



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCÁTALISIS

FERMENTACIÓN HOMOLÁCTICA DE DISACÁRIDOS Y MONOSACÁRIDOS UTILIZANDO A *Bacillus subtilis* Δ alsS

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

Q. A. Ofelia Edith Carreón Rodríguez

DIRECTOR DE TESIS: Dr. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

Cuernavaca, Morelos

2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



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 asesoría del Dr. Alfredo Martínez Jiménez, en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca CONACyT 229684/210510; el proyecto: EDO. DE MORELOS 2007-C01-80360; el proyecto de Estímulos a la Innovación, ProInnova 2010; y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM a través del proyecto PAPIIT IN220908.



MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Victor Humberto Bustamante	Instituto de Biotecnología - UNAM
Dr. Humberto Flores Soto	Instituto de Biotecnología - UNAM
Dr. Alfredo Martínez Jiménez	Instituto de Biotecnología - UNAM

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente	Dr. Agustín López Munguía-Canales	Instituto de Biotecnología - UNAM
Secretario	Dr. Enrique Merino Pérez	Instituto de Biotecnología - UNAM
Vocal	Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán	Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM
Suplente	Dra. Cinthia E. Núñez López	Instituto de Biotecnología - UNAM
Suplente	Dr. Alfredo Martínez Jiménez	Instituto de Biotecnología - UNAM



LA CIENCIA

*La ciencia es de virtud asiento,
raudal que no se agota,
corona del estudio y el talento,
fúlgido sol que en el espacio brota,
dando calor y vida al pensamiento.*

*Por la ciencia el mortal rasga ese velo
de ignorancia, que aterra;
por ella, en fin, con empeñoso anhelo
investiga los antros de la tierra,
y los mundos que ruedan en el cielo.
(Antonio Plaza)*



*A mí Tutor
Dr. Alfredo Martínez Jiménez*

*Sus consejos y enseñanzas
lograron la elaboración y
terminación de este
proyecto. Agradezco la
oportunidad y confianza
para trabajar con usted y
con en el grupo de
laboratorio*

A mí Universidad

*Por ser excelsa y
grandiosa, sabiduría
por sí misma.*



A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Victor Humberto Bustamante y al Dr. Humberto Flores Soto por brindarme parte de su valioso tiempo con sus inapreciables observaciones.

A los miembros del jurado, Dr. Agustín López Munguía-Canales, Dr. Enrique Merino Pérez, Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán y la Dra. Cinthia E. Núñez López agradezco sus observaciones que encausaron la terminación de esta Tesis

A la Dra. Noemí Flores, por compartir sus conocimientos y ayudarme a la construcción de los vectores.

A la Q. Georgina Hernández, M. en C. Ramón de Anda y Q. Mercedes Enzaldo por su apoyo técnico y amistad.

A todos y cada uno de los integrantes del laboratorio Bolívar/Gosset, por que me ayudaron a crecer tanto profesional como personalmente, en especial: Dr. Adelfo, Sandra, Andrea, Marco Tulio, César, Naty y la Sra. Silvia.



A mi padre (Q.E.P.D)
Lic. Alfonso Carreón Alva

IN MEMORIAM

En mi ser tu esencia se hace presente,
y este mundo no has dejado. Gracias
por el Don de la vida, por tu sabiduría
y sobre todo por ser mi Padre.

A mi Madre.
Lic. María Ofelia Rodríguez Molina

Agradezco tus palabras de aliento
cuando el panorama se vislumbraba
oscuro, tu apoyo cuando los
escalones se hacían más altos y por tu
confianza en mi.

A mis Hermanos

M. en C. Alfonso Carreón Rodríguez
M en D. Fernando Carreón Rodríguez
Alfredo Carreón Rodríguez

En mi han quedado sus enseñanzas;
juegos y penurias compartidas.
Agradezco a mis hermanos por su
cariño y cuidados expresados.



A mi amor

Lic. Oscar Aarón Molina de la Garza

Gracias por ser mi columna, por tu paciencia en mis noches oscuras y por las palabras correctas para alcanzar la cima.

A mis Cuñadas

Med. F. Mónica Viviana Martínez Martínez
M en L. C. Sara Morales Flores
Claudia Rodríguez Cornejo

Gracias por su amistad y por ser un ejemplo a seguir, en virtud e inteligencia.

A mis sobrinos

Sara Fernanda Carreón Morales
Jaqueline Vivianne Carreón Martínez
Claudia Andrea Carreón Martínez
Patricio Carreón Rodríguez
Maximiliano Carreón Rodríguez
Paloma Carreón Rodríguez

Gracias a ellos por su ternura, inocencia y alegría que contagian.

ÍNDICE DE FIGURAS -----	xi
ÍNDICE DE TABLAS -----	xii
ABREVIATURAS -----	xiii
I.a. RESUMEN -----	1
I.b. ABSTRACT -----	3
II. INTRODUCCIÓN -----	5
III. ANTECEDENTES -----	7
III.1. Producción de Lactato	7
III.1.1. Ingeniería metabólica para cepas productoras de Lactato.....	8
III.2. Catabolismo de Carbohidratos en <i>B. subtilis</i>	11
III.2.1. Transporte y generación de monosacáridos fosforilados.....	13
III.2.2. Fuentes de materia prima utilizadas por <i>B. subtilis</i> en la producción de ácido láctico	15
III.2.2.a Almidón.....	15
III.2.2.b Azúcares Convencionales: Sacarosa, Glucosa y Fructosa.....	16
III.2.2.c. Carbohidratos provenientes de los residuos lignocelulósicos.....	19
III.2.2.d Lactosa	23
III.2.2.e. Glicerol.....	24
III.3. Metabolismo Fermentativo de <i>B. subtilis</i>	25
IV JUSTIFICACIÓN -----	30
V HIPÓTESIS -----	31
VI OBJETIVOS -----	31
VI.1. Objetivo General.....	31
VI.2. Objetivos Particulares.....	31
VII MATERIALES Y METODOS -----	32
VII.1. CEPAS Y PLÁSMIDOS.....	32
VII.2. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	33

VII.2.1. Técnicas genéticas	33
VII.2.1.a. Purificación de DNA cromosomal y plasmídico.....	34
VII.2.1.b. Reacción de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	34
VII.2.1.c. Digestiones y ligaciones	34
VII.2.1.d. Transformación	35
VII.2.1.e. Construcción de la cepa de <i>B. subtilis</i> ER382 ($\Delta alsS$)	35
VII.3. CONDICIONES DE LOS CULTIVOS.....	37
VII.3.1 Condiciones de crecimiento.....	37
VII.3.2. Cultivos.....	37
VII.3.3. Concentración celular	38
VII.4. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	38
VII.4.1. Análisis por HPLC de Sustratos y Productos Metabólicos	38
VII.4.2. Determinación enzimática de glucosa y L-Lactato	38
VII.4.3. Determinación de azúcares reductores totales por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	38
VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	39
VIII.1. Construcción de la cepa de <i>B. subtilis</i> ER382 ($\Delta alsS$)	39
VIII.2. Caracterización de la cepa progenitora (<i>B. subtilis</i> 168 trp^+) y mutante (<i>B. subtilis</i> ER382 $\Delta alsS$) en mini-fermentadores utilizando glucosa como fuente de carbono.	40
VIII.3. Evaluación de <i>B. subtilis</i> 168 trp^+ y <i>B. subtilis</i> ER382 $\Delta alsS$ en fructosa, sacarosa, celobiosa y arabionosa.	44
VIII.4. Análisis de la producción de L-Lactato en <i>B. subtilis</i> ER382 ($\Delta alsS$) en diferentes fuentes de carbono	49
IX CONCLUSIONES-----	51
X PERSPECTIVAS-----	52
XI BIBLIOGRAFÍA-----	53



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo de glucosa a D-Lactato en <i>E. coli</i> .-----	11
Figura 2. Sistema de la Fosfoenolpiruvato (PEP): glucosa fosfotransferasa de <i>B. subtilis</i> (PTS).-----	14
Figura 3. Catabolismo de glucosa, fructosa y sacarosa en <i>B. subtilis</i> .-----	17
Figura 4. Regulones de <i>B. subtilis</i> dependientes de antiterminadores y/o control PTS.-----	18
Figura 5. Composición de la Lignocelulosa del bagazo de caña.-----	20
Figura 6. Catabolismo de L-arabinosa en <i>B. subtilis</i> .-----	22
Figura 7. Metabolismo fermentativo de <i>B. subtilis</i> .-----	26
Figura 8. Modelo de regulación del operón <i>alsSD</i> y del gen <i>ldh</i> en condiciones no aireadas.-----	27
Figura 9. Vector para generar la inactivación del gen <i>alsS</i> .-----	36
Figura 10. Minifermentadores o mini-fleakers.-----	37
Figura 11. pTOPO <i>alsS-Spt</i> y patrón de restricción del mismo.-----	39
Figura 12. PCR de <i>B. subtilis</i> Δ <i>alsS</i> .-----	40
Figura 13. Cinética de crecimiento y consumo de glucosa de <i>B. subtilis</i> 168 <i>trp</i> ⁺ (WT) y <i>B. subtilis</i> ER382 (Δ <i>alsS</i>).-----	41
Figura 14. Producción de L-Lactato y 2,3-butanodiol por <i>B. subtilis</i> 168 <i>trp</i> ⁺ y <i>B. subtilis</i> ER382 (Δ <i>alsS</i>) a partir de glucosa (10g/L).-----	41
Figura 15. Cinética de crecimiento y de consumo de la fuente de carbono de <i>B. subtilis</i> 168 <i>trp</i> ⁺ (WT) y de <i>B. subtilis</i> ER382 (Δ <i>alsS</i>).-----	45
Figura 16. Cinética de crecimiento y de consumo de la fuente de carbono de <i>B. subtilis</i> 168 <i>trp</i> ⁺ y de <i>B. subtilis</i> CH1.-----	48
Figura 17. Producción de L-Lactato de <i>B. subtilis</i> ER382 en medio LB adicionado diferentes fuentes de carbono.-----	49



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Carbohidratos catabolizados por <i>B. subtilis</i> en aerobiosis. -----	12
Tabla 2. Cepas y plásmidos -----	32
Tabla 3. Oligonucleótidos.-----	33
Tabla 4. Resumen de resultados de cultivos de <i>B. subtilis</i> 168 trp ⁺ (WT) y <i>B. subtilis</i> ER382 $\Delta alsS$ -----	42
Tabla 5. Resumen de resultados para la producción de L-Lactato de <i>B. subtilis</i> 168 trp ⁺ y <i>B. subtilis</i> ER382 $\Delta alsS$ -----	42

ABREVIATURAS

Símbolo	Definición	Unidades
Lct	Lactato	
Glc	Glucosa	
Sac	Sacarosa	
Fru	Fructosa	
Ara	Arabinosa	
Gly	Glicerol	
Cel	Celobiosa	
Glc-6-P	Glucosa-6-fosfato	
Fru-6-P	Fructosa-6-fosfato	
Fru-1,6-P	Fructosa-1,6-fosfato	
PEP	Fosfoenolpiruvato	
DHAP	Dihidroxiacetona-fosfato	
G-3-P	Gliceraldehído-3-fosfato	
ace	Acetato	
Spt	Espectinomicina	
Amp	Ampicilina	
Km	Kanamicina	
EI	Enzima I del complejo multi-enzimático PTS	
HPr	Proteína sensible a calor.	
EII	Enzima II del complejo multi-enzimático PTS	
<i>ptsHI</i>	Operón que codifica para la EI y la proteína sensible a calor HPr	
<i>ptsG</i>	Gen que codifica para PTS-permeasa (enzima II ^{glc})	
<i>alsSD</i>	Operón que codifica para las enzimas acetolactato sintasa y acetolactato deshidrogenasa	
<i>alsS</i>	Gen que codifica para la enzima acetolactato sintasa	



<i>alsR</i>	Gen que codifica para el regulador positivo del operón <i>alsSD</i>
<i>ldh</i>	Gen que codifica para la enzima lactato deshidrogenasa
<i>ldhD</i>	Gen que codifica para la enzima D-lactato deshidrogenasa
<i>ldhL</i>	Gen que codifica para la enzima L-lactato deshidrogenasa
<i>sacP</i>	Gen que codifica para PTS-permeasa (enzima II ^{sac})
<i>sacA</i>	Gen que codifica para la enzima fosfosacarasa
<i>sacB</i>	Gen que codifica para la enzima levansacarasa
<i>sacC</i>	Gen que codifica para la enzima levanasa
<i>sacXY</i>	Operón de los genes que codifican para los reguladores del gen <i>sacB</i>
<i>sacT</i>	Gen que codifica para el regulador del operón <i>sacPA</i>
<i>fruA</i>	Gen que codifica para PTS-permeasa (enzima II ^{fru})
<i>levDEFG</i>	Operón que codifica para PTS-permeasa (enzima II ^{fru})
<i>fruB</i>	Gen que codifica para la enzima fructosa-1-fosfato cinasa
<i>fruC</i>	Gen que codifica para la enzima fructocinasa
<i>glpF</i>	Gen que codifica para la proteína facilitadora
<i>glpK</i>	Gen que codifica para la enzima fosforilasa
<i>glpD</i>	Gen que codifica para la enzima deshidrogenasa
<i>araA</i>	Gen que codifica para la enzima L-arabinosa isomerasa
<i>araB</i>	Gen que codifica para la enzima L-ribulosa isomerasa
<i>araD</i>	Gen que codifica para la enzima L-ribulosa-5-fosfato epimerasa
<i>araR</i>	Gen que codifica para el regulador del operón <i>araABD</i> y el gen <i>araE</i>
<i>amyE</i>	Gen que codifica para la enzima α -amilasa
<i>celRABCD</i>	Operón que codifica para las enzimas que metabolizan celobiosas
<i>lacA</i>	Gen que codifica para la enzima β -galactosidasa
<i>pgi</i>	Gen que codifica para la enzima fosfoglucoisomerasa
<i>pfk</i>	Gen que codifica para la enzima fosfofructocinasa
<i>trp</i>	Triptofano

<i>pdhABCD</i>	Operón que codifica para el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa	
<i>loxP</i>	Secuencia reconocida por la recombinasa CRE	
ALSS	Acetolactato sintasa	
ALSD	Acetolactato deshidrogenasa	
ACS	Acetil-CoA sintetasa	
ACK	Acetato cinasa	
ADH	Alcohol deshidrogenasa	
FRD	Fumarato reductasa	
LDH	Lactato deshidrogenasa	
PDH	Piruvato deshidrogenasa	
BDH	Butanodiol deshidrogenasa	
ACK	Acetato cinasa	
PYC	Piruvato carboxilasa	
PFL	Piruvato formato liasa	
PPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	
PTA	Fosfotransacetilasa	
PYK	Piruvato cinasa	
μ	Velocidad específica de crecimiento	h^{-1}
X_{max}	Biomasa máxima alcanzada durante la fase de crecimiento exponencial	g_{DWC}/L
$Y_{p/s}$	Rendimiento producto/sustrato	g_p/g_s
q_s	Velocidad específica de consumo de sustrato	$g_s/g_{DWC} h$
q_p	Velocidad específica de formación de producto	$g_p/g_{DWC} h$
Q_p	Productividad volumétrica	$g_{lct}/L h$

I.a. RESUMEN

Los plásticos biodegradables, pueden ser obtenidos a partir de polilactatos (PLA), polímero generado de una mezcla de los isómeros puros L y D-Lactato, por lo que la demanda del ácido láctico se está incrementando sustancialmente. En este campo, *Bacillus subtilis* tiene las características genéticas que potencialmente permitirían obtener un microorganismo homoláctico y producir únicamente el enantiómero L-Lactato, sumado a su capacidad de utilizar una amplia gama de azúcares, al menos reportadas en cultivos en condiciones aeróbicas, incluyendo varias pentosas, hexosas y disacáridos. En este trabajo se construyó una cepa derivada de *B. subtilis* 168 *trp*⁺ con el propósito de obtener una cepa homofermentativa productora de L-Lactato (*B. subtilis* ER382 Δ *alsS*). Para esto se eliminó el gen *alsS* que codifica para la enzima acetolactato sintasa, que cataliza la reacción de piruvato a acetolactato, parte inicial de la vía de síntesis del butanodiol. Cabe resaltar que *B. subtilis* ER382 cuando es cultivada en glucosa presenta una mayor velocidad específica de crecimiento con respecto a su cepa progenitora (0.38 vs 0.33h⁻¹), además de un aumento en la cantidad de biomasa generada (0.67 vs 0.49 g/L). Estos incrementos, aunque marginales, en la cepa modificada representan un mejor desempeño en términos cinéticos. En comparación con su cepa progenitora, ER382, consume glucosa a una velocidad específica dos veces mayor y produce 13.2 g/L de L-Lactato a partir de 10 g/L de glucosa, obteniendo un 32% más con respecto al máximo teórico. Este 32% más lo proporcionan los nutrientes del medio complejo utilizado. Al parecer la velocidad de crecimiento se ve acrecentada por un efecto en la eliminación de los productos de inhibición de la vía del butanodiol, aunado a un probable efecto positivo en la expresión del operón *pdhABCD* que codifica para el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa, redirigiendo el flujo de piruvato hacia la formación de acetyl-CoA.

Por otro lado, se comprobó que *B. subtilis* ER382 tiene la capacidad de fermentar fructosa, celobiosa, sacarosa y arabinosa, cuando son utilizados como única fuente de carbono en medio complejo. Sin embargo, en el mismo medio, no puede utilizar glicerol, lactosa o almidón. La capacidad de utilizar fructosa fue tan

eficiente como la de glucosa, terminándose de consumir 10 g/L a las 12 horas de fermentación. Por el contrario el catabolismo de celobiosa, sacarosa y arabinosa fue muy lento, tardando hasta 60 horas de fermentación, el cual se correlaciona con una velocidad específica de crecimiento cinco veces menor con respecto a glucosa. El rendimiento de conversión de azúcares a L-Lactato fue 30% más con respecto al teórico máximo, excepto cuando la única fuente de carbono fue arabinosa (rendimiento del 80%). Este hecho sugiere que la vía de las pentosas es ineficiente en condiciones anaerobias. En concordancia con los resultados anteriores, la productividad específica y volumétrica en la formación de L-Lactato fue mucho menor en sacarosa, celobiosa y arabinosa en comparación con la obtenida en fructosa y glucosa. Se propone que el metabolismo de los disacáridos en relación con el de las hexosas es lento, derivado de una baja actividad de sus transportadores o de las enzimas que los hidrolizan. Por otra parte *B. subtilis* ER382 no fermenta glicerol, al parecer en condiciones anaerobias no se expresan algunos genes que codifican para las enzimas que internalizan y metabolizan este carbohidrato; así mismo, tampoco fermenta lactosa, ya que no contiene el transportador para metabolizarlo; al igual que tampoco puede fermentar almidón, ya que aunque contiene los genes que codifican para las enzimas que lo hidrolizan, al parecer en condiciones anaerobias éstas no se están expresando.

