

**PRODUCCIÓN DE QUITINASAS EXTRACELULARES CON UNA CEPA
ALCALÓFILA HALOTOLERANTE DE *Streptomyces sp.*
AISLADA DE RESIDUOS DE CAMARÓN**

**PRODUCTION OF EXTRACELLULAR CHITINASES FROM ALKALOPHILIC
MODERATELY HALOPHILIC *Streptomyces sp.* ISOLATED OF SHRIMP WASTE**

L. Sastoque- Cala¹, M. Mercado-Reyes², M.M. Martínez-Salgado³,
B. Quevedo-Hidalgo¹ y A.M. Pedroza-Rodríguez^{1*}

¹Laboratorio de Biotecnología Aplicada. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No 43-82. Bogotá. Colombia.

²Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.

³Laboratorio de Ambiental y de suelos. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.

Recibido 22 de Julio 2006; Aceptado 31 de Mayo 2007

Resumen

A partir de residuos de camarón provenientes de una industria pesquera Colombiana se aislaron 9 cepas de microorganismos quitinolíticos pertenecientes a diferentes grupos morfológicos como cocos Gram positivos, bacilos Gram positivos y Actinomycetos. La cepa 9A identificada como *Streptomyces sp* fue seleccionada para continuar con el estudio por presentar actividad quitinolítica significativamente mayor ($p < 0.05$) (0.035 U l^{-1}), en un medio a base de quitina coloidal a pH alcalino (9.2) y elevadas concentraciones de NaCl (6% p/v), lo que lo ubica como un posible microorganismo alcalófilo/halotolerante. Por medio de un diseño factorial 2^2 se demostró que la interacción de los dos tipos de quitina (quitina coloidal y residuos de camarón) en sus concentraciones más altas incrementaron significativamente ($p < 0.05$) la actividad enzimática alcanzando valores máximos de 0.120 U l^{-1} a los 16 días de evaluación. Empleando el medio de cultivo modificado se realizaron las cinéticas finales a escala de matraz encontrando una correlación positiva entre viabilidad y actividad enzimática ($p < 0.05$) demostrando que los sustratos fueron utilizados como fuente de carbono y actuaron como inductores de la actividad enzimática que posiblemente se comportó como un metabolito asociado a crecimiento alcanzando valores de 0.156 U l^{-1} a los 26 día de crecimiento. Finalmente la cepa aislada de *Streptomyces sp* fue capaz de degradar residuos de camarón al 1% p/v presentes en una suspensión acuosa de pH 9.2 estabilizada con NaCl al 1 % p/v bajo unas condiciones nutricionales mínimas.

Palabras clave: *Streptomyces sp*, residuos de camarón, quitina coloidal, actividad quitinasa.

Abstract

Nine strains were isolated from a shrimp waste in Cartagena Colombia. Different morphological groups were identifying: Gram-positive coccus, Gram-positive bacillus and actinomycetes. The strain 9A identified as *Streptomyces sp* was the best strain reaching significantly quantities ($p < 0.05$) of sugars reducers associated with chitinolytic activity (0.035 U l^{-1}) in a medium with colloidal chitin to alkaline pH (9.2) and high concentrations of NaCl (6% p/v). This microorganism could be alkalophilic and moderately halophilic bacteria. By means of an experimental design 2^2 were demonstrated that the interaction of the two chitin types (colloidal chitin and waste shrimp) in their higher concentrations increased significantly ($p < 0.05$) the enzymatic activity 0.120 U l^{-1} after 16 days of evaluation. Using the modified medium was carried out the final kinetics to Erlenmeyer flasks scale finding a positive correlation between cellular viability and enzymatic activity ($p < 0.05$), demonstrating that these substrates were used as carbon source and they acted as inducer of the enzymatic activity 0.156 U l^{-1} after 26 day of growth. Finally *Streptomyces sp* was able to degrade waste shrimp to 1% p/v in a water suspension at pH 9.2 stabilized with NaCl to 1% p/v under minimum nutritional conditions after 8 days the treatment.

Keywords: *Streptomyces sp*, waste shrimp, Colloidal chitin, Chitinase activity.

* Autor para la correspondencia: E-mail: apedroza@javeriana.edu.co; aurapedroza@yahoo.com

1. Introducción

La quitina es un polímero de N-acetilglucosamina (β 1.4- acetamida-D-glucosa), la cual está presente en los exoesqueletos de insectos, caparazones de crustáceos y en la pared celular de los hongos. La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Richard y col., 2006). Varios derivados de la misma han recibido especial atención debido a su amplio rango de aplicaciones. Recientemente se demostró que oligómeros de quitina y el quitosano (quitina con baja acetilación) tienen actividades antitumorales, inmunoregulatorias, antibacterianas y antifúngicas (Shang y col., 2004). Desde el punto de vista ambiental el polímero se ha utilizado para remover un amplio intervalo de compuestos tóxicos como metales pesados y colorantes (Blackburn, 2004; Dao y col., 2004). La pesca comercial de crustáceos y su proceso subsiguiente, generan grandes cantidades de residuos sólidos que se convierten en un problema ambiental si no se tratan adecuadamente (Gildberg y Stenberg, 2001).

