

PRODUCCIÓN DE β -AMILASA IN VITRO EN DOS CALDOS DE CULTIVO DIFERENTES POR LA BACTERIA DEL GÉNERO *Halomona* AISLADA DE SUELO SALINO-SÓDICO DE LA REGIÓN DE VIESCA COAHUILA

José Roberto Guerrero Ramírez^a; Mónica Aldara Kamey Aguilar^a; Mayela Alvarado Martínez^a; María de Lourdes Froto Madariaga^a; Manuel Ramírez Pérez^{a*}

^a Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de Ciencias Biológicas U.T. Área de Fito biotecnología Aplicada. Blvd. Torreón-Matamoros Km 7.5 s/n, Cd. Universitaria. Ejido El Águila. C.P. 27000. Torreón, Coahuila. México.
manuelrp50@gmail.com

Palabras clave: *Halomona*, Enzima, Amilasa, Lugol

Introducción

Se llama suelo salino a un suelo con exceso de sales solubles, la sal dominante en general es el cloruro de sodio, razón por la cual el suelo también se llama suelo salino-sódico¹. La diversidad de los microorganismos halófilos es muy variada, muchos de esos microorganismos han sido aislados de hábitats que presentan alta salinidad ubicados en diferentes puntos geográficos del planeta². *Halomonas* es un bacilo Gram negativo, quimio heterótrofo. La mayoría de las especies realizan respiración aerobia y utilizan otros compuestos como últimos aceptores de electrones, otro grupo minoritario es capaz de realizar fermentaciones. Estas bacterias pueden crecer en una gran variedad de compuestos como única fuente de carbono y energía³. Sánchez-Porro y colaboradores (2003) llevaron a cabo un estudio de las bacterias halófilas moderadas productoras de enzimas hidrolíticas extracelulares presentes en ambientes hipersalinos. Como resultado del mismo encontraron una gran variedad de enzimas con potencial biotecnológico, incluyendo amilasas, DNAsas, lipasas, proteasas y pululaninas en las especies del género *Halomonas*⁴. Las extremozimas ofrecen nuevas oportunidades para biocatálisis y biotransformaciones como resultado de su extrema estabilidad. El descubrimiento de nuevas especies extremófilas proveen una ruta a nuevas enzimas, con la posibilidad de que esto lleve a nuevas aplicaciones⁵. La producción de enzimas es el área más promisorio de todas, pues estas bacterias poseen características como estabilidad a altas concentraciones Salinas, versatilidad de uso y bajo riesgo de contaminación durante su cultivo, que en conjunto favorecen su escalamiento a nivel industrial⁶. La mayoría de las Halo enzimas extra e intracelulares que se han aislado y caracterizado hasta el momento provienen de bacterias halófilas moderadas. Así, se han descrito varias hidrolasas de interés industrial del tipo de las amilasas, proteasas, nucleasas y nucleotidasas, producidas por diferentes bacterias halófilas⁷. El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de amilasa por la halomona aislada, utilizando dos caldos de cultivo diferentes en condiciones mesofílicas aerobias de crecimiento.

Parte experimental

Preparación de inóculo: Se prepararon dos matraces Erlen Meyer con 50 mL, uno de Caldo Nutritivo (CN) y otro con Caldo Infusión Cerebro Corazón (CBHI) con una concentración de 0.8 M de Cloruro de Sodio (NaCl). Ambos matraces se inocularon con una suspensión de *Halomona spp* a 0.5×10^8 UFC de MacFarland. Las muestras inoculadas se incubaron en agitación de Shacker a 37° C por 48 horas a 120 rpm. A las 48 horas se corroboró el crecimiento con tinción de Gram y observando morfología típica de la bacteria, deteniendo ahí su crecimiento. Cepa problema: De cada matraz se tomó una alícuota de 0.1 mL y se sembraron cajas por duplicado de agar Nutritivo y BHI con 2M de NaCl para preparación del inóculo a ensayar. De cada crecimiento efectuado se

prepararon suspensiones bacterianas a 0.5×10^8 UFC. **Producción de enzima:** A 2 matraces Erlen Meyer con 50 mL de CN y CBHI a 2 M de NaCl y 1% de almidón de papa, se inocularon con 1.0 mL de la suspensión bacteriana a 0.5×10^8 de UFC. Incubándose posteriormente en Shacker a 37° a 120 rpm. A las 48 hrs, se tomaron muestras de los matraces y se realizó la prueba de reducción de Lugol para observar la presencia de amilasas, continuando así en ambos tratamientos hasta la presencia mínima de enzima, para lo cual se modificó la prueba de Lugol a cada 24 horas hasta la detección firme de la presencia de enzima, esto cuando la reducción de Lugol fue instantánea. En ese momento se detuvo la incubación y se procedió a separar la bacteria del caldo con la enzima por centrifugación a 2000 rpm por 5 minutos, guardándose el sobrenadante a 4° C, para posteriores ensayos.

Resultados

La producción final de la β -amilasa producida por la bacteria halófila halo tolerante *Halomona spp* se inició a los 11 días de incubación del tratamiento. Presentando su mayor actividad a los 14 días de incubación. Generando una reacción inmediata de reducción del Lugol. Este hecho fisiológico se dio en condiciones aerobias y mesofílicas en caldos de mínima formulación como lo son el CN y CBHI.

Conclusiones

La búsqueda de biomoléculas de interés biotecnológico es una actividad que se debe fortalecer actualmente. El caso mencionado es un acierto en este rubro, ya que en las salinas de Viesca Coahuila no se había referenciado ningún trabajo anterior, mucho menos haberse aislado una bacteria que produjera algún metabolito de interés económico, por lo que el resultado de este trabajo tiene posibilidades de escalar a mayores objetivos de investigación.

Referencias

- 1.- R.Brinkman, 1980. Saline and sodic soils. In: Land reclamation and water management, p. 62-68. International Institute for Land Reclamation and Improvement (ILRI), Wageningen, The Netherlands
- 2.- Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. 1998. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62: 504-544.
- 3.- Arahall, D. R., Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Mormile, M. R., Tindall, B. J., Oren, A. Béjar, V., Quesada, E. and Ventosa, A.2007. Int J Syst Evol Microbiol 57, 2436-2446.
- 4.- Sanchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E., and Ventosa, A. 2003. J Appl Microbiol 94, 295-300.
- 5.- Hough, D. and Danson M. 1999. *Current Opinion in Chemical Biology*. 3: 39 - 46.
- 6.- Rohit S, Yusuf Ch, Uttam Ch.2005. *Biotech Adv* 2001; 19: 627- 62.
- 7.- Kamekura M, Hamawata T, Onishi H. 1982. *Appl Environ Microbiol*. 44: 994-5.