I.b. ABSTRACT

Biodegradable plastics can be obtained from polylactate (PLA), a polymer that is obtained from a mixture of pure L and D-Lactate; hence lactic acid demand is increasing substantially. In this field, *B. subtilis* has the genetic characteristics that potentially can be modified to construct a homolactic microorganism to produce only the L-Lactate enantiomer. Furthermore *B. subtilis* has the ability to use a wide range of sugars, at least reported in aerobic cultures, including several pentoses, hexoses and disaccharides. In this work, in order to obtain a homofermentative L-Lactate strain, a strain derived from *B. subtilis* 168 trp^+ was constructed. The *alsS* gene that encodes for the acetolactate synthase enzyme, that catalyzes the conversion of pyruvate to acetolactate (the initial part of the butanediol pathway) was interrupted. The *B. subtilis* $\Delta alsS$ was called ER382. Remarkably when ER382 was grown in glucose, it showed a higher specific growth rate compared to its parental strain 168 trp^+ (0.38 vs 0.33 h^{-1}), with a simultaneous increase in the amount of biomass produced (0.67 vs. 0.49 g/L). Although these increments seem to be negligible in kinetic terms they represented a better performance for modified strain. The specific rate for glucose consumption in ER382 was two-fold higher when compared to its parental strain and produced 13.2 g/L of L-Lactate from 10 g/L of glucose; this represented a yield 32% higher with respect to the theoretical value. This 32% is provided by the use of nutrients from the complex medium. Probably the growth rate was increased as a consequence of a reduction in the formation of metabolites from the butanediol pathway, and by a positive effect on the expression of the *pdhABCD* operon that encodes the pyruvate dehydrogenase complex enzyme, which redirects the flow of pyruvate to acetyl-CoA.

On the other hand, our results showed that *B. subtilis* ER382 has the capacity to ferment fructose, cellobiose sucrose or arabinose, when used as carbon sources in complex medium. In contrast ER382 strain was unable to ferment glycerol, lactose or starch in the same complex medium. The ability of *B. subtilis* ER382 to use fructose as a sole carbon source was as efficient as for

glucose; the consumption of 10 g/L of this carbohydrate was completed in 12 hours of fermentation. In contrast the catabolism of cellobiose, sucrose and arabinose was very slow when compared to that of glucose; the consumption of 10 g/L of these carbohydrates was completed in 60 hours of fermentation. Accordingly, the specific growth rates in these carbohydrates were very low. The efficiency of conversion of sugars to L-Lactate was 30% higher with respect to the maximum theoretical value except for arabinose in which the yield was 80% of the maximum theoretical value. This fact suggests that the pentose pathway of *B. subtilis* is inefficient under anaerobic conditions. The specific and volumetric production rates of L-Lactate were much lower in sucrose, cellobiose and arabinose compared to that obtained in either fructose or glucose. It is likely that the metabolism of disaccharides is very slow when compared to that of hexoses, as a result of a very low activity of their transporters or of their hydrolytic enzymes. As indicated previously strain ER382 is unable to ferment glycerol, starch or lactose. The *B. subtilis* genome contains all the genes necessary for the transport and metabolism of glycerol and starch; however it is possible that under anaerobic conditions such genes not expressed. In contrast, the genes encoding proteins needed for the transport and metabolism of lactose are absent in the genome of *B. subtilis*.

II. INTRODUCCIÓN

El futuro agotamiento en las reservas del petróleo y problemas ambientales, asociados con el uso de los combustibles, plantean la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías que soporten la variedad de energéticos y productos químicos que se obtienen del crudo. Estas reservas están reduciéndose a gran velocidad y tienden a desaparecer, por lo que se buscan nuevas alternativas para producir energía. Los bioenergéticos (etanol, biodiesel y biogás) son combustibles que pueden ser obtenidos de la biomasa proveniente de materia orgánica de actividades agrícolas e industriales, además de poder ser producidos por procesos tecnológicos sustentables que cumplan con las especificaciones y normas de calidad requerida para ser utilizadas como combustibles.

Después de los combustibles, los plásticos y polímeros conforman el mayor porcentaje de uso del petróleo. Estos materiales constituyen parte del problema de contaminación y permanencia en el ambiente, ya que solo un pequeño porcentaje se recicla y su velocidad de bio-degradación es extremadamente lenta (Frías y col., 2003). El desarrollo tecnológico ha llevado a la obtención de plásticos biodegradables, conocidos por su nombre genérico como polilactatos (PLA) para resolver el inconveniente ambiental y la sustitución en el uso del petróleo (Narayanan *et al.*, 2004). Debido a su uso en la manufactura de estos plásticos biodegradables de alta calidad, la demanda de lactato se está incrementando sustancialmente. La síntesis, las propiedades físicas y de biodegradación del PLA dependen de la relación usada de los enantiómeros ópticamente puros. Además, el ácido láctico es un producto muy utilizado en la industria textil, farmacéutica y alimenticia. En este campo, *B. subtilis* tiene las características genéticas que potencialmente permitirían obtener un microorganismo homoláctico: ya que en su genoma *B. subtilis* posee únicamente el gen que codifica para la enzima esteroespecífica L-lactato deshidrogenasa, produciendo el isómero L-Lactato. Por otro lado, bajo condiciones de fermentación *B. subtilis* produce una mezcla de L-Lactato y butanodiol. En la síntesis de butanodiol la primera enzima comprendida

es la acetolactato sintasa codificada por el gen *alsS*, por lo que al eliminar la formación de la enzima se evita la producción de butanodiol, obteniendo como único producto el L-Lactato (Nakano *et al.*, 1997; Cruz-Ramos *et al.*, 2000). Aunado a esto *B. subtilis* tiene la capacidad de utilizar una amplia gama de azúcares, al menos reportadas en cultivos en condiciones aeróbicas, incluyendo varias pentosas, hexosas, disacáridos y almidón, entre otros (Stülke and Hillen, 2000).

Debido a las características de *B. subtilis* mencionadas en el párrafo anterior se propone en este trabajo conocer su capacidad para utilizar diversos carbohidratos provenientes de fuentes renovables (celobiosa, arabinosa y almidón), residuos industriales (lactosa, glicerol) y azúcares refinados (glucosa, fructosa y sacarosa) en condiciones de no aireación para la formación del ácido láctico.

III. ANTECEDENTES

III.1. Producción de Lactato

La producción mundial de ácido láctico se estima mayor a 100 mil toneladas métricas por año y debido a su versatilidad química se está incrementando rápidamente (Cock y Rodríguez, 2007). El ácido láctico es un acidulante, saborizante y conservador, ampliamente utilizado en la industria alimenticia, farmacéutica y textil. Recientemente la industria de los polímeros ha dado espacio hacia la utilización del ácido láctico. Mediante la polimerización del ácido, se produce los llamados polilactatos (PLAS) para la generación de plásticos biodegradables. Las aplicaciones del PLA van desde empaques para alimentos, botellas, matriz de los medicamentos y hasta pañales. Las propiedades físicas y la velocidad de degradación de estos polímeros pueden modificarse variando la mezcla de los enantiómeros L y D-Lactato en la síntesis de éste. Por lo tanto es importante que en la obtención de los isómeros del ácido láctico sean ópticamente puros.

Actualmente el 90% de la producción de ácido láctico se consigue por fermentación (Narayanan *et al.*, 2004). A diferencia de la síntesis química (a partir de lactonitrilo), la ventaja del uso de fermentación es su carácter renovable, la baja temperatura para la producción, relativo bajo consumo de energía y principalmente la alta estéreo-especificidad del producto (Singh *et al.*, 2006). Sin embargo en la fermentación de azúcares con diferentes microorganismos se obtienen principalmente una mezcla de los isómeros o una mezcla con otros productos de fermentación.

Bacterias ácido lácticas (BAL)

En la producción del ácido láctico, las industrias tradicionalmente utilizan bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* o *Lactococcus*) las cuales utilizan sustratos como glucosa, sacarosa o almidón. Los mejores rendimientos han sido a partir de carbohidratos simples. Sin embargo los requerimientos nutricionales de estas bacterias son complejos, debido principalmente a su limitada capacidad de sintetizar algunos metabolitos como la vitamina B y aminoácidos, por lo que los medios utilizados deben complementarse con fuentes ricas en estos compuestos (Hofvendahl *et al.*, 2000).

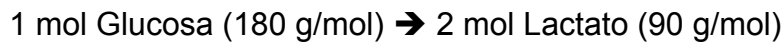
III.1.1. Ingeniería metabólica para cepas productoras de Lactato

En los últimos años el empleo de la tecnología del DNA recombinante y el análisis sistemático de datos biológicos han aumentado considerablemente, dando lugar a la ingeniería de vías metabólicas (IVM), la cual se define como la modificación y/o introducción de nuevas reacciones bioquímicas para el mejoramiento directo de propiedades celulares mediante tecnología de DNA recombinante (Stephanopoulos, 1998). Particularmente, se ha iniciado el desarrollo de nuevas cepas, mediante IVM, con la propiedad de producir uno u otro isómero de lactato. Para este propósito se han modificado cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus helveticus* y *E. coli* (Saitoh *et al.*, 2005; Nikkila *et al.*, 2000; Utrilla *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2003; Dien *et al.*, 2001)

Uno de los objetivos principales de la ingeniería metabólica en proyectos relacionados con la obtención de productos del metabolismo primario del carbono, es obtener los mayores rendimientos. Frecuentemente se hace referencia al rendimiento teórico máximo, el cual se emplea en términos de moles a partir de las relaciones estequiométricas o bien en términos másicos. De tal manera que, el rendimiento teórico máximo se puede definir como la mayor cantidad de masa (gramos) obtenida de producto por masa (gramo) de sustrato, tomando en consideración la correspondiente relación estequiométrica de la reacción. En el

caso de los microorganismos es necesario tomar en cuenta el balance las reacciones bioquímicas. En las siguientes ecuaciones se muestra el rendimiento máximo de lactato que se obtiene por gramo de glucosa:

Reacción por mol de Glucosa



Rendimiento Teórico Máximo

$$\frac{2 \text{ mol Lct}}{1 \text{ mol Glu}} \rightarrow \frac{2 \times (90 \text{ g/mol Lct})}{180 \text{ g/mol Glc}} \rightarrow 1 \text{ g Lct / gGlc}$$

Esto implica que la conversión teórica máxima de glucosa a lactato, por medio de la glucólisis, es del 100%. Para la estimación del rendimiento teórico máximo de otros azúcares, como la celobiosa, sacarosa y arabinosa, se considera la respectiva relación estequiométrica, y en estos casos en términos máximos también resulta ser de 1 g de lactato por cada gramo de azúcar.

A partir de *S. cerevisiae* se construyó una cepa que contiene seis copias del gen que codifica para la enzima L-lactato deshidrogenasa (bovina). De 200 g/L de glucosa proveniente de la fermentación del jugo de caña se obtuvo solamente un rendimiento del 61% de L-Lactato (122 g/L) debido a que simultáneamente se produjo etanol. El proceso además requiere de condiciones micro-aeróbicas y medios de cultivos complejos. La pureza óptica del lactato fue del 99.9%. (Saitoh *et al.*, 2005).

L. helveticus fue inactivado en el gen *ldhD* que codifica para la enzima D-lactato deshidrogenasa permitiendo un incremento de dos veces la concentración

del estereoisómero L-Lactato. Esto se realizó construyendo dos cepas *ldhD* negativas de *L. heveticus*. La primera fue construida por una eliminación interna en la región del promotor, previniendo la transcripción del gen *ldhD* y la segunda fue realizada por el reemplazo del gen estructural *ldhD* con una copia adicional del gen *ldhL* de la misma especie que codifica para la enzima L-lactato deshidrogenasa. La actividad de la enzima fue incrementada de un 53% y 93% respectivamente en cada cepa (Nikkila *et al.*, 2000).

E. coli tienen la capacidad natural de producir D-Lactato con una concomitante mezcla de ácidos orgánicos, por lo que algunos investigadores han construido cepas homolácticas de *E. coli*, interrumpiendo aquellas vías que compiten por la disponibilidad del carbono en el nodo de piruvato (Zhou *et al.*, 2003; Utrilla *et al.*, 2009). La cepa modificada de Zhou *et al.* (2003) produce 110 g/L de D-Lactato obteniendo más del 95% del máximo teórico, usando para esto medios minerales (Martínez *et al.*, 2007), sin la necesidad de agregar alguna otra fuente de carbono o energía (aminoácidos o vitaminas). Eliminando la síntesis de las enzimas: alcohol deshidrogenasa, fumarato reductasa y piruvato formato liasa, Utrilla *et al.* (2009) obtuvieron la cepa de *E. coli* CL3 alcanzando un rendimiento del 95% con una productividad volumétrica de 2.88 g/ l*h (Figura 1). Por otra parte se han construido cepas derivadas de *E. coli* para producir L-Lactato, integrando en su cromosoma el gen que codifica para la enzima estéreo-específica L-lactato deshidrogenasa de *Pediococcus*, con la correspondiente eliminación de las vías anteriormente mencionadas, aunado a la eliminación de la vía de producción de D-Lactato (Zhou *et al.*, 2003).

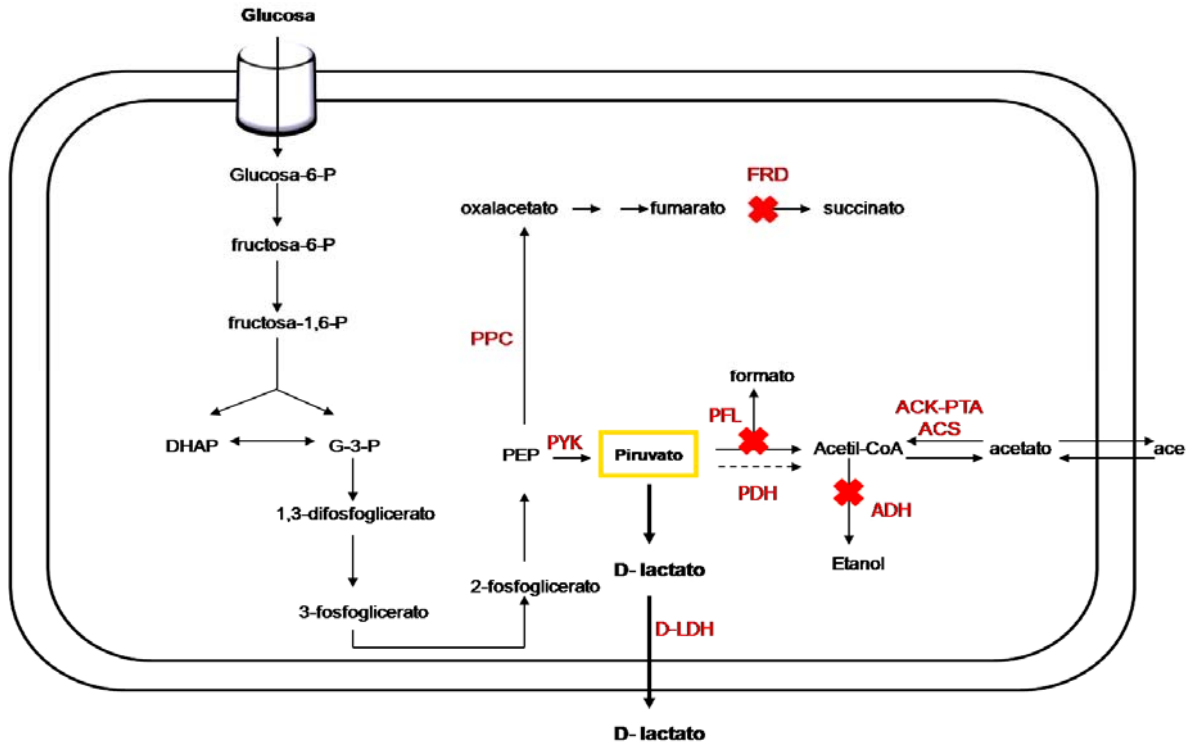


Figura 1. Metabolismo de glucosa a D-Lactato en *E. coli*. Las rutas que compiten por la disponibilidad del piruvato son marcadas por una "X", ACS, acetil-CoA sintetasa; ACK, acetato cinasa; ADH, alcohol deshidrogenasa; FRD, fumarato reductasa; D-LDH, D-lactato deshidrogenasa; PDH, piruvato deshidrogenasa; PFL, piruvato formato liasa; PPC; fosfoenolpiruvato carboxilasa; PTA, fosfotransacetilasa; PYK, piruvato cinasa; PEP, fosfoenolpiruvato; DHAP, Dihidroxiacetona-fosfato; G-3-P, gliceraldehido-3-fosfato; ace, Acetato (Utrilla *et al.*, 2009).


III.2. Catabolismo de Carbohidratos en *B. subtilis*

B. subtilis es una bacteria Gram-positiva, reconocida como GRAS (Generally-Recognized-As-Safe) para su uso en la manufactura de productos alimenticios; es capaz de degradar varios polisacáridos (Tabla 1) que se encuentran presentes en las plantas generando como resultado, oligo- di- o monosacáridos que son transportados a la célula para después ser catabolizados (Sonenshein *et al.*, 1993; Stülke & Hillen, 2000). Al menos alrededor de 18 diferentes mono o disacáridos pueden ser metabolizados por *B. subtilis* (Tabla 1) como fuente de carbono y energía (Stülke & Hillen, 2000) y eficientemente sintetiza una amplia diversidad de proteínas (principalmente enzimas), excretando muchas de ellas (Ferrari *et al.*, 1993).

La potencial excreción de celulasas y hemicelulasas es una característica importante en esta bacteria, pues permite la hidrólisis en cierto grado de residuos agroindustriales. Previamente, ha sido probado que *B. subtilis* produce algunas xilanasas (Raposo *et al.*, 2003; John *et al.*, 2006) y se han expresado genes que codifican para celulasas que *B. subtilis* puede excretar eficientemente (Ferrari *et al.*, 1993).

Estos carbohidratos son introducidos a la célula por sus transportadores específicos (sistema de la fosfotransferasa [PTS] o transportadores dependientes de ATP), fosforilados y después catabolizados hacia la vía de la glucólisis o de las pentosas fosfatos.

