

### CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA HOMOLÁCTICA DE *Bacillus subtilis*

Ofelia Edith Carreón Rodríguez, Noemí Flores Mejía, Guillermo Gosset Lagarda y Alfredo Martínez Jiménez  
 Instituto de Biotecnología. UNAM. Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor.  
 Tel (777) 3291601, Fax (777) 3172388. C. electrónico: ocarreon@ibt.unam.mx  
 Palabras clave: *Bacillus subtilis*, L-lactato, velocidad de crecimiento.

**Introducción.** *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram +, que hasta hace poco tiempo era considerada estrictamente aerobia. Desde hace una década se ha demostrado que también puede crecer bajo condiciones anaerobias utilizando diferentes aceptores finales de electrones. En condiciones de fermentación produce principalmente lactato y 2,3-butanodiol (1). El piruvato es el sustrato común de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), acetolactato deshidrogenasa (ALSS) y piruvato deshidrogenasa (PDH) del metabolismo fermentativo de *B. subtilis*.

El objetivo de este trabajo fue generar una cepa homoláctica de *B. subtilis* inactivando el gen *alsS* que codifica para la enzima acetolactato sintasa, la cual canaliza el piruvato hacia la formación de butanodiol.

**Metodología.** Se utilizaron procedimientos estándares para llevar a cabo preparación de plásmidos, digestiones, ligaciones y transformaciones. *E. coli* XL1Blue fue utilizada como cepa hospedera para la construcción de plásmidos. La cepa de *B. subtilis* 168 *trp*<sup>+</sup> fue transformada utilizando el método de competencia natural. Las condiciones de cultivo anaerobio fueron: mini-fermentadores con 200 ml de medio Luria - 10 g/L de glucosa, 37 °C, pH 7, 100 rpm sin aireación. El medio Luria contiene por litro: 5 g extracto de levadura; 10 g de hidrolizado de caseína; y 5 de NaCl. El crecimiento fue cuantificado espectrofotométricamente, el butanodiol se determino por cromatografía de gases, la glucosa y el L-lactato usando un analizador bioquímico.

**Resultados y discusión.** El gen *als* fue interrumpido en *B. subtilis* 168 por recombinación homóloga usando el cassette de Espectinomicina flanqueado por los sitios *loxP*. La construcción de la cepa (*B.s. Δals*) fue verificada mediante ensayos de PCR y digestiones. La caracterización de la cepa progenitora y de *B.s. Δals*, en cultivos no aireados (Fig.1), muestra que durante las primeras 5 h el consumo de glucosa y la formación de lactato se llevan a cabo a la misma velocidad en las dos cepas. Sin embargo debido a que la cepa *B.s. Δals* forma una mayor cantidad de biomasa que *B.s. 168 trp*<sup>+</sup> (1.11 vs 0.75 g/L), posteriormente la mutante consume con mayor rapidez la glucosa, agotándola por completo a las 10 h de fermentación y produciendo 17.8 g/L de lactato, 16% más que la cepa progenitora. Mientras que *B.s. 168 trp*<sup>+</sup> consume los 10 g/L de glucosa poco después de las 14 h.

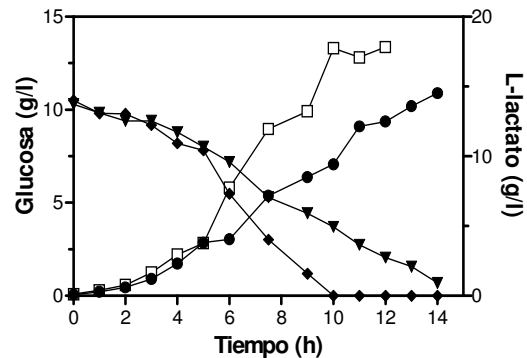


Fig. 1. Consumo de glucosa, ▼ *B.s. 168 trp*<sup>+</sup>, ◆ *B.s. Δals*; producción de lactato, ● *B.s. 168 trp*<sup>+</sup>, □ *B.s. Δals*.

La inactivación del gen *als*, ocasiona que la cepa mutante no produzca ni acetoina, ni 2,3-butanodiol. La cepa silvestre acumula 6 g/L de butanodiol a partir de las 5 h. Los resultados sugieren que este carbono es dirigido hacia la formación de lactato en *B.s. Δals*, y que la eliminación de los productos formados de la vía de butanodiol (acetolactato, acetoina y butanodiol) reduce un efecto inhibitorio, lo cual permite que la mutante crezca más. La concentración de lactato fue mayor a 10 g/L (el rendimiento teórico de conversión de glucosa en lactato es de 1 g/g), debido a que *B. subtilis* tiene la capacidad de convertir varios de los aminoácidos presentes en el medio Luria en piruvato y en las condiciones evaluadas en lactato.

**Conclusiones.** Cuando el gen *als* es inactivado el flujo de piruvato es re-dirigido hacia la formación de lactato, eliminando por completo la formación de 2,3-butanodiol, obteniéndose una cepa homoláctica.

**Agradecimiento.** PAPIIT DGAPA-UNAM IN220908

#### Bibliografía.

1. Cruz-Ramos, H., T. Hoffmann, M. Marino, H. Nedjari, E. Presencan-Siedel, O. Dreesen, P. Glaser, and D. Janh. 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J. Bacteriol.* 182:3072-3080
2. Romero, S., E. Merino., F. Bolívar., G. Gosset, A. Martínez. 2007. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism. *App. Environ. Microbiol.* 73(16):5190-5198.