

Producción de enzimas exoxilanolíticas por inmovilización de la bacteria extremófila cepa FT3 en alginato de calcio

Production of exoxylanolytic enzymes by immobilisation of FT3 strand extremophilus bacteria in calcium alginate

Neida Rios M¹, Luis Enrique Terrazas Siles¹, Maria Teresa Alvarez Aliaga¹

¹Área de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia

Dirección para correspondencia: Neida Ríos. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra N° 2224, Miraflores. La Paz, Bolivia.

E mail: neidarm@gmail.com

Recibido para publicación en 31/07/09

Aceptado en 10/10/09

RESUMEN

Las xilanasas son exoglucanasas capaces de degradar xilano. Estas enzimas se pueden aplicar en varios procesos industriales como en la degradación de residuos agrícolas, para obtener azúcares los cuales se fermentan para producir etanol. La aplicación industrial sin embargo, requiere estabilidad principalmente a elevadas temperaturas, por ello existe gran interés en el estudio de microorganismos termófilos. En la presente investigación se estudió la producción de xilansasas en un sistema de inmovilización con alginato de calcio de la cepa bacteriana FT3 anaeróbica termófila, aislada de la región altiplánica de Bolivia. Los resultados mostraron que cuando la viscosidad del alginato es del 1%, la actividad fue de 3 [UI/mL]. Esta actividad fue incrementada a 4.5 [UI/mL], en cultivo en batch con alginato cálcico de alta viscosidad al 2 %. Cuando el sistema inmovilizado fue ensayado en un cultivo continuo que permitía la recuperación de la enzima, se logró incrementar la actividad hasta 15 [UI/mL]. El cambio de CINH₄ por extracto de levadura como fuente de nitrógeno en el medio, permitió mayor incremento de la actividad enzimática en el biorreactor hasta 23,5 [UI/mL].

Palabras Clave: xilanasas, termófila, inmovilización, biorreactor

ABSTRACT

Xylanases are exoglucanases capable of producing xylane. These enzymes can be applied in several industrial processes such as agricultural residue treatment to obtain sugars which are later fermented to produce ethanol. However, this process requires stabilization at high temperatures; therefore there is great interest in the study of thermophilus micro organisms.

This study focuses on the production of xylanases using calcium alginate for immobilisation of the FT3 thermophilus anaerobic bacteria, which was isolated from the andean region of Bolivia. The results showed that when the viscosity of the calcium alginate was 1%, a xylanolytic activity of 3 [IU/mL] was achieved. In batch cultures, the best immobilisation was achieved with high viscosity calcium alginate of at 2%, improving the enzymatic activity to 4.5 [IU/mL]. When a continuous system of immobilized cells was used in order to recover the enzyme, the enzymatic activity was increased to 15 [IU/mL]. When NH₄Cl was replaced by yeast extract as a source of nitrogen in the medium, the enzymatic activity was improved to 23, 5 [IU/mL] in the bioreactor.

Key Words: xylanases, thermophile, immobilisation, bioreactor

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los avances logrados en el desarrollo de procesos industriales sostenibles en diversas áreas, se ha logrado gracias a la aplicación de microorganismos o componentes de ellos, es decir productos intermediarios o finales provenientes de su metabolismo. Es en ese sentido que algunos reportes económicos estiman que al menos el 5% de las ventas químicas globales son derivados de la biotecnología industrial y esta producción podría duplicarse hasta el 2010¹. Se ha sugerido que algunos de estos bioprocesos podrían resultar de técnicas emergentes principalmente de tecnología de DNA recombinante, ingeniería metabólica, bioinformática, genómica funcional y proteómica. Sin embargo, pese a la importancia que generan estos procesos se sabe también que pueden ser rápidamente desplazados por procesos químicos catalíticos tradicionales².

Dentro de los procesos industriales, el desarrollo de algunas investigaciones está basado en microorganismos extremófilos debido a la estabilidad que presentan sus metabolitos³. Éstos ofrecen ventajas en procesos industriales, por su función rápida y eficaz en condiciones extremas como ser pH, temperatura, concentraciones de sal, etc. Por ejemplo las enzimas de los termófilos son capaces de catalizar reacciones a temperaturas elevadas, además de presentar mayor estabilidad y vida media más prolongada que los mesófilos.