Tabla 1. Carbohidratos catabolizados por *B. subtilis* en aerobiosis. (Adaptado de Stülke & Hillen, 2000).

Ruta metabólica	
Glucosa Celobiosa Fructosa Glicerol Glucitol Glucosamina Maltosa Manitol Manosa Sacarosa Trehalosa N-acetil-glucosamina Oligo-β-glucósido Oligo-β-manósido β-glucósido Almidón	 Glucólisis
Inositol	Ruta metabólica especial
Arabinosa Galactosa Gluconato Ribosa Xilosa	Pentosas Fosfatos

III.2.1. Transporte y generación de monosacáridos fosforilados

El genoma de *B. subtilis* posee genes que codifican para sistemas de transporte (sistemas multiproteínicos) involucrados en la internalización de carbohidratos, dentro de ellos destacan los transportadores ABC (*por sus siglas en ingles, ATP-Binding Cassette*) y el sistema fosfoenolpiruvato:carbohidrato fosfotransferasa (PTS). Sin embargo algunos carbohidratos también pueden ser introducidos a la célula por difusión facilitada (Reizer *et al.*, 1988; Saier *et al.*, 1993; Steinmetz., 1993).

Sistema fosfoenolpiruvato:carbohidrato fosfotransferasa (PTS)

El sistema PTS es un complejo multi-enzimático, responsable de la detección, transporte y fosforilación de numerosos azúcares que funcionan como fuente de carbono. Este sistema consiste en dos componentes generales: a) la enzima I (EI) y la proteína sensible a calor (HPr); y b) varias enzimas azúcar-específicas del tipo II (EII) (Figura. 2). El fosfato es transferido del fosfoenolpiruvato (PEP) vía EI, HPr y EII al azúcar.

Los genes *ptsI* y *ptsH* codifican para EI y HPr, respectivamente, y se encuentran organizados formando el operón *ptsHI* (Kunst *et al.*, 1998). La expresión del operón es constitutiva, esta condición refleja dos circunstancias: la necesidad del sistema multi-enzimático para la utilización de una amplia variedad de azúcares y la intervención de las enzimas en muchos procesos de regulación (Reizer *et al.*, 1988; Saier *et al.*, 1993). La proteína HPr de las bacterias Gram-positivas tiene dos sitios de fosforilación. El residuo amino-acídico His-15 de HPr es fosforilado vía PEP para la internalización del azúcar a la célula, mientras que el residuo Ser-46 dependiente de ATP regulado por la enzima HPr cinasa tiene la finalidad exclusivamente de procesos regulatorios (Reizer *et al.*, 1988; Saier *et al.*, 1993, Reizer *et al.*, 1999).

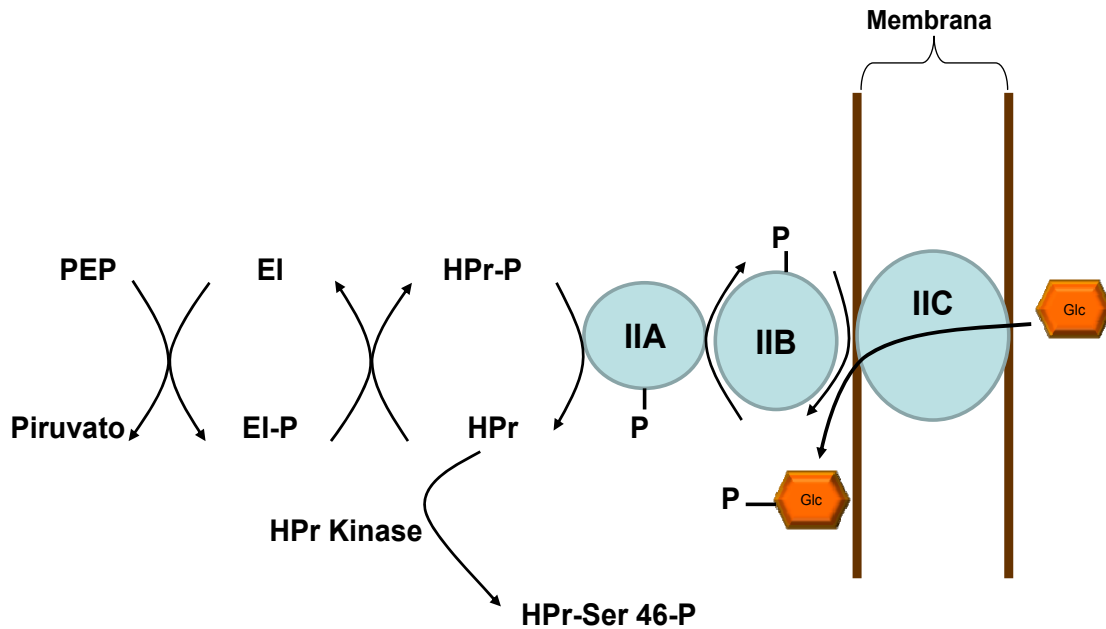


Figura 2. Sistema de la Fosfoenolpiruvato (PEP): glucosa fosfotransferasa de *B. subtilis* (PTS). La internalización del carbohidrato y fosforilación comienza con la transferencia del fosfato del PEP vía enzima I (EI), enzima sensible a calor (Hpr) y finalmente enzimas II (IIA, IIB y IIC). Glc, Glucosa; Glc-P, glucosa-6-fosfato (Stülke & Hillen, 2000; Reizer *et al.*, 1988).

La proteína HPr no solamente fosforila el sistema enzimático II (EII), también interviene en modificar los reguladores transcripcionales para la modulación de sus actividades (Stülke & Hillen, 2000; Reizer *et al.*, 1988). Los reguladores transcripcionales modificados por la proteína HPr, poseen un dominio duplicado, llamado “dominio de regulación PTS” (PRD, “PTS Regulation Domain”). La fosforilación está involucrada en la inducción o represión catabólica de los operones (Stülke & Hillen, 2000, Reizer *et al.*, 1999).

III.2.2. Fuentes de materia prima utilizadas por *B. subtilis* en la producción de ácido láctico

B. subtilis utiliza bajo condiciones aerobias diversas fuentes de carbono, dentro de los cuales se encuentran hexosas, pentosas, disacáridos y polisacáridos; en la siguiente sección se detalla la genética y la vía utilizada en el catabolismo de estos carbohidratos

III.2.2.a Almidón

La amilopectina y la amilosa son los dos polímeros de glucosa que constituyen la estructura química del almidón, estos se encuentran confinados dentro de un gránulo semi-cristalino en el endospermo del grano (Serna, 1996). El almidón en la industria se utiliza en su forma natural, pero en mayor medida en sus diversas formas modificadas, como es el caso de los jarabes de maltodextrina, glucosa, fructosa.

El procesamiento del almidón requiere de hidrólisis de sus polímeros, mediante procesos químicos o enzimáticos. Industrialmente la ruptura de la estructura cristalina de los polímeros requiere de varias enzimas (α -amilasa, β -amilasa, pululanasa, amiloglucosidasa). La α -amilasa es la primera enzima utilizada en el proceso de depolimerización del almidón hacia maltodextrinas (licuefacción) (Serna, 1996). Después del almidón, el factor que más incide en el costo de la producción de la glucosa es la obtención de la α -amilasa, representando un cuarto del costo total (Crabb & Mitchinson, 1997).

Las plantas producen grandes cantidades de polisacáridos que pueden servir como sustratos de bacterias. *B. subtilis* secreta diversas enzimas que depolimerizan nutrientes complejos (glucanasas, proteasas y nucleasas). Dentro de las enzimas que degradan polisacáridos compuestos de glucosa se encuentran la α -amilasa (*amyE*), β -1,4-glucanasa (codificada por *egIsS*) y β -1,3-1,4-glucanasa (codificada por *bgIS*) (Kunst *et al.*, 1998; Stülke & Hillen, 2000).

III.2.2.b Azúcares Convencionales: Sacarosa, Glucosa y Fructosa

Sacarosa, este disacárido está formado por una unidad de glucosa y otra de fructosa. La sacarosa se encuentra libre en la naturaleza y se obtiene principalmente de la caña de azúcar que contiene de 15 - 20% del disacárido, esto se traduce en un 60% de la producción mundial.

B. subtilis utiliza dos sistemas para transportar y utilizar sacarosa. El primero involucra el transporte y fosforilación del azúcar (Figura 3) por medio de una PTS-permeasa específica (enzima II^{sac}) e hidrólisis del compuesto intracelular sacarosa-6-fosfato por la enzima fosfosacarasa (sacarosa-6-fosfato hidrolasa). Los genes *sacP* y *sacA* que codifican para la permeasa y la hidrolasa respectivamente, se encuentran organizados en un operón (Figura 4b).

Más que catabolismo, el segundo sistema tiene una función anabólica (Figura 3). Éste se encuentra conformado por la enzima extracelular levansacarasa (codificada por el gen *sacB*, Lvs; Figura 4a) que conlleva dos reacciones: a) hidrólisis de sacarosa; y b) la transferencia del radical fructosil hacia el aceptor, para la síntesis del polímero levano. La glucosa obtenida de la hidrólisis se internaliza por su permeasa (codificada por *ptsG*) y el polímero es hidrolizado por otra enzima extracelular levanasa (*sacC*) a fructosa.

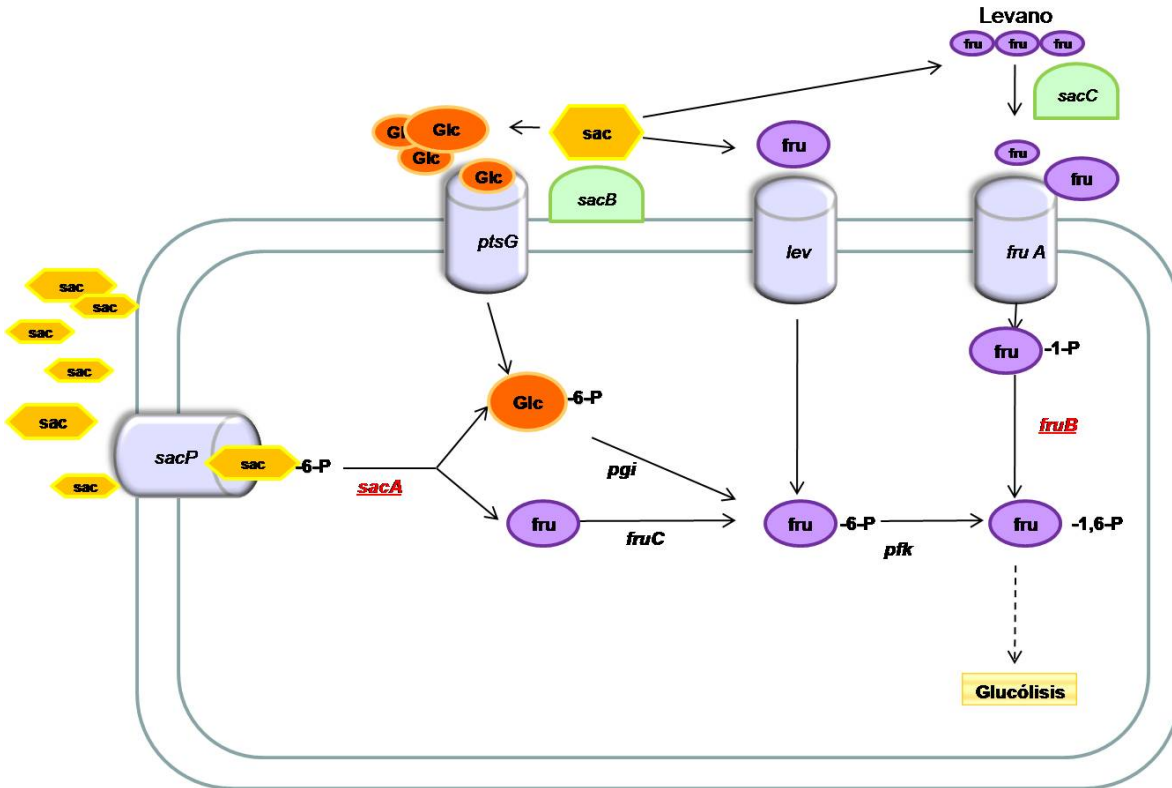


Figura 3. Catabolismo de glucosa, fructosa y sacarosa en *B. subtilis*. El transporte y los pasos enzimáticos son simbolizados por flechas. Los genes que codifican para las permeasas (*lev* = *levD*, *levE*, *levF* y *levG*) y proteínas (constitutivos, inducibles [subrayados]) del metabolismo catabólico son mostrados en cursiva. La transfructosilación de sacarosa por la enzima extracelular levansacarasa (*sacB*) resulta principalmente en una mezcla de glucosa, fructosa y el polímero de levano. El gen *sacC* codifica para la levanasasa que hidroliza el polímero de fructosa. *sacP*, PTS-permeasa (enzima II^{sac}); *fruA*, PTS-permeasa (enzima II^{fru}); *ptsG*, PTS-permeasa (enzima II^{glc}); *sacA*, fosfosacarasa; *fruB*, fructosa-1-fosfato cinasa; *fruC*, fructocinasa; *pgi*, fosfoglucoisomerasa; *pfk*, fosfofructo cinasa. Glc, glucosa; sac, sacarosa; fru, fructosa; glc-6-P, glucosa-6-fosfato; fru-6-P, fructosa-6-fosfato; fru-1-P, fructosa-1-fosfato; fru-1,6-P, fructosa-1-6-fosfato (Steinmetz, 1993).

La presencia de sacarosa en el medio regula la transcripción de los genes involucrados en la regulación, internalización y metabolismo del carbohidrato (*sacB*, *sacPA*, *sacXY* y *sacT*). En aerobiosis la regulación de estos genes se encuentra controlada por un grupo de elementos como se muestra en la Figura 4. Las proteínas responsables para la inducción del gen *sacB* y el operón *sacPA* son codificadas por el operón *sacXY* y el gen *sacT* respectivamente. Las proteínas SacT y SacY son reguladores positivos, no se unen directamente al metabolito inductor, actúan vía anti-terminación de los genes que controlan. En ausencia del inductor, SacX (permeasa homologa a SacP) fosforila a SacY e inhibe la

transcripción. Por otro lado, se desconoce la manera en que SacT es fosforilado o de-fosforilado y si SacP actúa como la cinasa homóloga a SacX. La concentración externa para la máxima expresión de estos genes son diferentes: a concentraciones de 1 mM de sacarosa el operón *sacPA* es completamente inducido, mientras que es reprimido a altas concentraciones del mismo disacárido; por otro lado la inducción de *sacB* se lleva a cabo a una concentración de 30 mM, la cual se encuentra muy relacionada con la *Km* de la enzima Lvs (Steinmetz, 1993).

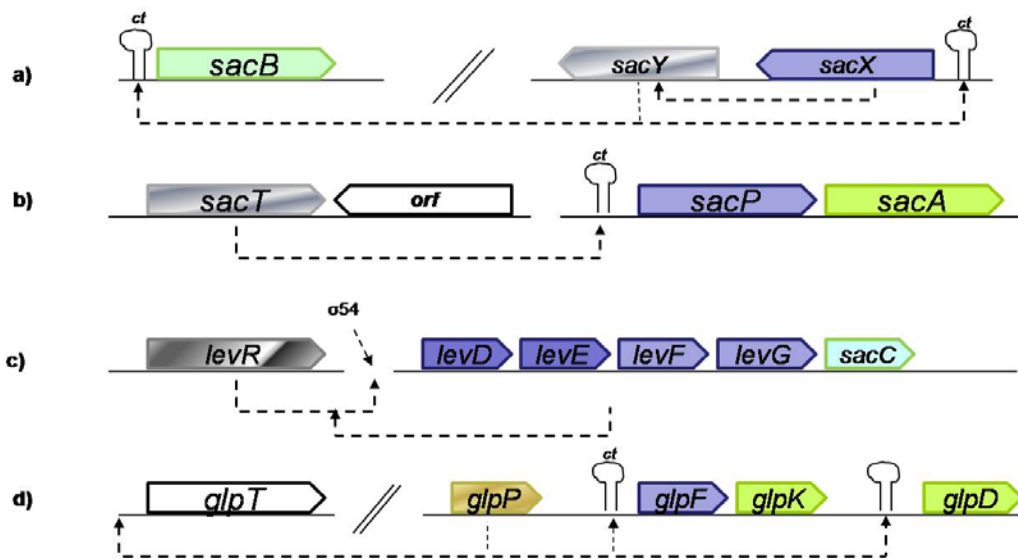


Figura 4. Regulones de *B. subtilis* dependientes de antiterminadores y/o control PTS. Los primeros dos sistemas (a,b) involucran elementos estructurales y funcionales homólogos: antiterminadores, terminadores condicionales (ct) y enzimas II. (a) El regulón *sacB* (Lvs). Este regulón comprende el operón regulador *sacXY* y el gen no contiguo *sacB*. La regulación de la transcripción parece estar controlada por una cascada de regulaciones; en ausencia del inductor la transcripción del operón y del gen *sacB* es prevenida por dos terminadores condicionales. En esta condición la función de SacY es inhibida por la fosforilación del producto del gen *sacX* (enzima II^{sac} putativa). La presencia de sacarosa en el medio resulta en su transportación (enzima II^{sac}) y fosforilación, esta acción permite la de-fosforilación del antiterminador SacY y en consecuencia la transcripción de *sacB* que codifica para la levansacarasa. (b) Operón *sacPA*. La transcripción de este operón se encuentra regulada positivamente por sacarosa y el antiterminador SacT (codificada por el gen *sacT*). (c) Operón levanasa. Los primeros cuatro genes codifican para la enzima II^{fruc} los cuales son regulados positivamente por el producto del gen *levR*. (d) Regulón de glicerol. Este regulón comprende al menos dos grupos de genes no contiguos que son regulados por la proteína GlpP (codificado por *glpP*). La función del regulador tiene un comportamiento similar a un antiterminador, permitiendo la transcripción del gene *glpD* y del operón *glpFK* (Steinmetz, 1993; Débarbouillé *et al.*, 1990; Débarbouillé *et al.*, 1991; Cruz *et al.*, 1990).

Glucosa, se encuentra en las frutas y en la miel. La glucosa comercial se obtiene por hidrólisis de almidón o fécula de granos, realizada por vía ácida o enzimática. Se utiliza en la industria alimentaria, en cervecería, como fuente de carbono para procesos microbiológicos y en farmacia. Ésta es la fuente de carbono y energía preferida por *B. subtilis*. El transporte y fosforilación es vía EII del sistema PTS codificado por el gen *ptsG*, pero no es el único, al menos existen dos transportadores más dependientes de este sistema.

