



R. 4318

TD
626

TRABAJO REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE
LA FACULTAD DE BIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA ,
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOLOGIA , POR EL LICEN-
CIADO

MARCO ANTONIO DELGADO DELGADO

SEVILLA , 17 DE SEPTIEMBRE , 1.981

PONENTE

PR. J. PEREZ SILVA

DIRECTOR

DR. J. CONDE ZURITA

TB 626

UNIVERSIDAD DE QUININDIA
FACULTAD DE BIOLOGIA
SECRETARIA

22-9-81

ENTRADA N.º 448

TD
626

OBTENCION Y ESTUDIO DE MUTANTES SUPERPRODUCTORES

Y EXCRETORES DE AMINOACIDOS EN SACCHAROMYCES

CEREVISIAE

Antes de proceder a la exposición del presente trabajo deseo expresar mi agradecimiento a aquellas personas que lo hicieron posible .

- Al Dr. Jaime Conde Zurita , Director de este trabajo , por sus , totalmente desinteresadas , enseñanzas , criticas y ayudas . Su amistad e interés fue un gran estímulo en el trabajo con Saccharomyces cerevisiae .
- Al Pr. Dr. Julio Perez Silva , Catedrático del Departamento de Microbiología , que hizo posible el trabajo con levaduras y constantemente demostró su ayuda e interés por esta Tesis .
- Al Pr. Dr. Enrique Cerdá Olmedo , Catedrático del Departamento de Genética , que me permitió libremente el uso de aparatos de su Departamento .
- A Doña Josefa Guerrero , que contribuyó altamente al estudio de la superproducción de treonina .
- Al Dr. Jose Enrique Ruiz y a todos mis compañeros doctorandos cuya amistad aligeró las horas de laboratorio .
- A D. Antonio Gutierrez , técnico de La Cruz del Campo S. A. que , generosamente , me ayudó en las determinaciones de aminoácidos .

A Rosa Maria

A Cristina

A mi padre

INDICE

INTRODUCCION

Pág.

I.1.- Producción industrial de aminoácidos : Importancia económica y uso de los aminoácidos	1
I.2.- Métodos de producción de aminoácidos	3
I.2.1.- Síntesis química de aminoácidos	4
I.2.2.- Síntesis química de metionina , treonina y lisina .	4
I.2.3.- Síntesis enzimática de aminoácidos	6
I.2.4.- Obtención de lisina y treonina por fermentación microbiana	7
I.3.- Síntesis de metionina y treonina en <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	12
I.4.- Síntesis de lisina en <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	21
I.5.- Regulación del metabolismo primario . Obtención de mutantes desregulados	26
I.6.- Objetivo y estrategia de nuestro trabajo	31

MATERIAL Y METODOS

II.1.- Microorganismos utilizados	34
II.2.- Medios de cultivo	35
II.3.- Mutagénesis con N-Metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (NG)	37

	<u>Pág.</u>
II.4.- Mutagénesis con Etilmetanosulfonato (EMS)	37
II.5.- Formación y aislamiento de los diploides	38
II.6.- Esporulación y disección de las ascas	38
II.7.- Determinación de auxotrofias y sexo	38
II.8.- Transferencia citoplásmica desde una estirpe a otra usando el mutante <u>karl-1</u>	39
II.9.- Nomenclatura de estirpes diploides y sus derivados meióticos	40
II.10.- Determinación de la excreción por test de alimentación cruzada	40
II.11.- Determinación del peso seco	42
II.12.- Obtención de exudados y pools	42
II.13.- Determinación de L-Lisina	43
II.14.- Determinación de L-Metionina	44
II.15.- Determinación de L-Treonina y L-Homoserina	44
II.16.- Determinación de glucosa en el medio de cultivo	46
II.17.- Obtención del extracto crudo para ensayos enzimá- ticos	46
II.18.- Ensayo del enzima aspartoquinasa	47
II.19.- Especificidad del ensayo enzimático	48

RESULTADOS

Pág.

III.1.- Obtención de mutantes resistentes a etionina	50
III.2.- Selección de excretoras de metionina	50
III.3.- Estudio del crecimiento de los mutantes resistentes a etionina	52
III.4.- Cuantificación de la metionina excretada y almacenada	54
III.5.- Velocidad de aparición de la metionina en los exudados	54
III.6.- Estudio genético de las estirpes resistentes a etionina y excretoras de metionina	56
III.6.1.- Relaciones de dominancia y recesividad	56
III.6.2.- Análisis meiótico de los diploides	56
III.6.3.- Segregación de la resistencia a etionina	56
III.6.4.- Complementación para la resistencia a etio- nina y la excreción de metionina	57
III.6.5.- Análisis meiótico del segundo grupo de complementación	59
III.6.6.- Segregación de la excreción de metionina	60
III.6.7.- Estudio de la resistencia en estirpes monogénicas .	62
III.6.8.- Estudio de la resistencia en estirpes digénicas ...	64

III.6.9.- Estudio de la excreción de metionina en estirpes digénicas para la resistencia a etionina	65
III.6.10.- Transmisión citoplásmica del carácter excretor de metionina	68
IV.1.- Obtención de revertientes prototrófos derivados de la estirpe S2207A , deficiente en la aspar- toquinasa	70
IV.2.- Selección de excretores de treonina entre los revertidos	70
IV.3.- Papel del inositol en la excreción	70
IV.4.- Concentración óptima de inositol	71
IV.5.- Treonina excretada y almacenada por las estirpes JG1 , JG2 y JG3	72
IV.6.- Aparición de treonina a lo largo del tiempo	72
IV.7.- Sustitución del sulfato amónico por ácido as- pártico como fuente de nitrógeno	74
IV.8.- Estudio genético de los mutantes excretores de treonina	76
IV.8.1.- Relaciones de dominancia y recesividad	76

	<u>Pág.</u>
IV.8.2.- Análisis meiótico de la excreción	76
IV.8.3.- Participación del alelo <u>hom3r</u> en la excreción	78
IV.8.4.- Existencia del alelo <u>tex1-1</u> en la estirpe parental S2207A	79
IV.8.5.- Relaciones de dominancia y recesividad	80
IV.8.6.- Confirmación de la naturaleza digénica del carácter excretor en la estirpe JG1	81
IV.8.7.- Estudio genético de la espora MDX1-5C	83
IV.8.8.- Existencia del gen <u>TEX2</u>	84
IV.8.9.- Estudio bioquímico de la aspartoquinasa de las estirpes JG1 , JG3 , JGX1 y F6	85
V.1.- Selección de clones resistentes a tialisina y excretores de lisina	86
V.2.- Estudio del crecimiento de los mutantes resis- tentes a tialisina	88
V.3.- Eliminación por L-Lisina del efecto inhibitor de la tialisina	88
V.4.- Aparición de lisina en el medio de cultivo	89
V.5.- Influencia del inositol sobre la resistencia a tialisina y la excreción de lisina	90

V.6.- Estudio genético de los mutantes excretores
de lisina 91

V.6.1.- Relaciones de dominancia y recesividad 91

V.6.2.- Análisis meiótico de los diploides 91

V.6.3.- Segregación de la resistencia a tialisina 91

V.6.4.- Segregación de la excreción de lisina 92

VI.1.- Obtención de estirpes excretoras de más de
un aminoácido 94

DISCUSION Y CONCLUSIONES

VII.- Discusión 95

VIII.- Conclusiones 116

BIBLIOGRAFIA

IX.- Bibliografía 118

INTRODUCCION

I.1.- PRODUCCION INDUSTRIAL DE AMINOACIDOS : IMPORTANCIA ECONOMICA Y
USO DE LOS AMINOACIDOS .-

La producción de aminoácidos por fermentación es el proceso microbiológico más importante y conocido dentro de la obtención , por fermentación , de metabolitos primarios .

Su comienzo se puede datar en 1908 , cuando el japonés Ikeda descubrió el gran poder enaltecedor de sabores del ácido glutámico . Con el transcurso del tiempo , el glutamato sódico se ha convertido en un aditivo alimentario omnipresente , gracias al descubrimiento por científicos japoneses de un grupo de bacterias altamente productoras de ácido glutámico . En la tabla I-1 resumimos los métodos de producción , cantidad producida y precio de los distintos aminoácidos , según Izumi y col. (1978) . Estos mismos autores estiman en 1000 millones de dolares , las ventas anuales del mercado de aminoácidos .

La aplicación principal de los aminoácidos es la fortificación de alimentos humanos y piensos para animales , se utilizan también en medicina y cosméticos . Sólo nos referiremos aquí a su uso como corrector en alimentos .

El origen de las proteínas consumidas en los países en desarrollo , es predominantemente vegetal (Tabla I-2) . El valor nutritivo de las proteínas vegetales está limitado por su bajo contenido en algunos aminoácidos esenciales , principalmente metionina y lisina .

- TABLA I-1 -

ESTUDIO SOBRE LA PRODUCCION DE AMINOACIDOS EN 1.977

<u>AMINOACIDO</u>	<u>M. PROD.</u>	<u>CANTIDAD (T/Año)</u>	<u>PRECIO</u>
L-Alanina	E	50-100	IV
L-Arginina	F , Ex	200-300	III
L-Asparagina	S	10-50	II
L-Aspártico	E	500-1000	II
L-Cisteina	S	50-100	III
L-Cistina	Ex	10-50	III
L-Glutamina	F	200-300	III
L-Glutámico	F	250.000	I
Glicina	S	3.000	I
L-Histidina	F , Ex	50-100	V
L-Hidroxi prolina	Ex	10-50	V
L-Isoleucina	F	10-50	V
L-Leucina	Ex	50-100	III
L-Lisina	F	25.000	II
L-Metionina	S	50-100	III
DL-Metionina	S	100,000	II
L-Fenilalanina	S	50-100	IV
L-Prolina	F	50-100	V
L-Serina	S , Ex	10-50	IV
L-Treonina	F , S	50-100	IV
L-Triptofano	S	50-100	V
L-Tirosina	Ex	10-50	III
L-Valina	F , S	50-100	III

- TABLA I-1 (cont.) -

Método de producción :

- F : Fermentación microbiana
- Ex : Extracción diversos materiales
- S : Síntesis química

Precios :

- I : Menos de 4 \$/Kg
- II : Entre 4 y 20 \$/Kg
- III : Entre 20 y 40 \$/Kg
- IV : Entre 40 y 80 \$/Kg
- V : Más de 80 \$/Kg

(Tomado de Izumi , 1978)

- TABLA I-2 -

ESTIMA , PARA 1975 , DEL APORTE DE PROTEINAS EN EL MUNDO

	Paises en desarrollo	Paises desarrollados	Total	Incremento desde 1960
Población (Miles de millones)	2,9	1,1	4,0	1,0
Proteina animal	14,6	19,0	33,6	12,2
Carne	6,7	9,4	16,1	5,6
Pescado	2,7	1,3	4,0	2,0
Huevos	1,1	1,1	2,2	0,8
Leche	4,1	7,2	11,3	3,8
Proteina vegetal	51,6	26,4	78,0	30,7
Cereales	33,0	10,6	43,6	11,0
Legumbres	13,1	11,8	24,9	17,1
Hortalizas	3,1	2,1	5,2	1,9
Raices	2,4	1,9	4,3	0,7
Total	66,2	45,4	111,6	43,0
Prop. Prot. Animal (%)	22	42	30	

El aporte de proteinas se calcula en millones de toneladas .

Estimación de Kaneko y col. (1974) .

Este desequilibrio se corrige fácilmente añadiendo aminoácidos en pequeñas cantidades a los alimentos y piensos ; esta adición tiene una gran importancia nutricional y económica . En la tabla I-3 , se compara el valor nutritivo de los cereales fortificados con aminoácidos respecto a los mismos sin fortificar ; este valor o eficiencia proteínica se expresa como el cociente (PER) entre el peso ganado por el animal respecto a la proteína total suministrada en el pienso durante el periodo experimental ; como referencia se toma el valor de la caseína (PER : 2,5) , una proteína animal de alto valor nutritivo .

En la fabricación de piensos se utilizan como fuentes de proteínas la harina de pescado y las harinas vegetales . Sin embargo , la harina de pescado , que tiene un alto valor nutritivo , es escasa y cara , por lo que se emplean cada vez más las harinas vegetales fortificadas . De ellas , la más usada es la harina de soja cuyo primer aminoácido limitante es la metionina , que se le añade . Debido a un aumento muy notable en el precio de la harina de soja , se tiende cada vez más a emplear harinas vegetales a base de cereales en la fabricación de los piensos . El maíz es deficiente en lisina y triptófano y a casi todos los demás cereales hay que añadirles treonina . Las semillas oleaginosas son deficientes en lisina , metionina , triptófano y treonina . Un breve resumen del contenido en aminoácidos de las pro-

- TABLA I-3 -

FORTIFICACION DE CEREALES CON AMINOACIDOS

<u>CEREAL</u>	<u>AMINOACIDOS AÑADIDOS</u>	<u>PER</u>
Arroz	Ninguno	1,5
	L-Lisina , 0,2% ; DL-Treonina , 0,2%	2,61
Harina de Trigo	Ninguno	0,65
	L-Lisina , 0,2%	1,56
	L-Lisina , 0,4% ; DL-Treonina , 0,3%	2,67
Maiz	Ninguno	0,85
	L-Lisina , 0,4%	1,08
	L-Lisina , 0,4% ; DL-Triptófano , 0,07%	2,55
Sorgo	Ninguno	0,69
	L-Lisina , 0,2%	1,77
Cebada	Ninguno	1,66
	L-Lisina , 0,25% ; DL-Treonina , 0,2%	2,28

(Según Kaneko y col. (1974)) .

teínas componentes de los piensos y de distintos tipos de levadura se presenta en las tablas I-4 y I-5 .

Según la FAO (1976) , se estima que los requerimientos de lisina , metionina más cisteína y treonina para un adulto humano son de , respectivamente , 12 , 13 y 7 mg. por Kg. de peso . En cuanto a los requerimientos para animales domésticos , en la tabla I-6 mostramos algunos de ellos .

I.2.- MÉTODOS DE PRODUCCION DE AMINOACIDOS .-

Los aminoácidos son producidos actualmente por tres tipos principales de procesos (Tabla I-1) : síntesis química , fermentación microbiana o síntesis enzimática . Una serie de aminoácidos son producidos por extracción a partir de diversos materiales , bien por la dificultad de su síntesis química (Histidina , extraída de hidrolizados de sangre; Hidroxiprolina) o su fácil obtención a partir de hidrolizados proteicos (Leucina , Tirosina) o de cabello (Cistina) o su poca demanda comercial (Hidroxiprolina) .

Industrialmente , la metionina se produce exclusivamente por síntesis química , debido a la equivalencia en valor nutritivo de sus isómeros . La lisina se produce por fermentación utilizando bacterias cocciformes . La treonina se produce tanto por síntesis química como por fermentación , usando distintas especies microbianas .

- TABLAS I-4 y I-5 -

CONTENIDO EN PROTEINAS , LISINA , METIONINA , TREONINA Y TRIPTOFANO
DE ALGUNAS MATERIAS PRIMAS EN LA FABRICACION DE PIENSOS Y DE DISTIN-
TOS TIPOS DE LEVADURAS .

<u>FUENTE DE PROTEINA</u>	<u>% PROTEINA</u>	<u>% LIS</u>	<u>% MET</u>	<u>% THR</u>	<u>% TRP</u>
Caseina	80	7,0	2,7	3,8	1,0
Harina Pescado	65	4,9	1,9	2,7	0,75
Cebada	11,5	0,53	0,18	0,36	0,17
Maiz	8,9	0,22	0,17	0,34	0,09
Harina Soja	47,5	3,2	0,75	2,0	0,5
Harina Algodón	41	1,71	0,52	1,32	0,47

<u>TIPO DE LEVADURA</u>	<u>% PROTEINA</u>	<u>% LIS</u>	<u>% MET</u>	<u>% THR</u>	<u>% TRP</u>
Cervecera	47	3,25	0,66	2,03	0,48
Destileria	45	3,19	0,57	2,05	0,46
Torula sp.	50	3,62	0,7	2,45	0,5

(Tomado de Feedstuffs , edición de 1977)

- TABLA I-6 -

REQUERIMIENTOS DE ALGUNOS ANIMALES DOMESTICOS EN LISINA , TREONINA
Y METIONINA .

<u>ANIMAL</u>	<u>LIS</u>	<u>MET</u>	<u>THR</u>
Cerdo			
(5-10 kg)	1,2	0,8	0,7
(20-35 kg)	0,7	0,5	0,45
Aves de corral	0,5	0,53	0,4
Conejos	0,7	0,6	0,6

(Expresados como % de la ración , según Feedstuffs , edición 1977)

I.2.1.- Síntesis química de aminoácidos .-

La síntesis química de aminoácidos se puede dividir en dos tipos de procesos : la síntesis del grupo R (diferente para cada aminoácido) y la del grupo $-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ (común para todos) . El resultado de cualquier proceso químico es una mezcla racémica de D- y L-aminoácido , por tanto la síntesis química trae consigo el problema adicional de la resolución óptica de los isómeros .

Existen diversos métodos de síntesis del grupo $-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ algunos de los cuales reseñamos en la figura I-1 (Kaneko y col. 1974) .

I.2.2.- Síntesis química de metionina , treonina y lisina .-

La metionina es producida actualmente en gran escala por síntesis química a partir de la acroleína . En la figura I-2 se muestra el proceso químico de síntesis de metionina , a partir de la acroleína , según Pierson y col. (1948) . En general , cualquier proceso de síntesis de metionina obedece al diagrama propuesto por T. Yagamuchi (1967) (Figura I-3) .

La síntesis de treonina es más compleja ya que existen cuatro isómeros de este aminoácido : L- y D-Treonina ; L- y D-Alotreonina . El único útil desde el punto de vista nutricional es la L-Treonina . La mayoría de los métodos químicos de síntesis dan una mezcla racémica de los

METODO DE BUCHERER



USO DE ALFA-CETOACIDOS



METODO DE WAKAMATSU

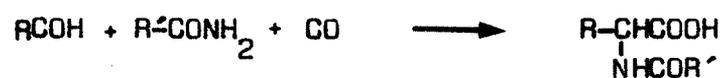


FIG. I-1 .- ALGUNOS METODOS DE SINTESIS QUIMICA DEL GRUPO $-\underset{\text{NH}_2}{\text{CHCOOH}}$
(según Kaneko y col. , 1974)

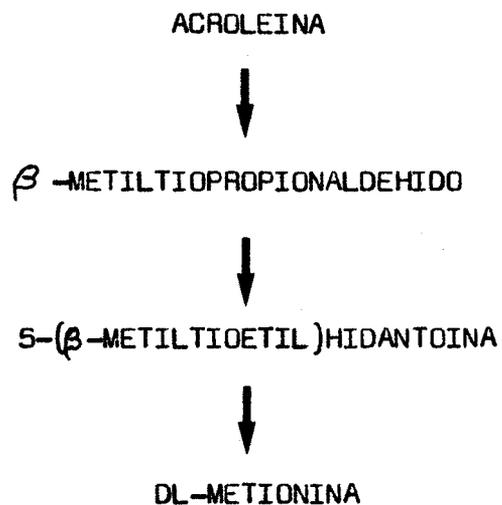


FIG. I-2 .- SINTESIS DE DL-METIONINA A PARTIR DE ACROLEINA POR EL PROCESO DE PIERSON Y COL. (1948)

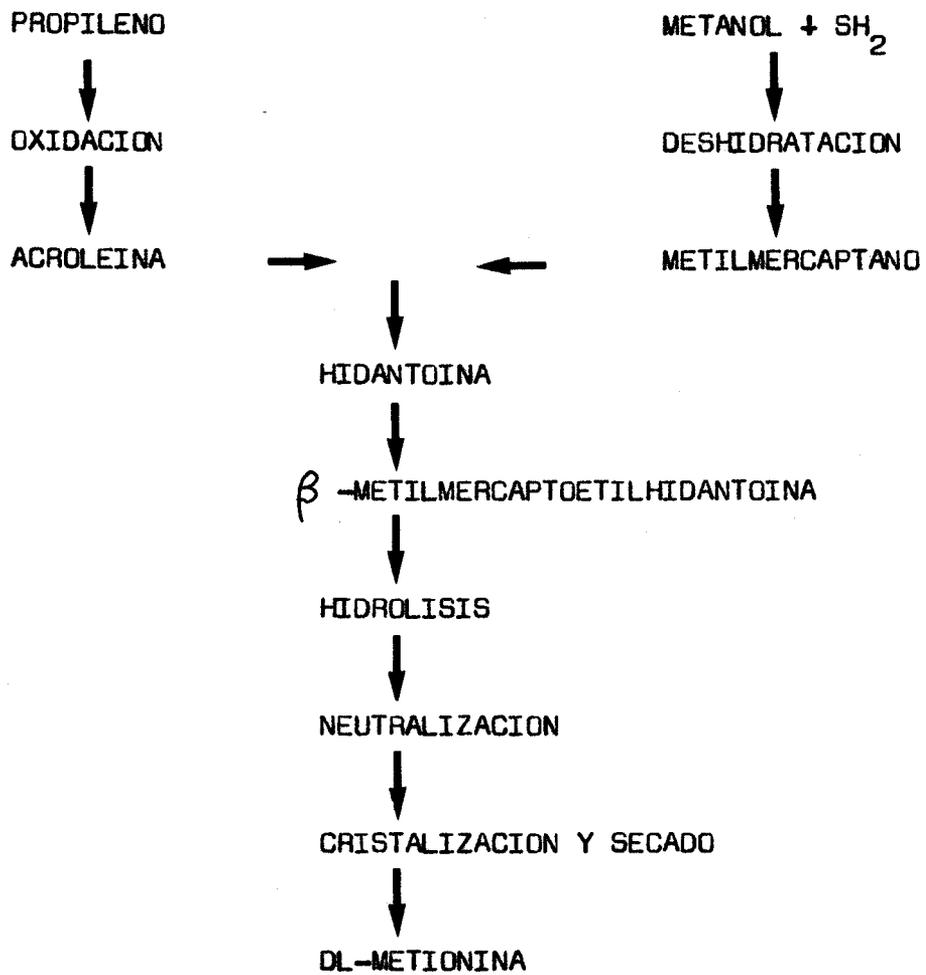


FIG. I-3.- SINTESIS GENERAL DE METIONINA A PARTIR DE ACROLEINA
 (YAGAMUCHI , 1967)

cuatro isómeros .

Existen varios métodos de síntesis química de treonina ; en la figura I-4 representamos el método de Sato y col. (1957), uno de los más usados industrialmente ya que rinde un 90% de DL-Treonina y un 10% de DL-Alotreonina . La DL-Alotreonina puede separarse de la DL-Treonina por su distinta solubilidad y estabilidad .

La mezcla racémica DL-Treonina puede ser resuelta utilizando aminoacilasas bacterianas o de riñón de cerdo , que hidrolizan asimétricamente derivados acetilados , benzoilados o N-cloroacetilados de la DL-Treonina .

Sin embargo , el método más utilizado es la cristalización preferencial . A 9 partes de DL-Treonina se le añade 1 parte de L-Treonina y se disuelve en 30 partes de agua a 80°C , que luego se enfría a 20°C. Precipitan dos partes de L-Treonina . El proceso anterior se puede aplicar para aislar D-Treonina . La repetición de las operaciones anteriores conduce a la total resolución de los dos isómeros .

Hay varios procesos de síntesis química de lisina , a partir de compuestos como caprolactamas , dihidropirano , ciclohexanona y piperidina .

Uno de los más usados es el procedimiento de Stamicarbon (1968) que puede rendir de un 70% a un 90% de DL-Lisina . Fukumara (1976) partiendo del ciclohexano , un subproducto de las síntesis de caprolacta-

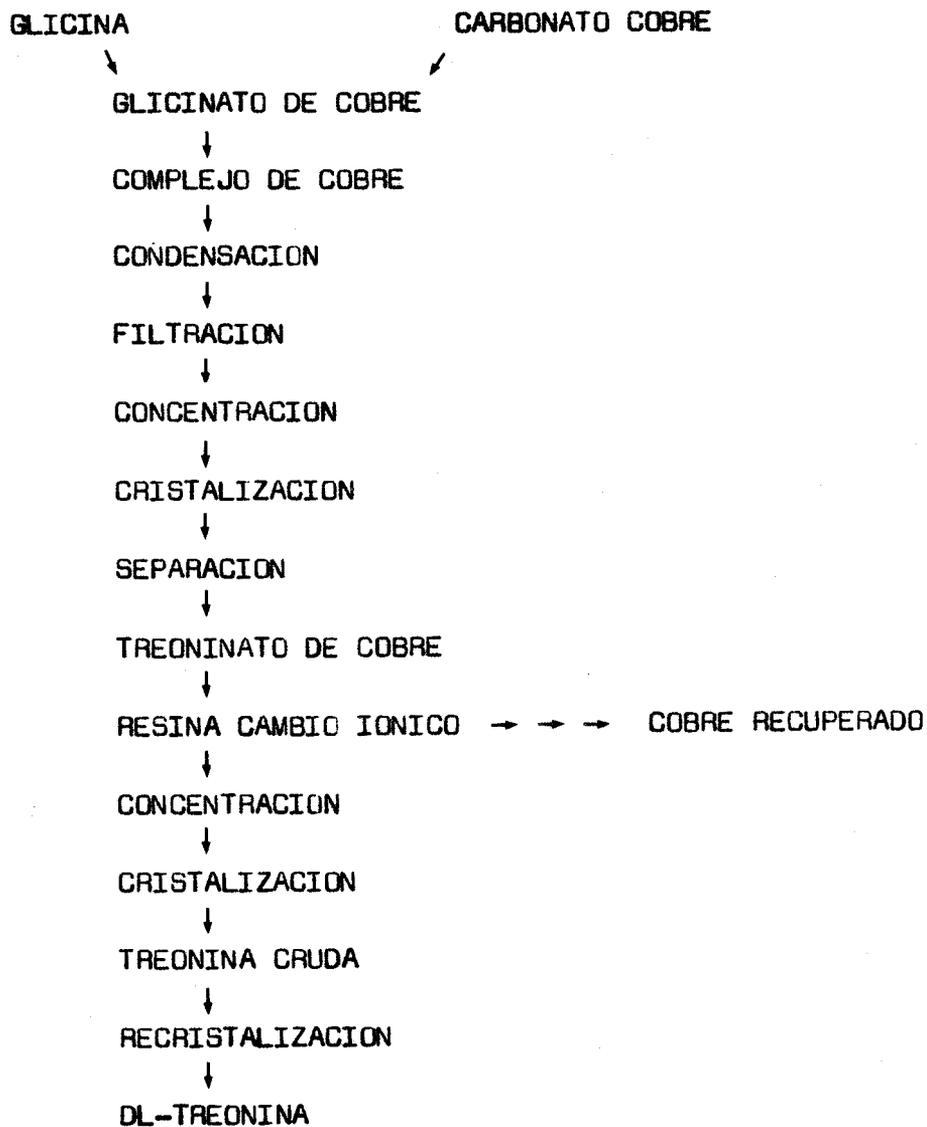


FIG. I-4 .- SINTESIS DE TREONINA A PARTIR DE UN COMPLEJO

GLICINA-COBRE

(SATO Y COL. , 1957)

mas , sintetiza el compuesto DL-Aminocaprolactama . En este punto del proceso se añaden dos enzimas microbianos : L-aminocaprolactamo hidrolasa y Aminocaprolactama racemasa . Las dos enzimas actúan simultáneamente transformando la mezcla DL-Aminocaprolactama en L-Lisina . Este proceso , desarrollado recientemente y representado en la figura I-5 , puede competir seriamente con la producción de L-Lisina por fermentación microbiana , que actualmente es el proceso industrial utilizado .

Aparte del reseñado anteriormente , existen diversos métodos para la resolución óptica de la L-Lisina . Generalmente se emplean aminoacilasas fúngicas inmovilizadas sobre un soporte de DEAE-Sephadex . Otros métodos , utilizan diversas sales de lisina como el aminobencenosulfonato de DL-Lisina , sulfanilato de DL-Lisina , etc. , susceptibles de cristalización preferencial de la forma L .

I.2.3.- SINTESIS ENZIMATICA DE AMINOACIDOS .-

El uso de enzimas o células inmovilizadas sobre una matriz polimérica , permite la síntesis continua de algunos aminoácidos .

El ácido aspártico se produce industrialmente en Japón con células empaquetadas de Escherichia coli , aprovechando la acción de la aspartasa celular sobre el ácido fumérico . El ácido L-Aspártico formado se puede transformar industrialmente en L-Alanina (Chibata y col. 1974) por la enzima L-Asparto- β -descarboxilasa de Pseudomonas ducunhae (Chi-

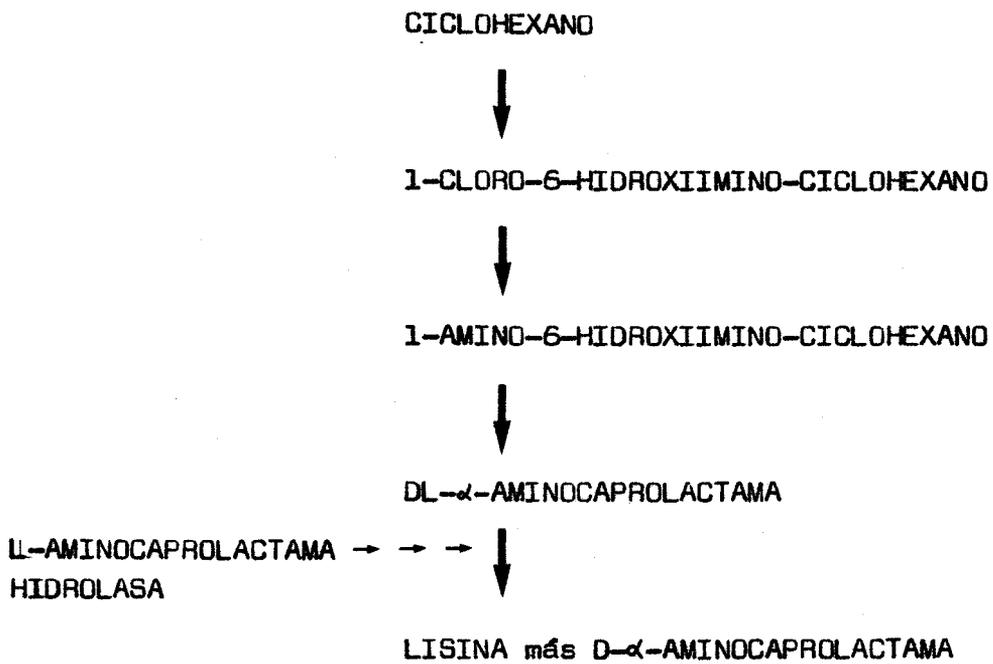


FIG. I-8 .- SINTESIS ENZIMATICA DE LISINA A PARTIR DE DL- α -AMI-
NOCAPROLACTAMA

(FUKUMARA , 1976)

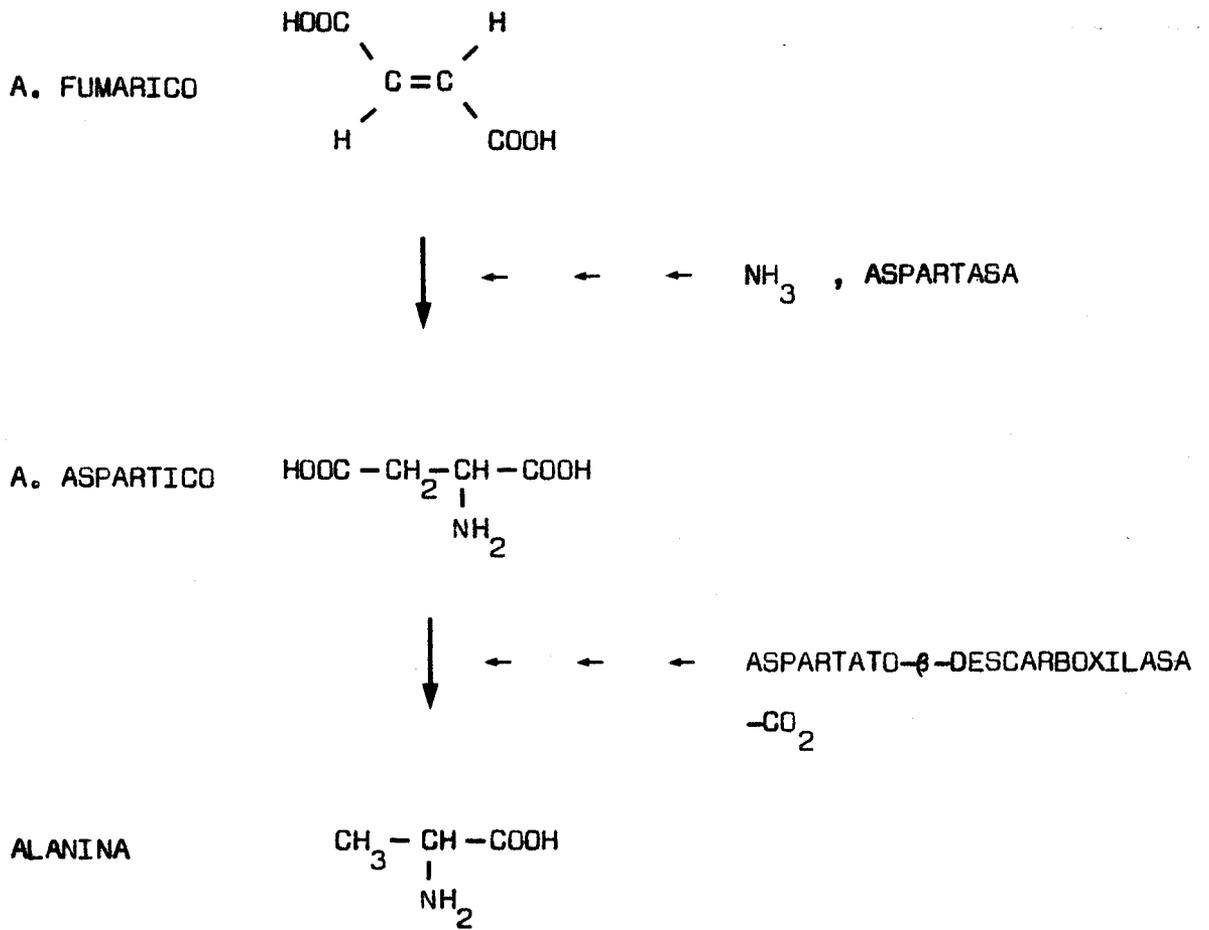


FIG. I-6.- TRANSFORMACION ENZIMATICA DEL ACIDO FUMARICO EN
ACIDO ASPARTICO Y ALANINA (Chibata y col. , 1965)

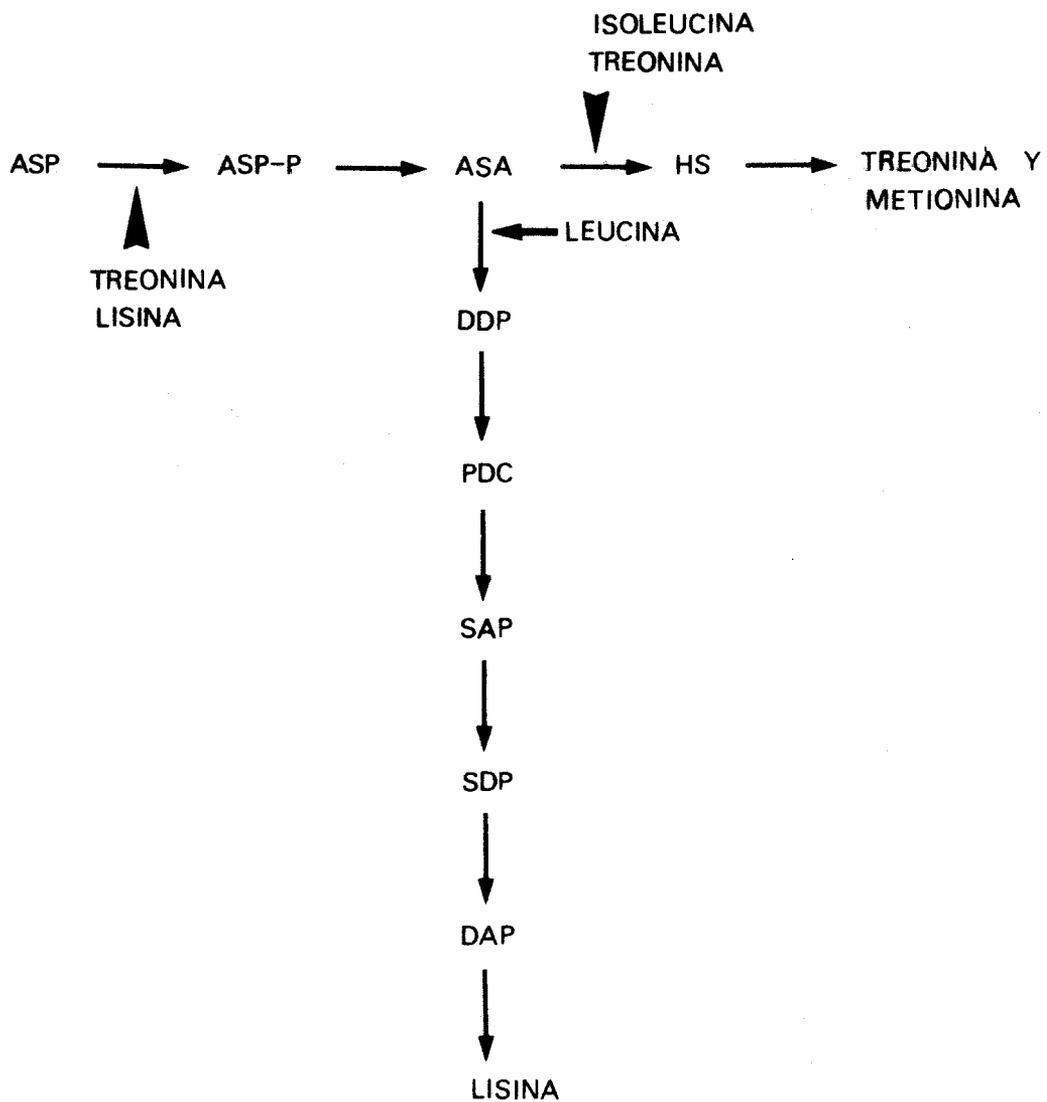
bata y col. 1965) . La reacción global se muestra en la figura I-6 .

