



PRODUCCIÓN DE ENZIMAS DE ARQUEAS HALÓFILAS CULTIVADAS POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

Martha F. Martín del Campo¹, Rosa M. Camacho¹, Juan C. Mateos-Díaz¹, Jesús Córdova², Marcelo Müller-Santos³, Jorge A. Rodríguez¹. ¹ Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara, Jalisco, C.P. 44270, ² Departamento de Química, Universidad de Guadalajara, ³ Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. email:mr_cataldo_86x@hotmail.com

Palabras clave: Fermentación sólida, arquea halófila, esterasa/lipasa

Introducción. Las enzimas de arqueas halófilas han sido catalogadas como biocatalizadores altamente estables; sin embargo, su producción típica en cultivo en lote es baja, dificultando su purificación y caracterización. Las esterasas y lipasas de arqueas halófilas podrían ser un biocatalizador altamente estable a condiciones requeridas en la industria por lo que su búsqueda y producción son de alto interés biotecnológico. En el presente trabajo, tres arqueas halófilas: *Natronococcus* sp. TC6 (Ntc), *Halobacterium* sp. NRC1 (Hb) y *Haloarcula marismortui* (Hm) fueron cultivadas en lote, implementando por primera vez la fermentación en medio sólido (FMS) para el cultivo de arqueas halófilas con el fin de introducir mejoras en la producción de la actividad esterasa/lipasa respecto a lo obtenido actualmente por fermentación en medio líquido (FML).

Metodología. Ntc fue cultivada en medio DSM97, Hb y Hm fueron cultivadas en medio ATCC 2185 a 4M de NaCl y 40 °C. La FMS fue realizada de acuerdo con (1) empleando 4 soportes inertes: agrolita (A), vermiculita (V), esponja de poliuretano (PM) y fibra de vidrio (FV) a 80% (p/v) de contenido líquido, la actividad acuosa (a_w) fue medida mediante un higrómetro. La FML se llevó a cabo en matraces a 250 rpm. 10% (v/v) de inóculo fue empleado tanto en FMS como FML. Se tomaron muestras cada 24h para cuantificar la biomasa por densidad óptica (600nm) y la actividad esterasa/lipasa de acuerdo a (2) empleando éster de *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB) y de *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL) como sustratos, y tanto el caldo con las células como muestra enzimática. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Resultados. Para la exploración del cultivo por FMS en arqueas halófilas se seleccionó a Ntc por su capacidad de producir actividad esterasa/lipasa (3), y se midió la actividad esterasa/lipasa y a_w para seleccionar las mejores condiciones de producción. Las arqueas halófilas tienen su óptimo de crecimiento a 0.7-0.75 a_w (5-4M de NaCl) (4) por lo que la búsqueda de estos valores es deseable. Se detectó (**Tabla 1**) que una alta a_w (V,A,PM) propicia una menor actividad. Relevantemente, al emplear la mezcla FV-PM (5 g FV/1g PM) la a_w fue cercana al óptimo y la actividad sobre *p*-NPL superior al empleo de todos soportes por si solos, y a su vez 6.4 veces superior al cultivo por FML a 4M NaCl.

Tabla 1. Cribado de soportes en el cultivo de Ntc por FMS a 120 h.

Soporte	Actividad enzimática <i>p</i> -NPL, U/L	a_w
V	9.6 ± 0.2	0.85
A	10.8 ± 0.4	0.85
PM	1.9 ± 0.09	0.93
FV	17.1 ± 0.9	0.78
FV-PM	33.4 ± 1.0	0.74

La mezcla FV-PM fue empleada posteriormente como soporte en el cultivo de Hb y Hm. Al determinar la actividad esterasa/lipasa se encontró que para las 3 arqueas, la actividad fue siempre mayor en FMS respecto a la FML, siendo para *p*-NPL entre 2.4 a 6.2 veces (**Fig. 1 A**) y entre 2.3 a 2.8 veces para *p*-NPB (**Fig. 1 B**).

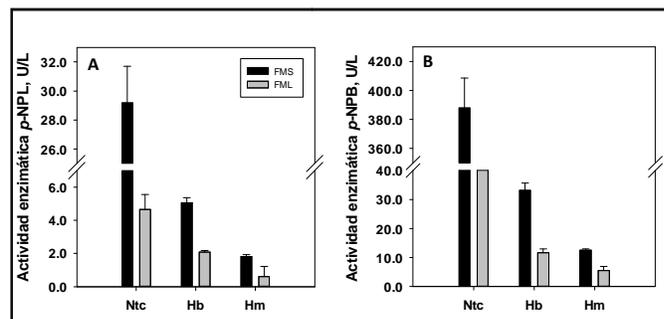


Fig. 1. Comparación de la máxima producción de actividad esterasa/lipasa sobre *p*-NPL (A) y *p*-NPB (B) producida por FMS y FML para Ntc (120 h), Hb (48h) y Hm (72) h.

Conclusiones. Las tres arqueas halófilas fueron cultivables por FMS donde la baja a_w propiciada mejoró la producción de biomasa y actividad esterasa/lipasa.

Agradecimiento. Martha F. Martín del Campo agradece al CONACYT por su beca doctoral. Se agradece el financiamiento otorgado por CNPq (PVE-301166/2014-5 y SEP-CONACYT (JI-6127).

Bibliografía.

- Raimbault M, Alazard D (1980). *Eur J Appl Microbiol .Biotechnol.* Vol (9): 199-209.
- Camacho R, Mateos JC, González O, Prado L, Córdova J (2009). *J Ind Microbiol biotechnol.* vol (36):901-909.
- Boutaiba S, Bhatnagar T, Hacene H, Mitchel D, Baratti JC. *J Mol Catalysis.* vol (41): 21-26.
- Rodríguez V, Ventosa A, Juez J, Imhoff. (1985) *Microbial Ecology* vol (11):107-115.