



EVOLUCIÓN ADAPTATIVA DE LA CEPA PTSGHI⁻ DE *Bacillus subtilis* 168 Y LA CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LA CEPA EVOLUCIONADA CV846 EN MEZCLAS DE GLUCOSA-XILOSA-ARABINOSA.

Natividad Cabrera-Valladares, Alfredo Martínez J, Francisco Bolívar Z y Guillermo Gosset L.

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Av. universidad 2001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. Tel. 01(777) 3291601,

Fax 01(777) 3291648. gosset@ibt.unam.mx

Palabras clave: *Bacillus subtilis* 168, evolución adaptativa, xilosa.

Introducción. *Bacillus subtilis* 168 es una bacteria Gram positiva utilizada ampliamente en la industria para la producción de enzimas (1). Utiliza varios azúcares y polímeros como fuente de carbono, sin embargo, no puede utilizar xilosa (2). La xilosa se encuentra presente en los residuos agroindustriales, específicamente en la fracción de la hemicelulosa. La cepa CVPTSGHISp (*ptsGHI::loxPsp*) de *B. subtilis* 168 es deficiente en el transporte de glucosa. El objetivo de este trabajo fue la obtención de cepas evolucionadas derivadas de la cepa CVPTSGHI y su caracterización fisiológica en medio mineral (MM) con 8 g/L de glucosa (MMG), 8g/L de xilosa (MMX), en mezclas de estos azúcares (MMGX) y de arabinosa (MMGXA) con 4 g/L de la fuente de carbono.

Metodología. Se sometió a evolución adaptativa la cepa CVPTSGHISp mediante una serie de pases secuenciales de cultivos en crecimiento exponencial usando matraces con 25 ml de MMG a 37° C y 300 rpm. Se preparó un stock de células de cada pase (-70° C). La caracterización cinética se llevó a cabo en matraces usando MM con glucosa (G), xilosa (X) o arabinosa (A) como fuentes de carbono. La concentración de azúcares se determinó por HPLC.

Resultados y discusión. El proceso de evolución incluyó 11 pases. Para determinar la dinámica de este proceso, se seleccionaron 10 colonias al azar de los pases 3-8 y se caracterizaron en MMG. La velocidad específica de crecimiento (μ) se muestra en la Figura 1. Los resultados sugieren que las modificaciones genéticas en las colonias evolucionadas que originaron un incremento en la μ con respecto a la cepa CVPTSGHISp, se adquirieron durante los primeros pases (Figura 1).

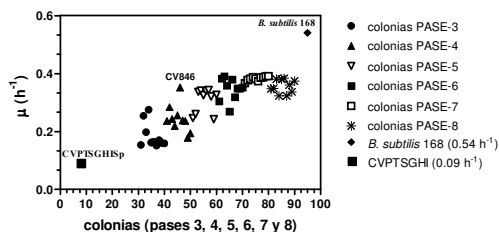


Figura 1. Dinámica del proceso de evolución

La cepa CV846 (Figura 1, pase 4) se caracterizó en MMG y MMX. Los valores de μ y velocidad específica de glucosa (q_s) se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la cepa evolucionada CV846.

cepas	μ (h ⁻¹)	q_s (g _{Glc} g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹)
<i>B. subtilis</i> 168 (MMG)	0.52±0.02	0.97±0.04
CVPTSGHISp (MMG)	0.09±0.003	0.37±0.08
CV846 (MMG)	0.28±0.01	0.60±0.03
CV846 (MMX)	0.24±0.04	0.68±0.04

Datos obtenidos de las mezclas MMGX nos indican que la cepa CV846 utilizó xilosa preferentemente que glucosa (datos no mostrados) y en MMGXA co-utilizó arabinosa y xilosa preferentemente a la glucosa (Figura 2).

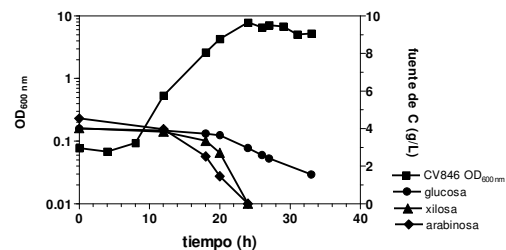


Figura 2. Caracterización cinética de La cepa evolucionada CV846 en MMGXA.

Para conocer si el transportador GlcP (3) transporta glucosa y xilosa en la cepa CV846, se inactivó el gen *glcP*. La cepa evolucionada CV846*glcP*⁻ no creció en MMG y MMX (datos no mostrados).

Conclusiones. Se obtuvo por evolución adaptativa una población diversa de cepas evolucionadas de *B. subtilis* 168 PTS⁻. Se caracterizó la cepa evolucionada CV846:

- En cultivos MMG presentó una μ correspondiente a un 54% de la cepa ancestral y adquirió la capacidad de utilizar xilosa como única fuente de carbono.

- En cultivos MMGX y MMGXA utilizó pentosas y hexosas de manera secuencial. En esta cepa el transporte de glucosa y xilosa es por el transportador GlcP.

Agradecimiento. Se agradece el apoyo financiero de la beca de CONACyT a Natividad Cabrera Valladares No. 138521.

Bibliografía. 1.- Bron, S Meima, R Maarten Van Dijn, J Wipat A and Harwood C R. (1999). Molecular Biology and Genetics of *Bacillus* spp. En: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain A. 2ª ed. ASM Press. E.U.A. 2.- Stulké J and Hillen W. (2000). Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:849-880.

3.- Paulsen L, Chauvaux S, Choi P, and Milton H Saier JR. (1998). Characterization of glucose-specific catabolite repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*: Identification of a novel Hexose: H⁺ symporter. *Journal of Bacteriology.* 180: 498-504.