayores a 37°C que a las otras temperaturas utilizadas. Como muestra la tabla 10, los valores mínimos decrecen con el incremento de la temperatura, de forma que las concentraciones mínimas más altas se obtuvieron a 22°C y las más bajas a 37°C; estas diferencias variaron con la temperatura entre 3 y 20 veces. Respecto a las concentraciones intracelulares máximas, para la mayoría de los aminoácidos (excepto el aspártico, la arginina y la isoleucina) la concentración aumenta al incrementarse la temperatura, de forma que los valores máximos más altos se obtuvieron a 37°C y los máximos más bajos a 22°C; las diferencias variaron con la temperatura entre 1,2 y 6 veces. A 37°C las diferencias entre la concentración mínima y la máxima variaron entre 60 (Ej: Thr, Ser o His) y 80 veces (Ej: Gly).

A cualquier temperatura 22°, 30° o 37°C, los valores intracelulares mínimos para todos los aminoácidos se detectaron en fase exponencial tardía o en fase estacionaria temprana (excepto alanina, isoleucina y leucina a 30°C, y glicina, isoleucina y lisina a 22°C). A 22°C, todos los aminoácidos alcanzaron sus valores máximos en la fase estacionaria tardía (excepto aspártico y glutámico), mientras que a 30° y 37°C la concentración intracelular máxima de todos los aminoácidos se detectó al principio de la fase exponencial (con la excepción de glutámico, alanina, arginina, tirosina y valina a 30°C).

La figura 20 muestra las variaciones en la concentración de aminoácidos por ml de cultivo (A, B y C) y por célula (D, E y F), a 22° (A y D), 30° (B y E) y 37°C (C y F). A 30° y 37°C (Fig. 20E y 20F) la concentración intracelular de aminoácidos por célula decreció con la curva de crecimiento (excepto como se indicó antes glutámico, alanina, arginina, tirosina y valina, cuyas concentraciones

aumentaron al final de la fase exponencial). A 22°C (Fig. 20D), sólo la concentración intracelular de aspártico y glutámico decrecieron con la curva de crecimiento como también se indicó con anterioridad; todos los demás aminoácidos aumentaron al final de la fase exponencial. A 22° y 30°C la concentración de todos los aminoácidos por ml cultivo (Fig. 20A, 20B y 20C) varió de forma similar, aumentando a lo largo de la curva de crecimiento; a 37°C sólo la alanina y la arginina mostraron este comportamiento, la concentración por ml de cultivo del resto de los aminoácidos decreció fuertemente una vez alcanzada la fase estacionaria temprana (Fig. 20C).

	22°C		30°C		37°C	
	Mín	Máx	Mín	Máx	Mín	Máx
Asp	0,76	44,5	1,19	30,9	0,14	5,24
Glu	8,82	51,1	12,1	35,7	3,33	58,1
Ser	0,83	1,90	0,83	6,19	0,07	4,76
His	7,62	29,8	1,36	17,1	0,71	36,7
Gly	0,35	4,76	2,17	8,15	0,10	9,29
Thr	0,37	2,86	0,32	5,24	0,29	15,9
Ala	1,19	11,4	5,55	23,1	1,40	14,3
Arg	4,62	35,9	3,69	26,5	2,10	31,2
Tyr	0,33	0,74	0,21	1,07	0,17	3,81
Val	1,83	2,86	0,91	3,57	0,52	6,67
Met	0,17	0,29	0,04	0,68	0,04	0,12
Phe	0,62	1,05	0,69	4,76	0,11	3,57
Ile	0,21	0,74	0,24	1,26	0,02	0,40
Leu	0,31	0,64	0,45	4,52	0,10	1,88
Lys	0,21	0,29	0,02	1,04	0,02	0,24

TABLA 10. Concentración intracelular (mM) mínima (Mín.) y máxima (Máx.) de aminoácidos de la estirpe IFI256 creciendo en medio mínimo SD a 22°, 30° y 37°C. Los resultados mostrados en la tabla son la media de cuatro experimentos, las desviaciones medias variaron entre 1,85-2,11% de la señal detectada por HPLC.

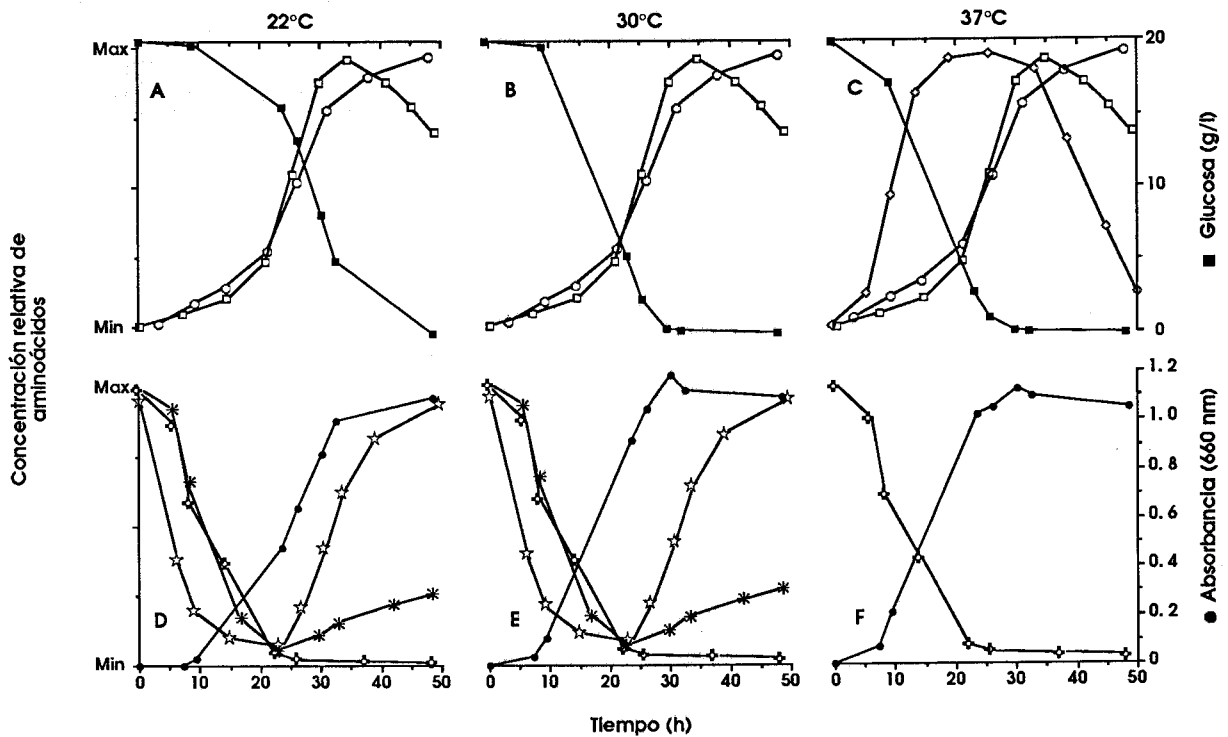


Figura 20. Crecimiento (absorbancia a 660 nm) (●), consumo de glucosa (■) y variaciones en la concentración intracelular de aminoácidos a 22° (A y D), a 30° (B y E) y 37°C (C y F); expresada por ml de cultivo (A, B y C) y por célula (D, E y F). Los valores absolutos, desviaciones medias y número de experimentos se encuentran en la Tabla 10.

20A: (□) Asp, Ser, His, Gly, Thr; (○) los demás aminoácidos. 20B: (□) Gly, Met; (○) los demás aminoácidos. 20C: (□) Ala; (○) Arg; (●) los demás aminoácidos. 20D: (☆) Ala, Phe; (\*) Asp, Ile, Lys; (⊕) los demás aminoácidos. 20E: (⊕) Gly, Met; (\*) Asp, Ser, His, Ile, Phe, Leu, Lys; (☆) los demás aminoácidos. 20F: (⊕) todos los aminoácidos.

### 3.5. Fermentación/respiración: cambios en el contenido interno de aminoácidos.

La estirpe de *Saccharomyces* IFI256 y el mutante "petite" IFI256P (obtenido de forma espontánea a partir de IFI256) se cultivaron a 30°C en cultivo discontinuo hasta mediados de la fase exponencial del crecimiento ( $A_{660 \text{ nm}} = 0,7$ , aproximadamente  $4 \times 10^7$  cél/ml) y se determinó el contenido intracelular de aminoácidos por célula (mM) bajo condiciones solo fermentativas (la estirpe "petite" creciendo en YPD o en SD), fermentativas/respiratorias (IFI256 creciendo en YPD o en SD) y exclusivamente respiratorias (IFI256 creciendo en YPG o en SG) (Tabla 11). Todos los aminoácidos detectados cuyos precursores son intermediarios de la ruta glicolítica (Fig. 1) (Gly, Ser, Ala, Leu, Val, Tyr, Met, Ile, Thr y Phe) mostraron concentraciones superiores bajo condiciones fermentativas, decreciendo cuando las condiciones fueron fermentativas/respiratorias y alcanzando las menores concentraciones bajo condiciones respiratorias, tanto en medio rico como en medio mínimo. Las únicas excepciones fueron, la histidina, cuya concentración raramente varía bajo las condiciones usadas, y el aspártico, precursor de varios aminoácidos. En la mayoría de los casos la concentración varió entre 2 y 3 veces.

Respecto a los aminoácidos detectados que derivan del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Lys, Arg y Glu), la concentración de Arg, Glu y Lys varió al cambiar el metabolismo de fermentativo a respiratorio. El Glu (en YPG) y la Lys (en SG) alcanzaron sus máximos valores bajo condiciones exclusivamente respiratorias. Se debe puntualizar que aunque la ruta glicolítica es una serie de reacciones que producen piruvato a partir de glucosa-6-fosfato (Gancedo y Serrano 1989), en este estudio los aminoácidos derivados de oxaloacetato (Fig. 1), son también considerados aminoácidos derivados de la glicolisis.

Los cambios observados podrían ser debidos a la naturaleza de la fuente de carbono (glucosa/glicerol) más que al tipo de metabolismo. Diferencias en la tasa de crecimiento podrían influir también en las concentraciones de aminoácidos medidas. Por lo tanto se llevaron a cabo dos grupos de experimentos. En el primero, las células se cultivaron de forma similar al experimento anterior



	Fermentativo IFI256P		Ferment./Respirat. IFI256		Respiratorio IFI256	
	YPD	SD	YPD	SD	YPG	SG
<u>Aminoácidos derivados de la glicólisis:</u>						
His	25	11	25	10	25	10
Phe	4,1	0,8	3,9	0,8	3,2	0,5
Tyr	1	1,6	0,7	0,9	0,4	1,3
Ser	10	1,5	8,5	1,4	2,9	0,8
Gly	9,1	8,5	9,1	7,8	2,7	3,8
Ala	133	80	43	20	53	38
Val	8,2	3,8	6,2	2,1	5	2,4
Leu	2,7	1,1	4,1	1	1,8	0,7
Asp	5,6	0,6	5,7	1,7	5,6	3,2
Thr	19	3,8	12	2,2	5,8	1,7
Ile	4,8	0,8	2,5	0,6	0,5	0,5
Met	1,2	0,2	1	0,2	1	0,2
<u>Aminoácidos derivados del TCA:</u>						
Glu	77	86	100	34	126	84
Arg	19	7,4	46	24	11	4,2
Lys	1,6	0,5	2	1	1,4	1,1

TABLA 11. Concentración intracelular (mM) de aminoácidos de la estirpe "petite" IFI256P creciendo en medio completo (YPD) o medio mínimo (SD) [metabolismo fermentativo], y de la estirpe "grande" IFI256 creciendo tanto en fuentes de carbono fermentables (YPD o SD, metabolismo fermentativo y respiratorio) o respirables (YPG o SG, metabolismo respiratorio). Los resultados mostrados en la tabla son la media de cinco experimentos, las desviaciones medias variaron entre 1,90-2,09% de la señal detectada por HPLC.

pero esta vez en diferentes fuentes de carbono fermentable (fructosa) y respirable (etanol), en lugar de las anteriormente usadas glucosa y glicerol. La tasa de crecimiento en fructosa y etanol fueron similares a las observadas en glucosa y glicerol respectivamente (Tabla 12). Los resultados fueron comparables a los de la tabla 11. En casi todos los casos, la concentración de los aminoácidos procedentes de la ruta glicolítica disminuye cuando el metabolismo cambia de fermentativo a respiratorio, mientras que la concentración de los aminoácidos derivados del ciclo de ácidos tricarboxílicos (Arg, Lys y Glu) se incrementa al ser el metabolismo respiratorio.

En un segundo grupo de experimentos, la concentración intracelular de aminoácidos se midió tanto en la fase exponencial como en la estacionaria, donde se pueden estudiar las transiciones entre metabolismo fermentativo y respiratorio y comparar los resultados con situaciones donde se mantiene el metabolismo fermentativo o el respiratorio. Cuando la estirpe "grande", IFI256, crece en un fuente de carbono fermentable como glucosa o fructosa, su metabolismo es principalmente fermentativo, produciendo etanol (Aguilera y Benítez 1988, 1989). Cuando la glucosa se agota al principio de la fase estacionaria, la estirpe cambia a metabolismo respiratorio usando el etanol previamente formado. Los experimentos se llevaron a cabo comparado el contenido interno de aminoácidos de:

a) la estirpe "petite" creciendo en medio mínimo, SD, en fase exponencial frente a fase estacionaria (metabolismo exclusivamente fermentativo).

b) la estirpe "grande" creciendo en medio mínimo, SD, en fase exponencial (metabolismo mixto fermentativo/respiratorio) frente a fase estacionaria (metabolismo respiratorio).

c) la estirpe "grande" creciendo en SG, en fase exponencial frente a fase estacionaria (metabolismo exclusivamente respiratorio).

Cuando entraron en la fase estacionaria, ambas estirpes, "grande" y "petite", creciendo en glucosa mostraron una disminución de la concentración de casi todos los aminoácidos, aunque esta disminución fue ligeramente superior en la cepa "petite". Para la

	Fermentativo		Ferment./Respirat.		Respiratorio	
	IFI256P		IFI256		IFI256	
	YPF	SF	YPF	SF	YPE	SE
<u>Aminoácidos derivados de la glicólisis:</u>						
His	116	18,6	40,6	19,16	113	18,04
Phe	3,22	0,68	3,60	0,73	2,54	0,45
Tyr	0,86	1,28	0,58	0,69	0,38	1,04
Ser	14,1	0,97	5,64	0,95	3,94	0,55
Gly	6,55	5,40	5,76	4,96	1,96	2,43
Ala	208	187	99,8	46,7	83,2	87,9
Val	11,8	5,41	8,85	2,97	7,31	3,35
Leu	1,60	0,47	1,79	0,45	1,05	0,31
Asp	5,72	0,61	5,77	1,66	5,72	3,20
Thr	21,3	1,93	5,75	1,08	6,39	0,86
Ile	0,70	0,17	0,5	0,13	0,07	0,09
Met	2,86	0,58	2,74	0,62	2,23	0,51
<u>Aminoácidos derivados del TCA:</u>						
Glu	80,6	86,3	103	34,5	134	87,1
Arg	24,5	6,31	39,7	20,9	14,7	3,6
Lys	2,19	1,80	6,76	3,29	2,19	3,83

TABLA 12. Concentración intracelular (mM) de aminoácidos de la estirpe "petite" IFI256P creciendo en medio completo (YPF) o medio mínimo (SF) [metabolismo fermentativo], y de la estirpe "grande" IFI256 creciendo tanto en fuentes de carbono fermentables (YPF o SF, metabolismo fermentativo y respiratorio) o respirables (YPE o SE, metabolismo respiratorio). Los resultados mostrados en la tabla son la media de cinco experimentos, las desviaciones medias variaron entre 1,90-2,09% de la señal detectada por HPLC.

estirpe "grande" creciendo en glicerol, la entrada en la fase estacionaria se acompañó de una ligera disminución y en algunos casos incluso de un incremento en la concentración. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13. La concentración de cada aminoácido en fase exponencial se representó frente a la concentración en fase estacionaria (Fig. 21). Globalmente la concentración intracelular de los aminoácidos disminuyó de forma gradual en el "petite", en el "grande creciendo en SD y en este último creciendo en SG (64, 80 y 86% de reducción respectivamente, Fig. 21A, 21B, 21C). Para cada aminoácido, el cambio en la concentración (aumento/reducción) se produjo independientemente de si los precursores procedían del ciclo de ácidos tricarbónicos o de la ruta glicolítica. Esto está indicando que la razón de los cambios observados se debe al cambio metabólico que se produce al pasar de fase exponencial a fase estacionaria más que los posibles cambios de fermentación a respiración, y que el contenido interno de aminoácidos decrece bajo un metabolismo fermentativo al entrar en fase estacionaria (Tabla 13).

### 3.6. Cambios en el contenido interno de aminoácidos con la tasa de crecimiento.

Las variaciones observadas en el contenido intracelular de aminoácidos podrían deberse a diferencias en la tasa de crecimiento. Por lo tanto, inicialmente se establecieron las concentraciones de aminoácidos como productos del metabolismo primario en relación con el crecimiento celular, determinando el rendimiento  $Y_{px}$  (Pirt 1975) en cultivo continuo.

Tanto la estirpe IFI256 como su mutante "petite" IFI256P se cultivaron en un quimiostato en medio mínimo SD a 30°C usando glucosa como fuente limitante de carbono para establecer las diferentes tasas de crecimiento y se midió el rendimiento  $Y_{px}$  a cada tasa de dilución.

Se han descrito tres situaciones con respecto a la posible relación entre la tasa de crecimiento y la tasa de formación de producto (Aguilera y Benítez 1988) (Fig. 22A, 22B y 22C):

	Condiciones fermentativas		Condiciones mixtas		Condiciones respiratorias	
	IFI256P (SD)		IFI256 (SD)		IFI256 (SG)	
	Exp.	Est.	Exp.	Est.	Exp.	Est.
<u>Aminoácidos derivados de la glicólisis:</u>						
His	11,4	9,2	11,5	9	11,4	13,2
Phe	0,7	0,4	0,8	0,7	0,5	0,5
Tyr	1,6	1,6	0,9	0,9	1,3	1,5
Ser	1,5	0,7	1,4	0,9	0,9	1,3
Gly	8,5	4,7	7,8	5,8	3,8	4
Ala	80	52	20	18	38	30
Val	3,8	2,8	2,1	1,8	2,4	4,1
Leu	1,1	0,9	1,1	0,8	0,7	0,6
Asp	0,6	0,6	1,7	1,5	3,2	3,3
Thr	3,9	2,8	2,2	1,6	1,7	1,4
Ile	0,8	0,7	0,6	0,6	0,5	0,6
Met	0,2	0,3	0,2	0,6	0,2	0,6
<u>Aminoácidos derivados del TCA:</u>						
Glu	86	58	34	28	84	73
Arg	7,4	5,7	24	12	4,3	2,3
Lys	0,5	0,4	1	0,7	1,1	1,1

TABLA 13. Concentración intracelular (mM) de aminoácidos de la estirpe "petite" IFI256P creciendo en medio mínimo, SD (condiciones fermentativas) y la estirpe grande creciendo en SD o SG en fase exponencial (Exp.) (SD, condiciones mixtas, fermentación-respiración; SG, condiciones respiratorias), y en fase estacionaria del crecimiento (condiciones respiratorias). Los resultados mostrados en la tabla son la media de seis experimentos, las desviaciones medias variaron entre 1,85-2,11% de la señal detectada por HPLC.

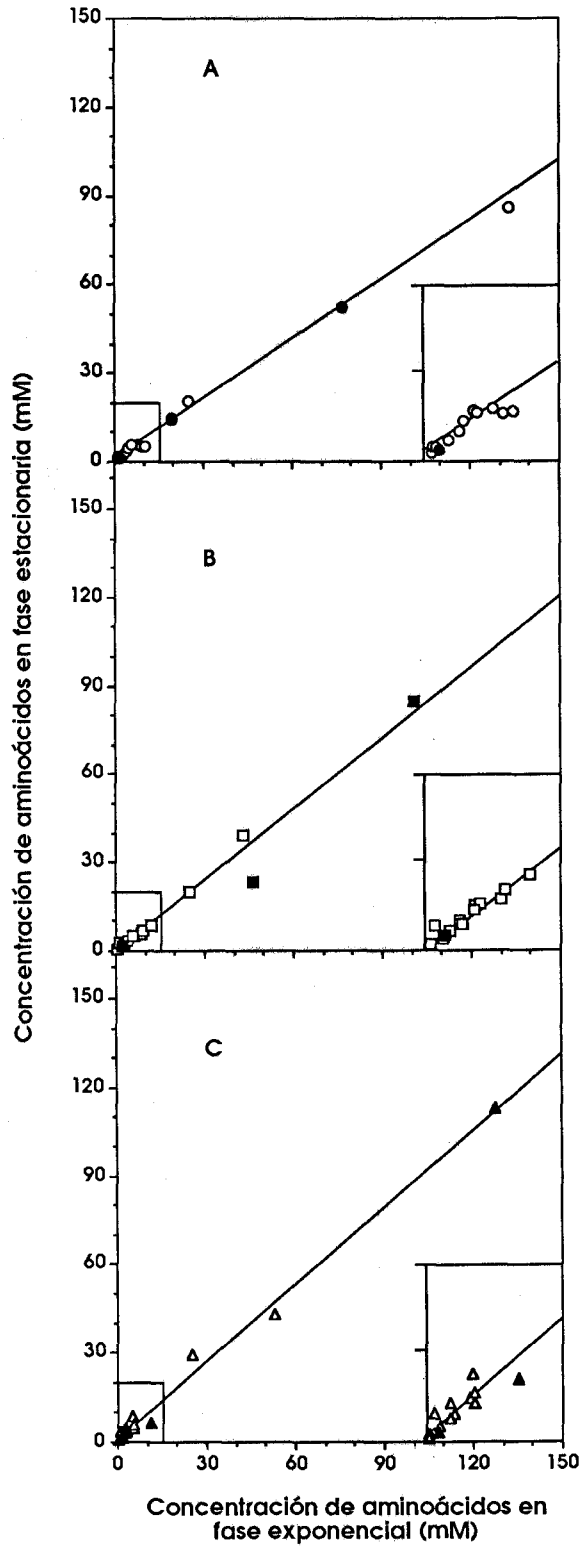


Figura 21. Concentración intracelular de aminoácidos (mM) en fase exponencial frente a la misma en fase estacionaria de la estirpe "petite" IFI256P cultivada en SD (A), y de la estirpe "grande" creciendo en SD (B) y SG (C). Símbolos abiertos: aminoácidos derivados de la glicolisis; símbolos cerrados: aminoácidos derivados del ciclo de ácidos tricarboxílicos.

1) Cuando ambos procesos no están relacionados, la tasa específica de formación de producto,  $q_p$ , es independiente de la tasa de crecimiento,  $\mu$  (Fig. 22A).

2) Cuando ambos procesos están totalmente ligados, la cantidad de producto formado es directamente proporcional a la biomasa formada (Fig. 22B), y la tasa específica de formación de producto es  $q_p = Y_{px} \mu$ , donde  $Y_{px}$  es el producto formado con respecto a la biomasa obtenida.

3) Cuando los procesos están parcialmente ligados,  $q_p = Y_{px} \mu + \beta$  (Fig. 22C).

Cuando, en cultivo continuo, decreció la tasa de dilución,  $D$  (equivalente a  $\mu$  en cultivo discontinuo), se incrementó en ambas estirpes el rendimiento de aminoácidos producidos por unidad de biomasa ( $Y_{px}$ ) (Figs. 23 y 24). A tasas bajas de dilución,  $Y_{px}$  aumentó dramáticamente con la disminución de los valores de  $D$ , alcanzando un valor constante sólo a valores de  $D$  mayores de  $0,06 \text{ h}^{-1}$  (Figs. 23 y 24). Estos resultados están de acuerdo con los esperados cuando dos procesos metabólicos están parcialmente ligados (Aguilera y Benítez 1988).

Aunque la concentración de todos los aminoácidos aumentó con la disminución de la tasa de crecimiento por debajo de valores de  $0,06 \text{ h}^{-1}$  (Figs. 23 y 24) (resultado de procesos parcialmente ligados, Fig. 22C), este incremento varió entre los diferentes aminoácidos. Además, esta variación fue diferente en la estirpe "grande" y en la "petite". Como muestra la tabla 14, la estirpe "petite" presenta incrementos en  $Y_{px}$  entre 1,5 y 7,3 veces, dependiendo del aminoácido, mientras que en la estirpe "grande" estos incrementos varían entre 2,5 y 12 veces.

La tabla 14 muestra también que, a las mismas tasas de dilución y para el mismo consumo de azúcar, la cantidad de biomasa formada fue menor en la estirpe "petite" que en la "grande", indicando que la estirpe "grande" fue más eficiente al metabolizar el sustrato que el mutante "petite". Por lo tanto, cuando se calculó el rendimiento producto/sustrato,  $Y_{ps}$ , se observó que a tasas de dilución mayores de  $0,2 \text{ h}^{-1}$  para una cantidad dada de azúcar consumida la estirpe "grande" presentó un contenido intracelular de aminoácidos casi dos veces mayor que la estirpe "petite" (Tabla 14). Al decrecer la tasa de dilución, estas diferencias se

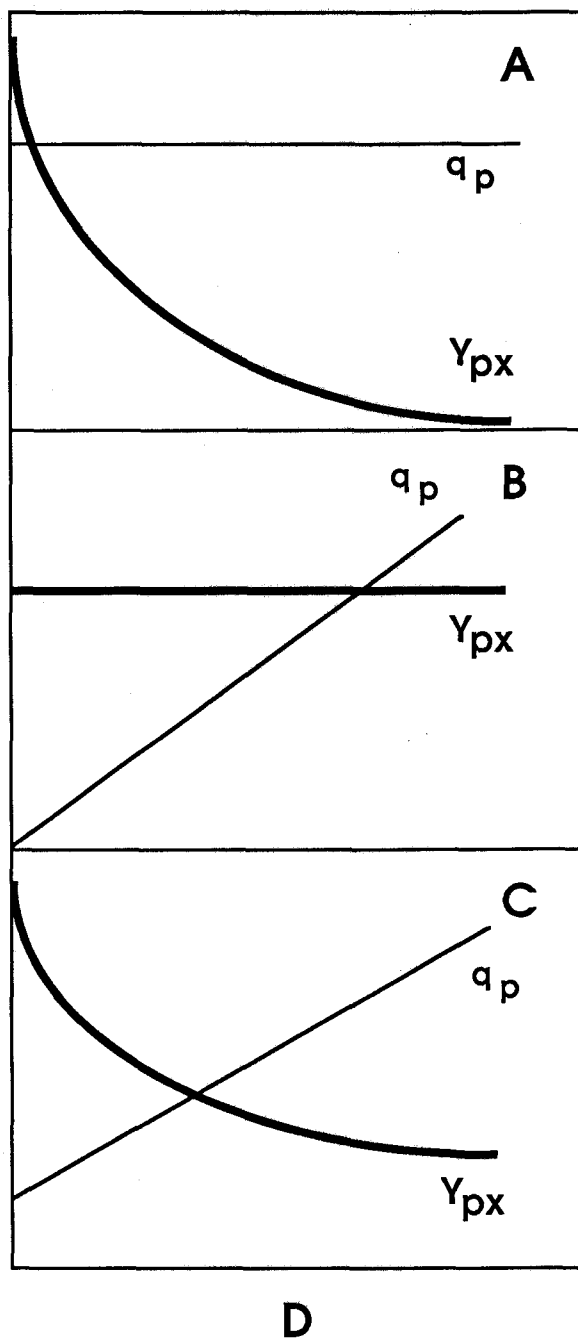


Figura 22. Variaciones en la tasa de formación de producto,  $q_p$ , y el rendimiento producto/biomasa,  $Y_{px}$ , en función de la tasa de dilución,  $D$ , cuando el producto metabólico es independiente (A), o está ligado total (B) o parcialmente al crecimiento (C) (Aguilera y Benítez 1988).