Estos residuos pueden ser tratados ó purificados por métodos químicos ó biológicos, de tal manera que se conviertan en una fuente de bajo costo para la producción de derivados de quitina, enzimas ó alimentos ricos en carbohidratos asimilables para las mismas industrias camaroneras (Richard y col., 2006). Para lograr este aprovechamiento biotecnológico es muy importante desarrollar procesos que lleven a cabo la hidrólisis enzimática del polímero. El proceso biológico se logra mediante la acción de quitinasas (EC 3.2.1.14) enzimas extracelulares que hidrolizan el enlace glucosídico β 1-4. Estas enzimas son capaces de hidrolizar el polímero en oligómeros y monómeros de N-acetil-glucosamina (GlcNAC). La literatura reporta la producción de quitinasas a partir de *Bacillus lichiniformis*, *Nocardia orientalis*, *Serratia* sp, *Talaromyces emersonii*, *Streptomyces cinereoruber*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* y *Aeromonas* sp (Guo y col., 2004; Kesuka y col., 2006). Sin embargo la producción de quitinasas por parte de Actinomycetes alcalófilos-halotolerantes, no ha sido muy reportada. Los microorganismos y las enzimas producidas por extremófilos tienen muchas ventajas con respecto a sus homólogas no extremófilas ya que pueden ser catalíticas bajo condiciones ambientales extremas, situación que es frecuente en algunos procesos industriales (Podar y col., 2006). Entre los extremófilos, la mayoría de estudios sobre enzimas alcalinas se han concentrado en los microorganismos halófilos ó alcalófilos, sin embargo las bacterias haloalcalófilas han sido menos exploradas. Este grupo requiere altas concentraciones de sales y pH alcalino para crecer y secretar sus enzimas (Patel y col., 2005). Recientemente una bacteria alcalófila-halotolerante perteneciente a los cocos Gram

positivos (*Salinococcus alkaliphiles* sp.) fue reportada, crece en intervalos de 0-25 % p/v de NaCl y valores de pH de 6.5 -11.5 con unos valores óptimos de 10% NaCl y pH 9.0. (Zhang y col., 2002). La mayoría de los estudios sobre bacterias haloalcalófilas se han centrado en la caracterización filogenética de los mismos; solamente unos pocos reportes trabajan en la evaluación de las condiciones de crecimiento y potencial enzimático. Por esta razón es de interés desarrollar trabajos enfocados a optimizar las condiciones de crecimiento y producción de diferentes tipos de enzimas. (Patel y col., 2005). En especial para ciertos grupos microbianos que no son citados frecuentemente como las bacterias filamentosas halófilas-alcalófilas.

En el presente artículo se reporta el aislamiento de un *Streptomyces* sp. alcalófilo-halotolerante a partir de residuos de camarón y su capacidad para producir quitinasas extracelulares empleando sustratos comerciales como la quitina coloidal y subproductos industriales como los residuos de camarón.

2. Materiales y métodos.

2.1 Aislamiento de microorganismos quitinolíticos

El muestreo se realizó en una industria camaronera localizada el Cartagena Colombia. Tomando varias muestras de 500 g de residuos de camarón a partir de una pila en proceso de degradación. El transporte y preservación se realizó a 4° C. Las muestras aleatorias fueron tomadas de la parte alta de la pila en sus secciones anterior, media y posterior (ZA, ZB, ZC). Las zonas identificadas como ZD y ZE corresponden a la parte media de la pila sección anterior y media. El pH inicial de los residuos fue 9.2 valor que se tomó como base para ajustar el pH de los medios de cultivo. El aislamiento primario se realizó triturando los residuos en molino eléctrico hasta obtener un tamaño de partícula de 5 (+/- 2) mm, posteriormente se realizó la técnica de dilución decimal y recuento en placa sobre agar extracto de camarón-quitina coloidal Sigma (MQE) reportado por Sakai y col., (1998), cuya composición en g l⁻¹ fue: 0.5% p/v de quitina, 0.7% p/v (NH₄)₂SO₄, 0.1% p/v K₂HPO₄, 6% p/v de NaCl, 0.01% p/v MgSO₄. 7H₂O, 0.05% p/v de extracto de levadura y 1% v/v de extracto de camarón pH 9.2. Las cajas se incubaron a 30° C por cinco días.

Las colonias que presumiblemente presentaron actividad quitinolítica fueron purificadas por pases sucesivos en agar quitina coloidal (MQ): 0.5% p/v de quitina coloidal, 0.7% p/v (NH₄)₂SO₄, 0.1% p/v K₂HPO₄, 1% p/v NaCl, 0.01% p/v MgSO₄. 7H₂O, 0.05% p/v extracto de levadura y 1.5% p/v agar, incubando las cajas a 30° C por 4 días. Los microorganismos recuperados fueron clasificados de acuerdo con las características microscópicas

observadas mediante coloración de Gram y preservados a -70°C en glicerol al 60% v/v siguiendo la metodología descrita por (Meza y col., 2004).

2.1.1. Identificación bioquímica de la cepa con mayor actividad quitinolítica

Para la identificación se realizaron estudios macroscópicos, microscópicos de las colonias y pruebas bioquímicas. Los estudios macroscópicos consistieron en evaluar el tipo de micelio aéreo, tipo de micelio vegetativo, color de micelio vegetativo y del micelio aéreo, producción de pigmentos difusibles en el medio de cultivo y consistencia de las colonias. En la Tabla 1 se observan las pruebas bioquímicas realizadas (Cross, 1989; Martínez-Salgado, 2003).

2.2 Selección de la cepa con mayor actividad quitinolítica.

2.2.1. Preparación del inóculo

Cada una de las cepas se sembró de forma masiva en agar quitina coloidal por 15 días a 30°C (Sakai y col., 1998; Felse y Panda, 2000). A partir de éstas cajas se realizaron suspensiones en solución salina 0.85% p/v, con una concentración de 9×10^8 células ml^{-1} . Según el tubo número tres del nefelómetro de Mc. Farland.

2.2.2. Estudios de cinéticas en matraces

Cada cepa se cultivó en matraces de 250 ml utilizando 45 ml de medio líquido quitina coloidal pH 9.2 y 5 ml de inóculo durante 16 días realizando muestreos cada dos días para determinar la actividad quitinolítica, la cual fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de N-acetilglucosamina por minuto por litro bajo las condiciones del ensayo. Se empleó la técnica de oxido reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en la cual la N-acetilglucosamina (g l^{-1}) era el patrón (Miller, 1959; Howard y Hutcheson, 2003). Las condiciones de operación se mantuvieron constantes a razón de 30°C y 150 rpm. La mejor cepa se seleccionó teniendo en cuenta la mayor actividad enzimática en función del tiempo de fermentación. Para esta prueba cada muestra se centrifugó por 15 minutos a 5000 rpm y en el extracto crudo se midió el pH, y actividad enzimática. Los resultados presentados en los gráficos corresponden al promedio de dos repeticiones con una desviación estándar menor al 20%.

