

**Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada**



**EFFECTOS DE LUZ Y SALINIDAD EN LA PRODUCCION
DE B-CAROTENO EN *Bacillus sp. 13* Y SU
IDENTIFICACION FILOGENETICA**

**TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS**

RAQUEL PEDRIN CABALLERO

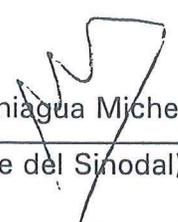
Ensenada, Baja California, Mexico. Diciembre de 2001.

TESIS DEFENDIDA POR
Raquel Pedrín Caballero
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dr. Jorge Olmos Soto

Director del Comité



Dr. Jesús Paniagua Michel

(Nombre del Sinodal)

Miembro del Comité



Dr. Alexei Licea Navarro

(Nombre del Sinodal)

Miembro del Comité



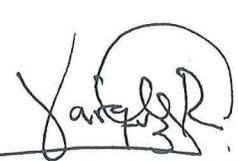
Dr. Helmut Maske Rubach

(Nombre del Sinodal)

Miembro del Comité

(Nombre del Sinodal)

Miembro del Comité



Dr. Facundo J. Márquez Rocha

Jefe del Departamento de

(Nombre del Dpto.)



Dr. Luis Alberto Delgado Argote

Director de Estudios de Posgrado

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA**



**DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA MARINA**

**EFFECTOS DE LUZ Y SALINIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE β -CAROTENO EN
Bacillus sp. 13 Y SU IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA**

TESIS

**que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para
obtener el grado de**

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA MARINA

PRESENTA

RAQUEL PEDRIN CABALLERO

Ensenada, Baja California. México. Diciembre de 2001

RESUMEN de la Tesis de **Raquel Pedrin Caballero**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS con ESPECIALIDAD en BIOTECNOLOGÍA MARINA**. Ensenada, Baja California, México. Diciembre de 2001.

EFFECTOS DE LUZ Y SALINIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE β -CAROTENO E IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE *Bacillus sp. 13*

Resumen Aprobado por:


Dr. Jorge Olmos Soto
Director de Tesis

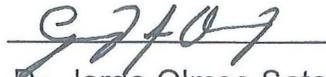
Con la finalidad de crear nuevas fuentes de producción de β -caroteno, se determinaron las condiciones óptimas de cultivo de *Bacillus sp.13*, una bacteria capaz de sintetizar este pigmento de manera natural, induciéndose un preinóculo con luz blanca y posteriormente realizando cinéticas de crecimiento con 3 condiciones de luz: luz blanca, luz azul, sin luz y como control, una cinética de crecimiento sin luz y sin la inducción del preinóculo. Utilizándose 5 concentraciones de NaCl para cada condición de luz. Se determinó que la concentración de NaCl, no afecta el crecimiento ni la producción del pigmento, sin embargo, existe un efecto por la luz utilizada en la producción de β -caroteno. *Bacillus sp. 13*, se identificó filogenéticamente por análisis de secuencia del gen 16S rDNA de mostrando una similitud del 66.9% con *Bacillus MR-4*. Posteriormente se trataron de aislar los genes que codifican para las enzimas requeridas en la biosíntesis de β -caroteno, mediante la construcción de librerías genómicas de *E. coli* DH5 α y mutagénesis generalizada utilizando el mini-transposón Tn-10. *E. coli* DH5 α no fue capaz de expresar los genes carotenogénicos de *Bacillus sp. 13* y no pudieron aislarse por mutagénesis generalizada debido a la presencia de glucosa en el medio ya que posiblemente *Bacillus sp. 13* reprima la expresión de los genes carotenoides mediante represión catabólica.

Palabras claves: *Bacillus*, β -caroteno, carotenoides, luz, salinidad, isopentenil difosfato.

ABSTRACT of the Thesis presented by **Raquel Pedrin Caballero**, as a partial requirement to obtain the **MASTER in SCIENCE** degree of **MARINE BIOTECHNOLOGY**. Ensenada, Baja California, México. Diciembre, 2001.

EFFECTS OF LIGHT AND SALINITY IN THE PRODUCTION OF β -CAROTENE AND PHYLOGENETIC IDENTIFICATION OF *Bacillus sp. 13*

Abstract approved by:


Dr. Jorge Olmos Soto
Thesis Director.

In order to create new sources of β -carotene production, optimum conditions of growth were determined for *Bacillus sp. 13*, a bacteria capable to produce this pigment in a natural manner. Induction a preinoculum was made with white light and then growth conditions with 3 lights conditions: white light, blue light, without light and as a control a kinetic growth without light and without preinoculum induction. Using 5 NaCl concentrations for each light condition. The results determined that the NaCl concentration does not affect the growth and pigment production and exists an effect because the light used in the β -carotene production. A phylogenetic identification has been made by partial sequencing analysis of 16S rDNA gene of *Bacillus sp. 13*, showing a homology of 66.9% with *Bacillus MR-4*, conclusion that they became from a common ancestor. An isolation of the genes that codify for the required enzymes of the β -carotene biosynthesis had been assayed, using a genomic library in *E. coli* DH5 α and generalized mutagenesis by mini-transposon Tn-10. *E. coli* DH5 α was unable to express the carotenogenic genes of *Bacillus sp. 13* and they could not been isolated by generalized mutagenesis due the presence of glucose in the media and is possible that *Bacillus sp. 13* repress the expression of the carotenoid genes by catabolic repression.

Key words: *Bacillus*, β -carotene, carotenoides, light, salt.

DEDICADA A:

*A LO MÁS IMPORTANTE Y VALIOSO QUE TENGO EN LA VIDA: MIS OJITOS DE
ALMENDRITA; IVANA, MI HIJA*

*A QUIENES A PESAR DE TODO SOY YO UNA PEQUEÑA PARTE DE LO MÁS
VALIOSO:
MIS PADRES*

*AL RESTO DE TODO ESTE PRECIOSO TESORO: RODRIGO, CITLALI, JUAN
CARLOS, JUAN CARLITOS, ITZEL, XOCHITL, OSCAR, ORLANDO, AIDA Y LOS
QUE VIENEN....*

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT PROYECTO 225080-5-4301PB

A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ Dr. JORGE OLMOS SOTO, Dr. JESUS PANIAGUA MICHELL, Dr. ALEXEI LICEA NAVARRO Y Dr. HELMUT MASKE RUBACH.

A CITLALI ROMERO, MARGARITA JAUREGUI E IVONNE BEST POR EL APOYO BRINDADO.

A LA Dr. ELIZABETH PONCE RIVAS POR SUS CONSEJOS Y AYUDA.

A LA Dr. BEATRIZ CORDERO POR SU APOYO.

A MIS AMIGOS, POR SU INVALUABLE AMISTAD: ROSALIA, ALEX, FAUSTO Y KARINA, GABY, MAURICIO, GALDY Y JORGE, FLORE, DARLA, YESSICA, ASUNCIÓN, DANY, CESAR ESTRADA, CESAR DE LA PEÑA, REBECA, ALEJANDRA MORA, GERARDO AMADOR Y VARINKA, CLARISSA, ANGÉLICA Y EDUARDO, TONY Y LULA, YOLI Y GISELA.

A MIS COMPAÑEROS DE MAESTRÍA Y DOCTORADO DE ACUICULTURA

A JORGE SIMENTAL Y ANSELMO POR SU ASESORÍA EN EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

A ALEJANDRO SANCHEZ POR SU ASESORÍA EN LA UTILIZACIÓN DE PAQUETERA EN EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

A ROSALIA CONTRERAS POR LA ASISTENCIA TÉCNICA

A MARIA ELENA CORONA, ALEXANDRINA CERVANTES, BIBIANA MEDINA Y CECILIA LOERA.

A DON GILBERTO, LUPITA Y DON RAFA

Y A TODOS A QUELLOS QUE POR CULPA DE MI LAGUNA MENTAL NO SEAN MENCIONADOS.

CONTENIDO

	Página
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	5
II.1 GÉNETICA MOLECULAR	7
II.1.1 EFECTOS DE LUZ	7
II.1.2 EFECTOS DE SAL	10
II.2 BIOSÍNTESIS DE PIGMENTOS	12
II.3 IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA	18
III JUSTIFICACIÓN	20
IV OBJETIVOS	21
V METODOLOGÍA	22
V.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS	22
V.1.1 OBTENCIÓN DE LA CEPA DE <i>Bacillus</i>	22
V.1.2 INDUCCIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES	22
V.1.3 CRECIMIENTO	23
V.1.4 CÁLCULO DEL TIEMPO DE DUPLICACIÓN	24
V.1.5 EXTRACCIÓN DE β -CAROTENO	24
V.1.6 CUANTIFICACIÓN DE β -CAROTENO	24
V.1.7 ANÁLISIS POR HPLC	25
V.1.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
V.2 IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA	26
V.2.1 SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S rDNA	26
V.2.2 IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA	27
V.3 ANÁLISIS DE LOS GENES DE LOS CAROTENOIDES	28
V.3.1 LIBRERÍA GENÓMICA	28
V.3.2 MUTAGÉNESIS GENERALIZADA POR Tn10	32

VI RESULTADOS	33
VI.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS	33
VI.1.1 INDUCCIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES	33
VI.1.2 CRECIMIENTO	33
VI.1.3 IDENTIFICACIÓN DE β -CAROTENO	34
VI.1.4 CUANTIFICACIÓN DE β -CAROTENO	37
VI.1.5 PRODUCCIÓN DE β -CAROTENO	42
VI.1.6 ANÁLISIS POR HPLC	42
VI.2 IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA	45
VI.3 ANÁLISIS DE LOS GENES CAROTENOGÉNICOS	49
VI.3.1 LIBRERÍA GENÓMICA	49
VI.2.1 MUTAGENESIS GENERALIZADA	51
VII. DISCUSIONES	53
VII.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CULTIVO	53
VII.1.1 CRECIMIENTO	53
VII.1.2 PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS	55
VII.2 IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA	56
VII.3 ANÁLISIS DE LOS GENES CAROTENOGÉNICOS	58
VIII. CONCLUSIONES	60
IX. PERSPECTIVAS	61
X. REFERENCIAS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de carotenoides. Se muestran las estructura de β -caroteno, el cual representa a los carotenoides hidrocarbonados y la estructura de la cantaxantina que representa a las xantófilas, las cuales son carotenoides que contienen oxígeno.	2
2	Tipos de radiación electromagnética, cada tipo de radiación se dispersa en un intervalo específico de longitudes de onda y frecuencias. La luz visible corresponde al intervalo de longitudes de onda desde 400 nm (Violeta) a 700 nm (Rojo).	6
3	Rutas biosintéticas para la producción de carotenoides en eubacterias.	15
4	Rutas biosintéticas para la síntesis de xantofilas glucosiladas.	16
5	Curva de Calibración de β -caroteno	25
6	Plásmido pUC19, muestra el sitio múltiple de clonación y el gen que codifica para la β -galactosidasa	30
7	Plásmido pHV1249 que contiene la secuencia Tn-10, secuencia del plásmido pBR22, secuencia del plásmido pE194ts y los sitios de restricción para <i>Nco I</i> , <i>Eco RI</i> y <i>Sst I</i> . Resistencia a cloranfenicol, Ampicilina y Eritromicina	32
8	Inducción para la producción de β -caroteno por <i>Bacillus sp.</i> 13	34

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
9	Densidad óptica de <i>Bacillus</i> sp. 13 en diferentes condiciones de luz y concentraciones de NaCl.	35
10	Espectrogramas de A) Solución estándar de β -caroteno en metanol absoluto grado HPLC y B) Extracción de β -caroteno en metanol absoluto grado HPLC de una muestra de LB4 crecido sin luz y colectado en t7.	39
11	Producción de β -caroteno con diferentes condiciones de luz y diferentes concentraciones de NaCl.	40
12	Cromatogramas de HPLC de A) estándar de β -caroteno y B) Una extracción de <i>Bacillus</i> sp. 13 con medio LB1 colectado en t4.	44
13	A) Fragmentos obtenidos de la reacción en cadena de la polimerasa del gen 16S rDNA y B) Secuencia obtenida de las primeras 500pb del gen 16S rDNA de <i>Bacillus</i> sp. 13 en sentido 5'.	46
14	Alineamiento realizado en el programa BLAST.	47
15	Arbol filogenético de especies del género <i>Bacillus</i>	48
16	A). Detección de ADN cromosomal, B) Detección de ADN plasmídico y C) Digestión de DNA cromosomal.	50
17	Obtención de ADN plasmídico de pSG 35.1, pHV1249 y pUC19.	52

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Oligonucleótidos utilizados para la identificación filogenética	27
II	Tiempo de duplicación en horas de <i>Bacillus sp.</i> 13	37
III	Producción de β -caroteno	42

I. INTRODUCCIÓN

Los carotenoides constituyen una de las familias de pigmentos naturales más importantes, cuya coloración va desde el amarillo hasta el rojo. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y están asociados a mecanismos de protección, reproducción y transferencia de energía (Rodríguez *et al.*, 1998). Su estructura química es la de un tetraterpeno constituido por unidades múltiples de isopreno (fig.1); se conocen dos tipos de carotenoides: carotenos y xantofilas, los primeros no contienen oxígeno en sus anillos terminales a diferencia de las xantofilas (Rodríguez *et al.*, 1998).

Los carotenoides son utilizados en la industria alimenticia para dar coloración a carnes y productos lácteos (Spears, 1988). En acuicultura se han utilizado ampliamente al suplementar las dietas para dar coloración a la carne de crustáceos y peces como el salmón (Barbosa *et al.*, 1999). En medicina se han propuesto como agentes preventivos de cáncer, úlceras y enfermedades cardiovasculares (Craft y Soares, 1992), además de reducir niveles totales de colesterol, estimular el sistema inmune, prevenir ciertos desórdenes de fotosensibilidad y elevar el número de células CD4⁺ en pacientes con SIDA (Coodley *et al.*, 1996).

Los microorganismos y plantas utilizan a los carotenoides como protección contra la acción fotodinámica (Tuvenson *et al.*, 1988), por lo que una de las principales funciones de estos pigmentos en todos los organismos fotosintéticos

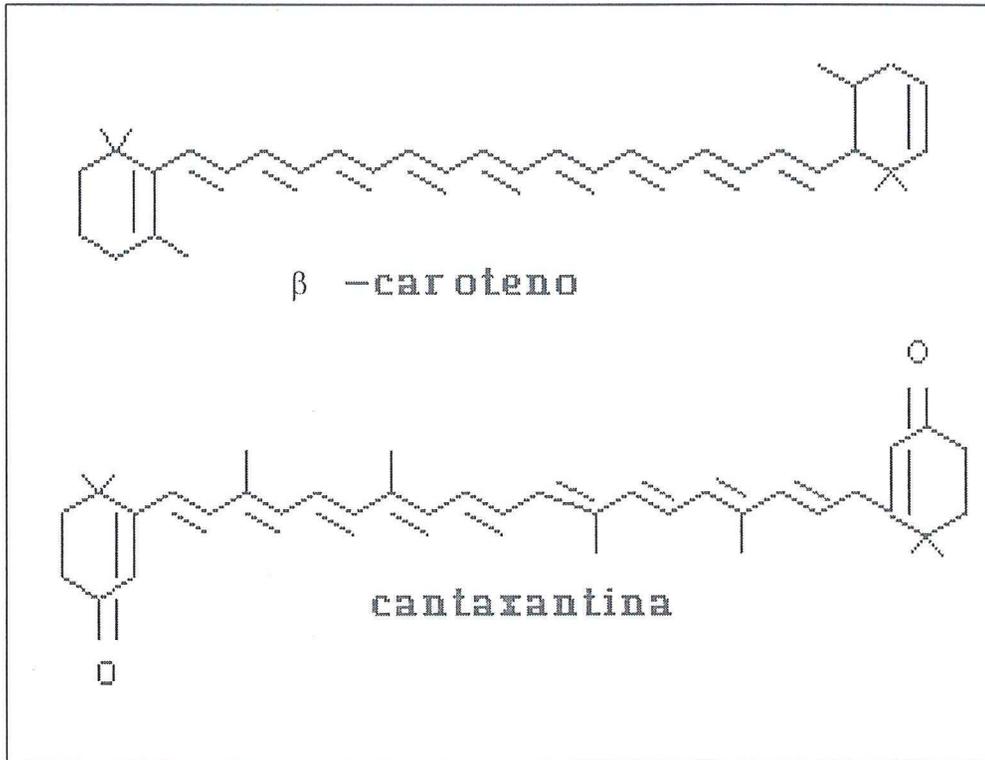


Figura 1. Estructura de carotenoides. Se muestran las estructuras del β -caroteno, el cual representa a los carotenoides hidrocarbonados y la estructura de la cantaxantina que representa a las xantofilas, las cuales son carotenoides que contienen oxígeno.

incluyendo bacterias fotosintéticas anoxigénicas y cianobacterias, es la de proveer protección fotooxidativa contra el daño potencial que produce la combinación de oxígeno, luz y moléculas fotosensoras como las bacterioclorofilas o clorofilas, por la extinción del estado excitado triplete de las moléculas fotosensoras y del estado excitado singulete del oxígeno. (Armstrong, 1997).

Se ha sugerido que los microorganismos no fotosintéticos, sintetizan carotenoides para ofrecer una protección fotooxidativa similar al de los organismos fotosintéticos, contra otras moléculas fotosensoras que se acumulan en sus células (Buchard 1966, Armstrong 1997). Algunos ejemplos de estas moléculas

fotosensoras son citocromo C en *Sarcina lutea* (Mathews y Siström, 1960), protoporfirina IX en *Mixococcus xanthus* (Gorgam *et al.*, 1996) y aún cuando *Escherichia coli* no es una bacteria carotenogénica, produce compuestos relacionados con porfirinas que pueden servir como fotosensores (Sammato y Tuvenson, 1987).

