

Charcas Salineras: Ecosistemas Susceptibles de ser Usados para la Recuperación de Enzimas de Interés Industrial

Silvia Cabrera-López¹, Gustavo A. Rivera-Solís¹, José B. Escamilla-Sánchez¹,
Jorge A. Tamayo-Cortés¹, Sergio Ortiz-Milán², Sara E. Solís-Pereira¹ y
Gerardo Rivera-Muñoz^{1*}

¹Instituto Tecnológico de Mérida

Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica

Km. 5 Carr. Mérida-Progreso, S.N., Mérida, Yucatán, México, C.P. 97138

²Industria Salinera de Yucatán, S.A. de C.V., Gerencia de Ecología

Calle 1-H No. 105 Altos 17-A x 8 y 10, Col. México Norte,

Mérida, Yucatán, México, C.P. 97128

albatros1953@msn.com

RESUMEN

El Objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de actividad enzimática asociadas a la degradación de la materia orgánica; proteasas, lipasas, celulasas y quitinasas presentes en el sistema de charcas salineras de Industria Salinera de Yucatán, S.A. de C.V. (ISYSA) ubicada en la comunidad de "Las Coloradas" estado de Yucatán. La charca más activa del sistema fue la denominada "Soledad" ya que presentó buenos niveles de las cuatro actividades enzimáticas evaluadas siendo la actividad quitinolítica la más importante tanto en la columna de agua, 141.04 $\mu\text{mol NaGlu/ml}$, como en la zona de sedimentos, 271.88 $\mu\text{mol NaGlu/ml}$. La segunda actividad más importante resulto ser la celulolítica con 70.07 $\mu\text{mol Glu/ml}$, en la columna de agua y 102.85 $\mu\text{mol Glu/ml}$ en la zona de sedimentos. En esta charca la salinidad expresada en % de NaCl fue del 26.3 % por lo que tanto los microorganismo como las enzimas presentes en la misma pueden ser catalogadas como halófilas extremas. Estos datos dejan entrever que eventualmente en los sistemas de charcas salineras de la empresa ISYSA podrían recuperarse, además del cloruro de sodio, extremozimas halófilas de interés industrial que están siendo producidas de manera simultánea al proceso de clarificación de las salmueras.

Palabras clave: Charcas salineras, enzimas halófilas, quitinasas, proteasas, celulasas, lipasas

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the levels of enzymatic activities associated with degradation of organic matter; proteases, lipases, cellulases and chitinases present in the system of solar saltworks of Industria Salinera de Yucatán, S.A. de C.V. (ISYSA), located in the community of "Las Coloradas" State of Yucatán. The most active pond of the system was "Soledad" since

presented good levels of the four enzymatic activities evaluated. Chitinolytic activity was the most important found in both, the water column, 141.04 $\mu\text{mol NaGlu/ml}$, as in the area of sediments, 271.88 $\mu\text{mol NaGlu/ml}$. The second most important was the cellulolytic activity with 70.07 $\mu\text{mol Glu/ml}$ in the water column and 102.85 $\mu\text{mol Glu/ml}$ in the zone of sediments. The salinity of this pond, expressed in % of NaCl, was 26.3%, for this reason the microorganism and the enzymes present can be classified as extreme halophilic. The current study shows that eventually we can recover the halophilic extremozymes produced during the clarification process of brines in the solar saltworks

Key Words: *Solar Saltworks, halophilic enzymes, chitinases, proteases, cellulases, lipases*

INTRODUCCIÓN

La empresa Industria Salinera de Yucatán S.A. de C.V. (ISYSA), está dedicada a la producción de sal en el mismo lugar, "Las coloradas", en donde la civilización maya cosechaba el mineral hace al menos 2100 años. Actualmente ISYSA comercializa 500,000 toneladas al año de cloruro de sodio de alta pureza en 21 estados de la república mexicana, Centroamérica, El Caribe y los Estados Unidos. El cloruro de sodio producido por ISYSA es sal de mar obtenida por evaporación solar, misma que después se somete a procesos industriales tecnificados en la planta refinadora ubicada en Tizimin, Yucatán (www.isysa.com.mx).

Obtener la sal de mar pudiera parecer un proceso simple y rápido en el que se requiere tan solo evaporar el agua de mar y cosechar

el producto. Sin embargo el producto obtenido mediante esta opción resulta ser amargo ya que es una mezcla de sales tales como KCl, MgCl_2 , CaSO_4 , CaCO_3 , MgSO_4 y el NaCl que representa el 80% del peso total.

