

Diseño de estrategias de cultivo de *Chromohalobacter salexigens* para la optimización de la bioproducción de ectoínas

J. M. Pastor¹, M. J. Salar², M. Salvador³, N. Borges⁴, L. N. Csonka⁵, C. Vargas⁶, V. Bernal⁷, M. Cánovas¹

¹Depto. de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, Facultad de Química, Universidad de Murcia. Murcia. josempastor@um.es

²Depto. de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad de Murcia. Murcia.

³Synbio lab, Faculty of Medical Sciences, University of Surrey, Reino Unido.

⁴Instituto de Tecnología Química e Biológica António Xavier. Universidade Nova de Lisboa. Oeiras. Portugal.

⁵Dpt. of Biological Sciences, Purdue University. West Lafayette, EE.UU.

⁶Depto. de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. Sevilla.

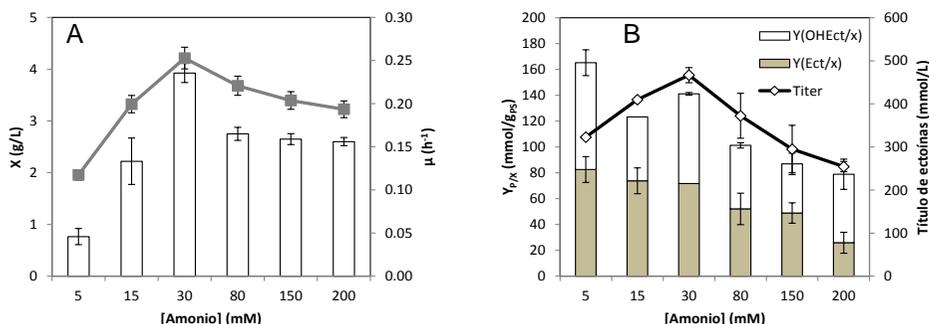
⁷Área de Biología. Dirección de Nuevas Energías. Centro de Tecnología de Repsol. Repsol S.A. Móstoles. Madrid.

C. salexigens se cultivó en medios con diferente contenido en glucosa y amonio con el fin de determinar cómo responde a los cambios en los aportes externos de fuentes de carbono y nitrógeno. Se empezó analizando los efectos de una alimentación no balanceada de carbono y nitrógeno sobre el crecimiento y la producción de ectoínas en *C. salexigens* en cultivos en matraces agitados.

Efecto de la concentración de amonio en el crecimiento y la producción de ectoínas

Los cultivos discontinuos se crecieron en una concentración de amonio entre 5 y 200 mM, con una concentración fija de glucosa (20 mM). La concentración de amonio afectó tanto al rendimiento en biomasa como a la velocidad de crecimiento de *C. salexigens*. A bajas concentraciones, ambos parámetros incrementaron en proporción al aporte de amonio. Los bajos rendimientos en biomasa se deben a una síntesis de ectoínas y componentes celulares limitada por la escasez del nitrógeno. Además, el efecto sobre la velocidad de crecimiento sugiere que la actividad de los sistemas de captación de amonio se vea afectada por la concentración del mismo en el medio. Se observó un descenso ligero en la velocidad de crecimiento con el aumento de la concentración de amonio (Figura 1A).

Figura 1



La tasa de mortalidad celular en la fase estacionaria aumentó de forma llamativa a altas concentraciones de amonio, lo que indica que un exceso de esta fuente de nitrógeno podría tener efectos tóxicos en las células, que serían aún más importantes tras el agotamiento de la fuente de carbono (Figura 1A). El contenido en ectoínas de las células fue menor a concentraciones mayores de amonio, mientras que su título volumétrico alcanzó un máximo a 30 mM (Figura 1B).

Efectos de la limitación y exceso de nitrógeno sobre el metabolismo de *C. salexigens*: *overflow* de carbono y flujos metabólicos relativos

La baja eficiencia del crecimiento de *C. salexigens* en presencia de un aporte de glucosa y amonio desequilibrado podría estar relacionada con: i) cambios metabólicos que producen un *overflow* de productos secundarios (como piruvato y acetato) (Pastor *et al.*, 2013) y ii) una producción de ectoínas menor debida a una disponibilidad reducida de amonio para síntesis de biomasa. El crecimiento ineficiente de *C. salexigens* presenta una correlación con la acumulación en el medio de cultivo de gluconato, piruvato, y en menor medida acetato.

