

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE XILANASAS POR INMOVILIZACIÓN EN UN SISTEMA DE CULTIVO CONTINUO DE LA BACTERIA TERMÓFILA CEPA FT3 EN ALGINATO DE CALCIO

Neida Ríos Manríquez
Universidad Mayor de San Andrés

María Teresa Alvarez A.
Universidad Mayor de San Andrés

Luis Enrique Terrazas S.
Universidad Mayor de San Andrés

Recibido: septiembre 30, 2009 Aceptado: octubre 29, 2009

Resumen

Las xilanasas son exoglucanasas capaces de degradar xilano. Estas enzimas se pueden aplicar en varios procesos industriales como es la degradación de residuos agrícolas, producción de azúcares fermentables, producción de etanol, industria papelera y en distintos procesos relacionados a la industria alimenticia. La aplicación industrial sin embargo, requiere estabilidad principalmente a elevadas temperaturas, por ello existe gran interés en el estudio de microorganismos termófilos. En este estudio se optimizó la producción de xilanasas, en una primera fase en cultivo en batch y posteriormente en cultivo continuo 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 muestran que usando un medio basal, la actividad es 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 permitiera la recuperación de la enzima, se logró incrementar la actividad hasta 13 [UI/mL]. El cambio de NH_4Cl por extracto de levadura como fuente de nitrógeno y residuos de soya como fuente de carbono en el medio permitió mayor incremento de la actividad enzimática en el biorreactor hasta 17 [UI/mL].

Palabras clave: xilanasas, termófila, inmovilización, biorreactor

Abstract

Xylanases are exoglucanases capable to degrade xylane. These enzymes can be applied in several industrial processes such as agricultural waste degradation, fermentable sugar production, bioethanol production, paper industry and in processes related to food industry. However for industrial application, stability at high temperatures is needed. Therefore there is a great interest in thermophile microorganism studies. In order to improve xylanases production, a bacterial immobilization was tested. The strain FT3, of thermophile anaerobic bacteria, was used for immobilization in calcium alginate. FT3 was isolated from the Andean region in Bolivia. When a basal medium was used a xylanolytic activity of 3 [IU/mL] was achieved. In batch culture the best immobilisation was achieved with calcium alginate of high viscosity 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 activity was increased to 13 [IU/mL]. When NH_4Cl was replaced by yeast extract and soy residues was used as carbon source the enzymatic activity was improved to 17 [IU/mL] in the bioreactor.

Keywords: xylanases, thermophile, immobilisation, bioreactor

1 Introducción

La demanda de productos y procesos biotecnológicos, representan una alternativa a los procesos químicos convencionales en especial en aquellos catalizados por enzimas. Esto puede deberse a que se produce un menor número de subproductos, o porque son procesos más selectivos para la obtención del producto de interés [1].

Los avances logrados en el desarrollo de procesos industriales sostenibles en diversas áreas actualmente, se han alcanzado 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 resultar el doble hasta el 2010 [2]. Sin embargo, pese a la importancia que generan técnicas destacadas como la tecnología de DNA recombinante, ingeniería metabólica, bioinformática, genómica funcional y proteómica, se sabe también que además de necesitar tecnología avanzada estas pueden ser rápidamente desplazadas por procesos químicos catalíticos tradicionales [3].

En varias investigaciones dentro de procesos industriales, los microorganismos extremófilos han sido ampliamente estudiados debido a la estabilidad que presentan sus metabolitos [4]. Estos ofrecen ventajas en procesos industriales, por su función rápida y eficaz en condiciones extremas como es el 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 vienen planteando diferentes soluciones biológicas que permitan al mismo tiempo su disminución y aplicación. Es así que la necesidad de implementar un control sobre la contaminación estimula y potencia el uso de materiales de residuos agrícolas renovables en estos procesos. Generalmente éstos poseen gran cantidad de hemicelulosas, celulosas, y un bajo porcentaje de ligninas, por lo que puede brindar grandes cantidades de fuente de carbono al ser fácilmente degradables por bacterias con capacidad de hidrolizar dichos componentes.

