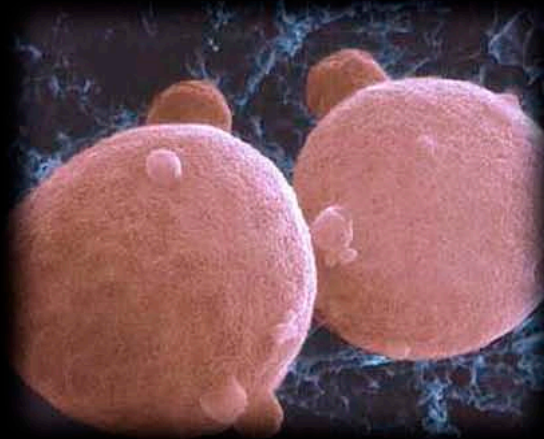




OPTIMIZACIÓN Y ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS QUITINOLÍTICAS

Halobacterium salinarum



Myriam Sieira Silva

OPTIMIZACIÓN Y ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS QUITINOLÍTICAS

Halobacterium salinarum

Memoria presentada por:

Myriam Sieira Silva

Para optar al máster de Biotecnología Avanzada

Vigo, 2013

Título proyecto:

OPTIMIZACIÓN Y ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DE
ENZIMAS QUITINOLÍTICAS DE *Halobacterium salinarum*.

*OPTIMIZACIÓN E ESCALADO DA PRODUCCIÓN DE ENCIMAS
QUITINOLÍTICAS DE Halobacterium salinarum.*

*OPTIMIZATION AND SCALE UP OF CHITINOLYTIC ENZYMES
PRODUCTION FROM Halobacterium salinarum.*

Realizada por: Myriam Sieira Silva

Dirigida por: M^a Ángeles Sanromán Braga, Francisco Javier Deive Herva

Departamento de Ingeniería Química

Universidad de Vigo

Vigo, 2013

Dña. **M^a Ángeles Sanromán Braga**, Profesora Titular de Ingeniería Química, y
D. **Francisco Javier Deive Herva**, Investigador del Programa Isidro Parga de la
Universidad de Vigo,

INFORMAN:

Que la memoria titulada “**OPTIMIZACIÓN Y ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS QUITINOLÍTICAS DE *Halobacterium salinarum***”, que para optar al Máster de Biotecnología Avanzada, presenta Dña. **Myriam Sieira Silva**, ha sido realizada bajo nuestra inmediata dirección en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Vigo.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe en Vigo a 5 de Julio de 2013



M^a Ángeles Sanromán Braga



D. Francisco Javier Deive Herva

A Fátima y Alberto

ÍNDICE

RESUMEN

1	INTRODUCCIÓN	1-0
1.1	LAS QUITINASAS	1-1
1.1.1	DEFINICIÓN Y ORIGEN	1-1
1.1.2	APLICACIÓN E IMPORTANCIA.....	1-2
2	OBJETIVOS	2-0
2.1	OBJETIVOS.....	2-1
3	MATERIALES Y MÉTODOS	3-0
3.1	MICROORGANISMO UTILIZADO.....	3-1
3.2	MEDIO DE CULTIVO.....	3-1
3.3	VIABILIDAD CELULAR	3-2
3.4	PREINÓCULO E INÓCULO BIORREACTOR	3-2
3.5	OPERACIÓN EN BIORREACTOR	3-4
3.5.1	BIORREACTOR AIRLIFT	3-4
3.5.2	BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO (STR).....	3-5
3.6	TRATAMIENTO DE MUESTRAS	3-6
3.7	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	3-10
3.7.1	DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA.....	3-10
3.7.2	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA	3-11
3.8	PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA.....	3-11
3.8.1	DETERMINACIÓN CONTENIDO PROTEICO: MÉTODO BRADFORD ..	3-11
3.8.2	OBTENCIÓN DE LA QUITINASA PURIFICADA.....	3-12
3.8.3	ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DODECIL SULFATO SÓDICO (SDS-PAGE).	3-12
3.9	ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	3-13
3.9.1	LISIS DE PARED CELULAR.....	3-13
3.9.2	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO.....	3-14
3.10	MODELADO MATEMÁTICO	3-14

4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	4-0
4.1	CULTIVO EN MATRAZ	4-1
4.2	ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DE QUITINASAS: OPERACIÓN EN BIORREACTORES <i>AIRLIFT</i> Y DE AGITACIÓN MECÁNICA.....	4-4
4.3	PURIFICACIÓN PRELIMINAR.....	4-11
4.4	APLICACIÓN DE LA ENZIMA PRODUCIDA	4-13
5	CONCLUSIONES	5-0
6	BIBLIOGRAFÍA	6-0

RESUMEN

Las quitinasas son enzimas producidas por diferentes microorganismos, en particular, por bacterias marinas. A pesar de haber sido ampliamente estudiadas, las últimas investigaciones se centran en enzimas procedentes de los microorganismos extremófilos marinos, ya que pueden presentar propiedades ventajosas y únicas en el campo de la biotecnología.

La especie *Halobacterium salinarum*, es una *archaea* halófila perteneciente a la familia *Halobacteriaceae*. En el presente estudio, el gen responsable de la síntesis quitinolítica en este organismo extremófilo, ha sido insertado en *Escherichia coli* y se ha evaluado la producción de quitinasas a distintas escalas (matraz y biorreactor). Tras los estudios preliminares, se procedió a la optimización de su producción en dos configuraciones de biorreactor: *airlift* y biorreactor de tanque agitado. Los resultados indican que los valores máximos de actividad (20,99 U/L) se obtienen operando con un biorreactor de tanque agitado a 300 rpm y 0,66 vvm. Adicionalmente, se procedió a la modelización de los cultivos ensayados empleando para ello diversos modelos cinéticos: logístico, Gompertz, Baranyi y Luedeking & Piret. Finalmente, se ha determinado el peso molecular de la quitinasa producida por *H. salinarum* (66,58 kDa) mediante electroforesis SDS-PAGE, así como su actividad antifúngica en dos especies de hongos: *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium*.

INTRODUCCIÓN

1.1 LAS QUITINASAS

1.1.1 DEFINICIÓN Y ORIGEN

Las quitinasas (Figura 1.1 A) son enzimas hidrolíticas cuya función es degradar la quitina, un polisacárido insoluble, no ramificado, de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) con enlaces β (1, 4) (Figura 1.1 B). Después de la celulosa, molécula muy similar, la quitina es el biopolímero más abundante en la naturaleza (Aam et al, 2010; Abd-Aziz et al, 2008; Arbia et al, 2013; Howard et al, 2003; Patil et al, 2000; RaviKumar, 2000; Samia et al, 2013; Suresh, 2012).

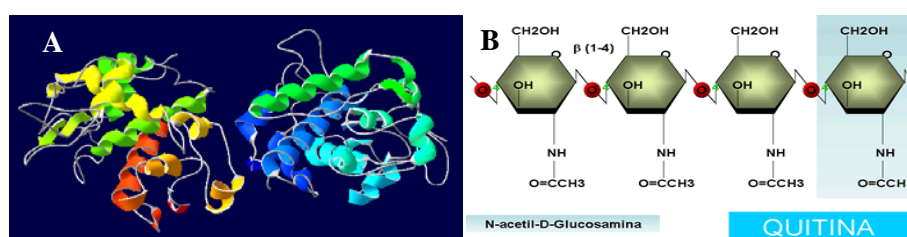


Figura 1.1.- (A) Estructura 3D de la quitinasa de cebada. (B) Estructura molecular de la quitina.

Las enzimas quitinolíticas se encuentran distribuidas en un amplio rango de organismos, tales como virus, bacterias, hongos, insectos, crustáceos, plantas y vertebrados. En estos organismos desempeñan distintas funciones fisiológicas y metabólicas, como el proceso de muda de los insectos y la digestión de alimentos quitinosos, la obtención de energía en ciertos microorganismos, así como agente enzimático de defensa contra patógenos quitinosos (en hongos) (Dahiya et al, 2006).

El papel de las quitinasas en bacterias es procesar y digerir macromoléculas que contienen GlcNAc (N-acetilglucosamina) con el fin de producir la energía requerida en sus procesos metabólicos (Abd-Aziz et al, 2008; Howard et al, 2003; Liu et al, 2003; Suresh, 2012; Wang et al, 2009). Su tamaño molecular oscila entre 20-60 kDa (Javed et al, 2013). Más específicamente, las bacterias marinas presentan una gran importancia en la producción de quitinasas, ya que es en este medio donde se produce una sustancial cantidad de quitina (Howard et al, 2003; Wang et al, 2009; Arbia et al, 2013; Suresh, 2013). En la actualidad, en el medio marino se generan anualmente 10^{11} toneladas de quitina, constituyendo de un 20 a un 58% del peso seco total de los desechos marinos. Éstos provienen tanto de los exoesqueletos de crustáceos (camarones, cangrejos y langostas, entre otros), como de las plumas de calamar (Aam et al, 2010; Abd-Aziz et

al, 2008; Arbia et al, 2013; Howard et al, 2003; Patil et al, 2000; RaviKumar, 2000; Samia et al, 2013; Suresh, 2012).

Por esta razón, el estudio de microorganismos extremófilos con capacidad de sobrevivir en el medio marino puede resultar de gran utilidad en el sector biotecnológico (Deive et al, 2011).

Los extremófilos adaptados a vivir en un medio salino se conocen como microorganismos halófilos, ya que necesitan la presencia de NaCl para alcanzar un crecimiento óptimo. El género *Halobacterium* es el más conocido de la familia *Halobacteriaceae*, especialmente *Halobacterium salinarum*. Este microorganismo es una arqueobacteria halófila Gram negativa (Hassanshahian, 2010; Arbia et al, 2013). Para poder sobrevivir necesita que exista al menos un 10% de NaCl en el medio, aunque experimenta su crecimiento óptimo en un ambiente del 25% (w/v) de NaCl, 50°C y a pH de 7,5 (Manikandanet al 2009; Oren & Ventose, 2009).