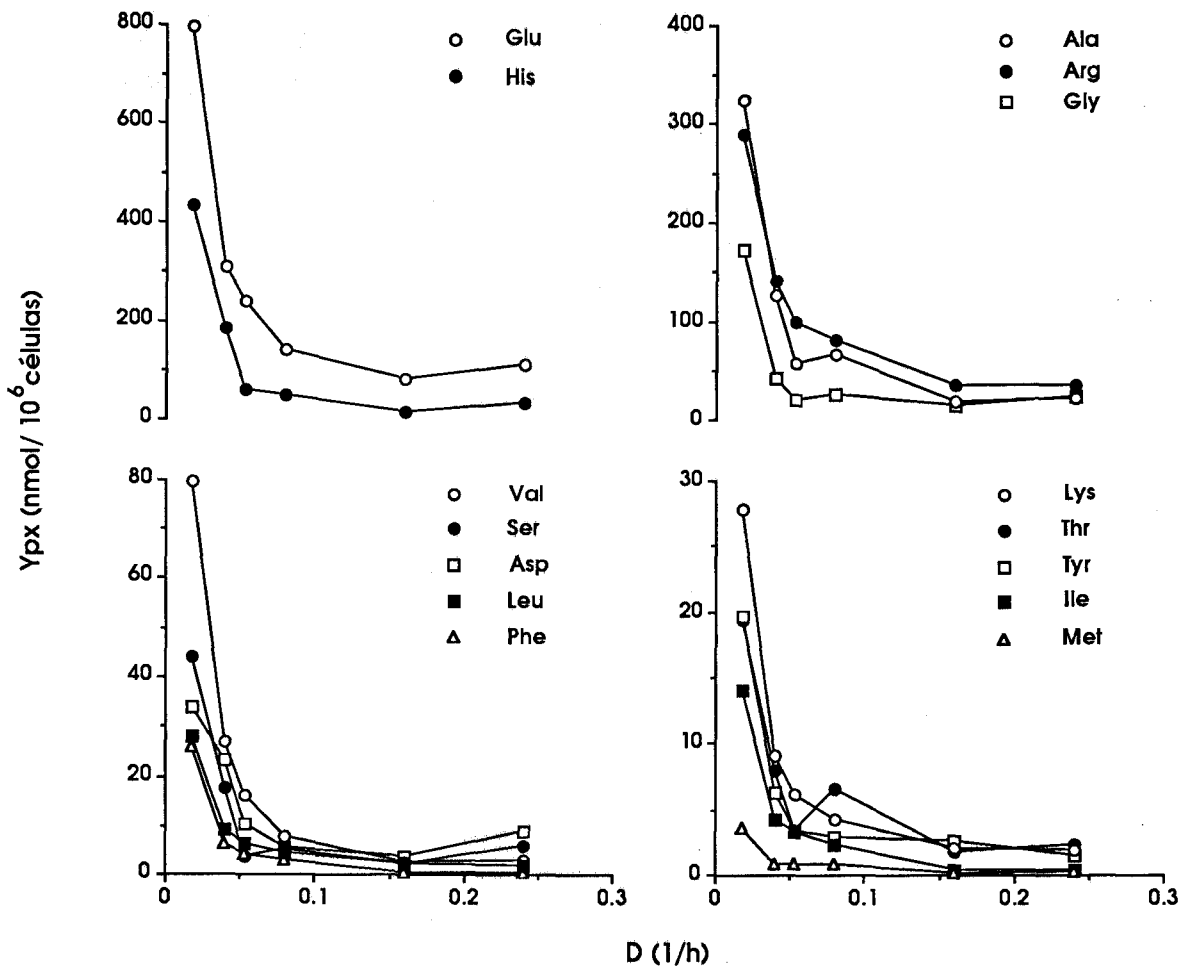


Figura 23. Variaciones en el rendimiento producto/biomasa,  $Y_{p_x}$  (nmoles de aminoácido/10<sup>6</sup> células), en función de la tasa de dilución,  $D$  (h<sup>-1</sup>), de la estirpe silvestre IFI256 cultivada en cultivo continuo con medio mínimo a 30°C.

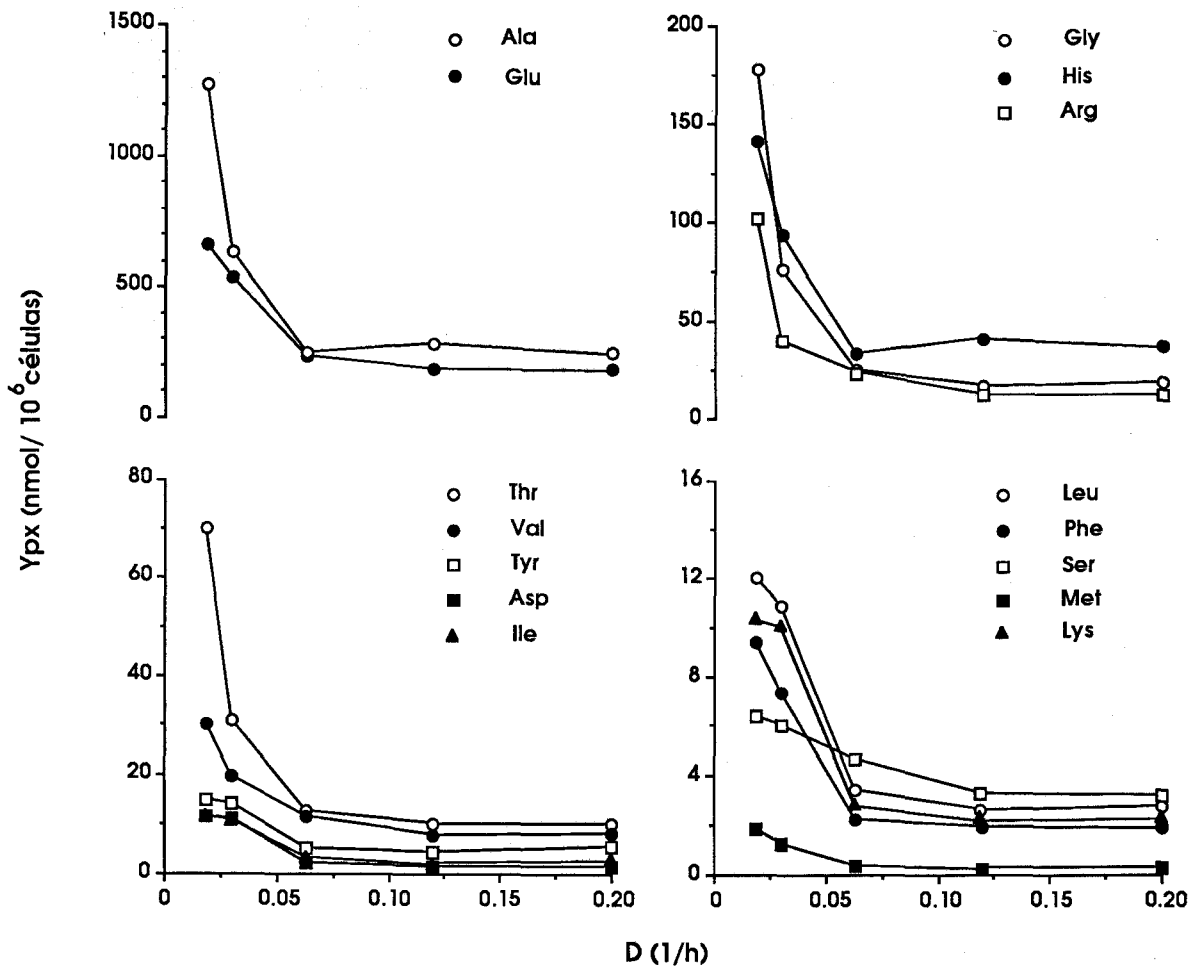


Figura 24. Variaciones en el rendimiento producto/biomasa,  $Y_{p x}$  (nmoles de aminoácido/10<sup>6</sup> células), en función de la tasa de dilución,  $D$  ( $h^{-1}$ ), de la estirpe "petite" IF1256P cultivada en cultivo continuo con medio mínimo a 30°C.

D	$\Delta s$	x		Y <sub>px</sub>		Y <sub>ps</sub>	
		IFI256P	IFI256	IFI256P	IFI256	IFI256P	IFI256
0,02	3,5	10	15,2	1,5-7,3	2,5-12	4,3-21	11-52
0,06	4,65	18,6	28,5	1,1-4	1,2-5	4,4-16	7,4-31
0,08	6,8	31,6	50,4	1-1,2	1-1,5	4,6-5,6	7,4-11
0,15	7,2	33,9	58,5	1	1	4,7	8,1
0,20	7,5	35,2	59,5	1	1	4,7	7,9

TABLA 14. Relación entre diferentes parámetros celulares de la estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* IFI256 y del mutante "petite" IFI256P creciendo en cultivo continuo con glucosa como sustrato limitante del crecimiento. D es la tasa de dilución ( $h^{-1}$ ) equivalente a la tasa de crecimiento,  $\mu$ . Otros parámetros son x ( $10^6$  células/ml);  $\Delta s$  (mmoles glucosa); Y<sub>px</sub> (nmoles de aminoácidos/ $10^6$  células), valores relativos del contenido interno de aminoácidos (mM) con la tasa de crecimiento, comparados con los detectados a D = 0,20  $h^{-1}$ , donde Y<sub>px</sub> es constante y considerada la unidad; e Y<sub>ps</sub> (nmoles de aminoácidos/mmoles de glucosa), calculado dividiendo Y<sub>px</sub> por Y<sub>sx</sub> (mmoles de glucosa/ $10^7$  células). Los resultados mostrados en la tabla son la media de cuatro experimentos, las desviaciones medias variaron entre 2,3-2,7% de la señal detectada por HPLC.

incrementan. A una tasa de dilución de  $0,02 \text{ h}^{-1}$  y a partir de la misma cantidad de glucosa consumida la estirpe "grande" produjo alrededor de 2,5 veces más aminoácidos que el mutante "petite". La figura 25 muestra la variación de  $Y_{sx}$  de las estirpes IFI256 e IFI256P en función de la tasa de dilución en cultivo continuo reafirmando la idea de que la estirpe "grande" fue más eficiente al metabolizar el sustrato.

Asimismo, a tasas de dilución mayores de  $0,06 \text{ h}^{-1}$  el rendimiento  $Y_{px}$  fue constante tanto en la estirpe "grande" como en la "petite", pero los valores absolutos fueron diferentes entre ambas estirpes. La tabla 15 muestra los valores de  $Y_{px}$  para cada aminoácido en la estirpe "petite" y la "grande" a tasas de dilución mayores de  $0,06 \text{ h}^{-1}$  (donde  $Y_{px}$  es constante), y a una tasa de dilución igual a  $0,02 \text{ h}^{-1}$ , que fue la menor tasa de dilución medida. A tasas de dilución mayores de  $0,06 \text{ h}^{-1}$ , la razón entre la estirpe "petite" y la "grande" (IFI256P/IFI256) es comparable a los datos obtenidos en cultivo discontinuo en SD (Tabla 11). Las diferencias en las concentraciones de aminoácidos no son debidas a diferencias en la tasa de crecimiento de ambas estirpes ya que esta vez las tasas de crecimiento fueron idénticas (Tabla 15). A una tasa de crecimiento de  $0,02 \text{ h}^{-1}$ , la concentración de glucosa es tan baja que sólo el metabolismo respiratorio está presente en la estirpe "grande" (Gancedo y Serrano 1989). Por lo tanto, los datos de la tabla 15 serían comparables a los obtenidos en cultivo discontinuo en SG (Tabla 11). Pero a esta tasa de dilución el rendimiento  $Y_{px}$  se incrementó en ambas estirpes (Figs. 23 y 24), siendo este incremento mayor en la estirpe "grande" (de 2,5 a 12 veces) al ser comparado con el mutante "petite" (de 1,5 a 7,3 veces). En consecuencia, la razón IFI256P/IFI256 fue menor para la mayoría de los aminoácidos en la tabla 15 al compararla con la tabla 11.

### 3.7. Variación del rendimiento sustrato/biomasa ( $Y_{sx}$ ) con la temperatura.

La tabla 14 muestra que a  $30^{\circ}\text{C}$  el rendimiento sustrato biomasa ( $Y_{sx}$ ) fue siempre menor en la estirpe "grande" que en el mutante "petite". Para ver si tales diferencias se mantenían o no a

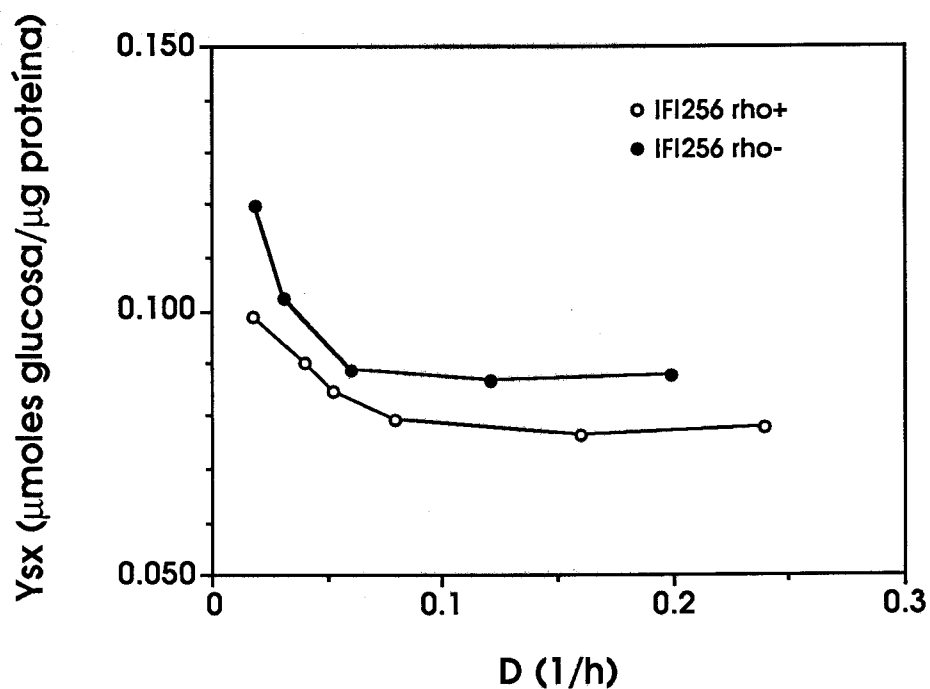


Figura 25. Variación de  $Y_{sx}$  (mmoles de glucosa/mg de proteína) de la estirpe "grande" IFI256 (○) y del mutante "petite" IFI256P (●) en función de la tasa de dilución empleada en el quimiostato.

	Y <sub>px</sub>					
	$\mu > 0,06$			$\mu = 0,02$		
	IFI256P	IFI256	$\frac{\text{IFI256P}}{\text{IFI256}}$	IFI256P	IFI256	$\frac{\text{IFI256P}}{\text{IFI256}}$
<u>Aminoácidos derivados de la glicólisis:</u>						
His	34	40	0,85	140	445	0,31
Phe	2,2	2,9	0,76	9,5	26	0,36
Tyr	5	3	1,6	16	20	0,8
Ser	4	5	0,8	6	45	0,13
Gly	24	28	0,85	175	175	1
Ala	225	70	3,2	1280	330	3,87
Val	11	7,4	1,5	30	80	0,37
Leu	3	3,7	0,8	12,5	28	0,45
Asp	1,6	6	0,26	11	35	0,31
Thr	12	7,6	1,6	70	19	3,7
Ile	2,4	2,2	1,1	11	14	0,78
Met	0,6	0,8	0,75	2	4	0,5
<u>Aminoácidos derivados del TCA:</u>						
Glu	235	115	2	660	800	0,82
Arg	22	85	0,25	100	290	0,34
Lys	1,6	3,5	0,45	10,8	27	0,4

TABLA 15. Concentración intracelular de aminoácidos formados, Y<sub>px</sub> (nmoles/10<sup>6</sup> células) en la estirpe "petite" IFI256P y en la "grande" IFI256, y la razón entre ambos parámetros a las tasas de crecimiento en las cuales el valor de Y<sub>px</sub> es constante ( $\mu > 0,06 \text{ h}^{-1}$ , Figs. 16 y 17) y a la mínima tasa de crecimiento medida ( $\mu = 0,02 \text{ h}^{-1}$ ). Los resultados mostrados en la tabla son la media de cuatro experimentos, las desviaciones medias variaron entre 2,1-3,2% de la señal detectada por HPLC.

otras temperaturas, se llevaron a cabo experimentos con ambas estirpes a 22°, 30° y 37°C. La figura 26 muestra que  $Y_{sx}$  varía con la fase de crecimiento, de tal forma que antes de la fase exponencial, la estirpe "grande" presenta un incremento continuo en el valor  $Y_{sx}$ , hasta el principio de dicha fase donde  $Y_{sx}$  alcanza un valor constante. Esta meseta se mantiene durante esta fase y hasta el principio de la fase estacionaria. A 22°, 30° y 37°C,  $Y_{sx}$  presenta una meseta similar (de hecho los valores son casi idénticos). En el mutante "petite" sin embargo,  $Y_{sx}$  no llega a alcanzar una meseta. De hecho,  $Y_{sx}$  aumenta de forma continua durante las diferentes fases de crecimiento. Además, en el mutante "petite" este parámetro aumenta con la temperatura, de forma que los valores más altos de  $Y_{sx}$  se alcanzaron a 37°C.

#### **4. SELECCION DE MUTANTES RESISTENTES A ANALOGOS TOXICOS.**

Como se ha comentado en la Introducción, la resistencia a un determinado tóxico, análogo de aminoácido, conduce en la mayoría de las ocasiones a la superproducción de dicho aminoácido (Arfin y Gantt 1983). En este trabajo se utilizaron la resistencia a etionina (análogo tóxico de la metionina) y la resistencia a hidroxinorvalina (análogo tóxico de la treonina) para seleccionar mutantes superproductores de metionina y/o treonina. Antes de proceder a la selección se llevaron a cabo una serie de experimentos para conocer tanto la toxicidad como los efectos de ambos análogos sobre el contenido interno de aminoácidos y S-adenosil-metionina. Asimismo, se estudió el efecto de la adición de metionina o treonina al medio de cultivo sobre los mismos parámetros.

##### **4.1. Efectos de la etionina en la estirpe silvestre IFI256.**

Se calculó la concentración mínima inhibitoria de etionina tanto para la cepa silvestre IFI256 como para la cepa haploide de laboratorio S288C creciendo en medio mínimo líquido. Mientras que la cepa S288C deja de crecer a una concentración de 0,08 mM, la estirpe IFI256 no cesa en su crecimiento hasta concentraciones de 0,3 mM. Cuando se utilizó medio sólido, esta concentración fue de

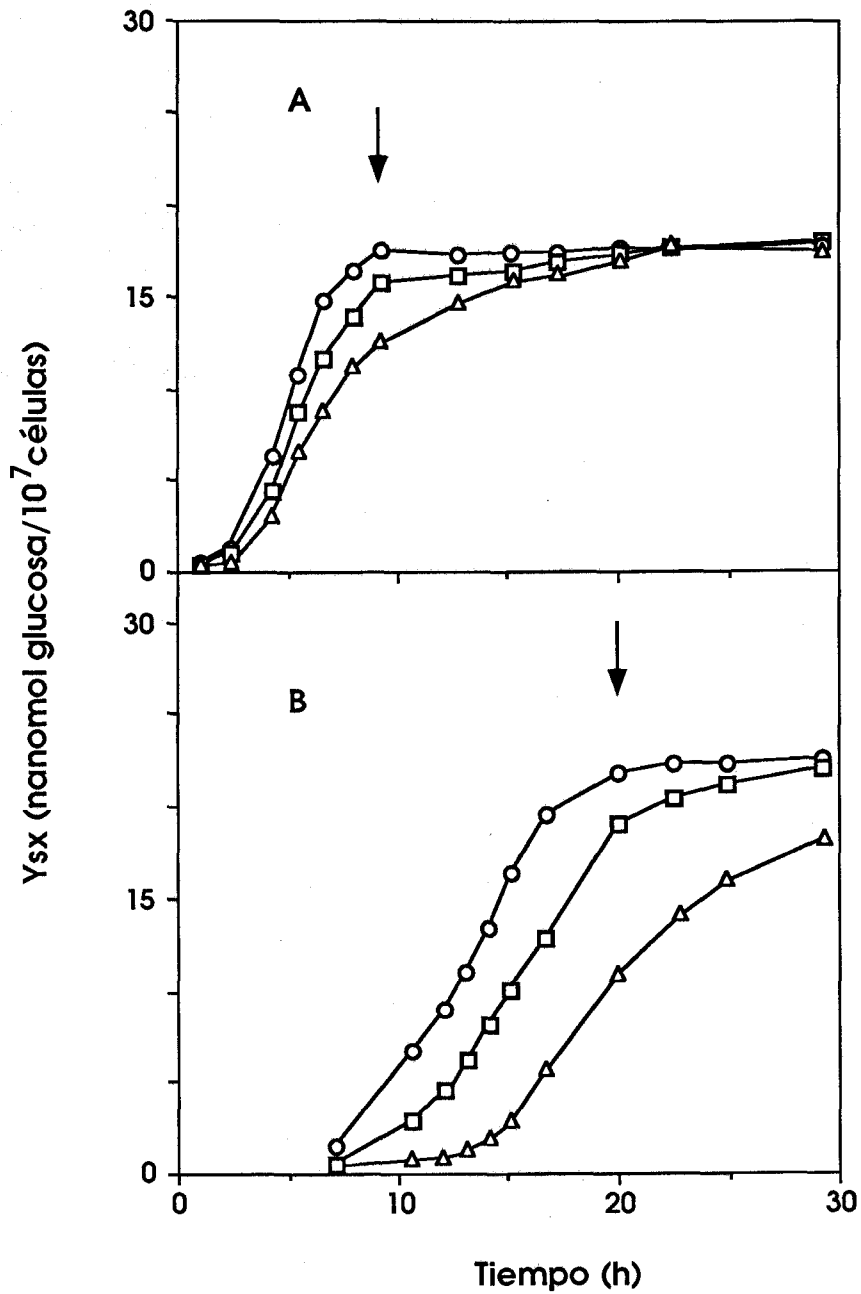


Figura 26. Evolución de Ysx en función de la temperatura en la estirpe "grande" IFI256 (A) y en el mutante "petite" IFI256P (B). (▲) 22°C, (◻) 30°C y (○) 37°C. La flecha indica el comienzo de la fase exponencial.



0,8 mM para la cepa IFI256. Por lo tanto, cuando se llevaron a cabo experimentos en cultivo continuo, el medio de cultivo inicial fue SDe suplementado con 0,1 mM de etionina.

Como muestra la tabla 16 concentraciones de etionina en el medio de cultivo de 0,5 mM (SDe) produjeron una disminución entre 7 y 10 veces del contenido de S-adenosil-metionina, así como la reducción de los niveles de metionina hasta valores no detectables; por el contrario aumentaron los niveles de homoserina, treonina, isoleucina, aspártico, glutámico, arginina y alanina. Cuando se usó una concentración de 2 mM, se produjo una disminución generalizada de todos los aminoácidos. Estos resultados son consecuentes con el bloqueo de la ruta específica de la síntesis de metionina, saturación de la ruta procedente de aspártico y acumulación de piruvato, lo que produciría un aumento en la síntesis de alanina, glutámico y arginina (Jones y Fink 1982).

	SD	SDe (0,5 mM)	SDe (2 mM)
Asp	1,67	8,6	4,55
Glu	34	46,6	29
Ser	1,45	2,3	1,13
His	11,4	12,5	6,24
Hom	n.d.	13,2	15,92
Gly	7,83	12,4	5,63
Thr	2,18	9,34	1,37
Ala	20,3	122,6	24,97
Arg	24,5	160	35,85
Tyr	0,87	0,93	1,20
Val	2,14	22,13	1,49
Met	0,20	n.d.	n.d.
Ile	0,64	8,47	1,11
Phe	0,82	0,90	1,41
Leu	1,06	14,05	0,68
Lys	0,98	1,3	0,6
Ado-Met	3,1	2,9	0,33

TABLA 16. Efecto de la adición de etionina al medio de cultivo sobre la concentración intracelular de aminoácidos (mM) y sobre la concentración intracelular de S-adenosil-metionina (Ado-Met) (mM).

#### 4.2. Efectos de la hidroxinorvalina en la estirpe silvestre IFI256.

La concentración mínima inhibitoria de hidroxinorvalina para la cepa IFI256 en medio mínimo líquido fue de 1 mM, mientras que en medio sólido fue de 2,5 mM.

Como muestra la tabla 17 el incremento de la concentración de hidroxinorvalina en el medio de cultivo sin comenzar a ser tóxica produjo una disminución hasta niveles no detectables del contenido intracelular de S-adenosil-metionina, así como la reducción de los niveles de casi todos los aminoácidos salvo Glu, His y Ala. Estos resultados son consecuentes con el bloqueo de la ruta de síntesis de aminoácidos producidos a partir de aspártico, falta de utilización de oxaloacetato con un mayor funcionamiento del ciclo de ácidos tricarboxílicos (aumenta la concentración de Glu), aumento de la concentración de piruvato (aumenta la concentración de Ala) y saturación de la glicolisis (aumenta la concentración de His). La utilización de concentraciones superiores de hidroxinorvalina produjo la disminución de todos los aminoácidos (Tabla 17).

#### 4.3. Efecto de la adición de metionina al medio de cultivo.

La estirpe silvestre IFI256 se cultivó en medio mínimo, SD, suplementado con metionina a distintas concentraciones que fueron desde 0,1 mM hasta 100 mM. Ninguna de las concentraciones empleadas produjo inhibición del crecimiento.