El segundo polisacárido más abundante en plantas está constituido por hemicelulosa, este es soluble en álcali y está estrechamente relacionado con la celulosa. Está compuesto 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 [5, 6, 7].

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 frágil [8].

La baja productividad es una dificultad inminentemente dentro de los procesos biotecnológicos, una posible solución a este problema es incrementar la concentración celular [9]. El establecimiento de cultivos continuos, fed-batch y biorreactores con células inmovilizadas pueden incrementar la biomasa y por ende la productividad. El objetivo de estudio fue establecer un cultivo continuo con bacterias inmovilizadas, que permitiera la recuperación de enzimas xilanasas, para ello se probaron distintas condiciones que permitieran el incremento de la producción enzimática.

2 Materiales y métodos

2.1 Microorganismo

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 Chaquí-Bolivia de localización Geográfica: S 19° 37.46,0" /W 65° 4.302" a una altura de 3721 m.s.n.m., y cuya condición climática es extrema. Esta cepa FT3 ha sido estudiada anteriormente comprobándose su capacidad de degradar hemicelulosa [10].

2.2 Condiciones de cultivo

Cultivo batch

Se utilizó el Medio 11 basal mineral, que contiene: Solución 1 10ml/L (g/L): 100 NH₄Cl; 10 NaCl, 10 MgCl₂.6H₂O, 5 CaCl₂.H₂O, 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, c.s.p. 1000 mL), como agente reductor se utilizó tioglicolato de sodio (10 % solución), 2 mL/L [11]; y como fuente de carbono (10 - 20 %) se utilizaron residuos agroindustriales de soya. El volumen del inóculo fue del 10% del medio de cultivo, y como fuente de carbono estándar se utilizó xilano. El cultivo fue realizado en viales de 100 mL a una temperatura de 60° C y pH neutro.

Tratándose de una cepa anaerobia se utilizó la Técnica de Hungate, donde el oxígeno existente es remplazado por gas nitrógeno antes de la inoculación [12]. El crecimiento del cultivo fue detectado a través de la medición de la densidad óptica utilizando un espectrofotómetro Cary 20 a una longitud de onda de 540 nm.

Cultivo continuo

Para el cultivo continuo, se tomaron en cuenta las condiciones establecidas en cultivo en batch, y se procedió a inmovilizar las células bacterianas en alginato de calcio, para ello se optimizó la concentración y la viscosidad del alginato a usarse.

2.3 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 perlas [13].

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 entre la jeringa y la solución de cloruro de calcio [12]. Se formuló un experimento de optimización tomando como variables concentraciones de 1.5, 2, 2.5 y 3 % de alginato de sodio y cloruro de calcio, y como respuesta la actividad xilanolítica.

2.4 Establecimiento del biorreactor

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 (Fig. 1). El flujo de alimentación fue determinado según los valores de cinética de crecimiento de la cepa.

