

EMPLEO DE SÓLIDOS SUSPENDIDOS PARA EL MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE ACTIVIDAD ESTERASA/LIPASA DE UNA ARQUEA HALÓFILA

Martha F. Martín del Campo Solís ^a, R. María Camacho Ruíz ^a, Juan C. Mateos Díaz ^a, Jorge A. Rodríguez González ^{a*}

^a Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Av. Normalistas #800 Col. Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, 44270, MÉXICO. *email: jrodriguez@ciatej.mx

Resumen

Las esterases (EC 3.1.1.1) y lipasas (EC 3.1.1.3), son enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres y en medios no acuosos (*e.g.* solventes orgánicos) realizan gran variedad de síntesis siendo este rubro su más importante aplicación. Las condiciones en síntesis suelen ser agresivas con las enzimas, por lo que es de gran interés biotecnológico encontrar esterases/lipasas que las soporten. Los microorganismos extremófilos, cuyas enzimas están adaptadas a condiciones fisiológicas extremas como la arquea halófila *Natronococcus* sp. TC6 (crecimiento a 4M NaCl), resultan una fuente interesante de estas enzimas; sin embargo, una dificultad en su obtención y aislamiento es que la producción de la actividad es típicamente baja respecto a bacterias y hongos. En el presente trabajo se exploró e implementó exitosamente el cultivo en lote empleando sólidos de fibra de vidrio molida en suspensión, obteniendo que a una concentración de 160 g/L hubo una mejora en la producción de actividad esterasa/lipasa de *Natronococcus* sp. TC6 de 1.8 y 4.3 veces (hidrólisis de *p*-nitrofenil butirato (*p*NPB) y *p*-nitrofenil laurato (*p*NPL), respectivamente) respecto al cultivo en lote (sin sólidos añadidos), ambos a 120 h. Estos resultados ofrecen una alternativa altamente atractiva para la producción de enzimas de halófilos.

Introducción

Natronococcus sp. TC6, es una de las pocas cepas de arqueas halófilas con actividad esterasa/lipasa reportada [1]. Sin embargo, la baja producción de esta actividad ha dificultado la purificación y caracterización de estas enzimas. Previamente, ya han sido implementadas estrategias para la mejora en la producción de la actividad esterasa/lipasa de esta arquea como el cultivo en lote alimentado [2], pero presentan la desventaja de que en esas condiciones algunos componentes de los biorreactores pueden sufrir corrosión. La fermentación con sólidos suspendidos (FSS) consta de un cultivo sumergido en lote (FS) con niveles elevados de sustratos o sólidos insolubles [3], se lleva a cabo en columnas empacadas a través de las cuales se circula líquido, o cultivos sumergidos estacionarios o agitados. En un cultivo con sólidos suspendidos, las partículas se mueven de manera independiente como un fluido y la transferencia de masa y calor son altos entre las partículas y el medio así como el gas respecto a la FL. En la búsqueda de estrategias de cultivo de alto rendimiento para la producción de esterases/lipasas de *Natronococcus* sp. TC6, se planteó en este trabajo implementar la fermentación en lote con sólidos inertes en suspensión a nivel matraz con el fin de incrementar la actividad esterasa/lipasa respecto a la fermentación en lote e incluso la fermentación en lote alimentado previamente alcanzada por nuestro grupo de trabajo.

Metodología

Cepa y medio de cultivo: *Natronococcus* sp. TC6, proviene de la Algerian Culture Collection. Esta cepa fue donada por el laboratorio de Biocatálisis y Química fina (UMR CNRS 6111) de Marsella, Francia por el Prof. Jaques Baratti.

Cultivo en lote con sólidos inertes en suspensión: Se empleó medio DSM97 modificado a 4M de NaCl en matraces de 250 mL inoculados al 10% (V/V) e incubados a 40 °C en un agitador orbital (Environ shaker ino-lab) a 250 rpm. Se agregó una proporción de fibra de vidrio calibre 0.8 mm de 80, 160, 320 y 480 g/L al medio, previamente molida a un tamaño de partícula de 0.84-2.0 mm en mortero, y se

esterilizó junto al medio de cultivo. Para el cultivo en lote (FS), se emplearon matraces sin sólidos con el mismo inóculo.

Determinación de Biomasa: Se empleó un método indirecto en el cual se recuperó el total del fermento y sólidos, se centrifugó 20 minutos a 5000 rpm (centrifuga Hettich 320R) y 25 °C, se desechó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 25 mL de solución NaCl 4M recentrifugando a las mismas condiciones entre cada lavado. Al final la muestra con sólidos fue secada a 70 °C (drying oven DGH-9145A) y posteriormente el contenido total de cada muestra fue pasada a un crisol y calcinada a 600 °C para determinar su peso. La biomasa se determinó indirectamente al restar del peso de la muestra seca el peso de las cenizas obtenidas en la mufla, realizando un ajuste al cálculo con el contenido de cenizas en la biomasa que fue de $47.16 \pm 2.54\%$ y con los controles con medio de cultivo sin inocular en presencia de sólidos a los cuales se les realizó el mismo tratamiento que a las muestras con biomasa.

