

EFECTO DE LAS FUENTES CARBONADAS C5 Y C6 SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN *BACILLUS SUBTILIS* SUBSP. *SPIZIZENII*

Mirta E. Galelli, Silvia S. Miyazaki

Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. Departamento de Biología Aplicada y Alimentos. Área de Agroalimentos. Av. San Martín 4453, 1417 y Buenos Aires. Argentina.

miyazaki@agro.uba.ar

Introducción

Uno de los problemas que más preocupa a la Sociedad en los últimos años es la contaminación del medio ambiente por acumulación de plásticos provenientes de fuentes no renovables. Su reemplazo por plásticos biodegradables sería una forma de reducir los residuos y de preservar los recursos fósiles. Actualmente los polihidroxicarbonatos (PHAs) son producidos comercialmente utilizando bacterias Gram negativas, estas bacterias contienen endotoxinas de lipopolisacáridos (LPS), que son pirógenas para los seres humanos, por lo tanto, estos bioplásticos no podrían ser usados para insumos médicos o en contacto directo con los alimentos. Este inconveniente se evitaría con el uso de bacterias Gram positivas. Una opción es el *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, considerada generalmente segura (GRAS) por la Food and Drug Administration, los bioplásticos sintetizados por esta bacteria están libres de endotoxinas.

Por otra parte, se ha observado que en el caso de *Bacillus subtilis* se produce la liberación de enzimas proteolíticas al medio de cultivo durante la esporulación.

En el presente trabajo se estudió el efecto, de la incorporación al medio de caldo nutritivo distintas fuentes carbonadas C5 y C6, sobre la acumulación de PHAs, la liberación de enzimas proteolíticas extracelulares y la formación de esporas bacterianas.

Materiales y métodos

El inóculo de *B. subtilis* libre de plásmidos se obtuvo de un cultivo de 12h en agar nutritivo a 30°C. Se usaron medios de cultivo de caldo nutritivo con distintas fuentes carbonadas: glucosa, manitol y xilosa al 1%. Los cultivos se realizaron en erlenmeyers de 50/100ml (v/v) a 30°C ó 37°C, con agitación a 150rpm.

La esporulación en los distintos medios se determinó por el número de células viables estables después del tratamiento a 80°C durante 20 min y por coloración de esporas con verde de malaquita. Los PHAs se determinaron por espectrofotometría por formación del ácido crotónico, (DO_{235nm}). La actividad proteolítica se determinó con azocaseína (DO_{440nm}). Los datos fueron analizados con el test de ANOVA.

Resultados

Cuando la temperatura del cultivo en caldo nutritivo con la fuente carbonada C5, xilosa, se incrementó de 30°C a 37°C, se favoreció el crecimiento de *B. subtilis* 4,6 veces pero fue una temperatura desfavorable para la síntesis de PHAs, decreciendo su acumulación en 5,4 veces. En el caso de la glucosa y el manitol no se observaron mayores diferencias por efecto del incremento de la temperatura, tanto en el crecimiento como en la acumulación de PHAs.

A 30°C, la presencia de xilosa en el medio de cultivo incrementó la acumulación de PHAs en un 448% respecto del medio con glucosa y en un 244% respecto del medio con manitol. La síntesis de PHAs fue dependiente de la concentración de xilosa, en tanto que para glucosa y manitol no se observó un aumento del PHAs al incrementar la concentración de la fuente carbonada.

La síntesis de PHAs aumentó con xilosa de las 24 a las 48h, mientras que con glucosa y manitol la producción de PHAs se mantuvo constante durante ese período.

La síntesis de proteasas fue mayor con xilosa a las 48h, 15 veces respecto de glucosa y 1,4 veces mayor respecto de manitol.

El número de esporas se incrementó de 10^4 para glucosa y manitol a 10^8 UFC por ml cuando se incorporó xilosa al medio de cultivo de caldo nutritivo.

Discusión

La xilosa (C5) actuaría sobre *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* favoreciendo la liberación de proteasas y estas estarían relacionadas con la formación de esporas. Este comportamiento se observó a las 48h, mientras que, con las fuentes carbonadas C6 la liberación de proteasas fue menor observándose una menor formación de esporas. La presencia de proteasas sería necesaria para el proceso secuencial de la formación de esporas y los PHAs acumulados se utilizarían como fuentes de energía para ese proceso.

Cuando se utilizó xilosa como fuente carbonada la bacteria fue más sensible a los efectos del aumento de la temperatura de 30 a 37°C, esto estaría probablemente relacionado con la temperatura óptima de dichas enzimas involucradas en el metabolismo de la xilosa.

Conclusión

Por lo tanto, la diferencia del número de carbonos de la fuente carbonada tuvo un efecto importante en el comportamiento de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* respecto de la síntesis de PHAs, liberación de proteasas y formación de esporas.

Referencias

Flora GD, Bhatt K, Tuteja U. (2010). Optimization of culture conditions for polyhydroxybutyrate production from isolated *Bacillus* species. *J Cell Tissue Res.*; 102, 2235-2242.

Mamtesh Singh, Sanjay KS Patel and Vipin C Kalia. (2009). *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial Cell Factories*, 8,:38-49.

Schallmey, M., Singh, A. Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.*, 50, 1–17.

Shilpi Khanna, Ashok K. Srivastava. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40, 607–619

Dancer B.N. and J. Mandelstam (1975). Production and Possible Function of Serine Protease During Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 121 (2), 406-410.