Los sistemas de charcas salineras multipozas, son ecosistemas en los que se pueden visualizar dos zonas de evaporación, el área de concentración primaria y el área de cristalizadores, (Fig. 1). En ellos la zona de evaporación esta integrada por charcas de poca profundidad interconectadas de forma secuencial que son alimentadas con agua de mar, en las que el agua de mar se evapora haciendo uso de la energía solar y se va concentrando paulatinamente dando como resultado salmueras con valores de salinidad creciente.

Artículos

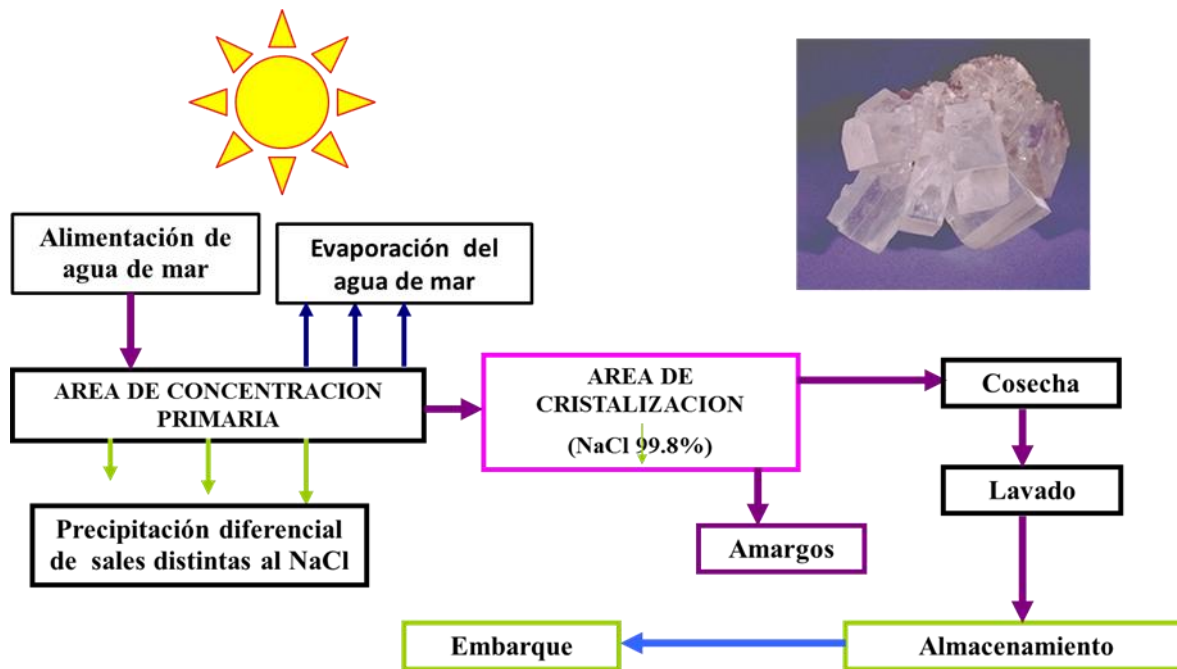


Fig. 1. Estructura general de los sistemas de charcas salineras

Durante este proceso se desarrollan de manera simultánea eventos fisicoquímicos y biológicos que permiten obtener cristales de cloruro de sodio con el 99.8% de pureza, libre de partículas insolubles (Davis & Giordano, 1996).

En los eventos fisicoquímicos se logra la precipitación diferencial de las sales que se encuentran disueltas junto con el cloruro de sodio en el agua de mar, para ello después de que se logra la precipitación de una de las sales, la salmuera resultante es trasladada a otra charca de la salina en donde la salinidad de la salmuera se incrementara hasta llegar al punto en la que otra de las sales precipitara. Este evento se repetirá hasta que

el NaCl este prácticamente puro y se logre su precipitación en forma de cristales grandes en las pozas del área de cristalizadores.

El incremento de la salinidad favorece un incremento de la presión osmótica y un decremento de la actividad de agua (A_w) eventos que provocan la muerte de aquellos organismos que no sean capaces de adaptarse a estas condiciones y solo sobreviven algunos microorganismos (Fig. 2), como la microalga *Duanliella salina*, capaces de sintetizar metabolitos intracelulares que funcionan como osmorreguladores, como el glicerol, arabitol, manitol, betainas y ácido glutámico (Grant, 2004).