Sin embargo, la producción de enzimas extremófilas a menudo presenta desventajas relativas a los procesos de producción, como los habituales bajos niveles de expresión enzimática, fenómenos de inhibición y elevados costes de producción de la proteína. Por esta razón, la expresión de enzimas quitinolíticas en huéspedes mesófilos, como es el caso de *Escherichia coli*, podría ser una estrategia interesante dada la versatilidad de esta bacteria, la reducción de costes asociados a la producción y la posibilidad de incluir en los vectores de expresión marcadores que faciliten la purificación de las proteínas recombinantes (Patil et al, 2000). También es importante resaltar que la secreción periplasmática de *E. coli* favorece la estabilidad de la enzima recombinante y su correcto plegamiento (Mergulhao et al, 2005).

1.1.2 APLICACIÓN E IMPORTANCIA

En los últimos años, las quitinasas han jugado un papel relevante en diversidad de aplicaciones industriales, sanitarias y agrícolas, debido fundamentalmente a sus reconocidas propiedades antibacterianas, antifúngicas, hipocolesterolémicas, antidepressivas y potenciadoras del sabor de alimentos (Figura 1.2) (Howard et al, 2003).



Figura 1. 2.-Sectores de aplicación de las quitinasas. (A) Industrial: potenciador de sabor y digestión de residuos de quitina. (B) Sanitario: Anticolesterolémico, antidepresivo, antibacteriano. (C) Agrícola: antifúngico.

Conviene destacar además que los quito-oligosacáridos, el dímero acetilquitobiosa y los monómeros de N- acetilglucosamina son de gran interés para la industria debido a su amplio rango de aplicaciones, motivo por el cual su valor económico se ha visto aumentado a lo largo de los años (Arbia et al 2013).

Dada la naturaleza hidrofóbica de la quitina, este polímero se ha convertido en un residuo industrial de difícil eliminación. Tradicionalmente, el procesado de la quitina ha consistido en el tratamiento químico con ácidos y bases concentrados a altas temperaturas. Además del alto impacto económico que conllevan estos procesos, es necesario destacar su marcado carácter contaminante (Arbia et al, 2013; Wang et al, 2009). Actualmente, los métodos biotecnológicos se presentan como una alternativa atractiva y medioambientalmente sostenible para el tratamiento de este tipo de residuos. (Abd-Aziz et al, 2008; Howard et al, 2003; Liu et al, 2003; Suresh, 2012; Wang et al, 2009). El principal problema es que la gama de quitinasas de las que se puede disponer es limitada, especialmente, en lo que se refiere al intervalo de condiciones de operación, de modo que se hace patente la necesidad de investigar otras fuentes de obtención eficientes y con la habilidad de producir enzimas con nuevas propiedades biocatalíticas.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS

En los últimos años, tanto los productos resultantes de la hidrólisis de la quitina como la aplicación de las quitinasas, han adquirido gran importancia en el sector alimentario, sanitario y agrario. Cabe destacar que la quitina es un residuo industrial de difícil eliminación y la forma tradicional de conseguirlo es mediante el tratamiento con ácidos y bases fuertes, lo que se traduce en un alto impacto ambiental y económico.

Por estas razones, el principal objetivo del presente proyecto fin de máster es la producción y optimización del escalado de la producción de enzimas quitinolíticas mediante cepas recombinantes de *Escherichia coli* que expresan quitinasas de *Halobacterium salinarum* (*archaea* extremófila).

Para ello, se estudiará la producción a escala matraz y biorreactor (*airlift* y tanque agitado), así como el efecto de distintos parámetros sobre la producción de la quitinasa con el fin de lograr optimizar el proceso.

Adicionalmente, una vez producida la quitinasa a escala biorreactor, la enzima se purificará con el fin de caracterizarla y analizar sus posibles aplicaciones. Se llevarán a cabo protocolos de purificación específicos, teniendo en cuenta la cola de histidinas con la que se expresa en el vector de clonación.

La proteína purificada, se utilizará para la caracterización del peso molecular de la quitinasa mediante una electroforesis SDS-PAGE. Como aplicación de la enzima quitinolítica, se evaluará su capacidad antifúngica. Se valoró la lisis de la pared del hongo *Trametes versicolor* y la inhibición del crecimiento de los hongos *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium* en placa.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MICROORGANISMO UTILIZADO

En primer lugar se ha aislado el gen que codifica la quitinasa de *Halobacterium salinarum* y se ha clonado, secuenciado y caracterizado estructuralmente. Posteriormente, estos genes se han subclonado en vectores de expresión (pGEX and pET 100) con el fin de conseguir cepas hiperproductoras, capaces de expresar altos niveles de la enzima de interés. El organismo huésped elegido ha sido *Escherichia coli* BL21. Este trabajo ha sido realizado por el grupo de investigación de la Dra. Carmen Sieiro, perteneciente al Departamento de Microbiología de la Universidad de Vigo.

3.2 MEDIO DE CULTIVO

Dado que *E. coli* se utiliza como organismo hospedador, el medio de cultivo utilizado ha sido el Luria Bertani (LB) (Figura 3.1), cuya composición se detalla en la Tabla 3.1. Además de los componentes nutricionales necesarios para garantizar la expresión del gen recombinante de interés, se añaden al medio pequeñas cantidades de inductor y antibiótico. Como inductor del gen recombinante insertado en *E. coli* se utiliza Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Bioline) de concentración 0,5 mM.



Figura 3.1.- Medio Líquido LB.

La ampicilina trihidratada (Fisher Bioreagents) es el antibiótico utilizado en el cultivo, dado que el plásmido recombinante introducido en la cepa de *E. coli*, confiere resistencia a las bacterias que lo expresen. Se garantiza la supervivencia exclusiva de las cepas transformadas dotadas el plásmido de interés. A 37°C, la ampicilina es efectiva durante 3 días

Para preparar la ampicilina, es necesario añadir unas gotas de NaOH 10 M a la solución, puesto que el cambio brusco de pH es lo que provoca la disolución de la

misma. La ampicilina se esteriliza mediante microfiltración (0,22 μm), debida a su sensibilidad a altas temperaturas.

Tabla 3.1.-Composición medio de cultivo Luria Bertani (LB).

Compuesto	Concentración (g/L)
Triptona	10
Extracto de Levadura	5
Cloruro Sódico	10
Ampicilina	0,1
Agar	15

3.3 VIABILIDAD CELULAR

Con el fin de comprobar la viabilidad de la cepa recombinante, se llevó a cabo un ensayo preliminar a nivel matraz. Para ello se utilizaron matraces Erlenmeyers de 250 mL, a los que se les añadió 50 mL de medio de cultivo (LB). Los matraces se inocularon a una concentración del 5%, tras la adición de ampicilina 100 μM .

Antes de inducir el cultivo con IPTG 0,5 mM (30 μL) se requiere un valor de densidad óptica a 600 nm comprendido entre 0,7 y 0,9 g/L. La incubación se realizó a una velocidad de agitación de 250 rpm y a 37°C en un incubador orbital (Thermo Forma 420). Los matraces se cerraron con tapones de celulosa, para permitir la aireación pasiva de los cultivos.

Se tomaron muestras regularmente (cada hora), durante las 5 horas siguientes a la inducción con IPTG.

3.4 PREINÓCULO E INÓCULO BIORREACTOR

Para la proliferación y conservación del microorganismo, se llevó a cabo una siembra en placa. Al medio LB se le añadió agar (Scharlau) como agente de solidificación (15 g/L). El medio de cultivo se autoclavó durante 20 min a 121°C. Las placas se inocularon con 0,3 mL de la suspensión celular facilitada por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Vigo y se incubaron a 37°C durante 2 días (Figura 3.2).

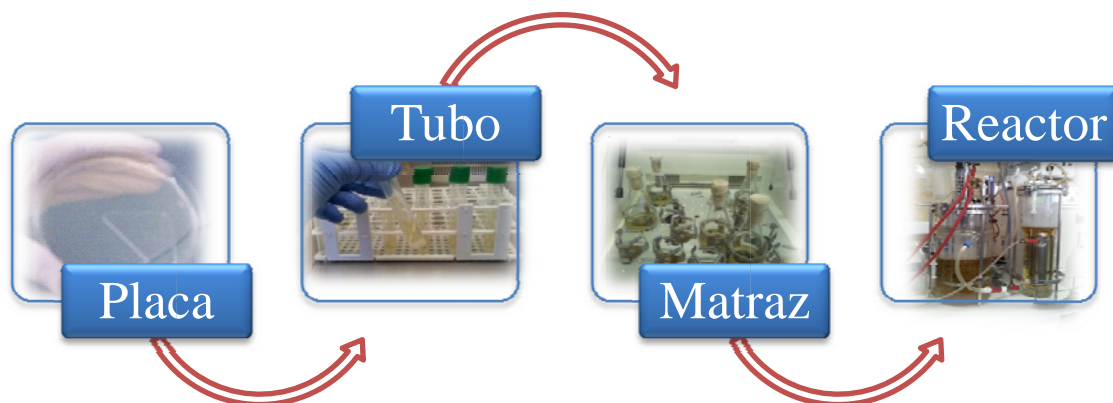


Figura 3.2.- Escalado cultivo biorreactor.

Posteriormente, se realizó un preinóculo en tubo (Figura 3.2) conteniendo 3 mL de medio LB previamente autoclavado como ya se ha descrito. A continuación, se añadieron 6 μ L de ampicilina a cada tubo y se picó una colonia de la placa petri (Figura 3.3 A). Se incubó durante toda la noche en un shaker (Thermo Scientific) a 37°C y 250 rpm (Figura 3.3 B). Finalmente, se mezclan todos los tubos en un único cultivo, y se utilizaron como inóculo del cultivo sumergido de matraz (2,5 mL por matraz), cuya composición es la mostrada en la Tabla 3.1.

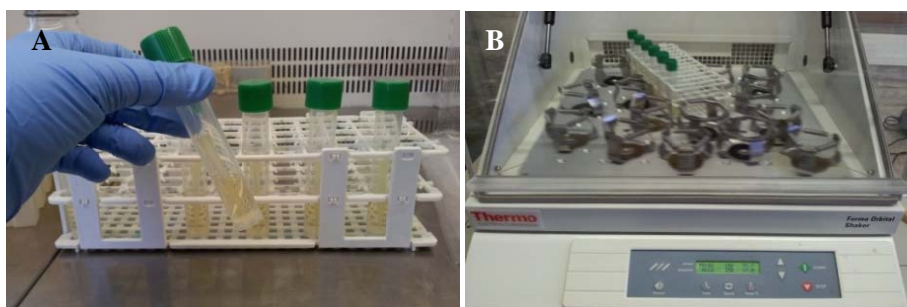


Figura 3.3.- (A) Detalle punta pipeta en tubo. (B) Tubos en incubación en shaker (250 rpm y 37°C).

Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 50 mL de medio. Con el fin de garantizar el crecimiento de las cepas recombinantes, se añadieron 100 μ L de ampicilina a cada matraz, que se cerraron con tapones de celulosa.

Los matraces se incubaron a 37°C y 250 rpm (Figura 3.4) y se monitorizó la biomasa y la actividad quitinolítica durante el tiempo de cultivo.



Figura 3. 4.-Shaker con matraces en agitación. (250 rpm y 37°C).

3.5 OPERACIÓN EN BIORREACTOR

3.5.1 BIORREACTOR AIRLIFT

Se utilizó un biorreactor *airlift* (B. Braun, Alemania) (Figura 3.5 A), que presenta una cuba de vidrio de 2L de volumen (43,5 cm de alto y 8 cm de diámetro), con un volumen de trabajo de 1,5 L (Figura 3.5). Se ha operado en modo discontinuo y la temperatura se ha mantenido constante a 37°C, mediante la circulación de agua por el encamisado de la cuba (Figura 3.5 A).

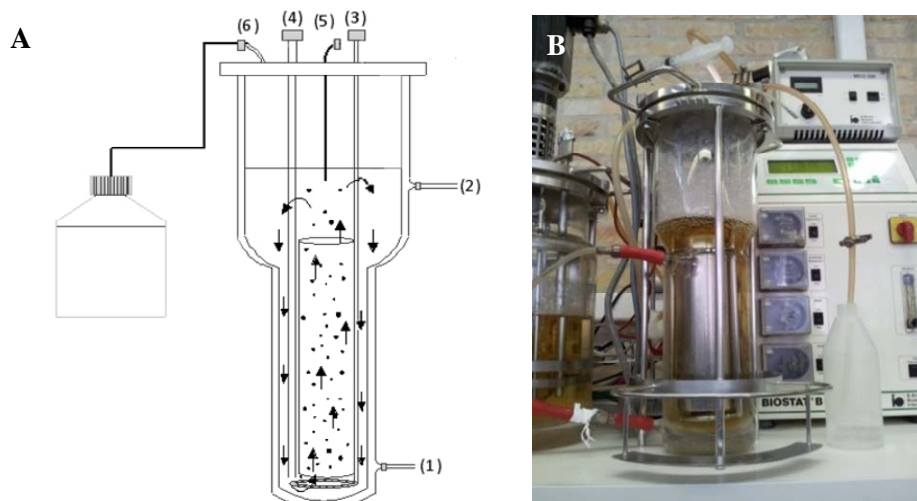


Figura 3. 5.- (A) Biorreactor *airlift*. 1. Entrada agua en la camisa 2. Salida agua de la camisa 3. Entrada de aire 4. Toma de muestra 5. Entrada inductor y ampicilina 6. Salida de aire (B) Biorreactor *airlift* utilizado.

En el sistema *airlift*, tanto la agitación como la aireación se logran mediante la inyección de aire por la parte inferior de la cuba. La entrada de aire produce una convección que se canaliza por un tubo vertical interior en la cuba (Figura 3.5 A). Las burbujas de aire van aumentando de tamaño conforme ascienden por el tubo interior, disminuyendo la relación superficie/volumen y la transferencia de oxígeno al cultivo. Al

medio de cultivo se le añaden 3 mL de ampicilina así como 75 mL de inóculo. Al igual que en biorreactor de tanque agitado, para inducir la expresión del gen de interés, se añade IPTG 0,5mM (0,9 mL) (Figura 3.5 B).

Este biorreactor operó en un rango de aireación de 0,66 vvm y 2 vvm. La temperatura se ha mantenido constante a 37°C y el pH inicial se ajustó a 7,2.

3.5.2 BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO (STR)

Se utilizó una cuba cilíndrica de 5 L (16 cm de diámetro y 35 cm de alto) (Biostat B, Braun) equipada con un agitador mecánico (Turbina Rushton) la cual está conectada a una unidad de control que mantiene la temperatura constante mediante circulación de agua por el encamisado, y que permite controlar de forma independiente variables como la velocidad de agitación y aireación entre otras (Figura 3.6). En este tipo de biorreactor, la entrada de un flujo de aire da lugar a zonas de diferente densidad, provocando la circulación del fluido, y por tanto la agitación (Figura 3.7 A).

La agitación se consigue por la acción de un agitador mecánico (turbina Rushton) encargado de mover un eje central metálico unido a un sistema de palas que crean turbulencias en el medio.

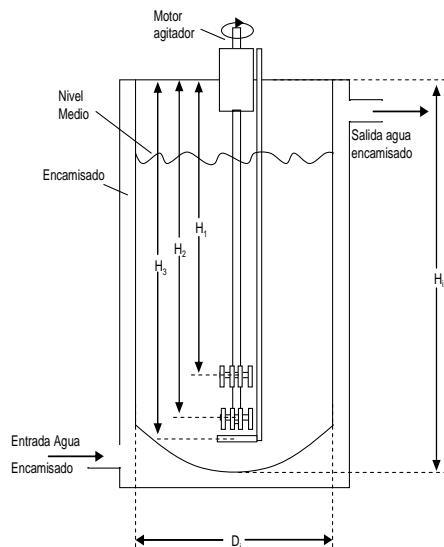


Figura 3.6.-Biorreactor tanque agitado.

La aireación se introduce por medio de un difusor de aire, situado en la parte inferior de la cuba. La transferencia de oxígeno se consigue gracias a las burbujas que van ascendiendo por el interior del biorreactor.

Tanto la aireación como la agitación se han ajustado dentro de un rango que permitiese evitar problemas operaciones tales como la aparición excesiva de espuma (Figura 3.7 B). Este biorreactor operó a una velocidad de aireación de 0,66 vvm y a un rango de agitación comprendido entre 150 y 400 rpm. El volumen de medio LB utilizado en este biorreactor es de 3 L, en el que se incluyen 6 mL de ampicilina y 150 mL de inóculo (5% v/v) procedentes del cultivo en matraz y se ajusta el pH a 7,2.

Como ya se ha comentado, es necesaria la adición de IPTG 0,5 mM (1,8 mL) para inducir la síntesis enzimática en el microorganismo huésped, una vez que se han alcanzado niveles de biomasa de 0,7 y 0,9 g/L a unidades de absorbancia a 600 nm. La temperatura se mantuvo constante a 37°C.

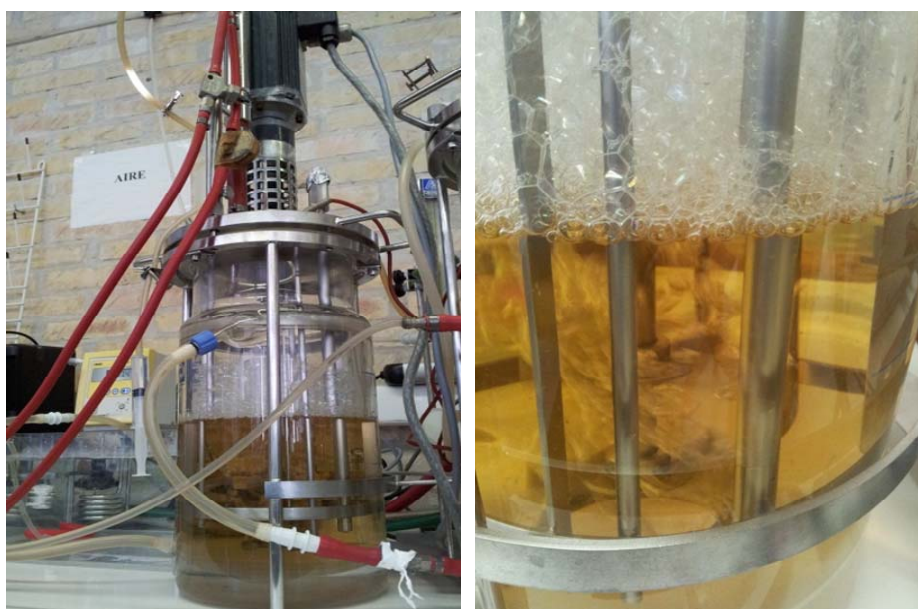


Figura 3.7.- (A) Cultivo en configuración *STR*. (B) Detalle agitación y aireación del cultivo.

3.6 TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Para monitorizar los parámetros representativos del cultivo (pH, biomasa y actividad quitinolítica) se tomaron muestras a tiempos preestablecidos durante 24 horas (Figura 3.11) y se centrifugaron 10 minutos, a 4°C y a 8000 rpm (Rotina 380R Hettich Zentrifugen) (Figura 3.8). El sobrenadante resultante se utilizó para cuantificar la actividad extracelular, mientras que el pellet resultante se congela.



Figura 3. 8.- Rotina 380R Hettich Zentrifugen.

Posteriormente el pellet se descongeló y se resuspendió en 2,5 mL de tampón TrisHCl 20mM a pH 7,3, denominado tampón de lisis, al que se añade NaCl hasta una concentración 1,5 M, dada la naturaleza halófila del organismo.

Estas muestras se sometieron a un proceso de sonicación (Bandelin Sonopuls HD 2070), en el cual la aplicación de ultrasonidos provoca la desestructuración de su membrana celular cuya resultado es la lisis celular y la consiguiente liberación de la quitinasa producida intracelularmente al medio.

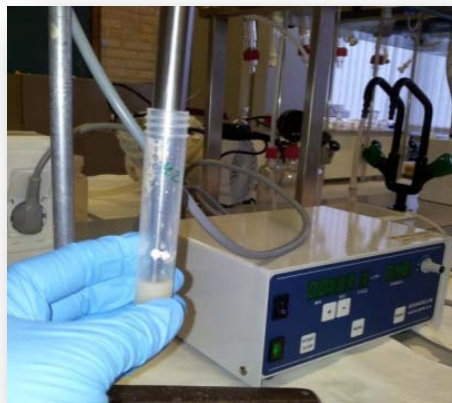


Figura 3. 9.-Detalle de la sonicación de las muestras.

Se realizaron 10 ciclos de 30 segundos cada uno, al 50% de la potencia máxima. Es importante que la sonicación no se efectúe de forma continuada, sino que se alternen las diferentes muestras y sean conservadas a la espera de un nuevo ciclo en un baño de hielo, evitando con ello que las enzimas sufran procesos de desactivación (Figura 3.9).