2.3. Diseño factorial 2^2

Para evaluar el efecto del tipo de quitina sobre la actividad enzimática se llevó a cabo un diseño experimental 2^2 . Las pruebas se realizaron en

matraces de 250 ml que contenían 45 ml de cada medio y de una suspensión de 9×10^8 conidios ml^{-1} . Los Erlenmeyer se mantuvieron en agitación constante de 150 rpm por 16 días a 30°C . El diseño incluía 4 tratamientos con tres repeticiones para un total de 12 matraces. Los factores estudiados fueron quitina coloidal como sustrato comercial y residuos de camarón como residuo industrial. Como variable de respuesta se seleccionó la actividad quitinolítica en U l^{-1} . En la Tabla 2 se observa la matriz generada para cada factor y su respectivo nivel (Montgomery, 2000). El análisis de datos se realizó usando los programas SAS 9.0 (2002) y Desing Expert 6.0. Los resultados fueron tratados con un modelo empírico el cual relaciona la respuesta cuantificada con los factores evaluados y sus niveles. Para un diseño de dos factores el modelo es:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

Donde y , corresponde a la actividad enzimática; b_0 es el intercepto, b_1 , b_2 , son los coeficientes lineales y X_1 X_2 son los factores ó variables independientes.

2.4. Cinéticas en el sustrato definido por el diseño factorial 2^2

Se realizaron cinéticas de crecimiento en matras empleando el medio de cultivo compuesto por quitina coloidal al 1.5% p/v y extracto de camarón al 1% v/v, pH 9.2. El proceso se evaluó por 30 días realizando muestreos cada dos días, para cuantificar azúcares reductores, actividad enzimática, pH y viabilidad celular. Esta ultima se realizo por medio de la técnica dilución decimal y siembra de 0.1 ml en superficie en medio quitina coloidal y extracto de camarón agarizado con 2% p/v de agar, pH 9.2 y se expreso como logaritmo en base 10 de unidades formadoras de colonia. Los datos que se presentan en las gráficas corresponden al promedio de los duplicados. La inoculación y condiciones de operación se realizaron de la misma manera que en la sección 2.

2.5. Degradación in vitro de residuos de camarón.

La capacidad de degradación de la cepa seleccionada empleando residuos de exoesqueletos de camarón se evaluó empleando un medio líquido compuestos por 1% p/v de residuos triturados y 1% p/v NaCl a pH 9.2. Cada matraz se inoculó con una suspensión de 9×10^8 células ml^{-1} . La prueba se llevo a cabo durante 36 días a 30°C en agitación continua de 150 rpm. Los parámetros evaluados fueron actividad enzimática, recuento de células viables y pH.

3. Resultados y discusión

3.1 Aislamiento

El empleo de medios a base de quitina coloidal como método de selección ha sido reportado por autores como Shang y col., (2004), los cuales recuperaron a partir de suelos una cepa de *Aeromonas schubertii* utilizando 0.2% p/v de quitina coloidal. En nuestro estudio se empleó una estrategia similar a la de estos autores sin embargo el medio utilizado generó por si mismo un ambiente más selectivo básicamente por tres factores, la fuente de carbono (quitina coloidal y extracto de camarón), pH (9.2) y 6% p/v de NaCl. La combinación de los tres determinó que solamente se recuperaran ciertos grupos morfológicos con capacidad para producir quitinasas extracelulares bajo unas condiciones de alcalinidad y osmolaridad moderadamente altas. (Fig. 1). Al analizar los resultados obtenidos, la recuperación varió con respecto a la zona de muestreo, de tal manera que el grupo morfológico predominante fue cocos Gram positivos con porcentajes de recuperación de 33% ZA, 33% ZB, 60% ZC, 52% ZD y 54% ZE. A continuación la mayor prevaencia se dio para los bacilos Gram positivos (22%, 34%, 20%, 12%, 0%) y coco bacilos Gram negativos con 11% en todas las zonas de muestreo. La recuperación de cocos Gram positivos y cocobacilos Gram negativos en todas las zonas de muestreo puede asociarse a ciertos géneros como *Marinococcus* sp, *Micrococcus* sp, *Staphylococcus* sp, *Vibrio* sp, *Escherichia coli* y *Salmonella* sp. Que pueden ser patógenos para camarón y se han recuperado a partir de estos residuos sólidos (Figuroa, 2000). Por el contrario las bacterias filamentosas solamente fueron aisladas en un 20% en la zona C. La posible razón pudo estar asociada con el grado de colonización del residuo en esta zona por colonias blancas pulverulentas y secas características de actinomicetos que estaban ausentes en las demás zonas de muestreo. Para limitar aun más las poblaciones a los potenciales productores de enzimas se realizaron subcultivos en un medio que solamente tenía quitina coloidal. En este agar solamente crecieron 9 cepas, de los grupos morfológicos bacilos Gram positivos, cocos Gram positivos y actinomicetos las demás pudieron perder su capacidad de crecimiento posiblemente por el déficit en algún micro elemento ó aminoácido esencial que no fue aportado por la quitina coloidal y se encontraba en los residuos de camarón. Es factible que esto sucediera por que para la obtención del extracto de residuos de camarón se llevaron a cabo dos ciclos de tratamiento térmico de 120°C por 30 minutos cada uno para precipitar mayor cantidad de proteínas y dejar concentrado el material rico en quitina, determinando la posible pérdida de ciertos componentes. Los resultados presentados concuerdan con el estudio realizado por Figuroa y col. (2000),

quienes caracterizaron la flora bacteriana presente en camarón y recuperaron los mismos grupos; sin embargo estos autores determinaron que algunos de ellos pueden causar enfermedades al camarón por lo tanto se deben seleccionar solamente aquellos que no sean patógenos si se piensa en la producción de alimentos para las industrias pesqueras obtenidos a partir de estos residuos.