Artículos

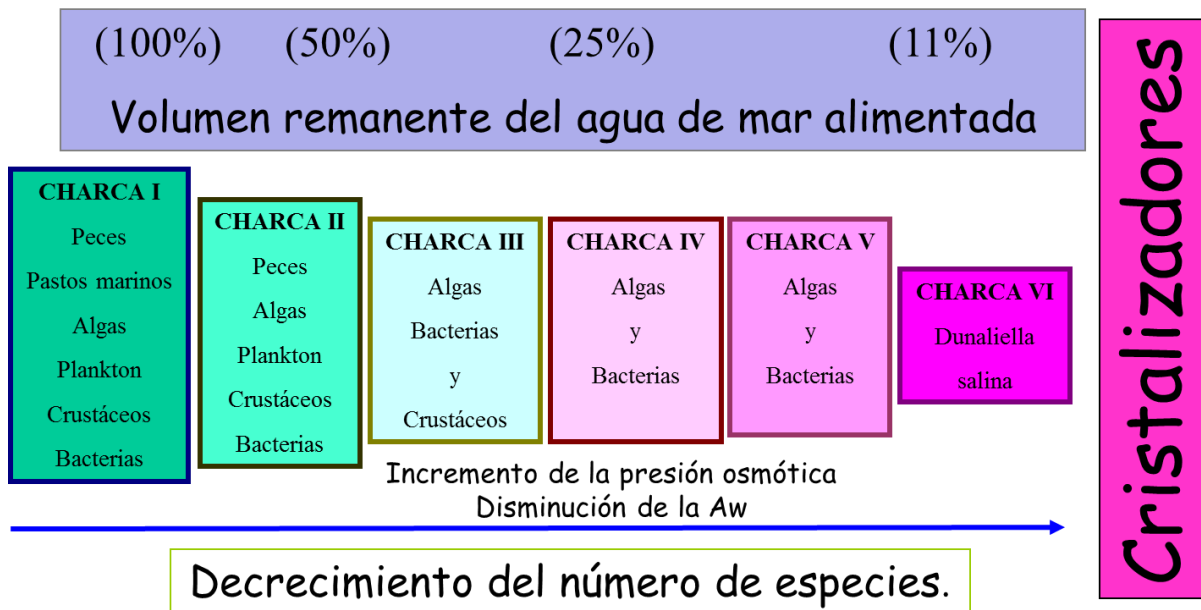


Fig. 2. Disminución de especies ante el incremento de la salinidad

Los procesos biológicos sirven para eliminar el detritus que se acumulan a lo largo del sistema, producto de la muerte de los organismos que no soportan las elevadas presiones osmóticas y las bajas actividades de agua y que son ricos en materia orgánica. Estos eventos los realizan principalmente microorganismo que se encuentran en la columna de agua o en las películas microbianas que se forman en los fondos de las charcas, mediante la síntesis de enzimas extracelulares que participan en la degradación de la materia orgánica como la celulosa, aportada por pastos marinos macro y microalgas (Chung, 2009), la quitina, proteínas y lípidos aportados por peces, moluscos y crustáceos presentes en el agua de alimentación (Liaw & Mah, 1992; Hau-Heredia *et al.*, 2009; VijayAnand *et al.*, 2009; Shivanand & Jayaraman, 2009).

Para realizar este proceso los microorganismos halófilos presentes en la columna de agua y la zona de sedimentos de las pozas sintetizan enzimas extracelulares capaces de funcionar bajo condiciones de salinidad y pH en las que una gran mayoría de las proteínas precipitarían o se desnaturarían. Las enzimas halófilas son capaces de mantenerse solvatadas, estructuralmente estables y funcionales aun en ambientes con baja actividad de agua (Danson & Hough, 1997).

La suma de los procesos fisicoquímicos y biológicos ayuda a que en el área de cristalizadores el cloruro de sodio de alta pureza precipite en forma de cristales grandes, mismos que son cosechados una vez que el líquido remanente rico en Mg^{++} y K^+ , que es conocido como "amargos" es removido. Después de que los cristales de

NaCl son cosechados estos son lavados, secados y almacenados hasta su traslado a la planta de refinado.

Es importante destacar que las propiedades físicas y la composición química de las salmueras determina la calidad de la sal cristalizada, por lo que en los procesos establecidos de manera industrial, como es el caso de ISYSA, se monitorea de manera rutinaria, la densidad, la temperatura, la claridad, la viscosidad y salinidad de las charcas salineras ya que los valores de estos parámetros son usados como indicadores para el manejo del sistema de charcas salineras.

Finalmente es importante resaltar que existe la posibilidad de que las charcas salineras sean fuente no solo de NaCl si no también de metabolitos de interés industrial como las enzimas adaptadas a trabajar bajo condiciones de altas presiones osmóticas y bajos niveles de actividad de agua (Setati, 2010).

