



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y
BIOCATÁLISIS

INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS EN Bacillus subtilis PARA LA UTILIZACIÓN DE XILOSA Y PRODUCCIÓN DE ETANOL Y L-LACTATO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

M. en C. Aida Susana Romero García

DIRECTOR DE TESIS: *Dr. Alfredo Martínez Jiménez*



CUERNAVACA, MOR., AGOSTO DE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó bajo la tutoría del Dr. Alfredo Martínez Jiménez y la supervisión del Dr. Enrique Merino Pérez en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca CONACyT 184798 y de los proyectos CONACyT-SAGARPA 2004-C01-224 y CONACyT-Estado de Morelos MOR-2004-C02-048.

Agradezco el apoyo técnico de Mercedes Enzaldo,
a Georgina Hernández por el análisis en HPLC,
a Ramón de Anda por su apoyo en fermentaciones aeróbicas,
a Abel Linares y J. Manuel Hurtdo por su apoyo en la Unidad de Cómputo,
a Paúl Gaytán y Jorge Arturo Yáñez por su apoyo en la
Unidad de Síntesis y Secuencia del IBT, UNAM.

RECONOCIMIENTOS

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Alfredo Martínez Jiménez Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

Dr. Enrique Merino Pérez Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Dr. Alfredo Martínez Jiménez Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL AMPLIADO:

Dr. Enrique Merino Pérez Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Dra. Alejandra Covarrubias Robles Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Joel Ozuna Quintero Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Guillermo Delgado Lamas Instituto de Química, UNAM

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente Dr. Francisco Bolívar Z. Instituto de Biotecnología, UNAM

Secretario Dra. Alejandra Covarrubias R. Instituto de Biotecnología, UNAM

Vocal Dr. Guillermo Delgado L. Instituto de Química, UNAM

Suplente Dr. Joel Osuna Q. Instituto de Biotecnología, UNAM

Suplente Dr. Alfredo Martínez J. Instituto de Biotecnología, UNAM

DEDICO ESTE TRABAJO

A nuestra pequeña y amada Ikram porque lleva el nombre de alguien que fue grande, al igual que ella lo será.

To Heriberto Prado, because I don't shine if he doesn't shine.

A mi mamá, Felicitas García porque puedes aprender sus costumbres en un mes pero nunca dejará de sorprenderte.

A Sofi y Carlos Prado porque en ellos las palabras apoyo, confianza y calidez se funden en un abrazo auténtico.

A mis hermanos, Luisa Roberto y Gerardo, por su apoyo y por la infancia.

AGRADEZCO

Al Dr. Alfredo Martínez, su dirección en la realización de este trabajo, su apoyo, confianza y amistad.

Al Dr. Enrique Merino, su participación siempre valiosa y entusiasta.

A todos los miembros del jurado por sus aportaciones para enriquecer este trabajo.

A todos los miembros del Lab. Bolívar-Gosset por sus críticas... ¡siempre constructivas!

La investigación es continua y ramificada. Es muy fácil entrar en esas ramificaciones y perder de vista el objetivo principal del motivo de la investigación y llegar a un lugar donde no se concluye nada.

También es fácil caer en la “necedad científica” en donde uno se aferra a una idea o a un objetivo caduco o sin sentido (en donde los resultados dicen “esto no funcionará”), uno debería tener la sabiduría de ya no continuar en ese barril sin fondo en donde lo que se encuentre no nos ayudará a nosotros ni a nadie.

Cuando los resultados no son lo que uno esperaba, también uno puede caer en la desesperación de querer llegar a ese objetivo no importa cómo y brincar en diferentes caminos con el único propósito de llegar a ese objetivo y jamás redondear o tratar concluir explicando qué está pasando.

El trabajo en equipo es muy importante porque nos ayuda a validar nuestros resultados, también es igualmente importante apoyarnos para llegar a ese objetivo en común.

Susana Romero 2003

*El sentido común no piensa,
sólo traduce sus necesidades;
es para toda ciencia el primer obstáculo
que hay que vencer.*
Ikram Antaki

*Toda nuestra ciencia,
comparada con la realidad,
es primitiva e infantil...
y sin embargo es lo máspreciado que tenemos.*
Albert Einstein

*En algún rincón perdido del universo,
hubo una vez una estrella alrededor de la cual
unos animales inteligentes inventaron el conocimiento.
Fue el minuto más arrogante y mentiroso de la historia universal.*
Friedrich Nietzsche

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	14
ANTECEDENTES.....	18
PRODUCCIÓN DE ETANOL.....	20
PRODUCCIÓN DE LACTATO.....	26
UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR <i>Bacillus subtilis</i>	28
JUSTIFICACIÓN.....	30
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	36
CONDICIONES DE LOS CULTIVOS.....	38
RESULTADOS.....	42
PRESENTACIÓN DEL MANUSCRITO 1: Metabolic Engineering of <i>Bacillus subtilis</i> for Ethanol Production: Lactate Dehydrogenase Plays a Key Role in Fermentative Metabolism.....	43
RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL POR <i>Bacillus subtilis</i>	44
RESULTADOS NO INCLUIDOS EN EL ARTÍCULO DE PRODUCCIÓN DE ETANOL.....	48
PRESENTACIÓN DEL MANUSCRITO 2: Homolactic fermentation from glucose and cellobiose using <i>Bacillus subtilis</i>	50
RESUMEN DE RESULTADOS DE PRODUCCIÓN DE LACTATO POR <i>Bacillus subtilis</i>	51
UTILIZACIÓN DE XILOSA COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO POR <i>Bacillus subtilis</i>	54
Cepas Caracterizadas.....	55
CULTIVOS AIREADOS.....	56
FERMENTACIONES NO AIREADAS.....	61
Diseño y construcción de plásmidos para utilizar xilosa como única fuente de carbono.....	67
PRESENTACIÓN DEL MANUSCRITO 3: Ingeniería Metabólica: Residuos agroindustriales y etanol carburante.....	70
DISCUSIÓN.....	71
CONCLUSIONES.....	78
PERSPECTIVAS.....	79
BIBLIOGRAFÍA.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Cepas bacterianas utilizadas u obtenidas en este trabajo.....	33
TABLA 2. Vectores utilizados o contruidos en este trabajo.....	34
TABLA 3. Oligonucleótidos utilizados.....	35
TABLA 5. Producción de etanol en diferentes cepas derivadas de BS35.	47
TABLA 6. Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) en condiciones aeróbicas.	60
TABLA 7. Velocidad específica de consumo de fuente de carbono (q_s ($g_s/g_{DCW}h$)) en condiciones aeróbicas.....	60
TABLA 8. Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) en cond. anaeróbicas. ..	65
TABLA 9. Velocidad específica de consumo de fuente de carbono (g_s/g_{DCW}^*h) en condiciones anaeróbicas.....	66
TABLA 10. Velocidad específica de producción de ácido láctico ($g_{lactato}/g_{DCW}^*h$) en condiciones anaeróbicas.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición genérica de los residuos agroindustriales (biomasa o lignocelulosa) y de la fracción hemicelulósica del bagazo de caña de azúcar (BCA).	19
Figura 2. Metabolismo de <i>E. coli</i> y vía heteróloga para la producción de etanol.	23
Figura 3. Metabolismo fermentativo de <i>B. subtilis</i> y la modificación propuesta para desviar el flujo de carbono hacia la producción de etanol.	25
Figura 4. Curva de peso seco de células para <i>B. subtilis</i> a 600 nm.	40
Figura 5. Efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento y producción de etanol con BS35 <i>alsS</i> -, <i>udhA</i> +.	48
Figura 6. Desempeño de BS35 <i>alsS</i> - <i>udhA</i> +, en cultivos aeróbicos a 120rpm (■) y 80 rpm (●) con 1 VVM de flujo de aire.	49
Figura 7. Cinéticas de los cultivos aeróbicos en medio mineral con 10 g/L glucosa. Cepas: A) CH1 <i>alsS</i> ; B) CH1 <i>alsS</i> -, <i>xil</i> * (cepa mutante); C) 168Trp ⁺ /P43; D) 168Trp ⁺ / <i>glcP</i> (cepa transformada).	57
Figura 8. Cinéticas de los cultivos aeróbicos en medio mineral con xilosa. Cepas A) CH1 <i>alsS</i> -, <i>xil</i> * (cepa mutante) y B) 168Trp ⁺ / <i>glcP</i> (cepa transformada).	58
Figura 9. Cinéticas de los cultivos aeróbicos en medio mineral con mezcla glucosa-xilosa. Cepas: A) CH1 <i>alsS</i> ; B) CH1 <i>alsS</i> -, <i>xil</i> * (cepa mutante); C) 168Trp ⁺ /P43; D) 168Trp ⁺ / <i>glcP</i> (cepa transformada).	59
Figura 10. Cinéticas de los cultivos anaeróbicos en medio mineral con glucosa. Cepas: A) CH1 <i>alsS</i> ; B) CH1 <i>alsS</i> -, <i>xil</i> * (cepa mutante); C) 168Trp ⁺ /P43; D) 168Trp ⁺ / <i>glcP</i> (cepa transformada).	62
Figura 11. Cinéticas de cultivos anaeróbicos en medio mineral con xilosa. Cepas A) CH1 <i>alsS</i> -, <i>xil</i> * (cepa mutante) y B) 168Trp ⁺ / <i>glcP</i> (cepa transformada).	63
Figura 12. Cinéticas de los cultivos anaeróbicos en medio mineral con mezcla glc-xil. Cepas A) CH1 <i>alsS</i> ; B) CH1 <i>alsS</i> -, <i>xil</i> * (cepa mutante); C) 168Trp ⁺ /P43; D) 168Trp ⁺ / <i>glcP</i> (cepa transformada).	64
Figura 13. A. Plásmido pUC- <i>xylE1</i> que contiene el gen <i>xylE</i> de <i>E. coli</i> . B. Plásmido pUC- <i>xylA</i> que contiene el gen <i>xylA</i> de <i>B. subtilis</i>	68
Figura 14. A. Plásmido pUC- <i>xylB</i> que contiene el gen <i>xylB</i> de <i>B. subtilis</i> . B. Plásmido pUC- <i>xylAB</i> que contiene los genes <i>xylA</i> y <i>xylB</i> de <i>B. subtilis</i>	68
Figura 15. Plásmido pUC- <i>xylABE</i> que contiene los genes <i>xylA</i> , <i>xylB</i> y <i>xylE</i> en tandem.	69

ABREVIATURAS

Ab ^R	Resistencia a antibiótico
ADHB	Alcohol deshidrogenasa B
ALSS	Acetolactato sintasa
BAL	Bacterias ácido lácticas
BCA	Bagazo de caña de azúcar
FDA	Administración de alimentos y drogas (del inglés Food and Drug Administration)
GRAS	Generalmente considerado como seguro (del inglés Generally Regarded As Safe)
IVM	Ingeniería de Vías Metabólicas
kD	Kilodaltones
LDH	Lactato deshidrogenasa
MTBE	éter metil terbutílico (del inglés metil-terbutil-eter)
PDC	Piruvato descarboxilasa
PLK	Sitio múltiple de clonación (del inglés polilinker)
<i>PalsS</i>	Promotor del gen <i>alsS</i>
PLA	Polilactato
<i>Pldh</i>	Promotor modificado del gen <i>ldh</i>
RBS	Sitio de unión a ribosoma (del inglés ribosome binding site)
SSF	Sacarificación y fermentación simultánea (del inglés simultaneous saccharification and fermentation)
term	terminador
TTP	Tiaminpirofosfato o cocarboxilasa
<i>TcryIII A</i>	Terminador de la transcripción del gen <i>cryIII A</i>
UDHA	Transhidrogenasa
VVM	Volumen de aire/volumen de medio-minuto
::	Interrupción del gen
μ	Velocidad Específica de Crecimiento (h ⁻¹)

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener cepas derivadas de *B. subtilis* que pudieran utilizar glucosa o xilosa para producir mayoritariamente etanol o L-lactato. Primeramente se abordó la producción de etanol por *B. subtilis* a partir de glucosa. Después se abordó la producción de L-lactato a partir de glucosa o celobiosa usando a *B. subtilis* y finalmente, se siguió con la utilización de xilosa por *B. subtilis* en condiciones aireadas y no aireadas.

B. subtilis es una bacteria Gram-positiva que puede fermentar glucosa en medio Luria-Bertani y producir mayoritariamente L-lactato y, en menor cantidad, 2,3-butanodiol y no produce ácido acético o etanol.

Llevando a cabo ingeniería de vías metabólicas se modificó el metabolismo de *B. subtilis* para producir etanol, por medio de la expresión heteróloga de una vía etanológica tomada de *Z. mobilis* (una bacteria aislada del pulque), e interrumpiendo las vías productoras de L-lactato y butanodiol (que compiten fuertemente por el piruvato disponible). Los resultados de este trabajo permitieron dilucidar un nuevo rol metabólico de la enzima lactato deshidrogenasa de *B. subtilis*, el cual consiste en mantener el equilibrio redox NADPH/NADP⁺ a través de la oxidación del cofactor NADPH. Con base en estos resultados se incluyó una nueva variable en el metabolismo de *B. subtilis* expresando la transhidrogenasa soluble de *E. coli*, para tratar de reestablecer el desequilibrio NADPH/NADP⁺ generado por la interrupción de la lactato deshidrogenasa, así se obtuvo una cepa derivada de *B. subtilis* que produce etanol como producto único a partir glucosa, tanto los rendimientos como las productividades de etanol fueron las más altas obtenidas en cultivos lote para este tipo de bacteria.

Por otro lado, se demostró que *B. subtilis* puede fermentar celobiosa produciendo L-lactato con alta pureza óptica, y que además puede fermentar altas concentraciones de glucosa obteniendo títulos de L-lactato mayores a 100 g/L en medio rico, debido a que además del azúcar *B. subtilis* puede dirigir esqueletos de carbono del medio de cultivo hacia la producción de L-lactato.

De la literatura se conoce que a pesar de que *B. subtilis* cuenta con las enzimas necesarias para llevar a cabo el metabolismo de la xilosa, no puede utilizarla como única fuente de carbono debido a que no cuenta con un transportador específico para introducirla. Por esto, se obtuvieron cepas derivadas de *B. subtilis* que ahora pueden consumir xilosa como única fuente de carbono tanto en condiciones aeróbicas como fermentativas, por la expresión de un transportador inespecífico para xilosa o por la selección de mutantes que pueden crecer en medio mineral suplementado con xilosa. En condiciones aireadas *B. subtilis* pudo crecer mediante el consumo de la pentosa o la glucosa, en tanto que en condiciones de fermentación produjo L-lactato, en estas condiciones *B. subtilis* mostró una deficiencia en el transporte de glucosa.

ABSTRACT

The goal of this study was to develop *Bacillus subtilis* strains that produce ethanol or L-lactate as main fermentation products using glucose or xylose as substrates. First, the ethanol production from glucose using *B. subtilis* was tackled. Then the L-lactate production from glucose or cellobiose using *B. subtilis* was studied. Finally the xylose utilization by *B. subtilis* under aerobic and anaerobic conditions was faced. *B. subtilis* is a Gram-positive bacterium, that ferments glucose producing mostly L-lactate and lesser 2,3-butanediol, but not ethanol or acetate. Although *B. subtilis* has the enzymes to metabolize xylose, it cannot grow using xylose as unique carbon source because it does not have a specific xylose transporter.

B. subtilis was modified using metabolic engineering for ethanol production, with the heterologous expression of an ethanologenic pathway from *Z. mobilis* (a bacterium isolated from pulque), followed by the interruption of the lactate and butanediol pathways. These results let to notice a new metabolic role of the *B. subtilis* lactate dehydrogenase because participates in the NADPH/NADP⁺ redox equilibrium by means NADPH cofactor oxidation. Based on these results the soluble transhydrogenase of *E. coli* was introduced in the *B. subtilis* metabolism, this new *B. subtilis* recombinant strain produced ethanol as main fermentation product from glucose with the highest yields and productivities of ethanol reported in batch culture for this kind of bacteria. On the other hand, *B. subtilis* could ferment cellobiose producing L-lactate with high optical purity state, besides a *B. subtilis* recombinant $\Delta alsS$ strain fermented 100g/L of glucose producing larger L-lactate titer than 100g/L of L-lactate in rich medium, because *B. subtilis* can direct carbon from culture medium to L-lactate.

B. subtilis recombinant strains were obtained to use xylose as unique carbon source under aerobic and anaerobic conditions. Under aerobic conditions, *B. subtilis* could grow using a mixture of xylose and glucose; under fermentative conditions *B. subtilis* produced L-lactate from xylose, and let to notice that *B. subtilis* undergoes by a glucose transporter deficiency under these conditions.

INTRODUCCIÓN

Durante el siglo XX, gran parte de la economía mundial se cimentó en el comercio del petróleo. Sin embargo, el petróleo es un recurso natural no renovable y se prevé su agotamiento en un futuro cercano. En el caso del petróleo mexicano, sus yacimientos se encuentran cada vez más profundos por lo que su extracción es cada vez más costosa, además de que el petróleo extraído posee menor calidad. Lo anterior muestra la necesidad de una transición planeada de nuestra actual dependencia del petróleo hacia una sociedad energéticamente renovable y más amable con el medio ambiente (34).

Desarrollo sostenible

Por desarrollo sostenible se entiende un proceso de cambio en el cual la explotación de fuentes, la dirección de inversiones, la orientación del desarrollo tecnológico y el cambio institucional están todos en armonía y resaltan el potencial presente y futuro para satisfacer las necesidades y aspiraciones humanas. Esto es, satisfacer las necesidades del presente sin comprometer la habilidad de futuras generaciones para satisfacer sus propias necesidades. La sustentabilidad demanda productos que no sólo funcionan bien comparados con sus contrapartes convencionales; además, son más durables, menos tóxicos, fácilmente reciclables y biodegradables al final de su vida útil. Tales productos deberían ser derivados tanto como sea posible de fuentes renovables y contribuir mínimamente a la generación de gases invernadero (11).

La biotecnología apoya al desarrollo sostenible

La biotecnología es considerada como una tecnología clave para una industria química sostenible pues a través de su aplicación es posible obtener energía renovable. La biotecnología ofrece beneficios ambientales y económicos, entre los que se encuentran: una reducción potencial de

contaminantes provenientes de procesos y productos industriales, habilidad para destruir de forma segura a los contaminantes acumulados por medio de remediación del ambiente, producción económicamente mejorada, y obtención sostenible de productos existentes y novedosos (11). Así la biotecnología se ha subdivido en: biotecnología roja aplicada a procesos médicos; p.ej. en el diseño de microorganismos que produzcan antibióticos; la biotecnología verde aplicada a la agroindustria, p.ej. en el diseño de plantas transgénicas que crezcan bajo condiciones ambientales astringentes; y la biotecnología blanca aplicada a procesos industriales, p.ej. en el diseño de microorganismos que produzcan compuestos químicos importantes para el hombre como el alcohol carburante (45).

Química verde

La industria química provee una vasta variedad de productos útiles para el hombre. Inconvenientemente, la mayoría de sus procesos de producción dependen de fuentes fósiles, en muchos de ellos se producen compuestos secundarios tóxicos, desechos y productos que no son realmente reciclables o degradables después de su vida útil y, en consecuencia son dañinos para el ambiente (14).

La química verde nace a partir de una industria química que intenta proveer de procesos producción más amigables con el ambiente, En la química verde, al estimar los beneficios ambientales y económicos proporcionados por el proceso, se considera el ciclo de vida completo de un producto: producción de la materia prima, manufactura, uso del producto y destino; así como, el uso de energía primaria, uso de la materia prima, emisiones en toda la cadena de producción, toxicidad, riesgo y uso de la tierra (11).

Un ejemplo de este tipo de procesos lo constituye la producción de plásticos biodegradables, para lo cual se desarrollan procesos a base de microorganismos, que evitan o minimizan el uso de sustancias peligrosas lo que contribuye a un cambio paulatino en el que la dependencia del petróleo se dirija hacia un proceso industrial sostenible y amable con el ambiente. El

polilactato (PLA), poli-3-hidroxi-butirato (PHB), bio-polietileno y plásticos a base de almidón, son ejemplos de plásticos biodegradables, cuyas aplicaciones van desde bolsas para basura, pañales, productos de uso médico como catéteres, hasta alfombras y tapicería.

Biocombustibles

Actualmente, en el contexto de desarrollo sostenible, se plantea una perspectiva global en cuanto a los retos energéticos y su relación con la estabilidad climática global, en la que la generación de energía residirá en un enfoque multifacético que incluye el uso de energía nuclear, solar, geotérmica, hidráulica, maremotriz, eólica, proveniente de biomasa o bioenergía y, contempla el uso de combustibles fósiles siempre y cuando el carbono sea secuestrado (43).

El bioetanol, biogas, biodiesel y biohidrógeno son ejemplos de biocombustibles cuyo uso comercial ha surgido en menor o mayor grado (43). También se requerirá diversificar a la biomasa utilizada para la producción de bioenergía y biomateriales. Países cercanos al trópico podrán obtener energía a partir de caña de azúcar, material que contiene un alto grado energético, para otros el almidón de maíz o de papa serán la materia prima para obtener energía; para países en condiciones económicas y de agricultura no muy favorables los residuos agroindustriales serán la solución.

ANTECEDENTES

Desde hace más de tres décadas se ha demostrado la factibilidad tecnológica y práctica de emplear etanol, producido a partir de azúcar de caña o de almidón de maíz, como combustible para automóviles. Aunque México no podría utilizar estos sustratos para dicho propósito ya no es siquiera autosuficiente para abastecer la demanda alimentaria de estos insumos, sí podría utilizar los residuos de la industria azucarera y, potencialmente, cualquier residuo agroindustrial, para obtener productos con un mayor valor agregado como el etanol carburante o el lactato (34).

En la actualidad millones de autos circulan usando etanol o mezclas de gasolina-etanol principalmente en Estados Unidos y Brasil. Éste último es uno de los más grandes productores de etanol carburante a partir de caña de azúcar y lo hace a bajo costo. En 1973, el programa brasileño de alcohol (Proalcool) estimuló la creación de una industria de bioetanol. Desde la creación de Proalcool, Brasil ha ahorrado US\$27 billones en importaciones de petróleo. Además, la industria productora de etanol a partir de caña de azúcar genera 152 veces más trabajos en comparación con la producción de la misma cantidad de gasolina a partir de petróleo (42).

Los residuos agroindustriales constituyen una fuente renovable de energía, se obtienen en cantidades enormes y son una materia prima barata, aunque de composición química más compleja. Entre éstos se encuentran el bagazo de caña de azúcar (BCA), la cascarilla del arroz, el rastrojo u olote de maíz, los pastos, los desechos de madererías (viruta y aserrín), maderas suaves y duras, papel de desecho de oficinas, etc. En promedio, el bagazo de caña de azúcar mexicano contiene 42% de celulosa y 28% de hemicelulosa (Fig. 1). Asumiendo eficiencias de conversión de 0.95 para la transformación de hemicelulosa y celulosa en azúcares fermentables (rendimiento de conversión de $0.51 \text{ g}_{\text{ETANOL}}/\text{g}_{\text{AZÚCAR}}$ y una densidad del etanol de 0.789 kg/L), se podrían obtener 7.05 millones de litros de etanol por día o el equivalente al

7% en volumen de la gasolina consumida por día en nuestro país. La conversión del bagazo de caña nacional en etanol alcanzaría para oxigenar (sustituir el oxigenante que actualmente usa PEMEX) el 100% del consumo de gasolina nacional a un 3%, y habría aún excedentes de 4 millones de litros de etanol por día, los cuales podrían ser usados como combustible (34).

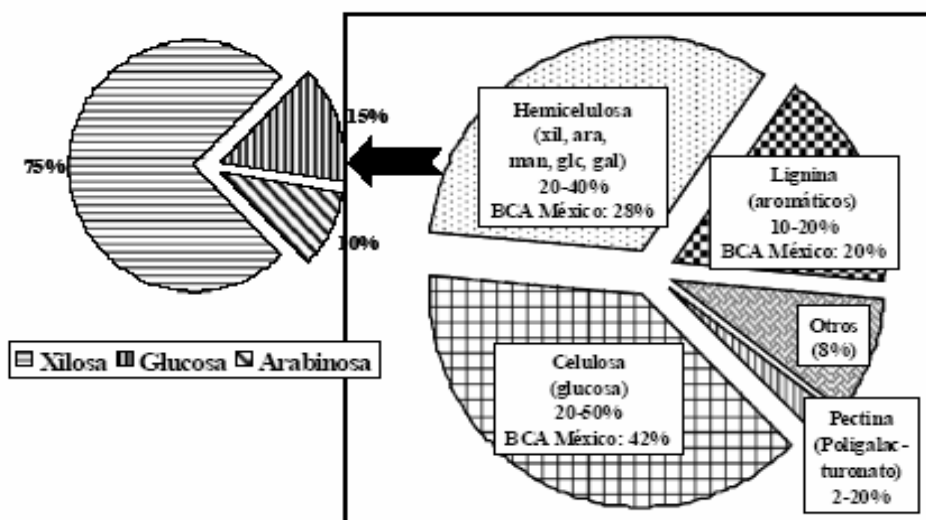


Figura 1. Composición genérica de los residuos agroindustriales (biomasa o lignocelulosa) y de la fracción hemicelulósica del bagazo de caña de azúcar (BCA).

Sacarificación de los residuos agroindustriales (hidrólisis ácida-enzimática)

Para que los residuos agroindustriales puedan ser transformados en etanol o algún otro compuesto con valor agregado usando microorganismos, éstos deben ser transformados en azúcares simples. Los residuos agroindustriales son cortados en partículas de tamaño relativamente pequeño, después se someten a hidrólisis usando ácido diluído, con lo que se generan dos fracciones. Una fracción sólida, mayoritariamente compuesta de celulosa y lignina, y una fracción líquida, que contiene un jarabe rico en xilosa, producto de la despolimerización del xilano presente en la hemicelulosa. Posteriormente, la fracción sólida es sometida a la acción de celulasas que hidrolizan a la celulosa en glucosa. Tras la hidrólisis ácida-enzimática de

residuos agroindustriales se obtienen jarabes ricos en glucosa y xilosa. En este proceso, el aspecto limitante es el económico y se debe fundamentalmente al elevado costo de las celulasas que se emplean para realizar la sacarificación (18, 20)

Limitaciones de los microorganismos silvestres

En la naturaleza existen microorganismos silvestres que pueden llevar a cabo una fermentación alcohólica o láctica a partir de glucosa, sacarosa y fructosa pero no a partir de celobiosa o pentosas, como la xilosa o la arabinosa. Existen otros microorganismos silvestres que pueden utilizar una amplia variedad de carbohidratos (hexosas y pentosas), pero que llevan a cabo fermentaciones ácido-mixtas (producen varios ácidos orgánicos y etanol).

En este sentido, la ingeniería de vías metabólicas nos permite la modificación o introducción de nuevas reacciones bioquímicas en el metabolismo de microorganismos, mediante la tecnología del ADN recombinante; así como, mejorar sus propiedades celulares para obtener productos importantes para el hombre (38); por ejemplo, para obtener etanol carburante o lactato a partir de materia prima de composición compleja.

PRODUCCIÓN DE ETANOL

A la fecha no se han obtenido microorganismos que puedan utilizar todos los substratos presentes en hidrolizados de lignocelulosa y formar los productos requeridos que serían principalmente homo-fermentaciones, para un bioproceso consolidado. En un sentido idealizado, se requeriría un microorganismo que hidrolice la celulosa y hemicelulosa, que consuma los productos de esa hidrólisis como son la glucosa y la xilosa, y que produzca etanol y lactato como productos únicos.

Saccharomyces cerevisiae ha sido el microorganismo preferido para producir etanol a partir de glucosa, fructosa o sacarosa, pues lo hace a velocidades elevadas y con rendimientos altos; sin embargo, su limitación es que no

puede fermentar pentosas. Se han construido cepas derivadas de *S. cerevisiae* expresando la xilosa isomerasa del hongo *Piromyces sp.* E2 y todas las enzimas involucradas en la conversión de xilulosa a intermediarios glucolíticos. Las enzimas sobreexpresadas han sido: xilulokinasa, ribulosa-5-P isomerasa, ribulosa-5-P epimerasa, transcetolasa y transaldolasa, además se eliminó a la aldosa reductasa para minimizar la producción de xilitol. La cepa recombinante pudo crecer utilizando xilosa con una velocidad de 0.09 h^{-1} , y la velocidad específica de consumo de xilosa en cultivos anaeróbicos fue $1.1 \text{ g xilosa (g biomasa * h)}^{-1}$ (26). Posteriormente, esta cepa se sometió a presión selectiva mediante evolución adaptativa, para mejorar su velocidad de consumo de xilosa y producción de etanol en medios de cultivo que contenían mezclas de glucosa y xilosa. La cepa obtenida pudo crecer utilizando xilosa, como única fuente de carbono, con una velocidad específica de consumo de xilosa en cultivos anaeróbicos de $0.9 \text{ g xilosa (g biomasa * h)}^{-1}$ (27).

Becker y cols. (2003) desarrollaron una cepa recombinante derivada de *S. cerevisiae* que pudo crecer en arabinosa. Lo consiguieron expresando toda la vía para la utilización de arabinosa. Esta vía heteróloga incluyó los genes *araA* de *B. subtilis*, *araB* y *araD* de *E. coli* que codifican para las enzimas L-arabinosa isomerasa, L-ribulokinasa y L-ribulosa-5-P-4-epimerasa, respectivamente; junto con una arabinosa permeasa de otra levadura. La levadura capaz de utilizar arabinosa se seleccionó a través de transferencias secuenciales en medios con arabinosa. La cepa aislada creció con un tiempo de duplicación de 7.9 h utilizando arabinosa como única fuente de carbono, la velocidad de producción de etanol fue de $0.08 \text{ g de etanol (g biomasa * h)}^{-1}$ bajo condiciones limitantes de oxígeno (3).

Escherichia coli es una bacteria que puede consumir una amplia variedad de azúcares incluyendo glucosa, xilosa, arabinosa y manosa, entre otros, produciendo D-láctico, acético, fórmico, CO_2 , succínico y pequeñas cantidades de etanol y fumárico (Fig. 2). Usando Ingeniería de Vías

Metabólicas (IVM), se clonó e integró en el genoma de *E. coli* la vía que produce etanol a partir de piruvato proveniente de *Zymomonas mobilis* (una bacteria Gram-negativa y etanológica aislada del pulque). La vía etanológica comprendió los genes que codifican para las enzimas piruvato decarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADHB) (39). También se eliminó la vía metabólica que permite la producción de succínico obteniéndose una *E. coli* etanológica denominada KO11 (18, 19) (Fig. 2). Posteriormente se construyó la cepa LY168 en la que se eliminó la producción de los ácidos fórmico, láctico y acético. Estas cepas producen mayoritariamente etanol a partir de glucosa, xilosa o mezclas de estos azúcares, con rendimientos mayores al 95% (32). Adicionalmente se produjeron cepas derivadas de la cepa KO11 carentes del sistema de transporte de glucosa (sistema de transporte de la fosfotransferasa, PTS). Estas mutantes retuvieron la habilidad para fermentar xilosa y otros azúcares, algunas cepas carentes del sistema PTS regeneraron la habilidad para fermentar glucosa, y produjeron etanol más rápido que la progenitora. Dos de estas mutantes (SL28 y SL40) produjeron casi 60 g/L de etanol (1200 mM) a partir de 120 g/L de xilosa después de 48 h (29). Con estas cepas recombinantes de *E. coli* se logró una conversión de etanol a partir de xilosa o glucosa del 90% respecto al teórico, a una velocidad de producción de 1 g de etanol por litro de medio de cultivo por hora. Como se viene practicando desde hace dos décadas, dichos microorganismos y estrategias están patentados, y su uso con fines comerciales o de producción están protegidos (US Patent 5821093) (21). Sin embargo, esta *E. coli* etanológica no elimina la necesidad de la hidrólisis ácida-enzimática para la utilización de residuos agroindustriales.