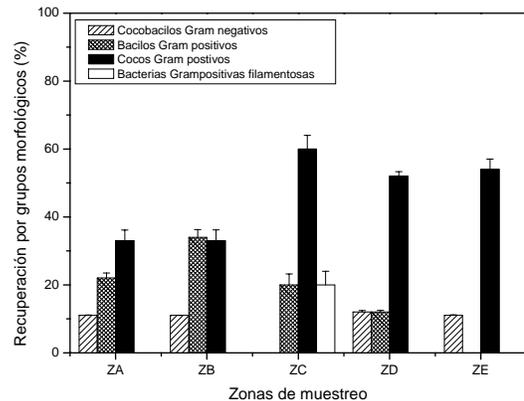


Fig. 1. Recuperación porcentual por grupos morfológicos en las diferentes zonas de muestreo. Zona alta anterior de la pila (ZA), zona alta media de la pila (ZB), zona alta posterior (ZC), zona media anterior (ZD) y zona media media (ZE).

De acuerdo con la literatura los microorganismos que se recuperan a partir de residuos marinos, pueden tener características fisiológicas especiales gracias a las cuales algunos de ellos podrían ser clasificados como alcalófilos/moderadamente halófilos. Básicamente porque requieren un pH alcalino (pHs 6.5-9.0, óptimo 9.0) y elevadas concentraciones de sales para crecer (0-25% p/v) (Patel y col., 2005). Los mecanismos fisiológicos que pueden estar implicados son: La regulación citoplasmática al pH asociada con la pared celular, por la presencia de polímeros ácidos (ácido galacturónico, ácido glucónico, ácidos glutámico, ácido aspártico y ácido fosfórico), cargados negativamente que disminuyen los valores de pH en la superficie, dándole a la pared la habilidad para absorber iones hidrógeno y sodio. De esta manera generan un rechazo de los iones hidroxilo y como consecuencia pueden asistir a las células en el crecimiento en ambientes alcalinos (Galinski y Truper, 1994). Por otro lado la membrana celular mantiene la homeostasis con respecto al pH usando el sistema antiporte de Na^+/K^+ y el sistema ATPasa para expulsión de H^+ (Horikashi, 1999; Bertus, 2003). Con respecto a la osmoadaptación y osmoregulación los microorganismos halófilos ó halotolerantes han desarrollado dos mecanismos. La acumulación de grandes cantidades de KCl y solutos orgánicos compatibles, para nivelar la elevada fuerza iónica externa y la baja actividad de agua (Mata, 2006). Las cepas recuperadas posiblemente tenían esta

capacidad ya que el crecimiento fue abundante en los medios selectivos utilizados en este estudio.

3.2 Selección de la cepa con mayor actividad quitinolítica en fermentación líquida usando quitina grado químico

Los tres grupos (cocos, bacilos y actinomicetes) han sido reportados en la literatura como microorganismos quitinolíticos (Watanabe y col., 1990; Imanaka y col., 2001; Shang y col., 2004) sin embargo su capacidad enzimática puede variar. De acuerdo con los resultados de la cinética en matraz se encontró que la cepa 9A identificada como *Streptomyces* sp genero la mayor liberación de azúcares reductores (0.181 g l^{-1}) con actividad quitinolítica significativamente mayor (0.035 U l^{-1}) ($p < 0.05$) que los cocos y bacilos a los 16 días de evaluación (Fig. 3), determinando que este microorganismo fuera seleccionado como la mejor cepa para continuar con el estudio. Adicionalmente se observó en la Fig. 3 que este tiempo fue insuficiente para establecer el potencial quitinolítico de la cepa, por que en la curva de 16 días no se observo una clara disminución de los azúcares reductores lo que permite suponer que el incremento podía continuar dada la complejidad del sustrato; por esta razón fue necesario incrementar el período de evaluación a 40 días. Por otro lado algunos géneros pertenecientes al grupo de los cocos y los bacilos pueden ser patógenos para camarón razón que también se considero para eliminar los dos grupos morfológicos. La literatura reporta a *Nocardia orientales* y *Streptomyces cinereoruber* como actinomicetes quitinolíticos, aislados a partir de ecosistemas con pH neutros y baja concentración de sales lo que los clasifica como microorganismos no extremófilos. (Mahadevan y col., 1997; Trejo-Estrada y col., 1998; Felse y Panda., 2000). La mayoría de los actinomicetes son quitinolíticos tal como lo publicó Schrempf (2001), sin embargo nuestros resultados son interesantes por que la cepa aislada creció a pH de 9.2 y concentración de sales 6% p/v para el aislamiento primario y 1% p/v para las cinéticas de actividad y degradación de residuos de camarón demostrando que puede ser un microorganismos alcalófilo/halotolerante no reportado hasta el momento por la literatura. Las características de crecimiento de esta cepa concuerdan con Bertus, (2003) quien define que un microorganismo alcalófilo/halofilo es aquel que crece a pH mayores de 9.0, con una concentración de sales entre 2-5 M.

