

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---



FACULTAD DE CIENCIAS

Construcción y caracterización de una cepa derivada de  
*Bacillus subtilis* que pueda utilizar xilosa como única  
fuente de carbono

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

TELMA OLIVIA PARIENTE PÉREZ

TUTOR

DR. GUILLERMO GOSSET LAGARDA

CO-TUTORA

M. en C. AÍDA SUSANA ROMERO GARCÍA



2007



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  
DIRECCIÓN DEL DR. GUILLERMO GOSSET  
LAGARDA Y CO-TUTORIA DE LA M. EN C. AÍDA  
SUSANA ROMERO GARCÍA EN EL DEPARTAMENTO  
DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS DEL  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Paciente Pérez Telma Olivia 01 735 35 4 03 72 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 402016216</p>
<p>2. Datos del tutor Dr Guillermo Gosset Lagarda</p>
<p>3. Datos de la Co-tutora M en C Aída Susana Romero García</p>
<p>4. Datos del sinodal 1 Dr José Luis Puente García</p>
<p>5. Datos del sinodal 2 Dr Alfredo Martínez Jiménez</p>
<p>6. Datos del sinodal 3 Dra Laura del Carmen Vargas Parada</p>

A mi padre signo de fuerza, constancia y entereza en mi vida, ejemplo a seguir.

A mi madre por enseñarme lo noble y hermoso de la vida.

A mis hermanos con sus risas iluminan mi vida y la de mis padres



Cada persona, en su existencia, puede tener dos actitudes: construir o plantar. Los constructores un día terminan aquello que estaban haciendo y entonces les invade el tedio. Los que plantan a veces sufren con las tempestades y las estaciones, pero el jardín jamás para de crecer.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Guillermo Gosset Lagarda por haberme abierto las puertas al mundo del conocimiento al permitirme estar dentro de su grupo de trabajo.

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez por su apoyo y sobre todo por compartir sus experiencias profesionales conmigo.

A la M. en C. Aída Susana Romero García por la paciencia y dedicación que tuvo para guiarme en este camino de la investigación, pero sobre todo por ser una gran persona de la cual aprendí mucho.

A la M. en C. Georgina Hernández por todo el apoyo técnico en el manejo y análisis de muestras por HPLC.

A M. C. Ramón de Anda por el apoyo técnico en el manejo del equipo de fermentación, así como por sus consejos.

A C.D. Mercedes Enzaldo Cruz por proveerme del material necesario, ya que sin ello este trabajo no sería posible, pero sobre todo por la amistad y sinceridad.

A todos y cada uno de los integrantes del laboratorio Bolívar/Gosset por la amistad, apoyo y comprensión que me brindaron durante mi estancia en el laboratorio, en especial a Inés, Natividad, Monse, Marina, Noemí, Gerardo.

A ti César por animarme y salvarme de caer en la desesperación, aunque tú no te hayas dado cuenta.

Especialmente mis padres por ayudarme a crecer no sólo en el ámbito profesional sino como persona, por creer en mí porque con su apoyo he llegado a realizar una de mis mejores metas. A mis hermanos por sus consejos y todos los momentos compartidos durante mi carrera. A la familia Pariente Benítez por su apoyo, sabiduría y experiencias compartidas.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
NOMENCLATURA.....	8
1. RESUMEN.....	9
2. INTRODUCCIÓN.....	12
3. ANTECEDENTES.....	14
3.1 Características de <i>Bacillus subtilis</i> .....	14
3.2 Metabolismo de carbohidratos.....	16
3.3 Xilosa .....	19
3.3.1 Metabolismo de la xilosa.....	19
3.4 Metabolismo y regulación de la xilosa en <i>Bacillus subtilis</i> .....	20
3.5 Mutantes espontáneas xil <sup>+</sup> de <i>Bacillus subtilis</i> .....	22
3.6 Permeasa de glucosa (GlcP).....	23
3.7 Metabolismo durante el crecimiento aeróbico y anaeróbico.....	24
3.7.1 Crecimiento aeróbico.....	25
3.7.2 Respiración de nitratos.....	28
3.7.3 Fermentación anaeróbica.....	28
4. JUSTIFICACIÓN.....	31
5. HIPÓTESIS.....	32
6. OBJETIVOS.....	32
6.1 Objetivo general.....	32
6.2 Objetivo particular.....	32
6.2.1 Objetivos específicos.....	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
7.1 Cepas y plásmidos.....	33
7.2 Reactivos.....	34
7.2.1 Enzimas.....	35
7.2.2 Extracción de plásmido.....	35
7.3 Generación de mutantes espontáneas xil <sup>+</sup> de <i>B. subtilis</i> .....	35

7.4 Transformación de <i>B. subtilis</i> 168Trp <sup>+</sup> .....	35
7.5 Generación de un banco de células.....	37
7.6 Medios de cultivo.....	38
7.7 Condiciones de cultivo.....	38
7.7.1 Desarrollo de inóculos .....	39
7.7.2 Cultivos aeróbicos.....	39
7.7.3 Cultivos anaeróbicos.....	40
7.8 Métodos analíticos.....	40
7.8.1 Concentración celular.....	40
7.8.2 Evaluación mediante HPLC.....	40
8. RESULTADOS.....	42
8.1 Generación de mutantes espontáneas xil <sup>+</sup> de <i>B. subtilis</i> .....	42
8.2 Transformación de la cepa 168Trp <sup>+</sup> con el plásmido pE18P43glcP.....	42
8.3 Evaluación del crecimiento de <i>B. subtilis</i> en condiciones aeróbicas.....	43
8.3.1 Crecimiento aeróbico en glucosa.....	43
8.3.2 Crecimiento aeróbico en xilosa.....	46
8.3.3 Crecimiento aeróbico en mezcla glucosa-xilosa.....	48
8.4 Evaluación del crecimiento de <i>B. subtilis</i> en condiciones anaeróbicas.....	52
8.4.1 Crecimiento anaeróbico en glucosa.....	53
8.4.2 Crecimiento anaeróbico en xilosa.....	58
8.4.3 Crecimiento anaeróbico en mezcla glucosa-xilosa.....	62
9. DISCUSIÓN.....	68
10. CONCLUSIONES.....	76
11. PERSPECTIVAS.....	78
12. REFERENCIAS .....	79
13 ANEXOS.....	86
13.1 Descripción del equipo de fermentación.....	86
13.1 Operación del equipo de fermentación.....	88
13.2 Descripción del equipo de mini-fermentadores (Fleakers).....	89
13.2.1 Operación del equipo de mini-fermentadores.....	90
13.3 Cálculos.....	92

<b>13.3.1 Estimación de la velocidad específica de crecimiento.....</b>	<b>92</b>
<b>13.3.2 Corrección de biomasa por factor de dilución.....</b>	<b>92</b>
<b>13.3.3 Cálculos de rendimientos y velocidades de consumo de azúcares y formación de productos.....</b>	<b>93</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Estructura desarrollada de la xilosa, así como su estructura en el espacio.....	<b>19</b>
<b>Figura 2</b> Ruta metabólica de la xilosa.....	<b>20</b>
<b>Figura 3</b> Modelo del operón <i>xylAB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> .....	<b>21</b>
<b>Figura 4</b> Organización genética del operón <i>xyn</i> en <i>Bacillus subtilis</i> .....	<b>21</b>
<b>Figura 5</b> Modelo de la regulación del operón <i>xylAB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> .....	<b>22</b>
<b>Figura 6</b> Organización de la secuencia del gen <i>glcP</i> .....	<b>24</b>
<b>Figura 7</b> El ciclo de Krebs y vías relacionadas.....	<b>26</b>
<b>Figura 8</b> Ruta de respiración aeróbica en <i>Bacillus subtilis</i> .....	<b>27</b>
<b>Figura 9</b> Rutas de fermentación y el catabolismo, propuesta para <i>Bacillus subtilis</i> .....	<b>30</b>
<b>Figura 10</b> Plásmido pE18P43glcP.....	<b>34</b>
<b>Figura 11</b> Patrón de bandas del plásmido pE18P43glcP con las enzimas <i>HindIII</i> y <i>EcoRI</i> la cual produce dos bandas de 3000 y 1800 pb.....	<b>43</b>
<b>Figura 12</b> Crecimiento aeróbico en medio mínimo con 10g/L de glucosa de las cepas: A) CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> ; B) CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> <i>xil</i> *; C) 168Trp <sup>+</sup> /P43; D) 168Trp <sup>+</sup> /glcP .....	<b>45</b>
<b>Figura 13</b> Crecimiento aeróbico en medio mínimo con xilosa en las cepas A) CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> <i>xil</i> * y B) 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	<b>46</b>
<b>Figura 14</b> Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) aeróbico en xilosa de las cepas CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> <i>xil</i> * y 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	<b>47</b>
<b>Figura 15</b> Velocidad específica de consumo de xilosa ( $q_{xil}$ ) en cultivos en medio mínimo con xilosa de las cepas CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> <i>xil</i> * y 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	<b>47</b>
<b>Figura 16</b> Cinéticas de crecimiento, consumo de azúcar y formación de producto en medio mínimo con mezcla glucosa-xilosa de las cepas: A) CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> ; B) CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> <i>xil</i> *; C) 168Trp <sup>+</sup> /P43; D) 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	<b>49</b>
<b>Figura 17</b> Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), en condiciones aeróbicas en mezcla glucosa-xilosa de las cepas CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> , CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> <i>xil</i> *, 168Trp <sup>+</sup> /P43 y 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	<b>51</b>
<b>Figura 18</b> Velocidad específica de consumo ( $q_s$ ) de glucosa y xilosa durante el crecimiento aeróbico en mezcla glucosa-xilosa de las cepas CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> , CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> <i>xil</i> *,	

168Trp <sup>+</sup> /P43 y 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	52
<b>Figura 19</b> Crecimiento anaeróbico en medio mínimo con glucosa de las cepas: A) CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> ; B) CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> xil*; C) 168Trp <sup>+</sup> /P43; D) 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	54
<b>Figura 20</b> Velocidad específica de crecimiento anaeróbico en medio mínimo con glucosa de las cepas A) CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> ; B) CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> xil*; C) 168Trp <sup>+</sup> /P43; D) 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	55
<b>Figura 21</b> Velocidad específica de consumo de glucosa durante la fase exponencial en cultivos anaeróbicos con glucosa de las cepas CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> , CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> xil*, 168Trp <sup>+</sup> /P43, 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	56
<b>Figura 22</b> Comparación de velocidad específica de producción de lactato ( $q_{\text{lactato}}$ ), en la fase exponencial (a) y en la fase estacionaria (b), en cultivos anaeróbicos en medio mínimo con glucosa de las cepas CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> , CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> xil*, 168Trp <sup>+</sup> /P43, 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	57
<b>Figura 23</b> Crecimiento anaeróbico en medio mínimo con xilosa de las cepas CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> xil* y 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	59
<b>Figura 24</b> Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en cultivos anaeróbicos en medio mínimo con xilosa de las cepas CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> xil* y 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	60
<b>Figura 25</b> Velocidad específica de consumo de xilosa ( $q_{\text{xil}}$ ) en cultivos anaeróbicos en medio mínimo de las cepas CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> xil* y 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	60
<b>Figura 26</b> Comparación de velocidad específica de producción de lactato ( $q_{\text{lactato}}$ ) en la fase exponencial (a) y en la fase estacionaria (b), en cultivos anaeróbicos con xilosa de las cepas CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> xil* y 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	61
<b>Figura 27</b> Crecimiento anaeróbico en mezcla glucosa-xilosa de las cepas A) CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> ; B) CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> xil*; C) 168Trp <sup>+</sup> /P43; D) 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	63
<b>Figura 28</b> Velocidad específica de crecimiento en cultivos anaeróbicos en medio mínimo con mezcla glucosa-xilosa de las cepas A) CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> ; B) CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> xil*; C) 168Trp <sup>+</sup> /P43; D) 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	65
<b>Figura 29</b> Velocidad específica de consumo de glucosa ( $q_{\text{glc}}$ ) en cultivos anaeróbicos en medio mínimo con mezcla glucosa-xilosa de las cepas CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> , CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> xil*, 168Trp <sup>+</sup> /P43 y 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	66
<b>Figura 30</b> Velocidad específica de producción de lactato ( $q_{\text{lactato}}$ ), en la fase exponencial en cultivos anaeróbicos en medio mínimo con mezcla glucosa-xilosa de las cepas CH1	

<i>alsS</i> <sup>-</sup> , CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> xil*, 168Trp <sup>+</sup> /P43 y 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	<b>67</b>
<b>Figura 31</b> Balance de ATP y NADH en el metabolismo de azúcares en <i>Escherichia coli</i> . (Tao et al. 2001 en Hernández - Bustos, 2003).....	<b>73</b>
<b>Figura 32</b> Componentes del equipo de fermentación.....	<b>88</b>
<b>Figura 33</b> Preparación del fermentador para esterilizar.....	<b>89</b>
<b>Figura 34</b> Componentes del equipo de mini-fermentadores o Fleakers.....	<b>90</b>
<b>Figura 35</b> Modo de preparar los mini-fermentadores para su esterilización.....	<b>91</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Grupos y características del género <i>Bacillus</i> .....	<b>15</b>
<b>Tabla 2.</b> Azúcares utilizados por <i>Bacillus subtilis</i> .....	<b>18</b>
<b>Tabla 3.</b> Cepas utilizadas en este trabajo.....	<b>33</b>
<b>Tabla 4.</b> Plásmidos utilizados en este trabajo.....	<b>33</b>
<b>Tabla 5.</b> Rendimiento biomasa/sustrato ( $Y_{x/s}$ ) y producto/sustrato ( $Y_{p/s}$ ) del crecimiento aeróbico en glucosa de las cepas CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> , CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> <i>xil</i> <sup>*</sup> , 168Trp <sup>+</sup> /P43 y 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	<b>44</b>
<b>Tabla 6.</b> Resumen de la biomasa, y rendimientos biomasa/sustrato y producto/sustrato durante el consumo de glucosa (primera fase de crecimiento) y el consumo de la xilosa (segunda fase de crecimiento) en las cepas CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> , CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> <i>xil</i> <sup>*</sup> , 168Trp <sup>+</sup> /P43, 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	<b>50</b>
<b>Tabla 7.</b> Rendimientos $Y_{\text{biomasa/sustrato}}$ y $Y_{\text{producto/sustrato}}$ , del crecimiento anaeróbico de las cepas con fondo genético CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> , CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> <i>xil</i> <sup>*</sup> , 168Trp <sup>+</sup> /P43 y 168Trp <sup>+</sup> /glcP.....	<b>58</b>

## NOMENCLATURA

SIMBOLO	DEFINICIÓN	UNIDADES
<b>Eri</b>	Eritromicina.	
<b>Cepa mutante</b>	<i>B. subtilis</i> CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> xil*.	
<b>Cepa transformada</b>	<i>B. subtilis</i> 168Trp <sup>+</sup> /glcP.	
<b>glc</b>	Glucosa.	
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani	
<b>Lin</b>	Lincomicina.	
<b>DCW</b>	Peso seco de células (por sus siglas en inglés dry cellular weight)	g/L
<b>DO</b>	Densidades ópticas.	
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución (por sus siglas en inglés High performance liquid chromatography)	
<b>M9</b>	Medio mineral para <i>Escherichia coli</i> .	
<b>P</b>	Producto	
<b>q<sub>p</sub></b>	Velocidad específica de formación de producto.	g <sub>p</sub> /g <sub>DCW</sub> ·h
<b>q<sub>s</sub></b>	Velocidad específica de consumo de azúcar.	g <sub>s</sub> /g <sub>DCW</sub> ·h
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.	min <sup>-1</sup>
<b>S</b>	Sustrato	g/L
<b>Spt</b>	Espectinomicina.	
<b>Trp<sup>+</sup></b>	Capaz de sintetizar triptófano	
<b>X<sub>MAX</sub></b>	Biomasa máxima alcanzada durante la fase de crecimiento exponencial.	g <sub>DCW</sub> /L
<b>xil</b>	Xilosa.	
<b>μ</b>	Velocidad específica de crecimiento.	h <sup>-1</sup>
<b>168Trp<sup>+</sup>/P43</b>	Cepa 168Trp <sup>+</sup> transformada con el plásmido pE18P43.	
<b>CH1 <i>alsS</i><sup>-</sup></b>	Cepa parental de CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> utilizada como control.	

## 1. RESUMEN

Ante el agotamiento de los yacimientos de petróleo y con ello todos los productos que de él derivan es imperiosa la necesidad de crear alternativas que nos permitan sustentar tal demanda de hidrocarburos, sin comprometer los recursos de las futuras generaciones. Una de estas alternativas es la biotecnología, que a través de sistemas biológicos tiene como finalidad la producción de compuestos capaces de sustituir a los obtenidos por el petróleo a partir de materias primas más económicas.

Los residuos agroindustriales, los cuales están constituidos principalmente por mezclas de xilosa, glucosa, celulosa, lignina y pectinas, representan una fuente de carbono abundante y barata. No obstante, los organismos de interés industrial no son capaces de utilizar al máximo dichos sustratos.

*Bacillus subtilis* es un microorganismo ampliamente usado a nivel industrial en condiciones aeróbicas, capaz de metabolizar una amplia variedad de azúcares tales como glucosa, arabinosa, manosa, sacarosa, etcétera. Sin embargo, a pesar de que *B. subtilis* posee las enzimas necesarias para metabolizar la xilosa no es capaz de crecer utilizándola como única fuente de carbono, debido a que carece de un transportador específico para introducirla (Schmiedel y Hillen, 1996; Steinmetz, 1993).

En la literatura, se han encontrado dos reportes de cepas de *B. subtilis* capaces de crecer utilizando la xilosa como única fuente de carbono (fenotipo xil<sup>+</sup>), ya sea como consecuencia de una mutación no caracterizada o bien por el relajamiento en la especificidad del transportador de arabinosa.

En este estudio se generaron y evaluaron dos cepas capaces de crecer utilizando la xilosa como única fuente de carbono, bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Las cepas obtenidas fueron una mutante espontánea xil<sup>+</sup> llamada CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* obtenida a través del método descrito por Schmiedel y Hillen (1996) y derivada de la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup>; y la cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP derivada

de la cepa 168Trp<sup>+</sup> la cual fue transformada con el plásmido pE18P43glcP, el cual contiene un gen que codifica para una permeasa de glucosa (*glcP*) de *B. subtilis*.

Con estas cepas se relizaron cultivos aeróbicos y anaeróbicos en medio mínimo utilizando como fuentes de carbono glucosa, xilosa y mezcla glucosa-xilosa. En el crecimiento aeróbico en xilosa las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP presentaron una velocidad específica de crecimiento de 0.25 h<sup>-1</sup>, una biomasa de 2.14 g/L y consumieron toda la xilosa del medio mínimo (aproximadamente 10 g/L).

En los cultivos aeróbicos en glucosa, las todas cepas presentan una velocidad específica de crecimiento de 0.6 h<sup>-1</sup> y una biomasa de 3.5 g/L, comparando los resultados en glucosa y xilosa vemos que la velocidad específica de crecimiento disminuye en aproximadamente 50% así mismo la biomasa disminuye 60% comparándola con glucosa, ello probablemente como consecuencia de una incapacidad de XylA y XylB para fosforilar e isomerizar la xilosa o bien por la capacidad de la vía de las pentosas.

En anaerobiosis las cepas presentaron una disminución en su velocidad específica de crecimiento en relación con los cultivos aeróbicos como consecuencia de una limitada producción de ATP. La velocidad específica de crecimiento de las cepas fue de 0.036 h<sup>-1</sup> alcanzando una biomasa final de 0.11 g/L. Se obtuvo como principal producto el lactato con rendimientos lactato/xilosa de 0.578 g<sub>lactato</sub>/g<sub>xilosa</sub> para la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* y 0.660 g<sub>lactato</sub>/g<sub>xilosa</sub> para la cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP, los cuales son 50% menor en relación con los obtenidos en los cultivos anaeróbicos en glucosa ( $Y_{\text{lactato}/\text{glc}}=1$ ).

En los cultivos aeróbicos en medio mínimo con una mezcla glc/xil las cepas presentaron un crecimiento diáuxico, en la cual se observó que todas fueron capaces de utilizar la xilosa; en el caso de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/P43 (las cuales carecen de un transportador para xilosa) fueron capaces de utilizar la xilosa, debido a la co-utilización del acético presente en el medio, producido durante la fase de crecimiento en glucosa. Bajo estas condiciones la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* presentó un consumo total de xilosa presente en el medio, mientras que el resto de las cepas su consumo fue parcial.

Por otra parte en los cultivos anaeróbicos en mezcla glucosa-xilosa sólo las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y CH1 *alsS* xil\* presentaron crecimiento diáuxico; sin embargo, la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* fue la única capaz de utilizar la xilosa (no llega a consumirla toda) una vez que se agoto la glucosa. El crecimiento que presentó la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> se debió más a los componentes presentes después de la lisis celular que al consumo de xilosa.

Los resultados obtenidos indican que tanto la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP son capaces de introducir y metabolizar la xilosa bajo condiciones aeróbicas en cultivos con xilosa. No obstante, en condiciones anaeróbicas la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* resultó ser mejor que la cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP, debido a que, en los cultivos en mezcla fue la única capaz de utilizar xilosa una vez agotada la glucosa.

Los resultados obtenidos en los cultivos aeróbicos y anaeróbicos en xilosa, mostraron que el transportador GlcP permite el transporte xilosa lo cual es congruente, debido a que la xilosa es una aldopentosa y la única diferencia con los azúcares reportados es que es una pentosa. De tal forma se concluyó que el GlcP, además de permitir la entrada de glucosa, manosa, 2-Deoxiglucosa y metil  $\alpha$ - glucosidos también permite la entrada de xilosa, lo cual demuestra que GlcP presenta una amplia utilización de azúcares.

## 2. INTRODUCCIÓN

A lo largo de nuestra vida cotidiana realizamos un sin fin de actividades tales como: transportarnos, trabajar, alimentarnos, divertirnos, entre otras. Actividades que realizamos gracias a que contamos con los recursos tecnológicos. De esta forma, la vida es más cómoda debido a la presencia de fuentes de energía, como el petróleo y el gas natural. Desafortunadamente, esta sociedad dependiente de la energía proveniente de fuentes fósiles tocará fin durante el siglo XXI, como consecuencia del uso excesivo y creciente de las mismas. Esta situación nos plantea la necesidad de buscar y desarrollar nuevas tecnologías que permitan suplir las necesidades energéticas actuales sin comprometer las de nuestros descendientes. Es así, como la ciencia ha puesto principal atención al potencial biotecnológico que representa la biomasa (término utilizado para asignar a todos los materiales orgánicos que provienen del mundo vegetal), la cual es considerada como una materia prima renovable.

Ahora bien, ¿de dónde obtenemos la biomasa vegetal? Una de las principales fuentes de biomasa son los residuos agroindustriales tales como: el bagazo de caña de azúcar, la cáscara y pulpa del café, entre otros; los cuales pueden ser utilizados como materia prima en la generación de productos como enzimas, ácidos orgánicos, etanol y aminoácidos. Entre los grupos de materia prima renovable obtenidos de la biomasa vegetal se encuentra la celulosa y hemicelulosa, polímeros de carbohidratos que constituyen el 75% de toda la materia orgánica. La celulosa es un homopolímero de glucosa. La hemicelulosa es un polímero heterógeno, cuya constitución es 75% de xilosa, 15% de glucosa y 10% de arabinosa (Martínez *et al.*, 2000). La cuestión por la que los carbohidratos son una opción para sustituir las fuentes fósiles, es debido a que gracias a transformaciones químicas o biológicas, se pueden obtener ácidos orgánicos, tales como láctico, acético, fumárico u obtener combustibles como el bioetanol.

La gran mayoría de los microorganismos utilizados en la industria son capaces de metabolizar la glucosa, pero pocos utilizan eficientemente la xilosa y por consiguiente no se aprovecha al 100% la fuente de carbono que representan los residuos agroindustriales. De esta forma se genera la necesidad de buscar organismos capaces de metabolizar pentosas y hexosas. *B.*

*subtilis* es una bacteria que puede metabolizar una variedad de azúcares entre las cuales destacan glucosa, arabinosa, xilosa, entre otros. Sin embargo, *B. subtilis* carece de un transportador que le permita introducir la xilosa, de ahí la importancia de incorporar un transportador específico para xilosa a fin de maximizar el potencial industrial que nos ofrece *B. subtilis*, en la utilización de residuos agroindustriales.

Entre los compuestos que se pueden obtener de la utilización de la biomasa vegetal a través de la fermentación realizada por microorganismos esta el ácido láctico. El ácido láctico (ácido – 2- hidroxipropinoico)  $\text{CH}_3\text{-CHOHCOOH}$  (Jonh *et al*, 2007) constituye una plataforma química primaria, debido a sus múltiples aplicaciones en la industria alimenticia, farmacéutica, textil y química. El ácido láctico puede ser producido a través de síntesis químicas, o un proceso fermentativo denominada fermentación láctica, llevado a cabo por bacterias u hongos filamentosos. Las bacterias lácticas convierten el ácido pirúvico a lactato en una reacción catalizada por la enzima D- lactato deshidrogenasa o L- lactato deshidrogenasa. Los dímeros de lactato pueden ser polimerizados para obtener polímeros biodegradables, así el ácido láctico nos ofrece una alternativa viable para solventar futuros problemas de escasez de suministros petroquímicos y la necesidad de tener un menor impacto en el medio ambiente mediante la degradación biológica de polímeros. Cabe aclarar que los lactobacilos no utilizan eficientemente la xilosa y presentan requerimientos nutricionales complejos de tal forma que hacen costosa y poco viable, desde el punto de vista económico, la obtención de lactatos a partir de estos microorganismos. De ahí la importancia de estudiar procesos fermentativos en diversos microorganismos con el fin de maximizar la utilización de xilosa y poderla convertir en productos útiles para el ser humano.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 Características de *Bacillus subtilis***

El género *Bacillus* pertenece a las bacterias Gram-positivas capaces de producir endosporas termoresistentes bajo condiciones de estrés. Así mismo, resisten a agentes y condiciones perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos (Bioland, 2006). Este género comprende más de 50 especies y está subdividido dentro de 6 grupos considerando la variedad morfológica y metabólica de cada especie (Priest, 1993) (Tabla 1). Posee un ADN con bajo contenido de G+C (de 32-38), la mayoría de las especies del género son versátiles quimioheterótrofas capaces de respirar usando una variedad de compuestos orgánicos (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos) (Bioland, 2006).