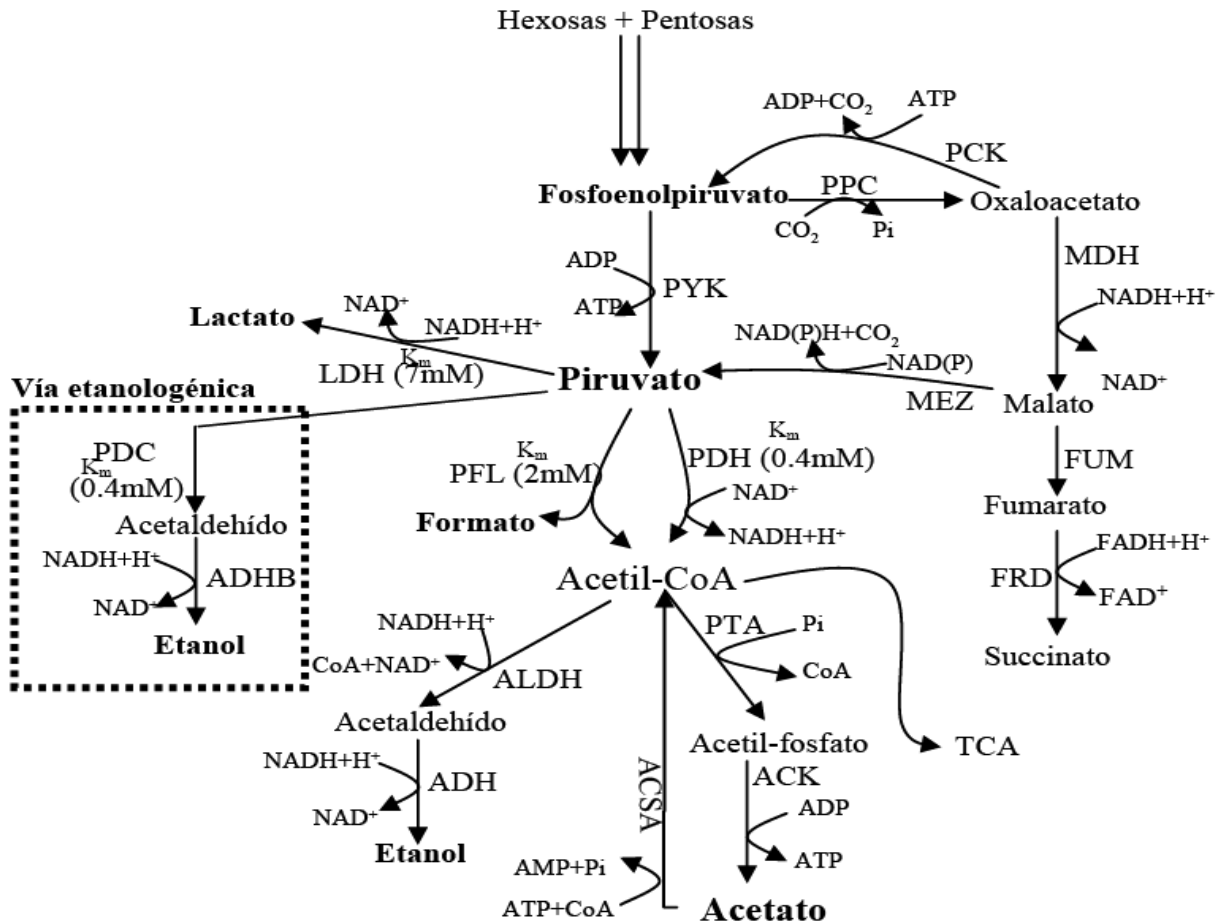


Figura 2. Metabolismo de *E. coli* y vía heteróloga para la producción de etanol.

Abreviaturas: ACSA: acetil-CoA sintetasa, ACK: acetato cinasa, ADH: alcohol deshidrogenasa, ALDH: aldehído deshidrogenasa, FRD: fumarato reductasa, FUM: fumarasa, LDH: lactato deshidrogenasa, MDH: malato deshidrogenasa, MEZ: enzima málica, PCK: fosfoenolpiruvato carboxilasa, PDH: piruvato deshidrogenasa, PFL: piruvato formato liasa, PPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa, PTA: fosfotransacetilasa, PYK: piruvato cinasa. De *Z. mobilis*: PDC, piruvato descarboxilasa, ADHB, alcohol deshidrogenasa, también se indica la Km de las enzimas que compiten por el piruvato, observando que la PDC tiene una especificidad por el sustrato tan alta como la PDH. Adaptado de Ingram *et al.* 1998.

Producción de etanol en bacterias Gram-positivas

Las bacterias Gram-positivas pueden ser usadas para desarrollar un biocatalizador avanzado productor de etanol, tomando ventaja de características inherentes para resistir pH bajos, temperaturas altas, concentraciones elevadas de azúcar, sal y etanol, y otras condiciones que resultan potencialmente ventajosas para mejorar la competitividad comercial en la producción de etanol (8). Varios grupos han tratado de desarrollar una

bacteria Gram-positiva etanologénica, se han construido diferentes operones etanologénicos empleando los genes *pdc* y *adhB* de *Zymomonas mobilis* o el gen *pdc* de *Sarcina ventriculy* (una bacteria Gram-positiva) para expresarse en vectores monocopia o multicopia. Con estas construcciones se han modificado bacterias ácido lácticas y de los géneros *Corinebacterium* y *Bacillus* para producir etanol; sin embargo, el éxito ha sido limitado (1, 12, 22, 30, 37, 51). Se ha reportado producción de etanol a partir de glucosa usando bacterias ácido lácticas en cultivos en matraz, pero los rendimientos no han sido muy buenos pues se produce ácido láctico en cantidades importantes (30). Otros grupos no han podido producir etanol en una fermentación y recurren a hacer ensayos *in vitro* usando células completas de *C. glutamicum* o extractos celulares de *B. megaterium* y, de igual forma, los rendimientos no son muy altos pues se producen otros compuestos secundarios (22, 37, 51).

Bacillus subtilis es una bacteria Gram-positiva, se conoce su genoma completo, es usada en la industria alimenticia por ser considerada un microorganismo GRAS (generally regarded as safe) por la Food & Drug Administration (FDA) de los EUA.

B. subtilis presenta una capacidad notoria para secretar al medio diversas enzimas degradativas (glucanasas, proteasas, amilasas y nucleasas, entre otras) que le permiten asimilar eficientemente los distintos sustratos disponibles en su entorno (50). Esta capacidad se ha utilizado para secretar proteínas heterólogas con alta eficiencia (13), por lo que es posible concebir que, aunado a las enzimas degradativas que comúnmente excreta, podría producir y secretar celulasas y xilanasas. Un organismo con tales características, podría utilizar los desechos agroindustriales como sustratos para llevar a cabo una fermentación alcohólica o láctica, minimizando los tratamientos previos, y constituir un proceso potencialmente consolidado.

Por otro lado, el crecimiento en condiciones anaeróbicas de *B. subtilis* ha sido motivo de estudio por algunos grupos de investigación. Inicialmente, se demostró que *B. subtilis* puede crecer en condiciones anaeróbicas utilizando

como último aceptor de electrones al nitrato (5, 6, 35). Espinosa de los Monteros *et al.*, (2001) evaluaron el potencial metabólico de *B. subtilis* fermentando glucosa y respirando nitratos. A partir de este trabajo se ha encontrado que *B. subtilis* tiene una capacidad elevada para metabolizar glucosa bajo respiración de nitratos ya que crece de manera similar que en aerobiosis, pero al fermentar glucosa en ausencia de nitratos su crecimiento se reduce (9).

B. subtilis cuenta con 4 vías en las que el piruvato es utilizado como sustrato en la síntesis de otros productos (Fig. 4) (6, 35).

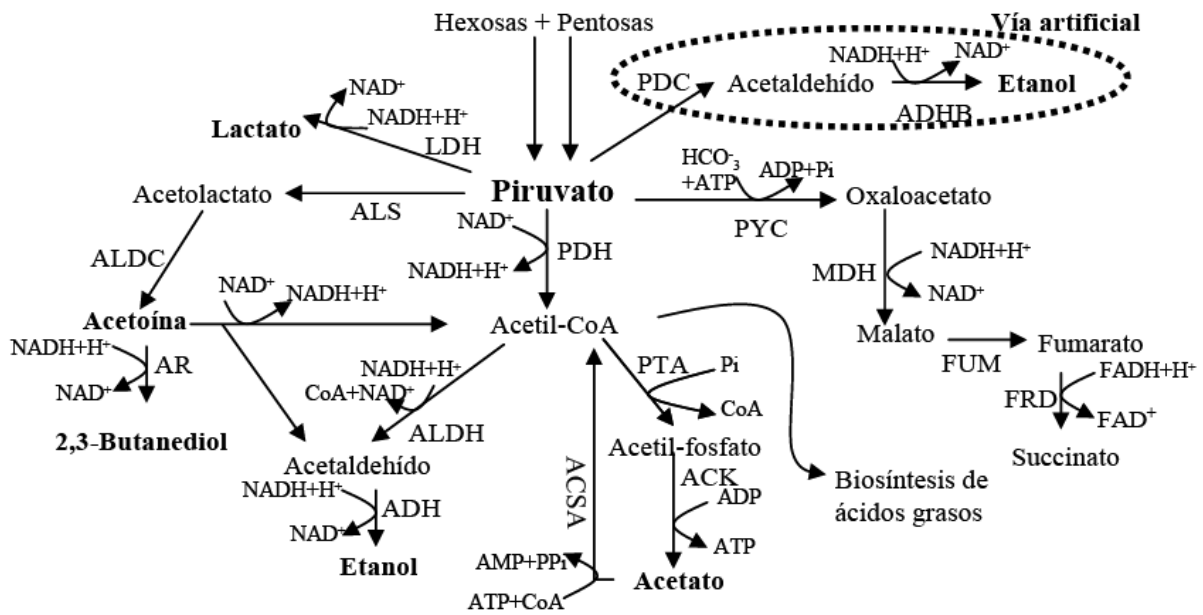


Figura 3. Metabolismo fermentativo de *B. subtilis* y la modificación propuesta para desviar el flujo de carbono hacia la producción de etanol.

ACSA: acetil-CoA sintetasa, ACK: acetato cinasa, ADH: alcohol deshidrogenasa, ALDC: acetolactato descarboxilasa, ALDH: aldehído deshidrogenasa, ALS: acetolactato sintasa, AR: acetoína reductasa, FRD: fumarato reductasa, FUM: fumarasa, LDH: lactato deshidrogenasa, MDH: malato deshidrogenasa, PDH: piruvato deshidrogenasa, PTA: fosfotransacetilasa, PYC: piruvato carboxilasa. De *Z. mobilis*: PDC, piruvato descarboxilasa, ADHB, alcohol deshidrogenasa.

Nakano y Espinosa de los Monteros coinciden en que los productos que se forman respirando nitratos son acetato y acetoína, mientras que los productos formados por fermentación de glucosa o con limitación de nitratos en medios de cultivo conteniendo aminoácidos son preferencialmente lactato

y cantidades pequeñas de butanodiol (9, 35). En este sentido, Hernández-Bustos (2003) llevó a cabo cultivos anaeróbicos con glucosa y celobiosa en medio mineral, observando un metabolismo homoláctico, con rendimientos de conversión de glucosa en láctico cercanos al 80% y con velocidades de formación de lactato elevadas (15).

Asimismo, Hernández-Bustos (2003) observó que si no existe un aceptor final de electrones en medio mineral y aunque se suplemente con glucosa, la velocidad específica de crecimiento en condiciones anaeróbicas es muy baja ($\mu=0.04 \text{ h}^{-1}$) (15). En este sentido, Nakano *et al.* (1997) demostraron que *B. subtilis* mejora su velocidad de crecimiento en anaerobiosis si además de glucosa, se adiciona piruvato, o mezclas de aminoácidos. Este estudio sugiere que *B. subtilis* necesita regenerar el poder óxido-reductor del NADH/NAD⁺, utilizando al piruvato como aceptor final de electrones, para que se active la glucólisis e iniciar el proceso de fermentación. De la misma forma, los aminoácidos pueden estimular la fermentación ya que a partir de algunos de ellos se puede generar piruvato (35).

PRODUCCIÓN DE LACTATO

Se están creando oportunidades para que, por medio de sacarificación y fermentación de los residuos agroindustriales, se obtengan productos con un valor agregado, tales como ácido láctico, fibras naturales, edulcorantes, proteínas recombinantes, enzimas microbianas y muchos otros productos obtenidos por fermentación. El desarrollo de procesos industriales basados en microorganismos pueden apoyar el cambio desde la actual dependencia de fuentes fósiles hacia procesos industriales sostenibles y amigables con el ambiente (14).

En particular, la producción mundial de ácido láctico se estima mayor a 100 mil toneladas métricas por año y, se está incrementando rápidamente debido a su versatilidad química. El ácido láctico es un acidulante, saborizante y conservador usado en la industria alimenticia, farmacéutica y textil. Además, recientemente se ha dado cabida a una nueva industria, en la cual mediante la

polimerización del ácido láctico se produce polilactato (PLA), que es utilizado en la manufactura de plásticos biodegradables. Las aplicaciones del PLA van desde empaques para alimentos hasta pañales. Las propiedades físicas y la velocidad de degradación de plásticos hechos con polilactato puede modificarse variando la mezcla de los enantiómeros L y D-lactato en la síntesis de este polímero, por ésto es importante la obtención del ácido láctico ópticamente puro. La producción del ácido láctico por fermentación tiene varias ventajas comparado con la síntesis química, como el bajo costo de los sustratos, la baja temperatura para la producción y el bajo consumo de energía, además de la alta estereoespecificidad del producto (48).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido los microorganismos que tradicionalmente se emplean para producir ácido láctico utilizando diferentes sustratos como glucosa, sacarosa o almidón. Los mejores rendimientos obtenidos han sido a partir de carbohidratos simples. Sin embargo, las BAL tienen requerimientos nutricionales complejos debido a su limitada capacidad para sintetizar vitamina B y aminoácidos, por lo que los medios utilizados deben complementarse con fuentes ricas en estos compuestos (16).

Se ha construido una cepa de *S. cerevisiae* que contiene seis copias del gen de la L-lactato deshidrogenasa bovina en su genoma. La cepa recombinante pudo fermentar jugo de caña (aprox 200 g/L de glucosa) produciendo 122 g/L de L-lactato con una pureza óptica del 99.9%, pero con rendimientos de conversión bajos debido a la producción de etanol (46). Además, el proceso requiere de condiciones microaeróbicas y medios de cultivo complejos.

También se ha modificado a *E. coli* para que produzca sólo lactato a partir glucosa o sacarosa. *E. coli* posee una D-lactato deshidrogenasa por lo que sólo produce D-lactato. Zhou *et al.* (2003) interrumpieron aquellas vías que compiten por la disponibilidad del carbono en el nodo del piruvato, como son las enzimas: alcohol deshidrogenasa, acetatocinasa, fumarato reductasa y piruvato formato liasa. La *E. coli* modificada produce 110 g/L de D-lactato con rendimientos mayores al 95% del máximo teórico, usando para esto

medios minerales, sin la necesidad de agregar aminoácidos o vitaminas al cultivo (32, 57). También se han construido cepas derivadas de *E. coli* para producir L-lactato, en este caso se integró en su cromosoma el gen que codifica para una L-lactato deshidrogenasa de *Pediococcus*. En estas variantes, aparte de interrumpir las vías arriba mencionadas, también se interrumpió la D-lactato deshidrogenasa homóloga, de tal forma que la cepa modificada produce L-lactato ópticamente puro, con rendimientos de conversión de glucosa en lactato mayores al 90% (58).

B. subtilis puede producir L-lactato en condiciones de fermentación o respirando nitratos, pues cuenta con una L-lactato deshidrogenasa (LDH) que permite dirigir el piruvato hacia L-lactato (9, 35). La LDH de *B. subtilis* posee una de las más altas actividades enzimáticas entre las bacterias Gram-positivas (10), lo que puede favorecer una alta productividad de L-lactato. Otra ventaja es que *B. subtilis* podría utilizar sustratos más complejos como celobiosa, almidón y podría hidrolizar parcialmente residuos agroindustriales para producir L-lactato.

UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR *Bacillus subtilis*

B. subtilis puede utilizar alrededor de 18 diferentes mono y disacáridos como fuente de carbono, tales como glucosa, manosa, fructosa, ribosa y arabinosa entre otros. Estos azúcares son introducidos a la célula, fosforilados y después catabolizados en la glucólisis o en la vía de las pentosas. De forma interesante no es capaz de crecer utilizando xilosa y galactosa como únicas fuentes de carbono, atribuyéndose este hecho únicamente a la carencia de los transportadores, ya que puede sintetizar todas las proteínas necesarias para metabolizar ambos azúcares; de forma interesante la expresión de las proteínas que metabolizan a la xilosa es inducida por la presencia de ésta. En *Bacillus megaterium* se identificó en el operón *XYL* al gen *xyIT* que codifica para un transportador protón-xilosa, pero que *B. subtilis* no tiene.

Krispin y cols. (1998) investigando el efecto tóxico de la galactosa en cepas de *B. subtilis* (*galE*⁻), obtuvieron mutantes espontáneas capaces de crecer en galactosa como única fuente de carbono. La caracterización de esas mutantes reveló que el transportador para arabinosa (*araE*) funcionaba como transportador de al menos tres azúcares: arabinosa, xilosa y galactosa, además encontraron que el transporte de galactosa sufre represión catabólica por glucosa (25). También se han obtenido mutantes de *B. subtilis* que pueden utilizar xilosa sin sufrir la represión catabólica a través de dos estrategias. Krispin y cols. (1998) interrumpieron la secuencia del gen que codifica para el represor del transportador (*araR*) y, otros autores expresaron de forma constitutiva el gen *araE* que codifica para un transportador no específico H⁺:pentosa que mete arabinosa, xilosa y galactosa (24).

JUSTIFICACIÓN

La utilización de los azúcares presentes en la hemicelulosa y su conversión en productos de fermentación permitiría el aprovechamiento de recursos naturales que se encuentran en grandes volúmenes, que son materias primas baratas y fuentes ricas en carbohidratos, pero que por su composición es difícil su utilización.

El desarrollo de cepas de *Bacillus subtilis* que utilicen xilosa como única fuente de carbono, sin sufrir represión catabólica, para la obtención de productos con mayor valor agregado, tales como etanol o L-lactato, podrán formar parte de la transición de tecnologías dependientes del petróleo hacia tecnologías sostenibles y más amigables con el medio ambiente. De esta forma, el desarrollo de cepas derivadas de *B. subtilis* con tales características permitiría la utilización global de residuos agroindustriales, al integrarse con el proceso de degradación de celulosa, obteniendo productos con valor agregado.

HIPÓTESIS

Si se lleva a cabo la expresión heteróloga de los genes *pdc* y *adhB* (que codifican para las enzimas piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa) de *Z. mobilis* para dirigir el flujo de carbono desde piruvato hasta etanol y si además se eliminan las vías homólogas de los productos mayoritarios fermentativos de *B. subtilis*, tales como L-lactato y 2,3-butanodiol, entonces se obtendrá una cepa derivada de *B. subtilis* que produzca principalmente etanol. Por otro lado, si se conserva la vía homóloga productora de L-lactato en *B. subtilis*, y se eliminan las vías que compiten por el carbono en el nodo de piruvato entonces se obtendrá una cepa derivada de *B. subtilis* que produzca principalmente L-lactato. Además, si se integra un transportador de xilosa en el metabolismo de *B. subtilis* permitirá su utilización tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

OBJETIVO GENERAL

- ⊕ Obtener cepas derivadas de *B. subtilis* que puedan utilizar glucosa o xilosa y produzcan mayoritariamente etanol o L-lactato.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ⊕ Construir el vector suicida pUC-*ldh*::operonCm para que integre los genes que codifiquen para las enzimas piruvato decarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADHB) de *Z. mobilis* interrumpiendo el gen que codifica para la lactato deshidrogenasa (LDH) de *B. subtilis*, de tal forma que *pdh* y *adhB* puedan expresarse bajo la regulación del promotor de la lactato deshidrogenasa (*Pldh*).
- ⊕ Integrar el vector pUC-*ldh*::operonCm en el genoma de la cepa *B. subtilis* CH1, la cual es protótrofa y no produce sus 7 proteasas mayoritarias. A la cepa recombinante se le denominará BS35 (CH1 *ldh*::*pdh-adh*).
- ⊕ Caracterizar el crecimiento y la formación de productos de la cepa BS35 a nivel fermentador utilizando glucosa como sustrato.
- ⊕ Construir el vector suicida pTOPO-*alsS*::*Spt* para *B. subtilis* que integre el cassette de resistencia a espectomicina (*Spt*), interrumpiendo el gen que codifica para la enzima acetolactato sintasa (ALSS) y, por tanto, eliminando la síntesis de 2,3-butanodiol.
- ⊕ Integrar el vector pTOPO-*alsS*::*Spt* en el genoma de las cepas de *B. subtilis* BS35 y *B. subtilis* CH1. A las cepas recombinantes se le denominará BS36 (BS35 *alsS*::*Spt*) y CH1 Δ *alsS* (CH1 *alsS*::*Spt*), respectivamente.
- ⊕ Caracterizar el crecimiento y la formación de productos a nivel fermentador de las cepas BS36 para producir etanol y, *B. subtilis* CH1 Δ *alsS* para producir lactato.

- ⊕ Obtener cepas derivadas de *B. subtilis* que puedan utilizar xilosa como única fuente de carbono llevando a cabo dos estrategias:
 - Obtener mutantes de *B. subtilis* que puedan utilizar xilosa tras resiembras sucesivas en medio mineral que contenga xilosa como única fuente de carbono.
 - Obtener recombinantes de *B. subtilis* que expresen un transportador para xilosa, que les permita crecer utilizando xilosa como única fuente de carbono.
- ⊕ Caracterizar el crecimiento y formación de productos a nivel fermentador de las cepas derivadas de *B. subtilis* que puedan utilizar xilosa como única fuente de carbono en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la Tabla 1 se presentan las cepas bacterianas, en la Tabla 2 se presentan los vectores, y en la Tabla 3 los oligonucleótidos, utilizados o construidos en este trabajo.

TABLA 1. Cepas bacterianas utilizadas u obtenidas en este trabajo.

Cepas	Genotipo y/o fenotipo	Fuente
<i>E. coli</i> XLI-blue	<i>supE44</i> , <i>hscR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> (Nal ^R), <i>thi</i> , <i>relA1</i> , lac F'(traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15, Tn10 (Tet ^R)). Cepa transformable a altas eficiencias y deficiente en recombinación. Modifica pero no restringe el DNA transformado, por lo que se utiliza para propagar a gran escala plásmidos, fagos filamentosos y fagémidos. El F' de esta cepa permite la selección de colonias blancas/azules en XGal y permite la super-infección con el bacteriófago M13.	Cepario del Laboratorio
<i>E. coli</i> JM101	<i>supE</i> , <i>thi</i> , Δ (lac-proAB), F'	Cepario del Laboratorio
<i>B. subtilis</i> WB700	TrpC2, Δ <i>nprE</i> , Δ <i>aprE</i> , Δ <i>epr</i> , Δ <i>bpf</i> , Δ <i>mpr::ble</i> , Δ <i>nprB::bsr</i> , Δ <i>vrpE::ery</i>	(56)
<i>B. subtilis</i> CH1	WB700 protótrofa, Cm ^R , Lin ^R , Eri ^R	(15)
<i>B. subtilis</i> CH1 <i>alsS</i> -	CH1, <i>als::Spt</i>	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BS35	CH1, <i>ldh::pdc-adhB</i> , <i>Cmf</i>	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BS36 (<i>BS35 alsS</i> -)	CH1, <i>ldh::pdc-adhB</i> , <i>Cmf</i> , <i>als::Spt</i>	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BS37 (<i>BS35 alsS</i> -, <i>udhA</i> +))	CH1, <i>ldh::pdc-adhB</i> , <i>Cmf</i> , <i>als::udhA_Spt</i>	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> CH1 <i>alsS</i> - <i>xi</i> [*]	CH1, <i>als::Spt</i> , obtenida tras resiembras sucesivas en medio mineral-xilosa.	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> 168	Protótrofa obtenida a partir de la cepa <i>B. subtilis</i> 168 trpC2	Cepario del Laboratorio
<i>B. subtilis</i> BSS27	168, <i>ldh::pdc-adhB</i> , <i>Cmf</i>	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BSS27 <i>alsS</i> -	168, <i>ldh::pdc-adhB</i> , <i>Cmf</i> , <i>als::Spt</i>	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BSS27 <i>alsS</i> -, <i>udhA</i> +	168, <i>ldh::pdc-adhB</i> , <i>Cmf</i> , <i>als::udhA_Spt</i>	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> 168/pE18P43	168 protótrofa, que contiene el plásmido vacío pE18P43	(40)

<i>B. subtilis</i> 168/pE18P43 <i>glcP2</i>	168 protótrofa que contiene el gen <i>glcP</i> (glucosa permeasa de <i>B. subtilis</i>) clonado en el plásmido pE18P43	(40)
--	---	------

TABLA 2. Vectores utilizados o construidos en este trabajo.

Vector	Características	Fuente
pUC19	Es un plásmido de alto número de copias en <i>E. coli</i> , tiene origen de replicación derivado de pBR322. El sitio de clonación múltiple está en fase con el gen <i>lacZα</i> . Posee el gen <i>bla</i> (Ap ^R).	BioLabs
pCR-Blunt II-TOPO	Permite la clonación de productos de PCR, con la selección directa de recombinantes vía interrupción del gen letal <i>ccdB</i> . Posee el gen <i>kan</i> (Km ^R).	Invitrogen
pLOI276	Derivado de pUC19 que contiene el gen <i>pdh</i> de <i>Z. mobilis</i> bajo la regulación de <i>PlacZ</i> .	(4)
pLOI284	Derivado de pUC19 que contiene el gen <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i> bajo la regulación de <i>PlacZ</i> .	(4)
IpTOPO- <i>pdh</i>	Derivado de pTOPO que contiene el gen <i>pdh</i> de <i>Z. mobilis</i> .	Este trabajo
pTOPO- <i>adh-term</i>	Derivado de pTOPO que contiene el gen <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i> , seguido del T <i>cryIII</i> A de <i>B. thuringiensis</i> .	Este trabajo
pTOPO- <i>pdh-adh-term</i>	Derivado de pTOPO que contiene los genes <i>pdh</i> y <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i> seguidos de T <i>cryIII</i> A de <i>B. thuringiensis</i> .	Este trabajo
pUC- <i>ldh</i>	Derivado de pUC19 que contiene <i>ldh_{BS}</i>	Este trabajo
pUC- <i>ldh-operon</i>	Derivado de pUC19 que contiene <i>ldh_{BS}::(pdh_{ZM}, adhB_{ZM})</i>	Este trabajo
pSG-PLK	Derivado de pSG35.1 que posee el sitio de clonación múltiple de pUC19 en lugar del P <i>aprE</i>	(23)
pSG-operon	Derivado de pSG-PLK que contiene <i>ldh_{BS}::(pdh_{ZM}, adhB_{ZM}, Cm^r)</i>	Este trabajo
pCm::Spt	pIC177 que contiene Cm ^r ::Spt ^r	(49)
pTOPO- <i>alsS::Spt</i>	Derivado de pTOPO que contiene <i>alsS::Spt^r</i>	Este trabajo
pTOPO- <i>alsS::UdhASpt</i>	Derivado de pTOPO que contiene <i>alsS::(udhA_{FC}, Spt^r)</i>	Este trabajo
pUC- <i>xylE1</i>	Derivado de pUC19 que contiene el transportador de xilosa de <i>E. coli</i> (<i>xylE</i>),	Este trabajo

	en dirección opuesta a <i>lacZ</i>	
pUC- <i>xylA</i>	Derivado de pUC19 que contiene el gen <i>xylA</i> de <i>B. subtilis</i>	Este trabajo
pUC- <i>xylB</i>	Derivado de pUC19 que contiene el gen <i>xylB</i> de <i>B. subtilis</i>	Este trabajo
pUC- <i>xylAB</i>	Derivado de pUC19 que contiene los genes <i>xylA</i> y <i>xylB</i> de <i>B. subtilis</i>	Este trabajo
pUC- <i>xylABE</i>	Derivado de pUC19 que contiene los genes <i>xylA</i> , <i>xylB</i> , <i>xylE</i> de <i>B. subtilis</i>	Este trabajo
pE18-P43	Derivado del plásmido pE194-cop6 con el sitio de clonación múltiple de pUC18; posee un promotor constitutivo P43, cuya expresión es principalmente en la fase estacionaria; presenta resistencia a eritromicina y lincomicina.	(55)
pE18-P43 <i>glcP2</i>	Derivado de pE18P43 que contiene el gen <i>glcP</i> bajo la regulación de P43.	Cepario del Laboratorio (construido por Natividad Cabrera)

TABLA 3. Oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia*
SD_PDC Primer 1	5-GTC GGC CGG CCA AGG AGG AGT AAG CAA TGA GTT ATA CTG TCG G
pd3'-AscI Primer 2	5-CTT GGC GCG CCT TAC GGC TGT TGG CGG GCA GC
AscI_adhB Primer 3	5-TAA GGC GCG CCA AGG AGG GTA TAG CTA TGG CTT CTT CAA CTT TTT ATA TTC
adh-termA Primer 4	5-TCC GGT CAA TTG GAG TGA TGT CCG TTT TCC TGT TTT GAA ATT AG
Terminador Primer 5	5-AAA AGA ATT CAA AAA AAA ACG GAC ATC ACT CCG GTC AAT TGG AGT G
ldh_SD Primer 6	5-CCG CGG ATC CAA GGA GGG ATG ATT AAT GAT GAA CAA ACA TGT A
ldh_TAA Primer 7	5-GCC CGA ATT CAC TCT AAA GTT GCG GTT AGT TGA C
alsS Primer 8	5-GTG TCA CAC ATG TAA TTG GCA TTC C
alsInicio Primer 9	5-GGC TGA GCA CTT AAA TGT TGC TTT C
SD_UDHA Primer 10	5-GCC GGT CGA CAA GGA GGA CCC TAC CAT GCC ACA TTC C
UDHA_TAA Primer 11	5-GCC GGT CGA CTT AAA ACA GGC GGT TTA AAC CG

*Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del IBt-UNAM.

PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Condiciones de Crecimiento. *E. coli* se creció en medio Luria-Bertani (por litro: 10 g bactotripton; 5 g extracto de levadura; 5 g NaCl) líquido o solidificado con agar al 1.5%. *E. coli*/pTOPO se seleccionó en LB Km 50 mg/l, las derivadas de pUC19 en Ap 200 mg/mL y las derivadas de pSG en Ap 100 mg/mL. Para observar producción de etanol se suplementó el medio LB con 20 g/l glucosa. Todos los cultivos se crecieron a 37°C y 300 rpm, a menos que se especifiquen otras condiciones de incubación. *B. subtilis* se creció en medio LB líquido o solidificado con agar al 1.5%, seleccionando a las cepas transformadas en LB sólido con cloramfenicol (5 mg/l). Todos los cultivos se crecieron a 37°C y 300 rpm, a menos que se especifiquen otras condiciones de incubación.

Procedimientos genéticos y técnicas de DNA recombinante. Todas las enzimas de restricción, T4 DNA polimerasa y marcadores de peso de fragmentos de DNA fueron obtenidos de New England BioLabs o MBI Fermentas, y se utilizaron de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. Los demás reactivos necesarios para el trabajo de microbiología y biología molecular se obtuvieron de Sigma-Aldrich Química, Research Organics Inc, Merck-México y Difco Laboratories. Por lo general, las manipulaciones de DNA que no se describen en este apartado, se llevaron a cabo por técnicas estándares, tal y como se describe en (31).

Reacciones de ligación. Para llevar a cabo las reacciones de ligación se utilizó T4 DNA ligasa procedente de New England BioLabs o MBI Fermentas, y se utilizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Por lo general, se llevaron a cabo ligaciones 1:1 y 1:5 (Vector:Inserto) siendo la relación 1:5 la que proporcionó el mayor número de clonas recombinantes adecuadas.

Transformación con DNA. El microorganismo huésped utilizado para la construcción de los diferentes vectores fue *E. coli* XL1-blue. Las células

electrocompetentes de *E. coli* XL1-blue se prepararon usando el medio YenB (medio de crecimiento libre de sales). Asimismo, *E. coli* se transformó usando el método de electro-transformación descrito por (47). *B. subtilis* se transformó en estado de competencia natural utilizando el método descrito por Cutting y Vander-Horn (1990).

Purificación de DNA. Para el análisis de clonas recombinantes, el DNA de plásmido se extrajo por el método de lisis-alcalina descrito por Rodríguez (44). Para los experimentos de clonación, los fragmentos de DNA procedentes de reacciones de PCR y de digestiones con enzimas de restricción mayores a 500 pb se analizaron y purificaron por gel de agarosa al 0.8 y 1.2 %. La purificación de DNA a partir de bandas de geles de agarosa se llevó a cabo por el método de destrucción-congelación del fragmento de agarosa con la posterior extracción con fenol y cloroformo, o bien, utilizando el kit Rapid Gel Extraction System de Marligen Bioscience Inc. Las extracciones de DNA cromosomal de *B. subtilis* se hicieron con el kit Microbial Genomic DNA Isolation de MO BIO Laboratories, Inc., a partir de cultivos crecidos durante 24 h a 37°C y 300 rpm.

Reacción en Cadena de la Polimerasa. Las reacciones en cadena de la polimerasa se realizaron utilizando Elongasa (New England BioLabs), Vent polimerasa (New England BioLabs) o Tfu polimerasa (Q-BIOgene). Las mezclas de reacción se prepararon en un volumen final de 50 µL, con los siguientes reactivos: 50 ng de DNA como templado, 35 pM de cada oligonucleótido iniciador, 0.2 mM de mezcla de dNTPs, amortiguador de enzima al 10% y 1-2 unidades de DNA polimerasa. La amplificación de las mezclas se incubaron en los termocicladores Robo Cyclor gradient 96 (Stratagene) o PCR Sprint (ThermoHybaid). El programa de amplificación se diseñó considerando el tamaño del templado a amplificar, la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos y la polimerasa utilizada.