Por otro lado, los desechos agrícolas son la mayor fuente de residuos y de potencial contaminante a nivel mundial. En la actualidad la acumulación de, éstos es uno de los problemas más preocupantes, por lo que se viene planteando diferentes soluciones biológicas que permitan al mismo tiempo su disminución y aplicación. Por otro lado, la necesidad de implementar un control sobre la contaminación, estimula y potencia el uso de materiales de residuos agrícolas renovables en estos procesos. Por lo general éstos poseen gran cantidad de hemicelulosas y celulosas, y un bajo porcentaje de ligninas, por lo que puede brindar grandes cantidades de fuente

de carbono ya que son fácilmente degradables por bacterias con capacidad de hidrolizar dichos componentes.

La hemicelulosa es el segundo polisacárido mas abundante en plantas, es soluble en álcali y está estrechamente relacionado a la celulosa. Está compuesta por unidades de glucosa, galactosa, manosa, arabinosa y principalmente xilosa. Las enzimas capaces de degradar se denominan en general hemicelulasas y han sido ampliamente estudiadas^{4,5,6}.

La reutilización de las enzimas es una de las formas que permite la reducción de costos, siendo la inmovilización biológica una técnica mediante la cual moléculas, enzimas, organismos o células son fijados a superficies o atrapados en matrices para ser reutilizados protegiendo el material biológico frágil⁷.

Así también se sabe que una dificultad inminente en los procesos biotecnológicos es la baja productividad, una posible solución a este problema es incrementar la concentración celular⁸. Esta desventaja puede ser superada a través del establecimiento de cultivos continuos o el uso de sistemas fed-batch. Así también, se puede conseguir una alta productividad en biorreactores con células inmovilizadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras y condiciones de cultivo. Para este estudio se utilizó una cepa denominada FT3, la cual fue aislada de una muestra de lodo de aguas termales de la región altiplánica de Chaqui-Bolivia, cuya condición climática es extrema. Esta cepa FT3 ha sido estudiada anteriormente comprobándose su capacidad de degradar hemicelulosa⁹.

Cultivo Batch. La cepa fue cultivada en viales de 100 mL a una temperatura de 60° C y pH neutro en un medio basal mineral Medio 11, que contiene: Solución 1 10ml/L (g/L): 100 NH₄Cl; 10 NaCl, 10 MgCl₂.6H₂O, 5 CaCl₂H₂O, 200 K₂HPO₄•3 H₂O; Solución 2 1ml/L (g/L): 1.5 FeCl₂.4H₂O, 0.006 H₃BO₃, 6.5 mL HCl 25%, 0,12 CoCl₂.6H₂O, 0,1 MnCl₂.4H₂O, 25 Na₂MoO₄.2H₂O, 25 NiCl₂.6H₂O, 70 ZnCl₂, 0,0015 CuCl₂.2H₂O, 0,0003 Na₂SeO₃, 0,5 NaOH; Solución 3 30 mL/L (g/L): 85 NaHCO₃; el medio fue suplementado con solución de Vitaminas

10mL/L (Biotina 1 mg, PABA 5 mg, B12 5 mg, Tiamina 10 mg, csp 1000 mL), como agente reductor se utilizó tioglicolato de sodio (10 % solución), 2 mL/L¹⁰; y como fuente de carbono (10 - 20 %) se utilizaron residuos agroindustriales como ser paja de trigo, cascarilla de arroz, paja de quinua . El volumen del inóculo fue del 10% del medio de cultivo, y como fuente de carbono estándar se utilizó xilano.

Para crear un ambiente de anaerobiosis, el aire existente en los viales fue remplazado por gas nitrógeno antes de la inoculación según la Técnica de Hungate¹¹. El crecimiento del cultivo fue detectado a través de la medición de la densidad óptica utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Cultivo Continuo. Una vez establecidas las condiciones del cultivo en batch, se inició el cultivo continuo, en el cual se procedió a inmovilizar las células bacterianas en alginato de calcio.

Encapsulación en perlas de alginato. Esta técnica fue desarrollada como una forma alternativa para la recuperación de bacterias anaerobias viables no cultivables. La técnica consiste en mezclar alginato de sodio con la muestra. La suspensión-mezcla es dispersada mediante goteo con jeringa 27G en una solución

de cloruro de calcio en constante agitación por dos horas para permitir la formación de las perlas¹².