Tabla 1. Grupos y características del género *Bacillus*  
(Priest, 1993)

Grupo	Características
I	Anaerobios facultativos, crecen rápidamente en ausencia de oxígeno. Producen ácidos a partir del metabolismo de una amplia variedad de azúcares. Ej. <i>B. polymyxa</i> , <i>B. macerans</i> .
II	Producen ácidos a partir del metabolismo de una amplia variedad de azúcares, incluyendo glucosa. La mayoría crece en ausencia de oxígeno, particularmente en presencia de nitratos. Las esporas son elipsoides y no hinchan la célula progenitora. Ej. <i>B. subtilis</i>
III	Aerobios estrictos, no producen ácidos a partir del metabolismo de azúcares. Producen esporas que hinchan a la célula progenitora. Ej. <i>B. brevis</i>
IV	Producen esporas esféricas que pueden hinchar a la célula progenitora y contienen L-lisina u ornitina en la pared celular. Aerobios estrictos, algunos presentan una habilidad limitada para producir ácidos a partir del metabolismo de azúcares. Ej. <i>B. sphaericus</i>
V	Especies termófilas, con temperaturas de crecimiento mayores a 50°C. Fisiológica y morfológicamente son heterogéneos, pero producen esporas ovales que hinchan a la célula progenitora. Ej. <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. thermocloacae</i> , <i>B. kaustophilus</i> y <i>B. coagulans</i>
VI	Especies termófilas y acidófilas con ácidos grasos alicíclicos en la membrana Ej. <i>B. acidocaldarius</i> , <i>B. acidoterrestris</i> y <i>B. cycloheptanicus</i> .

Muchos miembros del género *Bacillus* producen antibióticos, tales como bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina. La mayoría son mesófilos, con temperatura de crecimiento óptima entre 30 y 45 °C, pero el género también contiene un número de especies

termofílicas con una temperatura óptima de 65 °C; el límite inferior de pH para crecimiento en *Bacillus* es de 2 a 3. (Bioland, 2006).

*B. subtilis* es reconocida como una bacteria aerobia; sin embargo, ésta puede crecer y esporular lentamente bajo condiciones anaerobias estrictas, utilizando al nitrato como un aceptor final de electrones y a la glucosa como donador de estos (Cruz-Ramos *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 1997; Nakano y Zuber, 1998).

*B. subtilis* realiza una fermentación mixta, cuyos productos principales son butanediol, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Es reconocido como un organismo GRAS (generalmente reconocido como seguro por la FDA, por sus siglas en inglés generally regarded as safe), lo que le permite que sea ampliamente utilizado en la industria alimenticia (Zukowski, 1992). Sin embargo, un factor limitante para su uso en la producción de proteínas heterólogas, es la síntesis y secreción de proteasas extracelulares en el medio de cultivo (Stephenson *et al.*, 1999). Hasta la fecha son ocho las proteasas que se han identificado en *B. subtilis*, las cuales están clasificadas en dos grandes grupos: serinproteasas y metalproteasas (Stephenson *et al.*, 1999). Sin embargo, gracias al desarrollo tecnológico en la biología molecular, se han construido cepas de *B. subtilis* deficientes de proteasas (Ye *et al.*, 1996).

Así como *E. coli* representa la bacteria Gram-negativa más estudiada, *B. subtilis* representa el organismo modelo de las bacterias Gram-positivas. Con esta bacteria se han realizado numerosos estudios, incluyendo investigaciones relacionadas con su habilidad de esporular e incorporar DNA extraño que son de interés para la ciencia básica, así como por sus aplicaciones industriales en la producción de enzimas e insecticidas (Stülke y Hillen, 2000).

### **3.2 Metabolismo de carbohidratos**

*B. subtilis* utiliza algunos carbohidratos como fuente de carbono, lo cual le permite obtener la energía necesaria para llevar a cabo los procesos metabólicos.

En la naturaleza, las plantas constituyen los principales productores de polisacáridos, los cuales sirven como sustratos para las bacterias de suelo y hongos. Entre los carbohidratos complejos, los más abundantes son el almidón, la celulosa y la hemicelulosa (Stülke y Hillen, 2000). *B. subtilis* tiene la capacidad de secretar carbohidrolasas extracelulares, como son  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -1,4-glucanasa,  $\beta$ -fructanasa,  $\beta$ -xilana,  $\alpha$ -arabinasa, y  $\beta$ -mannanas, que degradan polisacáridos, produciendo oligo, di o monosacáridos que son transportados dentro de la célula, fosforilados y catabolizados a través de la vía glucolítica o la vía de las pentosas fosfatos (Tabla 2; Stülke y Hillen, 2000).

*B. subtilis* puede utilizar 18 diferentes mono- y disacáridos como única fuente de carbono; que puede transportar dentro de la célula a través de una gran diversidad de sistemas multiproteicos tales como transportadores (ABC), sistema de fosfotransferasa (PTS) (cassette de unión a ATP y fosfoenolpiruvato (PEP)), así como por difusión facilitada o transportadores secundarios (Steinmetz, 1993).

Tabla 2. Azúcares utilizados por *Bacillus subtilis*  
(Stülken y Hillen, 2000)

Azúcar	Operón (es) <sup>1</sup>	Transportador <sup>2</sup>	Ruta metabólica	Regulación <sup>3</sup>
Glucosa	<i>ptsGHJ</i>	P:PtsG	Glucólisis	AT:GlcT
Sacarosa	<i>sacPA</i>	P:SacP	Glucólisis	AT:SacT
β-Glucósidos	<i>bglPH</i>	P:BglP	Glucólisis	AT:lic.
Maltosa	<i>malA yfiA malP</i>	P:MalP	Glucólisis	?
N-acetil-glucosamina	<i>nagP nagAB yvoA</i>	P:NagP	Glucólisis	R:YvoA (?)
Trealosa	<i>TrePAR</i>	P:TreP	Glucólisis	R:TreR
Oligo-β-glucósido	<i>licBCAH</i>	P:Lic.,LicC, LicA	Glucólisis	A:LicR
Oligo-β-mannosida	<i>ydhMNOPQRST</i>	P:YdhM, YdhN YdhO	Glucólisis	R:YdhQ
Fructosa	<i>LevDEFG sacC fruRBA</i>	P:LevD,LevE LevF, LevG P:FruA	Glucólisis	A:LevR R:FruR
Manitol	<i>Molad</i>	P:MtlD	Glucólisis	A:MtlR
Manosa	<i>manPA ydjF</i>	P:ManP	Glucólisis	A:ManR
Celobiosa	NR	P:?	Glucólisis	?
Glucitol	<i>gutB ydjDE</i>	S: YdjD	Glucólisis	A:GutR
Glicerol	<i>glpFKD</i>	F:GlpF	Glucólisis	AT:GLP
Inositol	<i>IolABCDEFGH IJ</i>	IolF (?)	Ruta Especial	R:IolR
Gluconato	<i>gntRKPZ</i>	ABC:AraN AraP, AraQ	Pentosas	RGntR
Arabinosa	<i>AraABDLMNO PQ-abfA</i>	S:AraE	Pentosas	R:AraR
Ribosa	<i>rbsRKDACB</i>	ABC:RbsC, RASD RbsA	Pentosas	R:RbsR

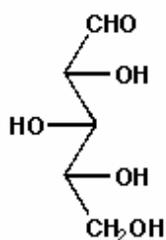
<sup>1</sup>Operón: NR no reportado.

<sup>2</sup>Mecanismo de transporte: P, sistema de fosfotransferasa; S, Simporte; F, Facilitador ABC-ATP; ? su función no ha sido reportado.

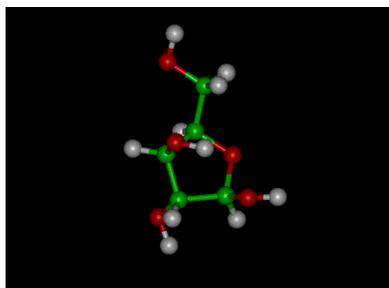
<sup>3</sup>Regulación: AT antiterminador; R represor; A activador

### 3.3 Xilosa

Entre los carbohidratos que constituyen los residuos agroindustriales se encuentra la xilosa (Figura 1), la cual es el segundo carbohidrato más abundante en la naturaleza; se presenta principalmente en estructuras poliméricas de xilano y hemicelulosa (Ingram *et al.*, 1999).



**Xilosa**

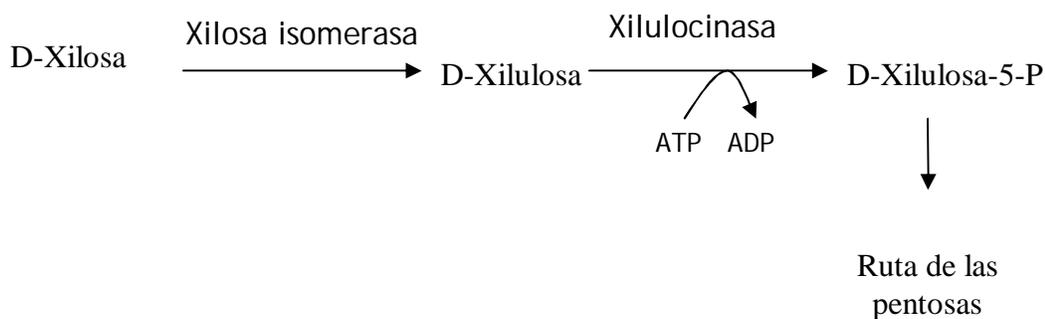


**Figura 1. Estructura desarrollada de la xilosa, así como su estructura en el espacio.**

La xilosa es utilizada por muchos microorganismos como fuente de carbono. Sin embargo, entre algunos de los organismos de importancia industrial no es utilizada, debido a que no presentan las enzimas necesarias para su metabolismo, o bien, porque carecen de un transportador que permita su introducción a la célula, como es el caso de *B. subtilis*.

#### 3.3.1 Metabolismo de la xilosa

Una vez que la xilosa es internalizada en la célula, es isomerizada a xilulosa, la cual es fosforilada formando xilulosa-5-fosfato (Dahl *et al.*, 1994). La vía metabólica es codificada por el operón *xylAB*, que está constituido por el represor (*xylR*), la xilosa isomerasa (*xylA*) y la xilulocinasa (*xylB*). Una vez que la xilulosa es fosforilada, entra a la vía de las pentosas para su catabolismo (Gärtner *et al.* 1988; Rygus *et al.* 1991) (Figura 2).

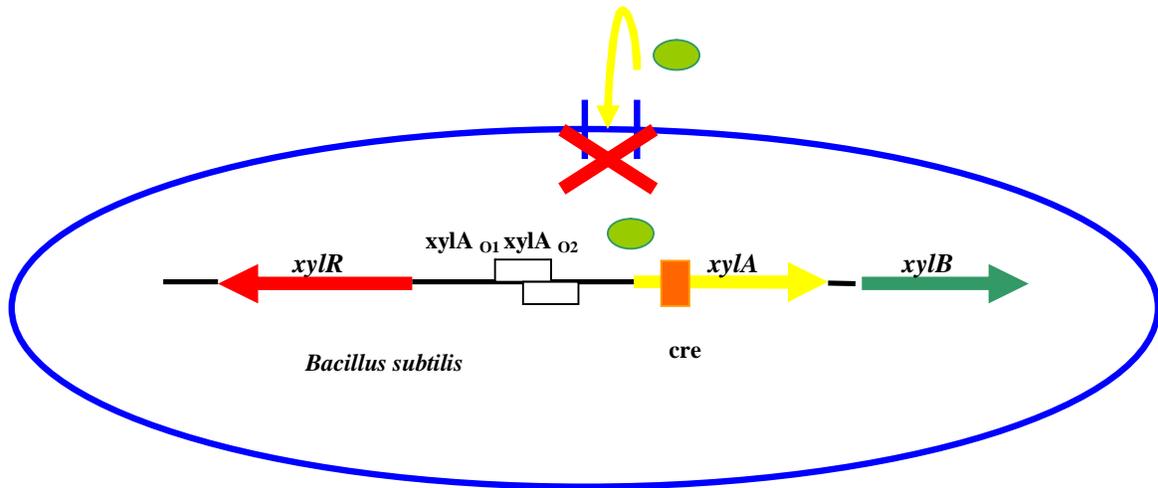


**Figura 2. Ruta metabólica de la xilosa (Gärtner *et al.*, 1988).**

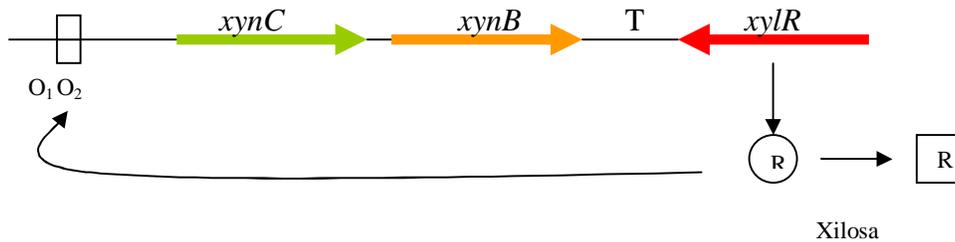
Los genes que codifican las enzimas para la utilización de xilosa ya han sido caracterizados en *E. coli* (Lawlis *et al.*, 1984, citado por Schmiedel *et al.*, 1997), *Salmonella typhimurium* (Shamanna y Sanderson, 1979, citado por Schmiedel *et al.*, 1997) y *B. subtilis* (Gärtner *et al.* 1988). La regulación y expresión de estos genes ocurre a nivel transcripcional y es mediado por un represor (codificado por *xylR*), el cual, en ausencia de xilosa, se une a la secuencia del operador (*xylO*) evitando la transcripción del operón *xylAB*.

### 3.4 Metabolismo y regulación de la xilosa en *Bacillus subtilis*

Como se mencionó anteriormente, *B. subtilis* posee las enzimas necesarias para el metabolismo de la xilosa; sin embargo, no es capaz de introducirla, debido a la carencia de un transportador específico que permita su entrada (Figura 3) (Schmiedel y Hillen, 1996; Steinmetz, 1993). No obstante esta bacteria llega a utilizar la xilosa cuando es introducida como xilanósido de la degradación del xilano, el cual es hidrolizado intracelularmente. Las dos enzimas que degradan xilano son una xilanasa y una endoxilasa que produce xilosa (Huang *et al.*, 2006). En *B. subtilis*, los genes que codifican estas enzimas se encuentran en el operón *xyn*; el cual está constituido por el gen *xynA*, cuyo producto es una  $\beta$ -xilanasa; y el operón *xynBC* que codifica una permeasa de xilanosidos y  $\beta$ -xilosidasa; T un terminador transcripcional y  $O_1$  y  $O_2$  son los operadores (Figura 4). *xynA* es expresado constitutivamente, mientras *xynBC*, junto con *xylAB* están bajo el control transcripcional del represor XylR (Schmiedel y Hillen, 1996).



**Figura 3. Modelo del operón *xylAB* de *B. subtilis*.**



**Figura 4 Organización genética del operon *xyn* en *Bacillus subtilis*.**

En ausencia de xilosa el represor R (*xylR*) está unido al operador (círculo), impidiendo la transcripción del operón. La xilosa se une a XylR produciendo un cambio conformacional (cuadrado) el cual es incapaz de unirse a los operadores.

Por otro lado, la regulación del operón *xylAB* ocurre a través de dos rutas (Figura 5):

- Ⓜ Represión catabólica: la cual es mediada por el elemento *cre* (elemento de respuesta catabólica), localizado en el fragmento de lectura *xylA*.
- Ⓜ Inducción dependiente de xilosa sobre la presencia del operador O1 y O2 (*xylO*), al cual se une el represor *xylR* (*xylR*), en ausencia de xilosa. En este estado la transcripción de *xylAB* es detenida. La inducción por xilosa dispara la liberación del

represor XylR del ADN permitiendo la transcripción (Gärtner *et al.* 1988; Rodionov *et al.*, 2001).

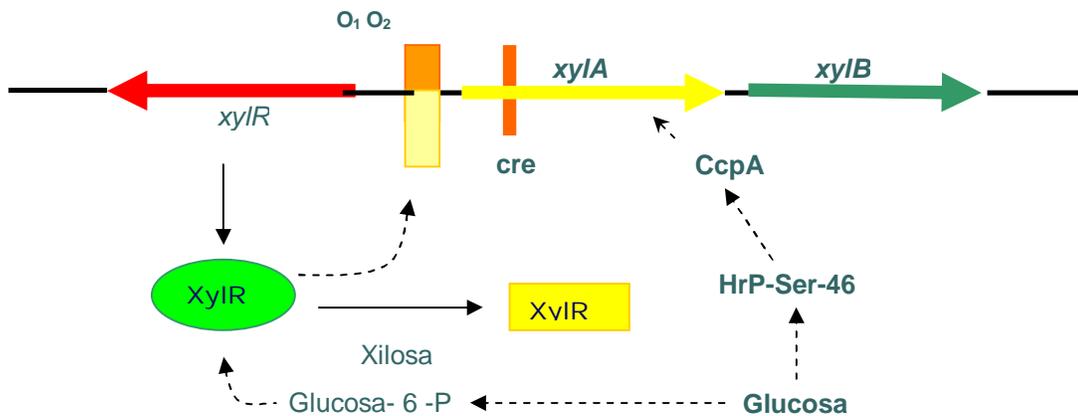


Figura 5. Modelo de la regulación del operón *xyIAB* de *B. subtilis*.

### 3.5 Mutantes espontáneas *xil*<sup>+</sup> de *Bacillus subtilis*

Schmiedel y Hillen (1996), descubrieron una mutante de *B. subtilis* 168 capaz de crecer en xilosa como única fuente de carbono. Después de crecer la cepa *B. subtilis* 168 algunos días en cajas de medio mínimo con xilosa, como única fuente de carbono, aparecieron colonias con una frecuencia de  $1 \times 10^{-6}$ / células. Una explicación para la aparición de estas colonias es la presencia de un gen críptico para la entrada de xilosa, el cual puede ser activado por una mutación espontánea, similar a la descrita por el operón *bgl* en *E. coli* K12 (Schmiedel y Hillen, 1996). Otra hipótesis es, que la entrada de xilosa en las cepas *xil*<sup>+</sup> se debe a una mutación que relaja la especificidad de otro sistema de transporte lo cual ocasiona que pueda reconocer a la xilosa (Schmiedel y Hillen, 1996).

Por otra parte, en 1998 Krispin y Allamansberger obtuvieron coincidentalmente mutantes espontáneas, las cuales fueron capaces de crecer en D-galactosa o D-xilosa como única fuente de carbono mientras realizaban estudios sobre el efecto tóxico de la galactosa sobre cepas de *B. subtilis galE*<sup>-</sup>. La caracterización de estas mutantes reveló que un transportador de arabinosa, AraE, funciona como un transportador para tres diferentes azúcares: L-arabinosa, D-galactosa y D-xilosa. Además estas mutantes mostraron que *B. subtilis* es capaz de crecer en

D-galactosa y D-xilosa cuando la L-arabinosa, el inductor de la síntesis de AraE, es adicionado al medio de crecimiento.

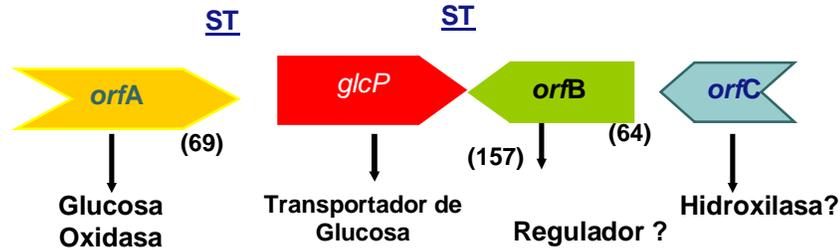
### 3.6 Permeasa de Glucosa (GlcP)

Paulsen *et al* (1998), reportaron tres tipos de mutantes de *B. subtilis* que exhiben resistencia a la represión catabólica por glucosa, las cuales dos presentan una resistencia total a represión catabólica del operón *gnt*-promovida por glucosa y una tercera que exhibe resistencia parcial. Las mutaciones fueron encontradas en:

- ❖ En el gen *ptsG*, el cual codifica para la enzima II específica para glucosa en PTS.
- ❖ En el gen *glcT*.
- ❖ En una secuencia desconocida a la que denominaron *glcP*. El producto del *glcP*, la proteína GlcP, está compuesta por 401 aminoácidos y parece ser una permeasa simporte, miembro de la familia fructosa/glucosa/galactosa de la superfamilia del principal facilitador.

Poco se sabe sobre esta permeasa, sin embargo durante el estudio realizado por Paulsen *et al* (1996), se encontraron lo siguiente (Figura 6)

- ❖ Las gráficas hidropáticas de la secuencia proteica sugieren una topología de 12  $\alpha$ -hélices transmembranales.
- ❖ En el gen los extremos son repetidos invertidos, los cuales pueden servir como terminadores transcripcionales.
- ❖ No se observa promotor que preceda al gen *glcP*.



**Figura 6. Organización de la secuencia del gen *glcP* (Paulsen *et al*, 1996).**

En experimentos realizados en *E. coli* encontraron que la proteína GlcP permite la entrada de glucosa y manosa, pero no de galactosa. Por lo cual concluyeron que la proteína GlcP transporta aldohexosas de la configuración gluco (manno) sin reconocimiento del grupo hidroxil en la posición 2. Así mismo el mecanismo por el cual funciona la permeasa es a partir de la fuerza motriz protón (Paulsen *et al*, 1996).

### 3.7 Metabolismo durante el crecimiento aeróbico y anaeróbico

Las bacterias frecuentemente se encuentran con cambios drásticos en su medio, entre los cuales están las fluctuaciones en los niveles de oxígeno externo. Estos cambios repercuten en cambios en el metabolismo que incluyen ajustes en las rutas metabólicas y velocidad de utilización de las fuentes de carbono, en el flujo de electrones con el fin de mantener el balance oxido-reducción, los mecanismos de producción de energía y ciertas reacciones de biosíntesis (Nakano y Zuber, 1997). Dichos cambios se llevan a cabo por modulación de la actividad de proteínas y/o por la regulación de la expresión de genes (Nakano y Zuber, 1997).

En el caso de *B. subtilis* al ser un organismo cuyo hábitat es el suelo, tiene que poseer los mecanismos necesarios para contender con los cambios de oxígeno, debido a que la cantidad de agua en el suelo es variable: En aerobiosis las proteínas inducidas incluyen enzimas del complejo de piruvato deshidrogenasa (PDH), varias enzimas del ciclo de ácidos tricarboxílicos y superóxido dismutasa (Nakano y Zuber, 1997). Mientras que en anaerobiosis las proteínas inducidas incluyen algunas enzimas glicolíticas y la PDH, debido a que *B. subtilis* carece de la enzima piruvato formato liasa (PFL) (Nakano y Zuber, 1998).

Estudios recientes han demostrado que *B. subtilis* puede crecer anaeróbicamente, ya sea a través de la respiración de nitratos o por fermentación (Nakano y Hulett 1997; Nakano *et al.*, 1997; Nakano y Zuber 1998; Cruz-Ramos *et al.*, 2000; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2001).

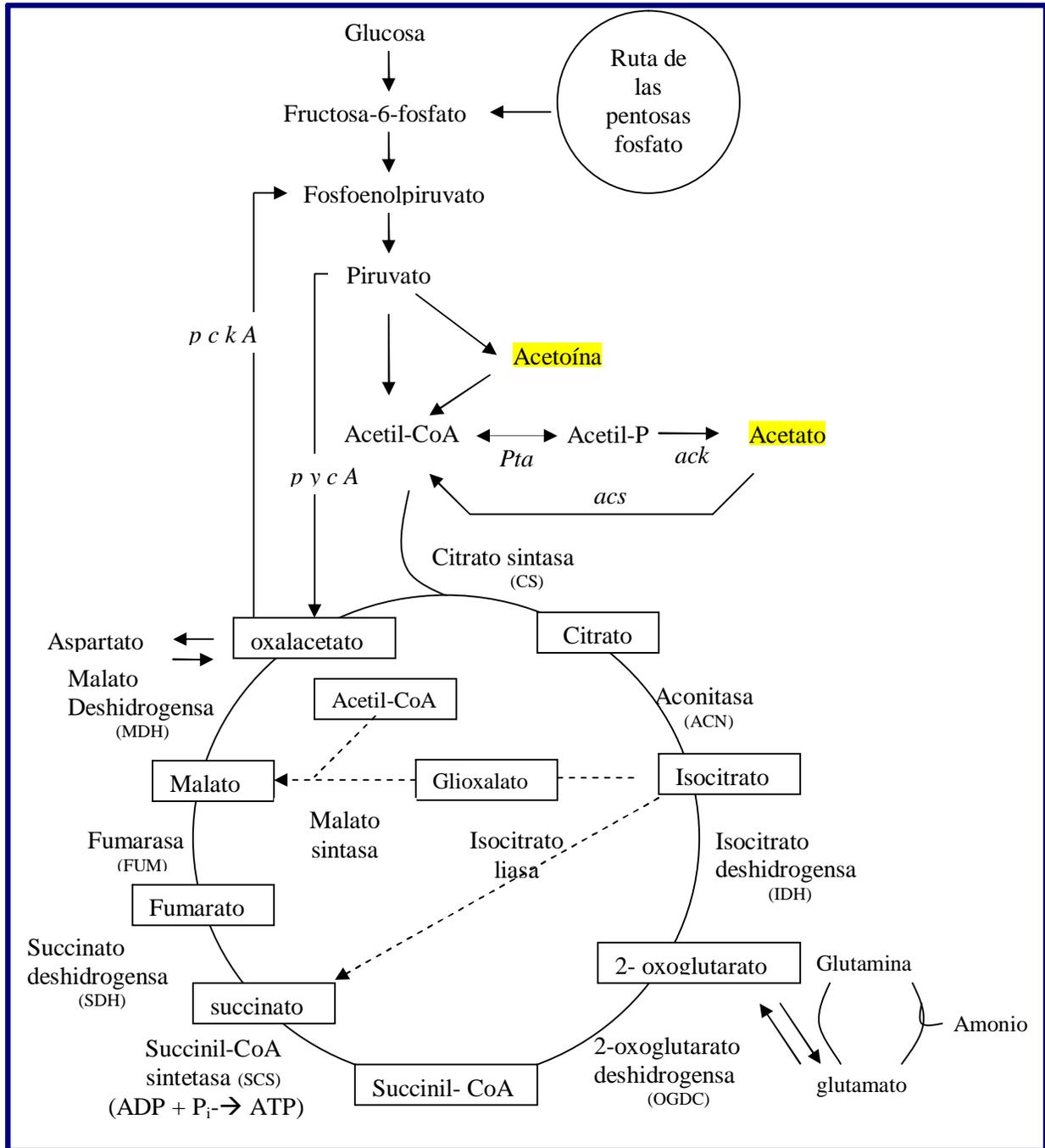
### 3.7.1 Crecimiento aeróbico

El ciclo de Krebs es la ruta central del metabolismo intermediario que genera ATP, poder reductor e intermediarios biosintéticos, cuyo principal sustrato es la acetil-Coenzima A (acetil-CoA), y sus principales derivados biosintéticos son 2-oxoglutarato, oxalacetato y succinil-CoA. En algunos organismos, el succinil-CoA es un precursor de lisina y metionina; sin embargo, *B. subtilis* utiliza acetil-CoA, para la biosíntesis de la lisina y metionina (Sonenshein, 2002).