En algunas especies de *Bacillus* se ha observado una coloración que indica la producción de dichos pigmentos y varias de las especies de *Bacillus* encontradas en sedimentos marinos forman colonias amarillas, anaranjadas-café o rojas (Sneath, 1986). Pedrin-Caballero (1999), aisló tres especies de *Bacillus* en un estuario marino y en el análisis cualitativo determinó la presencia de diferentes pigmentos carotenogénicos, entre los que sobresale β -caroteno.

Se ha observado que existen factores que inducen la biosíntesis de los carotenoides como la luz, ya que produce la síntesis de novo de una o más enzimas en la ruta de la biosíntesis de carotenoides, estos fotosensores absorben la luz azul, regulando la biosíntesis de estos pigmentos (Harding y Shropshire, 1980). Otro inductor como el NaCl además de la luz, se ha determinado en *Dunalliella salina*, ya que este compuesto incrementa los niveles de carotenoides en sus células (Sasson, 1997).

Debido a la gran diversidad del género *Bacillus*, cepas de nuevas especies son continuamente aisladas y descritas (Priest, 1993), lo que hace necesario identificar esta nueva especie con técnicas más precisas y establecer su filogenia con especies de este género.

En este sentido, en este trabajo se determinaron las condiciones óptimas de cultivo para la mayor producción de β -caroteno con diferentes condiciones de luz y diferentes concentraciones de NaCl, así como la identificación filogenética de *Bacillus* sp. 13 aislado de un estuario marino.

II. ANTECEDENTES

Un pigmento es una molécula que contiene un grupo cromóforo, responsable de absorber la luz y por lo tanto presenta color. La absorción de la luz es el primer paso necesario en cualquier proceso fotobiológico (Gregory, 1989).

La fotosíntesis comienza con 3 procesos: absorción, transferencia de energía y separación de cargas primarias que constituyen las llamadas reacciones de luz de la fotosíntesis. Para el entendimiento de las reacciones de luz se requiere de un entendimiento de la naturaleza de la luz (Falkowsky y Raven, 1997). La luz es radiación electromagnética compuesta por oscilaciones magnéticas y eléctricas perpendiculares y se propaga con una velocidad de 3×10^8 m/s. La energía emitida de la luz del sol no es continua, pero su energía es emitida en frecuencias discretas a lo largo de un gran rango de longitudes de onda, desde emisiones gamma y rayos X de alta energía, a través de ultravioleta, visible e infrarrojo, hasta ondas de radio de baja energía (fig 2). La región visible corresponde la región entre los 400 y 700nm y es la región donde los colores son percibidos por el ojo humano, donde la longitud de onda menor dentro de esta región es percibida como color violeta y la mayor longitud de onda es percibida como roja, (Falkowsky y Raven, 1997).

Los carotenoides representan un gran grupo de cromóforos debido al sistema conjugado de doble enlaces y a los anillos contenidos en sus moléculas, que permiten la interacción con fotones de longitudes de onda de la región visible,

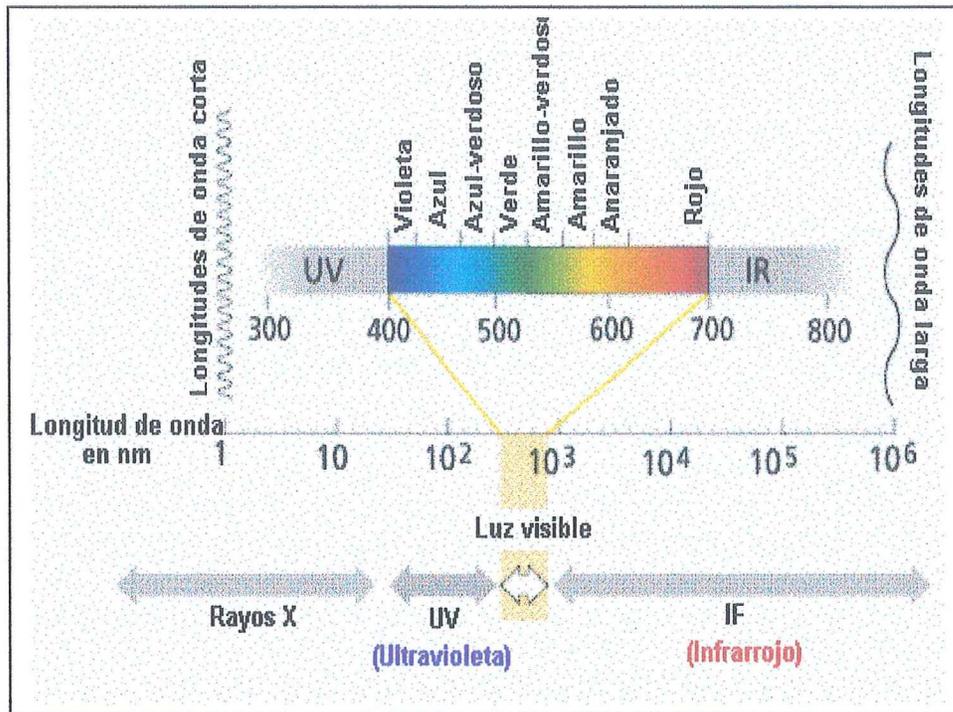


Figura 2. Tipos de radiación electromagnética, cada tipo de radiación se dispersa en un intervalo específico de longitudes de onda y frecuencias. La luz visible corresponde al intervalo de longitudes de onda desde 400 nm (Violeta) a 700 nm (Rojo) www.forestal.uchile.cl/cursos/fivegf/fotosintesis.htm

Espectralmente, los carotenoides despliegan bandas de absorción en la región del azul y/o la región azul-verde, que parcialmente se trasponen con la banda de Soret de la clorofila y dependiendo de la naturaleza de la trasposición, facilita la transferencia de la energía o remueve la excitación de la energía de las clorofilas. (Falkowsky y Raven, 1997).

La banda de Soret se refiere a bandas de absorción azul, relacionadas con porfirinas y clorofilas, es encontrada en todos los tetrapirroles conjugados, compuestos que forman las moléculas de clorofila (Falkowsky y Raven, 1997).

II. 1 GENÉTICA MOLECULAR

II.1.1 EFECTOS DE LUZ

El primer estudio genético molecular de la biosíntesis de los carotenoides, fue en la bacteria fotosintética anoxigénica *Rhodobacter capsulatus*, en donde identificaron un "cluster" de 50 kilobases que codifica para muchas de las enzimas requeridas en la fotosíntesis, incluyendo las requeridas para la síntesis de bacterioclorofilas y carotenoides. En esta especie se caracterizaron 7 genes (*crtA*, *crtB*, *crtC*, *crtD*, *crtE*, *crtF* y *crtI*) que codifican para las enzimas necesarias en la producción de esferoideno y esferoidenona (Armstrong *et al.*, 1989). El esferoideno y la esferoidenona son isoprenoides de 40 carbonos con un grupo aldehído y un grupo cetona respectivamente. (Britton y Riesen, 1995).

Poco se sabe acerca de los mecanismos reguladores en la regulación por luz en *Rhodobacter* spp. (Gregor y Klug, 1999). Se ha establecido que además de las bacterioclorofilas existen otras moléculas capaces de censar la señal de luz, en cultivos crecidos en luz azul. Buggy *et al.*, (1994), describió el gen *hvr A* durante la transcripción activada en baja intensidad de luz. Tampoco se conoce cómo es la transmisión de la señal de la luz a la proteína HvrA o SPB, las cuales pueden unirse a secuencias "upstream" del operón fotosintético y activar la transcripción de los genes fotosintéticos.

En *Mixococcus xanthus*, una bacteria no fotosintética, la síntesis de carotenoides es inducida por luz azul, el fotosensor de la carotenogénesis es protoporfirina IX, un precursor del grupo hemo sin un átomo de hierro (Gorgam *et*

al., 1996). Existen cuatro grupos de genes no relacionados en el cromosoma de *M. xanthus* responsables de la carotenogénesis y su regulación. Dos de estos grupos de genes, son los genes estructurales que codifican para las enzimas responsables de la biosíntesis de mixobactona. Fitoeno deshidrogenasa es codificada por el gen *carC* y los genes que codifican enzimas para la síntesis de fitoeno, la ciclización de licopeno la hidroxilación de neurosporeno y otro pasos biosintéticos están localizados en la región *carB-carA*. (Gorgam *et al.*, 1996).

Tres "loci" genéticos no relacionados han sido identificados y son necesarios para la regulación por luz y la expresión de los genes estructurales en esta especie. El operón *carQRS* consiste en tres genes acoplados traducionalmente que controlan la regulación por luz del regulón *car*. El promotor del operón requiere de CarQ, Car R es una proteína de membrana y Car S es un péptido pequeño que es requerido para la expresión de *carB*.

En la oscuridad, CarQ y CarR, generados por bajos niveles de transcripción del operón *carQRS*, son secuestrados en la membrana. Cuando la luz azul interactúa con el fotosensor protoporfirina IX genera una señal que permite la degradación de CarR, por lo tanto CarQ es liberado y puede unirse al núcleo de la RNA polimerasa para activar la transcripción del operón *carQRS* y el gen *carC*. la activación del operón *carQRS* permite la formación de nuevo CarQ, CarR y CarS. El nuevo CarR es destruido por la señal inducida por luz. El carQ libre activa más *carQRS* y *carC*. CarS, junto con el producto del gen *carA* activa la transcripción de "cluster" *carB*. La activación de *carB* y del gen *carC* permite la producción de mixobactona y carotenoides relacionados. (Gorgam *et al.*, 1996).

Aún cuando los efectos que produce la luz en la biosíntesis de los carotenoides no se han estudiado en todas las bacterias no fotosintéticas, se han determinado los genes que los producen en algunas especies, por ejemplo: los genes de los carotenoides del género *Erwinia* han sido clonados en *E. coli*, la cual ha sido capaz de expresar todos los genes *crt* de *Erwinia*. El sistema *Erwinia-E.coli* provee herramientas para el aislamiento y el análisis funcional in vivo de otros genes *crt* eubacteriales. La agrupación de los genes *crt* en este género es: *crtB*, *crtE*, *crtl*, *crtX*, *crtY* y *crtZ*; y codifican para las enzimas requeridas en la síntesis de zeaxantina y criptoxantina glucósido (Armstrong, 1997). Las secuencias comparadas entre *Erwinia herbicola*, *E. uderovora* y *R. Capsulatus*, permitió identificar que *crtB*, *crtE* y *crtl* son genes con alto porcentaje de homología (Armstrong, 1997).

Los principales carotenoides sintetizados por *Agrobacterium aurantiacum* bajo diferentes condiciones son adinoxantina y astaxantina (Yokoyama, 1995), los genes que codifican para estos pigmentos (*crtB*, *crtl*, *crtW*, *crtY* y *crtZ*) fueron clonados para alterar la pigmentación en el sistema *Erwinia-E. coli*. La importancia de este trabajo fue la identificación de un nuevo gene *crtW* en *A. aurantiacum* (Misawa *et al.*, 1995).

Por otra parte se ha determinado la producción de estafiloxantina en *Staphylococcus aureus*, una bacteria filogenéticamente relacionada con el género *Bacillus*. Un fragmento de DNA de 3.5 Kb fue identificado después de ser clonado en *E.coli* y *S. carnosus* confiriéndoles capacidad para producir el intermediario 4,4'-diaponeurosporeno. La secuencia de este fragmento reveló dos marcos de

lectura abiertos que codifican para dos proteínas hidrofóbicas de 254 aminoácidos (CrtM) y 448 aminoácidos (CrtN). CrtM presentó homología con fitoeno sintasa (CrtB) de *Synechococcus* y con escualeno sintasa de *E. herbicola*. CrtN tuvo similaridad con las fitoeno desaturasas de *R. capsulatus* y *E. herbicola* (Wieland *et al.*, 1994).

II.1.2 EFECTOS DE SAL

El género *Dunalliella* comprende muchas especies de algas verdes unicelulares, las cuales son marcadamente adaptables a la salinidad. Paniagua *et al.*, 1995 confirmó que en *Dunalliella bardawil* la carotenogénesis es incrementada por altas intensidades de luz y altas concentraciones de cloruro de sodio. La capacidad de las células de *Dunalliella* para adaptarse en altas concentraciones de NaCl, es debido a la acumulación de glicerol, que juega el papel de osmoregulador. Así mismo se ha determinado una proteína de 150 Kilodaltones la cual es responsable de la adaptación de *D. salina* a altas concentraciones de sal. Es una proteína de membrana cuyas cantidades se incrementan con la salinidad en el medio de cultivo (Sasson, 1997). *Dunalliella* contiene clorofilas a y b y un amplio contenido de carotenoides y xantofilas incluyendo β -caroteno, α -caroteno, cis-gamma-caroteno, luteína, luteína-5,6-epoxido, anteraxantina, violaxantina, zeaxantina y neoxantina. (Sasson, 1997).

Las bases fisiológicas para la adaptación a altas salinidades han sido estudiadas en muchas Cianobacterias, esto implica la expresión de un gran

conjunto de proteínas de stress a sal (Zuther *et al.*, 1998). Los genes que codifican enzimas involucradas en el proceso de exportación de iones como citocromos oxidasa han sido clonados y funcionalmente caracterizados. Para la identificación de los genes necesarios en el proceso de adaptación de sal, la generación de mutantes fue necesaria en *Synechocystis* sp. PCC 6803, en la cual se determinó que el gen *gcp* es responsable de la adaptación en ambientes hipersalinos y que la mutación de este gen reduce la tolerancia en estos ambientes e incrementa el contenido de pigmentos carotenoides. (Zuther *et al.*, 1995).

En el género *Bacillus* se ha estudiado el stress causado por ambientes salinos (Kunst, 1995) que estimulan la expresión del gen *sac B* que codifica para una levansucrasa y regula la expresión del gen *aprE* que codifica para una proteasa alcalina. *Bacillus subtilis* posee respuestas reguladoras globales que le permiten a la célula adaptarse a cambios en condiciones ambientales. El sistema de dos componentes está compuesto por un sensor quinasa y reguladores respuesta que juegan un papel importante en regular la respuesta global. En *Bacillus subtilis* el sistema de dos componentes DegS-DegU y ComP-CompA controlan la expresión de genes de competencia así como la síntesis de enzimas degradativas, incluyendo proteasas intracelulares y muchas enzimas las cuales son secretadas al medio de cultivo como levansucrasas, glucanasas, amilasas, xilanasas y proteasas. El crecimiento durante stress en sal en un medio de cultivo conteniendo cloruro de sodio 1M, permite la expresión nueve veces más de la expresión de *sacB*. Una hipótesis generada de este trabajo es que debido a la

señal de stress a sal, la señal es transducida vía el sistema DegU-DegS permitiendo la estimulación de la expresión de *sacB*. (Kunst, 1995).

II.2 BIOSÍNTESIS DE PIGMENTOS

Las eubacterias poseen un sistema genético discreto para la conversión de fitoeno a β -caroteno el cual requiere de los genes *crt* (Armstrong, 1997).

La biosíntesis de los carotenoides en *R. capsulatus* y *R. sphaeroides* inicia con 2 adiciones sucesivas de isopentenil pirofosfato (IPP) a geranil pirofosfato (GPP) y farnesil pirofosfato (FPP), para producir geranilgeranilpirofosfato (GGPP) (Armstrong, 1997). Las primeras reacciones bioquímicas dan la formación de fitoeno al condensar dos moléculas de GGPP catalizadas por fitoeno sintetasa (CrtB), seguida de la desaturación mediada por las proteínas relacionadas estructuralmente CrtI y CrtD, la hidratación catalizada por CrtC, la metilación por CrtF y la adición de grupos oxo catalizada por CrtA (fig 3).

En el género *Erwinia*, la ciclización es llevada a cabo por CrtY, la hidroxilación por CrtZ y la glucosilación catalizada por CrtX (fig 4). El gen *crtW* es requerido para la adición de un grupo oxo a carotenoides cíclicos y xantofilas. El patrón biosintético resultante para la síntesis de astaxantina a partir de GGPP sugiere que CrtZ es una β -caroteno hidroxilasa y CrtW una β -caroteno oxidasa los cuales pueden aceptar diferentes sustratos (Armstrong, 1997).

En *Staphylococcus aureus* se ha sugerido que la biosíntesis de los carotenoides inicia con la condensación de dos moléculas de farnesyl difosfato,

por la acción de dehidroescualeno sintetasa (CrtM) para formar dehidroescualeno, que después es deshidrogenado por una desaturasa (CrtN) (Wieland *et al.*, 1994).

E. coli contiene isoprenoides como isopentenyl tRNA y quinonas isoprenoides, en donde el inicio de la formación de varios isoprenoides es una reacción que utiliza FPP o IPP y FPP. Las concentraciones de estos últimos influyen en la tasa de síntesis de varios isoprenoides. Esta bacteria tiene el gene *ispA* que codifica para farnesil pirofosfato (FPP) sintetasa, el cuál tiene un alto porcentaje de homología con el gene *crtE* que es responsable de la síntesis de fitoeno a partir de prefitoeno difosfato. Debido ha esto, ha sido posible la expresión de los genes *crt* y el estudio de la biosíntesis de los carotenoides (Shingo *et al.*, 1990), de aquí que algunos estudios se llevaron a cabo con el fin de sobreproducir pigmentos carotenogénicos en cepas de *E. coli* utilizando genes exógenos de isopentenil pirofosfato (IPP) isomerasas, obteniéndose buenos resultados (Kajiwra *et al.*, 1997). Otro sistema de sobreproducción fue la transformación de *E. coli* con el plásmido pACYC que contiene los genes que intervienen en la producción de zeaxantina (Ruther *et al.*, 1997).