Tabla 1	[Glucosa] (mM)	[Amonio] (mM)	qGluconato (mmol·g _{PS} ⁻¹ ·h ⁻¹)	qPiruvato (mmol·g _{PS} ⁻¹ ·h ⁻¹)	qAcetato (mmol·g _{PS} ⁻¹ ·h ⁻¹)
Amonio variable	20	5	40,74 ± 5,08	43,33 ± 9,83	N.D.
	20	15	1,61 ± 0,01	15,77 ± 1,42	2,13 ± 0,21
	20	30	2,44 ± 0,36	6,51 ± 0,18	N.D.
	20	80	5,66 ± 2,35	2,38 ± 0,23	N.D.
	20	150	3,66 ± 1,44	1,39 ± 0,71	N.D.
	20	200	8,26 ± 1,62	1,60 ± 0,18	N.D.

Los perfiles metabólicos observados se vieron muy afectados por la naturaleza del nutriente limitante. La acumulación de piruvato y gluconato observada resultó especialmente alta en cultivos limitados por nitrógeno, y continuó después de que el crecimiento ya se hubiera detenido. El *overflow* metabólico observado en cultivos limitados por carbono fue mucho menor (Tabla 1). El piruvato y el acetato son metabolitos de *overflow*, y por tanto pueden servir como indicadores de un metabolismo ineficiente. A una concentración de glucosa inicial dada, la velocidad de excreción de piruvato aumentó de forma proporcional a la ratio C/N en el medio de cultivo. Por tanto, en *C. salexigens* el *overflow* depende de forma acusada de la disponibilidad de amonio en el medio de cultivo. El gluconato no puede considerarse metabolito del *overflow*. Se cree que la oxidación rápida de la glucosa a gluconato se debe a una adaptación de algunos microorganismos que ofrece ventaja al competir por las fuentes de carbono, dado que algunos microorganismos no son capaces de usar el gluconato como fuente de carbono. Además, el gluconato se consumió más adelante, en la segunda mitad de la fase exponencial de crecimiento (Pastor *et al.*, 2013). Es posible determinar ciertos flujos metabólicos relativos en nodos importantes del metabolismo rastreando la incorporación de ¹³C procedente de fuentes de carbono marcadas en posiciones específicas de las moléculas de ectoínas (Pastor *et al.*, 2013). Aprovechando este hecho, se cultivó a *C. salexigens* en [2-¹³C]-glucosa en diferentes proporciones amonio/glucosa: 0,5, 1,5, 2,5 y 3. Se observó un perfil alterado de solutos compatibles: en una ratio amonio/glucosa alta (es decir, en cultivos

limitados por glucosa), *C. salexigens* acumuló glutamato hasta un nivel comparable al de las ectoínas (Figura 2).

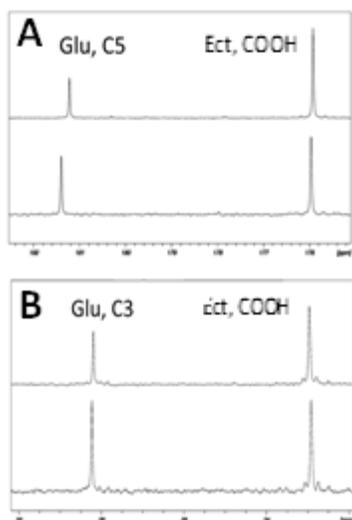


Figura 2. Espectros de ^{13}C -RMN mostrando señales de glutamato (Glu) y ectoína (Ect) de extractos de *C. salexigens* crecida en distintos ratios C/N en el medio (1,5 espectros superiores y 2,5 espectros inferiores). (A) Detalle de la zona de carbonos carboxílicos. (B) Detalle de la zona de grupos metileno y metilo.

Se hizo una estimación de ciertos ratios de flujos relevantes a partir de los patrones de marcaje observados, como se ha descrito previamente (Pastor *et al.*, 2013). Concretamente, se estimaron los ratios entre piruvato carboxilasa y piruvato deshidrogenasa (Pc/Pdh), piruvato carboxilasa y citrato sintasa (Pc/Cs) y citrato sintasa y ectoína sintasa (Cs/EctA), pero sólo se detectaron pequeñas variaciones entre los cultivos con ratio amonio/glucosa entre 0,5 y 3 (Figura 3).