De acuerdo a las necesidades metabólicas de la célula la acetil-CoA puede entrar al ciclo de Krebs, usarse para la biosíntesis de ácidos grasos, o convertirse en acetato con la concomitante síntesis de ATP. En *B. subtilis* la producción de acetato es catalizada por la fosfotransacetilasa (*pta*) y la acetato cinasa (*ack*). por otra parte, *B. subtilis* carece de la vía de glioxilato, la cual permite usar al acetato y ácidos grasos como única fuente de carbono; la utilización de acetato es mediada por la acetil-CoA sintetasa, el producto del gen *acs*. (Figura 7) (Sonenshein, 2002). La síntesis ATP y GTP ocurre en el ciclo de Krebs a nivel de sustrato, a través de la acción de la succinil-Coenzima A sintetasa (SCS) e indirectamente a través de la fosforilación oxidativa manejado por equivalentes reductores obtenidos por la acción de la isocitrato deshidrogenasa (IDH) la cual reduce  $\text{NADP}^+$ , el complejo oxoglutarato deshidrogenasa (OGDC), malato deshidrogenasa (MDH) y succinato deshidrogenasa (SDH). En *B. subtilis* la actividad de la SCS esta acoplada a la producción de ATP (Figura 7) (Sonenshein, 2002).

La fuente basal del oxalacetato (OAA) en bacterias Gram-positiva es a través de la actividad de la piruvato carboxilasa (codificada por *pycA*) en células creciendo sobre carbohidrato como principal fuente de carbono, o bien por la transaminación de aspartato. Cuando *B. subtilis* crecen en medios que contienen succinato, fumarato, malato o aminoácidos como glutamato, aspartato, asparagina, arginina, prolina, ornitina o histidina como única fuente de carbono los

convierte a OAA, el cual entra a la vía gluconeogénica hasta fosfoenolpiruvato (PEP) vía fosfoenolpiruvato carboxicina (Figura 7) (Sonenshein, 2002).

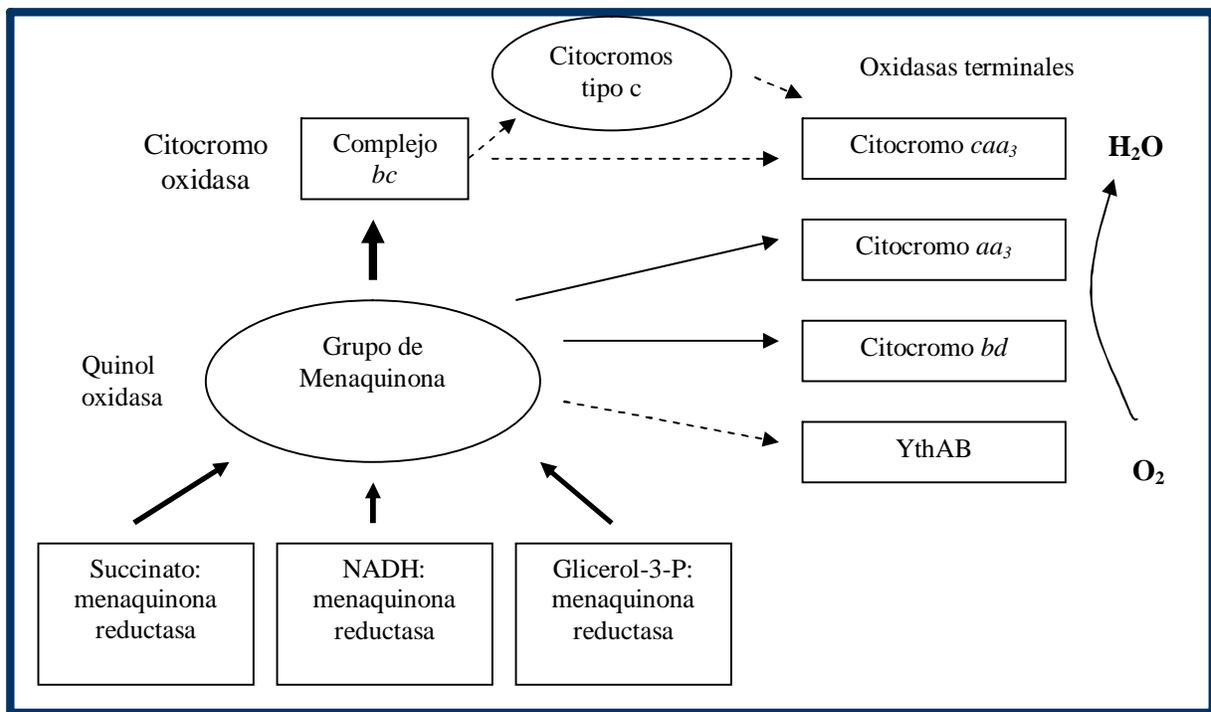


**Figura 7. El ciclo de Krebs y vías relacionadas.**

El ciclo de Krebs es la ruta central que genera ATP, poder reductor e intermediario. La ruta de glicoxilato, indicada con líneas punteadas, está ausente en *B. subtilis* (Sonenshein, 2002)

La energía metabólica equivalente de la glucosa es la máxima cantidad de ATP que puede ser generado de su completa oxidación hasta dióxido de carbono. Para organismos aeróbicos como *B. subtilis* esta generación de ATP es dependiente de la eficiencia de acoplamiento de la respiración y la síntesis de ATP y es usualmente expresado como la relación P/O (moles de ATP formado por molécula de oxígeno) (Dauner *et al.*, 2001).

*B. subtilis* sintetiza, bajo condiciones aeróbicas, una cadena de transportadores de electrones, compuesto por tres o posiblemente cuatro oxidasas terminales con diferente eficiencia de acoplamiento (Figura 8) (Winstedt y Wachenfeldt, 2000).



**Figura 8 Ruta de respiración aeróbica en *Bacillus subtilis* (Winstedt and Wachenfeldt, 2000)**

En cultivos aeróbicos con glucosa, se ha observado que *B. subtilis* no utiliza la rama del citocromo *bd*, debido a que ésta es activada en bajas concentraciones de oxígeno; así mismo, el citocromo *c* es inactivo en células creciendo con glucosa. Por lo tanto en cultivos aeróbicos con glucosa, la oxidación de NADH es, probablemente catalizada por el citocromo *aa3*, el cual ha mostrado estar presente durante el crecimiento vegetativo de *B. subtilis*. El transporte de un

electrón de NADH a través de esta rama transloca dos protones, y cuatro protones son necesarios para generar una molécula de ATP en la reacción catalizada por la ATP sintetasa. El transporte de un electrón de FADH transloca un solo protón. Por lo que, la relación P/O corresponde a la generación de 1 ATP por NADH y 0.5 ATP por FADH. De tal forma que la completa oxidación de glucosa a dióxido de carbono produce 15 ATP (Dauner *et al.*, 2001). La excreción de subproductos metabólicos tales como el acetato causa una pérdida energética en la célula debido a que la glucosa no puede ser oxidada a dióxido de carbono (Dauner *et al.*, 2001).

### **3.7.2 Respiración de nitratos**

*B. subtilis* tiene la capacidad de utilizar el nitrato como aceptor de electrones en la respiración anaeróbica. La reducción anaeróbica de nitrato está acoplada a la generación de energía, debido a que *B. subtilis* crece anaeróbicamente en medio mínimo que contiene glicerol, una fuente de carbono no fermentable, si el nitrato está presente (Nakano, *et al.*, 1997). La reducción de nitrato a nitrito y de nitrito a amonio es catalizada por la nitrato reductasa y nitrito reductasa, respectivamente. Los genes que codifican las subunidades de la nitrato reductasa (*nasB* y *nasC*) y nitrito reductasa (*nasD* y *nasE*) constituyen un operón junto con el gen *nasF*.

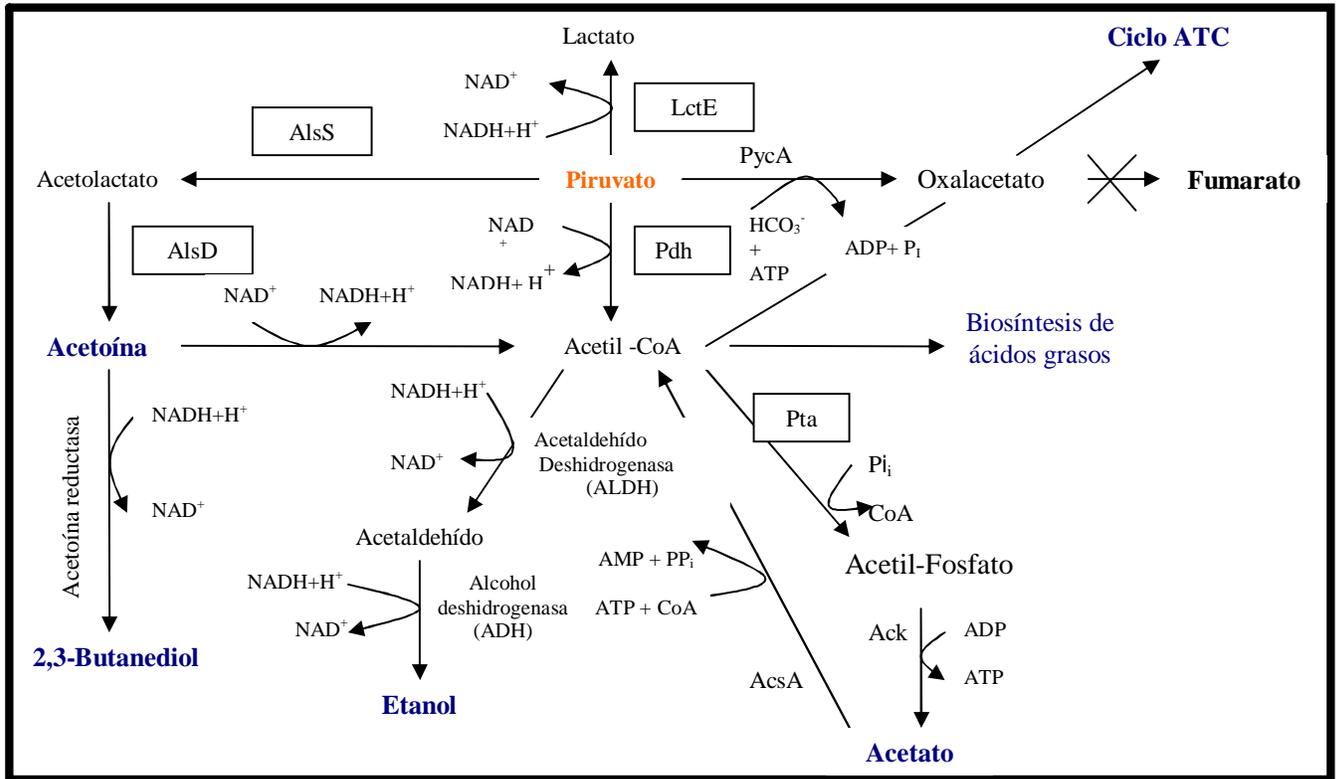
### **3.7.3 Fermentación**

*B. subtilis* posee una ruta de fermentación de glucosa muy deficiente, probablemente, como consecuencia de que la cantidad de piruvato acumulado durante la glicólisis no es suficiente para inducir la expresión de los genes involucrados en el catabolismo del piruvato (inducción por sustrato) o la activación de algunas enzimas involucradas (Nakano y Zuber 1998). Sin embargo, se ha logrado mejorar el crecimiento al utilizar mezclas de glucosa y piruvato o bien, cuando la glucosa va acompañada de una mezcla de aminoácidos (Nakano, 1997). Otra de las principales razones por la que *B. subtilis* necesita de ambos, glucosa y piruvato, para crecer es debido a la carencia de la piruvato formato liasa (PFL). En la ruta fermentativa de *E. coli*, la conversión de piruvato a acetil-CoA es catalizada por la PFL en lugar del complejo piruvato

deshidrogenasa (PDH) que funciona durante el crecimiento aeróbico. El encendido de PDH a PFL es importante para evitar el exceso de NADH bajo condiciones fermentativas, durante el cual el NADH no es reoxidado por la cadena respiratoria. En contraste, *B. subtilis* carece de PFL y en su lugar utiliza PDH la cual cataliza la conversión de piruvato a acetil-CoA durante la fermentación (Nakano *et al.*, 1997; Nakano y Zuber, 1998) Lo anterior, junto con otros datos indica que *B. subtilis* lleva a cabo una fermentación mixta de ácidos y butanediol en la cual PDH juega un papel tanto en el crecimiento fermentativo como en la respiración de nitratos.

En estudios realizados por Nakano (1997) se observó que *B. subtilis* sufre una fermentación mixta, durante la cual, obtuvieron lactato y pequeñas cantidades de acetato, etanol, acetoína y 2,3-butanediol como productos. En la fermentación, el metabolismo del piruvato a los productos finales regenera el NAD<sup>+</sup> de NADH (Figura 9).

En la fermentación, el piruvato puede ser convertido a lactato por la lactato deshidrogenasa (LctE) y a oxalacetato por la piruvato carboxilasa, el cual es sucesivamente convertido a malato, fumarato y succinato, aunque la producción de succinato en *B. subtilis* no ha sido reportada (Nakano, 1997).



**Figura 9. Rutas de fermentación y el catabolismo, propuesta para *B. subtilis* (Cruz-Ramos *et al.*, 2000)**

Las enzimas involucradas en las reacciones son: LctE, lactato deshidrogenasa; AlsS, acetolactato sintasa; AlsD, acetolactato descarboxilasa; PycA, piruvato carboxilasa; Pdh, piruvato deshidrogenasa; Pta, fosfotransacetilasa; Ack, acetato cinasa; AcsA, acetil-CoA sintetasa; ADH, alcohol deshidrogenasa; ALDH, acetaldehído deshidrogenasa y ATC, ácido tricarboxilico.

El piruvato, también, es catabolizado a acetoína y 2,3- butanediol por la  $\alpha$ -acetolactato sintasa (AlsS),  $\alpha$ -acetolactato descarboxilasa (AlsD) y acetoina reductasa (Figura 9). Cada una de las reacciones mencionadas contribuye a la reoxidación de NADH. Finalmente, el piruvato es convertido a acetil-CoA, el cual puede ser metabolizado a etanol por la acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, o acetato, la reacción de producción de acetato es acompañada por la síntesis de ATP, y la síntesis de etanol está involucrado en el reciclamiento de NADH. La funcionalidad de esta última vía no ha sido documentada intensivamente.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente un número importante de grupos de investigación en el mundo dedican su esfuerzo al estudio de diversos aspectos de la fisiología microbiana, con el propósito de aplicar el conocimiento generando cepas capaces de utilizar un amplio rango de sustratos y lograr que sintetizen nuevos metabolitos, entre otros.

*B. subtilis* es la bacteria Gram positiva más utilizada para la obtención de productos de interés para el hombre. Un aspecto interesante e importante de este microorganismo es su capacidad para la utilizar una variedad de carbohidratos tales como: glucosa, celobiosa, arabinosa, entre otros. Sin embargo, no puede crecer utilizando xilosa (segundo azúcar más abundante en la naturaleza) como única fuente de carbono a pesar de contar con las enzimas necesarias para metabolizar esta pentosa. Algunos reportes indican que *B. subtilis* no cuenta con un transportador específico de xilosa.

Por lo anterior se propone estudiar los procesos metabólicos, de crecimiento y de formación de productos de *B. subtilis* utilizando xilosa como única fuente de carbono, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas de dos cepas: una mutante que utilice xilosa y otra que contenga el potencial transportador inespecífico de xilosa-glucosa (GlcP). Esto permitirá ampliar el espectro de utilización de carbohidratos por *B. subtilis* y además de proporcionará información básica sobre la fisiología de este microorganismo.

Así mismo es importante realizar cultivos tanto aeróbicos como anaeróbicos en mezcla glucosa-xilosa, debido a que, los residuos agroindustriales son una mezclas de carbohidratos principalmente xilosa-glucosa por lo que es necesario saber el comportamiento de *B. subtilis* al utilizar la glucosa-xilosa en mezclas para la generación de productos.

## 5. HIPÓTESIS:

Si se lleva a cabo la expresión de un transportador que permita la entrada de xilosa en *B. subtilis*, se activará al operón *xylAB*, permitiéndole utilizar dicho azúcar, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo General:

Desarrollar cepas microbianas, principalmente de *E. coli* y *B. subtilis* mediante herramientas de la ingeniería de vías metabólicas y de bioingeniería capaces de convertir los azúcares presentes en hidrolizados de residuos agroindustriales en etanol, L o D lactato, succinato y otros productos homólogos o heterólogos a fin de sustituir los materiales obtenidos a partir del petróleo.

### 6.2 Objetivo Particular:

Generar cepas de *B. subtilis* capaces de utilizar xilosa como única fuente de carbono y caracterizarlas a nivel de fermentador utilizando glucosa, xilosa y mezcla glucosa -xilosa.

#### 6.2.1 Objetivos Específicos:

- ④ Generar una mutante espontánea que sea capaz de crecer en xilosa.
- ④ Transformar a *B. subtilis* con un plásmido (pE18P43glcP) que contiene el gen *glcP*.
- ④ Caracterizar a nivel fermentador en condiciones aeróbicas y anaeróbicas las cepas derivadas de *B. subtilis* utilizando glucosa, xilosa y mezcla glucosa-xilosa.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Cepas y plásmidos

Todas las cepas y plásmidos utilizados se describen en las Tablas 3 y 4.

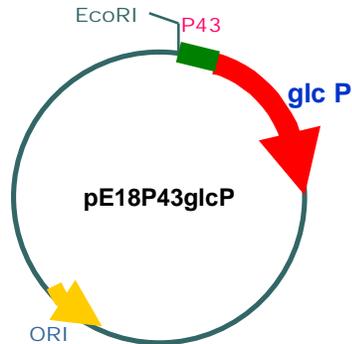
Tabla 3. Cepas utilizadas en este trabajo

Cepas	Genótipo/Fenotipo	Fuente
<i>Bacillus subtilis</i> CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup>	Protótrofa <i>nprE</i> , <i>aprE</i> , <i>epr</i> , <i>bpf</i> , $\Delta$ <i>mpr::ble</i> $\Delta$ <i>nprB::bsr</i> $\Delta$ <i>vpr::ery</i> , <i>als::Sp</i>	Romero, S., 2007
<i>B. subtilis</i> CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> <i>xil</i> <sup>*</sup>	Mutante espontánea con capacidad de utilizar xilosa	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> 168 Trp <sup>+</sup>	Protótrofa	Ceparío del Laboratorio
<i>B. subtilis</i> 168/ <i>glcP</i>	Similar a <i>B. subtilis</i> 168 protótrofa transformada con el plásmido pE18P43 <i>glcP</i>	Este Trabajo

Tabla 4. Plásmidos utilizado en este trabajo

Plásmidos	Características	Fuente
pE18P43	Derivado del plásmido pE194- <i>cop6</i> ; contiene 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.	Wu y Wong , 1999
pE18P43 <i>glcP</i>	pE18P43 que contiene el gen <i>glcP</i> expresado a partir del promotor P43.	Cabrera-Valladares 2006

El plásmido pE18P43glcP (Cabrera-Valladares, 2006) contiene el gen *glcP* el cual codifica para una permeasa de glucosa. (Figura 10.)



**Figura 10. Plásmido pE18P43glcP (Cabrera-Valladares, 2006).**

La cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> se utilizó para la generación de la mutante espontánea capaz de utilizar xilosa como única fuente de carbono (se describe más adelante), debido a que, ha sido previamente utilizada en el laboratorio. CH1 *alsS*<sup>-</sup> tiene interrumpido el gene *alsS*<sup>-</sup> (acetolactato sintasa) por el cassette de espectinomicina. También tiene interrumpidas las siete proteasas mayoritarias de *B. subtilis* (Ye et al., 1996).

La cepa *B. subtilis* 168 Trp<sup>+</sup> se utilizó como hospedero del plásmido pE18P43glcP, como se presenta en los resultados de esta tesis, le confiere la capacidad de introducir xilosa al contener el gen de la glucosa permeasa (*glcP*). Se decidió utilizar la cepa *B. subtilis* 168 Trp<sup>+</sup> para la caracterización de la permeasa, debido a que, la cepa 168 Trp<sup>+</sup> es protótrofa, no tiene deletadas las siete proteasas mayoritarias y no posee resistencia a antibióticos; representando una cepa silvestre.

## **7.2 Reactivos:**

### **7.2.1 Enzimas**

Para las digestiones realizadas se utilizaron enzimas de restricción proporcionadas por MBI Fermentas o New England BioLabs. Se utilizaron de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes.

### **7.2.2 Extracción de plásmido**

Las extracciones de plásmidos realizadas se llevaron a cabo por medio de un Kit de extracción (CONCERT Rapid plasmid Miniprep System de GibcoBRL).

### **7.3 Generación de mutantes espontáneas $xil^+$ de *B. subtilis***

Se obtuvieron mutantes espontáneas de *B. subtilis* CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* a través del procedimiento descrito por Schmiedel y Hillen. La cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> se sembró en cajas M9-xilosa 2g/L (M9-xil). La caja fue incubada a 37°C durante 72 horas, posteriormente, las colonias observadas fueron resembradas de nuevo en cajas M9-xil, incubándose nuevamente a 37°C durante 48 horas. Por último, se realizó un tercer pase, cuya incubación fue a 37°C y duró 24 hrs. Al final, se obtuvieron tres tamaños de colonias: grandes, medianas y chicas. Se resembraron las colonias aisladas en cajas M9-xil Eritromicina (Eri) 5µg/mL y Lincomicina (Lin) 5µg/mL, con la finalidad de evitar contaminantes. De cada tamaño se aisló una colonia y se realizaron los gliceroles correspondientes.

### **7.4 Transformación de *B. subtilis* 168 Trp<sup>+</sup>**

La cepa *B. subtilis* 168Trp<sup>+</sup> fue transformada con los plásmidos pE18P43 (plásmido control) y pE18P43glcP (plásmido conteniendo el gen *glcP*), obteniéndose las cepas *B. subtilis* 168Trp<sup>+</sup>/P43, la cual se utilizó como control y es incapaz de crecer en xilosa; y la cepa *B. subtilis* 168Trp<sup>+</sup>/glcP, la cual se planteo es capaz de crecer y utilizar la xilosa como única fuente de carbono. Las transformaciones se realizaron a través del método de transformación

para bacillus. Este método, tiene como base, la capacidad de *Bacillus* para alcanzar un estado de competencia natural.

El estado de competencia es el estado fisiológico característico que permite captar e incorporar ADN del medio exterior a su cromosoma; dicho estado se desarrolla cuando existe una limitación nutricional y se presenta después de la fase exponencial, durante el inicio de la fase estacionaria. Por último se ha asociado un tercer factor el cual depende del tipo celular (dimorfismo), debido a que los cultivos competentes son heterogéneos, es decir, existen células competentes y no competentes (Iáñez, 2006).

Para realizar la transformación fueron necesarias las siguientes soluciones: Sales Bacillus 10x, solución TBI, solución TBII y medio Luria-Bertani.

La composición de las sales bacillus 10x fue (para 10 mL): 1.4 g de  $K_2HPO_4$ , 0.6 g de  $KH_2PO_4$ , 0.2 g de  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.1 g de Citrato de Sodio. La solución TBI contiene (por cada 2.5 mL de sales bacillus 10x): 0.5 % de glucosa, 5mM de  $MgSO_4$ , 0.02 g de Casaaminoácidos, 50  $\mu\text{g/mL}$  de triptófano. La solución TBII contiene (por cada 2.5 mL de sales bacillus 10x): 0.5% de glucosa, 5mM de  $MgSO_4$ , 0.01% de Casaaminoácidos, 5  $\mu\text{g/mL}$  de Triptófano.

Se sembró la cepa *B. subtilis* 168Trp<sup>+</sup> en una caja LB sin antibiótico, se incubó a 37°C por 16 horas. En un tubo de 150 x 15 mm se inoculó 1 mL de la solución TBI con colonias de la cepa *B. subtilis* 168Trp<sup>+</sup>. El cultivo se incubó a 37°C hasta que las células alcanzaron el estado de competencia (de 4-5 horas aproximadamente). Una vez transcurrido el tiempo, se transfirieron 250  $\mu\text{L}$  del cultivo a 2.5 mL de solución TBII.