Una aportación importante en la determinación de la ruta biosintética de los carotenoides ha sido que *E. coli* utiliza un patrón independiente a mevalonato para la síntesis de isopentenil difosfato, mostrando que la primera reacción de este patrón consiste de la condensación de hidroxietil tiamina, derivada de piruvato, produciendo D-1-deoxylulosa -5-fosfato, el cuál es formado por una enzima D-1-deoxyxylulosa-5-fosfato sintetasa, codificada por el gene *dxs* que forma parte del operón que contiene a *ispA* y que pertenece a una familia de transcetolasas (Lois

et al., 1998). Se han identificado los genes *idi* de *E. coli* y *gps* de *Archeoglobus fulgidus* que codifican para una isopentenil difosfato isomerasa y una geranylgeranyl pirofosfato sintetasa respectivamente, los cuales junto con el "cluster" de *A. aurantiacum* fueron clonados en *E. coli* para producir astaxantina, produciendo 50 veces más que los valores establecidos anteriormente (Wang *et al.*, 1999).

En otro estudio *E. coli* fue transformada con genes *dxps* clonados de *Bacillus subtilis* y *Synechocystis sp. 6803*, incrementando los niveles de licopeno así como los niveles de ubiquinona-8, este incremento se debió al mejoramiento de la actividad de DXPS sintetasa en las cepas recombinantes de *E. coli* (Harker y Bramley, 1999).

Por lo que en este trabajo se espera que los efectos de luz y salinidad, incrementen la producción de β -caroteno en *Bacillus sp. 13*.

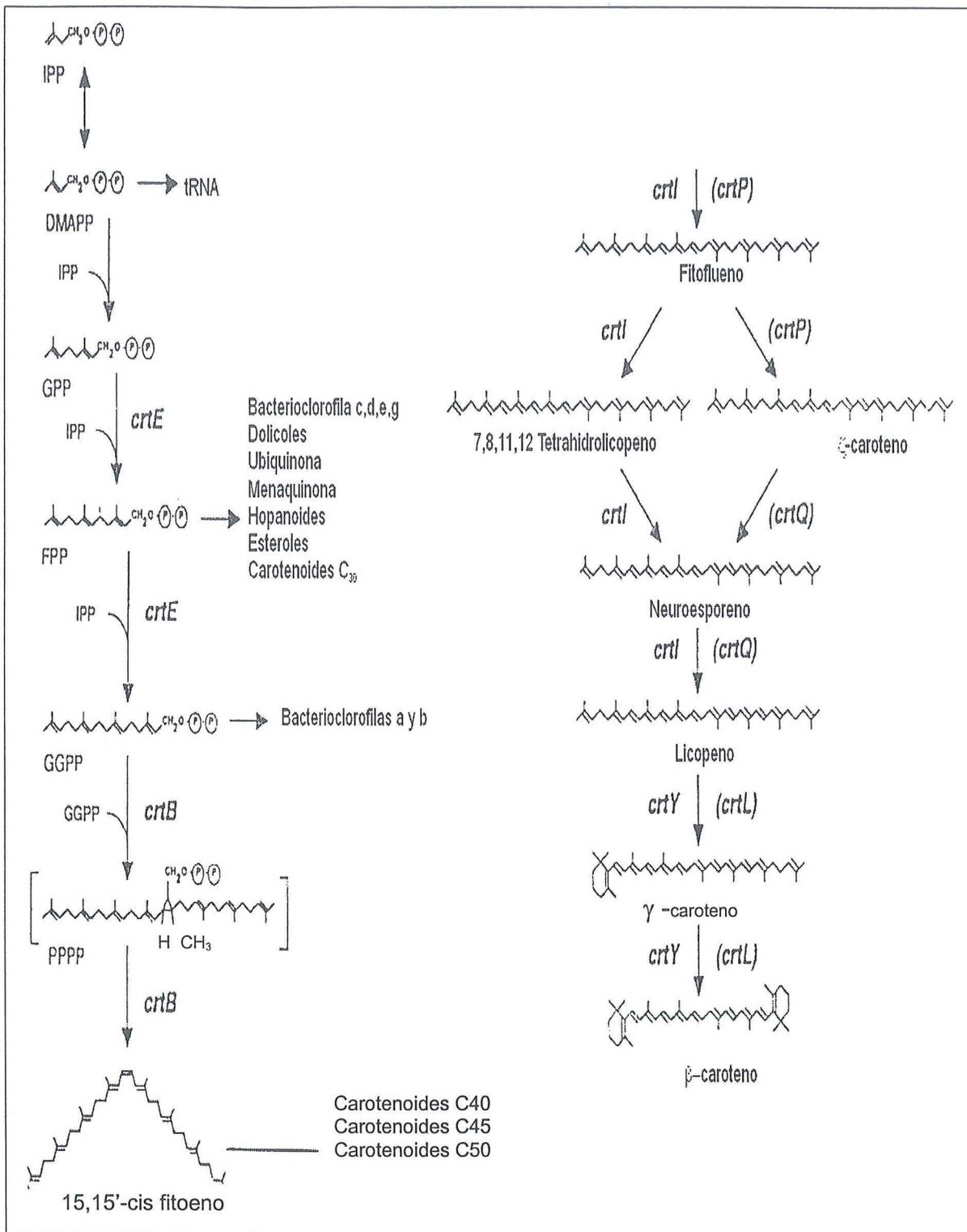


Figura 3. Ruta biosintética para la producción de carotenoides en eubacterias (Armstrong, 1997). Algunos productos adicionales se encuentran en otras eubacterias. Dimetilalilpirofosfato (DMAPP), farnesil pirofosfato (FPP), Geranil pirofosfato (GPP), Geranilgeranilpirofosfato (GGPP), isopentenil pirofosfato (IPP), prefitoeno pirofosfato (PPPP).

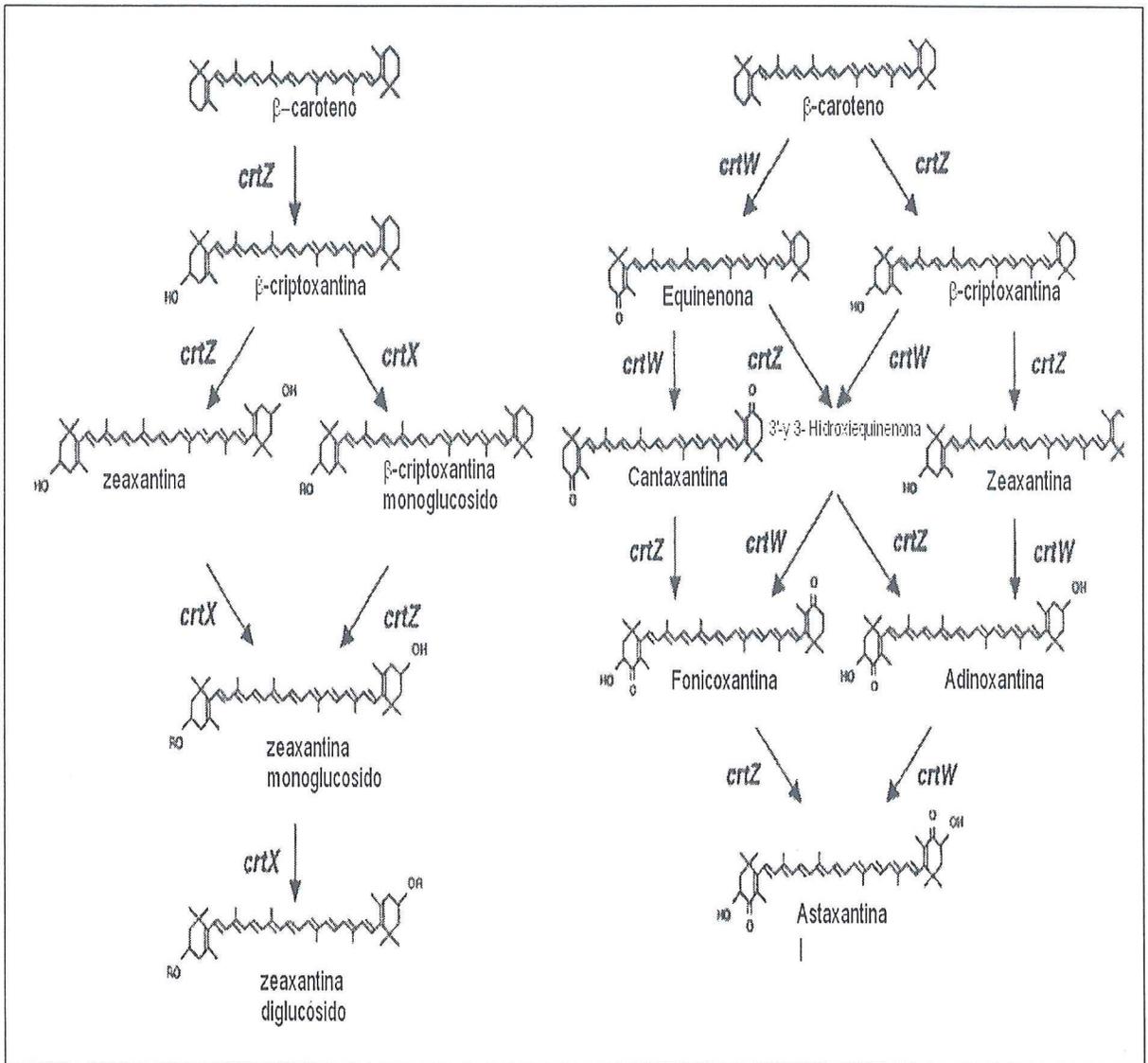


Figura 4. Rutas biosintéticas para la síntesis de xantofilas glucosiladas. Especies de *Erwinia*, dan como producto final zeaxantina glucosilada, y *A. aurantiacum* sintetiza astaxantina (Armstrong, 1997). **CrtX** : β -carotenglucosidasa, **CrtZ**: β -caroten hidroxilasa y **CrtW**: β -caroten oxidasa

Las especies gram negativas contienen quinonas y menaquinonas como parte de sus componentes redox en la cadena respiratoria, difiriendo de las bacterias gram positivas que solo contienen menaquinona. En el caso particular de *B. subtilis* la formación de menaquinona-7 es incrementada al inicio de la esporulación y una deficiencia de ella la bloquea, por lo que menaquinona está presente tanto en esporas como en células vegetativas a niveles comparables (Taber, 1993). Esto puede estar relacionado con la producción de carotenoides en especies de *Bacillus*, ya que en células vegetativas de *Bacillus megaterium* se encontró un pigmento amarillo correspondiente a un caroteno, el cual fue precursor de un pigmento rojo presente en la endospora, sintetizado entre T2 y T3 del proceso de esporulación, permaneciendo durante la germinación. De lo que se deduce que *B. megaterium* sintetiza un pigmento amarillo durante el crecimiento vegetativo y otro pigmento rojo durante la esporulación. Por lo que sugieren que el pigmento rojo funciona como estabilizador de membrana en la espora y que podría ser importante en las propiedades de resistencia de las esporas y que el pigmento amarillo de la célula vegetativa es utilizado para el proceso de germinación y crecimiento (Mitchell *et al.*, 1986).

A pesar de que *B. subtilis* no produce carotenoides en forma natural, cuenta con el gene *gerC3* que utiliza para la síntesis de menaquinona y que tiene homología con el gene *crtE* de *R. capsulatus* (Armstrong, 1993), además de un gene *dxsp* que codifica para D-1-deoxixilulosa-5-fosfato sintetasa, involucrado en la formación de D-1-deoxilulosa-5-fofato en *E. coli*, que pueden ser aprovechados

para la expresión de los genes *crt* en *B. subtilis*, bajo sistemas de regulación conocidos.

En un trabajo realizado por Pedrin-Caballero (1999), se determinó que la producción de β -caroteno en una especie marina del género *Bacillus* fue durante T3 a T6, es decir de las 9 a las 12 horas de crecimiento, esto coincide con los resultados de Mitchell *et al.*, (1986) y con la síntesis de menaquinona al inicio y durante la esporulación.

II.3 IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA

Tradicionalmente una especie comprende un grupo de cepas que muestran un alto grado de características fenotípicas similares. Actualmente las ramas evolutivas de los árboles filogenéticos de *Bacillus* y de géneros relacionados son derivados enteramente de secuencias de 16S rDNA (Priest, 1993).

De acuerdo con el criterio actual basado en el 16S rRNA, el árbol filogenético de bacterias contiene al menos 18 líneas principales de descendientes tradicionalmente llamados phyla, recientemente llamados división. En general, solo un número limitado de genes (menos de 40) están presentes en todos los genomas disponibles y que comparten suficiente similitud para ser reconocidos y utilizados como marcadores potenciales para investigaciones filogenéticas debido a su amplia distribución, constancia funcional, estabilidad genética y un número razonable de regiones o posiciones que evolucionaron independientemente. Otro requisito que deben cumplir es que tales marcadores puedan generar una base de

19

datos de secuencias, describiendo un amplio espectro de organismos diversos filogenéticamente. (Ludwing y Schleifer, 1999).

La sistemática del género *Bacillus* ha entrado en una fase interesante. Las demandas de las industrias biotecnológicas para nuevos productos han permitido el aislamiento de muchas bacterias nuevas. Esto ha estimulado el interés en la ecología y los hábitats de estos organismos. Muchas de estas nuevas especies tiene propiedades interesantes no asociadas usualmente con él genero *Bacillus*. El interés en la sistemática y ecología de *Bacillus* se ha generado por el uso de cepas recombinantes en la industria (Priest,1993).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran aplicación de los carotenoides en la industria alimenticia y farmacéutica, uno de los propósitos en el campo de la biosíntesis de carotenoides es el desarrollo de nuevas estrategias para su producción (Armstrong, 1997). En este sentido, bacterias Gram positivas como las del género *Bacillus* consideradas como GRAS, es decir, no patógenas al hombre, fáciles de manipular genéticamente, buenos secretores de metabolitos secundarios y fáciles de cultivar en medios relativamente baratos (Arbige *et al.*, 1993), en este sentido, *Bacillus* sp. 13 representa una alternativa económica al producir β -caroteno de manera natural y de tener tiempos de replicación mas cortos, con respecto al género *Dunaliella* para la producción de estos metabolitos a escala comercial, ya que *Dunaliella* requiere de altas intensidades de luz para producirlos (Borowitzka y Borowitzka, 1988),

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones óptimas de cultivo para la producción máxima de β -caroteno y establecer la relación filogenética de la especie productora (*Bacillus sp.* 13)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Realizar el crecimiento de *Bacillus sp.*13 con 2 condiciones de luz y 5 concentraciones diferentes de NaCl.
- 2) Identificar los carotenoides producidos durante el crecimiento.
- 3) Secuenciar las primeras 500 pb del gen 16S rDNA de *Bacillus sp.*13 y determinar su filogenia.
- 4) Aislar los genes relacionados con la producción de β -caroteno mediante librería genómica y mutagénesis generalizada.

V. METODOLOGÍA

V.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS

V.1.1-OBTENCIÓN DE LA CEPA DE *BACILLUS*

La cepa de *Bacillus sp.* (13) se obtuvo de un cepario de especies de *Bacillus* almacenado a -70°C , en el laboratorio de Microbiología Marina, del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (Pedrin-Caballero, 1999), se sembró una asada en medio LB sólido, se incubó a 37°C durante 24 horas en estufa LABLINE IMPERIAL II.

V.1.2- INDUCCIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES.

Las colonias obtenidas se expusieron a irradiación con luz blanca, provista de una fuente compuesta por 6 lámparas de 75 watts General Electric, con una intensidad promedio de 4.62×10^{16} cuantos $\text{seg}^{-1} \text{m}^{-2}$ durante 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se transfirió una colonia en 20 ml de LB líquido y se incubó en baño maría NESLAB EXACAL EX-700 con una agitación de 3.5 osc/min a 37°C durante 12 horas con una intensidad de luz de 4.62×10^{16} cuantos $\text{seg}^{-1} \text{m}^{-2}$, provista de una fuente compuesta por 6 lámparas de 75 watts General Electric para inducir el preinóculo.

Como control negativo se creció la cepa sin inducir en medio LB sólido y sin inducir el preinóculo, incubando a 3.5 osc/min a 37°C durante 12 horas.

V.1.3- CRECIMIENTO

El crecimiento de *Bacillus* sp. 13 se realizó en medio Luria-Bertani en diferentes concentraciones de cloruro de sodio grado analítico: LB1 (9.4mM NaCl), LB2 (94 mM NaCl), LB3(180mM NaCl), LB4 (370mM NaCl) y LB5 (500mM NaCl) y en 3 condiciones de luz: en ausencia de luz, luz blanca (400 a 700 nm) provista por 6 lámparas de 75 watts y luz azul (400 a 500 nm) cuya fuente fue la anteriormente descrita además de una pantalla de acrílico azul, y un experimento de crecimiento con el control negativo de la inducción del preinóculo en ausencia de luz. Sin la utilización de foto período a 37° C.

Se transfirió una alícuota del preinoculo para tener un inoculo de 0.2 D.O en 20 ml de medio LB1, LB2, LB3, LB4 y LB5, se incubaron en baño maría a 3.5 osc/min a 37°C, se expusieron a las diferentes condiciones de luz arriba descritas. El crecimiento se determinó cada hora a partir del inóculo al hacerse una dilución 1:10 (v/v) de los cultivos, se registró la densidad óptica analizada en un espectrofotómetro a 600nm.

Se colectó 1 ml de muestra de t4 a t8 de la fase estacionaria. Se centrifugaron a 12,000 g's, se descartó el sobrenadante y el botón celular se guardó a -20°C para la extracción de pigmentos.

V.1.4-CÁLCULO DEL TIEMPO DE DUPLICACIÓN (G).

El inicio de la fase exponencial se estimó cuando el tiempo de duplicación (G) se incrementaba considerablemente y se determinó mediante las formulas:

$$K=(\log_{10}N-\log_{10}N_0)/t$$

$$G=\log_{10}2/K$$

Donde K = tasa de crecimiento específico, N_0 es la densidad óptica inicial, N la densidad óptica final y t el tiempo entre ambas. (Arellano-Carbajal, 1999).

V.1.5-EXTRACCIÓN

Las muestras se lavaron con 1ml de una solución fisiológica de NaCl al 0.9% (p/v) y se adicionó 1 ml de metanol absoluto grado HPLC durante 1 hora (Wieland *et al.*, 1994), agitando suavemente cada 15 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 5,000 g, se separó el extracto, mismo que se analizó en un espectrofotómetro UV/VIS Hewlett Packard, de 400 a 500nm (Pedrin-Caballero, 1999).