Clonación en TOPO-Blunt. Para clonar varios productos de PCR se utilizó Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit de Invitrogen de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Análisis de Secuencia de DNA. Los elementos clonados en pTOPO se secuenciaron en ambas direcciones por el método de secuenciación de Sanger, utilizando los oligonucleótidos M13 Reverse Primer y M13 Forward (-20) incluidos en el Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Invitrogen. El DNA para ser secuenciado se purificó con el kit Rapid Plasmid Miniprep System (Marligen, Bioscience Inc). Estos análisis fueron llevados a cabo por la Unidad de Secuencia, IBt-UNAM.

CONDICIONES DE LOS CULTIVOS

Cultivos aeróbicos. Los cultivos aeróbicos se realizaron en fermentadores Applikon con un volumen de trabajo de 500 mL, equipados con turbina tipo Rushton de 6 paletas planas. La temperatura fue controlada a 37°C. El pH se mantuvo a 7.0 mediante adiciones automáticas de KOH 1N y 2N. La espuma fue controlada mediante adiciones manuales de Silicón grado alimenticio al 10%. El oxígeno disuelto fue controlado por arriba del 20% (con respecto al valor de saturación en aire) por incrementos automáticos en la velocidad de agitación. La velocidad de agitación fue de 600 rpm con un flujo constante de aire de 1 VVM. Los cultivos fueron monitoreados y controlados mediante el Biocontrolador ADI 1010.

Cultivos anaeróbicos. Los cultivos anaeróbicos se realizaron en sistemas de mini-fermentadores o mini-fleakers (Beall *et al.*, 1991), con un volumen de trabajo de 200 mL. La temperatura fue controlada a 37°C y el pH se mantuvo a 7.0 mediante la adición automática de KOH 2N o 4N. Los cultivos se mantuvieron a una velocidad de agitación de 100 rpm para garantizar el mezclado de los nutrientes (2).

Medios de cultivo. La evaluación de los cultivos se realizó en medio Luria, medio mineral (MM) conteniendo por litro (50): 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5.32 g K_2HPO_4 , 6.4 g KH_2PO_4 , 10 mg ácido cítrico, 0.4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg MnCl_2 , 4 mg CaCl_2 , y 3 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, el pH se ajustó a 7.2 con NaOH, o medio mineral suplementado con extracto de levadura o sólidos de licor de maíz. Todos los medios suplementados con diferentes concentraciones de azúcar (glucosa, xilosa o celobiosa), se indican en la sección de resultados. Todos los cultivos se realizaron por duplicado y en los resultados se presentaron los promedios de los mismos y el error estandar de las mediciones.

Los parámetros evaluados fueron: velocidad específica de crecimiento (μ); rendimiento Biomasa / sustrato ($Y_{x/s}$); velocidad específica de consumo de azúcar (q_s); producto final, así como la velocidad específica de formación de producto (q_p), los cuales se determinaron durante la fase de crecimiento exponencial y fueron corregidos por factor de dilución en función de la base o ácido adicionado a los cultivos para el control de pH.

Determinación de peso seco de *Bacillus subtilis*. El peso seco se determinó en base al método reportado por Martínez (1997) (33). De un cultivo de *B. subtilis* CH1 en medio mineral con glucosa 10 g/l a una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 3.54$, se realizaron diluciones. Se filtraron al vacío utilizando las membranas de teflón y se secaron a 65°C por 24 h. Se pesaron y por diferencia de peso y de acuerdo al volumen de la muestra, se calculó la concentración celular en g/l. Se relacionó por medio de una regresión lineal las lecturas de densidad óptica con el peso seco determinado (Fig. 4).

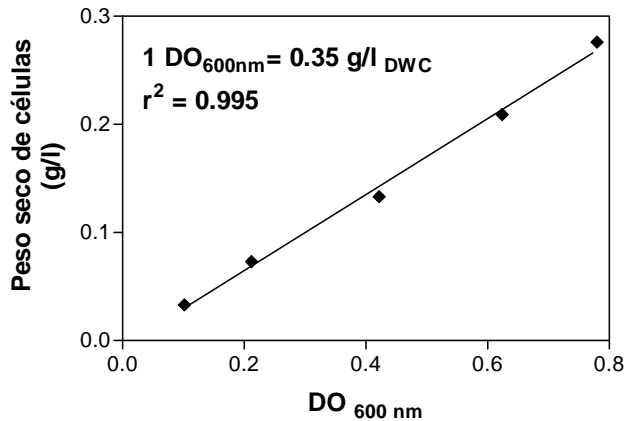


Figura 4. Curva de peso seco de células para *B. subtilis* a 600 nm.

Concentración Celular. La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11 y fue convertida a peso seco de células (DWC) de acuerdo a la curva de calibración realizada: $1 \text{ DO}_{600\text{nm}} = 0.35 \text{ g}_{\text{DWC}} / \text{l}$. El monitoreo de los cultivos se llevó a cabo tomando dos muestras de 1 mL cada una, centrifugándolas a 5,000 rpm durante 5 min. Los sobrenadantes se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

Análisis por HPLC de Sustratos y Productos Metabólicos. La cuantificación en sobrenadantes de glucosa, xilosa, piruvato y productos de fermentación se llevó a cabo por HPLC (Model 996, Waters, Millipore Co., Milford, MA) equipado con detectores de UV e índice de refracción. Las separaciones se llevaron a cabo a 50°C , usando una columna Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm; BioRad) y 5 mM H_2SO_4 como fase móvil, a un flujo de 0.5 mL/min (volumen de inyección, 20 μl). El etanol se midió por cromatografía de gases usando n-butanol como estándar interno (6850 Series GC System, Agilent, Wilmington, DE).

Determinación enzimática de glucosa y L-lactato. La determinación enzimática de glucosa y L-lactato se llevó a cabo en un analizador Bioquímico YSI modelo 2700, utilizando D-glucosa oxidasa inmovilizada o L-lactato oxidasa inmovilizada, respectivamente.

Ensayo de Actividad de Piruvato Descarboxilasa (PDC). La PDC produce acetaldehído y CO₂ a partir de piruvato, su actividad se determinó por medio de la reacción acoplada con la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). La ADH reduce al acetaldehído a etanol y oxida al NADH en NAD⁺, en el ensayo se monitorea la oxidación de NADH pues este compuesto tiene un pico de absorción a 340 nm (17). La actividad enzimática se reportó como unidades internacionales por miligramo de proteína celular total ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{PROT}}$).

Ensayo de Actividad de Alcohol Deshidrogenasa B (ADHB). La ADHB de *Z. mobilis* cataliza la reducción de acetaldehído dependiente de NADH, a etanol. Además, esta ADHB de *Z. mobilis* tiene la particularidad de catalizar de forma reversible esta reacción. La actividad de ADHB se determinó a partir de la reacción inversa en la que se monitorea la reducción de NAD⁺ dependiente de etanol (36). La actividad enzimática se reportó como unidades internacionales por miligramo de proteína celular total ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{PROT}}$).

Ensayo de Actividad de Lactato Deshidrogenasa (LDH). La LDH produce L-lactato y NAD⁺ a partir de piruvato y NADH, su actividad se determinó monitoreando la oxidación de NADH pues este compuesto tiene un pico de absorción a 340 nm (17). La actividad enzimática se reportó como unidades internacionales por miligramo de proteína celular total ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{PROT}}$).

RESULTADOS

PRESENTACIÓN DEL MANUSCRITO 1:

Metabolic Engineering of *Bacillus subtilis* for Ethanol
Production: Lactate Dehydrogenase Plays a Key Role
in Fermentative Metabolism

Appl Environ Microbiol. 2007 Aug;73(16):5190-8

Metabolic Engineering of *Bacillus subtilis* for Ethanol Production: Lactate Dehydrogenase Plays a Key Role in Fermentative Metabolism[∇]

Susana Romero,¹ Enrique Merino,² Francisco Bolívar,¹ Guillermo Gosset,¹ and Alfredo Martínez^{1*}

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis¹ and Departamento de Microbiología Molecular,² Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Received 19 March 2007/Accepted 1 June 2007

Wild-type *Bacillus subtilis* ferments 20 g/liter glucose in 48 h, producing lactate and butanediol, but not ethanol or acetate. To construct an ethanologenic *B. subtilis* strain, homologous recombination was used to disrupt the native lactate dehydrogenase (LDH) gene (*ldh*) by chromosomal insertion of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase gene (*pdh*) and alcohol dehydrogenase II gene (*adhB*) under the control of the *ldh* native promoter. The values of the intracellular PDC and ADHII enzymatic activities of the engineered *B. subtilis* BS35 strain were similar to those found in an ethanologenic *Escherichia coli* strain. BS35 produced ethanol and butanediol; however, the cell growth and glucose consumption rates were reduced by 70 and 65%, respectively, in comparison to those in the progenitor strain. To eliminate butanediol production, the acetolactate synthase gene (*alsS*) was inactivated. In the BS36 strain (BS35 Δ *alsS*), ethanol production was enhanced, with a high yield (89% of the theoretical); however, the cell growth and glucose consumption rates remained low. Interestingly, kinetic characterization of LDH from *B. subtilis* showed that it is able to oxidize NADH and NADPH. The expression of the transhydrogenase encoded by *udhA* from *E. coli* allowed a partial recovery of the cell growth rate and an early onset of ethanol production. Beyond pyruvate-to-lactate conversion and NADH oxidation, an additional key physiological role of LDH for glucose consumption under fermentative conditions is suggested. Long-term cultivation showed that 8.9 g/liter of ethanol can be obtained using strain BS37 (BS35 Δ *alsS* *udhA*⁺). As far as we know, this is the highest ethanol titer and yield reported with a *B. subtilis* strain.

Ethanol production from renewable resources, such as biomass, is a promising alternative to compete with and eventually replace nonrenewable fossil fuels; it has considerable advantages in terms of sustainability, lower greenhouse gas emissions, and cost reduction (25). Currently, fuel ethanol is produced by using *Saccharomyces cerevisiae* that ferments sucrose from sugarcane or glucose from hydrolyzed cornstarch. Nonetheless, large amounts of sugars are available in plant biomass. This biomass is a complex mixture of carbohydrate polymers, mainly cellulose and hemicellulose. Cellulose utilization requires a previous enzymatic breakdown to release glucose; however, the use of cellulases raises the cost of ethanol production (18, 22, 25).

Gram-positive bacteria have several traits, such as the capacity to withstand relatively low pH, high temperature, high sugar, salt and ethanol concentrations, and various other harsh conditions, which could be used to develop an advanced biocatalyst and improve the commercial competitiveness of fuel ethanol production (9, 17). Several groups have tried to develop ethanologenic gram-positive bacteria, but with limited success (2, 15, 19, 21, 27, 32).

Different chimerical *pet* operons have been constructed by employing *pdh* and *adhB* genes from *Zymomonas mobilis*

(gram-negative bacterium) or by using the *pdh* gene from *Sarcina ventriculi* (gram-positive bacterium) for expression in monocopy or multicopy vectors in gram-positive bacteria. In some of these cases, functional pyruvate decarboxylase (PDC) and alcohol dehydrogenase (ADH) enzymes have been detected, although the ethanol yields have been low or nonexistent (19, 21, 27, 32).

Bacillus subtilis has a generally-recognized-as-safe status (29), metabolizes an extensive range of sugars (31), and can efficiently synthesize a wide variety of proteinases and transport them out of the cell using secretion systems. This capacity can potentially be used to export cellulases, which could break down plant wastes, releasing cellobiose and glucose. Hence, ethanologenic *B. subtilis* strains engineered in the future might consume both carbohydrates to produce ethanol. This design could help in reducing fuel ethanol production cost. However, under fermentative conditions, *B. subtilis* produces lactate, acetate, butanediol, and traces of ethanol from glucose, amino acids, and pyruvate (Fig. 1) (7). Lactate is produced by the reduction of pyruvate, a reaction catalyzed by lactate dehydrogenase (LDH), with the simultaneous oxidation of one molecule of NADH per molecule of pyruvate reduced (7). In this study, the heterofermentative metabolism of *B. subtilis* was modified to obtain a gram-positive strain that produces ethanol as the main fermentation product. By inactivating the lactate dehydrogenase gene (*ldh*) via chromosomal integration of the *Z. mobilis* *pdh* and *adhB* genes, also eliminating butanediol synthesis, and by inserting the *E. coli* *udhA* transhydrogenase in the *alsS* locus, the resulting recombinant *B. subtilis* strain produced ethanol as the sole fermentation product.

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3 Cuernavaca, Mor. 62250, México. Phone: (52-777) 3291601. Fax: (52-777) 3172388. E-mail: alfredo@ibt.unam.mx.

[∇] Published ahead of print on 22 June 2007.

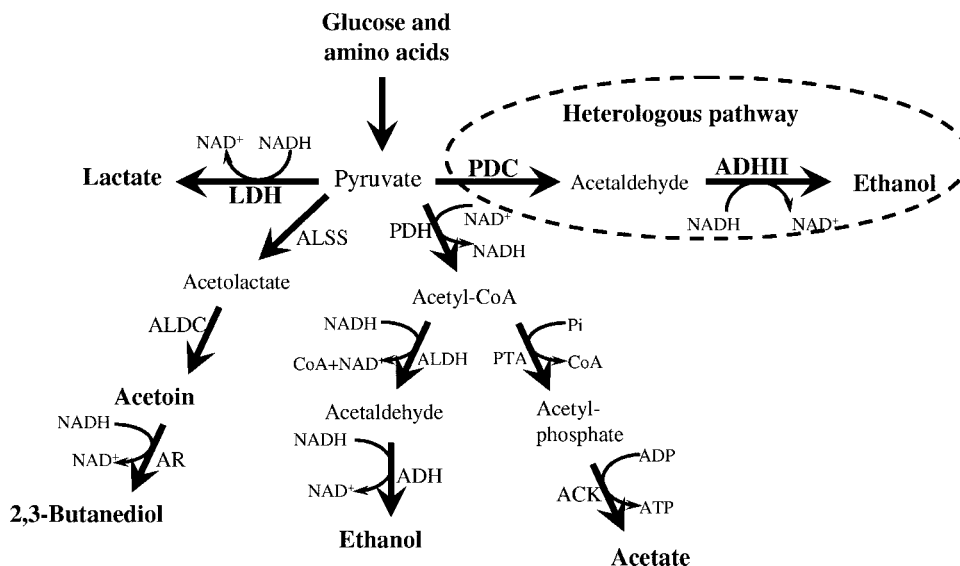


FIG. 1. *Bacillus subtilis* fermentation pathways. The heterologous pathway used in this study is highlighted with a dashed-line ellipse. PDC and ADHII are from *Z. mobilis*. ALDC, acetolactate decarboxylase; AR, acetoin reductase; PDH, pyruvate dehydrogenase; CoA, coenzyme A; ALDH, acetaldehyde dehydrogenase; PTA, phosphotransacetylase; ACK, acetate kinase. (Modified from references 7 and 26 with permission.)

LDH inactivation caused a *B. subtilis* growth defect in spite of complementation with a stoichiometrically equivalent redox pathway (PDC-ADHII). We found that LDH oxidizes NADH to NAD^+ and NADPH to NADP^+ . The apparent K_m value for both cofactors is comparable to K_m values of LDH for NADH of other gram-positive bacteria (14). Hence, an additional key physiological role of LDH for glucose consumption under fermentative conditions is suggested. The results presented in this work clearly indicate that this key physiological role of LDH

for glucose consumption under fermentative conditions should be considered in the development of new ethanologenic *B. subtilis* strains.

MATERIALS AND METHODS

Strains and plasmids. The *B. subtilis* strains and plasmids used in this study are listed in Table 1, and the oligonucleotides in Table 2. To avoid the Trp requirement, competent *B. subtilis* WB700 cells (35) were transformed by using chromosomal DNA from a Trp^+ *B. subtilis* BSR1 strain (20), recombinants were

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s) ^a	Source or reference
Strains		
<i>B. subtilis</i> WB700	<i>B. subtilis</i> 168 <i>trpC2</i> Δ <i>nprE</i> Δ <i>aprE</i> Δ <i>opr</i> Δ <i>bpf</i> Δ <i>mpr</i> <i>ΔnprB</i> <i>ΔvrpE</i> <i>Ery</i> ^r <i>Lin</i> ^r	35
<i>B. subtilis</i> CH1	WB700 prototroph	This study
<i>B. subtilis</i> CH1 Δ <i>alsS</i> mutant	CH1 <i>alsS</i> ::Spt	This study
<i>B. subtilis</i> BS35	CH1 <i>ldh</i> :: <i>pdh-adhB</i> <i>Cm</i> ^r	This study
<i>B. subtilis</i> BS36	CH1 <i>ldh</i> :: <i>pdh-adhB</i> <i>Cm</i> ^r <i>alsS</i> ::Spt	This study
<i>B. subtilis</i> BS37	CH1 <i>ldh</i> :: <i>pdh-adhB</i> <i>Cm</i> ^r <i>alsS</i> :: <i>udhA</i> _Spt	This study
Plasmids		
pUC19	pMB1 <i>ori</i> <i>Ap</i> ^r	BioLabs
pCR-Blunt II-TOPO	pBR322 <i>ori</i> <i>Km</i> ^r <i>ccdB</i> selection	Invitrogen
pLOI276	pUC19 carrying <i>pdh</i> _{Zm}	5
pLOI284	pUC19 carrying <i>adhB</i> _{Zm}	6
IpTOPO- <i>pdh</i>	pCR carrying <i>pdh</i> _{Zm}	This study
pTOPO- <i>adh-term</i>	pCR carrying <i>adhB</i> _{Zm} - <i>cryIIIAt</i>	This study
pTOPO- <i>pdh-adh-term</i>	pCR carrying <i>pdh</i> _{Zm} , <i>adhB</i> _{Zm} , and <i>Cm</i> ^r	This study
pSG-PLK	pBR322 <i>ori</i> <i>Ap</i> ^r	20
pSG- <i>operon</i>	pSG-PLK carrying <i>pdh</i> _{Zm} , <i>adhB</i> _{Zm} , and <i>Cm</i> ^r	This study
pUC- <i>ldh</i>	pUC19 carrying <i>ldh</i> _{Bs}	This study
pUC- <i>ldh</i> :: <i>operonCm</i>	pUC19 carrying <i>ldh</i> _{Bs} ::(<i>pdh</i> _{Zm} <i>adhB</i> _{Zm})	This study
pTOPO- <i>alsS</i>	pCR carrying <i>alsS</i>	This study
pCm::Spt	pIC177 carrying <i>Cm</i> ^r ::Spt ^r	30
pTOPO- <i>alsS</i> ::Spt	pCR carrying <i>alsS</i> ::Spt ^r	This study
pTOPO- <i>alsS</i> :: <i>udhA</i> _Spt	pCR carrying <i>alsS</i> ::(<i>udhA</i> _{Ec} Spt ^r)	This study

^a Zm, *Z. mobilis*; Bs, *B. subtilis*; Ec, *E. coli*.

TABLE 2. Oligonucleotides used in this study

Primer	Target gene	Sequence (5'→3')
1	<i>Z. mobilis pdc</i>	GTC GGC CGG CCA AGG AGG AGT AAG CAA TGA GTT ATA CTG TCG G
2	<i>Z. mobilis pdc</i>	CTT GGC GCG CCT TAC GGC TGT TGG CGG GCA GC
3	<i>Z. mobilis adhB</i>	TAA GGC GCG CCA AGG AGG GTA TAG CTA TGG CTT CTT CAA CTT TTT ATA TTC
4	<i>Z. mobilis adhB</i>	TCC GGT CAA TTG GAG TGA TGT CCG TTT TCC TGT TTT GAA ATT AG
5	<i>B. thuringiensis cryIIIAt</i>	AAA AGA ATT CAA AAA AAA ACG GAC ATC ACT CCG GTC AAT TGG AGT G
6	<i>B. subtilis ldh</i>	CCG CGG ATC CAA GGA GGG ATG ATT AAT GAT GAA CAA ACA TGT A
7	<i>B. subtilis ldh</i>	GCC CGA ATT CAC TCT AAA GTT GCG GTT AGT TGA C
8	<i>B. subtilis alsS</i>	GTG TCA CAC ATG TAA TTG GCA TTC C
9	<i>B. subtilis alsS</i>	GGC TGA GCA CTT AAA TGT TGC TTT C
10	<i>E. coli udhA</i>	GCC GGT CGA CAA GGA GGA CCC TAC CAT GCC ACA TTC C
11	<i>E. coli udhA</i>	GCC GGT CGA CTT AAA ACA GGC GGT TTA AAC CG

selected in mineral medium containing glucose, and the resulting prototrophic strain was designated CH1 (Table 1). *B. subtilis* CH1 was used to construct ethanologenic *B. subtilis* strains. During strain and plasmid construction, strains were grown in Luria-Bertani (LB) agar (23) containing appropriate antibiotics. The final antibiotic concentrations were as follows: 5 µg/ml chloramphenicol (Cm), 5 µg/ml erythromycin (Ery), 5 µg/ml lincomycin (Lin), 100 µg/ml spectinomycin (Spt), 10 µg/ml tetracycline (Tc), 50 µg/ml kanamycin (Km), and 100 µg/ml ampicillin (Ap).

Construction of ethanologenic *B. subtilis* strains. (i) Genetic procedures. Standard procedures were used for plasmid preparation, restriction enzyme digestions, ligations, transformations, and agarose gel electrophoresis (23). *E. coli* XL1-Blue was used as the host for plasmid constructions, and cells were grown in LB medium. *B. subtilis* was transformed by using the natural competence method (8). Chromosomal integrations and deletions were confirmed by using appropriate antibiotic markers and PCR analysis and by the examination of fermentation products.

(ii) Inactivation of *ldh* and chromosomal integration of *Z. mobilis pdc* and *adhB* genes. Specific primers were designed to amplify *Z. mobilis pdc* and *adhB* genes (Table 2). The primer design included the *B. subtilis* Shine-Dalgarno

consensus sequence and also the conserved distance between this motif and the start codon of each gene. The *Z. mobilis pdc* gene was amplified from vector pLOI276, using primers 1 and 2. The 1.7-kb PCR-amplified segment was cloned into pCR-TOPO, obtaining the vector IpTOPO-*pdc*.

The *Z. mobilis adhB* gene, followed by the terminator of the *Bacillus thuringiensis cryIIIAt* gene (*cryIIIAt*), was amplified (34). In the first PCR, using primers 3 and 4, the *adhB* gene was amplified from vector pLOI284, including half of *cryIIIAt*; in the second PCR, using primers 3 and 5, the *adhB* gene, followed by the complete terminator, was amplified; this PCR segment was cloned into pCR-TOPO, generating pTOPO-*adh-term*.

The *pdc* gene was purified as a 1.7-kbp EcoRV-AscI fragment from vector IpTOPO-*pdc*. This fragment was ligated into the blunt-treated BamHI and AscI sites upstream from the *adhB* gene in pTOPO-*adh-term*, obtaining the vector pTOPO-*pdc-adh-term*. The *pdc* and *adhB* genes were purified as a 2.88-kbp EcoRI-NaeI fragment from vector pTOPO-*pdc-adh-term*. This fragment was ligated into the EcoRI-HincII sites of vector pSG-PLK (20), obtaining the vector pSG-operon. This plasmid contained the *pdc* and *adhB* genes followed by the transcription terminator *cryIIIAt* and the chloramphenicol-resistant cassette (*cat*).

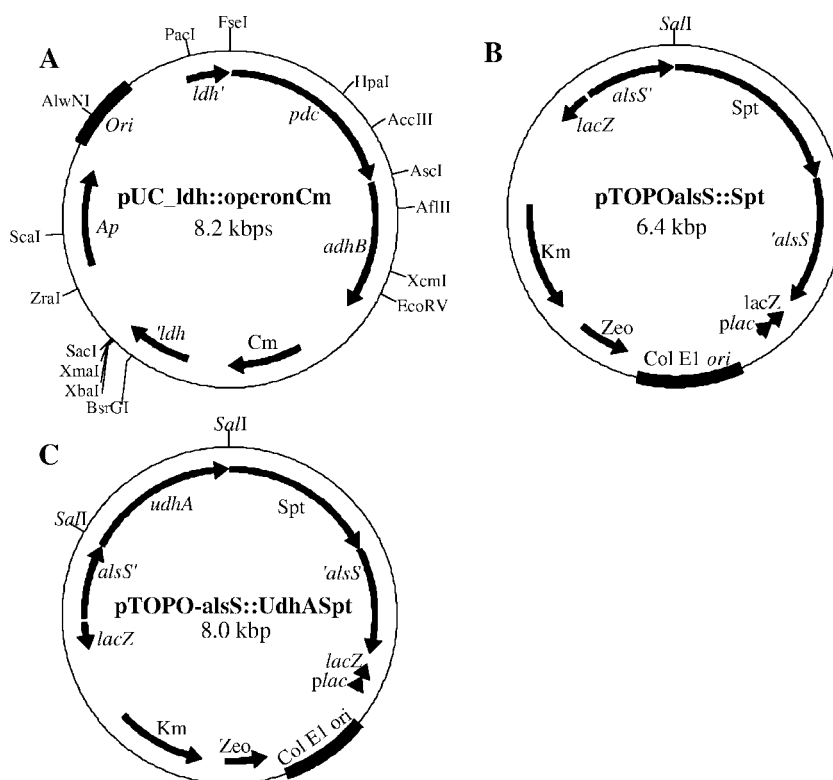


FIG. 2. Vectors constructed to inactivate (A) the *B. subtilis ldh* gene (*ldh_{Bs}*) by chromosomal integration of the *Z. mobilis pdc* gene (*pdc_{Zm}*) and *adhB_{Zm}*, (B) *alsS_{Bs}* by chromosomal integration of the Spt cassette, and (C) *alsS_{Bs}* by chromosomal integration of *E. coli udhA* and the Spt cassette.

The *ldh* gene of *B. subtilis* was amplified by PCR, using primers 6 and 7, and cloned into the *HincII* site of plasmid pUC19 to construct pUC-*ldh*.

The promoterless *pdg* and *adhB* genes, *cryIIIAt*, and the *cat* gene were purified as a 4.5-kbp blunt-treated *AccI* fragment from vector pSG-operon and ligated into the *EcoRV* site of the *ldh* gene in pUC-*ldh*; the resulting plasmid was pUC-*ldh*::operonCm (Fig. 2A).

Competent *B. subtilis* CH1 cells were transformed by using the suicide vector pUC-*ldh*::operonCm; thereby, *pdg* and *adhB* genes were integrated by double-crossover homologous recombination in the *ldh* locus into the *B. subtilis* CH1 genome (8) under the control of the *ldh* promoter. *B. subtilis* recombinants were selected by Cm^r and identified as being defective in lactate production under fermentative conditions. The resulting strain was named BS35.

(iii) ***alsS* cloning and inactivation.** The *alsS* gene was amplified by PCR from the *B. subtilis* genome using primers 8 and 9. This segment was cloned into vector pCR-TOPO in order to construct pTOPO-*alsS*. A 1.2-kbp segment containing the Spt cassette was cut out by double digestion with *Bam*HI-*Hind*III from vector pCm::Spt (30). After the ends were blunt-treated, the Spt cassette was ligated into the *Ssp*I site of the *alsS* gene of pTOPO-*alsS*, generating the pTOPO-*alsS*::Spt plasmid (Fig. 2B). The inactivation of the *alsS* gene, by the insertion of the Spt cassette contained in this plasmid, was transferred to the *alsS* locus of *B. subtilis* BS35 by a double homologous recombination event. *alsS* mutants were selected by Spt^r and identified for the absence of 2,3-butanediol production under fermentative conditions. This new strain was designated BS36.

The CH1 *alsS* mutant strain was constructed to evaluate the apparent K_m of LDH in the cellular extracts of the *B. subtilis* strain. Competent cells of strain CH1 were transformed with plasmid pTOPO-*alsS*::Spt. *alsS* mutants were selected by Spt^r and identified for the absence of 2,3-butanediol production under fermentative conditions.

(iv) **Inactivation of *alsS* by chromosomal integration of *E. coli* transhydrogenase gene (*udhA*).** The primer design to amplify the *E. coli udhA* gene included the same translational elements used in the amplification of the *pdg* and *adhB* genes. The PCR product containing the *udhA* gene, amplified from the *E. coli* JM101 genome using primers 10 and 11, was ligated into the unique *Sal*I site of pTOPO-*alsS*::Spt. The resulting plasmid was pTOPO-*alsS*::*UdhA*_Spt (Fig. 2C). Competent *B. subtilis* BS35 cells were transformed with this plasmid; the *udhA* gene was thereby integrated by double homologous recombination in the *alsS* locus into the *B. subtilis* BS35 chromosome (8), allowing the expression of *udhA* under the control of the *alsS* promoter. Transformants were selected on LB-Spt agar plates. *B. subtilis* BS37 (BS35 Δ *alsS udhA*⁺) was confirmed by PCR amplification of the *udhA* gene from the *alsS* mutant's genome and identified as being defective in lactate and butanediol production under fermentative conditions.

Inoculum preparation and fermentative conditions. LB-glucose 0.2% agar plates were inoculated with cells stored at -70°C in glycerol and incubated overnight at 37°C. These cells were used to inoculate 500-ml flasks containing 150 ml of LB broth with 20 g/liter glucose. The flasks were incubated overnight at 37°C and 100 rpm. Cells from the flasks were centrifuged and used as inocula at an initial optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.1. Cultures were performed by duplication in miniflexers (3) containing 200 ml of LB supplemented with 20 g/liter glucose. The working conditions were 35°C, 100 rpm, and pH 7 (controlled by the automatic addition of 2 N KOH). The growth was monitored by measuring the OD₆₀₀ with a spectrophotometer (Lambda 11; Perkin Elmer, Pomona, CA). Samples were periodically taken and centrifuged; supernatants were used for analytical determinations. Cells with an OD₆₀₀ adjusted to 1 were collected at 48 h elapsed time of fermentation, centrifuged, and utilized for enzymatic activity assays.

Analytical methods. Biomass measured by the OD₆₀₀ was converted to dry cellular weight (DCW) using a standard curve (1 OD₆₀₀ = 0.35 g DCW/liter). The PDC and ADHII enzymatic activities were assayed at 30°C following protocols previously described (5, 6). The LDH activity was assayed using pyruvate, NADH, and the buffers used for the PDC assay. The apparent K_m was determined in cellular extracts of *B. subtilis* CH1 Δ *alsS*, from cells collected at 48 h elapsed time of fermentation. *B. subtilis* BS35 and BS36 were included as negative controls. For the apparent K_m determination, different concentrations of NADH (0 to 0.15 mM) and NADPH (0 to 1.3 mM) were tested, with a constant pyruvate concentration (5.0 mM), employing the same buffers used for the PDC assay, at 30°C.

The protein concentration was determined by using a commercial Bradford reagent according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories, Inc., United States). The glucose, pyruvate, lactate, and butanediol levels were measured by high-pressure liquid chromatography and the ethanol levels by gas chromatography as previously reported (13).

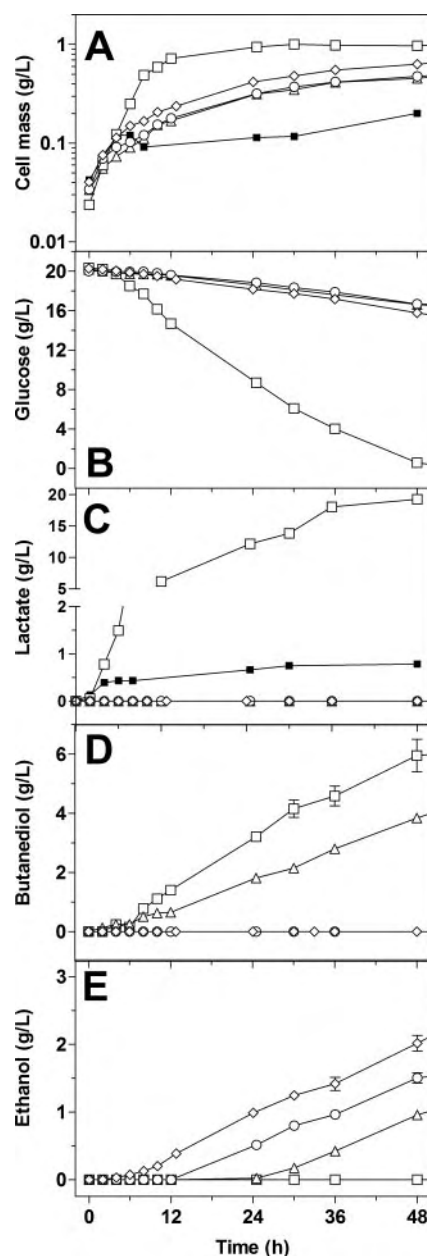


FIG. 3. Characterization of *B. subtilis* strains under fermentative conditions in LB medium containing glucose (20 g/liter). Cell mass formation (A), glucose consumption (B), lactate (C), butanediol (D), and ethanol (E) production of *B. subtilis* strains CH1 (□), BS35 (△), BS36 (○), and BS37 (◇). *B. subtilis* CH1 (■) was included as a control, using LB medium without glucose. The error bars represent the variations of duplicated experiments.