En tubos de 150 x 15 mm se colocaron 500 mL de la solución TBII con el cultivo y se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de plásmido (pE18P43 y pE18P43glcP); se incubaron a 37°C durante 1.5 hrs. Una vez concluido el tiempo de incubación, se procedió a plaquear, en cajas de LB con Ert 5 $\mu\text{g/mL}$  Lin 5 $\mu\text{g/mL}$ , las siguientes cantidades 100, 150, 200  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo. Todas las cajas se incubaron a 37°C durante 30 h. De esta manera se obtuvieron únicamente colonias que adquirieron el plásmido, el cual les confiere resistencia a eritromicina (Eri) y lincomicina

(Lin). Las colonias que crecieron se picaron con ayuda de palillos estériles y se transfirieron a tubos de ensaye con 5 mL de medio Luria-Bertani Erit 5µg/mL Lin 5µg/mL. Los tubos se incubaron a 37°C a 300 rpm durante 12 h. Transcurrido el tiempo se tomó 1mL del cultivo y se colocó en un criovial con un 1 mL de glicerol al 80%, se congeló inmediatamente con la ayuda de hielo seco y se almacenó a -70°C.

Adicionalmente, a las colonias obtenidas se les extrajo plásmido y se realizó un patrón de digestión, con el fin de corroborar que el plásmido que presentaban era el pE18P43 y pE18P43glcP. Por último y para comprobar que el transportador GlcP permite la entrada de xilosa, se estriaron cajas del medio mineral xilosa (como única fuente de carbono) con la cepa BS168Trp<sup>+</sup>/glcP a fin de observar crecimiento.

### **7.5 Generación de un banco de células.**

Con la finalidad de tener una homogeneidad en los inóculos y disminuir variaciones en los cultivos, se realizó un banco de células. Los bancos generados fueron de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil<sup>\*</sup>, 168 Trp<sup>+</sup>/P43 y 168 Trp<sup>+</sup>/glcP. Las cepas fueron crecidas en medio mineral sólido con agar (la preparación del medio mínimo se describe en la sección 7.6); los azúcares utilizados fueron glucosa o xilosa, y los antibióticos eritromicina (Eri), lincomicina (Lin) y espectinomina (Spt). Las cajas se incubaron a 37°C; el tiempo de incubación varió dependiendo de la fuente de carbono. Para glucosa el tiempo de incubación fue de aproximadamente, 20 h, y para xilosa de aproximadamente 26 h. Posteriormente al periodo de incubación, se cosecharon las células y resuspendieron en 100 mL de medio mineral con el azúcar y antibiótico(s) correspondientes. Los cultivos se incubaron a 37°C y 300 rpm durante aproximadamente 12 h cuando se utilizó glucosa y 24 h para xilosa.; periodo en el cual llega a la fase exponencial, obteniendo una D.O.<sub>600</sub>≈ 2.4. Por último, se almacenaron muestras en crioviales con glicerol al 40%, a -70 °C. Los cultivos realizados fueron de glucosa, xilosa y mezcla glucosa-xilosa, cuya concentración final fue de 10 g/L. Las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y 168 Trp<sup>+</sup>/pE18P43 no se crecieron en xilosa.

## 7.6 Medios de cultivos:

Para evaluar el crecimiento y metabolismo de azúcares en condiciones aeróbicas y anaeróbicas se utilizaron los siguientes medios: medio rico y medio mineral (Martínez *et al.* 1997), ambos suplementados con 10 g/L de azúcar. En el caso de la evaluación del crecimiento en mezclas de azúcares se utilizó 5 g/L de cada azúcar evaluado.

Medio mínimo cuya composición fue (por litro) 4 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 5.32 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 6.4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 10 mg de Ácido Cítrico; 0.4 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5 mg de  $\text{MnCl}_2$ ; 40 mg de  $\text{CaCl}_2$ ; 30 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; suplementado con 2 ó 10 g/L de azúcar. El sulfato de amonio y las sales de fosfato se esterilizaron juntos (por calor) y se prepararon soluciones patrón de los otros componentes del medio, los cuales se esterilizaron por filtración (0.22  $\mu\text{m}$ ) y se adicionaron al medio base antes de inocular los cultivos.

Medio Mineral M9 (este medio es utilizado principalmente para *E. coli*) cuya composición fue (para 1000 mL) 6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.5 g  $\text{NaCl}$ ; 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  1M; 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4$  1M; 10  $\mu\text{L}$  de tiamina (vitamina B12). Se adicionó 2 g/L de azúcar (glucosa o xilosa). Las sales de fosfato y cloruro de sodio y de amonio se esterilizaron juntos (por calor), y el resto de las soluciones se esterilizaron por separado (por calor), las cuales se adicionaron al medio base antes de inocular.

Para la recuperación de las células transformadas se utilizó el medio Luria-Bertuani (LB) con lincomicina y eritromicina, cuya composición (por litro) es: 10g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de  $\text{NaCl}$ , líquido o solidificado con agar al 1.5%. Los antibióticos utilizados fueron lincomicina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), eritromicina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para las cepas 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP; y espectinomicina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para las cepas CH1 *als*<sup>-</sup> y CH1 *als*<sup>-</sup> xil\*.

## 7.7 Condiciones de cultivos

### **7.7.1. Desarrollo de inóculos**

Los inóculos se realizaron adicionando 1.8 mL del preinóculo de glicerol por cada 200 mL de medio mineral, azúcar 10 g/L y la mitad del antibiótico. Los inóculos se incubaron a 37°C y 300 rpm durante 24 h. para los cultivos en condiciones aeróbicas y a 100 rpm durante 32 h. para los cultivos en condiciones anaeróbicas.

Los cultivos fueron inoculados centrifugando (4,000 rpm; 15 min; 25°C (equipo Sorvall Legend MACH 1.6R rotor 75002002F)) la cantidad suficiente de inóculo para obtener una  $DO_{600}$  inicial  $\approx 0.2$  para los cultivos aeróbicos y 0.1 para los anaeróbicos; las células fueron resuspendidas en una pequeña cantidad del medio y posteriormente transferidas a cada cultivo (sin antibiótico).

La evaluación de los cultivos se realizó en medio mínimo con 10 g/L de azúcar y sin antibiótico. Todos los cultivos se realizaron por duplicado, en los resultados se presenta un promedio.

En todos los cultivos los parámetros considerados para evaluar fueron: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ); rendimiento biomasa-sustrato ( $Y_{x/s}$ ); velocidad específica de consumo de azúcar ( $q_s$ ); rendimiento producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ), velocidad específica de formación de producto ( $q_p$ ). Antes de realizar los cálculos, todos los datos obtenidos fueron corregidos por el factor de dilución en función de la base adicionada a los cultivos (ver anexo).

### **7.7.2 Cultivos aeróbicos**

Los cultivos aeróbicos se realizaron en fermentadores Applikon con un volumen de trabajo de 500 mL, equipados con una 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 2N. La espuma fue controlada mediante adiciones manuales de Silicón grado alimenticio al 10% (Droguería Cosmopolita). 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 inicial fue de 600 rpm con un flujo constante de aire, 1 vvm. Los

cultivos fueron monitoreados y controlados mediante el Biocontrolador ADI 1010, la adquisición de datos se llevó a cabo con la ayuda de una computadora personal mediante el software Bioexpert 1.20x de Applikon.

### **7.7.3 Cultivos anaeróbicos**

Los cultivos anaeróbicos se realizaron en sistemas de mini-fermentadores, con un volumen de trabajo de 200 mL. La temperatura fue controlada a 37°C, 100 rpm y el pH se mantuvo a 7.0 mediante la adición automática de KOH 2N.

## **7. 8 Métodos analíticos**

### **7.8.1 Concentración celular**

En todas las fermentaciones se midió la concentración celular de los cultivos a través de un espectrofotómetro Beckman DU-70. Las densidades ópticas obtenidas se convirtieron en peso seco (DCW) por medio de un factor de conversión: 1 D.O.= 0.35 g<sub>DCW</sub>/L. El monitoreo de los cultivos fue registrado cada 2 h., tomándose una muestra de 1.5 mL. El procesamiento de las muestras consistió en centrifugar la muestra a 12,000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron transferidos a un segundo tubo y almacenados a -20°C hasta su análisis.

### **7.8.2 Evaluación mediante HPLC**

Los ácidos orgánicos y azúcares de los sobrenadantes se determinaron utilizando el equipo de HPLC (cromatografía líquida de alta presión por sus siglas en inglés High performance liquid chromatography). Las determinaciones por HPLC, se llevaron a cabo por cromatografía isocrática con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5Mm y Na<sub>3</sub>N al 0.03% como fase móvil a un flujo de 0.5mL/min en una columna Aminex HPX-87H a 50°C. La detección se hizo simultáneamente con un detector de arreglo de diodos (Waters 996) y un detector de índice de refracción (Waters 410). El análisis y procesamiento de datos se realizó con el sistema Milenium (versión 3.01 Waters). Para este estudio, los ácidos orgánicos que se buscaron en los sobrenadantes de las muestras fueron:

acético y fumárico, así como acetoína, 2,3-butanediol y etanol para las muestras de cultivos aeróbicos; mientras que en anaerobiosis se buscó acetato, lactato, succinato y malato. La glucosa también fue cuantificada utilizando un analizador bioquímico (YSI modelo 2700).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Generación de mutantes espontáneas $xil^+$ de *B. subtilis*

Se generaron mutantes capaces de introducir xilosa, derivadas de *B. subtilis* CH1  $alsS^-$ , de acuerdo al protocolo reportado por Schmiedel y Hillen (1996) (mas detalles ver métodos 7.4). Como se mencionó en la sección 7.4, se obtuvieron colonias de tres tamaños distintos: grande, mediano y pequeñas. Se aisló una colonia de cada tamaño; posteriormente cada una de estas colonias se sembró en cajas LB Eri 5µg/mL Lin 5µg/mL a fin de descartar que las colonias fuesen producto de una contaminación. Una vez, corroborado lo anterior, se decidió trabajar con la colonia grande, debido a que, se pensó que al crecer más presentaba un mejor transporte. Esta cepa se denominó CH1  $alsS^- xil^*$ .

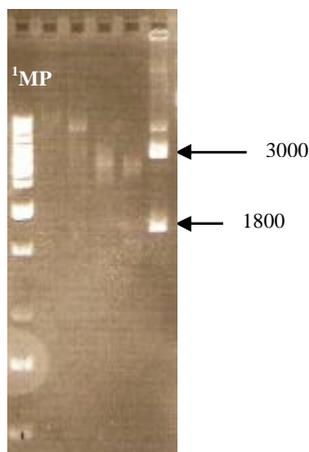
### 8.2 Transformación de la cepa 168Trp<sup>+</sup> con el plásmido pE18P43glcP

El plásmido pE18P43glcP contiene el gen *glcP* el cual codifica la proteína GlcP, un transportador de la familia de la glucosa-manosa/H<sup>+</sup> simporter. Dentro de la literatura existen pocos reportes a cerca de dicho transportador. Como se menciona en los antecedentes, la caracterización del GlcP se ha llevado a cabo en *E. coli* obteniendo:

- ❖ El transportador GlcP no permite la entrada de galactosa
- ❖ Es capaz de transportar aldohexosas de la configuración gluco (manno), sin reconocimiento del grupo hidroxil en la posición 2, pero presenta una estereoespecificidad en el grupo hidroxilo del carbono 4.

Basados en este estudio se decidió transformar la cepa *B. subtilis* 168Trp<sup>+</sup> con el plásmido conteniendo el gen *glcP* (pE18P43glcP), a fin de observar si GlcP permite el transporte de xilosa a la célula. Obteniendo la cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP. Por otra parte, también se transformó la cepa 168Trp<sup>+</sup> con el vector pE18P43 a fin de obtener la cepa 168Trp<sup>+</sup>/P43, la cual sirvió como control.

Una vez realizadas las transformaciones, y para corroborar que la cepa tuviera el plásmido de interés, se purificó el plásmido y por patrón de restricción se comprobó que el patrón de bandas fuera el esperado. Las enzimas utilizadas fueron *HindIII* y *EcoRI* (Figura 11).



**Figura 11 Patrón de bandas del plásmido pE18P43glcP con las enzimas *HindIII* y *EcoRI* la cual produce dos bandas de 3000 y 1800 pb.**

<sup>1</sup> MP GeneRule 1Kb DNA Ladder

### **8.3 Evaluación del crecimiento de *B. subtilis* en condiciones aeróbicas.**

#### **8.3.1 Crecimiento aeróbico en glucosa.**

La caracterización de las cepas se llevó a cabo en medio mínimo con glucosa (10 g/L). En la figura 12 se muestran el crecimiento, consumo de glucosa y formación de productos de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\*, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP, alcanzando una biomasa de alrededor de 3.5 g/L, así mismo la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue cerca de 0.6 h<sup>-1</sup> para todas las cepas. También la velocidad específica de consumo de glucosa ( $q_{glc}$ ) y de producción de acético fue similar en todas las cepas, con valores de 1.2 g<sub>glc</sub>/g<sub>DCW</sub>·h y 0.23 g<sub>acético</sub>/g<sub>DCW</sub>·h, respectivamente. Como se observa en la tabla 5 para todas las cepas la mayor parte de la glucosa consumida fue canalizada hacia generación de biomasa y acético con una mínima formación de acetoína al final de la fase de crecimiento exponencial.

**Tabla 5. Rendimiento biomasa/sustrato ( $Y_{x/s}$ ) y producto/sustrato ( $Y_{Acético/s}$ ) del crecimiento aeróbico en glucosa de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup>, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP**

<b>Cepa</b>	<b><math>Y_{x/s}</math> (g<sub>DCW</sub>/g<sub>s</sub>)</b>	<b><math>Y_{p/s}</math> (g<sub>p</sub>/g<sub>s</sub>)</b>
<b>CH1 <i>alsS</i><sup>-</sup></b>	<b>0.50</b>	<b>0.20</b>
<b>CH1 <i>alsS</i><sup>-</sup> <i>xil</i><sup>*</sup></b>	<b>0.51</b>	<b>0.20</b>
<b>168Trp<sup>+</sup>/P43</b>	<b>0.45</b>	<b>0.20</b>
<b>168Trp<sup>+</sup>/glcP</b>	<b>0.52</b>	<b>0.21</b>

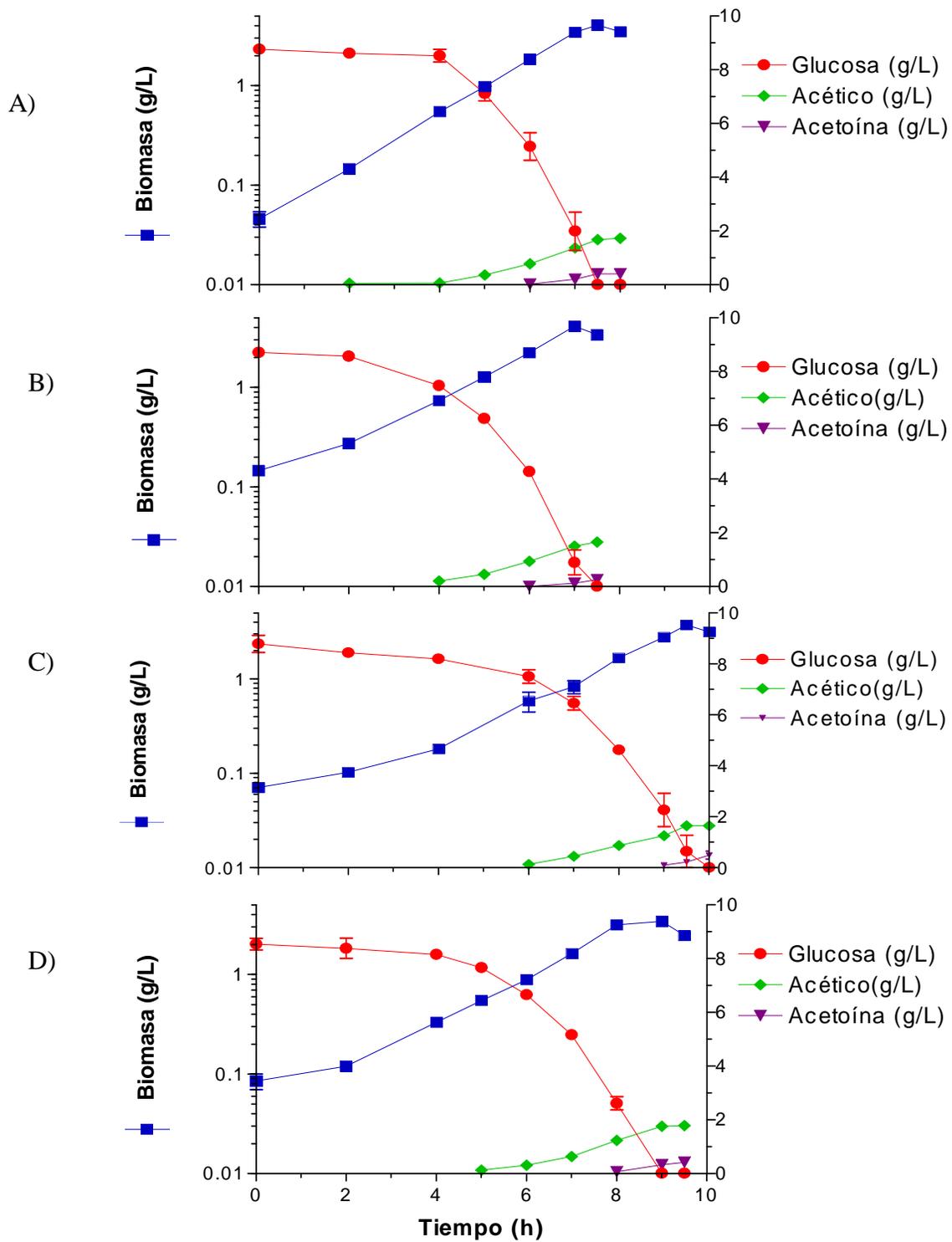


Figura 12. Crecimiento aeróbico en medio mínimo con 10 g/L glucosa de las cepas  
 A) CH1 *alsS*<sup>-</sup>; B) CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup>; C) 168Trp<sup>+</sup>/P43; D) 168Trp<sup>+</sup>/glcP.

### 8.3.2 Crecimiento aeróbico en xilosa.

Se determinó el crecimiento, consumo de azúcar y formación de productos, en cultivos de medio mínimo con xilosa, como única fuente de carbono. Los cultivos con xilosa se realizaron únicamente con las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP, las cuales fueron capaces de introducir xilosa; como consecuencia de una mutación o por la presencia de un transportador, y de esta forma metabolizarla.

En lo que respecta a las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/P43 fueron incapaces de crecer en xilosa, ello debido a que carecen de un transportador específico que les permita introducirla.

En la figura 13 se observa la cinética de crecimiento, consumo de xilosa y formación de productos de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP.

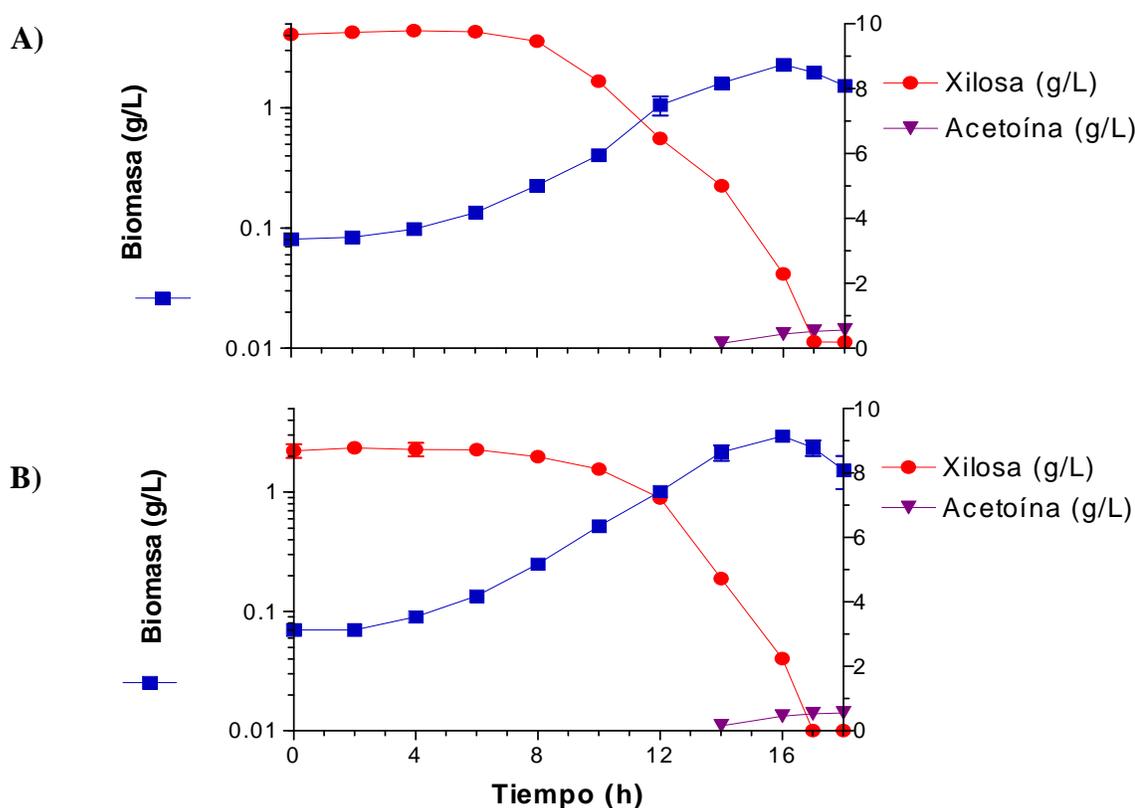
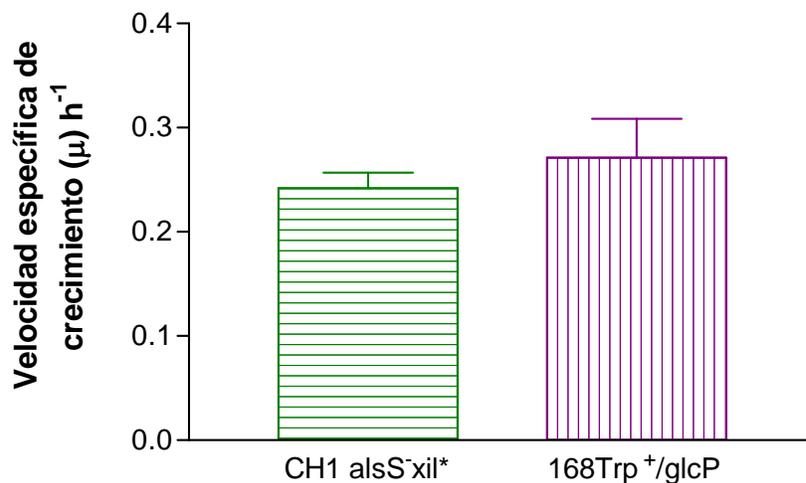
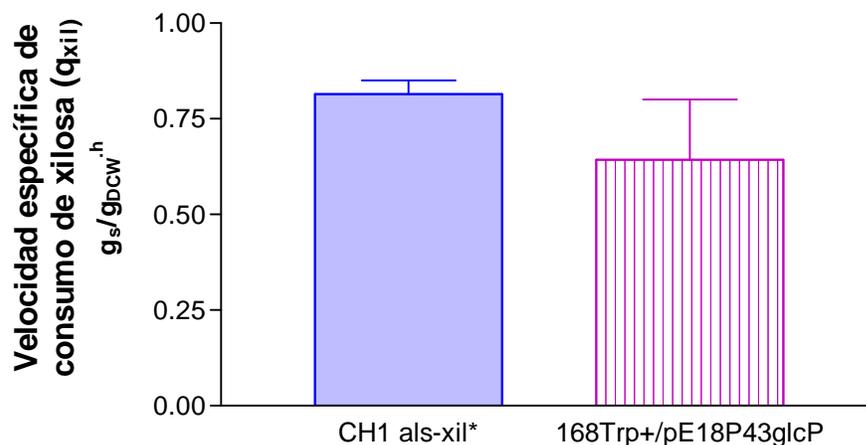


Figura 13. Crecimiento aeróbico en medio mínimo con xilosa en las cepas A) CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* y B) 168Trp<sup>+</sup>/glcP.

Tanto la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* como la 168Trp<sup>+</sup>/glcP consumieron toda la xilosa adicionada al medio (aproximadamente 10 g/L) y la biomasa alcanzada en ambas fue similar, cerca de 2.14 g/L.



**Figura 14. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) aeróbico en xilosa de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP.**



**Figura 15. Velocidad específica de consumo de xilosa ( $q_{xil}$ ) en cultivos en medio mínimo con xilosa de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP.**

En figura 14 se observa que las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* y cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP alcanzaron una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) similar, la cual es aproximadamente, de 0.25  $h^{-1}$ , así mismo una velocidad específica de consumo de xilosa de aproximadamente 0.7  $g_{xil}/g_{DCW} h$ .

(Figura 15). Para ambas cepas, CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP se observó que la velocidad de consumo de xilosa disminuye un 42% en relación con la velocidad de consumo de glucosa de dichas cepas.

En los cultivos de medio mínimo con xilosa se detectaron pequeñas cantidades de acetoina como único producto al final del cultivo (como se observa en la figura 13), por lo que no se obtuvieron los parámetros correspondientes.

### 8.3.3 Crecimiento aeróbico en mezcla glucosa-xilosa.

Se llevaron a cabo cultivos en medio mínimo con mezcla glucosa-xilosa (glc-xil), con el objetivo de realizar una comparación entre el comportamiento de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* y 168 Trp<sup>+</sup>/glcP.

Las evaluaciones se realizaron con una concentración inicial de 10 g/L de azúcares totales (5 g/L de glucosa y 5 g/L de xilosa). En la figura 16 se presenta el crecimiento, consumo de azúcar y formación de producto de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\*, 168Trp<sup>+</sup>/P43, 168Trp<sup>+</sup>/glcP.

En los cultivos en medio mínimo con mezcla glc-xil las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\*, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP llegaron a utilizar la xilosa experimentando un crecimiento diáuxico, debido a que, primero consumieron la glucosa y posteriormente la xilosa (Figura 16). En todos los casos la glucosa se agotó a las 8 horas. La xilosa se agotó a las 16 h en la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\*, mientras que su cepa progenitora presentó un consumo aparente de xilosa pero no pudo consumir la xilosa adicionada en 20 h de cultivo. Así mismo, en las cepas 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP se apreció una fase de muerte celular (lisis celular) ligera, después de agotarse la glucosa, seguida de una fase de adaptación en la cual las cepas comenzaron a utilizar la xilosa. Al parecer, en menor grado, este efecto también se presentó con CH1 *alsS*<sup>-</sup> y ocasiono que hubiese un consumo aparente de xilosa.