V.1.6.-CUANTIFICACIÓN DE β -CAROTENO PRODUCIDO

Se prepararon 5 soluciones de β -caroteno (Sigma) en metanol grado HPLC al 100% cuyas concentraciones fueron 2, 4, 6, 8 y 10 μ g/ml. Estas se calibraron a 450 ± 1 nm en el espectrofotómetro de barrido UV/VIS Hewlett Packard 8453 y se cuantificó el β -caroteno extraído de las muestras (fig 5).

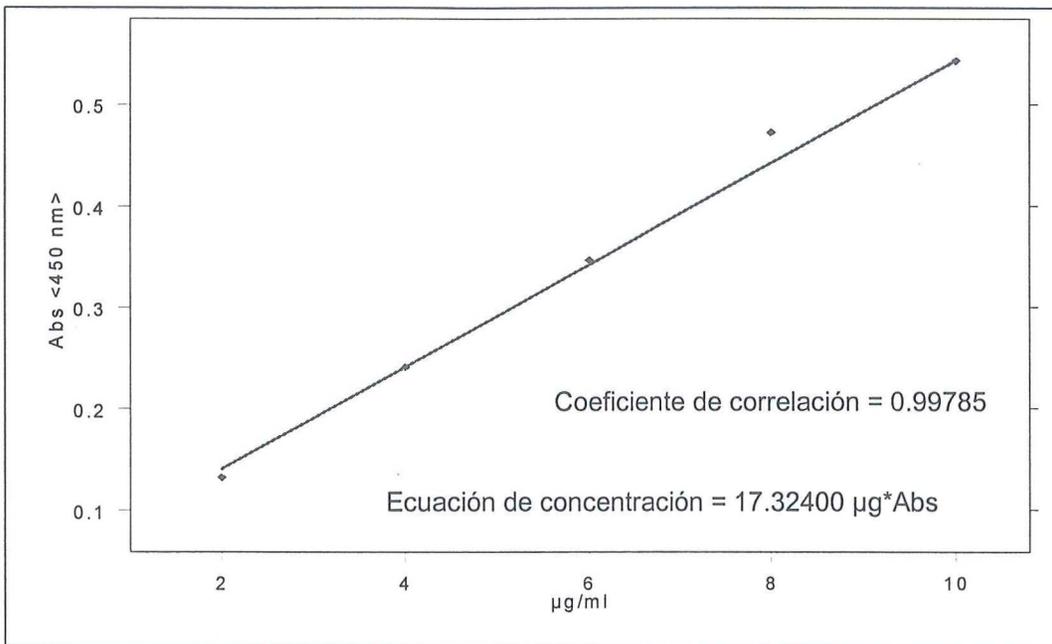


Figura 5. Curva de calibración de β -caroteno

V.1.7.- ANÁLISIS POR HPLC DE β -CAROTENO

El análisis de las muestras se realizó en un HPLC Hewlett Packard serie 1100 equipado con un inyector manual, un sistema cuaternario para solventes y un detector múltiple de longitud de onda. Se empleó una columna Zorbax C_{18} de fase inversa con un tamaño de partícula de $5\mu\text{m}$. La elución fue isocrática con metanol al 100% y una velocidad de flujo de 0.5 ml/min . El estándar de referencia utilizado fue β -caroteno marca sigma el cual fue disuelto en metanol al 100%.

V.1.8-ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis de los resultados de los experimentos para la elección del tiempo de duplicación se hizo mediante un análisis de varianza múltiple (MANOVA) (Ostle, 1963). De manera paralela se realizó un análisis de covarianza múltiple (MANCOVA) para la elección de la producción de β -caroteno. Se hizo una prueba a posteriori de Tukey (Ostle, 1963) para el caso en el que se detecto diferencias significativas utilizando el programa "Statistica 5.0®" utilizando para todos los casos un $\alpha= 0.05$. Las desviaciones estándar se obtuvieron al promediar los valores obtenidos por triplicado en el programa "EXCEL 2000®".

V.2 IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA

V.2.1.-SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S rDNA

Se purificó DNA cromosomal de *Bacillus sp* (13), a una concentración 1X (Olmos y Contreras, 1999) y se amplificó el gen 16S rDNA por medio de PCR de sus siglas en ingles Reacción en Cadena de la Polimerasa bajo las siguientes condiciones: 1 μ l de DNA cepa 13, 1 μ l oligonucleótido universal para procariotas de un tamaño de 28pb como sentido (Gray *et al.*, 1984) y un oligonucleotido específico para el género *Bacillus* de 17 pb como antisentido (Tabla. I) (Hernández-Zarate, 2000), 1 μ l de *Taq* Polimerasa, 1 μ l de dNTPs, 5 μ l de amortiguador, 40 μ l de H₂O.

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para la identificación filogenética.

Oligonucleótido	Tamaño	Secuencia
16Sf rDNA universal para procariontes	28 pb	CCG-TCG-ACAGAG-TTT-GAT-CCT-GGC-TCA-G
16Sr rDNA para el género <i>Bacillus</i>	17 pb	CCC-AGT-TTC-CAA-TGA-CC
16S rDNA para secuenciar 500 pb del género <i>Bacillus</i>	17 pb	GAG-TTT-GAT-CCT-GGC-TC

La reacción fue llevada a cabo en un termociclador bajo el siguiente programa: un ciclo durante 6 minutos a 95 °C; 25 ciclos con tres series de 1min a 95 °C, 1 min a 55 °C y 2 minutos a 72 °C y 1 ciclo a 72 °C por 10 minutos. (Ausubel *et al.*, 1992; Griffin y Griffin, 1994.)

Los productos de PCR se secuenciaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos (IBT) utilizando un oligonucleotido diseñado para secuenciar las primeras 500pb a una concentración de 5pmol/μl. Tabla I. (Arellano-Carbajal).

V.2.2 IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA

La secuencia obtenida se alineó en una banco de secuencias (GeneBank) www.ncbi.nlm.nih.gov, utilizando el programa "BLAST".

Las primeras 10 secuencias analizadas en el "BLAST" se buscaron en el programa "ENTREZ" de la dirección anterior de la red y de ahí se importaron y se editaron en el programa "EDITseq" del paquete "DNASTar", para alinearlas por el método Clustal con el programa "Meg Align", el cual encuentra las partes

conservadas y variables de las secuencias analizadas para el esquema del árbol filogenético.

IV.3 ANÁLISIS DE LOS GENES DE LOS CAROTENOIDES

IV.3.1.-LIBRERÍA GENÓMICA

Para la librería genómica se purificó DNA cromosomal de *Bacillus sp.* (13) por el método de fenol/cloroformo (Olmos y Contreras, 1999) y se concentró 6x, el producto se verificó en un gel de agarosa al 1.2%. Posteriormente se hizo una digestión parcial con la enzima *Sau3A* bajo las siguientes condiciones: 17 µl de DNA cromosomal cepa 13, 1µl de amortiguador A, 1.8 µl de H₂O y 0.2 µl de *Sau3A* a 37 °C durante 20 min, posteriormente la reacción se neutralizó a 65°C durante 10 minutos, los fragmentos obtenidos se verificaron en un gel de agarosa al 1.2%.

Paralelamente se hizo una digestión del sitio de clonación múltiple del plásmido pUC19 (fig 6) con la enzima *BamH1* que se utilizó como vector en las siguientes condiciones: DNA plasmídico pUC19 15µl, *Bam H1* 1µl, Buffer B 3µl, H₂O 11µl, se invirtió el tubo y se incubó a 37°C durante 6 horas, posteriormente se neutralizó a 80°C durante 20 minutos.

El DNA plasmídico digerido se desfosforiló con la enzima Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) utilizando 20µl de pUC19 digerido, 0.5µl de CIP, 1 µl de Buffer B y 8.5µl de H₂O, se incubó a 37°C durante 1 hora y se neutralizó la enzima a 65°C durante 10 minutos.

Los fragmentos obtenidos de la digestión parcial de DNA cromosomal se clonaron en el plásmido pUC19 por medio de una reacción de ligación: 7.5µl de

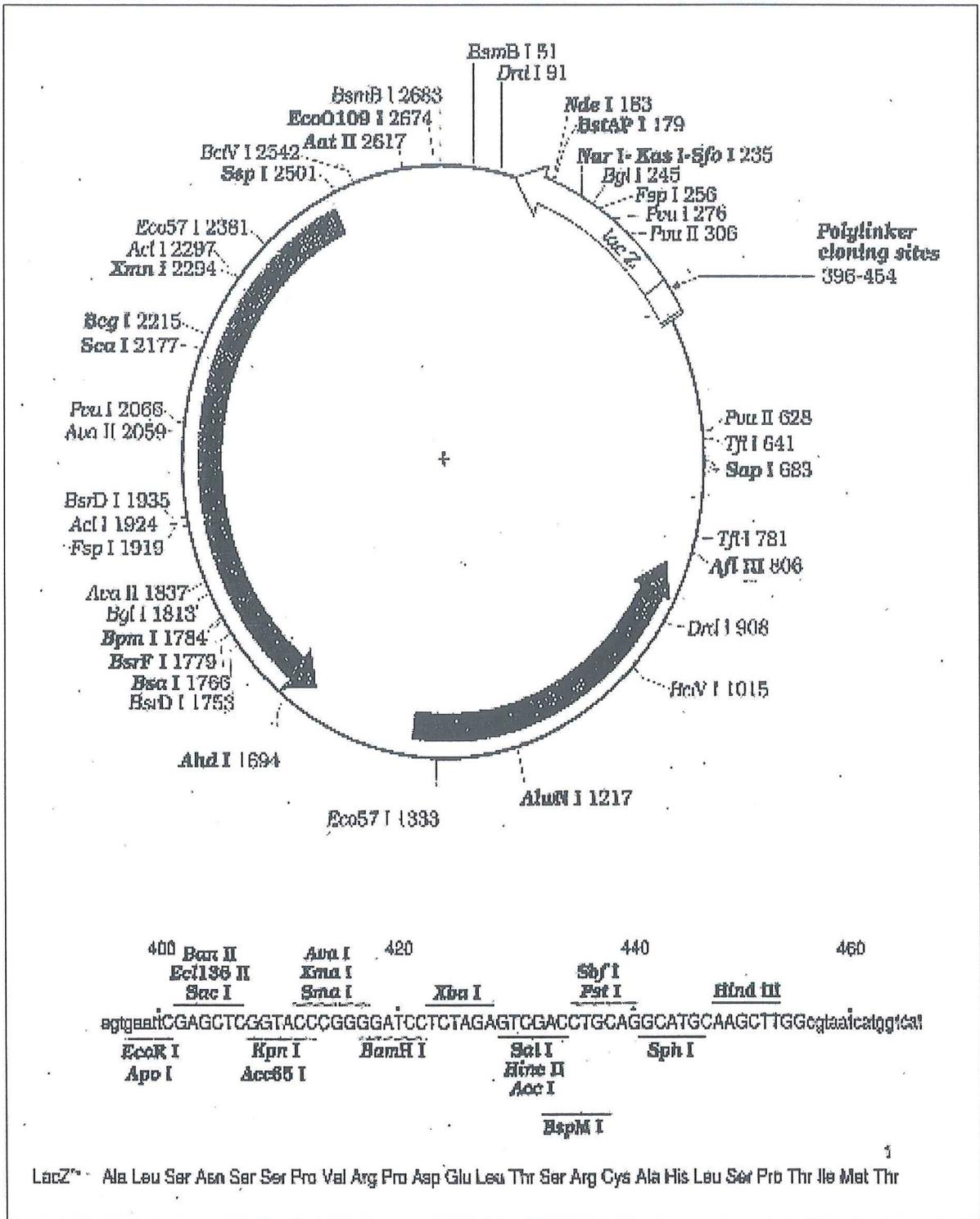


Figura 6. Plásmido pUC19. sitio múltiple de clonación, gen que codifica a la enzima b-galactosidasa (Yanish, *et al.*, 1988).

pUC19 digerido y desfosforilado, 15µl de la digestión parcial de DNA cromosomal con *Sau3A* , 0.3µl de BSA (Suero de Albumina Bovina), 2µl de buffer de ligasa, 0.5µl de ligasa y 4.7µl de H₂O. La reacción se llevo a cabo durante 8 horas a 16°C, la enzima se inactivo a 65°C durante 10 minutos.

Finalmente se transformaron células competentes de *Escherichia coli DH5α* (Ausubel *et al.* 1992). Con el producto clonado, se inocularon 100 y 50 µl de células transformadas en medio LB sólido suplementado con 200µg de ampicilina y se incubaron a 37°C durante 24 horas (Sambrook *et al.*, 1989).

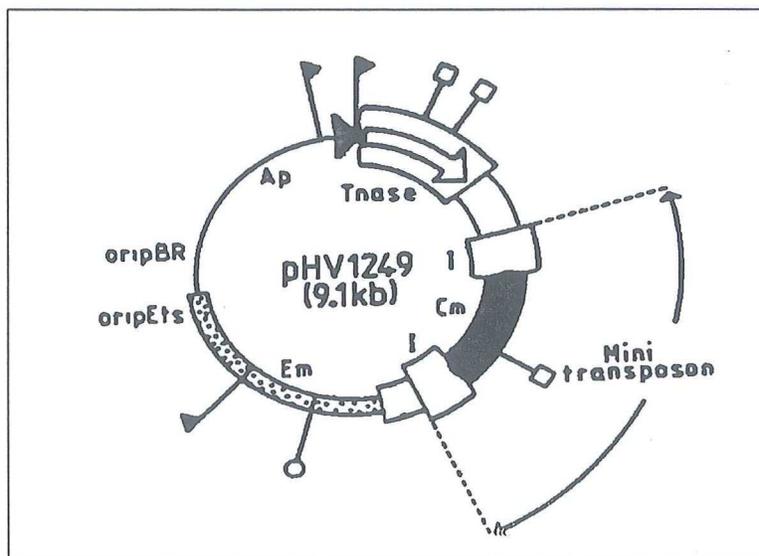


Figura 7. plásmido pHV1249 que contiene la secuencia Tn-10 , secuencia del plásmido pBR22 , secuencia del plásmido pE194ts  y los sitios de restricción para *Nco* I , *Eco* RI  y *Sst* I . Resistencia a cloranfenicol (Cm), Ampicilina (Ap) y Eritromicina (Em). (Petit *et al.*, 1990)

IV.3.2.-MUTAGÉNESIS GENERALIZADA POR Tn10

Las células de *Bacillus sp.* (13) se indujeron en medio LB sólido tal como se describe anteriormente. Las células inducidas se transformaron en un medio mínimo (MM1) a 300 rpm y 37°C durante 5 horas o hasta obtener un movimiento flagelar fuerte (Cutting y Vander Horn, 1990). Se hizo una dilución 1/10 del cultivo en MM2 y agregar el plásmido pHV1249 (fig.7) Se incubaron 3 horas después de la adición del plásmido, se transfirieron 500µl a 2500µl de medio LB líquido y se crecieron a 37°C durante tres horas. Después de este tiempo, la temperatura fue cambiada a 51°C durante 3 horas, y se inocularon 50µl en LB sólido suplementado con 5µl de cloranfenicol y se incubaron a 37°C durante 12 horas (Petit *et al.*, 1990).

VI. RESULTADOS

VI.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CULTIVO

VI.1.1-INDUCCIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES.

La inducción de los carotenoides en medio sólido fue indicada por un aumento en la intensidad de la coloración en las colonias amarillas y en la inducción del preinóculo por el cambio del color ámbar del medio LB1 a amarillo (fig 8).

VI.1.2-CRECIMIENTO de *Bacillus sp. 13*

La figura 9 muestra los resultados, donde se observa que el crecimiento con las 5 concentraciones de NaCl fue similar, sin embargo, al analizar los resultados con las 4 condiciones de luz se observa que el crecimiento sin inducción y con luz blanca tardan el mismo tiempo en llegar a t_0 , es decir 4 horas, mientras que con luz azul alcanza t_0 a las 5 horas y sin luz a las 6 horas. Por lo tanto, es evidente que en la condición sin luz es la que requiere mas tiempo en llegar al inicio de la fase estacionaria.

El tiempo de duplicación representado en la Tabla II no mostró diferencias para cada uno de los tratamientos. Los resultados del análisis de varianza de dos vías ($\alpha=0.05$) indicaron que entre tratamientos con LUZ ($F = 1.054$ $p = 0.379$), LB ($F = 12.155$, $p = 0.344$) y en la interacción de ambos factores LUZ x LB ($F = 0.532$, $p = 0.880$), no hubo diferencias significativas asegurando que el tiempo de duplicación de *Bacillus sp. 13* es similar en todos

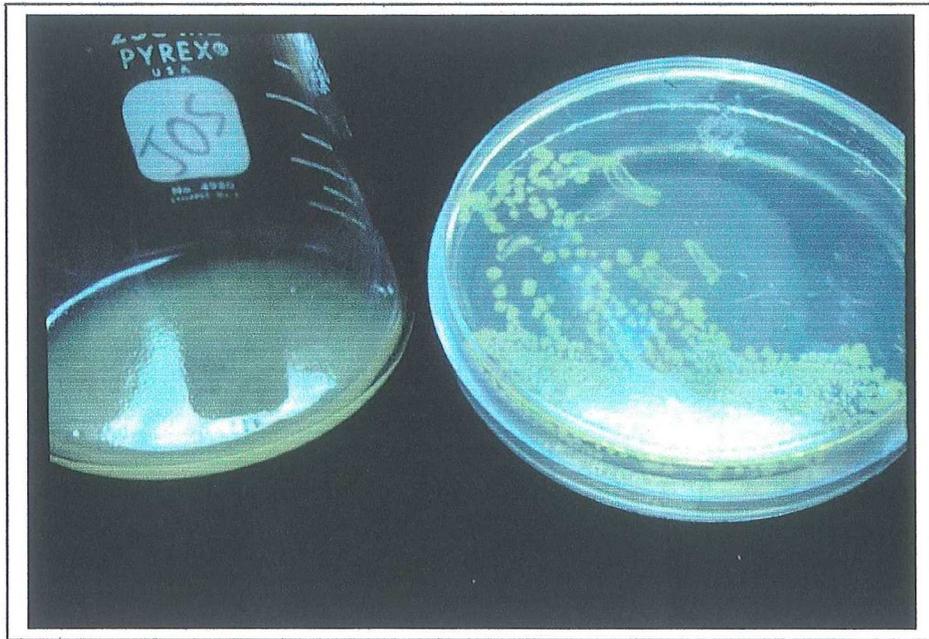


Figura 8. Inducción para la producción de β -caroteno por *Bacillus* sp. 13

los tratamientos, es decir que los efectos de luz y de concentración de NaCl en el medio de cultivo no afecta el crecimiento de este microorganismo.