Influencia de la concentración de alginato. El tamaño y la esfericidad de las perlas dependen principalmente de la viscosidad de la solución del alginato y de la distancia que hay entre la jeringa y la solución de cloruro de calcio¹¹. Se formuló un experimento de optimización tomando como variables concentraciones de 1.5, 2, 2.5, 3 % de alginato de sodio y cloruro de calcio, y como respuesta, la actividad xilanólítica.

Establecimiento del biorreactor. Una vez polimerizadas, las perlas de alginato con las células ya inmovilizadas se trasladaron 10 mL de la preparación a un biorreactor. Una vez empacado fue llenado con gas-nitrógeno y se selló todas las conexiones para impedir el ingreso de aire, todo este proceso fue realizado en la cámara de anaerobiosis.

El biorreactor fue construido utilizando como columna una jeringa de 20 mL de capacidad, en la cual fue acoplado un conducto de alimentación-recirculación, y otro de salida (Figura 1). El flujo de alimentación fue determinado según los valores de la cinética de crecimiento de la cepa.

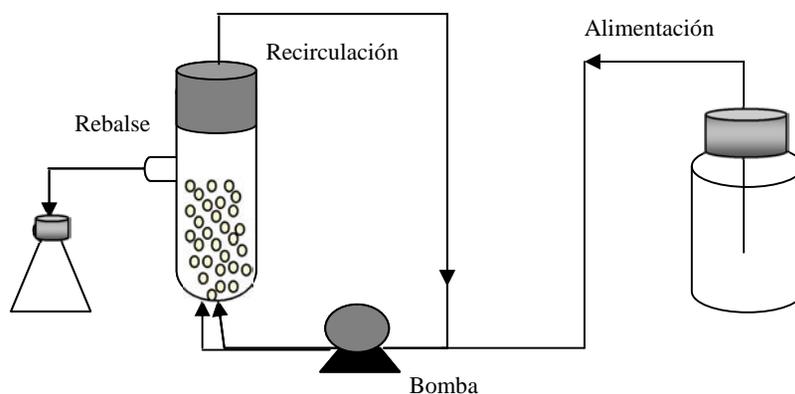


Figura 1. Biorreactor con células bacterianas inmovilizadas en alginato cálcico

Para mantener las condiciones de temperatura de la cepa a 60°C, el bioreactor mas el medio de alimentación fue puesto en una bañó maría a dicha temperatura.

Determinaciones analíticas. Determinación de la actividad enzimática. Determinación de xilanasas por la técnica de DNS: Este es un

método estándar, basado en la determinación de enzimas de forma indirecta y se fundamenta en la determinación de presencia de grupos carbonilos libres (C=O), de los llamados azúcares reductores. Se basa en la utilización de ácido 3,5-dinitrosalicílico para producir la oxidación de los azúcares¹³.

Determinación de β -D-glucosidasa y β -D-xilosidasa: Este método está basado en la utilización del p-nitrofenol y principalmente se define como: la unidad enzimática β -D-glucosidasa y β -D-xilosidasa., es expresada como la capacidad de liberar un μmol de p-nitrofenol por minuto bajo condiciones estandarizadas¹³.

Determinación de proteínas totales. La determinación de proteínas se realizó según la técnica de Lowry (1999), usando albúmina sérica bovina como estándar¹⁴.

RESULTADOS

La cepa FT3, fue aislada de una muestra de aguas termales, de la región de Chaqui-Potosí, a través de la técnica de Roller tubes⁹, esta cepa mostró capacidad de hidrólisis con diferentes residuos agrícolas, utilizados como fuente de carbono. Esta cepa expresó extracelularmente aproximadamente 3.8 [UI/mL] de actividad xilanolítica y una actividad CMCasa de 0.8 [UI/mL] a las 56 horas de cultivo siendo este el tiempo del pico máximo de actividad, cuando la cepa creció con cascarilla de arroz como fuente de carbono (Figura 2), todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