Fructosa o levulosa, se encuentra en abundancia en las frutas azucaradas y en la miel, mezclada con glucosa; se obtiene industrialmente a partir de la glucosa comercial (por ejemplo, jarabe de maíz glucosado), de la sacarosa o por hidrólisis de la inulina extraída de las raíces tuberosas de la dalia, de la aguaturma (pataca) o de agaves. *B. subtilis* utiliza dos rutas (Figura 3) para la asimilación del carbohidrato. La primera constituida por una PTS-permeasa (*fruA*) fosforilando la fructosa, esta parece ser la mejor ruta de entrada de la fuente de carbono. Los genes del metabolismo son inducidos por fructosa. El operón *levDEFG* (Figura 4c) compone la segunda PTS-permeasa responsable de la entrada de la fructosa; el producto intracelular, fructosa-6-fosfato puede metabolizarse vía enzimas constitutivas involucradas en diversas rutas metabólicas (Steinmetz, 1993; Stülke & Hillen, 2000).

III.2.2.c. Carbohidratos provenientes de los residuos lignocelulósicos

Residuos Agroindustriales

Los residuos agroindustriales constituyen una fuente renovable, de gran abundancia y bajo costo, que potencialmente pueden ser utilizados como materia prima para la fabricación de productos químicos de gran volumen. Entre estos se encuentran el bagazo de caña de azúcar, la cascarilla de arroz, el rastrojo u olote de maíz, los pastos de crecimiento rápido, los desechos de madererías (viruta y aserrín), maderas suaves y duras, papel de desecho de oficinas, etc. Estos materiales son altamente heterogéneos y están compuestos principalmente por

hemicelulosa, celulosa, lignina y pectinas (Figura 5), los cuales para su bioconversión requieren ser hidrolizados en azúcares solubles, utilizando métodos químicos (hidrólisis con ácidos minerales) y/o enzimáticos.

La celulosa el mayor componente de la lignocelulosa, es un polímero lineal unido por enlaces glucosídicos $\beta(1-4)$. La hemicelulosa es un heteropolímero complejo y ramificado, compuesto de hexosas (D-glucosa, D-galactosa, D-manosa), pentosas (D-xilosa, L-arabinosa) y ácidos urónicos (Martínez *et al.*, 2001). La lignina es un polímero aromático que contiene residuos fenólicos (van Maris *et al.*, 2006).

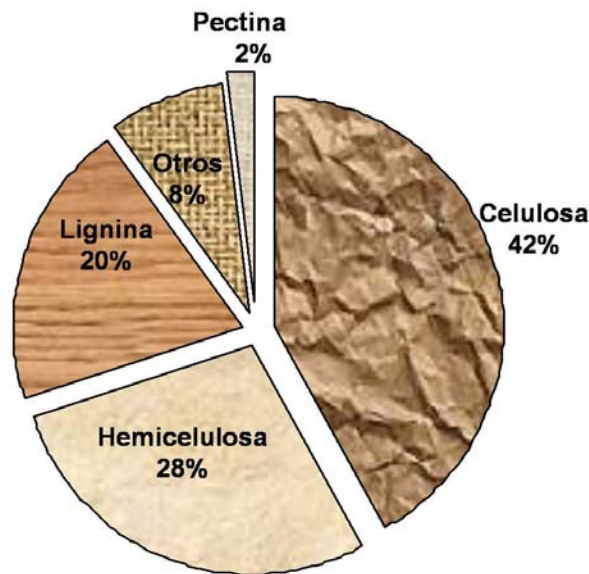


Figura 5. Composición de la Lignocelulosa del bagazo de caña
(Martínez *et al.*, 2006).

Sacarificación de los residuos agroindustriales

La biomasa de los residuos agroindustriales requiere tratamientos previos de hidrólisis para obtener los monosacáridos que puedan ser fermentados por los microorganismos. Usualmente la hidrólisis de la fracción celulósica es enzimática, utilizando celulasas de *Trichoderma reesei* bajo condiciones de pH 5.0-5.5

(obteniendo disacáridos como la celobiosa), mientras que para la fracción hemicelulósica es recomendable llevar a cabo una hidrólisis termo-química para generar jarabes que contengan los monosacáridos de esta fracción (Ingram *et al.*, 1999; van Maris *et al.*, 2006).

La mayoría de los microorganismos utilizan glucosa para llevar a cabo sus actividades metabólicas. Por otro lado es restringida la variedad de microorganismos que metabolizan pentosas y otras hexosas diferentes a la glucosa, más aún no existen microorganismos que puedan fermentar eficientemente xilosa, arabinosa o una mezcla de ellos, a productos de alto valor agregado como lactato (Ingram *et al.*, 1999; Dien *et al.*, 2003; van Maris *et al.*, 2006).

Genética y Vías metabólicas (celobiosa, arabinosa)

Celobiosa. El operón *celRABCD* que codifica para la permeasa (EII) y la fosfo- β -glucosidasa (enzima que hidroliza el disacárido) se encuentra en el genoma de *B. subtilis*.

Arabinosa. La bacteria puede utilizar L-arabinosa como única fuente de carbono y energía (Figura 6c) mediante su conversión en D-xilulosa-5-fosfato, intermediario de la vía de las pentosas fosfato. Para ello se requieren de tres enzimas intracelulares: L-arabinosa isomerasa, L-ribulosa cinasa y L-ribulosa-5-fosfato-4-epimerasa, codificados por los genes *araA*, *araB* y *araD* respectivamente. El operón *ara* contiene seis genes más además de los antes descritos, llamados *araL*, *araM*, *araN*, *araP*, *araQ*, y *abfA* (Sá-Nogueira *et al.*, 1997). El análisis de la secuencia del operón *araABDLMNPQ-abfA* (Figura 6b) muestra que los productos de los genes *araN*, *araP* y *araQ* son homólogos a los componentes de un sistema de transportadores y el gen *abfA* probablemente codifica para la α -L-arabinofuranosidasa, mediante la construcción de mutantes en estos genes se demostró que no son esenciales para la utilización de L-arabinosa (Sá-Nogueira *et al.*, 1997).

El locus *araR* de *B. subtilis* (Figura 6a) comprende dos genes con promotores divergentes; el gen regulador *araR* que codifica para una proteína represora y el gen llamado *araE* análogo al gen que codifica para la L-arabinosa permeasa de *E. coli* (Sá-Nogueira & Mota, 1997). La proteína AraR regula la transcripción del gen *araE*, así como su propia transcripción, característico de los genes que se transcriben divergentemente; así mismo, regula la transcripción del operon *ara*, cada uno de ellos contiene dos operadores a los cuales se une la proteína represora, indicativo de la formación de un lazo del DNA y reprimiendo la transcripción del operón. La expresión de ambos operones es inducida por arabinosa y reprimida por glucosa (Sá-Nogueira & Ramos, 1997).

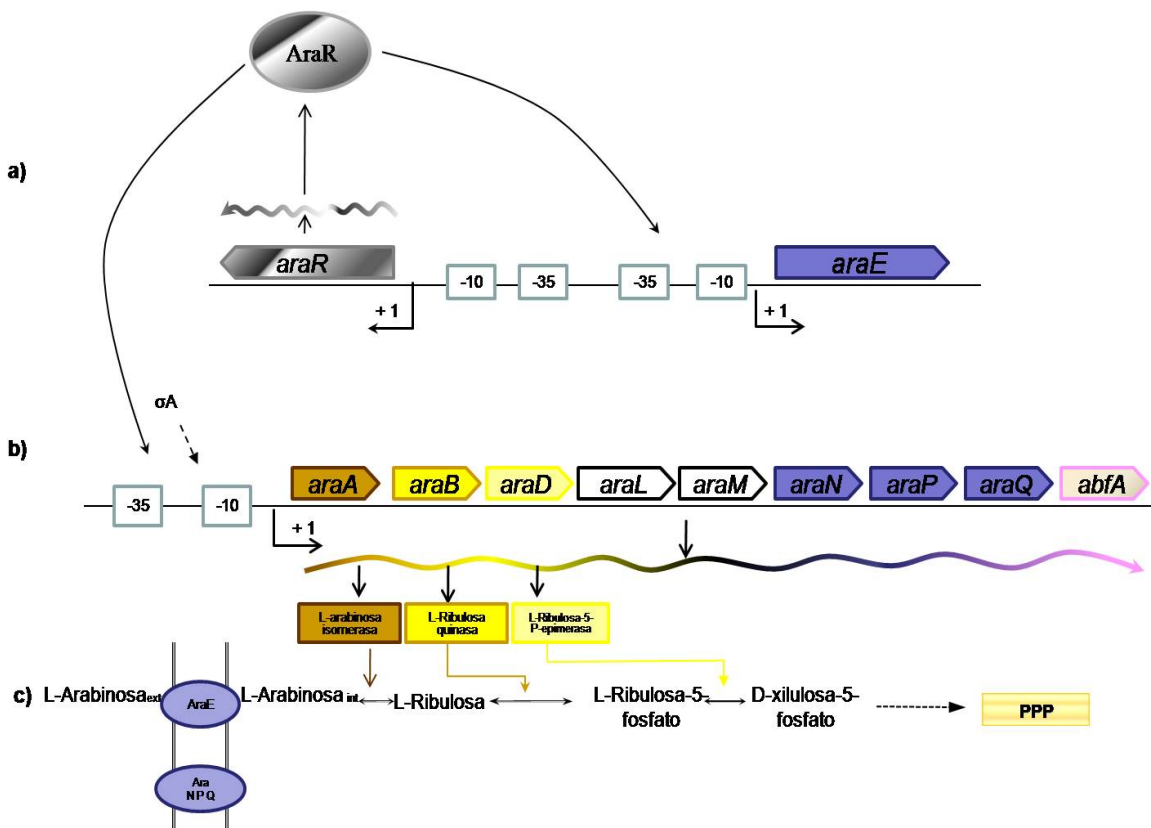


Figura 6. Catabolismo de L-arabinosa en *B. subtilis*. Las flechas largas indican la acción del represor AraR a los promotores del operón *araABDLMNPQ-abfA* y del gen *araE* respectivamente. a) Operón *araR*. Regulador negativo *araR* y gen *araE* que codifica para una permeasa. b) Operón *ara*. La expresión del operón es fuertemente dirigida por σ^A , los rectángulos representan las enzimas que intervienen en el catabolismo de arabinosa. c) Metabolismo de L-arabinosa. PPP, ruta de las pentosas fosfato (Sá-Nogueira & Ramos, 1997; Krispin et al., 1998).

B. subtilis no es capaz de crecer cuando se encuentra presente xilosa y galactosa como únicas fuentes de carbono, atribuido a una falta de transportadores, pues contiene los genes necesarios para metabolizar estos azúcares. Sin embargo se han generado mutantes que permitan utilizar estos carbohidratos, haciendo constitutiva la expresión del gen *araE*, el cual codifica para una permeasa no específica (simporte H⁺:pentosa) (Sá-Nogueira & Ramos, 1997; Krispin *et al.*, 1998)

III.2.2.d Lactosa

Industria Láctea

Desde hace más de dos décadas la producción de la industria láctea tiene como contrapartida un derivado altamente contaminante (30,000 – 50,000 mg/L DBO): el lactosuero, un líquido que se separa de la leche cuando ésta se coagula para la obtención del queso. Este subproducto, que generalmente se desecha, contiene un poco más del 25% de las proteínas de la leche, cerca del 8% de la materia grasa y aproximadamente el 95% de lactosa (azúcar de la leche) (CONAGUA, 2008; Valencia y Ramírez, 2009).

El lactosuero (dulce y medio ácido) producido en México es cercano a 1 millón de toneladas y contiene 50 mil toneladas de lactosa y 5 mil toneladas de proteína. A pesar de esta riqueza nutricional, potencialmente utilizable, casi la mitad (Carrillo, 2002) del lactosuero es descargado al drenaje y llega a ríos y suelos, causando un problema serio de contaminación. Las proteínas y la lactosa se transforman en contaminantes cuando el líquido es arrojado al ambiente sin ningún tipo de tratamiento, debido a que la carga de materia orgánica que contiene permite la reproducción de microorganismos (Valencia y Ramírez, 2009).

Desde el punto de vista tecnológico, una gama de productos de alto valor agregado se pueden obtener del lactosuero dulce. La lactosa del suero directamente o separada de este, puede ser usada como fuente de carbono en

procesos fermentativos para la obtención de ácido láctico. Es más, para las bacterias lácticas u otras bacterias Gram-positivas o Gram-negativas el lactosuero con un manejo adecuado llega a constituir *per se* un medio de cultivo completo (Carrillo, 2002; Valencia y Ramírez, 2009).

B. subtilis posee el gen *lacA* que codifica para la enzima β -galactosidasa para metabolizar la lactosa; sin embargo al parecer en su genoma no se encuentra un gen que codifique para el transportador específico de este disacárido (Stülke & Hillen, 2000).

III.2.2.e. Glicerol

Actualmente existe una gran tendencia a producir biodiesel a partir de triglicéridos. Las fuentes agropecuarias para la obtención de biodiesel, pueden ser la *Jatropha*; higuera; aceites de desperdicio de restaurantes; cuando la producción agrícola lo permite, de granos oleaginosos o bien en nuevos procesos a partir de microalgas oleaginosas. Un subproducto en la producción de biodiesel es el glicerol, este puede ser aprovechado como fuente de carbono para la obtención de un producto de valor agregado.

El 1,2-propanodiol es un producto obtenido de la fermentación del glicerol y pocos miembros de la familia de las *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*) pueden metabolizarlo; sin embargo recientemente se ha descubierto que *E. coli* puede catabolizar glicerol hacia 1,2-propanodiol (González *et al.* 2008) y potencialmente puede ser metabolizado a piruvato. A partir de este metabolito se pueden obtener una amplia variedad de productos de fermentación, incluyendo el lactato.

En *B. subtilis* el glicerol es catabolizado mediante una vía inducible, involucra la internalización de la fuente de carbono a la célula por una proteína facilitadora (codificada por *glpF*; Figura 4), fosforilación (*glpK*) y deshidrogenación



(*glpD*), lo cual permite que el intermediario dihidroxiacetona fosfato entre a la vía de la glucólisis. Intracelularmente el inductor, es el metabolito glicerol-3-fosfato. Los genes que intervienen en el catabolismo del glicerol al menos se encuentran en dos *locus* del genoma de *B. subtilis*. (Figura 4d) El gen *glpT* (permeasa) no se encuentra ligado al operón *glpPFKD*.

III.3. Metabolismo Fermentativo de *B. subtilis*

Hasta la década pasada se consideraba que *B. subtilis* era un microorganismo aerobio estricto, pero se ha demostrado que en condiciones no aireadas también puede crecer (Figura 7), ya sea por respiración anaerobia (sin oxígeno utilizando como aceptor de electrones nitratos, nitritos o NH_4) (Cruz-Ramos *et al.*, 2000; Espinosa de los Monteros *et al.*, 2001) o por fermentación (Nakano *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 2000; Cruz-Ramos *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2007). La dirección entre la respiración anaerobia y la fermentación depende de una cascada de regulación a nivel de la transcripción sujeto a la presencia o ausencia de nitrato/nitrito, piruvato u otro aceptor de electrones (Figura 8). Se han identificado dos sistemas de regulación. El primero, la proteína reguladora Fnr (regulación redox) que actúa directa o indirectamente en la expresión de diversas enzimas involucradas en las vías anaerobias mediante la unión al DNA y segundo ResD-ResE, proteínas involucradas en el sistema de dos componentes, codificadas por los dos últimos genes del operón *resABCDE* (Nakano *et al.*, 1997; Cruz-Ramos *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2000).

La valoración del potencial metabólico de *B. subtilis* fermentando glucosa y respirando anaerobiamente (nitratos como aceptor de electrones) fue estudiada por Espinosa de los Monteros *et al.* (2001), concluyendo que tiene una elevada capacidad para metabolizar glucosa bajo respiración anaerobia, ya que su velocidad de crecimiento no disminuye drásticamente, tan solo un 50% ($\mu=0.72 \text{ h}^{-1}$) en comparación a las condiciones aerobias ($\mu=1.42 \text{ h}^{-1}$)

Por su parte, Hernández-Busto (2003) observó que si no existe un aceptor final de electrones en medio mineral suplementado con glucosa, la velocidad específica de crecimiento es muy baja ($\mu=0.04 \text{ h}^{-1}$). En este sentido, Nakano *et al.* (1997) y Cruz-Ramos *et al.* (2000) demostraron que *B. subtilis* mejora su velocidad de crecimiento en anaerobiosis si además de glucosa se adiciona piruvato. Nakano *et al.* (1997) sugiere que la cantidad de piruvato acumulado por la vía glucolítica es insuficiente para el funcionamiento de algunas enzimas o para inducir la expresión de algunos genes involucrados en el catabolismo del piruvato.