La síntesis enzimática de L-Triptófano a partir de Indol y Piruvato se logra con triptofanasa inmovilizada . En el medio de reacción se añade inosina , que forma un complejo insoluble inosina-triptófano , este complejo precipita y al eliminar el producto de la reacción fuerza a la triptofanasa a la síntesis continua de L-Triptófano .

I.2.4.- OBTENCION DE LISINA Y TREONINA POR FERMENTACION MICROBIANA .-

Los microorganismos actualmente usados para la producción de lisina pertenecen al grupo de bacterias productoras de ácido glutámico . Estos microorganismos están clasificados en una serie de géneros como Corynebacterium , Brevibacterium , Arthrobacter , Microbacterium , pero todos ellos tienen una serie de características comunes que los hacen muy difíciles de separar entre sí ; el Manual Bergey en su séptima edición da como dudosa la situación taxonómica de muchos de estos géneros ; en realidad , su separación se ha debido más a intereses de patentes , que a una diferenciación taxonómica real .

La ruta de biosíntesis de lisina en bacterias , está entroncada con la de treonina y metionina , existiendo una fuerte relación regulatoria entre estos productos finales . En la figura I-7 se muestra la ruta de síntesis de lisina y su regulación en Brevibacterium flavum (Yamada y col. 1972) (Rose y col. 1978) .



→ REPRESION

▶ INHIBICION

FIG. 1-7 BIOSINTESIS DE LISINA EN BACTERIAS CORINEFORMES

ABREVIATURAS USADAS EN LA FIGURA ANTERIOR

ASP : Acido aspártico

ASP-P : Aspartil fosfato

ASA : Aspartato semialdehido

HS : Homoserina

DDP : 2,3-Dihidropicolinato

PDC : Piperidina-2,6-Dicarboxilato

SAP : N-Succinil- α -amino- ϵ -Oxopimelato

SDP : N-Succinil-2,6-Diaminopimelato

DAP : Diaminopimelato

Este grupo de bacterias reúne una serie de características que lo hace adecuado para una alta producción de aminoácidos . La principal ventaja es que su aspartoquinasa (ATP:L-Aspartato-4-fosfotransferasa EC 2.7.2.4), enzima que controla la síntesis de treonina , metionina y lisina está sometida a una inhibición de tipo multivalente por treonina y lisina (Miyajima y col. 1968 ; Nakayama y col. 1966 ; Shio y col. 1969 Shio y col. 1970) . Una mutación que limite la concentración de treonina dentro de las células desinhibe en alto grado la aspartoquinasa , independientemente de la concentración de lisina que se llegue a alcanzar en el medio ; esto hace que las cepas industriales de Corynebacterium glutamicum y Brevibacterium flavum sean auxotróficas para la homoserina o para la treonina . Otra forma de romper la inhibición por los productos finales es utilizando cepas resistentes a S-(2-aminoetil)-L-cisteína o tialisina (análogo tóxico de la lisina) y/o α -amino- β -hidroxivalérico (análogo de la treonina)(K. Sano 1970 ; Nakamori 1973) .

Las producciones obtenidas con estos mutantes se aumentan introduciendo nuevas auxotrofias en aminoácidos derivados del ácido pirúvico , del oxalacético o del aspártico (todos precursores de la lisina) . Estas auxotrofias incrementan la cantidad de precursores disponibles para la síntesis de lisina . El uso de cepas con múltiples auxotrofias ayuda a la estabilización de la producción e impide el desarrollo de revertientes , peores productores . En la mejora de la producción , es

especialmente útil una auxotrofia para la leucina ya que este aminoácido se ha demostrado ejerce represión sobre la dihidropicolinato sintetasa , aunque la lisina no inhibe ni reprime este enzima (K. Nakayama , 1966) .

Como complemento a su fácil desregulación , el grupo de los microorganismos "productores de ácido glutámico" tiene de modo natural un requerimiento para la biotina . Los niveles de biotina en el medio de fermentación son importantes en el rendimiento de la misma . Un nivel de biotina óptimo para el crecimiento trae consigo una pobre producción de lisina , aumento de los pools de lactato , acetato y succinato y excreción de alanina , malato y aspartato . Estudios efectuados en células de Brevibacterium lactofermentum crecidas con niveles altos y bajos de biotina , demuestran que a bajo nivel de biotina , se pierden por lavado el 95% de los aminoácidos del pool intracelular , mientras que a nivel alto de biotina , solo se pierde los aminoácidos neutros (Shiio y col. 1962a , 1962b) . Se supone que la deficiencia en biotina , altera la síntesis de ácidos grasos de cadena larga , ya que el enzima clave en esta ruta es la acetil-CoA-carboxilasa , rica en biotina . La alteración en la síntesis y distribución de los ácidos grasos sería responsable del incremento de permeabilidad , en condiciones de poca biotina . La adición de penicilina (Nara y col. 1964) y detergentes diversos produce el mismo efecto que la deficiencia en biotina . Demain y col.(1968)

han revisado extensamente los temas anteriores .

Por último , Corynebacterium glutamicum , Brevibacterium flavum y B. lactofermentum son incapaces de catabolizar la lisina producida utilizandola como fuente de nitrógeno . Esto anula el riesgo de una desaparición de la lisina al final de la fermentación , cuando las fuentes de nitrógeno se vuelven limitantes .

La producción de treonina es un proceso mucho menos extendido que la producción de lisina o de ácido glutámico . Se utilizan los mismos microorganismos anteriores disponiéndose sus auxotrofias para la producción de treonina , es decir se utilizan cepas de Brevibacterium lactofermentum auxótrofas para la Lisina y resistentes a α -amino- β -hidroxivalérico (Miyajima y col. 1968 ; Shiio y col. 1970) . La resistencia a este análogo parece deberse a la falta de inhibición por treonina de la homoserina deshidrogenasa . Auxotrofias complementarias para metionina e isoleucina , aumentan la producción .

Recientemente , Komatsubara y col. (1979) han publicado la obtención de una estirpe de Serratia marcescens productora de treonina . Esta posee dos isoenzimas de la aspartoquinasa , uno inhibido por treonina y reprimido por isoleucina , el otro inhibido y reprimido por lisina. El enzima homoserina deshidrogenasa también está reprimido por isoleucina e inhibido por treonina .

Estos autores reunieron en una cepa , por transducción , una serie de características genéticas presentes en otras cepas de la misma

especie y que permiten la producción de pequeñas cantidades de treonina . Estas características son :

- Un alelo thrA₁ 1(fr) que codifica una isoenzima de la aspartoquinasa resistente a retroinhibición por treonina .
- Un alelo thrA₂ 1(fr) que codifica una homoserina deshidrogenasa resistente a retroinhibición por treonina .
- Un alelo Hnr-1 que causa síntesis constitutiva de las enzimas de biosíntesis de treonina .
- Un alelo lysC₁ (fr) que codifica una isoenzima de la aspartoquinasa resistente a la inhibición y represión por lisina .

La cepa que acumula todas estas mutaciones produce 25 g/l de treonina en un medio con sacarosa y urea .

En las fermentaciones productoras de lisina o treonina se utilizan dos tipos de medios : un medio de crecimiento , dónde aumenta la biomasa hasta aproximadamente 10^{10} cel/ml. y apenas se produce aminoácido , luego se va alimentando intermitentemente con un medio de producción altamente rico en melazas (fermentación tipo feed-batch) . En esta etapa el rendimiento de la conversión de hidratos de carbono a lisina es máximo .

La fermentación dura aproximadamente tres días y se interrumpe a una determinada concentración de hidratos de carbono , a partir de la cual el rendimiento de su transformación en lisina es muy pequeño .

I.3.- BINTESES DE METIONINA Y TREONINA EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE .-

La ruta de biosíntesis de metionina y treonina en levaduras , a semejanza de las rutas existentes en procariotas , parte del ácido aspártico del cual se sintetizará homoserina ; en este punto la ruta se ramifica dirigiéndose hacia la síntesis de metionina y treonina . Como es común en las rutas ramificadas , cada uno de los productos finales va a ejercer regulación principalmente sobre el primer enzima de la ruta común y sobre el primer enzima de la ruta propia .

El estudio de la biosíntesis de metionina y treonina en S. cerevisiae se debe principalmente al grupo francés de Robichon-Szulmajster y colaboradores , que han estudiado muy concienzudamente los pasos y regulación de esta ruta (Masselot y col. 1977 ; Robichon-Szulmajster y col. 1966 ; Masselot y col. 1975) .

En la figura I-8 , representamos la ruta de biosíntesis de metionina y treonina , en Saccharomyces cerevisiae . En la tabla I-7 , la relación gen-enzima en esta ruta .

La biosíntesis de homoserina comprende tres etapas enzimáticas que llevan desde aspártico hasta homoserina . La primera enzima de la ruta , la aspartoquinasa (ATP:L-Aspartato-4-Fosfotransferasa , EC 2.7.2.4.) es la enzima llave de la misma , sobre la que se efectúa una fuerte regulación (Stadtman y col. 1961) . La treonina inhibe alostéricamente esta enzima siendo la afinidad por el inhibidor mayor que por el sustrato (Surdin-Kerjan , 1967) ; la homoserina también ejerce in-

- TABLA I-7 -

RELACION GEN-ENZIMA EN LA RUTA DE BIOSINTESIS DE METIONINA Y TREONINA
EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE .

<u>ETAPA</u>	<u>GEN</u>	<u>ENZIMA</u>
1	<u>HOM3</u>	ATP:L-Aspartato-4-Fosfotransferasa (Aspartoquinasa) (EC 2.7.2.4)
2	<u>HOM2</u>	L-Aspartato- β -Semialdehido:NADP oxidoreductasa (Aspartato Semialdehido Deshidrogenasa)(EC 1.2.1.11)
3	<u>HOM6</u>	L-Homoserina:NAD Oxidoreductasa (Homoserina Deshidrogenasa)(EC 1.1.1.3)
4	<u>THR1</u>	ATP:L-Homoserina-O-Fosfotransferasa (Homoserina kinasa) (EC 2.7.1.39)
5	<u>THR4</u>	O-Fosfomoserina Fosfo-liasa (Treonina sintetasa) (EC 4.2.99.2)
6	<u>MET2</u>	Acetil CoA:L-Homoserina-O-Acetil transferasa (Homoserina-O-transacetilasa)(EC 2.3.1.31)
7	<u>MET8</u>	O-Acetil-L-Homoserina Acetato liasa (Homocisteina sintetasa)(EC 4.1.99.10)
8	<u>MET6</u>	Metiltetrahidrofolato Homocisteina Metil transferasa (EC 2.1.1.8)
9	<u>MET16</u> <u>MET22</u>	3'-Fosfoadenosil-5'-Fosfosulfato reductasa
10	<u>MET5</u>	Sulfito reductasa
	<u>MET10</u>	Sulfidrico-nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidoreductasa (EC 1.8.1.2)
	<u>MET18</u>	
	<u>MET19</u>	
	<u>MET20</u>	

- TABLA I-7 (cont.) -

<u>ETAPA</u>	<u>GEN</u>	<u>ENZIMA</u>
11	<u>MET14</u>	Adenosil-5'-Fosfosulfato Quinasa
12	<u>MET3</u>	ATP:Sulfato adenilil transferasa (ATP sulfurilasa) (EC 2.7.7.4)

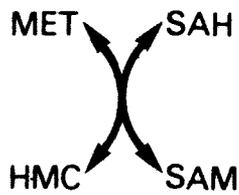
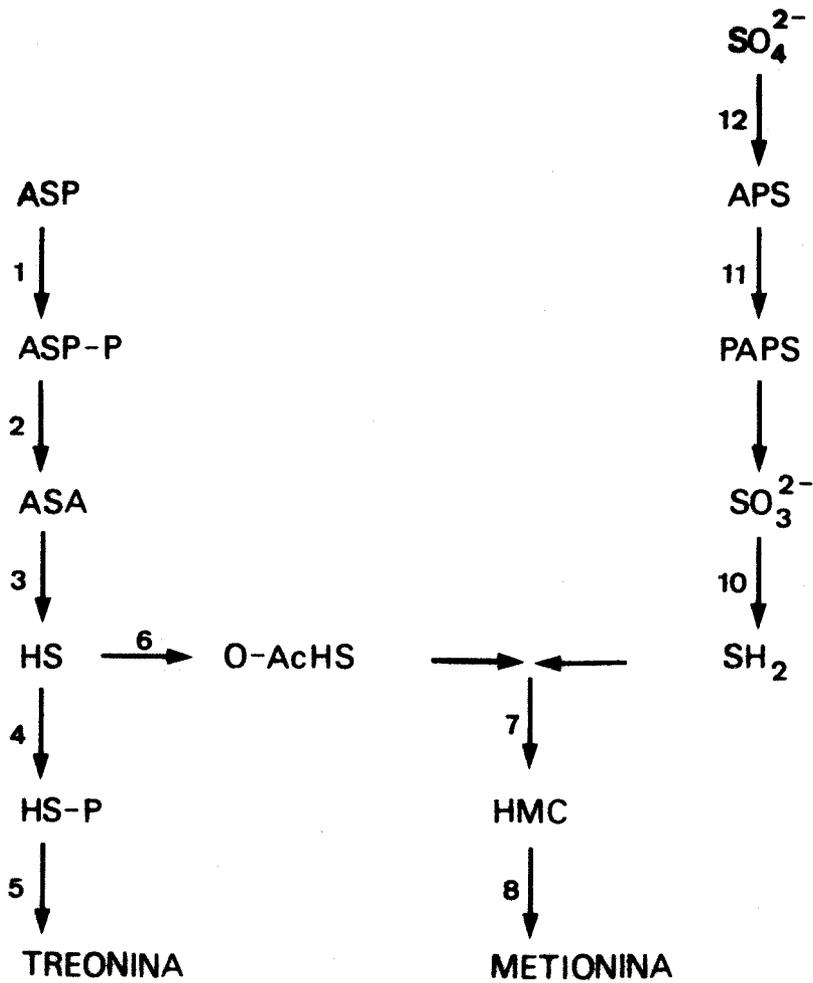
A los anteriores genes hay que añadir :

- MET7 , MET13 , MET21 , MET23 , MET24 .

Codifican enzimas de la ruta del tetrahidrofolato

- MET1 , MET4 , MET25 , MET17 .

Papel dudoso en la ruta de asimilación del sulfato .



**FIG. 1-8 BIOSINTESIS DE TREONINA Y METIONINA EN SACCHAROMYCES
 CEREVISIAE**

ABREVIATURAS USADAS EN LA FIGURA ANTERIOR

ASP : Acido aspártico

ASP-P : Aspartil-Fosfato

ASA : Aspartato-semialdehido

HS : Homoserina

HS-P : Homoserina fosfato

TRE : Treonina

O-AcHS : O-Acetil Homoserina

HMC : Homocisteina

APS : Adenosil-5'-fosfo-sulfato

PAPS : 3'-Fesfo-adenosil-5'-fosfosulfato

MET : Metionina

SAM : S-adenosil-metionina

hibición sobre la actividad de la aspartoquinasa . Tanto treonina como homoserina ejercen un efecto represor sobre este enzima .

Cuando Saccharomyces cerevisiae se cultiva en presencia de metionina 0,01 M , Robichon-Szulmajster y col. (1967b) proclaman que aparece una segunda actividad aspartoquinásica , llamada aspartoquinasa B , a diferencia de la actividad de la aspartoquinasa A , que es la principal. La aspartoquinasa B representa , como máximo , el 20% de la actividad total y es inhibida por treonina y metionina . Sin embargo , a nuestro juicio no está clara esta actividad aspartoquinásica B , porque sólo hay descrito un gen que sintetice aspartoquinasa , el gen HOM3 , y una mutación en este gen provoca la necesidad de metionina y treonina simultáneamente .

Una cuestión a tener en cuenta en el estudio de la aspartoquinasa es que el contenido medible en este enzima de distintas cepas , puede variar según un factor de 10 (Robichon-Szulmajster , 1967a) , hecho achacable , según esta autora , a variabilidad en la estabilidad de la aspartoquinasa de cepas diferentes .

La aspartatosemialdehido deshidrogenasa (L-Aspartato-~~α~~-Semialdehido:NADP oxidoreductasa , EC 1.2.1.11) , segunda enzima de la ruta transforma el aspartilfosfato en aspartato semialdehido . No es inhibible , pero si represible por treonina . Robichon-Szulmajster (1967b) aisló un mutante insensible simultáneamente a la represión de la aspartoquinasa y la aspartato semialdehido deshidrogenasa , postulando un represor co-

mún para las dos enzimas .

La homoserina deshidrogenasa (L-Homoserina:NAD oxidoreductasa EC 1.1.1.3) , sólo parece estar sometida a represión por parte de la metionina . Treonina y metionina ejercen también un claro efecto regulador sobre la actividad de este enzima (Robichon-Szulmajster y col. 1967a) .

Independientemente , de las consideraciones anteriores , las medidas hechas "in vivo" indican que la represión "in situ" tiene muy poca importancia , y que es la retroinhibición el fenómeno que regula la actividad de la ruta (Robichon-Szulmajster y col. 1973) .

La biosíntesis de metionina comprende por una parte , la entrada y transformación del sulfato externo en sulfuro y por otra parte la unión del sulfuro con la acetil-homoserina , para dar homocisteína que por metilación se transformará en metionina . Hay una parte de la ruta, la transformación del sulfato en sulfuro , común a metionina y cisteína . Parte de la metionina sintetizada se va a transformar en S-adenosilmetionina (SAM) , molécula donadora de grupos metilos , que ejerce un papel muy importante tanto en la regulación de la síntesis de metionina como a nivel más general .

A continuación vamos a estudiar las enzimas implicadas en la síntesis de metionina , describiendo sólo la regulación de su actividad , y no de su síntesis , ya que la regulación por represión de esta ruta

es un fenómeno bastante complejo y que afecta a varias enzimas . Esta regulación la estudiaremos posteriormente .

La transformación de homoserina en O-acetilhomoserina es el primer paso en la síntesis de metionina y está realizado por la homoserina-O-transacetilasa (AcetilCoA:L-Homoserina-O-Acetil-Transferasa EC 2.3.1.31) . Esta enzima está sometida a inhibición por la S-adenosilmetionina ($K_i : 5 \times 10^{-4} \text{ M}$)(Robichon-Szulmajster y col. 1967b) . La O-acetilhomoserina formada es unida a un grupo sulfuro por la homocisteina sintetasa (O-Acetil-L-Homoserina acetato liasa EC 4.1.99.10) . Esta enzima presenta una K_m para la O-Acetilhomoserina de $7 \times 10^{-3} \text{ M}$ y una inhibición competitiva por la metionina ($K_i : 1,9 \times 10^{-3} \text{ M}$)(Cherest y col. 1969) . La homocisteina formada se metila por la Metil-tetrahidrofolato-homocisteina-metiltransferasa , transformándose en metionina . Además del gen MET6 que codifica este enzima , mutaciones en otros cinco genes (MET7,MET13,MET21,MET23,MET24) producen el mismo fenotipo , estando implicados en la ruta del tetrahidrofolato (Masselot y col. 1977) .

Como una prolongación de la ruta , consideraremos la biosíntesis de S-adenosilmetionina a partir de metionina y ATP ,realizada por la S-adenosilmetionina sintetasa (ATP:L-Metionina-S-adenosil-transferasa EC 2.5.1.6) . Parece existir dos formas de este enzima (Chiang y Cantoni 1977) separables por cromatografía en DEAE-celulosa . Las S-adenosilmetionina sintetetasas I y II presentan dos actividades : adenosilación

de la metionina a expensas de ATP y actividad tripolifosfatasa . No se conoce nada sobre la regulación de esta enzima , curiosamente está descrito un tipo de mutantes que carece de actividad SAM-homocisteina-metil-transferasa (EC 2.1.1.10) , con fenotipo de auxotrofia para la metionina y capaz de crecer sólo sobre metionina (Robichon-Szulmajster y col. 1973) . Sin embargo , los mutantes de la ruta del Tetrahidrofolato pueden crecer tanto en SAM como en metionina ; aunque estos resultados están oscuros , pueden dar idea de la contribución de cada vía a la síntesis de metionina .

El sulfato externo es introducido en la célula por una permeasa específica . La transformación del sulfato en sulfuro , se lleva a cabo por cinco etapas enzimáticas , producto de once genes . No se conoce bien la relación gen-enzima de esta ruta , aunque Masselot y col. (1977) se inclinan a pensar que las enzimas ATP-sulfurilasa (ATP:sulfato adenilil transferasa EC 2.7.7.4) , APS-quinasa , PAPS-reductasa y Sulfito reductasa (Sulfuro de hidrógeno nicotinamida adenina dinucleotido fosfato oxidoreductasa , EC 1.8.1.2) , forman un complejo enzimático , como hipótesis para explicar los fenotipos de los distintos grupos de complementación existentes . La adenosina trifosfato sulfurilasa está regulada por inhibición tanto por la adenosina-5'-fosfosulfato como por el ión sulfuro , (Vito y Dreyfuss , 1964) .

Un exhaustivo trabajo sobre la regulación por represión de las en-

zimas de síntesis de metionina ha sido realizado por Surdin-Kerjan , Robichon-Szulmajster y Cherest , utilizando principalmente mutantes de Saccharomyces cerevisiae resistentes a etionina . Una serie de hechos básicos se deducen de su trabajo :

- a) La metionina reprime "in vivo" , a nivel de transcripción , la biosíntesis de una serie de enzimas (llamadas por ello , enzimas del grupo I) : Homoserina-O-transacetilasa , Homocisteína sintetasa , ATP-sulfurilasa , Sulfito reductasa y Sulfato permeasa (Cherest y col. , 1969; Surdin-Kerjan y col. , 1973 ; Surdin-Kerjan y col. , 1975) .
- b) La síntesis de estas enzimas parece coordinada , aunque sus genes estructurales están situados en cromosomas diferentes .
- c) En este sistema de regulación están implicados los productos de los genes ETH2 , ETH3 , ETH10 (Masselot y col. 1974a ; Masselot y col. 1974b ; Masselot y col. 1974c ; Cherest y col. 1973a ; Cherest y col. 1973c) y el metionil-ARN^{met}_t (Cherest y col. 1971 ; Cherest y col. 1975 ; Surdin-Kerjan y col. 1973 ; Cherest y col. 1973c) .

El mejor estudiado es el gen ETH2 . Robichon-Szulmajster y Masselot (Masselot y col. 1972) demostraron que el alelo eth2-2 de este gen consiste en una mutación sin sentido en una proteína represora . Estudios ulteriores sobre los mutantes resistentes a etionina , demuestran que mutaciones en los genes ETH2 , ETH3 y

ETHLO conducen a niveles desreprimidos de las enzimas del grupo I , resistencia a etionina , niveles altos de metionina , y en algunas estirpes a excreción de este aminoácido (Antoniewski y col. 1973) . En estudios posteriores aislaron un mutante termosensible en la metionil-ARN_t sintetasa (Surdin-Kerjan y col. 1976) ; en este mutante la metionil-ARN_t sintetasa tiene una afinidad por la metionina mucho más baja que el parental (mutación tipo Km) . Más aún , parece que el ARN_t implicado en la regulación es una especie menor del Metionil-ARN_t global , ya que no concuerda el nivel global de metionil-ARN_t en las células , con el nivel de desrepresión de las enzimas del grupo I . En levaduras es conocido el papel de los aminoacil-ARN_t en la represión de los enzimas que intervienen en la biosíntesis de los aminoácidos (Messenguy y col. 1976 ; Warner y col. 1978) .

- d) La S-adenosil-metionina ejerce un efecto represor sobre las enzimas del grupo I , habiéndose demostrado que no es a través de su conversión en metionina (Cherest y col. 1973b) . Estudios sobre la cinética de desrepresión de las enzimas del grupo I , han llevado a la conclusión de que si bien la metionina ejerce un control transcripcional , la represión debida a S-adenosil-metionina es a nivel post-transcripcional (Surdin-Kerjan y col. 1976 ; Cherest y col. 1973b ; Surdin-Kerjan y col. 1975) .

Spence y col. (1967) y Lipinski y col. (1976) han estudiado un tipo de mutante : el mutante sai-1 . Esta mutación provoca un fenotipo de

inhibición del crecimiento celular por concentraciones extracelulares de SAM del orden de 0,05 mM . Estos mutantes son indistinguibles del parental en ausencia de SAM externa , la inhibición por este metabolito es eliminada por metionina . La mutación *sai-1* es monogénica y ya que provoca un fenotipo de inhibición de algunos transportes activos , disminución del contenido de polisomas e inhibición de síntesis de ARN y ribosomas , Lipinski cree que causa una lesión en el metabolismo energético . Aunque de manera no conocida , parece evidente el papel regulador de la SAM .

Lor y Cossins (1972) han descrito una regulación por metionina de las enzimas de la ruta del tetrahidrofolato . La metionina ejerce una potente represión sobre el enzima 5-metil-tetrahidrofolato-homocisteina metil transferasa , codificada por el gen MEI6 . Esta represión no se ejerce sobre otras enzimas de la ruta : Tetrahidrofolato-metilen reductasa , Formiltetrahidrofolato sintetasa y Serina-Hidroximetil transferasa .

Paralelamente , se halló que la metionina tiene un efecto inhibitor sobre la actividad del enzima Metilen-tetrahidrofolato reductasa y no sobre los otros enzimas . No hay estudios posteriores de la conexión de esta regulación por metionina sobre la fabricación de 5-metil-tetrahidrofolato con los otros sistemas de regulación anteriormente descritos

La síntesis de treonina , a partir de homoserina , está poco estudiada . Dos enzimas transforman la homoserina en treonina : Homoserina

quinasa (ATP:L-Homoserina-O-Fosfotransferasa EC 2.7.1.39) y Treonina sintetasa (O-Fosfohomoserina fosfo-liasa EC 4.2.99.2) . Unicamente la primera está sometida a inhibición y quizás represión por treonina (Robichon-Szulmajster , 1967a) .

La figura I-9 resume la regulación de la ruta de biosíntesis de metionina y treonina en Saccharomyces cerevisiae .

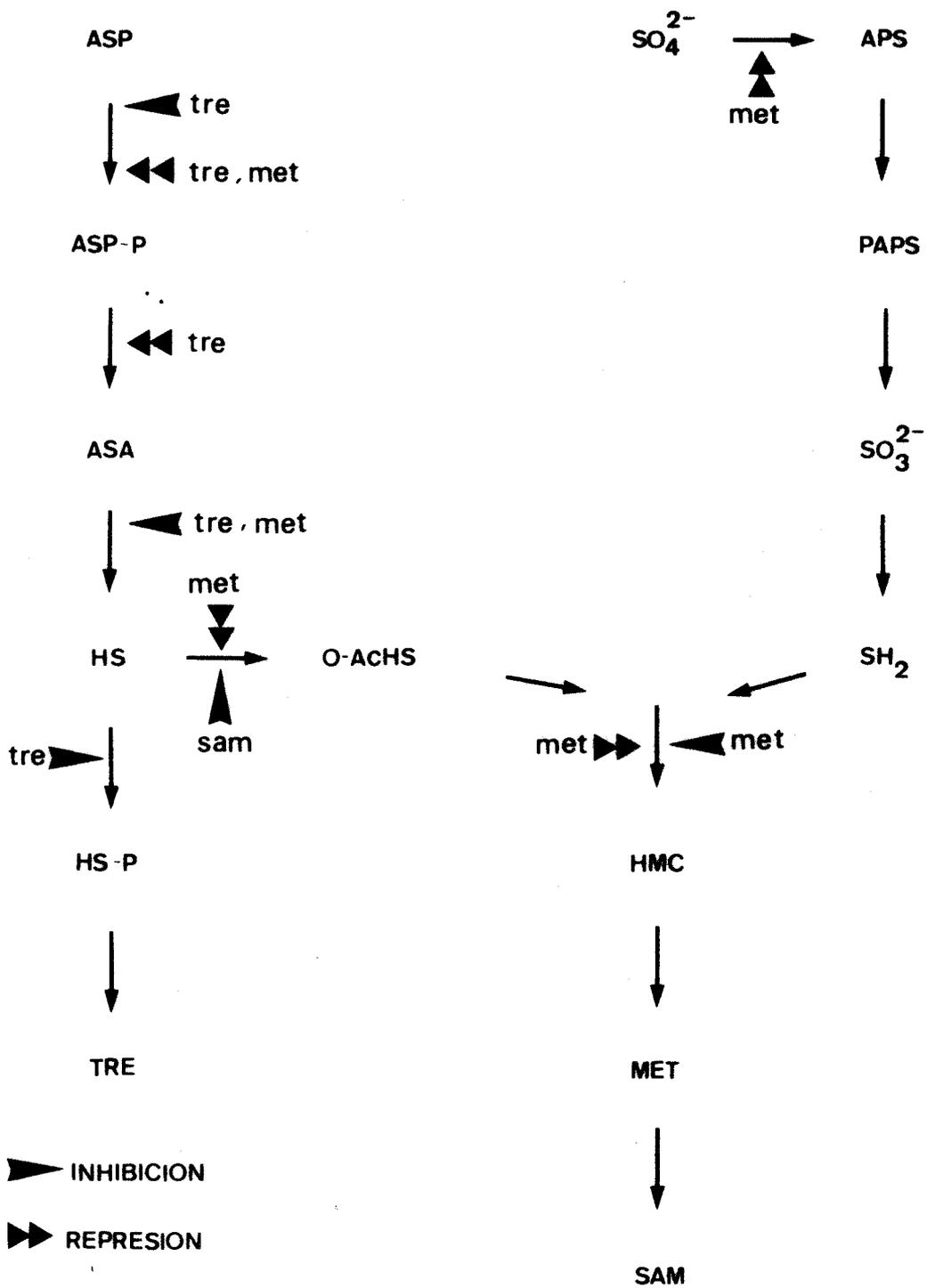


FIG 1-9 REGULACION BIOSINTESIS TREONINA Y METIONINA EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

ABREVIATURAS USADAS EN LA FIGURA ANTERIOR

ASP : Acido aspártico

ASP-P : Aspartil-Fosfato

ASA : Aspartato-semialdehido

HS : Homoserina

HS-P : Homoserina fosfato

TRE : Treonina

O-AcHS : O-Acetil Homoserina

HMC : Homocisteina

APS : Adenosil-5'-fosfo-sulfato

PAPS : 3'-Fesfo-adenosil-5'-fosfosulfato

MET : Metionina

SAM : S-adenosil-metionina

I.4.- SINTESIS DE LISINA EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE .-

La biosíntesis de lisina en organismos superiores procede a través del ácido aminoadípico , a diferencia de la síntesis de lisina en procariontes , que empieza en el aspartato semialdehído y acaba en lisina, a través del ácido diaminopimélico . La figura I-10 representa la ruta de biosíntesis de lisina en Saccharomyces cerevisiae y su probable regulación . La tabla I-8 expone la relación gen-enzima de esta ruta .

Han sido varios los investigadores que dedujeron la ruta de biosíntesis de lisina en levaduras empleando cepas de Saccharomyces cerevisiae o de Candida utilis . Con todo , aún hay pasos enzimáticos donde no se conocen mutantes , seguramente debido a la dificultad de ensayo bioquímico que representan .

La biosíntesis del ácido 2-oxoadípico , presenta una serie de correlaciones con la formación del ácido 2-oxoglutarico en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Bhattacharjee y col. 1967 , Hogg y col. 1968) . Bhattacharjee y col. (1967) también demostraron que los mutantes en los genes LYS12 y LYS11 acumulaban homocitrónico , homoaconítico y homoisocitrónico . Por comodidad los mutantes auxotróficos para la lisina se clasificaron en dos grupos , los que requerían lisina estrictamente y los que requerían lisina o ácido aminoadípico (Bhattacharjee y col. 1972) . Este mismo autor y sus colaboradores obtuvieron otros mutantes (1967,1968) del segundo grupo y estudiaron los metabolitos que se acumulaban en sus pools , presentándose tres grupos bien definidos : mutantes lys7 , lys8

- TABLA I-8 -

RELACION GEN-ENZIMA EN LA RUTA DE BIOSINTESIS DE LISINA
DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

<u>ETAPA</u>	<u>GEN</u>	<u>ENZIMA</u>
1		Homocitrato Sintetasa
2	<u>LYS7</u>	Homocitrato Dehidratasa
3	<u>LYS4</u>	Homoaconitato Hidratasa (EC 4.2.1.3)
	<u>LYS8</u>	
	<u>LYS10</u>	
	<u>LYS6</u>	
	<u>LYS16</u>	
4	<u>LYS12</u>	2-Hidroxi-3-Carboxiadipato deshidrogenasa (Homoisocitrato deshidrogenasa)(EC 1.1.1.87)
	<u>LYS11</u>	
5		Oxalglutarato descarboxilasa
6		Glutámico- α -Oxoadipico transaminasa
7		δ -Adenil- α -Amino adipico sintetasa
8		δ -Adenil- α -Amino adipico reductasa
9	<u>LYS2</u>	2-Amino adipato-Semialdehido deshidrogenasa (EC 1.2.1.31)
	<u>LYS5</u>	
10	<u>LYS9</u>	Sacaropina deshidrogenasa (EC 1.5.1.9) (NAD , Glutamato como producto)
	<u>LYS13</u>	
	<u>LYS14</u>	

- TABLA I-8 (cont.) -

<u>ETAPA</u>	<u>GEN</u>	<u>ENZIMA</u>
11	<u>LYS1</u>	Sacaropina deshidrogenasa (EC 1.5.1.9) (NAD(P) , Lisina como producto)
	<u>LYS15</u>	No conocida

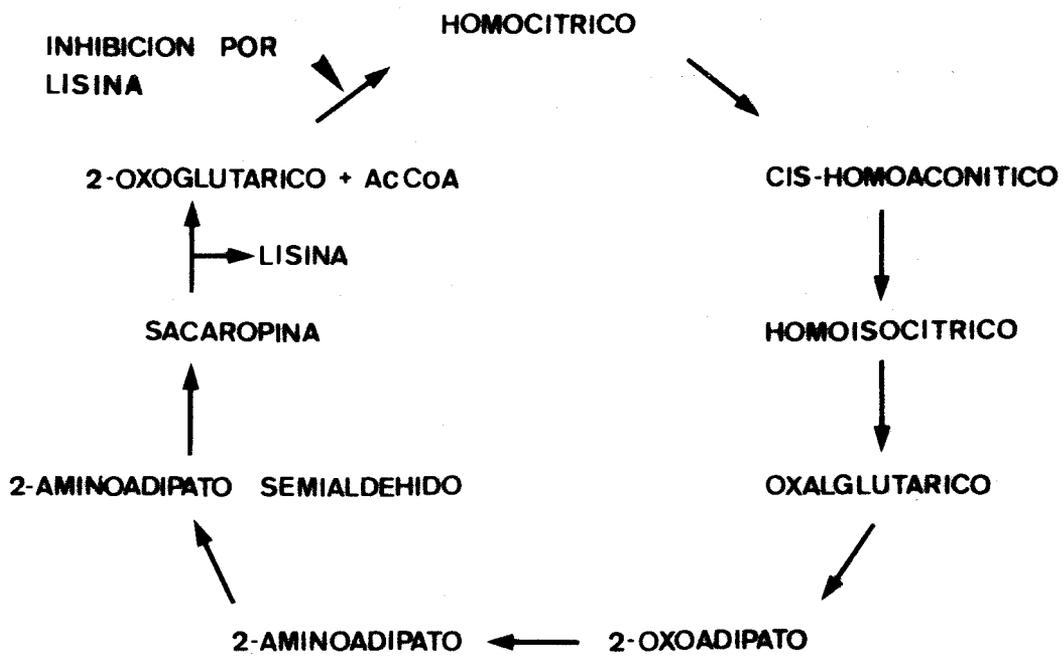


FIG.1-10 BIOSINTESIS DE LISINA Y SU REGULACION
EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

que acumulan homocitríco y homoacónitico y mutantes lys12 que acumulan homocitríco , homoacónitico y homoisocitríco .

Shina y col. (1970) demuestran que el paso desde ácido α -aminoadípico a α -aminoadípico- δ -semialdehído implica tres reacciones diferentes :

- a) Activación del aminoadípico a aminoadípico- δ -adenilato .
- b) Reducción de éste a α -aminoadípico- δ -adenil-semialdehído .
- c) Hidrólisis de este último para dar AMP y α -aminoadípico- δ -semialdehído .

Los mutantes en los genes LYS2 y LYS5 poseen las actividades primeras y segundas , pero carecen de la actividad hidrolítica . Estos dos genes no están ligados entre sí y controlan la misma etapa . Aunque Stressman y col. (1964) han demostrado la síntesis enzimática del ácido homocitríco en levaduras , no se han encontrado mutantes en este gen en S. cerevisiae , aunque sí en Saccharomycopsis lipolytica (Gaillardin , 1979) . Jones y Broquist (1965,1966) y Saunders y Broquist (1966) han descrito mutantes del grupo I afectados en la síntesis de sacaropina y en la ruptura de ésta a lisina más 2-oxoglutámico . Queda indeterminado el papel del ácido oxalglutámico , en la síntesis de lisina por Saccharomyces cerevisiae (Bhattacharjee , 1969) . Los estudios de Glass y col. (1971) en Rhodotorula glutinis han conducido a la obtención de los mismos tipos de mutantes descritos en Saccharomyces cerevisiae .

A diferencia de la ruta de biosíntesis de metionina y treonina , no es muy conocida la regulación de la biosíntesis de lisina en S. cerevisiae , aunque hay una serie de datos obtenidos con Candida utilis .

En 1967 , Maragoudakis y col. utilizando un mutante lys4 que excretaba ácido homocitríco , estudió la relación entre concentración de lisina en el medio y el ácido homocitríco excretado , viendo que la excreción aparece sólo cuando la concentración de lisina en el medio es baja ; postularon un papel regulatorio de la lisina sobre la homocitrato sintetasa . Tucci y Ceci (1972a) purificaron este enzima en S. cerevisiae separando dos tipos de actividad enzimática , que se presentaban en cantidades aproximadamente iguales a lo largo de las distintas fases de crecimiento . Un tipo de actividad , parece más sensible a represión por lisina que la segunda . Sin embargo , el efecto inhibitorio de la lisina sobre las dos actividades es bastante escaso , tanto in vivo como in vitro . Aunque previamente se habia demostrado que la adición de lisina 0,2 mM al medio reduce aproximadamente al 50% la incorporación de acetato radiactivo en lisina (Tucci , 1969) , las dos isoenzimas de la homocitrato deshidrogenasa presentan una inhibición por lisina 20 mM del 58% y el 95% in vivo e in vitro , respectivamente . Por tanto hay una inhibición de la síntesis de lisina a concentraciones mucho menores de las precisas si la homocitrato sintetasa fuese el enzima regulador de la ruta .

