

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



"PRODUCCION DE ALFA-AMILASA POR UNA
CEPANATIVA DE *Bacillus* Y SU APLICACION AL
TRATAMIENTO DEL ALMIDON RESIDUAL EN
GRANOS DE MALTA AGOTADOS"

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARA OPTAR
AL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

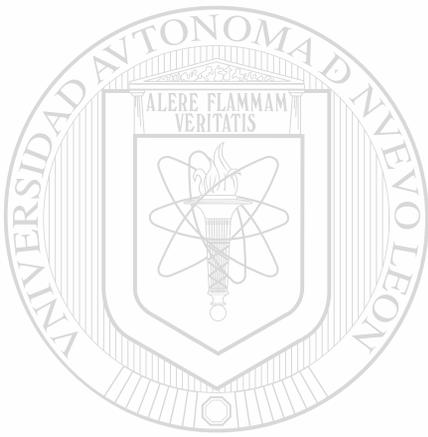
P R E S E N T A

Q.F.B: MARTHA OLIVIA OCHOA MONZON

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1994

TM
QR90
O2
C.1

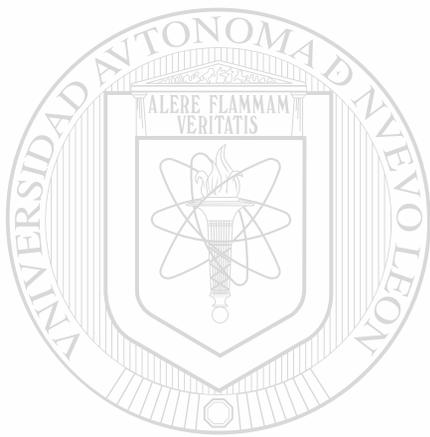


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

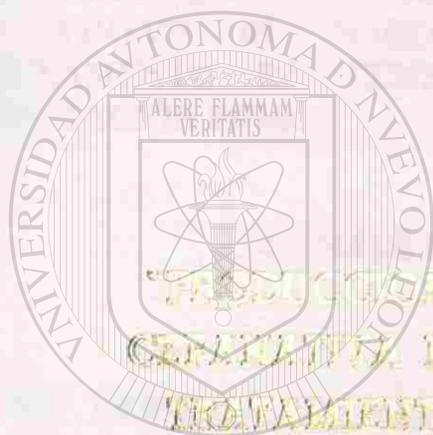
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**BIBLIOTECA, DIVISION
ESTUDIOS SUPERIORES**

®

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES



PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA POR UNA
CENICINA DE *Bacillus* Y SU APLICACIÓN AL
TRATAMIENTO DEL BAZOON RESIDUAL EN
GRANOS DE MALTA AGOTADOS™

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARA OPTAR

AL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

(ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL)

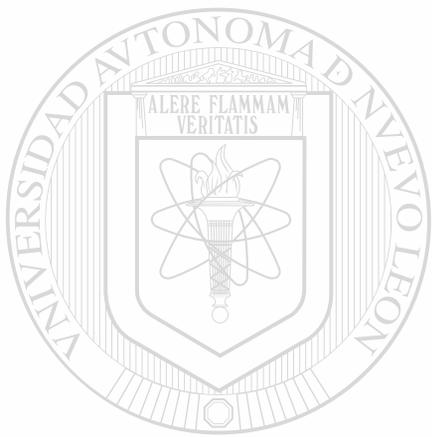
PRESENTA

QUE: MARTHA OLIVIA OCHOA MONZON

MONTESDEY, R. L.

MAYO DE 1994

TM
9290
02



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Q.I. ANDRÉS CERDA ONOFRE.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.

SEÑOR DIRECTOR, LA TESIS ELABORADA POR LA Q.F.B. MARTHA OLIVIA OCHOA MONZÓN, INTITULADA:

.. "PRODUCCION DE ALFA-AMILASA POR UNA CEPA NATIVA DE *Bacillus* Y SU APLICACION AL TRATAMIENTO DEL ALMIDON RESIDUAL EN GRANOS DE MALTA AGOTADOS."

HA SIDO ACEPTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRÁDO ACADEMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS ESPECIALIDAD MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL.

EN VIRTUD DE HABER CUMPLIDO ÍNTEGRAMENTE CON EL REGLAMENTO DE TESIS VIGENTE, SOLICITAMOS A USTED SU APROBACIÓN FINAL.

COMITÉ DICTAMINADOR DE LA TESIS.

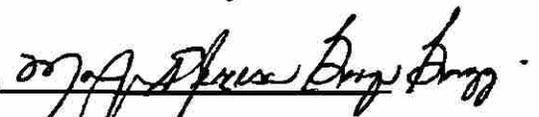
M.C. SERGIO S. FERNÁNDEZ DELGADILLO.
ASESOR



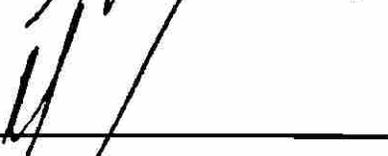
M.C. MARTHA SUÁREZ HERRERA.
SINODAL



M.C. MARÍA TERESA GARZA GONZÁLEZ.
SINODAL



M.C. CATALINA RIVAS MORALES.
SINODAL



VoBo.



DRA. MARIBEL SUÁREZ CÁRDENAS.
COORDINADOR DE CIENCIAS.

DEDICATORIA.

A MIS PADRES:

CARLOS OCHOA BECERRA Y OLIVIA MONZON DE OCHOA

A MI ESPOSO:

ALEJANDRO ABDO GARCIA

A MIS HIJOS:

ALEJANDRO EMIR, CARLOS ANWAR Y SAID

A MIS HERMANOS:

MARIA ESTHELA Y CARLOS

Agradezco el apoyo brindado para la elaboración de la presente tesis al:

**Centro de Información Técnica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Nuevo León**



**Departamento de Servicios Profesionales
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Nuevo León**

UANL

Laboratorio Central
Cervecería Cuauhtemoc-Moctezuma

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

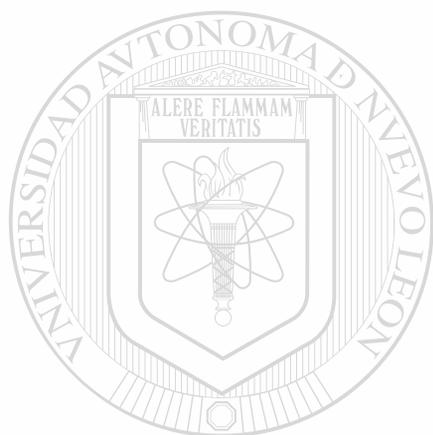


**Centro de Apoyo y Servicios Académicos
Departamento de Apoyo Visual
Unidad Mederos
Universidad Autónoma de Nuevo León**

INDICE GENERAL

| | Página |
|---|-----------|
| I.- INTRODUCCION | 2 |
| II.- MATERIALES Y METODOS | 11 |
| 1.- Microorganismo. | 11 |
| 1.1.- Aislamiento. | 11 |
| 1.2.- Selección. | 12 |
| 1.3.- Identificación. | 13 |
| 2.- Medios de cultivo. | 14 |
| 3.- Esterilización. | 15 |
| 3.1.- Area de trabajo. | 16 |
| 3.2.- Material de vidrio. | 16 |
| 3.3.- Medios de cultivo. | 16 |
| 3.4.- Aire. | 17 |
| 3.5.- Material utilizado y sustancias de desecho. | 17 |
| 4.- Preparación del inóculo. | 18 |
| 4.1.- Nivel matraz. | 18 |
| 4.2.- Nivel semi-piloto (bench-scale). | 18 |
| 5.- Fermentación. | 18 |
| 5.1.- Nivel matraz. | 19 |
| 5.2.- Nivel semi-piloto (bench-scale). | 20 |
| 6.- Métodos de análisis. | 22 |
| 6.1.- Alfa-amilasa (Knee-Beckord). | 23 |
| 6.2.- Alfa-amilasa (Wilson-Ingledew). | 23 |
| 6.3.- Turbidez. | 24 |
| 6.4.- Peso seco. | 24 |
| 6.5.- Detección de proteasas. | 25 |
| 6.6.- Determinación de la actividad amilolítica de la enzima experimental a 70°C, 80°C y 90°C. | 25 |
| 6.7.- Acción de la alfa-amilasa obtenida sobre la cebada y la malta. | 26 |
| 6.8.- Prueba de maceración para evaluar comparativamente la actividad de la enzima experimental. | 26 |
| 6.9.- Azúcares reductores (Somogyi-Nelson). | 27 |
| 6.10.- Análisis cromatográfico. | 27 |
| III.- RESULTADOS | 29 |
| IV.- DISCUSION | 33 |

| | |
|-------------------------------|------------|
| V.- CONCLUSIONES | 47 |
| VI.- TABLAS | 49 |
| VII.- FIGURAS | 81 |
| VIII.- GRAFICAS | 98 |
| IX.- APENDICE | 98 |
| 1.- Colorantes. | 100 |
| 2.- Reactivos. | 102 |
| 3.- Medios de cultivo. | 108 |
| X.- BIBLIOGRAFIA | 114 |



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE TABLAS

| | Página |
|--|-----------|
| I.- Utilización de amilasas en diversas industrias. | 50 |
| II.- Importaciones de amilasas en los Estados Unidos Mexicanos. | 51 |
| III.- Detección de la actividad amilolítica de varias cepas nativas en agar almidón. | 52 |
| IV.- Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad amilolítica producida por varias cepas nativas. | 53 |
| V.- Determinación de la actividad amilolítica de varias cepas nativas en cultivos agitados. | 54 |
| VI.- Composición general de las peptonas. | 55 |
| VII.- Comparación del contenido de aminoácidos de las peptonas con alfa-amilasa sacarificante de <i>Bacillus subtilis</i>. | 56 |
| VIII.- Tolerancia al incremento en la temperatura de hidrólisis de la enzima alfa-amilasa producida por varias cepas nativas. | 57 |
| IX.- Influencia de la velocidad de agitación en la producción de alfa-amilasa. | 58 |
| X.- Efecto de la temperatura de incubación en la producción de alfa-amilasa por tres cepas nativas. | 59 |
| XI.- Efecto del pH del medio, en la producción de alfa-amilasa por tres cepas nativas y la cepa de referencia B-L. | 60 |
| XII.- Producción de alfa-amilasa en diferentes fuentes de nitrógeno por varias cepas nativas. | 61 |
| XIII.- Influencia del inductor en la producción de alfa-amilasa en diferentes fuentes de nitrógeno. | 62 |

| | |
|--|-----------|
| XIV.- Influencia de la velocidad de agitación en la producción de alfa-amilasa por la cepa B-8 a 45°C. | 63 |
| XV.- Producción de alfa-amilasa en harina y peptona de soya por la cepa B-8. | 64 |
| XVI.- Producción de alfa-amilasa en harinas por la cepa B-8 a 45°C. Efecto del uso de agua potable en el medio de cultivo. | 65 |
| XVII.- Actividad de la alfa-amilasa producida por la cepa B-8 al crecer en un medio con soya como fuente de nitrógeno. | 66 |
| XVIII.- Condiciones fisiológicas más propicias para la producción de alfa-amilasa termorresistente por la cepa B-8. | 67 |
| XIX.- Comparación de las características morfológicas y bioquímicas de la cepa B-8 con varias especies de <i>Bacillus</i> . Descripción del crecimiento de la cepa B-8. | 68 |
| XX.- Análisis cromatográfico de los productos de hidrólisis del almidón por la enzima alfa-amilasa experimental. | 70 |
| XXI.- Producción de alfa-amilasa en 600 ml de medio de cultivo utilizando almidón como inductor y agua potable. | 71 |
| XXII.- Resultados obtenidos durante el proceso en la producción de alfa-amilasa en un fermentador con un volumen de seis litros de medio de cultivo. | 72 |
| XXIII.- Determinación de la actividad de proteasas durante la producción de alfa-amilasa. | 73 |
| XXIV.- Acción amilolítica de la alfa-amilasa experimental sobre la cebada y la malta a 80°C. | 74 |
| XXV.- Grado de hidrólisis de los almidones presentes en la malta por la acción de la alfa-amilasa experimental. | 75 |

| | |
|---|-----------|
| XXVI.- Datos experimentales de maceración obtenidos mediante el uso de un extracto comercial y la alfa-amilasa experimental. | 76 |
| XXVII.- Comparación del contenido de azúcares reductores en mostos de cervecería con los resultados obtenidos utilizando la alfa-amilasa experimental. | 77 |
| XXVIII.- Contenido de nitrógeno de las harinas utilizadas. | 78 |
| XXIX.- Composición química del agua potable. | 79 |
| XXX.-Producción de alfa-amilasa en procesos de fermentación semejantes al realizado. | 80 |



