



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DERIVADAS DE BACILLUS SUBTILIS 168 QUE HAN SIDO MODIFICADAS EN SU CAPACIDAD DE TRANSPORTE DE AZUCARES PARA LA PRODUCCION DE LACTATO.

Alan Heres, Natividad Cabrera, Luz María Mejía, Georgina Hernández, Ramón de Anda, Alfredo Martínez, Francisco Bolívar, Guillermo Gosset.

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM  
A.P. 510-3, Cuernavaca Morelos 62250, México

[heralan@hotmail.com](mailto:heralan@hotmail.com)

*Palabras clave: evolución adaptativa, ácido láctico, residuos agroindustriales.*

**Introducción.** El ácido láctico es un químico versátil usado; 1) como acidulante, saborizante y preservador de alimentos 2) para la producción de bases químicas y 3) para la polimerización de plásticos biodegradables (ácido poliláctico; PLA) <sup>(1)</sup>. De las 80 mil Ton. producidas mundialmente al año, alrededor del 90% se origina a partir de fermentación bacteriana<sup>(2)</sup> y el resto es producido sintéticamente por la hidrólisis de lactonitrilo <sup>(1)</sup>. Para la producción fermentativa es posible el uso de recursos renovables tales como los residuos agroindustriales que generalmente están constituidos por una mezcla de xilosa, glucosa, celulosa, lignina y pectinas, estos representan una fuente de carbono abundante y barata. *Bacillus subtilis* un microorganismo ampliamente utilizado en la industria designado como GRAS. Tiene las características genéticas potenciales para la producción de lactato, sumado a su capacidad de metabolizar una amplia variedad de azúcares bajo condiciones anaeróbicas adecuadas tales como pentosas, hexosas, disacáridos y almidón <sup>(3)</sup>. Sin embargo, a pesar de poseer la maquinaria enzimática necesaria para metabolizar xilosa (principal componente de los residuos agroindustriales) como única fuente de carbono, no es capaz de hacerlo debido a que carece de un transportador específico para introducirla.

El objetivo de este trabajo es caracterizar 4 cepas mutantes generadas en el laboratorio mediante evolución adaptativa (fenotipo; PTS<sup>-</sup>glc<sup>+</sup>xil<sup>+</sup>) para crecer en mezclas de glucosa y xilosa. Estas cepas proceden de una derivada de *B. subtilis* 168 *trp*<sup>+</sup> mutante en el sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS) con velocidad de crecimiento muy reducida (fenotipo; PTS<sup>-</sup>glc<sup>-</sup>), Con la finalidad de obtener cepas productoras de lactato, se les inactivó el gen *alsS* de la vía del 2,3-butanediol, la cual compite con la vía fermentativa del ácido láctico, por la disponibilidad del piruvato <sup>(4)</sup> (fenotipo; PTS<sup>-</sup>glc<sup>+</sup>xil<sup>+</sup>alsS).

**Metodología.** Las 4 mutantes: CV842, CV846, CV863 y CV879 (fenotipo; PTS<sup>-</sup>glc<sup>+</sup>xil<sup>+</sup>alsS<sup>-</sup>) fueron crecidas en mini fermentadores (fleakers) bajo condiciones que favorecieron la producción de lactato; se cultivaron en medio rico suplementado con una mezcla de glucosa y xilosa (10g/L <sup>g/L</sup>). La concentración de azúcares y productos de fermentación (lactato, ácido acético, acetoina y butanediol) fue determinada empleando cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y la

concentración de biomasa se determinó por espectrofotometría.

**Resultados.** Con base en el análisis de los parámetros cinéticos se determinó que la cepa evolucionada con mejor desempeño es la *B. subtilis* CV879 ya que mostró la mayor velocidad de crecimiento (0.077 h<sup>-1</sup>). La concentración de biomasa máxima alcanzada al final de la fase de crecimiento (X<sub>Max</sub>) por CV879 fue de 0.51 g/L. Además, pasadas 116 horas de fermentación se observó una acumulación máxima de 14.31g/L de ácido láctico. Por otro lado, habiendo pasado las 116 hrs de fermentación la mayoría de las cepas mostraron un consumo incompleto de glucosa al contrario de la xilosa que fue consumida totalmente aproximadamente pasadas 60 hrs de fermentación en el caso de las cepas CV863 y CV879. En ninguna de las cepas mutantes se observó producción de acetato, acetoina o butanediol, lo que corrobora que no hay competencia por la disponibilidad del piruvato y el flujo de carbono se puede dirigir hacia la producción de lactato. La cepa silvestre presentó, como era de esperar, consumo preferencial de glucosa respecto a la xilosa, además de una velocidad de consumo para glucosa mayor que la 4 evolucionadas.

**Conclusiones.** A pesar de haber readquirido la capacidad de utilizar la glucosa en las cepas PTS<sup>-</sup>glc<sup>+</sup>xil<sup>+</sup>alsS<sup>-</sup>, la capacidad adquirida de consumir xilosa fue mayor. Esto es una ventaja como cepas de producción de lactato ya que la xilosa es el principal componente de los residuos agroindustriales

**Agradecimiento.** Mercedes Enzaldo, por el apoyo técnico

### Bibliografía.

1. Hofvendahl K., Hahn-Hagerdal B., 2000, *Enzyme Microbiol. Technol.* 26:87-107.
2. Narayana N., Roychoudhury P.K., Srivastava A., 2004., *Elc. J. Biotechnol.* 7(2):167-179.
3. Stulke S. L., Reddy P., Saier M. Jr., and Reizar J., 1990. *J. Biological Chem.*, 265(30): 18581-18589.
4. Nakano, M.M., Daily Y.P., Zuber P., Clark D.P. 1997. *J. Bacteriol* 179: 6749-6755.