En un trabajo posterior , Tucci y Ceci (1972b) demostraron que hay

una etapa posterior a la síntesis del ácido aminoadípico , en la que se se regula verdaderamente la ruta , quedando la homocitrato sintetasa como un punto de regulación no muy sensible . Ya que este tipo de regulación es típico de rutas ramificadas , Tucci y Ceci diseñaron un experimento para probar esta posibilidad , con resultados negativos , salvo que el segundo producto teóricamente derivado del aminoadípico no sea esencial para el crecimiento o pueda sintetizarse por otra vía .

No hay nada establecido sobre este punto de control , ya que la sacaropina deshidrogenasa no parece admitir inhibición por lisina (Fujioka y col. 1972) . Recientemente , Gaillardin y col. (1979a) han demostrado que en Saccharomycopsis lipolytica , la sacaropina deshidrogenasa está sometida a represión por lisina específicamente y por un sistema general de control que afecta a la síntesis de enzimas de rutas biosintéticas de aminoácidos , análogo al existente en S. cerevisiae (Wolfner y col. 1975 ; Pierard y col. 1979 ; Messenguy y col. 1977).

En Penicillium chrysogenum , Luengo y col. (1980) encuentran que la actividad homocitrato sintetasa es inhibible y represible por lisina .

A pesar de lo dicho anteriormente sobre el dudoso papel regulador de la homocitrato sintetasa , hay una serie de evidencias en mutantes de Saccharomyces cerevisiae resistentes a S-2-aminoetil-cisteína e Hidroxilisina (Sinha y col. 1971 ; Gray y col. 1976 ; Haidaris y col. 1977) y mutantes de Saccharomycopsis lipolytica resistentes a 4,5-transdehidro-

lisina (Gaillardin , 1975 ; Gaillardin 1979b) . Estos mutantes tienen un fenotipo sobreproductor de lisina y se ha comprobado bioquímicamente que su homocitrato sintetasa no responde a la inhibición por lisina . Todo esto hace que la regulación de la ruta de biosíntesis de lisina en levaduras , no esté totalmente aclarada .

I.5.- REGULACION DEL METABOLISMO PRIMARIO . OBTENCION DE MUTANTES DES- REGULADOS .-

Las rutas del metabolismo primario están implicadas en la biosíntesis de moléculas esenciales para el crecimiento . Estas rutas suelen ser idénticas o muy similares en amplios grupos de microorganismos , aunque difieren en su regulación .

Los estudios sobre regulación del metabolismo primario , se han llevado a cabo en una serie de microorganismos (Escherichia coli , Salmonella typhimurium , Bacillus subtilis , Pseudomonas aeruginosa , Pseudomonas putida , Neurospora crassa , Aspergillus nidulans , Saccharomyces cerevisiae) generalmente no utilizadas industrialmente , pero de la regulación de su metabolismo se han derivado una serie de principios fundamentales .

En los comienzos de los estudios de las fermentaciones industriales se pensó más útil para el aumento de producción , la adición de precursores al medio de cultivo , que la mejora genética . Sin embargo , estas adiciones no suelen tener éxito y actualmente se tiende a modificar los mecanismos de regulación que actúan sobre la síntesis y actividad de los enzimas (Demain , 1973 ; Demain , 1980 ; Nakayama , 1976) .

Existen cuatro mecanismos principales de regulación de la actividad enzimática :

a) Modificación de la actividad enzimática por fosforilación y desfos-

forilación .

- b) Activación o inactivación proteolítica de las enzimas .
- c) Activación por moléculas no unidas covalentemente o que actúan como pequeños coactivadores .
- d) Retroinhibición .

Este último tipo de control es el más importante dentro de las rutas de biosíntesis de aminoácidos y actúa sobre el primer enzima de la ruta . Si la ruta de biosíntesis es ramificada , la retroinhibición afectará al primer enzima de la ruta común y al primer enzima de cada ramificación .

Sin embargo , los productos finales pueden comportarse de diferente forma en cuanto a su capacidad de inhibición sobre el primer enzima de la ruta . En un tipo de regulación , ambos productos finales han de estar presentes para ejercer efecto inhibitorio (inhibición concertada o multivalente) ; este es el caso de la biosíntesis de lisina , treonina y metionina por las bacterias de los géneros Brevibacterium y Corynebacterium ; una auxotrofia que conduzca a la desaparición de uno de los productos finales , disminuye totalmente la inhibición de la ruta , siendo quizás el caso más sencillo de desregulación .

En otro tipo de regulación , el efecto inhibitorio de cada producto final es aditivo (inhibición acumulativa o aditiva) o bien el paso primero de biosíntesis está llevado a cabo por tantas isoenzimas como

productos finales hay y cada producto final regula una de estas isoenzimas , este es el caso de la síntesis de lisina , metionina y treonina en Escherichia coli y la síntesis de aminoácidos aromáticos en Saccharomyces cerevisiae (Meuris 1967 , 1969) .

La regulación de la síntesis enzimática se ejerce en la biosíntesis de aminoácidos a través de los aminoacil-ARN_t que actúan como corepresores de una proteína aporepresora . En rutas ramificadas puede darse el fenómeno de represión concertada (el represor necesita para ser activo , la unión de todos los corepresores finales) o represión acumulativa (el complejo aporepresor más uno de los productos finales sólo es parcialmente activo como represor , y necesita la unión de los demás corepresores para volverse totalmente activo) .

Además de las etapas que controlan la velocidad de una ruta , existen otras que limitan la velocidad de la ruta , aunque no la controlan . La determinación de estas etapas es de gran importancia en la elección de un microorganismo con fines industriales (Hütter , 1979) .

La forma más general de obtener mutantes desregulados es la selección de mutantes resistentes a análogos tóxicos del producto final . Estos mutantes están afectados a nivel de síntesis o de actividad de enzimas reguladoras y superproducen el producto final natural . Como ruido de fondo , se obtienen otros mutantes resistentes , generalmente alterados en la permeabilidad para el análogo tóxico . En la tabla I-9 se re-

cogen algunos análogos de aminoácidos usados corrientemente .

Un método alternativo para desensibilizar un enzima a la retroinhibición por el producto final es conseguir revertientes a partir de mutantes que carezcan de este enzima . Con cierta frecuencia , pueden obtenerse revertientes cuyas enzimas tengan en sus secuencias de aminoácidos alteraciones , que recuperen la actividad pero impidan la retroinhibición por el producto final (Reh y col. 1969 ; Demain y col. , 1966) .

En el caso de que el metabolito deseado sea un intermediario de una ruta o un producto final de una ruta ramificada , la introducción de otras auxotrofias ayudan a la acumulación del producto buscado . Varios casos de este tipo se muestran en la figura I-11 , dónde se señalan las auxotrofias introducidas y los metabolitos que deben acumularse , si el mutante está mal alimentado (Demain , 1972) .

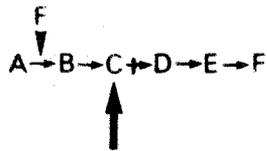
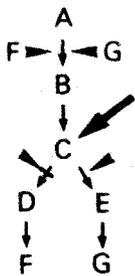
Lo expresado anteriormente es aplicable a todos los casos de producción de metabolitos primarios y a muchos casos de metabolitos secundarios , aunque en estos últimos la aplicación de los métodos anteriores se ve limitada por el desconocimiento de la ruta de biosíntesis y del estado de idiofase (fase del cultivo en la que tiene lugar la síntesis y excreción de metabolitos secundarios) .

Una característica que aumenta la producción de un determinado metabolito es la alteración de las barreras de permeabilidad que difi-

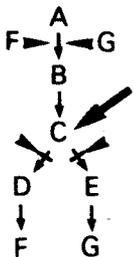
- TABLA I-9 -

ANALOGOS DE AMINOACIDOS MAS COMUNES

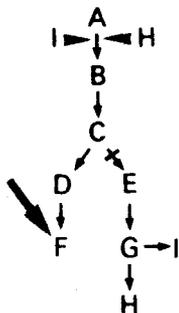
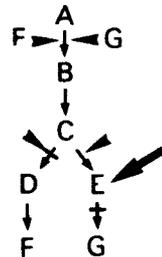
AMINOACIDO	ANALOGO
Fenilalanina	p-Fluorofenilalanina , tienilalanina
Tirosina	p-Fluorofenilalanina , D-triptófano
Triptófano	5-Metiltriptófano , 6-Metiltriptófano
Histidina	2-Tiazoalanina , 1,2,4-Triazol-3-Alanina
Prolina	3,4-Dehidroprolina
Valina	α -Aminobutirico
Isoleucina	Valina
Leucina	Trifluoroleucina , 4-Azaleucina
Treonina	α -Amino- β -Hidroxisalícico
Metionina	Etionina , Norleucina , γ -metilmetionina
Arginina	Canavanina



POBRE ALIMENTACION DE F



POBRE ALIMENTACION DE F Y G



POBRE ALIMENTACION DE I Y H

➡ PRODUCTO ACUMULADO

+➔ MUTACION AUXOTROFICA

➤ INHIBICION POR PRODUCTO FINAL

FIG.1-11 ACUMULACION DE METABOLITOS DEBIDA A POBRE ALIMENTACION DE UN PRODUCTO FINAL INHIBIDOR

cultan la salida del metabolito superproducido (papel de la biotina en las fermentaciones productoras de ácido glutámico o lisina) .

Aparte de los mecanismos regulatorios descritos anteriormente conviene reseñar la existencia en Saccharomyces cerevisiae y otras levaduras de un mecanismo general de regulación , en la síntesis de aminoácidos , cuyo sentido no está totalmente aclarado (Delforge y col. , 1975 ; Miozzari y col. , 1978 ; Wolfner y col. 1975) . Según el trabajo de Wolfner y col. las células de levadura en un medio de hambre para cualquiera de los aminoácidos arginina , histidina , lisina o triptófano desreprimen concertadamente la síntesis de los enzimas biosintéticos de estos aminoácidos . Estos autores , describen dos tipos de mutantes , alterados en este control . Mutantes eas incapaces de desrepresión y con un fenotipo de supersensibilidad a análogos de aminoácidos y mutantes tra , con fenotipo de desrepresión continua y al mismo tiempo termosensibilidad en el crecimiento , de modo que estos mutantes se estacionan a 37°C como células sencillas y sin yemas . Parece que la información sobre el estado de biosíntesis de aminoácidos es uno de los requisitos para comenzar el ciclo celular.

I.6.- OBJETIVO Y ESTRATEGIA DE NUESTRO TRABAJO .-

El objetivo de nuestro trabajo consiste en la obtención y estudio de mutantes de Saccharomyces superproductores y excretores de lisina , treonina y metionina .

La levadura es un subproducto muy importante de grandes industrias dedicadas a la fabricación de cerveza u otras bebidas alcohólicas , es cultivada en gran cantidad para su empleo en panadería o en fermentaciones productoras de alcohol ; por último , existen plantas industriales dónde la levadura son usadas , ellas o sus subproductos , como correctores alimenticios en piensos . En la tabla I-10 representamos una estima de la producción en 1977 de levaduras , tanto de panaderías como de levaduras secas (cervecías , destilerías , etc.) , que da idea de la importancia de este mercado .

La levadura usada para alimentación animal es un poco más pobre en metionina que la harina de soja y más pobre en treonina , metionina y lisina que la harina de pescado (Tablas I-4 y I-5) . Es importante , modificar genéticamente cepas de Saccharomyces cerevisiae , a fin de aumentar sus contenidos en estos aminoácidos , consiguiendo así biomasa abundante y enriquecida en aminoácidos esenciales en la dieta . Estas levaduras pueden seguir teniendo su primitivo interés industrial (cervecía , alcohol) pero su valor económico sería mucho más alto . La in-

- TABLA I-10 -

PRODUCCION DE LEVADURAS EN EL AÑO 1977 (Ton. peso seco)

Origen	Levadura panaderias	Levadura seca
Europa	74.000	160.000
América del Norte	73.000	53.000
Oriente	15.000	25.000
Inglaterra	15.500	—
América del Sur	7.500	2.000
Africa	2.700	2.500

(H. J. Pepler , 1979)

roducción de estas características en levaduras de panadería resultaría también en un pan más enriquecido .

Comenzaremos con la obtención de mutantes superproductores de aminoácidos seleccionándolos bien por su resistencia a etionina (análogo de la metionina) o a tialisina (análogo de la lisina) . En la figura I-12 representamos la fórmula de estos aminoácidos y sus análogos.

La etionina puede sustituir a la metionina en las reacciones metabólicas , suprimiendo el crecimiento celular , afectando la transferencia de grupos metilos y la síntesis de proteínas (Singer y col. 1978) . La tialisina actúa como análogo estructural y no metabolizable de la lisina y produce una represión y/o inhibición permanente de la biosíntesis de este aminoácido .

La obtención de estirpes superproductoras de treonina se intentó por reversión de una estirpe sin actividad aspartoquinásica . Entre los revertientes se buscaron aquellos que también habían perdido el control regulatorio del enzima .

Otras aproximaciones experimentales como la obtención de mutantes con proteínas enriquecidas en un determinado aminoácido (Momose y col. 1978) , etc. son factibles pero no han sido utilizadas aquí .

Los mutantes obtenidos se caracterizaron genéticamente (número y características de los genes implicados en el proceso) y fisiológicamente (cantidad de aminoácido excretada y/o almacenada en el pool , cinética

de aparición del aminoácido en medio líquido) .

Como final se logró la obtención de estirpes superproductoras de dos aminoácidos distintos , por recombinación entre dos parentales productores de un solo tipo de aminoácido .

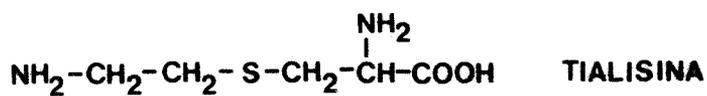
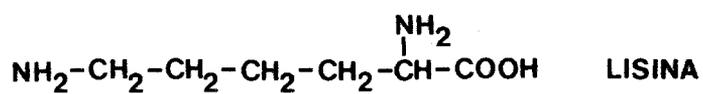
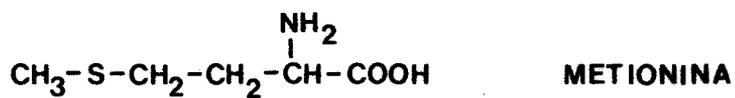
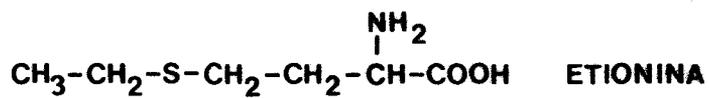


FIG.1-12 ESTRUCTURAS DE AMINOACIDOS Y
ANALOGOS .

MATERIAL Y METODOS

II.1.- MICROORGANISMOS UTILIZADOS .-

En la realización de este trabajo se han utilizado las estirpes de colección que a continuación detallamos , junto con su genotipo y procedencia (Tabla II-1) .

- TABLA II-1 -

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo</u>	<u>Origen</u>
F3	α <u>thr4</u>	G. R. Fink
F5	α <u>ade2-1</u>	G. R. Fink
F6	<u>a</u> <u>ade2-1</u>	G. R. Fink
F19	α <u>lys2</u>	G. R. Fink
F16	α <u>his4</u> <u>ade2-1</u> <u>can</u> ^r	G. R. Fink
MC40	<u>a/a</u> <u>lys1/lys1</u>	M. Culbertson
MC197	<u>a</u> <u>adel</u> <u>trp1</u> <u>ura3</u> <u>his2</u> <u>arg4</u> <u>met14</u> <u>lys2</u>	M. Culbertson
MC215	α <u>thr1</u> <u>arg1</u>	M. Culbertson
MC25	<u>a</u> <u>ino1-13</u> <u>ino4-8</u>	M. Culbertson
XK36A	α <u>his4</u> <u>leu1</u> <u>kar1-1</u> <u>nys</u> ^r	J. Polaina
D2862A	<u>a</u> <u>adel</u> <u>his1</u>	I. López
XJB31B	α <u>met6</u> <u>gal2</u>	Y. G. S. C.
XJB31D	<u>a</u> <u>met6</u> <u>gal1</u> <u>gal2</u>	Y. G. S. C.
X2180-1D	α <u>SUC</u> <u>mal</u> <u>gal2</u> <u>CUP1</u>	Y. G. S. C.

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo</u>	<u>Procedencia</u>
X2180-1A	<u>a</u> <u>SUC</u> <u>mal</u> <u>gal2</u> <u>CUP1</u>	Y. G. S. C.
STX13-2A	α <u>ilv1</u> <u>lys1</u> <u>ade5,7</u> <u>aro10</u> <u>met8</u> <u>ura4</u>	Y. G. S. C.
S2207A	α <u>hom3</u> <u>gal2</u> <u>his6</u> <u>ura3</u>	Y. G. S. C.
SL2103A	α <u>his5-2</u> <u>lys1-1</u> <u>trp1-1</u> <u>aro7-1</u> <u>ilv1-1</u> <u>leu2-1</u> <u>ade3-26</u> <u>met8-1</u>	Y. G. S. C.
5307-130	α <u>met2</u> <u>leu2</u> <u>lys7</u> <u>trp1</u> <u>ura4</u>	Y. G. S. C.

Y. G. S. C. : Yeast Genetic Stock Center

Para la determinación por bioensayo de la metionina , se utilizó Pediococcus cerevisiae (Leuconostoc mesenteroides) P60 de la Colección Española de Cultivo Tipos .

II.2.- MEDIOS DE CULTIVO .-

YPD .- Medio rico

Extracto de levadura	10 g/l
Bacto-Peptona	20 g/l
Glucosa	20 g/l

MM .- Medio mínimo

Sulfato amónico	2 g/l
Fosfato monopotásico	0,875 g/l
Fosfato bipotásico	0,125 g/l
Cloruro sódico	0,1 g/l
Cloruro cálcico	0,076 g/l
Sulfato magnésico	0,5 g/l
Biotina	2,0 mg/l
Piridoxamina	0,4 mg/l
A. Pantoténico	0,4 mg/l
Tiamina	0,4 mg/l
A. Bórico	0,01 mg/l
Sulfato cúprico . 5 H ₂ O	0,01 mg/l
Iódido potásico	0,1 mg/l
Cloruro férrico . 6 H ₂ O	0,05 mg/l
Sulfato de zinc . 7 H ₂ O	0,07 mg/l
Glucosa	20 g/l

El medio mínimo se suplementa con los requerimientos auxotrófi-

cos adecuados a razón de 40 mg/l . El pH se ajusta a 5,5 .

GNA .- Medio de preesporulación

Extracto de levadura	8 g/l
Bacto-Peptona	3 g/l
Glucosa	100 g/l

SPO .- Medio de esporulación

Acetato potásico	10 g/l
Extracto levadura	1 g/l
Glucosa	0,5 g/l

Todos los medios anteriores se solidificaron con agar Oxoid num. 1 a concentración de 18 g/l y se esterilizaron a una atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos .

II.3.- MUTAGENESIS CON N-METIL-N'-NITRO-N-NITROSOGUANIDINA (NG) .-

Se realiza en fase exponencial (cultivo de 18 horas , crecido en agitación a 28°C) . Una alícuota de 5 ml. de cultivo se lava y resuspende en tampón Tris-Maleico 0,1 M , pH 5,5 , de aquí se toman alícuotas para cálculo del número total de células . Se añade NG hasta una concentración final de 0,1 mg/ml. Incubar 15 minutos a 28°C , en reposo y oscuridad . Centrifugar durante 15 minutos a 5.000 r.p.m. Lavar dos veces , con tampón fosfato 0,1 M , pH 7 , y resuspender en 5 ml. de este tampón . De aquí se toman alícuotas para medir supervivencias y para sembrar en los distintos medios .

II.4.- MUTAGENESIS CON ETILMETANOSULFONATO (EMS) .-

Sobre cultivos en fase estacionaria . Una alícuota de 10 ml. se lava y resuspende en 10 ml. de tampón fosfato 0,1 M , pH 8,0 . De aquí se toman alícuotas para conteo de número total de células . Se añade EMS hasta una concentración final del 3% , agitando vigorosamente . Incubar una hora a 28°C . La mutagénesis se para lavando una vez con una solución de tiosulfato sódico al 10% (esterilizado por filtración y preparado fresco) y dos veces con tampón fosfato , las células se resuspenden en un volumen de 10 ml. y se toma una alícuota para conteo de supervivencia .

II.5.- FORMACION Y AISLAMIENTO DE DIPLOIDES .-

Los diploides se forman mezclando los dos sexos opuestos sobre una placa de YPD . Los cigotos se suelen observar al microscopio al cabo de seis horas . Si las auxotrofias de las estirpes parentales se complementan , los diploides se aislan en medio minimo . En caso contrario , los cigotos se aislan por micromanipulacion .

II.6.- ESPORULACION Y DISECCION DE LAS ASCAS .-

Se crecen los diploides en medio GNA durante 24 horas y luego se pasan a medio SPO . Al cabo de tres dias o cuatro se observan al microscopio abundantes ascas .

A una suspensión de éstas células en 0,3 ml. de agua estéril se añade una gota de glusulasa y tras , aproximadamente , diez minutos puede verse al microscopio que las ascas comienzan a disgregarse . Se diluye con 1 ó 2 ml. de agua estéril para detener la acción de la glusulasa y la mezcla se lleva a placas de YPD , dónde se micromanipulan (R. K. Mortimer , 1969) .

II.7.- DETERMINACION DE AUXOTROFIAS Y SEXO .-

Las auxotrofias se determinan por réplica con terciopelo sobre los distintos medios . El sexo , cruzando la cepa de sexo desconocido

con dos estirpes de sexo a y alfa respectivamente . En nuestro caso , se utilizaron X2180-1A y X2180-1D (estirpes silvestres tipo) .

II.8.- TRANSFERENCIA CITOPLASMICA DESDE UNA ESTIRPE A OTRA USANDO EL MUTANTE kar1-1 .-

Se emplea fundamentalmente el protocolo descrito por Conde y Fink (1976) .

La estirpe cuyo citoplasma se quiere transferir , se cruza con una estirpe de sexo opuesto , petite y portadora de la mutación kar1-1 . Tras la conjugación , se seleccionan colonias con las características auxotróficas del núcleo del parental kar1-1 y además no petite (capaces de crecer en glicerol como única fuente de carbono) . Estas estirpes tienen un citoplasma mezcla de ambos parentales .

En un segundo paso , una de estas estirpes se cruza con la estirpe receptora de citoplasma , que se ha hecho previamente petite usando bromuro de etidio . Se seleccionan clones con las auxotrofias del núcleo de la estirpe receptora y citoplasma mezcla de ambos parentales .

Los cigotos de todos estos cruces son seleccionados en la mezcla conjugante por micromanipulación .

II.9.- NOMENCLATURA DE ESTIRPES DIPLOIDES Y SUS DERIVADOS MEIOTICOS .-

Hemos nombrado con las iniciales MDX o JGX , seguidas de uno o dos números , a las estirpes diploides obtenidas a lo largo de este trabajo y utilizadas en el estudio genético de los mutantes excretorios.

Los derivados meióticos de estas estirpes , se han nombrado con las iniciales del diploide dónde provienen más un número y una letra que indican la tetrada y la espora de la que procede concretamente la estirpe en cuestión .

II.10.- DETERMINACION DE LA EXCRECION POR TEST DE ALIMENTACION CRUZADA .-

La excreción se determinó en medio sólido , usando un test de alimentación cruzada donde se probaba si una colonia del presunto excretor era capaz o no de alimentar a un césped auxotrofico para un requerimiento determinado .

Para ello , sobre placas de medio mínimo con los requerimientos necesarios y bien secas , se extiende con pipeta un césped auxotrofico a una concentración de 10^6 células/placa . El césped se fabrica a partir de un inóculo crecido en YEPD hasta fase estacionaria y diluido 100 veces en agua estéril . Una vez extendido el césped y seca la placa , se siembran con palillos las colonias a probar . En caso de excreción se observa un halo de crecimiento del césped alrededor de la colonia

excretora , generalmente a las 48 horas . Este halo es visible a simple vista , aunque normalmente se utiliza una lupa para verlo mejor . Es necesario ajustar el pH del medio hasta aproximadamente pH7 para evitar fenómenos Killer , que alteran totalmente los resultados .

La elección de la estirpe auxotrofica que se utiliza como césped es muy importante ya que puede dar lugar a distintos resultados experimentales . No parece que el sexo del césped sea importante ya que en el medio donde se prueba la excreción (medio mínimo) no hay fenómenos significativos de conjugación entre la estirpe excretora y el césped , con crecimiento de los diploides . En cambio , si es muy importante la mayor o menor limpieza de la auxotrofia del césped . El uso de céspedes bradi- trofos (con auxotrofias no muy estrictas) permite detectar umbrales más bajos de excreción , usando céspedes perfectamente auxotrofos se seleccionan excretoras con niveles de producción más alto . Particularmente en el caso de los excretoras de metionina , tres tipos de céspedes se han utilizado :

- a) La estirpe XJB31D , mutada en el gen MET6 . Esta estirpe es perfectamente auxotrofica y muy estricta en la selección de excretoras , habiendo varios excretoras débiles que no pueden alimentarla .
- b) La estirpe STX13-2A , lleva una auxotrofia en el gen MET8 y requiere metionina u homocisteina . Un excretor capaz de alimentar este césped podría excretar homocisteina , sin embargo nunca se ha de-

tectado homocisteina en los análisis de los exudados por cromatografía de gases . Esta estirpe muestra un claro carácter braditrofo cuando se siembra en un medio sin metionina . Como césped se emplea mucho más diluido que la estirpe anterior y es capaz de detectar excreciones más débiles .

- c) Estirpe 5307-130 , lleva una mutación en el gen MET2 , requiere metionina u homocisteina . De carácter braditrofo intermedio entre las dos estirpes anteriores .

Para detectar la excreción de lisina o de treonina , se emplearon respectivamente las estirpes MC40 (a/a lys1/lys1) y MC215 (thr1 arg1) . Ambas son muy limpias en sus requerimientos .

II.11.- DETERMINACION DEL PESO SECO .-

Se calcula pasando 50 ml. de cultivo por un filtro Millipore de 0,45 u de diámetro de poro . Se lava pasando 100 ml. de agua destilada y el filtro con la biomasa retenida se seca en una estufa a 45°C hasta peso constante . La diferencia entre el peso inicial y final se toma como peso seco .

II.12.- OBTENCION DE LOS EXUDADOS Y POOLLES .-

Los aminoácidos libres del exudado se determinan a partir de una

alícuota de medio de cultivo centrifugado y filtrado a través de un filtro Millipore . El pool se extrae tratando aproximadamente 300 mg (en peso húmedo de biomasa) con 10 ml. de agua destilada , precalentada a 100°C , en un tubo cerrado . Se mantiene a Baño María durante 15 minutos . Pasado este tiempo , se centrifuga y filtra por Millipore . Exudados y pools se conservan congelados hasta el momento de su medida .

II.13.- DETERMINACION DE LISINA .-

La producción de lisina en el caldo de cultivo se determinó por la técnica de Chinard (1952) . Este método se basa en la reacción de la lisina y algunos otros aminoácidos (prolina , ornitina) con la ninhidrina en medio ácido . A 1 ml. de problema se le añade 1 ml. de ácido acético glacial y 1 ml. de solución ácida de ninhidrina (0,4 ml. de ácido fosfórico 6M , 0,6 ml. de ácido acético y 25 mg. de ninhidrina) , preparada diariamente . Los tubos se cierran y la reacción tiene lugar calentando a Baño María , durante una hora . Se para , enfriando los tubos y ajustando su volumen hasta 5 ml. con ácido acético glacial frío. El blanco se prepara sustituyendo el problema por 1 ml. de agua destilada . El color resultante se lee a 540 nm. El método es lineal desde 10 a 80 mg/l de lisina monoclóhidrato . El error de distintas medidas de la misma muestra oscila sobre el 1% .

II.14.- DETERMINACION DE L-METIONINA .-

Debido a las pequeñas cantidades de L-Metionina presentes en el extracto crudo , pooled y exudados de las cepas excretoras , se midió ésta por el método biológico , recomendado por la casa Difco (Manual Difco , 5ª Edición) que usa una cepa de Pediococcus cerevisiae P60 ATCC 8042 . A 5 ml. del medio rehidratado (105 g/l) se le añade distintas alícuotas del problema y agua destilada , hasta un volumen de 10 ml. y se inocula con dos gotas de un cultivo de P. cerevisiae , diluido en solución salina . Se incuba a 37°C , durante 24 horas , luego se determina el crecimiento midiendo turbidez a 560 nm. El método es lineal desde 0,0 hasta 50 ug/10 ml. de mezcla final .

II.15.- DETERMINACION DE TREONINA Y HOMOSERINA .-

Estos dos aminoácidos se determinaron por cromatografía de gases , en un cromatografo Perkin-Elmer F11 , según el método de Roach y Gehrke (1969a , 1969b) modificado por Gehrke y col. (1971) .

A la muestra a analizar se le añade como control interno 1 ml. de una solución de Norleucina (1mg/ml) y se lleva , si procede , hasta un volumen de 20 ml. con agua destilada . Esta mezcla se pasa por una columna de Amberlita CG 120 AR , en forma protonada , con un flujo de 1 a 2 ml/min. Se lava con 70 ml. de agua destilada para eliminar moléculas no pegadas a la resina . Los aminoácidos se eluyen con 25 ml. de

hidróxido amónico 3N , seguido de 50 ml. de agua destilada . Este eluato se recoge en matraces para rotovapor y se evaporan a 60°C en atmósfera de nitrógeno y presión reducida .

El residuo seco se disuelve en 10 ml. de clorhídrico 3N en n-Butanol (usando baño de ultrasonidos). Los matraces se colocan a reflujo en baño de aceite a 100°C durante 45 minutos . Tras este tiempo , el residuo se vuelve a disolver en el baño de ultrasonidos (15 segundos) y se somete a 30 minutos más de reflujo . Luego se evapora en rotovapor en atmósfera de nitrógeno y presión reducida , a 70°C .

Las muestras se acilan añadiéndoles 5 ml. de una solución al 25% V/V de anhídrido de trifluoroacético en diclorometano . Esta mezcla se lleva a un tubo de aciclación y se tiene 5 minutos en baño de aceite a 150°C , quedando las muestras preparadas para ser inyectadas en el cromatógrafo . Usualmente se inyecta un volumen de 2 ul .

Los aminoácidos son identificados por su tiempo de retención y calculados por la fórmula

$$C_x = \frac{A_x}{A_i} F_x C_i$$

C_x : Concentración del aminoácido problema

C_i : Concentración del control interno (1 mg/ml)

A_x : Area del pico del aminoácido

A_1 : Area del pico control interno

F_x : Factor de respuesta relativa

Los factores de respuesta se habian hallado previamente (asi como los tiempos de retención) usando muestras puras de aminoácidos y empleando la fórmula

$$F_x = \frac{A_1 C_x}{A_x C_1}$$

Dónde C_x y C_1 son cantidades conocidas .

II.16.- DETERMINACION DE AZUCARES EN EL CALDO DE CULTIVO .-

La determinación de azúcares se llevó a cabo por el método de Dubois y col. (1951) . A 2 ml. de problema se añade 0,1 ml. de una solución de fenol al 80% en agua destilada y 5 ml. de ácido sulfúrico concentrado . Se deja reposar durante treinta minutos y se lee al espectrofotómetro a 490 nm. El método es lineal desde 5 a 25 mg/1 de glucosa .

II.17.- OBTENCION DEL EXTRACTO CRUDO PARA ENSAYOS ENZIMATICOS .-

Se parte aproximadamente de 1,5 l. de cultivo en medio minimo , suplementado con los requerimientos adecuados . Cuando el cultivo se halla al final de la fase logaritmica , se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos y se lava dos veces con tampón fosfato potásico 0,2 M pH 7.0 .

Las células se resuspenden en un volumen igual de tampón y se le

añade aproximadamente , su mismo volumen de bolas de vidrio (0,5 mm. de diámetro) . Las células se rompen en un agitador de tubos , durante seis periodos de un minuto , alternando cada minuto de ruptura con un minuto de reposo en hielo (C. Gancedo , comunicación personal) . La eficacia de la ruptura se sigue por observación al microscopio en contraste de fase . Con este método se consiguen rupturas del 90% de las células .

El extracto turbio se retira con una pipeta Pasteur y se centrifuga a 15000 r.p.m. durante veinte minutos . El extracto claro resultante tiene un contenido en proteína de 40-50 mg/ml determinado por el método de Lowry (1951) .

II.18.- ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ASPARTOQUINÁSICA .-

La actividad de la aspartoquinasa se determinó por el método de Black y Wright (1955) con las modificaciones hechas por Stadtman y col. (1961) . El método se basa en la medida de la formación de un complejo , de color rojo , medible a 540 nm. , entre el aspartohidroxamato y el ión férrico . El aspartohidroxamato se forma por reacción entre el Aspartil-fosfato (producto de la reacción de la aspartoquinasa) y la hidroxilamina (uno de los componentes de la mezcla de reacción) .

El extracto crudo , obtenido de la forma anterior , se pone a dializar toda la noche , contra tampón fosfato potásico 0,02 M pH 7,0 más

mercaptoetanol 0,03 M . La mezcla de reacción contiene : ATP , 10,4 mM ; Tris-ClH , 94 mM , pH 8,1 ; SO_4 Mg , 1,6 mM ; L-Aspártico , 10 mM ; Hidroxilamina clorhidrato 800 mM ; extracto hasta un volumen total de 2 ml. . Se incuba a 28°C , durante treinta minutos . La reacción se para añadiendo 2 ml. de reactivo de Cl_3Fe (10 g. de Cl_3Fe y 3,3 g. de ácido tricloroacético en 100 ml. de ClH 0,7 N) . Se centrifuga y se lee a 540 nm.

El blanco de la reacción lleva sustituido el ácido aspártico por tampón de extracción . La actividad enzimática se mantiene bastante estable durante una semana , cuando el extracto se conserva a 4°C.

II.19.- ESPECIFICIDAD DEL ENSAYO ENZIMATICO .-

La especificidad del ensayo enzimático se demuestra al suprimir en la mezcla de reacción alguno de los integrantes . En todos los casos , se obtiene un incremento nulo de absorbancia (Tabla II-2) .

- TABLA II-2 -

<u>Ensayo</u>	<u>Increment. Absorbancia</u>
Completo	0,061
Sin ATP	0,02
Sin Aspárt.	0,00
Sin Extracto	-0,07
Sin Sales	-0,07

El incremento de absorbancia obtenido en el ensayo es proporcional a la cantidad de extracto puesto en él , cómo se señala en la figura II-1 .

La aspartoquinasa de una estirpe no desregulada , la F6 , muestra inhibición por treonina , con resultados similares a los encontrados en la bibliografía . En las mismas condiciones de ensayo , Stadtman y col. (1961) encuentran una inhibición del 91% por treonina y del 2% por metionina . Nosotros encontramos inhibición del 96% y 3% respectivamente , como se ve en la tabla II-3 .

- TABLA II-3 -

<u>Ensayo</u>	<u>Actividad</u>
Control	100 %
Control + 10 mM Treonina	4 %
Control + 10 mM Metionina	97 %

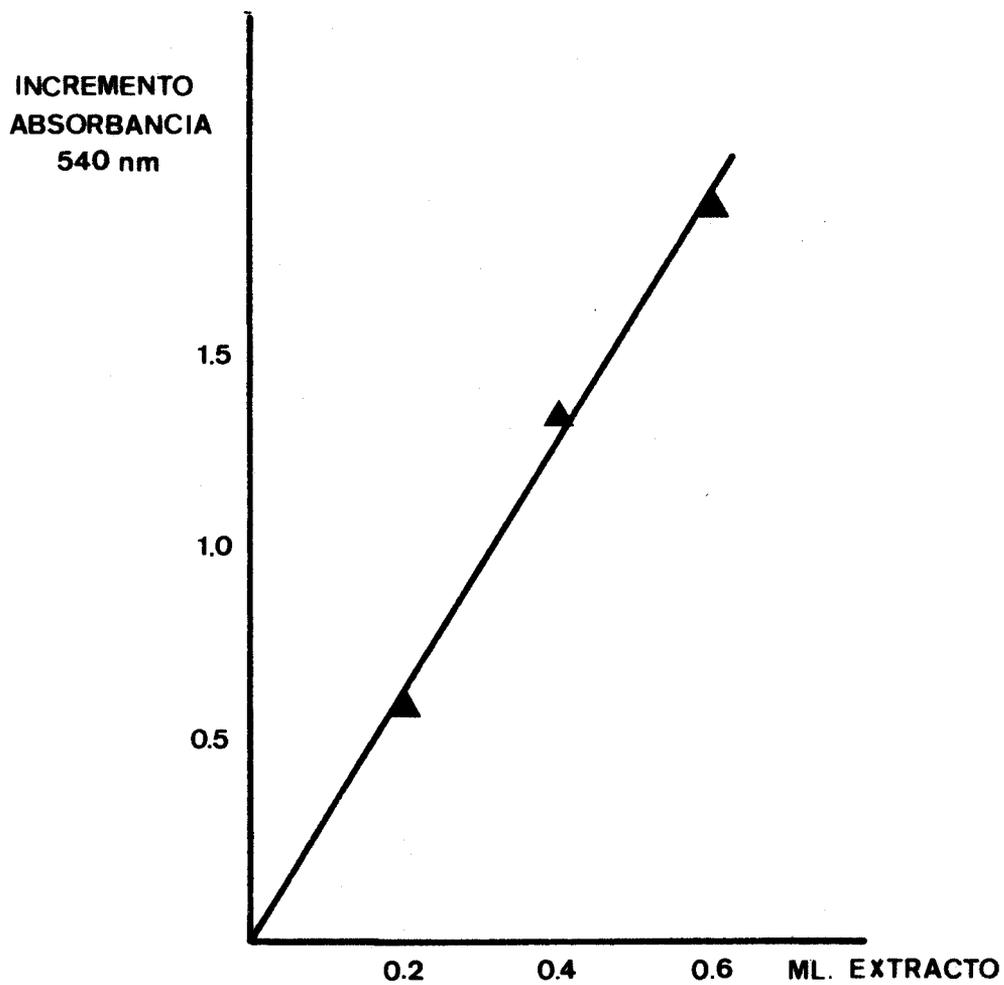


FIG. 2-1 RELACION ENTRE EL INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD ASPARTOQUINASICA Y LA CONCENTRACION DE EXTRACTO CRUDO

RESULTADOS

SUPERPRODUCCION Y EXCRECION DE METIONINA

III.1.- OBTENCION DE MUTANTES RESISTENTES A ETIONINA .-

Se utilizaron dos estirpes , F16 y F3 , para la obtención de mutantes resistentes a etionina 5 mM . El mutágeno empleado fue NG . La tabla III-1 resume los resultados obtenidos para las dos estirpes .