La adición de metionina al medio produjo un aumento proporcional de la metionina interna, ya que es transportada al interior de la célula por dos permeasas distintas (Tabla 18) (Jones y Fink 1982). Cuando la metionina añadida al medio estaba a una concentración de 10 mM la concentración interna de metionina creció aproximadamente hasta 350 mM (unas 35 veces más concentrada), cuando se añadió la metionina a concentraciones superiores, el contenido interno no aumentó más. De igual forma se produjo un incremento en la concentración intracelular de S-adenosil-metionina, que incluso llegó a ser detectada en el medio de cultivo.

Además se produjo una gran acumulación de homoserina (pero no de homoserina fosfato, lo que indica regulación de la homoserina quinasa), sin aumentar perceptiblemente ni la concentración de treonina ni la de isoleucina. Este hecho indica una fuerte regulación por metionina o por Ado-Met del primer enzima de la ruta de síntesis de metionina, la homoserina O-acetil-transferasa; asimismo una fuerte regulación por treonina de su propia síntesis. Los cromatogramas obtenidos en estas condiciones (Fig. 27) muestran la aparición de dos picos que normalmente no son detectados a 13,12 y 15 minutos, posteriormente el pico a los 13,12 minutos fue identificado como homocisteína, precursor inmediato de la metionina.

	SD <sub>h</sub> (0,05mM)	SD <sub>h</sub> (0,2 mM)	SD <sub>h</sub> (1 mM)
Asp	3,51	2,53	1,2
Glu	25,3	36,7	10,1
Ser	3,7	2,20	0,45
His	12,1	20,7	3,1
Gly	4,71	2,9	0,61
Thr	3,59	1,63	0,13
Ala	17,93	19,3	1,8
Arg	20,65	17,42	4,37
Tyr	1,81	0,57	0,13
Val	3,30	3,26	0,27
Met	0,11	0,19	n.d.
Ile	1,27	1,50	0,28
Phe	1,01	0,62	0,12
Leu	2,63	1,68	0,42
Lys	1,16	0,58	0,15
Ado-Met	2,19	n.d.	n.d.

TABLA 17. Efecto de la adición de hidroxinorvalina al medio de cultivo sobre la concentración intracelular de aminoácidos (mM) y sobre la concentración intracelular de S-adenosil-metionina (Ado-Met) (mM).

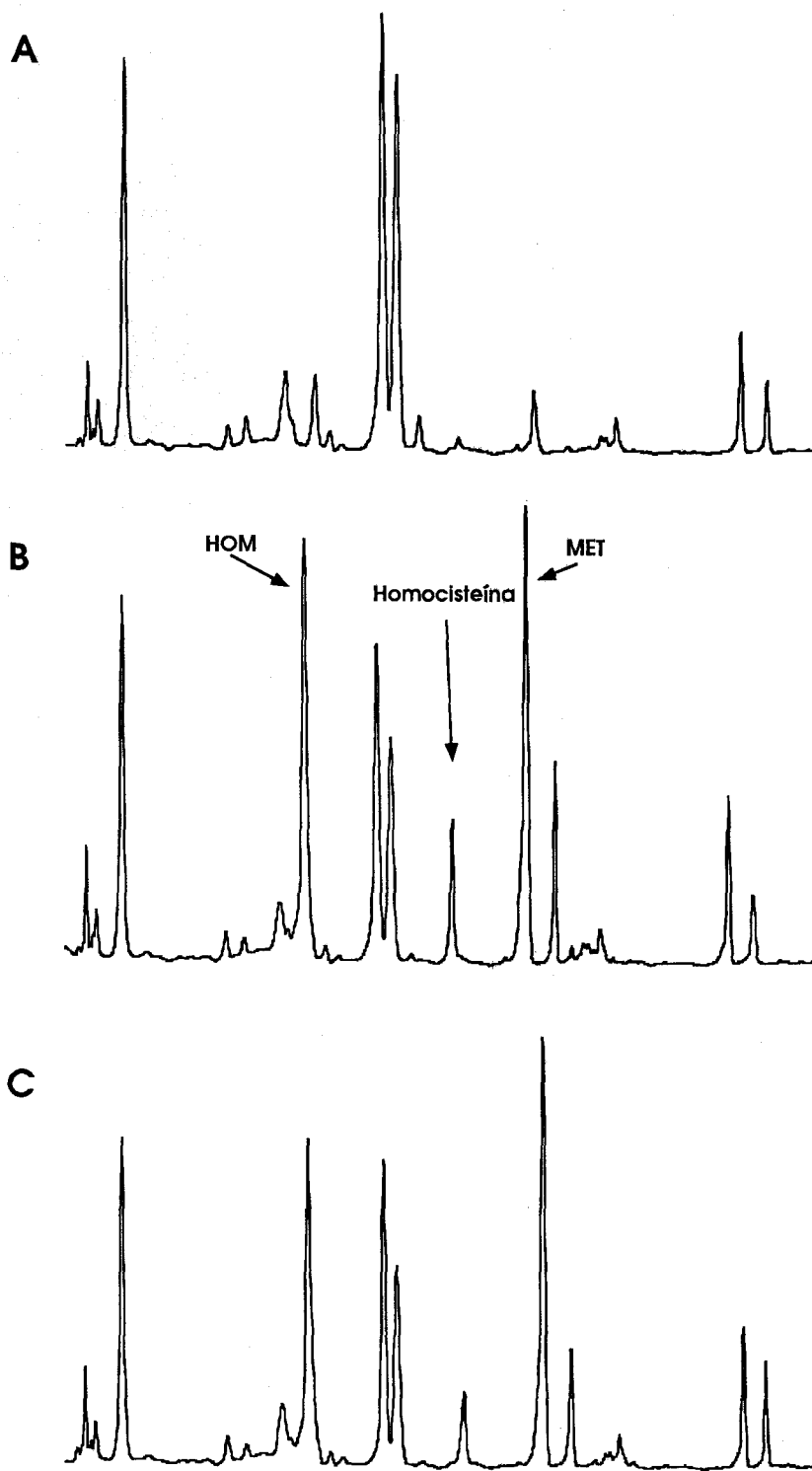


Figura 27. Efecto de la adición de metionina al medio de cultivo sobre la concentración intracelular de aminoácidos. (A) medio mínimo, SD; (B) con metionina 10 mM; y (C) con metionina 100 mM.

	SD	SD+Met (10 mM)	SD+Met (100 mM)
Asp	1,67	1,58	1,53
Glu	3,4	31,76	30,59
Ser	1,45	0,90	0,77
His	11,4	7,26	8,58
Hom	n.d.	66,4	57,98
Gly	7,83	7,3	7,18
Thr	2,18	1,82	1,68
Ala	20,3	14,13	12,58
Arg	24,5	14,22	13,92
Tyr	0,87	8,22	6,08
Val	2,14	2,3	2,23
Met	0,20	349	316
Ile	0,64	1,16	0,55
Phe	0,82	1,26	0,94
Leu	1,06	1,18	1,10
Lys	0,98	1,2	1,0
Ado-Met(i)	3,1	18,72	20,66
Ado-Met(e)	n.d.	0,35	24,76

TABLA 18. Efecto de la adición de metionina al medio de cultivo sobre la concentración intracelular de aminoácidos (mM) y sobre la concentración intracelular (i) y extracelular (e) de S-adenosilmetionina (Ado-Met) (mM).

#### 4.4. Efecto de la adición de treonina al medio de cultivo.

Se ensayó la posible toxicidad de altas concentraciones de treonina sobre el crecimiento de la cepa silvestre IFI256, pero concentraciones de hasta 1 M de treonina en el medio de cultivo, no llegaron a tener efectos tóxicos.

Cuando se estudió el contenido interno de aminoácidos de la cepa IFI256 creciendo en medio mínimo, SD, suplementado con 100 mM de Thr (Tabla 19) se observó un aumento en la concentración de todos los aminoácidos de al menos dos veces, cuatro veces en el

caso de la serina, ocho en el de la glicina y diez veces para la treonina. Este resultado nos indica la utilización de la treonina como fuente de nitrógeno y esqueletos carbonados para su incorporación en otros aminoácidos, asimismo indica que la degradación de la treonina por la serina hidroximetil transferasa (Fig. 3A) es un mecanismo muy efectivo de redistribución del nitrógeno y de esqueletos carbonados. El hecho de que la treonina añadida al medio sea degradada e incorporada en el metabolismo general choca con el anteriormente observada con la metionina, la cual no se utiliza sino que se almacena o es convertida en Ado-Met. Como han apuntado otros autores los organismos han diseñado mecanismos de ahorro celular, entre los que se encuentra no "desperdiciar" metionina o Ado-Met que cuesta energéticamente muy cara a la célula (aprox. 13-15 moléculas de ATP por molécula de Ado-Met formada).

	SD	SD+Thr (100 mM) /SD	SD+Thr (1 M) /SD
Asp	1,67	1,32	1,46
Glu	34	2,47	3,75
Ser	1,45	2,33	5,35
His	11,4	1,53	2,89
Gly	7,83	8,66	16,7
Thr	2,18	231,8	433,6
Ala	20,3	3,27	4,93
Arg	24,5	2,96	3,63
Tyr	0,87	3,15	5,19
Val	2,14	3,51	4,86
Met	0,20	3,6	5,2
Ile	0,64	4,35	5,16
Phe	0,82	2,32	2,64
Leu	1,06	2,89	3,5
Lys	0,98	3,73	7,62

TABLA 19. Efecto de la adición de treonina al medio de cultivo sobre la concentración intracelular de aminoácidos (mM).

#### 4.5. Selección de mutantes resistentes a etionina en cultivo continuo controlado por pH.

La complejidad de la ruta biosintética de la metionina tanto por el número de genes implicados como por la regulación de la ruta hacen posible la obtención de mutantes con diferentes grados de resistencia a análogos tóxicos así como de posibles superproductores de este aminoácido. La selección de dichos mutantes fue llevada a cabo en un pH-stato, turbidostato basado en el pH del medio, que permitía no sólo el control del crecimiento sino también el incremento en la concentración del tóxico en el tanque de cultivo (Jiménez y Benítez 1988a).

##### 4.5.1. Valores extremos de pH obtenidos en cultivo discontinuo.

Para fijar el pH de trabajo en el sistema de cultivo continuo, se determinaron el pH inicial (máximo) y final (mínimo) en cultivos discontinuos de IFI256 tanto en medio nutritivo (YPD) como en medio mínimo (SDe). El pH mínimo, detectado en el cultivo al final de la fase estacionaria, fue 2,3, mientras que el máximo, detectado en el cultivo recién inoculado, fue de 4,2. De acuerdo con los datos obtenidos el pH del cultivo continuo fue regulado para operar a un pH crítico, pH<sub>c</sub>, entre 3,4 y 3,6.

##### 4.5.2. Selección de mutantes resistentes a etionina en cultivo continuo controlado por pH.

Cuando se cultivó la estirpe IFI256 en medio SD o SDe en un quimiostato controlado por pH, se obtuvo una acidificación continua del medio de cultivo debida al crecimiento y la fermentación llevada a cabo por la levadura (Fig. 28). La bomba de alimentación (entrada de medio fresco) se conectó cuando el pH descendió por debajo del pH<sub>c</sub>, diluyendo el cultivo ( $D > \mu$ ). La bomba se desconectó ( $D = 0$ ) cuando el pH sobrepasó el pH<sub>c</sub> tras la dilución. Este control "feedback" provee de un continuo equilibrio en el cultivo sujeto a pulsos alternos de dilución y crecimiento (tal como se puede observar por el zigzag del registro de pH en la figura 28).

Una vez alcanzado el equilibrio, la concentración de glucosa en el vaso de cultivo fue casi constante (aproximadamente un 0,5%) en todas las condiciones usadas. Esto indica que las células estaban creciendo a su mayor tasa específica de crecimiento porque la glucosa, el sustrato limitante, estaba en exceso (Pirt 1975). La densidad óptica (D.O.660) del cultivo se mantuvo alrededor de 0,8. Ya que en este equilibrio la variación constante del pH es proporcional a la variación de la turbidez, la tasa de acidificación (disminución del pH por unidad de tiempo cuando  $D = 0$ ) obtenida después de cada pulso de dilución fue proporcional a la tasa específica de crecimiento,  $\mu$  (incremento en la turbidez por unidad de tiempo cuando  $D = 0$ ). La secuencia de diluciones y crecimiento introduce un método muy simple de incrementar, pulso a pulso, la concentración de cualquier compuesto tóxico en el cultivo, en este caso el análogo tóxico etionina.

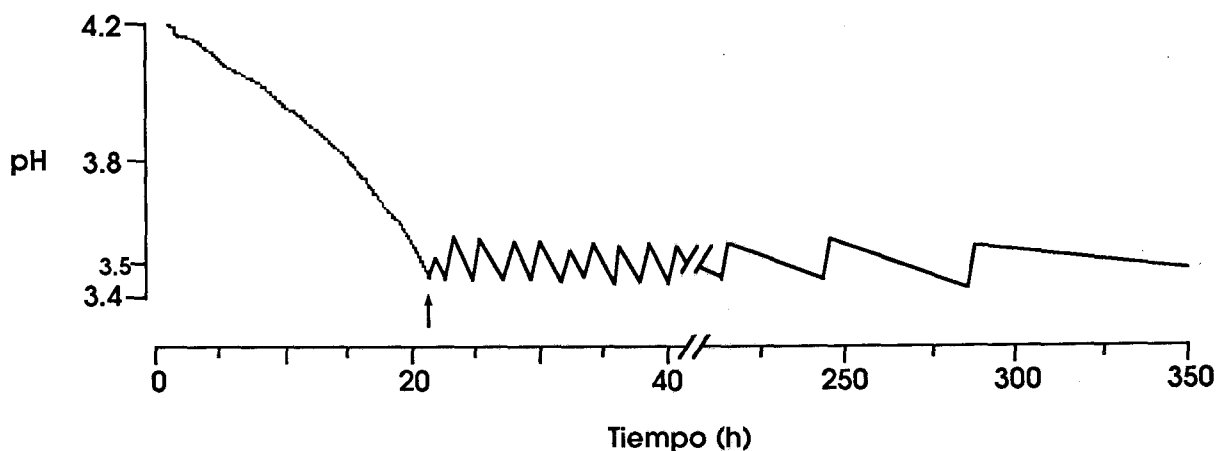


Figura 28. Registro de pH de un cultivo de la cepa silvestre IFI256 creciendo en SD suplementado con etionina (inicialmente a una concentración de 0,1 mM), sometido a control turbidostático por pH. La flecha indica el momento en que comenzó la regulación del pH por adición de medio fresco,  $SD_c$  (1 mM). Tras 48 horas comenzó la adición de medio fresco con etionina 5 mM y después de 160 horas con medio suplementado con etionina 10 mM.



Una vez que en el cultivo con la concentración inicial de etionina (0,1 mM) se alcanzó el equilibrio, la concentración de etionina en el medio fresco (el que se encuentra en el tanque de alimentación) SDe se aumentó a 1 mM. El siguiente pulso de dilución, producido por el bombeo de este medio, hizo que la concentración de la etionina en el cultivo alcanzase un valor más elevado, de forma que tras  $n$  pulsos la concentración de etionina en el cultivo se incrementó considerablemente. Los primeros cinco litros de medio fresco suplementado con 1 mM de etionina fueron seguidos por 3 litros suplementados con 5 mM después de 48 horas de incubación y finalmente 2 litros suplementados con 10 mM del análogo después de 160 horas. Los efectos del incremento de la concentración de etionina en el crecimiento se reflejaron inmediatamente en la posterior tasa de acidificación que se redujo proporcionalmente (Fig. 28). Después de 350 horas de incubación, cuando la concentración de etionina en el medio de cultivo fue 8 mM, la tasa de acidificación de las células fue casi nula, indicando que a duras penas podría algún mutante continuar creciendo a mayores concentraciones de etionina. Durante el experimento, se sembraron muestras del cultivo con diferentes concentraciones de etionina en cajas de medio SD. Las colonias aisladas se volvieron a sembrar en SD y de aquí a medio sólido SDe con concentraciones de etionina similares a las que había en el vaso de cultivo cuando se cogieron las muestras (Tabla 20). Este proceso se repitió varias veces. Los mutantes resistentes a etionina aislados se numeraron de ETHCC1 a ETHCC7, y posteriormente se caracterizaron (Fig. 29).

#### 4.5.3. Selección de mutantes resistentes a etionina en cultivo continuo.

Después de 350 horas de incubación en un cultivo continuo regulado por pH, el medio fresco se sustituyó por SDe suplementado con 1 mM de etionina y se usó para alimentar al cultivo. La bomba de nutrientes del fermentador se conectó a la entrada del medio y se reguló para dar una tasa de dilución apropiada,  $D$  ( $0,2 \text{ h}^{-1}$ ) que fue casi la máxima ( $0,23 \text{ h}^{-1}$ ) bajo estas condiciones ( $\mu < \mu_{\text{máx}}$ ). Se seleccionaron mutantes resistentes a etionina por su habilidad para

crecer a la mayor tasa de crecimiento,  $\mu$  ( $0,2 \text{ h}^{-1}$ ). Tras agotar 10 litros de medio SDe (1 mM de etionina), se tomaron muestras y se sembraron en medio SD, como en el apartado anterior. La estirpe resistente a etionina obtenida, numerada ETHCC8, fue posteriormente caracterizada (Tabla 20 y Fig. 29).

#### 4.5.4. Selección de mutantes resistentes a hidroxinorvalina.

El protocolo de selección de los mutantes se resume en la figura 29. El mutante resistente a etionina ETHCC6, aislado en cultivo continuo regulado por pH, fue posteriormente incubado en cultivo discontinuo con medio SDh suplementado con 0,1 mM de hidroxinorvalina, el análogo tóxico de treonina. A partir de este cultivo se aisló un mutante resistente a hidroxinorvalina. El mutante se cultivó en SDh sólido suplementado con 0,1 mM de hidroxinorvalina; de éste se seleccionaron algunas colonias. El experimento se repitió varias veces y finalmente se aisló y caracterizó el mutante HNVBC1. La estirpe HNVBC1 se inoculó en SD sin el análogo tóxico. Después de varios ciclos de cultivo en SD, las células se sembraron en el mismo medio SDh suplementado con 1 mM de hidroxinorvalina y se aisló y caracterizó un nuevo mutante, HNVBC2. HNVBC2 se cultivó en SD durante varias generaciones y el experimento se repitió varias veces, al cabo de las cuales después de seleccionar en SDh 1 mM de hidroxinorvalina se obtuvo el mutante HNVBC3. El mutante HNVBC4 se obtuvo por selección de colonias en SDh suplementado con 5 mM de hidroxinorvalina. Finalmente, a partir de HNVBC4, y después de varias generaciones creciendo en SD sin análogo, y aislamiento de colonias en SDh suplementado con 5 mM de hidroxinorvalina se seleccionó el mutante HNVBC5.

	[Eth] <sub>ext.</sub>	[Eth] <sub>int.</sub>	[Eth] <sub>max.</sub>	[Hnv] <sub>ext.</sub>	[Hnv] <sub>int.</sub>	$\mu$ SD (h <sup>-1</sup> )
IFI256	-	-	0,1	-	-	0,32
ETHCC1	1,08	0,54	2	-	-	0,22
ETHCC2	1,70	0,72	3	-	-	0,30
ETHCC3	3,32	1,02	5	-	-	0,29
ETHCC4	3,76	1,14	15	-	-	0,30
ETHCC5	4,32	1,23	20	-	-	0,30
ETHCC6	7,35	1,40	30	-	-	0,33
ETHCC7	8,04	1,84	50	-	-	0,25
ETHCC8	1,35	1,75	50	-	-	0,28
HNVBC1	-	-	-	0,1	0,3	0,24
HNVBC2	-	-	-	1	1,1	0,23
HNVBC3	-	-	-	1	1,6	0,25
HNVBC4	-	-	-	5	5,2	0,29
HNVBC5	-	-	-	5	7,3	0,27

TABLA 20. Concentración de etionina (mM) ([Eth]<sub>ext</sub>) o hidroxinorvalina ([Hnv]<sub>ext</sub>) en el medio en el cual se aislaron los mutantes resistentes a etionina (ETHCC1 a ETHCC8) o a hidroxinorvalina (HNVBC1 a HNVBC5); concentración intracelular de los análogos tóxicos en las muestras de las que se aislaron los mutantes ([Eth]<sub>int</sub>, [Hnv]<sub>int</sub>); concentración máxima de etionina que permite el crecimiento de los mutantes ([Eth]<sub>max</sub>) y tasa de crecimiento (h<sup>-1</sup>) de los mutantes y la estirpe silvestre en medio mínimo SD ( $\mu$ SD(h<sup>-1</sup>)). Los resultados que se muestran en la tabla son la media de cinco experimentos, las desviaciones medias variaron entre 1,3-1,8% de la señal detectada por HPLC.

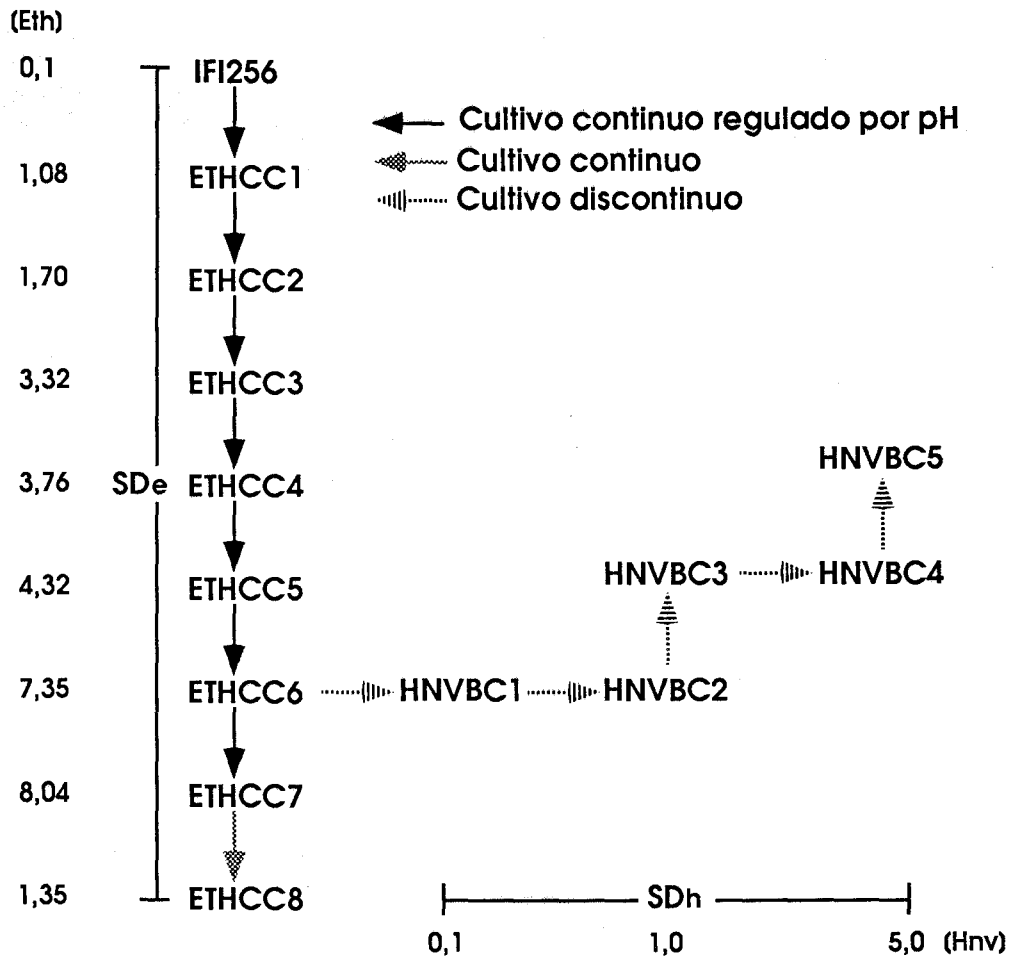


Figura 29. Esquema del aislamiento de los mutantes resistentes a etionina (ETHCC1-ETHCC8) o hidroxinorvalina (HNVBC1-HNVBC5) a partir de la estirpe silvestre IFI256. [Eth], concentración de etionina (mM); [Hnv], concentración de hidroxinorvalina (mM); SDe, medio mínimo SD suplementado con etionina; SDh, medio mínimo suplementado con hidroxinorvalina.

## 5. CARACTERIZACION INICIAL DE LOS MUTANTES OBTENIDOS.

### 5.1. Niveles de resistencia a los análogos.

La tabla 20 muestra algunos datos de los mutantes resistentes a etionina y/o a etionina e hidroxinorvalina. Las concentraciones externas de etionina a las que se recogieron las muestras con los posibles mutantes variaron entre 1,08 mM para el mutante ETHCC1 y 8,04 para el mutante ETHCC7. A fin de descartar los posibles mutantes incapaces de acumular el análogo tóxico (mutantes con permeasas defectivas) se midió la concentración interna de etionina en extractos libres de células. Esta, fue considerablemente menor que la concentración externa (Tabla 20). Sin embargo, una vez sembrados los posibles mutantes en SDe sólido con una concentración de etionina similar a la presente en el medio cuando se tomó la muestra, y cuando este proceso se repitió varias veces a fin de eliminar las células del cultivo que no eran resistentes, la concentración interna de etionina en los mutantes mostró un incremento proporcional a la externa (Fig. 30), siendo la interna ligeramente superior en todos los casos (datos no mostrados). Resultados similares se obtuvieron con los mutantes resistentes a hidroxinorvalina, donde la concentración externa a la que fueron aislados los mutantes fue comparable a la interna (Tabla 20).

Los mutantes obtenidos se cultivaron en medio SD durante varias generaciones y nuevamente sembrados en SDe para comprobar la estabilidad de la mutación. Todos los mutantes fueron estables después de crecer en medio SD durante varios cientos de generaciones.

Los mutantes resistentes a etionina fueron capaces de resistir concentraciones del análogo sustancialmente superiores a aquellas a las que se tomaron las muestras (Tabla 20). Esta concentración, la máxima a la que los mutantes pueden crecer, es 25 veces mayor para algunos de los mutantes.