RESULTS

***B. subtilis* produces lactate and butanediol under fermentative conditions.** *B. subtilis* under anaerobic conditions metabolizes glucose to different products, depending on the culture conditions, culture media, and terminal electron acceptor (7, 10, 26). The baseline performance of the prototrophic strain CH1 was characterized under nonaerated conditions, using LB supplemented with 20 g/liter glucose (Fig. 3). During the first

TABLE 3. Kinetic parameters of *B. subtilis* CH1 and its transformants under fermentative growth in LB broth with 20 g glucose/liter^a

Strain	μ (h ⁻¹ \pm SD) ^b	<i>q</i> glucose ^c (g glucose/g DCW/h \pm SD)		<i>q</i> ethanol (g ethanol/g DCW/h \pm SD) ^d	<i>q</i> lactate (g lactate/g DCW/h \pm SD) ^d	<i>q</i> butanediol (g butanediol/g DCW/h \pm SD) ^d
		Exponential phase	Stationary phase			
CH1	0.35 \pm 0.014	1.86 \pm 0.03	0.44 \pm 0.002	0	0.43 \pm 0.005	0.15 \pm 0.000
BS35	0.11 \pm 0.015	0.66 \pm 0.01	0.26 \pm 0.010	0.08 \pm 0.002	0	0.27 \pm 0.016
BS36	0.09 \pm 0.007	0.44 \pm 0.02	0.23 \pm 0.006	0.12 \pm 0.002	0	0
BS37	0.11 \pm 0.014	0.70 \pm 0.03	0.23 \pm 0.010	0.11 \pm 0.009	0	0

^a *q*, specific rate.^b Specific growth rate.^c Specific glucose consumption rate.^d Specific rates of ethanol, lactate, and butanediol production during the stationary phase.

10 h of the culture, *B. subtilis* CH1 grew exponentially, generating 0.6 g/liter of cell mass, producing mainly lactate (4.7 g/liter) and 2,3-butanediol (1 g/liter). Table 3 shows a summary of the kinetic parameters determined for these cultures.

During the stationary phase, a large amount of lactate (14.5 g/liter) was accumulated (Fig. 3C and Table 3). The specific glucose consumption rate diminished 75% in comparison with the rate in the exponential phase, and glucose was depleted at 48 h. A total of 5 g/liter of 2,3-butanediol was formed. Ethanol, acetate, succinate, formate, and acetoin were not detected during the culture.

B. subtilis CH1 was included as a control, using LB medium without glucose. The CH1 cells grew exponentially, generating only 0.11 g/liter of cell mass and 0.8 g/liter of lactate (Fig. 3).

***B. subtilis* containing *pd*c and *adh*B genes produced ethanol, but *ldh* knockout reduced growth rate and glucose consumption.** Based on the high lactate productivity observed during the exponential and stationary growth phases, the *ldh* promoter was considered a good candidate to be used for driving heterologous gene expression under nonaerated conditions. Therefore, this promoter was selected to drive *pd*c and *adh*B expression in the *B. subtilis* chromosome.

Characterization of strain BS35 (CH1 *ldh::pd*c-*adh*B) under nonaerated conditions showed that the heterologous genes *pd*c and *adh*B are expressed, leading to the synthesis of functional enzymes. Table 4 shows a summary of the PDC, ADHII, and LDH enzymatic activities determined in strains CH1 and BS35. Interestingly, interruption of the *ldh* gene impaired the growth capacity of strain BS35 (Fig. 3A), diminishing its growth rate by 70% in comparison with that of strain CH1, possibly as a consequence of a 65% decrease in the specific glucose consumption rate (Fig. 3B and Table 3). In comparison with the titer and specific rate of butanediol production in strain CH1, the final titer and the specific rate of butanediol production were slightly reduced in strain BS35, but lactate production

was completely abolished (Table 3 and Fig. 3C and D). Even though the growth and glucose consumption rates in strain BS35 were impaired, it produced ethanol during the stationary phase (Fig. 3E), with a specific productivity of 0.08 g ethanol/g DCW/h (Table 3). Interestingly, ethanol accumulation in the culture broth was detected until 24 h elapsed time of fermentation, and 0.95 g/liter was obtained at 48 h.

Butanediol synthesis suppression increased ethanol production capacity. Acetoin synthesis from pyruvate involves two steps, catalyzed by acetolactate synthase (ALSS) and acetolactate decarboxylase (Fig. 1). Butanediol is formed from acetoin reduction (7). Thus, ALSS directly competes with PDC for pyruvate in strain BS35. Hence, to increase pyruvate availability, the *als*S gene was interrupted as described in Materials and Methods. Insertional inactivation of *als*S totally abolished butanediol production (Fig. 3D) and allowed the onset of ethanol production at 12 h of culture time (Fig. 3E). The specific ethanol production rate in strain BS36 increased 50% in comparison with the rate in strain BS35 (Table 3). Analysis of glucose consumption and ethanol production in the stationary phase (from 12 to 48 h) revealed that 1.5 g/liter of ethanol was produced from 3 g/liter of glucose consumed. This value corresponds to 98% of the maximum theoretical yield (0.51 g ethanol/g glucose). In comparison with the rates in strain CH1, the growth and glucose consumption rates in BS36 remained impaired.

***B. subtilis* L-LDH can use both NADH and NADPH as cofactors.** The heterologous ethanol pathway in strain BS35 is equivalent to the native lactate pathway in strain CH1 in terms of NADH reoxidation (Fig. 1 and Table 4). Nevertheless, as shown above, the growth and glucose consumption rates were impaired when the homologous lactate pathway was replaced with the heterologous ethanol pathway.

To determine the LDH cofactor specificity, we evaluated if NADPH could be a substrate of *B. subtilis* LDH. Enzymatic assays clearly showed that both NADH and NADPH are substrates for LDH (Table 5). A control test was also performed using BS35 and BS36 cellular extracts, showing that in the absence of LDH, no NADPH reduction can be detected (Table 5).

Furthermore, to verify that only the LDH activity was responsible for NADPH oxidation, the apparent K_m (Michaelis-Menten affinity constant) was determined in cellular extracts from a *B. subtilis* *ldh*⁺ Δ *als*S strain (CH1 *als*S mutant strain)

TABLE 4. Specific enzymatic activities of PDC, ADH, and LDH in *B. subtilis* strains^a

Strain	LDH (IU/mg protein \pm SD)	PDC (IU/mg protein \pm SD)	ADHII (IU/mg protein \pm SD)
<i>B. subtilis</i> CH1	7.36 \pm 0.02	0.00	0.03 \pm 0.02
<i>B. subtilis</i> BS35	0.02 \pm 0.01	4.21 \pm 0.03	3.19 \pm 0.04

^a Samples were collected at 48 h of nonaerated culture. Activities were replicated four times.

TABLE 5. Determination of specific enzymatic activities of LDH of *B. subtilis* strains towards two different cofactors^a

Strain	Cofactor	Sp act (IU/mg protein \pm SD)
BS35	NADPH	0.01 \pm 0.01
BS36	NADPH	0.02 \pm 0.005
CH1	NADPH	0.68 \pm 0.04
CH1	NADH	7.36 \pm 0.02

^a Activities were replicated four times. Samples were collected at 48 h of nonaerated culture.

(Table 1). The apparent K_m values of LDH were 0.013 mM for NADH and 0.288 mM for NADPH.

The expression of a transhydrogenase improved growth and reduced the onset time for ethanol production. The *E. coli udhA* gene encodes a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (4). This enzyme catalyzes the reversible transfer of reducing equivalents between NADP⁺ and NAD⁺ pools according to the following equation: NADPH + NAD⁺ \leftrightarrow NAP⁺ + NADH.

Neither any putative transhydrogenase-encoding gene nor any enzymatic system(s) that could fulfill a similar function has been identified in the *B. subtilis* genome. To evaluate if LDH could play a role in maintaining NADPH/NADP⁺ equilibrium, the *udhA* gene from *E. coli* was integrated into the *B. subtilis* BS35 chromosome to disrupt the native *alsS* gene and, at the same time, be under the control of the *alsS* promoter (see Materials and Methods for details). Under anaerobic conditions, the *alsS* promoter is induced during the exponential phase and its expression is maintained during the stationary phase (7). A 22% improvement in the growth rate and a 59% increase in the glucose consumption rate during the exponential phase were observed (Fig. 3 and Table 3); as expected, butanediol production was abolished. Ethanol production started at 6 h of culture, and 2 g/liter of ethanol was produced at 48 h; 4.1 g/liter of glucose was consumed during this time, indicating a high conversion yield of glucose into ethanol (96% of the theoretical maximum).

***B. subtilis* can produce lactate and butanediol from rich medium.** The results with the progenitor strain CH1 indicated that higher yields were obtained in comparison with the amount of glucose consumed, considering that the theoretical maximum yields of lactate and butanediol from glucose are 1.0 g lactate/g glucose and 0.5 g butanediol/g glucose (Fig. 3). In addition, some lactate was produced by strain CH1 in glucose-free LB medium (Fig. 3). These results indicated that components from the rich medium were used to build up cell mass and synthesize fermentation products. Furthermore, LB medium supplemented with glucose allowed the generation of reducing power by strain CH1, to produce large amounts of lactate and butanediol. On one hand, BS35 produced 0.95 g ethanol/liter and 3.8 g butanediol/liter. After the inactivation of ALSS in strain BS36, no butanediol but only 1.5 g/liter of ethanol was produced at 48 h; only 0.65 g/liter more of ethanol was produced than in strain BS35, and a larger amount could be expected. Based on carbon, 2 mol of pyruvate is used to produce 1 mol of butanediol, but just 1 mol of NADH is needed. In comparison, 2 mol of pyruvate and NADH is required to form 2 mol of ethanol. Thereby, in terms of reducing

power, although a greater availability of carbon precursors to produce ethanol probably exists in BS36, the reducing power must be limiting. These results suggest that BS35 produced butanediol from carbon sources obtained from rich medium components with a lesser reducing power than glucose.

In addition, *ldh* inactivation reduced cell mass formation, but small amounts of the glucose consumed were efficiently converted into ethanol in the BS36 and BS37 strains. In these cases, it is suggested that components from the LB were only used for cell mass formation. BS37 was also cultivated in LB without glucose, and biomass formation was only 0.19 g/liter (similar to that found for the first 12 h of culture with glucose); no ethanol was produced in this condition (data not shown). These results confirm that components from rich medium were used to build up cell mass, and that actual ethanol obtained with the BS36 and BS37 strains was synthesized from the glucose consumed.

Exogenous pyruvate was channeled to ethanol, improving the growth rate. *B. subtilis* has a poor capacity to grow anaerobically in glucose-mineral medium (26). However, when glucose-mineral medium is supplemented with pyruvate or amino acids, *B. subtilis* can grow anaerobically, producing lactate, acetate, and butanediol (7, 26). Consequently, to test if pyruvate availability or the PDC- and ADHII-specific activities limit BS37's anaerobic growth in rich medium (LB), LB-glucose medium was supplemented with 2 g/liter of pyruvate (Fig. 4). It was observed that glucose and pyruvate were cometabolized during the exponential growth phase. During this phase, pyruvate and glucose were consumed at the same specific rate. The growth rate of BS37 increased from 0.11 h⁻¹ (Table 3) to 0.27 h⁻¹ when pyruvate was added (Fig. 3 and 4). Pyruvate was exhausted at 12 h, coincidental with the end of the exponential growth phase.

The onset of ethanol production was at 6 h of culture time; the ethanol production rate was 0.9 g ethanol/g DCW/h when glucose and pyruvate were consumed simultaneously. This rate is similar to the ethanol production rates of ethanologenic organisms like *E. coli* KO11 and yeast (13, 33). In molar terms, the sum of the glucose and pyruvate consumption rates was similar to the ethanol production rate (19 versus 22 mmol ethanol/g DCW/h), indicating that the PDC and ADHII levels in BS37 do not limit ethanol production; therefore, the expres-

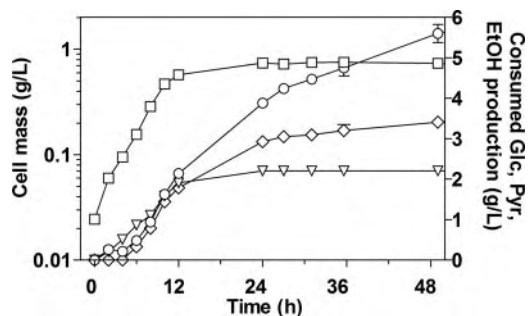


FIG. 4. Characterization of *B. subtilis* BS37 in LB supplemented with glucose (Glc; 20 g/liter) and pyruvate (Pyr; 2 g/liter) under fermentative conditions. Cell mass (\square), consumed glucose (\circ), consumed pyruvate (∇), and ethanol (EtOH) production (\diamond). The error bars represent the variations of duplicated experiments.

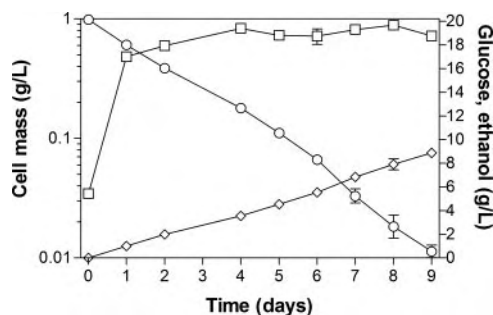


FIG. 5. Long-term fermentation of *B. subtilis* BS37 in LB supplemented with glucose (20 g/liter). Cell mass (\square), glucose consumption (\circ), and ethanol production (\diamond). The error bars represent the variations of duplicated experiments.

sion level of these enzymes was not the reason for glucose consumption and growth impairment. After pyruvate depletion, 3.5 g/liter of glucose was consumed and 1.6 g/liter of ethanol was produced (i.e., 90% of the theoretical yield).

In long-term cultivation, *B. subtilis* BS37 produced 8.9 g/liter ethanol from glucose. The growth and formation of products from *B. subtilis* BS37 (*ldh::pdc adhA Δ alsS udhA⁺*) were characterized in LB broth with 20 g/liter glucose under nonaerated conditions in long-term cultivation (Fig. 5). During the first 4 days, strain BS37 produced ethanol (3.6 g/liter) from glucose (7.5 g/liter) with a high ethanol yield (95% of the theoretical). Although the specific rate of ethanol production was low, it was constant during the 9 days of batch culture. Hence, *B. subtilis* BS37 produced 8.9 g/liter of ethanol from 20.13 g/liter of glucose, despite the ethanol yield diminishing (87% of the theoretical) during the last days, which could be an effect of ethanol evaporation. The ethanol formation during the 9 days indicates that PDC and ADHII were functional during this long period.

DISCUSSION

Several groups have tried to develop ethanologenic gram-positive bacteria by engineering lactic acid bacteria, *Corynebacterium*, and *Bacillus* species. Nevertheless, little or no ethanol has been produced by these recombinant microorganisms (2, 15, 19, 21, 27, 32).

Barbosa and Ingram (2) tried to express the *Z. mobilis pdc* and *adhB* genes by using a multicopy vector in *B. subtilis*. Using Western blot analysis, they observed that both proteins were synthesized in *B. subtilis*, although no enzymatic activity or ethanol production was reported (2). Talarico et al. (32) constructed different chimeric operons using *pdc* genes from gram-positive and gram-negative bacteria and from *Saccharomyces cerevisiae*, to be expressed in multicopy vectors in *Bacillus megaterium*. They reported different PDC activity levels for each source, indicating the importance of differences in codon usage between gram-positive and gram-negative bacteria. Despite high levels of PDC and ADH in the recombinant *B. megaterium* strain, in vivo ethanol production was null, and an in vitro assay was necessary to prove ethanol production from pyruvate (32).

LDH plays a complex role in *B. subtilis* fermentative metabolism. It has been reported that *ldh* inactivation reduced the

rate of growth of *B. subtilis* under fermentative conditions (7). In the present study, with the substitution of the combined PDC and ADH activities for LDH activity, we tried to maintain the NADH/NAD⁺ redox balance; however, the glucose consumption and growth rates of the *B. subtilis ldh* mutant were impaired. Two hypotheses could explain this phenomenon.

(i) The PDC and ADHII activity levels might not be sufficient to substitute for the previous LDH activity; thus, the NADH/NAD⁺ redox balance in this strain might be limited. Nevertheless, the *Z. mobilis* PDC and ADHII enzymes were found to be functional in *B. subtilis*, with enzymatic activity levels similar to those observed in ethanologenic *E. coli* (28). The addition of pyruvate led to an increase of 32% in the glucose consumption rate. Furthermore, it was also shown that the activities of these enzymes were sufficient to produce ethanol at a rate similar to that reported for ethanologenic *E. coli* KO11 and yeast (0.9 g ethanol/g DCW/h) (13, 33). This fact demonstrates the potential of ethanol production in BS37 and eliminates the possibility that the PDC and ADHII levels were not sufficient to support the anaerobic growth of *B. subtilis*.

(ii) *B. subtilis* LDH might contribute to maintaining NADPH/NADP⁺ equilibrium under fermentative conditions. It has been reported that *B. subtilis* LDH oxidizes NADH to NAD⁺ (14, 36). Our data proved that *B. subtilis* LDH can use both NADH and NADPH as cofactors, although the apparent K_m of LDH showed a preferential binding of NADH over NADPH. The K_m value for NADH was similar to that reported by Yoshida (36). The K_m values of LDH for NADH from different gram-positive bacteria range from 0.001 to 0.22 mM. LDH from *B. subtilis* has one of the largest reported activities and highest affinities for NADH (14). The K_m value for NADPH of *B. subtilis* LDH was similar to the K_m values for NADH of LDH from *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus jensenii* (14). Thus, the LDH from *B. subtilis* has a significant affinity for NADPH, whose influence in the NADPH/NADP⁺ equilibrium must be decisive in the fermentative metabolism of *B. subtilis*.

The transhydrogenase's enzymatic activity (4) partially restored the observed diminished growth rate, supporting the hypothesis that LDH might have an important physiological and regulatory role related to the NADPH/NADP⁺ balance. In this sense, the cofactor-level imbalance provoked by LDH inactivation might affect the metabolism of *B. subtilis*, diminishing glucose consumption in the ethanologenic *B. subtilis*—a role that the ethanologenic pathway might not fulfill.

LDH inactivation in *Lactobacillus* has also been reported to have negative effects on the glucose consumption rate and cellular growth (1, 12, 21) and on peptidoglycan precursor synthesis (11). Based on the results of these previous works and those presented in this study, it can be speculated that the LDH role in some gram-positive bacteria is as complex as it is in *B. subtilis*; it sustains not only the pyruvate transformation to lactate and NADH⁺ oxidation but also, apparently, the NADPH oxidation. Hence, the development of an ethanologenic microorganism derived from a gram-positive bacteria, such as *B. subtilis*, might require the use of other enzymatic activities, such as those of a transhydrogenase, or the directed evolution of protein to obtain new ADHs that might fulfill the complex role of LDH in the metabolism of gram-positive bac-

teria, or metabolic strategies to reduce the generation of NADPH in glucose catabolism.

High ethanol production from glucose in *B. subtilis*. This study reports the metabolic engineering of *B. subtilis* for the production of ethanol as the main fermentation product. The strategy was based on the replacement of the LDH activity by the PDC and ADHII activities. The resulting strain produced ethanol, while the parental strain did not produce this compound under the same growth conditions. To ensure the efficient expression of these genes to transcriptional and translational levels in this study, the use of a strong promoter (*ldhp*) and the *B. subtilis* Shine-Dalgarno consensus sequence (AAG GAAG) of *B. subtilis* placed at an optimum distance from the ATG start codon were included (16). In addition, to avoid metabolic burden and to have a genetically stable strain, the heterologous *pet* operon was integrated by disrupting the native *ldh* gene. At the same time, the *ldh* promoter (*ldhp*) would drive *pdh* and *adhB* expression. The combination of all these factors allowed the generation of a *B. subtilis* strain with relatively high enzymatic activities for PDC and ADHII. The enzymatic activity levels were comparable to those of the patented ethanologenic *E. coli* KO11 (24, 28), indicating adequate transcription, translation, and protein folding of PDC and ADHII in *B. subtilis* under nonaerated conditions.

When *alsS* was inactivated, the resulting ethanologenic *B. subtilis* strain reached an ethanol yield of 88.8% of the maximum theoretical value from the glucose consumed in 48 h of batch cultures, although the ethanologenic *B. subtilis* consumed only 3 g/liter during this time; this is because the specific rate of glucose consumption was low. Interestingly, besides the partial restoration of the growth rate with *udhA* expression, the onset of ethanol production was shortened, similar to the onset of lactate production in the parental CH1 strain. With the aforementioned strategy, the ethanologenic *B. subtilis* BS37 produced 9 g/liter of ethanol with an ethanol yield on glucose close to 90% during 9 days of fermentation culture. These results clearly demonstrated that it is possible to engineer *B. subtilis* to produce ethanol as a single fermentation product. The specific rate of ethanol production was relatively low and was very closely related to the specific rate of glucose consumption. In conclusion, this is the first time that a recombinant strain of *B. subtilis* could produce ethanol in vivo as a sole fermentation product with a high ethanol yield from glucose. These results open new possibilities to develop a process that takes advantage of the *B. subtilis* secretion system by using complex substrates for ethanol production.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Georgina Hernández for high-pressure liquid chromatography analysis and to Mercedes Enzaldo for technical support, as well as to Eugenio López and Santiago Becerra for the synthesis of oligonucleotides. We thank S. L. Wong (Calgary University, Canada) for kindly providing the *B. subtilis* WB700 strain.

This research was supported by the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) grants CONACyT—SAGARPA 2004-C01-224 and CONACyT—Estado de Morelos MOR-2004-C02-048. Susana Romero was supported by CONACyT scholarship 184798.

REFERENCES

- Aarnikunnas, J., N. von Weymarn, K. Rönnholm, M. Leisola, and A. Palva. 2003. Metabolic engineering of *Lactobacillus fermentum* for production of mannitol and pure L-lactic acid or pyruvate. *Biotechnol. Bioeng.* **82**:653–663.
- Barbosa, M. F. S., and L. O. Ingram. 1994. Expression of the *Zymomonas mobilis* alcohol dehydrogenase II (*adhB*) and pyruvate decarboxylase (*pdh*) genes in *Bacillus*. *Curr. Microbiol.* **28**:279–282.
- Beall, D. S., K. Ohta, and L. O. Ingram. 1991. Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **38**:296–303.
- Boonstra, B., C. E. French, I. Wainwright, and N. C. Bruce. 1999. The *udhA* gene of *Escherichia coli* encodes a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase. *J. Bacteriol.* **181**:1030–1034.
- Conway, T., Y. A. Osman, J. I. Konnan, E. M. Hoffmann, and L. O. Ingram. 1987. Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *J. Bacteriol.* **169**:949–954.
- Conway, T., G. W. Sewell, Y. A. Osman, and L. O. Ingram. 1987. Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **169**:2591–2597.
- Cruz-Ramos, H., T. Hoffmann, M. Marino, H. Nedjari, E. Presecan-Siedel, O. Dreesen, P. Glaser, and D. Jahn. 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J. Bacteriol.* **182**:3072–3080.
- Cutting, S. M., and P. B. Vander-Horn. 1990. Genetic analysis, p. 27–74. In C. R. Harwood and S. M. Cutting (ed.), *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Dien, B. S., M. A. Cotta, and T. W. Jeffries. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**:258–266.
- Espinosa-de-los-Monteros, J., A. Martinez, and F. Valle. 2001. Metabolic profiles and *aptE* expression in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**:379–384.
- Ferain, T., J. N. Hobbs, Jr., J. Richardson, N. Bernard, D. Garmyn, P. Hols, N. E. Allen, and J. Delcour. 1996. Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **178**:5431–5437.
- Ferain, T., A. N. Schanck, and J. Delcour. 1996. ¹³C nuclear magnetic resonance analysis of glucose and citrate end products in a *ldhL-ldhD* double-knockout strain of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **178**:7311–7315.
- Garay-Arroyo, A., A. A. Covarrubias, I. Clark, I. Niño, G. Gosset, and A. Martinez. 2004. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**:734–741.
- Garvie, E. I. 1980. Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol. Rev.* **44**:106–139.
- Gold, R. S., M. M. Meagher, S. Tong, R. W. Hutkins, and T. Conway. 1996. Cloning and expression of the *Zymomonas mobilis* “production of ethanol” genes in *Lactobacillus casei*. *Curr. Microbiol.* **33**:256–260.
- Helmann, J. D. 1995. Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* σ^A -dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**:2351–2360.
- Ingram, L. O., H. C. Aldrich, A. C. Borges, T. B. Causey, A. Martinez, F. Morales, A. Saleh, S. A. Underwood, L. P. Yomano, S. W. York, J. Zaldivar, and S. Zhou. 1999. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnol. Prog.* **15**:855–866.
- Ingram, L. O., P. F. Gomez, X. Lai, M. Moniruzzaman, B. E. Wood, L. P. Yomano, and S. W. York. 1998. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* **58**:204–214.
- Inui, M., H. Kawaguchi, S. Murakami, A. A. Vertes, and H. Yukawa. 2004. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **8**:243–254.
- Jan, J., F. Valle, F. Bolivar, and E. Merino. 2001. Construction of protein overproducer strains in *Bacillus subtilis* by an integrative approach. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**:69–75.
- Liu, S., N. N. Nichols, B. S. Dien, and M. A. Cotta. 2006. Metabolic engineering of a *Lactobacillus plantarum* double *ldh* knockout strain for enhanced ethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**:1–7.
- Lynd, L. R., W. H. van Zyl, J. E. McBride, and M. Laser. 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**:577–583.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Martinez, A., S. W. York, L. P. Yomano, V. L. Pineda, F. C. Davis, J. C. Shelton, and L. O. Ingram. 1999. Biosynthetic burden and plasmid burden limit expression of chromosomally integrated heterologous genes (*pdh*, *adhB*) in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **15**:891–897.
- Mielenz, J. R. 2001. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:324–329.
- Nakano, M. M., Y. P. Dailly, P. Zuber, and D. P. Clark. 1997. Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J. Bacteriol.* **179**:6749–6755.
- Nichols, N. N., B. S. Dien, and R. J. Bothast. 2003. Engineering lactic acid bacteria with pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase genes for

- ethanol production from *Zymomonas mobilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**:315–321.
28. Ohta, K., D. S. Beall, J. P. Mejia, K. T. Shanmugam, and L. O. Ingram. 1991. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:893–900.
 29. Sonenshein, A. L., J. A. Hoch, and R. Losick. 1993. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington, DC.
 30. Steinmetz, M., and R. Richter. 1994. Plasmids designed to alter the antibiotic resistance expressed by insertion mutations in *Bacillus subtilis*, through in vivo recombination. *Gene* **142**:79–83.
 31. Stülke, J., and W. Hillen. 2000. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:849–880.
 32. Talarico, L. A., M. A. Gil, L. P. Yomano, L. O. Ingram, and J. A. Maupin-Furlow. 2005. Construction and expression of an ethanol production operon in gram-positive bacteria. *Microbiology* **151**:4023–4031.
 33. Tao, H., R. Gonzalez, A. Martinez, M. Rodriguez, L. O. Ingram, J. F. Preston, and K. T. Shanmugam. 2001. Engineering a homo-ethanol pathway in *Escherichia coli*: increased glycolytic flux and levels of expression of glycolytic genes during xylose fermentation. *J. Bacteriol.* **183**:2979–2988.
 34. Wong, H. C., and S. Chang. 1986. Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:3233–3237.
 35. Ye, R., L. P. Yang, and S. L. Wong. 1996. Construction of protease deficient *Bacillus subtilis* strains for expression studies: inactivation of seven extracellular proteases and the intracellular LonA protease, p. 160–169. *In* Proceedings of the International Symposium on Recent Advances in Bioindustry. The Korean Society for Applied Microbiology, Seoul, Korea.
 36. Yoshida, A. 1965. Enzymatic properties of lactate dehydrogenase of *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **99**:66–77.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL POR *Bacillus subtilis*

Se construyó el plásmido que integraría los genes pdc_{ZM} y $adhB_{ZM}$ en el locus de ldh_{BS} , llevando a cabo una recombinación homóloga doble e interrumpiendo el gen ldh_{BS} . Con este plásmido se transformó la cepa de *B. subtilis* CH1 (cepa con interrupciones-supresiones de las siete proteasas mayoritarias), se obtuvieron varias candidatas que interrumpieron el gen ldh_{BS} e integraron los genes pdc_{ZM} y $adhB_{ZM}$, se les denominó BS27, BS30, BS33 y BS35. Dichas cepas tuvieron actividad enzimática de PDC y ADHIII, y no tuvieron actividad de LDH.

Al llevar a cabo la caracterización a nivel fermentador de las cepas BS27, BS30, BS33 y BS35, los resultados de las fermentaciones mostraron que dichas cepas produjeron etanol (alrededor de 1 g/L a las 48h). En el balance de carbono de la cepa silvestre CH1, y de su derivada BS35 se observó que la cepa CH1 produjo láctico y butanodiol y no se detectó etanol y el flujo de carbono se dividió entre la producción de lactato (56%), butanediol (30%) y CO₂ (14%). La cepa modificada BS35 no formó láctico y el flujo de carbono se dividió entre la producción de etanol (14%), butanediol (53%) y CO₂ (33%). Además, se observó que la velocidad de crecimiento de BS35 disminuyó tres veces respecto a la de CH1 ($\mu_{CH1}=0.35$ a $\mu_{BS35}=0.11h^{-1}$), esto podría deberse a que la vía heteróloga productora de etanol no lograba regenerar el NAD⁺ a la velocidad que el metabolismo de *B. subtilis* lo requiere. Cabe mencionar que el butanodiol es producto de la condensación de dos moléculas de piruvato, actividad llevada a cabo por la enzima acetolactato sintasa (ALSS) codificada por el gen *alsS*.

Se llevó a cabo la construcción de un vector suicida, pTOPO-*alsS*::*Spt*, que integró el cassette de resistencia a espectinomicina (*Spt*) interrumpiendo el locus *alsS*, con el propósito de eliminar la síntesis de butanodiol. La integración del vector se realizó en dos fondos genéticos de *B. subtilis*: BS35 (para analizar la producción de etanol) y CH1 (para evaluar la producción de

L-lactato). Se llevó a cabo la caracterización del crecimiento y formación de productos de la cepa derivada de *B. subtilis*: BS36 (BS35 *alsS::Spt*) a nivel fermentador en medio luria con 20g/L de glucosa (LB-Glc 20 g/L).

Las cepas *B. subtilis* BS35 y BS36 tuvieron casi la misma velocidad de crecimiento (alrededor de 0.1 h⁻¹), este resultado apoyaba la hipótesis de que en términos de balance de NADH/NAD⁺, la vía heteróloga productora de etanol no lograba regenerar el NAD⁺ a la velocidad que el metabolismo de *B. subtilis* lo requería. Tampoco, el consumo de glucosa se alteró, pero *B. subtilis* BS36 comenzó a producir etanol 14h antes que su parental BS35 y la cantidad de etanol producido aumentó dos veces.

Determinación de la actividad específica de la enzima lactato deshidrogenasa de *B. subtilis* (LDH) usando NADPH como cofactor.

PDC y ADHIII han sido utilizadas para crear una vía heteróloga en otros microorganismos y, bajo la regulación de un promotor fuerte han sido capaces de mantener el equilibrio NADH/NAD⁺, o bien mantener los requerimientos de la célula para conservar su velocidad de crecimiento. Sin embargo, dado que no se recuperó la velocidad de crecimiento de *B. subtilis*, ésto podría deberse a que la enzima LDH interrumpida interviene en alguna otra regulación metabólica, en la cual las enzimas PDC y ADH son incapaces de intervenir o actuar. Posiblemente, la LDH de *B. subtilis* es capaz de utilizar otro cofactor además del NADH. Tratando de indagar esta posibilidad, se evaluó la actividad de LDH de *B. subtilis* para oxidar NADPH *in vitro*. En la Tabla 4 se muestra la actividad enzimática de LDH con los dos cofactores, evaluada en los extractos celulares de la cepa CH1 (que contiene la LDH funcional), también se incluyeron las cepas BS35 y BS36, como controles negativos. En la Tabla 4 se observa que la LDH de CH1 oxida a ambos cofactores *in vitro*, en tanto que las cepas BS35 y BS36 no muestran tal actividad debido a que el gen que codifica para la LDH está interrumpido.

TABLA 4. Actividad enzimática de la LDH utilizando diferentes cofactores.

Cepa	Actividad enzimática de LDH (Uenzima/ mg prot)	Cofactor
BS35	0.01	NADPH
BS36	0.02	NADPH
CH1	0.68	NADPH
CH1	7.36	NADH

Al observar este comportamiento se planteó la hipótesis de que si la LDH intervenía en ambos equilibrios redox (NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺), entonces habría en la célula *Δldh* una acumulación de NAD⁺ y NADPH, y que si se introducía en el metabolismo de *B. subtilis* una enzima que pudiera utilizar NAD⁺ y NADPH, se podría regenerar NADH y NADP⁺; con ésto, la producción de etanol mejoraría como consecuencia de: **(a)** el incremento del cofactor NADH y **(b)** el aumento en la velocidad de crecimiento de la cepa.