Tras la sonicación, como ya se ha indicado, la quitinasa está presente en el medio, por lo que interesa separar la proteína de los componentes estructurales celulares mediante la centrifugación de las muestras. Se centrifugan a 8000 rpm a 4°C durante 10 min. En una centrifuga Eppendorf (Centrifuge 5415R) (Figura 3.10). El sobrenadante se utilizó para cuantificar la actividad intracelular.



Figura 3. 10.-Eppendorf Centrifuge 5415R.

La medida de la actividad quitinasa se realizó por medio de medidas espectrofotométricas, monitorizando la liberación de 4-nitrofenol a partir del sustrato 4-nitrofenil N-acetil-b-D-glucosamina (Sigma), como se detallará posteriormente.

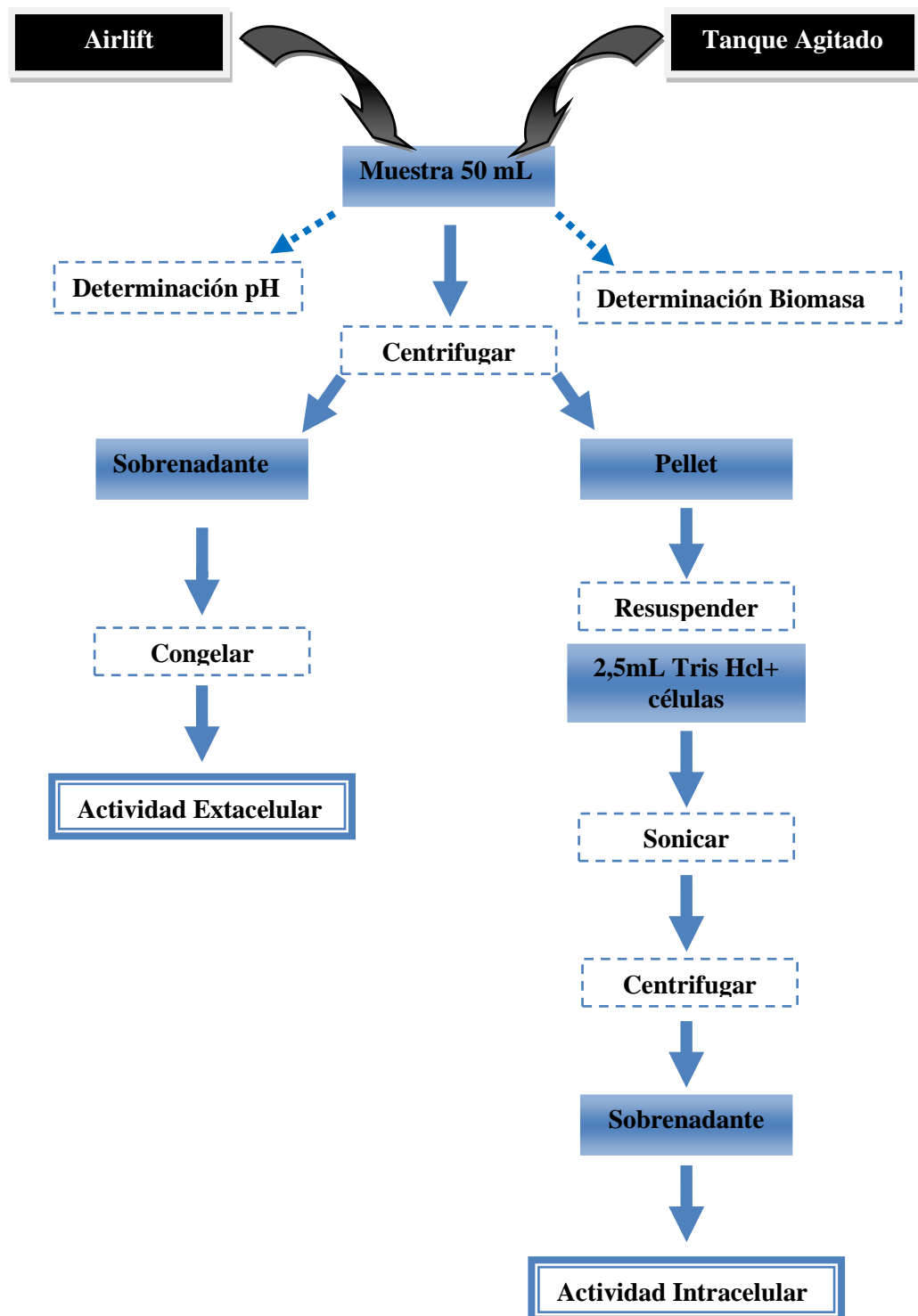


Figura 3.11.-Esquema del tratamiento de muestras.

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

Todas las medidas se realizaron por duplicado, siendo los datos finales presentados valores medios, con desviación estándar menor del 15%.

3.7.1 DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA

El calibrado absorbancia-peso seco se realizó a partir de una serie de diluciones en agua desionizada, de una suspensión celular cuya concentración se determinó gravimétricamente. El pellet obtenido de la centrifugación de un cultivo se resuspendió en agua desionizada. Una parte de éste se dividió en alícuotas equivolumétricas que se depositaron en recipientes de aluminio desechables y se secaron en una estufa, para posteriormente introducirlos en un desecador donde se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Finalmente se determinó el peso seco de cada alícuota por gravimetría.



Figura 3. 11.- Espectrofotómetro (Unicam Helios β).

Con la otra parte de la suspensión inicial se prepararon diluciones seriadas a las que se les determinó su absorbancia a 600 nm (Figura 3.11). Los datos obtenidos se pueden observar en la Figura 3.12.

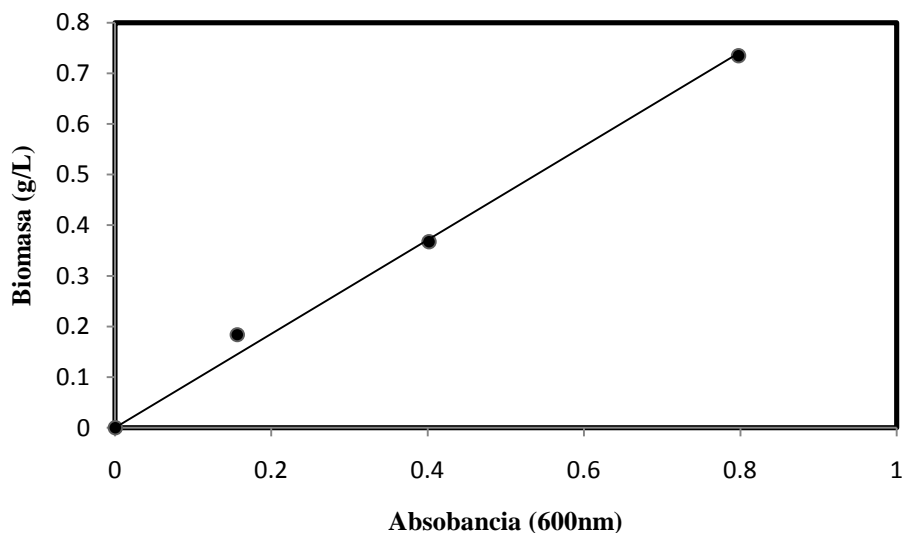


Figura 3. 12.-Recta patrón del calibrado de la biomasa (Biomasa (g/L) = 0,9276 * (Absorbancia)).

3.7.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA

La actividad de la quitinasa se determinó espectrofotométricamente siguiendo la liberación de los productos de la hidrólisis enzimática del 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosamina. Todas las medidas de la actividad enzimática se realizaron por duplicado y con el blanco correspondiente para cada muestra. El blanco se consiguió inactivando 50 μ L de muestra mediante ebullición durante 5 minutos. El tratamiento de las demás muestras, al igual que el blanco, consistió en mezclar 50 μ L de muestra con 450 μ L de tampón (TrisHCl 20mM a pH 7,3 NaCl 1,5 M) y junto con 500 μ L de sustrato 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosamina 0,5 mM. La reacción colorimétrica se mantuvo durante 4 h a 40°C en un baño termostatzado. Finalmente, se añadieron 500 μ L de Na₂CO₃ 3M en un baño de hielo para detener la reacción.

Las muestras se centrifugaron para precipitar el Na₂CO₃, evitando así que interfiera la turbidez generada en la medida espectrofotométrica de la actividad. A continuación, se midió en el espectrofotómetro la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm. En estas condiciones, el coeficiente de extinción molar 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosamina, corresponde a 17215 M⁻¹ cm⁻¹. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de del 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosamina por hora de reacción en las condiciones de ensayo explicadas anteriormente.

3.8 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA

Una vez completado el proceso de escalado se procedió a purificar la quitinasa producida. Para ello, en primer lugar se concentró 10 veces la enzima producida mediante el uso de centriconos (Amicon ® 10 kDa Ultra 2. Millipore).

3.8.1 DETERMINACIÓN CONTENIDO PROTEICO: MÉTODO BRADFORD

Una vez concentrada la muestra, es necesario conocer su concentración de proteínas antes de introducirla en la columna, dado que ésta tiene una capacidad máxima de 60 mg/ml. Para ello se seleccionó uno de los métodos más ampliamente utilizados, consistente en una reacción colorimétrica que se monitoriza por espectrofotometría UV visible (Bradford, 1976).

3.8.2 OBTENCIÓN DE LA QUITINASA PURIFICADA

La quitinasa se dotó de una cola de Histidina con el objetivo de facilitar su purificación para facilitar su purificación mediante la unión específica de la misma con la resina de una columna específica. La columna utilizada fué HisPur Ni-NTA Spin (Thermo Scientific) con un volumen de resina de 0,2 mL, dado que la concentración enzimática es baja (Figura 3.13).

Siguiendo el protocolo del fabricante, se introdujo un volumen de muestra concentrada (10 veces) de 400 μ L.



Figura 3. 13.- Columnas HisPur Ni-NTA Spin.

Una vez realizada la elución, se obtuvieron 5 fracciones, correspondiendo las 3 últimas a la quitinasa purificada. La nomenclatura utilizada se detalla a continuación:

- *Fracción A*: tampón de lavado
- *Fracción B*: proteína no específica
- *Fracción 1, 2, 3*: enzima purificada (Pp1, Pp2, Pp3)

3.8.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DODECIL SULFATO SÓDICO (SDS-PAGE).