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



INDICE DE FIGURAS

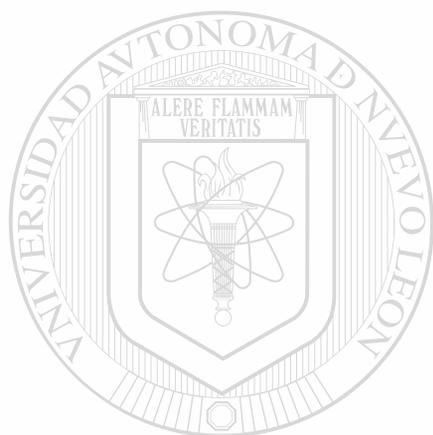
| FIGURA | Página |
|---|---------------|
| 1.- Método de aislamiento para la obtención de un cultivo puro de una bacteria productora de amilasa. | 82 |
| 2.- Ensayo preliminar para la selección de la cepa productora de amilasa. | 83 |
| 3.- Procedimiento empleado para confirmar la elección de la cepa productora de amilasa. | 84 |
| 4.- Método para preparar el inóculo a nivel matraz. | 85 |
| 5.- Método para preparar el inóculo a nivel semipiloto. | 86 |
| 6.- Fermentador MF-114 de New Brunswick Scientific Co., Inc. | 87 |
| 7.- Esquema de la tapa del vaso de fermentación. | 88 |
| 8.- Indicador y controlador modular de pH Modelo pH 22 New Brunswick Scientific Co., Inc. | 89 |
| 9.- Controles del Fermentador Micro Ferm, serie MF-114. | 90 |
| 10.- Analizador de oxígeno disuelto. Modelo DO-50 New Brunswick Scientific Co., Inc. | 91 |
| 11.- Variaciones morfológicas de la cepa B-8 al incubarse a diferentes temperaturas. (a) 35°C, (b) 45°C y (c) 55°C. | 92 |
| 12.- Variaciones morfológicas de la cepa B-30 al incubarse a diferentes temperaturas. (a) 35°C, (b) 45°C y (c) 55°C. | 93 |
| 13.- Variaciones morfológicas de la cepa B-55 al incubarse a diferentes temperaturas. (a) 35°C, (b) 45°C y (c) 55°C. | 94 |
| 14.- Variaciones morfológicas de la cepa B-8 durante la producción de alfa-amilasa. (a) 24 horas, (b) 48 horas y (c) 72 horas. | 95 |
| 15.- Mecanismo de hidrólisis del almidón por las amilasas. | 96 |

| | |
|--|-----------|
| 16.- Perfil cromatográfico de los carbohidratos resultantes de la actividad enzimática. | 97 |
|--|-----------|

GRAFICA

Página

| | |
|--|-----------|
| 1.- Gráfica de proceso para producir alfa-amilasa en un fermentador de seis litros. | 99 |
|--|-----------|



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Para producir una alfa-amilasa termorresistente, se aisló una cepa productora de alfa-amilasa a partir de suelo, identificada como *Bacillus licheniformis*. Se probaron diferentes fuentes de nitrógeno como: extracto de levadura, tripticasa (casitona), casaminoácidos, peptona de carne, peptona de soya, harina de trigo y harina de soya. La producción más alta se obtuvo en la mezcla extracto de levadura/tripticasa (3,970 u/ml) a 35°C y 70°C de temperatura de hidrólisis y con la harina de soya (1,521 u/ml) a 45°C y 80°C de temperatura de hidrólisis. La adición de Ca⁺⁺ al medio de cultivo aumenta la termorresistencia de la enzima, presentando actividad a 85°C. El pH entre 7.0 y 8.0 no afecta la producción, observándose un descenso al utilizar pH 6.0 en el medio de cultivo. El grado de agitación afecta la producción de la enzima. Un incremento de 10°C en la temperatura de incubación causa una reducción en la producción a un 31.5% de la que presenta a 35°C. El uso de maltosa como inductor en lugar de almidón ocasiona un descenso en la producción; excepto en el caso de los casaminoácidos. Utilizando el medio de extracto de levadura/tripticasa/almidón en un reactor se obtuvo una actividad máxima de 583 u/ml a las 36 horas. Se confirma que la enzima es una alfa-amilasa por su patrón de azúcares resultante de la hidrólisis del almidón. ®

Para reducir el almidón residual presente en los granos agotados, provenientes de la maceración de la malta en el proceso de producción de la cerveza es posible utilizar una alfa-amilasa termorresistente. La enzima experimental obtenida al actuar sobre la cebada produce dextrinas dentro del tiempo límite de la prueba; y en la malta reduce el tiempo de sacarificación de los almidones presentes.

El comportamiento de la alfa-amilasa experimental en la preparación de mostos de cervecería presenta una actividad sacarificante mayor que la del extracto comercial, excepto que su concentración es 100 veces menor, lo cual se puede abatir con un proceso de extracción y concentración de la enzima.

I. INTRODUCCION

ASPECTOS GENERALES DE LAS ENZIMAS.

En todos los procesos vitales están implicadas las enzimas, las actividades que desempeñan son sumamente importantes y de una diversidad tal que van desde el mantenimiento de la vida y su propagación hasta la utilización de recursos naturales, la obtención de alimentos, la producción de medicamentos, el tratamiento de residuos domésticos e industriales y otras aplicaciones en muy diversos campos (10, 20, 29, 58, 65, 73, 75, 82, 85, 101).

Desde la antigüedad el hombre ya preparaba alimentos mediante procesos de fermentación muy rudimentarios; hoy en día, las fermentaciones industriales abarcan productos tan disímiles como ácidos orgánicos, solventes, esteroides, enzimas, vitaminas, etc. (1, 16, 73, 85).

El proceso fermentativo sustituye al proceso químico cuando conviene eliminar varias etapas de este último (10, 29) considerando, por supuesto: la mezcla de reacción, las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso, las transformaciones específicas que sean requeridas y la composición del producto.

Las enzimas, ya sean crudas, purificadas o inmovilizadas son ampliamente utilizadas en los procesos industriales, en química analítica, medicina, aplicaciones domésticas, etc. (10, 20, 25, 29, 65, 82, 85, 101). El uso de enzimas en la producción químicos presenta como limitante, en algunos casos, el alto costo involucrado en el gasto de enzima como reactivo en una etapa única. Esto generó la investigación encaminada a inmovilizar la enzima para su reutilización en conversiones subsecuentes (25, 39, 85). Al considerar la aplicación industrial de una enzima microbiana se estiman cuatro

principios básicos: fuentes de abastecimiento, costos de producción, purificación y estabilidad (29). Los métodos de inducción enzimática y los cambios genéticos realizan un papel muy importante en la obtención de mayores cantidades de enzima a menor costo (29, 85, 101).

Los microorganismos que no pueden incorporar nutrientes por los procesos de fagocitosis y pinocitosis, se valen de exoenzimas que sintetizan en su interior y excretan al medio que los rodea para lograr que las macromoléculas del entorno se hidrolicen a productos finales solubles o pequeños que puedan entrar a la célula; estas exoenzimas pueden ser liberadas totalmente al medio en el cual inician la llamada digestión extracelular (amilasas, lisozimas, peptidasas, ribonucleasas, lipasas, etc.). Otras exoenzimas tienen funciones diferentes a las mencionadas; por ejemplo, las nucleotidasas convierten nucleótidos que son impermeables a la membrana en nucleósidos que penetrarán a la célula para ser usados en biosíntesis y las penicilinasas de muchas bacterias hidrolizan la molécula de penicilina y la destruyen. En las bacterias Gram negativas se encuentran también exoenzimas que no atraviesan la capa externa de la pared celular denominadas enzimas periplasmáticas, por ejemplo; ribonucleasa I, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, etc. Otra clase de enzimas exocelulares son las que permanecen firmemente unidas a la superficie de la célula, desde donde actúan sobre los sustratos externos a la membrana celular; las enzimas del grupo *Citophaga* que hidrolizan la celulosa y la penicilinasas de *Bacillus licheniformis* son ejemplos de estas enzimas de superficie (90).

Las enzimas pueden ser obtenidas a partir de microorganismos, de tejidos animales o de las plantas. Las más costeables técnicamente por razones económicas son las enzimas microbianas. De las enzimas producidas por los microorganismos, las exocelulares son las más fáciles de separar y utilizar, se cree que la secreción de la enzima es

debida a la imposibilidad de que actúe en el sustrato dentro de la célula, como sucede con el almidón en el caso de la alfa-amilasa (74); en cambio, las endoenzimas presentan pérdida de estabilidad en soluciones diluídas y al ser colocadas en reactores sufren alteraciones estructurales, además de que se requiere de ruptura celular para su separación (29).

Las amilasas, celulasas, catalasas, glucoamilasas, pectinasas, proteasas y muchas otras más, son enzimas de múltiples usos y son producidas industrialmente.

AMILASAS.

La obtención de la amilasa puede realizarse a partir de plantas, hongos filamentosos, levaduras o bacterias. En la tabla I se presentan varias aplicaciones de estas enzimas. Las amilasas termoestables tienen un papel muy importante en la industria textil y del papel, producción de almidón, liquefacción de almidones, producción de alimentos, adhesivos y azúcar, así como algunos otros productos industriales (2, 48, 70, 82).

Además, en la actualidad es tema de interés ecológico y de protección ambiental el tratamiento de residuos y, en el caso de las agroindustrias, algunos desechos agroindustriales que usualmente son abandonados causando problemas de contaminación contienen apreciables cantidades de almidón. Estos desechos pueden ser reciclados mediante un tratamiento con amilasas para la utilización de los almidones presentes y convertirlos en etanol, metano u otras sustancias (28).

Las amilasas son obtenidas de muy diversas fuentes: órganos de animales (páncreas) (85), plantas (malta) (29, 73), hongos filamentosos (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*) (30, 32, 40, 57, 58, 92), levaduras (*Endomycopsis*, *Schwanniomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*) (87, 92, 105, 106) y bacterias (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*)

(47, 99).

De acuerdo al tipo de hidrólisis que realizan sobre la molécula de almidón existen tres clases de amilasas:

1.- Alfa-Amilasa ó alfa-1,4-D-glucano-hidrolasa (E.C. 3.2.1.1.).

Las alfa-amilasas se han clasificado en varios grupos de acuerdo a sus mecanismos de acción pero básicamente todas las alfa-amilasas hidrolizan al azar los enlaces glucosídicos alfa (1-4) de las moléculas de las dos formas de almidón, amilosa y amilopectina produciendo maltosa, maltotriosa y alfa-dextrinas y licuando rápidamente el almidón (65). Las alfa-amilasas pueden ser obtenidas de diversas fuentes, como se mencionó anteriormente, y el grado de hidrólisis que presentan sobre la molécula de almidón y los productos que se forman depende de su procedencia (92). Las amilasas provenientes de diferentes fuentes difieren en el grado de hidrólisis que presentan sobre la molécula de almidón, así como en su estabilidad térmica; por ejemplo, la alfa-amilasa bacteriana puede ser utilizada a temperaturas de 80°C o mayores, mientras que la alfa-amilasa producida por hongos se inactiva alrededor de los 60°C.

2.- β -Amilasa ó 1,4-alfa-glucan-maltotriosa (E.C. 3.2.1.2.).

Rompe o separa unidades de maltosa de los extremos no reductores de las cadenas de almidón. Su acción es progresiva y cesa cuando alcanza una ramificación, ya que no puede hidrolizar los enlaces alfa (1-6), dando lugar a la formación de dextrinas limitantes (46, 65).

3.- Glucoamilasa, amiloglucosidasa, exo-1,4-alfa-glucosidasa ó 1,4-alfa-glucan-glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.3.).

Hidroliza solamente los extremos no reductores del almidón, glucógeno, dextrinas y maltosa (10). La glucoamilasa, además de hidrolizar uniones alfa-(1-4) rompe también, aunque más

lentamente, uniones alfa-(1-3) (65).

Las alfa-amilasas producidas por diferentes especies de *Bacillus* varían en sus tipos (sacarificante o liquificante) y también en el rango de temperaturas y pH en donde presentan su máxima actividad. La alfa-amilasa producida por cada cepa es de naturaleza específica y presenta variaciones en:

- 1.- La iniciación de la síntesis enzimática (durante la fase de crecimiento o al final de la misma);
- 2.- Grado de represión catabólica de la síntesis enzimática por la glucosa;
- 3.- Requerimiento, si es que lo hay, de almidón para la síntesis enzimática (74)
- 4.- Relaciones de la velocidad de crecimiento celular específico y las velocidades de transcripción y translación del RNA mensajero específico para la alfa-amilasa (83).