Se ha reportado que las transhidrogenasas son enzimas que llevan a cabo la siguiente reacción: NADPH + NAD⁺ ⇌ NADP⁺ + NADH.

En el genoma de *B. subtilis* no se ha detectado algún gen que codifique para una posible transhidrogenasa, ni se ha reportado algún otro sistema enzimático que pudiera complementar una función similar a la interconversión de NADH y NADPH. *E. coli* cuenta con dos transhidrogenasas: una soluble (UdhA) y otra que se ancla en membrana. Por lo que se diseñaron oligos para amplificar el gen *udhA* de *E. coli*. Se obtuvo por PCR la secuencia de 1.5 kb que contenía la secuencia del gen *udhA* precedido por el Shine-Dalgarno consenso de *B. subtilis*.

El plásmido pTOPO-*alsS*::*Spt* (que anteriormente se había construido), se cortó en el sitio único Sall y se ligó con la secuencia de *udhA*, obteniéndose así el plásmido pTOPO-*alsS*::*UdhA*_Spt. La cepa BS35 se transformó con dicho plásmido, obteniéndose varias transformantes. Se incubaron varias de estas transformantes en LB-Glc 20g/L y espectinomicina a 37°C, 300 rpm, durante 20h, los sobrenadantes se analizaron en cromatografía de gases. En la Tabla 5 se muestran las clonas que produjeron mayor concentración de

etanol. Se decidió utilizar la clona 3 para posteriores análisis pues creció mejor que la clona 27, y se le denominó *B. subtilis* BS37 (BS35 *alsS::udhA_Spt*).

TABLA 5. Producción de etanol en diferentes cepas derivadas de BS35.

Cepa	Etanol (g/L)
BS35 (cepa parental)	0.80
BS35 <i>alsS,udhA</i> + Clona 3	3.96
BS35 <i>alsS,udhA</i> + Clona 27	4.30
BS35 <i>alsS,udhA</i> + Clona 30	1.57

Caracterización en mini-fermentador de BS37 (BS35 *alsS::udhA_Spt*).

La cepa BS37 creció con dos diferentes μ , primero a $0.16h^{-1}$, y después cambio su velocidad de crecimiento a $\mu_2=0.08$, este comportamiento le permitió incrementar un 29% su biomasa, produciendo un 33% más de etanol. En HPLC se buscó la presencia de acético, acetoína, butanodiol, lactato y succínico, pero no fueron detectados en los sobrenadantes analizados.

Caracterización en mini-fermentador de BS37 hasta consumir totalmente la glucosa.

La cepa BS37 creció exponencialmente durante las primeras 24h del cultivo lote, consumiendo glucosa y produciendo etanol. Durante 9 días de fermentación la cepa BS37 produjo 9 g/L de etanol consumiendo toda la glucosa, lo que indica un rendimiento etanol del 90% respecto del teórico. El análisis por HPLC no detectó otros productos de fermentación.

RESULTADOS NO INCLUIDOS EN EL ARTÍCULO DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

Efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento y producción de etanol con BS35 *alsS*,*udhA*+

En este caso la cepa BS35 *alsS*,*udhA* fue crecida en las mismas condiciones descritas para los mini-fermentadores, usando en este caso una velocidad de agitación de 250 en lugar de 100 rpm. Se presentaron dos velocidades de crecimiento diferentes durante la fase exponencial 0.35 y 0.05 h⁻¹ (Fig. 5). La velocidad de agitación se incrementó con la finalidad de obtener una mayor transferencia de oxígeno a partir del aire presente en la parte gaseosa superior del fermentador. Al parecer de las 8 a las 10 h se agotó el oxígeno dentro del minifermentador o, probablemente, llegó a ser limitante para mantener el crecimiento a la velocidad de 0.35 h⁻¹. El incremento en la velocidad de agitación permitió aumentar la biomasa al doble y, a su vez producir un 50% más de etanol en el mismo tiempo que para BS35 *alsS*-*udhA* a 100 rpm. En los cromatogramas del HPLC se buscó la presencia de acético, acetoína, butanediol, lactato y succínico, pero no se detectaron en los sobrenadantes analizados. Este resultado abre la posibilidad de usar diferentes estrategias de fermentación con el objetivo de mejorar la productividad de etanol utilizando la cepa BS35 *alsS*,*udhA*+

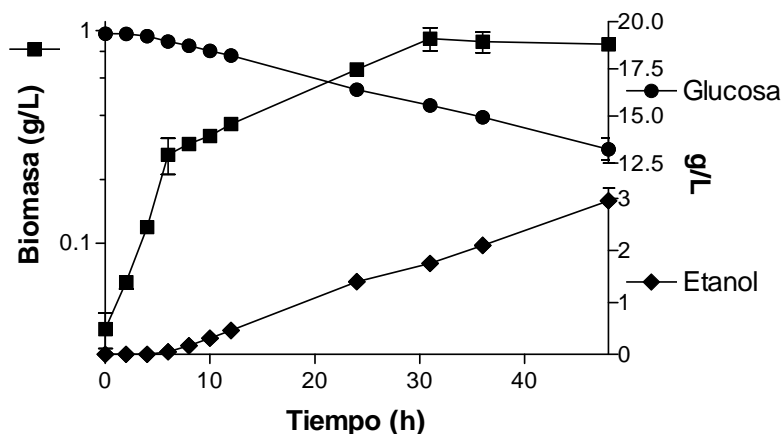


Figura 5. Efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento y producción de etanol con BS35 *alsS*,*udhA*+

Desempeño de BS35 *alsS*-,*udhA*+ en cultivos aireados.

Los cultivos se realizaron a 80 y 120 rpm usando 1 VVM. A 120 rpm, la cepa creció con una $\mu=0.27 \text{ h}^{-1}$, y se obtuvo una mayor biomasa al término de la fase exponencial; aunque la cepa consumió más glucosa (casi 7 g/L), la concentración de etanol producido fue sólo de 1.9 g/L a las 48 h de cultivo, además de obtuvo ácido acético (2.9 g/L). A 80 rpm, la cepa creció con una $\mu=0.22 \text{ h}^{-1}$, y se obtuvo una menor cantidad de biomasa que a 120 rpm, con un consumo de 5.7 g/L de glucosa y una producción de 1.8 g/L de etanol, en esta condición también se produjo ácido acético (2.6 g/L). La notable sensibilidad metabólica al oxígeno en el cultivo de *B. subtilis* fue evidente cuando una mayor concentración de oxígeno prendió la vía productora de ácido acético, ya que ésta es energéticamente más favorable que la vía de producción de etanol. Sin embargo, la introducción de la vía heteróloga productora de etanol permitió la generación de una nueva cepa derivada de *B. subtilis* que puede producir etanol en condiciones aeróbicas. Adicionalmente, otra posible estrategia para incrementar la producción de etanol sería interrumpir la vía productora de acético, por medio de la integración de otra PDC, en este caso sería interesante probar la de *Sarcina ventriculi* (Gram-positiva) para evitar la posibilidad de eventos de recombinación con la PDC de *Z. mobilis* y obtener cepas derivadas de *B. subtilis* que tendría dos copias de PDC, además de interrumpir la vía productora de acético.

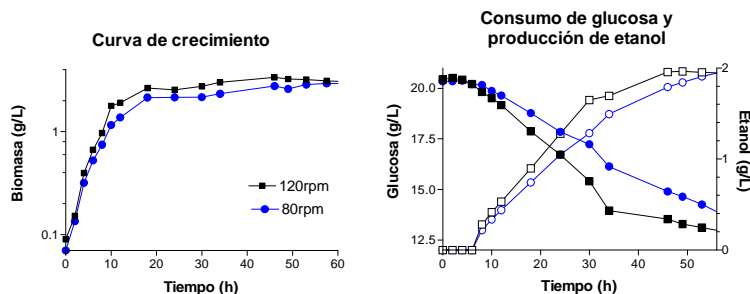


Figura 6. Desempeño de BS35 *alsS*-,*udhA*+, en cultivos aeróbicos a 120rpm (■) y 80 rpm (●) con 1 VVM de flujo de aire.

PRESENTACIÓN DEL MANUSCRITO 2:

Homolactic fermentation from glucose and cellobiose
using *Bacillus subtilis*

Homolactic fermentation from glucose and cellobiose using *Bacillus subtilis*

Susana Romero¹, Claudia Hernández-Bustos¹, Guillermo Gosset¹, Alfredo Martínez^{1*}

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, ²Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Mor., México.

*Corresponding author. Alfredo Martínez

Mailing address: Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3 Cuernavaca, Mor. 62250, México. Phone: (52-777) 3291601. Fax: (52-777) 3172388.

Email addresses: **SR:** sugar_cia@yahoo.com, **CHB:** gosset@ibt.unam.mx, **AM:** alfredo@ibt.unam.mx

Keywords: *Bacillus subtilis*, cellobiose, L-lactate, lactate dehydrogenase, 2,3-butanediol, fermentations

Abstract

Biodegradable plastics can be made from polylactate, which is a polymer made from lactic acid. This compound can be produced from simple sugar in culture fermentations using microorganisms; it is also possible to use renewable resources as substrates. *Bacillus subtilis* is a Gram-positive bacterium, which is a GRAS microorganism (generally regarded as safe) by the FDA. *B. subtilis* produces and secretes different kind of enzymes, such as proteases, cellulases, xylanases and amylases to utilize carbon sources more complex than the monosaccharides present in the environment. Thus, *B. subtilis* could be potentially used to hydrolyze carbohydrate polymers contained in lignocellulosic biomass to produce chemical commodities. Enzymatic hydrolysis of cellulosic fraction of agroindustrial wastes produces mainly cellobiose and less glucose. Under aerobic conditions, *B. subtilis* can be grown using cellobiose, and in this study it was proved that under anaerobic conditions, *B. subtilis* can ferment cellobiose to produce L-lactate with the 82% of the theoretical yield; with a specific rate of L-lactate production similar to that one obtained fermenting glucose. Under fermentative conditions, *B. subtilis* produces mostly L-lactate and lesser 2,3-butanediol from glucose in complex media. Thus in this study the 2,3-butanediol synthesis of *B. subtilis* was eliminated obtaining the strain CH1 *alsS*Δ. The elimination of this pathway that competed for pyruvate availability led to increase L-lactate yield in a 15% compared with the parental strain. CH1 *alsS*Δ fermented 5 and 10% of glucose to completion in mineral medium supplemented with yeast extract in four and nine days, respectively. The L-lactate yield was up to 95% using mineral media, and the optical purity of L-lactate was high because *B. subtilis* has just one L-lactate dehydrogenase.

Background

The chemical industry has come under increasing pressure to make chemical production more eco-friendly and independent from fossil resources. The development of industrial processes based on microorganisms eliminate the use or generation of hazardous substances and can support the shift from the actual fossil resources dependence toward sustainable and eco-safety industrial processes⁴.

The production of biodegradable plastics from lactic acid involves polylactate synthesis. Physical properties and biodegradation rates of polylactate can vary depending on the D- and L-enantiomers blend ⁸.

Lactic acid production using microorganisms (a biological fermentation) eliminates the hazard substances generation and the D- and L-enantiomers can be produced in an optically pure state.

Ninety percent of current commercial lactic acid (about 72000 ton/year) is produced from mono- and disaccharides by culture fermentation using lactic acid bacteria. It is also possible to use renewable resources such as agroindustrial wastes as substrates to produce lactic acid, although a pretreatment to free simple sugars is needed ⁵. Cellulose is hydrolyzed by combination of cellobiohydrolase and endoglucanase activities with cellobiose as the primary product. The ability to utilize cellobiose is widespread among gram-positive, gram-negative and *Archeal* genera ⁶.

A variety of microorganisms that produce L-lactate, such as *Escherichia coli* ^{16,17}, *Saccharomyces cerevisiae* ¹⁰, *Lactobacillus* sp ^{1, 11}, and lactic acid bacteria⁵, have been developed for increasing their L-lactate titer, rising their L-lactate specific and volumetric productivity, spreading their substrate range including pentose sugars and disaccharides and eliminating their growth requirements. Nevertheless, new biocatalysts are needed to use alternative bio-based feedstocks, like agroindustrial wastes avoiding the use of fungi cellulases, exhibiting high L-lactate yields with high chiral purity.

Bacillus subtilis is a Gram-positive bacterium, which is a GRAS microorganism (generally regarded as safe) by the FDA. *B. subtilis* can be grown using cellobiose under aerobic conditions ¹³, because it has the *celRABCD* operon which codifies for EII permease and phospho- β -glucosidase proteins ⁶. Under anaerobic conditions, *B. subtilis* produces L-lactate and 2,3-butanediol from glucose ⁹.

In this paper, we report L-lactate synthesis from cellobiose during anaerobic fermentation using *B. subtilis*. In addition, we eliminated the 2,3-butanediol production of *B. subtilis* (strain CH1 *alsSA*) increasing L-lactate yield in a 15% compared with the parental strain. CH1 *alsSA* fermented 5 and 10% of glucose completely producing just L-lactate in mineral medium supplemented with yeast extract.

Results and Discussion

***B. subtilis* produces L-lactate from cellobiose under fermentative conditions.**

B. subtilis CH1 is a prototroph strain that was constructed to avoid the auxotrophic requirements of *B. subtilis* WB700. To determine the ability of *B. subtilis* CH1 to grow using cellobiose under anaerobic conditions, the characterization of this strain using LB and MM media supplemented with cellobiose (10 g/L) was undertaken (Figs. 1A and 2A). Also, *B. subtilis* CH1 was grown in LB and MM media supplemented with glucose (10 g/L) as control (Figs. 1B and 2B).

B. subtilis CH1 grew exponentially during the first 12 h using cellobiose or glucose in LB medium (Fig. 1A and B), although the specific growth rate of strain CH1 in LB medium using cellobiose diminished 2-fold in comparison with glucose (Table 1). Although the maximum biomass obtained at the end of exponential growth was similar using cellobiose or glucose (Table 1). The specific rate of cellobiose consumption of strain CH1 in LB medium diminished 50% in comparison with glucose; however, the specific rates of cellobiose and glucose consumption were similar in MM (Table 1).

The cellobiose consumption in LB medium was retarded 6h probably because strain CH1 had a slight inhibition of cellobiose utilization due to the media components, during this time strain CH1 used them to grow increasing the lactate yield more than 100% of the theoretical (Fig. 1A and Table 2). The cellobiose utilization in MM was not retarded supporting the hypothesis that there was no cellobiohydrolase inhibition (Fig. 2A).

B. subtilis CH1 fermented cellobiose and glucose using mineral or complex medium, and produced L-lactate as main fermentation product. In all the culture fermentations, the L-lactate production specific rates were larger in the exponential than in the stationary phase (Table 2). The L-lactate production specific rates were similar using cellobiose or glucose in a complex or mineral media during stationary phase (Table 2).

Strain CH1 consumed cellobiose (10g/L) completely in both LB and MM media (Figs. 1A and 2A), and produced L-lactate with a yield of 82% of the theoretical in MM medium (Table 2).

It is known that some *Lactobacillus* spp use cellobiose as carbon source, but there is little information about lactic acid production from cellobiose. *L. delbrueckii* has obtained better yields and higher quantities of lactate⁵. Recently, Adsul *et al.* (2007) reported a *L.*

delbrueckii mutant produced 90 g/L of lactic acid from 100 g/L of cellobiose¹; however, they do not mention the optical purity of the product. The principal problem of lactic acid production in *Lactobacillus* spp has been the optical purity of the product which is not higher than 95% because some lactic acid bacteria have both L-lactate dehydrogenase and D-lactate dehydrogenase^{5,10} and the 5% of chiral impurity of the lactate may increase the cost associated with purification which is very complex to resolve.

Although the L-lactate yield and productivity of *L. delbrueckii* mutant are better than those obtained in this report, *B. subtilis* continues being another alternative to take advantage of bio-based feedstocks completely, because it can use other substrates like arabinose, and this gives a product of optical purity. To our knowledge, there is no report on cellobiose utilization and L-lactate production using *B. subtilis*.

***B. subtilis* biomass increased when MM was supplemented with yeast extract or corn liquor solids.**

The growth of *B. subtilis* in mineral medium (MM) diminished compared with complex medium like LB (Table 1). To increase both *B. subtilis* growth and L-lactate production specific rate on mineral medium, this medium was supplemented with yeast extract (YE) or corn liquor solids (CLS), components that are rich in vitamins and minerals and are not expensive.

Specific growth rate of *B. subtilis* CH1 increased 5-fold or 7-fold when MM was supplemented with YE or with CLS, respectively (Table 3). The addition of quantities larger than 8 g/L of YE or 10 g/L of CLS to mineral medium did not increase the specific growth rate of *B. subtilis* CH1, although, biomass obtained at the end of exponential phase increased in proportion with the addition of rising quantities of YE or CLS (Table 3).

In MM supplemented with YE, L-lactate yields diminished 15% in comparison with LB medium (Tables 2 and 4). In MM supplemented with CLS, L-lactate yields increased 5% in comparison with LB medium (Tables 2 and 4), although CLS had a contamination with D-lactate (Table 4), introducing a racemic mixture of L- and D-lactate.

The L-lactate production specific rates of CH1 during exponential phase of *B. subtilis* grown in MM supplemented with YE or CLS diminished 45% in comparison to LB, although L-lactate production specific rates during stationary phase were similar in LB or

MM supplemented with YE or CLS (Tables 2 and 4). Thus, we chose MM supplemented with 8 g/L of yeast extract to assess the capability of L-lactate production of *B. subtilis*.

L-lactate yield and lactate production specific rate increased when butanediol synthesis was suppressed.

Strain CH1 *alsS*⁻ was constructed to avoid the pyruvate availability competition between L-lactate production and 2,3-butanediol synthesis. In strain CH1 *alsS*⁻ butanediol production was eliminated by interrupting the gene that encodes the acetolactate synthase enzyme (ALSS), which is the first enzyme of the pathway.

Strain CH1 *alsS*⁻ was characterized under anaerobic conditions using LB medium supplemented with 20 g/L of glucose, and strain CH1 was included as a control (Fig. 3 and Table 5).

The elimination of the butanediol pathway in strain CH1 *alsS*⁻ did not affect either the growth specific rate nor the obtained maximum biomass at the end of exponential phase (Fig. 3a and Table 5).

During exponential growth, the glucose consumption specific rate of CH1 *alsS*⁻ increased 12% compared to CH1; this behavior probably caused 15% increase in L-lactate production specific rate of CH1 *alsS*⁻ compared to the control (Table 5).

During the stationary phase, the elimination of the butanediol pathway in strain CH1 *alsS*⁻ directed more carbon to lactate production, increasing a 20% rise of the L-lactate production specific rate of CH1 *alsS*⁻ compared to CH1 (Table 5).

L-lactate yield of CH1 *alsS*⁻ increased 15% up of the theoretical, and L-lactate volumetric productivity of CH1 *alsS*⁻ increased a 15% compared with the control (data not shown).

Therefore in CH1 *alsS*⁻ butanediol production was abolished completely, this strain produced just L-lactate in LB with high yield, productivity, and optically pure state, avoiding the purification from a racemic mixture.

***B. subtilis* CH1 *alsS*⁻ fermented to completion 5% and 10% glucose, and produced L-lactate as the exclusive fermentation product.**

To evaluate the ability of L-lactate production of *B. subtilis* CH1 *alsS*⁻, this strain was challenged to ferment to completion 5 and 10% of glucose, just as the same high sugar concentrations of cellulosic syrups.

Strain CH1 *alsS*⁻ was anaerobically grown using different media including LB medium, mineral medium supplemented with 8 g/L of yeast extract (MM+YE) and MM. All of these media were supplemented with 5 or 10% of glucose. Biomass formation, glucose consumption and L-lactate production were evaluated (Fig. 4).

When LB was supplemented with 5% or 10% of glucose, the specific growth rate of CH1 *alsS*⁻ was not affected by the high glucose concentration (Tables 5 and 6). CH1 *alsS*⁻ grew exponentially during the first 10 h, using glucose and components of the medium. During exponential growth, the specific rate of glucose consumption increased by 10% when the glucose concentration was augmented from 2 to 5% or 10% (Tables 5 and 6). During exponential growth, the specific rate of L-lactate production increased 20% and 55% when CH1 *alsS*⁻ grown in LB was supplemented from 2 to 5% or 10% of glucose, respectively (Tables 5 and 7).

During the stationary phase, L-lactate production specific rates were similar when CH1 *alsS*⁻ grown in LB was supplemented with 5% or 10% of glucose. CH1 *alsS*⁻ produced L-lactate using both glucose and components of the medium, obtaining L-lactate yields from glucose up to 100% of the theoretical in LB supplemented with 5 or 10% of glucose. Although the fermentation with 10% of glucose was stopped at 174h of elapsed time, CH1 *alsS*⁻ consumed just 51 g/L of glucose and produced only L-lactate (Table 7).

When MM was supplemented with 5% or 10% of glucose, the specific growth rate of CH1 *alsS*⁻ was similar in both sugar concentrations (Table 6). CH1 *alsS*⁻ grew exponentially during first 26 h, consuming 3 g/L of glucose and producing only L-lactate with yields up to 97% of the theoretical. During exponential phase, glucose consumption specific rate of CH1 *alsS*⁻ increased 25% when the glucose concentration was augmented from 5 to 10%, causing a 5% increase of the L-lactate specific production rate (Tables 6 and 7).

During the stationary phase, the specific rate of L-lactate production of CH1 *alsS*⁻ increased 85% when glucose concentration was increased from 5 to 10% (Table 7), although CH1 *alsS*⁻ did not finish the glucose in 9 days of elapsed time. The L-lactate yield from glucose diminished from 96% to 92% when glucose concentration was increased from 5 to 10%, because CH1 *alsS*⁻ produced small quantities of acetic acid in this condition (data not shown).

Because of *B. subtilis* growth rate diminishes in MM although the MM has been supplemented with 1, 5 or 10% of glucose (Table 1 and 6), the MM was supplemented with 8g/L of yeast extract (YE) besides of glucose.

When MM supplemented with 8g/L of yeast extract (MM+YE) was mixed with 5% or 10% of glucose, the specific growth rate of CH1 *alsS*⁻ was similar in both sugar concentrations (Table 6). CH1 *alsS*⁻ grew exponentially during first 10 h, using glucose and components of the medium. During exponential growth, the specific rate of glucose consumption had a 2-fold increase when glucose concentration was augmented from 5 to 10%, and in consequence the consumed glucose had an 80% increase as well (Table 6). During exponential growth, the L-lactate specific production rate had a 10% increase when CH1 *alsS*⁻ grown in LB was supplemented from 5% to 10% of glucose (Table 7).

During the stationary phase, L-lactate specific production rate of CH1 *alsS*⁻ diminished to 30% when glucose concentration was increased from 5% to 10% using MM+YE. CH1 *alsS*⁻ produced L-lactate using both glucose and components of the medium, obtaining L-lactate yields from glucose up to 100% of the theoretical in MM+YE supplemented with 5 or 10% of glucose. In fact, CH1 *alsS*⁻ fermented 5 or 10% of glucose using MM+YE medium to completion producing exclusively L-lactate with volumetric productivities of 0.78 and 0.54, respectively (Table 7).

The final lactate titer of 105 g/L for strain CH1 *alsS*⁻ compare favorably with recombinant bacteria such as *L. lactis*² and *E. coli* SZ194¹⁵, and exceed the performance of previously engineered biocatalysts^{10,12,17}. The L-lactate yield of CH1 *alsS*⁻ more than 100% of the theoretical using glucose implies that this strain can use components of the medium to produce L-lactate.

Conclusions

We confirmed that *Bacillus subtilis* can use cellobiose under fermentative conditions and produce L-lactate with high optical purity.

We established that a recombinant *B. subtilis* strain was able to produce high yields of L-lactate with high optical purity, using an inexpensive mineral medium supplemented with 0.8% of yeast extract.

The results in this study show that it can be developed a process of L-lactate production using *B. subtilis* taking advantages of its cellobiose utilization capability, high lactate yields and osmotic stress high resistance.

B. subtilis CH1 *alsS*⁻ can also be cultivated at high density to increase the L-lactate volumetric productivity.

Methods

Strains and Culture Media

Bacillus subtilis CH1 and CH1 *alsS*⁻ strains were used in all experiments. *B. subtilis* CH1 is a prototroph strain obtained as described in ⁹ from *B. subtilis* WB700 strain (168, *trpC2*, $\Delta nprE$, $\Delta aprE$, Δepr , Δbpf , Δmpr , $\Delta nprB$, $\Delta vrpE$, *Ery*^r, *Lyn*^r)¹⁴. Inactivation of the *alsS* gene of *B. subtilis* CH1 strain to generate strain CH1 *alsS*⁻ (168, $\Delta nprE$, $\Delta aprE$, Δepr , Δbpf , Δmpr , $\Delta nprB$, $\Delta vrpE$, $\Delta alsS$, *Ery*^r, *Lyn*^r, *Spt*^r) was obtained as described in ⁹.

Culture media were Luria Bertani (LB) or mineral medium (MM)⁷. LB containing (per liter) 5 g yeast extract, 10 g tryptone, 5 g NaCl. LB was supplemented with different concentrations of celobiose or glucose as indicated in Results section. MM containing (per liter) 4 g (NH₄)₂SO₄, 5.32 g K₂HPO₄, 6.4 g KH₂PO₄, 10 mg citric acid, 0.4 g MgSO₄•7H₂O, 0.5 mg MnCl₂, 4 mg CaCl₂, and 3 mg FeSO₄•7H₂O, pH was adjusted at 7.2 with NaOH. MM was supplemented with different concentrations of celobiose or glucose, as indicated in Results section. MM added with glucose was supplemented with different concentrations of yeast extract (YE) or corn liquor solids (CLS), as indicated in Results section. When MM was supplemented with 5% or 10% of glucose, 2 mM of betaine (a non-metabolized protective osmolyte)¹⁵ was added.

Inoculum preparation and fermentation conditions

Strains from frozen vials were plated in Petri dish fermentation media and incubated overnight at 37°C. Cells from plates were seed to inoculate a 250 mL flask with 150 mL of the same fermentation media and incubated overnight at 37°C, 120 rpm. Erythromycin (5 µg/ml) and lyncomycin (5 µg/ml) were added to CH1 inoculum, and spectinomycin (100 µg/ml) was added to CH1 *alsS*⁻ inoculum. Cells from flasks were centrifugated and utilized as inocula at an initial optical density of 0.1 at 600 nm (OD₆₀₀). Fermentations were

performed in duplicate in miniflaskers³ containing 200 mL of fermentation culture media as indicated in Results section. Working conditions were 37°C, 100 rpm of agitation speed, and pH 7 (controlled by automatic additions of 2 or 4N KOH). Growth was followed by measuring OD₆₀₀ with a spectrophotometer (Lambda 11, Perkin Elmer, Pomona, CA). Supernatants were separated, from samples periodically taken, and conserved at -20°C for later HPLC analysis.

Analytical methods

Culture data show the average of two fermentations. OD₆₀₀ was converted to dry cellular weight using a standard curve (1 OD₆₀₀ = 0.35 g/L of dry cellular weight, DCW). All values of biomass, substrates and products were corrected by dilution factor. Glucose and fermentation products in supernatants were measured by HPLC (Model 996, Waters, Millipore Co., Milford, MA) equipped with a refractive index and an UV detector. Separations were carried out at 50°C, using an Aminex HPX-87H column (300 X 7.8 mm; BioRad), and 5 mM H₂SO₄ as mobile phase, at a flow rate of 0.5 mL/min (injection volume, 20 µl). L-lactate was measured using a biochemistry analyzer (YSI 2700 SELECT™) which contains a specific L-lactate oxidase enzyme immobilized in the YSI L-lactate membrane. The purity of L-lactate was evaluated as follows: optical purity = (L-lactate quantity determined in YSI analyzer * 100) / total lactic acid quantity determined in HPLC. In the case of MM supplemented with yeast extract or corn liquor solids, glucose was determined with the biochemistry analyzer using an YSI D-glucose membrane.

Authors' contributions

SR: participated in the design of this study, performance of cloning, construction of the homolactic fermentative strain, fermentations, data analysis and writing of the manuscript.

CHB: participated in the construction of the prototroph strain, fermentations and data analysis. **GG:** review and commented the manuscript. **AM:** participated in the study design, results analysis and writing of the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

Acknowledgments

We thank to Georgina Hernández for HPLC analysis and to Mercedes Enzaldo, Ricardo Ciria and Alma Valle and for technical support. We thank S.L. Wong (Calgary University,

Ca) for kindly providing the *B. subtilis* WB700 strain. This research was supported by the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) grants: CONACyT – SAGARPA 2004-C01-224 and CONACyT – Estado de Morelos MOR-2004-C02-048. Susana Romero was supported by CONACyT scholarship 184798.

References

- (1) Adsul M, Khire J, Bastawde K, Gokhale D. Production of lactic acid from cellobiose and celotriose by *Lactobacillus delbrueckii* mutant Uc-3. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:5055-5057.
- (2) Bai DM, Zhao XM, Li XG, Xu SM. Strain improvement and metabolic flux analysis in the wild-type and a mutant *Lactobacillus lactis* strain for L(+)-lactic acid production. *Biotechnol Bioeng.* 2004;88:681-689.
- (3) Beall DS, Ohta K, Ingram LO. Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 1991;38:296-303.
- (4) Hatti-Kaul R, Törnvall U, Gustafsson L, Börjesson P. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals- a cradle-to-grave perspective. *Trends Biotechnol.* 2007;25:119-124.
- (5) Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microbiol Technol.* 2000;26:87-107.
- (6) Lai X, Davis FC, Hespell RB, Ingram LO. Cloning of cellobiose phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase genes: functional expression in recombinant *Escherichia coli* and identification of a putative binding region for disaccharides. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:355-363.
- (7) Martínez A, Ramírez OT, Valle F. Improvement of culture conditions to overproduce b-galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997;47:40-45.
- (8) Narayanan N, Roychoudhury PK, Srivastava A. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic J Biotechnol.* 2004;7:167-179.
- (9) Romero S, Merino E, Gosset G, Martinez A. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73.
- (10) Saitoh S, Ishida N, Onishi T et al. Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:2789-2792.

- (11) Singh SK, Ahmed SU, Pandey A. Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochem.* 2006;41:991-1000.
- (12) Skory C. Lactic acid production by *Rhizopus oryzae* transformants with modified lactate dehydrogenase activity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;64:237-242.
- (13) Tobisch S, Glaser P, Krüger S, Hecker M. Identification and characterization of a new b-glucoside utilization system in *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol.* 1997;179:496-506.
- (14) Ye R, Yang LP, Wong SL. Construction of protease deficient *Bacillus subtilis* strains for expression studies: inactivation of seven extracellular proteases and the intracellular lonA protease. *Proc International symposium on recent advances in bioindustry.* 1996;160-169.
- (15) Zhou S, Grabar TB, Shanmugam KT, Ingram LO. Betaine tripled the volumetric productivity of D(-)-lactate by *Escherichia coli* strain SZ132 in mineral salts medium. *Biotechnol Lett.* 2006;28:671-676.
- (16) Zhou S, Shanmugam KT, Yomano LP, Grabar TB, Ingram LO. Fermentation of 12% (w/v) glucose to 1.2 M lactate by *Escherichia coli* strain SZ194 using mineral salts medium. *Biotechnol Lett.* 2006;28:663-670.
- (17) Zhou S, Yomano LP, Shanmugam KT, Ingram LO. Fermentation of 10% (w/v) sugar to D(-)-lactate by engineered *Escherichia coli* B. *Biotechnol Lett.* 2005;27:1891-1896.

Figure legends

Figure 1 - Anaerobic characterization of *Bacillus subtilis* CH1 in LB broth supplemented with 10 g/L of sugar.

(A) Cellobiose fermentation, (B) Glucose fermentation. (■) Biomass formation, (●) sugar consumption, (◆) L-lactate production.

Figure 2 - Anaerobic characterization of *Bacillus subtilis* CH1 in Mineral Medium supplemented with 10 g/L of sugar.

(A) Cellobiose fermentation, (B) Glucose fermentation. (■) Biomass formation, (●) sugar consumption, (◆) L-lactate production.

Figure 3 - Anaerobic characterization of *B. subtilis* CH1 (■) and CH1 *alsS*- (●) in LB-Glucose 20 g/L.

(A) Biomass formation, (B) Glucose consumption, (C) L-Lactate, and (D) 2,3-Butanediol production.

Figure 4 - Anaerobic characterization of *B. subtilis* CH1 *alsS*- using different media supplemented with 50 g/L (A, C, E) or 100 g/L (B, D, F) of glucose.

(A, B) Biomass formation, (C, D) Glucose consumption, and (E, F) L-lactate production using different media such as (■) Luria Broth, (◆) mineral medium supplemented with 8 g/L of yeast extract, or (●) mineral medium.