Con el fin de facilitar la separación de las diferentes enzimas presentes en la muestra y determinar el peso molecular aproximado de la quitinasa producida por *H. salinarum*, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida 10%. El análisis electroforético (EPS 301 Amersham Bioscience) se llevó a cabo conforme el método descrito por Laemmli (1970) (Figura 3.14).



Figura 3.14.- Equipo electroforesis Power Supply EPS 301 (Amersham Bioscience).

3.9 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Como se hace referencia en la bibliografía, Gomaa et al (2012) y Javed et al (2013), las enzimas quitinolíticas pueden ser de gran utilidad en el biocontrol de hongos fitopatógenos. Esto es debido a sus propiedades antifúngicas, dado que las quitinasas pueden hidrolizar la quitina presente en la pared celular de los hongos, pudiendo inhibir el crecimiento de los mismos, e incluso provocando la lisis celular. Para ello se han realizado dos estudios diferentes:

3.9.1 LISIS DE PARED CELULAR.

Para determinar si la quitinasa procedente de *H. salinarum* tiene efecto antifúngico sobre las paredes de *T. versicolor*, se realizó un ensayo cualitativo. Esta prueba consiste en la observación mediante microscopía óptica de la pared de *T. versicolor*, tal y como indican Fleuri et al (2009).

Este ensayo se implementó en tubos tipo Eppendorf (1,5 mL) conteniendo tampón TrisHCl 20mM a pH 7,3 NaCl 1,5 M, al que se le añadió la enzima intracelular concentrada 10 veces (10-20 μ L). En esta disolución se introdujo una pequeña porción de micelio de *T. versicolor* y se dejó reaccionar durante 72 horas. Pasado este tiempo, se procedió a su control por microscopía óptica (Olimpus Bx41) (Figura 3.15).



Figura 3.15.-Microscopio óptico (Olimpus Bx41).

3.9.2 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO

En el estudio de la inhibición del crecimiento fúngico se utilizaron dos especies distintas: *T. versicolor* y *P. chrysosporium*.

Estos hongos se sembraron en medio LB sólido, sobre el cual se colocó previamente un disco estéril de nitrocelulosa impregnado con 15 microlitros de quitinasa concentrada 10 veces, y se incubaron a 30°C durante 120 horas.

3.10 MODELADO MATEMÁTICO

El modelado matemático de los datos permite predecir el comportamiento de los microorganismos ante unas condiciones determinadas. En este proyecto fin de máster, como se comentará en el apartado de resultados, se han ajustado los datos obtenidos en los ensayos a ecuaciones teóricas con la ayuda de la herramienta SOLVER de Microsoft EXCEL (2007). Los modelos seleccionados fueron el logístico, Gompertz y Baranyi. La calidad del ajuste de los modelos, se ha evaluado mediante la comparación del coeficiente de regresión (R^2), el cual muestra la diferencia entre los datos experimentales y los calculados por cada modelo.

En base a los ajustes realizados, se han generado figuras con la herramienta informática (Sigma Plot 2011 versión 10.0) que representan gráficamente la relación de los datos observados y los predichos por el modelo con mayor R^2 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CULTIVO EN MATRAZ

En general, existen pocos trabajos de investigación centrados en la capacidad de los microorganismos extremófilos para la obtención de enzimas quitinolíticas (Faramazi et al, 2009; Wang et al, 2012), motivo por el que se plantea la necesidad de abordar este trabajo en el presente proyecto fin de máster.

Como paso preliminar al escalado de la producción en biorreactor de laboratorio, se han realizado ensayos de producción enzimática a escala matraz.

Tras el análisis de los datos obtenidos en la actividad enzimática extracelular e intracelular, se ha concluido que la quitinasa se detecta de forma exclusiva en el ambiente intracelular, razón por la cual, los resultados presentados a continuación son referentes a esta enzima.

Como se muestra en la Figura 4.1, la cepa mutante de *H. salinarum* mostró un crecimiento adecuado en el medio propuesto, alcanzando la fase estacionaria en sólo 5 horas.

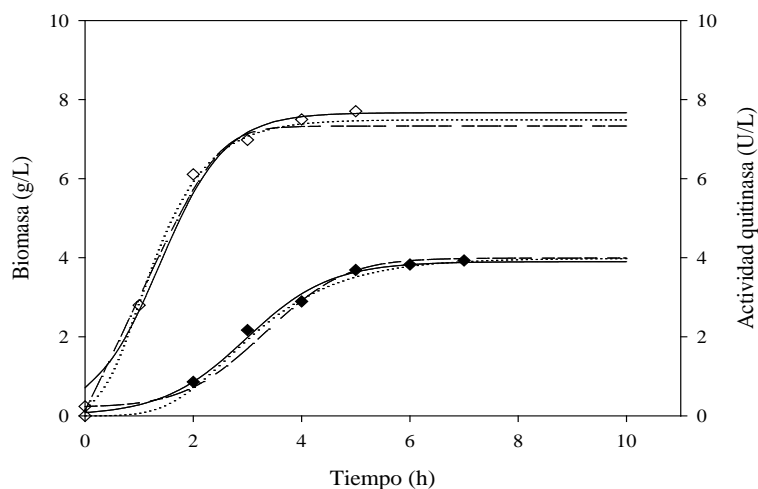


Figura 4.1.- Concentración celular (símbolos llenos) y actividad quitinasa (símbolos vacíos) de *H. salinarum* en cultivos en matraz. Los datos experimentales ajustados a los distintos modelos están representados por líneas: logístico (—), Gompertz (.....) y Baranyi (-.-.-).

Se registraron valores máximos de crecimiento tras la adición de inductor de alrededor de 3.9 g/L, con un crecimiento específico de 0,88-1,79 h⁻¹, dependiendo del modelo cinético seleccionado, como se comentará posteriormente.

En la Figura 4.1 se muestra los niveles de producción enzimática en función del tiempo. Los valores máximos de producción de quitinasa (7,3 – 7,7 U/L) se alcanzaron a partir de las 4 horas de inducción, momento a partir del cual se observó un descenso

en los niveles de síntesis de la biomolécula, lo que podría asociarse al aumento del pH registrado en el cultivo (de 7,25 a 8,39). Estos resultados son comparables a los publicados por Liu et al (2003), que señalaron valores de 9,95 U/L en la producción de quitinasas por el hongo *Verticillium lecanii*, tras seis días operando a 150 rpm y 24°C. A escala matraz se puede concluir que los valores obtenidos en el presente proyecto son prometedores, ya que el tiempo requerido para alcanzar el máximo de actividad es claramente inferior a los publicados anteriormente (más de 5 veces).

El modelado matemático de los datos experimentales es una herramienta útil para predecir el comportamiento de los microorganismos para unas condiciones ambientales determinadas.

TABLA 4.1.- Ecuaciones utilizadas para modelar el crecimiento y la actividad quitinolítica de *H. salinarum*.

Referencias	Modelos	Ecuaciones	Parámetros
Ye et al, 2013	Logístico E. 3.1.	$X = \frac{X_{\max}}{1 + e^{\left[\ln\left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right) - \mu_m t\right]}}$ $A = \frac{A_{\max}}{1 + e^{\left[\ln\left(\frac{A_{\max}}{A_0} - 1\right) - \mu_A t\right]}}$	<p>X y A: biomasa/actividad quitinasa en función del tiempo (t)</p> <p>X_0 y X_{\max}: concentraciones de biomasa inicial y máxima.</p> <p>A_0 y A_{\max}: valores iniciales y máximos de actividad</p> <p>μ_m y μ_A: velocidad específica de crecimiento y de producción</p>
Deive et al, 2009	Gompertz E. 3.2.	$X = \frac{X_{\max}}{e^{\left[\exp(-\mu_m(t-m))\right]}}$ $A = \frac{A_{\max}}{e^{\left[\exp(-\mu_A(t-m_A))\right]}}$	<p>X y A: biomasa y actividad quitinolítica en función del tiempo (t)</p> <p>X_0 y X_{\max}: concentraciones de biomasa inicial y máxima</p> <p>A_0 y A_{\max}: valores iniciales y máximos de actividad</p> <p>μ_m y μ_A: velocidad de crecimiento específica y de producción</p> <p>m y m_A: tiempo al que μ y μ_A alcanzan el máximo</p>
Baranyi & Rogers, 1994	Baranyi E. 3.3.	$X = X_0 + \mu_{\max} B - Ln \left[1 + \left(\frac{e^{[-\mu_m B]} - 1}{e^{[X_{\max} - X_0]}} \right) \right]$ $B = t + (1/\mu_{\max}) * Ln \frac{e^{[(-\mu_m t) + q]}}{1 + q}$ $q = 1/e^{[(-\mu_m \lambda)]} - 1$	<p>X y A: biomasa y actividad quitinolítica en función del tiempo (t)</p> <p>X_0 y X_{\max}: concentración de biomasa inicial y biomasa máxima</p> <p>μ_m: velocidad específica de crecimiento o de producción enzimática</p> <p>λ: parámetro del modelo</p>

En la Tabla 4.2 se muestran los valores de los parámetros de ajuste de cada modelo junto con los coeficientes de regresión. De los valores presentados se puede concluir que todos los modelos permiten describir adecuadamente los datos experimentales, como se desprende del valor de los coeficientes de regresión R^2 (superiores a 0,97).

TABLA 4.2.- Ajustes según los modelos logístico, Gompertz y Baranyi para predecir el crecimiento y la actividad quitinasa a escala matraz.