Pocos géneros bacterianos están involucrados con la producción industrial de enzimas. En el caso de las alfa-amilasas predominan las bacterias bacilares aerobias y formadoras de esporas, específicamente del género *Bacillus* (75).

Investigaciones en la producción y utilización de amilasas.

El interés en la producción de alfa-amilasas se ha incrementado y en los últimos 10 años se han publicado numerosos trabajos sobre el tema. Abarcando aspectos como:

- 1.- Aspectos fisiológicos y nutricionales (12, 24, 43, 49, 56, 57, 60, 71, 80, 83, 88, 99).
- 2.- Producción de la alfa-amilasa en sistemas:
 - a.- Sumergidos (32, 99).
 - b.- Batch (8, 28, 31, 71).
 - c.- Fed-batch (8, 71, 109).

- d.- Continuos (28, 31).
 - e.- Con sustratos sólidos (77, 79).
 - f.- Acuosa de dos fases (5, 6).
 - g.- Inmovilización de la enzima (14).
 - h.- Inmovilización del bacilo en un fermentador airlift (19, 38).
- 3.- Efecto de diferentes compuestos sobre la producción (48, 49, 61, 78, 104, 110).
 - 4.- Presencia de inductores y represores (104).
 - 5.- Producción junto con proteasas (55, 59).
 - 6.- Optimización de los procesos y hacerlos más idóneos para su aplicación industrial, empleando:
 - a.- Estudios sobre el gen (45, 91, 104).
 - b.- Uso de agentes mutagenéticos (9, 108).
 - c.- Uso de recombinantes genéticos (2, 3, 103, 104).
 - 7.- Purificación de la enzima (43, 50, 68, 84).
 - 8.- Cepas resistentes a altas temperaturas (11, 44, 46, 89, 91, 98).
 - 9.- Estabilidad de la alfa-amilasa en medios:
 - a.- Ácidos (44).
 - b.- Alcalinos (11).
 - 10.- Estudios de regulación enzimática (17, 91, 98).
 - 11.- Técnicas para determinar actividad (13, 62).
 - 12.- Nuevas aplicaciones o usos de la enzima (20, 28, 58).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las industrias nacionales emplean amilasas que en su mayor parte son obtenidas mediante importaciones, las cuales alcanzaron en 1991 un total de 165, 920 Kg con un costo de 3,717 millones de pesos (7). El 73 % de la amilasa importada proviene de Dinamarca, Francia y Estados Unidos. Tabla II.

APLICACION EN LA INDUSTRIA CERVECERA.

Para la producción de la cerveza, la materia prima principal es la malta, que junto con los aditivos (granos sin germinar, jarabes, azúcares, etc.) proporcionan los carbohidratos necesarios para el desarrollo de la levadura y la producción de etanol. El almidón contenido en la malta y los aditivos, es sometido a un tratamiento térmico-enzimático que es necesario para obtener carbohidratos de bajo peso molecular como glucosa, maltosa y maltotriosa (73). Este se inicia colocando la mezcla de malta, aditivos y agua a 46°, temperatura a la cual actúa la enzima β -amilasa formando dextrinas limitantes. Después de 30 minutos la temperatura asciende un grado centígrado por minuto hasta alcanzar los 70°C. Durante este tiempo actúan las proteasas, las β -amilasas y se inicia la acción hidrolítica de las alfa-amilasas. La sacarificación ocurre a 70°C durante 60 minutos; y la prueba cualitativa aplicada al sobrenadante para la detección del almidón se espera resulte negativa en un tiempo de 10 minutos (73). Después de este tratamiento las partículas residuales (granos agotados) todavía contienen almidón. Los granos residuales vienen a ser un subproducto importante en la industria cervecera y presentan un valor nutricional aceptable pues su contenido en proteína y fibra relativamente alto (53, 96) los hacen adecuados para su uso en la producción de forrajes (53); de hecho, hasta se ha sugerido incorporarlos a la alimentación humana (53, 96).

En la industria cervecera, como se indica en la tabla I, la enzima alfa-amilasa es utilizada para mejorar (complementar) la capacidad diastásica de la malta durante el proceso de maceración (39, 69).

Por otra parte, es factible reducir el contenido de azúcares en los granos agotados e incorporar tales azúcares al mosto, de modo tal que al agregar alfa-amilasas termorresistentes (47) durante el proceso de maceración se incrementa la hidrólisis del almidón presente, al sumarse la actividad diastásica de la malta con la

actividad hidrolítica de la alfa-amilasa (69), aumentando el contenido de los azúcares reductores en el mosto y reduciendo los azúcares residuales presentes en los granos agotados (42).

Desde el punto de vista económico, la sustitución de la malta por una mezcla de cebada y enzima reduce grandemente el costo del mosto sin menoscabo de la calidad del producto (42, 102).

La adición de enzimas amilolíticas durante el proceso de maceración proporciona varias ventajas como:

- 1.- Mejorar la formación de azúcares fermentables en el mosto.**
- 2.- Reducir el período de filtración.**
- 3.- Incrementar el límite de atenuación de la levadura.**
- 4.- Mejorar el promedio de vida de la cerveza.**

El presente trabajo parte de la siguiente hipótesis:

El tratamiento con alfa-amilasa reduce el contenido de almidón residual presente en los granos agotados, provenientes de la maceración de la malta en el proceso de producción de cerveza.

Una amilasa termorresistente, cuya actividad permanezca óptima a 70°C, reducirá la cantidad de almidón existente en los granos agotados presentes en la fabricación de la cerveza y mejorará el proceso, así como también la calidad del producto.

La orientación principal de la investigación propuesta está encaminada a la búsqueda de amilasas capaces de reducir el almidón presente en las partículas residuales resultantes del tratamiento tradicional de la malta en la industria cervecera.

Objetivo

Producir una amilasa bacteriana termorresistente, capaz de reducir la cantidad de partículas de almidón residual insoluble presentes en los tratamientos a altas temperaturas (70°C), utilizados durante la maceración de la malta en la industria cervecera.

La investigación enfoca primero hacia el aislamiento de cepas del género *Bacillus*, pues la amilasa que éste produce, presenta acción hidrolítica sobre la molécula de almidón a temperaturas iguales o superiores a 70°C, a diferencia de las amilasas fúngicas que no resisten temperaturas altas y pierden su actividad hidrolítica.

Para la producción de alfa-amilasa es necesario la búsqueda de fuentes de carbono y nitrógeno económicas y accesibles (47), así como el estudio de la influencia de las condiciones ambientales.

Algunos trabajos relacionados directamente con el objetivo de la investigación serían estudios realizados sobre aereación y temperatura (59), el efecto del extracto de levadura (4), la maltosa como fuente de carbono (83), búsqueda de medios de cultivo económicos (12).

Se reportan resultados para los siguientes objetivos secundarios:

- a) Aislamiento de una cepa productora de alfa-amilasa.**
- b) Temperatura, agitación y pH más favorables para la producción.**
- c) Experimentos con extracto de levadura, harina de soya, harina de trigo, peptona de carne, peptona de caseína y peptona de soya como fuentes de nitrógeno.**
- d) Comparación de la producción de la alfa-amilasa en presencia de almidón y en presencia de maltosa.**
- e) Producción de la enzima en seis litros de medio de cultivo y**
- f) Acción de la enzima obtenida en partículas de cebada y malta.**

II. MATERIALES Y METODOS

1.- MICROORGANISMO.

1.1.- AISLAMIENTO.

Existen diferentes métodos de aislamiento basados tanto en medios de cultivo generales o básicos como en medios de cultivo enriquecidos, selectivos y/o diferenciales (22, 27, 34, 63, 86, 95). La siguiente información es considerada para el diseño del procedimiento más adecuado para lograr el aislamiento de una cepa de *Bacillus* productora de amilasa.

a.- El hábitat donde con más frecuencia se encuentra el género de *Bacillus* es en el suelo (35, 90).

b.- Las clases y cantidades de enzimas sintetizadas por un microorganismo son características de cada especie y cada cepa (37, 81). En el caso de la enzima alfa-amilasa, que es una enzima inducible (72, 92), su producción depende de la presencia de la sustancia que actúa como inductor (almidón) y por ello se utilizará como muestra para el aislamiento suelo proveniente de: sembradíos de gramíneas, áreas cercanas a industrias harineras, silos y empresas o bodegas donde se manejan harinas y/o forrajes (72).

c.- El género *Bacillus* presenta, como una de sus características, la formación de esporas (35); por ello, para reducir la población microbiana presente en las muestras de suelo se preparan diluciones que se someten a tratamiento térmico a 70°C durante 10 minutos (95).

d.- Como en la población microbiana sobreviviente al tratamiento se incluyen esporas, microorganismos termófilos y termorresistentes, se emplea un medio diferencial para distinguir las cepas productoras de amilasa (90, 95).

e.- El género *Bacillus* incluye especies mesófilas y termófilas por lo que se utilizan como temperaturas de incubación: 35°C, 45°C, 55°C y 65°C (66, 92).

La Figura 1 presenta el procedimiento diseñado para el aislamiento de las cepas productoras de alfa-amilasas.

1.2.- SELECCION.

La selección se lleva a cabo en tres etapas. La primera de ellas encaminada a elegir las cepas que presentan mayor producción de amilasa, utilizando placas de agar almidón midiendo la zona de decoloración producida al agregar el reactivo de iodo (26, 27).

La segunda etapa consiste en propagar las bacterias en el medio de propagación [1] reportado por Tetraut y Stark (94) y después de incubarlas 48 horas a las temperaturas elegidas, inocular series de tres matraces Erlenmeyer de 250 ml., conteniendo 75 ml. del medio de fermentación: [2] tripticasa, extracto de levadura y almidón (94), [12] harina de soya y almidón (73) ó [13] harina de trigo y almidón (73). Después de incubar a las temperaturas previamente determinadas durante 48-72 horas, en un agitador rotatorio a 125 rpm y a temperatura controlada, la biomasa es separada por centrifugación. Al sobrenadante obtenido se le determina el tiempo requerido -en minutos- para que el almidón, presente en la mezcla de extracto enzimático y sustrato, sea completamente hidrolizado (73).
Figura 2.

Para confirmar la selección de la cepa de mejor producción se procede a la tercera etapa, empleando para ello los medios de cultivo [1] y [2] descritos por Tetraut y Stark (94) y como método analítico para la determinación de la actividad enzimática el método reportado por Wilson-Ingledew (105). Figura 3.

1.3.- IDENTIFICACION.

Las características de las bacterias seleccionadas se dilucidan hasta donde es posible, mediante observaciones y ensayos para acumular datos que permitan realizar la comparación con las descripciones de varias especies publicadas en el Manual Bergey (35) y en otras publicaciones sobre identificación de microorganismos (22, 27, 34, 86, 95).

Para diferenciar las especies de *Bacillus* se consideran las siguientes características:

- a.- Características coloniales (35, 86).
- b.- Producción de amilasa (22, 27, 34, 35, 95).
- c.- Reacción de Gram (22, 95).
- d.- Posición dominante de la espora (22, 34, 35).
- e.- Distensión de la célula por la espora (22, 34, 35).
- f.- Crecimiento en medio líquido (35, 86).
- g.- Características de crecimiento en medio semisólido (86).
- h.- Crecimiento a 35°C, 45°C, 55°C, 65°C (22, 35).
- i.- Utilización y fermentación de azúcares (22, 34, 35, 95).
- j.- Crecimiento en anaerobiosis (22, 34, 35).
- k.- Producción de indol (22, 27, 34, 35).
- l.- Prueba de rojo de metilo (22, 27, 35).
- m.- Producción de acetimetilcarbinol (22, 27, 34, 35).
- n.- Utilización de citratos (22, 27, 35).
- ñ.- Utilización de nitratos (22, 27, 35, 95).
- o.- Crecimiento de caldo-NaCl (22, 34).
- p.- Hidrólisis de la caseína (22, 34, 35).
- q.- Hidrólisis de la lecitina (34, 35, 95).
- r.- Hidólisis de la urea (22, 34).

2.- MEDIOS DE CULTIVO.

Se necesita de una investigación detallada para establecer el medio de cultivo más económico para cada proceso de fermentación y ciertos requerimientos básicos deberán ser cubiertos por cualquier medio de cultivo (1, 90).

