

AISLAMIENTO DE MUTANTES RESISTENTES AL 1,2,4, TRIAZOLE EN CANDIDA UTILIS

M. A. Díaz y J. Benítez

Dirección de Microbiología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 25 de octubre de 1985

Recibido: 19 de mayo de 1986

ABSTRACT. In the following paper the isolation and characterization of 1,2,4 triazole resistant mutants from *Candida utilis* is described. These mutants showed a 2 to 2,5-fold increase in intracellular thiolic aminoacid content. The methionine content of these mutants did not differ from the wild type level. Such a behaviour clearly suggest that these mutants and the ethionine resistant mutants previously isolated in this laboratory are of different origin.

RESUMEN. En el presente trabajo se describe el aislamiento y estudio de un grupo de mutantes aislados en levaduras por primera vez, resistentes al 1,2,4 triazole. Estos mutantes mostraron un contenido intracelular de aminoácidos tiólicos entre 2 y 2,5 veces mayor que la cepa parental *Candida utilis* Y-900. Estos mutantes mostraron niveles normales de L-metionina, lo cual sugiere que los mismos son cualitativamente diferentes de los mutantes resistentes a etionina previamente aislados en este laboratorio.

INTRODUCCION

El valor nutricional de la levadura forrajera se encuentra limitado por su bajo contenido de aminoácidos azufrados¹. Estudios genéticos y bioquímicos han demostrado que la L-metionina y otros aminoácidos azufrados son interconvertibles². La mayor parte de los estudios relacionados con la biosíntesis de la metionina han sido realizados en bacterias³ y en menor medida en *Saccharomyces cerevisiae*⁴. Salvo algunos estudios realizados en *Saccharomycopsis lipolytica*⁵ poco se conoce acerca del metabolismo de aminoácidos azufrados en levaduras forrajeras.

La vía de asimilación de sulfato juega un papel importante en la biosíntesis de compuestos azufrados. En el presente trabajo se aplican criterios de selección para aislar cepas hiperproductoras de aminoácidos azufrados tales como cisteína y homocisteína en la levadura *Candida utilis*. Se logra el aislamiento de mutantes resistentes al análogo del sulfuro 1,2,4 triazole⁶ que mostraron un contenido mayor de aminoácidos tiólicos.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos empleados. Se utilizó la cepa parental *Candida utilis* Y-900. Las cepas XA-97, XA-432 e YE-1110 son mutantes resistentes a etionina, hiperproductores de metionina aislados previamente en laboratorio⁷.

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento. Como medio rico se empleó el medio YPG compuesto por extracto de levadura (10 g/L), peptona (10 g/L) y glucosa (20 g/L). Como medio mínimo se empleó el medio GO descrito por Galzy y Sionimski⁸. Para los medios sólidos se añadió agar (Oxoid) (20 g/L). La levadura fue crecida aeróbicamente a 30 °C.

Aislamiento de mutantes resistentes al 1,2,4, triazole. La sensibilidad de la cepa Y-900 al 1,2,4, triazole fue determinada en el rango de concentración comprendido entre 10⁻⁶ y 1 mol/L en medio GO. La cepa Y-900 fue crecida durante 24 h en medio YPG y diluciones apropiadas de este cultivo fueron inoculadas a placas de medio GO suplementadas con diferentes concentraciones de 1,2,4 triazole. Las placas fueron incubadas 7 d a 30 °C. Las colonias resistentes fueron aisladas, purificadas y verificadas para su resistencia a 1,2,4 triazole.

Determinación de metabolitos. El contenido de metionina intracelular fue determinado por el método microbiológico⁹. La metionina fue determinada en extractos obtenidos por ebullición preparados según Cherest y Robichon-Szulmajster⁹. El contenido de aminoácidos tiólicos se determinó por el método colorimétrico de Kredich y Tomkins¹⁰.

Análisis estadísticos. Se empleó un análisis de varianza modelo factorial con los datos obtenidos para las diferentes cepas. El cálculo de F se realizó según la expresión siguiente:

$$\frac{CM_{cep}}{CM_{error}}$$

donde: CM cuadrado medio

Con el objetivo de comparar las medias obtenidas se aplicó el test de rangos múltiples de Duncan¹¹.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra la curva de inhibición de la cepa Y-900 por 1,2,4 triazole. Una fuerte inhibición del crecimiento es observada a concentraciones del análogo superiores a 10⁻⁴ mol/L. La concentración seleccionada para el aislamiento de mutantes osciló entre