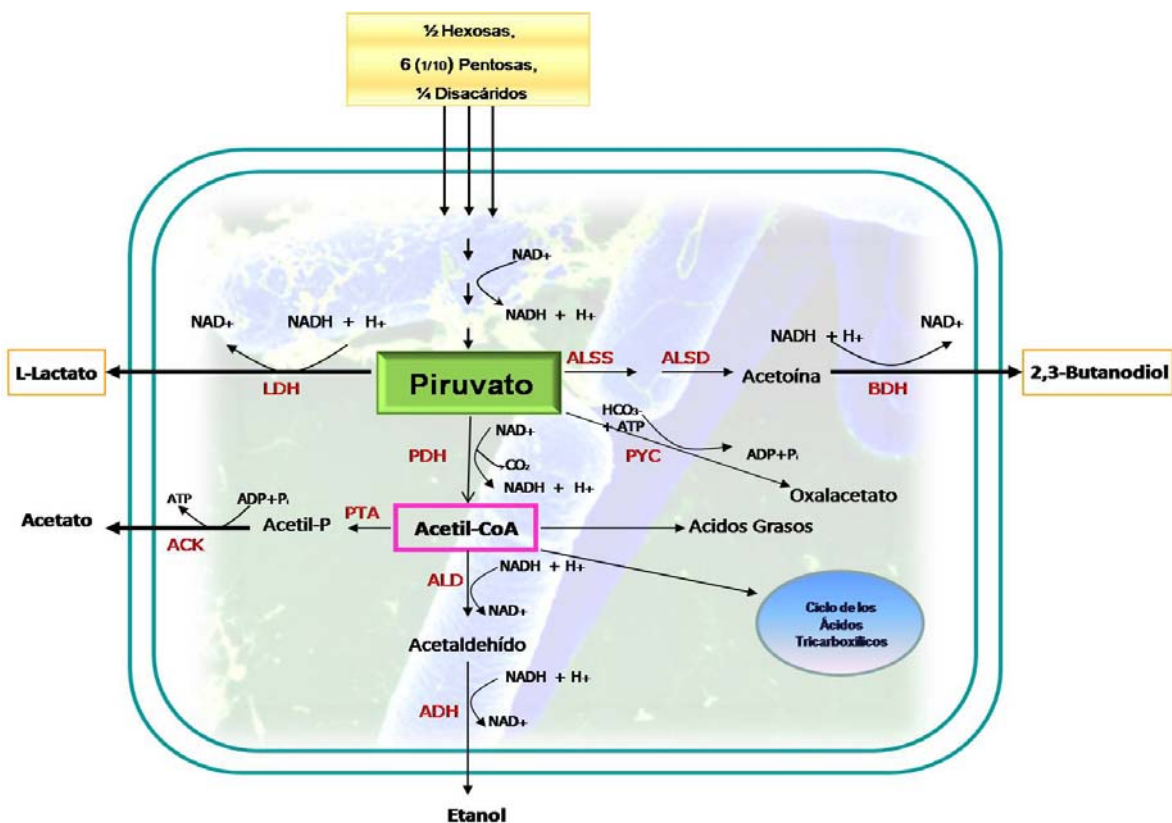


Figura 7. Metabolismo fermentativo de *B. subtilis*. Las abreviaturas en mayúsculas son las enzimas que catalizan las reacciones mostradas. LDH, lactato deshidrogenasa; ALSS, acetolactato sintasa; ALSD, acetolactato deshidrogenasa; BDH, butanodiol deshidrogenasa; PDH, piruvato deshidrogenasa; PTA, fosfotrasacetilasa; ACK, acetato cinasa; ALD, acetaldehído deshidrogenasa; ADH, alcohol deshidrogenasa; PYC, piruvato carboxilasa (Nakano *et al.*, 1997; Cruz-Ramos *et al.*, 2000).

El piruvato en condiciones aerobias es dirigido hacia la formación de acetil-CoA mediante la catálisis del complejo multienzimático de la piruvato

deshidrogenasa (PDH) (Figura 7). Se sabe que en anaerobiosis la enzima PDH no se expresa fuertemente, por lo tanto con la finalidad de conocer si este complejo enzimático se ve involucrado en la velocidad de crecimiento en condiciones no aireadas, Nakano *et al.* (1997) utilizó a *B. subtilis* (*ace*; Freese & Fortnagel, 1969), mutante en la primera enzima (E1) del complejo, observando una disminución en la velocidad de crecimiento en medio mineral. Sorpresivamente la adición de piruvato incrementa la expresión del operón *pdhABCD* (Ye *et al.*, 2000), que codifica para el complejo enzimático PDH en especial para los primeros dos genes *pdhA* y *pdhB* que se encuentran reprimidos en anaerobiosis. Estos genes codifican para la primera enzima (E1) del complejo que cataliza la transferencia del grupo acetil, paso limitante de la reacción de piruvato a acetil-CoA. El intermediario acetil-CoA, con un alto contenido energético ($\Delta G = -31.4$ KJ/mol), es destinado hacia rutas anabólicas (síntesis de lípidos, proteínas) para la formación de la membrana; lo que explicaría el resultado observado por Nakano *et al.* (1997) y Cruz-Ramos *et al.* (2000) con respecto al incremento en la velocidad de crecimiento al adicionar piruvato al medio mineral.

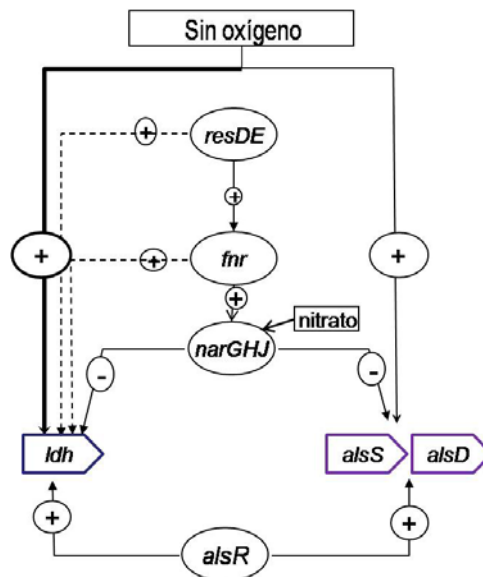


Figura 8. Modelo de regulación del operón *alsSD* y del gen *ldh* en condiciones no aireadas. La flecha con mayor intensidad indica que en anaerobiosis el gen se expresa fuertemente, las flechas intermitentes muestran una regulación parcial. Los signos de más y menos señala el tipo de regulación; inducción (+), represión (-) (Cruz-Ramos *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2000).

El nivel de expresión de los genes en condiciones de no aireación con y sin aceptor de electrones ha sido objetivo de estudio (Ye *et al.*, 2000; Marino *et al.*, 2000; Clements *et al.*, 2002), así como el comportamiento del flujo de piruvato en condiciones fermentativas (Nakano *et al.*, 1997; Cruz-Ramos *et al.*, 2000). El gen *ldh*, que codifica para la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), es reprimido parcialmente por el aceptor de electrones (nitrato/nitrito o piruvato) e inducido fuertemente en condiciones de fermentación (Ye *et al.*, 2000); esta reacción conduce el poder de oxido-reducción de la célula regenerando el cofactor NAD^+ (Figura 7) (Cruz-Ramos *et al.*, 2000).

B. subtilis cuenta con 4 vías en las que el piruvato es utilizado como sustrato en la síntesis de otros productos (Figura 7). Nakano *et al.* (1997), Espinosa de los Monteros *et al.* (2001) y Cruz-Ramos *et al.* (2000) coinciden en que los productos que se forman bajo respiración anaerobia son principalmente acetato y acetoína, mientras que los productos formados por fermentación de glucosa o con limitación de nitratos son preferencialmente lactato, butanodiol y trazas de etanol.

La formación de etanol involucra la intervención de tres enzimas (Figura 7). Primero la PDH cataliza la formación de Acetil-CoA con la concomitante producción de un mol de NADH. Posteriormente un mol de Acetil-CoA es utilizado por las enzimas acetaldehído deshidrogenasa (ALD), seguido de la alcohol deshidrogenasa (ADH) hacia la formación de un mol de etanol con la correspondiente formación de 2 moles de NAD^+ . Cabe aclarar que por cada mol de piruvato formado a partir de medio mol de glucosa se produce un mol de NADH. Las reacciones estarían balanceadas para su producción a partir de glucosa; sin embargo no produce este alcohol (Cruz-Ramos *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2007) o se han detectado trazas en condiciones de fermentación (Nakano *et al.*, 1997).



El gen *ldh* es inducido en la fase exponencial y su expresión es regulada por factores ambientales (oxígeno, nitratos/nitritos, piruvato), aunado a los sistemas de regulación (Fnr, ResDE y AlsR) (Nakano *et al.*, 1997; Cruz-Ramos *et al.*, 2000; Renna *et al.*; 1993) (Figura 8). La eliminación del gen codificante para la enzima LDH, genera una cepa no productora de lactato; aunque no esperado, también se obtiene un decremento en la formación de acetato y 2,3-butanodiol, productos de otras vías; afectando el crecimiento celular, independientemente de que exista aceptor de electrones o no. (Nakano *et al.*, 1997; Cruz-Ramos *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2007).

El operón *alsSD* codifica para la acetolactato sintasa y descarboxilasa, enzimas involucradas en la vía del 2,3-butanodiol. No todas las enzimas que potencialmente son funcionales en condiciones de fermentación en *B. subtilis* son cruciales para su crecimiento, entre estas están la acetolactato sintasa y descarboxilasa (ALSS, ALSD) pues cuando es eliminada la vía del butanodiol no se afecta la velocidad de crecimiento (Cruz-Ramos *et al.*, 2000).

B. subtilis puede producir el isómero L-Lactato en condiciones de fermentación, pues la enzima L-lactato deshidrogenasa (LDH) que tiene es esteroespecífica para la reacción de piruvato hacia L-Lactato (Figura 7) y al parecer no tiene otra lactato deshidrogenasa. La LDH de *B. subtilis* posee una de las más altas actividades enzimáticas entre las bacterias gram-positivas ($A_{spe} = 11 \times 10^3$ U/mg) (Garvie, 1980), lo que podría favorecer una alta productividad de L-Lactato.

IV JUSTIFICACIÓN

B. subtilis es un microorganismo cuyas características fisiológicas en condiciones de fermentación han sido poco documentadas, particularmente la utilización de diferentes carbohidratos bajo un ambiente no-aireado. Además se sabe que en estas condiciones *B. subtilis* produce mayoritariamente butanodiol y L-Lactato; potencialmente puede modificarse para obtener como producto único L-Lactato, el cual puede ser utilizado en la producción de PLA. Por lo que este trabajo se enfocó al desarrollo de cepas homolácticas de *B. subtilis* y su evaluación en condiciones de fermentación para valorar el aprovechamiento de carbohidratos presentes en: residuos lignocelulósicos (arabinosa, glucosa y celobiosa), lácteos (lactosa), subproducto del biodiesel (glicerol) (materias primas baratas y disponibles en gran volumen); así como la utilización de sacarosa, almidón y fructosa

V HIPÓTESIS

- Se propone *B. subtilis* en condiciones sin aireación podrá metabolizar diferentes fuentes de carbono y aunado a la inactivación del gen *alsS* que codifica para la enzima acetolactato sintasa de dicho microorganismo, permitirá generar una cepa homoláctica con la capacidad de formar L-Lactato ópticamente puro.

VI OBJETIVOS

VI.1. Objetivo General

- Generar una cepa homoláctica de *B. subtilis* inactivando el gen *alsS* que codifica para la enzima acetolactato sintasa y evaluar la formación de L-lactato en diferentes fuentes de carbono.

VI.2. Objetivos Particulares

- Generar una cepa derivada de *B. subtilis* 168 trp^+ con interrupción en el gene que codifica para la acetolactato sintasa (168 $\Delta alsS$)
- Caracterizar la cepa 168 $\Delta alsS$ en medio Luria con 10 g/L de glucosa bajo condiciones no aireadas.
- Determinar si la cepa de *B. subtilis* $\Delta alsS$ puede metabolizar bajo condiciones no aireadas las siguientes fuentes de carbono: fructosa, sacarosa, celobiosa, arabinosa, glicerol, almidón y lactosa.



VII MATERIALES Y METODOS

VII.1. CEPAS Y PLÁSMIDOS

Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo

Cepas o plásmidos	Características	Fuente
Cepas		
<i>E. coli</i> XL1Blue	Tc ^r . Cepa transformable a altas eficiencias y deficiente en recombinación. Se utiliza para propagar a gran escala plásmidos, fagos filamentosos y fagémidos.	Ceparío del laboratorio
<i>E. coli</i> XL1Blue /pJet-Spt	Contiene el gen de resistencia a Espectinomicina flanqueado por los sitios loxP clonado en el plásmido pJet 1.2.	Este trabajo
<i>E. coli</i> XL1Blue /pTOPOalsS	Km ^r , Zeocina ^r . Contiene el gen <i>alsS</i> (acetolactato sintasa de <i>B. subtilis</i>) clonado en el vector pTOPO-blunt.	Este trabajo
<i>E. coli</i> XL1Blue /pTOPOalsS-lxSptlx	Km ^r , Zeocina ^r . Contiene el gen de resistencia a Espectinomicina proveniente del plásmido pJet-Spt entre el gen <i>alsS</i> .	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> 168	Protótrofa obtenida a partir de la cepa <i>B. subtilis</i> 168 trpC2	Ceparío del laboratorio
<i>B. subtilis</i> 168 (Δ alsS)	168, <i>alsS::Spt</i>	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> ER382 (Δ alsS)	168, <i>alsS</i> -	Este trabajo
Plásmidos		
ploxSpec-Walt	Am ^r , Sp ^r . El vector de expresión lleva clonado el gen de resistencia a Espectinomicina flanqueado por los sitios loxP, que utilizan la recombinasa CRE.	Material del laboratorio, proporcionado por F. Valle.
pCRM-Ts-Phleo	Phleo ^r . Plásmido utilizado para escindir el cassette de resistencia por recombinación homóloga entre los dos sitios loxP	Dr. Fernando Valle, comunicación personal
pJET1.2/blunt	Vector de clonación de productos de PCR generados con el DNA polimerasas que generan fragmentos romos. Contiene un gen letal (<i>eco471R</i>), que es interrumpido por la ligadura de una inserción de ADN en el sitio de la clonación.	FERMENTAS
pJet-Spt	Am ^r . Contiene clonado el gen de Espectinomicina flanqueado por los sitios loxP.	Este trabajo
pTOPOalsS	Km ^r . contiene el gen <i>alsS</i> de <i>B. subtilis</i> .	Romero <i>et al</i> , 2007
pTOPOalsS-lxSptlx	Km ^r , Zeocina ^r Contiene el gen de resitencia a Espectinomicina procedente del plásmido pJet-Spt entre el gen <i>alsS</i> de <i>B. subtilis</i> .	Este trabajo

En el laboratorio se han construido cepas derivadas de *B. subtilis* CH1 (WB700 protótrofa, *nprE aprE epr bpf Δmpr::ble ΔnprB::bsr Δvpr::ery*) en las que se ha inactivado el gen *alsS*; sin embargo su crecimiento anaerobio se ve afectado; se postula que esto sea debido a que estas cepas presentan modificaciones genéticas para minimizar la producción de proteasas y que en su genoma existen diversas modificaciones incluyendo la presencia de varios marcadores de selección con resistencias a antibióticos. Además, de que esto representa un problema para la utilización futura de cassettes de resistencia, y no se sabe exactamente en donde se encuentran estas modificaciones dentro del genoma.

B. subtilis 168 *trp*⁺ es una cepa protótrofa obtenida de la cepa de *B. subtilis* 168 *trpC2*, no tienen ningún marcador en su genoma, lo que permite una amplia gama en la utilización de antibióticos como cepa de selección. En la tabla 3 se muestran los oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Primer	Nombre	Secuencia (5'→3')
1	SpecR_up	GGC CTA GGA TGC ATA TGG CGG CCG
2	SpecR-down	ATA ACT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG TTA TC
3	alsInicio	GGC TGA GCA CTT AAA TGT TGC TTT C
4	alsS	GTG TCA CAC ATG TAA TTG GCA TTC C

VII.2. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

VII.2.1. Técnicas genéticas

Todas las enzimas de restricción, T4 DNA polimerasa y marcadores de peso de fragmentos de DNA fueron obtenidos de New England BioLabs o MBI Fermentas, utilizándose de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. El resto de los reactivos necesarios para el trabajo de microbiología y biología molecular se obtuvieron de Sigma-Aldrich Química, Research Organics Inc, Merck-México y Difco Laboratories.



VII.2.1.a. *Purificación de DNA cromosomal y plasmídico*

Para el análisis de clonas recombinantes, el DNA plasmídico fue obtenido por medio del método de lisis alcalina (Tait *et al*, 1983). La purificación de los plásmidos digeridos con enzimas de restricción se llevo acabo utilizando el kit “Gel Extration Systems” de la marca Marligen Bioscience Inc. En los experimentos de clonación, los fragmentos de DNA procedente de reacciones de PCR y digestiones con enzimas de restricción se analizaron por gel de agarosa al 1.0%. Para purificar el DNA cromosomal de *B. subtilis* 168 trp⁺ se utilizó el kit “Microbial Genomic DNA Isolation”, a partir de cultivos crecidos por 12 h a 37°C y 300 rpm.

VII.2.1.b. *Reacción de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)*

Para la reacción de PCR, se utilizó la Elongase Enzyme Mix (Invitrogen, Inc.) y la AccuPrime Super Mix I. Las mezclas de reacción se realizaron en un volumen final de 50 µL, con los siguientes reactivos: 50 ng de DNA como templado, 5 pM de cada oligonucleótido iniciador, 0.2 mM de mezcla de dNTPs, amortiguador de la enzima correspondiente al 10% (concentración final en el volumen de reacción) 1-2 unidades de DNA polimerasa. Para la amplificación, las mezclas se incubaron en el termociclador PCR Sprint (ThermoHybaid). El programa de amplificación se diseñó considerando el tamaño del templado a amplificar, la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos y la polimerasa utilizada. La purificación de los productos de PCR, se realizó con el kit Purelink™ PCR Purification K3100 marca Invitrogen.

VII.2.1.c. *Digestiones y ligaciones*

Para las reacciones de digestión y ligación, se utilizaron las enzimas de restricción (*HpaI*, *XhoI*, *NcoI*), polimerización (T4_DNA polimerasa) de Fermentas Inc., y ligación (T4_DNA ligasa) de Biolabs Inc. Las mezclas de reacción se realizaron en un volumen final de 50 µL, y las condiciones se ajustaron de acuerdo

a las especificaciones del proveedor. La purificación de los productos de digestión, polimerización y digestión, se realizó con el kit Purelink™ PCR Purification K3100 marca Invitrogen.

VII.2.1.d. *Transformación*

El microorganismo huésped utilizado para la construcción de diferentes vectores fue *E. coli* XL1Blue. El DNA plasmídico se incorporó a las células por el método de electro-transformación (Sharma & Schimke, 1996), utilizando un electroporador (Eppendorf 2510) a 2,500 volts. Posteriormente, las células se recuperaron en medio SOC sin glucosa a 37°C por 2 horas y plateadas en cajas LB con Km 30 µg/ml y Spt 100 µg/ml. *B. subtilis* fue transformada utilizando el método de competencia natural (Cutting & Vander-Horn, 1990). La preparación de las células competentes se realizó con el uso del medio TB1, el cual contiene sales T 10X (por 100 ml: 14g K₂HPO₄, 6g KH₂PO₄, 2g (NH₄)₂SO₄, 1g Citrato de sodio), glucosa 20%, MgSO₄ 1M y casa aminoácidos 10%.