Nuestro grupo ha venido trabajando en el aislamiento y selección de bacterias halófilas quitinolíticas involucradas el proceso de producción de NaCl (Hau-Heredia, 2009) así como en la valoración de las actividades enzimáticas involucradas en el desarrollo de este proceso (Escamilla-Sánchez *et al.*, 2009) y está interesado en la recuperación y caracterización cinética de estas enzimas, ya que podrían ser usadas en ambientes salinos o con bajas actividades de agua en las industrias de los alimentos y farmacéutica (DasSarman & Arora, 2001).

Por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer los niveles de actividad enzimática asociadas a la degradación de la materia orgánica; proteasas, lipasas, celulasas y quitinasas presentes en el sistema de charcas salineras de ISYSA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El área de estudio de este trabajo fue el sistema de charcas salineras de ISYSA ubicado en la comunidad de "Las Coloradas" estado de Yucatán; este sistema de charcas salineras cuenta con 27 charcas funcionales, de las cuales 13 fueron sujeto de este estudio,

Muestreo

El muestreo se realizó de la columna de agua y en la zona de sedimentos en la parte central de las charcas estudiadas, usando envase de PET (poli-etilen-tereftalato) de boca ancha, previamente lavados y sanitizados. La recolecta de muestras y la toma de temperatura en los puntos de muestreo se realizaron de manera simultaneas, las muestras se recolectaron por duplicado y se guardaron en una hielera para su transporte al laboratorio de ISYSA.

Manejo de muestras.

En el laboratorio de ISYSA se midió la salinidad (°Be) de las muestras y posteriormente fueron transportadas bajo refrigeración al laboratorio de Biotecnología Enzimática del Instituto Tecnológico de

Mérida (ITM) en donde se les midió el pH y se centrifugaron a 13500 rpm a 4°C, durante 15 min. El sobrenadante libre de células obtenido fue el que se ocupó para realizar las determinaciones de actividad proteolítica, actividad quitinolítica, actividad celulolítica, actividad lipolítica y proteína soluble.

Actividad proteolítica (Kunitz, 1947)

Para esta determinación se usaron 2.0 ml de una solución de caseína al 2.0% en amortiguador de fosfatos 0.2 M de pH 8.0, 7.5 ó 7.3 y la salinidad ajustada, con cloruro de sodio, al valor determinado en cada punto de muestreo. A la solución de caseína se le añadió 1.0 ml de sobrenadante libre de células obtenido de cada punto de muestreo. El desarrollo de la reacción se llevó a cabo a la temperatura promedio de cada charca durante 30 min y se detuvo mediante la adición de 4.0 ml de ácido tricloroacético al 10%. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 13500 rpm, durante 15 min. En el sobrenadante se midió la cantidad de tirosina liberada por acción enzimática, utilizando el método de Lowry *et al.* (1951). El valor de densidad óptica leída a 590 nm fue interpolado en una curva estándar de tirosina (0 a 100 µg/ml)

Actividad quitinolítica (Monreal & Reese, 1969)

En esta determinación se usaron 0.7 ml de una suspensión de quitina coloidal al 1.0% en amortiguador de fosfatos 0.2 M de pH 8.0, 7.5 ó 7.3 y la salinidad ajustada, con cloruro

de sodio, al valor determinado en cada punto de muestreo. A esta suspensión se le adicionó 0.8 ml del sobrenadante libre de células, la mezcla se incubó a 26°C durante una hora, posteriormente se le adicionaron 3 ml de reactivo de DNS (Miller, 1959) y se llevó a ebullición por 5 min, se dejó enfriar y se aforó a 20 ml con agua destilada, se leyó la densidad óptica a 550 nm y los valores obtenidos se interpolaron en la curva estándar de N-Acetil glucosamina.

Actividad celulítica (Mandels, 1976)

Para esta determinación se usó como sustrato una tirilla de papel filtro Whatman No. 1 de 1.0 x 6.0 cm (50 µg de celulosa) que se colocó en 0.7 ml de amortiguador de fosfatos 0.075 M de pH 8.0, 7.5 ó 7.3 y la salinidad ajustada, con cloruro de sodio, al valor determinado en cada punto de muestreo, a los que se les adicionó 0.8 ml del sobrenadante libre de células, la mezcla se incubó a 26°C durante una h, posteriormente se le adicionaron 3 ml del reactivo de DNS (Miller, 1959) y se llevó a ebullición por 5 min se dejó enfriar y se aforó a 20 ml con agua destilada, se leyó la densidad óptica a 550 nm y los valores obtenidos se interpolaron en la curva estándar de glucosa.