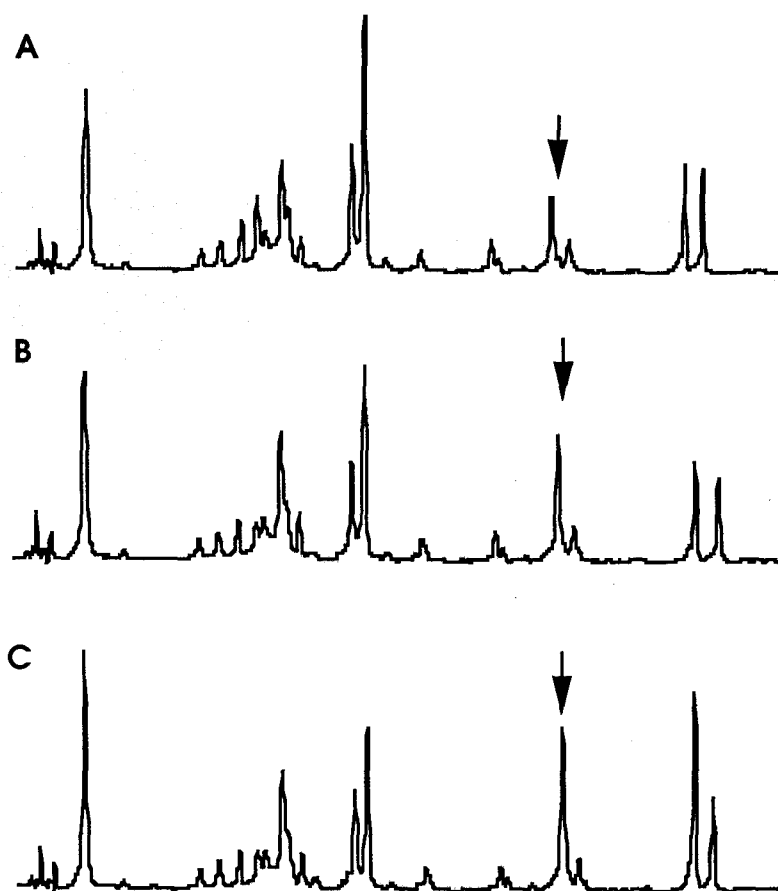


Figura 30. Cromatogramas del contenido interno de aminoácidos del mutantes ETHCC5 creciendo en SDe con 5 mM (A), 10 mM(B) y 20 mM (C) de etionina. Las flechas indican el pico de etionina intracelular.

## 5.2. Tasa de crecimiento.

Aunque los mutantes superproductores de aminoácidos suelen ser mórbidos y en general crecen despacio (Ramos *et al.* 1991, Nass y Poralla 1976, Seibold *et al.* 1981), el cultivo continuo permite el aislamiento de aquellas células que crecen a la mayor velocidad. De hecho todos los mutantes crecieron en medio SD con tasas de crecimiento similares o en ocasiones mayores a las de la estirpe silvestre (Tabla 20).

### 5.3. Concentración interna de aminoácidos.

Cuando en los mutantes resistentes a etionina se determinó la concentración intracelular de metionina se observó un incremento en dicha concentración, de forma que la de la estirpe silvestre creciendo en SD es cercana a 0,2 mM, pero en el mutante ETHCC7 este valor alcanzó los 32,6 mM. El aumento en la concentración intracelular de metionina fue directamente proporcional a la concentración de etionina tolerada por los mutantes (Tabla 21). Los aminoácidos relacionados con la metionina y parcialmente implicados en la misma ruta metabólica (Jones y Fink 1982), como la homoserina, treonina y S-adenosil-metionina también mostraron variaciones cuando se compararon con el silvestre: el contenido interno de treonina se incrementó en los mutantes entre 2 y 3 veces; el contenido en S-adenosil-metionina se incrementó más de 10 veces, mientras que la homoserina varió ampliamente entre las diferentes estirpes; excepcionalmente, el mutante ETHCC8 presentó un contenido interno de treonina de 79,1 mM, y sólo 3,1 mM de metionina (Tabla 21).

Estos aminoácidos y la isoleucina son sintetizados a partir de aspártico, por lo tanto las concentraciones de aspártico e isoleucina también se determinaron en la estirpe silvestre y en los mutantes resistentes a etionina. El contenido interno de aspártico e isoleucina se incrementó hasta 10 veces, siendo las concentraciones muy variables entre las distintas estirpes.

Los mutantes resistentes a hidroxinorvalina llegaron a acumular por encima de 214 mM de treonina, cerca de 40 veces la concentración observada en el silvestre, así como metionina, S-adenosil-metionina, aspártico e isoleucina. El incremento en la concentración de homoserina fue muy variable entre las diferentes estirpes (Tabla 21).

Tanto a los mutantes superproductores de metionina como a los de treonina se les realizó la prueba de alimentación cruzada (Ramos *et al.* 1991). Esta consiste en comprobar si el mutante en cuestión es capaz de alimentar por excreción a un césped de un auxótrofo para el aminoácido superproducido. Ninguno de los mutantes aislados fue capaz de alimentar el césped auxótrofo. Para confirmar que los mutantes no eran excretores, muestras del medio

de cultivo donde se cultivaron los mutantes se examinaron en el HPLC, mostrando en sólo dos de los casos, ETHCC7 y HNVBC5, algunas trazas del aminoácido superproducido, metionina y treonina respectivamente, junto con trazas de homoserina que también resultó excretada. Estas trazas, sólo detectables mediante HPLC, podrían explicarse simplemente por la liberación de aminoácidos al medio producida por lisis de algunas células presentes en el cultivo.

	Asp	Hom	Thr	Ile	Met	Ado-Met
IFI256	3,2	n.d.	5,8	1,2	0,2	3,1
ETHCC1	5,4	15,6	10,2	3,2	2,3	0,9
ETHCC2	10,0	95,0	16,9	6,8	3,2	1,1
ETHCC3	3,1	20,2	16,8	5,2	5,1	1,4
ETHCC4	12,2	66,1	17,0	4,1	6,5	1,7
ETHCC5	21,7	80,4	15,4	5,4	8,7	2,0
ETHCC6	29,8	116	12,0	6,2	10,2	11,0
ETHCC7	3,1	91,5	14,8	7,5	32,6	5,6
ETHCC8	3,2	8,8	79,1	0,9	3,1	16,9
HNVBC1	10,1	24,6	22,3	8,4	4,1	9,0
HNVBC2	9,6	68,7	53,0	10,1	3,3	8,5
HNVBC3	6,0	130	49,1	6,8	4,2	6,5
HNVBC4	4,6	255	23	4,0	6,0	4,4
HNVBC5	2,9	142	214	5,1	3,5	5,3

TABLA 21. Concentración intracelular de aminoácidos (mM) de la estirpe IFI256 y los mutantes resistentes a etionina (ETHCC1-ETHCC8) e hidroxinorvalina (HNVBC1-HNVBC5) creciendo en medio mínimo SD. Estos resultados son la media de cinco experimentos; las desviaciones medias variaron entre 1,2-1,8% de la señal detectada en HPLC. n.d.: no detectado.



#### 5.4. Cariotipo.

A fin de eliminar la posibilidad de que los mutantes obtenidos pudieran proceder de algún contaminante presente en el vaso de cultivo del fermentador se realizó el cariotipo de dichos mutantes y se comparó con el de la estirpe original, los resultados obtenidos se muestran en la figura 31. Como puede observarse en esta, todos los mutantes caracterizados derivan de la estirpe original IFI256.

#### 5.5. Sexo y esporulación en los mutantes.

Todos los mutantes aislados, tanto resistentes a etionina como resistentes a hidroxinorvalina, fueron incapaces de cruzar con las cepas usadas como control (MMY1 y MMY2). Asimismo todos ellos presentaron una esporulación similar a la del silvestre, es decir, producían diadas capaces de esporular y presentaban un 99% de esporulación en medio SPOQ.

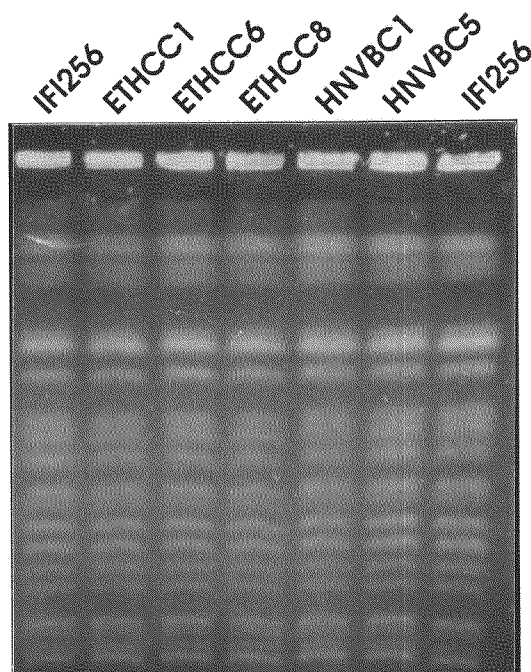
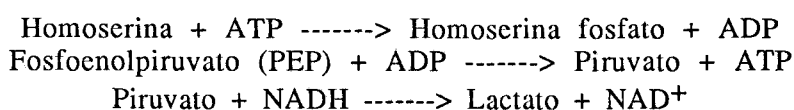


Figura 31. Cariotipo de la estirpe silvestre IFI256; los mutantes resistentes a etionina ETHCC1, ETHCC6 y ETHCC8, y de los mutantes resistentes a hidroxinorvalina HNVBC1 y HNVBC5.

## 6. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LOS MUTANTES.

El uso de extractos crudos conlleva problemas tales como la existencia de enzimas que puedan utilizar el mismo sustrato. Antes de comenzar con la caracterización de los mutantes se estudió la fiabilidad de los ensayos acoplados utilizados para las medidas enzimáticas. De los enzimas estudiados la única ambigüedad podía venir de las enzimas homoserina deshidrogenasa y homoserina quinasa, por lo que se estudio el sistema cinético teórico (Fig. 32A) presente en un extracto crudo con ambas actividades.

La "inhibición por sustrato" observada a altas concentraciones de homoserina sobre la homoserina quinasa podría ser un artefacto del ensayo enzimático utilizado. Como se ha comentado en Métodos dicho ensayo utiliza dos reacciones acopladas (piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa) para determinar la velocidad de la reacción:



estas podrían resumirse en una reacción global:



Uno de los productos de esta, el  $\text{NAD}^+$ , junto con la homoserina son los sustratos para la homoserina deshidrogenasa (el enzima anterior de la ruta) que "in vivo" salvo a altas concentraciones de homoserina realiza la reacción contraria, es decir, la producción de homoserina y  $\text{NAD}^+$ . En los extractos crudos utilizados se encuentra también la actividad homoserina deshidrogenasa, que con el  $\text{NAD}^+$  producido por la reacción acoplada y la homoserina adicionada al extracto podría ser perfectamente funcional (fig. 32A). La acción de esta enzima provocaría la producción de  $\text{NADH}$ , con lo que la actividad observada para la homoserina quinasa sería menor que la real. Cuanto mayor fuera la concentración de homoserina mayor sería el efecto descrito.

Si formulamos la cinética de este hipotético sistema enzimático, tendremos que la velocidad enzimática observada ( $V_{\text{obs}}$ ), es igual a la velocidad de las reacciones acopladas ( $V_{\text{sis}}$ )

menos la velocidad enzimática de la homoserina deshidrogenasa (VHD) ( $V_{\text{obs}} = V_{\text{sis}} - V_{\text{HD}}$ ). Si consideramos que tanto el PEP como el ATP son constantes debido a su alta concentración, podemos formular  $V_{\text{sis}}$  en función de la concentración de homoserina en el ensayo, la  $K_m$  de la homoserina para la homoserina quinasa y la  $V_{\text{max}}$  de ésta:

$$V_{\text{sis}} = V_{\text{max}} \times [\text{HOM}] / (K_{m\text{HOM}} + [\text{HOM}])$$

Del mismo modo podemos formular la VHD, considerando que la unión de ambos sustratos al enzima se produce al azar sin un determinado orden y sin que ninguno de estos altere la afinidad por el otro sustrato al unirse antes al enzima (Segel 1975).

$$V_{\text{HD}} = V_{\text{max}} \times [\text{HOM}] / (K_{m\text{HOM}} \times (1 + (K_{m\text{NAD}^+} / [\text{NAD}^+])) + [\text{HOM}] \times (1 + (K_{m\text{NAD}^+} / [\text{NAD}^+])))$$

Cuando en estas ecuaciones se sustituyen los valores conocidos (para  $V_{\text{sis}}$  los datos obtenidos en el ensayo a concentraciones pequeñas de homoserina y para VHD los obtenidos al caracterizar la homoserina deshidrogenasa), y se varía tanto la concentración de homoserina como la de  $\text{NAD}^+$ , se obtiene una familia de curvas de las posibles cinéticas. Como se puede observar en la figura 32B todas las curvas obtenidas podrían confundirse con una inhibición por sustrato. Si se complica aun más el sistema se puede considerar un posible efecto "activador" o "inhibidor" de la unión previa del  $\text{NAD}^+$  al enzima. En cualquiera de los dos casos, las curvas obtenidas siguen aparentando una inhibición por sustrato.

Una vez estudiado el sistema se llegó a la conclusión de que en los cinco minutos que dura el ensayo de la homoserina quinasa no se produce suficiente  $\text{NAD}^+$  (se requiere al menos una concentración de 0,05 mM para observar el efecto descrito) como para hacer funcionar la homoserina deshidrogenasa en dirección contraria a la que presenta "in vivo". Ensayos de la velocidad de estas enzimas de forma puntual y con tiempos largos de incubación corren el peligro de acoplar estas dos reacciones dependientes de homoserina, falseando los resultados observados. Ya que nuestros ensayos no

presentaban este tipo de problemas se procedió a la caracterización de las enzimas silvestres y mutantes.

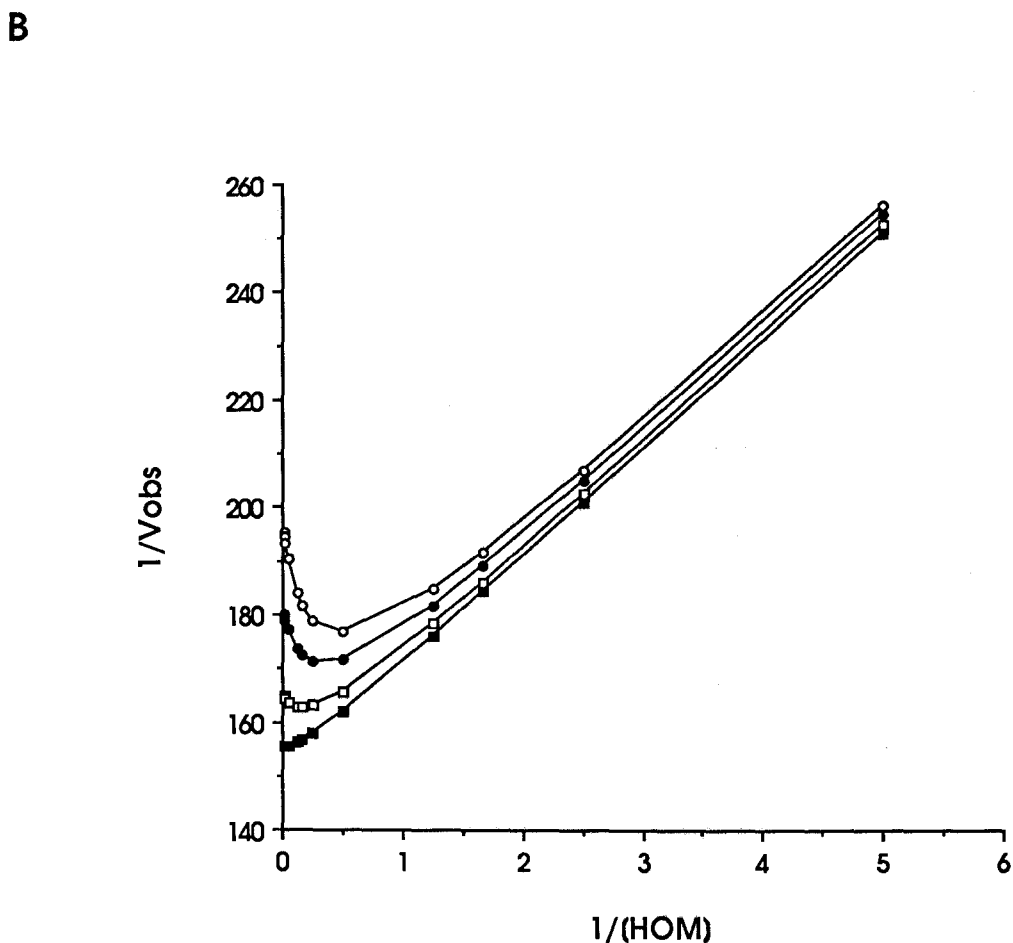
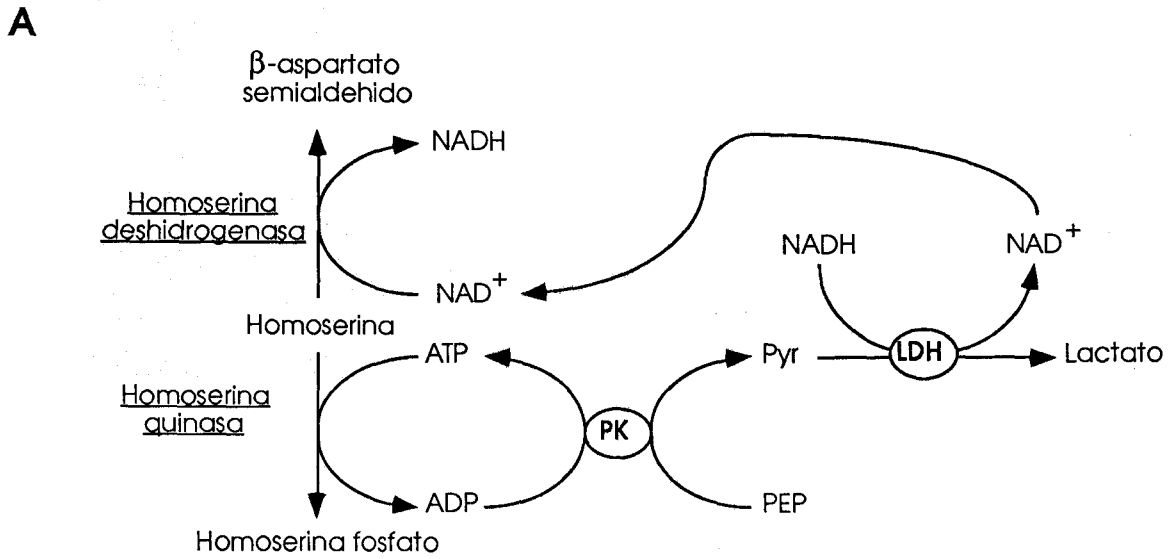


Figura 32. (A) Posible sistema cinético de reacciones acopladas presente en los ensayos enzimáticos de la homoserina quinasa. (B) Cinéticas teóricas del sistema en función de la concentración de NAD<sup>+</sup> en el ensayo (○) 0,08 mM, (●) 0,02 mM, (□) 0,008 mM y (■) 0,002 mM.

### 6.1. Actividad aspartato quinasa.

Se llevaron a cabo estudios cinéticos de velocidad inicial de la actividad aspartato quinasa en extractos crudos de la estirpe silvestre IFI256 en tampón Hepes 0,5 M pH 7,5 a 30°C. Tanto el L-aspartico ( $K_m[\text{Asp}] = 7,5 \text{ mM}$ ) como el ATP ( $K_m[\text{ATP}] = 5,52 \text{ mM}$ ) mostraron una cinética de saturación normal Michaelis-Menten. La adición de L-treonina al ensayo enzimático inhibió de forma alostérica la actividad ( $K_i[\text{Thr}] = 2,31 \text{ mM}$ ) mientras que la adición de L-metionina no produjo ningún tipo de inhibición. Estos resultados son similares a los anteriormente descritos (Ramos *et al.* 1991).

Una vez realizado el estudio del enzima silvestre se procedió al estudio de los mutantes superproductores aislados, calculándose la actividad del extracto, la afinidad del enzima por el sustrato ( $K_m[\text{Asp}]$ ) y el posible efecto de la adición de L-treonina o L-metionina sobre la actividad (Tabla 22).

	U/g	$K_m[\text{Asp}]$	% Act. + Thr	% Act. + Met
IFI256	9,5	7,5	7	100
ETHCC1	49,1	6,3	19	100
ETHCC2	40,4	10,1	13	81
ETHCC3	14,4	1,7	4	87
ETHCC4	20,4	3,6	11	95
ETHCC5	20,6	33,5	9	100
ETHCC6	14,1	3,6	5	100
ETHCC7	26,2	2,6	50	100
ETHCC8	18,5	15,0	39	88
HNVBC4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HNVBC5	17,0	0,3	52	100

TABLA 22. Actividad aspartato quinasa de la estirpe silvestre IFI256, y de los mutantes derivados de ella resistentes a etionina y a hidroxinorvalina. U/g, unidades por gramo de proteína;  $K_m[\text{Asp}]$ , constante de afinidad para el aspartato (mM); %Act.+Thr o %Act.+Met, actividad residual tras la adición de treonina o metionina respectivamente a una concentración final de 20 mM. Los resultados son la media de cinco experimentos, con una desviación standard entre 1,3-1,6%. n.d.: no determinada.

Al compararse con la estirpe silvestre, la actividad específica (actividad aspartato quinasa por gramo de proteína) de los mutantes en los extractos crudos se incrementó entre 1,5 y 5 veces. La afinidad por el sustrato también estaba sensiblemente alterada en los mutantes; la  $K_m[\text{Asp}]$  se redujo hasta veinte veces en el mutante HNVBC5 y aumentó hasta cinco veces en el mutante ETHCC5. En la mayoría de los mutantes, la actividad aspartato quinasa se inhibía por treonina menos que en la cepa silvestre; la actividad residual tras la adición de L-treonina 20 mM en dos de los mutantes fue del 50 % mientras que en el silvestre esta fue de un 7%. La adición de metionina no afectó la actividad de la estirpe silvestre ni la de algunos mutantes, y cuando tuvo algún efecto, éste fue muy leve, ya que tras la adición de L-metionina 20 mM la actividad residual fue de al menos un 81%. Esto sugiere un efecto inespecífico de la metionina mostrado por la mayoría de los mutantes y posiblemente relacionado con la alteración de la afinidad de la aspartato quinasa por la treonina.

Los datos de la afinidad por el sustrato, la inhibición por treonina y/o metionina, y la actividad específica sugieren que en los mutantes la síntesis de la enzima también ha sido alterada.

## 6.2. Actividad homoserina deshidrogenasa.

La cinética de la actividad homoserina deshidrogenasa encontrada en extractos crudos de la estirpe silvestre IFI256 se estudió mediante medidas de velocidad inicial. Los experimentos se llevaron a cabo en tampón Hepes 0,5 M pH 7,5. Mientras que la L-homoserina muestra una cinética de saturación normal Michaelis-Menten ( $K_m[\text{Hom}] = 9,34 \text{ mM}$ ), el  $\text{NAD}^+$  muestra una cinética de saturación dependiente de la concentración de la L-homoserina ( $K_m[\text{NAD}^+] = 0,18$ ). Este tipo de cinética es relativamente normal en reacciones multisustrato, habiéndose descrito previamente para otras reacciones dependientes de piridín nucleótidos (Fujioka y Nakatani 1970) (Fig. 33). Asimismo, mientras que la adición de metionina al ensayo enzimático inhibió de forma competitiva la actividad ( $K_i[\text{Met}] = 9,31 \text{ mM}$ ) la adición de treonina no produjo ningún tipo de inhibición (la inhibición por treonina del enzima se ha descrito en otras estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*; la

ausencia de inhibición es explicable por diferencias en el fondo genético).

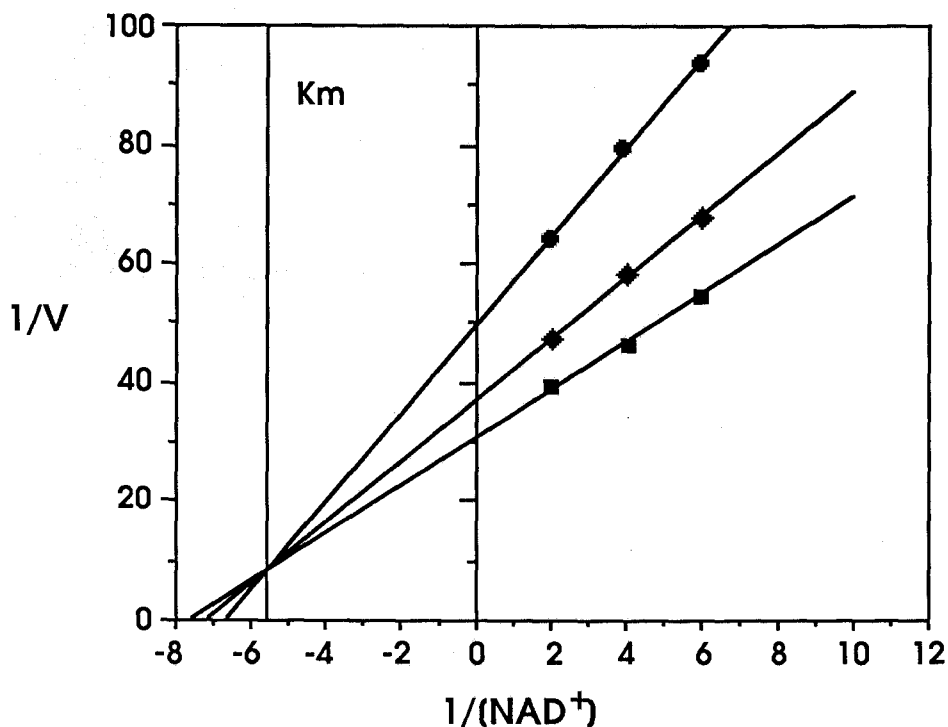


Figura 33. Cinética de la homoserina deshidrogenasa de la estirpe silvestre IFI256 en función de la concentración de  $\text{NAD}^+$ . Las concentraciones de homoserina usadas fueron 40 mM (■), 20 mM (●) y 10 mM (●).

Posteriormente, se estudió en los mutantes superproductores aislados la homoserina deshidrogenasa, calculándose la actividad del extracto, la afinidad del enzima por el sustrato ( $K_m[\text{Hom}]$ ) y el posible efecto de la adición de treonina o metionina sobre la actividad (Tabla 23).

La actividad específica en los extractos crudos de los mutantes fue similar o ligeramente superior a la del silvestre. Sin embargo, la afinidad por los sustratos en los mutantes, tanto para la L-homoserina (Tabla 23) como para el  $\text{NAD}^+$  (datos no mostrados), estaba alterada; la  $K_m[\text{Hom}]$  fue sustancialmente mayor en los

mutantes, con la excepción de dos mutantes cuya  $K_m$  fue similar a la del silvestre. Esta variación hace menos favorable la reacción, favoreciendo a su vez la reacción reversa (en el sentido de la síntesis de homoserina). Los efectos de la adición de metionina o treonina no fueron muy fuertes, reflejando probablemente variaciones en la afinidad por el sustrato. La treonina no afectó la reacción enzimática ni en el silvestre ni en la mayoría de los mutantes; en aquellos en los que tuvo un ligero efecto inhibitorio y probablemente inespecífico, el enzima conservó entre un 92-96% de actividad residual. La metionina no afectó a la mayoría de los mutantes; aquéllos que fueron afectados, así como el silvestre, retuvieron entre un 78-92% de su actividad.