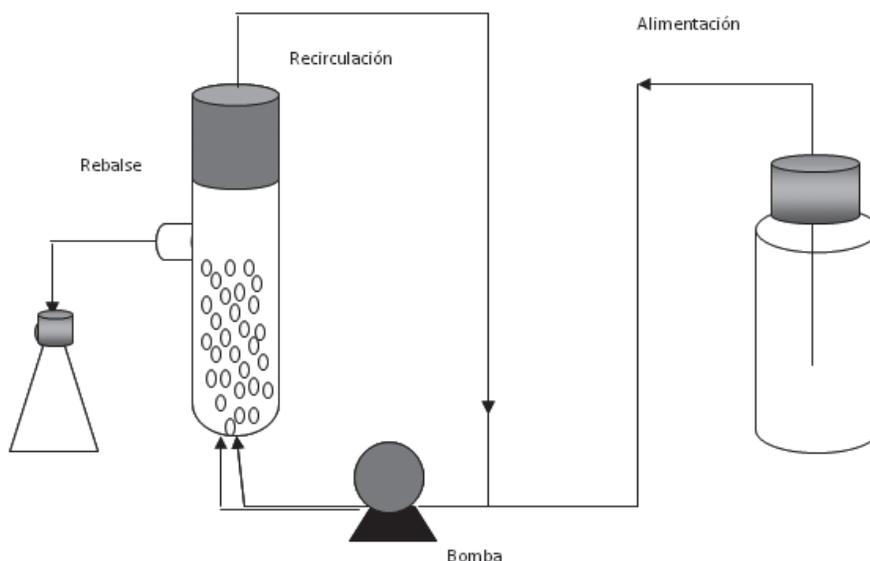


Figura 1. Biorreactor con células bacterianas inmovilizadas en alginato cálcico.

De acuerdo a la capacidad del biorreactor, este fue empacado con perlas de alginato hasta un volumen de 8 mL, y se procedió a llenar el restante con 10 mL de medio de cultivo. Una vez empacado fue llenado con gas-nitrógeno y se sellaron todas las conexiones para impedir el ingreso de aire, este proceso fue realizado en la cámara de anaerobiosis.

Para mantener las condiciones de temperatura de la cepa 60°C, el biorreactor más el medio de alimentación fueron puestos en un baño maría a dicha temperatura. Para caracterizar la enzima se tomaron en cuenta pH, temperatura y la especificidad por el sustrato.

2.5 Determinaciones analíticas

Determinación de la actividad enzimática

Determinación de xilanasas por la técnica de DNS: Este es un método estándar, que esta basado principalmente en la determinación de enzimas de forma indirecta. Se basa en la determinación de presencia de grupos carbonilos libres (C=O), de los llamados azúcares reductores. En este método se usa ácido 3,5-dinitrosalicílico para producir la oxidación de los azúcares liberados, como producto de la hidrólisis enzimática de un sustrato polimérico específico [14].

Determinación de β -D-glucosidasa y β -D-xilosidasa: Este método esta 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 μ mol de p-nitrofenol por minuto bajo condiciones estandarizadas [14]. Consiste en la utilización de sustratos glucopiranosidos y xilopiranosidos unidos a p-nitrofenol, este último es liberado por hidrólisis enzimática y fue determinado a 405 nm .

3 Resultados y Discusión

La cepa FT3, fue aislada de una muestra de aguas termales, de la región de Chaquí-Potosí, a través de la técnica del tubo rodado de Hungate [10], esta cepa mostró capacidad de hidrólisis con diferentes residuos agrícolas, utilizados como fuente de carbono. Expresando extracelularmente aproximadamente 2.8 [UI/mL] de actividad xilanólítica y una actividad CMCasa de 0.8 [UI/mL], presentando el pico máximo a las 56 horas de cultivo, siendo este el tiempo del pico máximo de actividad, cuando la cepa creció con xilano como fuente de carbono estándar (Fig. 2), este proceso fue realizado en cultivo en batch, todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Dentro de las aplicaciones más relevantes para las enzimas xilanasas, se encuentra 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 esta aplicación es una baja o nula actividad celulolítica ya que alteraría la materia durante este proceso. Por lo tanto la cepa FT3 al poseer dichos requisitos resulta tener potencial aplicación dentro de la industria papelera.