Actividad lipolítica (Hoffelman *et al.*, 1985)

La actividad lipolítica se cuantificó usando un sistema de ensayo que contenía 12.8 ml de amortiguador de fosfatos 0.02 M de pH 8.0, 7.5 ó 7.3 y la salinidad ajustada, con cloruro de sodio, al valor determinado en

cada punto de muestreo, 0.3 ml de tributirina y 1.0 ml del sobrenadante libre de células.

Esta mezcla se incubo a 26 °C, durante 15 min y se tomo la lectura de pH inicial y pH final. La diferencia de los valores de pH obtenidos fue interpolada en una curva patrón de pH contra concentración de ácido butírico. Los resultados se reportaron como μ moles de ácido butírico liberados por mililitro de sobrenadante libre de células.

Proteína soluble

La cuantificación de la proteína soluble presente en las salmueras de cada una de las charcas se realizó siguiendo la técnica de Lowry *et al.* (1951) los datos de densidad óptica obtenidos fueron interpolados en una curva estándar de albumina sérica bovina (ASB)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de las condiciones de ensayo

Para establecer las condiciones de ensayo para cuantificar las actividades

quitinolítica, celulolítica, proteolítica y lipolítica que se producen y que trabajan en el sistema de charcas salineras de ISYSA, se determinaron los valores de, pH, temperatura (°C) y salinidad (°Be) que se tenía a lo largo del sistema. Manejando como puntos de muestreo 13 de las 27 charcas que integran el sistema de charcas salineras de la empresa. La selección de las charcas sujeto a estudio se realizo tomando como criterio el que estas charcas son consideradas por la empresa como los puntos representativos del comportamiento del sistema y que estas charcas han sido estudiadas de manera rutinaria por el Dr. J.S. Davis profesor emérito de la Universidad de Florida, USA

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3, como era de esperarse la salinidad se fue incrementando desde un valor inicial de 8.5 °Be hasta 28.5 °Be, la temperatura se incremento a lo largo de las charcas salineras de los 22.7 a los 27.5°C. Y en el caso del pH se presentaron fluctuaciones en el valor de este parámetro sin que se presentara ninguna tendencia definida.