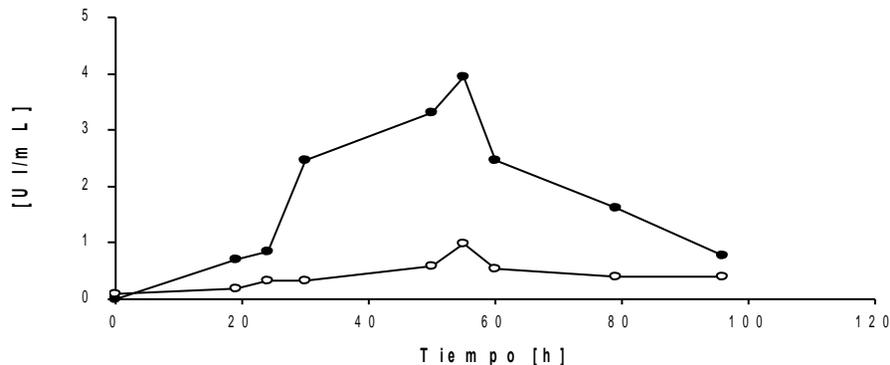


Figura 2. Actividad xilanolítica, y celulolítica, cepa FT3 crecida con cascarilla de arroz como fuente de carbono. (◆) Actividad xilanolítica, (°) actividad CMCasa

Así también, se comprobó que la cepa FT3 puede crecer con otros sustratos como ser paja de quinua y paja de trigo. Sin embargo, las actividades xilanolíticas presentadas en ambos casos fueron de 2.5 y 2 [UI/mL] respectivamente

(Tabla 1), siendo éstas inferiores a la actividad xilanolítica encontrada con cascarilla de arroz, por lo que este sustrato fue seleccionado para los siguientes experimentos.

Tabla 1. Actividad Hemicelulolítica en diferentes sustratos

	Sustrato		
	<i>Paja de Quinua</i>	<i>Paja de Trigo</i>	<i>Cascarilla de Arroz</i>
Hemicelulasas UI/mL	2.5	2	3.8

La cepa FT3, además presentó actividades importantes como ser β -xilosidasa de aproximadamente 100 [UI/mL], y β -glucosidasa de 50 [UI/mL]. Cabe recalcar que estas

actividades se presentaron una vez que hubieron interactuado las enzimas exoglucanasas y siguiendo el mismo patrón que las primeras (Figura 3), en cuanto al tiempo.

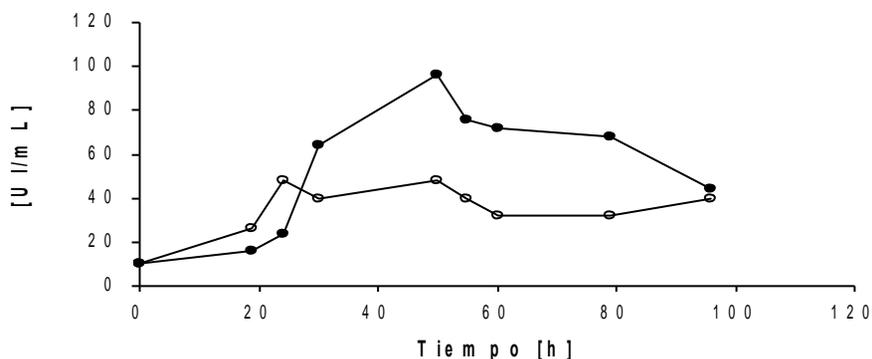


Figura 3. Actividad β -xilosidasa, y β -glucosidasa, cepa FT3 crecida con cascarilla de arroz como fuente de carbono (◆) Actividad β -xilosidasa, (°) actividad β -glucosidasa

La cepa FT3 fue seleccionada para este estudio, por presentar una actividad xilanólítica significativa y una baja actividad celulolítica. Para determinar los valores de velocidad de crecimiento (μ), se realizó una cinética de

crecimiento (Figura 4), a través del incremento de la biomasa determinada por densidad óptica, donde la cepa empieza aproximadamente a las 20 horas, la fase exponencial hasta las 40 horas, momento en que empieza su fase estacionaria.