- TABLA III-1 -

<u>Est.</u>	<u>Nº Tot. cel/ml</u>	<u>%Superv.</u>	<u>Nº Resist. obt.</u>	<u>Frec. Resist.</u>
F16	2,37 10 ⁸	11,53	405	3,67 10 ⁻⁷
F3	1,69 10 ⁸	3,0	23	46,47 10 ⁻⁷

En ninguno de estos casos se obtuvieron resistentes espontáneos . Las colonias presuntamente resistentes obtenidas en estas mutagénesis se recrecieron en medio rico durante varias generaciones y se volvió a probar su resistencia a etionina . Todos los clones mostraron seguir siendo resistentes .

III.2.- SELECCION DE EXCRETORES DE METIONINA .-

Las colonias resistentes se probaron sobre un césped de una cepa de Escherichia coli auxotrofa para la metionina , a fin de seleccionar posibles excretores . Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III-2. Las 12 estirpes derivadas de F3 , se numeraron desde F300 a F312 y constituyeron el principal material de trabajo .

- TABLA III-2 -

<u>Est.</u>	<u>Colonias probadas</u>	<u>Colonias excretoras</u>	<u>% Excretoras</u>
F16	405	87	21,4
F3	23	12	52,2

A lo largo de este trabajo , se sustituyó la estirpe de Escherichia coli por dos estirpes de levadura auxótrofas para la metionina : 5307-13D (met2) y XJB31D (met6) , ya que la bacteria tenía un crecimiento muy pobre en el medio mínimo de levaduras . Las dos levaduras escogidas tienen un comportamiento diferente en cuanto a sus requerimientos de metionina : 5307-13D es menos estricta que XJB31D . Esto permite catalogar a las estirpes excretoras según su potencial de excreción en estirpes que alimentan a los dos céspedes o solamente a uno de ellos . Esta clasificación se refleja en la tabla III-3 , que se refiere únicamente a las estirpes derivadas de F3 . Como veremos posteriormente esta clasificación hecha según la potencia de excreción está íntimamente relacionada con el comportamiento genético de la resistencia y la excreción .

- TABLA III-3 -

<u>Excretor</u>	<u>Crecim. 5307-13D</u>	<u>Crecim. XJB31D</u>
F300	+	-
F301	+	+
F304	+	-
F305	+	-

- TABLA III-3 (cont.) -

<u>Excretor</u>	<u>Crecim. 5307-130</u>	<u>Crecim. XJB310</u>
F306	+	-
F307	+	-
F310	+	+
F312	+	+

III.3.- ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE LOS MUTANTES RESISTENTES A ETIONINA.-

Tanto el parental F3 como los resistentes a etionina derivados de él , se sembraron en medio mínimo (suplementado con treonina) con y sin etionina 5 mM y se calcularon sus parámetros de crecimiento . Estos datos quedan reflejados en la tabla III-4 , dónde se dan los valores de la velocidad de crecimiento , tiempo de duplicación y número final de células .

- TABLA III-4 -

<u>Estirpe</u>	<u>Etionina</u>	<u>v(h⁻¹)</u>	<u>Td (h)</u>	<u>r²</u>	<u>Nº Final cel./ml.</u>
F3	+		No crecimiento		
	-	0,25	2,76	0,99	2,46 10 ⁸
F301	+	0,25	2,76	0,99	1,36 10 ⁸
	-	0,29	2,38	0,99	1,24 10 ⁸
F310	+	0,06	11,5	0,99	0,94 10 ⁸
	-	0,1	6,9	0,98	0,46 10 ⁸

- TABLA III-4 -

<u>Estirpe</u>	<u>Etionina</u>	<u>v(h⁻¹)</u>	<u>Td (h)</u>	<u>r²</u>	<u>Nº Final (cel/ml)</u>
MDX21	+		No crecimiento		
	-	0,27	2,55	0,99	3,2 10 ⁸
F306	+	0,12	5,75	1,0	1,62 10 ⁸
	-	0,1	6,9	0,98	1,7 10 ⁸

v : Velocidad de crecimiento

Td : Tiempo de duplicación

r² : Ajuste crecimiento a una curva exponencial

El efecto tóxico de la etionina sobre la estirpe F3 se elimina por metionina a dosis muy bajas , como se refleja en la tabla III-5 , dónde se representa el crecimiento (como % del control) de esta estirpe , a distintas concentraciones de etionina .

- TABLA III-5 -

<u>Estirpe</u>	<u>Etionina (mM)</u>	<u>Metionina (mM)</u>	<u>Crecimiento (%)</u>
F3	0	0,0	100
F3	5	0,0	0
F3	5	0,3	30
F3	5	0,6	70
F3	5	3,0	93
F3	5	6,0	110

III.4.- CUANTIFICACION DE LA METIONINA EXCRETADA Y ALMACENADA .-

Se midieron los pools de metionina y la metionina presente en el medio , en cultivos crecidos durante 48 horas , en agitación . Los resultados se sumarizan en la tabla III-6 .

- TABLA III-6 -

<u>Estirpe</u>	<u>Metion. Pool $\mu\text{M/gps}$</u>	<u>Metion. Exud. $\mu\text{M/gps}$</u>	<u>Metion. Total</u>
F3	1,27	No detect.	1,3
F301	7,14	9,2	16,35
F310	8,2	10,2	18,4
F312	7,0	8,2	15,1
F305	3,0	No detect.	3,0
F307	2,9	No detect.	2,9

(Cada medida es media de cinco valores)

III.5.- VELOCIDAD DE APARICION DE LA METIONINA EN EL MEDIO .-

En dos estirpes de las mayores en producción (F301 y F310) y una de baja producción (F305) , se estudió la aparición de metionina a lo largo del tiempo , junto con el consumo de glucosa , concentración de biomasa alcanzada y des censo de pH . Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla III-7 y se representan en las figuras III-1 , III-2 y III-3 .

- TABLA III-7 -

Producción de metionina por la estirpe F305

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Biomasa (gps/l)</u>	<u>Glucosa (g/l)</u>	<u>pH</u>	<u>Met. (uM/gps)</u>
0	0,08	20	5,5	No det.
12	0,93	17,6	5,42	No det.
24	1,82	13,51	4,91	6,2
36	1,86	12,8	3,75	8,5
48	1,92	11,75	3,7	6,2
60	1,90	11,6	3,71	5,7
72	1,91	11,59	3,67	5,5

Producción de metionina por la estirpe F310

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Biomasa (gps/l)</u>	<u>Glucosa (g/l)</u>	<u>pH</u>	<u>Met. (uM/gps)</u>
0	0,17	20	5,5	No det.
12	1,2	14,72	2,9	8,4
24	2,6	4,65	2,65	12,36
36	2,79	2,17	2,1	10,18
48	2,81	2,0	2,0	9,75
60	2,83	1,95	1,98	8,92
72	2,82	1,87	2,0	8,97

- TABLA III-7 (cont.) -

Producción de metionina por la estirpe F301

<u>Tiempo (h)</u>	<u>Biomasa (gps/l)</u>	<u>Glucosa (g/l)</u>	<u>pH</u>	<u>Met. (uM/gps)</u>
0	0,2	20	5,5	No det.
12	0,78	17,5	3,2	7,2
24	2,24	4,5	2,8	10,22
36	2,62	2,2	2,2	8,7
48	2,61	2,12	2,15	7,7
60	2,66	2,17	2,1	7,6
72	2,6	2,0	2,0	7,5

En todos los casos se observa que la aparición de metionina está asociada a la fase de crecimiento y que cuando el cultivo entra en fase estacionaria hay una bajada en la concentración de metionina exudada . Este último hecho ha sido reportado previamente por Antoniewski y col. (1973) . Estos autores creen que parte de la metionina excretada es vuelta a introducir al interior de las células por las permeasas de Saccharomyces cerevisiae .

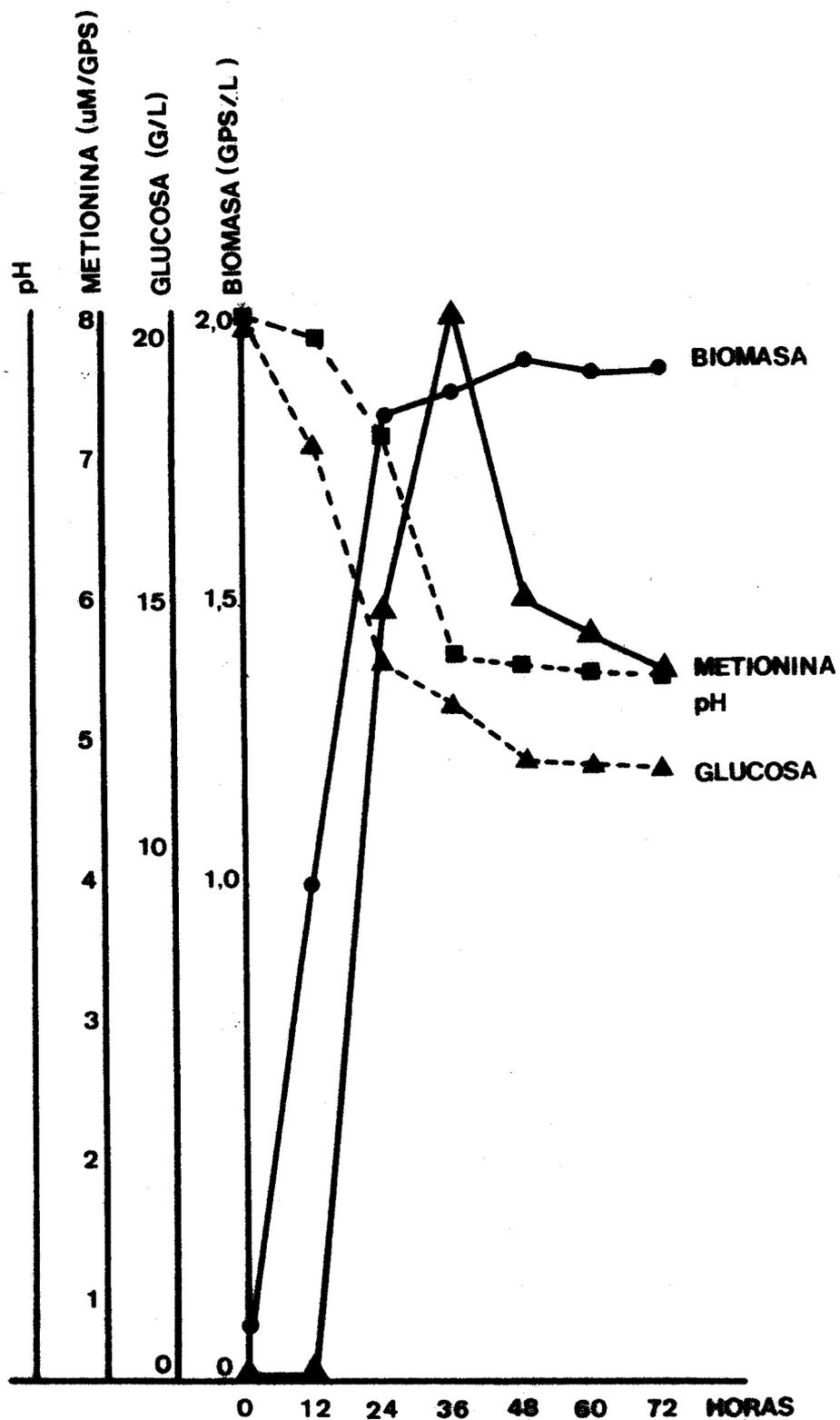


FIG. 3-1 CINETICA DE APARICION DE METIONINA EN UN CULTIVO DE LA ESTIRPE F305.

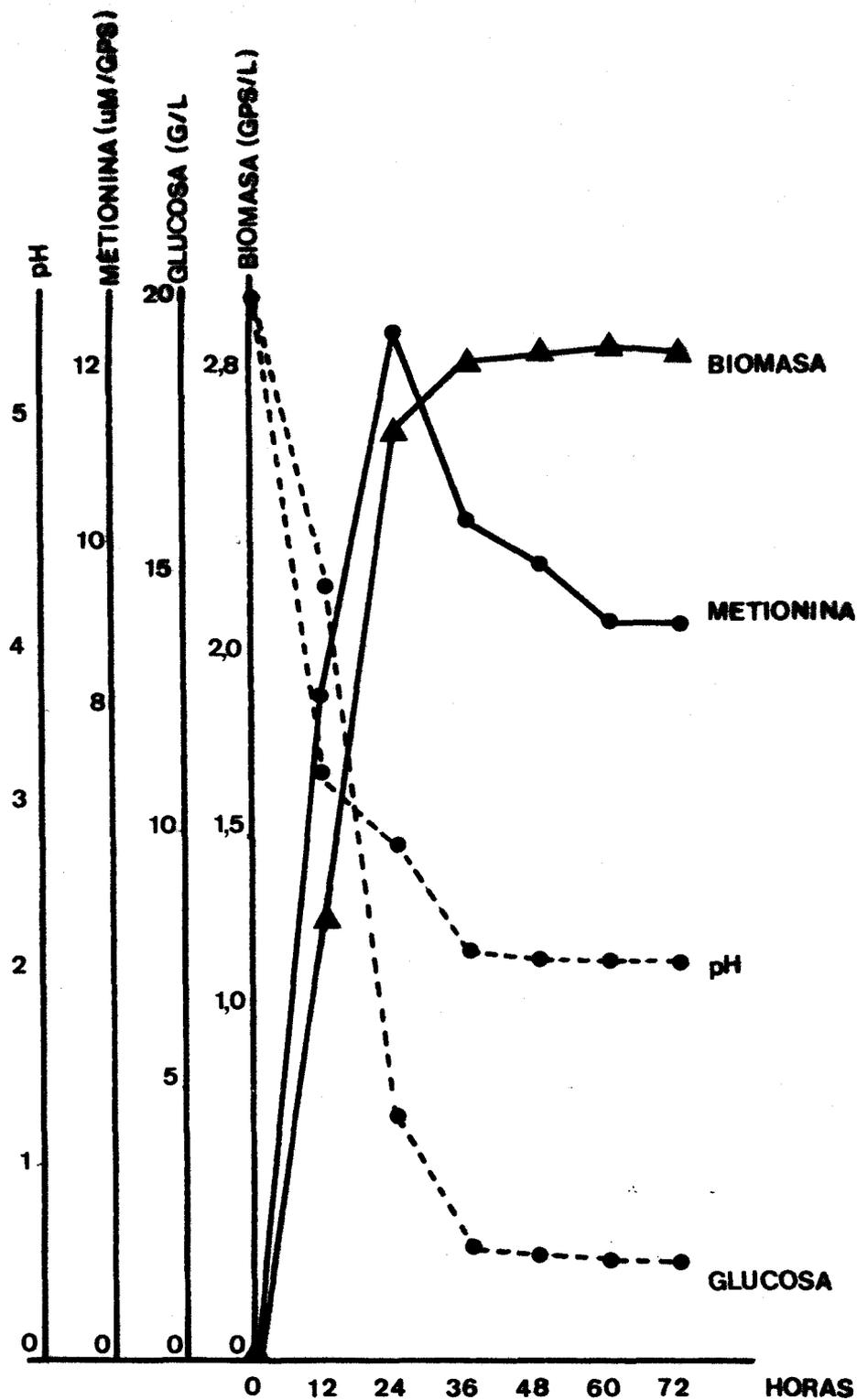


FIG.3-2 CINETICA DE APARICION DE METIONINA EN UN CULTIVO DE LA ESTIRPE F310.

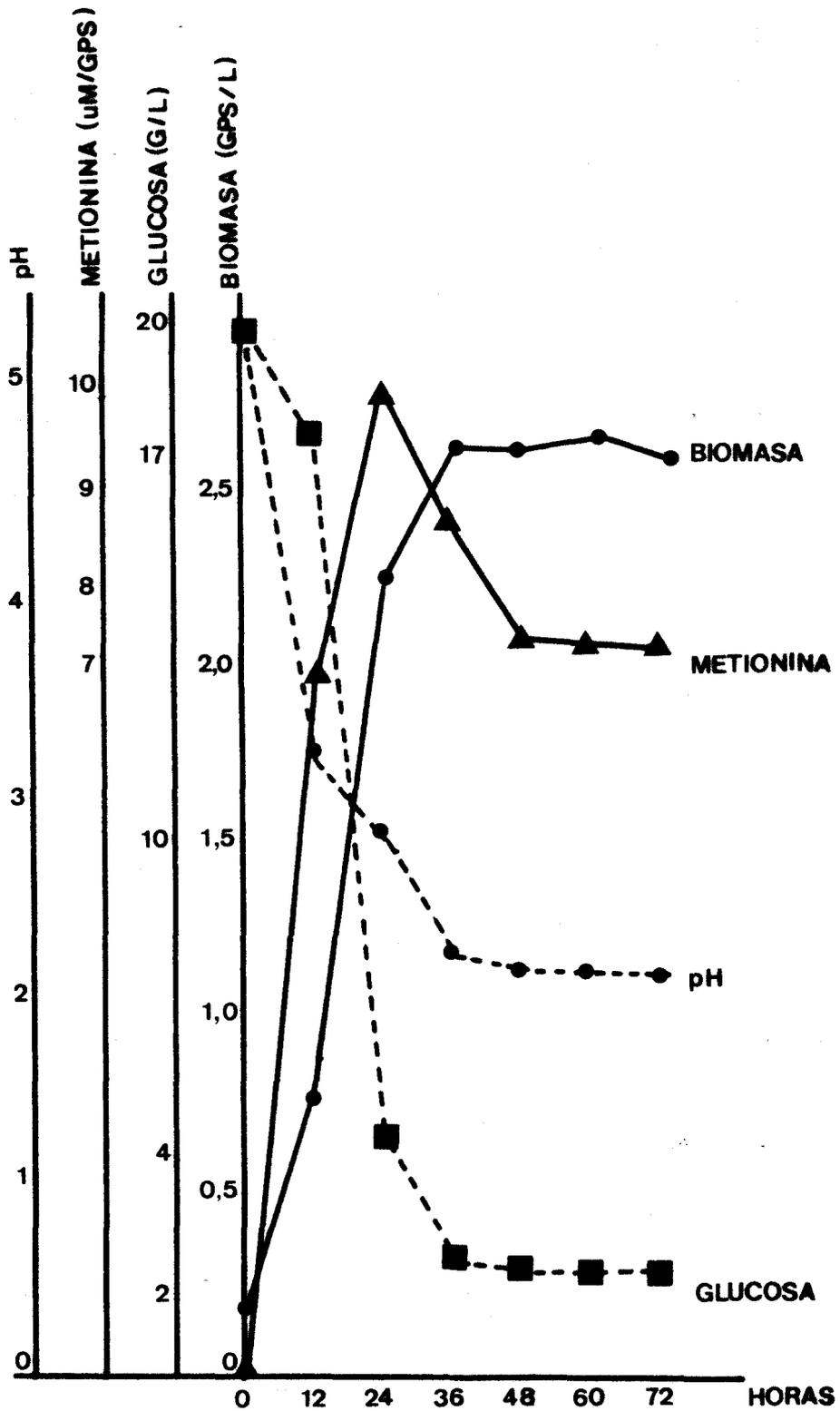


FIG. 3-3 CINETICA DE APARICION DE METIONINA EN UN CULTIVO DE LA ESTIRPE F301.

III.6.- ESTUDIO GENETICO DE LAS ESTIRPES RESISTENTES A ETIONINA Y EXCRETORAS DE METIONINA .

III.6.1.- Relaciones de dominancia y recesividad .-

Se cruzaron los 87 clones excretorios obtenidos de F16 , por la estirpe F13 . Todos los diploides eran sensibles a etionina y no excretorios. Los clones derivados de F3 se cruzaron con F6 y F13 , todos los diploides eran también sensibles a etionina y no excretorios .

III.6.2.- Análisis meiótico de los diploides .-

Se sometieron a análisis meiótico los diploides obtenidos al cruzar las estirpes derivadas de F3 con la estirpe silvestre F6 . A continuación se estudian las segregaciones obtenidas tanto para la resistencia como para la excreción .

Los cruces efectuados en este estudio genético se han recopilado en la tabla III-8 , que muestra para cada cruce los parentales que en él intervienen y el objeto del mismo . La tabla III-9 resume los genotipos asignados a las estirpes resistentes y a sus derivados meióticos utilizados en este estudio . Todo el conjunto de cruces efectuados , se muestra en la figura III-4 .

- TABLA III-9 -

GENOTIPO ASIGNADO A LAS ESTIRPES PARENTALES Y EXCRETORAS DE METIONINA ,
REFERIDAS EN ESTE ESTUDIO .-

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo</u>
F3	α <u>thr4</u> eth ^s MET ^{no exc.}
F300 a F312	α <u>thr4</u> eth ^r MET ^{exc.}
MDX8-10A	<u>a</u> <u>ade2</u> eth ^r MET ^{no exc.}
MDX9-2C	<u>a</u> <u>ade2</u> eth ^r MET ^{no exc.}
MDX7-10C	<u>a</u> <u>ade2</u> eth ^r MET ^{exc.}
F16	α <u>his4</u> <u>ade2-1</u> eth ^s MET ^{no exc.}
F242	α <u>his4</u> <u>ade2-1</u> eth ^r MET ^{exc.}
F229	α <u>his4</u> <u>ade2-1</u> eth ^r MET ^{exc.}
MDX28-30	<u>a</u> <u>ino</u> ⁻ <u>ade2-1</u> eth ^r MET ^{exc.}
MDX13-14A	<u>a</u> <u>ade2</u> eth ^r MET ^{exc.}

- TABLA III-8 -

CRUCES EFECTUADOS EN EL ESTUDIO DE LOS MUTANTES EXCRETORES DE METIONINA

<u>CRUCE</u>	<u>PARENTALES</u>	<u>OBJETO DEL CRUCE</u>
MDX6	F300 x F6	Segregación resistencia y excreción
MDX7	F301 x F6	Idem.
MDX8	F304 x F6	Idem.
MDX9	F305 x F6	Idem.
MDX10	F306 x F6	Idem.
MDX11	F307 x F6	Idem.
MDX12	F310 x F6	Idem.
MDX13	F312 x F6	Idem.
MDX14	MDX7-10C x F300	Complementación resistencia y excreción
MDX15	MDX7-10C x F304	Idem.
MDX16	MDX7-10C x F305	Idem.
MDX17	MDX7-10C x F306	Idem.
MDX18	MDX7-10C x F307	Idem.
MDX19	MDX7-10C x F310	Idem.
MDX20	MDX7-10C x F312	Idem.
MDX21	MDX7-10C x F3	Idem.
MDX22	F301 x SL210-3A	Implicación gen <u>MET8</u> en la excreción
MDX23	F301 x XJB31D	Implicación gen <u>MET6</u> en la excreción

- TABLA III-8 (cont.) -

<u>CRUCE</u>	<u>PARENTALES</u>	<u>OBJETO DEL CRUCE</u>
MDX24	MDX13-4A x 5307-13D	Implicación gen <u>MET2</u> en la excreción
MDX25	MDX8-10A x F3	Segregación resistencia y excreción
MDX26	MDX9-2C x F3	Idem.
MDX27	F242 x MC25	Idem.
MDX28	F229 x MC25	Idem.
MDX29	MDX28-3D x 5307-13D	Implicación gen <u>MET2</u> en la excreción
MDX30	F229 x SL2103A	Implicación gen <u>MET8</u> en la excreción
MDX31	F229 x XJB31D	Implicación gen <u>MET6</u> en la excreción
MDX32	MDX7-10C x F301	Complementación resistencia y excreción

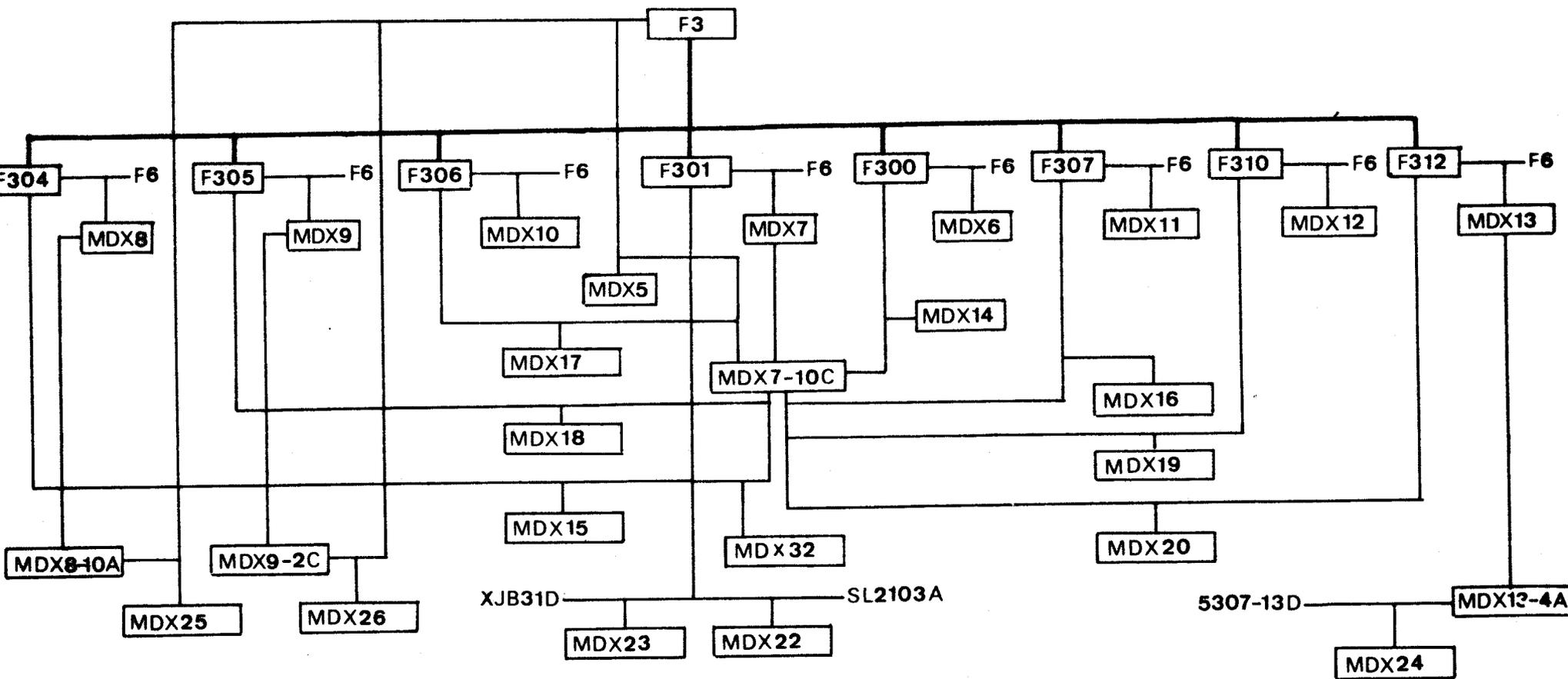


FIG. 3-4 CRUCES EFECTUADOS EN EL ESTUDIO DE LA EXCRECION DE METIONINA

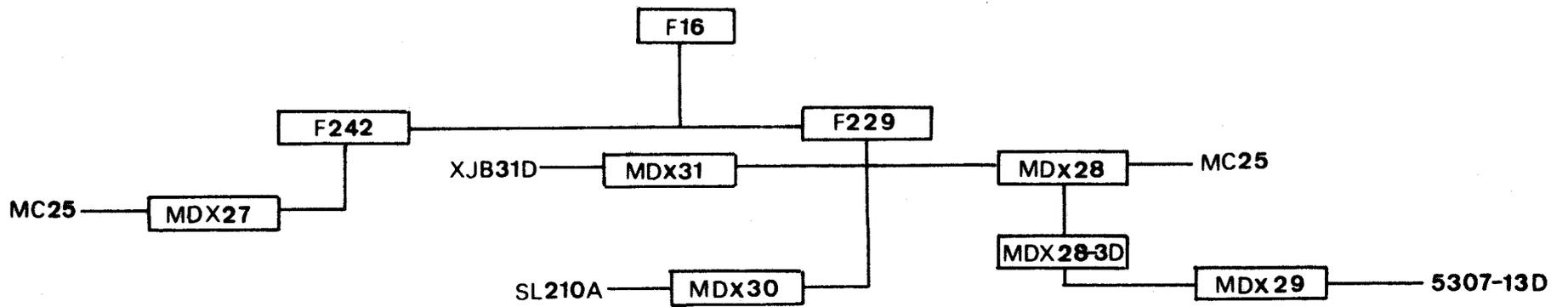


FIG. 3-4 (Continuación)

III.6.3.- Segregación de la resistencia a etionina .-

La tabla III-10 muestra la segregación de la resistencia a etionina en estirpes derivadas de F3 .

- TABLA III-10 -

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>4R:0S</u>	<u>3R:1S</u>	<u>2R:2S</u>	<u>1R:3S</u>	<u>0R:4S</u>
MDX6	23	0	0	5	13	5
MDX7	31	0	0	31	0	0
MDX8	20	0	0	6	11	3
MDX9	17	0	0	3	13	1
MDX10	29	0	0	6	19	4
MDX11	23	0	0	3	13	7
MDX12	20	0	0	20	0	0
MDX13	13	0	0	13	0	0

El análisis meiótico separa dos grupos claramente definidos de resistentes . Un grupo donde la resistencia segrega monogénicamente (estirpes F301 , F310 , F312) y otro grupo donde la resistencia aparece como digénica (estirpes F300 , F304 , F305 , F306 , F307) .

III.6.4.- Complementación para la resistencia a etionina y excreción de metionina .

La estirpe MDX7-10C (genotipo a ade2 eth^R MET^{exc}) , derivada del cruce MDX7 , se utilizó para estudiar la complementación de la resisten-

cia a etionina entre los resistentes derivados de F3 . Los resultados se registran en la tabla III-11 .

- TABLA III-11 -

<u>Estirpe</u>	<u>MM</u>	<u>MM + treo.</u>	<u>MM + treo. + etion.</u>	<u>Excrec.</u>
F3	-	+	-	-
MDX7-10C	-	+	+	+
MDX14	+	+	+	+
MDX32	+	+	+	+
MDX15	+	+	+	+
MDX16	+	+	+	+
MDX17	+	+	+	+
MDX18	+	+	+	+
MDX19	+	+	+	+
MDX20	+	+	+	+
MDX21	+	+	-	-

Todas las estirpes diploides ,excepto el control MDX21 , muestran ser resistentes y excretoras . Esto indica , en principio , que todos los resistentes derivados de F3 son alélicos para la resistencia ; sin embargo , unos son monogénicos y otros digénicos . Experiencias posteriores aclararon este punto .

También se cruzaron los derivados de F16 resistentes a etionina con la estirpe MDX13-4A (a ade2 eth^R MET^{EXC}) . De 73 resistentes derivados de F16 , 66 de ellos crecieron en medio mínimo más etionina y

son excretores de metionina , otros siete dan diploides sensibles y no excretores . Aparece , por tanto , un segundo grupo de complementación para la resistencia a etionina .

III.6.5.- Análisis meiótico del segundo grupo de complementación .-

Las estirpes F242 y F229 , derivadas de F16 , que complementan para la resistencia con la estirpe MDX13-4A , se cruzaron con la sensible MC25 y se analizó la segregación para la resistencia a etionina en cada caso . Los resultados se presentan en la tabla III-12 .

- TABLA III-12 -

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>0R:4S</u>	<u>1R:3S</u>	<u>2R:2S</u>	<u>3R:1S</u>	<u>4R:0S</u>
MDX27	8	0	0	8	0	0
MDX28	15	0	0	15	0	0

Una espora derivada del cruce MDX28 y otra espora derivada del cruce MDX27 , de genotipos $a \underline{ino}^- eth^r MET^{exc}$, se cruzaron con las siete estirpes que forman el segundo grupo de complementación para la resistencia a etionina . Todos los diploides resultantes eran resistentes y excretores , lo que indica que los parentales son alélicos entre sí para la resistencia y la excreción .

III.6.6.- Segregación de la excreción de metionina .-

Los cruces efectuados entre los excretores derivados de F3 y la

estirpe sensible F6 fueron probados también para la segregación de la excreción de metionina (Tabla III-13) .

- TABLA III-13 -

<u>Cruce</u>	<u>Res.</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>0E:4NE</u>	<u>1E:3NE</u>	<u>2E:2NE</u>	<u>3E:1NE</u>	<u>4E:0NE</u>
MDX7	M	31	0	0	31	0	0
MDX12	M	20	0	0	20	0	0
MDX13	M	13	0	0	13	0	0
MDX8	D	14	0	9	4	1	0
MDX9	D	11	3	5	3	0	0
MDX10	D	19	1	6	12	0	0
MDX11	D	13	1	8	4	0	0

Res: Resistencia a etionina (M:monogénica , D:digénica)

E : Espora(s) excretora(s)

NE : Espora(s) no excretora(s)

En estos cruces hay que destacar una serie de observaciones importantes :

- a) Hay un primer grupo de excretores , todos ellos monogénicos para la resistencia a etionina y también monogénicos para la excreción de metionina .
- b) En este grupo , resistencia y excreción van ligadas , siendo independientes de cualquier otra auxotrofia y en concreto de la auxotrofia thr4 aportada por el padre excretor (Tabla III-14) .

- c) La excreción en este grupo es muy neta y repetitiva , siendo capaces de alimentar tanto a la estirpe XJB31D como 5307-13D .
- d) Un segundo grupo de excretoras está constituido por las estirpes que muestran una segregación extraña para la excreción y digénica para la resistencia a etionina .
- e) En este segundo grupo , resistencia y excreción no están ligadas en absoluto .
- f) Todas las esporas excretoras eran auxotrofas para la treonina , pero no todas las esporas auxotrofas para la treonina eran excretoras .
- g) La segregación de la excreción en este segundo grupo es bastante confusa , existiendo diferencias evidentes en la capacidad de excreción entre esporas de una misma tetrada . Al ser reprobadas , algunas esporas consideradas excretoras , dejaban de serlo pero nunca aparecían nuevos excretoras .

- TABLA III-14 -

<u>Cruce</u>	<u>Fenotipo de las esporas</u>			
	<u>thr4 y exc.</u>	<u>thr4 y no exc.</u>	<u>THR4 y exc.</u>	<u>THR4 y no exc.</u>
MDX7	34	28	28	34
MDX12	22	17	18	23
MDX13	16	9	11	16

III.6.7.- Estudio de la resistencia en estirpes monogénicas .-

Con el propósito de verificar si la resistencia a etionina y por tanto la excreción de metionina , se debía a alteraciones estructurales en algunas de las enzimas de la ruta de la metionina que impidieran un control por retroinhibición de este aminoácido sobre su propia ruta de biosíntesis , se hicieron cruces entre F301 , F312 y F229 (o sus derivados meióticos de sexo a) con estirpes portadoras de mutaciones en los genes MET2 , MET8 y MET6 , que codifican los pasos desde homoserina hasta metionina . Si la resistencia a etionina se encontrara en uno de estos genes deberíamos siempre esperar una segregación 2:2 para la resistencia ; en caso contrario lo esperado sería una segregación digénica para la resistencia , donde el tipo de tetradas más frecuente serían los tetratipos 3S:1R , ya que habría alguna espora resistente a etionina pero auxotrofa para la metionina y aparecería , por tanto , como sensible a etionina en un medio sin metionina . La tabla III-15 muestra las segregaciones obtenidas . De estos resultados se podría deducir que la resistencia a etionina (y la excreción de metionina) que lleva la estirpe MDX13-4A se debe a una mutación estructural en el gen MET2 .

Sin embargo , si consideramos como segregan los marcadores MET2 y eth^R encontramos que son independientes entre si y por tanto existen esporas auxotrofas para la metionina , que pueden crecer en medio con

etionina pero sin metionina . La tabla III-5 muestra como segrega la resistencia a etionina con respecto a la auxotrofia para metionina .

Estos resultados pueden ser explicados teniendo en cuenta una serie de observaciones de Cherest y col. (1970) , que seran discutidas más tarde . De la segregación de las auxotrofias implicadas en los cruces anteriores se deduce que los genes que codifican resistencia a etionina no se hayan ligados a centrómero .

Otro hecho importante deducible de las segregaciones de los cruces anteriores MDX23 , MDX24 , MDX29 y MDX31 es que ni el gen de resistencia presente en el primer grupo de complementación , ni el presente en el segundo grupo , son alelos del gen ETH2 .

Robichon-Szulmajster y col. (1974a) localizaron este gen de resistencia en el cromosoma XIII , próximo a los genes MET6 y LYS7 . Estos dos marcadores se hallan implicados en los cruces anteriores , y sus segregaciones con respecto a la resistencia a etionina (Tabla III-15) demuestran que no están ligados a ella .

- TABLA III-15 -

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>0R:4S</u>	<u>1R:3S</u>	<u>2R:2S</u>	<u>3R:1S</u>	<u>4R:0S</u>
MDX22	20	5	13	2	0	0
MDX23	22	5	11	6	0	0
MDX24	38	0	0	38	0	0
MDX29	11	2	8	1	0	0
MDX30	20	3	15	2	0	0
MDX31	10	2	7	1	0	0

<u>Cruce</u>	<u>Nº Espo.</u>	<u>Eth^r met2</u>	<u>Eth^r MET2</u>	<u>Eth^s met2</u>	<u>Eth^s MET2</u>
MDX24	152	34	42	42	34

		<u>Eth^r lys7</u>	<u>Eth^r LYS7</u>	<u>Eth^s lys7</u>	<u>Eth^s LYS7</u>
MDX24	152	38	38	37	39
MDX29	44	10	11	12	11

		<u>Eth^r met6</u>	<u>Eth^r MET6</u>	<u>Eth^s met6</u>	<u>Eth^s MET6</u>
MDX23	88	21	23	22	20
MDX31	40	11	9	10	10

III.6.8.- Estudio de la resistencia a etionina en estirpes digénicas .-

El estudio comenzó probando la segregación de la resistencia a distintos niveles de concentración de etionina en las progenies de los cruces MDX8 , MDX9 , MDX10 , MDX11 a fin de poner de manifiesto genes de efectos fenotipicos mayores y menores e implicados en la resistencia . Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla III-16 , donde se indican las segregaciones obtenidas para cada concentración de etionina .