Artículos

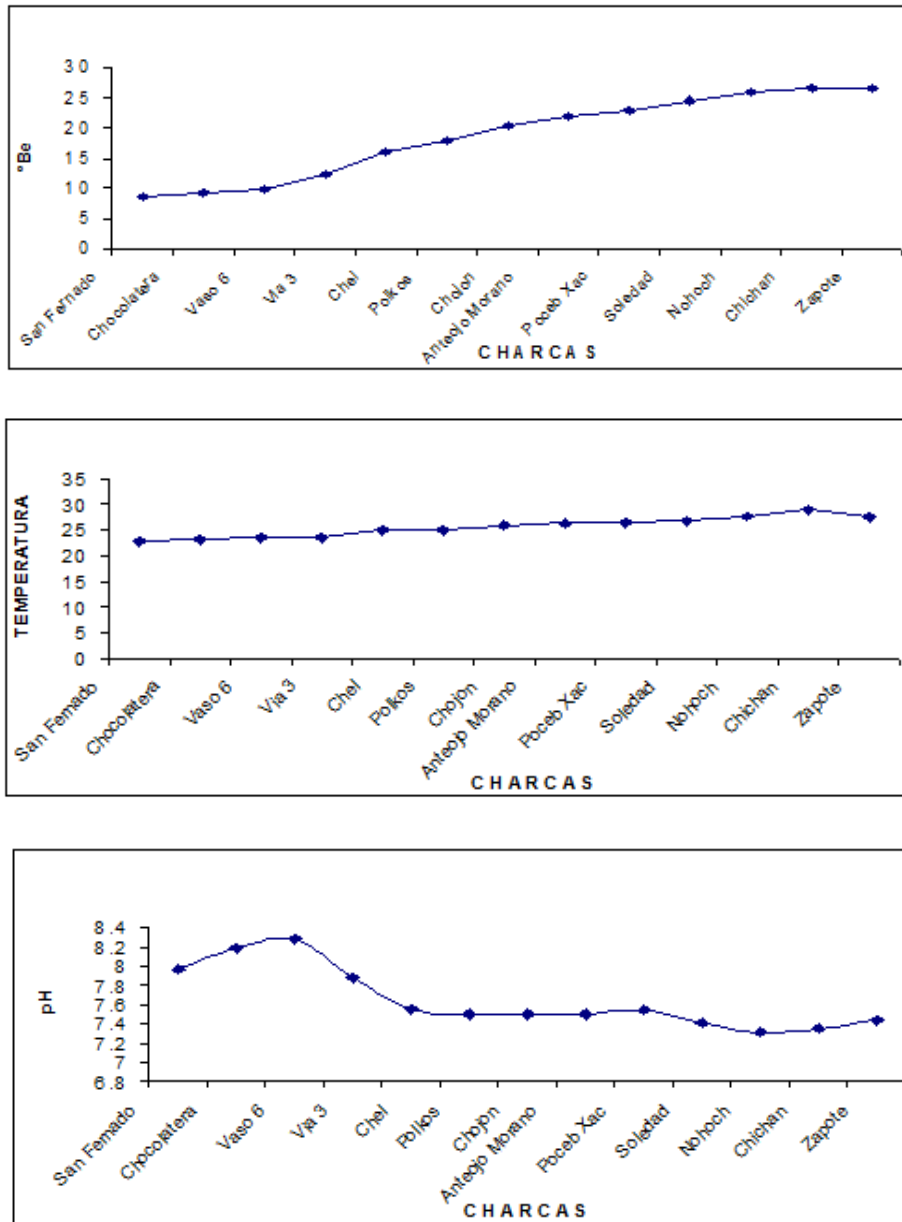


Fig. 3. Evolución de la Salinidad (°Be), la temperatura (°C) y pH en el sistema de charcas salineras de la empresa ISYSA

Tomando estos datos en consideración se decidió que los sistemas de ensayo para la determinación de las actividades enzimáticas se debieran realizar conservando las condiciones de salinidad de

cada una de las charcas, manejando una temperatura de 26°C, valor que se obtuvo al sacar el promedio de las temperaturas existentes en las charcas sujeto de estudio. Y en el caso del pH se decidió manejar el valor

Artículos

de 8, para las charcas San Fernando, Chocolatera, Vaso 6 y Vía 3; 7.5 para las charcas Chel, Polkos, Chojon, Anteojo Morano, Poceb Xac y 7.3 para las charcas Soledad, Nohoch, Chichan y Zapote usando

en todos los casos amortiguador de fosfatos, en la tabla1 se resumen las condiciones de ensayo que se usaron para cada una de las charcas

Tabla 1. Condiciones seleccionadas para la determinación de actividades enzimáticas.

Nombre de las charcas	Salinidad (% NaCl)	pH de ensayo	Temperatura de ensayo (°C)
San Fernando	8.5	8.0	26
Chocolatera	9.2		
Vaso6	9.8		
Vía 3	12.6		
Chel	16.6	7.5	
Polkos	18.7		
Chojon	21.7		
A. Morano	23.2		
Poceb Xac	24.2		
Soledad	26.3	7.3	
Nohoch	27.6		
Chichan	28.3		
Zapote	28.5		

En la tabla 2 se presentan los datos de las actividades volumétricas quitinolítica, celulolítica, proteolítica y lipolítica cuantificadas en la columna de agua y en la zona de sedimentos del sistema de charcas salineras de la empresa ISYSA y como se puede observar el comportamiento de estas

zonas es diferente, siendo la zona de sedimentos la que presento los mayores niveles de actividad enzimática, esto es un indicador de una actividad microbiana más intensa. La charca más activa del sistema fue la denominada "Soledad" ya que presentó buenos niveles de las cuatro actividades

Artículos

enzimáticas evaluadas siendo la actividad quitinolítica la más importante tanto en la columna de agua, 141.04 $\mu\text{mol NaGlu/ml}$, como en la zona de sedimentos, 271.88 $\mu\text{mol NaGlu/ml}$. La segunda actividad más importante resulto ser la celulolítica, 70.07 $\mu\text{mol Glu/ml}$, en la columna de agua y 102.85

$\mu\text{mol Glu/ml}$, en la zona de sedimentos. En esta charca la salinidad expresada en % de NaCl fue del 26.3% por lo que tanto los microorganismo como las enzimas presentes en la misma pueden ser catalogadas como halófilas extremas según lo reportado por DasSarman & Arora (2001)

Tabla 2. Valores de actividad volumétrica en la columna de agua y en la zona de sedimentos del sistema de charcas salineras de ISYSA