Este hecho es un reflejo de la rigidez metabólica de *C. salexigens* al enfrentarse a cambios ambientales. Previamente hemos descrito un patrón de rigidez similar en respuesta a la concentración de sal (Pastor *et al.*, 2013) que vuelve a ponerse de manifiesto en respuesta a cambios en los aportes de carbono y nitrógeno.

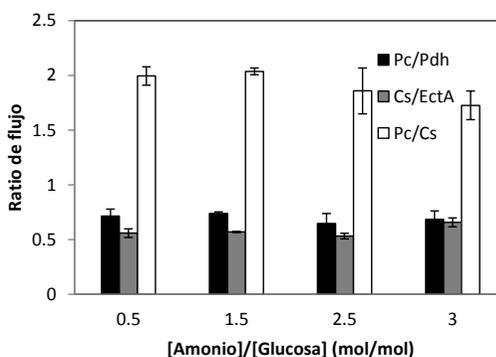


Figura 3

Conexión entre el metabolismo *overflow* y la fuente de carbono. Comparación de glucosa y fructosa.

Se analizó la fisiología de *C. salexigens* en medio mínimo con fructosa en función de la salinidad y se comparó su comportamiento con glucosa como fuente de carbono. *C. salexigens* se cultivó en medio mínimo M63 suplementado con fructosa o glucosa como única fuente de carbono a tres concentraciones de sal (NaCl 0,75, 1,5 y 2,5 M). Tal como se había descrito previamente, el rendimiento máximo en biomasa aumentó con la salinidad en glucosa como fuente de carbono, mientras que la velocidad de crecimiento disminuyó un 60% desde 0,75 M (salinidad óptima para el crecimiento) hasta 2,5 M (salinidad óptima para la síntesis de biomasa). La velocidad de crecimiento en fructosa resultó un 30-40% menor en cualquiera de las salinidades probadas (Figura 4A), mientras que el rendimiento máximo en biomasa fue mayor que en los cultivos con glucosa, excepto en NaCl 2,5 M (Figura 4B). El análisis de los sobrenadantes de los cultivos en

fructosa reveló la ausencia de gluconato, piruvato y acetato, al menos en niveles detectables. La ausencia de metabolismo *overflow* concuerda con el rendimiento mayor en biomasa en los cultivos de fructosa. Además, a 2,5 M de NaCl, donde los cultivos en glucosa mostraron un metabolismo *overflow* mucho menor que a baja salinidad, no se observó una diferencia significativa en el rendimiento en biomasa entre las dos fuentes de carbono.

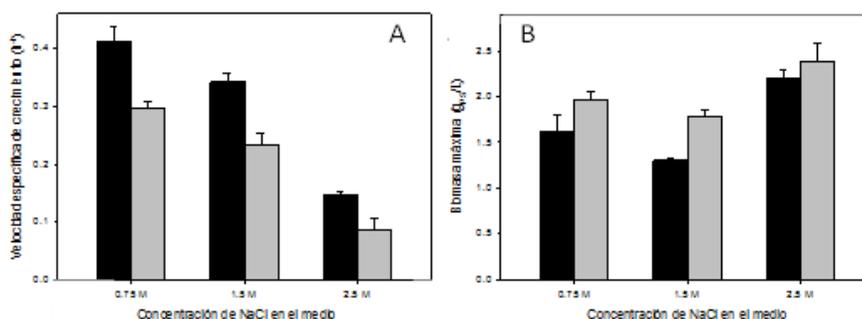


Figura 4. Código de color según fuente de carbono: barras negras, glucosa; barras grises, fructosa.