VII.2.1.e. *Construcción de la cepa de B. subtilis ER382 (ΔalsS)*

Estrategia de clonación para inactivar la expresión del gen alsS. En la amplificación de las 1085 pb del cassette de Espectinomicina flanqueado por los sitios lox (denominado loxP-Spt-loxP') se utilizaron los oligos 1 (SpecR_up) y 2 (SpecR-down) (Tabla 3). El producto de PCR se clonó en el plásmido pJET-1.2 derivando en el vector pJET-Spt (Fig. 9-I). El vector pTOPOalsS (Romero *et al.*, 2007) se digirió con la enzima de restricción *HpaI* quedando sitios romos (Fig. 9-II), mientras que el vector pJET-Spt se digirió en los sitios *XhoI* y *NcoI* (obteniendo sitios cohesivos) para escindir el cassette de Espectinomicina. Posteriormente este fragmento se polimerizó con la enzima T4_DNA polimerasa para obtener sitios romos. La ligación se llevó a cabo con la enzima T4_DNA ligasa (Biolabs Inc.) a temperatura ambiente por 10 min. De la ligación se obtuvo el plásmido pTOPOalsS-Spt (Fig. 9-III).

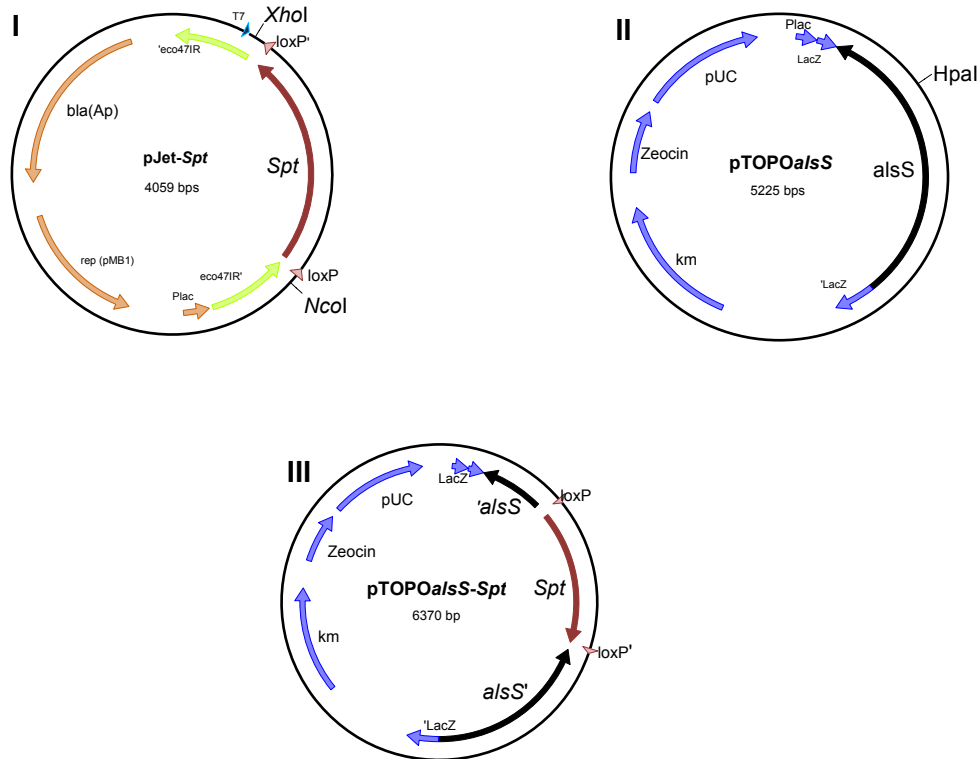


Figura 9. Vector para generar la inactivación del gen *alsS*. I) Vector pJET-*Spt* que contiene el gen de Espectinomicina flanqueado por los sitios loxP, se muestran los sitios de restricción *XhoI* y *NcoI* para escindir el cassette. II) Vector pTOPO-*alsS* que lleva el gen *alsS* de *B. subtilis*, el sitio de restricción *HpaI* es mostrado. III) Vector pTOPO*alsS-Spt*. Cassette de Espectinomicina entre el gen *alsS*. Este último plásmido fue utilizado para obtener el producto de PCR (*alsS-loxP/Spt/loxP'-alsS'*) para la integración cromosomal en *B. subtilis* e inactivar el gen *alsS*.

B. subtilis 168 *trp*⁺ fue transformada por competencia natural, como se especifica en la sección anterior, con el fragmento lineal (*alsS-loxP/Spt/loxP'-alsS'*) de DNA obtenido del vector pTOPO*alsS-Spt* con los oligos 3 (*alsDinicio*) y 4 (*alsS*) (Tabla 3). La integración cromosomal fue confirmada usando el antibiótico apropiado como marcador, que en este caso fue Espectinomicina 100 µg/ml. La cepa generada fue *B. subtilis* 168 *trp*⁺ (Δ *alsS*).

La cepa de *B. subtilis* 168 *trp*⁺ (Δ *alsS*) fue transformada con el plásmido pCRM-Ts-Phleo para remover el cassette de Espectinomicina. Este vector contiene el gen que codifica para la recombinasa CRE, la cual reconoce la secuencia de los sitios loxP y realiza una doble recombinación homóloga, escindiendo el cassette de Espectinomicina.

VII.3. CONDICIONES DE LOS CULTIVOS

VII.3.1 Condiciones de crecimiento

E. coli se creció en medio Luria-Bertani (LB) (por litro: 10 g de bacto triptona; 5 g de extracto de levadura; 5 g de NaCl) líquido o solidificado (agar 1.5%). *E. coli*/pTOPO-*alsS* se seleccionó en LB Amp 100 µg/ml. *B. subtilis* se creció en medio LB líquido o solidificado, seleccionando las cepas transformadas en LB sólido con Spt 100 µg/ml. En matraz, todos los cultivos se crecieron a 37° C y 300 rpm, a menos que se especifiquen otras condiciones de incubación.

VII.3.2. Cultivos

Estos se realizaron en sistemas de mini-fermentadores o mini-fleakers (Figura 10II) (Beall *et al.*, 1991), sin aireación, con un volumen de trabajo de 200 ml. La temperatura fue controlada a 37° C, el pH se mantuvo a 7.0 unidades mediante la adición automática de KOH 2N (Figura 10I) y la velocidad de agitación fue mantenida a 100 rpm. Se realizó duplicado por cada experimento y los datos reportados en las gráficas son el promedio de esos duplicados indicando el error estándar.

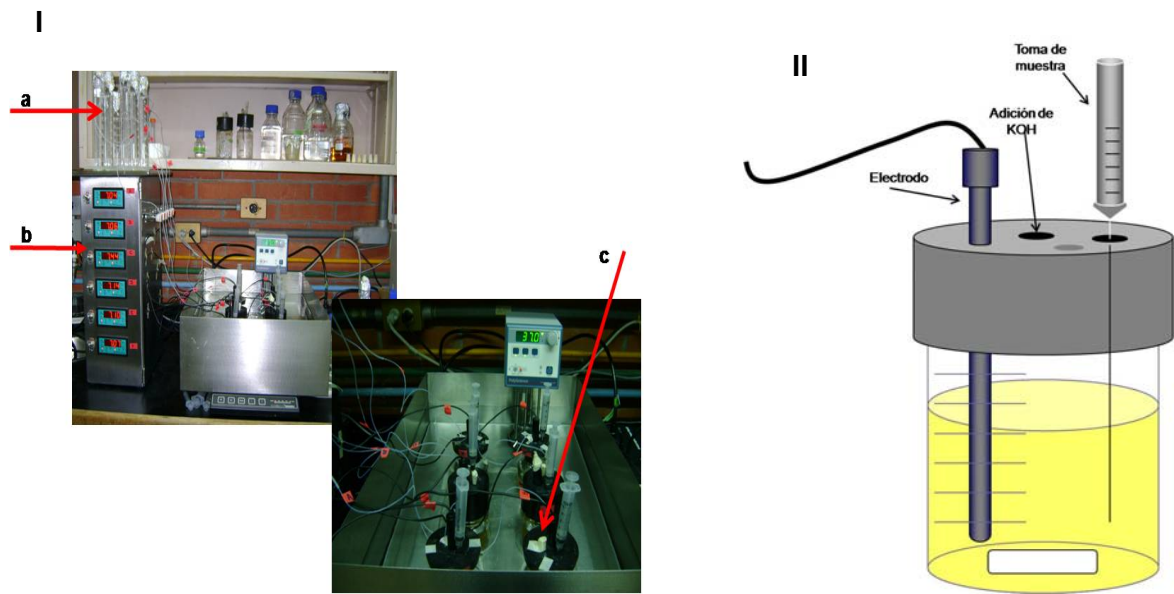


Figura 10. Minifermentadores o mini-fleakers. I.- Fermentación utilizando un sistema para mini-fleakers. a) KOH 2N, b) Torre controladora de pH y c) Fleakers o mini-fermentadores. II. Fleaker

VII.3.3. Concentración celular

La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11 y fue convertida a peso seco de células (DWC) de acuerdo a la curva obtenida por Martínez *et al.* (1997): $1DO_{600\text{ nm}} = 0.35\text{ g}_{\text{DWC}} / \text{l}$. El monitoreo de los cultivos se llevó a cabo tomando dos muestras de 1 ml cada una, centrifugándolas a 5000 rpm, durante 5 min. Los sobrenadantes se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

VII.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

VII.4.1. Análisis por HPLC de Sustratos y Productos Metabólicos

La cuantificación en sobrenadantes de glucosa, fructosa, celobiosa, arabinosa, glicerol y productos de fermentación (acetoína, 2,3-butanodiol) se llevó a cabo por HPLC (Model 996, Waters, Milipore Co., Milford, MA) equipado con detectores de UV e índice de refracción. Las separaciones se llevaron a cabo a 50°C , utilizando una columna Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm; BioRad), 5 mM H_2SO_4 como fase móvil y flujo de 0.5 ml/min (vol. de inyección, 20 μl).

VII.4.2. Determinación enzimática de glucosa y L-Lactato

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

VII.4.3. Determinación de azúcares reductores totales por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Los carbohidratos sacarosa, lactosa y almidón presentes en los sobrenadantes fueron cuantificados por el método espectrofotométrico (DNS) utilizando el ácido 3,5-dinitrosalicílico. Previa hidrólisis de los carbohidratos con las enzimas correspondientes.

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1. Construcción de la cepa de *B. subtilis* ER382 ($\Delta alsS$)

La construcción del vector pTOPO*alsS-Spt* se verificó por reacciones de digestión con las enzimas de restricción *XmnI* y *XhoI* (Figura 11a) con los cuales se obtienen fragmentos de 3507 y 2863 pb (Figura 11b).

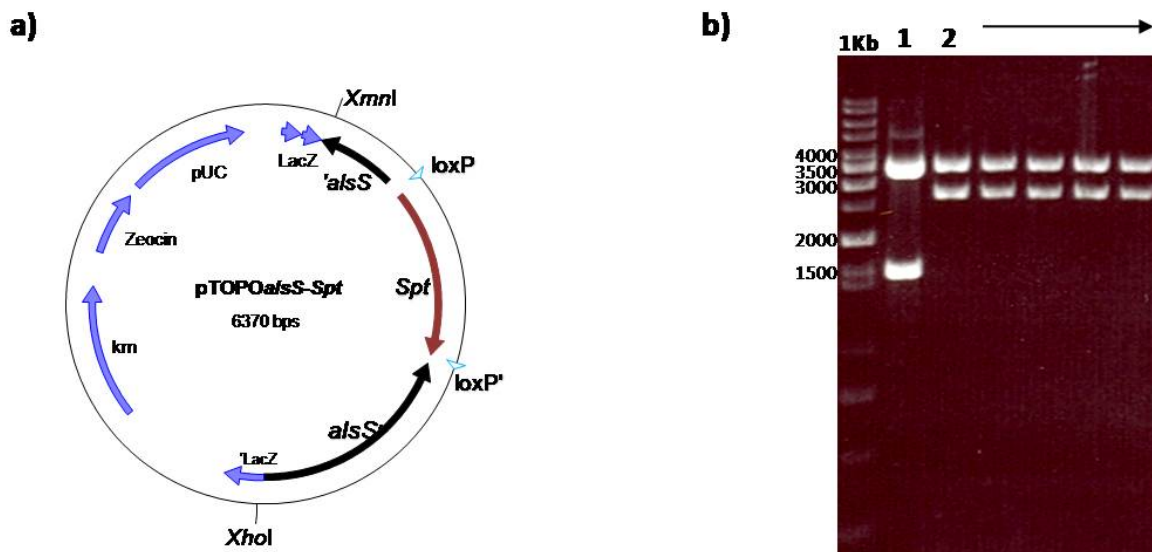


Figura 11. pTOPO*alsS-Spt* y patrón de restricción del mismo.a) Vector pTOPO*alsS-Spt*, se muestran los sitios de restricción de *XhoI* y *XmnI* con el que se cortó el plásmido observado en el gel (b). b) Gel de agarosa. En la columna 1 se observa el patrón de restricción del vector pTOPO*alsS* (3507 pb, 1718 pb), de la columna 2 en adelante se muestra el patrón de restricción de varias clonas del vector pTOPO*alsS-Spt* (3507 y 2863 pb).

La integración del producto de PCR (*alsS-loxP/Spt/loxP'-alsS'*) en el cromosoma de *B. subtilis* se llevó a cabo por doble recombinación homóloga, interrumpiendo el gen *alsS* en *B. subtilis* 168 *trp*⁺. Se obtuvieron varias candidatas en las que interrumpió el gen *alsS*, las cuales se confirmaron por PCR (Figura 12). La mutante, como se esperaba no produjo butanodiol (verificado por HPLC). La cepa mutante a la cual se le escindió el cassette de Espectinomicina por el plásmido pCRM-Ts-Phleo, fue denominada *B. subtilis* ER382 ($\Delta alsS$).

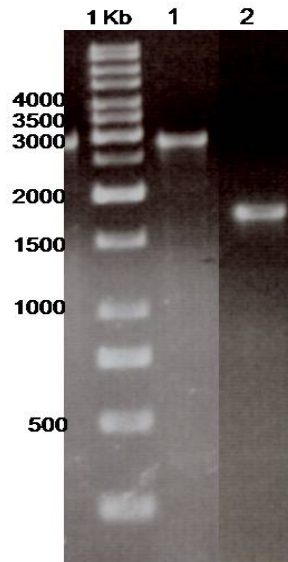


Figura 12. PCR *B. subtilis* Δ alsS. 1) Producto de PCR del fragmento de DNA denominado *alsS-loxP/Spt/loxP'-alsS'* amplificado del cromosoma de *B. subtilis* 168 trp^+ Δ alsS.(2785 pb) 2) Control positivo. Amplificación del gen *alsS* de *B. subtilis* 168 trp^+ (1700 pb).

VIII.2. Caracterización de la cepa progenitora (*B. subtilis* 168 trp^+) y mutante (*B. subtilis* ER382 Δ alsS) en mini-fermentadores utilizando glucosa como fuente de carbono.

La caracterización de *B. subtilis* 168 trp^+ (cepa progenitora) y de *B. subtilis* ER382 (Δ alsS) en cultivos no aireados en medio Luria suplementados con 10 g/L de glucosa se muestra en la Figura 13. Los parámetros cinéticos fueron calculados durante las primeras 6 horas para ambas cepas.

La cantidad de biomasa durante estas primeras 6 horas en la cepa ER382 es mayor que para *B. subtilis* 168 trp^+ (0.67 vs 0.49 g/L) (Figura 13), al igual que la velocidad de crecimiento (0.38 vs 0.32 h^{-1}) (Tabla 4). La cepa mutante consume con mayor rapidez el azúcar (Figura 13), con una velocidad específica dos veces mayor con respecto a la cepa progenitora durante las primeras 6 h, agotándola por completo a las 10 horas de fermentación y produciendo 13.2 g/L de L-Lactato con 32% de más con respecto al “teórico máximo” (Figura 14, Tabla 5).

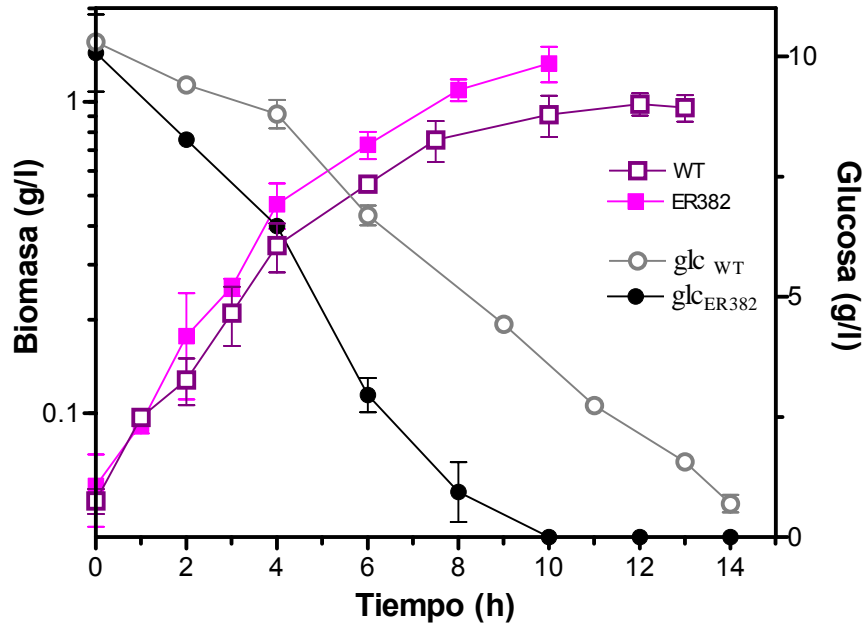


Figura 13. Cinética de crecimiento y consumo de glucosa de *B. subtilis* 168 *trp*⁺ (WT) y *B. subtilis* ER382 ($\Delta alsS$). Los cuadrados significan la biomasa y los círculos el consumo de glucosa.

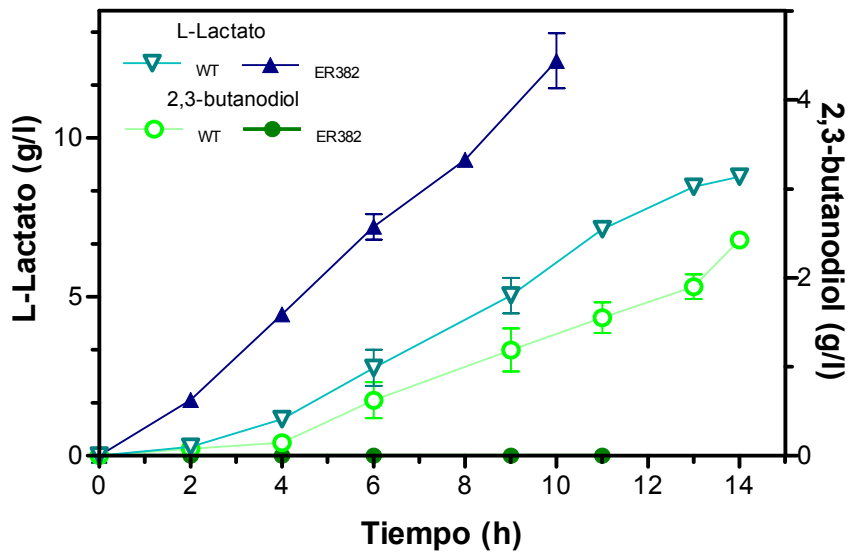


Figura 14. Producción de L-Lactato y 2,3-butanodiol por *B. subtilis* 168 *trp*⁺ y *B. subtilis* ER382 ($\Delta alsS$) a partir de glucosa (10g/L).