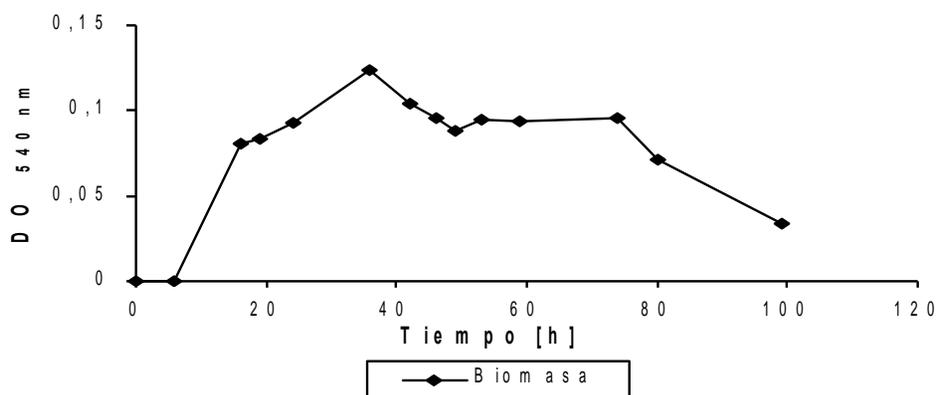


Figura 4. Cinética de crecimiento cepa FT3, crecida en xilano como fuente carbono estándar

De acuerdo a los datos obtenidos la cepa FT3, tuvo una velocidad de crecimiento de $0.0218 \text{ horas}^{-1}$ (Tabla 2). Para mantener las condiciones de biomasa, sustrato y producto, (en este caso actividad xilanólítica), constantes en un cultivo continuo, el flujo de alimentación para esta cepa fue de 0.218 mL/h , para permitir que el medio de

alimentación sea lo suficientemente consumido para mantener una concentración constante de células y por ende de la producción de enzimas xilanólíticas. El tiempo de residencia fue de 140 horas, que permitieron mantener estable el biorreactor.

Tabla 2. Condiciones biológicas de la cepa FT3 para el funcionamiento del bioreactor

Cinética de crecimiento			
Condiciones Biorreactor			
μ	Flujo (mL/h)	(h)	Tiempo de Residencia (h)
0.022	0.22	47	140

Para la inmovilización de las células, se desarrolló un experimento de optimización en cuanto a la matriz de inmovilización ya que

existió diferencia en cuanto al crecimiento de la bacteria a diferentes concentraciones de alginato cálcico (Figura 5).



Figura 5. Diferencia de crecimiento de células inmovilizadas en alginato cálcico

Es así que cuando se trabajó a una concentración de 1.5%, las perlas no fueron consistentes por lo que las bacterias tendieron a salir más rápidamente hacia el medio. Cuando se utilizaron concentraciones de 2.5% y 3% el proceso para la encapsulación se tornó dificultoso ya que a esta concentración la solución es espesa por lo que la aguja sufrió taponamientos durante el proceso impidiendo la formación de perlas esféricas. Cuando la inmovilización de células se realizó con una concentración del 2% de alginato de

sodio y cloruro de calcio (Figura 6), se obtuvo una actividad xilanolítica de aproximadamente 4 [UI/mL]. Así también, se pudo observar que las perlas tienen una formación más esférica cuando se utiliza alginato de alta viscosidad, siendo este un factor importante debido a que posteriormente las perlas de forma alargada no permitieron un buen empaquetamiento en el establecimiento del biorreactor¹².