Los resultados muestran que a medida que aumenta la concentración de etionina en el medio , hay un desplazamiento de la segregación que pasa desde ser todas las tetradas 4R:0S a ser la mayoría de ellas 2R:2S. Esto indica que está segregando un gen , el de efectos fenotipicos mayores . Para concentraciones de etionina aún más altas empiezan a aparecer tetratipos , indicando que a ese nivel se necesita ya en algunas esporas la acción conjunta de los genes de efecto fenotipico mayor y menor para que se manifieste la resistencia a etionina 5 mM .

A una concentración de etionina 5 mM , la resistencia es típicamente digénica . Resulta evidente que la estirpe F306 lleva un alelo del gen menor que confiere más resistencia que los alelos llevados por F304 , F305 , F307 . El efecto de los dos genes , mayor y menor , es claramente multiplicativo . En estos cruces se pudo determinar que ninguno de los genes de resistencia está ligado al gen THR4 .

- TABLA III-16 -

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>Etion.</u>	<u>0R:4S</u>	<u>1R:3S</u>	<u>2R:2S</u>	<u>3R:1S</u>	<u>4R:0S</u>
MDX8	15	0 mM	0	0	0	0	15
	15	0,1 mM	0	0	15	0	0
	15	0,5 mM	0	0	15	0	0
	15	1 mM	1	4	10	0	0
	15	5 mM	2	9	4	0	0
MDX9	13	0 mM	0	0	0	0	13
	13	0,1 mM	0	6	7	0	0
	13	0,5 mM	0	11	2	0	0
	13	1 mM	1	10	2	0	0
	13	5 mM	1	10	2	0	0
MDX10	21	0 mM	0	0	0	0	21
	21	0,1 mM	0	0	3	14	4
	21	0,5 mM	0	0	9	11	2
	21	1 mM	0	5	9	5	2
	21	5 mM	4	14	3	0	0
MDX11	17	0 mM	0	0	0	0	17
	17	0,1 mM	0	0	17	0	0
	17	0,5 mM	2	12	3	0	0
	17	1 mM	5	9	3	0	0
	17	5 mM	5	9	3	0	0

De cada uno de estos cruces se escogió una espora de sexo a y portadora del gen mayor o del gen menor y se construyeron los diploides correspondientes con F301. En todos los casos se demostró que el gen mayor era alélico al existente en F301, lo que explica que los diploides entre estirpes resistentes monogénicas y digénicas sean resistentes también.

Para probar si alguno de los genes, mayor o menor, estaba ya presente en la estirpe parental F3 se hicieron los cruces de dos esporas, derivadas respectivamente de MDX9 y MDX8, con genotipo a ade2 eth^r con el parental F3. La segregación obtenida muestra que en F3, no existe ninguno de los dos genes de resistencia (tabla III-17).

- TABLA III-17 -

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>0R:4S</u>	<u>1R:3S</u>	<u>2R:2S</u>	<u>3R:1S</u>	<u>4R:0S</u>
MDX25	12	3	8	1	0	0
MDX26	9	1	7	1	0	0

III.6.9.- Estudio de la excreción de metionina en estirpes digénicas para la resistencia a etionina .-

El carácter irregular de la expresión de la excreción en estirpes digénicas para la resistencia a etionina y el hecho de que las esporas excretoras fuesen siempre auxotrofas para la treonina, quedó señalado anteriormente.

Por los datos de análisis en cromatografía de gases, sabemos que

el parental F3 , por ser auxotrofo para la treonina , acumula una gran cantidad de homoserina . De hecho , esta auxotrofia se está comportando como si provocara una desregulación en el sentido de que al acumularse niveles altos de homoserina se fuerza la biosíntesis de metionina .

Otras dos indicaciones experimentales hay que añadir a estos datos . La primera es el resultado de probar las segregaciones para la excreción de los cruces registrados en la tabla III-17 . Se trataba de cruzar derivados de genotipo a ade2 eth^r MET^{no exc.} con la estirpe F3 (thr4 eth^s MET^{no exc.}) . Con los genotipos dados a estos parentales , no se esperaba ninguna espora excretora dentro de la descendencia o en todo caso una segregación confusa como la observada en este tipo de excretores . Sin embargo , la segregación para la excreción fué muy clara , existiendo una fuerte relación entre ser thr4 y excretor (Tablas III-18 y III-19) .

- TABLAS III-18 -

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>0E:4NE</u>	<u>1E:3NE</u>	<u>2E:2NE</u>	<u>3E:1NE</u>	<u>4E:0NE</u>
MDX25	12	0	4	8	0	0
MDX26	9	0	0	9	0	0

- TABLA III-19 -

<u>Cruce</u>	<u>Fenotipo de las esporas</u>			
	<u>THR4 y exc.</u>	<u>THR4 y no exc.</u>	<u>thr4 y exc.</u>	<u>thr4 y no exc.</u>
MDX25	1	23	18	1
MDX26	1	10	11	0

En estas segregaciones se observaban a veces esporas excretoras con halos más pequeños que los demás .

Para demostrar más claramente la implicación del carácter thr4 en la excreción se revertieron las 18 esporas auxotrofas para la treonina y las 11 esporas de igual fenotipo del cruce MDX26 , a prototrofas para la treonina . Se probó la capacidad de excreción de al menos tres clones revertientes de cada espóra , no encontrándose excreción en ningún caso . Sin embargo , revertientes prototrofos de F301 , F310 y F312 si resultaron ser excretoras .

Una segunda indicación es que el carácter excretor en las estirpes digénicas para la resistencia se pierde espontáneamente , aunque no la resistencia . Para ello , se probaron aproximadamente 1400 clones de F305 tanto para la resistencia como para la excreción . No apareció ninguna colonia sensible a etionina , pero si se veía claramente diferencias en los halos de excreción de las diferentes colonias . También aparecieron colonias no excretoras , con una frecuencia del 2% aproximadamente .

III.6.10.- Transmisión citoplásmica del carácter excretor de metionina .-

Los hechos anteriores condujeron a sospechar la presencia de un carácter citoplásmico que , junto a la auxotrofia para la treonina , determinaría el fenotipo excretor . Para probar esta hipótesis , usamos la estirpe XK36A , portadora de la mutación karl-1 , como vector capaz de transferir citoplasma desde una estirpe a otra . En la tabla III-20 y en la figura III-5 representamos los cruces realizados y los fenotipos observados . Los heteroplasmones finales tienen el núcleo de la célula receptora y citoplasma mezcla de las células donadora , vector y receptora .

- TABLA III-20 -

<u>Est. dadora</u>	<u>Est. receptora</u>	<u>Heteroplasmones</u>
F305 , excretora	F3 , no excretora	Excretor
F3 , no excretora	F3 , no excretora	No excretor
F305 , excretora	Rev. F3 , no excretora	No excretor
F3 , no excretora	Rev. F3 , no excretora	No excretor

Rev. F3 es una estirpe prototrofa para la treonina , no excretora de metionina , revertiente espontánea de F3 .

Los resultados obtenidos indican la presencia de un factor citoplásmico presente en F305 y no en F3 , transmisible por XK36A , que combinado con una auxotrofia en el gen THR4 , hace posible un fenotipo excretor de metionina .

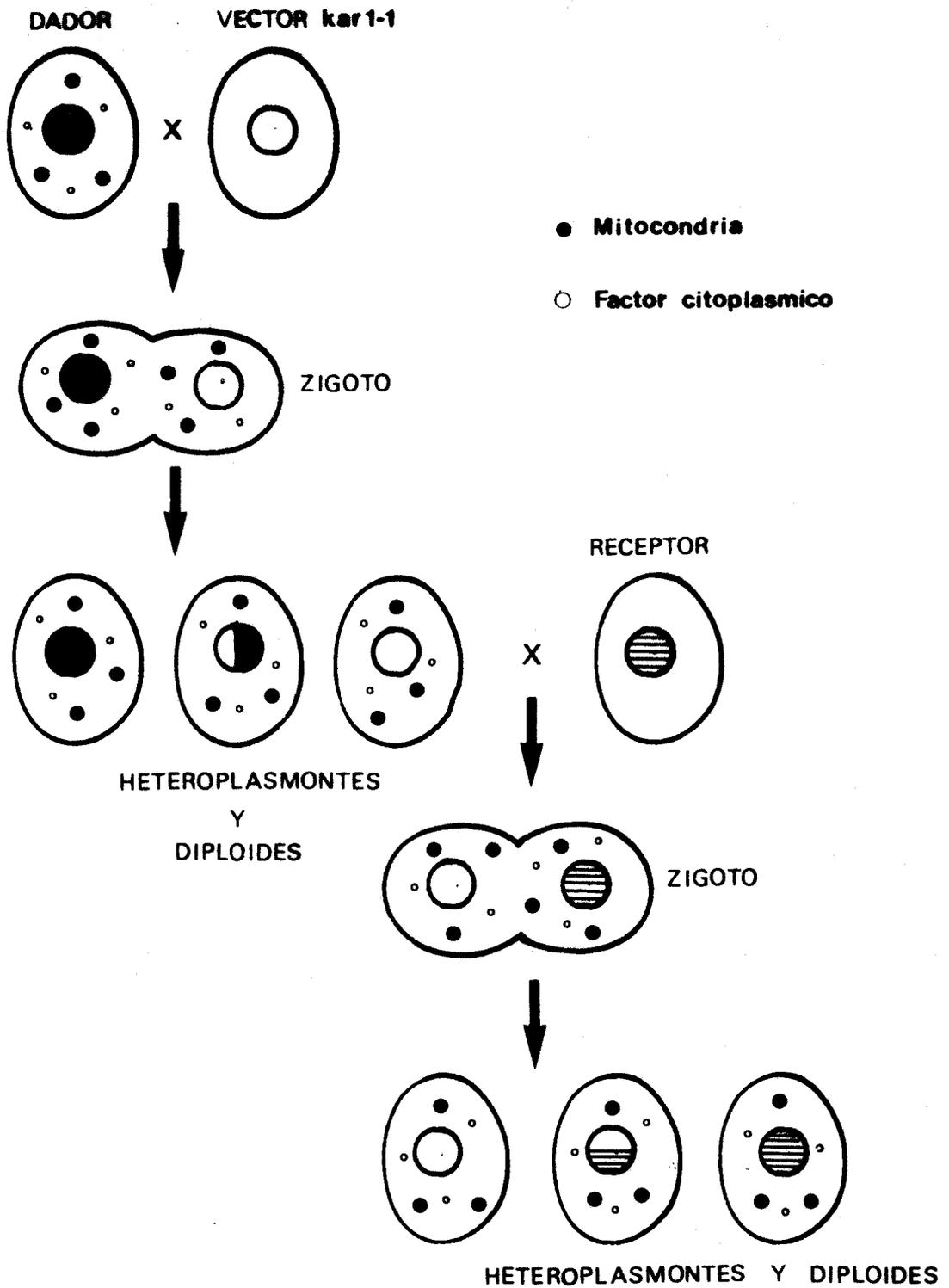


FIG. 3-5 TRANSFERENCIA CITOPASMICA A TRAVES DEL
MUTANTE *kar1-1*.

SUPERPRODUCCION Y EXCRECION DE TREONINA

IV.1.- OBTENCION DE REVERTIENTES PROTOTROFOS DERIVADOS DE LA ESTIRPE S2207A , DEFICIENTE EN LA ASPARTOQUINASA .-

La estirpe S2207A es auxotrofica para la homoserina por estar mutada en el gen HOM3 que codifica la aspartoquinasa . Revertientes prototrofos de S2207A se obtuvieron por mutagénesis con NG o EMS . La tabla IV-1 recoge las frecuencias de reversión y supervivencia obtenidas en dichas mutagénesis .

- TABLA IV-1 -

<u>Mutageno</u>	<u>Superv. (%)</u>	<u>Frec. Rev. Esp.</u>	<u>Frec. Rev. Induc.</u>
NG	16,8	$1,23 \cdot 10^{-6}$	$7,25 \cdot 10^{-6}$
NG	7,2	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$6,2 \cdot 10^{-6}$
EMS	25	$1,5 \cdot 10^{-7}$	$12,0 \cdot 10^{-7}$
EMS	29	$2,6 \cdot 10^{-7}$	$3,5 \cdot 10^{-7}$

IV.2.- SELECCION DE EXCRETORES DE TREONINA ENTRE LOS REVERTIDOS .-

Entre los 51 clones revertidos por EMS se aislaron 2 estirpes excretoras de treonina (JG1 y JG2) , capaces de alimentar un césped de la estirpe MC215 , auxotrofa para este aminoácido . De entre los revertidos por NG (87 clones) se seleccionó un solo excretor (JG3) .

IV.3.- PAPEL DEL INOSITOL EN LA EXCRECION .-

Un hecho nuevo , ya que no hay ningún dato similar en la bibliografía , que observemos tanto en los excretores de treonina como de li-

sina es la influencia del inositol en la visualización de la excreción sobre un césped auxotrófico . En ausencia de inositol y a pesar de que tanto el excretor como el césped son prototrofos para el inositol , no se ven halos de crecimiento del césped alrededor de la colonia excretora . Los datos de análisis por cromatografía de gases de los exudados de estirpes excretoras de treonina , crecidas en medios con y sin inositol , demuestran que en este último caso hay una elevación del pool de treonina y una disminución de la treonina excretada . Sin embargo , la cantidad de treonina exudada sería suficiente , a nuestro juicio , para permitir un crecimiento del césped , por lo que pensamos que la presencia del inositol favorece tanto la salida de la treonina de la célula excretora como la entrada del aminoácido en las células auxotrofas .

IV.4.- CONCENTRACION OPTIMA DE INOSITOL .-

Rutinariamente usamos en los medios de excreción una concentración de inositol de 10 mg/l . Mayores concentraciones (20 , 40 , 60 mg/l) no aumentan el tamaño ni disminuyen el tiempo de aparición de los halos del césped , concentraciones de 60 mg/l disminuyen , incluso , el tamaño del halo . Como referencia , el medio Yeast Nitrogen Base (Difco) proporciona una concentración de inositol de 2 mg/l , en este medio también se hace visible la excreción .

La falta o presencia del inositol no afecta al vigor de la estirpe

productora , como se ve en la tabla IV-2 donde se registran los pesos secos alcanzados a las 48 horas de incubación por las estirpes JG1 y JG2 , creciendo en medios con y sin inositol .

- TABLA IV-2 -

<u>Excretor</u>	<u>Peso seco (mg/ml)</u>	
	<u>Con Inositol</u>	<u>Sin Inositol</u>
JG1	1,44	1,48
JG2	1,34	1,40

IV.5.- TREONINA EXCRETADA Y ACUMULADA POR JG1 , JG2 y JG3 .-

En la tabla IV-3 se recogen los datos correspondientes a la treonina medida en los pools y medios de cultivo de JG1 , JG2 y JG3 en presencia y ausencia de inositol . Como control damos los valores del pool (en medio sin inositol) y exudado (en medio con inositol) encontrados en la estirpe no excretora F6 .

IV.6.- APARICION DE TREONINA A LO LARGO DEL TIEMPO .-

Registramos , en cultivo liquido agitado , la aparición de treonina a lo largo del tiempo en el medio y su acumulación en el pool celular , en correlación con el crecimiento del cultivo (como peso seco) , consumo de glucosa y descenso de pH . Los resultados encontrados (Figu-

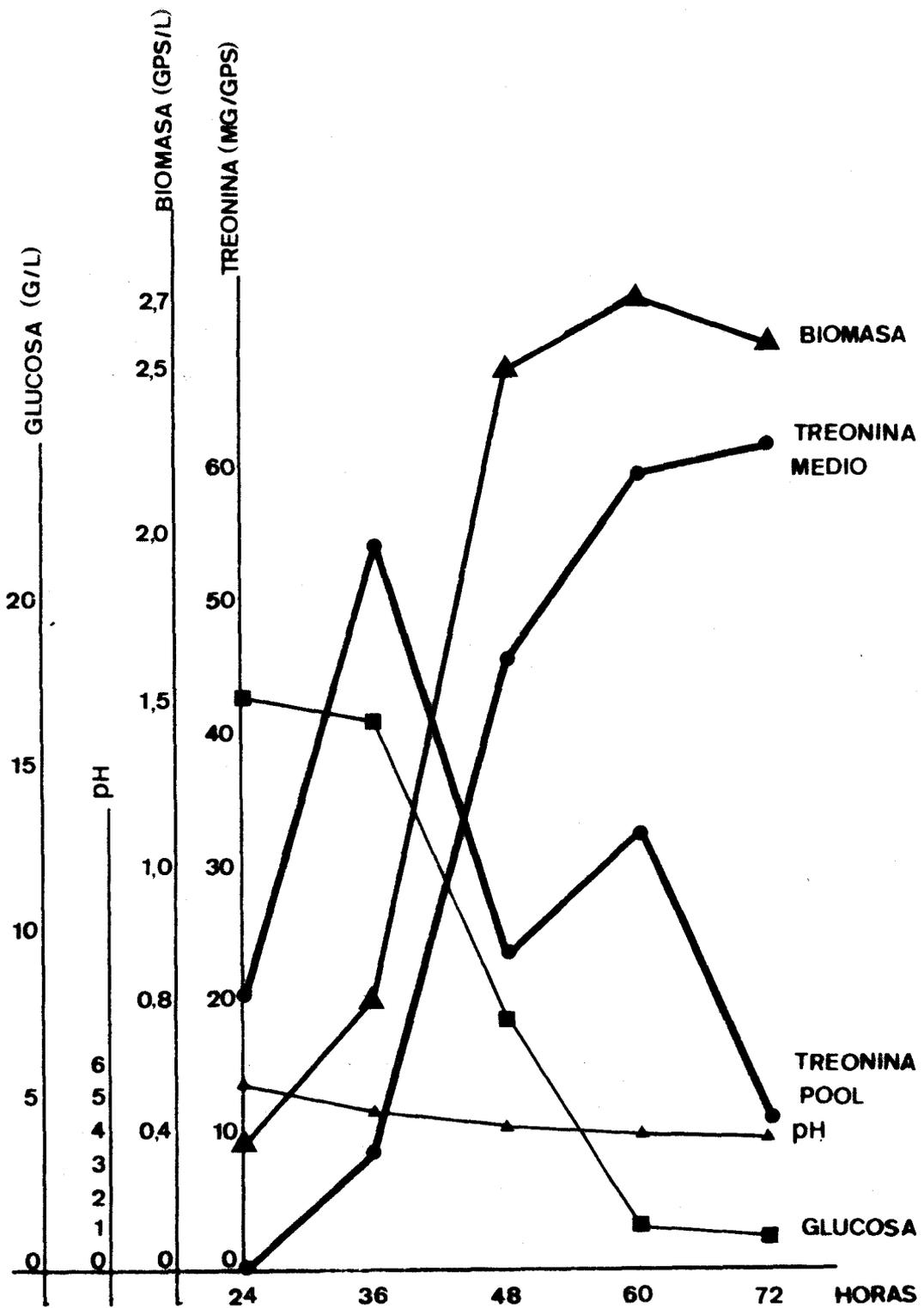


FIG.4-1 CINETICA DE APARICION DE TREONINA EN UN CULTIVO DE LA ESTIRPE JGX1-32B.

- TABLA IV-3 -

<u>Estirpe</u>	<u>Pool (mg/gps)</u>		<u>Exudado (mg/gps)</u>	
	<u>Con Inosit.</u>	<u>Sin Inosit.</u>	<u>Con Inosit.</u>	<u>Sin Inosit.</u>
JG1	14,2	20,65	11,1	8,0
JG2	16,3	17,0	10,0	4,0
JG3	9,2	36	34,7	19,5
F6	-	1,64	No det.	-

ra IV-1 y Tabla IV-4) demuestran claramente que la aparición de treonina en el exudado está asociada al crecimiento de la biomasa .

El comportamiento del pool es más variado , de una forma que creemos relacionada con las distintas fases del cultivo . Al principio y durante la fase exponencial el pool crece y luego desciende mientras aumenta la treonina excretada ; al llegar la fase estacionaria hay un aumento transitorio del pool , que luego vuelve a bajar . Esto puede deberse a que las células no están utilizando treonina para síntesis de nuevas proteínas , aunque si la están produciendo a una velocidad mayor que la de salida de la treonina desde las células al medio . En esta experiencia se usó la estirpe JGX1-32B , un derivado meiótico de JG1 , con alta producción de treonina .

- TABLA IV-4 -

<u>T. (h)</u>	<u>Biomasa (gps/l)</u>	<u>Glucosa (g/l)</u>	<u>pH</u>	<u>Treonina (mg/gps)</u>	
				<u>Pool</u>	<u>Exudado</u>
24	0,38	17,5	2,8	21,2	No detect.
36	0,78	16,7	2,4	55	8,56
48	2,56	7,5	2,2	24	47
60	2,76	1,4	2,1	33	60,6
72	2,62	1,1	2,0	11	62

IV.7.- SUSTITUCION DEL SULFATO AMONICO POR A. ASPARTICO COMO FUENTE DE NITROGENO .-

Al ser el aspártico el sustrato de la aspartoquinasa y el iniciador de la ruta de biosíntesis de treonina, quisimos ver si la sustitución del sulfato amónico por ácido aspártico aumentaba la cantidad de treonina excretada. Las primeras experiencias se realizaron en placas de Petri usando el test de alimentación cruzada. Se pusieron placas que llevaban como fuente de nitrógeno 2 g/l de sulfato amónico y concentraciones crecientes de ácido aspártico (20, 40 y 60 mg/l) y placas que llevaban como única fuente de nitrógeno ácido aspártico a una concentración de 500 mg/l, como control se ponían placas que llevaban sólo sulfato amónico a la concentración habitual de 2 g/l.

Resultaba que a mayores concentraciones de aspártico se afectaba

desfavorablemente el tamaño del halo , que cada vez era más pequeño o nulo . Para profundizar en estos resultados contrarios al papel potenciador del ácido aspártico en la ruta de biosíntesis de treonina se analizó por cromatografía de gases la treonina excretada y almacenada por la estirpe JG1 , creciendo en sulfato amónico o en ácido aspártico , como única fuente de nitrógeno . Los resultados (Tabla IV-5) muestran que efectivamente el ácido aspártico potencia la producción de treonina y que los resultados en placa deben achacarse al césped , quizás menos permeable a la treonina en presencia de aspártico .

- TABLA IV-5 -

<u>Estirpe</u>	<u>Fuente de Nitrógeno</u>	<u>Pool (mg/gps)</u>	<u>Excret. (mg/gps)</u>
JG1	Sulfato amónico	15,5	10,3
JG1	A. Aspártico	16,8	44,84

(Las cantidades de sulfato amónico y ácido aspártico presentes en estos medios son equivalentes , en ambos casos , a 0,5 g/l de nitrógeno amónico)

IV.8.- ESTUDIO GENETICO DE LOS MUTANTES EXCRETORES DE TRECININA .-

Los cruces efectuados en este estudio se encuentran resumidos en la tabla IV-6 y representados en la figura IV-2 . En la tabla IV-7 se recopilan las estirpes utilizadas y sus genotipos .

IV.8.1.- Relaciones de dominancia y recesividad .-

Las estirpes JG1 y JG2 se cruzaron con la silvestre F6 y la estirpe JG3 con la D2862A , seleccionándose los diploides en medio mínimo . En ningún caso resultaron diploides excretores , según el test de alimentación cruzada , por lo que concluimos la recesividad del fenotipo excretor .

IV.8.2.- Análisis meiótico de la excreción .-

Los diploides obtenidos anteriormente se esporularon y sometieron a análisis de tetradas , determinándose la segregación de la excreción . Los resultados se representan en la tabla IV-8 .

- TABLA IV-8 -

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>0E:4NE</u>	<u>1E:3NE</u>	<u>2E:2NE</u>	<u>3E:1NE</u>	<u>4E:0NE</u>
JGX1	32	3	23	6	0	0
JGX2	19	3	15	1	0	0
MDX1	19	0	6	13	0	0

- TABLA IV-6 -

CRUCES EFECTUADOS EN EL ESTUDIO DE LOS MUTANTES EXCRETORES DE TREONINA

<u>CRUCE</u>	<u>PARENTALES</u>	<u>OBJETO DEL CRUCE</u>
JGX1	JG1 x F6	Segregación excreción .
JGX2	JG2 x F6	Segregación excreción .
JGX3	JGX1-24C x JG2	Complementación excreción .
JGX4	JG1 x D2862A	Implicación gen <u>HOM3</u> en la excreción .
JGX5	JG1 x MC197	Implicación gen <u>THR1</u> en la excreción .
JGX6	JGX1-24C x S2207A	Existencia del alelo <u>tex1-1</u> en S2207A .
JGX7	JG1 x JGX1-27B	Confirmación digenia excreción .
JGX8	JG1 x JGX1-27C	Idem.
JGX9	JGX1-20B x JGX1-27A	Idem.
JGX10	JGX1-3A x JGX1-27D	Idem.
MDX1	JG3 x D2862A	Segregación excreción . Implicación gen <u>HOM3</u> en la excreción .
MDX2	MDX1-5C x JG2	Complementación excreción .
MDX3	MDX1-5C x JG1	Complementación y segregación excreción .
MDX4	MDX1-5C x S2207A	Idem.
MDX5	JG3 x JGX1-24C	Complementación excreción .
MDX6	MDX1-5C x JG3	Complementación excreción

- TABLA IV-7 -

GENOTIPOS ASIGNADOS A LAS ESTIRPES PARENTALES Y EXCRETORAS DE TREC-
NINA , REFERIDAS EN ESTE ESTUDIO .-

<u>ESTIRPES</u>	<u>GENOTIPO</u>
S2207A	α <u>his6</u> <u>ura3</u> <u>gal2</u> <u>hom3</u> <u>tex1-1</u>
JG1	α <u>his6</u> <u>ura3</u> <u>gal2</u> <u>hom3r</u> <u>tex1-1</u>
JG2	α <u>his6</u> <u>ura3</u> <u>gal2</u> <u>hom3r</u> <u>tex1-I</u>
JG3	α <u>his6</u> <u>ura3</u> <u>gal2</u> <u>hom3r</u> <u>tex1-1</u> <u>tex2-1</u>
JGX1-24C	<u>a</u> <u>ade2</u> <u>hom3r</u> <u>tex1-1</u>
JGX1-27A	α <u>hom3</u> ? <u>tex1</u> ?
JGX1-27B	<u>a</u> <u>hom3</u> ? <u>tex1</u> ? <u>his6</u> <u>ade2</u> <u>ura3</u>
JGX1-27C	<u>a</u> <u>hom3</u> ? <u>tex1</u> ? <u>his6</u>
JGX1-27D	α <u>hom3</u> ? <u>tex1</u> ? <u>ura3</u> <u>ade2</u>
JGX1-20B	<u>a</u> <u>hom3r</u> <u>tex1-1</u> <u>ura3</u>
JGX1-3A	<u>a</u> <u>ade2</u> <u>hom3r</u> <u>tex1-1</u>
MDX1-6C	<u>a</u> <u>adel</u> <u>hom3r</u> <u>tex2-1</u>

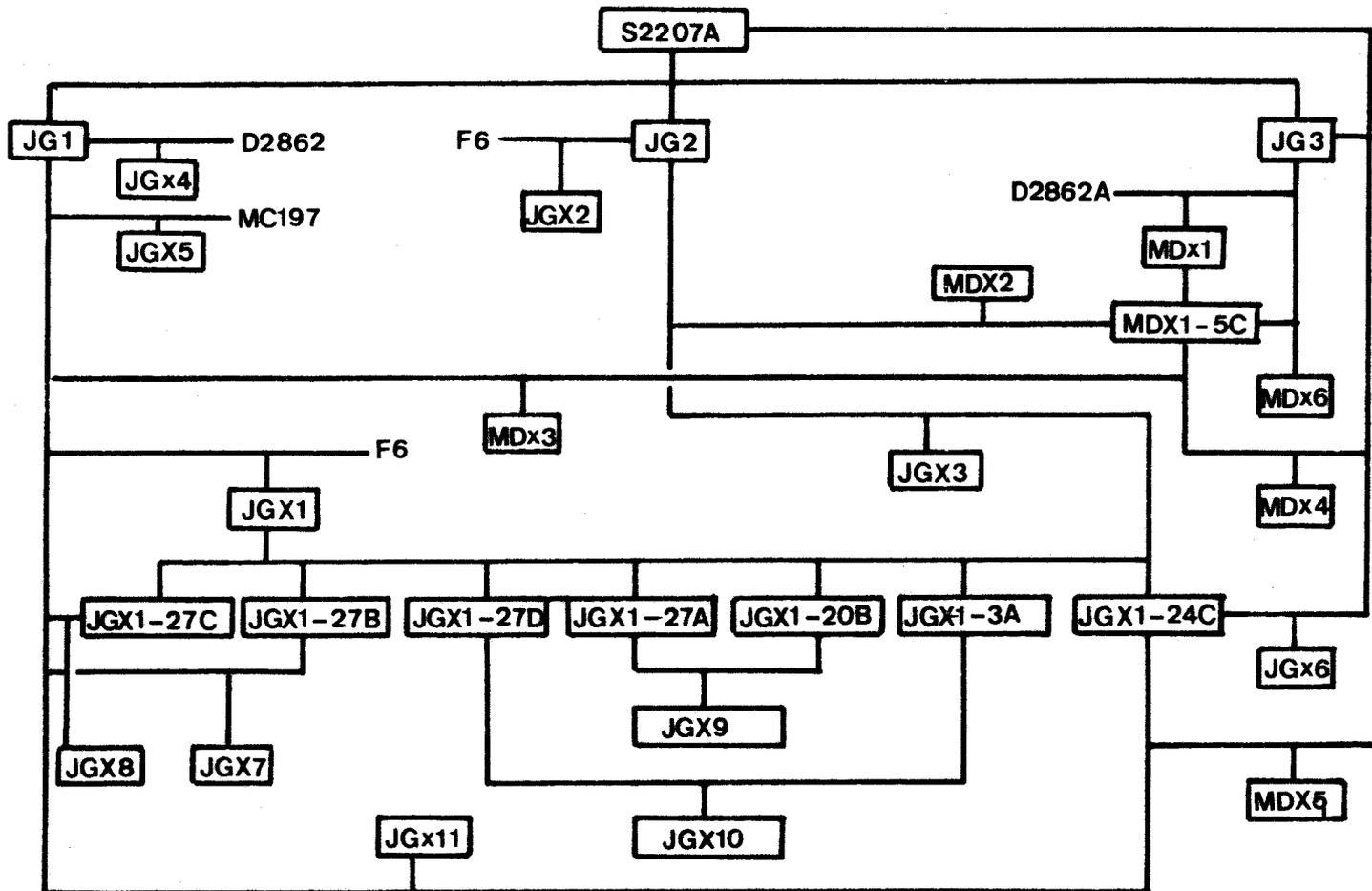


FIG.4-2 CRUCES EFECTUADOS EN EL ESTUDIO DE LA EXCRECION DE TREONINA

Los resultados de los cruces JGX1 y JGX2 se ajustan a la proporción 1 : 4 : 1 predecible si dos genes intervienen en la manifestación del carácter excretor . Sin embargo , en el cruce MDX1 resulta un alto número de tetradas ditipo parentales , que para una herencia digénica sólo es explicable si los dos genes implicados están ligados entre si . Ya que JG3 fue obtenido y estudiado más tarde y que el conocimiento de JG1 y JG2 fue una herramienta importante en el estudio de JG3 , nos centraremos en el estudio de estos dos mutantes y posteriormente en el de JG3 .

Del cruce JGX1 se obtuvo un derivado meiótico , la espora JGX1-24C de fenotipo excretor y sexo a , que se cruzó con JG2 (cruce JGX3) . El diploide era excretor y , ya que JG1 y JG2 fueron aislados en la misma mutagénesis , consideraremos a JG1 y JG2 como mutantes alélicos y centraremos nuestro estudio sólo en JG1 .

La excreción de treonina era digénica , a pesar de que los excretos se seleccionaron por reversión en el gen de la aspartoquinasa . Supusimos , como hipótesis de trabajo , que en la excreción intervienen dos genes :

- El alelo revertido del gen HOM3 (hom3r) , que codifica una aspartoquinasa insensible a inhibición y causa la superproducción de treonina .
- Otro gen , cuyo alelo presente en las estirpes excretoras facilita

la excreción de treonina al medio . Lo llamaremos TEX (excreción de treonina) y supondremos que algunos de sus alelos recesivos permiten la excreción de treonina . Al alelo de este gen , existente en JG1 , JG2 y JG3 , lo llamaremos tex1-1 .

IV.8.3.- Participación del alelo hom3r en la excreción .-

El gen HOM3 está situado , en Saccharomyces cerevisiae , a 4 cM del gen HIS1 . Aprovechando esta característica , cruzamos JG1 y JG3 por la estirpe D2862A portadora de una mutación en el gen HIS1 . Un alto porcentaje (96%) de esporas simultáneamente excretoras y prototrofas para la histidina , en la descendencia meiótica , sería un buen indicio de que el alelo hom3r participa en la excreción ; en caso contrario , esperaríamos que sólo la mitad de las esporas excretoras fuesen prototrofas para la histidina . Los resultados de estos cruces (Tabla IV-9) demuestran claramente la participación del alelo hom3r en la excreción . Posteriormente , los estudios bioquímicos confirmaron esta indicación .

- TABLA IV-9 -

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>Esp. Exc.</u>	<u>Exc. e HIS1</u>	<u>Exc. e his1</u>
JGX4	37	56	56	0
MDX1	19	32	28	4

IV.8.4.- Existencia del alelo tex1-1 en la estirpe parental S2207A.-

Para aclarar si el alelo tex1-1 , estaba presente en la estirpe parental o habia sido inducido por mutagénesis simultáneamente con la reversión para homoserina , cruzamos la espóra JGX1-24C con el parental S2207A y se analizó la segregación de la excreción entre la descendencia meiótica . Los resultados se muestran en la tabla IV-10 .

- TABLA IV-10 -

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>4E:0NE</u>	<u>3E:1NE</u>	<u>2E:2NE</u>	<u>1E:3NE</u>	<u>0E:4NE</u>
JGX6	23	0	0	23	0	0

En este cruce solo está segregando un gen de los dos necesarios para la excreción ; este gen tiene que ser el alelo hom3r implicando que el alelo tex1-1 estaba ya presente en S2207A , dónde se mantenía criptico al ser esta estirpe auxotrofa para la homoserina .

Con objeto de descartar un posible papel regulador del gen TEX1 sobre la síntesis de treonina a partir de homoserina y apoyar la hipótesis de su intervención en la excreción , no en la superproducción de treonina , cruzamos JG1 con MC197 , estirpe portadora de una mutación en el gen ARG4 , que mapea a 8 cM del gen THR1 , único gen de la ruta de biosíntesis de treonina regulado por el producto final . La tabla IV-11 muestra que las esporas excretoras eran mitad auxotrofas para la arginina y mitad prototrofas , lo que demuestra que el gen TEX1 no es el gen THR1 .

- TABLA IV-11 -

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>Esp. Exc. y arg4</u>	<u>Esp. Exc. y ARG4</u>
JGX5	17	11	11

IV.8.5.- Relaciones de dominancia y recesividad .-

A partir de esporas obtenidas en los cruces anteriores se fabricaron una serie de diploides y se estudió el carácter excretor . Los genotipos y fenotipos observados en estas cepas fueron (Tabla IV-12) :

- TABLA IV-12 -

<u>Diploide</u>	<u>Genotipo asignado</u>	<u>Fenotipo</u>
JGX1	<u>hom3r/HOM3</u> , <u>tex1-1/TEX1</u>	No excretor
JGX6	<u>hom3r/hom3</u> , <u>tex1-1/tex1-1</u>	Excretor
JGX1-24C x MD10	<u>hom3r/HOM3</u> , <u>tex1-1/tex1-1</u>	No excretor

MD10 es un revertiente espontáneo para la homoserina , derivado de S2207A .

El resultado más conflictivo de estos cruces , es el último donde se esperaba que el carácter excretor se comportara como semi-dominante ; sin embargo , su fenotipo es no excretor , usando el test de alimentación cruzada.

IV.8.6.- Confirmación de la naturaleza digénica del carácter excretor en la estirpe JG1 .-

Como confirmación de todos los resultados anteriores , se cruzaron las cuatro esporas de la tetrada 27 del cruce JGX1 con JG1 o derivados meióticos excretores de sexo contrario . La tetrada JGX1-27 tenía un fenotipo de 0 esporas excretoras : 4 esporas no excretoras . Según nuestro modelo esta tetrada es un ditipo no parental , con dos esporas de genotipo hom3r TEX1 y 2 esporas HOM3 tex1-1 , por tanto al cruzar todas las esporas de la tetrada con una estirpe excretora (hom3r tex1-1) deberíamos esperar siempre una segregación de 2 esporas excretoras : 2 esporas no excretoras . Hechos los cruces , los resultados (Tabla IV-13) se ajustan a la predicción de nuestro modelo .

- TABLA IV-13 -

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>4E:0NE</u>	<u>3E:1NE</u>	<u>2E:2NE</u>	<u>1E:3NE</u>	<u>0E:4NE</u>
JGX7	14	0	0	14	0	0
JGX8	11	0	0	11	0	0
JGX9	6	0	0	6	0	0
JGX10	12	0	0	12	0	0

Para confirmar más aún nuestra hipótesis acerca de las funciones de los alelos hom3r y tex1-1 y su interrelación dentro de la expresión del fenotipo excretor , se analizaron los pooles y exudados de las cuatro esporas de una tetrada tetratipo proveniente del cruce JGX1 . En estas esporas se dan los cuatro tipos posibles de genotipos que deben corresponderse a los siguientes fenotipos :

<u>Genotipo</u>	<u>Fenotipo</u>
a) <u>hom3r</u> <u>tex1-1</u>	Excreción fuerte . Pool mayor que c) y d) y menor que b) . Acumula y excreta .
b) <u>hom3r</u> <u>TEX1</u>	Excreción menor que a) o nula , pool mayor que a) , c) ó d) . Acumula (<u>hom3r</u>) , no excreta (<u>TEX1</u>) .
c) <u>HOM3</u> <u>tex1-1</u>	Excreción muy pequeña o nula , pool bajo como d) . No acumula (<u>HOM3</u>) .
d) <u>HOM3</u> <u>TEX1</u>	Excreción nula , pool bajo . Tipo silvestre .

