



OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE ENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA, PRODUCIDA POR LA BACTERIA HALÓFILA MODERADA PRO-III-115

Rodrigo A. Rivera-Solís, Silvia A. Moreno-Mendieta, Sara E. Solís-Pereira,
Alicia Cardos-Vidal y Gerardo Rivera-Muñoz

Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica del Instituto Tecnológico de Mérida
Km. 5 Carr. Mérida-Progreso S/N, C.P.97118, (999)944-81-22 ext.172
grivera@itmerida.mx

Palabras clave: bacterias halófilas, quitinasas, optimización.

Introducción. La quitina es un recurso natural renovable, que se puede obtener a partir de insectos, hongos, algas e invertebrados marinos. Estructuralmente es un polímero con cadenas no ramificadas de unidades de N-acetilglucosamina (NAcGlu) unidas por enlaces β 1-4 glucosídicos que se encuentra presente en la cutícula de los insectos y en el caparazón de crustáceos como el camarón, la langosta y el cangrejo. El aprovechamiento de los residuos quitinosos del camarón puede ser orientado a la producción de quitina y quitosano o de sus monómeros respectivos: la N-acetil-D-Glucosamina y la glucosamina, ambos de interés para la industria farmacéutica y para la industria alimentaria. La hidrólisis enzimática total de la quitina hasta llegar a N-acetilglucosamina libre, requiere de la acción de un sistema multienzimático que actúa de manera sinérgica y consecutiva. Nuestro grupo posee una colección de cepas bacterianas aisladas de la zona costera del estado de Yucatán que poseen la capacidad de sintetizar enzimas quitinolíticas.

El objetivo de este trabajo fue encontrar las condiciones óptimas para determinar la actividad quitinolítica (A.Q.) producida por la cepa halófila moderada PRO-III-115 aislada por Granados Baeza (2000).

Metodología. La quitina coloidal (Q. C.) usada se produjo usando quitina recuperada de residuos de camarón recolectados en la zona de Lerma, Campeche. La quitina se produjo siguiendo el método reportado por No *et al* (1989). La Q.C. fue obtenida mediante el método reportado por Monreal y Reese (1969). La cepa PRO-III-115 se conservó y propagó en el medio de cultivo sólido propuesto por Carroad. Las fermentaciones para producir la A.Q. se realizaron usando el mismo medio en fase líquida. A los sobrenadantes libres de células obtenidos después de centrifugar se les determinó la A.Q. siguiendo el método reportado por Monreal y Reese (1969) y los azúcares reductores obtenidos se cuantificaron siguiendo el método de Miller (1959). La optimización de las condiciones del sistema de ensayo para la cuantificación de la A.Q. se realizó mediante un diseño factorial 3^3 manejando como puntos centrales, los valores de pH, temperatura y molaridad del buffer que se han usado en los trabajos anteriores de este proyecto. La concentración de sustrato y Q.C. al 1.0%, se conservó constante y en todos los casos se usó buffer de Trisima-Base

Resultados y Discusión: En la figura 1 se muestran el efecto de la temperatura, el pH y la molaridad del buffer sobre los títulos de actividad quitinolítica, como se puede observar los mejores títulos de actividad se lograron

Cuando se maneja una temperatura de 60°C, un pH de 8.9 y un buffer 0.04M.

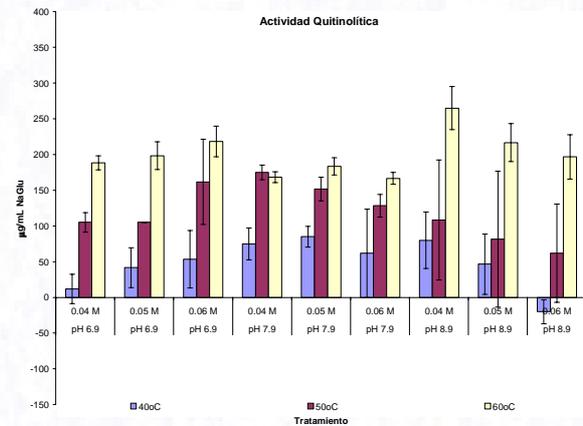


Fig. 1. Efecto de Temperatura, pH y Molaridad en el título enzimático

Al realizar el análisis de varianza se encontró que el parámetro temperatura fue el que tuvo mayor influencia sobre los tratamientos manejados en el experimento. Las 3 mejores combinaciones se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Mejores títulos de actividad quitinolítica

Temp	M Buffer	pH	µg/mL NaGlu
60°C	0.04	8.9	265
60°C	0.05	8.9	216.66
60°C	0.06	8.9	196.66

Conclusiones: La temperatura fue el factor que modificó los títulos de actividad, observándose el mayor título a 60°C. El pH y la molaridad no tienen una influencia significativa sobre el sistema,

Agradecimiento: A la UADY por la beca otorgada para la realización de este trabajo y al ITM por la facilidad otorgada para el uso de sus instalaciones.

Referencias: 1) Granados-Baeza, Manuel Jesús. Aislamiento y selección de microorganismos halófilos quitinolíticos. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Mérida, Yucatán, México. Febrero 2000.

2) No, H.K.; Meyers, S.P.; Lee, K.S. Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1989, 37, 3, 575-579.

3) Monreal, J.; Reese, E.T. The chitinase of *Serratia Marcescens*. *Canadian Journal of Microbiology*. 1969, 15, 689-696.

4) Miller, G.L. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 1959, 31, 3, 426-428.