	U/g	$K_m$ [Hom]	% Act. + Thr	% Act. + Met
IFI256	9,2	9,34	100	80
ETHCC1	13,3	30,1	100	100
ETHCC2	14,8	17,9	96	100
ETHCC3	9,9	26,5	100	100
ETHCC4	9,9	165	100	89
ETHCC5	9,3	107	100	100
ETHCC6	9,9	9,9	96	100
ETHCC7	11,6	8,9	100	92
ETHCC8	14,0	13,9	100	100
HNVBC4	13,0	167	100	89
HNVBC5	7,1	163	92	78

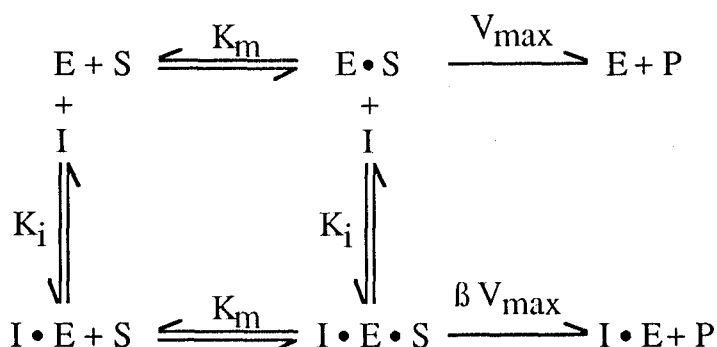
TABLA 23. Actividad homoserina deshidrogenasa de la estirpe silvestre IFI256, y de los mutantes derivados de ella resistentes a etionina y a hidroxinorvalina. U/g, unidades por gramo de proteína;  $K_m$ [Hom], constante de afinidad por la homoserina (mM); %Act.+Thr o %Act.+Met, actividad residual tras la adición de treonina o metionina respectivamente, a una concentración final de 20 mM. Los resultados son la media de cinco grupos de experimentos con desviaciones standard entre 0,005-0,008 de la variación de la densidad óptica observada.



### 6.3. Actividad homoserina quinasa.

Se han llevado a cabo estudios cinéticos de la actividad homoserina quinasa en extractos crudos de la estirpe silvestre IFI256, en tampón Hepes 0,5 M pH 7,5 a 30°C. Mientras que el ATP mostró una cinética de saturación normal Michaelis-Menten ( $K_m[\text{ATP}] = 0,1 \text{ mM}$ ), la L-homoserina a concentraciones por encima de 3 mM mostró una cinética de saturación hiperbólica ( $K_m[\text{Hom}] = 0,135 \text{ mM}$ ) (Fig. 34A), debido a que concentraciones superiores a 3 mM de L-homoserina inhiben a la homoserina quinasa. Por encima de esta concentración, la L-homoserina causa una inhibición marcada pero parcial ( $K_i[\text{Hom}] = 47,1 \text{ mM}$ ) (Fig. 34A). Asimismo, mientras que la adición de treonina al ensayo enzimático inhibió la actividad de forma competitiva ( $K_i[\text{Thr}] = 1,132 \text{ mM}$ ), la adición de metionina no afectó la actividad de la enzima.

Los datos experimentales obtenidos se ajustan a un modelo cinético (esquema adjunto), ya propuesto por otros autores para el enzima bacteriano (Shames y Wedler 1984), que supone la existencia de un sitio activo y otro regulador.



donde E = complejo enzima-ATP, S = L-homoserina, P = homoserina fosfato, I = inhibidor (en este caso L-homoserina),  $K_m$  = constante de afinidad y  $K_i$  = constante de inhibición. En condiciones de equilibrio (Segel 1975) la velocidad inicial es

$$v = \frac{V_{\max} [S] / K_m + \beta V_{\max} [S][I] / K_m K_i}{1 + [S] / K_m + [I] / K_i + [S][I] / K_m K_i}$$

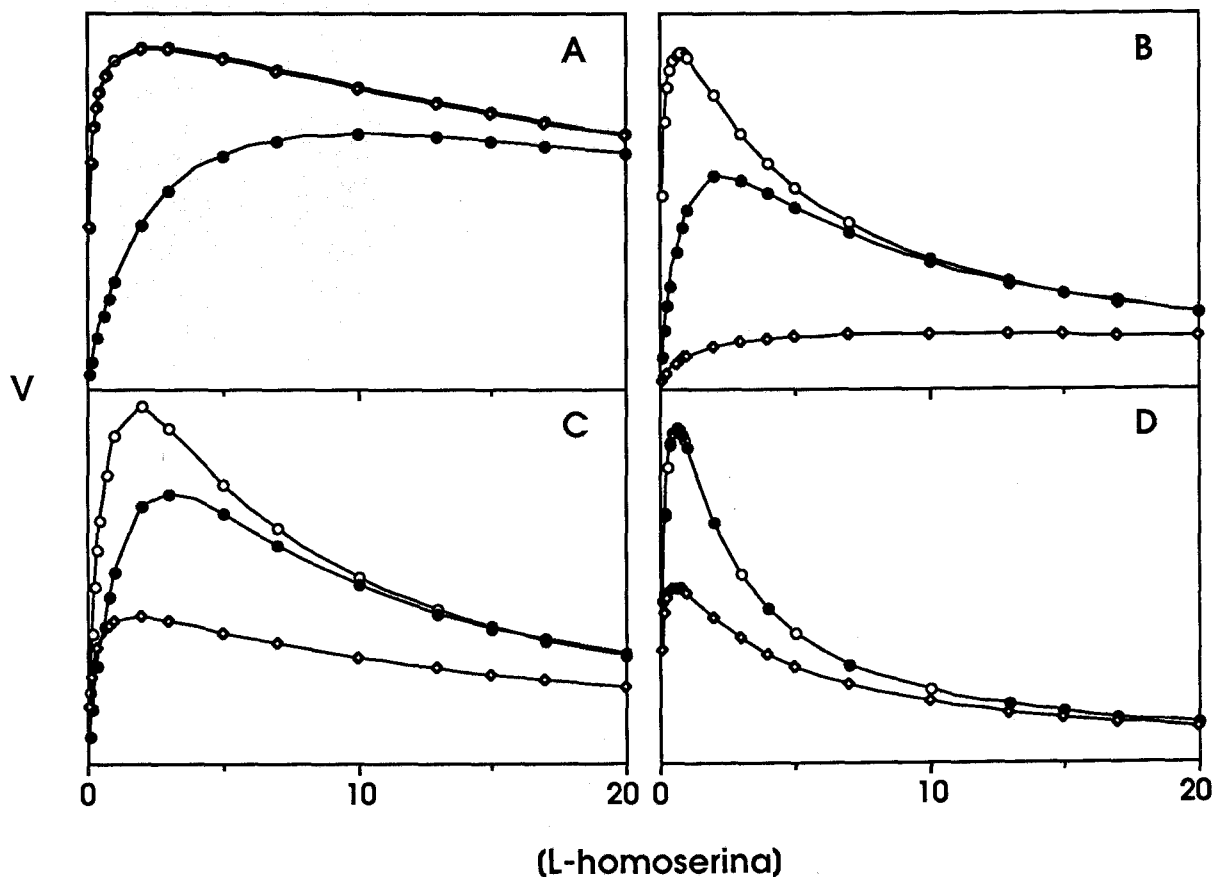


Figura 34. Cinéticas de la homoserina quinasa de la estirpe silvestre IFI256 (A) y de los mutantes ETHCC4 (B), ETHCC5 (C) y ETHCC6 (D) en función de la concentración de L-homoserina en ausencia de un inhibidor (○) o tras la adición de L-treonina 20 mM (●) o L-metionina 20 mM (◆).

Con los resultados de velocidad inicial obtenidos experimentalmente, y a partir de esta fórmula, se determinaron los valores de los distintos coeficientes que intervienen en ella.

Una vez realizado el estudio de la enzima silvestre se procedió al estudio de los mutantes superproductores, calculándose la actividad del extracto, la afinidad del enzima por el sustrato ( $K_m[\text{Hom}]$ ) y el posible efecto de la adición de treonina o metionina sobre la actividad homoserina quinasa (Tabla 24). La actividad específica homoserina quinasa fue en la mayoría de los mutantes

más alta, incluso superior a cuatro veces, que en el silvestre. La afinidad enzima-sustrato también fue mayor en los mutantes, alcanzando, en dos de los mutantes, valores entre 10 y 15 veces los del silvestre. Estos resultados, junto con las variaciones de las propiedades cinéticas observadas, indicarían una alteración de la síntesis del enzima.

Cuando se añadió treonina a la reacción enzimática, la actividad homoserina quinasa fue inhibida en todos los casos, aunque en diferente grado en los distintos mutantes. En general la enzima se inhibió menos en los mutantes que en la estirpe silvestre, con una actividad residual en algunos de ellos entre el 82 y el 96% frente a un 33% en la estirpe silvestre.

Mientras que la adición de metionina no afectó a la actividad homoserina quinasa silvestre, la actividad de los mutantes fue inhibida en diferentes grados. La actividad residual varió entre un 33% en el mutante más afectado a un 90% en el menos afectado.

	U/g	$K_m$ [Hom]	% Act. + Thr	% Act. + Met
IFI256	4,2	0,135	33	100
ETHCC1	10,7	0,358	21	87
ETHCC2	16,1	0,626	96	89
ETHCC3	7,5	0,672	53	90
ETHCC4	11,7	0,141	43	85
ETHCC5	8,0	2,010	54	55
ETHCC6	7,3	0,718	95	66
ETHCC7	8,2	1,420	86	41
ETHCC8	7,9	0,167	82	33
HNVBC4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HNVBC5	3,6	0,120	39	52

TABLA 24. Actividad homoserina quinasa de la estirpe silvestre IFI256, y de los mutantes derivados de ella resistentes a etionina y a hidroxinorvalina. U/g, unidades por gramo de proteína;  $K_m$ [Hom], constante de afinidad por la homoserina (mM); %Act.+Thr o %Act.+Met, actividad residual tras la adición de treonina o metionina respectivamente, a una concentración final de 20 mM. Los resultados son la media de cinco grupos de experimentos con desviaciones standard entre 0,004-0,006 de la variación de la densidad óptica observada. n.d.: no determinada.

#### 6.4. Inhibición de la homoserina quinasa por L-homoserina, L-treonina o L-metionina.

La inhibición de la actividad enzimática por homoserina, treonina o metionina se estudió con más detenimiento en extractos parcialmente purificados, en la estirpe silvestre y en tres de los mutantes más significativos: el mutante ETHCC4, que tiene una  $K_m[\text{Hom}]$  similar a la del silvestre, ETHCC5 que tiene la mayor  $K_m$  de todas las estirpes, unas 15 veces mayor que la del silvestre, y ETHCC6 que tiene un valor de  $K_m$  5 veces mayor que la del silvestre (similar a la  $K_m$  exhibida por otros mutantes). Estos experimentos se llevaron a cabo para establecer el tipo de inhibición que se estaba produciendo y obtener más información sobre estas enzimas. La figura 34 muestra el comportamiento de la homoserina quinasa silvestre (Fig. 34A) y la de los tres mutantes (Fig. 34B, 34C y 34D) con o sin la adición de treonina o metionina, y la tabla 25 muestra los datos obtenidos. Mientras que en las estirpes estudiadas la inhibición por treonina fue de tipo competitivo, la producida por metionina fue acompetitiva.

	$K_m[\text{Hom}]$	$K_i[\text{Hom}]$	$K_i[\text{Thr}]$	$K_i[\text{Met}]$
IFI256	0,13	47,1	1,13	-
ETHCC4	0,14	3,84	2,27	5,38
ETHCC5	2,01	1,64	11,58	3,10
ETHCC6	0,72	0,52	87,02	4,61

TABLA 25. Constante de afinidad para la homoserina ( $K_m[\text{Hom}]$ ) (mM) y constante de inhibición para la homoserina ( $K_i[\text{Hom}]$ ), treonina ( $K_i[\text{Thr}]$ ) y metionina ( $K_i[\text{Met}]$ ) (mM) en la estirpe silvestre IFI256 y en tres de los mutantes resistentes a etionina. Los resultados son la media de cinco grupos de experimentos con desviaciones standard entre 0,003-0,006 de la variación de la densidad óptica observada.

Los datos experimentales obtenidos apoyan la existencia de un sitio activo y de un sitio regulador, como se ha sugerido para la homoserina quinasa de bacterias (Shames y Wedler 1984). Paralela

a la pérdida de afinidad por la homoserina como sustrato existe un incremento de la inhibición por este aminoácido. La  $K_i$  fue al menos 100 veces menor en el mutante ETHCC6 que en el silvestre, lo que indicaría una alteración tanto del sitio activo como del regulador. La existencia de esta alteración está apoyada por los resultados obtenidos con la adición de treonina o metionina. Con respecto a la treonina, la inhibición fue de tipo competitivo, la  $K_i$  alcanzó valores 80 veces mayor que la del silvestre, indicando que la alteración del sitio activo produce una pérdida de afinidad por la treonina. La metionina no afectó la actividad de la enzima silvestre, pero inhibió acompetitivamente las de los mutantes. Los valores de  $K_i$  fueron entre 3 y 5 mM, indicando una alteración del sitio regulador.

#### 6.5. Actividad S-adenosil-metionina sintetasa.

La actividad S-adenosil-metionina sintetasa se determinó en la estirpe silvestre y en los mutantes superproductores por absorbancia a 260 nm, como se describe en el apartado 4.2.2.6 de Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 26. Ya que en levaduras existen dos S-adenosil-metionina sintetetasas, productos de los genes *SAM1* y *SAM2* (Thomas y Surdin-Kerjan 1991), la actividad enzimática detectada corresponde a la suma de ambas. Las estirpes mutadas en los genes *SAM1* o *SAM2* se han descrito como resistentes a etionina debido al incremento en su contenido intracelular de metionina. De un modo similar nuestros mutantes superproducen metionina y/o S-adenosil-metionina y son resistentes a etionina (Tabla 21).

Thomas y Surdin-Kerjan (1991) han sugerido que la etionina no se une a la enzima codificada por el gen *SAM2* pero si a la codificada por *SAM1*. A fin de conocer si en nuestros mutantes es el producto del gen *SAM1* y/o el de *SAM2* el que se encuentra afectado, se llevaron a cabo experimentos en la estirpe silvestre y en los mutantes superproductores determinando la formación de S-adenosil-metionina o S-adenosil-etionina a partir de metionina o etionina respectivamente. Como control se utilizaron las estirpes C90, carente del producto del gen *SAM1*, la C95, carente del producto del gen *SAM2*, y la CC435 6C, carente de ambas actividades.

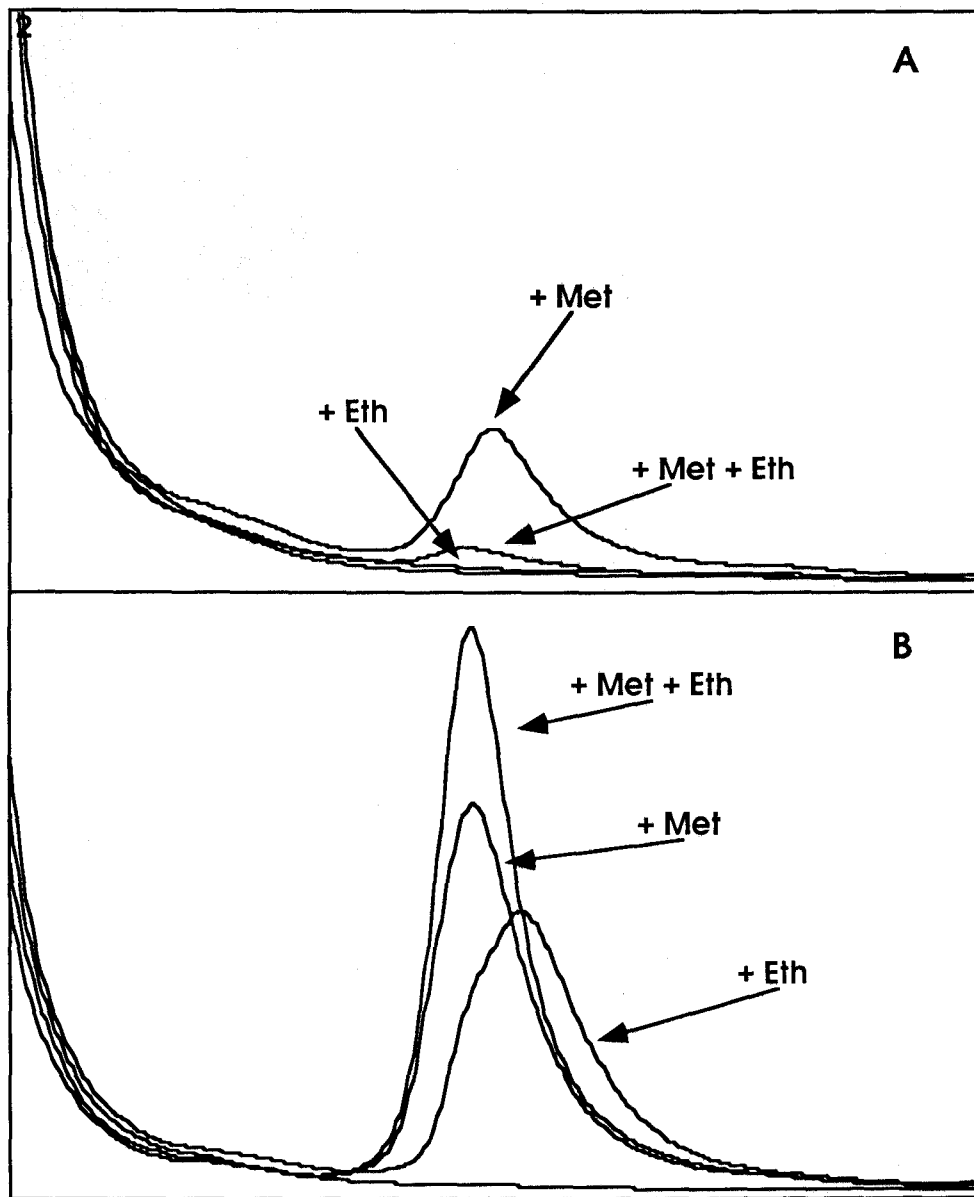


Figura 35. Formación de S-adenosil-metionina o S-adenosil-etionina tras incubar metionina (+Met), etionina (+Eth) o una mezcla equivalente de ambas (+Met+Eth) con un extracto crudo de la estirpe C95 (*SAM1 sam2*) (A) o de la estirpe C90 (*sam1 SAM2*) (B).

La estirpe C95, con el producto del gen *SAM1* funcional, es totalmente incapaz de usar la etionina (8 mM) para formar S-adenosil-etionina y su actividad en metionina se redujo al 40% en presencia de concentraciones equivalentes de metionina (4 mM) y etionina (4 mM) (Fig. 35 y Tabla 26), indicando que la S-adenosil-metionina sintetasa codificada por el gen *SAM1* es inhibida competitivamente por etionina. La estirpe C90, con el producto del gen *SAM2* funcional, reconoce a la etionina como sustrato y cataliza su conversión en S-adenosil-etionina; en este caso no se observó ninguna inhibición por etionina (Fig. 35 y Tabla 26). La estirpe CC435 6C no mostró ningún tipo de actividad S-adenosil-metionina sintetasa (Tabla 26).

	+ Met (mU/g)	+Met+Eth (%)	+Eth (%)
IFI256	8,90	88	75
ETHCC1	0,05	90	0
ETHCC2	0,10	91	0
ETHCC3	1,30	90	0
ETHCC4	2,00	89	0
ETHCC5	1,60	90	0
ETHCC6	0,90	90	0
ETHCC7	13,50	90	0
ETHCC8	40,20	89	0
HNVBC4	0,32	91	0
HNVBC5	1,20	90	0
C90	2,10	100	100
C95	0,45	60	0
C435 6C	0	0	0

TABLA 26. Actividad S-adenosil-metionina sintetasa de la estirpe silvestre IFI256, los mutantes resistentes a etionina y a hidroxinorvalina derivados de ella, y las estirpes control C90, C95 y C435 6C. +Met (mU/g), miliunidades por gramo de proteína en presencia de metionina como sustrato; +Met+Eth (%) o +Eth (%), porcentaje de la actividad residual en presencia de metionina y etionina, o en presencia sólo de etionina respectivamente. Los resultados son la media de cinco experimentos con desviaciones standard 1,9-2,09% del area observada.

Se determinó posteriormente el contenido intracelular de aminoácidos y de S-adenosil-metionina en las cepas C90 y C95, cultivadas en medio mínimo SD y en SD<sub>e</sub> 1 mM (a esta concentración la estirpe C95 comienza a sufrir los efectos tóxicos de la etionina, mientras que la C90 crece normalmente). En ambas estirpes cultivadas en SD el contenido intracelular de aminoácidos y S-adenosil-metionina fue similar; en SD<sub>e</sub> la estirpe C95 redujo considerablemente su contenido total de aminoácidos mientras que en la C90 las concentraciones de todos sus aminoácidos se mantuvieron constantes y además se acumuló homoserina. Esta acumulación de homoserina estaría ligada a la inhibición de la O-acetil-homoserina transferasa, primera enzima de la ruta específica de síntesis de metionina, que se ha descrito como reprimible e inhibible por Ado-Met (y posiblemente también por Ado-Eth). Asimismo, mientras que la estirpe C95 creciendo en SD<sub>e</sub> no presentaba S-adenosil-metionina intracelular, la C90 mantuvo la misma concentración que cuando crecía en SD. Estos resultados apoyan los anteriores que indican inhibición por etionina de la enzima codificada por *SAM1* (presente en la cepa C95), y la producción de Ado-Eth por parte del producto del gen *SAM2*.

Asimismo, la adición de metionina al medio SD<sub>e</sub> 5 mM, donde habían sido cultivadas ambas cepas y a cuya concentración de etionina ambas sufren el efecto tóxico, restituyó la tasa de crecimiento que éstas presentan creciendo en SD. La adición de Ado-Met palió en parte los efectos tóxicos de la etionina incrementando la tasa de crecimiento, pero el efecto sobre dicha tasa fue al menos dos veces mayor en la cepa C95 que en la C90. Estos resultados estarían de acuerdo con la auxotrofia para Ado-Met que produce la presencia de etionina en la cepa C95.

La estirpe silvestre IFI256 en presencia de etionina como sustrato mostró una actividad S-adenosil-metionina sintetasa reducida en un 25% respecto a la mostrada en presencia de metionina; en presencia de concentraciones similares de metionina y etionina la inhibición observada fue sólo de un 12% (Tabla 26). Todos los mutantes superproductores mostraron un comportamiento similar entre ellos y diferente al del silvestre; la actividad se redujo un 10% en presencia de metionina y etionina, mientras que no se detectó actividad en presencia de etionina como



sustrato. Los resultados sugieren la pérdida o una fuerte reducción de la actividad producto del gen *SAM2*, junto con la alteración de las propiedades cinéticas de la S-adenosil-metionina sintetasa codificada por el gen *SAM1*, que incluye la pérdida de afinidad o inhibición por etionina.

## 7. ESTUDIO DE LA DEGRADACION DE TREONINA.

### 7.1. Estudio de mutantes carentes de actividad treonina desaminasa anabólica y/o catabólica.

La acumulación de aminoácidos en los que normalmente las levaduras son deficitarias se podría conseguir por un aumento del flujo de síntesis (ya comentado para el caso de treonina y metionina en los apartados anteriores) o un bloqueo de la ruta degradativa de dichos aminoácidos.

En *Saccharomyces* la treonina es degradada, además de por la treonina deshidrogenasa y la serina hidroximetil transferasa, por dos enzimas, la L-treonina desaminasa, producto del gen *ILV1* y la L-serina (L-treonina) desaminasa, producto del gen *CHA*. Mientras que el producto del gen *ILV1* es necesario para la síntesis de isoleucina, el gen *CHA* parece ser inducido por altas concentraciones de serina (3,6 mM) o treonina (5 mM) (Ramos y Wiame, 1982).

Se estudió la concentración de aminoácidos en la cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* REMF5 que posee ambas actividades, en un mutante que carece de la actividad L-treonina desaminasa, 8723c (*ilv*), en un mutante carente de la actividad serina (treonina) desaminasa, 8655c (*cha*), y en un doble mutante, 8755c (*ilv1 cha*). Los resultados, obtenidos en HPLC para los aminoácidos de la ruta y algunos relacionados, se muestran en la tabla 27. Respecto a la concentración de treonina, la concentración máxima (16 mM) se obtuvo en el doble mutante, 8755c; el mutante *ilv1* presentó una concentración de 11 mM, superior a la del silvestre, 6 mM. Finalmente el mutante *cha* presenta la misma concentración que el silvestre 5,9 mM. La diferencia entre el doble mutante y el mutante *ilv1* se debe a la presencia de un alelo funcional de *CHA* que se vió inducido tanto por las altas concentraciones de serina como por las

de treonina. Los resultados apuntaban a la inducción del gen *CHA* en presencia de amonio y de altas niveles de serina o treonina intracelular.

Como comprobación de estos resultados se llevaron a cabo determinaciones de ambas enzimas en las cuatro estirpes anteriormente utilizadas (Tabla 27). Las actividades presentes en los extractos crudos obtenidos en medio completo confirmaron la existencia de ambas proteínas en presencia de fuentes de nitrógeno distintas de la serina o la treonina.

	REMF5	8655c <i>cha</i>	8723c <i>ilv1</i>	8736b <i>cha ilv1</i>
Asp	2,30	2,25	4,04	7,93
Met	1,10	1,20	1,53	3,12
Thr	6,00	5,80	11,0	15,7
Ile	4,20	3,70	8,40	12,5
Val	3,7	3,4	11,6	19,1
Leu	3,4	3,1	2,9	3,2
Ser	7,2	6,4	22,1	55,3
Gly	16,1	18,4	15,2	17,3
Ala	20,8	21,5	42,8	43,2
TD	1,53	1,6	n.d.	n.d.
STD	0,42	n.d.	0,34	n.d.

TABLA 27. Concentración interna de aminoácidos de las estirpes REMF5, 8655c, 8723c y 8736b cultivadas en YPD a 30°C; y actividades específicas (U/g) de treonina desaminasa anabólica (TD) y serina (treonina) desaminasa catabólica (STD) de dichas estirpes en las mismas condiciones de cultivo. Los resultados son la media de cuatro experimentos con desviaciones standard 1,84-2,10% del área observada. n.d.: no detectada.

Aunque las concentraciones de aminoácidos acumuladas se alejan mucho de las obtenidas con los mutantes superproductores, estos resultados apuntan a la posibilidad de obtener cepas que acumulen treonina mediante el uso de un mutante *cha ilv1* o un

mutante *cha* con un alelo *ilv1* rezumante para el primero de los genes, a fin de evitar la auxotrofia de isoleucina.