	Logístico	Gompertz	Baranyi
Parámetros Biomasa			
X_{\max} (g/L)	3,90	3,98	3,99
μ_q (h ⁻¹)	1,29	0,88	1,71
m (h)	---	2,63	---
λ	---	---	2,23
R^2	0,97	0,99	0,99
Parámetros Actividad Quitinolítica			
A_{\max} (U/L)	7,67	7,49	7,33
μ_A (h ⁻¹)	1,65	1,41	2,95
m (h)	---	0,97	---
λ	---	---	0,025
R^2	0,99	0,99	0,99

Paralelamente, una vez modelado el proceso biológico se ha propuesto el modelo de Luedeking & Piret (1959) (E. 4.4), con el fin de caracterizar más en profundidad la relación existente entre los procesos de síntesis quitinolítica y el crecimiento microbiano.

$$A = A_0 + mX_0 \left\{ \frac{e^{\mu t}}{\left[1 - \left(\frac{X_0}{X_{\max}} \right) (1 - e^{\mu t}) \right]} - 1 \right\} + n \left(\frac{X_{\max}}{\mu} \right) \ln \left[1 - \left(\frac{X_0}{X_{\max}} \right) (1 - e^{\mu t}) \right] \quad \text{E. 3.4}$$

De este modo, cuando $m \neq 0$ y $n = 0$ se puede afirmar que la producción enzimática está completamente asociada al crecimiento celular. Por el contrario, cuando $m = 0$ y $n \neq 0$, la producción enzimática es independiente de la biomasa, mientras que cuando m y n son distintos de 0, se puede considerar la existencia de un metabolito mixto (síntesis

enzimática parcialmente asociada al crecimiento). El ajuste de los datos experimentales obtenidos a escala matraz ($R^2= 0,70$, $m= 7,10$ y $n= 0$) indica que la enzima sintetizada muestra una gran dependencia con respecto a la biomasa. Por lo tanto, a tenor de los prometedores resultados obtenidos a escala matraz, en el siguiente apartado se abordará la producción de enzimas quitinolíticas a escala de biorreactor.

4.2 ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DE QUITINASAS: OPERACIÓN EN BIORREACTORES AIRLIFT Y DE AGITACIÓN MECÁNICA

Dada la importancia de las enzimas quitinolítica en sectores como la industria farmacéutica y alimentaria, se hace necesaria la implementación de procesos de obtención a gran escala eficientes. Para ello, el primer paso consiste en abordar su producción a escala biorreactor de laboratorio. Teniendo en cuenta los trabajos anteriores del grupo de bioprocesos de la *U. Vigo*, se han utilizado dos configuraciones diferentes de biorreactores: *airlift* y tanque agitado (Deive et al, 2012; Deive et al, 2009; Domínguez et al, 2009; Domínguez et al, 2005). Como ya se ha mencionado, la implementación de un proceso a mayor escala requiere el análisis exhaustivo de la influencia de las condiciones operacionales claves para asegurar una adecuada transferencia de materia (nutrientes y oxígeno) como son la agitación y la aireación.

El biorreactor *airlift* tiene como característica principal que la agitación se consigue mediante la inyección de aire a través de un difusor situado en la parte inferior del tanque. De este modo, se consigue asegurar la homogeneidad del medio de cultivo a la vez que se aporta el oxígeno necesario para realizar las funciones metabólicas. En este trabajo fin de máster se ha analizado en primer lugar la influencia de esta variable (0,66 vvm a 2 vvm) en la biomasa obtenida y en la producción enzimática.

En la Figura 4.2, se muestran los perfiles de concentración celular y actividad enzimática registrados en el biorreactor *airlift*. Se puede observar que la operación a niveles de aireación elevados supone un aumento en la concentración celular (desde 2,28 hasta 3,83 g/L). Sin embargo, los beneficios derivados de una mayor transferencia de materia no se traducen en un aumento de la actividad enzimática, ya que se observa una disminución de alrededor del 20% al operar a 2 vvm.

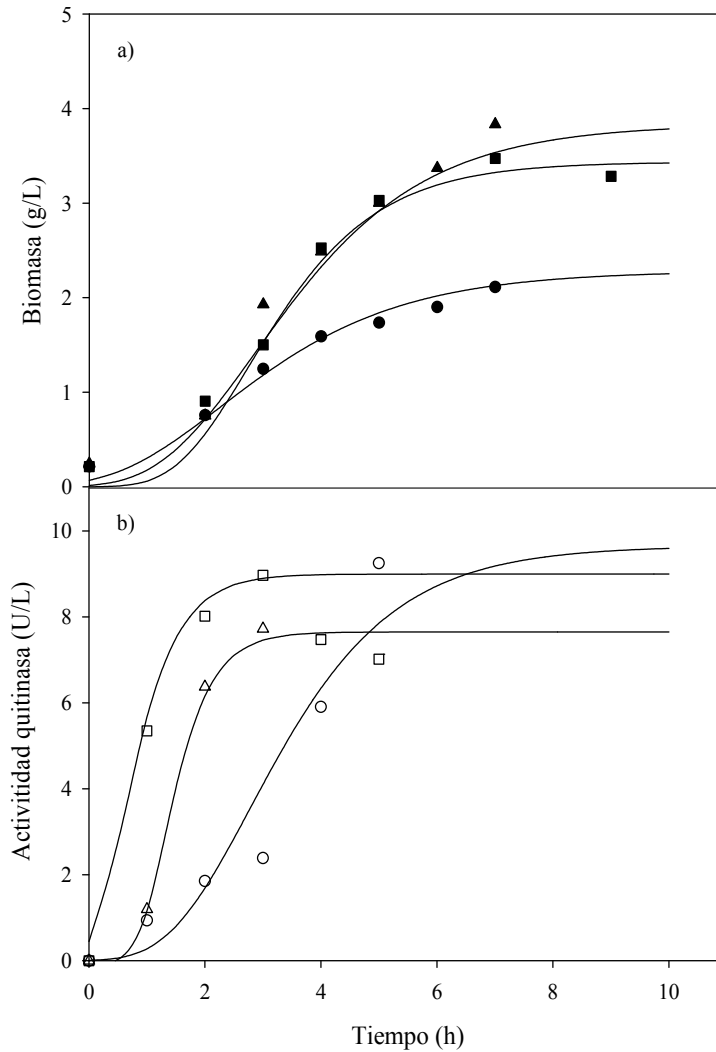


Figura 4.2.- (A) Concentración de biomasa (símbolos rellenos) y (B) perfil de la actividad quitinolítica de *H. salinarum* (símbolos vacíos) a distintos niveles de aireación (●) 0,6 (■) 1,33 y (▲) 2 vvm. Los datos experimentales están representados por símbolos y el modelo de Gompertz por líneas continuas.

Aunque los valores obtenidos son inferiores a los encontrados en la bibliografía, es importante resaltar que se han alcanzado niveles máximos de actividad en tan sólo 5 horas, lo que supone una ventaja indudable frente a las 72 h o 96 h que requirieron

Fleuri et al (2009), Goma (2012) o Liu et al (2003) en otros procesos de biosíntesis de enzimas quitinolíticas.

Una vez analizada la operación en biorreactor *airlift* y seleccionadas las condiciones de aireación más adecuadas (0,66 vvm), se consideró la utilización de configuración de biorreactor de tanque agitado, por ser una de las configuraciones más comunes en bioprocesos y además permite el control independiente de la aireación y la agitación.

Como han sugerido recientemente Saima et al (2013), la agitación puede crear fuerzas tangenciales que afecten al crecimiento microbiano, modificando la morfología y la integridad celular. Análogamente, la producción de metabolitos microbianos está influenciada en gran medida por la velocidad de agitación a la que se opera. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el estudio de las posibles alteraciones provocadas por las variables mecánicas es uno de los objetivos de este trabajo fin de máster, considerando un rango de operación entre 150 y 400 rpm, y presentándose los datos obtenidos en la Figura 4.3.

Como se muestra en la Figura 4.3, se puede concluir que un mayor grado de mezcla se traduce en un mayor crecimiento celular, confirmando la tendencia registrada en el biorreactor *airlift*. Sin embargo, los perfiles de actividad enzimática mostraron un óptimo de actividad a 300 rpm, lo cual indica que la generación de una elevada turbulencia conllevó la modificación de las rutas metabólicas que desencadenaron la síntesis enzimática. En la Figura 4.3 se puede observar un máximo de actividad enzimática (20,99 U/L) 5 horas después de la inducción, disminuyendo a valores de 13,7 U/L tras 20 horas. Este hecho puede indicar que los mecanismos de síntesis de enzimas quitinolíticas son mucho más sensibles a la velocidad de agitación que el crecimiento celular, tal como indican Fenice et al (2012), en su estudio sobre los efectos de la agitación y aireación sobre enzimas quitinolíticas producidas por el hongo antártico *Lecanicillium muscarium*. Es necesario destacar nuevamente la eficacia del proceso, ya que el máximo de actividad se alcanza en solo 5 horas tras la inducción, lo que supone una mejora de 15 veces en relación a otros procesos de producción referenciados (Fenice et al, 2012).

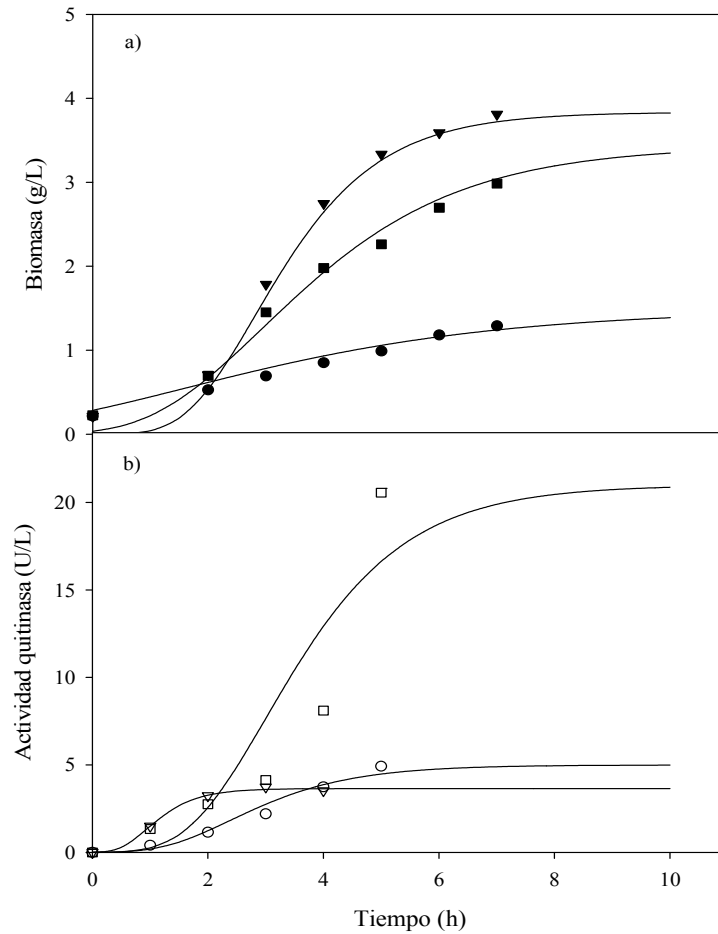


Figura 4.3.-(A) Concentración de biomasa y (B) perfiles de actividad quitinasa en STR operando a 0,66 vvm y diferentes velocidades de agitación (●) 150, (■) 300 y (▲) 400 rpm. Los datos experimentales se representan con símbolos y el modelo teórico de Gompertz con líneas continuas.