3.3 Identificación de la cepa de actinomicete

La identificación de la cepa actinomicete se realizó mediante la observación de sus características macroscópicas en agar quitina coloidal y extracto de camarón, presentando micelio aéreo extensivo y

esporulado inicialmente blanco, convirtiéndose al madurar a un color rosa-café, con colonias pequeñas irregulares y firmes de aspecto pulverulento, reverso de la colonia café, y pigmento difusible en el medio de color amarillo-café. Microscópicamente se caracterizo por presentar reacción positiva en la coloración de Gram, presentar micelio aéreo con filamentos en espiral abiertos y conidios ovoides (Fig. 2). Además se presentó el característico olor terroso de los suelos, el cual se debe a la producción geosminas (trans1,10-dimetil-trans-9-decalol) compuestos sesquiterpenoides, anillados no saturados de carbono, oxígeno e hidrogeno. (Martínez-Salgado, M, 2003; Serrano y col., 2003). Las características morfológicas y permitieron presuntamente identificar la cepa 9A perteneciente al género *Streptomyces* sp, lo que se confirmo por medio de pruebas bioquímicas (Tabla 1).

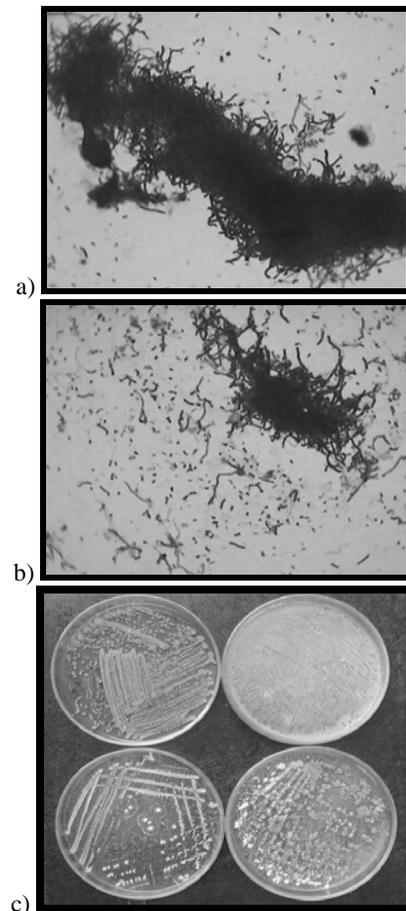


Fig. 2. Características microscópicas y macroscópicas de la cepa seleccionada. *Streptomyces* sp. Coloración de Gram aumento de 100 x (A, B) y Crecimiento en agar quitina coloidal (C).

3.4. Efecto del tipo de quitina sobre la producción de quitinasas

La actividad quitinolítica puede ser inducida utilizando sustratos químicamente definidos como la quitina coloidal de Sigma ó empleando residuos industriales más complejos como el extracto de camarón. De acuerdo con el análisis de varianza (Tablas 2-3) se observó que los niveles altos de quitina coloidal (1.5% p/v) y los niveles altos de extracto de residuo de camarón (1% v/v) tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la actividad enzimática a los 16 días de evaluación alcanzando 0.140 U l^{-1} , con respecto a los otros tratamientos. En la Fig. 4 se puede observar la mayor curvatura de la superficie en la interacción de los niveles altos de cada factor. Los dos tipos de sustrato pudieron ser utilizados como fuente de carbono como lo reportan Cottrell y col., (1999) y Kezucal y col., (2006) de tal manera que la inducción por sustrato fue comprobada ya que la concentración de azúcares reductores al inicio del experimento fue de 0.020 g l^{-1} incrementando en el día 16 tres veces más para el tratamiento 4 que con respecto a la concentración inicial (0.717 g l^{-1}).

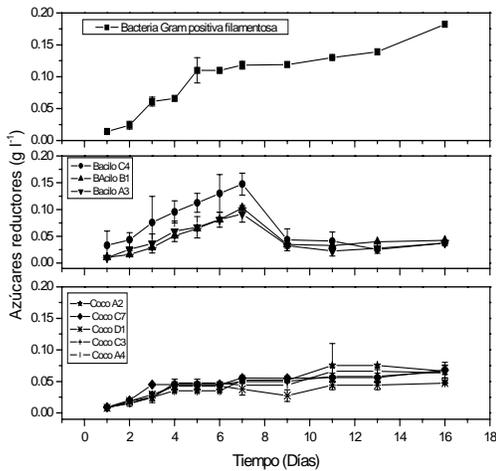


Fig. 3. Selección de la cepa con mayor actividad quitinolítica en medio quitina coloidal. 16 días, 30° C, pH 9.2, NaCl 6 % p/v, 150 rpm.

Tabla 2. Efecto del tipo de sustrato sobre la actividad quitinolítica evaluado por medio de un diseño factorial 2^2 .

Tratamientos	Factor X_1 Variable codificada	Factor X_2 Variable codificada	Valor observado Actividad quitinolítica U l^{-1}	Valor predicho Actividad quitinolítica U l^{-1}
1	1	0	0.045	0.042
2	1	0	0.040	0.042
3	1.5	0	0.076	0.067
4	1.5	0	0.059	0.067
5	1	1	0.056	0.050
6	1	1	0.045	0.050
7	1.5	1	0.16	0.16
8	1.5	1	0.16	0.16

(X_1) QC: Quitina coloidal Sigma % (p/v), (X_2) EC: Extracto de residuos de camarón % (v/v).

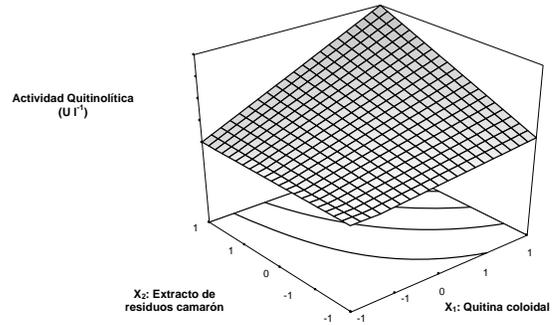


Fig. 4. Superficie de respuesta para la interacción de los factores, quitina coloidal (X_1) y extracto de camarón (X_2).

Tabla 1. Pruebas de identificación bioquímica para la cepa 9A.