Tabla 4. Resumen de resultados de cultivos de *B. subtilis* 168 trp⁺ (WT) y *B. subtilis* ER382 Δ alsS^a

<i>Cepa</i>	WT	ER382	WT	ER382	WT	ER382
Fuente de Carbono	^b μ (h ⁻¹)		^b X _{max} (g/L)		^b q _s (g _s /g _{DWC} *h)	
Glucosa	0.33	0.38	0.49	0.67	2.42	4.21
Fructosa	ND	0.36	ND	0.48	ND	2.61
Celobiosa	0.11	0.061	0.23	0.25	2.72	0.75
Sacarosa	0.052	0.071	0.15	0.31	0.57	0.48
Arabinosa	0.044	0.064	0.27	0.35	0.36	0.51

^a Los datos que aquí se presentan es el promedio de un duplicado de la fermentación.

^b Parámetros cinéticos en la fase exponencial.

q_s Velocidad específica de consumo de sustrato.

μ Velocidad específica de crecimiento.

X_{max} Biomasa máxima alcanzada durante la fase de crecimiento exponencial.

ND = no determinado

Las cinéticas para fructosa, celobiosa, sacarosa y arabinosa se presentan en secciones posteriores.

Tabla 5. Resumen de resultados para la producción de L-Lactato de *B. subtilis* 168 trp⁺ y *B. subtilis* ER382 Δ alsS^a

<i>Cepa</i>	WT	ER382	WT	ER382	WT	ER382	WT	ER382	WT	ER382
Fuente de Carbono	^b Y _{p/s} (g _p /g _s)		^c q _p (g _p /g _{DWC} * h)		^c Q _p (g _p /L * h)		^d L-Lactato (g/L)		^d 2,3-butanodiol (g/L)	
Glucosa	0.76	1.32	0.25	0.37	0.63	1.31	8.78	13.2	2.43	0.00
Fructosa	ND	1.32	ND	0.44	ND	1.31	ND	12.9	ND	0.00
Sacarosa	1.30	1.20	0.06	0.14	0.23	0.24	12.6	12.2	1.67	0.00
Celobiosa	1.20	1.27	0.09	0.06	0.24	0.25	12.2	12.6	1.96	0.00
Arabinosa	0.85	0.87	0.05	0.10	0.11	0.17	7.7	8.42	1.63	0.00

^a Los datos que se muestran es un promedio de dos fermentaciones del mismo experimento.

^b Rendimiento de L-Lactato al final de la fermentación.

^c La productividad específica y volumétrica con respecto a L-Lactato en la fase exponencial.

^d Es el valor total al final de la fermentación.

q_p Velocidad específica de producción de L-Lactato.

Q_p Velocidad volumétrica de producción de L-Lactato.

ND = no determinado

Las cinéticas para fructosa, celobiosa, sacarosa y arabinosa se presentan en secciones posteriores.



Por otro lado *B. subtilis* 168 *trp*⁺ consume totalmente los 10 g/L de glucosa poco después de las 14 horas alcanzando títulos de tan solo 8.78 g/L de L-Lactato. En este aspecto en el trabajo realizado por Romero *et al.* (2009), en el cual utilizaron la cepa de *B. subtilis* CH1 (WB700 protótrofa, *nprE aprE epr bpf Δmpr::ble ΔnprB::bsr Δvpr::ery*) y la cepa de *B. subtilis* CH1*alsS*⁻ (derivada de la cepa de *B. subtilis* CH1) en la cual se encuentra interrumpido en el gen *alsS* con un cassette de Espectinomicina; se muestra una disminución en la velocidad de crecimiento con respecto a su cepa parental (0.34 vs 0.32 h⁻¹), con una velocidad de consumo de glucosa de 1.99 g_s/g_{DWC}*h, en contraste con los resultados obtenidos en el presente trabajo con la cepa ER382 *alsS*⁻, la cual mejora tanto la velocidad de utilización del sustrato y la velocidad de crecimiento con respecto a su cepa parental (*B. subtilis* 168 *trp*⁺). Este fenómeno obtenido en referencia a la velocidad de crecimiento tal vez se deba a que la cepa utilizada de *B. subtilis* CH1 (*alsS*⁻) en el trabajo de Romero *et al.* (2009) contiene múltiples modificaciones genéticas que puedan estar afectando el metabolismo energético de la célula, mientras que la cepa ER382 *alsS*⁻ utilizada en este estudio es derivada directa de la cepa silvestre *B. subtilis* 168 *trp*⁺ y no contiene ningún marcador de selección y solo contiene interrumpido el gen *alsS* que codifica para la enzima acetolactato sintasa. En adición la velocidad específica de formación de L-Lactato es 50% mayor para la cepa ER382 en comparación con la cepa progenitora (Tabla 5) y la productividad volumétrica es dos veces mayor en la cepa ER382, debido a que la fermentación solamente se lleva a cabo en 10 horas (Tabla 5).

Los valores obtenidos de L-Lactato (Figura 14, Tabla 5) indican que también los componentes del medio Luria (aminoácidos) proporcionan parte de la fuente de carbono para la formación de lactato, produciéndose 13.2 g/L de L-Lactato, esto es 32% más del teórico máximo (el teórico máximo de acuerdo a la estequiometría bioquímica de la conversión de glucosa, y los demás azúcares evaluados en este trabajo, es de 1 g de lactato por cada g de azúcar).



La transcripción del operon *alsSD* se efectúa en la fase exponencial tardía y con mayor fuerza en la fase estacionaria (Renna *et al.*, 1993). El gen *alsR* codifica para la proteína activadora del operón, cuando es eliminado no hay transcripción del operon *alsSD*; sin embargo cuando se realiza una mutación puntual en la secuencia del regulador *alsR*, entonces la transcripción del operón se lleva a cabo en la fase exponencial (Renna *et al.*, 1993). La señal para la transcripción de *alsR* es el pH y/o acetato intracelular. La formación de 2,3-butanodiol por lo tanto comienza en la fase exponencial tardía (Figura 14, Tabla 5). La inactivación del gen *alsS*, redirige la poza de piruvato hacia la formación de L-Lactato, con la correspondiente eliminación en la formación de los productos de la vía de butanodiol (acetolacto, acetoína y butanodiol). El aumento en la biomasa y la velocidad de crecimiento de la mutante (Figura 13, Tabla 4) tal vez se deba en parte a una reducción del efecto inhibitorio de los productos de la vía del butanodiol, aunado quizás a un efecto positivo en la expresión del operón *pdhABCD* que codifica para la enzima piruvato deshidrogenasa y que se sabe se activa debido al aumento de la poza de piruvato (Nakano *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 2000), y incrementando la poza de acetil-CoA, siendo este un metabolito utilizado en vías anabólicas y energéticamente importante para la célula (Figura 7).

VIII.3. Evaluación de *B. subtilis* 168 *trp*⁺ y *B. subtilis* ER382 Δ *alsS* en fructosa, sacarosa, celobiosa y arabinosa.

La cepa progenitora (*B. subtilis* 168 *trp*⁺) y la mutante (*B. subtilis* ER382) tienen la capacidad de crecer bajo un sistema no aireado en medio complejo (medio Luria Broth, LB), empleando celobiosa (Figura 15a), sacarosa (Figura 15b), arabinosa (Figura 15c) o fructosa (Figura 17); sin embargo no puede utilizar glicerol, lactosa y almidón (datos no mostrados).

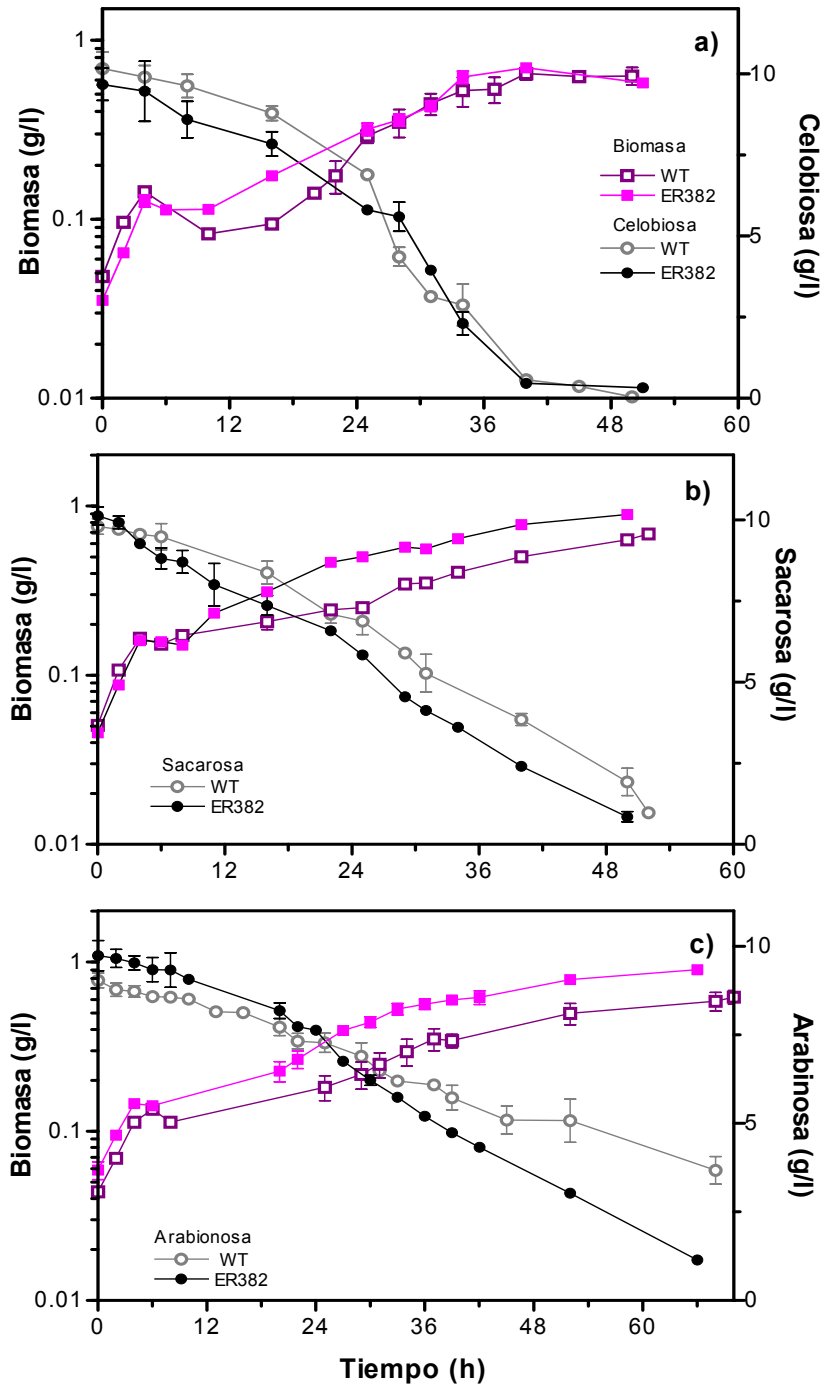


Figura 15. Cinética de crecimiento y de consumo de la fuente de carbono de *B. subtilis* 168 *trp*⁺ (WT) y de *B. subtilis* ER382 ($\Delta alsS$). a) Celobiososa. b) Sacarosa. c) Arabionosa

En estudios de expresión en condiciones anaerobias (respiración anaerobia y fermentación) se indica que la glicerol cinasa y la proteína transportadora del



glicerol (GlpF) no se encuentran expresadas en estas condiciones (Ye *et al.*, 2000; Marino *et al.*, 2000; Clements *et al.*, 2002). Por otro lado aunque *B. subtilis* tiene el gen *lacA* que codifica para la enzima que hidroliza la lactosa, no se sabe que exista algún transportador específico en condiciones aerobias, así como anaerobias, que pudieran transportar este disacárido. Y finalmente, aunque *B. subtilis* en su genoma se encuentra presente el gen *amyE* que codifica para la α -amilasa (enzima que hidroliza el almidón), y es muy probable que no se exprese esta enzima extra-celular en condiciones no-aireadas y por lo tanto no metabolice este polisacárido.

En la Figura 15(a, b y c) no se observa fase exponencial definida ya que el crecimiento en estas tres fuentes de carbono (celobiosa, sacarosa y arabinosa) es muy lento, tardando hasta 70 horas. Para la cinética con celobiosa se examinó de las 20 h a las 40 h, considerando un intervalo de 20 horas; en el caso de sacarosa se consideró de las 25 horas hasta las 34 h, y finalmente para obtener los parámetros cinéticos utilizando arabinosa se tomo en cuenta de las 25 horas a las 45 h.

Estos resultados sugieren que la disminución en la eficiencia de fermentación de estos azúcares podría deberse a una baja actividad en los transportadores o en las enzimas correspondientes al metabolismo para su hidrólisis o utilización. También es posible que exista un mayor consumo de ATP durante la internalización (transporte) y fosforilación de estos carbohidratos a la célula, es decir 2 moles de ATP por mol de monosacárido, para transportar y fosforilar el azúcar, en lugar de un mol de ATP por mol de azúcar, como sucede con la glucosa y fructosa por usar el sistema PTS (Figuras 2 y 3).

Cuando se utiliza como única fuente de carbono sacarosa, la biomasa máxima es dos veces mayor en la cepa ER382 con respecto a la parental y la velocidad específica de crecimiento incrementa un 50% con respecto a su parental (Tabla 4); sin embargo es seis veces menor que la obtenida en presencia de



glucosa o fructosa (Tabla 4). La velocidad de consumo del carbohidrato es ocho y cuatro veces más lenta que para glucosa y fructosa, respectivamente.

La sacarosa es un disacárido compuesto por dos hexosas; glucosa y fructosa. *B. subtilis* tiene dos sistemas para internalizar el disacárido a la célula; uno funcional en el catabolismo compuesto por un sistema de transporte PTS y una fosfotransferasa. Este transportador es dependiente de la fosforilación de la enzima II del transportador PTS para glucosa (Sutrina *et al* 1990), lo que podría ser una limitante en la velocidad de consumo, ya que se necesitaría de la fosforilación y energía del sistema de transporte de glucosa. Además la actividad de la fosfosacarasa (enzima que fosforila a la sacarosa interna) podría ser baja, ya que una vez hidrolizado el carbohidrato entra directamente a la vía glucolítica como glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato, este último fosforilado por una enzima constitutiva (Steinmetz, 1993). Y finalmente otra causa en la drástica disminución de la velocidad de consumo del sacarosa podría deberse a la saturación de la enzima transportadora o de la enzima hidrolítica (Steinmetz, 1993).

Cuando la fuente de carbono utilizada es sacarosa o arabinosa se encontró un efecto positivo en la velocidad de crecimiento y la biomasa en la cepa ER382, con respecto a la cepa progenitora (Figura 15b, c) como el observado cuando el medio es suplementado con glucosa (Figura 13). Sin embargo, cuando la única fuente de carbono es celobiosa, la velocidad específica de crecimiento es mayor en la cepa progenitora que en la cepa ER382 durante el intervalo de 20 a 40 h (Tabla 4, Figura 15a).

El disacárido de celobiosa se encuentra formado por un enlace de dos moléculas de glucosa y por consiguiente se esperaría, si su hidrólisis no fuese limitante, que la velocidad específica de crecimiento y del consumo de celobiosa fuera muy similar a la encontrada en glucosa en medio rico y condiciones anaerobias (Figura 13). Sin embargo el consumo completo de celobiosa tarda hasta 40 h (Figura 15a).

La velocidad de crecimiento en *B. subtilis* 168 trp^+ (en el intervalo de tiempo indicado en párrafos anteriores) en medio LB con celobiosa obtenida en este trabajo concuerda con el estudio de Romero *et al* (2009) (donde la cepa de estudio fue *B. subtilis* CH1), con la diferencia que la cinética de crecimiento obtenida aquí es mucho más lenta terminando aproximadamente a las 50 h (Figura 16). Esta disparidad podría deberse a la biomasa inicial y por lo tanto a las señales de regulación para la expresión de los transportadores o a la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de la fuente de carbono. Ya que en el caso del trabajo de Romero *et al.* (2009) la fase exponencial solamente dura 12 h, con una biomasa inicial de 0.17 g/L; mientras en este trabajo, esa fase exponencial se observa a partir de las 20 h, cuando la biomasa alcanzada es similar a la descrita en el estudio que realizó Romero *et al.* (2009), terminando aproximadamente en el mismo rango de tiempo (20 h – 32 h).

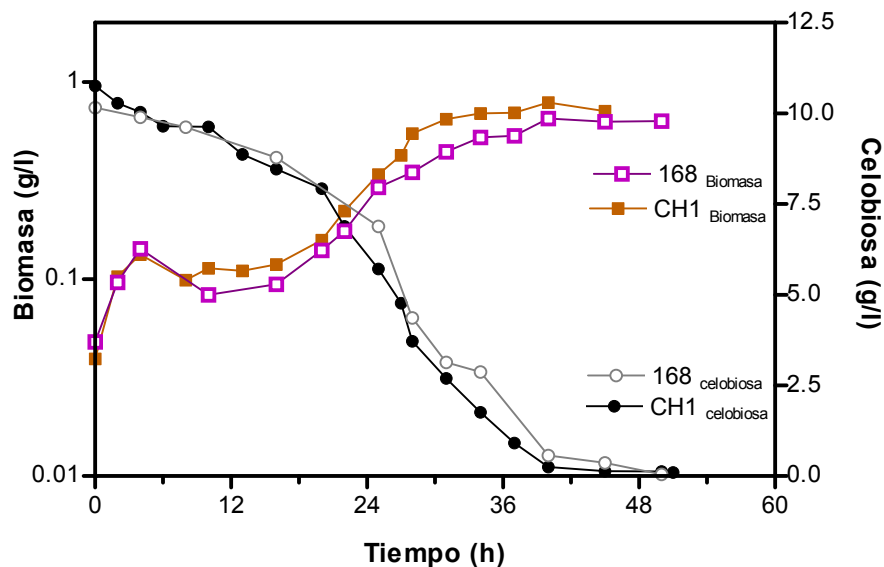


Figura 16. Cinética de crecimiento y de consumo de la fuente de carbono de *B. subtilis* 168 trp^+ y de *B. subtilis* CH1.