La tabla IV-14 recoge los valores de los pooles y exudados de las cuatro esporas , así como el genotipo asignado .

Es notable que la espora JGX1-32A , a pesar de no estar desregulada , por llevar el alelo tex1-1 es capaz de excretar una pequeña cantidad de treonina , no detectable por el test de alimentación cruzada .

- TABLA IV-14 -

<u>Espora</u>	<u>Pool (mg/gps)</u>	<u>Exudado (mg/gps)</u>	<u>Genotipo asign.</u>
JGX1-32A	0,5	2,9	<u>HOM3</u> <u>tex1-1</u>
JGX1-32B	5,5	43,6	<u>hom3r</u> <u>tex1-1</u>
JGX1-32C	Trazas	Trazas	<u>HOM3</u> <u>TEX1</u>
JGX1-32D	16,9	3,2	<u>hom3r</u> <u>TEX1</u>

IV.8.7.- Estudio genético de la espora MDX1-5C.-

En un intento de explicar la proporción tan alta de tetradas diti-pos parentales obtenidas en el cruce MDX1 , seleccionamos la espora MDX1-5C de fenotipo a ade2 thr^{exc} . Los diploides de esta espora con JG1 , JG2 y S2207A no son excretores , al contrario de lo que debería suceder si MDX1-5C fuese idéntico a JG1 . Si fueron excretores los diploides entre JG3 y JGX1-24C (cruce MDX5) . Como previamente se habia demostrado , la excreción necesita al menos dos genes : un alelo revertido del gen HOM3 y un gen que posibilita la excreción , al cual hemos llamado TEX1 . Si la espora MDX1-5C es excretora , debe llevar el alelo hom3r pero si su diploide con JG1 y S2207A no es excretor , la única explicación es que sea TEX1 , esto implicaría que al ser ella excretora y TEX1 , debe tener otro gen que posibilite la excreción , al que llamaremos tex2-1 . Esta fue nuestra hipótesis de trabajo .

IV.8.8.- Existencia del gen TEX2 .-

Según esta hipótesis , la espora MDX1-5C tendría un genotipo a ade2 hom3r tex2-1 . Si esto fuese así , en los cruces MDX4 y MDX3 deberían esperarse tetradas ditipo parentales y tetratipos , respectivamente . Los resultados de estos cruces los reflejamos a continuación en la tabla IV-15 .

- TABLA IV-15 -

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>0E:4NE</u>	<u>1E:3NE</u>	<u>2E:2NE</u>	<u>3E:1NE</u>	<u>4E:0NE</u>
MDX4	18	1	3	14	0	0
MDX3	27	0	0	8	12	7

Estos resultados se ajustan a la hipótesis de que la espora MDX1-5C tiene un genotipo hom3r , tex2-1 . También permiten explicar el alto grado de tetradas DP obtenidas en el cruce MDX1 . Ya que D2862A no lleva los alelos tex1-1 ni tex2-1 , como se demuestra en el cruce JGX4 , es obvio pensar que JG3 es un doble mutante de genotipo hom3r tex1-1 tex2-1 , en contraposición a JG1 y JG2 que son revertientes sencillos de genotipo hom3r tex1-1 TEX2 .

IV.8.9.- Estudio bioquímico de la aspartoquinasa de las estirpes

JG1 , JG3 , JGX1 y F6 .-

Para confirmar la naturaleza de la desregulación presente en las estirpes excretoras JG1 y JG3 , se estudió la inhibición por treonina de la aspartoquinasa presente en estas estirpes . Como control , se incluyeron también las estirpes F6 y JGX1 .

Los resultados se representan en la figura IV-3 y muestran claramente que mientras existe una fuerte inhibición por treonina de la aspartoquinasa de F6 , esta inhibición es prácticamente nula en JG1 y JG3 . El diploide JGX1 muestra un comportamiento intermedio , previsible según su genotipo , ya que en esta estirpe coexisten alelos desregulados y regulados del gen HOM3 .

La tetrada JGX1-32 fue usada anteriormente en la confirmación del genotipo hom3r tex1-1 propuesto para JG1 y JG2 (Tabla IV-14 , apartado IV.8.6) . Hemos medido las actividades aspartoquinásicas de las cuatro esporas de la tetrada y sus sensibilidades a inhibición por treonina (Tabla IV-16) . Es claro que las esporas 32A y 32C llevan el mismo tipo sensible de aspartoquinasa , aportado por F6 (HOM3) ; a pesar de eso , 32A (tex1-1) era capaz de excretar treonina al medio , 32C era incapaz de ello (TEX1) . 32B y 32D poseen la aspartoquinasa insensible a treonina aportada por JG1 (hom3r) , sin embargo 32B excreta la treonina sobreproducida (tex1-1) mientras que 32C , no lo hace (TEX1) .

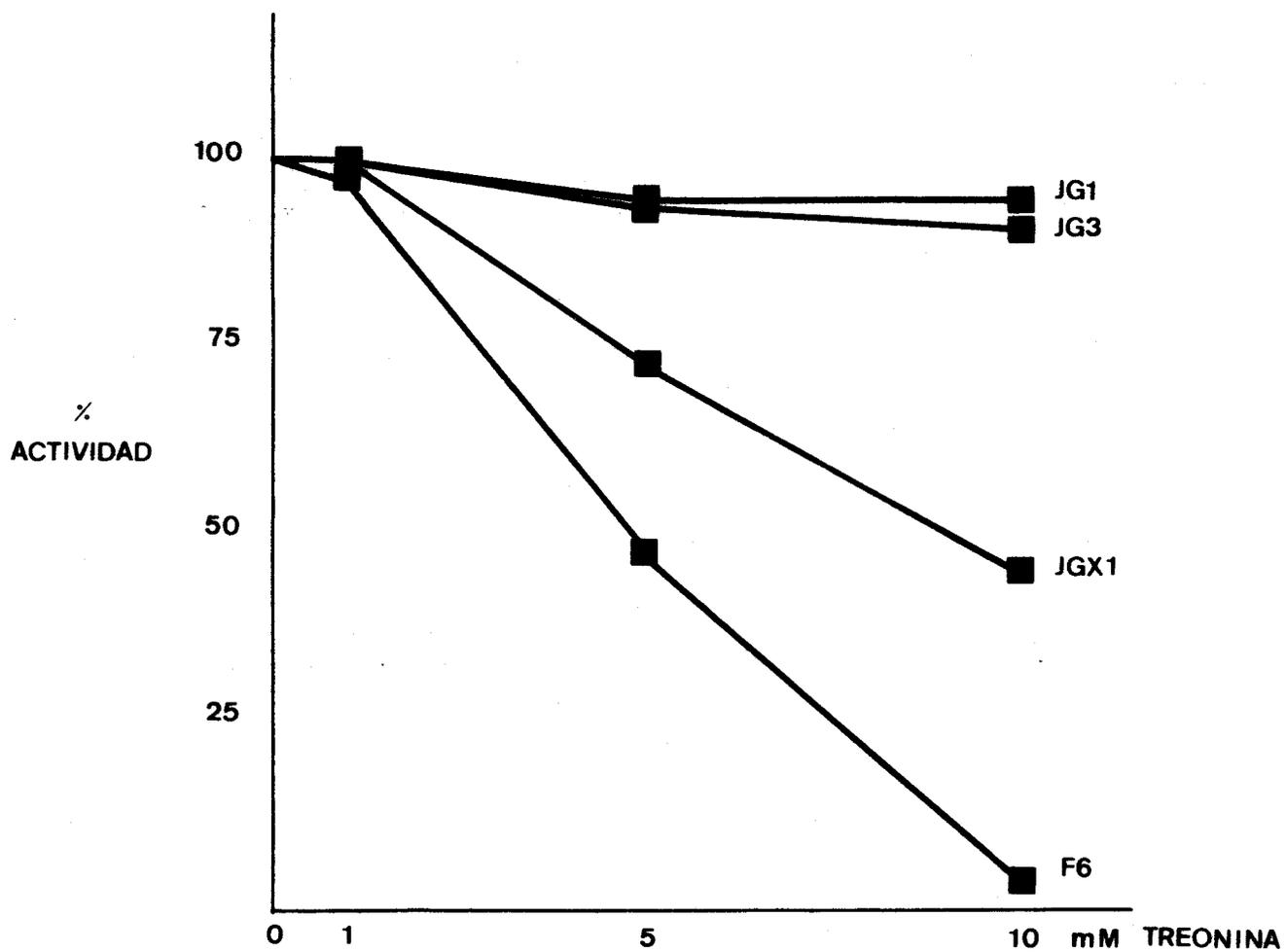


FIG.4-3 INHIBICION POR TREONINA DE LA ACTIVIDAD DE LA ASPARTOQUINASA EN ESTIRPES EXCRETORAS Y NO EXCRETORAS DE TREONINA

- TABLA IV-16 -

ESTUDIO DE LA ASPARTOQUINASA EXISTENTE EN CADA ESPORA DE LA TETRADA
JGX1-32 , Y SUS ESTIRPES PARENTALES F6 Y JG1 .-

<u>Estirpe</u>	<u>Actividad aspartoquinásica</u>		<u>Inhibición</u> (%)
	<u>Concentración de treonina</u>		
	0 mM	10 mM	
32-A	1,27	0,037	97.1
32-B	0,83	0,83	0
32-C	1,26	0,06	96,25
32-D	0,88	0,87	2
F6	1,19	0,024	98
JG1	0,85	0,84	1,2

La actividad se expresa en microMoles por gramo de proteína y
minuto de incubación ($\mu\text{M g}^{-1} \text{min}^{-1}$).

SUPERPRODUCCION Y EXCRECION DE LISINA

V.1.- SELECCION DE CLONES RESISTENTES A TIALISINA Y EXCRETORES DE LISINA .-

Los mutantes resistentes a tialisina se obtuvieron por mutagénesis con N₃ y selección sobre tialisina 0,1 mM , 0,5 mM y 1 mM en medio con prolina como única fuente de nitrógeno . Se utilizó la estirpe F6 como partida . Los resultados de estas experiencias difieren considerablemente de los publicados en la bibliografía . Haidaris y col (1977) obtienen al usar la estirpe silvestre X2180 , en las mismas condiciones de mutagénesis , 55 colonias resistentes a tialisina 1 mM de un total de 2270 colonias probadas ; estas 55 colonias las clasifican en tres grupos : buenos productores (5) , intermedios (5) , peores productores (45) . Nosotros , usando la estirpe F6 , no hemos podido conseguir resistencia a 0,5 y 1 mM , solamente a 0,1 mM . Usando la misma estirpe de los autores anteriores , si se consiguen resistentes a 0,5 y 1 mM , pero sigue siendo diferente la frecuencia de excretores obtenida , como muestra la tabla V-1 . En estos experimentos se usó la estirpe MC40 como césped auxotrofo para la lisina .

Los clones excretores derivados de F6 se pasaron tres veces por medio rico y se volvió a probar sus fenotipos . De los 41 clones seleccionados como excretores en el primer pase , solamente 17 mostraron una excreción clara y fuerte , aunque todos ellos seguían siendo resistentes a tialisina 0,1 mM . Se seleccionaron estos 17 clones para estu-

dios posteriores y se nombraron desde F601 a F617 .

- TABLA V-1 -

<u>Estirpe</u>	<u>Resistencia</u>	<u>Nº Col. prob.</u>	<u>Nº Col. Excr.</u>	<u>% Excr.</u>
X2180	1 mM	243	9	3,7
X2180	0,5 mM	322	1	0,3
F6	0,1 mM	1574	41	2,6

La baja frecuencia de excretores obtenida y el comportamiento genético que se verá posteriormente , nos indujo a probar la frecuencia espontánea de excretores en una población no mutagenizada del parental F6 ; se probaron 2000 clones derivados de F6 y ninguno de ellos resultó ser excretor .

Los halos obtenidos con excretores derivados de X2180 eran semejantes a los obtenidos con excretores derivados de F6 y ya que X2180 carece de marcadores auxotrofos , estos excretores no se han seguido estudiando posteriormente .

Por el tamaño de los halos obtenidos , los distintos excretores de lisina derivados de F6 , pueden clasificarse en tres grupos :

- Excreción buena : 2 estirpes .
- Excreción media : 7 estirpes .
- Excreción mala : 3 estirpes .

Todas las estirpes seleccionadas como resistentes a tialisina y excretoras de lisina , muestran resistencia a δ -Hidroxilisina , otro análogo de la lisina , a concentraciones de 1 mM , en medio con prolina como única fuente de nitrógeno .

V.2.- ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE LOS MUTANTES RESISTENTES A TIALISINA .-

La estirpe parental F6 y sus derivadas resistentes a tialisina se cultivaron en medio con prolina como única fuente de nitrógeno y en presencia y ausencia de tialisina 0,1 mM . Los parámetros del crecimiento se calcularon como en el caso de la resistencia a etionina . Los resultados se muestran en la tabla V-2 .

V.3.- ELIMINACION POR L-LISINA DE LA INHIBICION POR TIALISINA .-

Se estudió la eliminación del efecto tóxico de la tialisina por L-Lisina y D-Lisina . Los resultados se muestran en la tabla V-3 donde se representa el rendimiento (medido como peso seco y expresado como porcentaje respecto al control) de la estirpe F6 creciendo a distintas concentraciones de Tialisina , L-Lisina y D-Lisina .

- TABLA V-2 -

<u>Est.</u>	<u>Tialis. 0,1 mM</u>	<u>v(h⁻¹)</u>	<u>Td (h)</u>	<u>r²</u>	<u>Rendim. (cel/ml)</u>
F6	-	0,1	6,9	0,99	2,1 10 ⁸
F6	+		No crecimiento		
F606	-	0,09	7,66	1,0	1,93 10 ⁸
F606	+	0,05	13,8	0,99	0,83 10 ⁸
F617	-	0,05	13,8	0,99	0,5 10 ⁸
F617	+	0,05	13,8	0,98	0,46 10 ⁸
F630	-	0,085	8,1	0,99	1,6 10 ⁸
F630	+	0,08	8,6	0,99	1,2 10 ⁸
MDX33	-	0,12	5,7	1,0	2,3 10 ⁸
MDX33	+		No crecimiento		

v : Velocidad de crecimiento

Td : Tiempo de duplicación

r² : Ajuste del crecimiento a una curva exponencial

- TABLA V-3 -

<u>Estirpe</u>	<u>Tialisina (mM)</u>	<u>L-Lisina (mM)</u>	<u>D-Lisina (mM)</u>	<u>Rendim.</u>
F6	0	0	0	100
F6	0,1	0	0	0
F6	0,1	0,0068	0	12
F6	0,1	0,0136	0	54
F6	0,1	0,034	0	100
F6	0,1	0	0,0068	0,12
F6	0,1	0	0,0136	0,14
F6	0,1	0	0,034	0,01

V.4.- APARICION DE LISINA EN EL MEDIO DE CULTIVO .-

Se midió la aparición de lisina en el medio de cultivos creciendo en agitación , junto con el consumo de glucosa , descenso de pH y crecimiento del cultivo . Fueron estudiadas las estirpes F606 , F617 , F631 y se incluyó también la estirpe parental F6 , como cepa control no productora .

Los resultados obtenidos se representan en la tabla V-4 y en las figuras V-1 , V-2 , V-3 y V-4 . Cabe destacar el escaso crecimiento presentado por la estirpe F617 ; a pesar de esto , comparativamente , su rendimiento en la producción de lisina (expresado como g. de lisina producida respecto a g. de glucosa consumido) es intermedio entre las estirpes F631 y F606 .

- TABLA V-4 -

Producción de lisina por la estirpe F631 .-

<u>Horas</u>	<u>Biomasa (cel/ml)</u>	<u>Glucosa (g/l)</u>	<u>pH</u>	<u>Lisina (mg/l)</u>
0	3 10 ⁶	20	5,0	No detect.
12	9 10 ⁷	18,64	4,0	18,2
24	1 10 ⁸	4,25	3,2	25,1
36	1,1 10 ⁸	3,08	2,5	26,0
48	1,2 10 ⁸	2,57	2,4	26,4
60	1,5 10 ⁸	2,4	2,4	25,9
72	1,5 10 ⁸	2,4	2,3	26,0

Producción de lisina por la estirpe F6 .-

<u>Horas</u>	<u>Biomasa (cel/ml)</u>	<u>Glucosa (g/l)</u>	<u>pH</u>	<u>Lisina (mg/l)</u>
0	1,7 10 ⁶	20	5,0	N. d.
12	1,0 10 ⁸	7,6	4,0	N. d.
24	1,4 10 ⁸	4,2	3,5	N. d.
36	1,5 10 ⁸	2,1	3,0	N. d.
48	1,4 10 ⁸	0,8	2,2	N. d.
60	1,6 10 ⁸	0,6	2,0	N. d.
72	2,0 10 ⁸	0,3	2,0	N. d.

- TABLA V-4 (cont.) -

Producción de lisina por la estirpe F617 .-

<u>Horas</u>	<u>Biomasa (cel/ml)</u>	<u>Glucosa (g/l)</u>	<u>pH</u>	<u>Lisina (mg/l)</u>
0	0,4 10 ⁶	22,8	5,0	No detect.
12	1,18 10 ⁶	17,2	5,0	No detect.
24	2,0 10 ⁶	15,8	4,8	No detect.
36	3,9 10 ⁶	15	4,7	5,4
48	8,1 10 ⁶	14,9	4,6	25,4
60	1,0 10 ⁷	15,2	4,7	31,7
72	1,0 10 ⁷	15,0	4,6	32

Producción de lisina por la estirpe F606 .-

<u>Horas</u>	<u>Biomasa (cel/ml)</u>	<u>Glucosa (g/l)</u>	<u>pH</u>	<u>Lisina (mg/l)</u>
0	1,7 10 ⁶	20	5,0	No detect.
12	1,0 10 ⁸	6,6	4,0	35,0
24	1,0 10 ⁸	2,9	3,2	47,8
36	1,0 10 ⁸	1,8	2,5	48,2
48	1,1 10 ⁸	1,2	2,2	48
60	1,0 10 ⁸	1,0	2,2	49
72	1,0 10 ⁸	0,5	2,2	48,5

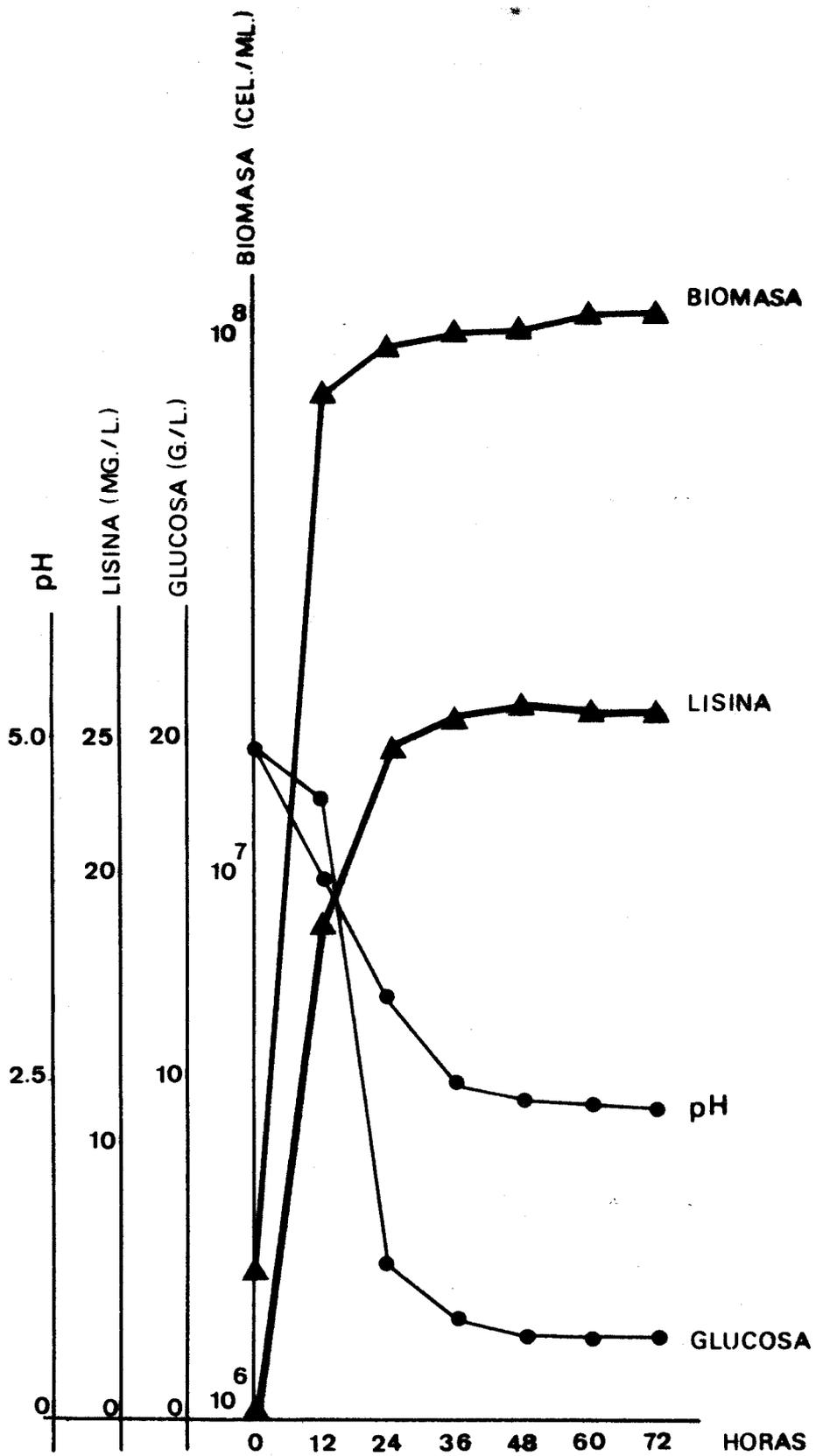


FIG.5-1 CINETICA DE APARICION DE LISINA EN UN CULTIVO DE LA ESTIRPE F606

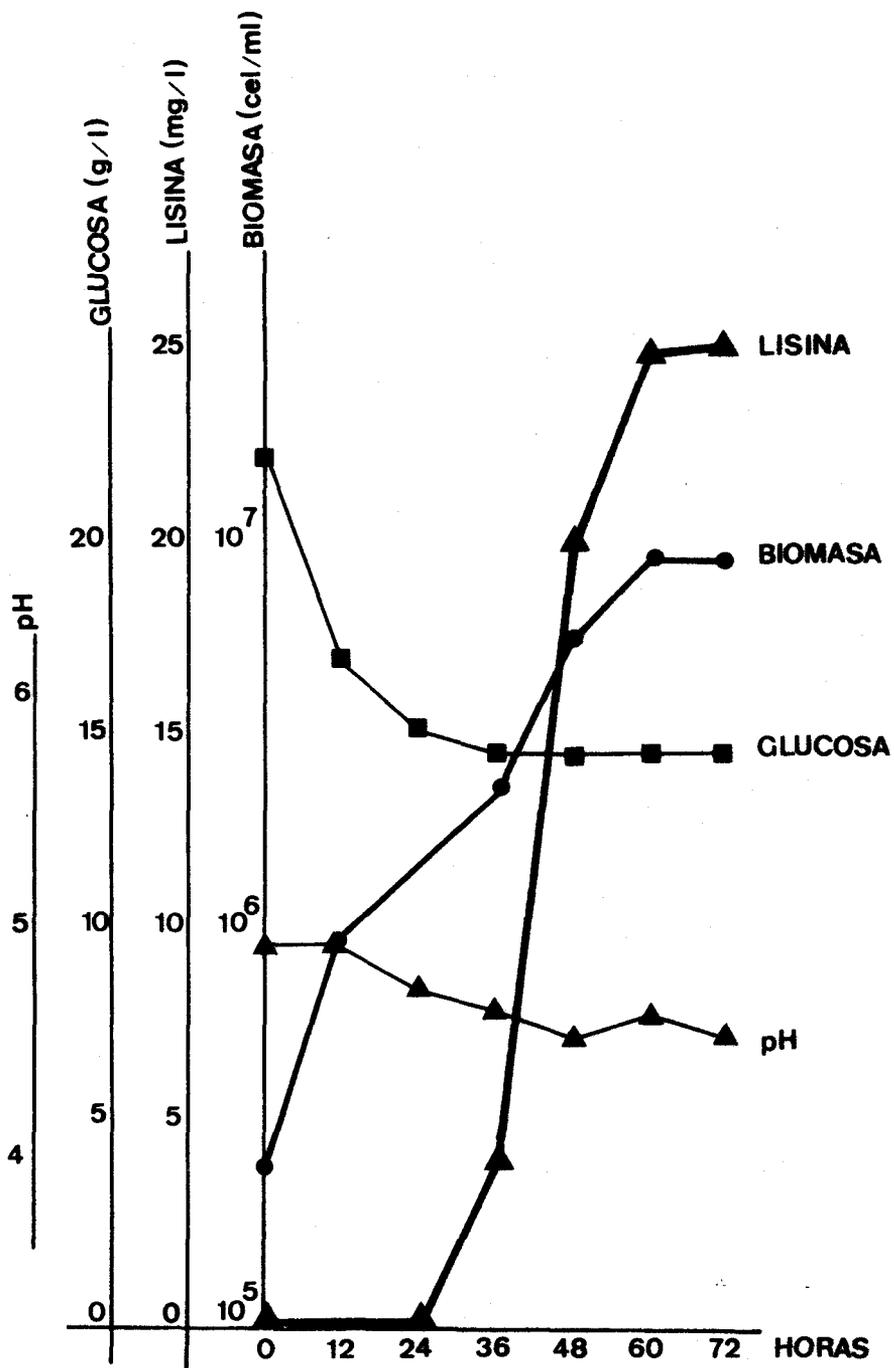


FIG.5-2 CINETICA DE APARICION DE LISINA EN UN CULTIVO DE LA ESTIRPE F617.

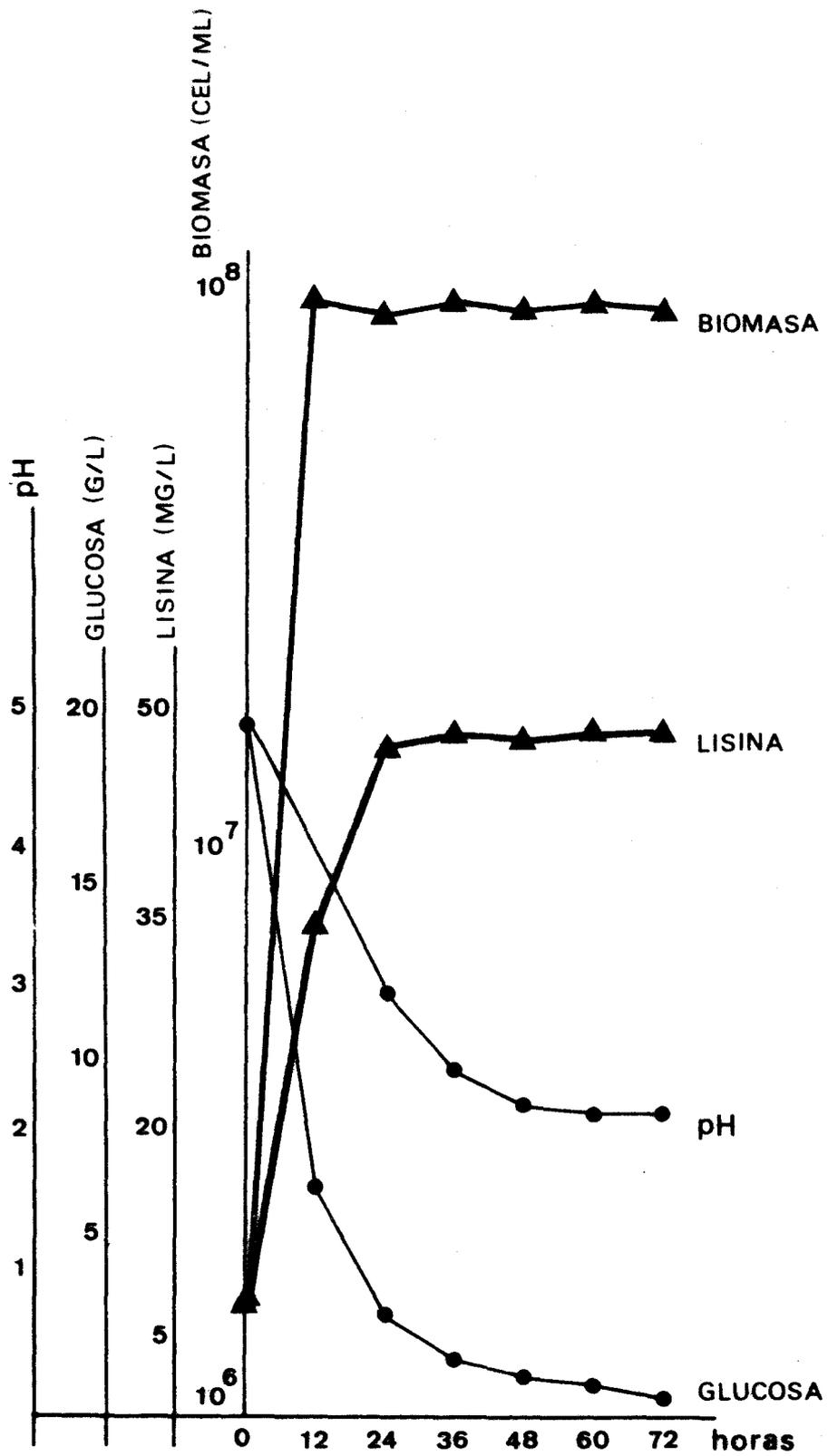


FIG. 5-3 CINETICA DE APARICION DE LISINA EN UN CULTIVO DE LA ESTIRPE F631

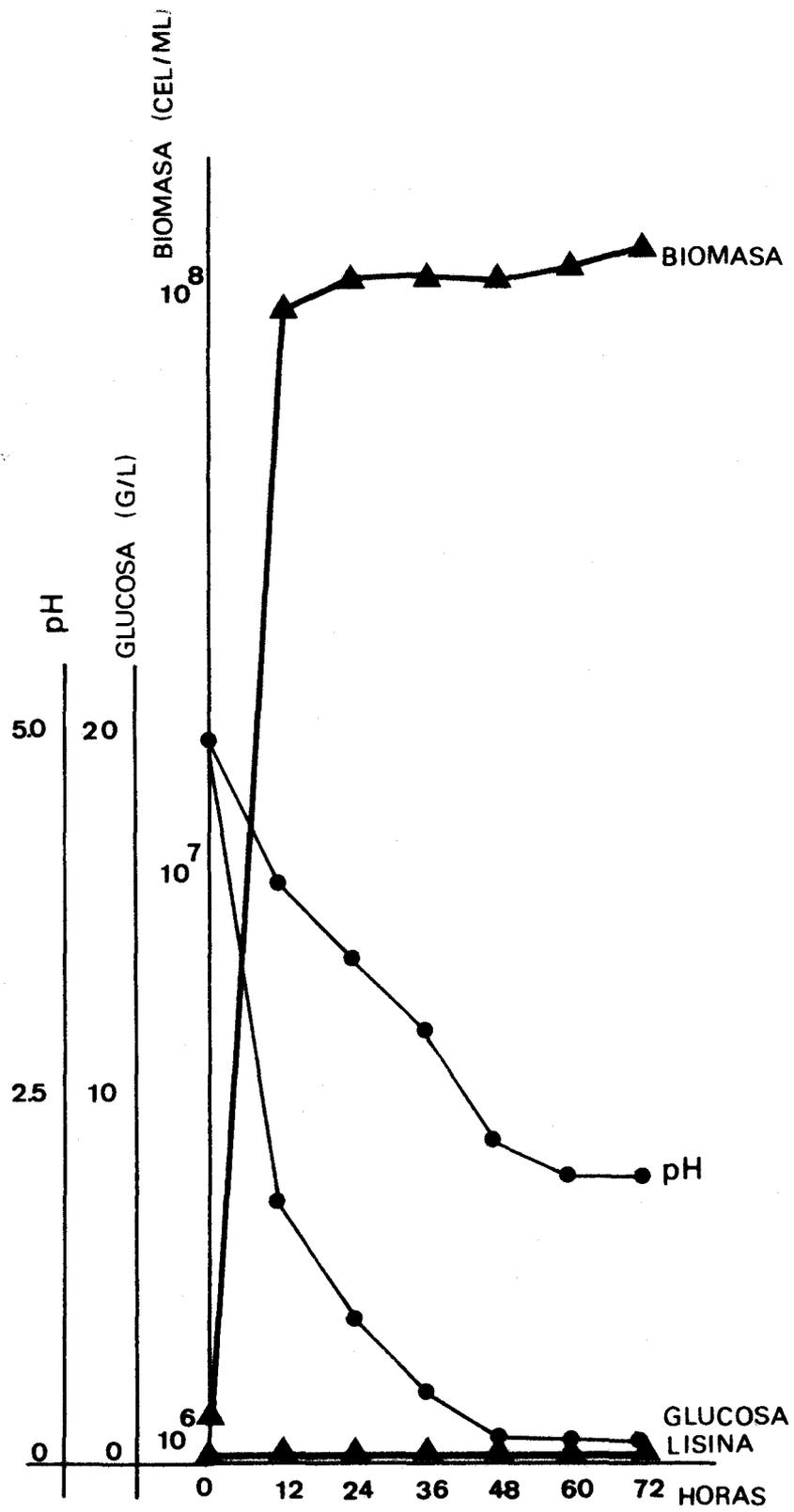
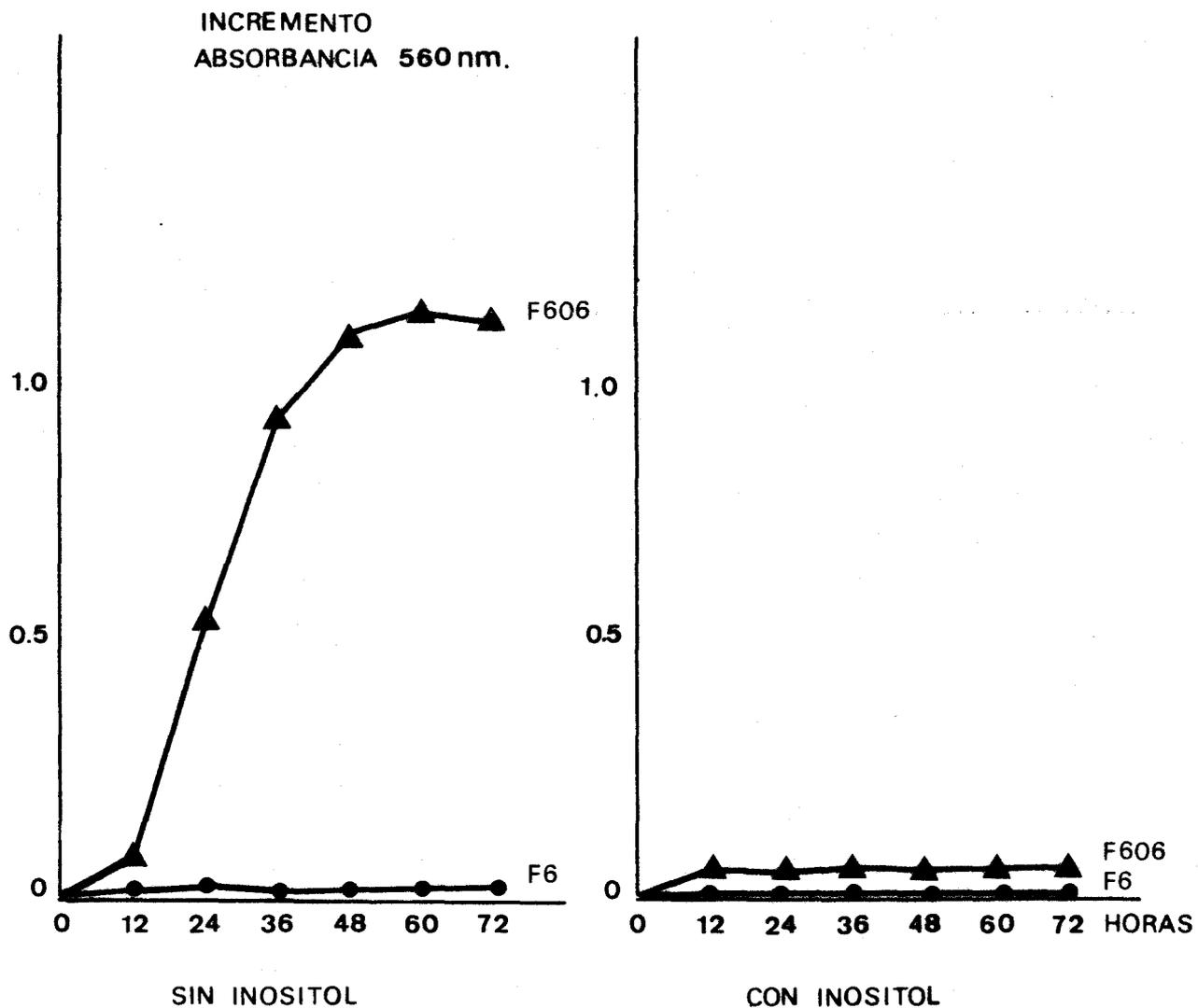


FIG.5-4 CINETICA DE APARICION DE LISINA EN UN CULTIVO DE LA ESTIRPE F6

V.5.- INFLUENCIA DEL INOSITOL SOBRE LA RESISTENCIA A TIALISINA Y LA EXCRECION DE LISINA .-

Cuando los clones excretores se cultivan en medio sólido o líquido con tialisina 0,1 mM e inositol 10 mg/l , se pierde el fenotipo de resistencia y el crecimiento es nulo . En las figuras V-5 y V-6 , podemos ver los crecimientos alcanzados (expresados como incremento de D.O. a 540 nm.) por las estirpes F606 y F6 , creciendo en medio mínimo más tialisina y medio mínimo más tialisina e inositol .