Pruebas Bioquímicas	Resultado
Galactosa	+
Glucosa	+
N-acetilglucosamina	+
Fructuosa	+
Sacarosa	-
Arabinosa	-
Rafinosa	-
Xilosa	-
Manitol	-
Celobiosia	-
Maltotriosa	+
Catalasa	+
Nitratos	+
Glicerol	-
Esculina	+
Urea	+
Triptofano	+
Fenilalanina	+
Lisozima	+
Xantina	ND
Hipoxantina	ND

Positivo: (+), Negativo (-), No determinado (ND).

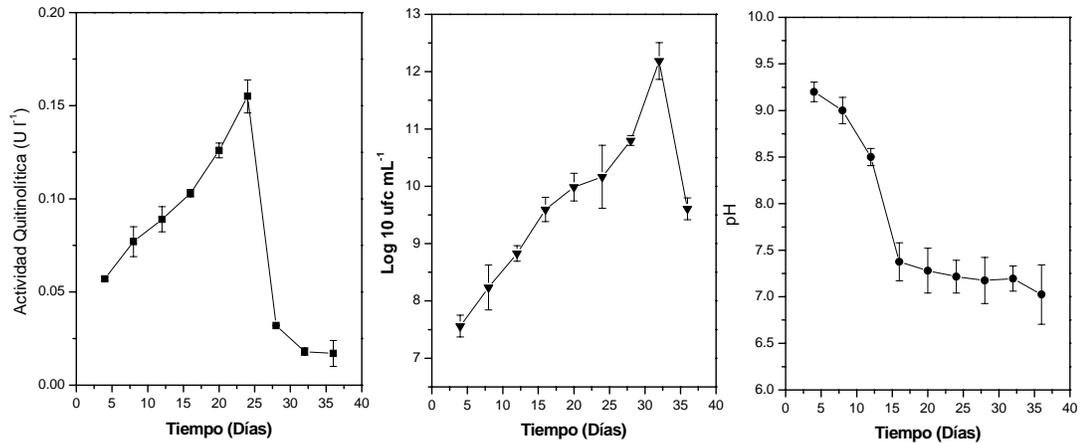


Fig. 5. Cinéticas en sustrato definido. Quitina coloidal (1.5 % p/v) y extracto de camarón (1% v/v), 30 días, pH 9.2, NaCl 6% p/v, 30° C, 150 rpm.

Un resultado similar fue publicado por Shang y col., (2004) quienes demostraron que la presencia de quitina coloidal 0.2% p/v actuó como inductor de la actividad quitinolítica extracelular en un cepa de *Aeromonas schubertii* alcanzando 0.16 U ml⁻¹ al cuarto día de crecimiento con respecto al control en el cual la actividad fue de 0.04 U ml⁻¹. Adicionalmente el extracto de camarón pudo aportar microelementos ó cofactores esenciales propios de hábitat natural de la cepa, que no fueron suministrados por el sustrato químicamente definido. (Sahai y Manocha, 1993; Matsumoto y col., 2004). Aunque la actividad quitinolítica extracelular inducible fue probada, el mecanismo de inducción y mejoramiento de las condiciones de producción necesitan ser evaluadas y optimizadas en futuros estudios.

Tabla 3. Parámetros estimados durante el análisis de varianza, incluyendo interacciones entre variables X₁ (Quitina coloidal Sigma) y X₂ (Extracto de camarón).

Variable	Coficiente	Valor de P>(F)
Intercepto	0.080	0.0002
X ₁ (Quitina Coloidal)	0.034	0.0002
X ₂ (Extracto de camarón)	0.025	0.0006
X ₂ X ₂	0.022	0.011

R² = 0.988, C.V. = 9%

3.5 Cinéticas en medio líquido a escala de matraz.

Una vez se seleccionaron las condiciones nutricionales se llevó a cabo las cinéticas completas que evaluaron viabilidad, actividad quitinolítica y pH en función del tiempo. Encontrando que la cepa de *Streptomyces sp.* tuvo un periodo de adaptación que se prolongó hasta el quinto día con niveles de expresión mínimos que pueden estar asociados a niveles constitutivos ó la cepa posiblemente primero

utilizó el extracto de levadura como fuente de carbono y posteriormente continuo con la quitina determinando que la biomasa y actividad enzimática fueran incrementado progresivamente de tal manera que se presentó una correlación positiva ($p < 0.05$) entre los dos parámetros hasta el día 25 en el cual se alcanzaron valores máximos de 1.23 g l⁻¹ de azúcares reductores librados, con una actividad quitinolítica de 0.154 U l⁻¹ y 10.5 unidades logarítmicas. El recuento de viables continuo aumentando hasta el día 34 (12 unidades logarítmica) posiblemente por la presencia de compuestos de menor peso molecular, posteriormente la viabilidad disminuyó drásticamente hasta 8 unidades logarítmicas entrando en fase de muerte (Fig. 5). La ruta metabólica que pudo llevar a cabo *Streptomyces sp* para degradar la quitina en primer lugar hace referencia a la degradación extracelular mediada por quitinasas para formar oligosacáridos que pueden entrar en el espacio periplásmico. Posteriormente estos oligosacáridos son degradados en residuos de *N*-acetilglucosamina (GlcNac), que son llevados al citoplasma mediante la vía del fosfoenol-piruvato utilizando el sistema GlcNac fosfotransferasa. A partir de aquí, la GlcNac-6P sufre una conversión en dos pasos, en el primero pierde su grupo acetil y en el segundo se libera amonio, para obtener Fructosa-6P, la cual puede entrar a glucólisis, continuar con ciclo de Krebs y finalizar con la cadena respiratoria. Siguiendo las rutas bioquímicas para la producción de carbono y energía de los microorganismos aeróbicos (Yu y col., 1991; Warren, 1996). Por esta razón se genera un descenso en el pH hasta 7.75 al final de la fermentación, esta acidificación está asociada a la formación de ácidos orgánicos, ya que se consideran parte de los metabolitos producidos durante la glucólisis.