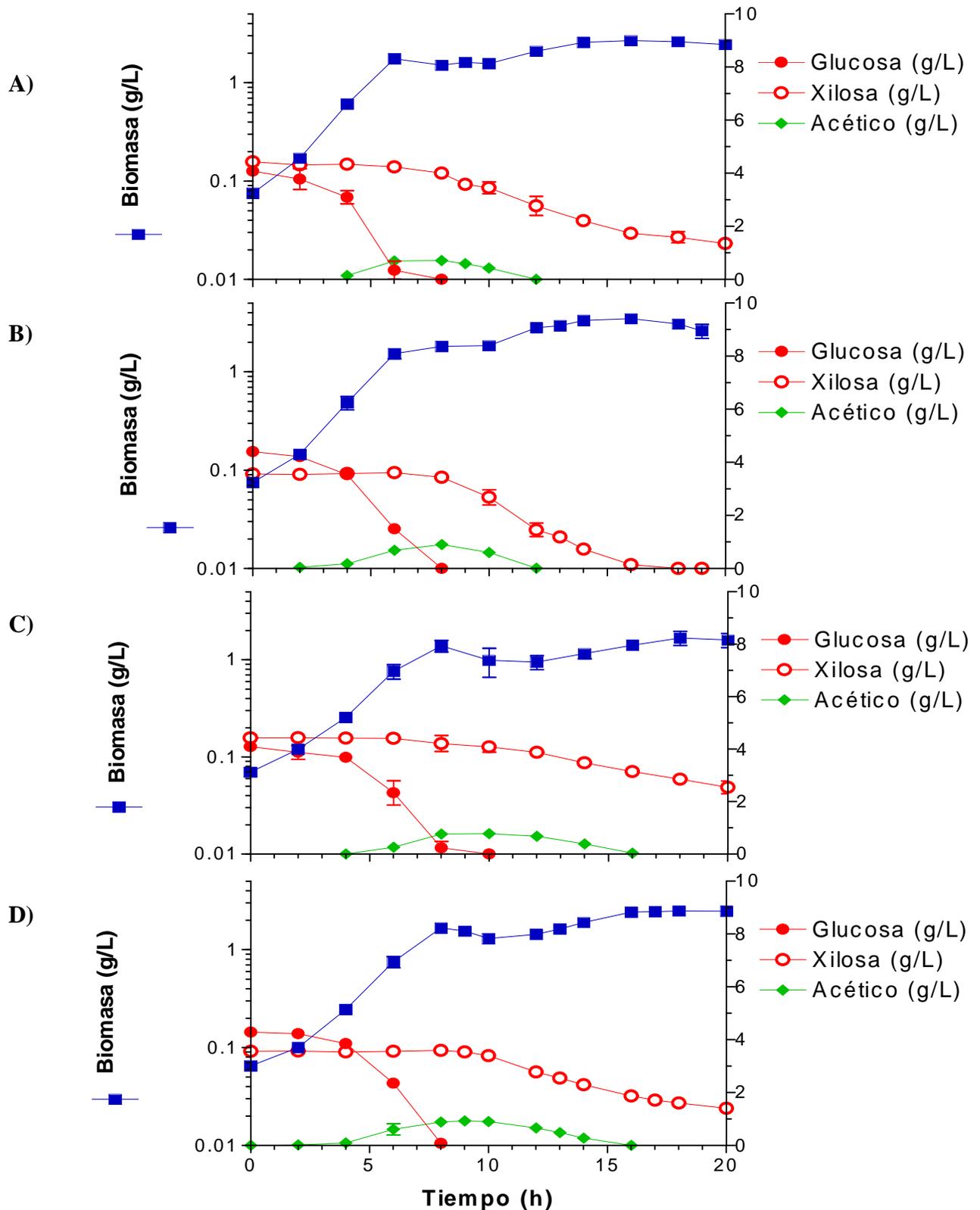


Figura 16. Cinéticas de crecimiento aeróbico, consumo de azúcar y formación de producto en medio mínimo con mezcla glucosa-xilosa de las cepas: A) CH1 *alsS*<sup>-</sup>; B) CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup>; C) 168Trp<sup>+</sup>/P43; D) 168Trp<sup>+</sup>/glcP.

La cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup>xil\* presentó un consumo total de la xilosa (3.5 g/L) a las 16 horas del cultivo, mientras que las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, 168Trp<sup>+</sup>/glcP y 168Trp<sup>+</sup>/P43 no consumieron toda la xilosa aún hasta las 20 horas. Es más el comportamiento entre 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP indican que GlcP no tiene un efecto de consumo de xilosa cuando el experimento se hace con la mezcla de azúcares. Algo interesante de este experimento es que la cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP no es capaz de utilizar la xilosa como fuente de carbono una vez agotada la glucosa en cultivos mezcla glc-xil, pareciendo que el represor XylR permaneciera, como en una memoria sobre *cre* impidiendo la transcripción de *xylAB*, ya que esta misma cepa si es capaz de utilizar la xilosa en cultivos en xilosa.

**Tabla 6. Resumen de la biomasa, y rendimientos biomasa/sustrato y producto/sustrato durante el consumo de glucosa (primera fase de crecimiento) y el consumo de la xilosa (segunda fase de crecimiento) en las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\*, 168Trp<sup>+</sup>/P43, 168Trp<sup>+</sup>/glcP**

<b>Cepa</b>	<sup>a</sup> <b>X<sub>MAX</sub></b> (g/L)	<sup>b</sup> <b>X<sub>MAX</sub></b> (g/L)	<sup>c</sup> <b>Y<sub>x/s</sub></b> (g <sub>DCW</sub> /g <sub>s</sub> )	<sup>d</sup> <b>Y<sub>p/s</sub></b> (g <sub>p</sub> /g <sub>s</sub> )	<sup>e</sup> <b>Y<sub>x/s</sub></b> (g <sub>DCW</sub> /g <sub>s</sub> )
<b>CH1 <i>alsS</i><sup>-</sup></b>	<b>1.7</b>	<b>2.6</b>	<b>0.5</b>	<b>0.2</b>	<b>0.40</b>
<b>CH1 <i>alsS</i><sup>-</sup> xil*,</b>	<b>1.5</b>	<b>3.3</b>	<b>0.5</b>	<b>0.2</b>	<b>0.30</b>
<b>168Trp<sup>+</sup>/P43</b>	<b>1.3</b>	<b>1.6</b>	<b>0.4</b>	<b>0.1</b>	<b>0.50</b>
<b>168Trp<sup>+</sup>/glcP</b>	<b>1.6</b>	<b>2.4</b>	<b>0.4</b>	<b>0.3</b>	<b>0.60</b>

<sup>a</sup>Biomasa máxima obtenida al termino de la fase de crecimiento exponencial con glucosa.

<sup>b</sup>Biomasa máxima obtenida al termino de la fase de crecimiento exponencial con xilosa.

<sup>c</sup>Rendimiento biomasa/glucosa obtenida de la fase de crecimiento exponencial con glucosa.

<sup>d</sup>Rendimiento acético/glucosa obtenida en la fase de crecimiento con glucosa.

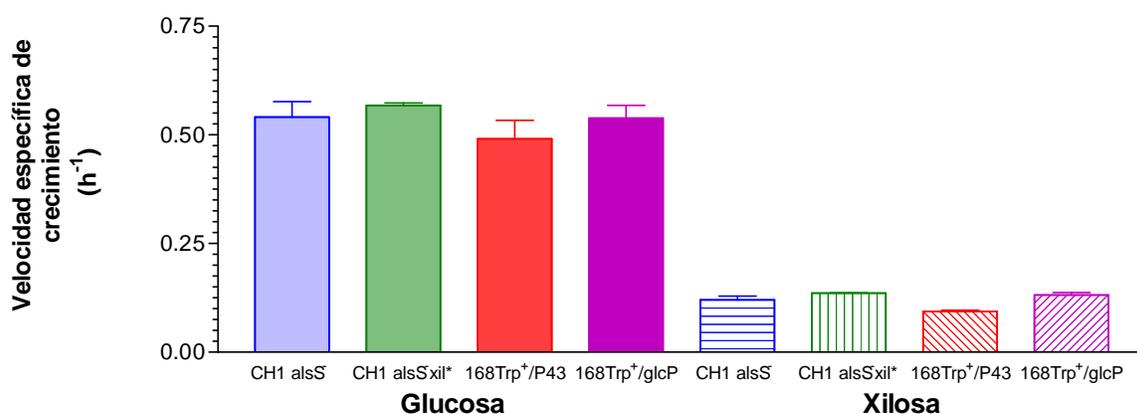
<sup>e</sup>Rendimiento biomasa/xilosa obtenida en la fase de crecimiento con xilosa.

En la tabla 6 se presenta la biomasa alcanzada por las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\*, 168Trp<sup>+</sup>/P43, 168Trp<sup>+</sup>/glcP al termino de las fases de crecimiento con glucosa y con xilosa, en la cual se observa que la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup>-xil\* alcanzó una biomasa final, aproximadamente, 23% mayor con respecto a las obtenidas en las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/glcP; y 50% mayor en relación con la cepa 168Trp<sup>+</sup>/P43. Por otra parte, se observa que glucosa consumida es

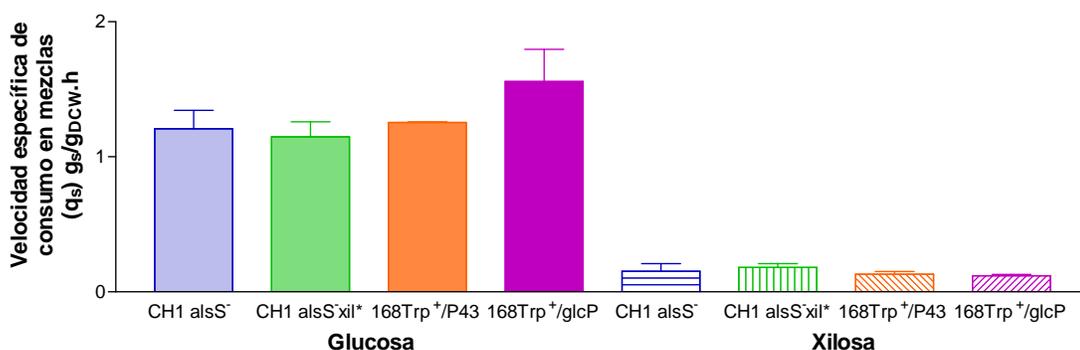
canalizada hacia la formación de biomasa y acético, mientras que aproximadamente el 45% de la xilosa consumida es canalizada hacia la formación de biomasa.

En la figura 17 se muestran las velocidades específicas de crecimiento alcanzadas durante el crecimiento en glucosa como con xilosa de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\*, 168Trp<sup>+</sup>/P43, 168Trp<sup>+</sup>/glcP. Durante el crecimiento en glucosa todas las cepas presentaron una velocidad específica de crecimiento de aproximadamente de 0.54 h<sup>-1</sup>, similar al valor obtenido cuando las cepas fueron cultivadas únicamente con glucosa (0.60 h<sup>-1</sup>). En el crecimiento con xilosa la velocidad específica de crecimiento para las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP es aproximadamente de 0.13 h<sup>-1</sup>, la cepa 168Trp<sup>+</sup>/P43 la cual presentó una velocidad específica de crecimiento en xilosa de 0.09 h<sup>-1</sup>.

Durante la segunda fase de crecimiento (consumo de xilosa) se observó una co-utilización de la xilosa y el acético, producido durante el consumo de glucosa. La presencia del acético, junto con los compuestos generados por la lisis celular, probablemente promueve la utilización de la xilosa en las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/P43, las cuales carecen de un transportador para xilosa.



**Figura 17. Velocidad específica de crecimiento, en condiciones aeróbicas en mezcla glc-xil de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\*, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP.**



**Figura 18. Velocidad específica de consumo ( $q_s$ ) de glucosa y xilosa en cultivos aeróbicos en mezcla glc-xil de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup>, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP.**

Como se observa en la figura 18, las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup> presentaron una velocidad específica de consumo de xilosa ( $q_{xil}$ ) 75% menor con respecto a su velocidad específica de consumo de glucosa ( $q_{glc}$ ), y las cepas 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP su  $q_{xil}$  es un 85% menor con respecto a la  $q_{glc}$ .

En cultivos de medio mínimo con mezcla glc-xil el único producto detectado fue el acético, que fue producido durante la fase de crecimiento con glucosa (primera fase de crecimiento) y posteriormente consumido junto con la xilosa durante la segunda fase de crecimiento.

#### **8.4 Evaluación del crecimiento de *B. subtilis* en condiciones anaeróbicas.**

La caracterización anaeróbica de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup>, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP, se realizó en el sistema de mini-fermentadores no aerados (fleakers), bajo las condiciones previamente descritas en métodos y materiales (sección 7.7.3).

Al igual que en el crecimiento aeróbico, se utilizaron la glucosa, xilosa y mezcla glucosa-xilosa como fuentes de carbono, evaluando el crecimiento, consumo de azúcar y formación de productos de las cepas.

#### 8.4.1 Crecimiento anaeróbico en glucosa.

Se utilizó la glucosa como primera fuente de carbono, con la finalidad de observar el comportamiento de las cepas, así como también poder establecer una base comparativa para la xilosa. La cinética de crecimiento, consumo de azúcar y formación de productos en medio mínimo con glucosa de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup>xil\*, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP, se presentan en la figura 19.

En la figura 19 se observa que el consumo de glucosa se llevó a cabo tanto en la fase exponencial como en la estacionaria. En las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>xil\*, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP el 52% de la glucosa total es consumida en la fase estacionaria, mientras que la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> la glucosa es consumida en proporciones similares en ambas fases (fase exponencial 47% y estacionaria 45%). Así mismo, se observa que las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\*, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP presentan dos fases de crecimiento, mientras la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> presenta sólo una fase.

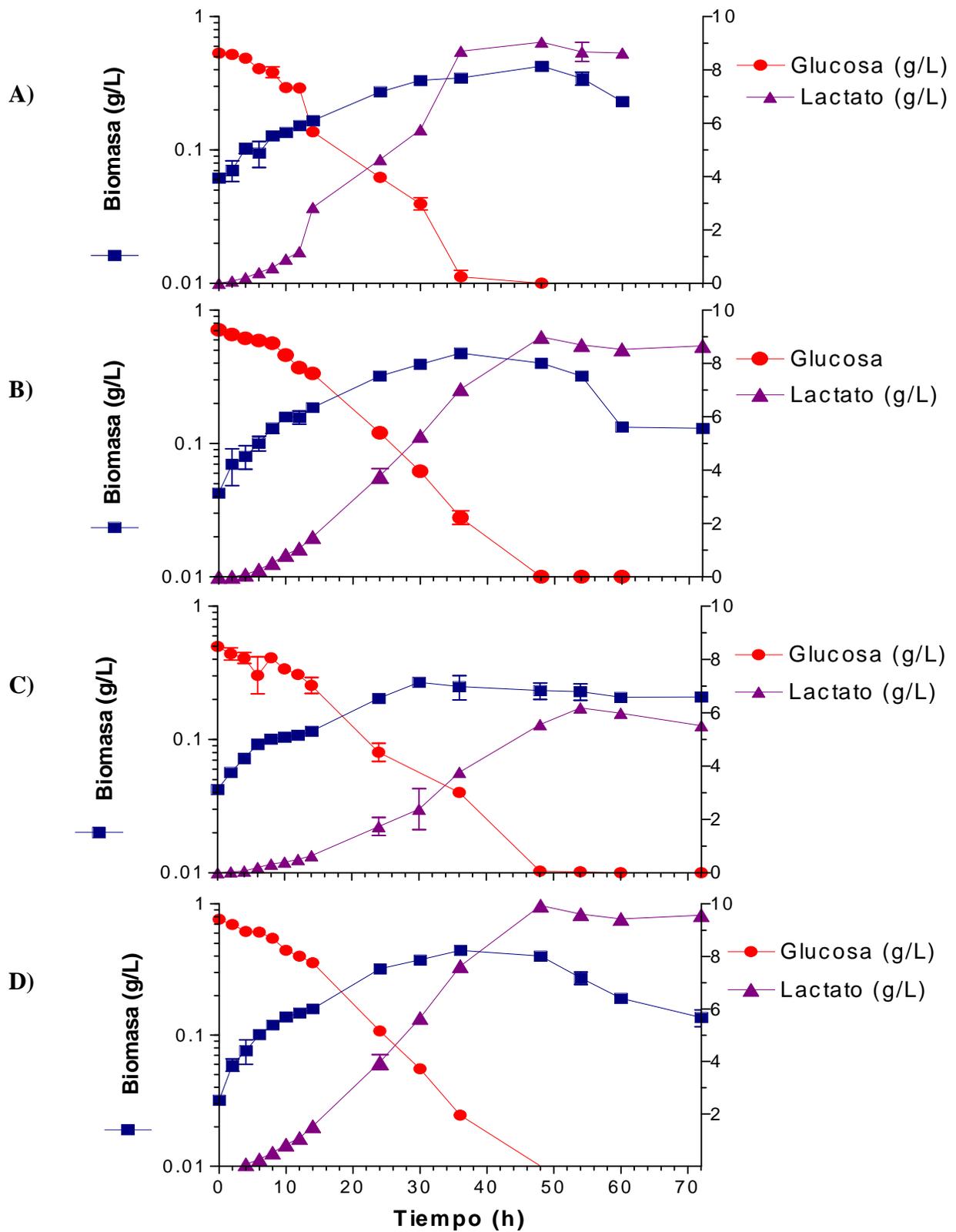
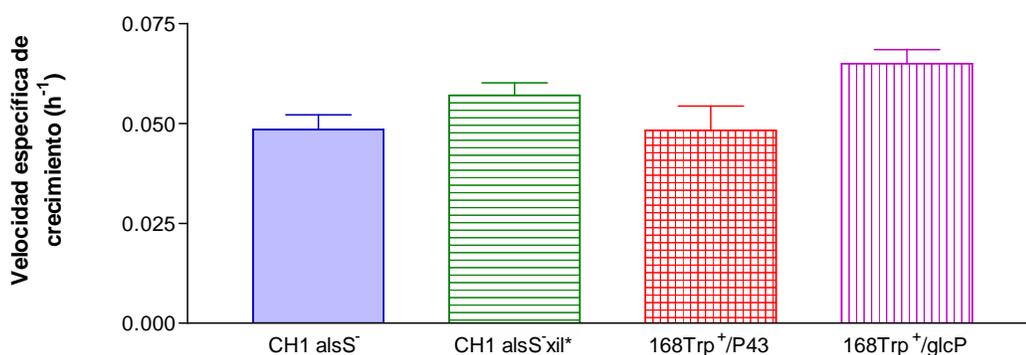


Figura 19. Crecimiento anaeróbico en medio mínimo con glucosa de las cepas: A) CH1 *alsS*<sup>-</sup>; B) CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup>; C) 168Trp<sup>+</sup>/P43; D) 168Trp<sup>+</sup>/glcP.

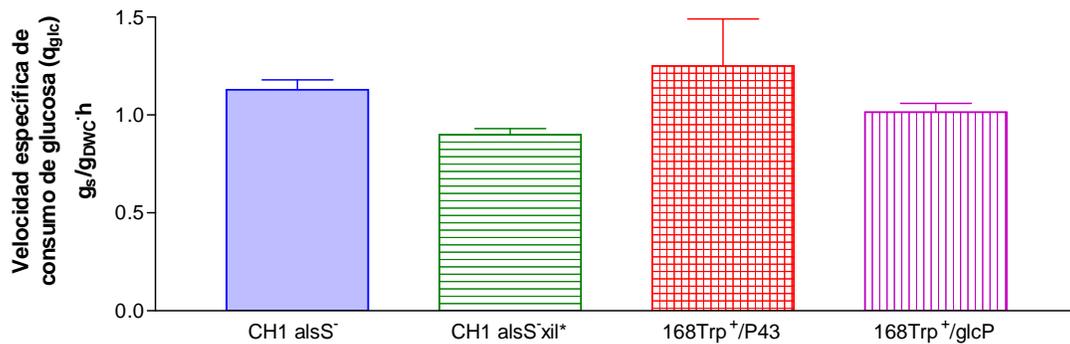
Durante el crecimiento exponencial las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/P43 alcanzaron una biomasa de de 0.15 g/L aproximadamente, mientras que las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP su biomasa (0.23 g/L) fue 27 % mayor en relación con sus parentales.

En la figura 20 se muestra la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de todas las cepas, en la cual se observa que las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP presentaron una velocidad específica de crecimiento (0.057 y 0.065 h<sup>-1</sup>, respectivamente) 25% mayor con respecto sus parentales (0.048 h<sup>-1</sup>).



**Figura 20. Velocidad específica de crecimiento, en cultivos anaeróbicos en medio mínimo con glucosa de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>; CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\*; 168Trp<sup>+</sup>/P43; D) 168Trp<sup>+</sup>/glcP.**

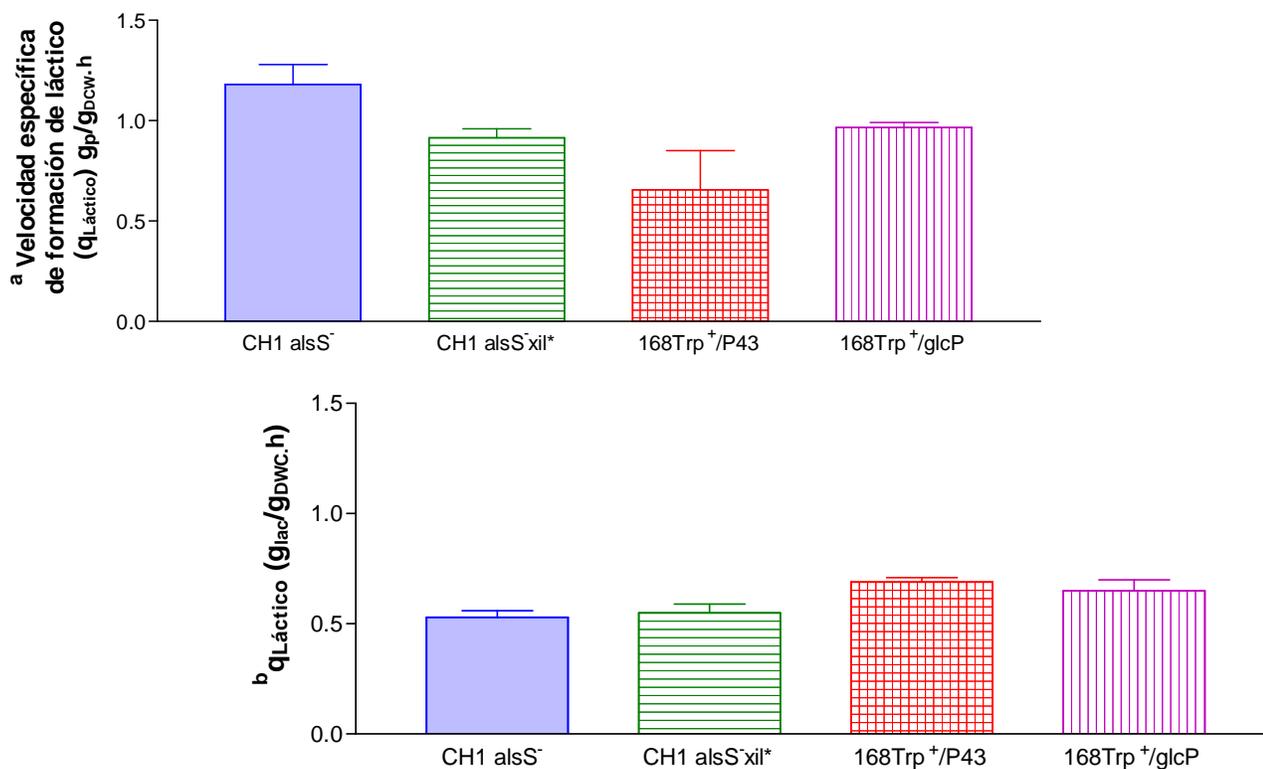
En la figura 21 se muestra la velocidad de específica de consumo de glucosa ( $q_{glc}$ ) donde se observa que la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* posee una  $q_{glc}$   $0.9 \pm 0.040$  g/g<sub>DCW</sub>.h que representa un 20% menor con respecto a la obtenida en la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> ( $1.1 \pm 0.064$  g/g<sub>DCW</sub>.h), mientras las cepas 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP presentan una  $q_{glc}$   $1.3 \pm .342$  y  $1.0 \pm 0.064$  g/g<sub>DCW</sub>.h, respectivamente.



**Figura 21. Velocidad específica de consumo de glucosa durante la fase exponencial en anaerobiosis con glucosa de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup>, 168Trp<sup>+</sup>/P43, 168Trp<sup>+</sup>/glcP**

Los productos obtenidos al final de la fermentación en medio mínimo con glucosa fueron principalmente lactato y pequeñas cantidades de acetato y succinato, para las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/glcP, excepto la cepa 168Trp<sup>+</sup>/P43 la cual solamente se detectó lactato.

La producción de lactato se presenta durante la fase de crecimiento y la fase estacionaria, lo que significa que la producción de lactato es constitutiva. La velocidad específica de producción de lactato (q<sub>lactato</sub>) es mayor entre un 45 y 65% durante la fase exponencial comparándola con la estacionaria (Figura 22).



**Figura 22. Comparación de velocidad específica de producción de lactato ( $q_{\text{lactato}}$ ), en la fase exponencial (a) y en la fase estacionaria (b), en cultivos anaeróbicos en medio mínimo con glucosa de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup>, 168Trp<sup>+</sup>/P43, 168Trp<sup>+</sup>/glcP.**

En la figura 22 se muestran las gráficas de la velocidad específica de producción de lactato ( $q_{\text{lactato}}$ ) en las fases de crecimiento y estacionaria. Como se observa, durante la fase exponencial las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/glcP presentaron una  $q_{\text{lactato}}$  30% mayor (1.18 y 0.96 g<sub>p</sub>/g<sub>DCW</sub>·h, respectivamente) con respecto a las obtenidas en las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup> (0.92 g<sub>p</sub>/g<sub>DCW</sub>·h) y 168Trp<sup>+</sup>/P43 (0.65 g<sub>p</sub>/g<sub>DCW</sub>·h). En la fase estacionaria las  $q_{\text{lactato}}$  fueron similares entre las cepas parentales y sus derivadas (0.53, 0.55 y 0.69, 0.65 g<sub>p</sub>/g<sub>DCW</sub>·h).