La presencia de inositol en el medio , estimula la excreción de lisina exactamente como en el caso de la excreción de treonina . Sin embargo , algunos de los excretores de lisina eran capaces de alimentar un césped de MC40 , incluso en ausencia de inositol .



FIGS. 5-5 Y 5-6. INFLUENCIA DEL INOSITOL SOBRE LA RESISTENCIA A TIALISINA DE LAS ESTIRPES F606 Y F6

V.6.- ESTUDIO GENETICO DE LOS MUTANTES EXCRETORES DE LISINA .-

Los cruces efectuados en este estudio se encuentran resumidos en la tabla V-9 y representados en la figura V-7 . En la tabla V-10 se recopilan las estirpes utilizadas y sus genotipos .

V.6.1.- Relaciones de dominancia y recesividad .-

Los 17 clones seleccionados anteriormente como excretores de lisina fueron cruzados con la estirpe silvestre F3 . Todos los diploides resultaron ser sensibles a etionina y no excretores de lisina .

V.6.2.- Análisis meiótico de los diploides .-

Las segregaciones obtenidas al analizar meióticamente algunos de los mutantes excretores de lisina resultan ser sumamente confusas cuando se considera el fenotipo excretor , aunque claras si se considera la segregación del genotipo de resistencia . En todos los casos estudiados la resistencia segrega monogénicamente , excepto en la estirpe F606 , e independientemente de la excreción .

V.6.3.- Segregación de la resistencia a tialisina .-

La tabla V-5 muestra las segregaciones de la resistencia a tiali-

- TABLA V-5 -

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>4R:0S</u>	<u>3R:1S</u>	<u>2R:2S</u>	<u>1R:3S</u>	<u>0R:4S</u>
MDX33	23	1	10	12	0	0
MDX34	9	0	6	3	0	0
MDX35	20	0	0	20	0	0
MDX36	25	0	0	25	0	0
MDX37	17	0	0	17	0	0
MDX38	12	0	0	12	0	0
MDX39	13	0	0	13	0	0
MDX40	10	0	0	10	0	0
MDX41	14	0	0	14	0	0
MDX42	15	0	0	15	0	0
MDX43	16	0	0	16	0	0

sina en estirpes excretoras de lisina cruzadas con diferentes estirpes sensibles .

La estirpe F606 muestra una segregación para la resistencia a tialisina no conforme a las proporciones esperadas para uno o dos genes . Sin embargo , cuando el fenotipo de resistencia se prueba por siembra en placa en lugar de por réplica sobre terciopelo , la segregación , con el tiempo , tiende a ser monogénica . Igualmente pasa cuando la segregación para la resistencia se prueba a concentraciones de tialisina en el medio inferiores a 0,1 mM (tabla V-6) .

- TABLA V-6 -

<u>Cruce</u>	<u>Tialis. (mM)</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>4R:0S</u>	<u>3R:1S</u>	<u>2R:2S</u>	<u>1R:3S</u>	<u>0R:4S</u>
MDX49	0,1	23	5	11	7	0	0
MDX49	0,05	23	1	4	18	0	0

V.6.4.- Segregación de la excreción de lisina .-

En todas las cepas estudiadas la segregación del fenotipo excretor es sumamente confusa (Tabla V-7) . La dificultad de asignar una segregación determinada a estos cruces , obedece a dos hechos principales :

- Dentro de un mismo cruce las potencias excretoras de las esporas varían mucho entre si . Más aún , la excreción no es estable con el tiempo y siempre decreciente .
- Cruces de un mismo excretor con diferentes cepas no excretoras re-

- TABLA V-7 -

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>0E:4NE</u>	<u>1E:3NE</u>	<u>2E:2NE</u>	<u>3E:1NE</u>	<u>4E:0NE</u>
MDX33	21	2	15	4	0	0
MDX34	9	5	2	2	0	0
MDX35	20	8	4	8	0	0
MDX36	25	11	12	2	0	0
MDX37	17	3	12	2	0	0
MDX38	13	3	5	5	0	0
MDX39	10	6	4	0	0	0
MDX40	10	2	6	2	0	0
MDX41	14	1	10	3	0	0
MDX42	15	2	10	3	0	0
MDX43	16	4	9	3	0	0

sultan en segregaciones muy variables , según el parental implicado en el cruce .

Los resultados obtenidos no permiten concluir nada sobre el número de genes implicados en la manifestación del fenotipo excretor . Su probable significado será considerado posteriormente en la discusión de los resultados .

En un intento de aclarar la naturaleza genética de la resistencia y de la excreción en estas cepas , se cruzaron entre si las cuatro esporas de una tetrada de fenotipo 1E:3NE para la excreción y 2R:2S para la resistencia , proveniente del cruce MDX41 . Las cuatro esporas tenían el siguiente fenotipo :

MDX41-10A : a LIS^{exc} TIA^r

MDX41-10B : α LIS^{no exc} TIA^r

MDX41-10C : a LIS^{no exc} TIA^r

MDX41-10D : α LIS^{no exc} TIA^s

Los resultados de los cuatro cruces posibles se reflejan en la tabla V-8 . Parecen indicar la naturaleza monogénica de la resistencia y digénica de la excreción en la estirpe F617 , así como la independencia entre resistencia y excreción .

- TABLA V-8 -

SEGREGACION DE LA RESISTENCIA

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>0R:4S</u>	<u>1R:3S</u>	<u>2R:2S</u>	<u>3R:1S</u>	<u>4R:0S</u>
MDX45	14	0	0	14	0	0
MDX46	13	0	0	13	0	0
MDX47	12	0	0	12	0	0
MDX48	16	0	0	16	0	0

SEGREGACION DE LA EXCRECION

<u>Cruce</u>	<u>Nº Tetr.</u>	<u>0E:4NE</u>	<u>1E:3NE</u>	<u>2E:2NE</u>	<u>3E:1NE</u>	<u>4E:0NE</u>
MDX45	14	0	0	14	0	0
MDX46	13	2	10	1	0	0
MDX47	12	12	0	0	0	0
MDX48	16	3	9	2	0	0

- TABLA V-9 -

CRUCES EFECTUADOS EN EL ESTUDIO DE LOS MUTANTES EXCRETORES DE LISINA

<u>CRUCE</u>	<u>PARENTALES</u>	<u>OBJETO DEL CRUCE</u>
MDX33	F606 x S2207A	Segregación resistencia y excreción
MDX34	F606 x XK36A	Idem.
MDX35	F631 x MC215	Idem.
MDX36	F631 x XJB31B	Idem.
MDX37	F631 x S2207A	Idem.
MDX38	F631 x F3	Idem.
MDX39	F627 x F3	Idem.
MDX40	F617 x F3	Idem.
MDX41	F617 x S2207A	Idem.
MDX42	F614 x S2207A	Idem.
MDX43	F610 x S2207A	Idem.
MDX45	MDX41-10A x MDX41-10B	Idem.
MDX46	MDX41-10A x MDX41-10D	Idem.
MDX47	MDX41-10C x MDX41-10B	Idem.

- TABLA V-9 (cont.) -

<u>CRUCE</u>	<u>PARENTALES</u>	<u>OBJETO DEL CRUCE</u>
MDX48	MDX41-10C x MDX41-10D	Segregación de resistencia y excreción
MDX49	F606 x JG1	Segregación de resistencia Obtención excretos de treoni- na y lisina , simultaneamente .

GENOTIPOS ASIGNADOS A LAS ESTIRPES EXCRETORAS DE LISINA REFERIDAS

EN ESTE ESTUDIO .-

<u>ESTIRPE</u>	<u>GENOTIPO</u>
F606	<u>a</u> <u>ade2</u> TIA ^r LIS ^{exc}
F631	Idem.
F617	Idem.
F614	Idem.
F610	Idem.
MDX41-10A	<u>a</u> <u>ade2</u> <u>his6</u> TIA ^r LIS ^{exc}
MDX41-10B	<u>α</u> <u>ade2</u> <u>hom3</u> TIA ^s
MDX41-10C	<u>a</u> <u>ura3</u> <u>his6</u> TIA ^r
MDX41-10D	<u>α</u> <u>ura3</u> <u>hom3</u> TIA ^s

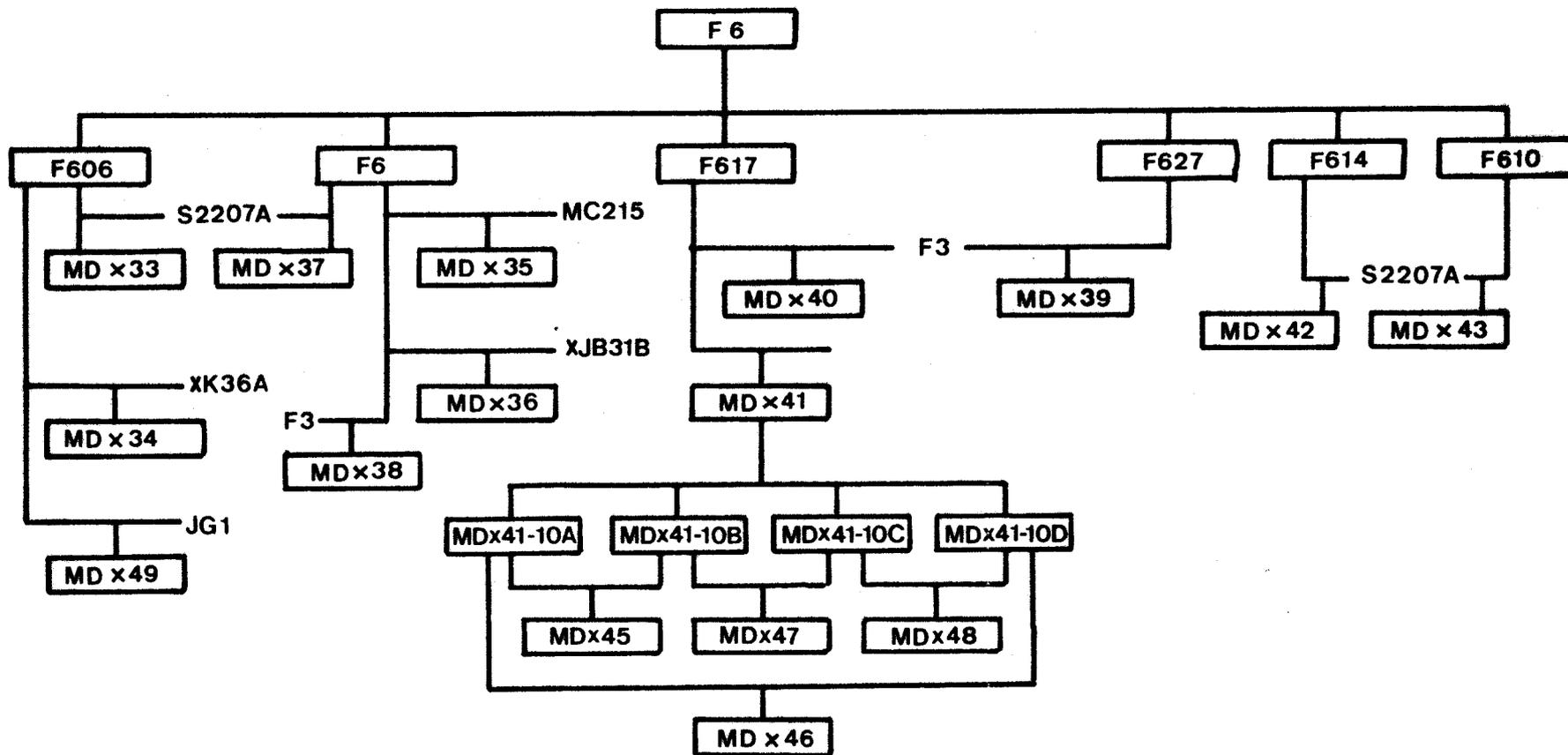


FIG. 5-7 CRUCES EFECTUADOS EN EL ESTUDIO DE LA EXCRECION DE LISINA

SUPERPRODUCCION Y EXCRECION DE MAS DE

UN AMINOACIDO

VI.1.- OBTENCION DE ESTIRPES EXCRETORAS DE MAS DE UN AMINOACIDO .-

Con el fin de obtener estirpes excretoras de más de un aminoácido , se hicieron todos los cruces posibles entre las tres clases de excretoras obtenidos y se seleccionaron derivados meióticos excretoras dobles . Se obtuvieron todos los tipos de dobles excretoras , con las frecuencias esperadas según las segregaciones individuales obtenidas previamente .

A continuación exponemos los distintos cruces efectuados y sus resultados (Tabla VI-1) .

- TABLA VI-1 -

Cruce MDX49 , entre JG1 (THR^{exc}) y F606 (LIS^{exc}) .-

<u>Nº Tetr.</u>	<u>Fenotipo probado</u>	<u>0R:4S</u>	<u>1R:3S</u>	<u>2R:2S</u>	<u>3R:1S</u>	<u>4R:0S</u>
23	Resist. Tialisina	5	11	7	0	0
		<u>0E:4NE</u>	<u>1E:3NE</u>	<u>2E:2NE</u>	<u>3E:1NE</u>	<u>4E:0NE</u>
23	Exc. Treonina	4	17	2	0	0
	Exc. Lisina	6	15	2	0	0

Esporas totales : 92

Esporas excretoras de treonina : 17

Esporas excretoras de lisina : 15

Esporas excretoras de treonina y lisina : 4

- TABLA VI-1 (cont.) -

Cruce MDX50 , entre F301 (MET^{exc}) y F617 (LIS^{exc}) .-

<u>Nº Tetr.</u>	<u>Fenotipo probado</u>	<u>0R:4S</u>	<u>1R:3S</u>	<u>2R:2S</u>	<u>3R:1S</u>	<u>4R:0S</u>
10	Resist. Etionina	0	0	10	0	0
	Resist. Tialisina	0	0	10	0	0
		<u>0E:4NE</u>	<u>1E:3NE</u>	<u>2E:2NE</u>	<u>3E:1NE</u>	<u>4E:0NE</u>
10	Exc. Metionina	0	0	10	0	0
	Exc. Lisina	2	7	1	0	0

Esporas totales : 40

Esporas excretoras de metionina : 18

Esporas excretoras de Lisina : 7

Esporas excfedoras de metionina y lisina : 2

- TABLA VI-1 (cont.) -

Cruce MDX51 , entre JG1 (THR^{exc}) y F301 (MET^{exc}) .-

<u>Nº Tetr.</u>	<u>Fenotipo probado</u>	<u>0R:4S</u>	<u>1R:3S</u>	<u>2R:2S</u>	<u>3R:1S</u>	<u>4R:0S</u>
14	Resist. Etionina	0	0	14	0	0
		<u>0E:4NE</u>	<u>1E:3NE</u>	<u>2E:2NE</u>	<u>3E:1NE</u>	<u>4E:0NE</u>
14	Exc. Metionina	0	0	14	0	0
	Exc. Treonina	0	10	4	0	0

Esporas totales : 56

Esporas excretoras de metionina : 16

Esporas excretoras de treonina : 6

Esporas excretoras de metionina y treonina : 12

DISCUSSION

El propósito de nuestro trabajo era la obtención de mutantes de Saccharomyces cerevisiae , capaces de sobreproducir y excretar treonina , metionina o lisina . Tras la obtención de estas estirpes , se inició su caracterización genética y fisiológica con los resultados expuestos anteriormente .

Discutiremos seguidamente estos resultados , su relación con otros datos presentes en la bibliografía , los puntos comunes en la excreción de los distintos aminoácidos y los problemas que quedan por resolver para un mejor conocimiento de estas estirpes .

La sobreproducción y excreción de metionina se obtuvo con mutantes resistentes a etionina . Con una frecuencia del 21,4% (en el caso de la estirpe F16) y del 52,17% (en la estirpe F3) los resistentes son también excretadores de metionina , capaces de alimentar un césped auxotrofo para este aminoácido . Morzycka y col. (1976) hallan que el 8,5% de los mutantes de Saccharomycopsis lipolytica , resistentes a etionina 5 mM , son también excretadores de metionina .

Están descritos en la bibliografía dos tipos de mutantes resistentes a etionina y no desregulados en la síntesis de metionina :

- Mutantes en la permeasa general de los aminoácidos y/o en las permeasa específica de la metionina (Sorsoli y col. 1964) .

- Mutantes con S-adenosilmetionina sintetasa inestable e incapaz de sintetizar S-adenosiletionina .

La acción tóxica de la etionina mostró ser eliminada específicamente por Dl-metionina a concentraciones muy bajas .

Las concentraciones de metionina excretadas y almacenadas en el pool por nuestras cepas , son similares a las halladas en la bibliografía ; en la tabla VII-1 comparamos algunos de estos datos con los nuestros . Watson (1976) reporta una concentración de 1,6 $\mu\text{M/gps}$ de metionina en el pool de células de *S. cerevisiae* creciendo sobre sulfato amónico 2 mM y de 250,9 $\mu\text{M/gps}$ en células creciendo sobre metionina 2 mM , como única fuente de nitrógeno .

Las escasas producciones de metionina halladas pueden ser consecuencias del fuerte control regulatorio al que está sometido esta ruta y al gasto energético que exige la síntesis de metionina .

En nuestros mutantes , la síntesis y excreción de metionina está asociada al crecimiento del cultivo como corresponde a un metabolito primario (Gaden , 1959) . Al entrar el cultivo en fase estacionaria hay una disminución de la metionina presente en el medio . Este hecho fue observado anteriormente por Antoniewski (1973) llegando a la conclusión de que parte de la metionina excretada vuelve a ser permeada al interior de las células y metabolizada posteriormente .

- TABLA VII-1 -

METIONINA EXCRETADA Y ACUMULADA POR LEVADURAS RESISTENTES A ETIONINA

Organismo	Metionina ($\mu\text{M/gps}$)				Referencia
	Pool		Exudado		
	Parental	Resistente	Parental	Resistente	
<u>S. cerevis.</u>	0,3-1,5	5,0-1,6	No det.	5,0-9,0	Robichon-Szulmajster (1974)
<u>S. cerevis.</u>	1,27	2,9-8,2	No det.	8,2-10,2	Este trabajo
<u>S. lipolyt.</u>	0,66	1,1-11,4	-	-	Morzycka (1973)

Entre los mutantes resistentes a etionina y excretores de metionina hay dos grupos claramente separables :

- Un grupo donde la resistencia segrega monogénicamente y es inseparable del carácter excretor . Por tanto ambos fenotipos son consecuencia de la misma mutación desreguladora .
- Un segundo grupo donde la resistencia segrega digénicamente y es independiente de la excreción . Por otra parte , el carácter excretor no muestra una segregación clara y constante .

Cada uno de estos grupos será estudiado a continuación .

El primer grupo de excretores es similar a los mutantes resistentes a etionina estudiados por Robichon-Szulmajster (1974a, 1974b , 1974c) . Se clasifica en dos grupos de complementación diferentes .

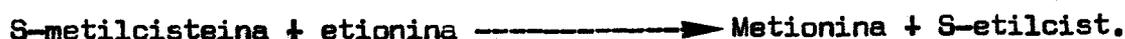
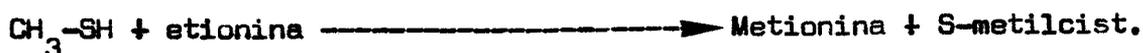
El único gen mapeado para la resistencia a etionina es el gen ETH2 , situado por Robichon-Szulmajster y col. (1974a) en el cromosoma XIII , a 7,1 cM del gen MET6 y 37,5 cM del gen LYS7 . Estos investigadores llegaron a la conclusión de que el producto del gen ETH2 es o forma parte de una proteína aporepresora que en unión del corepresor Met-ARNt reprime la síntesis del grupo I de enzimas de biosíntesis de metionina .

Los otros dos genes para la resistencia a etionina estudiados por Cherest y col. (1973) y Masselot y col. (1972) son denominados ETH3 y ETH10 ; no se conoce sus localizaciones , aunque sus acciones son similares a ETH2 .

Sin embargo , los cruces de F301 ó F229 (representantes de cada uno

de los grupos de complementación) por las estirpes XJB31B (met6) y 5307-13D (lys7) demuestran que ninguno de ellos es alélico a ETH2 y su resistencia se debe a otros genes diferentes , pudiendo ser alélicos o no a ETH3 ó ETH10 .

La mutación para resistencia que existe en la estirpe F301 , permite a Saccharomyces cerevisiae utilizar , en un fondo genético met2 , la etionina como esqueleto carbonado para la biosíntesis de metionina. Ha sido descrito en la bibliografía (Cherest y col. , 1970) que en presencia del alelo eth2-2 y de una auxotrofia para la metionina en el gen MET2 , existe una ruta alternativa de biosíntesis de metionina , cuya reacción global es la aceptación de un grupo mercaptilo por la etionina , proponiéndose estas reacciones :



En ausencia de actividad homoserina-O-transacetilasa , que aporta el sustrato normal para la homocisteina sintetasa y en presencia del gen ETH2 que confiere altos niveles enzimáticos , la homocisteina sintetasa puede metilar la etionina y transformarla en metionina , con una velocidad del 0,3% respecto a si utilizase su verdadero sustrato , la O-acetilhomoserina .

Así , el gen de resistencia presente en el grupo de complementa-

tación representado por F301 muestra caracteres comunes con los mutantes eth2 , pero no es alélico a ellos . La capacidad de utilizar etionina como precursor de metionina no existe en el grupo de complementación representado por F229 .

La naturaleza no excretora de los diploides MDX7 y MDX28 es una indicación de que la desregulación existente en estas estirpes es a nivel de represión más que a nivel de actividad enzimática . Esto se apoya con la segregación de los cruces entre F301 ó F229 y estirpes con marcadores en los genes met2 , met8 ó met6 . Estos cruces indican que las mutaciones que confieren resistencia y excreción no están en ninguno de los genes que codifican estas enzimas .

El segundo grupo de excretores muestra una segregación digénica para la resistencia a etionina e independencia entre la resistencia y la capacidad de excretar metionina .

La naturaleza digénica de la resistencia , en estas estirpes , queda bien establecida por el cambio de las segregaciones a distintas concentraciones de etionina , mostrándose claramente dos genes de distintas efectividades en la manifestación de la resistencia . Es conveniente señalar que el vigor del crecimiento y el fondo genético pueden alterar notablemente la claridad de la segregación y han de tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados . El hecho de que los diploides entre resistentes monogénicos y digénicos sean excretores y re-

sistentes , puede explicarse ya que en los casos estudiados el gen de efecto fenotipico mayor es alélico al gen presente en F301 .

La excreción presenta un comportamiento más complicado no explicable por un modelo mendeliano sencillo . A la vista de los resultados experimentales nosotros elaboramos el siguiente modelo :

- a) La excreción es consecuencia de la interacción entre dos componentes : uno nuclear y otro citoplásmico .
- b) El componente nuclear es una auxotrofia en el gen THR4 , que implica acumulación de homoserina . Esta acumulación permite una síntesis forzada de metionina .
- c) El componente citoplásmico es un factor que permite la excreción de metionina . Lo llamaremos en adelante (MEX)^{*} .
- d) Este factor proviene por mutación de un componente citoplásmico presente en la estirpe parental F3 , al cual llamaremos (MEX) . El factor (MEX) puede estar presente o no en otros fondos genéticos .
- e) El factor (MEX)^{*} es más o menos estable o se manifiesta más o menos en distintas estirpes , según cada fondo genético y/o su proporción respecto al factor (MEX) .
- f) De acuerdo con los puntos anteriores , una estirpe excretora tendrá al genotipo thr4 (MEX)^{*} . Una estirpe no excretora podrá tener tres genotipos diferentes :

- THR4 , (MEX)
- thr4 , (MEX)
- THR4 , (MEX) *

La hipótesis anteriormente expuesta explica una serie de hechos observados experimentalmente :

- a) La excreción es curable en F305 , pero no la resistencia .
- b) La segregación meiótica del carácter excretor es confusa , tendiendo a perderse ese carácter .
- c) Los diploides MDX25 y MDX26 no son excretores pero en su descendencia se observa una segregación 2E:2NE . Esto se puede explicar asignando a MDX8-10A y MDX9-2C los genotipos THR4 (MEX) * , y suponiendo que en el fondo genético de estos cruces (derivados meióticos de F3 por F3) el factor (MEX) es suficientemente estable como para manifestarse claramente .
- d) Los segregantes meióticos excretores de estos cruces son siempre thr4 . Sus revertientes espontáneos THR4 no son excretores .
- e) Existe en el citoplasma de F305 un factor que transferido a la cepa F3 , la hace excretora . Sin embargo , no hace excretor a un revertiente THR4 de F3 .

Este último experimento , la transferencia de material citoplásmico a través de una cepa karl-1 (Conde y col. 1976) aclara totalmente los hechos anteriores y conduce forzosamente a la hipótesis anterior .

El estudio en Saccharomyces cerevisiae de la resistencia a diversos antibióticos como tetraciclina (Hughes y col. 1972) , mikamicina (Howell y col. , 1974) y primaquina (Rotman , 1975) , oligomicina (Averner y Griffiths , 1973a , 1973b) , cicloheximida y cloramfenicol (Guerineau , 1974 , 1976) , inhibidores del transporte mitocondrial como la rodamina 6G (Carignani , 1977) o colorantes como el Verde Janus (Kruszewska , 1978) ha demostrado que el fenotipo resistente es una interacción entre genes nucleares y factores citoplásmicos o plasmagenes . En algunos casos este factor citoplásmico está localizado en la mitocondria pero en otros casos como la resistencia a Rodamina 6G y Verde Janus B no está localizado en ella . Debido a que los mutantes resistentes a uno de estos compuestos suele mostrar resistencia cruzada a otros compuestos no relacionados estructural o funcionalmente con él , se postula que el fenómeno de resistencia se debe a alteraciones en la permeabilidad de la membrana .

Guerineau y col. (1974) demuestran que la presencia de uno de los factores pi , que confieren resistencia a oligomicina , está directamente correlacionada con la existencia de moléculas de ADN circulares de 2 micras , un tipo de ADN episómico descubierto por Sinclair y col. (1967) Guerineau postula que este plásmido puede desempeñar un papel informacional en la biogénesis y/o función de membranas celulares . Kruszewska y col. (1978) llegan a la conclusión de que la resistencia a Verde Janus B

es una interacción entre genes nucleares y un factor citoplásmico similar al descrito por Guerineau , cuyo número de copias influye en el grado de resistencia presentado por las células .

Los resultados encontrados en el estudio de los mutantes excretores de metionina indican una acción sobre la membrana que altera su permeabilidad y provoca la excreción de metionina . Una actuación posible del factor citoplásmico sería invertir la dirección del flujo de la permeasa específica de metionina , creando un eflujo de metionina y etionina , que ejercería un efecto detoxificador . Esta detoxificación por si sola , no produce un fenotipo de resistencia a etionina 5 mM , pero puede conferir una pequeña ventaja selectiva a estirpes que llevan débiles mutaciones nucleares de resistencia .

El alto pool de homoserina debido a la auxotrofia en el gen THR4 y la posible desrepresión parcial de enzimas biosintéticas de metionina debido a la presencia de genes de resistencia , permitiría una producción de metionina , como la observada en estas estirpes , pequeña pero significativa . Es interesante notar que el porcentaje de excretores entre los resistentes y el de resistencia a etionina es mayor en la estirpe F3 (genotipo thr4) que en F16 (genotipo THR4) .

Tres mutantes excretores de treonina se obtuvieron por reversión de S2207A , deficiente en la aspartoquinasa .

Estos mutantes , creciendo en medio mínimo , excretan treonina al

medio , alcanzándose concentraciones entre 8 y 35 mg/gps . Algunos derivados meióticos de estas cepas alcanzan mayor producción ; posiblemente este hecho refleja la influencia del fondo genético sobre el vigor del crecimiento y la superproducción .

Al igual que en el caso anterior , la excreción de treonina está asociada a la fase de crecimiento del cultivo . Watson (1976) determinó la concentración intracelular de treonina en estirpes de Saccharomyces cerevisias , creciendo sobre treonina 2 mM o sulfato amónico 2 mM . Obtiene valores de 8,3 mg/gps y 1,23 mg/gps , respectivamente . Este último valor es muy próximo al de 1,6 mg/gps , encontrado por nosotros en la estirpe no desregulada F6 , creciendo sobre sulfato amónico .

Nuestros excretores son capaces de acumular hasta 36 mg/gps , lo que supone aproximadamente 4 veces más treonina que la reportada por Watson en células creciendo sobre treonina . La concentración máxima del aminoácido se alcanza a las 60 horas de cultivo . Posteriormente , quizás sea la treonina catabolizada por Saccharomyces .

La presencia de ácido aspártico , en el medio , estimula la producción de treonina , sugiriendo que controles anteriores a la síntesis de aspártico están limitando actualmente , en nuestras cepas , la superproducción de treonina .

En todos los mutantes excretores de treonina , podemos distinguir claramente entre el fenotipo superproductor y el fenotipo excretor .

La superproducción está causada por un gen , identificado bioquímica y genéticamente como un alelo desregulado del gen HOM3 . Este alelo codifica una aspartoquinasa insensible a retroinhibición por treonina .

El carácter superproductor segrega monogénicamente y es semidominante en el diploide entre una estirpe excretora y una silvestre (JGX1).

No hemos observado superproducción de homoserina y/o metionina . Esto indica que el control de la homoserina quinasa (EC 2.7.1.39)(Robichon-Szulmajster , 1967 ; Robichon-Szulmajster y col. , 1973) es muy débil en nuestras cepas . La desviación de homoserina a metionina está fuertemente controlada ; metionina y S-adenosilmetionina reprimen e inhiben la homoserina-O-transacetilasa (Robichon-Szulmajster y col. , 1967 Charest y col. , 1969 ; Charest y col. , 1971) .

El estudio genético de JG1 y JG3 ha puesto de manifiesto la existencia de dos genes , no ligados entre si , que afectan a la excreción de treonina . Hemos llamado a estos genes , TEX1 y TEX2 y a sus alelos presentes en nuestras cepas , tex1-1 y tex2-1 . El alelo tex1-1 procede de la estirpe parental S2207A , dónde se mantiene criptico ; tex2-1 no se encuentra presente en S2207A y parece haber sido inducido por mutagénesis simultáneamente a la reversión del gen HOM3 .

El análisis de la treonina excretada y acumulada por las esporas de una tetrada tetratipo (Tabla IV-14) demuestra que el alelo tex1-1 , incluso en un fondo genético no desregulado para la producción de treonina , provoca excreción del aminoácido . Aunque no tenemos datos confirmatorios , suponemos que tex2-1 es similar en función a tex1-1 .

Una serie de hechos experimentales , reportados en la bibliografía hacen patente el papel de las permeasas en la excreción de metabolitos . Grenson (1973) ha descrito en Saccharomyces cerevisiae , mutantes capaces de excretar arginina u otros aminoácidos . Estos mutantes combinaban una mutación inactivadora de la permeasa general de aminoácidos (Grenson , 1970 , 1971) y otra mutación que reduce la actividad de la permeasa específica para el aminoácido excretado . Beckerich y col. (1979) han obtenido mutantes de Saccharomycopsis lipolytica afectados en el transporte activo de lisina ; algunos de estos mutantes , presentan además un fenotipo excretor de lisina . Estos autores encuentran al menos cuatro genes implicados en la captación de lisina , lo que da idea de la posible complejidad del sistema .

En Escherichia coli , Halsall (1975) ha descrito mutantes con defectos en el sistema de transporte de lisina y excretores de este aminoácido .

No hay descrito en la bibliografía ningún sistema de transporte activo específico para treonina , aunque si están descritos para otros aminoácidos : lisina (Grenson , 1966a) , metionina (Gits y col. , 1967) ,

histidina (Crabeel y col. , 1970) , arginina (Grenson y col. 1967) . Nosotros sugerimos como más probable que TEX1 y TEX2 sintetizan proteínas de función permeásica ; los productos de estos dos genes pueden o no actuar unidos en una sola proteína funcional .

Como los mutantes excretores de metionina , los excretores de lisina se obtuvieron por resistencia a un análogo tóxico del aminoácido deseado : la tialisina ó S-(2-aminoetil)-L-cisteina . Este compuesto penetra difícilmente dentro de las células , pero una pequeña concentración inhibe completamente el crecimiento celular. Este efecto se contrarresta específicamente por concentraciones de L-Lisina , aproximadamente iguales a la mitad del inhibidor .

Las cepas excretoras obtenidas son capaces de acumular en el medio entre 26 y 50 mg de lisina por litro . Esta producción es escasa en comparación con las reportadas por Takenouchi y col. (1979) usando cepas de Candida pelliculosa (2,24 g/l) o por Gaillardin y col. usando Saccharomyces lipolytica (127 mg/l) . Sin embargo , el primer caso es difícilmente comparable al nuestro por las diferencias en la composición del medio de cultivo y las condiciones de fermentación .

Sobre la excreción de lisina y la resistencia a tialisina , juega un papel muy importante la concentración de inositol en el medio . Este hecho , idéntico al encontrado en la excreción de treonina será comentado

más tarde .

Todos los clones seleccionados como resistentes a tialisina y excretadores de lisina , eran recesivos para ambos fenotipos . La resistencia , excepto en una de las estirpes estudiadas , muestra una segregación claramente monogénica y es independiente del carácter excretor .

La excreción de lisina segrega de una manera confusa , que recuerda los datos obtenidos al estudiar los mutantes resistentes a etionina y débil excreción de metionina . Las frecuencias de segregación de la excreción varían para un mismo excretor , cuando se cruza con diferentes fondos genéticos y esto puede ser una evidencia de la inestabilidad de algún factor citoplásmico implicado en la excreción . Sin embargo , no hay ningún resultado serio que indique la existencia de este factor citoplásmico.

Gaillardin y col. (1974) estudiaron una serie de mutantes de Saccharomyopsis lipolytica , resistentes a 4,5-transdehidrolisina (análogo tóxico de la lisina) , que presentan algunas similitudes con el comportamiento genético de la excreción , en nuestras estirpes .

Estos mutantes , llamados mg5 , están afectados en el gen de la homocitrato sintetasa y acumulan lisina en su pool , pero no la excretan al medio . Posteriormente , Gaillardin (1975) obtuvo derivados excretadores de estas estirpes .

Los excretadores aparecían fácilmente (90,3% de los supervivientes) tras irradiación con luz UV de un cultivo de una cepa mg5 . Gaillardin

llamó *lex-1* a este nuevo carácter que permite la excreción de lisina en un fondo genético desregulado (*mg5*). El carácter *lex-1* es muy inestable y tiende a perderse con el tiempo; Gaillardin consiguió tras varios re-aislamientos clones que daban del 1 al 10% de colonias no excretoras cuando se plaqueaban.

El análisis meiótico de diploides homocigóticos para los caracteres *mg5* y *lex-1*, por el método de esporas en masa, nunca condujo a la recuperación de esporas con fenotipo excretor, aunque tanto el gen *mg5* como auxotrofías presentes en el cruce, segregaban normalmente.

Gaillardin concluye que el fenotipo *lex⁻* puede deberse a un determinante citoplásmico, que sólo se expresa en un fondo con regulación alterada y no en un fondo normal, donde probablemente se induce con la misma frecuencia.

Takenouchi y col. (1979) trabajando con mutantes de *Candida utilis* resistentes a tialisina y excretores de lisina, llegan a la conclusión de que no hay una relación clara entre la capacidad de resistencia a tialisina y la potencia excretora. No hacen estudios genéticos que confirmen o no la independencia de los dos fenotipos.

Zwolshen y col. (1981) estudiaron mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* resistentes a tialisina y excretores de lisina, clasificándolos en tres grupos:

- Grupo I : La resistencia es monogénica y dominante .

- Grupo II : La resistencia es monogénica y recesiva .
- Grupo III : La resistencia segrega irregularmente (no muestran los datos experimentales) y es fecesiva .

Estos autores no estudian la segregación del carácter excretor quizás por suponerlo inseparable de la resistencia a tialisina . Todos los mutantes mostraban actividad lisil-RNAt sintetasa más baja que el parental aunque no hay correlación entre la potencia excretora o el comportamiento genético de la resistencia con las actividades observadas en este enzima .

Nuestros resultados en la excreción de lisina no permiten la elaboración de un modelo que explique el comportamiento de estos mutantes .

Es evidente la separación del fenotipo excretor del fenotipo resistente . La resistencia presente en estas cepas parece ser a nivel de permeabilidad no por una desregulación en la síntesis de lisina . El o los caracteres que provocan la excreción son desconocidos , aunque su comportamiento recuerda a los mutantes dónde la excreción de metionina al medio parece mediada por un factor citoplásmico .

La aplicación de la técnica de transferencia de citoplasma , usando una estirpe karl-1 , es totalmente necesaria para el esclarecimiento de este punto .

Es posible reunir en una misma estirpe mutaciones que permitan la excreción simultánea de distintos aminoácidos , así como la resistencia simultánea a distintos análogos . Estos dobles excretores son posibles en todas las combinaciones : excretores de metionina y treonina , de metionina y lisina o de treonina y lisina . No se han intentado la obtención de excretores triples , pero nos parece totalmente factible su consecución .

Es de señalar que en todos los cruces realizados entre excretores sencillos , las segregaciones de los caracteres de resistencia y excreción se ajustan a las proporciones obtenidas previamente en cada caso , en los cruces entre estirpes excretoras y no excretoras . Todos estos caracteres son independientes entre sí y compatibles en el mismo genoma.

Un hecho que afecta tanto a la excreción de treonina como la de lisina , es el papel potenciador del inositol sobre la excreción . Un exceso de inositol en el medio provoca una mayor excreción de treonina (con bajada del pool celular) ; más aún , un exceso de inositol es necesario para que las estirpes excretoras de lisina y/o treonina sean capaces de alimentar un césped auxotrófico . La presencia de inositol elimina el fenotipo de resistencia a tialisina , permitiendo seguramente tanto una mayor salida de la lisina celular como una mayor entrada de tialisina en las células .

El exceso de inositol no afecta a la excreción de metionina ; tampoco al vigor del crecimiento de ninguna cepa excretora . Todas éstas son además prototrofas para el inositol y capaces de sintetizarlo .

Shiio (1962a) observó que células de Brevibacterium flavum creciendo en medio deficiente en biotina , poseen mecanismos alterados de permeabilidad que permiten la pérdida de los aminoácidos del pool por lavado de las células . Shibukawa (1965) descubrió en Corynebacterium glutamicum que sólo hay excreción de ácido glutámico cuando la razón de ácidos grasos saturados a insaturados es mayor que 1 . Esta razón está controlada por la concentración de biotina . Parece muy importante la composición de la membrana como causa de la mayor o menor salida de aminoácidos al medio .