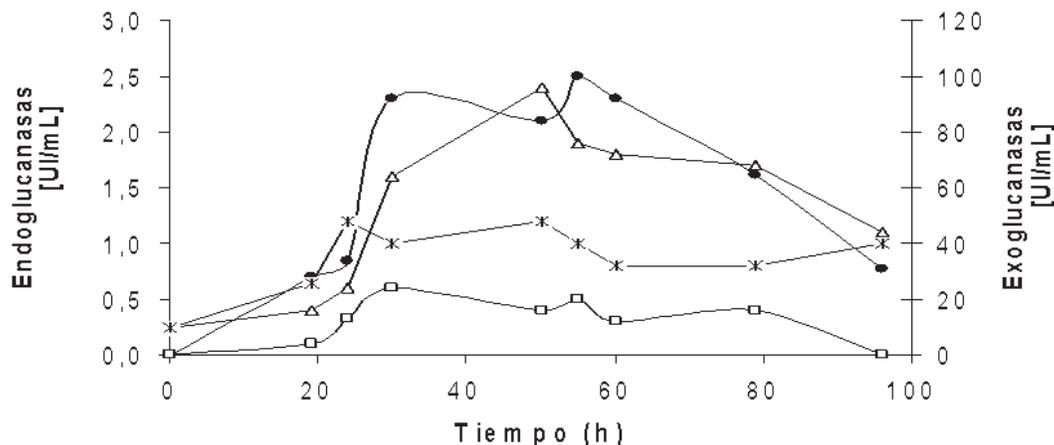


Figura 2. Actividad enzimática, cepa FT3 crecida en xilano como fuente de carbono. (●) Actividad xilanolítica, (□) actividad CMCasa, (Δ) actividad β-D-xilosidasa, (*) actividad β-D-glucosidasa

La cepa FT3, además presenta actividades β-xilosidasa de aproximadamente 100 [UI/mL], y β-glucosidasa de 50 [UI/mL] (Fig. 2), cabe recalcar que estas actividades se presentan una vez que han interactuado las enzimas exoglucanasas y siguen el mismo patrón que las primeras en cuanto al tiempo.

La cepa FT3 fue seleccionada para este estudio, por presentar una actividad xilanolítica significativa y una baja actividad celulolítica. Para determinar los valores de velocidad de crecimiento (μ), se realizó una cinética de crecimiento (Fig. 3), a través del incremento de la biomasa determinada por densidad óptica. Aproximadamente a las 12 horas empezó la fase exponencial hasta las 40 horas, tiempo en que empieza su fase estacionaria.

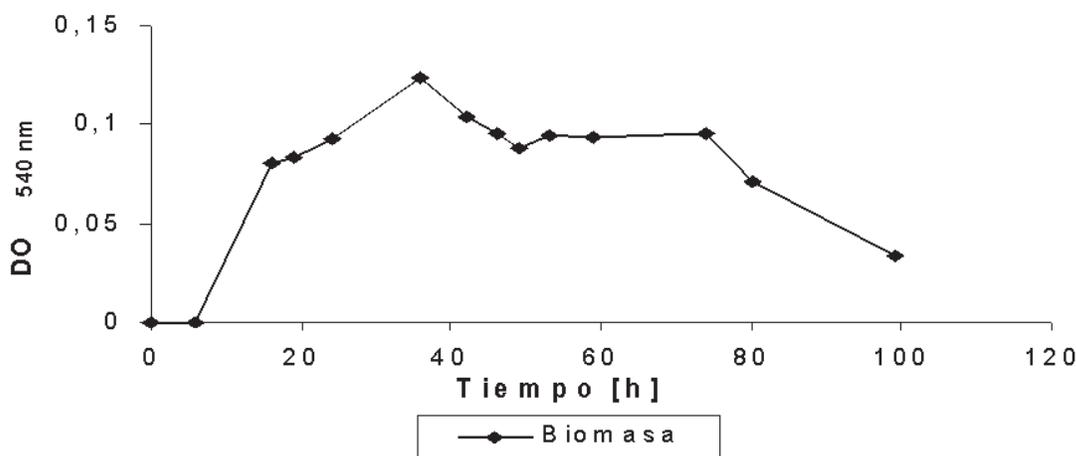


Figura 3. Cinética de crecimiento cepa FT3, crecida en xilano como fuente carbono estándar

El crecimiento bacteriano y la estabilidad de las perlas dependen de la matriz de inmovilización, por lo que se realizó un experimento para observar la influencia de estos parámetros en la actividad enzimática.

Cuando la inmovilización de células se realizó a una concentración del 2% de alginato de sodio y cloruro de calcio (Fig. 4), 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 permitirían un buen empaquetamiento en el biorreactor [13].