Como se mencionó anteriormente también se produjo acetato y succinato pero las cantidades fueron mínimas, por lo que no se obtuvieron los parámetros correspondientes.

**Tabla 7. Rendimiento biomasa-sustrato ( $Y_{\text{biomasa/sustrato}}$ ) y producto- sustrato ( $Y_{\text{Lactato/Glucosa}}$ ), del crecimiento anaeróbico en glucosa de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup>, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP**

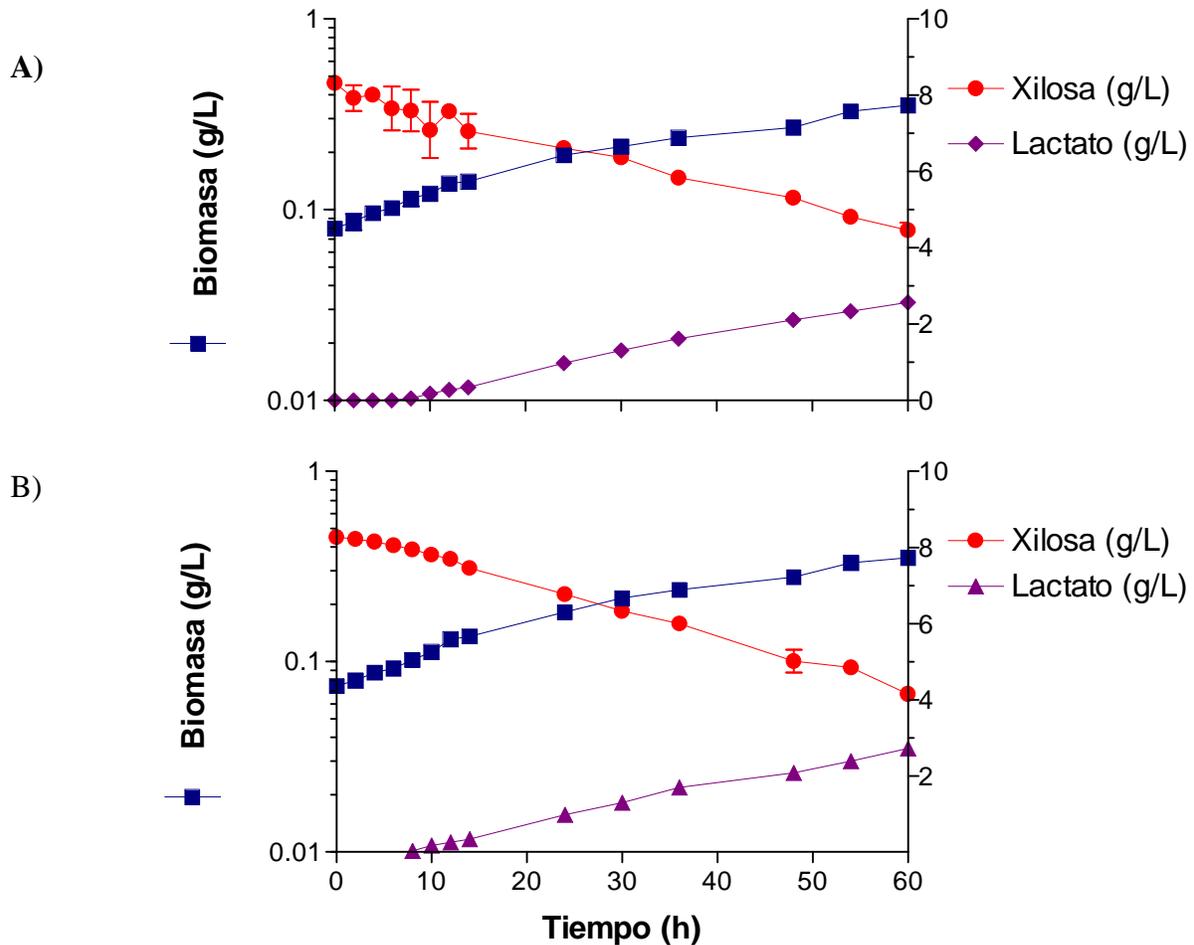
Cepa	$Y_{x/s}$ (g <sub>DWC</sub> /g <sub>s</sub> )	$Y_{p/s}$ (g <sub>p</sub> /g <sub>s</sub> )
CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup>	<b>0.043</b>	<b>1.04</b>
CH1 <i>alsS</i> <sup>-</sup> - <i>xil</i> <sup>*</sup>	<b>0.063</b>	<b>1.02</b>
168Trp <sup>+</sup> /P43	<b>0.039</b>	<b>0.51</b>
168Trp <sup>+</sup> /glcP	<b>0.064</b>	<b>1.03</b>

Como se observa en la tabla 7, las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/glcP canalizaron la glucosa consumida hacia la formación de lactato, mientras que la cepa 168Trp<sup>+</sup>/P43 se observa que solo la mitad de la glucosa consumida fue canalizada hacia lactato, a pesar de que no se reportó otro producto.

#### 8.4.2 Crecimiento anaeróbico en xilosa

Se llevaron a cabo cultivos anaeróbicos en medio mínimo con xilosa, con la finalidad de observar si *B. subtilis* es capaz de fermentar la xilosa y los productos que de ella se derivan.

Los cultivos anaeróbico en xilosa se realizaron con CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/glcP cuyas gráficas de crecimiento, consumo de azúcar y formación de productos se presenta en la figura 23.

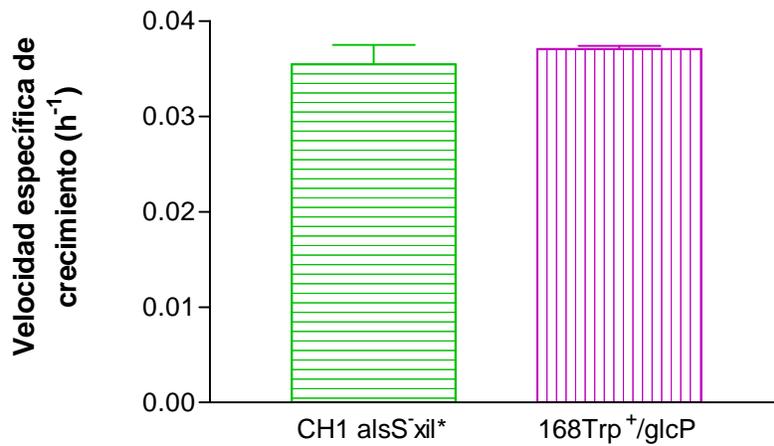


**Figura 23** Crecimiento anaeróbico en medio mínimo con xilosa de las cepas **A) CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup>** y **B) 168Trp<sup>+</sup>/glcP**.

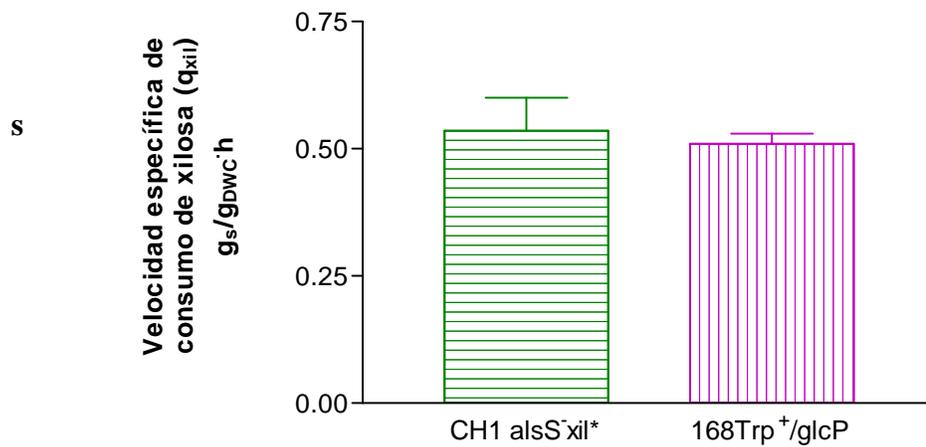
En la figura 23 se observa que las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/glcP fueron capaces de utilizar la xilosa, aunque muy lento, bajo condiciones anaeróbicas y cuyo consumo se presenta tanto en la fase exponencial como la estacionaria.

A las 20 h del cultivo, las cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/glcP consumieron cerca de un 50% de la xilosa total (8.5 g/L). Las proporciones en las cuales fue consumida la xilosa en el transcurso de la fermentación fueron para la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup> un 44% durante la fase exponencial y un 34% en la estacionaria, mientras la cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP un 33 % se realizó en la fase exponencial y un 42 % en la estacionaria.

Como observa en las gráficas, el crecimiento de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/glcP fue similar. Las cepas alcanzaron una biomasa ( $X_{MAX}$ ) de 0.11 g/L, así mismo la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) es alrededor de 0.036 h<sup>-1</sup> (figura 24) y la velocidad específica de consumo de xilosa ( $q_{xil}$ ) es de 0.5 g<sub>s</sub>/g<sub>DCW</sub>·h (figura 25).



**Figura 24. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en cultivos anaeróbicos en medio mínimo en xilosa, de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/glcP.**

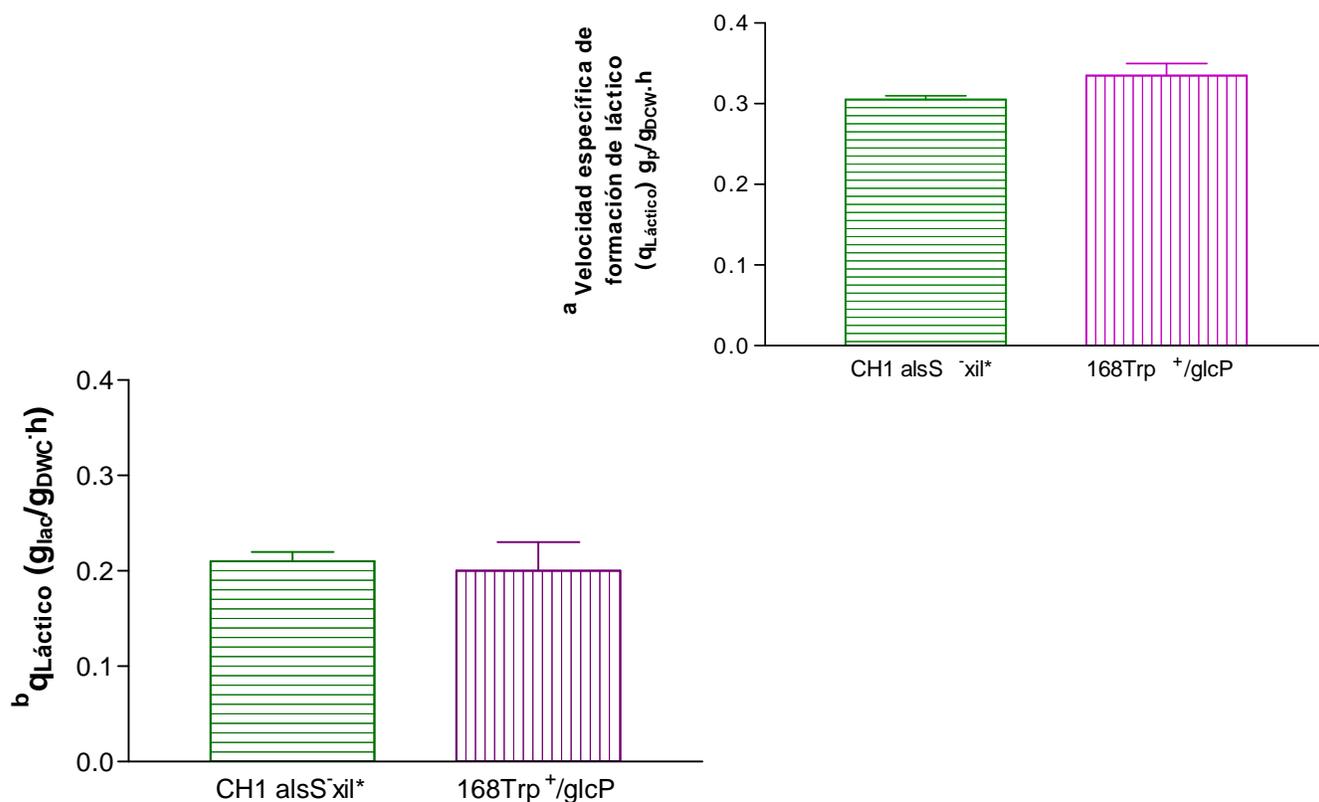


**Figura 25. Velocidad específica de consumo de xilosa ( $q_{xil}$ ) en cultivos anaeróbicos en medio mínimo de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/glcP**

Comparando los resultado obtenidos en cultivos en medio mínimo con xilosa con los observados en el mismo medio pero con glucosa para las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/glcP, observamos que la velocidad específica de crecimiento en xilosa disminuye aproximadamente

un 50% en relación con la obtenida en glucosa. En cuanto a la velocidad específica de consumo de xilosa, ésta disminuye entre un 40 y 50%, respectivamente, comparándola con la correspondiente en glucosa. Cabe aclarar que se obtuvieron cepas capaces de utilizar la xilosa, aunque lento, como única fuente de carbono bajo condiciones anaeróbicas, lo cual no ha sido reportado en la literatura.

En cultivos anaeróbicos en medio mínimo con xilosa los productos encontrados por el HPLC fueron principalmente lactato y en pequeñísimas cantidades acetato y succinato. La producción de lactato se presentó desde la fase exponencial. En la figura 26 se muestra las gráficas de velocidad específica de producción de lactato para ambas fases.



**Figura 26. Comparación de velocidad específica de producción de lactato ( $q_{\text{lactato}}$ ), en la fase exponencial (a) y en la fase estacionaria (b), de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP.**

Como se observa en la fase exponencial la velocidad específica de producción de lactato ( $q_{\text{lactato}}$ ) de la cepa CH1 *alsS<sup>-</sup>xil\** (0.31  $\text{g}_P/\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}$ ) fue 9% menor en relación con la cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP (0.34  $\text{g}_P/\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}$ ), en tanto que, en la fase estacionaria la  $q_{\text{lactato}}$  de ambas cepas fue similar, aproximadamente 0.21  $\text{g}_P/\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}$ .

Al analizar los rendimientos biomasa/sustrato ( $Y_{X/S}$ ) y producto/ sustrato ( $Y_{P/S}$ ) se observa que el 66% de la xilosa consumida (3.9 g/L) fue canalizada hacia la formación de lactato, cuya producción final fue 2.6 g/L para CH1 *alsS<sup>-</sup>xil\** y 2.7 g/L para la 168Trp<sup>+</sup>/glcP.

#### **8.4.3 Crecimiento anaeróbico en mezcla glucosa-xilosa (glc-xil)**

Se realizaron cultivos anaeróbicos en medio mínimo con mezcla glc-xil en las cepas CH1 *alsS<sup>-</sup>*, CH1 *alsS<sup>-</sup>xil\**, 168Trp<sup>+</sup>/P43, 168Trp<sup>+</sup>/glcP. En la figura 27 se presenta el crecimiento, consumo de azúcares y formación de productos de la cepa mencionadas.

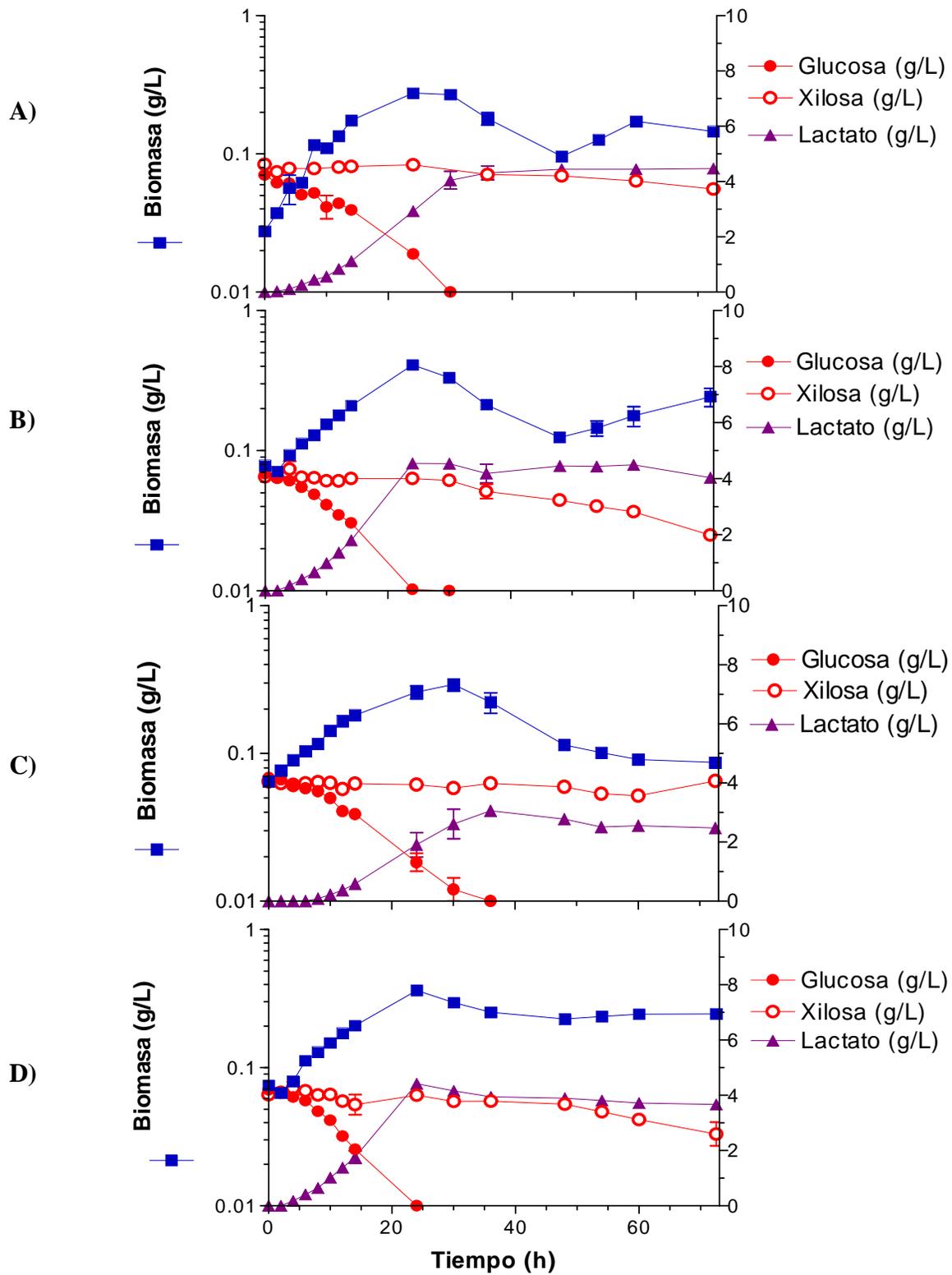
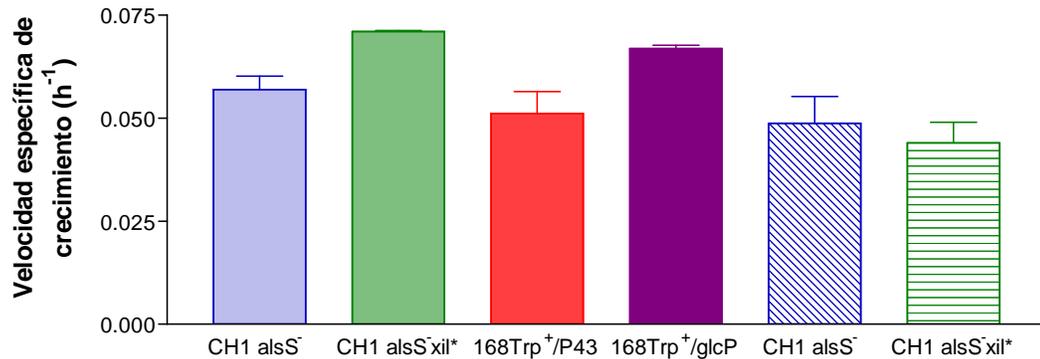


Figura 27. Crecimiento anaeróbico en medio mínimo con mezcla glc-xil de las cepas A) CH1 *alsS*<sup>-</sup> ; B) CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup>; C) 168Trp<sup>+</sup>/P43; D) 168Trp<sup>+</sup>/glcP.

Las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup> presentan un crecimiento diáuxico aparente, en el cual se advierte una etapa de lisis celular al agotarse la glucosa para posteriormente crecer, probablemente utilizando los componentes de los productos de la lisis celular, y en el caso de CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup> se observó un ligero consumo de xilosa, el cuál no es muy claro, ya que no se refleja en la producción de lactato. En las cepas 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP no se observa un crecimiento diáuxico ya que una vez agotada la glucosa, las cepas experimentan una lisis celular, la cual es seguida de una fase estacionaria, en la que no hay consumo de xilosa. En todos los casos las cepas consumieron toda la glucosa en un intervalo de tiempo de 24 a 30 h.

Durante la fase de crecimiento con glucosa, la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup> presentó un incremento del 50% en su biomasa con respecto a la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup>, en tanto que la cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP incrementó un 31% su biomasa en relación con la 168Trp<sup>+</sup>/P43.

Como podemos observar los cultivos anaeróbicos en medio mínimo con mezcla glc-xil de las cepas 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP presentan crecimiento únicamente al utilizar la glucosa, una vez agotada la glucosa experimentan un lisis celular precedida de una fase estacionaria. Durante la fase de lisis celular, la cual duró aproximadamente 18.5hrs, la biomasa disminuyó un 55.6% para la cepa 168Trp<sup>+</sup>/P43 y un 17% para la 168Trp<sup>+</sup>/glcP en relación con la alcanzada en la primera fase de crecimiento, posteriormente entraron en una fase estacionaria. Al final de la fermentación las cepas mantuvieron una biomasa de 0.087 g/L para la cepa 169Trp<sup>+</sup>/P43 y 0.241 g/L para la cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP.

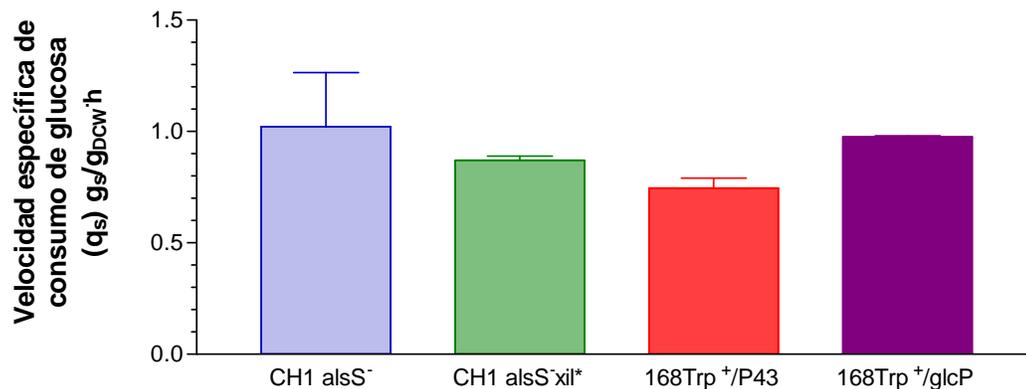


**Figura 28. Velocidad específica de crecimiento en cultivos anaeróbicos en medio mínimo con mezcla glc-xil de las cepas A) CH1 *alsS*<sup>-</sup>; B) CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup>; C) 168Trp<sup>+</sup>/P43; D) 168Trp<sup>+</sup>/glcP.**

En la figura 28 se presenta la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup>, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP, durante el crecimiento en glucosa y en xilosa. Se observa que las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/glcP presentaron un incremento del 20% en su  $\mu_{\text{glc}}$ , en relación a las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/P43, lo cual concuerda con los resultados obtenidos cuando las cepas fueron cultivadas en anaerobiosis usando glucosa como única fuente de carbono. El crecimiento observado en las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup> durante la segunda fase de crecimiento, se debe probablemente a los componentes liberados al medio durante la fase de lisis que sufrió la cepa, más que por la utilización de xilosa.

Las cepas 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP no fueron capaces de utilizar la xilosa en mezcla glc-xil bajo condiciones anaeróbicas.

Las velocidades específicas de consumo de azúcar ( $q_s$ ) de los cultivos medio mínimo en mezcla glc-xil de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup>, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP se presentan en la figura 29.

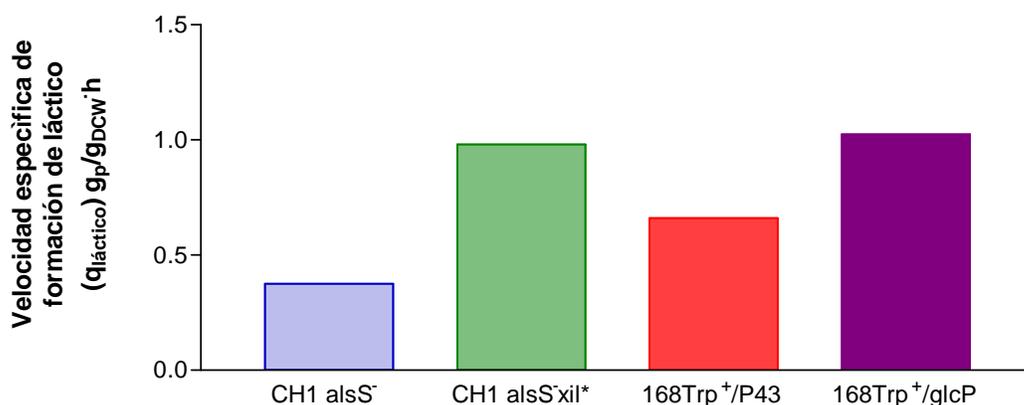


**Figura 29. Velocidad específica de consumo de glucosa ( $q_{glc}$ ) en cultivos anaeróbicos en medio mínimo con mezcla glc-xil de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup>, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP.**

Podemos observar que la  $q_{glc}$  de la cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP (1.00  $g_{glc}/g_{DCW} \cdot h$ ) aumentó alrededor de un 20% respecto a 168Trp<sup>+</sup>/P43 (0.7  $g_{glc}/g_{DCW} \cdot h$ ), mientras que la  $q_{glc}$  de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup> fueron similares (1.02 ± 0.34 y 0.9 ± 0.029  $g_{glc}/g_{DCW} \cdot h$  respectivamente). Las cepas con fondo genético CH1 presentaron una velocidad específica de consumo aparente de xilosa ( $q_{xil}$ ) de 0.1 y 0.4  $g_{xil}/g_{DCW} \cdot h$  respectivamente.