COLUMNA DE AGUA					
CHARCA	Actividad quitinolítica $\mu\text{mol NaGlu/ml}$	Actividad celulolítica $\mu\text{mol Glu/ml}$	Actividad proteolítica $\mu\text{mol de Tirosina/ml}$	Actividad lipolítica $\mu\text{mol ac. butírico/ml}$	Proteína soluble ($\mu\text{g/ml}$)
Sn. Fernando	29.61	18.92	0.41	4.46	14.05
Chocolatera	46.26	5.87	0.32	4.29	15.38
Vaso No. 6	43	32.78	0.14	3.75	18.08
Vía No. 3	2.32	27.45	0.49	7.95	17.15
Chel	25.42	11.72	0.82	12.05	14.01
Polkos	25.44	10.67	0.33	11.16	12.75
Chojon		7.46	1.24	9.29	11.83
Anteojito Morano	24.98	57.82	0	0	15.49
Poceb Xac	60.56	76.48	0.83	10.00	8.28
Soledad	141.04	70.07	1.29	13.57	7.24
Nohoch Xac	11.1	18.13	2.28	12.86	11.8
Chichan Xac	22.2	0	0.54	11.96	12.9
Zapote	15.73	21.05	1.04	12.05	8.76
ZONA DE SEDIMENTOS					
Sn. Fernando	25.89	8.51	0.02	8.57	13.98
Chocolatera	3.7	59.16	0.03	3.39	19.9
Vaso No. 6	0.02	0	0.23	2.68	12.72
Vía No. 3	22.65	21.86	0.01	0.89	13.75
Chel	30.04	59.94	0.93	11.96	12.61
Polkos	44.4	12.26	0.55	9.29	18.27
Chojon		54.9	0.29	10.98	17.52
Anteojito Morano	280.67	52.5	1.11	9.73	10.24
Poceb Xac	133.18	46.9	0.36	9.11	12.16
Soledad	271.88	102.86	0.55	12.59	8.65
Nohoch Xac	51.8	13.05	3.6	12.68	7.35
Chichan Xac	0	0	0	0	0
Zapote	0	0	0	0	0

Artículos

Cuando se calcularon las actividades enzimáticas específicas, tabla 3, se encontró que de la proteína soluble total, presente en la columna de agua de esta charca, el 31.21% de la misma es una mezcla de las actividades quitinolítica (19.48%), celulolítica (9.68%), proteolítica (0.18%) y lipolítica

(1.87%). Esto quiere decir que de los 1987 kg de proteína soluble total que potencialmente podrían ser recuperados de esta charca, (tabla 4) 387.07 kg serían de enzimas quitinolíticas, 192.34 kg de enzimas celulolíticas, 3.58 kg de enzimas proteolíticas y 37.16 kg de enzimas lipolíticas.

Tabla 3. Valores de actividad específica en la columna de agua y en la zona de sedimentos del sistema de charcas salineras de ISYSA

COLUMNA DE AGUA				
CHARCA	Actividad específica quitinolítica $\mu\text{mol NaGlu}/\mu\text{g proteína}$	Actividad específica celulolítica $\mu\text{mol Glu}/\mu\text{g proteína}$	Actividad específica proteolítica $\mu\text{mol de Tirosina}/\mu\text{g proteína}$	Actividad específica lipolítica $\mu\text{mol ac. butírico}/\mu\text{g proteína}$
Sn. Fernando	2.11	1.35	0.03	0.32
Chocolatera	3.01	0.38	0.02	0.28
Vaso No. 6	2.38	1.81	0.01	0.21
Vía No. 3	0.14	1.60	0.03	0.46
Chel	1.81	0.84	0.06	0.86
Polkos	2.00	0.84	0.03	0.88
Chojon	0.00	0.63	0.10	0.78
Anteojito Morano	1.61	3.73	0.00	0.00
Poceb Xac	7.31	9.24	0.10	1.21
Soledad	19.48	9.68	0.18	1.87
Nohoch Xac	0.94	1.54	0.19	1.09
Chichan Xac	1.72	0.00	0.04	0.93
Zapote	1.80	2.40	0.12	1.38
ZONA DE SEDIMENTOS				
Sn. Fernando	1.85	0.61	0.00	0.61
Chocolatera	0.19	2.97	0.00	0.17
Vaso No. 6	0.00	0.00	0.02	0.21
Vía No. 3	1.65	1.59	0.00	0.06
Chel	2.38	4.75	0.07	0.95
Polkos	2.43	0.67	0.03	0.51
Chojon	0.00	3.13	0.02	0.63
Anteojito Morano	27.41	5.13	0.11	0.95
Poceb Xac	10.95	3.86	0.03	0.75
Soledad	31.43	11.89	0.06	1.46
Nohoch Xac	7.05	1.78	0.49	1.72
Chichan Xac				
Zapote				

Artículos

Tabla 4. Volumen de salmuera y contenido de proteína soluble que maneja el sistema de charcas salineras de ISYSA

