

Evaluación de bacterias Antárticas como potenciales productoras de lipasas de interés industrial

Soria, V., Solari, A., Cabot, S., Varela, H. y Loperena, L.

Depto. de Bioingeniería, Inst. Ing. Química, Facultad Ingeniería, UDELAR, J. Herrera y Reissig 565, CP 11.300, URUGUAY, *e-mail: vsoria@fing.edu.uy*

Palabras clave: lipasas microbianas, microorganismos psicrófilos

Resumen

Los microorganismos psicrófilos son capaces de crecer en ambientes permanentemente fríos, para ello desarrollan estrategias bioquímicas especiales y compuestos celulares con gran potencial biotecnológico. En este trabajo se evaluó la producción de enzimas lipolíticas de cinco cepas bacterianas antárticas crecidas en medio aceite de oliva durante 36 o 74 horas, a su temperatura óptima de crecimiento. La determinación enzimática se realizó usando como sustratos p-nitrofenilpalmitato y p-nitrofenilbutirato. Las cinco cepas crecieron bien y se detectó actividad lipolítica y/o estereolítica en todas, siendo la cepa 7Ab la que presentó la mayor actividad lipolítica y estereolítica en el menor tiempo de fermentación.

Abstract

Psychrophilic microorganisms are able to grow in permanently cold habitats. In order to survive they develop biochemical strategies and cell compounds of interesting biotechnological potential. The aim of this work was to evaluate the lipase activity in five bacteria strains from Antarctica, grown in olive oil medium for 36 to 74 hours, at their optimum growth temperature. Enzyme activity was determined using p-nitrophenylpalmitate and p-nitrophenylbutyrate as substrates. The five strains grew well and lipolytic and / or estereolytic activity was detected in all of them. The 7Ab showed the highest lipolytic and estereolytic activity in the shortest time of fermentation.

Introducción

La adaptación de los microorganismos a condiciones ambientales extremas, como las encontradas en el continente Antártico, los obliga a desarrollar componentes celulares y estrategias bioquímicas apropiadas. En este sentido se acepta que estos microorganismos constituyen un importante reservorio de moléculas de interés industrial y con aplicaciones biotecnológicas novedosas. En particular las enzimas activas en frío o adaptadas al frío, son en general producidas por organismos que habitan un medio ambiente permanentemente frío como los que se localizan en las zonas polares, a altas altitudes y en la profundidad de los océanos. Estas enzimas psicrófilas se caracterizan por una alta eficiencia catalítica por debajo de los 40 °C y se asocian a menudo, o casi siempre, con una alta termosensibilidad (Feller y Gerday, 2003). Las enzimas lipolíticas están ampliamente distribuidas entre los animales, las plantas y

microorganismos. Las bacterias producen diferentes clases, incluyendo carboxilesterasas (EC 3.1.1.1), que hidrolizan ésteres de ácidos carboxílicos de cadena corta ($C \leq 12$) y lipasas (EC 3.1.1.3), que presentan máxima actividad con los acilglicéridos de cadena larga insolubles en agua ($C \geq 12$) (Eggert *et al.*, 2000). Estas enzimas no requieren de cofactores y usualmente exhiben buena quimio-selectividad, regio-selectividad y enantio-selectividad. Su especificidad por el sustrato es baja y su actividad óptima se mantiene en un rango amplio de temperaturas. Estas interesantes propiedades hacen que las lipasas sean los biocatalizadores más versátiles (Kademi *et al.*, 2005). Su uso comercial mueve un mercado millonario y comprende una gran variedad de aplicaciones como síntesis de biopolímeros y biodiesel, fabricación de productos farmacéuticos, agroquímicos, cosméticos y sabores (Haki y Rakshit, 2003). A pesar de que el conocimiento sobre las lipasas activas en frío crece rápidamente, éste es aún incompleto y disperso, por lo cual ha surgido a nivel mundial la necesidad de aumentar la investigación sobre los microorganismos productores de lipasas activas a bajas temperaturas y sus aplicaciones industriales. Si bien las lipasas activas en frío están presentes en muchos microorganismos que sobreviven a temperaturas alrededor de 5 °C, solo unas pocas bacterias y levaduras han sido utilizadas para su producción (Joseph B., *et al* 2008). Por esta razón en el presente trabajo se pretende estudiar la capacidad de producción de lipasas activas a bajas temperaturas de aislados antárticos, como contribución a la búsqueda de nuevos productos procedentes de fuentes biológicas para su aplicación en procesos tecnológicos.

A partir de un screening en medio sólido de 120 aislados de muestras provenientes de Isla Rey Jorge, Isla Decepción, Port Lockroy, Cuber Ville y Cabo Kaise, se identificaron las bacterias productoras de lipasas por la formación de un halo alrededor de la colonia cuando crecían en un medio con tributirina (Ronald, 2000). Se evaluó la actividad relativa y específica en base al diámetro del halo de degradación y se seleccionaron e identificaron las cinco mejores productoras de lipasas (Varela, H. *et al.*, 2008). El objetivo del presente trabajo fue evaluar las condiciones de cultivo y de producción de lipasas de los aislados seleccionados a nivel de matraces.