La arabinosa es internalizada a la célula por *B. subtilis* a través de dos tipos de transportadores regulados por la inducción del carbohidrato, posteriormente entra a la vía de las pentosas fosfato, se sabe que esta vía es ineficiente en aerobiosis (Steinmetz, 1993) por lo que sería probable que en condiciones de

anaerobiosis también se encuentre ineficiente, estimando que el consumo de ATP sea elevado y por lo tanto sea causal de este comportamiento.

VIII.4. Análisis de la producción de L-Lactato en B. subtilis ER382 ($\Delta alsS$) en diferentes fuentes de carbono

La capacidad de metabolizar glucosa y fructosa (hexosas) a L-Lactato por ER382 es sumamente rápida (1.31 g/L h; Figura 17 y Tabla 5), ya que *B. subtilis* posee los transportadores específicos para estos monosacáridos por un sistema PTS, coadyuvando a que estos entran al metabolismo por la vía glucolítica. La internalización, fosforilación y catabolismo hacia piruvato (glucólisis) genera un consumo bajo de ATP con un rendimiento total de 2 mol ATP por cada mol de carbohidrato, esto podría explicar el rápido consumo de los azúcares.

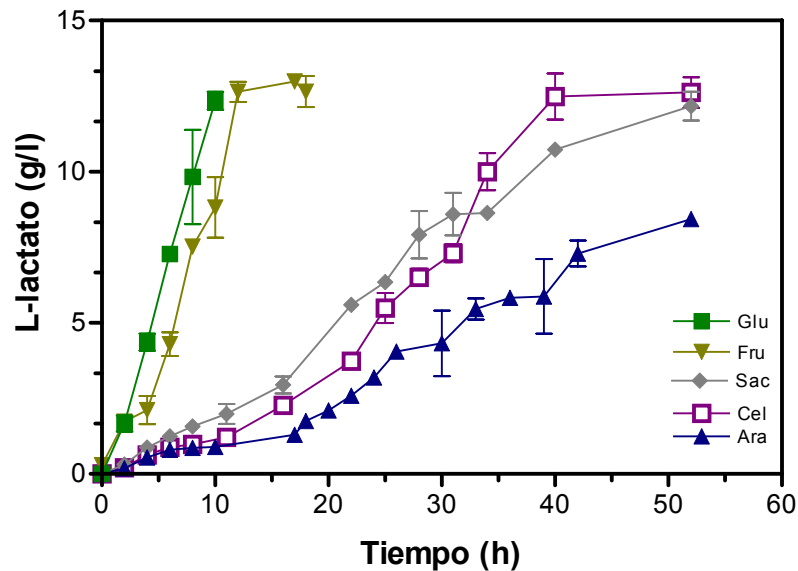


Figura 17. Producción de L-Lactato de *B. subtilis* ER382 en medio LB adicionado diferentes fuentes de carbono. Glc, glucosa; Fru, fructosa; Sac, sacarosa; Cel, celobiosa; Ara, arabinosa.

En la mutante ER382 el rendimiento de L-Lactato proveniente del catabolismo de disacáridos y hexosas fue mayor al máximo teórico, mientras que el obtenido utilizando como única fuente de carbono arabinosa fue tan solo del



84% en la cepa mutante (Figura 17 y Tabla 5). Se necesitan 3 moléculas de arabinosa para formar 5 moléculas de lactato con la concomitante formación de 5 moles de NAD^+ , recuperándose el balance de oxido-reducción, por lo que el bajo rendimiento tal vez se deba a la ineficiente vía de las pentosas fosfato o al alto consumo de ATP explicado anteriormente. Por otro lado, al igual que con la glucosa o fructosa, en los disacáridos se obtiene un rendimiento mayor al del teórico (entre 20 y 30% más, Tabla 5), indicando que la cepa metaboliza carbono, contenido en el medio Luria, a lactato.

En comparación con la cepa progenitora, la velocidad específica de formación de L-Lactato es dos veces mayor en la cepa mutante cuando utiliza sacarosa y arabinosa (Tabla 5); sin embargo la productividad volumétrica es muy similar para ambas cepas en estos azúcares. En el trabajo realizado por Zhou *et al.* (2003) utilizando a *E. coli* como cepa productora de L-Lactato se obtuvieron productividades volumétricas entre 0.36 y 0.64 $\text{g}_p/\text{L}^* \text{ h}$, siendo similar las productividades obtenidas en este estudio cuando el azúcar utilizado fue glucosa o fructosa (Tabla 5) con la cepa parental (*B. subtilis* 168 trp^+), sin embargo la cepa derivada ER382 ($\Delta a/sS$) en la cual se redirigió la poza de piruvato hacia la formación de lactato, incrementa al doble la productividad volumétrica (1.31 $\text{g}_p/\text{L}^* \text{ h}$) usando las mismas fuentes de carbono (Tabla 5).

B. subtilis potencialmente puede utilizar en ambientes no-aireados carbohidratos provenientes residuos lignocelulósicos e industriales (celobiosa, sacarosa, arabinosa, fructosa, glucosa), lo que permitirá una disminución en los costos de producción hacia la obtención del ácido láctico, así como también el aprovechamiento de los residuos. Sin embargo la eficiencia obtenida de los disacáridos y pentosas es menor con respecto a las hexosas, por lo que se tendría que dirigir los estudios hacia este aspecto para incrementar las productividades volumétricas en la formación de productos de valor agregado como el ácido láctico.

IX CONCLUSIONES

- El gen *alsS* fue inactivado en la cepa *B. subtilis* 168 *trp*⁺ obteniéndose la cepa ER382, en ésta el carbono es re-dirigido hacia la formación de L-Lactato, eliminándose por completo la formación de 2,3-butanodiol.
- En comparación a la cepa silvestre, la velocidad de crecimiento y la formación de biomasa se incrementó en la cepa ER382 cuando se utilizó glucosa, sacarosa o arabinosa, al parecer debido a la eliminación del efecto tóxico de los intermediarios de la vía del butanodiol.
- Para la cepa de *B. subtilis* ER382 el rendimiento teórico máximo con respecto a L-Lactato fue mayor al 100% con glucosa, fructosa, celobiosa y sacarosa probablemente por un aporte de los componentes del medio rico utilizado.
- Se comprobó que la cepa silvestre y la mutante ER382 son capaces de metabolizar glucosa, fructosa, sacarosa, celobiosa y arabinosa a L-Lactato, utilizando con mayor rapidez glucosa y fructosa. No puede utilizar glicerol, lactosa y almidón. La glicerol cinasa no se encuentra expresada en condiciones anaerobias. Por otro lado, no existe ningún transportador para internalizar lactosa. Y finalmente, aunque *B. subtilis* contiene el gen *amyE*, el cual codifica para la amilasa, quizás en condiciones no-aireadas no se exprese esta enzima extra-celular.
- En la cepa ER382 la velocidad de crecimiento es menor cuando utiliza sacarosa, celobiosa y arabinosa con respecto a las hexosas (glucosa o fructosa), probablemente debido a un alto consumo de ATP en el transporte y fosforilación de estos azúcares, además de deficiencias en las vías metabólicas utilizadas, como en el caso de la arabinosa.

X PERSPECTIVAS

- La baja eficiencia en la internalización y fosforilación de disacáridos y pentosas podría deberse a un bajo nivel de expresión o una baja actividad en los transportadores y las enzimas que fosforilan estos azúcares, por lo que se plantea la medición del nivel de expresión de los genes y las actividades enzimáticas correspondientes y compararlas con los niveles en condiciones aerobias.
- Explorar si efectivamente existe un alto consumo de ATP al internalizar los disacáridos y pentosas, determinando el nivel energético de las células crecidas bajo glucosa, fructosa, sacarosa, celobiosa y arabinosa mediante la medición del ATP y ADP intracelular.
- Determinar el crecimiento y capacidad de producción de L-Lactato por la cepa de *B. subtilis* ER382 ($\Delta alsS$) en medio mineral bajo condiciones no-aireadas utilizando como fuentes de carbono fructosa, sacarosa, arabinosa y celobiosa.
- Se sabe que la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) juega un papel importante en la velocidad de crecimiento de *B. subtilis* silvestre en condiciones sin aireación, por lo que se propone determinar el papel que desempeña esta enzima en la mejora del crecimiento que presenta *B. subtilis* ER382 ($\Delta alsS$), midiendo los niveles de expresión del operón *pdhABCD* y la actividad enzimática de PDH.

XI BIBLIOGRAFÍA

- Beall D.S, Otha K, Ingram L.O. **1991**. Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* **38**:296-303. Doi:10.1002/bit.260380311.
- Carrillo A.J.L. **2002**. Tratamiento y reutilización del suero de leche. *Conversus. IPN.* **10**:27-30.
- Clements L.D., Streips U.N. and Miller B.S. **2002**. Differential proteomic analysis of *Bacillus subtilis* nitrate respiration and fermentation in defined medium. *Proteomics.* **2**:1724-1734.
- Cock S.L. and Rodríguez de Stouverel A. **2007**. Producción económica de ácido láctico utilizando residuos de cosecha y jugos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum C.*). *Agricultura Técnica.* **67**(1): 29-38.
- CONAGUA **2008**. Estadísticas del agua en México. México D.F. 1-228.
- Crabb W.D. & Mitchinson C. **1997**. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *TIBTECH.* **15**:349-350.
- Cruz-Ramos H., Hoffmann T., Marino M., Nedjari H., Presencan-Siedel E., Dreesen O., Glaser P. and Janh D. **2000**. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J. Bacteriol.* **182**:3072-3080.
- Cruz A., Steinmetz M., Aymerich S., Richter R. and Le Coq D. **1990**. Induction of levansucrase in *Bacillus subtilis*: an antitermination mechanism negatively controlled by the phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **172**(2):1043-1050.
- Cutting S.M. and Vander-Horn P.B. **1990**. Genetic analysis. p.27-74. In Harwood and S.M. Cutting (ed). *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Débarboulé M., Arnaud M., Fouet A., Klier A and Rapoport G. **1990**. The *sacT* gene regulation the *sacPA* operon in *Bacillus subtilis* shares strong homology with transcriptional antiterminators. *J. Bacteriol.* **172**(7):3966-3973.
- Débarboulé M., Martin-Verstraete I., Klier A. and Rapoport G. **1991**. The transcriptional regulator LevR of *Bacillus subtilis* has domains homologous to both σ^{54} - and phosphotransferase system-dependent regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**:2212-2216.
- Dien B.S., Nichols N.N. and Bothast R.J. **2001**. Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**:259-264.
- Dien B.S., Cotta M.A. and Jeffries T.W. **2003**. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **63**:258-266.

- Espinosa-de-los-Monteros J., Martínez A., Valle F. **2001**. Metabolic profiles and *aprE* expression in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor. *Appl Microbiol Biotechnol.* **53**:379-384.
- Ferrari E., Jarnagin A. and Schmidt B.F. **1993**. Production of extracellular enzymes. p. 917-937. In Sonenshein, A L. (ed). *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. 1993. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Freese, E. and Fortnagel U. **1969**. Growth and sporulation of *Bacillus subtilis* mutants blocked in the pyruvate dehydrogenase complex. *J. Bacteriol.* **99**: 754-756.
- Frías A.C., Lema II. y García A.G. **2003**. La situación de los envases de plástico en México. *Gaceta Ecológica.* **69**: 63-81.
- Garvie E. I. **1980**. Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol. Rev.* **44**:106-39
- González R., Murarka A., Dharmadi Y. and Yazdani S.S. **2008**. A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: Trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering.* **10**:234-245.
- Hernández Busto C. **2003**. Crecimiento y formación de productos en cultivos aeróbicos de *Bacillus subtilis* con glucosa, xilosa y celobiosa. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Zacatepec, Zacatepec, Mor., pp 1-98.
- Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B. **2000**. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microbiol. Technol.* **26**:87-107.
- Ingram L.O., Aldrich H.C., Borges A.C.C., Causey T.B., Martínez A., Morales F., Saleh A., Underwood S.A., Yomano L.P., York S.W., Zaldivar J., and Zhou S. **1999**. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnol.* **15**:855-866.
- John F.J., Rice J.D., and Preston J. **2006**. Characterization of *XynC* from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* Strain 168 and analysis of its role in depolymerization of glucuronoxylan. *J. Bacteriol.* **188**:8617-8616.
- Krispin O. and Allmansberger R. **1998**. The *Bacillus subtilis* AraE protein displays a broad substrate specificity for several substrates. *J. Bacteriol.* **180**:3250-52.
- Kunst, F., *et al.* **1998**. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249-256.
- Marino M., Hoffmann T., Shmid R., Möbitz H. and Jahn D. **2000**. Changes in protein synthesis during the adaptation of *Bacillus subtilis* to anaerobic growth conditions. *Microbiol.* **146**:97-105.
- Martínez A., Ramírez O.T. and Valle F. **1997**. Improvement of cultura conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**:40-5.

- Martínez, A., Rodríguez M.E., Wells M.L., York S.W., Preston J.F. and Ingram L.O. **2001**. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnol. Progress*. **17**: 287-293.
- Martínez A., Rodríguez, M.E., López-Munguía C.A. and Gosset L.G. **2006**. ¿Etanol carburante a partir de bagazo de caña? *Claridades*. 155: 33-39.
- Martínez A., Grabar T.B., Shanmugam K.T., Yomano L.P., York S.W., Ingram.L.O. **2007**. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnol Lett*. **29**, 397-404.
- Nakano, M.M., Daily Y.P., Zuber P, and. Clark D.P. **1997**. Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J. Bacteriol*. **179**: 6749-6755.
- Narayanan N., Roychoudhury P.K., Srivastava A. **2004**. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Elec. J. Biotechnol*. **7**(2): 167-179.
- Nikkila, K.K., Hujanen, M., Leisola, M. and Palva, A. **2000**. Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+) lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol*. **66**:3835-3841.
- Raposo M.P., Inácio J.M. and Mota L.J. **2003**. Transcriptional regulation of genes encoding arabinan-degrading enzymes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*. **186**:1287-1296.
- Reizer J., Saier M.H., Deutshcer J., Greiner F., Thompson J. and Hengstenberg W. **1988**. The phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in gram-positive bacteria. Properties, mechanism, and regulation. *C. Rev. Microbiol*. **15**(4):297-328.
- Reizer J., Bachem S., Reizer A., Arnaud M., Sair M. H. and Stülke J. **1999**. Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis – the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiol*. **145**: 3419-3429.
- Renna M.C., Najimudin N., Winik L.R. and Zahler S.A. **1993**. Regulation of the *Bacillus subtilis* *alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *J. Bacteriol*. **175**(12):3863-3875.
- Romero, S., Merino E., Bolívar F., Gosset G. and Martínez A. **2007**. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism. *App. Environ. Microbiol*. **73**(16):5190-5198.
- Romero, S., Hernández C., Merino E., Bolívar F., Gosset G. and Martínez A. **2009**. Homolactic fermentation from glucose and cellobiose using *Bacillus subtilis*. *Microbial Cell Factories*. **8**:23.
- Saier M.H., Fagan M.J., Hoischen C. and Reizer J. **1993**. Transport Mechanisms. p.133-149. In Sonenshein, A L. (ed). *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. 1993. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Saitoh S., Ishida N., Onishi T., Tokuhiko K., Nagamori E., Kitamoto K. and Takahashi H. **2005**. Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactid acid of extremely high optical purity. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2789-92.
- Sá-Nogueira I., Nogueira T.V., Soares S. and Lecanstre H. **1997**. The *Bacillus subtilis* L-arabinose (*ara*) operon: nucleotide sequence, genetic organization and expression. *Microbiol.* **143**:957-969.
- Sá-Nogueira I. and Mota L.J. **1997**. Negative regulation of L-arabinose metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the *araR* (*araC*) gene. *J. Bacteriol.* **179**(5):1598-1608.
- Sá-Nogueira I. and Ramos S. **1997**. Cloning, fuctional analysis, and transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* *araE* gene involved in L-arabinose utilization. *J. Bacteriol.* **179**(24):7705-7711.
- Serna S.S. **1996**. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. Editorial A.G.T. S.A.
- Sharma R.C. and Schimke R.T. **1996**. Preparation of electro-competent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques.* **20**:42-4.
- Singh S.K., Ahmed S.U. and Pandey A. **2006**. Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochem.* **41**:991-1000.
- Sonenshein A.L., Hoch J.A., and Losick R. **1993**. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Steinmetz M. **1993**. Carbohydrate catabolism: pathways, enzymes, genetic regulation, and evolution. p 157-167. In Sonenshein, A L. (ed). *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. 1993. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Stephanopoulos G. **1998**. Metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng.* **58**:119-120.
- Stülke J. and Hillen. **2000**. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:849-80.
- Sutrina S.L., Reddy P., Saier M. Jr., and Reizar J. **1990**. The glucose permease of *Bacillus subtilis* is a single polypeptide chain that functions to energize the sucrose permease. *J. Biological Chem.* **265**(30):18581-18589.
- Utrilla J., Gosset G. and Martínez A. **2009**. ATP limitation in a pyruvate formate lyase mutant of *Escherichia coli* MG1655 increases glycolytic flux to D-lactate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s10295-009-0589-9.
- Valencia E.D. y Ramírez M. L. **2009**. La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos.* **73**:27-31.
- van Maris A., Abbott D.A., Bellissimi E., van den Brink J., Kuyper M., Luttik M., Wouter H., Scheffers W.A. van Dijken J. and Pronk J. **2006**. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek.* **90**:391-418.

- Tait RC, Kado C.I., Rodríguez R.L. **1983**. A comparison of the origin of replication of pSa with R6K. *Mol. Gen. Genet.* **192**(1-2):32-8.
- Ye R.W., Tao W., Bedzyk L., Young T., Chen M., Li. L. **2000**. Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* **182**:4458-4465.
- Zhou S., Causey T.B., Hasona A., Shanmugam K.T. and Ingram L.O. **2003**. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:399-407.
- Zhou S., Shanmugam K.T. and Ingram L.O. **2003**. Funtional replacement of the *Escherichia coli* D-(-)-lactate dehydrogenase gene (*ldhA*) with the L-(+)-lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2237-44.