Estos requerimientos incluyen:

- 1.-Fuente de energía: Industrialmente predomina el empleo de almidones y melazas (1).**
- 2.-Fuente de carbono: Con frecuencia es cubierta por la fuente de energía (1).**
- 3.-Fuente de nitrógeno: Generalmente se emplean sales de amonio o amoníaco, pero ciertos microorganismos presentan requerimiento de nitrógeno orgánico y para ello se utilizan productos en las formas más económicas con mayor contenido de nitrógeno, por ejemplo: derivados de caseína, soya, carne, pescado, levaduras y otros (1, 15, 27, 63).**
- 4.-Fuente de minerales: Los requerimientos inorgánicos de muchas bacterias pueden ser satisfechos si se agregan K^+ , Mg^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Fosfatos y Sulfatos a los medios de cultivo. Otros iones como Zn^{++} y Cu^{++} se necesitan en cantidades muy pequeñas que a menudo vienen como impurezas en los reactivos empleados (1).**

La cantidad y naturaleza de los constituyentes de un medio de cultivo están determinados por el rendimiento en la formación de biomasa (Y_{xS}) y del producto requerido (Y_{pS}). Cuando el interés principal es la biomasa, los cálculos se basan en la composición elemental de ésta (1, 85); y si se forman grandes cantidades de producto diferente a la biomasa, deberán incluirse cantidades adicionales del sustrato necesario para la formación de este compuesto (76, 81, 85). De acuerdo a lo anterior están diseñados los medios de cultivo siguientes: [4] almidón - peptona de carne, [5] maltosa - peptona de carne, [6] almidón + peptona de soya, [7]

maltosa + peptona de soya, [8] almidón - caseína hidrolizada, [9] maltosa - caseína hidrolizada, [10] almidón - extracto de levadura, [11] maltosa - extracto de levadura, [12] almidón - harina de soya, [13] almidón - harina de trigo, [14] almidón - casaminoácidos y [15] maltosa - casaminoácidos.

Ellos están diseñados para buscar los componentes que permitan mejorar la producción de la enzima alfa-amilasa por el género *Bacillus* probando como fuentes de carbono almidón y maltosa que funcionan también como inductores (54, 93); y como fuentes de nitrógeno (15, 27, 63) peptona de carne, peptona de soya, peptona de caseína, casaminoácidos, extracto de levadura, harina de soya y harina de trigo. La composición de estas fuentes de nitrógeno se muestra en las tablas VI y XXVIII.

Para la preparación de los medios de cultivo orientados a la producción de alfa-amilasa se considera la posibilidad de utilizar agua potable en lugar de agua destilada; el agua utilizada debe tener su composición bien establecida sobre todo en el pH, dureza, sólidos totales disueltos, color, turbidez y contenido de cloruros (tabla XXIX). La adición de sales de calcio aumenta la termoestabilidad de la enzima (54, 72, 88, 92) por lo que se considera también para el diseño de los medios de fermentación.

En el apéndice se presentan las composiciones de los medios de cultivo empleados para la producción de alfa-amilasa.

3.- ESTERILIZACION.

Al efectuar estudios sobre el comportamiento metabólico de un microorganismo es necesario asegurar la pureza del cultivo utilizado, así como la ausencia de microorganismos y/o esporas viables ajenos a la cepa de prueba en cada una de las etapas de la investigación, sea en el material de vidrio, el área de trabajo y los reactivos o medios de

cultivo requeridos para conseguir el objetivo del estudio.

3.1. AREA DE TRABAJO.

Es necesario asegurar tanto la asepsia del área de siembra como la transferencia de los cultivos y sobrenadantes obtenidos a partir de ellos. Las mesas de trabajo se desinfectan con una solución de Oxibac. También se emplea una campana de siembra. La limpieza del equipo que lo requiera y los pisos y paredes se realiza utilizando también solución de Oxibac.

3.2. MATERIAL DE VIDRIO.

Las pipetas, tubos y matraces que requieran de esterilización se sujetan a un tratamiento térmico con calor seco a 150°C durante 2 horas. Para garantizar que se mantuvo la temperatura correcta de esterilización, se emplean tubos Proper-Hi-Dri.

En el caso de electrodos de pH y oxígeno que tengan contacto con el cultivo o el sobrenadante, se les limpia cuidadosamente con el alcohol etílico de 96° para evitar afectarlos con líquidos más agresivos o tratamientos térmicos.

Para las celdas de espectrofotómetro o las cubetas para el potenciómetro, la desinfección se efectúa utilizando solución de Oxibac.

3.3. MEDIOS DE CULTIVO.

La esterilización de la mayor parte de los medios de cultivo se efectúa por calor húmedo a la presión de 15 libras por pulgada cuadrada y temperatura de 121°C, durante 15 minutos (15, 16, 27, 34, 63, 73, 86, 95).

De igual manera se esteriliza el vaso de fermentación teniendo precaución con el tipo de mangueras que se utilizan y conectando los filtros de aire previamente empacados con lana de vidrio (1, 10, 16, 73).

Después del período de incubación y una vez alcanzado el máximo de producción de enzima, las células son separadas por centrifugación a altas velocidades y bajas temperaturas. Aunque el sobrenadante se observa cristalino, no hay certeza de que esté exento de células y esporas por lo que, si se va a mantener un período largo de tiempo en refrigeración, es conveniente esterilizarlo por filtración para asegurar su conservación.

En el caso de sustancias termolábiles, también se emplea la esterilización por filtración (15).

3.4. AIRE.

Para la esterilización del aire se emplea lana de vidrio empacada al azar dentro de los cilindros metálicos que van colocados dentro de la consola del fermentador (1, 85).

3.5. MATERIAL USADO Y SUSTANCIAS DE DESECHO.

Todo el material, medios de cultivo utilizados, sobrenadantes desechados, biomasas separadas, etc. son sometidos a tratamiento térmico por calor húmedo a presión (121°C, 15 libras por pulgada cuadrada, 15 minutos).

Los tubos y frascos de policarbonato o polipropileno son sumergidos en solución desinfectante durante toda la noche y se lavan al día siguiente.

Para lograr el control de los bacilos y las esporas que pudiesen ser

arrastrados por la corriente del aire que sale del fermentador, la manguera de salida se sumerge en solución desinfectante de Oxibac.

Para evitar que las fibras de lana de vidrio del filtro de salida se saturen con la humedad del aire de salida del fermentador, éste pasa por un condensador situado en la tapa del fermentador y de esta manera se reduce la posibilidad de arrastre de células por la humedad y la reducción en la eficiencia del filtro de salida.

4.- PREPARACION DEL INOCULO.

4.1. NIVEL MATRAZ.

Se inoculan matraces Erlenmeyer de 250 ml. conteniendo 50 ml. del medio de cultivo, la siembra es por agitación a partir de la cepa seleccionada. Posteriormente se incuban, en un agitador rotatorio de temperatura controlada a 150 rpm durante 18 a 24 horas a la temperatura de prueba. Antes de utilizarlo se ajusta el grado de turbidez (48, 64). Figura 4.

4.2.- NIVEL SEMI-PILOTO (BENCH-SCALE).

Tres tubos con 7.5 ml. del medio de cultivo se siembran por agitación, a partir de la cepa de prueba. Después de incubar a 35°C durante 18 horas, el cultivo obtenido se transfiere a un matraz Erlenmeyer de dos litros conteniendo 600 ml. de medio de cultivo, conservando la proporción del inóculo (10% v/v) e incubando en el agitador rotatorio a 175 rpm., 35°C durante 24 horas. Figura 5.

5. FERMENTACION.

El estudio sobre el proceso de fermentación se efectúa en dos etapas: A nivel matraz en donde se prueba la influencia de la temperatura, la agitación, el pH, inductores y fuente de nitrógeno; y

la segunda, a nivel semipiloto en las condiciones y medio de cultivo elegidas en la primera etapa.

5.1. NIVEL MATRAZ.

Estudios comparativos de producción de alfa amilasa por las cepas B-8, B-30 y B-55.

Las fermentaciones se llevan a cabo en series de tres matraces Erlemmeyer de 250 ml. conteniendo 75 ml. del medio de cultivo. Los medios, una vez inoculados, son incubados en un agitador rotatorio en control de temperatura. El muestreo se realiza a las 24, 48 y 72 horas para establecer el tiempo de incubación más adecuado para obtener la mejor producción de alfa-amilasa. El crecimiento bacteriano se evalúa a 620 nm. (83, 93), en un espectrofotómetro Coleman Junior II modelo 6/20. La cantidad de amilasa producida se determina en el sobrenadante, después de separar la biomasa por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, por el método reportado por Wilson-Ingledew (105). A los medios de cultivo que contienen harinas se les agrega una solución buffer de fosfatos con cloruro de calcio para extraer la enzima y mejorar el nivel de temperatura al cual se observa la máxima actividad (73).

Se realizan una serie de experimentos usando los medios de cultivo [1], [2] y [3] reportados por Tetrault-Stark (94) e incubando a 35°C, 45°C, 55°C, 60°C y 65°C con una agitación de 125 rpm.

Ya que la actividad de la enzima disminuye al aumentar la temperatura del ensayo enzimático, en análisis posteriores se adicionan 20 μ M de Ca^{++} (93) para proteger la enzima e incrementar el rango de temperatura en el que realiza su acción hidrolítica (54, 88, 92).

En la siguiente serie de experimentos se busca establecer la influencia del pH en la producción de la alfa amilasa en el medio de

cultivo antes mencionado e incubando a 35°C y 125 rpm. Simultáneamente se trabaja una cepa testigo y las muestras se toman a las 24 y 48 horas de incubación.

Para comprobar el comportamiento de producción de alfa amilasa en las cepas en relación al nivel de agitación del cultivo durante la incubación, se prueban las siguientes velocidades de agitación: 125 rpm y 225 rpm.

A continuación se diseñan una serie de experimentos encaminados a probar la influencia de diversas fuentes de nitrógeno en la cantidad de amilasa producida y la presencia de almidón o de maltosa como inductores. En la primera parte se utilizan tres cepas y se prueban: la peptona de carne, la peptona de soya, la peptona de caseína, extrato de levadura, casaminoácidos, harina de soya y harina de trigo como fuentes de nitrógeno y se usa almidón soluble o maltosa como inductores. Conforme se establecen los niveles de producción de alfa amilasa para cada cepa, se selecciona la mejor. En la segunda parte, con la cepa seleccionada, se busca la confirmación de la fuente de nitrógeno (peptona de soya, harina de soya o harina de trigo), pH (6.0 ó 7.0) e inductor (almidón soluble o maltosa) más adecuados para la producción, así como la posibilidad de utilizar agua potable en lugar de agua destilada para la preparación del medio de cultivo.

Por último, se comprueba la actividad amilolítica de la enzima obtenida a 70°C, 80°C y 90°C, mediante un análisis cromatográfico.

5.2. NIVEL SEMIPILOTO (BENCH-SCALE).

La fermentación se lleva a cabo en un fermentador MicroFerm, serie MF 114, construido por New Brunswick Scientific Co., Inc., con capacidad de 14 litros y un volumen de trabajo de 2 a 11 litros. Figura 6. El vaso de fermentación es preparado con seis litros del medio de fermentación elegido y una vez colocada la tapa junto con

las mangueras y los filtros de aire, se esteriliza. La colocación de las mangueras, electrodos y termopar se representa en la Figura 7.

Para iniciar el proceso, el electrodo de pH se conecta al potenciómetro Modelo pH 22 (Figura 8), se limpia cuidadosamente con etanol de 96° y se coloca en agua destilada. Después de ajustar el cero mecánico y el cero electrónico y con el aparato encendido, se sumerge el electrodo en una solución buffer de pH conocido. Se deja al menos 10 minutos un termómetro dentro del recipiente para estabilizar la lectura de la temperatura. Se ajusta el control de temperatura del aparato a la temperatura de la solución buffer y se calibra el aparato al pH conocido del buffer. Se utilizan soluciones buffer de pH 4.0 y 7.0. Se lava el electrodo con agua destilada, se limpia con etanol de 96° y se coloca en la tapa del fermentador.

El registrador de temperatura, Figura 9., se prepara ajustando el cero con el termopar fuera del receptáculo en la consola del microfermentador. El electrodo de oxígeno se limpia cuidadosamente con etanol de 96° y se coloca en el sitio que le corresponde en la tapa del vaso de fermentación. Después de conectarlo al módulo controlador de oxígeno disuelto, Figura 10., se ajusta el cero con el sistema galvánico.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El equipo se pone en funcionamiento asegurándose que la temperatura permanezca estable a 35°C, la agitación se ajusta a 125 rpm y la aeración a 1000 cc de aire/minuto.

En seguida se toma una muestra que será utilizada como referencia para los valores iniciales en los análisis que se llevarán como parámetros de control.