Charca	Volumen (m ³)	Proteína soluble (g/m ³)	Proteína solubles total (kg)
San Fernando	156278	14.05	2195.71
Chocolatera	347332	15.38	5341.97
Vaso No. 6	578058	18.08	10451.29
Vía No. 3	920337	17.15	15783.78
Chel	1269962	14.01	17792.17
Polkos	400374	12.75	5104.77
Chojón	441835	11.83	5226.91
Anteojito Morano	124478	15.49	1928.16
Poceb Xac	229880	8.28	1903.41
Soledad	274448	7.24	1987.00
Nohoch Xac	130975	11.8	1545.51
Chichan Xac	131800	12.9	1700.22
Zapote	232200	8.76	2034.07

Estos datos dejan entrever que eventualmente en los sistemas de charcas salineras de la empresa ISYSA podrían recuperarse, además del cloruro de sodio, extremozimas halófilas de interés industrial que están siendo producidas de manera simultánea al proceso de clarificación de las salmueras. Para ello sería necesario establecer las condiciones de manejo de las charcas para implementar un procedimiento de recuperación de estas enzimas sin alterar el proceso de clarificación de las salmueras.

En este contexto, resulta atractivo cuantificar la presencia de este tipo de enzimas en los efluentes que se generan en la zona de cristalizadores "Amargos" para evaluar la posibilidad de que estos pudieran

ser usados como materia prima para la recuperación de enzimas halófilas extremas.

AGRADECIMIENTOS

Sirva este documento, para rendir un pequeño homenaje a mi maestro y amigo Dr. Carlos Huitrón Vargas, de quien recibí lecciones académicas y de vida que me han permitido desarrollarme como profesor y profesionalista en el área de la biotecnología enzimática y microbiana. ¡Mil gracias Dr. Huitrón! siempre estaré profundamente agradecido con usted.

Artículos

REFERENCIAS

- Danson MJ & Hough DW (1997) The structural Basis of protein halophilicity. *Comp. Biochem. Physiol.* 117A (3): 307-312
- Davis JS & Giordano M (1996) Biological and Physical events involved in the origin, effects, and control of organic matter in solar Saltworks. *Int. J. Salt Lake Res.* 4:335-347.
- DasSarman S & Arora P (2001) Halophiles Encyclopedia of life Sciences, *Nature publishing Group*, 1-9
- Escamilla-Sánchez JB, Cabrera-López S, Tello-Cetina J, Solís-Pereira S, Ordoñez-López U, Ortiz-Milan S & Rivera-Muñoz G (2009) Application of canonical correlation analysis in solar saltworks enzymatic activities evolution: proteolytic activity case. In Proceedings of the International Conference on the ecological Importance of Solar Saltworks (CEISSA 2009). Lekkas, T.D.and Korovessis, N.A. eds. Mérida, Yucatán, México. Pp. 34-41
- Grant WD (2004) Life at low water activity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 359: 1249-1267
- Hau-Heredia L, Granados-Baeza MJ, Cardos-Vidal A, Escamilla-Sánchez JB, Solís S, Ortiz-Milan S & Rivera-Muñoz G (2009) Chitinolytic Bacterial Isolation from solar Saltworks. In Proceedings of the International Conference on the ecological Importance of Solar Saltworks (CEISSA). Lekkas, T.D.and Korovessis, N.A. eds. Mérida, Yucatán, México pp. 57-62
- Hoffelman M, Hartman J, Zinn A & Scherier P (1985) Isolation, purification and characterization of lipase isoenzymes from technical *Aspergillus niger* enzyme. *J. Food Sci.* 50: 1721-1725
- Kunitz M (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J.Gen. Physiol.* 30: 291-310.
- Liaw HJ & Mah RA (1992) Isolation and Characterization of Haloanaerobacter chitinovorans ge. Nov., sp. Nov., a halophilic, anaerobics, chitinolytic bactererium from a solar saltern. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1): 260-266
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Mandels M, Andreotti R & Roche C (1976). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6:21-33.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3): 426-428.
- Monreal J & Reese ET (1969) The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 15: 689-696.
- Setati ME (2010) Diversity and Industrial potential of hydrolase-producing halophilic/halotolerant eubacteria. *African J. Biotechnol.* 9 (11): 1555-1560
- Shivanand P & Jayaraman G (2009) Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris*

Artículos

VIT isolated from Kumta coast. *Proc. Biochem.* 44: 1088-1094
VijayAnad S, Hemapriya J, Selvinb J & Kiran S (2009) Production and optimization of

haloalkaliphic protease by an extremophile *Halobacterium* SP Js !, Isolated from thalassohaline environment. *African J. Basic Appl. Sci.* 1 (4): 49-54