Como ya se indicó para los cultivos a escala matraz, se utilizaron de nuevo los modelos logísticos, de Gompertz y de Baranyi para ajustar los datos experimentales ya que, a pesar de limitaciones inherentes tales como el sobredimensionamiento característico de las velocidades específicas de crecimiento y producción, que suponen la utilización de los modelos de Gompertz y logístico, estas ecuaciones son de las más ampliamente empleadas en la caracterización de este tipo de procesos biológicos (Ye et al, 2013). Las Tablas 4.3 y 4.4 muestran los valores de los parámetros para cada una de las condiciones utilizadas, lo que permite confirmar las conclusiones previas relativas a la utilización de velocidades de agitación intermedias para maximizar la producción enzimática.

TABLA 4.3.- Datos correspondientes a la cinética del crecimiento celular y actividad quitinolítica según el modelo logístico, Gompertz y Baranyi de *H. salinarum* en configuración airlift.

Reactor	Aeración (vvm)	Parámetros Biomasa			Parámetros Actividad Quitinolítica				
		Logístico	Gompertz	Baranyi	Logístico	Gompertz	Baranyi		
Airlift	0,66	X_{max} (g/L)	2,95	2,28	2,30	A_{max} (g/L)	9,61	9,65	9,80
		μ_m (h ⁻¹)	0,49	0,56	0,46	μ_A (h ⁻¹)	1,54	0,71	1,99
		m	--	2,25	--	m	--	2,78	--
		λ	--	--	1,23	λ	--	--	1,03
		R^2	0,96	0,99	0,99	R^2	0,95	0,98	0,98
	1,33	X_{max} (g/L)	3,47	3,43	3,30	A_{max} (g/L)	9,03	8,99	8,91
		μ_m (h ⁻¹)	1,10	0,80	1,68	μ_A (h ⁻¹)	6,88	1,87	3,97
		m	--	2,74	--	m	--	0,59	--
		λ	--	--	2,30	λ	--	--	0
		R^2	0,99	0,99	0,99	R^2	0,96	0,99	0,97
2	X_{max} (g/L)	3,75	3,83	3,79	A_{max} (g/L)	7,48	7,65	6,93	
	μ_m (h ⁻¹)	0,94	0,61	1,20	μ_A (h ⁻¹)	5,40	2,16	5,08	
	m	--	2,85	--	m	--	1,29	--	
	λ	--	--	1,80	λ	--	--	0,89	
	R^2	0,96	0,99	0,97	R^2	0,95	0,99	0,99	

TABLA 4.4.-Datos correspondientes a la cinética del crecimiento celular y actividad quitinolítica según el modelo logístico, Gompertz y Baranyi de *H. salinarum* en STR.

Reactor	Agitación (rpm)	Parámetros Biomasa			Parámetros Actividad Quitinolítica			
		Logístico	Gompertz	Baranyi	Logístico	Gompertz	Baranyi	
STR	150	X_{max} (g/L)	1,37	1,49	1,30	A_{max} (g/L)	4,80	4,99
		μ_m (h^{-1})	0,62	0,32	0,69	μ_A (h^{-1})	1,28	0,85
		m	--	1,59	--	m	--	2,39
	λ	--	--	2,30	λ	--	--	
	R^2	0,98	0,99	0,98	R^2	0,98	0,99	
	300	X_{max} (g/L)	2,97	3,43	2,79	A_{max} (g/L)	19,95	20,99
μ_m (h^{-1})		0,81	0,52	0,95	μ_A (h^{-1})	1,45	0,73	
m		--	2,94	--	m	--	3,01	
λ	--	--	1,72	λ	--	--		
R^2	0,98	0,99	0,99	R^2	0,95	0,99		
400	X_{max} (g/L)	3,76	3,83	3,79	A_{max} (g/L)	3,75	3,65	
	μ_m (h^{-1})	1,20	0,83	1,79	μ_A (h^{-1})	2,42	2,09	
	m	--	2,81	--	m	--	0,94	
λ	--	--	2,23	λ	--	--		
R^2	0,97	0,99	0,99	R^2	0,99	0,99		

Tras el análisis de los coeficientes de regresión (R^2 : 0,91- 0,99) se puede concluir que cualquiera de los modelos elegidos permite una descripción satisfactoria del proceso de producción, aunque es el modelo de Gompertz es el que mejor se ajusta, puesto que los valores del coeficiente de regresión son más próximos a la unidad.

En la Tabla 4.5, se presentan los ajustes al modelo de Luedeking & Piret (E.4.4), que permitirán dilucidar la naturaleza de las enzimas quitinolíticas sintetizadas (Tabla 4.5).

TABLA 4.5.-Datos correspondientes al ajuste del modelo Luedeking & Piret, en cultivos de *H. salinarum*.

Biorreactor	Variables en estudio		Parámetros Luedeking & Piret		
	Agitación (rpm)	Aireación (vvm)	m (U/g)	n (U/g/h)	R^2
<i>Airlift</i>		0,66	2,82	0,02	0,99
		1,33	2,41	0,09	0,96
		2	3,45	0,01	0,95
STR	150		0,67	1,26	0,99
	300	0,66	3,43	0,12	0,98
	400		0,95	0,01	0,98

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que en general la enzima producida está más influenciada por la generación de biomasa que por la velocidad de crecimiento, en línea con lo expuesto anteriormente tras el ajuste de los datos obtenidos a escala matraz. No obstante, la operación a velocidades de agitación suaves (150 rpm) supone una diferencia ostensible en la naturaleza de la enzima producida, lo que parece confirmar nuestra hipótesis previa de que las condiciones operacionales optimizan los mecanismos de síntesis enzimática.

4.3 PURIFICACIÓN PRELIMINAR

Una vez establecidas las condiciones operacionales más adecuadas se procedió a estudiar preliminarmente el proceso de *downstream*, en concreto la purificación parcial de las enzimas quitinolíticas objeto de estudio. Para ello, en primer lugar se hizo necesario determinar si la carga proteica del crudo celular era apropiada para un correcto uso de la columna cromatográfica seleccionada (ver apartado de materiales y métodos). Las especificaciones de la columna recomiendan la utilización de concentraciones de proteína inferiores a 60 mg/mL, de modo que se operó a concentraciones 10 veces inferiores a este valor (0,57 mg/ mL).

En siguiente lugar, se planteó la estrategia de purificación siguiendo el protocolo detallado previamente, y se consiguieron valores máximos de actividad en la fracción Pp1, como se puede apreciar en la Tabla 4.6. Los datos mostrados permiten concluir una pérdida de actividad enzimática, quizás debida a la presencia de imidazol, que es necesario adicionar en distintas concentraciones (10 mM, 25 mM y 250 mM) para la elución proteica, tal como indican las instrucciones de la columna utilizada en la separación. Por lo tanto, posteriores trabajos en este campo se centrarán en optimizar las condiciones de operación para mejorar la viabilidad del proceso de purificación.

TABLA 4. 6.-Actividad enzimática de la muestra original y de las distintas fracciones obtenidas de la purificación con la columna HisPur Ni-NTA Spin.

	Act. Enzimática (U/L)
Muestra	1432,472
Fracción	Purificación (U/L)
A	1,5
B	130,5
Pp1	515,6
Pp2	217,6
Pp3	85,4

Una vez realizada la purificación enzimática a través de la separación cromatográfica, se ha realizado una electroforesis SDS-PAGE con el fin de identificar las bandas correspondientes a la enzima producida responsable de la actividad quitinolítica. Tal y como se muestra en la Figura 4.4, se ha identificado la banda correspondiente a la quitinasa producida por *H. salinarum*.

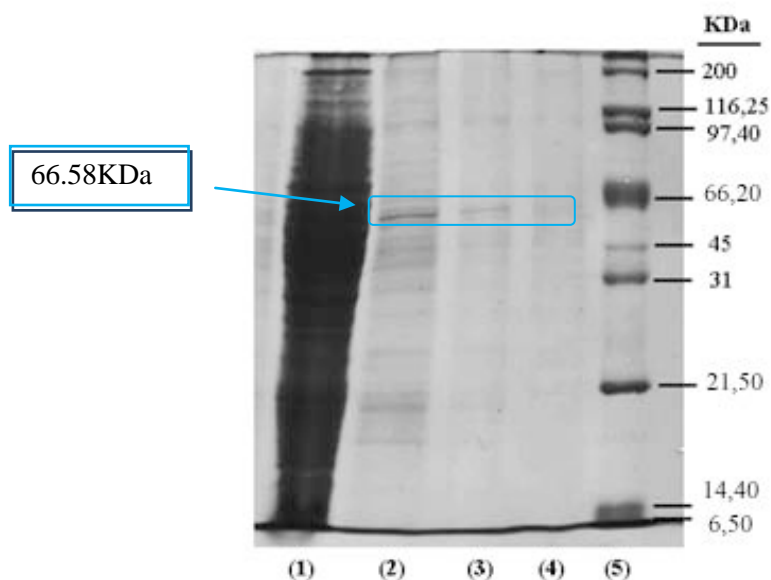


Figura 4.4.- Gel SDS-PAGE 10% de las fracciones purificadas y de la enzima concentrada. (1) Proteína concentrada (2) Pp1 (3) Pp2 (4) Pp3 (5) Patrón.

Asimismo, el peso molecular de la enzima se ha estimado mediante la comparación con los patrones de diferentes pesos moleculares. En el revelado del gel de poliacrilamida, a simple vista se hace evidente la liberación de la carga proteica que ha sufrido la muestra tras haber eluído a través de la columna. En las fracciones Pp1, Pp2 y Pp3 se observa una banda tenue, cuyo peso molecular es aproximadamente 66 kDa. La banda es menor en la fracción 3 que en la 1, como es de esperar, lo que permite confirmar que el peso molecular de la quitinasa de *H. salinarum* es aproximadamente de 66,58 kDa.