Una vez que se establecen la temperatura, la agitación, la inyección de aire, el pH y el oxígeno disuelto, y antes de agregar el inóculo se añade el agente antiespumante (silicón F-10, Bayer de México). En

seguida se procede a la adición del inóculo. Para ello se destapa, en condiciones de asepsia la tapa de abertura para la adición del inóculo que se encuentra en la tapa del fermentador, Figura 7 y se agrega el inóculo previamente preparado como se indica en la Figura 5. En seguida se procede a un nuevo muestreo.

Las primeras 24 horas de fermentación el muestreo se realiza cada cuatro horas para detectar las variaciones en los parámetros de control (azúcares reductores, actividad de alfa-amilasa y biomasa). Después de ese tiempo las muestras se toman cada dos horas hasta llegar al máximo de actividad enzimática.

La biomasa se separa por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido es utilizado en las pruebas de la acción amilásica sobre la cebada y la malta antes y después del tratamiento de extracción. La extracción se realiza mediante la adición de sulfato de amonio al 70 % de saturación y disolviendo el precipitado en una solución buffer de fosfatos con cloruro de calcio para extraer la enzima y mejorar el nivel de temperatura al cual se observa la máxima actividad (42, 46).

6. METODOS DE ANALISIS.

6.1. ALFA-AMILASA (Knee-Beckord).

Preparar una solución de almidón soluble de la siguiente manera:

Pesar 1 g. de almidón y formar una pasta con una pequeña cantidad de agua. Calentar a ebullición 75 ml. de agua destilada y, con agitación constante y sin dejar de calentar, agregar la pasta poco a poco. Continuar calentando dos minutos más. Enfriar a 30°C y agregar 2 ml. de solución buffer de fosfato (pH 6.0). Ya disuelto el almidón completar los 100 ml. con agua destilada a igual temperatura.

A 20 ml. de la solución de almidón añadir 10 ml. del preparado enzimático, de los cuales 0.5 a 10 ml. pueden ser la enzima y completando los 10 ml. con solución buffer de fosfatos pH 6.0.

Determinar el tiempo requerido en minutos para que el almidón presente sea completamente hidrolizado por el extracto enzimático, es decir, que al tomar una muestra de la mezcla de reacción y agregarle solución de iodo no dé el color característico de la presencia de almidón. (73).

6.2. ALFA-AMILASA (Wilson-Ingledew).

El sustrato consiste en una solución de almidón soluble, al 0.2%, disuelto en una solución buffer de fosfatos pH 6.0 y enfriado a 40°C después de calentar a ebullición. El reactivo de iodo se prepara en el momento de usarse diluyendo 1 ml. de la solución stock de iodo en 500 ml. de agua destilada acidificada con 5 ml. de ácido clorhídrico 5 N.

Para el análisis, se coloca 1 ml. de solución enzimática en un tubo de ensayo y se lleva a la temperatura a la cual se desea determinar la actividad enzimática en un baño de agua. Se le agregan 2.0 ml. del sustrato de almidón y después de 10 minutos se detiene la reacción tomando 0.2 ml. de la mezcla de hidrólisis y añadiendo 5 ml. del reactivo de iodo.

Se mide la absorbancia a 620 nm contra un blanco que consiste en 0.2 ml. de agua destilada con 5 ml. del reactivo de iodo. El control del sustrato es preparado usando 1 ml. de buffer en lugar de la enzima. Las actividades que resultan a consecuencia de lecturas de absorbancia inferiores a 0.125, después de 10 minutos, requieren de dilución de las muestras de donde proceden, para dar reacciones lineales dentro de ese tiempo (105).

La actividad de la enzima es calculada a partir de las absorbancias usando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{C - P}{C} \times 40 \times D$$

Donde:

La actividad enzimática está dada en u/ml

D = Factor de dilución de la enzima.

C = Lectura de absorbancia del control.

P = Lectura de absorbancia del problema.

40 = Factor constante que representa 10 veces los 4.0 mg. de almidón presente en el tubo de hidrólisis.

6.3. TURBIDEZ.

Para la medición de la turbidez causada por el crecimiento microbiano, después de tomar la muestra del mosto fermentado, se procede a efectuar la lectura de transmitancia a 620 nm ajustando al 100% con el medio sin inocular (41, 48, 86).

6.4. PESO SECO.

A dos tubos de ensayo de 13 x 100 mm. previamente tarados, se les agregan de 5 a 6 ml. de muestra del mosto fermentado, tomada en condiciones de asepsia. El contenido de biomasa deberá ser aproximadamente de 2 a 5 mg. de peso seco por mililitro de muestra. Se centrifuga a 3000 rpm durante 15 minutos y el sedimento se lava con un volumen de 5 ml. de suero fisiológico y posteriormente con agua destilada. Se secan a 105°C hasta llegar a peso constante. Los tubos se enfrían en un desecador y se pesan en una balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg. La diferencia de en peso, entre los dos tubos de una muestra, no deberá ser mayor de 0.2 mg. (41).

6.5. DETECCION DE PROTEASAS.

El procedimiento que a continuación se describe es una modificación del método reportado por Montville.

Se utilizan placas de agar que contienen 1% de caseína, 1% de gelatina y 1.5% de agar bacteriológico. Como la adición directa de caseína causa la formación de agregados macroscópicos que obstaculizan la observación de la hidrólisis, esta proteína se disuelve previamente en hidróxido de sodio 0.02 N y se agita hasta que se forma una solución traslúcida. Y enseguida se agregan luego la gelatina y el agar, agitando una disolución y ajustando el pH a 7.0 con ácido clorhídrico 1 N. Se depositan 20 ml. en cada caja de petri estéril y se deja solidificar. Cuando han solidificado, se divide el campo en cuatro partes y en el centro de cada cuadrante se hace una horadación con un sacabocados estéril del No. 2.

Del sobrenadante preparado para la determinación de alfa-amilasa se deposita una gota en cada horadación usando una pipeta de 0.2 ml. estéril. El agar en las placas es opaco, y al estar presente la proteasa, se hidrolizan las proteínas contenidas en el medio de cultivo, formandose un halo claro alrededor de la horadación. El diámetro de hidrólisis se mide a las 3, 7 y 24 horas de incubación a 30°C (67).

6.6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA

- DE LA ENZIMA EXPERIMENTAL A 70°C, 80°C Y 90°C.

Para comprobar la actividad amilolítica de la enzima obtenida se prepara una serie de tubos con 4 ml de solución de almidón al 0.2% a pH 6.0. Se coloca en un baño de agua con la temperatura controlada a 70°C junto con un tubo con solución enzimática para que la temperatura sea igual en ambos. En seguida se agregan 2.0 ml de solución enzimática a cada tubo. Cuando el almidón se ha hidrolizado completamente (prueba con lugol) o la coloración de la muestra de

prueba sea constante, se procede a realizar el análisis de azúcares reductores y se envían a realizarles un análisis cromatográfico.

La prueba se repite con temperaturas de 80°C y 90°C.

6.7. ACCION DE LA ENZIMA ALFA AMILASA OBTENIDA SOBRE LA CEBADA Y LA MALTA.

La cebada o la malta se muelen hasta obtener una mezcla de polvo, gránulos pequeños y cáscaras.

Se preparan seis matraces Erlenmeyer de 125 ml. con 12 g. de muestra (cebada o malta) en cada uno y se les agregan 98 ml. de agua de la llave. A tres de ellos, se agregan 2 ml. de solución de enzima y al resto 2 ml. de agua potable. Los matraces son colocados en un baño de agua a 80°C y agitación de vaivén (100 oscilaciones por minuto).

Después de la muestra inicial, se toman muestras del sobrenadante cada 10 minutos para realizar la detección de almidón, utilizando una solución de iodo. El ensayo termina cuando la prueba del almidón es negativa, es decir, se ha sacarificado totalmente el almidón presente en el sobrenadante.

El procedimiento se repite calentando la cebada o la malta suspendida en agua hasta gelatinizar los almidones presentes.

Cuando se presenta positiva la sacarificación del almidón a los 10 minutos, el experimento se repite tomando muestras cada 1 ó 2 minutos y posteriormente cada 30 ó 60 segundos.

6.8. PRUEBA DE MACERACION PARA EVALUAR COMPARATIVAMENTE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA EXPERIMENTAL.

Se pesan 5 g. de materia prima (malta 40% - cebada 60%) y se le agregan 20 ml. de agua destilada a 45°C, se agita a 200 rpm (con aspas magnéticas) para homogenizar. Al llegar a 70°C (en baño maría) se le agregan 10 ml. de agua a 70°C y 1 ml. de extracto enzimático; se mantienen las condiciones a 70°C y 200 rpm durante una hora. Se enfría a 20°C. Se afora a 45 ml. con agua destilada a temperatura ambiente; se filtra y se hacen determinaciones de densidad, color y pH.

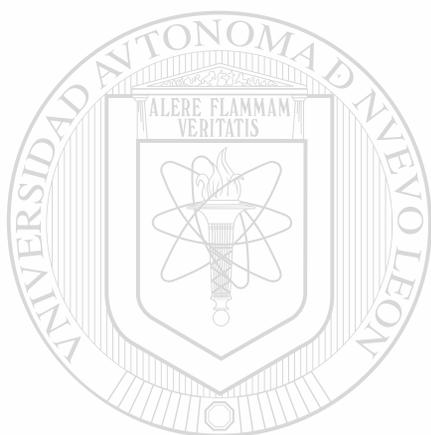
6.9. AZUCARES REDUCTORES (Somogyi-Nelson).

A 1-5 ml de muestra conteniendo no más de 0.6 mg de glucosa o su equivalente se le agrega un volumen igual del reactivo de cobre. Las muestras, los blancos y los estándares de glucosa se calientan durante 10 minutos en un baño de agua hirviendo y en seguida se enfrían. Para determinar cantidades menores de 0.1 mg de glucosa, se le agrega a cada tubo 1.0 ml del reactivo de arsenomolibdato; 2.0 ml en el caso de que la cantidad de glucosa sea de 0.1 a 0.6 mg. Cuando todo el óxido cuproso se disuelve después de mezclar, la solución se diluye a 25 ml (o un volumen apropiado más pequeño) y se deja reposar al menos 15 minutos, pero no más de 40 minutos antes de realizar la lectura en un espectrofotómetro a 500 nm. La glucosa equivalente es calculada a partir de una curva de estandarización (41).

6.10. ANALISIS CROMATOGRAFICO.

Con la finalidad de hacer una comparación entre los productos de hidrólisis de un extracto comercial, la alfa-amilasa Kinase-HT (Proveedor ENMEX, S.A.), y el extracto obtenido, se hace un análisis cromatográfico inyectando 1 ml. de la mezcla enzima con sustrato a un cromatógrafo HPLC (Beckman) usando agua destilada como eluente. El flujo es de 0.6 ml/min y la temperatura de la columna de

90°C. La columna de Spherogel carbohydrate con 7.5 mm. de diámetro y 30 cm. de largo. Se utilizan un detector de índice de refracción Altex Modelo 156, un integrador Varian Modelo 4270 y manitol como estándar interno.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

III. RESULTADOS

La selección de las mejores cepas nativas productoras de alfa-amilasa se basó en:

- a) La medición del diámetro de la zona de hidrólisis en agar almidón producida por la alfa-amilasa secretada por la cepa nativa (26, 27). La cepa B-8 presentó una zona de hidrólisis de 2.6 mm de diámetro y las cepas B-30 y B-55, 2.4 mm. Tabla III.
- b) El tiempo, en minutos, necesario para que el almidón presente en la mezcla de reacción sea totalmente hidrolizado por el extracto enzimático a pH 6.0 y una temperatura de 40°C (73). B-8, B-30 y B-55 presentan los menores tiempos para la hidrólisis del sustrato, (6.0, 6.5 y 5.0 minutos respectivamente); así como, producción de enzima a mayores temperaturas de incubación. Tabla IV.
- c) La determinación cuantitativa de alfa-amilasa presente en la mezcla de reacción midiendo el almidón residual después de 10 minutos a pH 6.0 y temperaturas de hidrólisis de 40°C y 60°C (105). Tabla V.

La alfa-amilasa producida por las cepas B-8, B-30 y B-55 presentan tolerancia al incremento de la temperatura de hidrólisis. Las cepas B-8 y B-30 presentan un comportamiento semejante al detectarse actividad aún a 80°C (Tabla VIII).

Manteniendo constantes el inóculo, medio de cultivo y temperatura de incubación e incrementando la velocidad de agitación se presenta un descenso en la actividad enzimática de las tres cepas (Tabla IX).