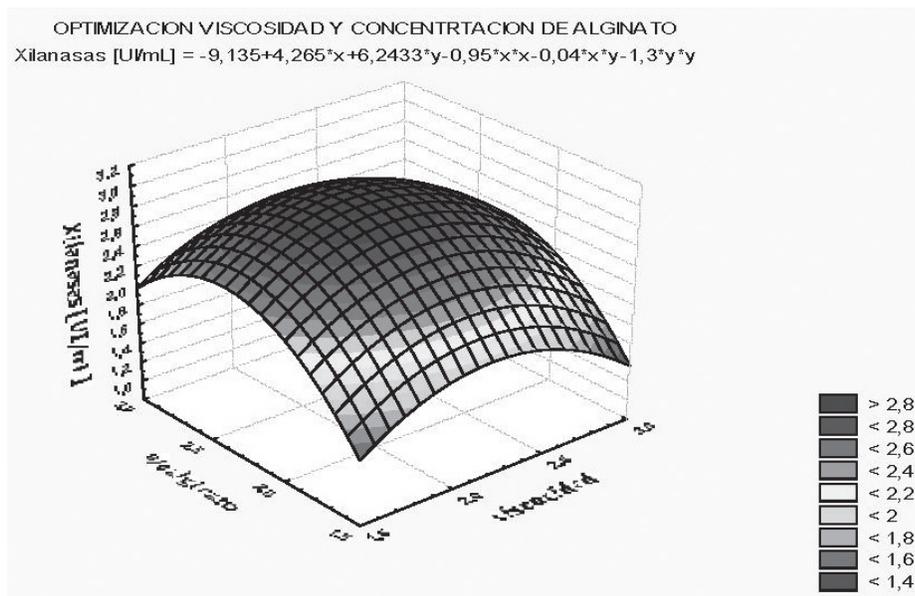


Figura 4. Influencia de la concentración y viscosidad de alginato cálcico en la producción de xilanasas

La consistencia de las perlas es inestable cuando se trabaja a concentraciones menores al 2% de alginato cálcico, por lo que las bacterias tienden a salir más rápidamente hacia el medio lo que posteriormente podría impedir la fácil recuperación de la enzima. A concentraciones mayores a 2% el proceso para la encapsulación se tornó dificultoso ya que a esta concentración la solución es espesa y la aguja sufre taponamientos durante el proceso e impide la formación de perlas esféricas.

Según los resultados obtenidos la cepa FT3, tiene una velocidad de crecimiento de 0.0218 generaciones por hora (Tabla 1), el flujo de alimentación para el biorreactor fue de 0.218 mL/h para mantener las condiciones de biomasa, sustrato y producto, (en este caso actividad xilanolítica), constantes en cultivo continuo. Así también se calculó que teniendo un Tiempo de Retención Hidráulica (TRH o t) de 47 horas, el tiempo de residencia óptimo que permitió mantener estable el biorreactor fue de 140 horas.

Cinética de crecimiento

Condiciones Bioreactor

μ	Flujo [mL/h]	τ [h]	Tiempo de Residencia [h]
0,022	0,22	47	140

Tabla 1. Condiciones determinadas para el funcionamiento del biorreactor

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 xilanolítica en cultivo continuo, en comparación al cultivo en batch incrementando la actividad enzimática hasta 3 veces más. 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 partiendo de la fase logarítmica donde se presentó una actividad xilanolítica de 4.5 [UI/mL], como se especifica en materiales y métodos (Fig. 5 A), 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 (Fig.5 B), durante este tiempo se realizaron determinaciones de actividad xilanolítica y producción de xilosa, llegándose a obtener hasta 13 [UI/mL]. En una tercera fase (Fig.5 C), 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 batch [15], en experimentos llevados a cabo con la misma cepa bajo las mismas condiciones de pH y temperatura. Es así que cuando se usó extracto de levadura se obtuvo 17 [UI/mL] de actividad xilanolítica.

