

PRODUCCIÓN DE L-LACTATO CON *Bacillus subtilis* A PARTIR DE GLUCOSA Y CELOBIOSA.

Claudia I. Hernández y Alfredo Martínez. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62210 México. Fax:(777) 3 17 23 88. ibeth@ibt.unam.mx

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, L-láctico, glucosa, celobiosa.

Introducción. El ácido láctico ha sido ampliamente utilizado en la industria de alimentos, farmacéutica y química. Actualmente ha tomado mayor auge debido a su uso como materia prima para la producción de plásticos biodegradables, cuyas propiedades dependen de la mezcla de isómeros del lactato. Requiriéndose el L-láctico ópticamente puro en mayor proporción. El ácido láctico es producido por síntesis química o por fermentación, en la primera se obtienen mezclas racémicas, mientras que los procesos fermentativos permiten producir D o L-láctico ópticamente puro, además de utilizar fuentes renovables. Sin embargo, son pocos los microorganismos que producen L-láctico y entre las bacterias la mayoría sintetiza D-láctico. Se sabe que *Bacillus subtilis* posee una lactato deshidrogenasa funcional en condiciones de fermentación (1, 3), pero su capacidad para producir lactato no ha sido evaluada. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción de L-lactato en medio mineral utilizando glucosa y celobiosa como fuentes de carbono.

Metodología. Se utilizó la cepa de *B. subtilis* WB700CH2 (trp^+ , xil^+), la cual se generó a partir de la cepa de *B. subtilis* WB700 no productora de proteasas (4). Los cultivos se llevaron a cabo en mini-fermentadores no aireados, con un volumen de trabajo de 200 ml a 37°C, 100 rpm y pH 7.0, utilizando medio mineral (MM, 2) suplementado con glucosa y/o celobiosa. La determinación de ácido láctico se realizó por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) y la pureza del mismo se evaluó con un analizador enzimático.

Resultados y discusión.

En condiciones no aireadas, *B. subtilis* fermenta glucosa y piruvato en acetato, lactato y pequeñas cantidades de etanol, acetoina y 2,3-butanodiol (3). En el presente trabajo probamos que en medios minerales, *B. subtilis* es capaz de fermentar glucosa y celobiosa en lactato (cuadro 1). El análisis enzimático específico para L-lactato arroja los mismos valores de láctico que por HPLC, indicando que se produjo L-lactato ópticamente puro. Sin embargo la velocidad de crecimiento es baja, lo cual sugiere la presencia de un desbalance energético, que requiere del aporte de nutrientes adicionales como vitaminas y/o aminoácidos (3). A pesar de esto y aún cuando la biomasa máxima alcanzada no fue mayor a 0.6 g/l, los rendimientos de formación de L-lactato fueron mayores a 0.8 (Cuadro 1).

Para contrarrestar el desbalance, se utilizaron sólidos de licor de maíz (SLM) para suplementar el medio mineral (30 g/l) y 57 g/l de glucosa. La velocidad de crecimiento y la biomasa

obtenida se incrementaron 2.2 y 6.8 veces respectivamente, en comparación con medio mineral y 10 g/l de glucosa. El rendimiento de formación de L-lactato fue mayor a 0.7, alcanzándose 41 g/l de L-láctico en 107 h.

En comparación con el metabolismo de glucosa, la productividad volumétrica de lactato fue 30% menor cuando se utilizó celobiosa y 80% mayor cuando se suplementó el medio con SLM (cuadro 1).

Cuadro 1. Resumen de resultados.

Azúcar (g/l)	?	X _{MAX}	Y _{P/S}	Q _P
Celobiosa (10.5)	0.037	0.53	0.83	0.15
Glucosa (9.3)	0.039	0.50	0.80	0.21
SLM-glucosa (57)	0.087	3.4	0.71	0.38

? = velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

Y_{P/S} = Rendimiento final producto/sustrato (g L-láctico/g azúcar)

X_{MAX} = Biomasa máxima durante la fase estacionaria (g/l)

Q_P = Productividad volumétrica de lactato (g lactato/l h)

Conclusiones.

Con glucosa y celobiosa (10 g/l) se produce ácido L-láctico ópticamente puro, con rendimientos de conversión mayores al 80% del teórico.

Las bajas velocidades de crecimiento y biomasa generada en medios minerales en condiciones anaerobias pueden ser incrementadas con la adición de nutrientes económicos como los sólidos de licor de maíz.

La adición de SLM con 57 g/l de glucosa, permitió obtener 41 g/l de L-lactato, con una productividad volumétrica 80% mayor a la obtenida con solo glucosa.

Agradecimiento. Se agradece el apoyo financiero del proyecto CONACyT Z-003.

Bibliografía.

- Espinoza de los Monteros, J, Martínez, A y Valle, F. (2001) Metabolic profiles and *aprE* expresión in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 379-384.
- Martínez, A, Ramírez, O, T y Valle, F. (1997). Improvement of culture conditions to produce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 40-45.
- Nakano, M y Zuber, P. (1998). Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Ann. Rev. Microbiol.* 52:165-190.
- Ye, R, Yang, LP y Wong, SL. (1996). Construction of protease deficient *Bacillus subtilis* strains for expression studies: Inactivation of seven extracellular proteases and the intracellular LonA protease. *Proceedings of the International Symposium on Recent Advances in Bioindustry*, Seoul, Korea, Abril 25-26. 160-169.