Al realizar pruebas de fermentación con el inóculo, el medio de cultivo y la agitación constantes, y variando la temperatura de incubación, se observó que ninguna de las cepas nativas se desarrolla a temperaturas superiores a 55°C. La producción de la enzima disminuyó drásticamente al incubar las cepas a 55°C observándose

un escaso crecimiento. La cepa B-8 produce mayor actividad a 35°C siendo de 3,970 u/ml, igualmente la cepa B-30 con 4,000 u/ml (Tabla X).

Tanto la cepa B-30 como la cepa B-55 cambian drásticamente su comportamiento al variar el pH del medio de cultivo obteniéndose resultados muy bajos; en cambio la cepa B-8 presenta resultados semejantes a los anteriores y su comportamiento es análogo al de la cepa de referencia (B-L) y no presentan diferencia en la producción al variar el pH del medio de cultivo. Se observa que las diferencias en el pH del medio de cultivo no afectan, de manera significativa, los niveles de producción de la cepa B-L; comportamiento semejante presenta la cepa B-8 (Tabla XI).

Al permanecer constantes el inóculo, la temperatura (45°C), el pH, la agitación y estableciendo un medio de cultivo básico con almidón y exento de fuente de nitrógeno, se procedió a probar: peptona de carne, peptona de soya, peptona de caseína y extracto de levadura como fuentes de nitrógeno. Los niveles más altos corresponden a la peptona de soya utilizando la cepa B-8 obteniéndose 41.3 u/mg de biomasa (Tabla XII).

Al cambiar el inductor de almidón a maltosa, los niveles de actividad se reducen. Los valores registrados la tabla XIII son menores pues la determinación de la actividad enzimática se realizó a 80°C.

Existe un marcado descenso en la actividad amilásica al aumentar el nivel de agitación 100 rpm (Tabla XIV). Lo mismo se observó al mantener el cultivo en reposo.

Cuando se utiliza harina de soya como fuente de nitrógeno, la cepa B-8 incrementa la producción de alfa-amilasa (Tabla XV). Presenta un ligero aumento cuando se emplea agua potable (de la llave) (1546

u/ml) en lugar de agua destilada (1295 u/ml) para preparar el medio de cultivo (Tabla XVI). Para la extracción de la enzima se utilizó un buffer de fosfatos adicionado de cloruro de calcio monohidratado lográndose detectar actividad a 85°C cuando la cepa B-8 se cultiva en medio base con harina de soya y almidón (Tabla XVII).

La presencia de almidón, ya sea como almidón soluble o formando parte de otro componente, favorece la producción (Tablas XVI y XVII).

La tabla XVIII presenta las condiciones fisiológicas (nutricionales y ambientales) más propicias para la obtención de alfa-amilasa.

La cepa B-8, finalmente elegida para realizar el escalamiento, presenta las características de crecimiento, fisiológicas, bioquímicas y morfológicas que se muestran en la Tabla XIX.

Un alto porcentaje de maltosa es obtenida al hidrolizar almidón soluble a 70°C, 80°C y 90°C utilizando la enzima alfa-amilasa (Tabla XX).

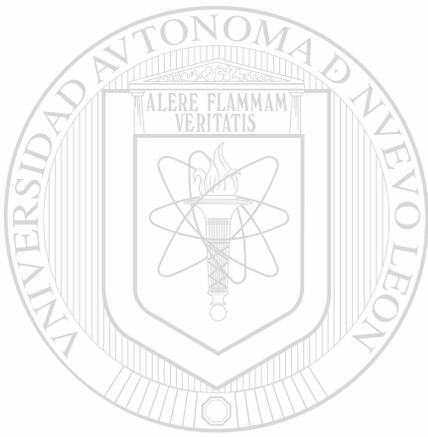
La cantidad de alfa-amilasa producida en harina de soya disminuye al aumentar el volumen de medio de cultivo a 600 ml (Tabla XXI).

Utilizando resultados obtenidos al trabajar con el fermentador con un volumen de trabajo de seis litros (Tabla XXII), se establece la gráfica del comportamiento del proceso, Grafica 1. Se presenta poca actividad proteolítica durante el proceso de fermentación (TablaXXIII).

Al probar la actividad sacarolítica de la enzima obtenida sobre partículas de malta, dá negativa la prueba del almidón a los 3.5 minutos y en la cebada se observa un color pardo en la mezcla de reacción dentro del tiempo límite de la prueba (Tabla XXIV). La cantidad de azúcares reductores producidos a partir de la malta

hidrolizada se muestran en la tabla XXV.

Al realizar la prueba de maceración para evaluar comparativamente la actividad de la enzima se observan semejanzas entre la alfa-amilasa experimental y el extracto comercial (Tabla XXVI). El perfil de azúcares obtenido del mosto tratado con la alfa-amilasa experimental muestra gran similitud con el perfil de carbohidratos obtenido utilizando la Kinase-HT (Proveedor ENMEX, S.A.).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IV. DISCUSION

Por presentar niveles de actividad enzimática altos en los sobrenadantes procedentes de sus cultivos, las cepas B-8, B-30 y B-55 fueron seleccionadas para estudios que a continuación se comentan.

Se siguió el comportamiento de las tres cepas buscando las condiciones de temperatura, pH y agitación más adecuados para la producción de alfa-amilasa. La reacción enzimática se realiza a diferentes temperaturas de las cuales, la temperatura de 70°C nos indicaría la actividad de una amilasa que corresponde al objetivo que se busca.

En la técnica de preparación del inóculo (60, 64, 83, 103) se busca que la etapa de crecimiento en que éste se encuentra sea antes de alcanzar la fase estacionaria y su comportamiento sea uniforme, utilizando el mínimo número de transferencias para su adaptación al medio de cultivo y las condiciones de incubación. De esta manera se reduce el riesgo de contaminación y se mantiene la capacidad de producción de la cepa (75). Para establecer la preparación del inóculo se consideraron los artículos de Krishnan-Chandra (48),[®] Meyrath-Suchanek (64), Srivastava-Baruah (88) y Tetraut-Stark (94).

La búsqueda de este tipo de bacterias requiere de una serie de pruebas de crecimiento y producción a diferentes temperaturas. Los resultados de estas pruebas en las cepas nativas indican que sus límites de desarrollo se extienden hasta 55°C (temperaturas mínimas y óptimas de las bacterias termofílicas) y su crecimiento abarca también temperaturas propias de las bacterias mesofílicas (temperaturas óptimas y máximas) (66, 90).

Los miembros del género *Bacillus* que son termorresistentes

presentan células más pequeñas que las formas menos resistentes, sugiriendo con esto que células más pequeñas tendrían mayores velocidades metabólicas facilitando el transporte rápido de sustratos y productos de desecho, lo cual tiene como consecuencia, una rápida resintetización de los componentes celulares desnaturalizados por el calor (66, 90). Esto lo observamos en la figura No. 11a, la cual presenta las características morfológicas de las células de la cepa B-8 a 35°C, al variar la temperatura de crecimiento las células aumentan su tamaño tendiendo a formar cadenas largas y ramificadas a 45°C (figura No. 11b); pero a 55°C se reduce la cantidad de crecimiento, las células son más pequeñas y hay escasas agrupaciones en cadenas (figura No. 11c). La cepa B-30 no presenta variaciones evidentes en su forma al variar la temperatura pero sí en la cantidad de crecimiento (figura No. 12). La cepa B-55 presenta un comportamiento semejante a la cepa B-8 observándose pleomorfismo (figura No. 13). Esta característica de termoestabilidad es intrínseca e independiente de cualquier factor estabilizante transferible (2, 66, 90). Sin embargo, se presentan excepciones, como el *Bacillus licheniformis* que es un bacilo mesófilo y produce alfa-amilasa que hidroliza almidón a 110°C (74).

Cuando la cepa B-8 crece en un cultivo estático a 45°C, el crecimiento está limitado a la superficie formando una película delgada que al romperse forma fragmentos que flotan y no presenta turbidez en el medio de cultivo. Al incubarse a 35°C, la cepa forma una película densa, plegada, que tiende a ascender por las paredes del recipiente mientras el resto del medio de cultivo permanece cristalino. Si la incubación se hace con agitación, el crecimiento es uniforme en el caldo, sin formación de capas, películas o anillos. La forma bacilar presenta variaciones conforme pasa el tiempo de incubación (figura No. 14). Al comparar las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas con las especies de *Bacillus* más semejantes (tabla XIX), se observa mayor afinidad con las características de *Bacillus licheniformis*.

La producción de alfa-amilasa por el género *Bacillus* se realiza generalmente dentro del rango de pH de 6.0 a 7.0 (33, 60, 99), lo cual concuerda con el comportamiento de la cepa B-8 ya que dentro del rango de pH experimentado no hay variaciones importantes en la producción de la enzima. Las cepas B-30 y B-55 cambiaron en su comportamiento durante la investigación. Este cambio puede ser consecuencia de las condiciones de conservación de las cepas, las cuales se mantenían en refrigeración (4°C) en cultivos de 24 horas de incubación en agar nutritivo con subcultivos cada 4 meses, confirmando la pureza de la cepa. Al presentarse cambios ambientales importantes en la temperatura y grado de humedad aumenta la tendencia de los cultivos a la inestabilidad (94).

La influencia de la agitación en la producción de alfa-amilasa es muy variable. Los métodos mencionados por Prescott y Dun (73) requieren de agitación solamente para el mezclado del medio de cultivo y facilitar así el contacto de los nutrientes con las células. La cantidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo varía dependiendo de la velocidad de agitación, el tipo de recipiente, el volumen de líquido contenido en el recipiente y la viscosidad del medio de cultivo. Krishnana y Chandra (48) consideran que el uso de cultivos estáticos causan un descenso drástico en la producción de la enzima. Wynes y Lloyd (107) consideran la producción de amilasa en fermentaciones a mayor escala en condiciones aereadas y agitadas. Roychoudhury, Parulekar y Weigand (83) demostraron que el requerimiento de oxígeno varía linealmente con la cantidad de biomasa producida y que la capacidad de síntesis enzimática se mantiene aún teniendo la concentración de oxígeno como limitante. Markkanen y Bailey (60) encontraron que hay un nivel de agitación que optimiza la producción y que la cantidad de alfa-amilasa se incrementaba por reducción de la aereación al final de la fase exponencial, causando un descenso en el pH que actúa como factor limitante. Markkanen-Bailey (60) y Krishnana-Chandra (48) demostraron que al aumentar la velocidad de agitación o incubar sin

movimiento hay un descenso en la producción. Esto concuerda con el comportamiento de las cepas seleccionadas al necesitar de mezclado junto con aereación a un nivel apropiado para mejorar la producción de la enzima.

Durante estos experimentos se observó que la actividad enzimática de las diluciones preparadas a partir de la enzima cruda obtenida disminuía, conforme pasaba el tiempo, al permanecer a temperatura ambiente e inclusive al almacenarse en refrigeración (4°C) para realizar la determinación de nuevo al día siguiente. La inactivación de la enzima, en consecuencia, está relacionada con la temperatura (39, 81), pues la inactivación es mayor a temperatura ambiente que a 4°C (92). Para resolver esto se agregan sales de calcio divalente, éstas protegen la enzima de la inactivación térmica (39, 51, 81) y aumentan la termoestabilidad de la alfa-amilasa (4, 54, 88, 92). Hay que considerar que ciertas sales de calcio como el cloruro, nitrato y el cloracetato no proporcionan esa protección (54). El Ca^{++} al estar en contacto con la enzima modifica su estructura adquiriendo una estructura espacial más estable. Requiere de una relación de al menos seis átomos gramo de calcio por molécula de enzima para establecer una conformación molecular que proporcione protección completa a la enzima. Posiblemente el grupo carboxilato se encuentre involucrado en la formación de los enlaces con los iones calcio divalentes (81, 92).

La composición y concentración del medio de cultivo influye de manera determinante sobre el crecimiento del bacilo y la producción de alfa-amilasa (18). Tanto la naturaleza y cantidad de la fuente de nitrógeno, como la presencia o ausencia de inductores afectan la producción de amilasa.