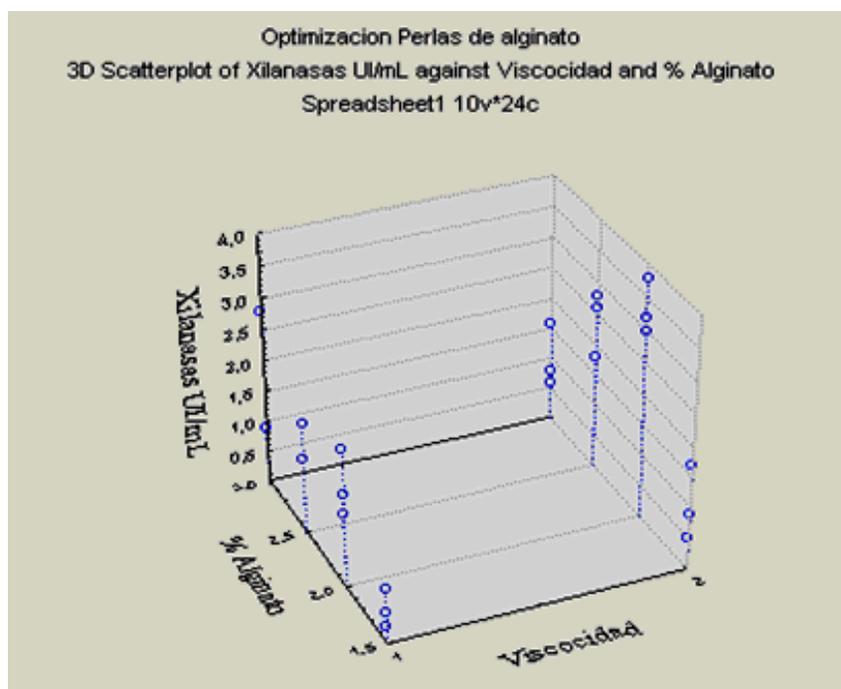


Figura 6. Influencia de la concentración y viscosidad de alginato cálcico en la producción de xilanasas

La optimización de la producción enzimática se realizó mediante dos cambios fundamentales en el medio de cultivo, en una primera fase se llevó a cabo el cultivo en condiciones batch, como se especifica en materiales y métodos (Figura 7A), en el biorreactor ya armado, luego se procedió a dar alimentación continua con un flujo de alimentación de 0.22 mL/h teniendo como tiempo de retención 140 horas para mantener estable el biorreactor en proceso continuo (Figura 7B). Durante este tiempo se realizó determinaciones de actividad xilanólica y producción de xilosa, (la determinación de este azúcar fue realizado con el método de DNS para azúcares reductores). En

una tercera fase (Figura 7C), como parte de la optimización de la actividad enzimática se cambió la fuente de nitrógeno de NH_4Cl por extracto de levadura a una concentración semejante de 100 g/L en la solución A del medio 11 (la solución A fue usada en un volumen de 10 mL/L de medio) tomando en cuenta la proporción de nitrógeno en ambas fuentes. El extracto de levadura fue seleccionado dado que mostró ser la mejor fuente de nitrógeno en cultivos en batch¹⁵, en experimentos llevados a cabo con la misma cepa bajo las mismas condiciones de pH y temperatura.

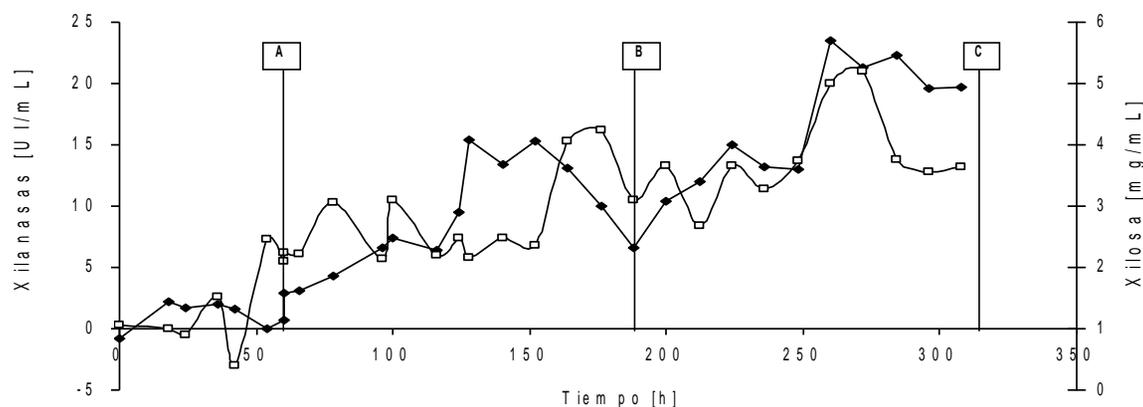


Figura 7. Producción de xilanasas (♦) y xilosa (◻) en cultivo continuo

DISCUSIÓN

Dentro de las aplicaciones más relevantes que se tiene para las enzimas xilanasas, está su uso en la industria del papel ya que permite la disminución del uso de compuestos clorados, que después se tornan tóxicos. Uno de los principales requisitos que estas enzimas deben cumplir para su posterior aplicación es una baja o nula actividad celulolítica ya que alteraría la materia.