Fig. 1.

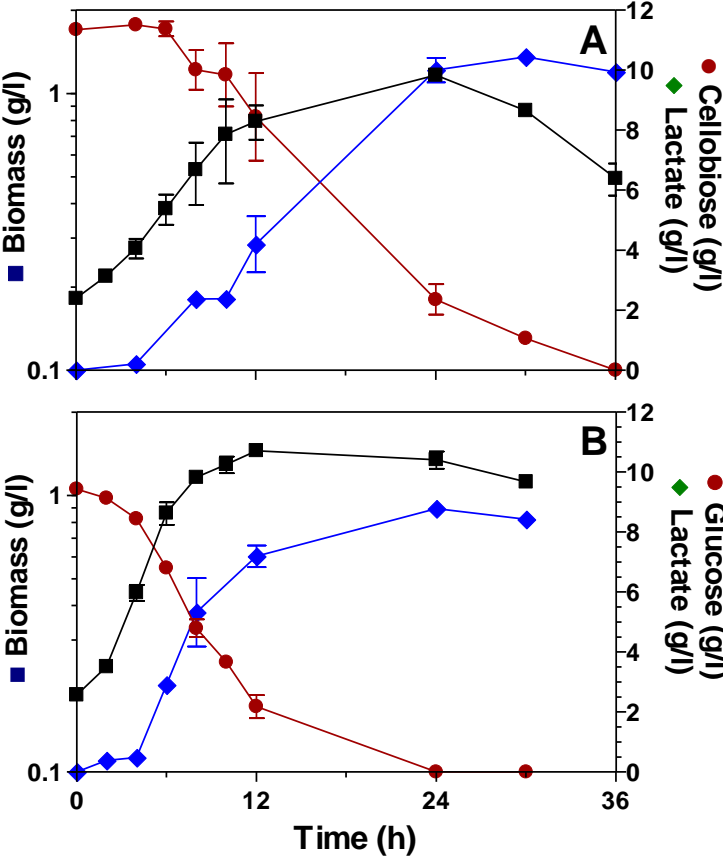


FIG. 2

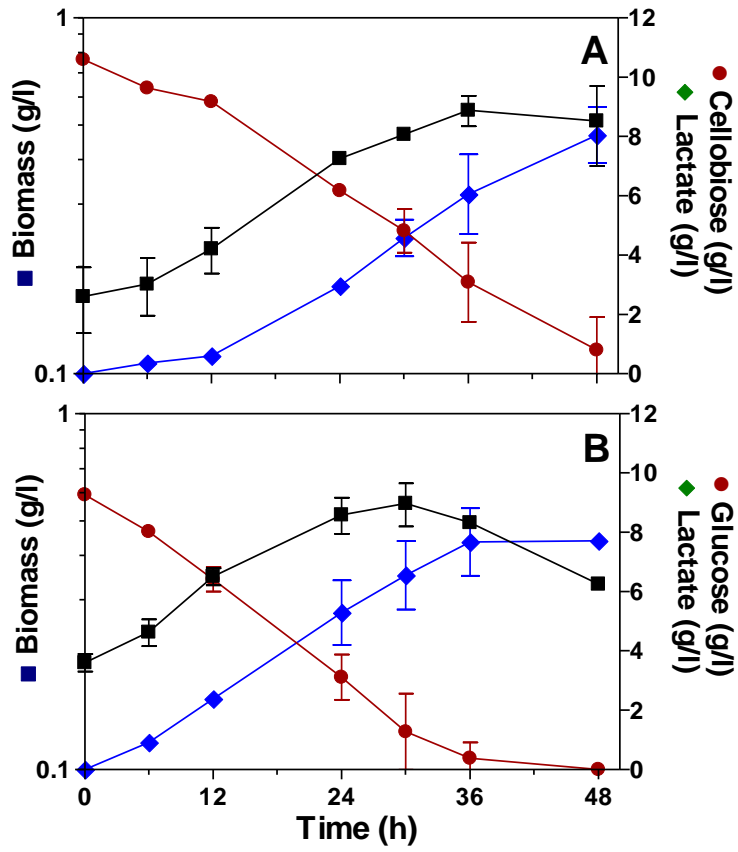


FIG. 3.

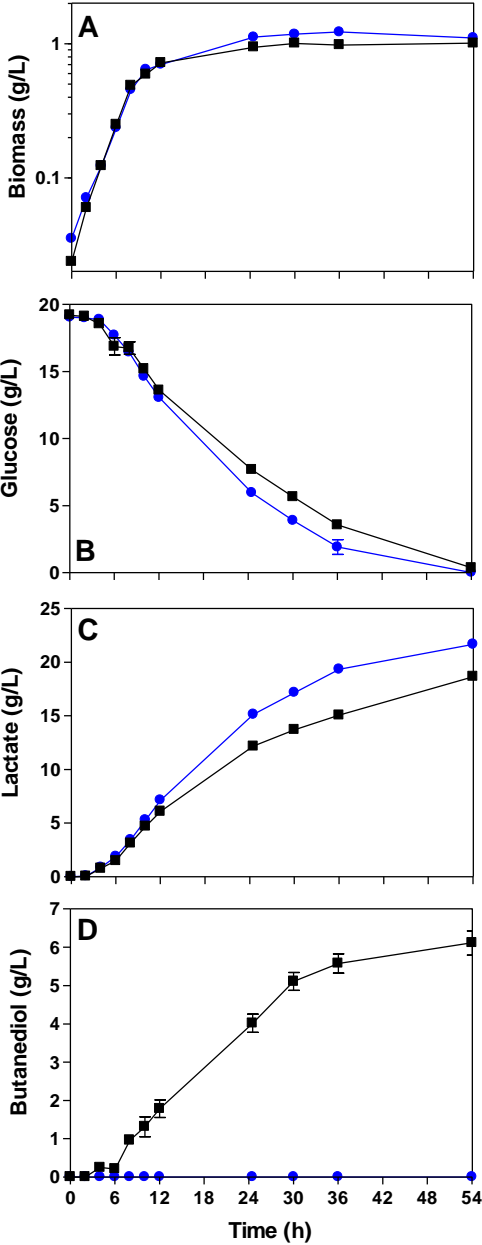


FIG. 4.

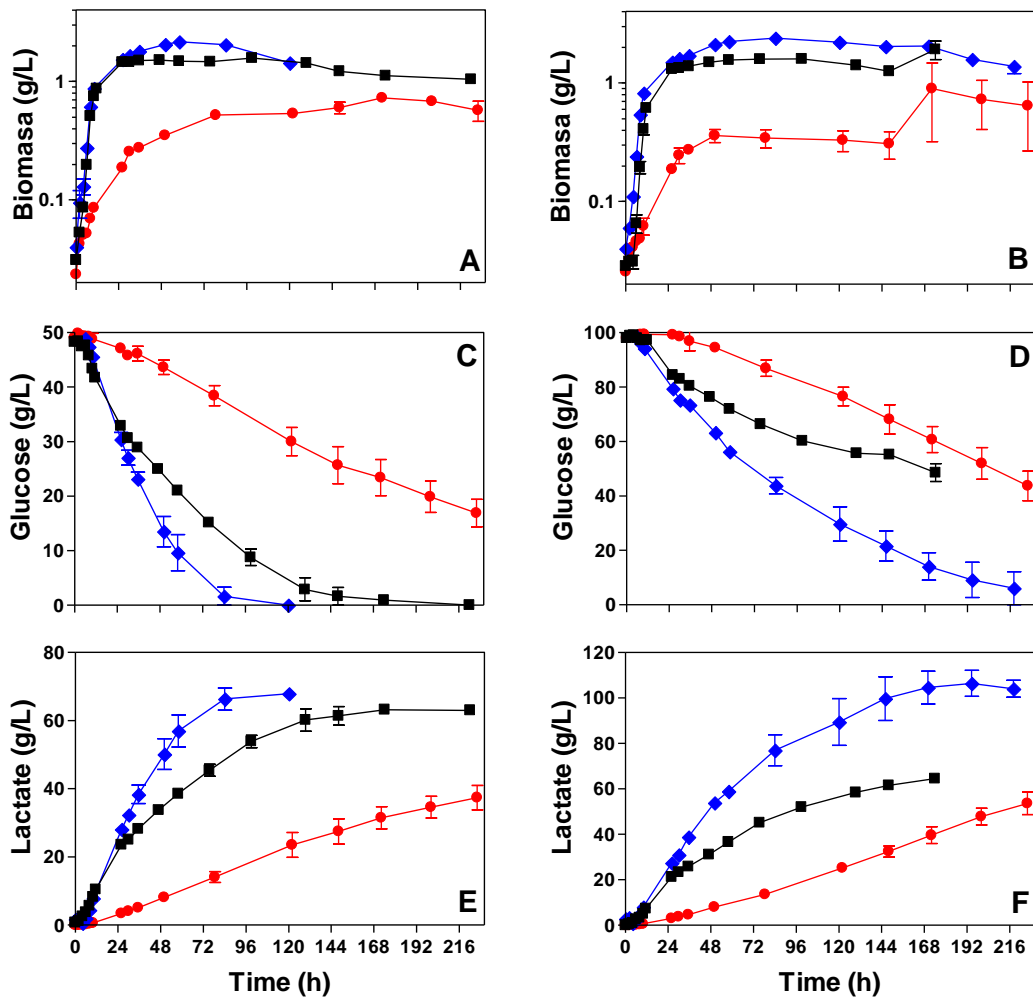


Table 1. Kinetic parameters for batch fermenter cultures of *B. subtilis* CH1 grown in luria or mineral medium supplemented with glucose or cellobiose (10g/L).

Medium	Sugar	^a X _{MAX} (g/l)	μ (h ⁻¹)	^b Y _{X/S} (g _{DWC} /g _S)	^c q _S (g _S /g _{DWC} *h)	^d Consumed sugar (g/l)
Luria	Glucose	0.67	0.30	0.26	1.17	2.6
	Cellobiose	0.61	0.13	0.23	0.60	2.9
Mineral	Glucose	0.32	0.04	0.05	0.77	6.1
	Cellobiose	0.30	0.04	0.06	0.66	4.8

^aMaximum biomass obtained at the end of exponential growth.

^bBiomass yield from substrate during exponential growth.

^cq_S: Specific rate of sugar consumption during exponential phase.

^dConsumed sugar during exponential growth.

Table 2. Kinetic parameters for L-lactate production for batch fermenter cultures of *B. subtilis* CH1 grown in luria or mineral medium supplemented with glucose or cellobiose (10g/L).

Medium	Sugar	^a Y _{P/S} (g _P /g _S)	^b q _P (g _P /g _{DWC} *h)	^c q _P (g _P /g _{DWC} *h)	^d Q _P (g _P /l*h)	^e Final L-lactate (g/l)
Luria	Glucose	1.23	2.25	0.28	0.48	11.6
	Cellobiose	1.14	1.69	0.26	0.36	13.0
Mineral	Glucose	0.83	0.66	0.21	0.16	7.7
	Cellobiose	0.82	0.58	0.38	0.17	8.1

^aL-lactate yield from sugar at the end of fermentation.

^bq_P: Specific rate of L-lactate production during exponential growth.

^cq_P: Specific rate of L-lactate production during stationary phase.

^dQ_P: Volumetric productivity of L-lactate.

^eL-lactate produced at the end of stationary phase.

Table 3. Kinetic parameters for batch fermenter cultures of *B subtilis* CH1 grown in mineral medium-glucose (10g/L) supplemented with different concentrations of yeast extract (YE) or corn liquid solids (CLS).

Supplement	^a X _{MAX} (g/l)	μ (h ⁻¹)	^b Y _{X/S} (g _{DWC} /g _S)	^c q _S (g _S /g _{DWC} *h)	^d Consumed sugar (g/l)
YE					
8 g/l	0.89	0.23	0.17	1.36	5.30
10 g/l	0.95	0.23	0.17	1.31	5.48
12 g/l	1.25	0.21	0.17	1.19	7.18
CLS					
5 g/l	0.30	0.24	0.21	1.17	1.45
10 g/l	0.40	0.31	0.26	1.21	1.55
15 g/l	0.68	0.27	0.18	1.49	3.73
25 g/l	1.25	0.25	0.27	0.96	4.70
30 g/l	1.18	0.28	0.20	1.38	5.77

^aMaximum biomass obtained at the end of exponential growth.

^bBiomass yield from substrate during exponential growth.

^cq_S: Specific rate of sugar consumption during exponential phase.

^dConsumed sugar during exponential growth.

Table 4. Kinetic parameters for L-lactate production for batch fermenter cultures of *B. subtilis* CH1 grown in mineral medium-glucose (10g/L) supplemented with different concentrations of yeast extract (YE) or corn liquid solids (CLS).

Supplement	^a Y _{P/S} (g _P /g _S)	^b q _P (g _P /g _{DWC} *h)	^c q _P (g _P /g _{DWC} *h)	^d Q _P (g _P /l*h)	^e Final L-lactate (g/l)
YE					
8 g/l	0.76	1.06	0.38	0.52	8.31
10 g/l	0.71	0.94	0.32	0.47	7.48
12 g/l	0.71	0.97	0.19	0.47	7.51
CSL					
25 g/l	0.88	0.82	0.27	0.52	8.37
30 g/l	0.85	1.22	0.26	0.51	8.16

^aL-lactate yield from glucose at the end of fermentation.

^bq_P: Specific rate of L-lactate production during exponential growth.

^cq_P: Specific rate of L-lactate production during stationary phase.

^dQ_P: Volumetric productivity of L-lactate.

^eL-lactate produced at the end of stationary phase.

Table 5. Kinetic parameters for batch fermenter cultures of *B. subtilis* CH1 and CH1 *alsS*- grown in luria medium supplemented with glucose (20 g/L).

<i>B. subtilis</i> strain	^a X _{MAX} (g/l)	μ (h ⁻¹)	^b q _S (g _S /g _{DWC} *h)	^b q _P (g _P /g _{DWC} *h)	^c q _S (g _S /g _{DWC} *h)	^c q _P (g _P /g _{DWC} *h)
CH1	0.46	0.34	1.79	2.29	0.52	0.47
CH1 <i>alsS</i> -	0.42	0.32	1.99	2.63	0.51	0.56

^aMaximum biomass obtained at the end of exponential growth.

^bDuring exponential growth.

^cDuring stationary growth.

Table 6. Kinetic parameters for batch fermenter cultures of *B. subtilis* CH1 *alsS*- grown in luria medium (LB), mineral medium with 8g/L of yeast extract (MM+YE), or mineral medium (MM), supplemented with 50 or 100 g/L of glucose (Glc).

Media	^a X _{MAX} (g/l)	μ (h ⁻¹)	^b Y _{X/S} (g _{DWC} /g _S)	^c q _S (g _S /g _{DWC} *h)	^d Consumed sugar (g/l)
50 g/L Glc					
LB	0.72	0.30	0.14	2.23	5.25
MM+YE	0.83	0.27	0.16	1.74	5.26
MM	0.16	0.06	0.06	1.09	2.91
100 g/L Glc					
LB	0.68	0.40	0.14	2.12	4.80
MM+YE	0.78	0.29	0.09	3.45	9.26
MM	0.16	0.07	0.06	1.39	3.11

^aMaximum biomass obtained at the end of exponential growth.

^bBiomass yield from glucose during exponential growth.

^cq_S: Specific rate of glucose consumption during exponential phase.

^dConsumed glucose during exponential growth.

Table 7. Kinetic parameters for L-lactate production for batch fermenter cultures of *B subtilis* CH1 *alsS*- grown in luria medium (LB), mineral medium with 8g/L of yeast extract (MM+YE), or mineral medium (MM), supplemented with 50 or 100 g/L of glucose (Glc).

Media	^a Y _{P/S} (g _P /g _S)	^b q _P (g _P /g _{DWC} *h)	^c q _P (g _P /g _{DWC} *h)	^d Q _P (g _P /l*h)	^e Final L-lactate (g/l)
50 g/L Glc					
LB	1.30	3.18	0.32	0.46	63.11
MM+YE	1.34	2.46	0.46	0.78	68.04
MM	0.96	1.28	0.36	0.17	37.40
100 g/L Glc					
LB	1.27	4.11	0.27	0.37	64.51
MM+YE	1.09	2.68	0.30	0.54	105.59
MM	0.92	1.33	0.67	0.24	53.69

^aL-lactate yield from glucose at the end of fermentation.

^bq_P: Specific rate of L-lactate production during exponential growth.

^cq_P: Specific rate of L-lactate production during stationary phase.

^dQ_P: Volumetric productivity of L-lactate.

^eL-lactate produced at the end of stationary phase.

RESUMEN DE RESULTADOS DE PRODUCCIÓN DE LACTATO POR *Bacillus subtilis*

B. subtilis CH1 (WB700 protótrofa, Cm^R, Lin^R, Eri^R) fermenta celobiosa produciendo mayoritariamente L-lactato.

B. subtilis CH1 creció exponencialmente durante las primeras 12 h del cultivo utilizando glucosa o celobiosa, aunque su velocidad de crecimiento fue mayor en glucosa, tanto en medio mineral como en el medio rico (LB). La cepa CH1 consumió 10 g/L de celobiosa en medio mineral produciendo L-lactato con rendimientos mayores al 82% respecto del máximo teórico.

Cabe mencionar que *B. subtilis* disminuyó su velocidad de crecimiento y su biomasa en medio mineral respecto a su crecimiento en un medio rico (LB), por lo que se llevaron a cabo fermentaciones de *B. subtilis* CH1 evaluando diferentes composiciones de medios de cultivo, tratando de incrementar su velocidad de crecimiento y de aumentar su biomasa. Se decidió complementar el medio mineral con extracto de levadura o sólidos de licor de maíz debido a que son fuentes ricas en vitaminas y minerales y además son baratos.

Se observó que el medio mineral complementado con extracto de levadura (EL) o sólidos de licor de maíz (SLM), *B. subtilis* incrementó su biomasa de manera directamente proporcional a la cantidad de EL o SLM adicionado. Sin embargo, a concentraciones mayores de 8 g/L de EL o de 10 g/L de SLM, la velocidad de crecimiento de *B. subtilis* ya no se incrementó. Cabe mencionar que en los diferentes medios analizados se produjo L-lactato. Sin embargo, en los SLM se observaron ciertas cantidades de D-lactato, que contaminaron la producción de L-lactato final.

La interrupción de la vía de butanodiol permite incrementar el rendimiento de lactato y su velocidad de producción.

Como se mencionó previamente, se construyó e integró el vector (pTOPO-*alsS::Sp η*) en el genoma de *B. subtilis* CH1, con el objeto de interrumpir el locus *alsS* y bloquear la producción de butanodiol. A la cepa obtenida de esta transformación se le denominó CH1 Δ *alsS* (CH1 *alsS::Sp η*), se verificó en

HPLC para que no produjera butanodiol. Se llevó a cabo la caracterización de las cepas de *B. subtilis* crecidas en medio rico suplementado con glucosa para promover el metabolismo anaeróbico. Aún cuando la cepa parental CH1 y la cepa modificada CH1 $\Delta alsS$ prácticamente tuvieron la misma velocidad de crecimiento (alrededor de $\mu = 0.44 \text{ h}^{-1}$), la cepa CH1 $\Delta alsS$ consumió más rápido glucosa y también incrementó su velocidad de producción de lactato, lo cual se observó especialmente en la fase estacionaria.

***B. subtilis* CH1 $\Delta alsS$ pudo fermentar completamente 50 ó 100 g/L de glucosa produciendo L-lactato como producto de fermentación mayoritario.**

Se evaluó la capacidad de *B. subtilis* para producir lactato a partir de 50 g/L o 100 g/L de glucosa. Se valoró este comportamiento en tres diferentes medios de cultivo: medio luria (LB), medio mineral (MM) y medio mineral suplementado con 8 g/L de extracto de levadura (MM+EL).

En **MM**, la cepa CH1 $\Delta alsS$ tuvo velocidades de crecimiento similares en ambas concentraciones de glucosa ($\mu = 0.06 \text{ h}^{-1}$ en 50g/L de Glc y $\mu = 0.07 \text{ h}^{-1}$ en 100g/L de Glc), que fueron las más bajas de los tres medios analizados. La cepa comenzó el consumo de glucosa y producción de lactato desde fase exponencial hasta estacionaria. En 9 días de fermentación, la cepa sólo consumió 37 de los 50 g/L de glucosa, sin embargo el rendimiento de conversión de glucosa consumida en lactato fue del 96% respecto del máximo teórico. En el caso del cultivo de 100 g/L, la cepa sólo consumió 54 g/L, con un rendimiento del 92% respecto del teórico. Esta disminución en el rendimiento es debida a que se detectaron pequeñas cantidades de acético en estos cultivos.

En **medio LB**, la cepa CH1 $\Delta alsS$ aumentó un 25% su velocidad de crecimiento en el cultivo con 100g/L de glucosa respecto al de 50g/L. La cepa comenzó el consumo de glucosa y producción de lactato desde la fase exponencial y continuó hasta la fase estacionaria. En seis días de fermentación, la cepa consumió los 50g/L de glucosa produciendo 63 g/L de lactato. Cabe mencionar que si se considera el rendimiento de lactato desde glucosa, sólo deberían producirse 50g/L de lactato; sin embargo,

hemos observado que cuando *B. subtilis* crece en un medio rico, puede tomar componentes del medio y producir lactato aumentando de esta forma la concentración final de lactato producida.

En **MM+EL**, la cepa CH1 $\Delta alsS$ tuvo velocidades de crecimiento similares en ambas concentraciones de glucosa analizadas ($\mu=0.28 \text{ h}^{-1}$), y la biomasa máxima obtenida fue mayor en este medio que en los otros dos analizados. La cepa comenzó el consumo de glucosa y producción de lactato desde la fase exponencial y continuó hasta la fase estacionaria. En 4 días de fermentación, la cepa consumió los 50g/L de glucosa produciendo 68 g/L de lactato. Este comportamiento también se observó en el cultivo de 100 g/L de glucosa, la cual fue consumida totalmente en 9 días de fermentación produciendo 105 g/L de lactato. La cepa CH1 $\Delta alsS$ generó las mejores productividades volumétricas de lactato en el MM+EL.

UTILIZACIÓN DE XILOSA COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO POR *Bacillus subtilis*

Obtención de mutantes espontáneas derivadas de *B. subtilis* que pueden utilizar xilosa como única fuente de carbono.

La cepa CH1 *alsS*⁻ se sembró en cajas que contenían medio mineral M9 suplementado con 0.2% de xilosa (M9-xil) incubándose a 37°C durante 72 h. Posteriormente, las colonias observadas fueron resembradas en otra caja M9-xil, incubándose nuevamente a 37°C durante 48 h. Por último se realizó un tercer pase, cuya incubación fue a 37°C y duró 24 h. Al final, se obtuvieron tres tamaños de colonias: grandes, medianas y chicas. De cada tipo de colonia se aisló una en tubos que contenían M9-xil Eri⁵ Lin⁵ y, se congelaron con glicerol,

Se decidió trabajar con la cepa capaz de utilizar xilosa como única fuente de carbono y que generó las colonias más grandes, a ésta se le denominó CH1 *alsS*⁻, *xyI*^{*}.

Expresión del transportador de glucosa *glcP_{BS}* en *B. subtilis* para utilizar xilosa como única fuente de carbono.

Paulsen *et al.* (1998) al obtener mutantes de *B. subtilis* que exhibían resistencia a la represión catabólica, observaron que las mutaciones se presentaron en (41):

(1) El gen *ptsG*, el cual codifica para la enzima II específica para glucosa en PTS (2). El gen *glcT*, que codifica un antiterminador transcripcional, el cual controla la expresión del gen *ptsG*. Y (3) el gen *glcP*. El producto del gen *glcP* es la proteína GlcP que es una permeasa de Glucosa/Manosa:H⁺, miembro de la familia simporte de fucosa/ glucosa/galactosa: H⁺ (FGHS).

En experimentos realizados en *E. coli* RE707 (Glc-, Man-) y *E. coli* RE777 (Gal-) encontraron que GlcP permite la entrada de glucosa y manosa, pero no de galactosa. Así mismo, permite la entrada de 2-deoxiglucosa y metil α -glucósido. La glucosa permeasa funciona por una fuerza protón motriz. Paulsen, *et al.* (1998) concluyeron que la GlcP transporta aldohexosas de la

configuración gluco (manno), sin reconocimiento del grupo hidroxilo en la posición 2, pero presenta una estereoespecificidad en el grupo hidroxilo del carbono 4.

La xilosa es una aldopentosa cuya estructura en el espacio es parecida a la glucosa, esta característica permitió plantear el uso de GlcP para transportar a esta pentosa.

En el cepario del laboratorio se contaba con un plásmido replicativo para *B. subtilis* que tiene clonada la permeasa de glucosa (*glcP*) llamado pE18P43*glcP* (construido por Natividad Cabrera).

La cepa *B. subtilis* 168 protótrofa se transformó con los plásmidos pE18P43*glcP* (que contiene al gen que codifica para la permeasa) y pE18P43 (plásmido vacío, Wu, 1999), obteniéndose las cepas 168Trp⁺/*glcP* y 168Trp⁺/P43, respectivamente.

Cepas Caracterizadas

Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización a nivel fermentador de las siguientes cepas:

- *B. subtilis* CH1 *alsS* (cepa con 7 supresiones-delecciones de proteasas mayoritarias, protótrofa, $\Delta alsS$)
- *B. subtilis* CH1 *alsS-xi*^{*} (CH1, mutante espontánea capaz de transportar xilosa) denominada **cepa mutante**.
- *B. subtilis* 168Trp⁺/P43 (cepa protótrofa, que contiene el vector vacío).
- *B. subtilis* 168Trp⁺/*glcP* (168, que contiene el vector con la permeasa de glucosa, *glcP*, bajo la regulación de un promotor constitutivo P43), denominada **cepa transformada**.

La caracterización se llevó a cabo bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, en medio mineral suplementado con glucosa, xilosa o mezclas glucosa-xilosa.

CULTIVOS AIREADOS

Las condiciones en aerobiosis fueron: Medio mineral (Martinez *et al.*, 1997), Azúcar: Glucosa, Xilosa, o su mezcla. Concentración inicial de azúcar: 10 g/L (en las mezclas glc-xil, 5 g/L de cada azúcar), Volumen : 500 mL, T: 37°C, Velocidad de agitación: 600 rpm, OD_{600nm} inicial: 0.2, KOH: 2N, pH: 7, vvm: 1. Todos los cultivos se hicieron por duplicado.

En la figura 7 se muestran el crecimiento, consumo de glucosa y formación de productos de las cepas CH1 *alsS*⁻, CH1 *alsS*⁻,xil*, 168Trp⁺/P43 y 168Trp⁺/*glcP* en condiciones aireadas y utilizando glucosa como única fuente de carbono.

En la figura 8 se muestran el crecimiento, consumo de xilosa y formación de productos de las cepas CH1 *alsS*⁻,xil* y 168Trp⁺/*glcP* en condiciones aireadas y utilizando xilosa como única fuente de carbono.

En la figura 9 se muestran el crecimiento, consumo de sustrato y formación de productos de las cepas CH1 *alsS*⁻, CH1 *alsS*⁻, xil*, 168Trp⁺/P43 y 168Trp⁺/*glcP* en condiciones aireadas y utilizando glucosa y xilosa como fuentes de carbono.

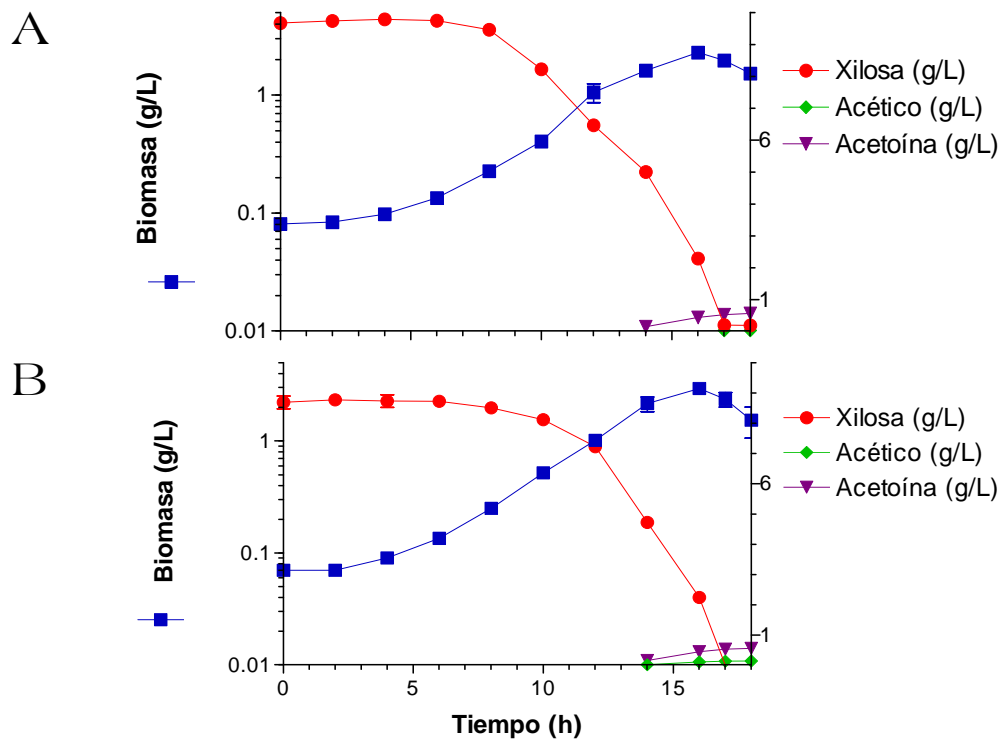


Figura 8. Cinéticas de los cultivos aeróbicos en medio mineral con xilosa. Cepas A) CH1 *alsS- xil** (cepa mutante) y B) 168Trp⁺/*glcP* (cepa transformada).

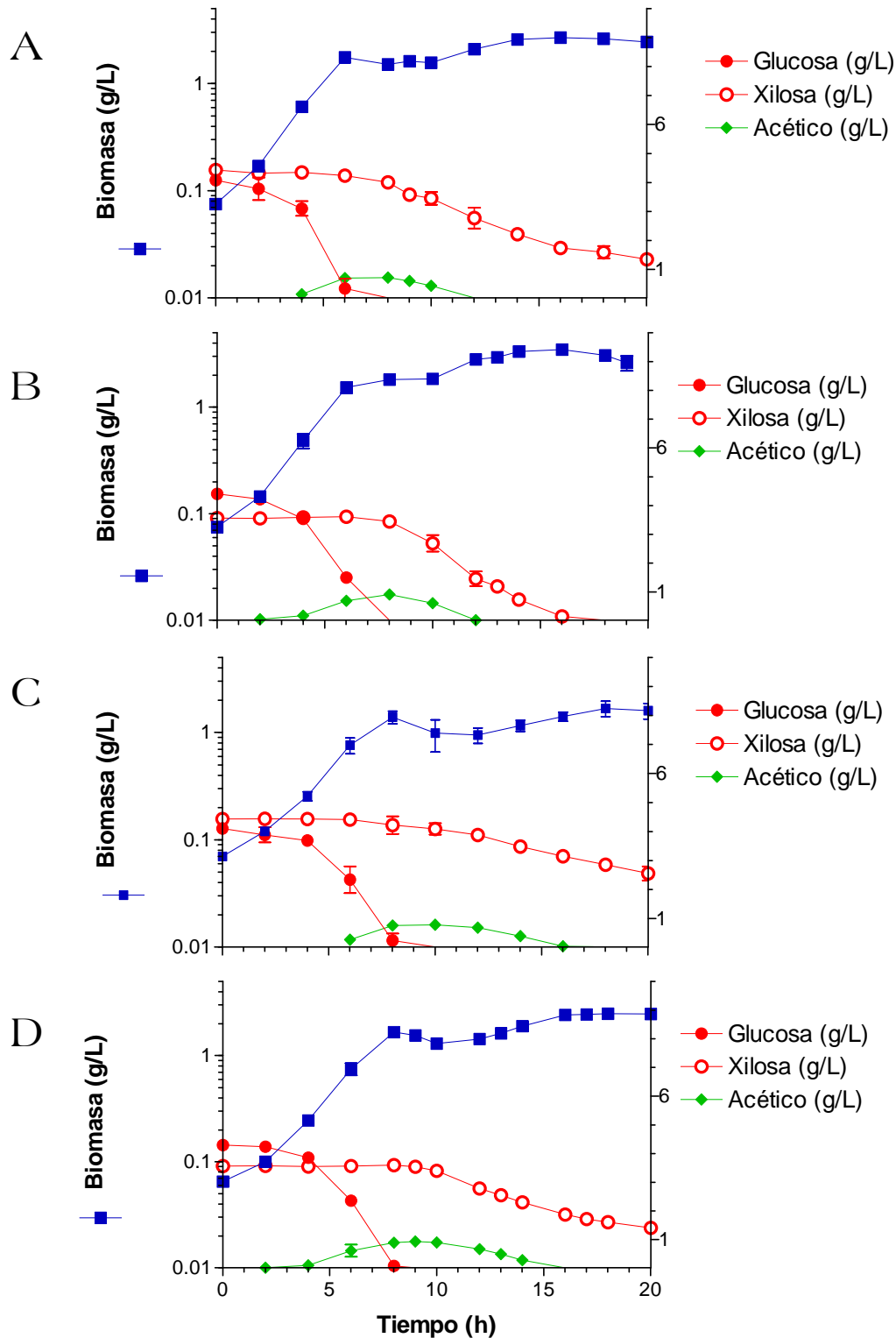


Figura 9. Cinéticas de los cultivos aeróbicos en medio mineral con mezcla glucosa-xilosa. Cepas: A) CH1 *alsS*-; B) CH1 *alsS*- *xil** (cepa mutante); C) 168Trp⁺/P43; D) 168Trp⁺/*glcP* (cepa transformada).