Materiales y métodos

Microorganismos: *Arthrobacter* sp. 134d, *Psychrobacter* sp. 7Ab, *Bacillus* sp. 19b, *Pseudomonas* sp. 27a y *Pseudomonas* sp. 173d.

Medio de cultivo (%m/v): peptona 0.5, extracto de levadura 0.3, goma arábiga 0.5 y aceite de oliva 1, pH 7 (Gupta *et al.*, 2004; Volpato *et al.* 2007).

Cultivos bacterianos: A partir de un cultivo microbiano crecido en agar nutriente inclinado se realizó el desarrollo del inóculo en un matraz de 250 ml con 50 ml de medio y se incubó durante 24h a 200 rpm. El inóculo se centrifugó a 10000g y 4°C y la biomasa obtenida se resuspendió en un matraz de 1L con 250 ml de medio que se incubó a 200 rpm durante 36 o 74 horas. La temperatura de incubación fue la temperatura óptima de cada cepa. Se tomaron 8 ml de muestra cada dos o tres horas para medir el crecimiento y determinar la actividad enzimática.

Métodos Analíticos: Se cuantificó biomasa por espectrofotometría a 600 nm. En forma experimental se determinó la equivalencia entre absorbancia y biomasa seca a 70°C.

La actividad lipolítica se midió para 200 μ L de sobrenadante usando como sustrato una solución de p- nitrofenilpalmitato en isopropanol (Barriga Gonzalez A.A. 2006, Winkler U.R. y Stuckmann M., 1979). Se prepararon blancos de sustrato y blancos de las distintas muestras. Los ensayos se realizaron a la temperatura de crecimiento del cultivo correspondiente y se midió la absorbancia a 410 nm a los 15 y 30 minutos de incubación. La actividad esterolítica se llevó a cabo de la misma manera que para lipasa sustituyéndose el p-nitrofenilpalmitato por p-nitrofenilbutirato en buffer fosfato pH 7. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de micromoles de p-nitrofenol liberado por mililitro por minuto ($\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$). Las absorbancias medidas se convirtieron a concentración de p-nitrofenol de acuerdo a la curva de calibración $y = 10.9x - 0.0478$ con $r^2 = 0.9974$, donde y es la absorbancia y x la concentración de p-Nitrofenol en micromoles por mililitro.

Resultados y Discusión

Las condiciones de cultivo se determinaron de acuerdo a la bibliografía consultada sobre producción de lipasas de cultivos bacterianos, teniendo en cuenta los géneros de pertenencia de los aislados (Gupta R. *et al*, 2004, Joseph B. *et*, 2008). De acuerdo a Gupta R. *et al*. (2004) la temperatura óptima de producción de lipasas se corresponde con la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo por lo cual primero se estudió el crecimiento de las cepas en función de la temperatura. El rango de temperaturas óptimas encontradas fue para las cepas 27a y 173d de 20-25°C, para 7Ab de 25-30°C, para 19b de 15-20°C y para 134d de 10-15°C. A continuación se realizó el cultivo de las cepas en medio con aceite de oliva como inductor, durante 36 o 74 horas según la temperatura de incubación (27a, 173d y 7Ab a 25°C, 19b y 134d a 15°C). Las cinco cepas crecieron bien (figura 1) y se detectó actividad lipolítica y/o esterolítica en todas. Se seleccionó la cepa 7Ab para la continuación de los estudios porque presentó la mayor actividad lipolítica y esterolítica en el menor tiempo de fermentación (figura 2). Como trabajo futuro se propone para la cepa 7Ab, determinar la cinética de producción de la enzima y su actividad en función de la temperatura. En las cepas en que se detectó baja o ninguna actividad lipolítica y/o esterolítica se realizarán ensayos complementarios para determinar si variando el inductor, la temperatura de crecimiento o el tiempo de cultivo, la actividad aumenta.

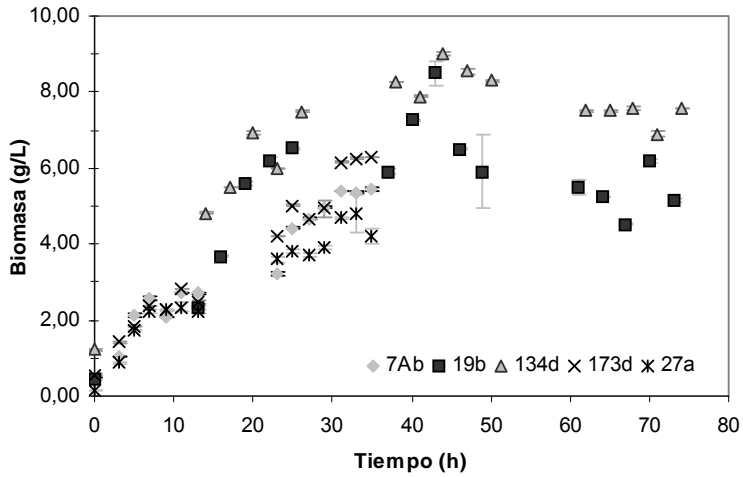


Figura 1. Perfiles de crecimiento. Los valores informados son el promedio la desviación estándar de duplicados.