VI.1.3 IDENTIFICACIÓN DE β -CAROTENO.

Los espectrogramas de la figura 10 corresponden a las lecturas realizadas de 400 a 500 nm de una solución estándar de β -caroteno y de una extracción con metanol de una muestra de *Bacillus* sp 13 crecido sin luz con inducción del preinóculo en t4 y medio LB1. Donde la máxima absorción registrada es la región 450 ± 1 nm correspondiente a la región visible del espectro de absorción, lo cual indica que *Bacillus* sp 13 produce este pigmento de manera natural.

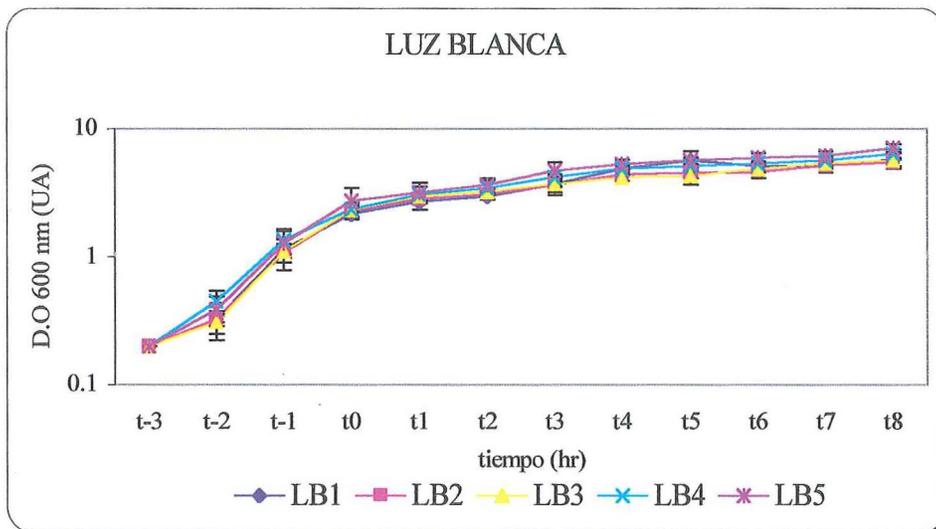
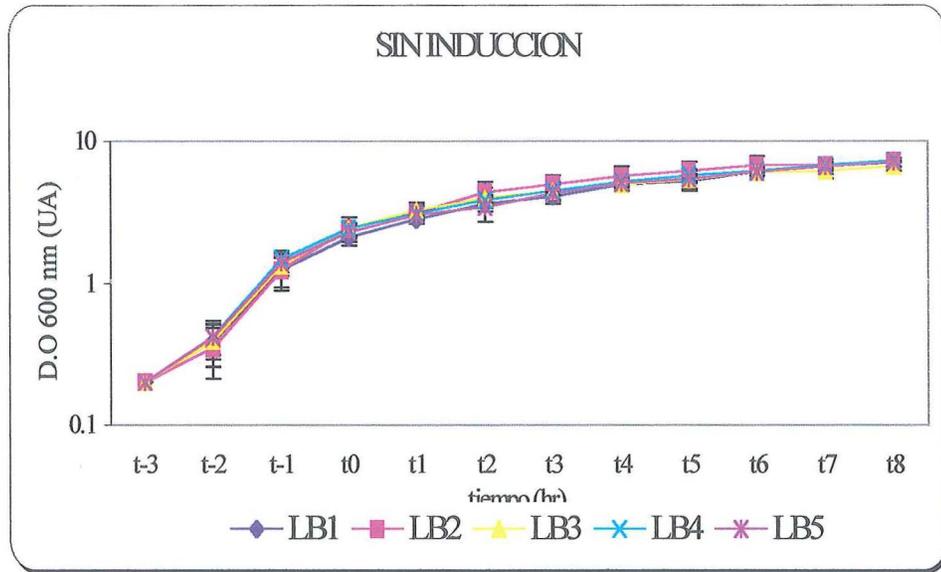


Figura 9. Densidad óptica de *Bacillus* sp. 13 en diferentes condiciones de luz y concentraciones de NaCl. LB1 9.4 mM de NaCl, LB2 94 mM de NaCl, LB3 180 mM de NaCl, LB4 370 mM de NaCl y LB5 500 mM de NaCl.

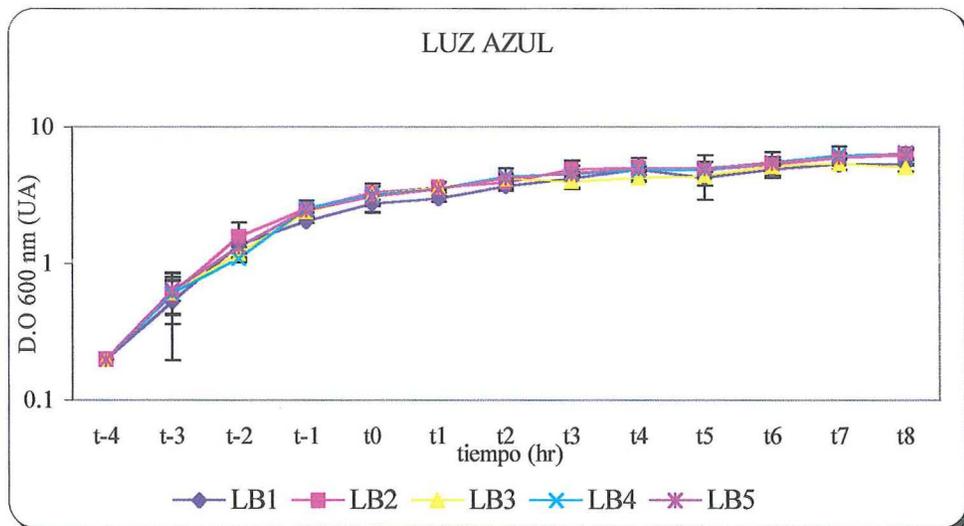
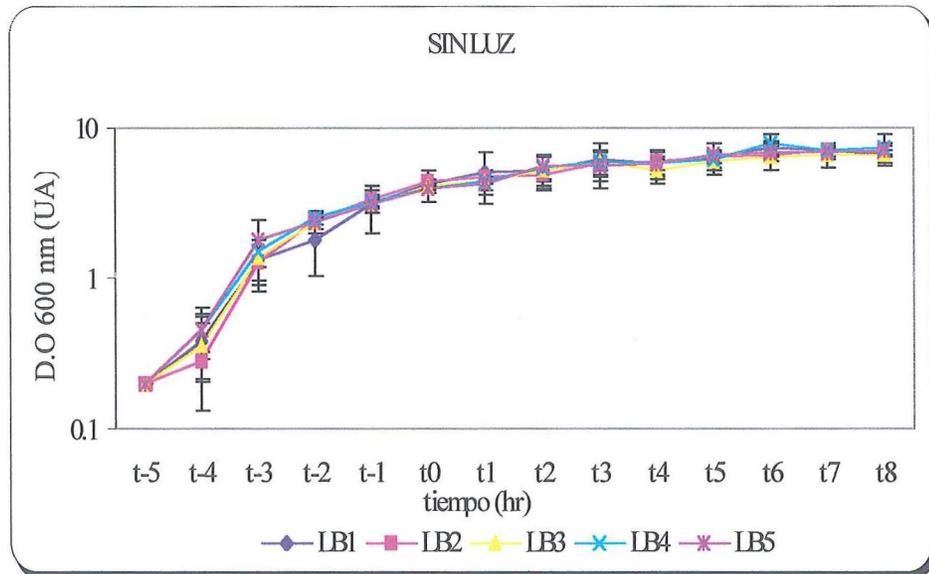


Figura 9. Continuación Evolución de la Densidad Óptica.

Tabla II. Tiempos de duplicación en minutos de *Bacillus sp. 13*

LUZ	LB1	LB2	LB3	LB4	LB5
SIN IND	0.5993±0.1399	0.4966±0.1216	0.6665±0.1784	0.6276±0.1025	0.7081±0.021 3
LUZ BLAN	0.6740±0.0377	0.6989±0.1309	0.6590±0.1426	0.7412±0.0.898	0.7010±0.397 0
SIN LUZ	0.7267±0.0837	0.4252±0.3156	0.6724±0.0645	0.7024±0.0838	0.6135±0.246 7
LUZ AZUL	0.7483±0.2776	0.6851±0.0897	0.7545±0.0797	0.6550±0.3039	0.6990±0.031 9

VI.1.4 CUANTIFICACIÓN DE β -CAROTENO

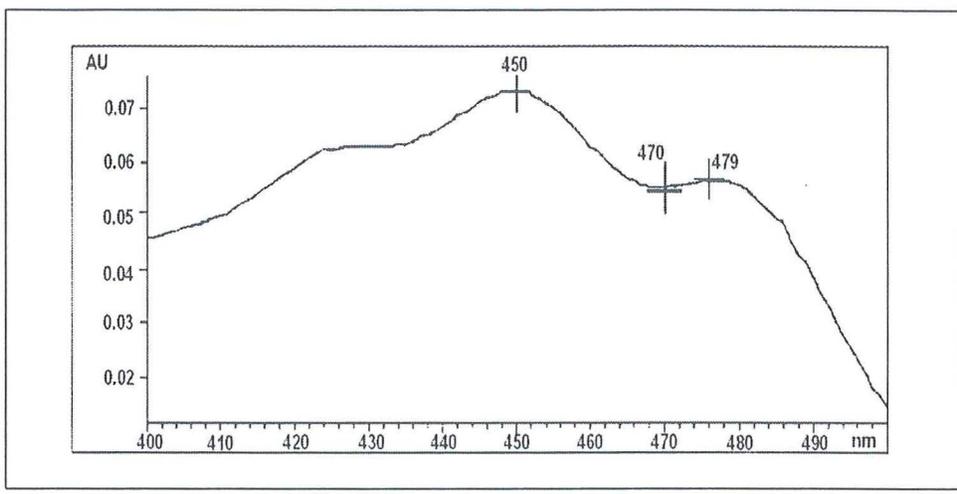
El pigmento se cuantificó utilizando la curva de calibración descrita en la figura 6. Los diagramas de barras de la figura 10 muestran que existen tendencias en la producción de β -caroteno conforme al tipo de luz utilizada. La producción de β -caroteno se mantiene constante en las condiciones sin inducción y luz azul, sin embargo los niveles de β -caroteno con la condición luz blanca varían de t4 a t8 con los diferentes medios utilizados. En contraste con la condición sin luz, se observa que existe una tendencia a disminuir para luego incrementar los niveles en t8, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Pedrin-Caballero (1999). La condición que produce la mayor concentración de carotenoides es sin luz, en t4 con los 5 medios de cultivo.

Los diagramas también muestran que el error estándar fue muy grande en los casos en que se utiliza luz blanca, sin luz y luz azul, sin embargo para la condición

sin inducción y en el experimento sin luz en el tiempo t4 de muestreo, el error estándar es muy cercano al valor de la media.

Los resultados del análisis de covarianza múltiple mostraron que no hubo diferencias significativas para los efectos de LB ($F = 1.588$, $p = 0.177$) y para la interacción de ambos factores LUZ , LB ($F = 0.612$, $p = 0.831$). Sin embargo se encontraron diferencias significativas para los efectos de LUZ ($F = 14.803$, $p = 0.000$), produciéndose las concentraciones mas altas de β -caroteno en el crecimiento realizado sin luz, con la inducción del preinóculo con los 5 medios en t4.

A



B

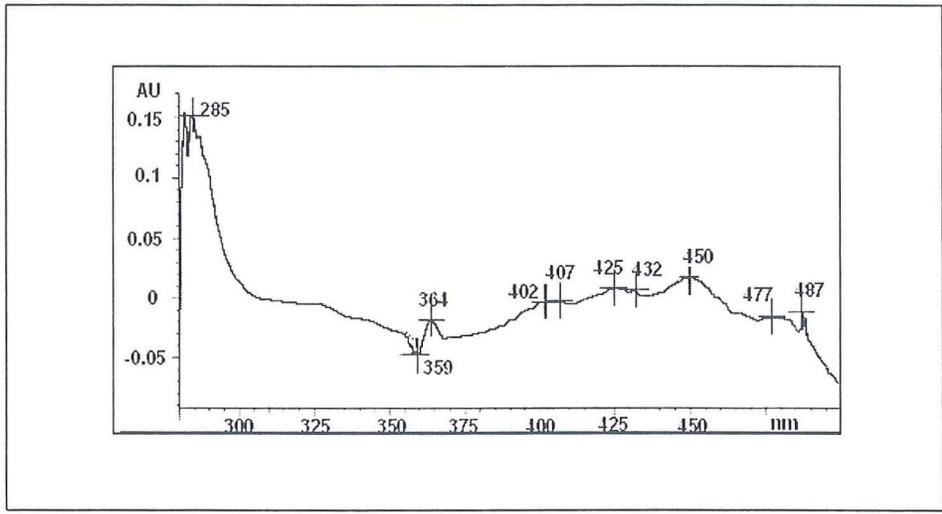


Figura 10. Espectrogramas de A) Solución estándar de β -caroteno en metanol absoluto grado HPLC. B) Extracción de β -caroteno en metanol absoluto grado HPLC de una muestra de LB4 crecido sin luz y colectado en t7.

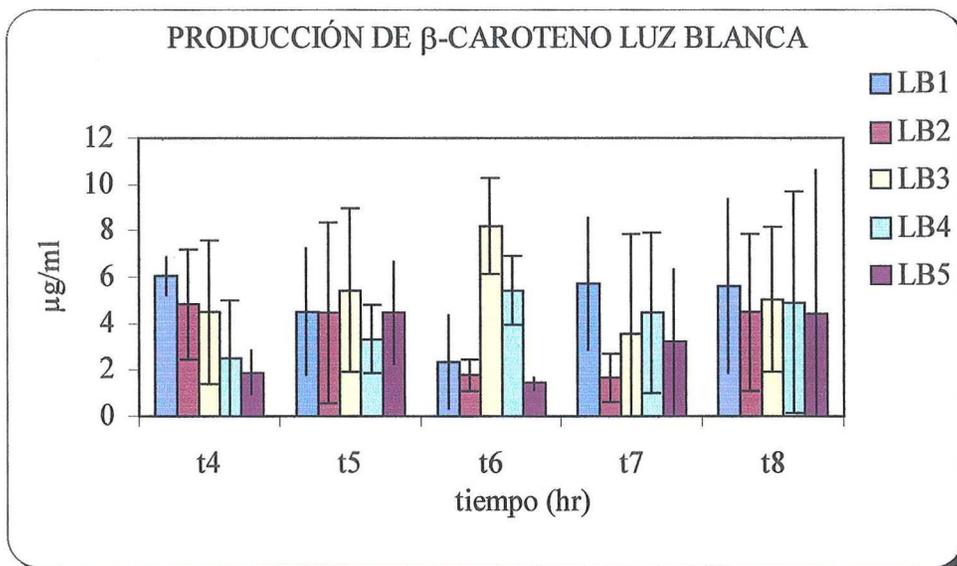
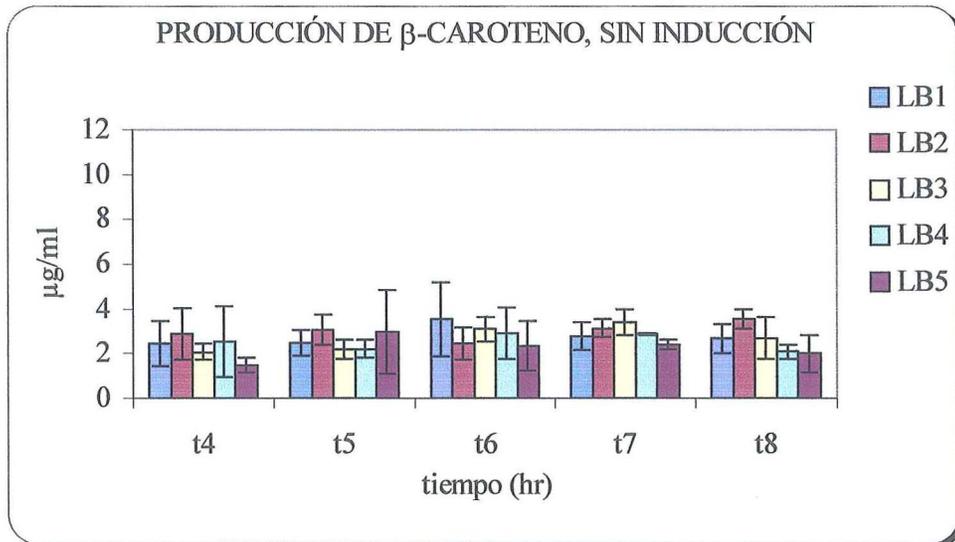


Figura 11. Producción de β -caroteno con diferentes condiciones de luz y diferentes concentraciones de NaCl. LB1 9.4 mM de NaCl, LB2 94mM de NaCl, LB3 180 mM de NaCl, LB4 370mM de NaCl y LB5 500 mM de NaCl.