Ya que los medios semi-industriales presentan un alto contenido en aminoácidos (Tabla 9) podrían ser utilizados directamente por una estirpe *cha ilv1*. Para comprobar esta posibilidad se estudiaron las tasas de crecimiento de las estirpes mutantes (8655c, 8723c y 8736b) y de la estirpe industrial IFI256 en medio completo, mínimo suplementado con isoleucina y medios semi-industriales (M, MA, MB y MAB); los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 28.

	IFI256	8655c <i>cha</i>	8723c <i>ilv1</i>	8736b <i>cha ilv1</i>
YPD	0,39	0,24	0,21	0,20
SD+Ile	0,31	0,20	0,19	0,16
M	0,11	0,03	0,02	0,02
MA	0,14	0,04	0,04	0,05
MB	0,11	0,03	0,03	0,03

TABLA 28. Tasas de crecimiento ( $h^{-1}$ ) de la estirpe industrial IFI256 y de las estirpes genéticas 8655c, 8723c y 8736b creciendo en medio completo (YPD), medio mínimo suplementado con isoleucina (SD+Ile), melazas (M), y melazas suplementadas con amonio (MA) o con biotina (MB). Los resultados son la media de tres experimentos con desviaciones standard 0,02.

Mientras que la estirpe IFI256, con gran capacidad de fermentación y que fue utilizada como control de estirpe industrial, redujo su tasa de crecimiento en medios semi-industriales a un tercio de la que presentó en medio completo, las estirpes mutantes utilizadas redujeron la tasa de crecimiento a una quinta o sexta parte de la presentada en medio completo (esta es la principal dificultad del uso industrial de estas cepas). Por lo tanto, la obtención de mutantes *ilv1 cha* a partir de estirpes industriales podría incrementar la concentración de treonina de estas cepas sin

mermar sus tasas de crecimiento y sin requerimientos especiales en los medios de cultivo.

## 7.2. Estudio de la degradación de treonina en los mutantes superproductores.

### 7.2.1. Treonina desaminasa o deshidratasa.

La actividad treonina desaminasa se ensayó en los extractos crudos obtenidos a partir de la estirpe silvestre IFI256 y de los mutantes superproductores de metionina y treonina con el fin de conocer si la degradación de treonina también se había visto afectada en las cepas superproductoras. Las actividades específicas (U/g) obtenidas se muestran en la tabla 29. Las diferencias observadas junto con la concentraciones internas de treonina e isoleucina detectadas (Tabla 21) indican que la acumulación de treonina no parece relacionada con la falta de degradación de esta.

	TDA	TDH
IFI256	2,31	0,26
ETHCC1	2,34	0,24
ETHCC2	3,25	0,20
ETHCC3	0,48	0,23
ETHCC4	1,05	0,24
ETHCC5	0,90	0,25
ETHCC6	1,41	0,20
ETHCC7	1,20	0,25
ETHCC8	0,82	0,23
HNVBC4	0,90	0,20
HNVBC5	0,40	0,19

TABLA 29. Actividad treonina desaminasa (TDA) y treonina deshidrogenasa (TDH) expresada en U/gramo de proteína de la estirpe silvestre IFI256, los mutantes resistentes a etionina y los resistentes a hidroxinorvalina derivados de ella. Los resultados son la media de cuatro grupos de experimentos con desviaciones medias entre 0,004-0,006 de la variación de la densidad óptica observada.

### 7.2.2. Treonina deshidrogenasa.

Con el mismo objetivo del apartado anterior se determinó la actividad específica treonina deshidrogenasa tanto para la estirpe silvestre IFI256 como para los mutantes aislados a partir de ella. Las actividades específicas (U/g) obtenidas se muestran en la tabla 29. Como en el apartado anterior los datos obtenidos no relacionan la acumulación de treonina con una falta de degradación, en este caso por parte de la treonina deshidrogenasa.

## **DISCUSSION**

## 1. SEPARACION DE OPA/MEC DERIVADOS DE AMINOACIDOS.

### 1.1. Caracterización del método de derivatización.

La derivatización en precolumna seguida por separación en HPLC usando cromatografía de fase reversa se ha revelado como un eficiente método de análisis de aminoácidos (Jarrett *et al.* 1986; Hill *et al.* 1979). La derivatización por OPA es un método muy seguro y además el más sensible, con límites de detección del orden de femtomolar (Gillespie y Spiegelman 1965).

Además de la derivatización con OPA se han desarrollado otros métodos para la separación de aminoácidos, tales como los basados en la detección de derivados feniltiohidantoicos (PTH) o 5-dimetil-aminonaftaleno-1-sulfonilicos (dansyl) (Johansson y Isaksson 1986). Se han descrito estrategias de optimización para la separación de PTH-derivados (Johansson y Isaksson 1986), pero estas contienen un gran número de variables, requiriendo un control estricto de la temperatura y un prolongado tiempo de preparación y análisis.

También la formación de derivados feniltiocarbamílicos (PTC) permite el análisis tanto de aminas primarias como secundarias (Bidlingmeyer *et al.* 1984), sin embargo, es necesaria la eliminación de solventes volátiles y subproductos de la reacción a baja presión, requiriendo un paso extra en la preparación de la muestra. Además, contaminantes tales como sales, lípidos, sustancias alcalinas y detergentes interfieren con el análisis. Estas limitaciones hacen el método de los PTC-derivados apropiado para muestras relativamente puras, más que para fluidos fisiológicos (Maugh 1984).

El método desarrollado en esta Tesis, basado en la derivatización con OPA mediada por  $\beta$ -mercaptoetanol, permitió separar mediante HPLC los aminoácidos del contenido intracelular de levaduras presentes en las muestras (Figs. 12, 13 y 14). Se utilizó una solución de aminoácidos patrón para identificar los aminoácidos encontrados en el interior celular (en este caso el contenido interno de aminoácidos en levaduras) a concentraciones que hicieron posible que los resultados se mostraran en un sólo cromatograma (Figs. 12, 13 y 14). No se detectaron ni cisteína ni prolina. La última

porque las aminas secundarias no reaccionan con la OPA sin una reacción anterior de rotura (Hogan *et al.* 1982), y la primera porque produce una respuesta muy pequeña, pero su presencia se puede determinar mediante otras reacciones (Jarrett *et al.* 1986).

Cuando los aminoácidos patrón se mezclaron con el reactivo OPA/MEC a diferentes tiempos (distintos tiempos de derivatización) antes de ser inyectados en la columna del HPLC, los derivados resultantes fueron razonablemente estables, aunque de un aminoácido a otro se observaron variaciones en la intensidad de la respuesta y en la estabilidad (Figs. 16 y 17). Si además se tiene en cuenta el tiempo de retención de cada uno de los OPA/MEC derivados (Fig. 17) la estabilidad de estos es aún mayor. Otros autores (Cooper *et al.* 1984) han descrito resultados similares encontrando mayor estabilidad cuando los derivados se examinaron en las condiciones presentes en la columna del HPLC. Esta estabilidad se atribuyó a la inmovilización de los OPA/MEC derivados en la columna de fase reversa, retardando de esta forma la reordenación del enlace oxígeno-azufre de la molécula (Cooper *et al.* 1984).

Utilizando las condiciones óptimas de reacción establecidas y el HPLC para separar los derivados de aminoácidos, la respuesta de todos los aminoácidos probados fue lineal hasta concentraciones de 1,5 mM de cada aminoácido. No se han probado concentraciones mayores. Otros investigadores han obtenido resultados similares cuando probaron cantidades por encima de 3 nmoles de cada aminoácido (Cooper *et al.* 1984).

Existen algunas desventajas en el uso de derivados OPA con la técnica del HPLC. Primero, existe una **caída en la fluorescencia** después de la derivatización de los aminoácidos (Hogan *et al.* 1982). En esta Tesis el problema se redujo mediante la detección de los derivados de aminoácidos a 340 nm y el uso de gradientes que permiten la detección del último aminoácido sólo 16 minutos después de la inyección. Bajo estas condiciones se obtiene una separación muy buena de los aminoácidos y una estabilidad de los derivados razonablemente alta para la mayoría de ellos (Figs. 16 y 17). Segundo, la **falta de derivatización de las aminas secundarias**. Este problema ha sido resuelto mediante el uso del 4-cloro-7-nitrobenzofurazano como un agente alternativo en su



determinación (Fallon *et al.* 1987). Tercero, la **baja respuesta de la cisteína**. La cisteína produce una baja respuesta a la derivatización pero puede ser determinada como ácido cisteíco o como carboximetil cisteína mediante las reacciones apropiadas (Jarrett *et al.* 1986). Como contrapartida las ventajas del método incluyen, 1) la pérdida de la interferencia del amonio comparado con los analizadores de aminoácidos (Hogan *et al.* 1982), y 2) la excelente sensibilidad, resolución y reproducibilidad del método: la derivatización con OPA de las aminas primarias, usando gradientes complejos como los descritos en esta Tesis y su posterior detección mediante HPLC es una forma sensible, reproducible, rápida y barata de medir el contenido intracelular o extracelular de aminoácidos. Finalmente, los valores absolutos detectados del contenido interno de aminoácidos de levaduras están en consonancia con los descritos por otros autores (Jones y Fink, 1982).

## 1.2. Optimización del gradiente de separación.

Los OPA/MEC derivados se separan bien cuando se utiliza un gradiente lineal de metanol variando entre el 10 y el 65%, con un tiempo total de análisis de 20 minutos por muestra (Jarrett *et al.* 1986), sin embargo, las mejores separaciones se obtienen con gradientes complejos con tres o cuatro solventes diferentes. El método descrito en esta Tesis da una mejor separación (Fig. 14A y 14B) y el tiempo de separación, comparado con otros (Jarrett *et al.* 1986), es ligeramente menor. Además, la sensibilidad del método permite detectar picomoles de aminoácidos (25 picomoles).

Los solventes utilizados en los gradientes presentan una serie de características que hacen de ellos los más apropiados para este tipo de separaciones:

1) La presencia de un tampón fosfato en ambos solventes (A y B) da lugar a una reducción de los tiempos de retención al utilizar una columna de fase reversa, reduciendo el tiempo de análisis.

2) Una buena separación depende de la solubilidad de la muestra en los solventes empleados, debido a esto ambos solvente (A y B) contienen al menos un 40% de agua destilada y desionizada. Asimismo, un incremento en el componente polar de la fase móvil (agua) incrementa la retención de los solutos.

3) Tanto el tetrahidrofurano como el acetonitrilo presentan un punto de ebullición no muy bajo (66 y 82 respectivamente, frente a 100 en el agua) con lo que su concentración apenas varía en la fase móvil.

4) La baja viscosidad del tetrahidrofurano y del acetonitrilo (0,55 y 0,37 respectivamente, frente a 1 en el agua) garantizan bajas presiones de trabajo, no poniendo en peligro la matriz de la columna.

5) Ni el tetrahidrofurano ni el acetonitrilo interfieren en la detección a 340 nm, ya que el primero absorbe a 215 nm y el segundo a 200 nm.

6) Las características diferenciadas de los cuatro solventes utilizados (tampón fosfato, tetrahidrofurano, acetonitrilo y agua) hacen que las propiedades del gradiente sean de una alta complejidad, logrando así una buena separación de sustancias muy similares.

La unión de todas estas propiedades hacen posible la separación de todos los aminoácidos en sólo 16 minutos.

## 2. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CONTENIDO INTRACELULAR DE AMINOACIDOS.

### 2.1. Influencia del medio de cultivo.

Como han descrito otros autores (Bui y Galzy 1990, Adler y Gustafsson 1980), el contenido intracelular de aminoácidos varía dependiendo de los medios de cultivo, p.e. bajos niveles de Met en aquellas levaduras que se encuentran creciendo en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono. Otros autores han encontrado (Cooper 1982) que el contenido intracelular de aminoácidos de una estirpe silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* cambia con la fuente de nitrógeno, de forma que en amonio, la concentración de Asp, Thr, Ala, Ile, Leu, Tyr y Phe es mayor que en glutamato, mientras que para el resto de los aminoácidos la concentración es menor. Existen estudios sobre las variaciones en las concentraciones intracelulares de todos los aminoácidos cuando las células se cultivan en cada uno de los diecinueve existentes (Cooper 1982), observándose un

marcado incremento en la concentración del aminoácido suministrado y de los derivados de este. A pesar de estos estudios existe una falta de conocimientos sobre la relación entre el contenido en aminoácidos y la fuente de carbono, temperatura de cultivo, tasa de crecimiento, etc. En esta Tesis se estudió el contenido intracelular de aminoácidos en función de estos parámetros (tasa de crecimiento, fuente de carbono, temperatura, etc...).

La tabla 9 muestra la concentración interna de aminoácidos en los distintos medios empleados. La máxima concentración se obtuvo con melazas suplementadas con bifosfato amónico. Todos los experimentos se realizaron a 30°C, usando la misma agitación y a partir del mismo inóculo, con lo que las diferencias observadas están relacionadas con la composición de los medios o con diferencias en las tasas de crecimiento. Para dilucidar entre ambas posibilidades se estudió la influencia de la tasa de crecimiento sobre el contenido intracelular de aminoácidos. Como muestran la figura 23 y la tabla 14, la concentración de aminoácidos no cambió con la tasa de crecimiento a valores mayores de 0,05 h<sup>-1</sup>, por otra parte, la tasa de crecimiento en los medios empleados fluctuó entre 0,4 h<sup>-1</sup> en YPD y 0,11 h<sup>-1</sup> en melazas sin suplementar (M). Por lo tanto, los cambios en la concentración de aminoácidos observados en diferentes medios no fueron debidos a los cambios en la tasa de crecimiento, pero si a la composición de los diferentes medios (por ejemplo, melazas, YPD o SD).

Se determinaron los aminoácidos presentes en los medios empleados antes de inocular (Tabla 7 y Fig. 18), observándose que mientras en SD no se detectaron ni siquiera trazas de aminoácidos, en YPD o en melazas se detectaron elevadas concentraciones. Aunque el contenido interno de aminoácidos es el balance entre la síntesis/degradación de aminoácidos y la síntesis/degradación de proteínas, la presencia de aminoácidos en el medio introduce una nueva variable: la incorporación y el consumo de aminoácidos a partir del medio de cultivo. Por lo tanto se estudió el consumo de aminoácidos en medios completos y semi-industriales, encontrándose diferencias de consumo entre los distintos aminoácidos (Tabla 8 y Fig. 19). Los resultados obtenidos indican que en medios completos gran parte del contenido interno de

aminoácidos se debe a la incorporación de los aminoácidos presentes en los medios de cultivo. La mayor parte de los aminoácidos del medio no se incorporan en la célula hasta que se agota la fuente de carbono (indicando que la célula está utilizando los esqueletos carbonados de los aminoácidos), y que la presencia de una buena fuente de nitrógeno modifica este consumo, posiblemente porque éste se ve favorecido por el secuestro de aminoácidos en la vacuola. Por lo tanto, las diferencias observadas (Tabla 9) son debidas, entre otros componentes del medio de cultivo, a la naturaleza de las fuentes de carbono. De ahí que para estudiar una sola variable, la fuente de carbono, sólo sean comparables los resultados obtenidos en medios equivalentes, es decir, completos con completos (YPD, YPG, YPF...), mínimos con mínimos (SD, SG, SF...), etc...

## 2.2 Influencia de la temperatura.

Se han descrito los efectos de un incremento de la temperatura sobre la fisiología celular y composición de las levaduras (Panchal y Almeida Tovares 1991). En general, a altas temperaturas (mayores que la óptima) una disminución en la tasa de crecimiento conduce a una disminución global en la biomasa, produciendo un decremento de las proteínas celulares y aminoácidos libres (Panchal y Almeida Tovares 1991). En este estudio cuando las levaduras se cultivaron a 22°, 30° y 37°C, la máxima concentración intracelular de aminoácidos se midió a 37°C (Tabla 10). Sin embargo, a 37°C, habría una buena eficiencia (altas concentraciones intracelulares de aminoácidos por célula) pero un pobre rendimiento global (bajas concentraciones intracelulares de aminoácidos por mililitro de cultivo). Cuando se considera la concentración de aminoácidos por mililitro de cultivo, los valores mayores se observaron a 22°C y al principio de la fase estacionaria para la mayoría de ellos (Fig. 20), indicando que a 22°C la tasa de recambio de aminoácidos es bastante menor, y que ésta se incrementa con la temperatura (Fig. 20 y Tabla 10). Como han indicado otros autores (Panchal y Almeida Tovares 1991), una disminución en la concentración de aminoácidos por densidad

celular reflejaría una disminución global en biomasa como consecuencia de la temperatura supraóptima.

Con respecto a los cambios en la concentración de aminoácidos a lo largo de la curva de crecimiento (Fig. 20), se observaron cambios coordinados de aminoácidos implicados en la misma ruta metabólica (Cooper 1982), posiblemente relacionados con las temperaturas óptimas de enzimas claves. Por ejemplo, a 22°C los siguientes incrementos en la concentración se correlacionaron con decrementos de aminoácidos relacionados (aumentan/decrecen): Thr/Ile, Ser/Gly, Met/Ile, Leu/Val; a 30° los siguientes aminoácidos aumentan simultáneamente Asp, Met e Ile; Ser y Gly; Glu, Arg; decrecen Ser y Gly; o aumentan/decrecen Thr/Ile, etc...

### 2.3. Influencia de la tasa de crecimiento.

Los mejores resultados desde un punto de vista aplicado se obtuvieron al estudiar el contenido interno de aminoácidos en función de la tasa de crecimiento en cultivo continuo (Fig. 23 y Tabla 14). Mientras que a tasas de dilución mayores de 0,05 h<sup>-1</sup> la concentración intracelular de aminoácidos fue independiente de la tasa de crecimiento, a valores de tasa de dilución menor de 0,05 h<sup>-1</sup> se obtuvo un considerable incremento en la concentración de todos los aminoácidos, este incremento varió entre 3 y 10 veces para una tasa de dilución de 0,018 h<sup>-1</sup>. Los resultados corresponden a los esperados para un producto parcialmente ligado al crecimiento (Pirt 1975, Aguilera y Benítez 1988). Si la concentración interna de aminoácidos hubiera estado totalmente ligada al crecimiento, el rendimiento de la concentración de aminoácidos por unidad de biomasa (Y<sub>px</sub>) hubiera sido constante a cualquier tasa de dilución (Fig. 22) (Pirt 1975, Aguilera y Benítez 1988).

### 2.4. Influencia del metabolismo (fermentativo *vs.* respiratorio).

Las diferencias observadas entre fuentes de carbono fermentables (YPD, SD) frente a respirables (YPG, SG) (Tabla 9) podrían deberse a diferentes precursores que se acumulan cuando el metabolismo es fermentativo en comparación con el respiratorio

(precursores de la glicolisis o del ciclo de ácidos tricarboxílicos) y consecuentemente los diferentes aminoácidos derivados de ellos (Cooper 1982).

La ruta de biosíntesis de aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae* y otros hongos superiores está regulada mediante diferentes mecanismos (Jones y Fink 1982, Urrestarazu *et al.* 1985), incluyendo represión por producto final y el control general de biosíntesis de aminoácidos. En contraste con la diversidad de mecanismos utilizados en levaduras para regular el flujo de aminoácidos en la célula, la producción de aminoácidos se encuentra muy relacionada con un solo parámetro como es el aporte de oxígeno al cultivo (Enei *et al.* 1989).

En esta Tesis, se ha mostrado que la concentración intracelular de aminoácidos de la estirpe industrial de *Saccharomyces cerevisiae* IFI256 varía en función del metabolismo celular, es decir, de si la célula fermenta o respira. Estos cambios se han relacionado con la disponibilidad de los precursores de aminoácidos (Ciriacy y Breitenbach 1979, Denis *et al.* 1981, Jones y Fink 1982) de forma que cuando la célula respira se produce un decremento en casi todos los aminoácidos derivados de intermediarios de la ruta glicolítica (Torrontegui *et al.* 1966, Torrontegui *et al.* 1968). Este efecto no se observó en aquellos cuyos precursores son intermediarios del ciclo de ácidos tricarboxílicos (Tabla 11).

Los aminoácidos producidos por *Brevibacterium* se han clasificado en tres grupos: el primer grupo (que incluye Glu, Gln, Arg y Pro) mostró una producción máxima cuando la oxigenación también fue máxima, esta acumulación fue fuertemente inhibida en situaciones de limitación de oxígeno (Enei *et al.* 1989); es necesario apuntar que Arg, Gln, Pro y Glu son aminoácidos cuyos precursores son intermediarios del ciclo de ácidos tricarboxílicos (Cooper 1982, y Fig. 1). Un segundo grupo (Lys, Ile y Thr), cuya biosíntesis decrece sólo ligeramente con la escasez de oxígeno, y un tercer grupo, donde la formación de producto se inhibió en presencia de oxígeno y la acumulación fue máxima cuando la respiración se inhibió por la limitación del oxígeno (Enei *et al.* 1989). De acuerdo con nuestros resultados, la producción máxima de estos aminoácidos no sintetizados a través del ciclo de ácidos tricarboxílicos, tuvo lugar cuando se inhibió la degradación aeróbica de glucosa y se

suministró fosfoenolpiruvato (ver Fig. 1) bajo condiciones limitantes de oxígeno (Enei *et al.* 1989, Torrontegui *et al.* 1966, Torrontegui *et al.* 1968). Sin embargo, aunque la falta de metabolismo respiratorio favorece la acumulación de aminoácidos derivados de la glicólisis, los resultados obtenidos desaconsejan la utilización de p.e. "petites" con este propósito.

Las levaduras parecen obtener un beneficio de la aerobiosis cuando crecen en medios con azúcares fermentables (Lagunas 1976). En esta Tesis se ha observado que la respiración representa una importante contribución a la tasa de crecimiento de las células y al rendimiento producto/biomasa,  $Y_{px}$  (Tablas 14 y 15). Aunque sólo el 3-5% de la glucosa total es utilizada en respiración en las estirpes "grandes" (Aguilera y Benítez 1988), se reflejó en un considerable incremento de la tasa de crecimiento (Aguilera y Benítez 1989). Estas diferencias entre ambas estirpes se reflejaron en los rendimientos sustrato/biomasa,  $Y_{sx}$ , y producto/biomasa,  $Y_{px}$ , que fueron mayor ( $Y_{sx}$ ) y menor ( $Y_{px}$ ) respectivamente en la estirpe "petite" que en la "grande", en cualquiera de las condiciones utilizadas (Tablas 14 y 15, y Fig. 24).

Se llevaron a cabo estudios del rendimiento sustrato/biomasa,  $Y_{sx}$ , en ambas estirpes a 22°, 30° y 37°C para ver si tales diferencias se mantenían a otras temperaturas distintas de 30°C. En la estirpe "grande" al principio de la fase exponencial (densidad celular de  $10^6$  células/ml)  $Y_{sx}$  alcanzó un plateau, cuyos valores fueron casi idénticos a las tres temperaturas (16,9, 17,2 y 17,4 nmoles de glucosa/ $10^7$  células a 22°, 30° y 37°C respectivamente). Sin embargo, en la estirpe "petite"  $Y_{sx}$  crece de forma continua durante las diferentes fases de crecimiento. Además,  $Y_{sx}$  aumenta con la temperatura, de forma que los mayores valores se obtuvieron a 37°C (19, 22, y 22,5 nmoles de glucosa/ $10^7$  células a 22°, 30° y 37°C respectivamente) a densidades celulares similares (Fig. 26).

Se ha propuesto que la mitocondria está implicada en la supervivencia bajo condiciones extremas de altas concentraciones de etanol y temperatura (Aguilera y Benítez 1989). Las estirpes de levadura que poseen mitocondrias funcionales muestran mayor viabilidad a altas temperaturas que las estirpes "petites" (Aguilera y Benítez 1989). Esto significa que en las estirpes "petites" la energía generada por el catabolismo es sólo parcialmente usada

para la síntesis de aminoácidos y otros materiales celulares, y la mayoría de esta es necesaria para el mantenimiento, lo que incluye metabolismo endógeno y pérdida debida a la mortalidad celular. El hecho de que la viabilidad decrezca al aumentar la temperatura (Aguilera y Benítez 1989), podría explicar, además de las diferencias observadas en el rendimiento producto/biomasa,  $Y_{px}$ , (Tablas 14 y 15), las diferencias detectadas a 22°, 30° y 37°C entre las estirpes "petite" y "grande".

### **2.5. Influencia de la fase de crecimiento (exponencial vs. estacionaria).**

Cuando las células entraron en fase estacionaria, se observó un mayor decremento en la concentración de aminoácidos en la estirpe "petite" que en la "grande" creciendo en fuentes de carbono fermentables y, sobre todo que en la estirpe "grande" creciendo en fuentes de carbono respirables (Tabla 13 y Fig. 21). Esta disminución en la concentración de aminoácidos podría estar relacionada con la síntesis de nuevos componentes celulares o fuentes de energía necesarias en fase estacionaria a expensas del contenido interno de aminoácidos (Jones y Fink 1982). De todas formas, la disminución observada sea cual sea el medio (SD, SG) o la estirpe utilizada (IFI256, IFI256P), está más relacionada con el cambio de fase de crecimiento, es decir, con la entrada en fase estacionaria que con otros factores experimentales.

## **3. AISLAMIENTO DE MUTANTES RESISTENTES A ANALOGOS TOXICOS DE AMINOACIDOS Y SU CARACTERIZACION.**

### **3.1. Acumulación de aminoácidos e intermediarios en presencia de metionina, treonina, etionina e hidroxinorvalina.**

La acumulación de intermediarios de la ruta de síntesis tras la adición al medio de metionina o treonina puede informarnos a cerca de los puntos de regulación existentes. La acumulación de homoserina, homocisteína y S-adenosil-metionina, pero no de



treonina, isoleucina o aspártico en el caso de la adición de metionina al medio de cultivo, nos está indicando una fuerte regulación sobre la homoserina O-acetil-transferasa, homoserina quinasa, homocisteína metil transferasa y S-adenosil-metionina sintetasa. La adición de etionina al medio de cultivo, produjo consecuencias atribuibles a controles sobre las mismas enzimas que al añadir metionina, salvo el efecto producido sobre la homoserina quinasa.

De igual forma, la acumulación de grandes concentraciones de treonina tras la adición de esta al medio de cultivo, sin la acumulación de homoserina o aspártico, está indicando regulación a nivel de aspartato quinasa y homoserina quinasa. Los resultados obtenidos con la adición de hidroxinorvalina al medio de cultivo señalan a la aspartato quinasa como la primera responsable de la regulación de la ruta de síntesis de treonina y metionina.