TABLA 6. Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) en condiciones aeróbicas.

Cepa	Glucosa	Xilosa	Mezcla	
			Glc	Xil
CH1 <i>alsS</i> -	0.60	0.00	0.54	0.12
CH1 <i>alsS-xil</i> * (cepa mutante)	0.58	0.24	0.57	0.14
168/pE18P43	0.55	0.00	0.49	0.09
168/pE18 <i>glcP</i> (cepa transformada)	0.60	0.36	0.54	0.13

En los cultivos que contenían glucosa como única fuente de carbono: Todas las cepas crecieron consumiendo la glucosa a totalidad, con una velocidad específica de crecimiento de alrededor de $0.6 h^{-1}$ (Tabla 6). La velocidad específica de consumo de glucosa fue similar entre las cepas analizadas (Tabla 7 y Fig. 7). Entre los productos observados se encuentran ácido acético y pequeñas cantidades de acetoína. La concentración máxima de éstos se obtiene al agotarse la glucosa (Fig. 7).

TABLA 7. Velocidad específica de consumo de fuente de carbono (q_s ($gs/g_{DCW}h$)) en condiciones aeróbicas.

Cepa	Glucosa	Xilosa	Mezcla		
			Glc	Xil	Acetico
CH1 <i>alsS</i> -	1.21	0.00	1.21	0.15	0.05
CH1 <i>alsS-xil</i> * (cepa mutante)	1.15	0.82	1.15	0.18	0.06
168/pE18P43	1.21	0.00	1.25	0.13	0.09
168/pE18 <i>glcP</i> (cepa transformada)	1.18	0.64	1.56	0.12	0.09

En los cultivos que contenían xilosa como única fuente de carbono:

Sólo las cepas mutante y transformada crecieron consumiendo la xilosa a totalidad. La velocidad específica de crecimiento (μ) de la cepa transformada un 40% mayor respecto a la cepa mutante (Tabla 6 y Fig. 8).

La velocidad específica de consumo de xilosa fue un 30% mayor en la cepa mutante respecto a la transformada. Las velocidades específicas de consumo de xilosa de las cepas mutante y transformada fueron un 35% menor en comparación con la q_s de glucosa (Tabla 7).

Entre los productos observados se encuentran pequeñas cantidades de acetoína (por debajo de 1 g/L) y trazas de ácido acético (Fig. 8).

En los cultivos que contenían glucosa y xilosa como fuentes de carbono:

Todas las cepas crecieron consumiendo la glucosa a totalidad, con una velocidad específica de crecimiento de alrededor de 0.54 h^{-1} (Tabla 6). Todas las cepas produjeron ácido acético (alrededor de 1 g/L), mismo que se consumió a la par que la xilosa en la segunda fase de crecimiento (Fig. 9).

De forma interesante, hasta las 20 horas que se analizaron los cultivos, sólo la cepa mutante consumió la xilosa a totalidad, consistente con una mayor velocidad específica de consumo de xilosa (Tabla 7).

La velocidad específica de consumo de acético fue un 70% menor respecto a la de consumo de xilosa para el fondo genético CH1, siendo la velocidad específica de consumo de acético un 30% menor respecto a la del consumo de xilosa para el fondo genético 168. Lo anterior coincide con una producción de acético ligeramente menor por cepas con el fondo genético CH1, en comparación con la producción de acético de las cepas con fondo genético 168 (Tabla 7). La q_s de glucosa de la cepa transformada (1.56) fue un 23% mayor en comparación con la cepa parental (Tabla 7). La q_s de xilosa disminuyó un 80% en los cultivos que contenían la mezcla glucosa-xilosa con respecto a los que contenían únicamente xilosa (Tabla 7).

FERMENTACIONES NO AIREADAS

Las condiciones en aerobiosis fueron: Medio mineral (Martinez *et al.* 1997), Azúcar: Glucosa, Xilosa, y sus mezclas, Concentración inicial de azúcar: 10 g/L (en las mezclas glucosa-xilosa fueron de 5 g/L de cada azúcar), Volumen: 200 mL, T: 37°C, Velocidad de agitación: 100 rpm, OD_{600nm} inicial: 0.1, KOH: 2N, pH: 7. Todas las fermentaciones se hicieron por duplicado.

En la figura 10 se muestran el crecimiento, consumo de glucosa y formación de productos de las cepas CH1 *alsS*, CH1 *alsS* xil*, 168Trp⁺/P43 y 168Trp⁺/*glcP* en condiciones no aireadas y utilizando glucosa como única fuente de carbono.

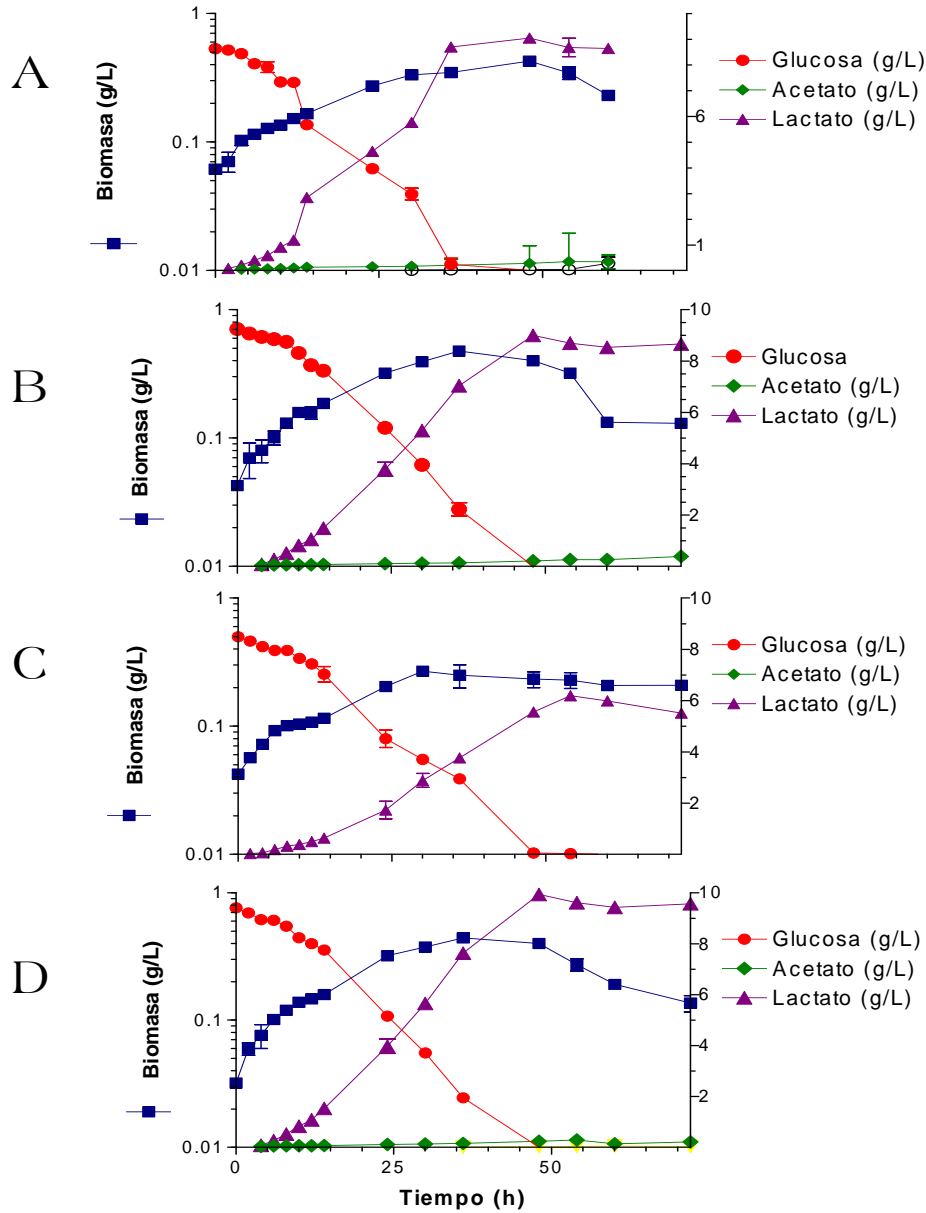


Figura 10. Cinéticas de los cultivos anaeróbicos en medio mineral con glucosa. Cepas: A) CH1 *alsS*; B) CH1 *alsS-xii** (cepa mutante); C) 168Trp⁺/P43; D) 168Trp⁺/*glcP* (cepa transformada).

En la figura 11 se muestran el crecimiento, consumo de xilosa y formación de productos de las cepas CH1 *alsS*-, *xil** y 168Trp⁺/*glcP* en condiciones no aireadas y utilizando xilosa como única fuente de carbono.

En la figura 12 se muestran el crecimiento, consumo de sustrato y formación de productos de las cepas CH1 *alsS*-, CH1 *alsS*-,*xil**, 168Trp⁺/P43 y 168Trp⁺/*glcP* en condiciones no aireadas y utilizando glucosa y xilosa como fuentes de carbono.

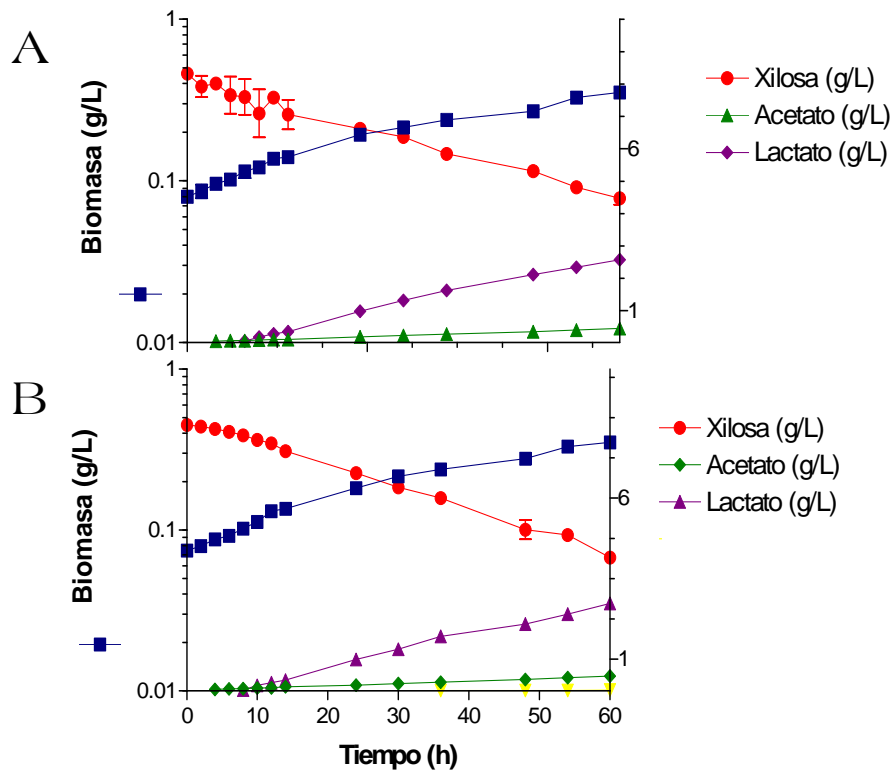


Figura 11. Cinéticas de cultivos anaeróbicos en medio mineral con xilosa. Cepas A) CH1 *alsS*-,*xil** (cepa mutante) y B) 168Trp⁺/*glcP* (cepa transformada).

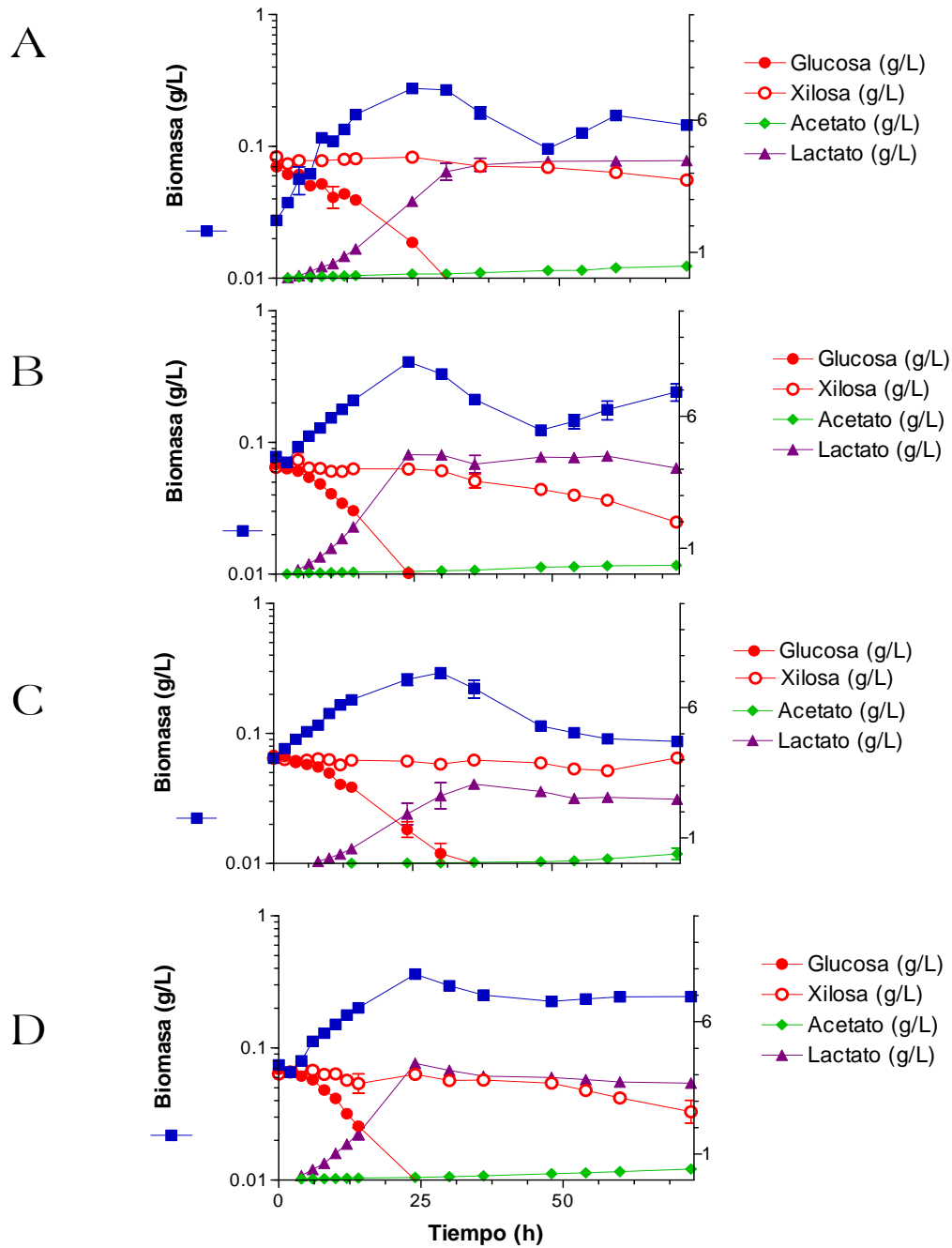


Figura 12. Cinéticas de los cultivos anaeróbicos en medio mineral con mezcla glc-xil. Cepas A) CH1 *alsS*⁻; B) CH1 *alsS*⁻,*xil*^{*} (cepa mutante); C) 168Trp⁺/P43; D) 168Trp⁺/*glcP* (cepa transformada).

TABLA 8. Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) en cond. anaeróbicas.

	Glucosa	Xilosa	Mezcla	
			Glc	Xil
CH1 <i>alsS</i> -	0.048	0.000	0.057	0.049
CH1 <i>alsS</i> -, <i>xil</i> * (cepa mutante)	0.057	0.035	0.071	0.044
168/pE18P43	0.048	0.000	0.051	0.000
168/pE18 <i>glcP</i> (cepa transformada)	0.065	0.037	0.067	0.000

I. En los cultivos que contenían glucosa como única fuente de carbono:

Todas las cepas crecieron consumiendo la glucosa a totalidad, siendo la velocidad específica de crecimiento de las cepas mutante y transformada un 20 y 35% mayores que sus respectivas cepas progenitoras, lo que indica que *B. subtilis* cursa por una deficiencia en el transporte de glucosa en condiciones anaeróbicas ya que al incrementar el transporte de este azúcar por medio de la sobreexpresión de una permeasa de glucosa la velocidad de crecimiento mejora, el caso de la cepa mutante indicaría que posiblemente el transportador que relajó su especificidad para transportar xilosa también acarrea glucosa (Tabla 8).

La velocidad específica de consumo de glucosa disminuyó alrededor de un 20% en la mutante y la transformada en comparación con sus parentales. Sin embargo, cuando las cepas crecen en las mezclas glucosa-xilosa, la velocidad específica de consumo de glucosa aumentó alrededor de un 20 % respecto a sus parentales (Tabla 9).

El principal producto de la fermentación de la glucosa fue el ácido láctico, aunque también se detectaron trazas de los ácidos acético y succínico.

La velocidad específica de producción de ácido láctico (qp) en fase exponencial es un 50% mayor que en la fase estacionaria (Tabla 10).

Cabe mencionar que la presencia de la permeasa GlcP permitió incrementar la cantidad, así como la velocidad de producción, de ácido láctico en la cepa transformada respecto a su parental, ya que ésta, a diferencia del fondo genético CH1 *alsS*-, todavía podría producir butanodiol en condiciones de fermentación.

TABLA 9. Velocidad específica de consumo de fuente de carbono ($g_s/g_{DCW} \cdot h$) en condiciones anaeróbicas.

	Glucosa	Xilosa	Mezcla	
			Glc	Xil
CH1 <i>alsS</i> -	1.13	0.00	0.79	0.12
CH1 <i>alsS</i> -, <i>xil</i> * (cepa mutante)	0.87	0.54	0.87	0.40
168/pE18P43	1.25	0.00	0.75	0.00
168/pE18 <i>glcP</i> (cepa transformada)	0.96	0.51	0.98	0.00

II. En los cultivos que contenían xilosa como única fuente de carbono:

Sólo las cepas mutante y transformada crecieron consumiendo la xilosa, aunque no fue a totalidad hasta las 72 h que se analizaron los cultivos, siendo la velocidad específica de crecimiento de la cepa transformada similar a la de la mutante (Tabla 8 y Fig. 11), aunque su μ y q_s disminuyeron alrededor de un 50% cuando se comparan estos mismos parámetros utilizando únicamente glucosa (Tabla 8).

El principal producto de la fermentación de la xilosa fue el ácido láctico, aunque también se detectaron trazas de los ácidos acético y succínico.

La velocidad específica de producción de ácido láctico (q_p) en fase exponencial fue un 50% mayor que en la fase estacionaria (Tabla 10).

TABLA 10. Velocidad específica de producción de ácido láctico ($g_{lactato}/g_{DCW} \cdot h$) en condiciones anaeróbicas.

	Fase Exponencial		Mezcla	
	Glucosa	Xilosa	Glc	Xil
CH1 <i>alsS</i> -	1.18	0.00	0.31	0.00
CH1 <i>alsS</i> -, <i>xil</i> * (cepa mutante)	0.92	0.31	0.98	0.01
168/pE18P43	0.66	0.00	0.49	0.00
168/pE18 <i>glcP</i> (cepa transformada)	0.97	0.34	1.03	0.00
	Fase Estacionaria		Mezcla	
	Glucosa	Xilosa	Glc	Xil
CH1 <i>alsS</i> -	0.53	0.00	0.06	0.00
CH1 <i>alsS</i> -, <i>xil</i> * (cepa mutante)	0.55	0.21	0.00	0.00

168/pE18P43	0.69	0.00	0.17	0.00
168/pE18 <i>glcP</i> (cepa transformada)	0.65	0.21	0.00	0.00

III. En los cultivos que contenían glucosa y xilosa como fuentes de carbono:

Todas las cepas crecieron consumiendo la glucosa a totalidad, siendo la velocidad específica de crecimiento de las cepas mutante y transformada un 25 y 30% mayores que sus respectivas cepas parentales (Tabla 8). De igual forma la velocidad específica de consumo de glucosa de las cepas mutante y transformada fueron un 10 y 30% mayores que sus respectivas cepas parentales (Tabla 9). Todas las cepas produjeron ácido láctico a partir de la glucosa (Fig. 12), siendo la velocidad específica de producción de ácido láctico de las cepas mutante y transformada un 200 y 100% mayores que sus respectivas cepas parentales (Tabla 10).

Por el contrario, sólo las cepas con fondo genético CH1 consumieron muy poca xilosa presente en los medios de cultivo que contenían las mezclas glucosa-xilosa, que básicamente la usaron para crecer (Tablas 8 y 9).

Diseño y construcción de plásmidos para utilizar xilosa como única fuente de carbono.

Los siguientes plásmidos se construyeron durante el doctorado, sin embargo, ya no se continuó con esa estrategia y no se logro evaluar su efecto, pero pueden ser usados en otros proyectos en el laboratorio. Todos los genes clonados cuentan con su propia secuencia consenso Shine-Dalgano separada a 7pb (distancia consenso) del codón de inicio. De tal forma que en los siguientes plásmidos podría inducirse con IPTG la expresión de genes clonados, exceptuando al plásmido pUC-xylE1 que se clonó en contrasentido del promotor de *lacZ*.

1. Se obtuvo por PCR el gen *xylE* (que codifica para el transportador de xilosa) de *E. coli B*, y se clonó en pUC19, obteniéndose el plásmido pUC_xylE (Fig. 13A).

2. Se obtuvo por PCR el gen *xylA* (xilosa isomerasa) de *B. subtilis*, y se clonó en pUC19, obteniéndose el plásmido pUC_xylA (Fig. 13B).

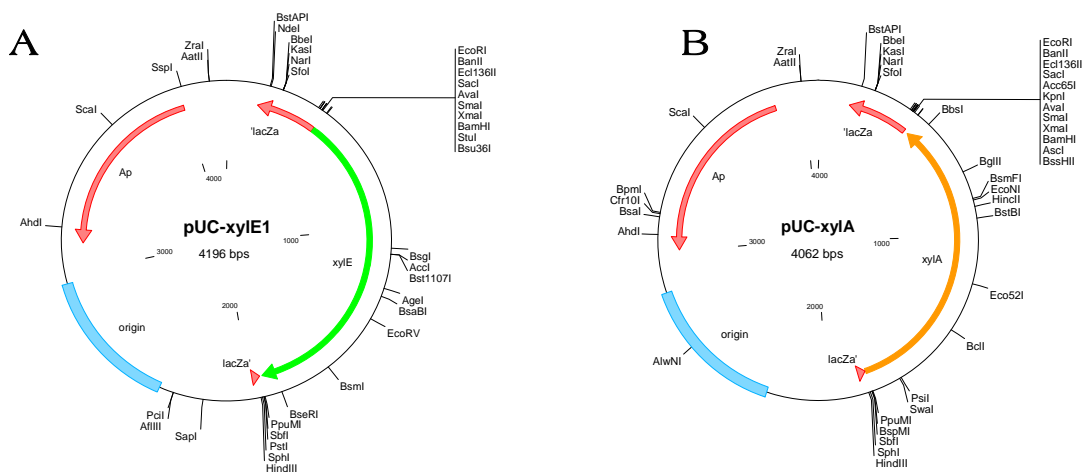


Figura 13. A. Plásmido pUC-*xylE1* que contiene el gen *xylE* de *E. coli*. B. Plásmido pUC-*xylA* que contiene el gen *xylA* de *B. subtilis*.

3. Se obtuvo por PCR la secuencia del gen *xylB* (xilulosa cinasa) de *B. subtilis*, y se clonó en pUC19, obteniéndose el plásmido pUC-*xylB* (Fig. 14A).

4. Se obtuvo el plásmido pUC-*xylAB*, que contiene a los genes *xylA* y *xylB* de *B. subtilis*, en tandem (Fig. 14B).

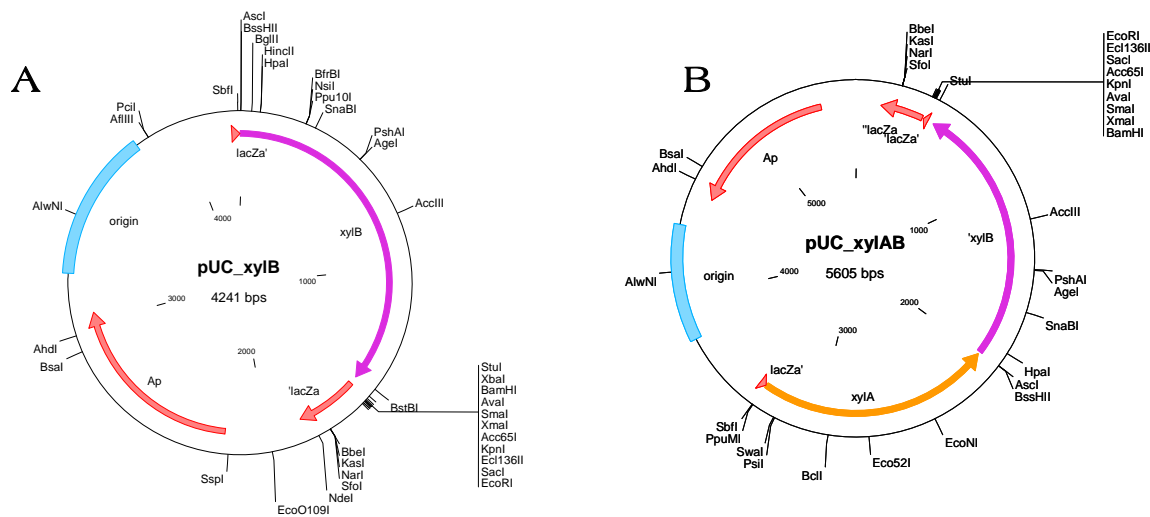


Figura 14. A. Plásmido pUC-*xylB* que contiene el gen *xylB* de *B. subtilis*. B. Plásmido pUC-*xylAB* que contiene los genes *xylA* y *xylB* de *B. subtilis*.

5. Se obtuvo el operón *xyLABE* lográndose poner en tandem *xyIA*, seguido del *xyIB* y al final *xyIE*, obteniéndose el plásmido llamado pUC-*xyLABE*, que podría ser usado para consumir xilosa sin sufrir represión catabólica (Fig. 15).

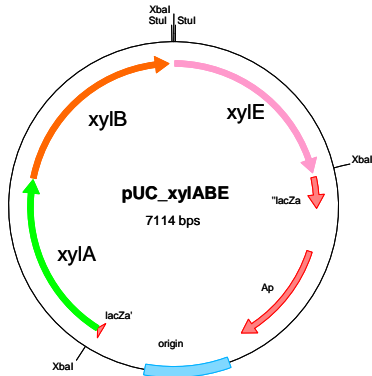


Figura 15. Plásmido pUC-*xyLABE* que contiene los genes *xyIA*, *xyIB* y *xyIE* en tandem.

PRESENTACIÓN DEL MANUSCRITO 3:

Ingeniería Metabólica: Residuos agroindustriales y etanol
carburante
Revista Ciencia y Desarrollo, Vol. 33, no. 210, Agosto 2007.

EL TIEMPO: MEDIDAS, CONCEPTOS
E INSTRUMENTOS

CIENCIA Y DESARROLLO

AGOSTO 2007 VOLUMEN 33 NÚMERO 210 MÉXICO

→ **INGENIERÍA
METABÓLICA**
ORGANISMOS
A LA MEDIDA

→ **MIRADA DE PIEDRA
MURALES
PREHISPÁNICOS**

→ **AFLATOXINAS**
UNA AMENAZA
EN EL MAÍZ



CAMBIO CLIMÁTICO

→ **LA MANO DEL HOMBRE EN EL CALENTAMIENTO GLOBAL
IMPACTO EN MÉXICO
INTERESES EN JUEGO**

\$20.00



HÉLIX:
El arte
de construir



|| **PRODUCTOS
DE LA CIENCIA,**
¿Limpieza de nopales?-láser ||



RAFAEL D. HERNÁNDEZ:
de Michoacán
para el mundo



Desde hace miles de años, el hombre se ha servido de los microorganismos para elaborar diversos productos fermentados, ya sea por bacterias, levaduras u hongos. Esta práctica comenzó posiblemente en el Oriente Medio, con la producción de bebidas alcohólicas a partir de miel, semillas o frutos; se extendió a Europa y de ahí llegó, posteriormente, a América, en algunos productos como el vino y el pan.

**SUSANA ROMERO G., MONTSERRAT ORENCIO T.,
GUILLERMO GOSSET L. Y ALFREDO MARTÍNEZ J.**





Ingeniería Metabólica,

residuos agroindustriales y etanol carburante

el 15 de octubre de 2011 a las 10:00 AM



En la Mesoamérica prehispánica, no obstante, ya se obtenían bebidas fermentadas como el pulque y, con el tiempo, se han encontrado nuevas aplicaciones en la medicina, la tecnología de alimentos, la remoción de contaminantes y en procesos industriales, por citar algunas.

Nuestra necesidad de satisfactores ha ido más allá y en la década de 1970, como resultado del conocimiento acumulado en el campo de la biología molecular, surgió la ingeniería genética y sus técnicas de ADN recombinante,¹ con lo cual se abre la posibilidad de aislar, editar y modificar el material genético.

El avance científico ha permitido la secuenciación de genomas completos y, como consecuencia, nace el interés por el estudio de la función, interrelación y evolución de todos los genes de un organismo, conocimientos que contribuyen al surgimiento de la Ingeniería de Vías Metabólicas (IVM) en los años noventa. Esta disciplina se aboca a modificar o introducir nuevas reacciones bioquímicas en el metabolismo de algún microorganismo, mediante tecnología de ADN recombinante, con el propósito de adecuar propiedades celulares para la obtención de diversos productos como el alcohol carburante o algunas proteínas como la insulina.

Esta área de conocimiento apoya sólidamente la investigación en biotecnología,² que se enfoca en la manipulación genética de los microorganismos con el fin de crear nuevos procesos industriales como es el hecho de utilizar residuos agroindustriales para obtener bioenergéticos como etanol, biodiesel y butanol (cuadro 1).

RESIDUOS AGROINDUSTRIALES EN TRANSFORMACIÓN

El actual desarrollo económico nacional y mundial está cimentado en el comercio y la transformación del petróleo (recurso natural no renovable). Para

→ La ingeniería de vías metabólicas (IVM) trabaja en la modificación o introducción de nuevas reacciones bioquímicas en el metabolismo de los microorganismos para obtener productos útiles



la economía mexicana, su exportación, aunada a las ventas nacionales, representa un tercio de los ingresos del gobierno federal; no obstante, se prevé su agotamiento durante el primer cuarto del presente siglo, lo cual plantea problemas tanto económicos como de abasto de energía, ya que nuestra demanda energética es satisfecha, principalmente, a partir del petróleo. De aquí la urgencia de impulsar el desarrollo y la implementación de un plan estratégico que conduzca a mantener las reservas de petróleo y gas natural por un periodo mayor al estimado, mediante la sustitución gradual de las materias primas fósiles con derivados químicos y energéticos obtenidos a partir de tecnologías sustentables³ que, además, sean más amigables con el ambiente.

1. Técnicas de laboratorio llevadas a cabo con el fin de combinar fragmentos de ADN que usualmente no estarían juntos.
2. La biotecnología está presente en cualquier aplicación tecnológica realizada en organismos vivos, sistemas biológicos o sus derivados con un fin específico. Una característica importante de los procesos biotecnológicos es que son sustentables y amables con el ambiente.
3. Las tecnologías sustentables plantean la obtención de bienes o insumos a partir de recursos renovables.



CUADRO 1

LA BIOTECNOLOGÍA Y SUS APLICACIONES

ESTA DISCIPLINA SE HA SUBDIVIDIDO EN:

- Biotecnología roja, aplicada a procesos médicos, por ejemplo, en el diseño de microorganismos que produzcan antibióticos.
- Biotecnología verde, empleada en la agroindustria, por ejemplo, en el diseño de plantas transgénicas que crezcan bajo condiciones ambientales extremas.
- Biotecnología blanca, utilizada en procesos industriales, por ejemplo, en el diseño de microorganismos que produzcan compuestos químicos como el alcohol carburante.