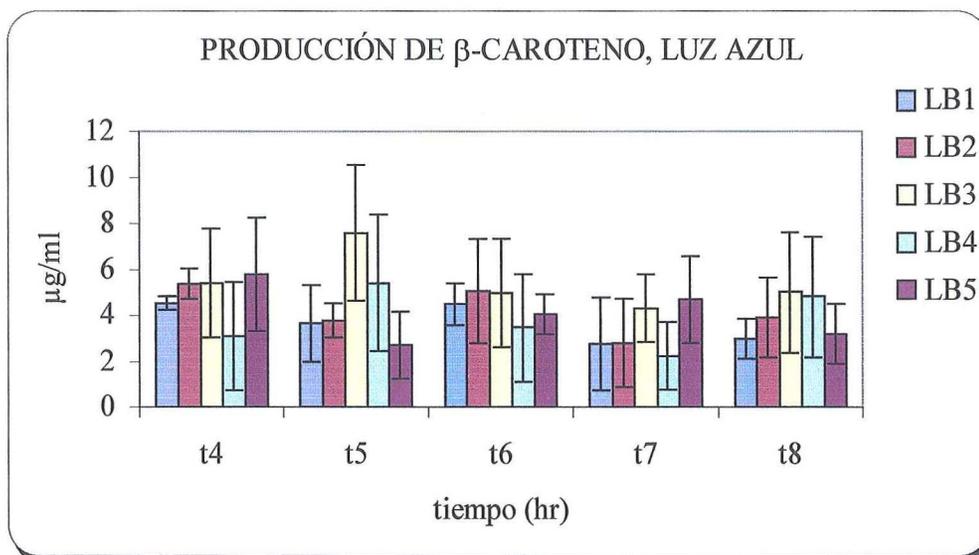
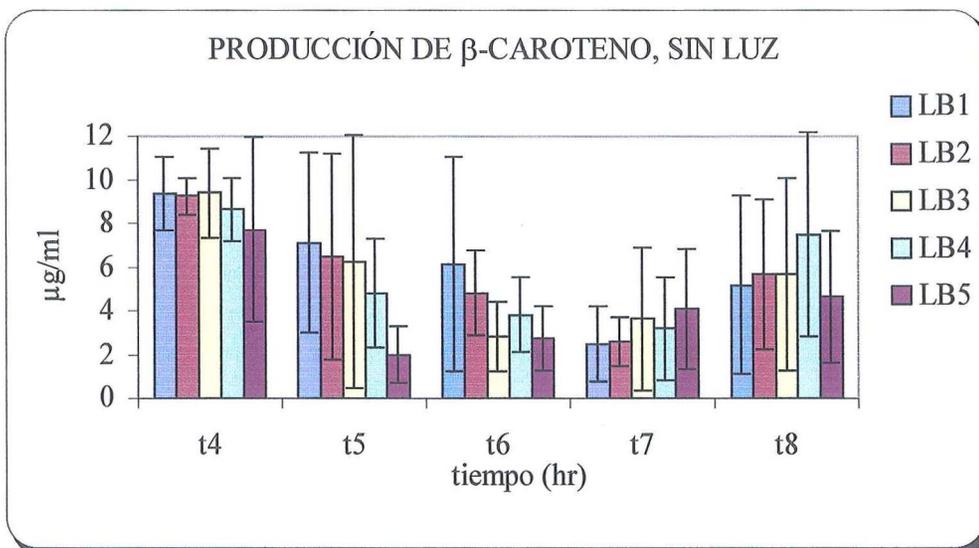


Figura 11. Continuación de producción de β -caroteno

VI.1.5 PRODUCCIÓN DE β -CAROTENO

La producción de β -caroteno por *Bacillus* sp. 13 fue calculado solo para la condición que produjo la mayor concentración de carotenoides, dicha condición fue sin luz con medio LB1 y las muestras fueron colectadas en t4 (Tabla III).

Tabla III. Producción de β -caroteno

Peso seco <i>Bacillus</i> sp. 13 $\mu\text{g/ml}$	β -caroteno de <i>Bacillus</i> sp 13 $\mu\text{g/ml}$	Producción %
2937	9.266475	0.362

El tamaño de muestra ($n = 8$) fue a razón de que de los 20 ml colectados, la mitad se destinó al análisis por HPLC, sin embargo de los 10 tubos analizados para la determinación de la producción, 2 muestras presentaron absorbancias negativas por lo que fueron descartados. La media aritmética de la producción es de 0.362% y la desviación estándar es de 0.12%.

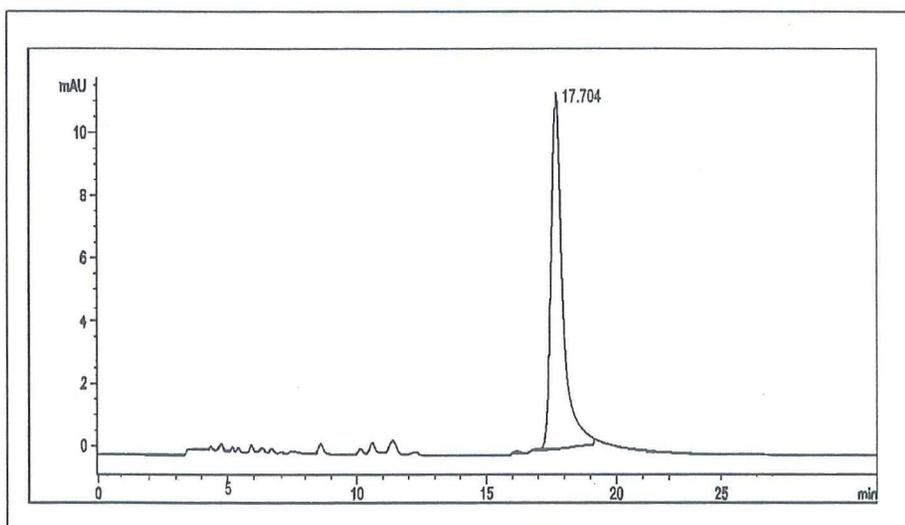
VI.1.6 ANÁLISIS POR HPLC.

El análisis por Cromatografía Líquida de Alta Presión de un estándar de β -caroteno con una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, muestra que el tiempo de retención es de 17.704 minutos (fig. 12A), muy similar al tiempo que presentó una extracción metanólica de *Bacillus* sp 13 de 17.674 (fig. 12B). Sin embargo el cromatograma del extracto de *Bacillus* en la condición sin luz, colectado en t4 con LB1, presenta

otras fracciones de menor área cuyos tiempos de retención son: 3.203, 3.428, 4.344, 5.103, 6.353, 7.526, 7.881 y 8.168 minutos.

Estos tiempos de retención corresponden al espectrograma presentado en la figura 10B, en el cual se muestran 9 regiones de absorción y coincide con 9 tiempos de retención en el cromatograma 12B. El β -caroteno presentó un máximo de 450 nm y tuvo un tiempo de retención de 17.674 cuya intensidad y altura en respectivos análisis fue el segundo en dichas características.

A



B

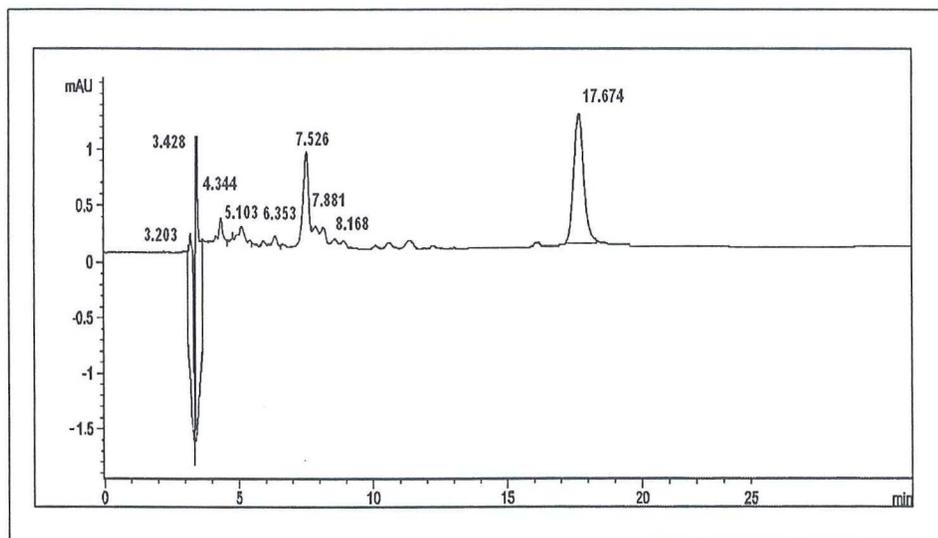


Figura 12. Cromatogramas de HPLC de A) estándar de β -caroteno y B) Una extracción de *Bacillus* sp. 13 con medio LB1 colectado en t4.

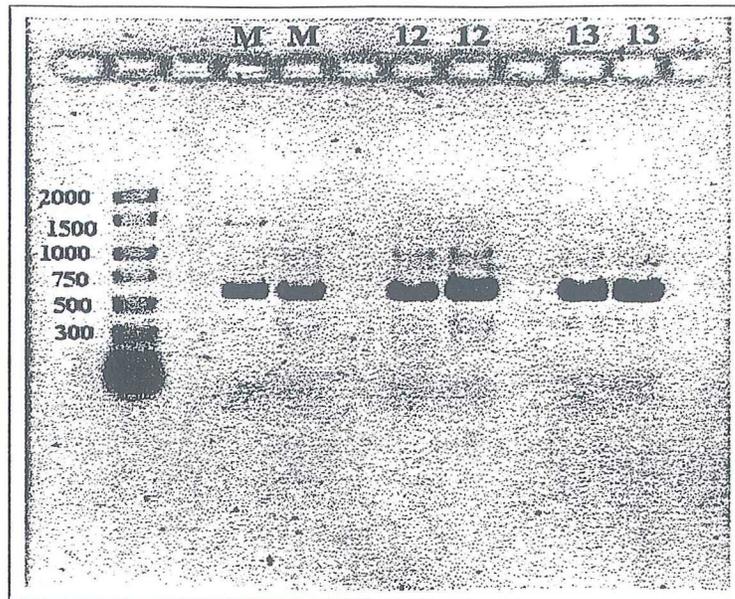
VI.2 IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA

Con el fin de realizar la identificación filogenética, se amplificó el gen 16S rDNA obteniéndose el fragmento esperado de 640 pb (Hernández-Zarate, 2000) (fig. 13). Debido a la presencia de fragmentos de menor intensidad, que impiden secuenciar el producto de PCR por su interferencia, el fragmento se purificó mediante un gel preparativo y se secuenció en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Una vez recibida la secuencia se analizó en el banco de datos "BLAST" del www.ncbi.nlm.nih.gov (fig. 14) para buscar especies del género *Bacillus* que compartieran alto grado de homología con la secuencia obtenida. La especie registrada que compartió esta característica fue *Bacillus MR-4*, una bacteria aislada de un consorcio capaz de degradar hidrocarburos del petróleo crudo y de sedimentos de mangles (Dias *et al.*, 1999).

Posteriormente de las especies registradas, se hizo un banco de 48 secuencias en el programa "Editseq®" del "DNASTAR®" para hacer un alineamiento en el programa "MegAlign®" (método clustal) perteneciente al "DNASTAR®". El árbol filogenético obtenido (fig.15) mostró 10 grupos, donde *Bacillus MR-4* y *Bacillus sp. 13* forman un grupo con un 66.9% de similitud y 5.2% de divergencia, estas especies se relacionan con el grupo formado por *Marine Bacillus* y *Bacillus sp. AS-38*, ya que estos 2 grupos provienen de un ancestro común y estos dos grupos divergen muy cercanamente según la escala de eventos de sustitución del programa "DNASTAR®".

A



B

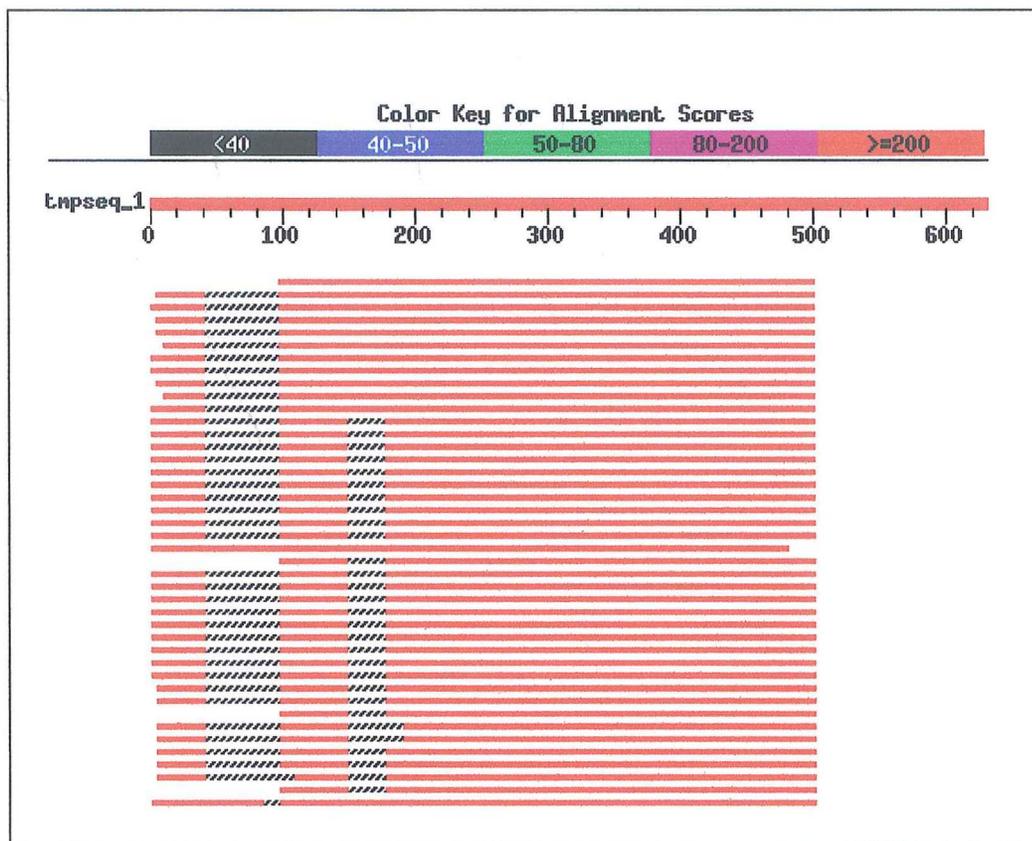
131

```

CGGANGAACCGCTGGCCGNGTCCCTAATACATGCAAGTGGAGACCGGATCGAT
CGGNGCNTGNTATCTGNGATCAGCCGGCGGACCGGACGGGTGGCATAAGCCCTGCC
TGTEAGAGACTCGGATAAACTCCGGGAAACCGGGCTAATAACCGGATAACACCT
ACCCCCCATGGGGGAAAGGTGAAAGGTGGCTTONGCTATCACTTACAGATG
GACCCGNGCCCATTANCTANITGGTGANGLAATGGCTACCAAGGGGACGA
TCCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CACACTCCTACCGGAGCCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACNAAAGTC
TGACCGAGCAACCCCGCGTGGTGAANAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCG
TTGITANGGAAGAACAAGTCCCGTTCGAATAGGGCCCGCCCTTGACGGTCCC
TAACCAGAAACCCACCGCTAACTACCTGCCAGCAATCCNCCGNAATACTNTA
ANITGNAACCGGTINTCCNGAATTATTGGCCCNAAACCCNCCANGNG
GITTINITAANGICTTGATGIGAAANCCACCGGNITAAANCCCTCAAAGGT
CAATTGAACNACINTGGGNCTCTTTCTATACTNNTAACCTTNCANNNN
CNINCGATTINNNNTTNTNANNACTCACNCTTNTNNGAGNEAN
CACNATATAINCAANINTNTNCANNCINGNNNNINININININACNNC
CNATTNCAATACCCNAATNNTNANNATAANANNNNINININININANTATG
NNEAANTGICCTINTONGANAGNNAATNNTTNCINONNATINANCNNTIC
NTAINGNNATTATACTINGNATCCNNEANGNACACNCAATATTANNNTA
NCNATTINACTNNANATTININCNCAITGCTATNGAANACTCAONTACNNAN
NINICTGANTCG

```

Figura 13. A) Fragmentos obtenidos de la reacción en cadena de la polimerasa del gen 16S rDNA, carril 2 marcador de peso molecular, carril 4 y 5 cepa M, carril 7 y 8 cepa 12, carril 10 y 11 cepa 13 B) Secuencia obtenida de las primeras 500 pb del gen 16S rDNA de *Bacillus* sp. 13 en sentido 5'.