Determinación de actividad esterasa/lipasa: La actividad lipasa/esterasa en FSS (incluyendo los sólidos) y FS se realizó por triplicado, cuantificando en discontinuo la liberación del *p*-nitrofenol liberado por la hidrólisis del enlace éster del *p*NPL ó de *p*NPB de acuerdo a la metodología reportada previamente para actividad esterasa/lipasa de halófilos [4]. Todos los ensayos y determinaciones se realizaron por triplicado.

Resultados

En la implementación del cultivo por FSS para la producción de esterases/lipasas de *Natronococcus* sp. TC6, se ensayaron diferentes cantidades de fibra de vidrio para el crecimiento de la cepa y la producción de esterases/lipasas respecto a la FS (0 g/L de soporte) observando crecimiento en todas las cantidades de soporte ensayadas, lo cual demuestra que la cepa tuvo una buena adaptación a este tipo de cultivo. Sin embargo, este crecimiento dependió como se esperaba de la cantidad de fibra presente.

La biomasa (Figura 1.-A) aumentó al incrementar la concentración de sólidos entre los rangos de 80 a 160 g/L; pero por encima de este valor, se presentó un menor crecimiento (a 360 y 480 g de sólidos/L) evidenciándose además, una decoloración de la biomasa del naranja típico intenso de la cepa a blanco probable debido a la fricción con la suspensión de sólidos. La máxima producción de biomasa se obtuvo con 160 g de sólidos/L con un valor de 5.69 g/L a las 96 horas; esto es una producción 1.64 veces superior a la obtenida en la FS.

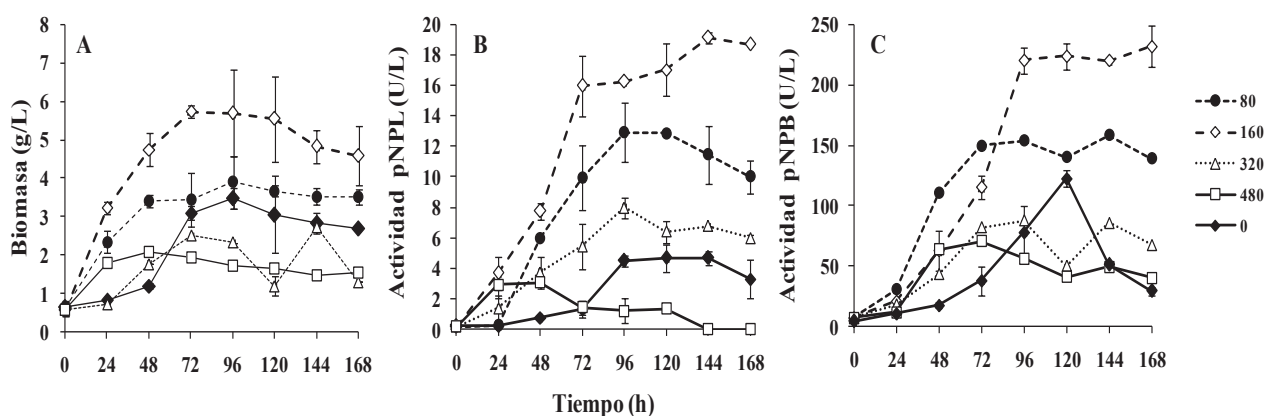


Figura 1.- Perfiles de producción de biomasa: A, de actividad esterasa/lipasa sobre B: pNPL y C: pNPB para *Natronococcus* sp. TC6 al cultivarse en FSS y FS (0 g/L de sólidos) con distintas cantidades de sólidos de fibra de vidrio (0, 80, 160, 320 y 480 g/L). Cultivo a NaCl 4M, pH 8.0 incubado a 250 rpm y 40 °C en un volumen de medio de 25 mL inoculados al 10% (v/v).

En la *Figura 1.-B* se muestran los perfiles de producción de esterasa/lipasa obtenidos al emplear *pNPL* como sustrato; se detectó que al emplear la cantidad de 160g/L de sólidos se obtuvo la producción máxima con un valor de 19.2 U/L a un tiempo de fermentación de 144 horas, siendo este valor 4.3 veces superior a lo obtenido por FS. El máximo alcanzado coincidió con un ligero descenso en la biomasa (*Figura 1.A*), este pequeño aumento podría asociarse a la liberación de una porción de material intracelular liberado por lisis celular. Cabe señalar que, cuando se empleó una cantidad importante de fibra de vidrio (480 g/L) se detectó actividad inferior a la obtenida por FS, llegando a ser nula en las últimas horas de cultivo y asociándose a un bajo crecimiento.