Por otro lado se sabe que en los procesos de cultivo en batch, los microorganismos presentan fases definidas durante su crecimiento y por ende de producción enzimática, una de las mejores formas de incrementar dicha producción es el establecimiento de cultivos continuos que nos permitan mantener una producción constante. La cepa FT3 mostró un incremento notable de actividad xilanólica en cultivo continuo en

comparación al cultivo en batch dando un incremento de hasta 3 veces más.

Así también, se ve que si bien el proceso de inmovilización celular pareciera ser una solución para incrementar la producción enzimática, podría interferir en ésta si no se toma en cuenta las concentraciones y viscosidades correctas.

En este estudio se ha comprobado que la cepa FT3 tiene actividad hidrolítica ya que presenta actividades xilanólicas significativas comparables con otros estudios^{16,17}. Por otro lado, la actividad celulolítica presentada es baja, por lo que el estudio de esta cepa resulta interesante, por su potencial para aplicaciones posteriores.

En este trabajo la actividad xilanólica fue incrementada cuando se estableció el cultivo continuo, pero esta fue mejorada cuando se cambió la fuente de nitrógeno, se espera poder incrementar más aun esta producción, cambiando

otros factores importantes como ser la fuente de carbono o la concentración de ambas fuentes, pH y temperatura.

AGRADECIMIENTOS

A ASDI/SAREC – Suecia en el desarrollo del Proyecto Biodiversidad Microbiana del Lago Poopo y Río Desaguadero, por el soporte económico; a la cooperación francesa IRD, por el apoyo en realización del curso de Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas

REFERENCIAS

- World chemicals: will industrial biotech bloom. *The Economist*. 2004; 9 April.
- Rogers PL, Jeon YJ, Svenson CJ. Application of Biotechnology to Industrial Sustainability. Institution of Chemical Engineers Trans IChemE. Process Safety and Environmental Protection. 2005; 83(6 Pt B): 499–503.
- Turner P, Mamo G, Karlsson EN. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb Cell Fact*. 2007; 6: 9.
- Ramírez P, Cocha JM. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento caracterización y determinación de la actividad celulolítica, *Revista Peruana de Biología*. 2003; 10 (1): 67-77
- Ruminot C, Schöbitz R, Ciampi L, Vignolo G. Encapsulación de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas antagonistas en contra de *Listeria monocytogenes*. Tucumán: Proyecto DID/UACH S S-200520 200520. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos; 2005.
- CANMET Energy Technology Centre. Ethanol: The "Green Gasoline". Canadá: CANMET Energy; 2005.
- Mukesh K, Lavanya M, Ramesh Ch. Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. *Biochem Eng J*. 2008; 38: 88–97.
- Ríos N, Crespo C, Terrazas L, Álvarez M. Aislamiento de cepas anaeróbicas termófilas productoras de celulasas y hemicelulasas implicadas en la producción de etanol, mediante técnicas de cultivo tradicionales y no tradicionales. *BIOFARBO*. 2007; 15(1): 43-50.
- Sommer P, Georgieva T, Ahring BK. Potential for using thermophilic anaerobic bacteria for bioethanol production from hemicellulose. *Biochem Soc Trans*. 2004; 32 (Pt 2): 283-9.
- Miller TL, Wolin MJ. A Serum Bottle Modification of the Hungate Technique for Cultivating Obligate Anaerobes. *Appl Environ Microbiol*. 1974; 27(5): 985-987.
- Kulasingam T. Cultivating the uncultured: amyolytic microorganisms from ecological niches [Tesis Doctoral]. Suecia: Lund University; 2005.
- Smidsrod O, Skjak B. Alginate as an immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*. 1990; 8(3):71-78.
- Hansson T, Adlercreutz P. Optimization of Galactooligo-saccharide production from lactose using β - glycosidases from Hyperthermophiles. *Food Biotechnology*. 2001; 15 (2): 79-97.
- Universidad de Buenos Aires. Manual de procedimientos. Argentina: Laboratorio de Micología Experimental; 1999.
- Casablanca E. Optimización de medios de cultivo para la producción de enzimas xilanasas, β -glucosidasas y β - xilosidasas, en células libres y encapsuladas (In Press).
- Flores ME, Pérez R, Huitrón C. β -Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. *Letters in Applied Microbiology*. 1997; 24 (5): 410–416.
- Marichamy S, Mattiasson B. Rapid production of cellulase-free xylanases by solventogenic *Clostridia* from rumen. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005; 37 (5): 497–504.