En este sentido, los residuos agroindustriales representan una fuente renovable de energía, pues se obtienen en cantidades enormes y constituyen una materia prima barata. Además, cualquier residuo agroindustrial puede ser convertido en diversos productos con mayor valor agregado, incluyendo sustitutos de derivados petroquímicos y combustibles [cuadro 2].

BACTERIAS ALCOHÓLICAS: ENERGÍA PARA EL TRANSPORTE

Desde hace más de tres décadas, se ha demostrado la factibilidad tecnológica y práctica de emplear etanol producido por el metabolismo de microorganismos, a partir de azúcar de caña o de almidón de maíz, como combustible para automóviles. En la actualidad, millones de autos circulan usando etanol o mezclas de gasolina-etanol, principalmente en Brasil y los Estados Unidos.

Debido a la enorme cantidad de autotransporte en el mundo, y en particular en nuestro país, se requiere contar con enormes volúmenes de etanol para cubrir la demanda energética, y los residuos agroindustriales son la materia prima más ventajosa.

Escherichia coli es una bacteria que, de forma natural, puede consumir una amplia variedad de azúcares, incluyendo glucosa y xilosa (azúcares muy abundantes en los residuos agroindustriales), a partir de los cuales se producen compuestos como los ácidos acético,⁴ fórmico,⁵ succínico⁶ y pequeñas cantidades de etanol.

Mediante los procesos propios de la ingeniería de vías metabólicas se ha logrado que *E. coli* produzca etanol a partir de la glucosa y xilosa, modificando su funcionamiento. Así se ha logrado, en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, producir mayoritariamente etanol a partir de glucosa y xilosa; además, se llevan a cabo estudios que podrán ser base de tecnologías independientes del petróleo, como aquéllos abocados a lograr que esta cepa etanologénica de *E. coli* genere etanol.

4. Es conocido como vinagre.

5. Es el más simple de los ácidos orgánicos; es relativamente fuerte y de olor irritante. Se encuentra en la saliva de las hormigas y es usado como preservativo y como agente antibacteriano en alimento para ganado.

6. Puede utilizarse como suplemento alimenticio y en la síntesis de productos químicos. Se genera en el proceso de fermentación de algunas bebidas como los vinos.



con mayor velocidad, para obtener procesos competitivos a escala industrial [cuadro 3].

El proceso para producir etanol a partir de residuos agroindustriales requiere un tratamiento previo para romper la celulosa y liberar la glucosa; éste es el paso más costoso e involucra el empleo de celulasas (conjunto de enzimas puras que rompen la celulosa y liberan glucosa) de hongos.

Bacillus subtilis es una bacteria que se encuentra comúnmente en el suelo. En forma tradicional se ha usado para producir enzimas útiles en la manufactura de detergentes biodegradables. En comparación con *E. coli*, tiene la ventaja de sintetizar una gran variedad de enzimas degradativas y transportarlas al exterior celular. Este eficiente sistema de secreción puede ayudar a transportar enzimas (celulasas)

→ La IM procura incidir en la producción de combustibles alternativos a los fósiles que, además de contaminar, no son recursos renovables

que rompan la celulosa para liberar glucosa y poder aplicarla en la producción de etanol, así se obtendría una nueva tecnología con un bajo costo de producción. Sin embargo, *B. subtilis* es un microorganismo que, de forma natural y en condiciones de fermentación, genera otros compuestos a partir de la glucosa, pero no etanol.

En nuestro instituto se ha logrado obtener una *B. subtilis* que genera etanol como producto

CUADRO 2 DESECHOS AGROINDUSTRIALES REUTILIZABLES

Bagazo de caña, cascarilla del arroz, rastrojo y olote de maíz, pastos, desechos de madererías (viruta y aserrín), maderas suaves y duras, papel desechado de oficinas... Todos estos restos pueden ser transformados, mediante procesos químicos y enzimáticos, en azúcares simples de seis [glucosa y manosa] y cinco [xilosa y arabinosa] átomos de carbono, que algunos microorganismos pueden utilizar como alimento y transformarlos en productos útiles.



principal, al modificar su metabolismo por medio de ingeniería de vías metabólicas. La cepa de *B. subtilis* resultante produce etanol a partir de glucosa con rendimientos mayores a 95 por ciento.

PERSPECTIVAS

La ingeniería de vías metabólicas constituye una alternativa para llevar a cabo la transición de nuestra actual dependencia del petróleo hacia una sociedad energéticamente renovable y amable con el medio ambiente. En México se consumen, aproximadamente, 105 millones de litros de gasolina diariamente, esto es equivalente a un consumo per capita de 1 litro de gasolina por día, valor que refleja los tremendos esfuerzos científicos y tecnológicos que deben ser realizados para convertir grandes cantidades de biomasa en etanol carburante. ●

AGRADECIMIENTOS

Al financiamiento otorgado a través del Fondo Mixto CONACYT-Estado de Morelos, clave MOR-2004-c02-048. Fondo Sectorial CONACYT-SAGARPA, clave 2004-224, y OSAP/INPES/INAM-IN220403-2.

BIBLIOGRAFÍA

- Ingram, L. D., et. al. (1999). *Enteric Bacterial Catalyst for Fuel Ethanol Production*. Biotechnology Progress. American Chemical Society, Washington, D.C., 15, 855-866, 1999.
- Parris, T. M., et. al. (2003). *Characterizing a sustainability transition: Goals, targets, trends, and Driving Forces*. *Env. Sci. Technol.* 37, 8068-8073.
- Martínez-Jiménez, A., et. al. (Julio 2006). ¿Etanol carburante a partir de bagazo de caña? *Ciudades Agropecuarias*. Publicación Mensual de la SASAEM, México, pp. 33-39.

CUADRO 3 CÓMO OBTENER ETANOL A PARTIR DE *E. COLI*

- Tomar los genes que codifican para las enzimas piruvato decarboxilasa y alcohol deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis* (una de las bacterias que producen el pulque).
- Integrarlos en el genoma de *E. coli* con el objetivo de generar una nueva vía metabólica para la síntesis de etanol, que es más eficiente que la presente originalmente en esta bacteria.
- Eliminar del genoma de *E. coli* las vías metabólicas que producían succínico, fórmico, láctico y acético.
- La *E. coli* resultante produce etanol a partir de glucosa xilosa y arabinosa con altos rendimientos.



DISCUSIÓN

En este trabajo se modificó el metabolismo de *Bacillus subtilis* para producir etanol o L-lactato como productos únicos a partir de glucosa. También se obtuvieron cepas derivadas de *B. subtilis* que pueden utilizar xilosa como única fuente de carbono en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

PRODUCCIÓN DE ETANOL UTILIZANDO A *B. subtilis*

Para construir una cepa derivada de *B. subtilis* productora de etanol se decidió integrar una vía heteróloga productora de etanol en el metabolismo de *B. subtilis* y, al mismo tiempo, interrumpir la principal vía que compite por la disponibilidad del piruvato como es la producción de L-lactato.

La vía heteróloga consistió de los genes *pdh* y *adhB* de *Z. mobilis*, mismos que formaron parte de un operón sin promotor, y que se integraron de tal forma que su transcripción fuera dirigida por el promotor de la lactato deshidrogenasa (LDH). Con esta estrategia se obtuvo la cepa *B. subtilis* BS35 que empezó a producir etanol (aunque en cantidades pequeñas), y ya no produjo L-lactato, aunque seguía produciendo butanodiol. Una observación importante fue que la falta de la lactato deshidrogenasa en el metabolismo de *B. subtilis* provocó una disminución en su velocidad de crecimiento y en el consumo de glucosa, aún cuando esta carencia se complementó con la inserción de la vía productora de etanol, que en términos de balance de redox (NADH/NAD⁺) son equivalentes. Cabe mencionar que Cruz-Ramos *et al.* (2000) demostraron que con la interrupción de la LDH provocaba la disminución de la velocidad crecimiento en condiciones fermentativas, aún cuando se adicionara nitratos o nitritos como aceptores de electrones, de hecho observaron que la interrupción del gen *ldh* es aún más deletérea que la interrupción del gen *pta* que codifica para la fosfotransacetilasa, enzima que junto con la acetato cinasa producen ATP y ácido acético (6).

Posteriormente, se decidió eliminar la producción de butanodiol para tener una mayor disponibilidad de carbono para producir etanol, obteniéndose así la cepa BS36, que incrementó ligeramente la producción etanol y que no modificó su velocidad de crecimiento. Este resultado concuerda con lo reportado con Cruz-Ramos *et al.* (2000), en donde se observa que al interrumpir el gen *alsS*, la velocidad de crecimiento no se modifica respecto a la cepa progenitora (6).

La disminución de la velocidad de crecimiento de las cepas BS35 y BS36 podría deberse a que las enzimas PDC y ADHB no estuvieran en cantidad suficiente y que, de alguna manera existiera una acumulación de piruvato o cofactores reducidos que estuvieran limitando el crecimiento. Primeramente, se clonaron los genes *pdc* y *adhB* de *Z. mobilis* bajo la regulación del promotor P_{adh} , en un vector replicativo para *B. megaterium*, mismo que se denominó pHIS-Fnr2-PET, del cual se corroboró su correcta construcción por patrón de digestión y cuya funcionalidad fue evaluada en *E. coli* (ya que era un plásmido 'shuttle'). Esta cepa produjo etanol en condiciones en las que la cepa progenitora de *E. coli* no lo hizo (datos no mostrados). Posteriormente, *B. subtilis* BS36 se transformó con el vector pHIS-Fnr2-PET, las clonas resultantes no produjeron más etanol que su cepa parental. Tras evaluar la actividad enzimática de PDC, ésta tampoco se incrementó, por lo que concluimos que se debía emplear o bien otro promotor o cambiar el vector. Cabe mencionar que las estrategias moleculares para emplear vectores replicativos en *B. subtilis* se ven un poco limitadas debido a que el fenómeno de inestabilidad de plásmido es más común que en *E. coli* (7).

Se decidió abordar otra estrategia en la que se simuló una acumulación de piruvato por medio de la adición de un exceso de éste (2 g/L) a un cultivo lote de *B. subtilis* BS36. Se observó que la velocidad de crecimiento de esta cepa aumentó y que las enzimas PDC y ADHB estuvieron en cantidad suficiente para dirigir el excedente de piruvato hacia la producción de etanol, con esto se eliminó la posibilidad de que las cantidades de enzimas PDC y ADHB fueran la causa de la disminución de la velocidad de crecimiento. Cabe

mencionar que si se adiciona más piruvato (10g/L) se empieza producir ácido acético (resultados no incluidos en el artículo de producción de etanol). A partir de estos resultados se deduce que tampoco existe un déficit de la especie reducida NADH y que de existir piruvato se puede reducir a etanol, aunque esta especie (NADH) no se recicle a partir de la glucólisis. Parte del piruvato también apoya y mejora el crecimiento, ya que este metabolito constituye un nodo a partir del cual se forman varios precursores que se utilizan para la acumulación de biomasa.

Por otro lado, si se analiza que la vía heteróloga productora de etanol (enzimas PDC y ADHB) era equivalente en términos de balance redox (NADH/NAD⁺) con la vía homóloga productora de L-lactato (enzima LDH) y se observa que aún con este cambio se ve afectado el crecimiento. Para poder explicar este fenómeno surgen algunas hipótesis: *i*) el L-lactato ejerce alguna clase de regulación para favorecer del crecimiento de *B. subtilis*, pues se ha reportado que existe un antiportador Lactato/Malato que aumenta el crecimiento de *B. subtilis* en malato (54); o bien *ii*) la enzima LDH participa en otra reacción metabólica en la que PDC y ADHB no pudieran hacerlo.

Para saber si el L-lactato ejerce alguna clase de regulación a favor del crecimiento de *B. subtilis*, se hicieron cultivos con *B. subtilis* (*ldh::pdc-adhB*) en los que se adicionó una cantidad determinada de lactato (2 g/L); sin embargo, su crecimiento no mejoró.

También se analizó la posibilidad de que la LDH pudiera oxidar otro cofactor además del NADH y encontramos que LDH también puede oxidar NADPH *in vitro*. Esta observación resultó interesante porque significaría que, si este comportamiento ocurre *in vivo*, la interrupción de la LDH afecta otro equilibrio (NADPH/NADP⁺) en el metabolismo de *B. subtilis* y que éste podría ser el causante, al menos parcialmente, de la disminución en la velocidad de crecimiento. En un intento para responder esta pregunta decidimos incluir una transhidrogenasa UDHA de *E. coli* en el metabolismo de *B. subtilis*. Esta enzima lleva a cabo la reacción: $\text{NADPH} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{NAP}^+ + \text{NADH}$ que puede ser reversible dependiendo de las concentraciones de las especies

participantes. Se ha estimado que la relación NAD^+/NADH se encuentra alrededor de 1 (28), por lo que las concentraciones de NAD^+ y NADH son comparables. En contraste, la relación $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ se encuentra en 0.005 (53), por lo que la forma dominante es NADPH . Este dato apoya nuestra hipótesis en la que sugerimos que la reacción arriba mencionada al incluirla en el metabolismo de la cepa de *B. subtilis* etanológica dirige este equilibrio ($\text{NADPH} + \text{NAD}^+ \Leftrightarrow \text{NAP}^+ + \text{NADH}$) hacia la derecha para favorecer el crecimiento y por ende la producción de etanol. La expresión de la enzima LDH en *B. subtilis* corrigió parcialmente el defecto en el crecimiento que provocó la delección de LDH, además de incrementar la producción de etanol, hechos que apoyan la potencial contribución de la LDH en el mantenimiento de ambos equilibrios ($\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ y NADH/NAD^+) en el metabolismo de *B. subtilis*. Un hecho interesante es que con la transhidrogenasa no se recuperó totalmente el crecimiento, esto podría deberse a las condiciones en que fue expresada esta enzima (en monocopia y bajo la regulación del P_{alsS}). También comprobamos que si se llevan a cabo diferentes estrategias de fermentación, a través de variar la cantidad de oxígeno disuelto puede mejorarse la productividad de etanol, llegando inclusive a obtener etanol en condiciones aireadas (ver sección de resultados no incluidos en el artículo de producción de etanol).

Ésta es la primera vez que se logra obtener una bacteria Gram positiva capaz de generar etanol como único producto de fermentación, y aunque la velocidad de síntesis es lenta en las cepas construidas en este trabajo, los rendimientos son altos alrededor del 90% en relación al teórico, utilizando un medio complejo como es el LB.

PRODUCCIÓN DE L-LACTATO UTILIZANDO A *B. subtilis*

La presión por el uso de plásticos biodegradables ha incrementado la producción de polilactato, entre otros materiales, que pueden usarse para tal fin. El polilactato es un polímero hecho de diferentes proporciones de los enantiómeros L- y D- del ácido láctico, por lo que es necesario obtener a los

enantiómeros ópticamente puros. Llevando a cabo ingeniería de vías metabólicas en *B. subtilis* para obtener L-lactato como producto principal o único a partir de glucosa o xilosa, podrá tomarse ventaja de otras características inherentes de *B. subtilis* como son: su capacidad de utilizar celobiosa y de su eficiente sistema de secreción de proteínas mismo que podría utilizarse para secretar celulasas y xilanasas para la utilización de residuos agroindustriales.

Si bien se ha observado que *B. subtilis* puede degradar celobiosa en aerobiosis (52), no se había observado que pudiera hacerlo en condiciones anaeróbicas. De forma interesante observamos que *B. subtilis* CH1 puede fermentar celobiosa y producir L-lactato con rendimientos arriba del 82%. Cabe mencionar que este rendimiento puede mejorarse si se eliminan las vías homólogas que compiten por la disponibilidad del piruvato, como la producción de butanodiol. Por lo que en este trabajo también se eliminó la producción de 2,3-butanodiol con lo que se obtuvo una cepa derivada de *B. subtilis* que sólo produce L-lactato a partir de glucosa en medio rico (LB), y con productividades de L-lactato cercanas a las de otras bacterias lácticas. Utilizando medio mineral suplementado con extracto de levadura (8 g/L), *B. subtilis* pudo fermentar a totalidad 100 g/L de glucosa produciendo arriba de 100g/L de L-lactato debido a que *B. subtilis* puede canalizar esqueletos de carbono del medio de cultivo (algunos aminoácidos) hacia la producción de L-lactato, además de usarlos para el crecimiento. Si bien existen otros reportes de bacterias que también producen arriba de 100 g/L de lactato, cabe destacar que *B. subtilis* lo hace en medio mineral suplementado con extracto de levadura. Este resultado abre la posibilidad de tomar ventaja de las característica inherentes arriba mencionadas de *B. subtilis*. Además de que el L-lactato obtenido tiene una elevada pureza óptica debido a que *B. subtilis* sólo cuenta con una L-lactato deshidrogenasa, lo que evita la purificación de mezclas racémicas.

UTILIZACIÓN DE XILOSA POR *B. subtilis*

La xilosa es el segundo carbohidrato mayoritario en la naturaleza debido a que forma parte de la hemicelulosa de plantas, constituyendo una materia prima que se encuentra en grandes volúmenes. Si se desea utilizar *B. subtilis* para la completa utilización de los residuos agroindustriales, es necesario que pueda usar a la xilosa como única fuente de carbono; o bien, metabolizarla sin sufrir represión catabólica por glucosa. A pesar de que cuenta con las enzimas necesarias para metabolizar a la xilosa, *B. subtilis* no cuenta con un transportador específico de xilosa y, por ésto no puede utilizarla como única fuente de carbono, aunado a que las enzimas que pueden metabolizar xilosa sufren represión catabólica por glucosa. En este trabajo se desarrollaron cepas derivadas de *B. subtilis*, que pueden consumir xilosa como única fuente de carbono tanto en condiciones aireadas como no aireadas.

En condiciones aireadas, se observó que las cepas, tanto la mutante (*B. subtilis* CH1 *alsS-xi**) como la recombinante (*B. subtilis* 168/pE18*glcP*) y sus respectivas progenitoras, pudieron consumir xilosa en cultivos que contenían mezclas de glucosa y xilosa, ésto después de consumir la glucosa y producir ácido acético, mismo que se consumió a la par que la xilosa. Este fenómeno sugiere un comportamiento metabólico, el cual no ha sido descrito con anterioridad, que posiblemente puede estar relacionado con la necesidad de obtener precursores metabólicos de forma simultánea a partir de sustratos gluconeogénicos cuando se utiliza xilosa como única fuente de carbono.

En condiciones no aireadas, se observó que tanto la cepa mutante como la transformada mejoraron su velocidad de crecimiento en glucosa produciendo L-lactato, ésto sugiere que, en condiciones de fermentación, el crecimiento de *B. subtilis* está limitado por el transporte del carbohidrato. De acuerdo a los resultados obtenidos con las cepas etanológicas, se puede plantear que sí se logra aumentar el transporte de glucosa en la cepa BS37 podría incrementar su crecimiento y producción de etanol.

De forma interesante encontramos que tanto la cepa mutante como la transformada pudieron consumir la xilosa como única fuente de carbono y produjeron L-lactato con buenos rendimientos, a partir de estos resultados se hipotetiza que si las cepas productoras de etanol derivadas de *B. subtilis* se transforman con el plásmido que contiene la permeasa de glucosa (GlcP), podrán consumir xilosa y producir etanol. Cabe mencionar que no existen reportes en cuanto a la utilización de xilosa por *B. subtilis* para producir L-lactato o etanol.

También se encontró que en los cultivos que contenían las mezclas glucosa-xilosa se produjo ácido acético en cantidades traza, y que sólo las cepas con fondo genético CH1 pudieron consumir pequeñas cantidades de xilosa, al parecer por sufrir represión catabólica por glucosa.

Para poder consumir xilosa sin sufrir represión catabólica por glucosa se construyeron los plásmidos pUC_*xyLAB* y pUC-*xyLABE* que ya tienen clonados en tandem los genes que codifican para las enzimas que pueden metabolizar a la xilosa así como para su transporte. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más trabajo enfocado en ampliar las herramientas moleculares en *B. subtilis*, tales como el uso de plásmidos replicativos estables y tener una variedad de promotores con diferentes fuerzas de regulación.

CONCLUSIONES

Esta es la primera vez que *B. subtilis*, una bacteria Gram-positiva, logró ser modificada para producir etanol como producto único a partir de glucosa, tanto los rendimientos como las productividades de etanol fueron las más altas obtenidas en cultivos lote para este tipo de bacteria.

La lactato deshidrogenasa tiene un papel clave en el metabolismo fermentativo de *B. subtilis*, ya que se elucidó su participación en el equilibrio redox NADPH/NADP⁺ al llevar también a cabo la oxidación del cofactor NADPH.

B. subtilis fermenta celobiosa y produce L-lactato con alta pureza óptica.

B. subtilis pudo ser modificada para producir L-lactato como producto único a partir de glucosa. Con rendimientos elevados, *B. subtilis* fermentó a totalidad concentraciones elevadas de glucosa.

Los avances arrojados por este trabajo abren la posibilidad de establecer procesos en los que se pueda tomar ventaja del sistema eficiente de secreción de proteínas de *B. subtilis* para degradar sustratos más complejos pero más baratos como son los residuos agroindustriales, a partir de los cuales se produzca etanol o L-lactato.

Cepas mutantes de *B. subtilis* pueden fermentar xilosa y producir L-lactato, de esta forma podrán aprovecharse completamente los residuos agroindustriales.

En condiciones de fermentación *B. subtilis* presenta una deficiencia en el transporte de glucosa.

Se demostró la versatilidad y el potencial que *B. subtilis* tiene para el desarrollo de procesos que no dependan de los combustibles fósiles.

PERSPECTIVAS en la Producción de Etanol

- Mejorar la sobreexpresión de la transhidrogenasa para saber si aumentando su expresión podría recuperarse por completo la velocidad de crecimiento de la cepa BS37.
- Continuar el estudio del estado REDOX que existe en las cepas CH1, BS35 y BS37, midiendo la concentración de los cofactores NADH/NAD⁺, NADPH/NADP⁺, así como determinar la actividad de las enzimas que participan en estos equilibrios en la glucólisis y vía de las pentosas.
- Llevar a cabo estrategias de fermentación que permitan incrementar la biomasa y en consecuencia aumentar la velocidad de producción de etanol. Estas estrategias irían desde la modificación de las condiciones de trabajo hasta la composición de los medios de cultivo.
- Realizar experimentos con presión selectiva para obtener cepas que mejoren su velocidad de crecimiento en anaerobiosis y que en consecuencia produzcan etanol más rápido. Aprovechando la característica de *B. subtilis* de poder insertar en su genoma DNA extraño, podría incluirse el DNA de *B. megaterium* (que crece mejor que *B. subtilis* en anaerobiosis) para que *B. subtilis* pueda tomar los elementos que necesita para mejorar su velocidad de crecimiento.
- Aumentar el transporte de glucosa por medio de la sobreexpresión de otro transportador de glucosa.
- Llevar a cabo ingeniería de proteínas de la enzima ADHB para ampliar los sustratos que pueda usar, a decir el NADPH.

PERSPECTIVAS en la Producción de L-Lactato

- Llevar a cabo la caracterización anaeróbica de la cepa CH1 $\Delta alsS$ evaluando su capacidad para fermentar celobiosa en concentraciones mayores de 10 g/L, ya que la hidrólisis de residuos agroindustriales genera celobiosa.

- Evaluar la posibilidad de usar sustratos más complejos pero más baratos como el almidón, ya que *B. subtilis* cuenta con las enzimas para hidrolizar dicho compuesto y utilizar la glucosa generada para crecer y producir lactato.
- Llevar a cabo diferentes estrategias de fermentación para incrementar la productividad de L-lactato utilizando a *B. subtilis*.
- Evaluar o ampliar el uso de diferentes sustratos como la arabinosa para producir L-lactato.

PERSPECTIVAS en la Utilización de Xilosa

- Ampliar las herramientas moleculares en cuanto el uso de vectores replicativos, así como la construcción de un banco de promotores con diferentes fuerzas de regulación además de diferente temporalidad de regulación.
- Mejorar la capacidad de *B. subtilis* para fermentar xilosa y producir L-lactato con mayor eficiencia. Al contarse con la batería de promotores de la perspectiva anterior podría modularse la expresión del transportador de xilosa de forma adecuada al metabolismo de *B. subtilis*, de esta forma se evitaría crear otros puntos limitantes para utilizar a la xilosa y producir L-lactato
- Incrementar la velocidad de consumo de xilosa tanto en condiciones aireadas como no aireadas, evitando el uso de vectores de alto número de copias, o bien por medio de la expresión de un transportador de xilosa con excelentes propiedades catalíticas.
- Mejorar la utilización de xilosa en condiciones en las que no exista represión catabólica por glucosa tanto en condiciones aireadas como no aireadas, por medio de la expresión de las enzimas involucradas en la vía quitando las señales de regulación catabólica podría ser utilizando vectores replicativos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barbosa MFS, Ingram LO. 1994. Expression of the *Zymomonas mobilis* Alcohol Dehydrogenase II (*adhB*) and Pyruvate Decarboxylase (*pdc*) Genes in *Bacillus*. *Curr. Microbiol.* 28:279-82
2. Beall DS, Ohta K, Ingram LO. 1991. Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Eschericia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 38:296-303
3. Becker J, Boles E. 2003. A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-Arabinose and produces ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4144-50
4. Conway T, Osman YA, Konnan JI, Hoffmann EM, Ingram LO. 1987. Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *J. Bacteriol.* 169:949-54
5. Cruz-Ramos H., Boursier L, Moszer I, Kunst F, Danchin A, Glaser P. 1995. Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identificacion of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. *EMBO J.* 14:5984-94
6. Cruz-Ramos H., Hoffmann T, Marino M, Nedjari H, Presecan-Siedel E, Dreesen O, Glaser P, Jahn D. 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J. Bacteriol.* 182:3072-80
7. Cutting SM, Vander-Horn PB. 1990. Genetic Analysis. In *Molecular biological methods for Bacillus*, ed. CR Harwood, SM Cutting, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
8. Dien BS, Cotta MA, Jeffries TW. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:258-66
9. Espinosa-de-los-Monteros J, Martinez A, Valle F. 2001. Metabolic profiles and *aprE* expression in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:379-84
10. Garvie EI. 1980. Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol. Rev.* 44:106-39
11. Gavrilescu M, Chisti Y. 2005. Biotechnology -a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.* 23:471-99
12. Gold RS, Meagher MM, Tong S, Hutkins RW, Conway T. 1996. Cloning and expression of the *Zymomonas mobilis* "Production of Ethanol" genes in *Lactobacillus casei*. *Curr. Microbiol.* 33:256-60
13. Harwood C, Cranenburgh R. 2008. *Bacillus* protein secretion: an unfolding story. *Trends Microbiol.* 16:73-9
14. Hatti-Kaul R, Törnvall U, Gustafsson L, Börjesson P. 2007. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals- a cradle-to-grave perspective. *Trends Biotechnol.* 25:119-24

15. Hernández Bustos C. 2003. Crecimiento y formación de productos en cultivos aeróbicos y anaeróbicos de *Bacillus subtilis* con glucosa, xilosa y celobiosa. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Zacatepec, Zacatepec, Mor., 1-98 pp.
16. Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microbiol. Technol.* 26:87-107
17. Hoppner TC, Doelle HW. 1983. Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17:152-7
18. Ingram LO, Aldrich HC, Borges AC, Causey TB, Martinez A, Morales F, Saleh A, Underwood SA, Yomano LP, York SW, Zaldivar J, Zhou S. 1999. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnol. Prog* 15:855-66
19. Ingram LO, Conway T. 1988. Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol* 54:397-404
20. Ingram LO, Gomez PF, Lai X, Moniruzzaman M, Wood BE, Yomano LP, York SW. 1998. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* 58:204-14
21. Ingram LO, Ohta K, Wood BE. 1998. *Gainesville, FL, US Patent No. 5821093*
22. Inui M, Kawaguchi H, Murakami S, Vertes AA, Yukawa H. 2004. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8:243-54
23. Jan J, Valle F, Bolivar F, Merino E. 2001. Construction of protein overproducer strains in *Bacillus subtilis* by an integrative approach. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:69-75
24. Krispin O, Allmansberger R. 1998. The *Bacillus subtilis* AraE protein displays a broad substrate specificity for several different sugars. *J. Bacteriol.* 180:3250-2
25. Krispin O, Allmansberger R. 1998. The *Bacillus subtilis* galE gene is essential in the presence of glucose and galactose. *J. Bacteriol.* 180:2265-70
26. Kuyper M, Hartog M, Toirkens M, Almering M, Winkler A, van Dijken J, Pronk J. 2005. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Res.* 5:399-409
27. Kuyper M, Toirkens M, Diderich J, Winkler A, van Dijken J, Pronk J. 2005. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 5:925-34
28. Lin S, Guarente L. 2003. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:241-6
29. Lindsay S, Bothast RJ, Ingram LO. 1995. Improved strains of recombinant *Escherichia coli* for ethanol production from sugar mixtures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:70-5
30. Liu S, Nichols NN, Dien BS, Cotta MA. 2006. Metabolic engineering of a *Lactobacillus plantarum* double *ldh* knockout strain for enhanced ethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33:1-7

31. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
32. Martinez A, Grabar TB, Shanmugam KT, Yomano LP, York SW, Ingram LO. 2007. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnol. Lett.* 29:397-404
33. Martínez A, Ramírez OT, Valle F. 1997. Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:40-5
34. Martínez-Jiménez A, Rodríguez Alegría M, López-Mungía A, Gosset-Lagarda G. 2006. ¿Etanol carburante a partir de bagazo de caña? *Claridades Agropecuarias. Publicación Mensual de la SAGARPA*33-9
35. Nakano MM, Dailly YP, Zuber P, Clark DP. 1997. Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J. Bacteriol.* 179:6749-55
36. Neale AD, Scopes RK, Kelly JM, Wettenhall REH. 1986. The two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*: purification by differential dye ligand chromatography, molecular characterization and physiological role. *Eur. J. Biochem.* 154:119-24
37. Nichols NN, Dien BS, Bothast RJ. 2003. Engineering lactic acid bacteria with pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase genes for ethanol production from *Zymomonas mobilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:315-21
38. Nielsen J. 2001. Metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:263-83
39. Ohta K, Beall DS, Mejia JP, Shanmugam KT, Ingram LO. 1991. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:893-900
40. Pariente Pérez T. 2007. Construcción y caracterización de una cepa de *B. subtilis* que puede utilizar xilosa como única fuente de carbono. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM
41. Paulsen I, Chauvaux S, Choi P, Saier MJ. 1998. Characterization of glucose-specific catabolite repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*: identification of a novel hexose:H⁺ symporter. *J. Bacteriol.* 180:498-504
42. Pessoa-Jr A, Roberto I, Menossi M, Dos Santos R, Filho S, Penna T. 2005. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121-124:59-70
43. Ragauskas A, Williams C, Davison B, Britovsed G, Cairney J, Eckert C, Templar R, Tschaplinski T. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311:484-9
44. Rodríguez RL, Tait RC. 1983. Recombinant DNA techniques: an introduction. Massachusetts, USA: Addison-Wesley Publishing Co. Advanced Book Program Reading, Massachusetts, USA. 1-236 pp.

45. Romero García S, Orencio Trejo M, Gosset Lagarda G, Martínez Jiménez A. 2007. Ingeniería Metabólica: Residuos agroindustriales y etanol carburante. *Ciencia y Desarrollo* 33:60-6
46. Saitoh S, Ishida N, Onishi T, Tokuhiko K, Nagamori E, Kitamoto K, Takahashi H. 2005. Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2789-92
47. Sharma RC, Schimke RT. 1996. Preparation of electro-competent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques* 20:42-4
48. Singh SK, Ahmed SU, Pandey A. 2006. Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochem.* 41:991-1000
49. Steinmetz M, Richter R. 1994. Plasmids designed to alter the antibiotic resistance expressed by insertion mutations in *Bacillus subtilis*, through in vivo recombination. *Gene* 142:79-83
50. Stülke J, Hillen W. 2000. Regulation of carbon metabolism in *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:849-80
51. Talarico LA, Gil MA, Yomano LP, Ingram LO, Maupin-Furlow JA. 2005. Construction and expression of an ethanol production operon in Gram-positive bacteria. *Microbiology* 151:4023-31
52. Tobisch S, Glaser P, Krüger S, Hecker M. 1997. Identification and characterization of a new β -glucoside utilization system in *Bacillus subtilis*. *J. Biotechnol.* 179:496-506
53. Veech R, Eggleston L, Krebs H. 1969. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver. *Biochem. J.* 115:609-19
54. Wei Y, Guffanti A, Ito M, Krulwich T. 2000. *Bacillus subtilis* YqkI is a novel malic/Na⁺-lactate antiporter that enhances growth on malate at low protonmotive force. *J. Biol. Chem.* 275:30287-92
55. Wu S, Wong S. 1999. Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*. *J. Biotechnol.* 72:185-95
56. Ye R, Yang LP, 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* 25-6
57. Zhou S, Causey TB, Hasona A, Shanmugam KT, Ingram LO. 2003. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:399-407
58. Zhou S, Shanmugam KT, Ingram LO. 2003. Functional replacement of the *Escherichia coli* D-(-)-lactate dehydrogenase gene (*ldhA*) with the L-(+)-lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2237-44