### **3.2. Multiplicidad y direccionalidad de las mutaciones obtenidas en cultivo continuo o discontinuo en presencia de análogos de aminoácidos.**

La regulación de la biosíntesis de aminoácidos se puede investigar mediante el uso de análogos de aminoácidos que permiten seleccionar mutantes con alteraciones en la regulación de dicha síntesis (Arfin y Gantt 1983). Además, el aislamiento de mutantes resistentes a análogos tóxicos es un método extremadamente útil a la hora de aislar superproductores de aminoácidos (Alix 1982). La similaridad de los análogos con los aminoácidos naturales les permite interferir con un gran número de procesos biosintéticos y reguladores (Fujioka y Nakatani 1970). En consecuencia, la resistencia a estos análogos puede darse de múltiples formas y por lo tanto se pueden aislar diferentes tipos de mutantes (Arfin y Gantt 1983). Quizás, debido a la inespecificidad de los efectos, un gran número de estos mutantes resistentes a análogos suelen ser estirpes mórbidas (Nass y Poralla 1976, Seibold *et al.* 1981). La selección de mutantes capaces de resistir altas concentraciones del análogo y posiblemente superproductores de un aminoácido en particular por acumulación de todas las mutaciones posibles, y que al mismo tiempo su tasa de crecimiento sea similar a

la de la estirpe silvestre, es extremadamente difícil y requiere técnicas de selección a largo plazo en cultivo continuo (Jiménez y Benítez 1988a).

Se sabe que en la tolerancia a etanol están implicados un gran número de genes (Ismail y Ali 1971). El método descrito para seleccionar levaduras tolerantes al etanol en cultivo continuo controlado por pH (Jiménez y Benítez 1988a) se aplicó para la selección de mutantes resistentes a altas concentraciones de etionina. El método se mostró eficaz tanto para el etanol como en este caso para la etionina (Tablas 20 y 21), y seguramente para cualquier compuesto tóxico que se utilice. Se aislaron mutantes resistentes a elevadas concentraciones de etionina, acumulando hasta 150 veces más metionina que el silvestre (Tabla 21) y creciendo a tasas de crecimiento similares o incluso mayores a las del silvestre (Tabla 20). Por lo tanto el cultivo continuo controlado por pH es un método preciso para el estudio de la cinética de inhibición del crecimiento por cualquier compuesto tóxico y un sistema de selección a largo plazo en presencia del inhibidor siempre que la resistencia al mismo este controlada por un gran número de genes (Arfin y Gantt 1983; Ismail y Ali 1971).

El método selectivo de aislamiento de mutantes resistentes a etionina con tasas rápidas de crecimiento, en cultivo continuo con concentraciones crecientes de etionina, parece imponer una presión selectiva fuerte y específica, a fin de mantener la máxima tasa de crecimiento en presencia del inhibidor. De esta forma se acumulan en un corto periodo de tiempo un número considerable de mutaciones (Martínez-Force y Benítez 1992). La etionina se ha descrito como un agente mutagénico (Alix 1982), pero el hecho de ser un análogo de aminoácido introduce una selección direccional en favor de aquellos mutantes capaces de superar sus efectos tóxicos, ya sea por superproducción de metionina o por insensibilidad o pérdida de afinidad por el análogo de aquellas proteínas implicadas en el metabolismo de la metionina.

De hecho, cuando se aisló el primer mutante (ETHCC1) (Martínez-Force y Benítez 1992) y posteriormente se caracterizó, ya mostraba alteraciones en las propiedades cinéticas de la aspartato quinasa (Tabla 22), homoserina deshidrogenasa (Tabla 23), homoserina quinasa (Tabla 24) y S-adenosil-metionina sintetasa

(Tabla 26). Además, cuando se estudiaron las actividades específicas, los resultados de la aspartato quinasa y homoserina deshidrogenasa indicaron alteración del patrón de síntesis de las enzimas. Estos resultados sugieren que junto con mutaciones en los genes estructurales de estas enzimas, genes reguladores (se conoce que una mutación en la sintetasa del ARNt-treonina produce la desrepresión de los genes *HOM2*, *HOM3* y *THR1*) o las regiones reguladoras de los genes estructurales (Mannhaupt *et al.* 1990a) también han sido afectadas. Con respecto a la homoserina quinasa el aumento en actividad puede ser debido a la elevada concentración de metionina en este mutante, diez veces la del silvestre aproximadamente, ya que se ha descrito que en presencia de altas concentraciones de metionina se incrementa la síntesis de esta enzima (Mountain *et al.* 1991).

Cuando se caracterizó el resto de los mutantes obtenidos en cultivo continuo (ETHCC2 a ETHCC8), la mayoría de ellos también mostraron alteraciones tanto de las propiedades cinéticas como del patrón de síntesis de las cuatro enzimas determinadas (aspartato quinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina quinasa y S-adenosil-metionina sintetasa; Tablas 23-26). Hay que tener en cuenta que los aislamientos de los mutantes fueron independientes unos de otros. El cultivo era probablemente una población mezcla de varios mutantes cuya única característica en común fue la de ser capaces de crecer a la tasa máxima de crecimiento en medio mínimo y en presencia del inhibidor, y no una población formada por un sólo mutante y todos sus descendientes. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que en todos los mutantes, las cuatro enzimas estaban alteradas de forma diferente (Tablas 22-26), lo que además argumenta a favor de una direccionalidad en el proceso selectivo. De todas formas la posibilidad de que el número de mutaciones sea menor, de que éstas sean comunes a muchos de los mutantes y que muchos de los datos obtenidos se deban a efectos pleiotrópicos no puede descartarse hasta que no se lleve a cabo el análisis genético de los mutantes.

En cultivo discontinuo se han seleccionado, como resistentes a hidroxinorvalina, mutantes de levaduras de crecimiento lento que producen entre 15 y 30 veces más treonina que la estirpe silvestre. El análisis genético de estos mutantes reveló que la superproducción

de treonina estaba asociada a la presencia de una sola mutación, una aspartato quinasa insensible a retroinhibición por treonina (Ramos y Calderón 1992). En este trabajo, del aislamiento de mutantes resistentes a hidroxinorvalina a partir de otros resistentes a etionina obtenidos en cultivo continuo (Fig. 29) se obtuvieron estirpes capaces de producir hasta 40 veces más treonina que la estirpe silvestre (Tabla 21) (Martínez-Force y Benítez 1992). Estos resultados indican que aunque el aislamiento de mutantes capaces de superproducir altas concentraciones de un aminoácido dado requiere una selección en cultivo continuo, la presencia de una paso limitante (en este caso nuestros resultados y los anteriormente obtenidos por Ramos y colaboradores apuntan a la aspartato quinasa como la enzima clave en la regulación de la biosíntesis de treonina en levaduras (Ramos y Calderón 1992)) podría permitir la selección en cultivo discontinuo de mutantes capaces de producir aminoácidos en concentraciones tan altas como las de los mutantes aislados en cultivo continuo, aunque sin la garantía de que crezcan a la misma velocidad que la cepa silvestre.

La superproducción de aminoácidos requiere frecuentemente mutaciones recesivas (Thomas *et al.* 1988) no observables en estirpes poliploides a no ser en homocigosis. IFI256 es una estirpe industrial altamente fermentativa (Jiménez y Benítez 1988b) de ploidía desconocida pero probablemente poliploide (aneuploide) y apomítica (ver primer apartado de resultados). El método de selección descrito junto con las propiedades del análogo empleado (se ha descrito que la etionina aumenta la frecuencia de recombinación) (Zimmermann *et al.* 1984) parecen imponer tal presión selectiva que permite que las mutaciones recesivas lleguen a estar en homocigosis, y por lo tanto expresarse fenotípicamente. Por ejemplo, el mutante ETHCC1, que acumula metionina pero tiene niveles muy bajos de S-adenosil-metionina, parece haber perdido uno de los productos de los genes *SAM1* y *SAM2* (nuestros resultados sugieren que el producto de *SAM2*), que codifican para las S-adenosil-metionina sintetasas en levaduras. De forma similar también se detectan niveles bajos de S-adenosil-metionina en los mutantes ETHCC2, ETHCC3, ETHCC4 y ETHCC5. Conociendo las características de la cepa silvestre, esta deficiencia sólo puede

observarse fenotípicamente si la mutación se encuentra en homocigosis.

### **3.3. Papel de la aspartato quinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina quinasa y S-adenosil-metionina sintetasa en la regulación de los niveles de metionina y treonina.**

La alteración de las propiedades cinéticas y/o del patrón de síntesis de la aspartato quinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina quinasa y S-adenosil-metionina sintetasa en los mutantes derivados de la estirpe IFI256 se tradujo en la acumulación de aspartato, homoserina, treonina y/o metionina/S-adenosil-metionina (Tabla 21). El aislamiento de mutantes superproductores de metionina o treonina con una aspartato quinasa insensible a retroinhibición por treonina apoya la idea de que la aspartato quinasa no solo sea la enzima clave en la regulación de la biosíntesis de treonina en levaduras (Ramos y Calderón 1992) sino de todos los aminoácidos de esa ruta. De forma similar, la biosíntesis de aminoácidos pertenecientes a la familia del aspartato en *Corynebacterium glutamicum* es regulada fundamentalmente por una retroinhibición concertada de la enzima aspartato quinasa por los productos finales lisina y treonina (Kalinowski *et al.* 1991). Además, mutantes de *C. glutamicum* que superproducen lisina y son resistentes al análogo de lisina S-amino-etil-L-cisteína tienen una aspartato quinasa que es resistente a la retroinhibición por lisina y treonina. Las tablas 21 y 22 de esta tesis muestran incrementos paralelos en la actividad específica de la aspartato quinasa y en las concentraciones de metionina y treonina en los mutantes. Los mutantes ETHCC7 y HNVBC5 que producen 32,6 mM de metionina y 214 mM de treonina respectivamente (las concentraciones máximas de estos aminoácidos), presentan las menores inhibiciones de la aspartato quinasa por treonina. Esto apoya el papel clave asignado a la aspartato quinasa en la regulación de la ruta biosintética de estos aminoácidos.

En *Brevibacterium flavum*, la resistencia de mutantes a hidroxinorvalina así como la superproducción de treonina en los mutantes son debidas a la perdida de retroinhibición en una

homoserina deshidrogenasa mutante. Esto apoya anteriores hipótesis de que la homoserina deshidrogenasa es el principal punto de control en la biosíntesis de treonina en esta bacteria (Shiio *et al.* 1970). Sin embargo, en este estudio la actividad específica homoserina deshidrogenasa fue muy similar a la del silvestre en la mayoría de los mutantes (Tabla 23) independientemente de los cambios observados en las concentraciones de aminoácidos (Tabla 21), lo que indica que esta enzima no parece jugar un papel preponderante en la regulación de la ruta biosintética.

Respecto a la homoserina quinasa, a partir de experimentos sobre la sensibilidad de la enzima a la homoserina, treonina y análogos de treonina se concluyó que esta actividad enzimática en *Saccharomyces cerevisiae* se veía poco afectada y que por lo tanto la homoserina quinasa no jugaba un papel importante en la regulación de la biosíntesis de treonina, al menos, a nivel de actividad enzimática (Ramos *et al.* 1991). En este estudio, sin embargo, se ha observado en los mutantes (Tabla 24) que existen variaciones en la actividad específica de esta enzima, junto con una disminución en la inhibición por treonina cuando se comparó con la estirpe silvestre. Además, la actividad en los mutantes se inhibió hasta un 67% (Tabla 24), lo que sugiere un importante papel de esta enzima en la regulación de la síntesis de metionina y treonina. Como ejemplo, el mutante ETHCC8, acumula homoserina cuando crece en medio mínimo suplementado con etionina 50 mM (Fig. 36) debido a la inhibición de la homoserina quinasa por el análogo de metionina. En medio mínimo sin etionina (Tabla 24 y Fig. 36), la homoserina quinasa de este mutante cataboliza la homoserina, incrementando la concentración de treonina.

A partir del trabajo de Thomas *et al.* (1988) que utilizaba estirpes con mutaciones en uno u otro o en ambos genes que codifican para la S-adenosil-metionina sintetasa (*SAM1* y *SAM2*) se concluyó que la S-adenosil-metionina y no su precursor metionina estaba implicada en la represión de los genes *MET* (Mountain *et al.* 1991). Por lo tanto, la metionina reprime los genes *MET* al ser convertida en S-adenosil-metionina por las enzimas codificadas por *SAM1* y *SAM2* (Cherest y Surdin-Kerjan 1981, Cherest *et al.* 1978). Las estirpes mutadas en los genes *SAM1* o *SAM2* son resistentes a etionina. Se ha sugerido que la etionina se une al producto del gen

*SAM1* reduciendo por tanto la síntesis de S-adenosil-metionina (Thomas y Surdin-Kerjan 1991). Se ha descrito que los mutantes resistentes a etionina poseen altos niveles de los productos de los genes *MET* (Thomas y Surdin-Kerjan 1991), probablemente debido a su reducida capacidad de sintetizar S-adenosil-metionina.

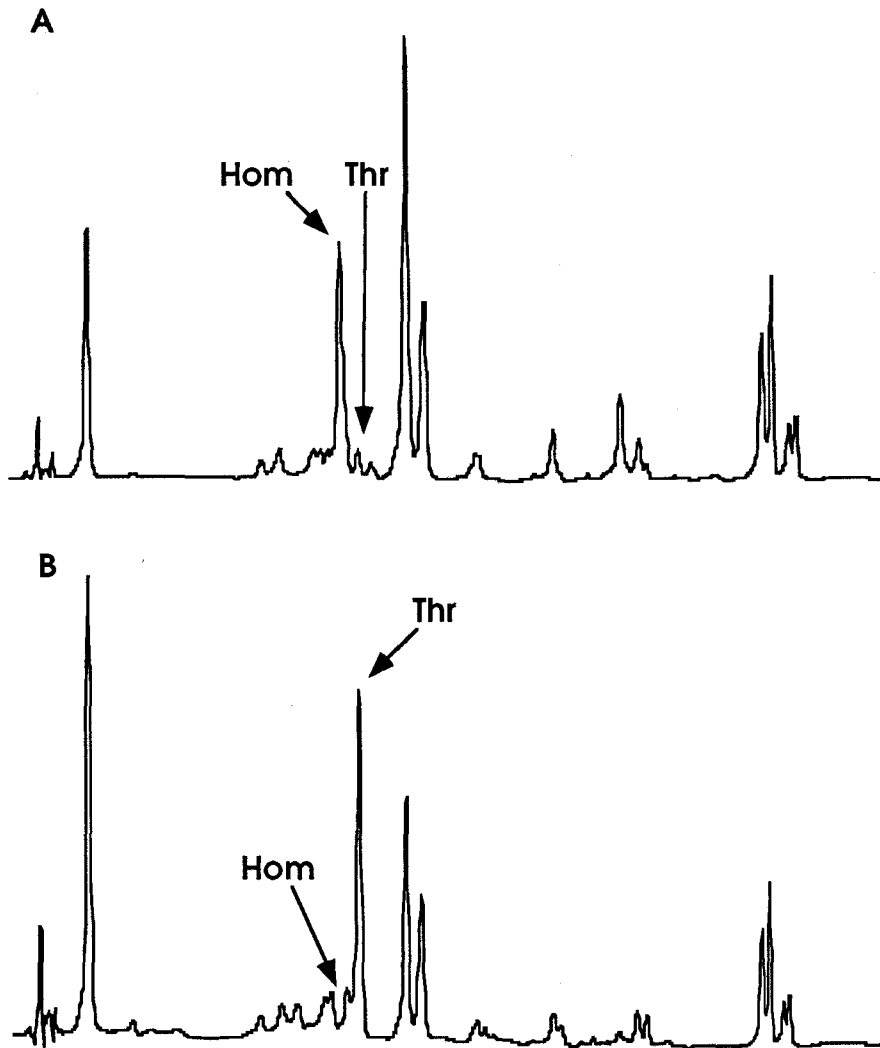


Figura 36. Cromatogramas del contenido interno de aminoácidos de la estirpe mutante ETHCC8 cultivada en medio mínimo con (A) o sin (B) etionina 50 mM. Las flechas indican los picos de homoserina y treonina.

De acuerdo con estos resultados, la mayoría de los mutantes aislados resistentes a etionina acumulan metionina (Tabla 21) y poseen niveles menores de S-adenosil-metionina sintetasa que la estirpe silvestre (con la excepción de los mutantes ETHCC7 y ETHCC8). Además nuestros resultados indican que mientras el producto del gen *SAM1* es incapaz de catabolizar etionina en lugar de metionina y se inhibe por etionina, el producto del gen *SAM2* es capaz de catabolizar la etionina en S-adenosil-etionina y por lo tanto no se inhibe en presencia de etionina (Tabla 26 y Fig. 35). El hecho de que los mutantes aislados resistentes a etionina parecen estar afectados principalmente en el producto del gen *SAM2* podría indicar que la S-adenosil-etionina es más tóxica para la célula que la propia etionina. La acumulación de diferentes mutaciones durante el experimento en cultivo continuo puede ser la razón por la que los productos de los genes *SAM1* y *SAM2* alteren su afinidad o inhibición por etionina, lo que explicaría el incremento de concentración de S-adenosil-metionina en los mutantes ETHCC7 y ETHCC8.

Como puede observarse en la Tabla 21, la concentración de S-adenosil-metionina en las células es menos variable que la de metionina. La razón podría ser que a concentraciones menores de un 30% de la del silvestre la cepa llegaría a ser auxótrofa para S-adenosil-metionina y por lo tanto se habría perdido en el proceso de selección que tuvo lugar en medio mínimo. Por otra parte, concentraciones superiores a 5 o 6 veces las del silvestre son probablemente letales para las células, debido a la superrepresión de los genes *MET* (Mountain *et al.* 1991) y a un exceso en la formación de poliaminas (Thomas *et al.* 1989). La pérdida de relación entre la actividad S-adenosil-metionina sintetasa y la concentración de S-adenosil-metionina podría ser debida a otras mutaciones no detectadas tales como aquellas que puedan afectar a enzimas implicados en la degradación de S-adenosil-metionina.

### 3.4. Regulación de la síntesis enzimática frente a la regulación de la actividad enzimática.

En levaduras, la regulación de la actividad enzimática juega un papel esencial en el establecimiento del flujo a través de una ruta



de síntesis. Una mutación en el gen *HIS1* hace a la enzima que codifica resistente a la retroinhibición por histidina, aumentando en estas células la concentración de histidina hasta 17 veces en comparación con la cepa silvestre, mientras que en un mutante desregulado en la síntesis de la enzima el contenido en histidina sólo se incrementa 2 o 3 veces (Messenguy 1987).

Además, se ha descrito que mientras el crecimiento en presencia de un análogo de aminoácido o en ausencia de un determinado aminoácido conduce a la célula a la activación de la transcripción de los genes pertenecientes a rutas de aminoácidos, principalmente los básicos y aromáticos (Messenguy 1987), no se observa ningún incremento en el ARNm de la aspartato quinasa bajo condiciones no represivas del control general de aminoácidos (Rafalski y Falco 1988). Cuando se han estudiado las respuestas transcripcionales de estas enzimas (Mountain *et al.* 1991), se ha observado una ligera estimulación por metionina pero no por treonina en la aspartato quinasa y homoserina quinasa, junto con una ausencia de respuesta en la transcripción de la homoserina deshidrogenasa.

Sin embargo, en este estudio las actividades específicas de la aspartato quinasa y homoserina quinasa fueron mayores en la mayoría de los mutantes superproductores de aminoácidos que en la estirpe silvestre. Considerando el incremento en los valores de  $K_m$  de estas enzimas, se puede concluir que la síntesis de la enzima ha sido fuertemente alterada en estos mutantes, conduciendo a un incremento en la producción de la enzima. Apoyando este punto de vista, todos los mutantes resistentes a etionina presentaron propiedades cinéticas de las S-adenosil-metionina sintetasas similares, mientras que la actividad específica varió 800 veces entre el mutante ETHCC1 (0,05 U/g) y ETHCC8 (40 U/g). Este incremento en la síntesis enzimática junto con la pérdida o reducción de la inhibición por treonina y/o metionina explica las concentraciones de aminoácidos alcanzadas por algunos mutantes (Tabla 21) y su capacidad para tolerar concentraciones del análogo tóxico (hasta 50 mM de etionina).

### 3.5. Posible alteración de la configuración de los enzimas.

Las aspartato quinasas mutantes parecen estar afectadas al menos en su sitio activo, a juzgar por los cambios de afinidad para el aspartato y la treonina. El aumento de afinidad por la metionina como inhibidor es un efecto inespecífico y posiblemente relacionado con los cambios en la estructura de la enzima antes mencionados (Tabla 22). La inhibición alostérica por treonina de la aspartato quinasa ha sido anteriormente descrita en levaduras (de Robichon-Szulmajster y Corrivaux 1963) y mutantes superproductores de treonina previamente analizados mostraron aspartato quinasas insensibles a treonina, de forma que la regulación de esta ruta tiene lugar principalmente a nivel de actividad enzimática (Ramos y Calderón 1992).

La alteración de la afinidad tanto para la homoserina como para el  $\text{NAD}^+$  mostrada por las homoserina deshidrogenasas mutantes, sugieren la modificación del sitio activo. En la estirpe silvestre, la metionina inhibe competitivamente la homoserina deshidrogenasa, mientras que la treonina no afectó la actividad de la enzima a diferencia de lo descrito en otros organismos (indicando la importancia del fondo genético de la cepa a partir de la cual se aíslan los mutantes) (Shiio *et al.* 1970). En bacterias la homoserina deshidrogenasa también es susceptible a la represión por metionina (Shames y Wedler 1984). Los mutantes superproductores de treonina en bacterias presentan homoserina deshidrogenasas insensibles a los inhibidores alostéricos treonina y su análogo hidroxinorvalina, y además son más estables en ausencia de protectores tales como la treonina. Además, se ha descrito que la inhibición de la homoserina deshidrogenasa por treonina es debida a la interacción indirecta causada por la unión de la treonina a un sitio alostérico del enzima, que simultáneamente incrementa la estabilidad de la enzima (Shiio *et al.* 1970). De manera similar, en este estudio la conformación de la homoserina deshidrogenasa podría haber sido genéticamente alterada en los mutantes, no sólo para incrementar la estabilidad de la enzima, sino también para hacerla insensible a la inhibición por treonina, lo que explicaría la actividad específica observada.

Se ha sugerido que la homoserina y la treonina compiten por el mismo sitio de unión en la homoserina quinasa ya que algunos

aminoácidos y análogos que son similares a la homoserina y a la treonina son también inhibidores de la enzima (Burr *et al.* 1976). La homoserina es un intermediario en la ruta biosintética que produce metionina y treonina, y su concentración intracelular en la estirpe silvestre es extremadamente baja, por debajo de los límites de detección (Tabla 21). Como consecuencia, las concentraciones fisiológicas de treonina pueden regular la actividad de la homoserina quinasa por inhibición competitiva, de forma que no es necesario recurrir a un sitio de unión alostérico en la enzima.

Sin embargo, los datos experimentales apoyan la existencia de dos sitios, uno activo y otro regulador en la homoserina quinasa (Fig. 34). La pérdida de afinidad de la enzima y el incremento de la inhibición por homoserina en los mutantes indican la alteración de ambos sitios (Tabla 25). Además, la treonina inhibe competitivamente a la enzima en la estirpe silvestre, mientras que la inhibición observada por metionina fue de tipo acompetitivo. La pérdida de afinidad por treonina en algunos de los mutantes también sugiere que el sitio activo se encuentra afectado, mientras que la alteración del sitio regulador es corroborada con la inhibición por metionina que muestran algunos de los mutantes. De forma similar, los datos cinéticos en bacterias se ajustan a un modelo de dos sitios para la homoserina quinasa con un sitio catalítico y otro regulador. En el modelo, la inhibición de la enzima por sustrato no tiene significado fisiológico ya que la concentración de homoserina fue 10 veces menor que la constante de inhibición determinada (Shames y Wedler 1984).

#### **4. MUTANTES AFECTADOS EN LA DEGRADACION DE TREONINA: RELACION ENTRE ÉSTA Y LA ACUMULACION DE TREONINA.**

Una parte importante de la degradación de treonina es llevada a cabo por el producto del gen *ILV1* (treonina desaminasa anabólica), primer enzima de la ruta de síntesis de isoleucina (Kakar y Wagner 1964). Un mutante carente de dicha actividad es auxótrofo para la isoleucina, pero en un medio con treonina o serina como fuente de nitrógeno es capaz de crecer debido a la inducción del gen *CHA* (L-serina/L-treonina desaminasa catabólica) (Ramos y Wiame 1982). Estudios iniciales indicaron que el gen *CHA* no es

capaz de inducirse en presencia de amonio como fuente de nitrógeno, sin embargo, nuestros datos de inducción en medio rico en un mutante *ilv1* o la transcripción de este en un mutante superproductor de treonina creciendo en medios con amonio (C. Bornaes comunicación personal) indican que el gen *CHA* es capaz de inducirse siempre que haya altas concentraciones de serina o de treonina. Cuando en esta Tesis se estudió el contenido interno de aminoácidos de mutantes afectados en el gen *ILV1*, en *CHA* o en ambos, la mayor concentración de treonina (tres veces la del silvestre) se encontró en el doble mutante (Tabla 27). Probablemente la gran concentración de serina detectada en este doble mutante fue la causante de la inducción de *CHA* en el mutante *ilv1*. Esta, junto con la alta concentración de alanina y valina detectadas indican una gran acumulación de piruvato en el doble mutante.

La similaridad en cuanto a concentración de aminoácidos entre el medio completo (YPD) y los medios semi-industriales (M, MA, MB y MAB) haría posible la utilización del doble mutante *ilv1 cha* para la obtención de biomasa enriquecida en treonina. Para comprobar esta posibilidad se estudió la tasa de crecimiento en los diferentes medios. Como puede observarse en la tabla 28, la tasa de crecimiento de esta cepa se redujo entre 3 y 8 veces al utilizar los medios semi-industriales. Las tasas obtenidas no tienen utilidad industrial; sin embargo, la obtención de este tipo de mutantes a partir de cepas industriales como la silvestre IFI256 podría resultar industrialmente beneficioso. De todas formas, un aumento de sólo tres veces la concentración de treonina no representa nada frente a las concentraciones obtenidas, por ejemplo, con el mutante HNVBC5. Serían necesarias mutaciones adicionales que incrementen el contenido interno de treonina para que estas fueran industrialmente útiles.

Asimismo, los datos obtenidos de los enzimas que degradan treonina en los mutantes superproductores indican que la falta de degradación no está implicada en la superproducción observada, corroborando datos obtenidos por otros autores en los que no solo no se reducía la degradación de treonina en los mutantes obtenidos, sino que también aumentaba la concentración de isoleucina (Ramos y Calderón 1992).