10^{-2} y 10^{-1} mol/L. Se purificaron 80 colonias resistentes al 1,2,4 triazole. De estas 80 colonias se eligieron 23 en base a su mayor contenido de aminoácidos tiólicos. En la Tabla I se muestra el contenido de metionina y aminoácidos tiólicos (cisteína + homocisteína) de un grupo de estos mutantes. Con fines comparativos se muestran los datos correspondientes para las cepas Y-900, XA-97, XA-432 e YE-1110. Para discriminar los mejores mutantes se aplicó un análisis de varianza modelo factorial en el cual se obtuvieron diferencias altamente significativas (Tabla II). Finalmente, se aplicó el test de rangos múltiples de Duncan¹¹ con el objetivo de comparar las medias. Las cepas comparadas se colocaron en orden decreciente de contenido de aminoácidos tiólicos. En cuanto al contenido de metionina los mutantes no diferían significativamente de la cepa parental.

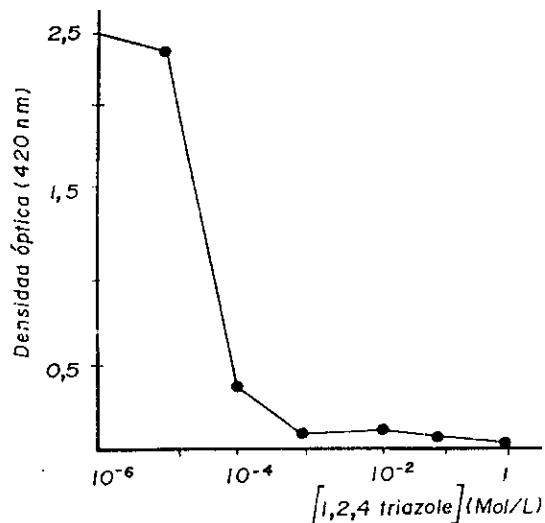


Fig. 1. Curva de inhibición de *Candida utilis* Y-900 por 1,2,4 triazole

TABLA I
Contenido de aminoácidos tiólicos (cisteína + homocisteína) y L-metionina en mutantes resistentes a 1,2,4 triazole y resistentes a DL-etionina

Cepa	Aminoácidos tiólicos ($\mu\text{mol/g peso seco}$)	Incremento* (%)	L-metionina ($\mu\text{mol/g peso seco}$)	Incremento (%)
Y-900	24,46	—	0,670	—
67	60,55	247	0,697	104
61	51,91	212	0,717	107
24	51,76	211	1,260	180
38	48,38	197	0,730	108
77	43,25	176	0,978	146
XA-432	17,68	—	5,200	780
XA-97	9,97	—	5,840	870
YE-1110	14,64	—	10,990	1 640

*Los incrementos están referidos a la cepa Y-900

TABLA II
Resultados del Análisis de Varianza Modelo Factorial

Fuentes	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
Cepas	22	7 408,38	336,74	3,59
Error	31	2 905,95	93,74	
Total		10 314,33		

$$F(22,31) = 1,93$$

0,05

$$F(22,31) = 1,98$$

0,01

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En *Salmonella typhimurium* la enzima o-acetil-L-serina sulfidrilasa cataliza la reacción entre el 1,2,4 triazole y la o-acetil-L-serina formando 1,2,4 triazole-1-L-alanina. Esto ocasiona un agotamiento de o-acetil-L-serina y la inhibición del crecimiento que puede ser revertida por suministro de cisteína exógena⁸. El déficit de o-acetil-L-serina además de privar a la célula del esqueleto carbonado de la cisteína, impide la inducción de las enzimas de la vía de asimilación de sulfato¹².

El posible mecanismo de acción de este análogo en levaduras es desconocido. Los resultados indican que el 1,2,4 triazole es incorporado y resulta tóxico para la levadura *Candida utilis*. La resistencia a este análogo podría explicarse por su no incorporación a la célula, por mutaciones en el gen estructural de la o-acetil-L-serina sulfidrilasa, o por mutaciones en otros genes que ocasionen un incremento en la biosíntesis de sulfuro endógeno. La existencia de un contenido mayor de aminoácidos tiólicos en los mutantes aislados favorece la última de estas hipótesis. El hecho de que estos mutantes poseen niveles normales de L-metionina sugiere que los mismos poseen un origen diferente de los mutantes resistentes a etionina previamente aislados en el laboratorio los cuales están de-reprimidos para las enzimas de la vía de asimilación de sulfato².

Desde el punto de vista práctico, como el contenido de aminoácidos tiólicos es 36 veces superior al de la L-metionina, un incremento de 2,5 veces en el contenido de aminoácidos tiólicos sería equivalente a incrementar entre otros el contenido de L-metionina intracelular de la levadura. Por otra parte, sería de gran interés la construcción de híbridos entre mutantes resistentes a etionina y mutantes resistentes a 1,2,4 triazole.