Score E Sequences producing significant alignments: (bits) Value
[gb|AF264685.1|AF264685](#)Bacillus sp. MR-4 16S ribosomal RNA ... [698](#)
 0.0 [emb|AJ250318.1|BFU250318](#)Bacillus fumarioli 16S rRNA gene, ... [595](#) e-
 167 [emb|X82492.1|BO16SRRNA](#)B. oleronius 16S rRNA gene [563](#) e-
 158 [gb|U49079.1|BSU49079](#)Bacillus sporothermodurans 16S rRNA ty... [547](#) e-
 153 [dbj|AB030931.1|AB030931](#)Bacillus sp. IPso2 gene for 16S rRN... [547](#) e-
 153 [dbj|AB030930.1|AB030930](#)Bacillus sp. IPso1 gene for 16S rRN... [547](#) e-
 153 [emb|X81130.1|BSIV16SRR](#)Bacillus sp.(IV) 16S rRNA [541](#) e-
 151 [dbj|AB029256.1|AB029256](#)Bacillus pseudofirmus gene for 16S ... [533](#) e-
 149 [emb|X76439.1|BS16SRR02](#)Bacillus pseudofirmus DSM 8715, 16S ... [533](#) e-
 149 [gb|U49080.1|BSU49080](#)Bacillus sporothermodurans 16S rRNA ty... [531](#) e-
 148 [emb|X60602.1|BACII6S](#)Bacillus sp. 16S ribosomal RNA [525](#) e-
 147 [gb|AF142574.1|AF142574](#)Bacillus subtilis strain ATCC9799 16... [523](#) e-
 146 [gb|AF156316.1|AF156316](#)Marine bacillus NRRLB-14850 16S ribo... [523](#) e-
 146 [emb|Z99104.1|BSUB0001](#)Bacillus subtilis complete genome (se... [523](#) e-
 146 [dbj|D26185.1|BAC180KB](#). subtilis DNA, 180 kilobase region o... [523](#) e-
 146 [dbj|AB021198.1|AB021198](#)Bacillus vallismortis gene for 16S ... [523](#) e-
 146 [dbj|AB017592.1|AB017592](#)Bacillus sp. gene for 16S rRNA, par... [523](#) e-
 146 [dbj|AB017591.1|AB017591](#)Bacillus sp. gene for 16S rRNA, par... [523](#) e-
 146 [dbj|AB017590.1|AB017590](#)Bacillus sp. gene for 16S rRNA, par... [523](#) e-
 146 [dbj|AB017589.1|AB017589](#)Bacillus sp. gene for 16S rRNA, par... [523](#) e-
 146 [dbj|AB017588.1|AB017588](#)Bacillus sp. gene for 16S rRNA, par... [523](#) e-

Fig Figura 14. Alineamiento realizado en el programa BLAST

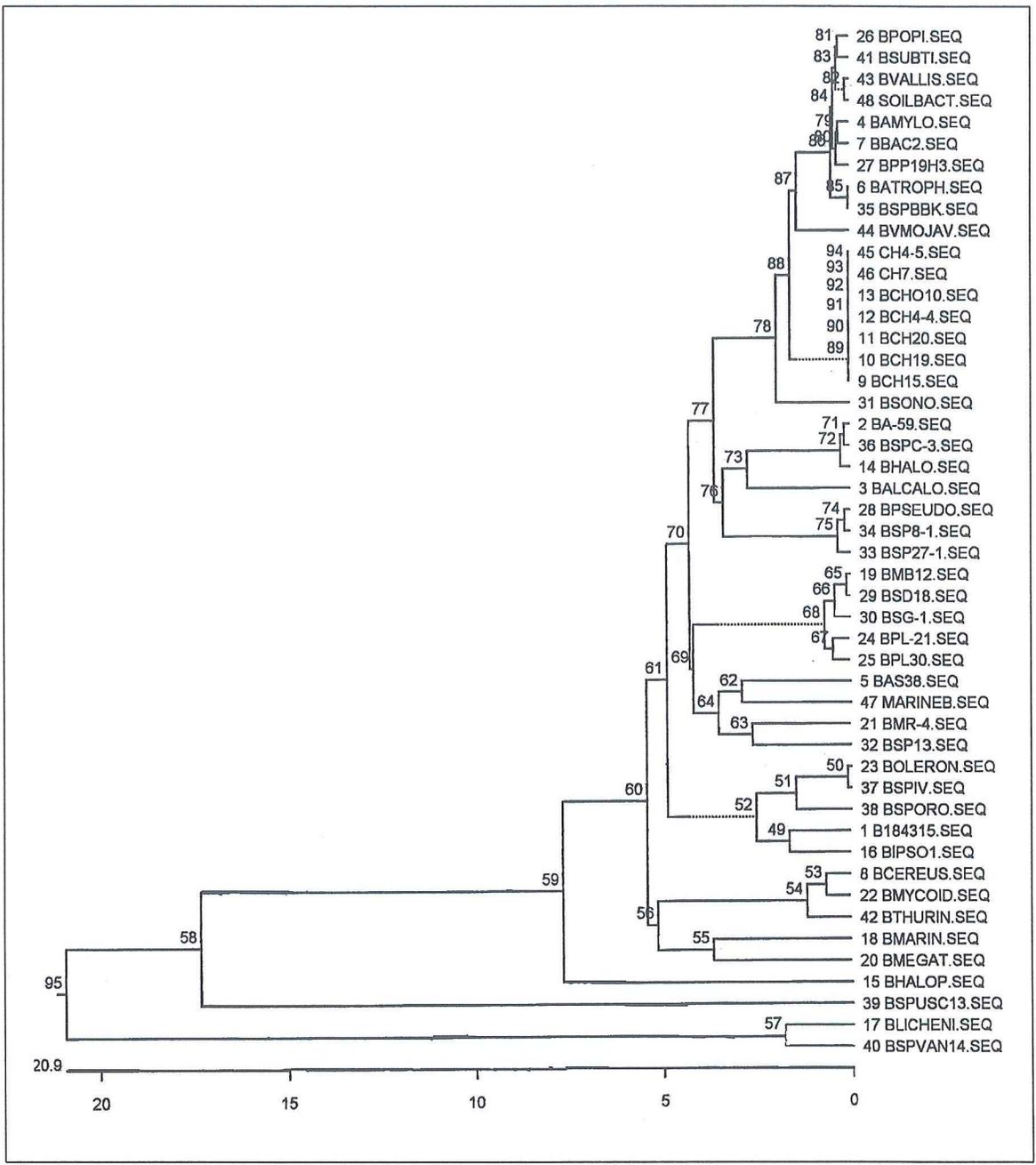


Figura.15 Arbol filogenético de especies del género *Bacillus*. La figura muestra la relación filogenética de *Bacillus sp. 13*

V.3. AISLAMIENTO DE LOS GENES CAROTENOGÉNICOS

V.3.1 LIBRERÍA GENÓMICA.

Se obtuvo el ADN cromosomal de *Bacillus subtilis* wt 168, el cual se utilizó como control y como marcador de peso molecular, cuyo genoma mide 4,175Kb (Anagnostopoulos, 1993) y de *Bacillus sp.* 13 a una concentración de 1x y 6x, se observó que los dos materiales genéticos tienen el mismo tamaño molecular (fig. 16 A). La figura 16 C presenta las digestiones parciales del ADN cromosomal de la cepa 13 con la enzima *Sau3 A* y en la cual no hay bandas bien definidas, pero podemos observar que existe un corrimiento del ADN a través de los carriles en el gel, indicando una digestión del ADN cromosomal de la cepa 13.

De la misma manera se presenta en la figura 16 B la purificación del ADN plasmídico el cual mide 2686 pb (Yanish, *et al*, 1988) y los productos de la digestión y desfosforilación de pUC19 los cuales presentan una sola banda e indican que el plásmido ha sido digerido y linearizado.

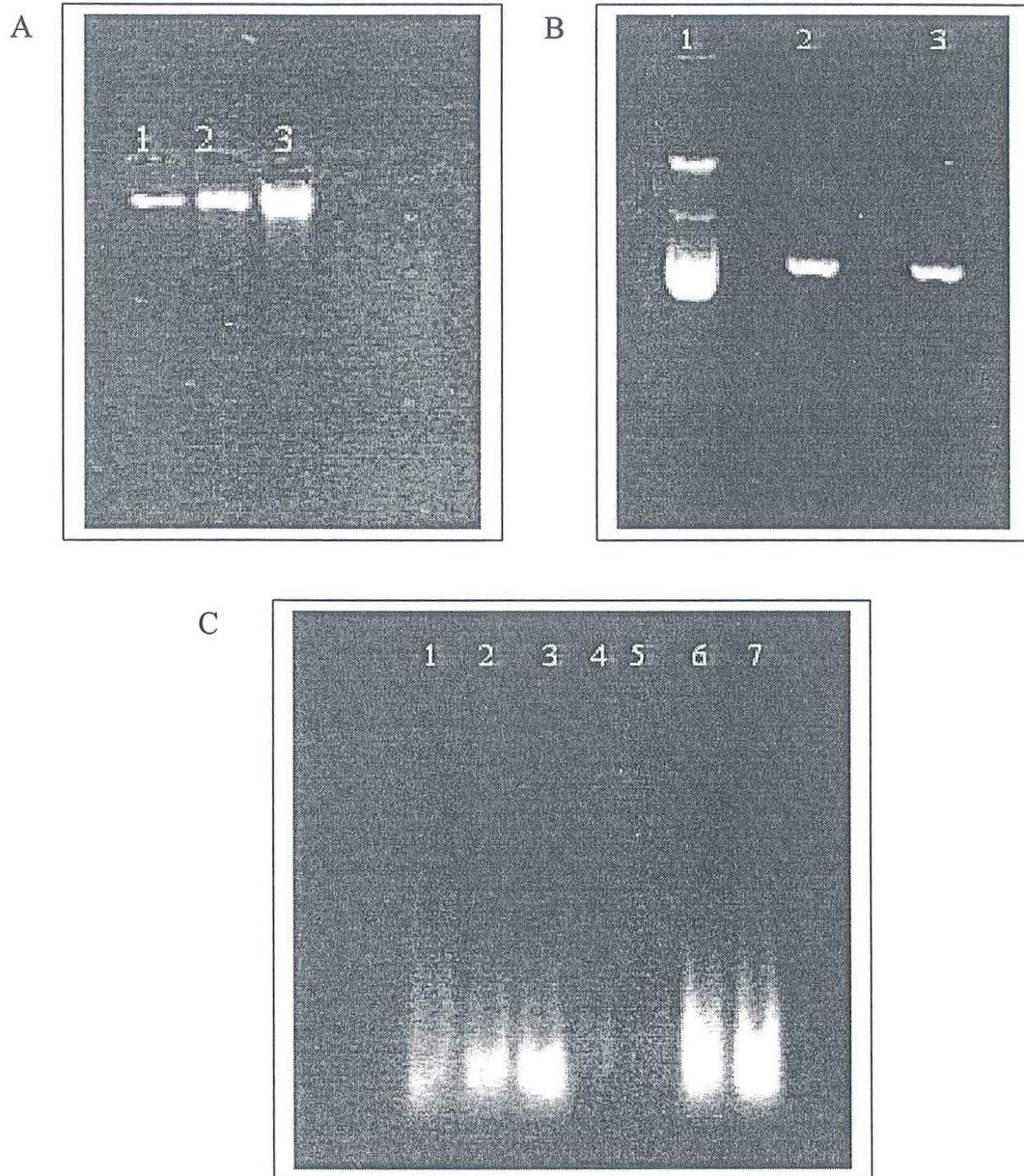


Figura 16. A) Detección de ADN cromosomal, carril 1 ADN *Bacillus subtilis* wt 168 1x, carril 2 ADN *Bacillus* sp.13 1x, carril ADN *Bacillus* sp. 13 6x. B). Carril 1 plásmido pUC19, Carril 2 y 3 pUC19 digerido y desfosforilados con las enzima *Bam* H1. C) carriles del 1-7 digestión de DNA cromosomal *Bacillus* sp. 13 con la enzima *Sau* 3A1

Debido a que *E. coli* DH5 α no sintetiza carotenoides de manera natural, sus colonias son de color blanco, pero al hospedar el vector con el fragmento que codifica para las enzimas requeridas en la biosíntesis de los carotenoides sus colonias serían de color amarillo, sin embargo los genes involucrados en la biosíntesis de β -caroteno no fueron expresados por lo que no se obtuvieron colonias pigmentadas de *E. coli* DH5 α , solo se obtuvo el crecimiento de colonias blancas.

V.3.2 MUTAGÉNESIS GENERALIZADA POR mini-Tn10

Al transformar las células de *Bacillus sp. 13* con el plásmido (fig 17) que contiene el transposón y éste al ser insertado a cromosoma, se esperaba que hubiera crecimiento de colonias blancas y colonias pigmentadas, indicando que las colonias blancas son las que han insertado el transposón a cromosoma y de esta manera han interrumpido el ó los genes que codifican para los carotenoides. Pero solo obtuvimos el crecimiento de colonias blancas, indicándonos que los genes carotenogénicos han sido interrumpidos, pero no podemos asegurar que dicha interrupción solo se deba a la inserción del transposón a cromosoma.

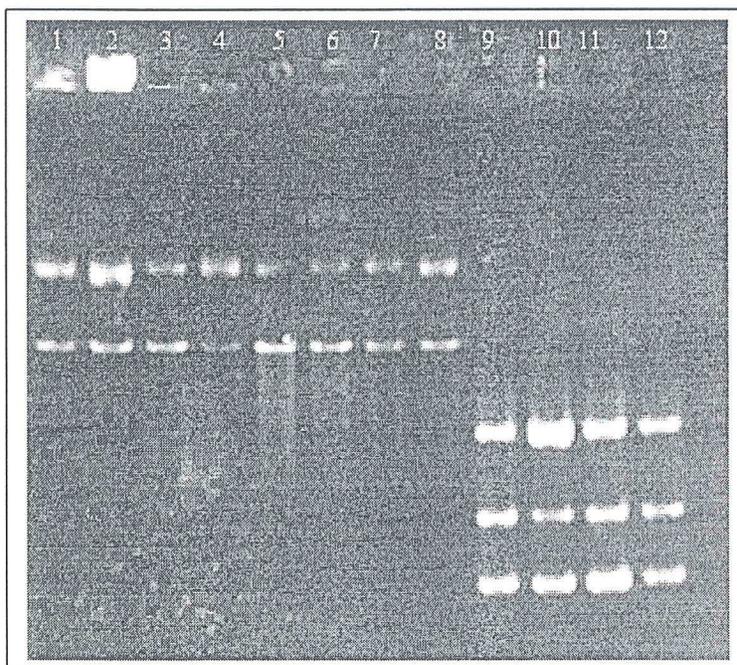


Figura 17. obtención de ADN plasmídico carriles del 1-4 plásmido pSG 35.1 de 1.1 Kb, carriles del 5-8 pHV1249 9.1 Kb y carriles del 9 al 12 plásmido pUC19 de 2.6 Kb

VII. DISCUSIONES

VII.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CULTIVO

VII.1.1 CRECIMIENTO

Las 4 condiciones de luz y las 5 concentraciones de NaCl utilizadas en el crecimiento de *Bacillus sp. 13*, no afectaron los tiempos de duplicación de *Bacillus sp. 13* esto representa una cualidad en esta especie, al tener la capacidad de crecer de manera similar en un amplio intervalo de NaCl, por lo que, al no haber una diferencia en el crecimiento, el medio óptimo es LB1, cuya concentración de NaCl es de 0.94mM, evitando un costo en la producción de β -caroteno.

Otra ventaja importante de *Bacillus sp. 13* con respecto a *Dunalliella salina* es el tiempo de duplicación. En un estudio en el cual determinaron el potencial carotenogénico de cepas de *Dunalliella salina* productoras de β -caroteno, calcularon la tasa de crecimiento específico (μ) a partir del inicio y el final del experimento, debido a que estas cepas no presentaron claramente la fase exponencial, donde la cepa BC02 obtuvo los valores más altos con base a las características de crecimiento y potencial carotenogénico (Sánchez-Castrejón, 1998).

Debido a la búsqueda constante de mejores fuentes potenciales para la producción de β -caroteno, se sugirió la utilización de *Trentepohlia odorata*, una microalga de agua dulce, que en comparación con *D. baradawil* acumuló una

mayor cantidad de carotenoides a bajas intensidades de luz y con la ventaja de que su cultivo no estaría confinado en áreas con altas salinidades (Koon Tan *et al.*, 1993), sin embargo, para el análisis de crecimiento, reportan tasas de crecimiento específico (μ) con diferentes intensidades de luz y diferentes concentraciones de amonio; de la misma manera que en el caso anterior, se calculó el tiempo de duplicación para la condición que reportó las concentraciones más altas de carotenoides y fue de $69.31 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$.

Sin embargo los tiempos de duplicación (tabla II) de *Bacillus sp.* 13 son de $0.754 \pm 0.079 \text{ h}^{-1}$ que corresponde al valor mas alto obtenido en la cinética con luz azul con el medio LB3 y $0.425 \pm 0.315 \text{ h}^{-1}$ que corresponde al valor más bajo obtenido en el experimento sin luz con el medio LB2, obteniéndose un tiempo de duplicación menor a las especies anteriores, siendo una de las mejores características de esta cepa, ya que una requisito importante con el cual debe cumplir el microorganismo de utilización industrial, es el de crecer rápidamente por varias razones: Al crecer en un tiempo relativamente corto el producto se forma rápidamente y un equipo costoso a gran escala no permanece mucho tiempo ocupado. Si el organismo crece con rapidez, hay menos probabilidad de que se presente una contaminación en el fermentador y será más fácil controlar los factores ambientales. (Brock, 1993).

VII.1.2 PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS.

Las graficas de la figura 10 mostraron que el error estándar fue muy grande en los casos en que se utilizaron luz blanca, sin luz y luz azul, esto pudo deberse a : **1.** Errores experimentales (Ostle B, 1963), ya que para extraer los carotenoides se necesitan condiciones controladas de luz y oxígeno debido a la inestabilidad de los carotenoides (Schiedt y Liaeen-Jansen, 1995) condiciones con las cuales no cuenta el laboratorio donde se extrajeron los carotenoides. **2.** A errores de medición, debido a que la extracción de los carotenoides se hizo en diferentes días de experimentación, de acuerdo al tipo de luz utilizado y al tiempo en que se muestreó y **3.** A la variación del material experimental, el cual pudo haber sido por el cambio de solvente utilizado, al cambiar metanol grado HPLC a Metanol grado reactivo para cierto número de muestras y a factores externos los cuales podrían influenciar las características bajo estudio (Ostle, 1963).

El análisis estadístico demostró que hubo diferencias significativas en los efectos por la utilización de luz, y las concentraciones más altas obtenidas son el crecimiento sin luz, por lo que esta es la mejor condición para la producción de los carotenoides aún cuando se requiere de la previa inducción con luz.

Las concentraciones más altas producidas en el crecimiento sin luz representan el 0.362% del peso seco obtenido. Este porcentaje es el obtenido del peso seco de zanahorias y otras plantas superiores; en contraste con el rendimiento de *Dunalliella salina* que es del 7-14% del peso seco a escala industrial; cuyas superficies de producción son de 600m³ con 20 cm de profundidad, a diferencia de la producción de β -caroteno en *Bacillus sp.* 13, hecha

en matraces con 20 ml de medio de cultivo; por lo que no se puede hacer una comparación directa con respecto a las superficies de producción.