4.4 APLICACIÓN DE LA ENZIMA PRODUCIDA

Se ensayó una posible aplicación de la quitinasa producida por *H. salinarum*, consistente en evaluar el efecto lítico sobre el hongo *T. versicolor*. Previamente, Fleuri et al (2009) comprobaron la capacidad de lisis de la quitinasa procedente de *Cellulosimicrobium cellulans*, mediante observación al microscopio óptico.

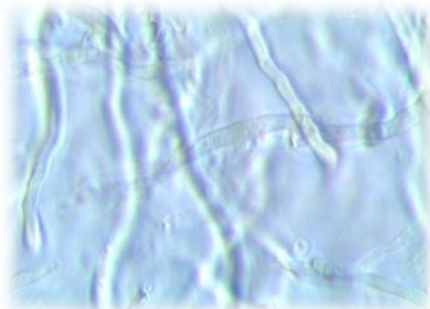


Figura 4.5.- Hifas *T. versicolor* tras tratamiento enzimático.

En el estudio realizado se comprobó que, transcurridas 72 horas de acción quitinolítica, no se pudo concluir un cambio relevante en la pared celular de *T. versicolor* (Figura 4.5). Se observaron fragmentos de hifas en el sobrenadante, pero ha sido imposible relacionarlo con una disrupción de naturaleza enzimática, ya que se comprobó que la presión ejercida al manipular el portaobjetos también da lugar a este tipo de fenómenos de lisis.

Por lo tanto, a la vista de los resultados poco clarificadores se utilizó otro ensayo para evaluar su posible efecto antifúngico. En este caso se impregnó un disco con la quitinasa purificada y se situó en dos placas de agar conteniendo un inóculo de los hongos *T. versicolor* y *P. chrysosporium*.

Si bien no existen resultados concluyentes (Figura 4.6) se observó que la trayectoria de crecimiento fúngico se desviaba ligeramente del disco de quitinasa, lo cual podría hacer pensar que la concentración enzimática no es lo suficientemente elevada para proporcionar un efecto antifúngico efectivo.

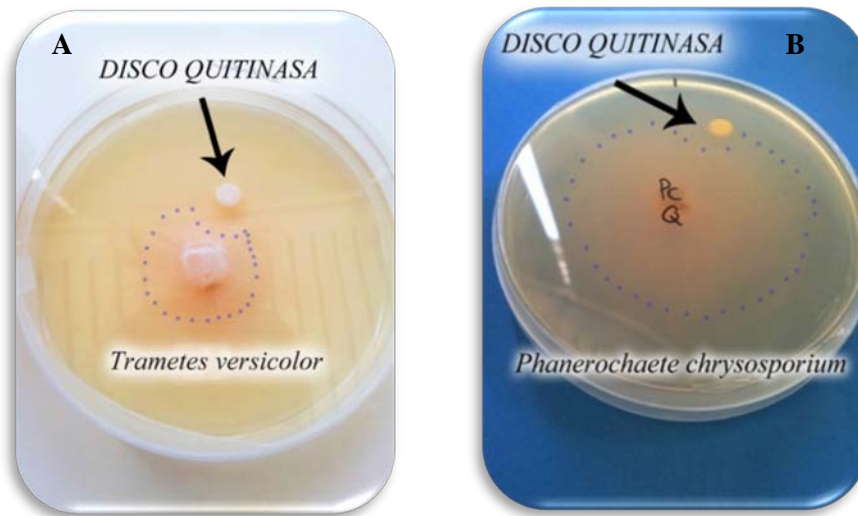


Figura 4.6.- Efecto del crudo enzimático de *Halobacterium salinarum* en el crecimiento de los hongos *T. versicolor* (A) y *P. chrysosporium* (B) .

Dado que los resultados obtenidos no son del todo concluyentes, sería de interés realizar ensayos posteriores a este proyecto fin de máster para verificar los resultados, trabajando con una mayor concentración enzimática.

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha demostrado por primera vez la viabilidad del escalado del proceso de producción de enzimas quitinolíticas a partir de la bacteria halófila *H. salinarum* tanto en biorreactor de tanque agitado como *airlift*. Cabe destacar la gran influencia de las condiciones hidrodinámicas del sistema sobre el crecimiento microbiano y sobre la producción enzimática. De este modo, se comprobó que la operación a niveles intermedios de aireación y agitación permitieron alcanzar valores elevados de crecimiento y actividad en poco más de 5 horas tras la inducción enzimática, lo cual supone una ventaja considerable respecto a los procesos de producción existentes.

Paralelamente, el ajuste de los datos experimentales de biomasa y actividad enzimática a diferentes modelos matemáticos ampliamente utilizados en otro tipo de procesos biotecnológicos permitió caracterizar en profundidad el proceso de producción. De este modo se comprobó que las condiciones operacionales afectan decisivamente el mecanismo de síntesis enzimática, aunque la operación a 0,66 vvm y 300 rpm permitió alcanzar un proceso de producción estable, determinándose que la biosíntesis quitinolítica presenta una mayor dependencia de la producción de biomasa que de la velocidad de producción. Finalmente, la enzima producida se purificó parcialmente y se determinó su peso molecular mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), obteniéndose un peso molecular de aproximadamente 66 kDa.

En resumen, se puede subrayar que ha sido la primera vez que se ha conseguido producir quitinasas a escala de biorreactor, como resultado de la combinación de un extremófilo de carácter halófilo, como es la arqueobacteria *H. salinarum* y un procarionte como es *E. coli*, como organismo hospedador del vector de clonación.

BIBLIOGRAFÍA

- Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sørli M, Vårum KM, Eijsink VGH. Production of chito oligosaccharides and their potential applications in medicine. *Mar. Drugs* (2010) 8: 1482-1517.
- Abd-Aziz S, Fernandez CC, Salleh MM, Ilias RM, Hassan MA. Effect of agitation and aeration rates on chitinase production using *Trichoderma virens* UKM1 in 2-l stirred tank reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2008) 150: 193-204.
- Arbia W, Adour L, Amrane A, Lounici H. Optimization of medium composition for enhanced chitin extraction from *Parapenaeus longirostris* by *Lactobacillus helveticus* using response surface methodology. *Food Hydrocoll.* (2013) 31: 392-403.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal. Biochem* (1976) 72: 248-254.
- Dahiya N, Tewari R, Singh G S. Biotechnological aspect of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol* (2006) 71: 773-782.
- Deive FJ, Rodríguez A, Varela A, Rodríguez C, Leitão MC, Houbraken JAMP. Impact of ionic liquids on extreme microbial biotypes from soil. *Green Chem.* (2011) 13: 687-696.
- Deive FJ, Sanromán MA, Longo MA. A comprehensive study of lipase production by *Yarrowia lipolytica* CECT 1240 (ATCC 18942): from shake flask to continuous bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol* (2009) 85: 258-266.
- Domínguez A, Deive FJ, Pastrana L, Rúa ML, Longo MA, Sanroman MA. Thermostable lipolytic enzymes production in batch and continuous cultures of *Thermus thermophilus* HB27. *Bioprocess Biosyst. Eng.* (2009) 33: 347-354.
- Dominguez A, Pastrana L, Longo MA, Rúa ML, Sanroman MA. Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. *Biochem. Eng. J.* (2005) 26: 95–99.
- Faramarzi MA, Fazeli M, Tabatabaei Y, Adrangi S, Jami Al Ahmadi K, Tasharrofi N, Aziz Mohsei F. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by a soil isolate of *Massilia timonae*. *Biotech* (2009) 8: 93-99.

Fenice M, Barghini P, Selbmann L, Federici F. Combined effects of agitation and aeration on the chitinolytic enzymes production by the Antarctic fungus *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003. *Microb. Cell Factories* (2012) 11:1-12.

Fleuri LF, Kawaguti HY, Sato HH. Production, purification and application of extracellular chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans* 191. *Braz. J. Microbiol.* (2009) 40: 623-630.

Gomaa EZ. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. *J. Microbiol.* (2012) 50:103-111.

Hassanshahian M, Mohamadian J. Isolation and characterization of *Halobacterium salinarum* from saline lakes in Iran. *Jundishapur J. Microbiol.* (2011) 4: 59-65.

Howard MB, Ekborg NA, Weiner RM, Hutcheson SW. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2003) 30: 627-636.

Javed S, Ahmad M, Ahmad M, Abdin M, Hamid R, Khan M, et al. Chitinases: An update. *J. Pharm. Bioallied Sci.* (2013) 5: 21-29.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* (1970) 227: 680-685.

Liu BL, Kao P-M, Tzeng Y-M, Feng K-C. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* (2003) 33: 410-415.

Manikandan M, Pašić L, Kannan V. Optimization of growth media for obtaining high-cell density cultures of halophilic archaea (family *Halobacteriaceae*) by response surface methodology. *Bioresour. Technol.* (2009) 100: 3107-3112.

Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles.* (2001) 5: 73-83.

Mergulhão FJM, Summers DK, Monteiro GA. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Adv.* (2005) 23: 177-202.

Oren A, Ventosa A. *Halobacterium salinarum* strain MMD047-A low-salt adapted member of the *Halobacteriaceae*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* (2010) 14: 869-870.

Patil RS, Ghormade V, Deshpande MV. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb. Technol.* (2000) 26: 473-483.

Ravi Kumar MN. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* (2000) 46: 1-27.

Saima, Kuddus M, Roohi, Ahmad IZ. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* In Press (2013) 11: 39-46.

Suresh PV. Biodegradation of shrimp processing bio-waste and concomitant production of chitinase enzyme and N-acetyl-D-glucosamine by marine bacteria: production and process optimization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* (2012) 28: 2945-2962.

Wang SL, Liu CP, Liang TW. Fermented and enzymatic production of chitin/chitosan oligosaccharides by extracellular chitinases from *Bacillus cereus* TKU027. *Carbohydr. Polym.* (2012) 90: 1305-1313.

Wang SL, Chao CH, Liang TW, Chen CC. Purification and characterization of protease and chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and conversion of marine wastes by these enzymes. *mar. biotechnol.* (2008) 11: 334-344.

Ye K, Wang H, Zhang X, Jiang Y, Xu X, Zhou G. Development and validation of a molecular predictive model to describe the growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged chilled pork. *Food Control* (2013) 32: 246-254.