La capacidad de la cepa para llevar a cabo la hidrólisis de quitina y crecer bajo unas condiciones ambientales extremas, puede estar asociado a dos mecanismos fisiológicos ampliamente presentados en la literatura. El primero de ellos hace referencia a

la supervivencia en hábitat hipersalinos que es mediado por la habilidad para mantener un balance osmótico. Estos microorganismos acumulan sales como cloruro de sodio y potasio hasta unas concentraciones que son isotónicas con respecto al medio ambiente, como resultado de esto las proteínas de los halófilos ó halotolerantes se han adaptado a presiones ambientales altas adquiriendo sobre su superficie una gran cantidad de residuos de aminoácidos cargados negativamente para evitar la precipitación (Bertus, 2003). El segundo mecanismo hace referencia a su capacidad para tolerar pH extremos (>9.0), estos microorganismos pueden mantener neutro el pH interno por lo tanto las enzimas intracelulares no necesitan adaptarse a condiciones extremas de crecimiento. Sin embargo esto no sucede con las proteínas extracelulares las cuales son funcionales bajo las condiciones extremas del hábitat que rodea a los microorganismos. Podar y Reysenbach (2006) reportan que la cepa haloalcalófila de *Natrosomonas pharaonis* ha desarrollado diferentes adaptaciones para establecerse en estos ambientes que incluyen modificaciones en las proteínas para incrementar la fracción de aminoácidos ácidos y reducir la hidrofobicidad de proteínas. Por otro lado estas células recubren la membrana celular con más glicoproteínas y secretan enzimas entrelazadas con lípidos.

3.6. Degradación de los residuos de camarón por acción de la cepa seleccionada

Las muestras obtenidas a partir de los residuos del crustáceo pudieron ser degradadas usando a *Streptomyces* sp por medio de un ensayo *in vitro*. Los resultados se observan en la Fig. 6. La concentración de azúcares reductores liberados fue de 0.295 g l^{-1} con una actividad de 0.057 U l^{-1} en el día 8. La hidrólisis se llevo a cabo bajo unas condiciones nutricionales mínimas por lo que la actividad enzimática fue menor de la misma manera que la viabilidad. Con base en estos resultados se puede suponer que los residuos producidos por la empresa camaronesa podrían ser tratados con un inoculante a base de *Streptomyces* sp. Sin necesidad de hacer un ajuste previo del pH solamente se haría un incremento en la concentración de nitrógeno para generar un balance de C/N adecuado para que inicie y se acelere el proceso de degradación. La suplementación podría llevarse a cabo utilizando otros tipos de residuo rico en nitrógeno como la soya, plátano, harina de pescado, entre otros que sean de fácil adquisición en la zona y bajo costo para darle al proceso mayor factibilidad económica. Por otro lado se observó macroscópicamente que los residuos de camarón fueron cambiando de aspecto en función del tiempo volviéndose más pequeños y oscuros. También se observó un incremento en la solubilidad de los mismos (datos no mostrados).

Estos cambios se dieron posiblemente porque la solubilidad de la quitina incrementa por la deacetilación parcial bajo condiciones suaves que no degradan completamente el polímero pero favorecen la pérdida de la estructura cristalina que es una consecuencia de la reducción de los puentes de hidrógeno causada por la eliminación de grupos acetilo (Jeraj y col., 2006; Richard y col., 2006).

Hay un interés creciente en los derivados obtenidos de la hidrólisis de la quitina como quitoligómeros, N-acetilglucosamina y glucosamina como precursores para elaboración de productos con aplicación en medicina y biorremediación (Warren, 1996; Coutiño y col., 2006). Por esta razón es necesario continuar con los estudios de aislamiento, selección y producción de cepas nativas productoras de enzimas que tengan propiedades catalíticas de alta eficiencia bajo condiciones ambientales variables para que puedan ser usadas en diferentes procesos biotecnológicos de interés industrial, agrícola y ambiental (Felse y Panda, 1999).

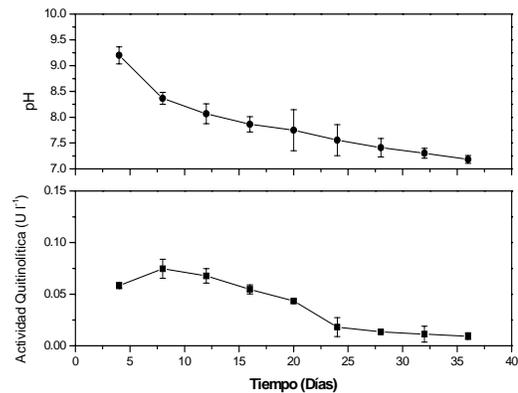


Fig. 6. Degradación de residuos de camarón bajo condiciones nutricionales mínimas. Residuos de camarón al 1% p/v, NaCl 1% p/v, pH 9.2, 30 días, 30° C, 150 rpm.

Conclusiones

A partir de residuos de camarón se aisló una cepa alcalófila/halotolerante de *Streptomyces* sp, la cual produjo cantidades significativas de enzimas quitinolíticas extracelulares, por la presencia de sustratos inductores como la quitina coloidal al 1.5% p/v y el extracto de residuos de camarón al 1% v/v a pH 9.2 que fueron utilizados como fuente de carbono determinando el incremento de la población en función del tiempo. Las células de *Streptomyces* sp. y sus enzimas fueron capaces de degradar conchas de camarón como única fuente de carbono presentes en un medio mínimo a los 8 días de evaluación produciendo un incremento en la actividad enzimática y un cambio en la consistencia, color y solubilidad de los residuos. Sin embargo los niveles de expresión enzimática y el tiempo de producción podrían mejorarse trabajando específicamente en la

optimización de ciertas condiciones ambientales y nutricionales. Lo que le daría al metabolito mayor interés comercial por que podría ser utilizado bajo varias condiciones ambientales.