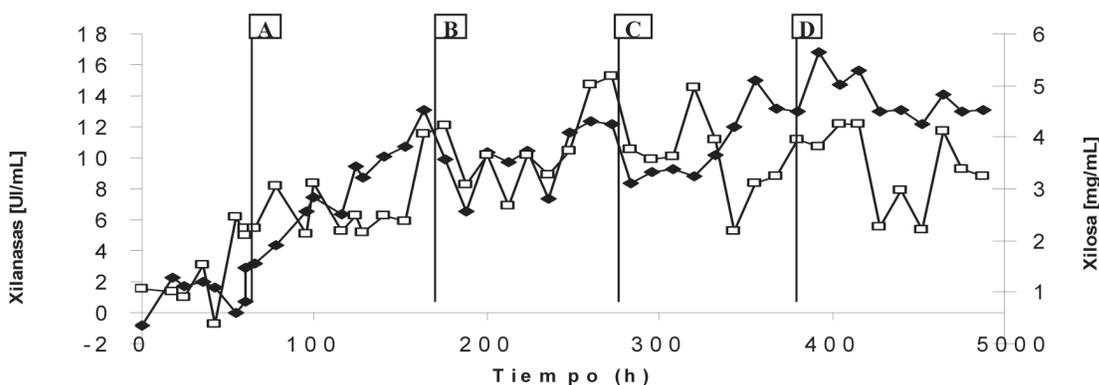


Figura 5. Producción de xilanasas (♦) y xilosa (◻) en cultivo continuo

Así también, se puede observar en la figura 5-D cuando el cultivo fue suplementado con hidrolizado de residuos de soya la actividad xilanolítica llega hasta un máximo de 15.8 [UI/mL], siendo esta menor que en el anterior ciclo, sin embargo, en esta etapa la actividad muestra mayor estabilidad en el tiempo.

En cuanto a la caracterización se ha visto que existe mayor estabilidad hasta temperaturas de 80° C, a temperaturas superiores la actividad baja considerablemente. La estabilidad al pH es amplia obteniendo mayor actividad a pH 8 (Fig. 6).

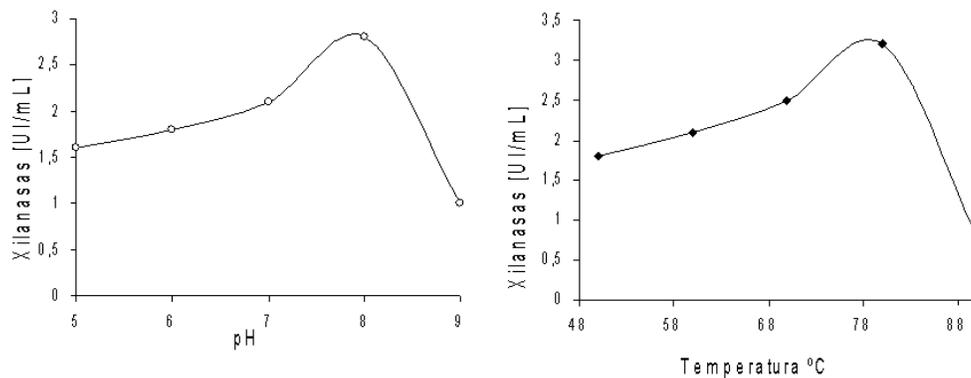


Figura 6. Caracterización de la actividad xilanolítica

En este estudio se ha comprobado que la cepa FT3 tiene actividad hidrolítica ya que presenta actividades xilanolíticas significativas comparables con otros estudios [16,17]. Por otro lado, el hecho de que la actividad celulolítica presentada es baja hace interesante a esta cepa, por su potencial para aplicaciones posteriores.

Así también, se ha visto 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 trabajo la actividad xilanolítica fue incrementada cuando se estableció el cultivo continuo, pero esta fue mejorada cuando se cambió la fuente de nitrógeno y mantenida cuando se utilizó residuos de soya como fuente de carbono, es importante recalcar el uso de estos desechos ya que no sólo contribuye con los procesos de biorremediación, sino también que disminuye considerablemente los costos del proceso, se espera poder incrementar más aún esta producción cambiando otros factores importantes como es el pH y temperatura, e inhibidores o inductores de la actividad xilanolítica.