Al final de los cultivos anaeróbicos en medio mínimo en mezcla glc-xil, los productos obtenidos fueron principalmente lactato y en pequeñísimas cantidades acetato y succinato. La producción de lactato se presentó durante la fase de crecimiento con glucosa para todas las cepas.

En todas las cepas el 100% del lactato obtenido se produjo en la fase del crecimiento exponencial con glucosa, mientras que en la fase del crecimiento exponencial con xilosa se reporta la obtención de pequeñísimas cantidades de acetato y succinato (No reportadas, debido a que era muy poco).



**Figura 30. Velocidad específica de producción de lactato ( $q_{\text{lactato}}$ ), en la fase exponencial en cultivos anaeróbicos en medio mínimo con mezcla glc-xil de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup>, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP.**

En la figura 30 se presenta la velocidad específica de producción de lactato ( $q_{\text{lactato}}$ ) de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup>, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP durante la fase de crecimiento exponencial correspondiente a los cultivos en medio mínimo con mezcla glc-xil. Como se observa las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*<sup>\*</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/glcP poseen una  $q_{\text{lactato}}$  similar ( $0.98 \pm 0.034$  y  $1.03 \pm 0.019$   $g_{\text{lactato}}/g_{DCW}h$ ) durante la fase exponencial en el crecimiento con glucosa; mientras que la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> presenta una  $q_{\text{lactato}}$  de  $0.06$   $g_{\text{lactato}}/g_{DCW}h$  durante la fase exponencial y una  $q_{\text{lactato}}$  de  $0.31$   $g_{\text{lactato}}/g_{DCW}h$  durante la fase estacionaria. La cepa 168Trp<sup>+</sup>/P43 presenta un  $q_{\text{lactato}}$  67% menor durante la fase estacionaria en relación con la obtenida en la fase exponencial.

## 9.-DISCUSIÓN

Una de las metas de la biotecnología y específicamente la ingeniería metabólica es ampliar el rango de sustratos que utiliza determinada cepa de un organismo, a fin de aprovechar al máximo los sustratos presentes en la biomasa vegetal. Partiendo de lo anterior, este trabajo tuvo el objetivo de obtener y construir cepas derivada de *B. subtilis* capaces de utilizar xilosa, debido a que *B. subtilis* posee las enzimas necesarias para catabolizar la xilosa, pero carece de un transportador para introducirla. De esta manera se puede aprovechar por *B. subtilis* los dos azúcares más abundantes en la naturaleza: glucosa y xilosa.

Para lograr lo anterior se abordaron las siguientes alternativas:

- Obtener una mutante espontánea xil<sup>+</sup> siguiendo el método descrito por Schmiedel y Hillen (1994).
- Introducir un transportador específico simporte dependiente de H<sup>+</sup> que permita la entrada de xilosa.

Primero, se obtuvo una mutante espontánea xil<sup>+</sup> derivada de la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> la cual se denominó CH1 *alsS*<sup>-</sup>xil\*.

La permeasa de glucosa (GlcP) de *B. subtilis* permite la entrada de aldohexosas de la configuración gluco (mano), sin reconocimiento del grupo hidroxil en la posición 2, y considerando que la xilosa es una aldopentosa, se decidió evaluar el potencial de (glcP) para introducir en *B. subtilis* xilosa. La cepa 168Trp<sup>+</sup> fue transformada con el plásmido pE18P43glcP, el cual contenía la permeasa de glucosa (glcP), obteniendo la cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP, que según pudimos comprobar, fue capaz de crecer en xilosa como única fuente carbono.

Una vez obtenidas las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*\* y 168Trp<sup>+</sup>/*glcP* se llevaron a cabo cultivos aeróbicos y anaeróbicos en medio mínimo con el fin de recabar información acerca de los aspectos metabólicos, de crecimiento y formación de productos en la utilización de xilosa.

### **Crecimiento aeróbico**

En busca de un mejor entendimiento de los aspectos bioenergéticos y su impacto en la formación de producto se realizaron cultivos aeróbicos en medio mínimo con glucosa, xilosa y mezcla glucosa-xilosa para las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*\*, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/*glcP*. Las cuales presentan una velocidad específica de crecimiento similar y que demuestra que el metabolismo de la glucosa en las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* y 168Trp<sup>+</sup>/*glcP* no se modificó.

Respecto al crecimiento aeróbico con xilosa, las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>*xil*\* y 168Trp<sup>+</sup>/*glcP* fueron capaces de crecer utilizando la xilosa como única fuente de carbono. Esto demuestra que *GlcP* es funcional con el vector evaluado y que permite transportar xilosa, activando el operón *xylAB* y permitiendo el metabolismo de la xilosa.

Comparando los resultados de glucosa y xilosa de las misma cepas vemos que la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) disminuye un 60% para la mutante y un 40% para la transformada. Así mismo, la biomasa alcanzada en xilosa es 40% menor comparándola con la glucosa; y en general todos los parámetros disminuyen en presencia de xilosa, probablemente, como consecuencia de una limitación en la capacidad de transporte de xilosa o bien por la insuficiente inducción del *XylA* y *XylB* para fosforilar e isomerizar a la xilosa. Para ver si se debe a una limitación en la capacidad de transporte de xilosa se podría medir la xilosa introducida por medio de xilosa marcada radiactivamente.

En cultivos con mezclas de carbohidratos, las bacterias frecuentemente consumen primero el carbohidrato que aporta mayor cantidad de energía. El consumo de los otros carbohidratos ocurre después del agotamiento del carbohidrato preferido, presentando varias fases de crecimiento exponencial, las cuales están separadas por fases de adaptación. A éste fenómeno

se le denomina crecimiento diáuxico, y depende de la represión que ejercen uno azúcares sobre el consumo de otros (Dauner, *et al*, 2002).

Durante el crecimiento diáuxico el consumo de cada uno de los carbohidratos está generalmente sujeto a represión catabólica por glucosa. Es decir la glucosa es metabolizada primeramente y una vez que se ha agotado la misma, los otros azúcares son metabolizados. De tal forma que, en cultivos de mezclas de azúcares, los azúcares no pueden ser metabolizadas simultáneamente de manera rápida y eficiente (Hernández-Montalvo *et al.*, 2001).

La represión catabólica es un mecanismo de regulación por medio del cual la célula coordina el metabolismo de las fuentes de carbono y energía, para maximizar su eficiencia y regular otros procesos metabólicos. En *B. subtilis*, como en la mayoría de las bacterias, la represión catabólica por glucosa depende de un sistema global que regula fuertemente la expresión de genes y operones involucrados en el metabolismo de otros carbohidratos (Chambliss, 1993).

Los cultivos aeróbicos realizados en medio mínimo con mezcla glc-xil de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\*, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP muestran un crecimiento diáuxico, el cual indica que el metabolismo de xilosa está fuertemente reprimido por la glucosa presente en el medio de cultivo.

A pesar de que las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>xil\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP presentan, ya sea una mutación o una permeasa de glucosa que les permiten la entrada de xilosa, son incapaces de utilizarla debido a la represión catabólica por glucosa a la cual está sometido el operón. Dicha represión catabólica (CCR) depende de la presencia del elemento ADN cis-actuando (CcpA) y el elemento de respuesta catabólica (*cre*) localizado dentro del marco de lectura abierta de *xylA* (Gärther, 1988; Rygus y Hillen, 1992). Por lo que es necesario eliminar la represión ejercida por la glucosa con la finalidad de que pueda haber una co-utilización de la glucosa y xilosa.

Durante el crecimiento aeróbico en mezcla glucosa-xilosa, se observa que las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/P43 fueron capaces de utilizar la xilosa, debido, probablemente a la co-utilización y/o presencia de acético.

Tanto en el crecimiento aeróbico en medio mínimo con glucosa como con mezcla glc –xil, el acético fue detectado como principal producto. La formación de acético, en los cultivos con mezclas glc-xil se presentó en la primera fase de crecimiento, como consecuencia del metabolismo de glucosa.

En *B. subtilis* la formación de acético a partir de acetyl-CoA es catalizada en una reacción de dos pasos por la fosfotransacetilasa (Pta) y acetato cinasa (Ack), con la concomitante producción de ATP (una molécula de ATP por una molécula de acetato) (Cruz- Ramos et al., 2000; Hederstedt 1993; Sonenshein 2002)

En el caso de los cultivos en medio mínimo en mezcla glc-xil, el acético producido durante la fase de crecimiento es co-metabolizado junto con la xilosa durante la segunda fase de crecimiento. El acético es metabolizado a través de la vía de acetyl-CoA sintetasa (AcsA), debido a que *B. subtilis* carece del ciclo de glioxilato; sirviendo potencialmente como fuente de energía para el catabolismo en el ciclo de los ATC (Dauner *et al*, 2002).

### **Crecimiento anaeróbico**

En el crecimiento anaeróbico en medio mínimo con glucosa, se observó que las cepas alcanzan velocidades específicas de crecimiento, aproximadamente, un 90% menor en relación con la obtenida bajo condiciones aeróbicas. Dentro de la literatura encontramos que *B. subtilis* posee una ruta de fermentación muy deficiente, por lo que es necesario adicionar intermediarios metabólicos (piruvato) o nutrientes adicionales como vitaminas y/o aminoácidos al medio, junto con la fuente de carbono (Nakano *et al.*, 1997; Cruz-Ramos *et al.*, 2000). Una de las razones que se propone para explicar este fenómeno es que *B. subtilis* requiere de piruvato ya que la cantidad de piruvato acumulado por la glicólisis no es suficiente para inducir la expresión de los genes involucrados en el metabolismo del mismo. En el caso de los aminoácidos pueden estimular la fermentación, debido a que algunos aminoácidos generan piruvato (Nakano *et al.*, 1997).

Al comparar las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP con la CH1 *alsS*<sup>-</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/P43, las primeras mejoraron un 25% su  $\mu_{\text{Glc}}$ , lo cual indicó que tanto el transportador GlcP, como la mutación, mejoran el consumo de glucosa. Por otra parte, el transportador GlcP puede considerarse como una alternativa viable en cepas productoras de etanol o lactato, ya que permite un ligero incremento en el consumo de glucosa.

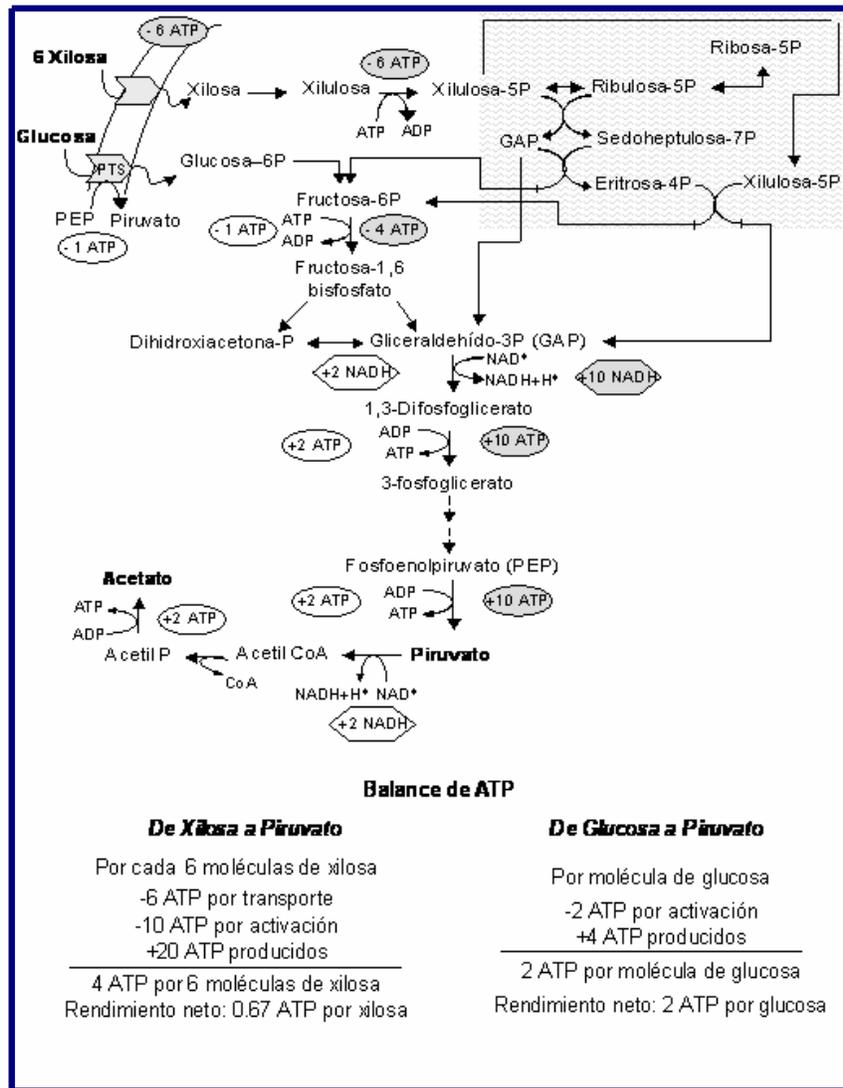
En los cultivos anaeróbicos en medio mínimo con xilosa las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP fueron capaces de utilizar lentamente la xilosa como única fuente de carbono bajo, presentando una velocidad específica de crecimiento de 0.036 h<sup>-1</sup> la cual fue un 88% menor con respecto a la obtenida en los cultivos aeróbicos con xilosa. No obstante los resultados indicaron que el transportador GlcP es suficiente para que *B. subtilis* sea capaz de introducir y metabolizar la xilosa a intermediarios de la vía de la pentosas, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

Al analizar los resultados obtenidos entre las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP se observó que presentan un comportamiento muy similar, lo que nos lleva a pensar que tal vez, la mutación ocasionada en la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* implica al transportador GlcP, aunque para comprobar esta hipótesis se podría realizar un estudio de microarreglos, para ver la expresión de GlcP.

Al comparar los datos obtenidos en los cultivos anaeróbicos con xilosa de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP con los correspondientes con glucosa, se observa una disminución del 50% en todos los parámetros ( $\mu$ , X q<sub>s</sub>), probablemente, como consecuencia de la limitada producción de ATP, debido a que, en la fermentación de la xilosa los requerimientos energéticos para su transporte y fosforilación son mayores en comparación con la glucosa. (Hernández – Bustos, 2003).

La glucosa es transportada y posteriormente fosforilada por el sistema de la fosfotransferasa (PTS), la cual sólo utiliza un fosfato, mientras que la xilosa es transportada por un sistema simporte -H<sup>+</sup> y fosforilada por una cinasa intracelular dependiente de ATP. Es así como la de glucosa requiere un ATP mientras que para la xilosa se requieren 2 ATP, por el cual el

rendimiento neto de la conversión de glucosa a piruvato es de 2 ATP, mientras que para la xilosa es de 0.67 ATP (Tao *et al*, 2001 en Hernández-Bustos, 2003). En la figura 31 se muestra la comparación del balance energético de *E. coli* durante la utilización glucosa vs. xilosa.



**Figura 31. Balance de ATP y NADH en el metabolismo de azúcares en *Escherichia coli*.**

(Tao *et al*. (2001) en Hernández –Bustos, 2003)

- Consumo o producción de ATP
- ◊ Consumo o producción de NADH

En la literatura se reporta que *B. subtilis* experimenta una lisis celular una vez que se agota la fuente de carbono o nitrógeno o se enfrenta a una limitante de nutrientes (Jolliffe *et al*, 1980). Varios grupos de investigación han demostrado que la síntesis de proteasas extracelulares *B. subtilis* está directamente relacionada en el control de la autólisis mediante modulación de la actividad de las enzimas autolíticas. La actividad autolítica está relacionada con la renovación de los componentes (peptidoglicanos) de la pared celular durante el crecimiento (Jolliffe *et al*, 1980). Esto podría indicar por qué tanto en los cultivos aeróbicos como anaeróbicos en medio mínimo con mezcla glc-xil se observa un crecimiento diaúxico después de agotarse la glucosa. En la primera fase de crecimiento, las cepas experimentan una muerte celular, la cual dura entre 2-4 h para los cultivos aeróbicos y 24 h para los cultivos anaeróbicos, después de éste tiempo las cepas comienzan una segunda fase aparente de crecimiento.

Como se mencionó anteriormente después de la fase de lisis celular se observa una segunda fase de crecimiento. En ambas condiciones de crecimiento (aeróbicas y anaeróbicas) la segunda fase no se debe a un proceso de germinación-esporulación durante la fase de muerte celular debido a que:

1.- El proceso de esporulación se lleva en ocho estadios en un periodo aproximado de 8 h (en medio rico) y se inicia durante la fase crecimiento estacionario (Martínez, 1997 en Hernández-Bustos, 2003). En el caso de los cultivos evaluados se observó que ninguna cepa presenta una fase estacionaria; las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* en condiciones aeróbicas presentan una fase de adaptación la cual es antecedida por la muerte celular.

2.- En condiciones anaeróbicas, en donde el proceso de muerte y adaptación tienen una mayor duración, el proceso de esporulación no puede darse, debido a que, *B. subtilis* pierde la capacidad de esporular bajo estas condiciones (Espinosa-Monteros *et al*, 2001; Hoffman *et al*, 1995).

Después de la fase de muerte celular, el medio de cultivo se ve enriquecido por la presencia de los componentes provenientes de la lisis del material celular (Hernández-Bustos, 2003). Al parecer las cepas 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP utilizan estos componentes sólo para el

mantenimiento del metabolismo, ya que no se observa ni crecimiento ni formación de producto durante la segunda fase de crecimiento.

Al analizar el crecimiento anaeróbico en mezcla glc-xil de la cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP, se observó que no presenta una segunda fase de crecimiento, no obstante, se aprecia un ligero consumo de xilosa cuando la cepa entra en fase estacionaria, el cual probablemente utiliza para el mantenimiento del metabolismo.

Como se menciona en los antecedentes *B. subtilis* utiliza la piruvato deshidrogenada (PDH) para el crecimiento fermentativo, durante el cual el NADH es reoxidado por la conversión de piruvato a lactato por la L-lactato deshidrogenada (*lctE*); acetoína y 2,3-butanodiol por  $\alpha$ -acetolactato sintasa (*alsS*),  $\alpha$ -acetolactato descarboxilasa (*alsD*), y acetoina reductasa; y etanol por aldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenada. De tal forma que el balance redox es mantenido por la producción de lactato y butanediol (Nakano y Zuber, 1998; Nakano y Zuber, 2002). Al término de todas las fermentaciones anaeróbicas se obtuvo lactato como principal producto.

Finalmente al realizar el balance de carbono en los cultivos anaeróbicos se observó lo siguiente:

- a) Tanto en los cultivos anaeróbicos en medio mínimo en glucosa como con mezcla glc-xil las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* y 168trp<sup>+</sup>/glcP dirigieron el 98% de la glucosa consumida a la producción de lactato, el 2% se canaliza hacia el crecimiento y formación de acetato y succinato. Mientras que la cepa 168Trp<sup>+</sup>/P43 sólo invirtió el 76% de la glucosa consumida a la producción de lactato.
- b) Los cultivos anaeróbicos en xilosa tanto la cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> xil\* como la 168Trp<sup>+</sup>/glcP canalizaron el 66% de xilosa consumida hacia lactato.

## 10. CONCLUSIONES

Se obtuvieron dos cepas *B. subtilis* capaces de utilizar xilosa como única fuente de carbono, bajo condiciones aeróbicas como anaeróbicas. La cepa CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* mutante espontánea *xil*<sup>+</sup> derivada de CH1 *alsS*<sup>-</sup> y la cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP la cual contiene la permeasa de glucosa GlcP, un transportador simporte-H<sup>+</sup>.

En condiciones aeróbicas la cepa 168Trp<sup>+</sup>/glcP creció mejor en relación con la cepa 168Trp<sup>+</sup>/P43. No obstante, las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP no presentaron cambios en el metabolismo de la glucosa en relación con las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/P43. El flujo de carbono se dirige principalmente hacia la formación de biomasa y acético.

En los cultivos anaeróbicos con glucosa las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP, mejoraron un 27% su velocidad específica de crecimiento con respecto a sus parentales.

El crecimiento aeróbico en medio mínimo en xilosa de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP mostró que tanto el transportador GlcP como la mutación son capaces de transportar la xilosa, permitiendo la activación del operón *xylAB* y así ser metabolizada produciendo intermediarios de la vía de las pentosas.

Probablemente, debido a un mayor requerimiento energético en el transporte y fosforilación de xilosa, las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\* y 168Trp<sup>+</sup>/glcP obtuvieron velocidades específicas de crecimiento aproximadamente un 60% y 45% menores en relación con la obtenidas en glucosa bajo condiciones anaeróbicas, mientras que para aerobiosis esta disminución se debe, probablemente, por una incapacidad de XylA y XylB para fosforilar e isomerizar la xilosa o bien por la capacidad de la vía de las pentosas.

El crecimiento diaúxico presentado en los cultivos aeróbicos para las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup>, CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*\*, 168Trp<sup>+</sup>/P43 y 168Trp<sup>+</sup>/glcP mostró que la glucosa reprime catabólicamente la utilización de la xilosa. Esto debe ocurrir mediante la represión del operón *xylAB*.

El crecimiento de las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/P43 durante la segunda fase de crecimiento en los cultivos aeróbicos en mezclas, se debe probablemente a la presencia del acético en el medio, y el cual es co-metabolizado con la xilosa.

Se obtuvo lactato como producto principal en todos los cultivos anaeróbicos; mientras que en los cultivos aeróbicos el producto obtenido fue el acético. La obtención de productos nos indica que las cepas CH1 *alsS*<sup>-</sup> *xil*<sup>\*</sup> y 168Trp<sup>+</sup>/glcP maximizan la utilización de la xilosa y la convierten en productos útiles para el ser humano.

Los resultados obtenidos en los cultivos aeróbicos y anaeróbicos en xilosa, mostraron que el transportador GlcP permite el transporte xilosa lo cual es congruente, debido a que la xilosa es una aldopentosa y la única diferencia con los azúcares reportados es que es una pentosa. De tal forma se concluyó que el GlcP, además de permitir la entrada de glucosa, manosa, 2-Deoxiglucosa y metil  $\alpha$ - glucosidos, también permite la entrada de xilosa, lo cual demuestra que GlcP presenta una amplia utilización de azúcares.

Finalmente el transportador GlcP ofrece una ventaja energética a la cepa, debido a que es independiente de ATP.

## 11. PERSPECTIVAS

Con el fin de mejorar la utilización de xilosa de cepas CH1 *alsS<sup>-</sup>xil\** y 168Trp<sup>+</sup>/glcP se propone eliminar la represión catabólica por glucosa, a través de la delección del sitio *cre* (elemento de respuesta catabólica) localizado en la secuencia del gen estructural de *xylA* y/o el represor R (*xylR*) a fin de obtener una cepa de *B. subtilis* capaz de metabolizar glucosa y xilosa a la par. En estudios realizados por Schmiedel y Hillen (1996) sobre la contribución de XylR, CcpA y *cre* en el crecimiento diaúxico en *Bacillus megaterium*, encontraron que la inactivación de *xylR* incrementa dos veces la expresión de *xylA* sobre glucosa. La delección de *cre* presenta un efecto más marcado, reduciendo la represión inducida por glucosa en 13 veces en la cepa silvestre hasta 2.5 veces. Cuando *xylR* y *cre* son inactivadas juntas una represión residual de 2.5 veces de *xylA* es encontrada. Lo mismo puede suceder con *B. subtilis*.

Realizar estudios con otras aldopentosa, tales como la arabinosa, ribosa y lixosa a fin de saber si GlcP permite su entrada.

## 12. REFERENCIAS

1. **Bioland** 2006 Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons, Inc., New York ([www.bioland.cl/mo-biobac.htm](http://www.bioland.cl/mo-biobac.htm))
2. **Cabrera -Valladares N.**, 2006. Construcción de cepas recombinantes de *Escherichia coli* productoras del biosurfactante monoramnolípido de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis Dctoral. Instituto de Biotecnología-UNAM.
3. **Chaillou S.**, Bor Y., Batt C., Postma P., Pouwels P. (1998) Molecular cloning and functional expression in *Lactobacillus plantarum* 80 of *xylT*, encoding the D-xylose- $H^+$  symporter of *Lactobacillus brevis*. Applied and Environmental Microbiology **64**: 4720-1728.
4. **Chambliss G. H.**, 1993 Carbon source-mediated catabolite repression en *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria. Eds. Sonenshein A. L., Hoch J. A., Losick R. American Society for Microbiology, Washington , DC. 15: 213-219.
5. **Cruz- Ramos H.**, Hoffmann T., Marino M., Nedjari H., Presecan-Siedel E., Dreesen O., Glaser P., Janh D. 2000 Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and regulation of gene expression. Journal Bacteriology **182**: 3072 – 3080.
6. **Dahl M.K.**, Degenkolb J., Hillen W. 1994 Transcription of the *xyl* operon is controlled in *Bacillus subtilis* by tandem overlapping operators spaced by four base-pair. J. Mol. Biol. **243**: 413-424.
7. **Dauner M.**, Storni T., Sauer U. 2001. *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. Journal of Bacteriology **24**:7308 -7317.