## **CONCLUSIONES**

- 1.- Se ha desarrollado un método sensible, reproducible y rápido para medir el contenido intracelular o extracelular de aminoácidos en levaduras, mediante derivatización con OPA y separación en HPLC.
- 2.- Se ha desarrollado un método para ensayar la actividad S-adenosil-metionina sintetasa de un extracto crudo basado en la medida de la producción de S-adenosil-metionina a partir de metionina, mediante cromatografía líquida de alta resolución.
- 3.- El contenido interno de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* varía enormemente con las condiciones de cultivo, la fase de crecimiento, la temperatura, el pH, etc. Al definir el contenido intracelular de aminoácidos de una cepa habría que definir en que condiciones se ha llevado a cabo el experimento, dada las variaciones observadas.
- 4.- Gran parte del contenido interno de aminoácidos de las levaduras cultivadas en medios completos procede de los aminoácidos presentes en el medio de cultivo, aunque en presencia de una buena fuente de nitrógeno no se incorporan en la célula hasta que se agota la fuente de carbono.
- 5.- Las variaciones en la concentración interna de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* a lo largo de la curva de crecimiento son mucho mayores a 37°C que a otras temperaturas. Para algunos aminoácidos esta variación fue de hasta 80 veces.
- 6.- El contenido intracelular de aminoácidos varía en función de que las células fermenten o respiren. Cuando respiran, decrecen casi todos los aminoácidos derivados de intermediarios de la glicólisis pero no los aminoácidos derivados de intermediarios del ciclo de Krebs. Cuando las células presentan un metabolismo fermentativo se observa el efecto contrario.
- 7.- La entrada en fase estacionaria de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* provoca un descenso generalizado en el contenido intracelular de aminoácidos, estando íntimamente relacionado con el estado energético de la célula.

8.- El contenido intracelular de aminoácidos está parcialmente ligado al crecimiento, incrementándose globalmente entre 3 y 10 veces al disminuir la tasa de crecimiento por debajo de  $0,05 \text{ h}^{-1}$ .

9.- Se han obtenido mutantes resistentes a etionina mediante selección en cultivo continuo que acumulan hasta 200 veces más metionina que la cepa silvestre y presentan tasas de crecimiento similares a la de esta cepa.

10.- A partir de mutantes resistentes a etionina se han obtenido por selección en cultivo discontinuo mutantes resistentes a hidroxinorvalina que acumulan hasta 40 veces más treonina que la cepa silvestre.

11.- El método de selección utilizado produjo cambios tanto en los parámetros cinéticos como en la síntesis de al menos las enzimas aspartato quinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina quinasa y S-adenosil-metionina sintetasa.

12.- Los datos cinéticos y de inhibición por treonina de la homoserina quinasa se ajustan a un modelo cinético de dos sitios, uno activo y otro regulador, descartando la inhibición de la enzima por un complejo homoserina-ADP.

13.- Mientras que el producto del gen *SAM1* de *Saccharomyces cerevisiae* es inhibido por etionina, análogo tóxico de metionina, el producto del gen *SAM2* es el responsable de la formación de S-adenosil-etionina a partir de etionina.

14.- La acumulación de aminoácidos observada al añadir metionina, treonina o sus análogos, junto con la correlación en los mutantes de la pérdida de inhibición de la aspartato quinasa y de la homoserina quinasa por treonina con la superproducción, apoyan el papel clave de la aspartato quinasa en la regulación de la ruta de síntesis de metionina y treonina. La homoserina quinasa sería un segundo punto de regulación en esta ruta.

## **BIBLIOGRAFIA**



- Aas, S. F. y Rognes, S. E. (1990) Nucleotide sequence of the yeast *THR4* gene encoding threonine synthase. *Nucleic Acids Res.* **18**: 665.
- Adler, L. y Gustafsson, L. (1980) Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* **124**: 123-130.
- Aguilera, A. y Benítez, T. (1988) Relationship between growth, fermentation and respiration rates in *Saccharomyces cerevisiae*: a study based on the analysis of the yield Y<sub>px</sub>. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 240-244.
- Aguilera, A. y Benítez, T. (1989) Synergistic effects of ethanol and temperature on yeast mitochondria. *Curr. Microbiol.* **18**: 179-188.
- Aida, K. (1986) An overview of the microbial production of amino acids. En: *Progress in Industrial Microbiology: Biotechnology of Amino Acid production*. (Aida, K., Chibata, I., Nakayama, K., Takinami, K. y Yamada, H., eds.) vol. 24, pp XXI-XXV. Kodansha Ltd. & Elsevier.
- Alix, J.-H. (1982) Molecular aspects of the in vivo and in vitro effects of ethionine, an analog of methionine. *Microbiol. Rev.* **46**: 281-295.
- Araki, K. (1990) Production of amino acids. En: *Nutrition: proteins and amino acids* (Yoshida *et al.*, eds.), pp 303-321. Japan Scientific Societies Press and Springer-Verlag.
- Arfin, S.M. y Gantt, J. S. (1983) Amino acids analogs as tools for the study of amino acid metabolism in mammalian cells. *TIBS* **3**: 163-164.
- Bhattacharjee, J. K. (1983). The lysine biosynthesis in eukaryotes. En: *Amino Acids Biosynthesis and Genetic Regulation*. (Herrmann, K. M. y Somerville, R. L. eds.). Addison-Wesley Publishing Company, Inc. U.S.A., pp 229-244.
- Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., y Tarvin, T. L. (1984) Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chrom.* **336**: 93-104.
- Bilinski, C. A. y Miller, J. J. (1980) Induction of normal ascosporeogenesis in two-spored *Saccharomyces cerevisiae* by glucose, acetate and zinc. *J. Bacteriol.* **143**: 343-348.
- Bilinski, C. A., Miller, J. J. y Girvitz, S. C. (1983) Events associated with restoration by zinc of meiosis in apomictic *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **155**: 1178-1184.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bryan, J. K. (1980) Synthesis of the aspartate family and branched-chain amino acids. En *The Biochemistry of plants a comprehensive treatise. Vol. 5: Amino acids and derivatives*. (Stumpf, P. K. y Conn, E. E., eds.), pp 430-460.
- Bui, K. y Galzy, P. 1990. Food yeast. En *Yeast Technology* (Spencer, J. F. T. y Spencer, D. N., eds.), pp 241-264. Springer-Verlag, N.Y.

- Burr, B., Walker, J., Truffa-Bachi, P. y Cohen, G. N. (1976) Homoserine kinase from *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **62**: 519-526
- Carlomagno, L., Huebner, V. D. y Matthews, R. H. (1985) Rapid separation of phosphoamino acids including the phosphohistidines by isocratic high-performance liquid chromatography of the orthophthalaldehyde derivatives. *Anal. Biochem.* **149**: 344-348.
- Casey, G. P. y Ingledew, W. M. (1986) Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **13**: 219-280.
- Cherest, H., Eichler, F. y de Robichon-Szulmajster (1969) Genetic and regulatory aspects of methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **97**: 328-336.
- Cherest, H. y Surdin-Kerjan, Y. (1981) The 2 methionine adenosyl transferases in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for the existence of dimeric enzymes. *Mol. Gen. Genet.* **182**: 65-69.
- Cherest, H., Surdin-Kerjan, Y., Exinger, F. y Lacronte, F. (1978) S-adenosylmethionine requiring mutants in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for the existence of two methionine adenosyl transferases. *Mol. Gen. Genet.* **163**: 153-167.
- Ciriacy, M. y Breitenbach, I. (1979) Physiological effects of seven different blocks in glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **139**: 152-160.
- Cooper, J. D. H., Ogden, G., McIntosh, J. y Turnell, D. C. (1984) The stability of the 0-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol derivatives of amino acids: an investigation using high-pressure liquid chromatography with a precolumn derivatization technique. *Anal. Biochem.* **142**: 98-102.
- Cooper, T. G. (1982) Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. En *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: metabolism and gene expression* (Strathern, J. N., Jones, E. W. y J.R. Broach, J. R., eds.), pp 39-100. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Crueger, W. y Crueger, A. (1989) Biotechnology: A textbook of industrial microbiology. R. Oldenbourg Verlag GmbH, München.
- Daghir, N. J. y Sell, J. L. (1980) Amino acid limitations of yeast single cell protein for growing chickens. *Poult. Sci.* **59**: 1598.
- Delgado, M. A., Guerrero, J. y Conde, J. (1982) Genetic and biochemical study of threonine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cel. Biol.* **2**: 731-736.
- Denis, C. L., Ciriacy, M. y Young, E. T. (1981) A positive regulatory gene is required for accumulation of the functional messenger RNA for the glucose-repressible alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **148**: 355-368.
- de Robichon-Szulmajster, H. y Corrivaux, D. (1963) Régulations métaboliques de la biosynthèse de la méthionine et de la thréonine chez

*Saccharomyces cerevisiae* I: Repression et rétro-inhibition de l'aspartokinase. *Biochim. Biophys. Acta* 73: 248-256.

de Robichon-Szulmajster, H. y Corrivaux, D. (1964) Régulations métaboliques de la biosynthèse de la méthionine et de la thréonine chez *Saccharomyces cerevisiae* III: Etude cinétique de la répression et de la dérépression des trois premiers enzymes de la chaîne. *Biochim. Biophys. Acta* 92: 1-9.

de Robichon-Szulmajster, H., Surdin, Y., Karassevitch, Y. y Corrivaux D. (1965) Régulations métaboliques chez *Saccharomyces cerevisiae*. Biosynthèse de la méthionine et de la thréonine. En: *Colloque International du C.N.R.S. sur Mécanismes de Régulation des Activités Cellulaires chez les Microorganismes*. CNRS, Paris, pp. 255.

de Robichon-Szulmajster, H., Surdin, Y. y Mortimer, R. K. (1966) Genetic and biochemical studies of genes controlling the synthesis of threonine and methionine in *Saccharomyces*. *Genetics* 53: 609-619.

de Robichon-Szulmajster, H., Surdin-Kerjan, Y. y Cherest, H. (1973) Regulatory aspects of threonine and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. En: *Genetics of Industrial Microorganisms: Actinomycetes and Fungi* (Vanek, Z., Hostálek, Z. y Cudlín, J. eds.). Elsevier, Amsterdam. 2:149-163.

de Vito y Dreyfuss (1964) Metabolic regulation of adenosine triphosphate sulfurylase in yeast. *J. Bacteriol.* 88:1341.

Enei, H., Yokozeki, K. y Akashi, K. (1989) Recent progress in microbial production of amino acids. En *Japanese Technology Reviews vol. 5. Biotechnology*. Gordon and Breach Science Publishers.

Fallon, A., Booth, R. F. G. y Bell, L. D. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry. En *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, volume 17* (Burdon et al., eds). Elsevier. Amsterdam-New York-Oxford.

Fleury, M. O. y Ashley, D. V. (1983) High-performance liquid chromatography analysis of amino acids in physiological fluids: on-line precolumn derivatization. *Anal. Biochem.* 133: 330-335.

Florentino, R. F. y Broquist, H. P. (1974) Production and nutritional evaluation of a high lysine baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in rats. *J. Nutr.* 104: 884-893.

Fujioka, M. y Nakatani, Y. (1970) A kinetic study of saccharopine dehydrogenase reaction. *Eur. J. Biochem.* 16: 180-186.

Gancedo, C. y Serrano R. (1989) Energy-yielding metabolism. En *The Yeast vol. 3 (2nd. ed.)* (Rose, A. H. y Harrison, J. S., eds.), pp 205-259. Academic Press, London.

Gardner, W. S. y Miller III, W. H. (1980) Reverse-phase liquid chromatographic analysis of amino acids after reaction with O-phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* 101: 61-65.

- Gomori, G. (1955) Preparation of buffers for use in enzyme studies. En *Methods in Enzymology*, vol. 1 (Colowick, S. P. y Kaplan, N. D., eds.), pp 38-146. Academic Press, New York.
- Graser, T.A., Godel, H. G., Albers, S., Földi, P. y Fürst, P. (1985) An ultra rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for determination of tissue and plasma free amino acids. *Anal. Biochem.* **151**: 142-152.
- Grenson, M., Hou, C. y Crabeel, M. (1970) Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae* IV. Evidence for a general amino acid permease. *J. Bacteriol.* **103**: 770-777.
- Grewal, N. S. y Miller, J. J. (1972) Formation of asci with two diploid spores by diploid cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* **18**: 1897-1905.
- Hancock, W. S. (1984) Handbook of HPLC for the separation of amino acids, peptides, and proteins. Volume I. Hancock ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Henry, S. A., Klig, L. S. y Loewy, B. S. (1984) The genetic regulation and coordination of biosynthetic pathways in yeast: amino acid and phospholipid synthesis. *Ann. Rev. Genet.* **18**: 207-231.
- Hinnebusch, A. G. (1988) Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**: 248-273.
- Hogan, D. L., Kraemer, K. L. y Isenberg, J. I. (1982) The use of high-performance liquid chromatography for quantitation of plasma amino acids in man. *Anal. Biochem.* **127**: 17-24.
- Ismail A. A. y Ali, A. M. M. (1971) Selection of high ethanol yielding *Saccharomyces*. I. ethanol tolerant and the effect of training in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.* **16**: 350-354.
- Jarrett, H. W., Cooksy, K. D., Ellis, B. y Anderson, J. M. (1986) The separation of O-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica columns. *Anal. Biochem.* **153**: 189-198.
- Jiménez, J. y Benítez, T. (1988a) Selection of ethanol-tolerant yeast hybrids in pH-regulated continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 917-922.
- Jiménez, J. y Benítez, T. (1988b) Hibridación de levaduras vínicas homotáticas con cepas heterotáticas. *Microbiología SEM* **4**: 117-124.
- Johansson, B., y Isaksson, K. (1986) Separation of phenylthiohydantoin-amino acids by fast protein liquid chromatography. *J. Chrom.* **356**: 383-392.
- Johnston, J. R. y Mortimer, R. K. (1959) Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads. *J. Bacteriol.* **78**: 292-297.
- Jones, E. W. y Fink, G. R. (1982) Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. En *The molecular biology of the yeast Saccharomyces*:

*metabolism and gene expression* (Strathern, J. N., Jones, E. W. y Broach, J. R., eds.), pp 181-300. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Joseph, M. H. y Marsden, C. A. (1986) Amino acids and small peptides. En *HPLC of small molecules, a practical approach* (Lim, C. K., ed.), pp. 13-28. IRL Press. Oxford-Washington DC.

Kakar, S. N. y Wagner, R. P. (1964) Genetic and biochemical analysis of isoleucine-valine mutants of yeast. *Genetics* 49: 213-222.

Kalinowski, J., Cremer, J., Bachmann, B., Eggeling, L., Sahun, H. y Pühler, A. (1991) *Mol. Microbiol.* 5: 1197-1204.

Karassevitch, Y. y de Robichon-Szulmajster, H. (1963) Régulation métabolique de la biosynthèse de la méthionine et de la thréonine chez *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 73: 414.

Kiang, J. M. y Zimmerman, D. R. (1980) Methionine additions to yeast single cell protein fed to baby pigs. *J. Anim. Sci.* 51: 78.

Kim, E. K. y Lea, H. Z. (1986) Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of homoserine dehydrogenase gene (*HOM6*) in yeast, *S. cerevisiae*. *Kor. J. Microbiol.* 24: 357-363.

Kobayashi, T., Doi, Y. y Takami, T. (1990) Application of amino acids foods and feeds. En: *Nutrition: Proteins and Amino Acids* (Yoshida, A., Naito, H., Niiyama, Y. y Suzuki, T. eds.) pp 285-299.

Kocková-Kratochvílová, A. (1990) Yeast and Yeast-like Organisms. VCH Publishers (UK), Cambridge.

Lagunas, R. (1976) Energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* discrepancy between ATP balance and known metabolic functions. *Biochim. Biophys. Acta* 440: 661-674.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. I., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Madison, J. T. y Thompson, J. F. (1976) Threonine synthase from higher plants-stimulation by s-adenosyl-methionine and inhibition by cysteine. *Biochim. Biophys. Res. Commun* 71: 684-691.

Mannhaupt, G., Pohlenz, H. D., Seefluth, A. K., Pilz, U. y Feldmann, H. (1990a) Yeast homoserine kinase: characteristics of the corresponding gene, *THR1*, and the purified enzyme, and evolutionary relationships with other enzymes of the threonine metabolism. *Eur. J. Biochem.* 102: 1-8.

Mannhaupt, G., van Linden, G., Vetter, I., Maurer, K., Pilz, U., Planta, R. y Feldmann, H. (1990b) Analysis of the *THR4* region on chromosome III of the yeast *S. cerevisiae*. *Yeast* 6: 353-361.

Marmioli, N., Ferri, M. y Puglisi, P. (1983) Involvement of mitochondrial protein synthesis in sporulation: Effects of erythromycin on

macromolecular synthesis, meiosis, and ascospore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **154**: 118-129.

Martínez-Force, E. y Benítez, T. (1991) Separation of O-phthalaldehyde derivatives of amino acids of the internal pool of yeast by reverse-phase liquid chromatography. *Biotechnol. Techniques* **5**: 209-214.

Martínez-Force, E. y Benítez, T. (1992) Selection of amino-acid overproducer yeast mutants. *Curr. Genet.* **21**: 191-196.

Maugh, T. H. II. (1984) New tool for amino acid analysis. *Science* **225**: 42.

Meister, A. (1965) *Biochemistry of the amino acids*. Vol. I. Academic Press. N. Y. London.

Mertz, J. E. y Spence, K. D. (1972) Methionine adenosyltransferase and ethionine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **111**: 778-783.

Messenguy, F. (1987) Multiplicity of regulatory mechanisms controlling amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Sci.* **4**: 150-153.

Minoda, Y. (1986) Raw materials for amino acid fermentation. En *Progress in industrial microbiology, vol. 24: Biotechnology of amino acids production* (Aida et al., ed.), pp 51-66. Kodansha LTD (Tokyo) and Elsevier Science Publishers B. V. (Amsterdam).

Mountain, H., Byström, A., Larsen, J. T. y Korch, C. (1991) Four major transcriptional responses in the methionine/threonine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**: 781-803.

Momose, H. (1983) New genetic approaches to amino acid-producing strains. En *Developments in Industrial Microbiology, vol. 24* (Nakamura, Y., ed.), pp 109-119. Academic Press. N. Y. London.

Nakaseko, Y., Niwa, O. y Yanajida, M. (1984) A meiotic mutant of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* that produces nature asci containing two diploid spores. *J. Bacteriol.* **157**: 334-336.

Nakoyama, K. (1986) Breeding of amino acid-overproducing mutants. En *Biotechnology of amino acid production* (Akida, K., Chibata, I., Nakayama, K., Takinami, K. y Yamada, H., eds.), pp 3-13. Elsevier, Amsterdam.

Nass, G. y Poralla, K. (1976) Genetics of borrelidin resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* and properties of their threonyl-tRNA-synthetase. *Molec. Gen. Genet.* **147**: 39-43.

Niederberger, P. (1989) Amino acids production in microbial eukaryotes and prokaryotes other than coryneforms. En *Microbial products: new approaches* (Baumberg et al., eds.), pp 1-24. Cambridge University Press.

Niederberger, R., Miozzari, G. y Hütter, R. (1981) Biological role of the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **1**: 584.

- Panchal, C. J. y Almeida Tovaes, F. C. (1991) Yeast strain selection for fuel ethanol production. En *Yeast strain selection* (Panchal, C. J., ed.), pp 225-243. Marcel Dekker Inc., N. Y.
- Petersen, J. G. J., Holmberg, S., Nilsson-Tillgren, T. y Kielland-Brandt, M. C. (1986a) Molecular cloning and characterization of the threonine deaminase (*ILV1*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Carlsberg Res. Commun.* **48**: 149-159.
- Petersen, J. G. J., Vaa, L., Holmberg, S., Kielland-Brandt, M. C. y Nilsson-Tillgren, T. (1986b) Molecular cloning and regulation of the catabolic serine (threonine) deaminase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. 13th Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology, S295. *Yeast*.
- Pirt, S. J. (1975) *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Rafalski, J. A. y Falco, S. C. (1988). Structure of the yeast *HOM3* gene which encodes aspartokinase. *J. Biol. Chem.* **263**: 2146-2151.
- Ramos, C. y Calderón, I. L. (1992) Overproduction of threonine by *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to hydroxynorvaline. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1677-1682.
- Ramos, C., Delgado, M. A. y Calderón, I. L. (1991) Inhibition by different amino acids of the aspartate kinase and the homoserine kinase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **278**: 123-126.
- Ramos, F. y Wiame, J. M. (1982) Occurrence of a catabolic L-serine (L-threonine) deaminase in *S. cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **123**: 571-576.
- Schürch, A., Miozzari, J. y Hütter, R. (1974) Regulation of tryptophan biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mode of action of 5-methyl-tryptophan and 5-methyl-tryptophan-sensitive mutants. *J. Bacteriol.* **117**: 1131-1140.
- Schuster, R. (1980) Determination of free amino acids by high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* **52**: 617-620.
- Segel, I. H. (1975) *Enzyme Kinetics*, Wiley-Interscience, New York.
- Seibold, M., Nill, K. y Poralla, K. (1981) Homoserine and threonine pools of borrelidin resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutants with an altered aspartokinase. *Arch. Microbiol.* **129**: 368-370.
- Shames, S. L. y Wedler, F. C. (1984) Homoserine kinase of *Escherichia coli*: kinetic mechanism and inhibition by L-aspartate semialdehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* **235**: 359-370.
- Sherman, F., Fink, G. R. y Lawrence, C. W. (1979) *Methods in yeast genetics laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Shiio, I. (1982) Metabolic regulation and over-production of amino acids. En: *Overproduction of microbial products* (Krumphonzl, V., Sikyta, B. y Vamêk, Z. eds.) FEMS Symposium n°13, pp. 463-472. Acad.Press. Inc. London.

- Sora, S. y Bianchi, M. (1982) Propanolol, atenolol, and trifluoperazine reduce the spontaneous occurrence of meiotic diploid products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 1299-1303.
- Spencer, J. F. T. y Spencer, D. M. (1983) Genetic improvement of industrial yeasts. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 121-142.
- Spencer, L. S. y Wedler, F. C. (1984) Homoserine kinase of *Escherichia coli*: kinetic mechanism and inhibition by L-aspartate semialdehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* **235**: 359-370.
- Stadtman, E. R., Cohen, G. N., le Bras, G. y de Robichon-Szulmajster, H. (1961). Feedback inhibition and repression of aspartokinase activity in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **236**: 2033-2038.
- Stekol, J. A., Weiss, S. y Somerville, C. (1963) A study of the comparative metabolism of ethionine and methionine in the male and female rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **100**: 86-90.
- Sturley, S. L. y Young, T. W. (1986) Genetic manipulation of commercial yeast strains. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 4.
- Thèze, J., Kleidman, L. y Saint-Girous, I. (1974) Homoserine kinase from *Escherichia coli* K-12: properties, inhibition by L-threonine and regulation biosynthesis. *J. Bacteriol.* **118**: 577-581.
- Thomas, D., Cherest, H. y Surdin-Kerjan, Y. (1989) Elements involved in S-adenosylmethionine-mediated regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* MET25 gene. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3292-3298.
- Thomas, D., Cherest, H. y Surdin-Kerjan, Y. (1990) Gene-enzyme relationship in the sulfate assimilation pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. 13th Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology. *Yeast*.
- Thomas, D., Rothstein, R., Rosenberg, N. y Surdin-Kerjan, Y. (1988) SAM2 encodes the second methionine S-adenosyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae*: Physiology and regulation of both enzymes. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 5132-5139.
- Thomas, D. y Surdin-Kerjan, Y. (1991) The synthesis of the two S-adenosyl-methionine synthetases is differently regulated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **226**: 224-232
- Torrontegui, G., Palacián, E. y Losada, M. (1966) Phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenesis and its repression by hexoses in yeasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**: 227-231.
- Torrontegui, G., Palacián, E., Treguerrez, E. y Losada, M. (1968) Utilization of malate or aspartate by a yeast lacking malate enzyme. *Archiv. Mikrobiol.* **62**: 192-197.
- Urrestarazu, L. A., Borell, C. W. y Bhattacharjee, J. K. (1985) General and specific controls of lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **9**: 341-344.



van Uden, N. (1971) Kinetics and energetics of yeast growth. En *The Yeasts* vol. 2 (Rose, A. H. y Harrison, J. J., eds.), pp 75-118. Academic Press, London.

Vasey, R. B. y Powell, K. A. (1984) Single cell protein. En *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews vol. II* (Russell, G. E., ed.), pp 285-311. Intercept, Newcastle upon Tyne.

Yamagata, S. (1987) Partial purification and some properties of homoserine O-acetyl-transferase of a methionine auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **169**: 3458-3463.

Yoshida, A., Naito, H., Niiyama, Y. y Suzuki, T. (1990) *Nutrition: Proteins and Amino Acids*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

Yoshinaga, F. y Nakamori, S. (1983) Production of amino acids. En *Amino acids: biosynthesis and genetic regulation* (K. M. Herrmann, K. M. y Somerville, R. L., eds.), pp 405-429. Addison-Wesley Publishing Co., London.

Yoshino, M. y Murakami, K. (1981) The effect of spermine on the interaction of AMP deaminase with threonine dehydratase activity in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **672**: 313-316.

Zimmermann, F. K., von Borstel, R. C., von Halle, E. S, Parry, J. M., Siebert, D., Zetterberg, G., Barale, R. y Loprieno, N. (1984) Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* **133**: 199-244.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Tahía Benítez Fernández, directora de esta Tesis, por su amistad, su confianza, su gran dedicación e interés en el desarrollo de este trabajo y en mi formación científica, así como su estímulo a la investigación y su valiosa aportación de ideas.

A la Dra. Isabel López Calderón y al Dr. Marco Antonio Delgado por sus valiosas sugerencias e interés en el desarrollo de este trabajo. Al Dr. Juan Jimenez por enseñarme los trucos del cultivo continuo e iniciarme en el manejo del HPLC. Al Dr. Andrés Aguilera por sus críticas a parte de este trabajo.

A los miembros del grupo de levaduras, a Cayo, Enca, Antonio, Jose María, Miguel, María José, Mercedes por su amistad, ayuda y sugerencias.

A los demás miembros del departamento, a Pepe Casadesús, Enrique, Juan Ramón, Antonio, Javier, Dudu, Paco, Edu, Luis, Beatriz, Reyes, Andrés, Bina, Rafa M., Rocio, Amando, Antonio H., Jesús, Rafa F.(I), Viki, Helena, Pepe L., Joaquín, Fernando, Felix, Rafa F.(II), Carmen Charo, Nicolas, Chon, Ana, Carmela, Pepe y Luis por su amistad.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Resolución de la Junta Integrada por los doctores nombrados en el día 10 de la fecha, para la Junta Doctoral de Enrique Martínez Force  
sobre Sinteris y superproducción de acs derivados del Acido Aspartico en S. creusace.

acuerdo unánime de la Junta. Apto Cum laude

Sevilla, 26 Junio 92

El Vocal

José M Pardo

El Presidente

J. Ledoche

El Secretario

[Signature]

El Secretario

[Signature]

92

El Doctor

[Signature]

El Doctorado

[Signature]

Biblioteca UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
600672926