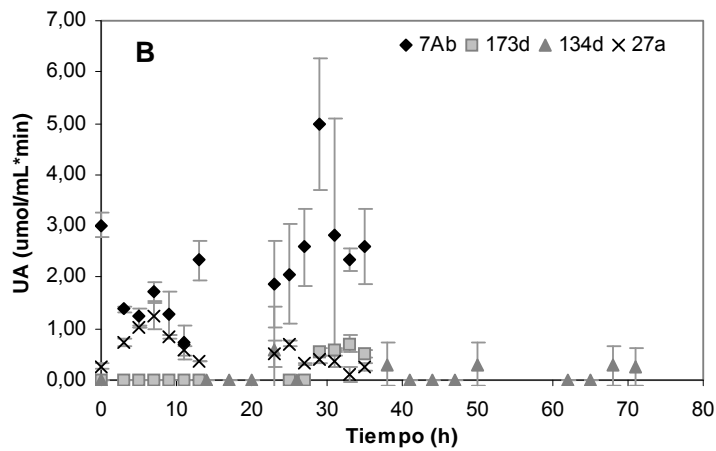
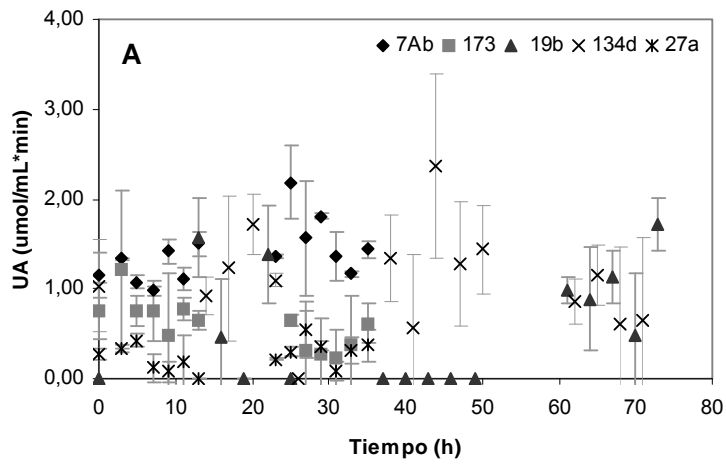


Figura 2. A: Actividad lipolítica; B: Actividad esterolítica. Los valores informados son el promedio la desviación estándar de duplicados.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC-UdelaR) y al Instituto Antártico Uruguayo (IAU).

Referencias Bibliográficas

Barriga Gonzalez, A. A., 2006. Enzimas lipolíticas de krill antártico: Purificación y caracterización, ¿Enzimas adaptadas al frío?, Tesis de Doctorado en Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Eggert T., Pencreac'h G., Douchet I., Verger R., Jaeger K-E, 2000. A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *Eur. J. Biochem.*, 267: 6459-6469.

Feller G., Gerday, C.H., 2003. Psychrophilic Enzymes: Hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews, Microbiology*, 1: 200-208.

Gupta R., Gupta N., Rathi, P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology*, 64 (6):763-781.

Haki, G.D., Rakshit, S.K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol.*, 89:17-34.

Joseph, B., Ramteke, P.M., Thomas, G., 2008. Cold active microbial lipase: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*, 26: 457-470.

Kademi, A., Danielle, L., Ajain, H., 2005. Lipases In: Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R., Larroche, C., editors. *Enzyme Technology*. India: Asiatech Publishers, 297-318.

Ronald, M.A., 2000. *Handbook of Microbiological Media*: 949.

Varela, H., Lupo, S., Soria, V., Bergalli, A., Bernardo, A., Calviño, A., Guigou, M., Pellegrino, A., Batista, S., Rivas, F. y Loperena, L., 2008. Selección y caracterización de cepas en ecosistemas de la Antártida para la producción de enzimas y biopolímeros. IV Simposio Latinoamericano sobre Investigaciones Antárticas y VII Reunión Chilena de Investigación Antártica: 80-84.

Volpato, G., Caron, D., Becerra Machado, D., Costa Rodrigues, R., Xandro Heck, J., Zachia Ayub, A., 2007. Aproveitamento de Glicerol para Producción de Lipase por *Bacillus* spp. BL74 Isolado de Ambientes Amazónicos. XVI SINAIFERM, Curitiba-Brasil.

Winkler, U. K., Stuckmann, M., 1979. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*, *Journal of Bacteriology*, 138 (3): 663-670.