La actividad xilanolítica expresada, por esta cepa FT3 resulta interesante ya que presenta gran estabilidad térmica, y el hecho de que pueda tolerar pH ligeramente alcalinos representa una gran oportunidad de aplicación en el tratamiento de efluentes donde se requiere este pH.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias al soporte económico recibido de ASDI/SAREC – Suecia en el desarrollo del Proyecto Biodiversidad Microbiana del Lago Poopó y Río Desaguadero.

Agradecimiento especial a la cooperación francesa IRD, por el apoyo en realización del curso de Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas. A la Cooperación francesa IFS en el desarrollo del proyecto Machacamarquita.

Referencias bibliográficas

- [1] Ferrer, Manuel (2005). Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables. *Actualidad SEM*, 38, 12-17
- [2] Anon. (2004). World chemicals: will industrial biotech bloom, *The Economist*
- [3] Rogers PL, Jeon YJ y Svenson CJ. Application of Biotechnology to Industrial Sustainability, Institution of Chemical engineers *Trans IChemE, Part B, Process Safety and Environmental Protection*. 2005; 83(B6): 499–503
- [4] Turner P., Mamo G y Karlsson E. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*. 2007; 6:9
- [5] Ramírez P. y 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
- [6] Ruminot C., Schöbitz R, Ciampi L, Vignolo G. Encapsulación de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas antagonistas en contra de *Listeria monocytogenes*. Proyecto DID/UACH S S-200520 200520. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 2005; Tucumán, Argentina
- [8] 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*. *Biochemical Engineering Journal*. 2008; 38: 88–97
- [9] 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. *Rev Biofarbo*. 2007; 15: 43-48
- [10] Sommer P., Georgieva T y Ahring BK. Potential for using thermophilic anaerobic bacteria for bioethanol production from hemicellulose. *Biochemical Society Transactions*. 2004; 2 (part 2)
- [11] Miller TL y Wolin M.J. A Serum Bottle Modification of the Hungate Technique for Cultivating Obligate Anaerobes. *Applied Microbiology*. 1974; 27 (5): 985-987
- [12] Kulasingam T. Cultivating the uncultured: amylolytic microorganisms from ecological niches. Report of Thesis Doctoral Lund University. 2005

- [13] Smidsrod O. y Skjak B. Alginate as an immobilization matrix for cells. Trends in Biotechnology. 1990; 8(3):71-78
- [13] Hansson T. y Adlercreutz P. Optimization of Galactoligosaccharide production from lactose using β -glycosidases from Hyperthermophiles. Food Biotechnology. 2001; 2:15
- [15] Manual de procedimientos. Universidad de Buenos Aires, Laboratorio de Micología Experimental. 1999
- [16] Casablanca E. Optimización de medios de cultivo para la producción de enzimas xilanasas, β -glucosidasas y β -xilosidasas, en células libres y encapsuladas (Manuscrito en preparación)
- [17] Flores ME, Pérez R y Huitrón C. β -Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. Letters in Applied Microbiology. 1997; 4: 410-416
- [18] Marichamy S. y Mattiasson B. Rapid production of cellulase-free xylanases by solventogenic *Clostridia* from rumen, Enzyme and Microbial Technology. 2005; 37: 497–504

Dirección de los autores

Neida Ríos Manriquez

Área de Biotecnología - Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
Universidad Mayor de San Andrés, La Paz – Bolivia
neidarm@gmail.com

María Teresa Álvarez Aliaga

Área de Biotecnología - Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
Universidad Mayor de San Andrés, La Paz – Bolivia
materesa_alvarez@yahoo.com

Luis Enrique Terrazas Siles

Área de Biotecnología - Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
Universidad Mayor de San Andrés, La Paz – Bolivia
enrique.terrazas@yahoo.com