Por otra parte, en la *Figura 1.-C*, se presenta la actividad hidrolítica sobre *pNPB* para el cultivo por FSS y FS. La actividad detectada al emplear el sólido siguió un patrón de aumento en la actividad para todas las concentraciones de fibra de vidrio alcanzando el máximo a las 96 horas para después mantenerse aproximadamente constante, por el contrario en la FS se observa un máximo a las 120 horas y un posterior descenso brusco lo que sugiere mayor estabilidad en FSS que en la FS. Al igual que para *pNPL* el máximo se encontró de 223 U/L al emplear 160 g de sólidos/L, llegando a ser 1.83 veces superior al máximo en FS. Para ambos sustratos, la producción máxima de actividad resulta similar a la producción por lote alimentado en biorreactor para la mitad de tiempo de fermentación [2], lo que la hace un sistema de cultivo con mejor productividad (U/L-h).

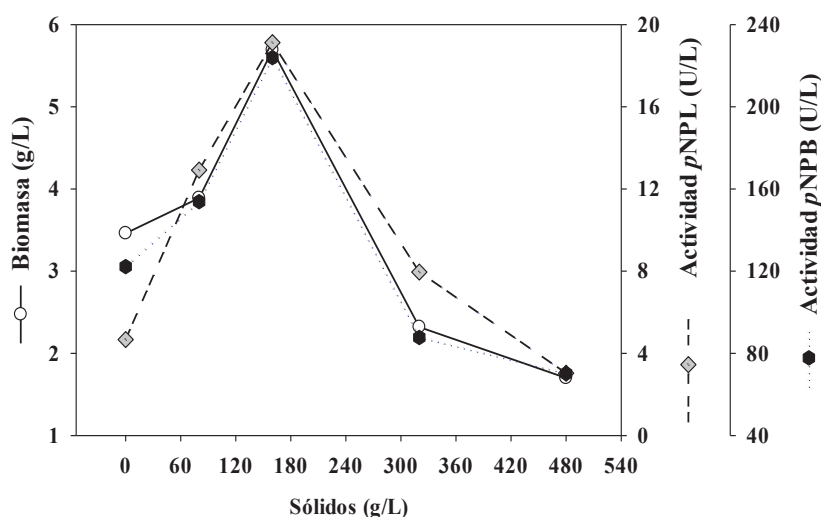


Figura 2.- Efecto de la cantidad de sólidos (fibra de vidrio molida) presente en el cultivo de FSS sobre la producción de biomasa y actividad esterasa/lipasa de Natronococcus sp. TC6.

En la *Figura 2.* se representan las máximas producciones de biomasa y actividad lipasa/esterasa obtenidas al cultivar a *Natronococcus sp. TC6* por FSS y FS con las diferentes cantidades de sólidos. La cepa *Natronococcus sp. TC6* creció favorablemente en FSS y las producciones máximas ocurrieron a 160 g/L, donde se observa el óptimo. Además, tal como se había reportado, se mantuvo la relación entre aumento en la actividad y el de biomasa. Concentraciones superiores a 160 g/L resultaron inhibitorias del crecimiento y por ende de la producción de actividad esterasa/lipasa.

Conclusiones

La cepa *Natronococcus* sp. TC6 fue cultivable empleando sólidos en cultivo en lote en suspensión mostrando adaptabilidad y anclaje a la fibra de vidrio durante su crecimiento y mejoras respecto al cultivo sumergido en lote para la producción de actividad esterasa/lipasa. Esta nueva estrategia de cultivo no había sido reportada previamente y representa una alternativa para la producción de metabolitos de este tipo de microorganismos.

Agradecimiento.

Martha F. Martín del Campo agradece al CONACYT por el financiamiento de su beca doctoral.

Referencias

1. Boutaiba, S., et al., "Preliminary characterization of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp.", in *Journal of Molecular Catalysis*, Vol. 41, No. B: Enzymatic, p. 21-26, 2006.
2. Martín del Campo Solís, M., et al., "Mejoramiento de la producción de lipasas/esterasas halófilas de *Natronococcus* sp. por cultivo en lote y lote alimentado", in *AMIDIQ* Vol. 1, No. p. 1055-1060, 2011.
3. Aidoo, K.E., R. Hendry, and B.J.B. Wood, "Solid substrate fermentations", in *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 28, No. p. 201-237, 1982.
4. Camacho, R., et al., "Production and characterization of esterase and lipase from *Haloarcula marismortui*", in *j. Ind. Microbiol. biotechnol.*, Vol. 36, No. p. 901-909, 2009.