Cultivo en *fed-batch* de *C. salexigens*

La información obtenida en los estudios anteriores se empleó en el desarrollo de una estrategia de alimentación que permitiera un cultivo de alta densidad de *C. salexigens*. Como se ha descrito en las secciones previas, los cultivos alimentados con bajos niveles de glucosa y de amonio mostraron los mayores contenidos de ectoína por unidad de biomasa. Esto indica que *C. salexigens* no está bien adaptada a concentraciones altas de nutrientes, lo que se puede explicar por su adaptación a crecer en ambientes pobres en nutrientes (Zahran, 1997; Oren, 2002). Este fenómeno es común en otros muchos microorganismos, y normalmente aparece acoplado a un metabolismo *overflow* alto durante el crecimiento en medios ricos en nutrientes. Además, un flujo bajo de nutrientes limita la cantidad de células producidas, lo que afecta a la productividad de los procesos. Este efecto resultó particularmente evidente cuando los niveles de nitrógeno eran bajos, lo que afectó a la velocidad de crecimiento. Por último, la acumulación de gluconato y el *overflow* de piruvato podrían evitarse. Para poder conseguir un nivel alto de producción de ectoínas, debe alcanzarse un rendimiento específico de ectoínas y de biomasa altos. Por todo esto, se decidió crecer *C. salexigens* en cultivos *fed-batch* limitados por glucosa, buscando optimizar las condiciones para mantener un cultivo de alta densidad. Se diseñaron los perfiles de alimentación *fed-batch* usando glucosa como nutriente limitante. Tras una fase inicial de cultivo discontinuo, los cultivos se alimentaron con una disolución concentrada de nutrientes, fijando la velocidad de crecimiento mediante el control de la velocidad de alimentación del nutriente limitante. La velocidad de alimentación de glucosa siguió un perfil exponencial para mantener el crecimiento celular (Nielsen, 2006). Durante todo el experimento se monitorearon el crecimiento, la producción de ectoínas y metabolitos y el consumo de nutrientes. Cuando la velocidad de crecimiento se ajustó a un nivel relativamente alto ($0,1 \text{ h}^{-1}$), se acumularon glucosa y

amonio y el crecimiento se detuvo en una densidad celular baja (12,6 g/L) como consecuencia de la inhibición por el amonio (Tabla 2). En una velocidad de crecimiento menor ($0,05 \text{ h}^{-1}$) se alcanzó una densidad mucho mayor (28,1 g/L). En este caso, el nutriente limitante fue la glucosa, que se agotó completamente en el medio de cultivo. Sin embargo, la alimentación de amonio no estaba equilibrada y continuó acumulándose en el reactor, llevando al final a una inhibición del crecimiento.

Tabla 2	Discontinuo	Fed-batch A	Fed-batch B	Fed-batch C
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.18	0,1	0,05	0,05
[Glucosa] inicial (mM)	20	20	20	20
[Amonio] inicial (mM)	30	30	30	15
Biomasa máxima (g/L)	2,12	12,6	28,1	42,36
Producción de ectoína (g/L)	0,16	0,27	1,62	1,96
Producción de hidroxiectoína (g/L)	0,18	0,18	1,51	2,25
Rendimiento en biomasa ($\text{g}_{\text{CDW}} \cdot \text{g}_{\text{glucosa}}^{-1}$)	0,6	0,25	0,5	0,75
Tiempo (h)	60	72	168	90
pO_2 (% O_2)	30	30	30	30

Para minimizar este efecto, se diseñó un esquema de alimentación con dos disoluciones de alimentación distintas. La segunda fase de alimentación se inició con una disolución de nutrientes menos concentrada en amonio. De esta forma se llegó a una densidad de 42,4 g/L. El título de ectoínas fue de 4,2 g/L. Este último esquema de alimentación, con una disolución con contenido bajo en nitrógeno y glucosa como nutriente limitante, permitió no sólo controlar la velocidad de crecimiento, sino también limitar el metabolismo *overflow*. Se observó acumulación de gluconato y piruvato durante las fases iniciales de los cultivos, alcanzándose concentraciones de hasta 7 mM de gluconato y 15 mM de piruvato. La cantidad de lactato y acetato observada fue mucho menor. Desde las 50 h de cultivo en adelante, no se detectó ninguno de estos metabolitos en los sobrenadantes de los cultivos, demostrando la limitación por carbono del crecimiento, de manera que las células recuperaban los productos excretados con el fin de maximizar el rendimiento metabólico. Por tanto, estos resultados demuestran que el *overflow* que se observa en *C. salexigens* en los cultivos discontinuos se puede minimizar en cultivos *fed-batch* limitados por la fuente de carbono, lo que indica que la eficiencia metabólica de esta especie es mucho mayor en entornos pobres en nutrientes.

Bibliografía

- Nielsen, J. (2006) Microbial process kinetics. In *Basic Biotechnology*. Rattledge, C., y Kristiansen, B. (eds). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 155-180.
- Oren, A. (2002) *Halophilic microorganisms and their environments*. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Pastor, J.M., Bernal, V., Salvador, M., Argandona, M., Vargas, C., Csonka, L.N., et al. (2013) Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Biol Chem* **288**: 17769-81.
- Zahran, H.H. (1997) Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol Fertil Soils* **25**: 211-223.