Al estudiar los resultados sobre la influencia de la naturaleza de la fuente de nitrógeno es posible comparar las características de cada fuente de nitrógeno (Tablas VI, VII y XXVIII) y la cantidad de actividad producida en cada caso. Las fuentes de nitrógeno utilizadas fueron:

- a) **Casaminoácidos (caseína hidrolizada con ácido clorhídrico). Sus productos de hidrólisis son aminoácidos libres. Contiene cistina y triptófano. Conserva, hasta cierto grado, el contenido en vitaminas y factores de crecimiento (27, 63, 81).**
- b) **Extracto de levadura es básicamente una mezcla de aminoácidos y péptidos, vitaminas hidrosolubles y carbohidratos. Los carbohidratos, principalmente glicógeno y trehalosa, se hidrolizan a glucosa durante la fabricación del extracto. Contiene calcio (0.01 g%), ácido glutámico (6.7 g%) y ácido aspártico (4.5 g%) entre sus componentes (27, 63, 88).**
- c) **Harina de soya proviene de las semillas de soya, las cuales contienen hasta un 40% p/p de proteína, hidratos de carbono, potasio, fósforo, azufre, magnesio y hierro. La harina empleada contiene 5.3% p/p de nitrógeno total y 29.5% p/p de proteínas.**
- d) **Harina de trigo proviene de los granos de trigo que contienen 13.5% p/p de proteína, 69% de carbohidratos. La harina empleada contiene 3.4% p/p de nitrógeno total y 18.96% p/p de proteínas.**
- e) **Peptona de carne presenta alrededor del 12% de nitrógeno total y un contenido de creatina de 0.5 a 2.0% (63).**
- f) **Peptona de soya presenta un elevado contenido en carbohidratos y vitaminas y constituye una excelente base nutritiva (63). La peptona de soya es obtenida de la planta de soya y su contenido de carbohidratos es alto; en este caso los microorganismos tienden a crecer rápidamente y presentan un descenso rápido en la viabilidad por tal motivo su uso en estudios de fermentación no es muy recomendado (63).**
- g) **Tripticasa (peptona de caseína obtenida por digestión triptica). Conocida también como casitona, es un componente muy utilizado**

en el cultivo general de microorganismos pues presenta una composición constante de aminoácidos y pequeños polipéptidos predominando el triptófano. Carece de hidratos de carbono (27, 63, 81).

La peptona de carne, los casaminoácidos y el extracto de levadura presentan baja producción, así como la harina de trigo. Gandhi (31) demostró que las fuentes de nitrógeno orgánicas son superiores a las inorgánicas; al utilizar la fuente de nitrógeno orgánica al 1%, la mayor actividad amilásica se observaba en peptona (1,440 KNU/l) seguida por triptona, caseína y extracto de levadura. Alam, Hong y Weigand (4) al estudiar el efecto del extracto de levadura en la producción de alfa-amilasa por *B. amiloliquefaciens* encontraron que la productividad aumenta al utilizar concentraciones de la fuente de nitrógeno de 1 y 2 g/l para decaer a concentraciones más altas. Si se emplean concentraciones altas (5 g/l) la enzima se desactiva por los metabolitos producidos (ácido acético, butanodiol y ácido láctico) cuando no se controla el pH del medio de cultivo. En estos casos la actividad enzimática detectada será igual a la enzima producida menos la enzima degradada por la acción de las proteasas menos la desactivada por la acción de los metabolitos. La concentración utilizada en los primeros experimentos fue de 2% y en el medio diseñado de 5%, los resultados obtenidos concuerdan con estas observaciones (4, 31). Emanuilova y Toda (28) al utilizar casitona como fuente de nitrógeno en la producción de alfa-amilasa por *B. caldolyticus*, encontraron una baja producción de la enzima cuando la casitona estaba sin inductor en el medio de cultivo y una producción alta cuando se le agregaba almidón. La tripticasa por sí sola no llega a igualar la producción obtenida cuando se combina con extracto de levadura.

Al probar diversas fuentes de nitrógeno no se logra el nivel de producción que se detectó en los experimentos relacionados con la

temperatura, pH y agitación. Es importante señalar que se ha logrado estabilizar la enzima respecto a la temperatura mediante la adición de sales de calcio en el líquido de dilución y así poder aumentar la temperatura de hidrólisis a 80°C. Cuando se realizó la determinación de actividad enzimática sin la adición de Ca⁺⁺, solamente las cepas B-8 y B-30 presentaban actividad (108 u/ml).

De las fuentes de nitrógeno experimentadas, la peptona de soya y la harina de soya favorecen más la producción. La harina de soya ha sido utilizada para la producción de la enzima en fermentaciones en sustratos sólidos (73, 77), y requiere un tratamiento de extracción (73) utilizando para ello una solución buffer de fosfatos y la adición de iones calcio para estabilizar la molécula enzimática (54, 88, 92). Los niveles de producción alcanzados son inferiores a los obtenidos en el medio de cultivo que se utilizó inicialmente para la selección de la cepa y las condiciones de incubación, utilizando la mezcla tripticasa -extracto de levadura (94).

Los medios se diseñaron para contener el equivalente correspondiente en nitrógeno, sin embargo, la producción no llega a igualarse con la obtenida inicialmente. Posiblemente es debido al tipo de aminoácidos que predominan en el extracto de levadura (ácido glutámico y ácido aspártico) y su contenido de calcio (27, 63). Considerando la estructura de la alfa-amilasa (Tabla VII), en la cual predominan el ácido glutámico y el ácido aspártico (36, 92), se explica que la mayor producción de enzima está relacionada con fuentes de nitrógeno que contengan dichos amino ácidos. También al utilizarse éstos como fuente de nitrógeno (88) la mejor producción se presenta cuando uno de éstos dos aminoácidos proporcionan el nitrógeno (74). Srivastava y Baruah (88) al comparar la producción de alfa-amilasa usando medios complejos que contienen harinas o peptonas, con medios de cultivo sintéticos o semisintéticos, obtuvieron resultados que apoyan los resultados obtenidos en la presente investigación.

La presencia de almidón, como almidón soluble o formando parte de otro componente, favorece la producción (28, 31, 48, 88) como se demuestra al comparar la producción de enzima en presencia de maltosa en lugar del almidón. Srivastava y Baruah (88), al hacer crecer la bacteria en presencia de glucosa, maltosa o sacarosa resulta en una represión de la síntesis de la alfa-amilasa. Si se utiliza maltosa en lugar de almidón, disminuye el grado de crecimiento así como la producción de alfa-amilasa (74, 88). Los resultados obtenidos respecto al comportamiento de la bacteria en presencia de maltosa como inductor confirman lo anterior a excepción de los casaminoácidos como fuente de nitrógeno.

Cuando se utiliza una temperatura de hidrólisis de 70°C, la hidrólisis total del almidón soluble se detecta a los quince minutos y los resultados de azúcares reductores (98%) indican actividad sacarificante a un buen nivel ya que el almidón sacarificado deberá contener al menos de 94 a 96% de glucosa o su equivalente (75). La hidrólisis total a 80°C se alcanza a los tres minutos y medio; la alfa-amilasa experimental, obtenida con la cepa B-8, reduce el tiempo de hidrólisis al subir la temperatura de 70°C a 80°C y el nivel de azúcares reductores se reduce en un 21%. Si la temperatura sube a 90°C, a los 10 minutos se produce un color pardo al realizar la detección de almidón, lo cual indica la presencia de dextrinas de bajo peso molecular junto con los azúcares reductores. Dado que la glucosa y la maltosa son carbohidratos fácilmente fermentables por las levaduras, el poder diastásico de la alfa-amilasa obtenida se confirma al realizar el análisis cromatográfico (46) de los productos de hidrólisis del almidón a 70°C y 80°C. El almidón es hidrolizado a maltosa y glucosa, lo que indica que la enzima cruda obtenida presenta una buena capacidad diastásica y concuerdan con el comportamiento de una enzima alfa-amilasa sacarificante (Tabla XX).

De acuerdo a las características de la enzima que se desea producir, lo ideal sería que la cepa fuera termofílica ya que las

enzimas de este tipo de bacterias presentan actividad y estabilidad a temperaturas superiores a las de incubación y lo mismo sucede con su síntesis (63, 76). Este criterio fué utilizado para emplear 45°C como temperatura de incubación en las etapas finales del trabajo, buscando obtener alfa-amilasa más termoestable y poder subir la temperatura de hidrólisis a 80°C. Las cepas presentan un rango de temperatura óptimo para la producción de alfa-amilasa dentro del cual variaciones de 3°C a 5°C no causan cambios significativos en la formación de la enzima (60). Durante la investigación, al cambiar la temperatura de incubación de 35°C a 45°C hay disminución en la cantidad de enzima formada pero también aumenta su termoestabilidad presentando actividad a 80°C.

Cuando se trabaja con volúmenes mayores en los que la producción de espuma puede afectar el proceso, es necesaria la adición de agentes antiespumantes. Wynes y Lloyd (54) utilizan copolímeros de organo-silicón en la fermentación sumergida de *Bacillus subtilis* para la producción de alfa-amilasa. Se utilizan concentraciones que van de una parte de antiespumante por 20,000 partes de medio de cultivo, hasta diez veces esta cantidad proporcionando un incremento efectivo en la producción de alfa-amilasa como también un buen control de la espuma formada. La concentración recomendada es de una parte de antiespumante por 4,000 partes de medio de cultivo (54). Una ventaja adicional de éste tipo de antiespumante es que no dejan residuos oleosos en el medio de cultivo.

Al llevar la producción a volúmenes mayores, utilizando el medio de tripticasa y extracto de levadura se presenta un descenso en el nivel de producción enzimática aunque el comportamiento de la enzima no cambia en relación a su termorresistencia en presencia de sales de calcio.

La elección del medio de tripticasa - extracto de levadura (48) para probar de nuevo la producción en seis litros de medio de cultivo,

se basa en los niveles de producción enzimática obtenidos en ese medio de cultivo a escala matraz.

El tiempo total del proceso fué de 49 horas. Durante las primeras 5 horas se observa que las mediciones de turbidez indican que el inóculo se encontraba en fase exponencial, como se observa en la gráfica No. 1. Lógicamente al mantenerse una velocidad de crecimiento constante y máxima, el consumo de oxígeno aumenta y en consecuencia la cantidad de oxígeno disuelto disminuye. El consumo de carbohidratos se incrementa tendiendo el pH a disminuir. Después de 8 horas, el ritmo de crecimiento tiende a disminuir aunque la velocidad de consumo de carbohidratos no disminuye, la actividad respiratoria está en su máximo y se incrementa la producción de alfa-amilasa. La fase estacionaria se presenta a las 15 horas y durante ella hay aumento en la producción de amilasa. Se mantiene constante la velocidad de consumo de carbohidratos así como el oxígeno disuelto.

La gráfica presenta un brusco descenso en la actividad detectada de la alfa-amilasa; éste coincide con la entrada del cultivo a la fase letal o de muerte, lo cual se muestra tanto en las mediciones de turbidez como en las de peso seco, sugiriendo la presencia de autólisis. El consumo de carbohidratos tiende a estabilizarse. Este breve período dentro de las 23 a las 49 horas podría explicarse como sigue: al entrar el cultivo en la fase letal y presentar autólisis se liberan proteasas intracelulares causando un descenso en la actividad amilásica detectada. Existe otra posibilidad para explicar la baja producción de amilasa en el reactor y es debido a la producción de proteasas inducibles por las cepas de *Bacillus* (24, 55, 59, 60, 67, 72, 74) junto con las amilasas. Parte de la amilasa producida sería degradada por las proteasas inducibles que alcanzan su actividad máxima a las 10 horas y la alfa-amilasa a las 28 horas (4), por tal motivo, se realiza la detección de proteasas (67) durante el proceso de fermentación manteniéndose prácticamente en niveles bajos y

constantes. Las cepas de *Bacillus* producen 2,3 butanodiol, acetato y lactato, los niveles de ácido (está controlado en el fermentador) y solvente producidos desactivarían la alfa-amilasa (4). Debido a que se controla el pH y permaneció estable, no hay desactivación de la enzima por la producción de ácidos orgánicos y el descenso en producción no fué debido a la producción de solventes y ácidos orgánicos (4, 31). La actividad se incrementa a expensas de componentes presentes en el medio que al ser consumidos por las células, este comportamiento es efectuado por las células que sobreviven a la lisis celular, ocasiona un descenso en el grado de opalescencia del mosto y se detecta por las mediciones de turbidez junto con peso seco. El momento cuando la producción de alfa-amilasa nuevamente llega al nivel que tenía a las 23 horas, concuerda con una estabilización en el peso seco, así como también en azúcares residuales y oxígeno disuelto.

Finalmente la máxima producción se alcanza a las 36 horas, aunque la actividad máxima detectada fué muy baja comparada con los resultados a nivel matraz. Gandhi (31) demostró que generalmente debido a la presencia de altas concentraciones de fuentes de carbono rápidamente metabolizables se ocasiona la represión por catabolitos en la síntesis de alfa-amilasa obteniéndose bajos niveles de actividad. Al observar la gráfica encontramos que cerca de las 10 horas se estabiliza brevemente la producción de amilasa a consecuencia de que el almidón es hidrolizado y se comienzan a liberar azúcares reductores en el medio de cultivo causando inhibición de la producción de enzima debido al efecto de la glucosa que actúa como represor de la síntesis de la enzima (represión por catabolitos) cuando se encuentra en altas concentraciones en el medio de cultivo (71). El descenso en la producción viene tiempo después que la fuente de carbono llega al mínimo valor. Los resultados bajos de actividad enzimática obtenidos en el reactor no concuerdan con las investigaciones de Roychoudhury, Parulekar y Weigand (83) y Markkanen y Bailey

(59), en las cuales la capacidad de síntesis enzimática se mantiene aún en presencia de oxígeno limitante, inclusive, dentro de ciertos límites (0.2/l/min.) causa un incremento en la producción de alfa-amilasa.