La carencia de biotina provoca en levaduras un incremento de la permeabilidad celular y daños en las estructuras de las membranas citoplásmica y vacuolar (Rose , 1963 ; Dixon y Rose , 1974) . Suomalaine y Keränen (1963) observaron en estas condiciones un cambio en la composición lipídica de la membrana , con descenso de los ácidos grasos de 18C e incremento en ácidos grasos más cortos de 16C , así como cambios en la proporción de ácidos grasos insaturados a saturados . Estas mismas observaciones se repiten en varios hongos y bacterias (Summers y Foster , 1965) .

El inositol forma parte de la membrana celular como fosfatidilinositol y esfingolípidos complejos (Suomalainen y col. , 1972) ; su carencia en mutantes auxotróficos , provoca la lisis celular .

Está bien estudiado el papel del inositol y los efectos de su ausencia en el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Becker y col. , 1980 Hanson y col. , 1980 ; Hayashi y col. , 1976 ; Henry y col. , 1977) , pero no hay datos sobre los efectos de un exceso de inositol sobre la composición de la membrana .

Nosotros pensamos que a semejanza de la biotina en la excreción de ácido glutámico , un exceso de inositol en el medio altera la relación entre los distintos tipos de lípidos en la membrana y produce un flujo más libre en la entrada o salida de algunos aminoácidos .

Treonina y lisina están almacenadas preferentemente (75-80%) en la vacuola de Saccharomyces cerevisiae (Wiemken y col. , 1974 ; Messenguy y col. , 1980) ; ésta presenta algunas diferencias en la composición de lípidos de su membrana , respecto a la citoplásmica (Schwencke , 1977) sería muy interesante medir en nuestros mutantes y sus cepas parentales creciendo con y sin inositol , la proporción en los pools citoplásmicos y vacuolares de treonina y lisina .

Las producciones de metionina y treonina alcanzadas por nuestras cepas , son de alto interés aplicado . Según la FAO (1973) los requerimientos de treonina y metionina más cisteína , para un adulto , son respectivamente 7 mg/kg y 13 mg/kg de peso .

Con las concentraciones de treonina y metionina almacenadas , ac-

tualmente , en los pooles de nuestras estirpes , 15 gramos de levaduras secas cubren el 96,4 y el 15,6% de las necesidades de treonina y metionina más cisteina de un adulto de 80 kg. de peso . Estas cifras son fácilmente superables , ya que las condiciones en que se han medido excreciones y pooles (medio mínimo , fermentación no controlada) no están en absoluto optimizadas . Son esperanzadoras también modificaciones genéticas que disminuyan la excreción y aumenten los pooles .

Las levaduras constituyen un producto industrial abundante , barato y natural . La introducción de los caracteres de superproducción de aminoácidos , por técnicas genéticas , en levaduras industriales , las enriquecerían notablemente en valor nutritivo y por tanto económico .

Como final , señalaremos los problemas que quedan por resolver , tanto desde el punto de vista aplicado como básico :

a) Optimización de los medios de producción y de las condiciones de fermentación .

b) Optimización genética de las estirpes :

- Limpieza , por retrocruzamiento con estirpes silvestres , del fondo genético de las estirpes excretoras a fin de eliminar caracteres indeseables inducidos por mutagénesis .
- Introducción de otras auxotrofias que aumenten la producción .

- Unión de varias mutaciones con similares fenotipos .

- c) Estudios de las producciones alcanzadas por mutantes excretadores de dos aminoácidos .
- d) Obtención y estudio de mutantes productores de tres aminoácidos .
- e) Confirmación y estudio detallado del factor citoplásmico , implicado en la excreción de metionina .
- f) Estudio bioquímico de los genes TEX , como posibles codificadores de una permeasa específica para la treonina .
- g) Caracterización genética de la excreción de lisina .
- h) Estudio de la influencia del inositol en la composición y funcionamiento de la membrana .

CONCLUSIONES

- 1.- Se han obtenido mutantes de Saccharomyces cerevisiae , excretores de metionina , treonina o lisina .
- 2.- Tanto la resistencia a análogos tóxicos del aminoácido deseado como la alteración de enzimas regulatorias claves por reversión de mutantes caren es de dichas enzimas , son métodos válidos para la obtención de mutantes desregulados .
- 3.- La excreción de metionina lisina y treonina por Saccharomyces cerevisiae se ajusta a los modelos cinéticos propios de los metabolitos primarios .
- 4.- En todos los casos estudiados , excepto en uno , el análisis meiótico separa y diferencia el fenotipo superproductor del excretor.
- 5.- La superproducción de los aminoácidos se debe a alteraciones en mecanismos de regulación enzimática , a nivel de síntesis o de actividad .
- 6.- La excreción puede estar mediada por genes nucleares y/o por factores citoplásmicos .
- 7.- Se han descubierto dos genes , llamados genes TEX , probablemente implicados en el transporte de treonina .

- 8.- Se ha demostrado la existencia de un factor citoplásmico implicado en la excreción de metionina .
- 9.- La excreción de algunos aminoácidos se ve afectada cuantitativamente por la presencia en el medio de metabolitos relacionados con la membrana (inositol) .
- 10.- Es posible obtener estirpes excretoras de dos tipos diferentes de aminoácidos , en cualquier combinación .
- 11.- En estos mutantes excretores dobles , los patrones de segregación de la excreción para cada aminoácido , se mantienen inalterados .

BIBLIOGRAFIA

- Antoniewski , J. y H. Robichon-Szulmajster . 1973 . Biosynthesis of methionine and its control in wild type and regulatory mutants of Saccharomyces cerevisiae . Biochimie , 55 : 529-539 .
- Avner , P. R. y D. E. Griffiths . 1973a . Isolation and characterization of oligomycin-resistant mutants of Saccharomyces cerevisiae . Eur. J. Biochem. , 32 : 301-311 .
- Avner , P. R. y D. E. Griffiths . 1973b . Studies on energy-linked reactions . Genetic analysis of oligomycin-resistant mutants of Saccharomyces cerevisiae . Eur. J. Biochem. , 32 : 312-321 .
- Bhattacharjee , J. K. , A. F. Tucci y H. Strassman . 1967 . Accumulation of Tricarboxylic Acids related to Lysine biosynthesis in a yeast mutant . J. Biol. Chem. , 242 (10) : 2542-2546 .
- Bhattacharjee , J. K. , A. F. Tucci y H. Strasman . 1968 . Accumulation of -Ketoglutaric Acid in yeast mutants requiring Lysine . Arch. Biochem. Biophys. , 123 : 235-239 .
- Bhattacharjee , J. K. y A. F. Tucci . 1969 . Relationship of Glutaric Acid to the Homocitric Acid pathway of biosynthesis of Lysine in yeast . J. Biol. Chem. , 244 (6) : 1417-1423 .

- Bhattacharjee , J. K. y A. K. Sinha . 1972 . Relationship among the genes , enzymes and intermediates of the biosynthesis pathway of lysine in Saccharomyces . Molec. Gen. Genet. , 115 : 26-30 .
- Becker , G. W. y R. L. Lester . 1980 . Biosynthesis of phosphoinositol-containing sphingolipids from phosphatidyl inositol by a membrane preparation from Saccharomyces cerevisiae . J. Bacteriol. , 142 (3) : 747-754 .
- Beckerich , J. M. , M. Lambert y H. Heslot . 1979 . Genetic control of lysine permease in Saccharomycopsis lipolytica . Arch. Microbiol. , 122 : 201-205 .
- Carignani , G. , W. E. Lancashire y D. E. Griffiths . 1977 . Extrachromosomal inheritance of Rhodamine 6G resistance in Saccharomyces cerevisiae . Molec. Gen. Genet. , 151 : 49-56 .
- Cherest , H. y H. Robichon-Szulmajster . 1966 . Resistance a l'ethionine chez Saccharomyces cerevisiae . I . Etude genetique . Genetics 54 : 981-991 .
- Cherest , H. , F. Eichler y H. Robichon-Szulmajster . 1969 . Genetic and regulatory aspects of Methionine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae . J. Bacteriol. , 97 (1) : 328-336 .

- Cherest , H. , G. Talbot y H. Robichon-Szulmajster . 1970 . Role of Homocysteine synthetase in an alternate route for methionine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae . J. Bacteriol. , 102 (2) : 448-461 .
- Cherest , H. , Y. Surdin-Kerjan y H. Robichon-Szulmajster . 1971 . Methionine-mediated repression in Saccharomyces cerevisiae : Pleiotropic Regulatory system involving Methionyl Transfer Ribonucleic Acid and the product of the gene ETH2 . J. Bacteriol. , 106 (3) : 758-772 .
- Cherest , H. , Y. Surdin-Kerjan , J. Antoniewski y H. Robichon-Szulmajster . 1973a . S-adenosyl-methionine-mediated repression of methionine biosynthetic enzymes in Saccharomyces cerevisiae . J. Bacteriol. , 114 (1) : 928-933 .
- Cherest , H. , Y. Surdin-Kerjan , J. Antoniewski y H. Robichon-Szulmajster . 1973b . Effects of regulatory mutations upon methionine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae : Locus ETH2-ETH3-ETH10 . J. Bacteriol. , 115 (3) : 1084-1093 .
- Cherest , H. y H. Robichon-Szulmajster . 1973c . The roles of two independent genes in one of the regulatory systems involved in methionine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae . En : Gene-

- tics of industrial microorganisms . Vol. II , pp. 165-178 . Edited por Z. Vaněk , Z. Hostálek y J. Cudlin . Academie . Prague .
- Cherest , H. , Y. Surdin-Kerjan y H. Robichon-Szulmajster . 1975 .
Methionine and S-adenosyl-methionine-mediated repression in a
Methionine-Transfer Ribonucleic Acid Synthetase mutant of Saccharomyces cerevisiae . J. Bacteriol. , 123 (2) : 428-435 .
- Chiang , P. K. y G. L. Cantoni . 1977 . Activation of Methionine for
transmethylation . J. Biol. Chem. 252 (13) : 4506-4513 .
- Chibata , I. , T. Kakimoto y J. Sato . 1965 . Enzymatic Synthesis of
L-Alanine . Appl. Microbiol. , 13 : 638-641 .
- Chibata , I. , T. Tosa y T. Sato . 1974 . Continuous L-Alanine Synthesis using immobilized Pseudomonas dacunhae cells . Appl. Microbiol. , 27 : 878-883 .
- Chinard , F. P. 1952 . Photometric estimation of Proline and Ornithine . J. Biol. Chem. , 199 (1) : 91-95 .
- Conde , J. y G. R. Fink . 1976 . A mutant of Saccharomyces cerevisiae
defective for nuclear fusion . Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 73 :
3651-3655 .

- Crabeel , M. y M. Grenson . 1970 . Regulation of Histidine uptake by specific feedback inhibition of two Histidine Permeases in Saccharomyces cerevisiae . Eur. J. Biochem. , 14 : 197-204 .
- Cramer , C. L. y R. H. Davis . 1979 . Screening for amino acids pool mutants of Neurospora and yeasts : Replica-printing technique . J. Bacteriol. , 137 (3) : 1437-1438 .
- Delforge , J. , F. Messenguy y J. M. Wiame . 1975 . The regulation of arginine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae . The specificity of Arg-R mutations and the general control of amino acid biosynthesis . Eur. J. Biochem. , 59 : 231-239 .
- Demain , A. L. , M. Jackson , A. R. Vitali y D. Hendlin . 1966 . Production of Guanosine-5'-Monophosphate and Inosine-5'-Monophosphate by fermentation . Appl. Microbiol. , 14 (5) : 821-825 .
- Demain , A. L. , y J. Birnbaum . 1968 . Alteration of permeability for the release of metabolites from the microbial cells . C. Topics Microbiol. Immunol. , 46 : 1-26 .

- Demain , A. L. 1972 . Cellular and environmental factors affecting the synthesis and excretion of metabolites . J. Appl. Chem. Biotechnol. , 22 : 345-362 .
- Demain , A. L. 1973 . Industrial fermentations and their relations to regulatory mechanisms . Advances in Applied Microbiology . Vol. VIII , pp. 1-30 . Academic Press . New York .
- Dixon , B. y A. H. Rose . 1964 . Observations on the fine structure of Saccharomyces cerevisiae as affected by biotin deficiency . J. Gen. Microbiol. , 35 : 411-419 .
- Dubois , P. 1951 . A Phenol-based method for sugar determination . Nature , 168 : 167 .
- Fogel , S. , C. Lax y D. D. Hurst . 1978 . Reversion at the HIS1 locus of yeast . Genetics , 90 : 489-500 .
- Fujooka , M. y Y. Nakatami . 1972 . Saccharopine Dehydrogenase . Interaction with Substrate Analogues . Eur. J. Biochem. , 25 : 305-307 .
- Fukumara , T. 1976 . Enzymatic Conversion of DL-Aminocaproactam into L-Lysine . Agric. Biol. Chem. , 40 : 1687-1689 .

Gaden , E. L. 1959 . Fermentation Process Kinetics . J. Biochem.

Microbiol. Tech. Eng. , 1 (4) : 413-429 .

Gaillardin , C. M. , L. G. Poirier y H. Heslot . 1974 . Regulation

of the L-Lysine pathway in the yeast Saccharomycopsis lipolytica mutants affected at the level of homocitrate synthase .

En : Genetics of Industrial Microorganisms , pp. 112-120 .

Academic Press : London .

Gaillardin , C. M. , G. Sylvestre y H. Heslot . 1975 . Studies on an

unstable phenotype induced by UV irradiation . The Lysine excreting (lex⁻) phenotype of the yeast Saccharomycopsis lipolytica . Arch. Microbiol. , 104 : 89-94 .

Gaillardin , C. M. , P.^e Fournier , G. Sylvestre y H. Heslot . 1976 .

Mutants of Saccharomycopsis lipolytica defective in Lysine Catabolism . J.^e Bacteriol. , 125 (1) : 48-57 .

Gaillardin , C. M. y H. Heslot . 1979a . Evidence for mutations in

the structural gene for Homocitrate Synthase in Saccharomycopsis lipolytica . Biochimie , 61 : 473-482 .

Gaillardin , C. M. , L. Poinier , A. Ribet y H. Heslot . 1979b .

General and lysine specific control of the Saccharopine dehydrogenase levels in the yeast Saccharomycopsis lipolytica .

Molec. Gen. Genet. , 172 : 185-192 .

Gahrke , Ch. W. , R. W. Zumwalt y K. Kuo . 1971 . Quantitative Amino acid analysis by Gas-Chromatography . J. Agr. Food Chem. ,

19 (4) : 605-618 .

Gits , J. y M. Grenson . 1967 . Multiplicity of the amino acid permeases in Saccharomyces cerevisiae . III . Evidence for a specific Methionine-transporting system . Biochim. Biophys. Acta ,

135 : 507-516 .

Glass , J. y J. K. Bhattacharjee . 1971 . Biosynthesis of Lysine in

Rhodotorula : Accumulation of Homocitric , Homoaconitic , Homoisocitric acids in a leaky mutant . Genetics , 67 : 365-376 .

Gray , G. S. y J. K. Bhattacharjee . 1976 . Biosynthesis of Lysine in

Saccharomyces cerevisiae : Regulation of Homocitrate Synthase in analogue-resistant mutants . J. Gen. Microbiol. , 97 : 117-120.

- Grenson , M. 1966a . Multiplicity of the Amino Acid Permeases in Saccharomyces cerevisiae . II . Evidence for a specific lysine-transporting system . Biochem Biophys. Acta , 127 : 339-346 .
- Grenson , M. , M. Meusset , J. M. Wiame y J. Bechet . 1966b . Multiplicity of the Amino Acid Permeases in Saccharomyces cerevisiae . I . Evidence for a specific arginine-transporting system . Biochem. Biophys. Acta , 127 : 325-338 .
- Grenson , M. , C. Hou y M. Crabeel . 1970 . Multiplicity of the Amino Acid Permeases in Saccharomyces cerevisiae . IV . Evidence for a General Amino Acid Permease . J. Bacteriol. , 103 : 770-777 .
- Grenson , M. y C. Hemont . 1971 . Mutation affecting activity of several distinct Amino Acid Transport System in Saccharomyces cerevisiae . J. Bacteriol. , 105 (2) : 477-482 .
- Grenson , M. 1973 . Specificity and regulation of the uptake and retention of Amino Acids and Pyrimidines in yeast . En : Genetics of Industrial Microorganisms . Vol. II , pp. 179-193 . Editado por Z. Vaněk , Z. Hostalek y J. Cudlin . Elsevier . Prague .

Guarineaau , M. , P. P. Slonimski y P. R. Avner . 1974 . Yeast episome : Oligomycin resistance associated with a small covalently closed non-mitochondrial DNA . Biochem. Biophys. Res. Commun. , 61 : 462-469 .

Guarineaau , M. , C. Grandchamp y P. P. Slonimski . 1976 . Circular DNA of a yeast episome with two inverted repeats : Structural analysis by a restriction enzyme and electron microscopy . Proc. Nat. Acad. Sci. USA , 73 : 3030-3034 .

Haidaris , C. G. y J. K. Bhattacharjee . 1977 . High lysine-excreting mutants of Saccharomyces cerevisiae . J. Ferment. Technol. , 55 (2) : 189-192 .

Halsall , D. M. 1975 . Overproduction of lysine by mutant strains of Escherichia coli with defective lysine transport systems . Biochem. Genetics , 13 (1 y 2) : 109-124 .

Hanson , B. A. y R. L. Lester . 1980 . Effects of inositol starvation on phospholipid and glycan synthesis in Saccharomyces cerevisiae . J. Bacteriol. , 142 (1) : 79-89 .

- Hayashi , E. , R. Hasegawa y T. Tomita . 1976 . Accumulation of neutral lipids in Saccharomyces carlsbergensis by myo-inositol deficiency and its mechanisms . J. Biol. Chem. , 251 : 5759-5769 .
- Henry , S. A. , K. D. Atkinson , A. Kolato y M. R. Culbertson . 1977 . Growth and metabolism of inositol-starved Saccharomyces cerevisiae . J. Bacteriol. , 130 : 472-484 .
- Hogs , R. W. y H. P. Broquist . 1968 . Homocitrate formation in Neurospora crassa . Relation to Lysine biosynthesis . J. Biol. Chem. , 243 (8) : 1839-1845 .
- Howell , N. , Trembath , A. W. Linnane y H. B. Lukins . 1973 . An analysis of polarity of mitochondrial gene recombination and transmission . Molec. Gen. Genet. , 122 : 37-51 .
- Hughes , A. R. y D. Wilkie . 1972 . Genetic analysis of mitochondrial resistance to Tetracycline in Saccharomyces cerevisiae . Heredity , 28 : 117-127 .
- Hutter , R. 1979 . Regulation of Primary Metabolism . En : Genetics of Industrial Microorganisms , pp. 44-53 . Editado por O. K. Bebek y A. I. Laskin . American Society for Microbiology , Washington D. C.

- Izumi , Y. , I. Chibata y T. Itoh . 1978 . Production and utilization of Amino Acids . *Angewandte Chemie* , 17 (3) : 176-183 .
- Jacobson , E. S. , E. S. Chen y R. C. Metzzenberg . 1977 . Unstable S-adenosyl-methionine synthetase in an ethionine-resistant strain of Neurospora crassa . *J. Bacteriol.* , 132 (2) : 747-748 .
- Jones , E. E. y H. P. Broquist . 1965 . Saccharopine , an intermediate of the amino adipic acid pathway of lysine biosynthesis . II . Studies in S. cerevisiae . *J. Biol. Chem.* , 240 (6) : 2531-2536 .
- Jones , E. E. y H. P. Broquist . 1966 . Saccharopine , an intermediate of the amino adipic acid pathway of lysine biosynthesis . III . Amino adipic semialdehyde-glutamate reductase . *J. Biol. Chem.* , 241 (14) : 3430-3434 .
- Kaneko , T. , Y. Izumi , I. Chibata y I. Itoh . 1974 . Synthetic production and utilization of amino acids . *Helsted Press Book* . Kodansha . Tokyo .
- Kometsubara , S. , M. Kisumi y I. Chibata . 1979 . Transductional construction of a threonine-producing strain of Serratia marcescens . *Appl. Environ. Microbiol.* , 38 (6) : 1045-1051 .

Kruszewska , A. y B. Szczésnik . 1978 . Janus Green Resistance in Saccharomyces cerevisiae : Interaction of Nuclear and Cytoplasmic factors . Molec. Gen. Genet. , 160 : 171-180 .

Lipinski , C. , A. J. Ferro y D. Mills . 1976 . Macromolecular synthesis in a mutant of Saccharomyces cerevisiae inhibited by S-adenosyl-methionine . Molec. Gen. Genet. , 144 : 301-306 .

Lor , K. L. y E. A. Cossins . 1972 . Regulation of C₁ metabolism by L-Methionine in Saccharomyces cerevisiae . Biochem. J. , 130 : 773-783 .

Lowry , O. H. , N. J. Rosenbrough , A. L. Faar y R. J. Randall . 1951 . Protein measurement with Folin Phenol reagent . J. Biol. Chem. , 193 : 265-275 .

Luengo , J. M. , G. Revilla , M. J. López , J. R. Villanueva y J. F. Martin . 1980 . Inhibition and repression of Homocitrate Synthase by lysine in Penicillium chrisogenum . J. Bacteriol. , 144 (3) : 869-876 .

Maragoudakis , M. E. , H. Holmes y M. Strassman . 1967 . Control of lysine biosynthesis in yeasts by a feedback mechanism . J. Bacteriol. , 93 (5) : 1677-1680 .

- Masselot , M. y H. Robichon-Szulmajster . 1972 . Non-sense mutation in the regulatory gene ETH2 involved in methionine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae . Genetics 71 : 535-550 .
- Masselot , M. y H. Robichon-Szulmajster . 1974a . Methionine Biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae : Mutations at the regulatory Locus ETH2 . I . Genetic data . Molec. Gen. Genet. 129 : 339-348 .
- Masselot , M. y H. Robichon-Szulmajster . 1974b . Methionine Biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae : Mutations at the regulatory Locus ETH2 . II . Physiological and Biochemical data . Molec. Gen. Genet. 129 : 349-362 .
- Masselot , M. y H. Robichon-Szulmajster . 1974c . Methionine Biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae . III . Study of Several Homoeallelic and Heteroallelic Diploids . Molec. Gen. Genet. 129 : 363-368 .
- Masselot , M. y H. Robichon-Szulmajster . 1975 . Methionine Biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae . I . Genetical analysis of Auxotrophic Mutants . Molec. Gen. Genet. 139 : 121-132 .
- Masselot , M. y Y. Surdin-Kerjan . 1977 . Methionine Biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae . II . Gene-Enzyme Relationships in the Sulfate Assimilation Pathway . Molec. Gen. Genet. 154 : 23-30 .

- Messenguy , F. y J. Delforge . 1976 . Role of transfer ribonucleic acids in the regulation of several biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae . Eur. J. Biochem. , 67 : 335-339 .
- Messenguy , F. y T. G. Cooper . 1977 . Evidence that specific and general control of Ornithine Carbamoyltransferase production occurs at the level of transcription in Saccharomyces cerevisiae . J. Bacteriol. , 130 (3) : 1253-1261 .
- Messenguy , F. , D. Colin y J. P. Ten Have . 1980 . Regulation of compartmentation of amino acids pools in Saccharomyces cerevisiae and its effects on metabolic control . Eur. J. Biochem. , 108 : 439-447 .
- Meuris , P. , F. Lacroute y P. P. Slonimski . 1967 . Etude systematique de mutants inhibés par leurs propres metabolites chez la levure Saccharomyces cerevisiae . I . Obtention and caracterisation des differentes classes de mutants . Genetics , 56 : 149-161 .
- Meuris , P. 1969 . Studies of mutants inhibes by their own metabolites in Saccharomyces cerevisiae . II . Genetic and Enzymatic analysis of three classes of mutants . Genetics , 63 : 569-580 .

- Miozzari , G. , P. Niederberger y R. Hütter . 1978 . Tryptophan biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae . Control of the flux through the pathway . J. Bacteriol. , 134 : 48-59 .
- Miyajima , R. , Okuka , S. y I. Shio . 1968 . Regulation of Aspartate family amino acids biosynthesis in Brevibacterium flavum . I . Inhibition by amino acids of the enzymes in threonine biosynthesis . J. Biochem. , 63 : 2-12 .
- Momose , H. y K. F. Gregory . 1978 . Temperature-sensitive mutants of Saccharomyces cerevisiae variable in the methionine content of their protein . Appl. Environm. Microbiol. , 35 (4) : 641-647 .
- Mortimer , R. K. y D. C. Hawthorne . 1969 . Yeast Genetics . En : The Yeasts , pp. 386-460 . Editado por A. H. Rose y J. S. Harrison. Academic Press . New York .
- Morzycka , E. , D. Sawnor-Korszynska , A. Paszewski , J. Grabski y K. Raczynska-Bojanowska . 1976 . Methionine overproduction by Saccharomycopsis lipolytica . Appl. Environm. Microbiol. , 32 (1) : 125-130 .

- Nakamori , S. y I. Shiio . 1973 . Production of L-Threonine by mutants resistant to both ~~-amino-~~ -Hydroxyvaleric Acid and S-(2-amino-ethyl-)L-Cysteine derived from Brevibacterium flavum . Agric. Biol. Chem. 37 (3) : 653-669 .
- Nakayama , K. , Tamaka , M. , Hagino , H. y S. Kinoshita . 1966 . Studies on Lysine Fermentation . Part V . Concerted Feedback Inhibition on Aspartic Semialdehyde-Piruvate Condensation in Micrococcus glutamicum . Agric. Biol. Chem. 30 (6) : 611-616 .
- Nakayama , K. 1976 . The Production of Amino Acids . Process Biochemistry , Marzo , pp. 4-9 .
- Nara , T. , Somejima , M. y S. Kinoshita . 1964 . Effect of Penicillin on Amino Acids Fermentation . Agric. Biol. Chem. 28 (2) : 120-124 .
- Peppler , H. J. 1979 . Production of Yeasts and Yeast Products . En : Microbial Technology . Vol. I . Editado por H. J. Peppler y D. Perlman . Academic Press .
- Pierard , A. , Messenguy , F. , Feller , A. y F. Hilger . Dual Regulation of the Synthesis of the Arginine Pathway Carbamoyl Phosphate Synthase of Saccharomyces cerevisiae by Specific and General Controls of Amino Acids Biosynthesis . Molec. Gen. Genet. 174 : 163-171 .

- Pierson , E. , M. Giella y M. Thirler . 1948 . A process for methionine synthesis from caprolactames . J. Amer. Chem. Soc. , 70 : 1450-1454 .
- Rasse-Messenguy , F. y G. R. Fink . 1974 . Feedback-resistant mutants of Histidine biosynthesis in yeasts . En : Genes , Enzymes and Populations , pp. 85-95 . Editado por A. M. SSB. Plenum Press . New York .
- Reh , H. y H. G. Schlegel . 1969 . Die Biosynthese von Isoleucin und Valin in Hydrogenomonas H16 . Arch. Mikrobiol. , 67 : 110-127 .
- Roach , D. y Ch. W. Gehrke . 1969a . The Gas-Liquid Chromatography of amino acids . J. Chromatography , 43 : 303-310 .
- Roach , D. y Ch. W. Gehrke . 1969b . Direct esterification of the protein amino acids . Gas-liquid chromatography of N-TFA-n-Butyl esters . J. Chromatography , 44 : 269-278 .
- Robichon-Szulmajster , H. y D. Carrivaux . 1963 . Régulations Métabolique de la biosynthese de la méthionine et de la thréonine chez Saccharomyces cerevisiae . I . Répression et retro-inhibition de L'Aspartokinase . Bioch. Biophys. Acta , 73 : 248-256 .

Robichon-Szulmajster , H. y H. Cherest . 1966a . Resistance a L'Ethionine chez Saccharomyces cerevisiae . II . Etude Physiologique . Genetics 54 : 993-1006 .

Robichon-Szulmajster , H. , Surdin-Kerjan , Y. y R. K. Mortimer . 1966b . Genetic and Biochemical Studies of genes controlling the synthesis of Threonine and Methionine in Saccharomyces . Genetics 53 : 609-619 .

Robichon-Szulmajster , H. y H. Cherest . 1967a . Regulation of Homoserine-O-transacetylase , first step in Methionine Biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae . Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 (2) : 256-262 .

Robichon-Szulmajster , H. 1967b . Régulation du fonctionnement de deux chaînes de biosynthèse chez Saccharomyces cerevisiae : Thréonine-méthionine et Isoleucine-Valine . Bull. Soc. Chim. Biol. 49 (11) : 1431-1462 .

Robichon-Szulmajster , H. , Surdin-Kerjan , H. y H. Cherest . 1973 . Regulatory Aspects of Threonine and Methionine Biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae . En : Genetics of Industrial Microorganisms , pp. 149-163 . Editado por Z. Vanek , Z. Hostalek y J. Cudlin . Elsevier .

- Rose , A. H. 1968 . On the osmotic behaviour of Saccharomyces cerevisiae as affected by Biotin deficiency . J. Gen. Microbiol. , 31 : 157-160 .
- Rose , A. H. 1978 . Primary products of Metabolism . Editado por A. H. Rose . Academic Press . New York .
- Rotman , A. 1975 . Genetics of a Primaquin-resistant yeast . J. Gen. Microbiol. , 89 : 1-10 .
- Sano , K. y I. Shio . 1970 . Microbial production of L-Lysine . III . Production by mutants resistant to S-(2-aminoethyl)-L-Cysteine . J. Gen. Appl. Microbiol. , 16 : 373-391 .
- Sato , M. , K. Okama y S. Akabi . 1957 . A review about threonine synthesis . Bull. Chem. Soc. Japan , 30 : 937-940 .
- Saunders , P. P. y H. P. Broquist . 1966 . Saccharopine , an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis . IV . Saccharopine dehydrogenase . J. Biol. Chem. , 241 (14) : 3435-3440 .
- Schurch , A. , J. Miozzari y R. Hütter . 1974 . Regulation of tryptophan biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae . Mode of action of 5-methyl-tryptophan-sensitive mutants . J. Bacteriol. , 117 : 1131-1140 .

- Schwencke , J. 1977 . Characteristics and integration of the yeast vacuole with cellular functions . *Physiolog. Végétale* , 15 (3) : 491-517 .
- Shibukawa , M. , H. Takashi y T. Oshawa . 1965 . L-Glutamic acid fermentation with beet molasses . V . Relation between biotin and oleate to the extracellular accumulation of L-Glutamate . *Agric. Biol. Chem.* , 29 : 813-823 .
- Shiio , I. 1962a . Effect of Biotin on the bacterial formation of glutamic acid . I . Glutamate formation and cellular permeability of amino acids . *J. Biochem.* , 51 : 56-62 .
- Shiio , I. , K. Narvi , N. Yahaba y M. Takahashi . 1962b . Free intracellular amino acids of a glutamate forming bacterium Brevibacterium flavum N^o 2447 . *J. Biochem.* , 51 : 109-111 .
- Shiio , I. y R. Miyajima . 1969 . Concerted inhibition and its reversal by end products of Aspartate kinase in Brevibacterium flavum . *J. Biochem.* , 65 (6) : 849-853 .
- Shiio , I. , R. Miyajima y K. Sano . 1970 . Genetically desensitized Aspartate Kinase to the concerted feedback inhibition in Brevibacterium flavum . *J. Biochem.* , 68 : 701-710 .

Sinclair , J. H. , B. J. Stevens , P. Shangavi y M. Rabinowitz .

1967 . Mitochondrial-atellite and circular DNA filaments in yeasts . Science , 156 : 1234-1237 .

Singer , R. A. , G. C. Johnston y D. Bedard . 1978 . Methionine analogs and cell division regulation in the yeast Saccharomyces cerevisiae . Proc. Nat. Acad. Sci. USA , 75 (12) : 6083-6087 .

Sinha , A. K. y J. K. Bhattacharjee . 1970 . Control of a Lysine-biosynthetic step by two unlinked genes of Saccharomyces . Biochem. Biophys. Res. Commun. , 39 (6) : 1205-1210 .

Sinha , A. K. , M. Kurtz y J. K. Bhattacharjee . 1971 . Effects of Hidroxylysine on the biosynthesis of Lysine in Saccharomyces . J. Bacteriol. , 108 (2) : 715-719 .

Sorsoli , W. A. , K. D. Spence y L. W. Parks . 1964 . Amino acid accumulation in methionine-resistant Saccharomyces cerevisiae . J. Bacteriol. , 88 (1) : 20-24 .

Spence , K. D. y S. K. Shapiro . 1967 . Some novel mutants of Saccharomyces cerevisiae inhibited by S-adenosyl-methionine and S-adenosyl-homocysteine . J. Bacteriol. , 94 (4) : 1136-1142 .

- Stamicarbon , N. V. 1968 . A process for Lysine synthesis from caprolactam . Japanese Patent No. 44-15764 .
- Stadtman , E. R. , G. N. Cohen , G. Lebras y H. Robichon-Szulmajster . 1961 . Feedback inhibition and repression of aspartokinase activity in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae . J. Biol. Chem. , 263 (7) : 2033-2038 .
- Strassman , M. y L. N. Ceci . 1964 . Enzymatic formation of Homocitric-Acid , an intermediate in lysine biosynthesis . Biochem. Biophys. Res. Commun. , 14 : 262-267 .
- Summers , J. S. y J. W. Foster . 1965 . Biotin deficiency in microorganisms . Bact. Proc. , pp. 75 . Annual meeting of Amer. Soc. Microbiol. Atlantic City , N. J. , USA .
- Suomalainen , H. y A. Keränen . 1963 . The effect of biotin deficiency on the synthesis of fatty acids by yeast . Biochem. Biophys. Acta , 70 : 495-503 .
- Suomalainen , H. y T. Nurminen . 1972 . Isolation and properties of the Plasma Membrane of the Yeast cell . Proceedings IV International Fermentation Symposium : Fermentation Technology Today , pp. 825-831 .

- Surdin , Y. , W. Sly , J. Sirc , A. M. Bordes y H. Robichon-Szulmajster . 1965 . Propriétés et contrôle génétique du système d'accumulation des acides aminés chez Saccharomyces cerevisiae . Biochim. Biophys. Acta , 107 : 546-566 .
- Surdin , Y. 1967 . La Semi-aldehyde aspartique dehydrogenase chez Saccharomyces cerevisiae . Propriétés et régulation . Eur. J. Biochem. , 2 : 344-348 .
- Surdin-Kerjan , Y. , H. Cherest y H. Robichon-Szulmajster . 1973 . Relationship between Methionyl transfer Ribonucleic Acid cellular content and synthesis of methionine enzymes in Saccharomyces cerevisiae . J. Bacteriol. , 113 : 1156-1160 .
- Surdin-Kerjan , Y. y H. Robichon-Szulmajster . 1975 . Existence of two levels of repression in the biosynthesis of methionine in Saccharomyces cerevisiae : Effect of Lomofungin on enzyme synthesis . J. Bacteriol. , 122 (2) : 367-374 .
- Surdin-Kerjan , Y. , H. Cherest y H. Robichon-Szulmajster . 1976 . Regulation of methionine synthesis in Saccharomyces cerevisiae operates through independent signals : Methionyl-tRNA^{met} and S-adenosyl-methionine . Acta microbiol. Acad. Sci. hung. , 23 : 109-120 .

Takenouchi , E. , T. Yamamoto . D. K. Tanaka , H. Nikolova y K. Soda.

1979 . Lysine production by 8-(2-aminoethyl)-L-Cysteine resistant mutants of Candida pelliculosa . Agric. Biol. Chem. , 43 (4) : 727-734 .

Tucci , A. F. 1969 . Feedback inhibition of Lysine biosynthesis in

Yeast . J. Bacteriol. , 99 : 624-625 .

Tucci , A. F. y L. N. Ceci . 1972a . Homocitrate Synthase from Yeast .

Arch. Biochem. Biophys. , 153 : 742-750 .

Tucci , A. F. y L. N. Ceci . 1972b . Control of Lysine biosynthesis

in Yeast . Arch. Biochem. Biophys. , 153 : 751-754 .

Vito , P. C. de , J. Dreyfuss . 1964 . Metabolic regulation of Adenosine triphosphate Sulfurylase in Yeast . J. Bacteriol. , 88

(5) : 1341-1348 .

Warner , J. R. y Ch. Gorenstein , 1978 . Yeast has a true stringent

response . Nature , 275 : 338-339 .

Watson , T. G. 1976 . Amino-acid pool composition of Saccharomyces

cerevisiae as a function of growth rate and amino-acid nitrogen source . J. Gen. Microbiol. , 96 : 263-268 .

- Wienken , A. y M. Dürre . 1974 . Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae* . Arch. Microbiol. , 101 : 45-57 .
- Wolfner , M. , D. Yep , F. Messenguy y G. R. Fink . 1975 . Integration of amino acid biosynthesis into the Cell Cycle of Saccharomyces cerevisiae . J. Mol. Biol. , 96 : 273-290 .
- Yagamuchi , T. 1967 . Methionine Synthesis : present and future . Japan Chem. Ind. Assoc. Monthly , 3 : 163-170 .
- Yamada , Y. , S. Kinoshita , T. Tsunoda y K. Aida . 1972 . The Microbial Production of Amino Acids . Halsted Press Book . New York .
- Zwolshen , J. H. y J. K. Bhattacharjee . 1981 . Genetic and Biochemical properties of Thialysine-resistant mutants of Saccharomyces cerevisiae . J. Gen. Microbiol. , 122 : 281-287 .

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
CONSEJO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

El presente es el original íntegro de por los abajo firmantes

de fecha para inscribir la tesis doctoral de:

Marco Antonio Delgado Delgado

"Obtención y estudio de mutantes super-
productores y excretores de aminoácidos en Factaria
impeis certansae"

con visado de la calificación: Sobresaliente "cum laude"

Sevilla, 26 de Marzo 1982
El Vocal El Vocal El Vocal

Elvira

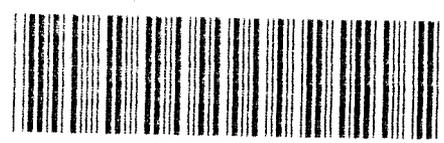
[Signature]

R. Verdá Olmedo

[Signature]

[Signature]

[Signature]



500292745
FBI E 70-066

292745