Agradecimientos

Este proyecto identificado con el código número (1595) fue financiado por oficina de fomento a la investigación. Vicerrectoría Académica. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.

Johana Bocanegra. Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Daniel Castro. Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Referencias

- Bertus, V. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology* 6, 213–218.
- Blackburn, R.S. (2004). Natural polysaccharides and their interactions with dye molecules: applications in effluent treatment. *Environmental Science Technology* 38, 4905–9.
- Cottrell, M.T., Moore, J.A., Kirchman, D.L. (1999). Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Applied Environmental Microbiology* 65, 2553–2557.
- Coutiño, L., Marín, M., Huerta, S., Revah, S., Shirai, K. (2006). Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry* 41, 1106–1110.
- Dao, Z., Zhang, L.N., Zhou, J.P., Guo, S.L. (2004). Development of a fixed-bed column with cellulose/chitin beads to remove heavy-metal ions. *Journal Applied Polymer Science* 94, 684–91.
- Felse, P. A., Panda, T. (2000). Production of microbial chitinases – A revisit. *Bioprocess Engineering* 23, 127-134.
- Felse, P. A., Panda, T. (1999). Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering* 20, 505-512.
- Figuroa, F. S. (2000). Identificación de géneros bacterianos en camarón. *Panorama Acuicola* 48 – 51.
- Galinski y Truper. (1994). Microbial behavior in salt stresses ecosystems. *FEMS Microbiology Review* 15, 95-108.
- Gildberg, A., Stenberg, EA. (2001). A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry* 36, 809–12.
- Guo, Sh., Chen, J., Lee, W. (2004). Purification and characterization of extracellular chitinase from *Aeromonas schubertii*. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 550–556.
- Horikashi, K. (1999). Alkalophiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology And Molecular Reviews* 63, 4, 735-750.
- Howard, B. M., Hutcheson, S. (2003). Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* 30, 627 – 635.
- Imanaka, T., Fukui, T., Fujiwara, S. (2001). Chitinase from *Thermococcus kokakaraensis* KOD1. *Methods Enzymology* 330, 319–29.
- Jeraj, N., Kunic, B., Lenasi, H., Breskvar, Katja. (2006). Purification and molecular characterization of chitin deacetylase from *Rhizopus nigricans*. *Enzyme and Microbial Technology* 34, 25-32.
- Kezuka, Y., Ohishi, M., Itoh, Y., Watanabe, J., Mitsutomi, M., Watanabe, T. and Nonaka, T. (2006). Structural Studies of a Two-domain Chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037 *Journal Molecular Biology* 358, 472–484.
- Mahadevan, B., Crawford, D.L. (1997). Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme and Microbial Technology* 20, 489-493.
- Martínez-Salgado, M. (2003). Evaluación de cepas antagonicas de *Actinomyces* y *Trichoderma* spp. Aislados a partir de suelos de cultivos de arroz (*Oryza sativa*) para el control de *Rhizoctonia solana*. *Mundo Microbiológico* 2, 9 – 14.
- Mata, J. (2006). Caracterización de exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Ideomonas, Palleromonas y Salipinger. Tesis de Doctorado. Universidad de Grabana. España. Pg 3-5.
- Matsumoto, Y., Saucedo-Castañeda, G., Revah, S., Shirai, K. (2004). Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Lecanicillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry* 39, 665–71.
- Meza, R. A., Monroy, A. F., Mercado, M., Poutou, R. A., Rodríguez, P., Pedroza, A. M. (2004). Study of the Stability in Real Time of Cryopreserved Strain Banks. *Universitas Scientiarum* 9, 235-42.
- Miller, G. (1958). Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical chemistry* 35, 426-428.
- Montgomery, D.C. (2003) Diseño y análisis de experimentos. Editorial Limusa. Segunda edición. Pg. 218- 276.
- Patel, R., Dodia, M., Satya P. Singh, B. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp: Production and optimization. *Process Biochemistry* 40, 3569–3575.

- Podar, M., Reysenbach, A.L. (2006). New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 1–6.
- Richard, J.L. Meanwell, P., Shama, G. (2006). Chitin in a dual role as substrate for *Streptomyces griseus* and as adsorbent for streptomycin produced during fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 657–664.
- Sahai, A.S., Manocha, M.S. (1993). Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host–parasite interaction. *FEMS Microbiology Review* 11, 317–38.
- Sakai, K., Yokota, A., Kurokawa, H., Wakayama, M. y Moriguchi, M. (1998). Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *Applied Environmental Microbiology* 64, 3397-3402.
- Schrempf, H. (2001). Recognition and degradation of chitin by *Streptomyces*, Antonie Van Leeuwenhoek. *International Journal Genetic Molecular Microbiology* 79, 285–9.
- Serrano, JA., Sandoval, AH., Ramirez, N., Ventosa, A. (2003). Método simplificado para el estudio morfológico por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido de Actinomicetos halófilos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 23, 1-9.
- Shang-Hsin, G., Jeen-Kuan, C., Wen-Chien, L. (2004). Purification and characterization of extracellular chitinase from *Aeromonas schubertii* Taiwan. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 550–556.
- Trejo-Estrada, SR., Paszczynski, A., Crawford, D.L. (1998). Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* 21, 81– 87.
- Warren, R. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annals Review Microbiology* 50, 183-212.
- Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., Tanaka, H. (1990). Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *Journal Bacteriology* 172, 4017–22.
- Yu, C, A., M. Lee., B. L. Bassier and S. Roseman. (1991). Chitin utilization by marine bacteria. *Journal Biology Chemistry* 266, 24260-24266.
- Zhang, W., Xue, Y., Ma, Y., Zhou, P., Ventosa, A., Grant, W.D. (2002). *Salinicoccus alkaliphilus* sp. nov.: a novel alkaliphile and moderate halophile from Baer Soda Lake in Inner Mongolia Autonomous Region, China. *International Journal Systematic Evolution Microbiology* 52, 789–93.