

EFFECTO DE LA ACUMULACION DE ACIDOS ORGANICOS SOBRE LA SINTESIS DE Cry UTILIZANDO UNA FUSION TRANSCRIPCIONAL *cry1Ac'-lacZ* EN *B. thuringiensis* HD73

Ulises Gaona Ramírez, Octavio Gómez Guzmán y Mayra de la Torre Martínez; Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN; Av. IPN 2508, Sn. Pedro Zacatenco, 07360, México, D.F., Fax 5747-3313, rgaona@mail.cinvestav.mx.

Palabras clave: *Fusión transcripcional, B. thuringiensis, ácidos orgánicos.*

Introducción. Se han tratado de incrementar la concentración y la productividad de proteínas Cry en *B. thuringiensis* mediante cultivos en lote utilizando medios de cultivo con altas concentraciones de nutrientes; pero se presentan problemas de desincronización, limitaciones por transferencia de masa y la acumulación de ácidos orgánicos, lactato y acetato (1). En condiciones aeróbicas hemos encontrado concentraciones de hasta 11.9 g de lactato. En este estudio se investigó la dinámica de acumulación de estos ácidos y de intermediarios del ciclo de Krebs en cultivos por lote alimentado (CLA), con alimentación intermitentemente y en cultivos por lote (CL), así como su efecto sobre la esporulación y sobre la expresión del gen *cry1Ac*.

Metodología. Se realizaron fermentaciones en CLA con alimentación intermitente utilizando una cepa de Bt HD73 acristalífera con una fusión transcripcional *cry1Ac'-lacZ*. Se hicieron determinaciones de ácidos orgánicos mediante HPLC, glucosa en un analizador bioquímico (YSI), conteo celular y de esporas en una cámara de Neubauer y actividad de β -gal.

Resultados y discusión. En los CLA las concentraciones mas altas detectadas fueron de 55, 53.7 y 12 g/L de citrato, acetato y lactato respectivamente, con una eficiencia de esporulación del 20 % y una actividad de β -gal de 2530 UI/mL. Mientras que en el cultivo en lote se obtuvieron concentraciones de 4.08, 4.09 y 1 g/L, de citrato, lactato y acetato respectivamente, una eficiencia de esporulación del 61 % y 348 UI/mL de β -gal. La acumulación de acetato se presentó antes de la acumulación de citrato, ésto nos hace suponer que existe al principio de la fermentación un desacoplamiento entre la glicolisis y el ciclo de

Krebs y después un cuello de botella en ese ciclo. Debido a que no existen reportes de la acumulación de este ácido, se planteó la hipótesis de que el citrato afectaba la esporulación y expresión de *cry*. Se realizó un cultivo en lote adicionando un pulso de citrato, en este cultivo se observó una esporulación de 6 % y 306 UI/mL de β -gal y un desplazamiento en el inicio del incremento de la actividad de β -gal que señala la activación del promotor del gen *cry1Ac* (Fig 1)

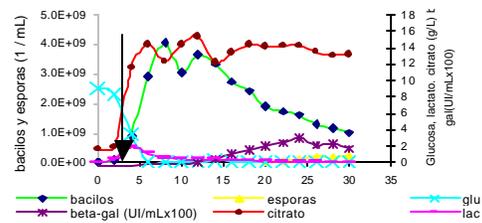


Fig. 1 Cinética del cultivo en lote con adición de pulso de citrato, la flecha señala la adición del pulso

Conclusiones. Se encontró que el citrato se acumuló en mayor cantidad que el acetato y lactato. La presencia de citrato en estas concentraciones provocó la disminución en la eficiencia de esporulación. Además el citrato retardó la activación del gen *cry1Ac*.

Agradecimientos. Al CONACyT, proyecto Z 001. Ulises Gaona fue becario 155165.

Bibliografía.

1. Ohara H., Yahata M. (1996). L-lactic acid production by *Bacillus* sp. In Anaerobic and aerobic culture. *J. Ferm and Bioeng.* 81:272-274.