BIBLIOGRAFIA

1. Woodman A. *Dean P. Proc. Nutr. Soc.* 30, 59A, 1971.
2. Benítez J. Tesis para optar por el grado de C. Dr., CENIC, Ciudad de La Habana, 1982.
3. Smith D. *Advances in Genetics* 16, 141, 1971.
4. Robinchon-Szulmajster H., Surdin-Kerjan Y. and Cherest H. *Genetics of Industrial Microorganisms*, Hostalek Z. and Cudlin J. (ed.) Elsevier Publishing Company, 1973.

5. Morzycka E., Sawnor-Korszynska D., Paszewki A. and Grabski J. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 125, 1976.
6. Kredich N. *J. Biol. Chem.* 2501, 7324, 1975.
7. Galzy P. and Slonimski P. *Comptes Rend. Acad. Sci. Paris* 245, 2453, 1957.
8. Steele B., Antonieski H., Scuberlich E., Reynolds M. and Baumann C. *J. Biol. Chem.* 177, 533, 1949.
9. Cherest M. and Robichon-Szulmajster H. *Genetics of Industrial Microorganisms*, Hostalek Z. and Cudlin J. (ed.) Elsevier Publishing Company, 1973.
10. Kredich N. and Tomkins G. *J. Biol. Chem.* 241, 4955, 1966.
11. Duncan D. *Biometrics*, 11, 1, 1955.
12. Kredich N. *J. Biol. Chem.* 246, 3474, 1971.

**Lo último
en Electroforesis**

SCAREL® DNA

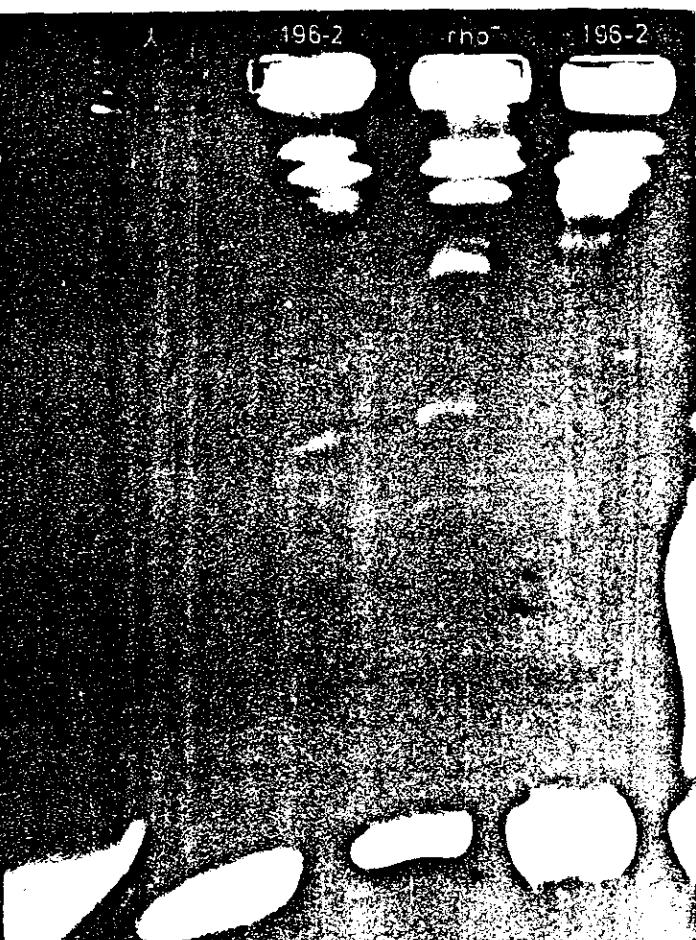
El sistema de campo alterante para resolución electroforética del DNA, permite separar cromosomas de eucariotes inferiores y grandes fragmentos de DNA de células de mamíferos.

Cuenta con una fuente de poder regulable y corriente directa (0-300 V, 0-400 mA)

Dimensiones de la cubeta: 300 x 240 x 90 mm

Posee electrodos de platino de 0,35 mm de diámetro

Foto: Cariotipo electroforético de cepas de levaduras. Se muestran las bandas correspondientes a los cromosomas cuya talla oscila entre 150 y 2 000 Kb así como DNA de lagó fago



**SCAREL®
DNA**

CN-IC Avenida 26 y calle 158, Cubanacán, Playa
Apartado Postal 6880 y 6990
Teléf. 21-8066. Ciudad de La Habana, Cuba Telex: 51-1582 CNICA CU