8. **Dauner M.**, Sonderegger M., Hochuli M., Szyperski T., Wüthrich K., Hohmann H. P. Sauer U., Bailey J. E., 2002 Intracellular carbon fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis* during growth on two-carbon substrate mixtures. *Applied and Environmental Microbiol.* **4**:1760-1771.
9. **Espinosa de los Monteros J.**, Martínez A. and Valle F. 2001. Metabolic profiles and *aprE* expression in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **57**:379-384.
10. **Gartner D.**, Geissendorfer M. and Hillen W. 1988 Expression of the *Bacillus subtilis xyl* operon is repressed at the level of transcription and is induced by xylose. *Journal of Bacteriology* **170**:3102-3109.
11. **Gil M. J.** 2007 Utilización de materias primas renovables. [www.unia.es/nuevo\\_inf\\_academica/visualizar\\_file\\_Adjunto](http://www.unia.es/nuevo_inf_academica/visualizar_file_Adjunto).
12. **Hederstedt L.** 1993. The krebs citric acid cycle En *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria. Eds Sonenshein A. L., Hoch J. A., Losick R. American Society for Microbiology, Washington, DC. **13**:181-197.
13. **Hernández-Bustos, C. I.** 2003 Crecimiento y formación de productos en cultivos aeróbicos y anaeróbicos de *Bacillus subtilis* con glucosa, xilosa y celobiosa. Tesis de Licenciatura, 98 pag. Instituto Tecnológico de Zacatepec. Zacatepec, Mor.
14. **Hernández –Montalvo V.**, Valle F., Bolivar F., Gosset G., 2001 Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 186-191.
15. **Huang J.**, Wang G., Xiao L. 2006. Cloning sequencing and expression of xylanases gene from *Bacillus subtilis* strain B10 in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol.* **97** (6):802-808.

16. **Hoffman T.**, Troup B., Szabo A., Hungerer C., Jahn D. 1995 The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: Cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. FEMS Microbiol. Lett. 131:219-225.
17. **Iáñez E.**, 2006 Curso de Microbiología General Ed. Síntesis. Madrid. 380 pág.
18. **Ingram L. O.**, Aldrich H. C., Borges A. C., Causey T. B., Martínez A., Morales F., Alif Saleh, Underwood S. A., Yomano L. P., York S. W., Zaldivar J., Zhou S. 1999 Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. Biotechnol. Progress **15**:855-866.
19. **Jolliffe L. K.**, Doyle R. J., Streips U. N. 1980 Extracellular proteases modify cell wall turnover in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology. **141** (3): 1199-1208.
20. **Jonh R. P.**, Nampoothiri K.M., Pandey A. 2007 Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspective. Appl. Microbiol. Biotechnol **74** (3): 524-534.
21. **Krispin O.**, Allmansberger R. 1998 The *Bacillus subtilis* AraE protein displays a broad substrate specificity for several different sugars. Journal of Bacteriology **180**: 3250-3252.
22. **Martínez A.**, Ramírez OT. Valle F. 1997. Improvement of culture conditions to overproduce beta-galactosidase from Escherichia coli in Bacillus subtilis. Appl Microbiol Biotechnol. **47**(1):40-5
23. **Martínez A.**, Rodríguez M. E., York S. W., Preston J. F., Ingram L. O., 2000. Effects of Ca(OH)<sub>2</sub> treatments (“Overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysate. Biotechnol. Bioeng. **69**:526-536.

24. **Nakano M. M.**, Dailly Y. P., Zuber P., Clark D.P. 1997 Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentative end products and genes required for growth. *Journal Bacteriology* **179**: 6749-6755.
25. **Nakano M. M.**, Hulett F. M. 1997 Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *FEMS Microbiology Letters* **157**: 1-7.
26. **Nakano M. M.**, Zuber P. 1998 Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). *Ann. Rev. Microbiol.* **52**: 165-190.
27. **Nakano M. M.** and Zuber P. 2002. Anaerobiosis. En *Bacillus subtilis* and its closest relatives from genes to cells. Eds Sonenshein A. L., Hoch J. A., Losick R. American Society for Microbiology, Washington, DC. **28**:393-404.
28. **Paulen I. T.**, Chauvaux S., Choi P., Saier M. H. 1998 Characterization of glucose – specific catabolite repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*: identification of novel hexose:H<sup>+</sup> symporter. *Journal of Bacteriology* **180**: 498-504.
29. **Priest F. G.** 1993 Systematics and ecology of *Bacillus*. En *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria. Eds Sonenshein A. L., Hoch J. A., Losick R. American Society for Microbiology, Washington, DC. **1**:3-16.
30. **Rodionov D. A.**, Mironov A. A., Gelfand M. S. 2001. Transcriptional regulation of pentose utilization systems in the *Bacillus/Clostridium* group of bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **205**: 305-314.
31. **Rogolsky M.** 1968. Genetic mapping of locus which regulates the production of pigment associated with spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **95**(6):2426-2427.

32. **Romero S.**, Merino E., Bolivar F., Gosset G., Martínez A., 2007. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **73** (16):5190-5198.
33. **Russell J. B.**, Cook G. M., 1995. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiology Rev.* **59**:48-62.
34. **Ryguis T.**, Hillen W. 1991 Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Applied Microbiology and Biotechnology* **35**: 549-599.
35. **Ryguis T.**, Hillen W. 1992. Catabolite repression of the *xyl* operon in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* **174**:3049-3055.
36. **Ryguis T.**, Scheler A., Allmansberger R., Hillen W. 1991 Molecular cloning, structure, promoters and regulatory elements for transcription of the *Bacillus megaterium* encoded regulon for xylose utilization. *Archives of Microbiology* **155**: 535-542.
37. **Schmiedel D.**, Hillen W. 1996 Contributions of XylR, CcpA and cre to diauxic growth of *Bacillus megaterium* and to xylose isomerase expression in the presence of glucose and xylose. *Mol. Gen. Genet.* **250**: 259-266.
38. **Snay J.**, Jeong J. W. Ataa M. M. 1989. Effects of growth conditions on carbon utilization and organic by-product formation in *B. subtilis*. *Biotechnol. Progress.* **5**: 63-69.
39. **Schmiedel D.**, Hillen W. 1996 A *Bacillus subtilis* 168 mutant with increased xylose uptake can utilize xylose as sole carbon source. *FEMS Microbiology Letters* **135**: 175-178.

40. **Schmiedel D.**, Kintrup M., Kuster E., Hillen W. 1997 Regulation of expression, genetic organization and substrate specificity of xylose uptake in *Bacillus megaterium*. *Molecular Microbiology* **23**:1053-1062.
41. **Sonenshein A.** 2002. The Krebs citric acid cycle. En *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Eds Sonenshein A. L., Hoch J. A., Losick R. ASM press, Washington, D.C. **12**:152-162.
42. **Steinmetz M.** 1993 Carbohydrate catabolism: pathways, enzymes, genetic regulation and evolution. En *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria. Eds Sonenshein A. L., Hoch J. A., Losick R. American Society for Microbiology, Washington, DC. **11**: 157-163.
43. **Stephenson K.**, Bron S., Harwood C.R. 1999 Cellular lysis in *Bacillus subtilis*; the affect of multiple extracellular protease deficiencies. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**:141-145.
44. **Stülke J.**, and Hillen W. 2000 Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 849-880
45. **Tao H.**, González R., Martínez A., Rodríguez M., Ingram L. O., Preston J. F., Shanmugam K. T. 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.
46. **Winstedt L.**, Wachenfeldt C. V. 2000. Terminal oxidases of *bacillus subtilis* strain 168: one quinol oxidase, cytochrome *aa<sub>3</sub>* or cytochrome *bd*, is required from aerobic growth. *J. of Bacteriology* **182**: 6557-6564.

47. **Wu S. C.**, Wong S. L. 1999 Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **72**: 185-195.
48. **Ye R.**, Yang L-P., Wong S-L. 1996 Construction of protease deficient *Bacillus subtilis* strains for expression studies: Inactivation of seven extracellular proteases and the intracellular LonA protease. Proc. of the International Symposium on Recent Advances in Bioindustry, Seoul Korea. Pp:160-169.
49. **Zukowski M. M.** 1992 Production of commercially valuable products. En *Biology of Bacilli. Applications to industry*. Doi R. H., McGloughlin M (eds) Butterworth – Heineman. EUA. **11**: 311-338.

## **13. ANEXOS**

### **13.1 Descripción del equipo de fermentación**

El equipo de fermentación para cultivos aeróbicos consistió de 6 fermentadores de la compañía Applikon, los cuales estuvieron conectados por medio de puertos seriales a dos computadoras. Cada sistema estuvo integrado por:

#### **a) BIOREACTOR**

Constituido por una jarra de fermentación, cuyo volumen nominal de 1 litro. El volumen de trabajo al cual puede operar es de 350 a 900 mL. El sistema de agitación estuvo integrado por dos turbinas Rushton de 45 mm de diámetro total con 6 paletas planas y un motor de velocidad variable (mod. P100; rango de velocidad: 0 a 1250 rpm), contó con 2 deflectores, dispersor de aire de orificio, sistema de enfriamiento mediante la recirculación de agua a través de los deflectores, calentamiento por medio de una mantilla térmica de 110W, sensores de pH (0-14), de oxígeno disuelto (rango: 0-500% de saturación en aire) y de temperatura (rango:0-150°C)

#### **b) BIOCONTROLADOR ADI 1010**

El cual llevó acabo la medición y control de las variables del proceso: pH, temperatura, oxígeno disuelto, nivel de líquido o adición de antiespumante y velocidad de agitación.

#### **c) BIOCONSOLA ADI 1025**

La bioconsola estuvo constituida esencialmente de los actuadores, y recibió las señales del biocontrolador para llevar a cabo el control de las variables del proceso. La bioconsola estuvo equipada con:

1) Tres bombas de adición para ácido, base y control de nivel, las cuales fueron operadas de forma manual o automática.

2) Dos rotámetros, en los cuales fueron controlados de forma manual, mediante una válvula de aguja, el flujo de aire u oxígeno.

3) Dos válvulas solenoides que controlaron la entrada de agua al sistema de enfriamiento.

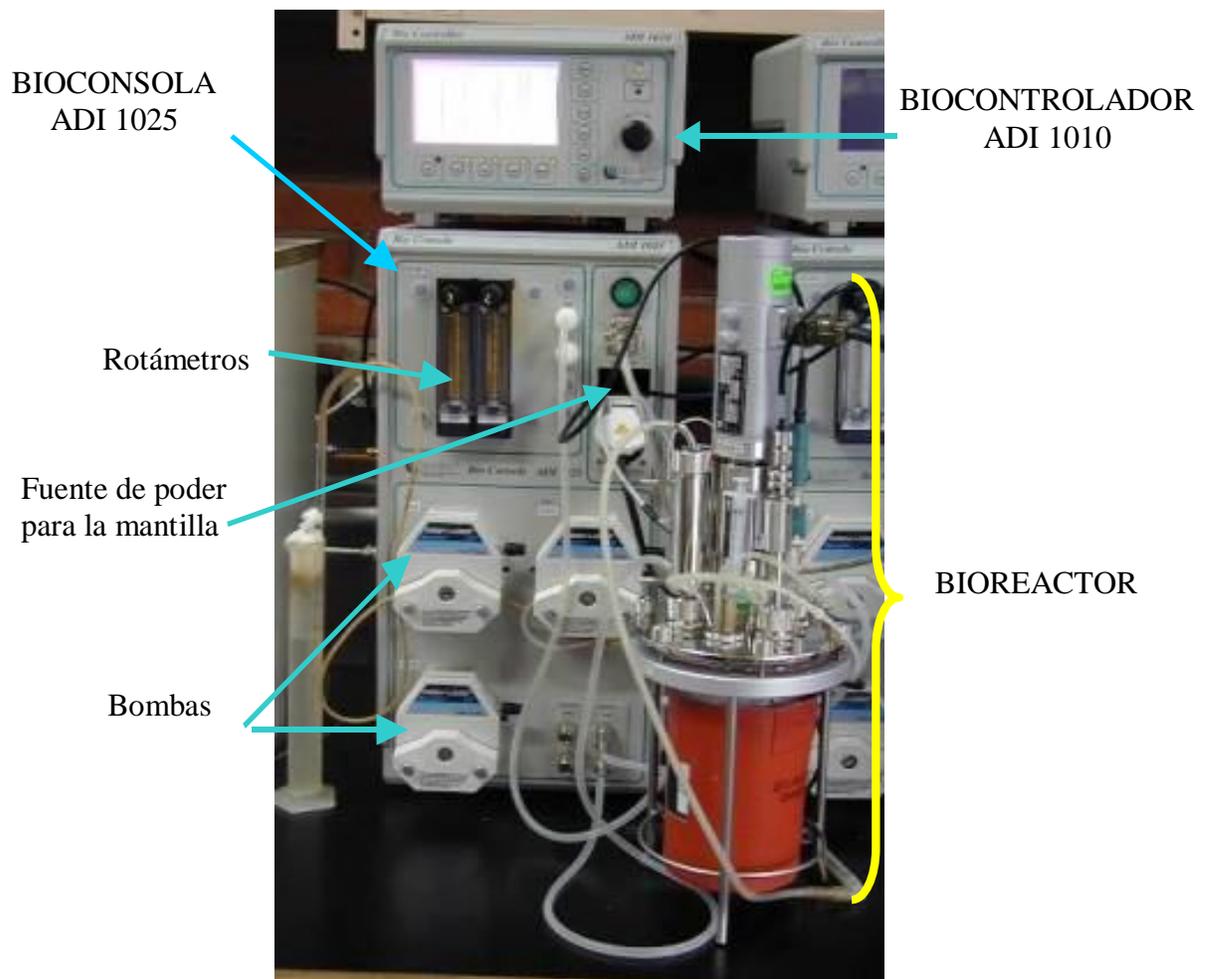
4) Una fuente de poder para la mantilla de calentamiento.

d) Sistema de cómputo

Mediante un programa de control y readquisición de datos (Software BioXpert versión 1.20x), cada computadora llevó a cabo el monitoreo simultáneo y de ser necesario el control remoto de 3 sistemas de fermentación. El Software permitió llevar a cabo:

- i) El control remoto de los parámetros del cultivo (pH, oxígeno disuelto, temperatura, nivel, control de espuma) por medio de algoritmos de control y algoritmos de tipo apagado/encendido (ON/OFF)
- ii) El monitoreo del cultivo mediante un registro de datos y gráfico del comportamiento de cada uno de los parámetros del cultivo.

La adquisición de datos se llevó a cabo cada 2h.



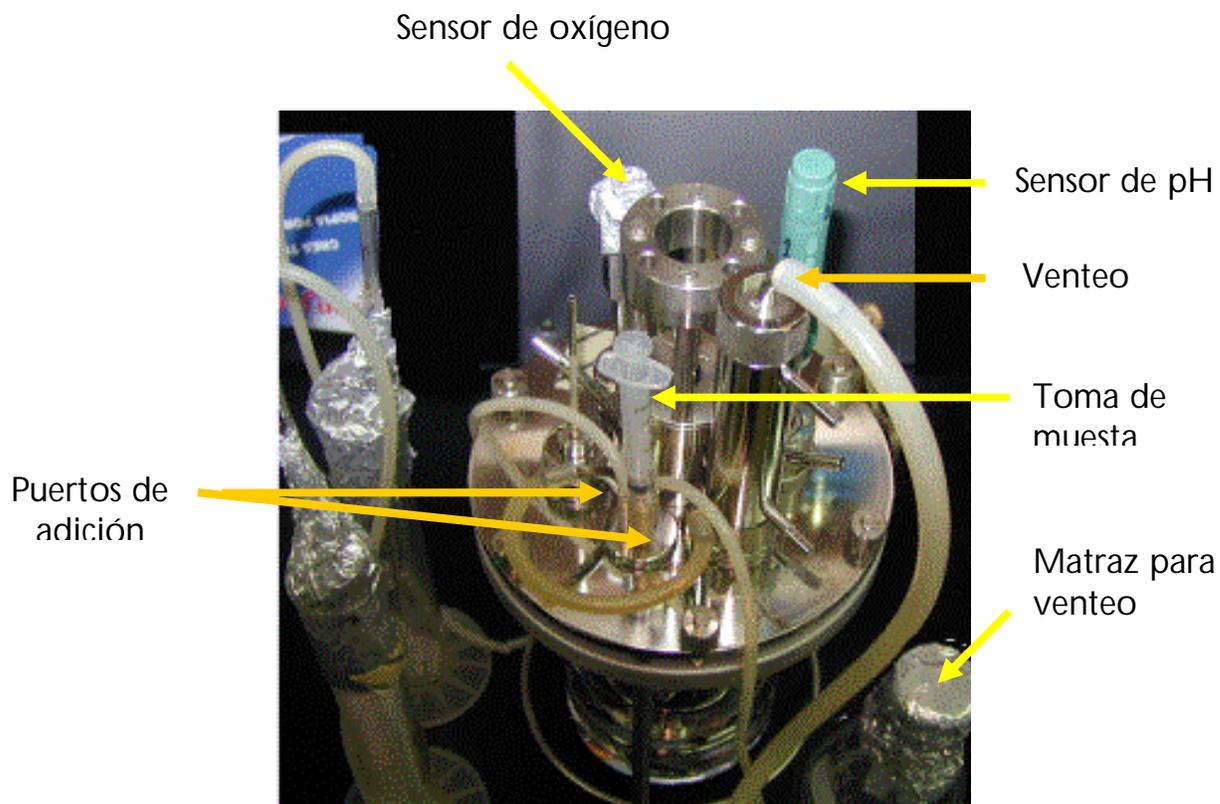
**Figura 32 Componentes del equipo de fermentación**

### **13.1.1 Operación del equipo de fermentación**

La jarra de fermentación se preparó para su esterilización de acuerdo a la figura 36 y se esterilizó por calor húmedo a 120°C durante 20 min., con el medio de cultivo. Para el caso del medio mínimo, la jarra se esterilizó sólo con las sales de fosfato y sulfato de amonio y una vez estéril se adicionaron las sales restantes, las cuales fueron previamente esterilizadas por filtración, así mismo la fuente de carbono (glucosa o xilosa).

Una vez estéril y a temperatura ambiente se adicionó los demás componentes y la fuente de carbono y se ajustó el volumen de trabajo a 500 mL con agua estéril. Se ajustó el pH, la

agitación y la temperatura a las condiciones de trabajo y una vez estable se calibró el sensor de oxígeno al 100% de saturación y se procedió a inocular.



**Figura 33. Preparación del fermentador para esterilizar**

### **13.2 Descripción del equipo de mini-fermentadores (Fleakers)**

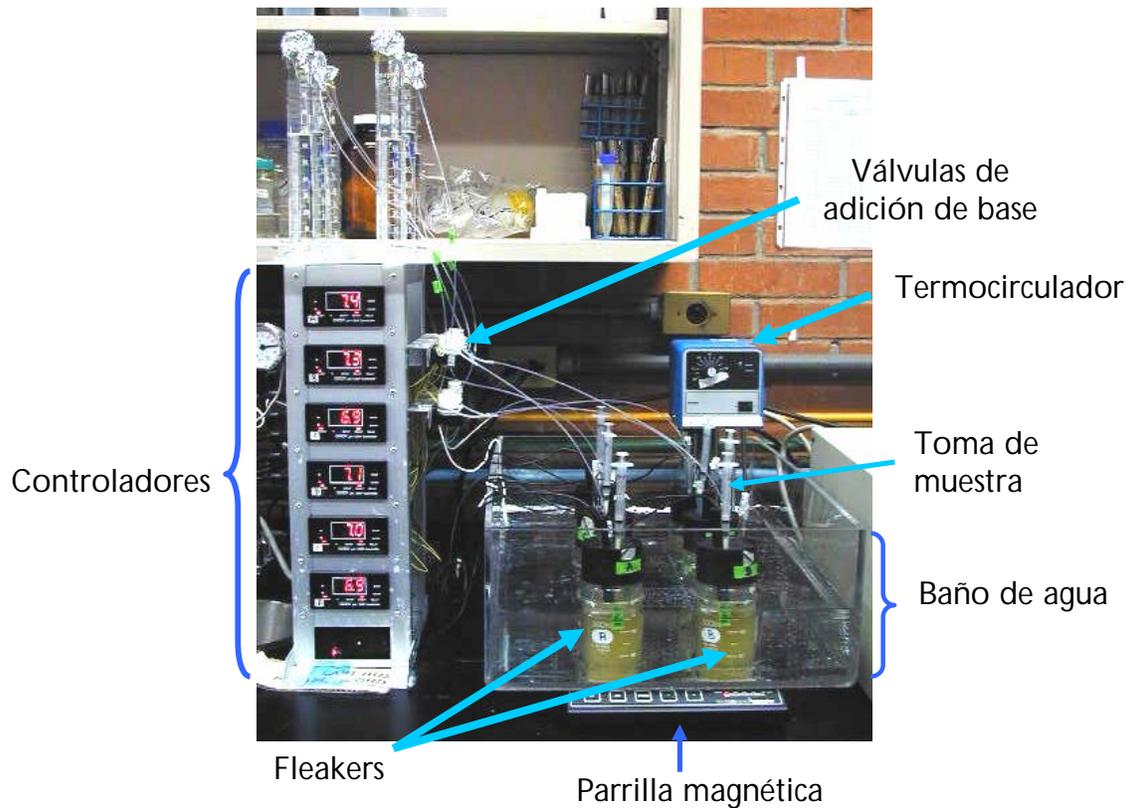
El sistema de mini-fermentadores o Fleakers consta de:

A) Un control de temperatura, el cual está integrado por un baño de agua, un sensor de temperatura y un termo-circulador de agua.

B) Un control de pH, el cual está integrado por 6 electrodos, 6 controladores y 6 válvulas (solenoides) de adición.

C) Un sistema de agitación o parrilla magnética para 6 magnetos (rango de 100 a 850 rpm)

D) 6 mini-fermentadores o fleakers con un volumen nominal de 250 mL y de trabajo de 200 mL, cuyo sistema de agitación consiste en un agitador magnético en forma de cruz de 1 pulgada.



**Figura 34. Componentes del equipo de mini-fermentadores o Fleakers**

### 13.2.1 Operación del equipo de mini-fermentadores

Los fleakers se esterilizaron por calor húmedo a 120 °C durante 20 min, sin el medio de cultivo; los fleakers fueron preparados como se indica en la figura 38. El medio y fuente de carbono se esterilizaron por separado.



**Figura 35. Modo de preparar los mini-fermentadores para su esterilización.**

Los electrodos de pH se esterilizaron por método químico y se calibraron antes de esterilizarse. La calibración se realizó por métodos estándares de calibración utilizando amortiguadores certificados de pH 7.0 y 4.0 respectivamente. Una vez calibrados, los electrodos se lavaron con agua destilada y se dejaron sumergidos por al menos 12 hrs. en una solución de KCL 3m –Formaldehído al 1%. Antes de utilizarlos en los mini-fermentadores, se enjuagaron tres veces estéril y se colocaron en cada uno de los fleakers.

El baño de agua se lleno con 20L de agua destilada aproximadamente y se ajusto la temperatura 2 h. antes de iniciar el cultivo.

Una vez esterilizados los fleakers se adicionó el medio y fuente de carbono y se ajustó el volumen de trabajo con agua destilada estéril. Una vez inoculados se colocaron dentro del

baño de agua, se encendió el sistema de agitación, se colocaron los electrodos de pH, las mangueras de adición de base y se encendieron los controladores de pH.

### 13.3 Cálculos

#### 13.3.1 Estimación de la velocidad específica de crecimiento

##### Velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ )

La determinación de la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), se realizó a través del software GraphPad Prism 3.0 graficando el logaritmo de la densidad óptica (D. O. <sub>600</sub>) de los cultivos vs Tiempo. La velocidad de crecimiento se obtuvo a partir de los datos correspondientes a la fase de crecimiento exponencial mediante el cálculo de una regresión no lineal utilizando la ecuación de crecimiento exponencial ( $X=X_0\exp^{\mu t}$ ) por el método de mínimos cuadrados

##### Biomasa producida durante la fase exponencial ( $X_{\max}$ )

#### 13.3.2 Corrección de biomasa por factor de dilución

La concentración de biomasa, azúcar consumida y productos obtenidos fueron corregidos en función al volumen de base adicionado a cada tiempo mediante un factor de dilución (FD).

Al tiempo (t) en que se tomó la muestra, se midió el volumen de base adicionada ( $V_b$ ) al cultivo y se suma al volumen inicial del cultivo ( $V_i$ ), con estos datos se calculó el factor de dilución (FD) de la siguiente manera:

$$FD = \frac{V_i + V_b}{V_i}$$

A partir del valor de FD obtenidos para cada tiempo, los datos fueron corregidos de la siguiente manera:

$$\text{Biomasa} = \text{Biomasa (g/L) a tx} * \text{FD a tx}$$

Concentración de azúcar= *Azúcar* (g/L) a tx \* FD a tx

Producto = *Producto* (g/L) a tx \* FD a tx

### 13.3.3 Cálculos de rendimientos y velocidades de consumo de azúcares y formación de productos

✚ Rendimiento producto/biomasa ( $Y_{p/x}$ ), biomasa/azúcar ( $Y_{x/s}$ ) y producto/azúcar ( $Y_{p/s}$ )  
La determinación de  $Y_{x/s}$  y  $Y_{p/s}$  durante la fase de crecimiento exponencial, se calculó de la siguiente manera:

$$Y_{x/s} = \frac{\text{g de Biomasa Producida}}{\text{g. de Azúcar consumida}}$$

$$Y_{p/s} = \frac{\text{g de Producto}}{\text{g de Azúcar consumida}}$$

$$Y_{p/x} = \frac{\text{g de Producto}}{\text{g de Biomasa producida}}$$

✚ Velocidad específica de consumo de Azúcar ( $q_s$ ) y de producción de productos ( $q_p$ )  
La determinación de  $q_s$  y  $q_p$  se realizó a través del siguiente cálculo:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}}$$

$$q_p = Y_{p/x} * \mu$$

En el caso de la fase estacionaria, se llevó a cabo de la siguiente manera: se eligió el intervalo de tiempo a evaluar y se calculó la concentración de biomasa promedio ( $X_{\text{Promedio}}$ ) así como el consumo de azúcar de  $q_s$  y  $q_p$  se llevó a cabo de la siguiente manera:

$$q_s = \frac{\text{Azúcar consumida}}{\Delta t(\text{h}) * X_{\text{PROM}}}$$

$$q_p = \frac{\text{Acido producido}}{\Delta t(\text{h}) * x_{\text{PROM}}}$$

#### ✚ Productividad volumétrica ( $Q_p$ )

La determinación de  $Q_p$  se realizó a través del siguiente cálculo:

$$Q_p = \frac{\text{g/l de producto producido}}{t(\text{h}) \text{ total de cultivo}}$$