Sin embargo, estos porcentajes podrían optimizarse, ya que debido al mejoramiento genético se ha podido anticipar un mejoramiento progresivo en el rendimiento del producto como en el caso de la penicilina, obtenido del hongo *Penicillium chrysogenum*, el cuál mejoró 50,000 veces. (Brock, 1993).

Hoy en día se requieren de nuevas estrategias de producción de carotenoides (Armstrong, 1997). Con la utilización de la tecnología del ADN recombinante pueden crearse nuevas cepas productoras de β -caroteno con la ayuda de plásmidos multicopia y/o mediante la Ingeniería Genética que regule la expresión de los carotenoides para obtener niveles superiores a los ya producidos.

Bacillus sp. 13 representa una fuente potencial y una alternativa económica en la producción de β -caroteno, ya que no necesita de altas concentraciones de NaCl en el medio de cultivo y aún cuando la cepa requiere luz para su inducción no necesita luz durante la biosíntesis de β -caroteno.

VII.2 IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA

Los resultados mostraron que con base al análisis del gen 16S rDNA de *Bacillus sp.* 13 y *Bacillus MR-4* son especies relacionadas y la distancia evolutiva de la rama del ancestro común, demuestra que el grupo formado por *Marine bacillus* apareció primero que el grupo formado por *Bacillus sp.* 13.

Otra característica importante que comparten ambas especies es la de pertenecer a ambientes marinos, ya que *Bacillus* MR-4 fue aislado de un manglar y *Bacillus* sp. 13 de un estuario, por lo que es posible que *Bacillus* sp. 13 sea de origen marino, aún cuando se piensa que una gran proporción de especies del género *Bacillus* que se encuentran en agua de mar se debe al desplazamiento de bacterias de la tierra al mar, este desplazamiento explica los números tan altos de *Bacillus* encontrados en aguas costeras (Priest, 1993). Sin embargo se desconoce si *Bacillus* MR-4 es capaz de producir pigmentos carotenogénicos.

El árbol filogenético muestra también que *Bacillus* sp. 13 no pertenece al grupo de *Bacillus subtilis*, este hecho es importante debido a que Pedrin-Caballero (1999) determinó que la cepa 13 perteneció al grupo IV en base a la localización de la spora, grupo en el cual se encuentra *Bacillus subtilis*. El análisis molecular demuestra que no son especies relacionadas filogenéticamente, ya que clasificar en base a morfologías y fisiologías son muy simples para ser indicadores filogenéticos confiables (Olsen y Woese, 1993).

Los resultados mostrados en el banco de datos del NCBI y el alineamiento realizado en el programa "DNASTar"; sugieren que la secuencia de *Bacillus* sp. 13 pertenece a una especie del género *Bacillus* no publicada. En base a lo anterior y de acuerdo a nuestros resultados, clasificamos a *Bacillus* sp. 13 como una especie de origen marino, halotolerante y productor de pigmentos carotenogénicos.

VII.3 ANÁLISIS DE LOS GENES CAROTENOGÉNICOS

Los genes que codifican para la síntesis de β -caroteno en *Bacillus sp.* 13 no pudieron ser aislados mediante la construcción de la librería genómica, debido a que no hubo expresión en *Escherichia coli* DH5 α . Este hecho fue similar en *Rhodobacter capsulatus*, del cuál no se expresaron los genes carotenogénicos en *E. coli* (Armstrong et al., 1989). Anteriormente Marrs (1981), observó que los pigmentos fotosintéticos no se acumulaban en cepas de *E. coli*, que hospedaba los genes en el plásmido pRPS404 y se ha sugerido que no transcribe los genes fotosintéticos de *R. capsulatus* (Johnson et al., 1986). En otro experimento, Armstrong (1989) concluyó que la carencia en la producción de carotenoides en *E. coli* se puede deber a la falta en el reconocimiento de al menos un promotor de los genes *crt*, o a la ausencia de los factores reguladores de la transcripción y que son necesarios para la expresión de los genes *crt*, o por diferencias en regulaciones postranscripcionales entre estas dos especies.

Por lo tanto, es posible que la RNA polimerasa de *E. coli* DH5 α no reconozca un promotor o los promotores de estos genes, o que carezca de los factores reguladores que se necesitan para la expresión de los genes que producen carotenoides en *Bacillus sp.* 13, ya que el producto del gen *crtE* de *Rhodobacter capsulatus* mostró tener la mayor similitud (32.8%) con el producto del gen *ger C3* de *Bacillus subtilis*.

En el caso de la mutagénesis generalizada, los genes tampoco fueron aislados. Una explicación a este hecho es que el medio mínimo utilizado en la

transformación de células de *Bacillus* contiene glucosa al 50% (Cutting y Vander Horn , 1990), que es un represor de AMPc y este a su vez activa la transcripción de genes carotenogénicos de *Erwinia herbicola* y de clonas de *E. coli* productoras de carotenoides, por lo que al crecer en presencia de glucosa inhiben la producción de estos pigmentos (Perry *et al.*, 1986), estas células no pueden restaurar la pigmentación después de la adición de AMPc exógeno al medio LB-glucosa agar. Sin embargo los pigmentos no fueron reprimidos por glicerol, sucrosa o lactosa al 1% en *Erwinia herbicola* y en *E. coli* no fueron reprimidos por arabinosa al 0.8%, maltosa, glicerol, sucrosa o lactato al 1% (Perry *et al.*, 1986),

Por lo que es posible que exista una represión catabólica en la expresión de los carotenoides en *Bacillus sp. 13*; sería interesante y necesario crear un medio mínimo de transformación con estos carbohidratos para no perder la expresión de los carotenoides y que sea posible interrumpir estos genes con el fin de aislar los genes para manipularlos con el de incrementar los niveles de producción de β -caroteno en *Bacillus sp. 13*.

VIII. CONCLUSIONES

- No existen efectos en el crecimiento por luz utilizada y la concentración de NaCl en el medio de cultivo.
- Existe un efecto en la producción de carotenoides por la luz utilizada
- No existe un efecto de NaCl en la producción de carotenoides
- El carotenoide principal producido es β -caroteno
- La cepa produce bajos niveles de β -caroteno sin estar inducida
- Para alcanzar altos niveles es necesario que la cepa sea inducida con luz blanca previamente
- El crecimiento en ausencia de luz es la condición óptima de cultivo
- Los genes de los carotenoides no pudieron ser aislados mediante librería genómica ni mutagénesis generalizada por mini-Tn10
- En base a la secuencia del gen 16S rDNA, *Bacillus* sp. 13, es una nueva especie no publicada del género *Bacillus*.

IX PERSPECTIVAS

- Escalar la producción de β -caroteno a nivel fermentador
- Optimizar el método de extracción de β -caroteno y cuantificar mediante HPLC
- Estandarizar un medio de cultivo carente de glucosa para la transformación de *Bacillus sp* 13.
- Aislar los genes de los carotenoides para caracterizar las unidades de transcripción.
- Crear cepas mutantes con producción de β -caroteno superior a la producción de la cepa silvestre
- Evaluar la interacción salinidad / calidad de luz.
- Comparar los niveles de producción y el rendimiento de β -caroteno producido por *Bacillus sp.* 13.

REFERENCIAS

- Ananostopoulos, C., P. Piggot, J. Hoch. 1993. The genetic map of *Bacillus subtilis*: *Bacillus subtilis* and other Gram positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. American Society for Microbiology, Washington D.C
- Arbige M., B. Bulthuis, J. Shultz, D. Crabb. 1993. Fermentation of *Bacillus*: *Bacillus subtilis* and other Gram positive Bacteria : Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics American Society for Microbiology, Washington D.C
- Arellano Carvajal, Fausto.1999. Búsqueda y caracterización de α -glucosidasas de *Bacillus* spp. Aislados ambientes marinos e identificados filogenéticamente. Departamento de Biotecnología Marina, CICESE. Tesis de Maestría.
- Armstrong G. A., M. Alberti, F. Leach, y J. Hearst. 1989. Nucleotid sequence, organization and nature of protein products of carotenoid biosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus*. Mol. Gene. Genet. 216. 254-268 p.
- Armstrong G. A., B.S. Hundle y J.E. Hearst. 1993. Evolutionary conservation and structural similarities of carotenoid biosynthesis gene products from photosynthetic and nonphotosynthetic organism. Methods in Enzymology. 297-311 p.

- Armstrong G.A. 1997. Genetics of Eubacterial carotenoid biosynthesis : A colorful Tale en : Ornston Nicholas L, Albert Balows, E. Peter Greenberg Annual Review of Microbiology. 51: 630-652 p.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E Kington, D.D Moore, J.G. Seidman, J.H. Smith y K. Struhl eds. 1992. "Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. Second edition. New York.
- Blanch, W. H y S. D. Clark. 1996. Biochemical Engineering. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Borowitzka M y L Borowitzka. 1988. Dunaliella: Microalgal Biotechnonolgy, Cambridge university Press.
- Brock T. D y M.T Madigan. 1993. Biotecnología microbiana: Microbiología, Prentice Hispanoamérica.
- Buchard, R.P, y M. Dworking. 1966. Light-induced lysis and carotenogenesis in *Mixococcus xanthus*. J. Bacteriol. 91: 896-897 p.
- Buggy, J.J., M.W. Sganga, y C.E. Bauer. (1994). Characterization of a lighth-reponding trans-activator responsible for differentially controlling reaction center and light-harvesting- I gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. J.Bacteriol. 176, 6936-6943.
- Craft N y J Soares .1992. Relative Solubility, Stability and Absortivity of lutein and β -caroteno in organic solvents. J. Agric. Food Chem. 40:431-434 p.

- Chor K. T., Y. K. Lee y K. K. Ho. 1993. Effect of light intensity and ammonium-N on carotenogenesis of *Trentepohlia odorata* and *Dunaliella bardawil*. *Journal of Applied Phycology*. 5: 547-549 p.
- Coodley G., M. Coodley, R. Lusk, T. Green, A. Bakke, D. Wilson, D. Wachenheim, G. Sextum, C. Salveson. 1996. β -carotene in HIV infection: an extended evaluation. *AIDS* 10: 943-967 p.
- Cutting S.M and P.B Vander Horn.1990. Genetic Analysis: Molecular Biological Methods for *Bacillus*. John Wiley & Sons, England.
- Días M.P., S.J Grigson, C.J. Peppiat y J.G Borguess,.1999. Isolation and characterization of novel hydrocarbon degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. No publicado. [www.ncbi.nlm.nih.gov, gb|AF264685.1|AF264685](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gb/AF264685.1|AF264685)
- Falkowski P.G., J.A. Raven. 1997. Light Absorption and Energy Transfer in the photosynthetic Apparatus: Aquatic Photosynthesis. Blackwell Science.
- Gorgam H.C, J. Mc G. Simos, R.H. Paul. Robson y D. A. Hodgson. 1996. Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: light-dependant membrane sequestration of ECF sigma factor CarQ by anti-sigma factor CarR. *Molecular Microbiology*. 19:(1)171-186 p.
- Gregor J, y K. Gabriele. 1999. Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS Microbiology Letters*. 179:1-9 p.
- Gregory R.P.F. 1989. Biochemistry of Photosynthesis. John Wiley & Sons.

- Griffin, H.G y A.M. Griffin. Eds. 1994 "PCR Technology". "Current Innovations". CRC Press. 370 pp.
- Harding R.W. y W. Shropshire. 1980. Photocontrol of carotenoid biosynthesis. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 1980. 31:217-38 p.
- Harker M y P.M. Bramley 1999. Expression of prokariotic 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatases in *E. coli* increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis. *FEBS Lett* 448:(1) 115-119 p.
- Hernández Zarate, G.2000. Estandarización de las metodologías de Fish y PCR y su utilización en la identificación filogenética de comunidades bacterianas en ostión (*Crassostrea gigas*). Tesis de Maestría. CICESE.
- Hemmi H, S Ohnuma, K Nagaoka, T Nishino. 1998. Identification of gene affecting lycopene formation in *Escheherichia coli* transformed with carotenoid biosynthetic gene: candidates for early gene in isoprenoid biosynthesis. *J. Biochem* 123:(6)1088-96 p.
- Johnson JA., W.K.R Wong, J.T Beatty. 1986. Expression of cellulase genes in *Rhodobacter capsulatus* by the use of plasmid expression vectors. *J. Bacteriol* 167:604-610 p.
- Kajiwara S, P.D Fraser, K Kondo, N Misawa.1997. Expression of an exogeneous in isopentenyl diphosphate isomerasa gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*." *Biochem J.* 324:(2)421- 426 p.

- Kunst, F., y G. Rapaport. 1995. Salt Stress Is an Environmental Signal Affecting Degradative Enzyme Sintesis in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 1995 May;177(9):2403-7.
- Lois LM, N Camous, S.R Putra, K Danielsen, M Rohmer, A Boronat. 1998. Cloning and characterization of a gene from *E. coli* encoding a trasketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:(5) 2105-10 p.
- Ludwig w. y K.H. Schleifer. 2001. Phylogey of Bacteria beyond the 16s rRNA Standard. www.vermicon.de/english/news/Science/khs99111.htm
- Marrs B. 1981. Mobilization of the genes for photosynthesis from *Rhodopseudomona capsulata* by a promiscuous plasmid. J. Bacteriol 146:1003-1012
- Mathews M.M. y W. R Sistron. 1960. The function of carotenoid pigments of *Sarcina lutea*. Arch. Mikrobiol. 35:139-146 p.
- Misawa N, Y. Satanomi, K. Kondo, A. Yokoyama, S. Kajiwra. 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. J. Bacteriol. 177: 6575-84 p.
- Mitchell C, S. Iyer., J.F Skomurski y J.C Vary. 1986. Red pigment in *Bacillus megaterium* spores. Applied and enviromental Microbiology. 52:(1) 64-67 p.

- Olmos-Soto Jorge y Contreras-Flores Rosalía. 1999. Manual de Prácticas "Técnicas en Genética Molecular". Comunicaciones Academicas, Serie Acuicultura. CICESE.
- Olsen G. J y C. R Woese. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. FASEB J. 7:113-123 p.
- Ostle B. 1963. Statistics in Research. The Iowa State University Press, second edition, U.S.A
- Paniagua, M.J., E. Dujardin y C. Sironval. 1995. Growth of *Dunalliella bardawil* under carotenogenic conditions. Journal of marine Biotechnology, 2, 101-104 p.
- Pedrin-Caballero R. 1999. Aislamiento y caracterización molecular parcial de especies de *Bacillus* marinos productores de pigmentos carotenogénicos. Tesis de Licenciatura , Univ. Aut. Baja California. 78 pp.
- Petit M.A, C. Braund, L. Janniere y S.D. Ehrlich .1990. Tn10-Derived transposon active in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 172:(12) 6736-6740 p.
- Perry K.L., T.A Simonitch, J Harrison-Lavoie y S.T Liu. 1986. Cloning and Regulation of *Erwinia herbicola* Pigments Genes. Journal of Bacteriology. 168:607-612 p.
- Priest, F.G.1993. "Systematics and ecology of *Bacillus*" : *Bacillus subtilis* and other Gram positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. American Society for Microbiology, Washington D.C.

- Rodríguez R, B. Ruiz y S. Sánchez. 1998. Los carotenoides en la Salud. BEB. 17:(3) 115-121 p.
- Ruther A., N Misawa, P Boger, G Sandmann. 1997. Production of zeaxanthin in *Escherichia coli* transformes with different carotenogenic plasmids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48:(2) 162-167 p.
- Sammartano L.J. y R.W Tuvenson. 1987. *Escherichia coli* strains carrying citochrome d terminal oxidase complex are sensitive to near -UV inactivation. J. Bacteriol. 169:5304-5307 p.
- Sasson A. 1997. Microalgal Biotechnologies: Recent Developments and Prospects for Developing countries. BIOTEC publication 1/2542. UNESCO. 76pp.
- Schiedt K y S. Liaaen-Jensen. 1995. Isolation and Análisis: Carotenoids. Birkhäuser Verlag. Basel.
- Shingo F., H. Hiroshi, N. Yukinobu, H. Kensuke y N. Tokuzo. 1990. Cloning and nucleotid sequence of *ispA* gene responsible for farnesyl diphosphate synthase activity in *Escherichia coli*. J. Biochem. 108:995-1000 p
- Sneath P. 1986. Endospore-forming Gram positive rods and cocci: Gram positives other than Actinomycetes, Williams and Wilkins, Vol2, 1104-1127 p.
- Spears K. 1988. Development in Food colourings: the natural alternatives. TibTech . 6: 283 p.

- Taber H. W. 1993. Respiratory Chains: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. America Society for Microbiology. Washington D.C. 199-212 p.
- Tuvenson RW., R. A Larson, y J. Kagan. 1998. Role of cloned carotenoid gene expressed in *Escherichia coli* in protecting against by near-UV light and specific phototoxic molecules. *Journal of Bacteriology*. 170:(10) 4675-4680 p.
- Wang C.W., M.K. Oh, J.C. Liao. 1999. Engineered isoprenoid pathway enhances astaxathin production in *Escherichia coli*. *Biotechno Bioeng* 62:(2) 235-241 p.
- Wieland B., F. Corinna, E. G. Maecker, T. Günther, M. Lechner, J.M. Bravo, K. Poralla y F. Götz. 1994. Genetic and Biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4-4'-Diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 176:(24) 7719-7726 p
www.forestal.uchile.cl/curso/fivegf/fotosintesis.htm
-
- Yanish P., J. Vieira y J. Messing. 1988. *Gene*. 33:103-119 p.
- Zuther, E., H. Schubert y M. Hagemann. 1998. Mutation of a gene encoding a putative glycoprotase leads to reduced salt tolerance, altered pigmentation, and Cyanophyn acumulation in the Cyanobacterium *Synechosystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*. 180 (7): 1715-1722.