Se utilizan diferentes tipos de unidades para medir la actividad de las enzimas hidrolíticas y varían de un fabricante a otro. En diferentes investigaciones se obtienen concentraciones de enzima que varían, en una cepa bacteriana, dependiendo de las condiciones fisiológicas, nutricionales y ambientales en las que se desarrolla la bacteria. La tabla XXX compara los resultados obtenidos, en el presente trabajo, con los resultados de varios investigadores.

La acción de la alfa-amilasa sobre los almidones presentes en los granos de los cereales, depende de la estructura granular porosa que puedan tener y que los haga accesibles a la enzima (97).

El uso de almidón gelatinizado acelera el efecto de la enzima. Los almidones presentes en los granos de los cereales tienen una estructura granular porosa que los hace accesibles a la hidrólisis amilásica (97). Se encuentran en forma de pequeños gránulos cristalinos dentro de capas protectoras y cuando el calentamiento comienza, el agua entra en los gránulos causando una hinchazón, un aumento de volumen. Al expandirse los gránulos se revientan (gelatinización) permitiendo que las enzimas sacarificantes tengan acceso a las moléculas de almidón (47, 100). La gelatinización de los almidones ocurre entre 105°C y 110°C (75).

La hidrólisis de amilosa produce oligosacáridos de bajo peso molecular abarcando desde maltosa a maltohexosa dependiendo del origen y naturaleza de la amilasa. Siendo una amilasa sacarogénica, el almidón se hidrolizaría inicialmente a dextrinas y posteriormente a maltosa y glucosa, que son azúcares libres diferenciándola así de las amilasas liquificantes que no los producen (75).

La cebada carece de amilasa, por ello, al realizar la prueba de detección de almidón en la mezcla de referencia, ésta dá positiva. Los gránulos de almidón en la cebada están compuestos casi enteramente de amilopectina, recubiertos por una capa delgada de proteína y exteriormente por una capa delgada de celulosa, por lo que requiere de un proceso de ruptura para facilitar el ataque enzimático (36, 75). La hidrólisis de la amilopectina produce glucosa, maltosa y una variedad de dextrinas alfa-limitantes ramificadas que contienen enlaces alfa-1,6 del polímero original (75). Al estar presente la alfa-amilasa experimental, los almidones presentes se hidrolizan parcialmente produciendo dextrinas que originan un color pardo al reaccionar con el iodo. Cuando la cebada es gelatinizada se facilita la acción de la alfa-amilasa y se reduce en 20 minutos el tiempo que tarda en detectarse el color pardo. No se presenta hidrólisis total dentro del tiempo límite de la prueba.

La composición promedio de la malta incluye un 59% de almidón y bajas concentraciones de azúcares (65). Cuando se determinan los azúcares reductores en la malta gelatinizada utilizada como referencia, los azúcares detectados corresponden a los azúcares presentes propios de ese tipo de malta, ya que las temperaturas de gelatinización inactivaron completamente la amilasa propia de la malta (tabla XXV). Cuando la malta se encuentra en forma de partículas, su amilasa permanece activa aunque la temperatura utilizada en la hidrólisis (80°C) es superior a su temperatura óptima (60°C-70°C). Al utilizar la alfa-amilasa experimental con la malta gelatinizada se producen 5.25% de azúcares reductores a partir de los almidones presentes. Al restar a los azúcares reductores producidos con la malta, en forma de partículas, y la alfa-amilasa experimental, los producidos por la amilasa presente en la malta y los azúcares presentes en la malta, quedarían 9.05% correspondientes a la acción de la enzima experimental sobre los almidones presentes en la malta. Demostrando con ello su efectividad sobre almidón particulado. La amilasa experimental ha reducido en un 82.5% el

tiempo que tarda en presentarse la hidrólisis total en la suspensión de malta.

El comportamiento de la alfa-amilasa experimental es semejante al de una alfa-amilasa comercial, únicamente se ajusta la concentración de la alfa-amilasa comercial a la concentración de la alfa-amilasa experimental (6,315 u/ml).

Pueba de maceración para evaluar comparativamente la actividad de la enzima.

El tiempo involucrado en el proceso no pudo ser limitado a 1 hora como lo indica la técnica debido a que el extracto está más diluído y se tomó como punto final la prueba de Windish (color azul con iodo).

Los resultados fueron comparables en lo referente a las características generales del mosto, pero el tiempo en que ya no se desarrolla (punto final) el color azul con el iodo (prueba de Windish) es diferente, lo cual indica que tenemos diferencias en la actividad de cada extracto, detalle que puede ser abatido mediante un procedimiento de concentración.

Al comparar los resultados obtenidos con los análisis semejantes realizados en diferentes mostos cerveceros, es posible deducir en base a la concentración de maltosa que la concentración de la alfa-amilasa experimental es 100 veces menor que la del extracto comercial. Respecto al contenido de glucosa y sacarosa, la enzima obtenida presenta una actividad sacarificante mayor que la del extracto comercial (Tabla XXVII).

V. CONCLUSIONES

El comportamiento de la cepa de *Bacillus* aislada a partir de suelo, es estable y reproducible en cuanto a la producción de enzima alfa-amilasa (E.C.3.2.1.1.) a nivel matraz, siendo la máxima actividad obtenida de 4,000 u/ml.

Las condiciones de incubación más favorables para la producción de la alfa-amilasa termoestable son: temperatura de 45°C, agitación de 125 rpm y pH 6.0-7.0.

El medio de cultivo conteniendo extracto de levadura y tripticasa, y el medio de cultivo con harina de soya como fuente de nitrógeno producen los niveles más altos de actividad enzimática.

La adición de almidón al medio de cultivo incrementa la producción de la enzima alfa-amilasa.

La adición de sales de calcio incrementa la termoestabilidad de la enzima presentando buenos niveles de actividad sacarificante a 80°C.

La enzima alfa-amilasa obtenida presenta actividad sacarificante satisfactoria a 70°C.

Considerando la concentración de maltosa detectada en el mosto, la concentración de la enzima experimental es 100 veces menor que la del extracto comercial (Kinase-HT).

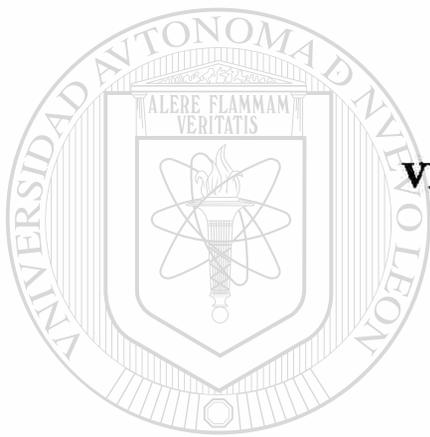
La enzima alfa-amilasa experimental presenta una actividad sacarificante mayor que la del extracto comercial (glucosa y sacarosa).

La enzima alfa-amilasa obtenida experimentalmente tiene capacidad para reducir los almidones presentes en los granos de los cereales utilizados en la industria cervecera.

Analizando las conclusiones obtenidas se llega a comprobar la validez de la hipótesis propuesta: El tratamiento con alfa-amilasa reduce el contenido de almidón residual presente en los granos agotados, provenientes de la maceración de la malta en el proceso de producción de la cerveza. Así como el logro del objetivo propuesto: Producir una amilasa termorresistente, capaz de reducir la cantidad de partículas de almidón residual insoluble presentes en los tratamientos a altas temperaturas (70°C), utilizados durante la maceración de la malta en la industria cervecera.

PERSPECTIVAS

Siendo la enzima obtenida un buen prospecto para su aplicación en la industria cervecera podría mejorarse el nivel de producción de la enzima alfa-amilasa experimental si se consideran variables como: concentración de almidón, concentración de la fuente de nitrógeno, agitación, aereación, etc., durante la fermentación. Estas variables pueden ser modificadas para establecer sus valores óptimos para la formación de la enzima por la cepa nativa.



VI. TABLAS

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA I
UTILIZACIÓN DE AMILASAS EN DIVERSAS INDUSTRIAS

| INDUSTRIA | USO | FUENTE |
|-------------------------|--|-----------------------------|
| Alimento para animales. | Facilitar la digestión en puercos, pollos, etc. | Bacterias, mohos, páncreas. |
| Almidones y mieles. | Producción de mieles de maíz, glucosa. | Bacterias, malta, mohos. |
| Bebidas destiladas. | Licuefacción y sacarificación de almidones. | Bacterias, malta, mohos. |
| Cereales. | Preparar alimentos para bebés y cereales para el desayuno. | Malta, mohos, páncreas. |
| Cervecería. | Maceración. | Bacterias, malta. |
| Chocolate, cocoa. | Mieles. | Bacterias, mohos. |
| Confitería, dulcería. | Recuperación de azúcar a partir de dulces escarpados. | Bacterias, mohos. |
| Farmacéutica. | Auxiliares para la digestión. | Bacterias, mohos, páncreas. |
| Fotografía. | Recuperación de la plata de las películas usadas. | Mohos. |
| Frutas y jugos. | Remover almidones de la pectina. | Mohos. |
| Lavandería. | Remover manchas, almidones solubles en frío. | Bacterias, mohos, páncreas. |
| Panificadora. | Complemento de la harina horneada de panes. | Bacterias, malta, mohos. |
| Papel. | Modificación del tamaño de los almidones, revestimientos. | Bacterias. |
| Saborizantes. | Clarificación, remoción de almidones. | Mohos. |
| Textiles. | Reducción del tamaño de la molécula de almidón. | Bacterias, mohos, páncreas. |
| Tintorería. | Remover manchas. | Bacterias, mohos, páncreas. |

FUENTE: Miller - Litsky, Industrial Microbiology, Mc. Graw Hill Book Co. 1976

TABLA II
IMPORTACIONES DE AMILASAS EN LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
(Amilasas, proteasas y mezclas de amilasas-proteasas)

| PAÍS | CANTIDAD (Kilogramos) | VALOR (Millones de pesos) |
|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| Alemania (República Federal) | 14330 | 254 |
| Barbados | 100 | 6 |
| Bélgica | 16250 | 89 |
| Dinamarca | 54194 | 1615 |
| Estados Unidos | 29127 | 725 |
| Francia | 38446 | 571 |
| Holanda | 972 | 117 |
| Japón | 3700 | 238 |
| Suecia | 300 | 21 |
| Suiza | 8501 | 81 |
| Total | 165920 | 3717 |

FUENTE: INEGI, Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos. Importación. Tomo II. 1991.

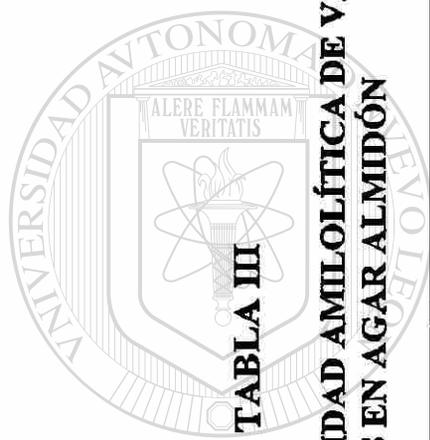


TABLA III

DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA DE VARIAS CEPAS NATIVAS EN AGAR ALMIDÓN

| CEPA | ZONA DE HIDRÓLISIS (mm de diámetro) |
|-------------|--|
| B-3 | 0.9 |
| B-7 | 1.5 |
| B-8 | 2.6 |
| B-16 | 1.4 |
| B-18 | 1.6 |
| B-19 | 1.1 |
| B-30 | 2.4 |
| B-55 | 2.4 |

TABLA IV

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA PRODUCIDA POR VARIAS CEPAS NATIVAS

| CEPA | TIEMPO DE DECOLORACIÓN (min.) | | |
|------|-------------------------------|------|------|
| | 35°C | 45°C | 55°C |
| B-3 | 40 | 40 | * |
| B-7 | 15 | 8 | * |
| B-8 | 10 | 6 | 5 |
| B-16 | 25 | 6 | * |
| B-18 | 18 | 40 | * |
| B-19 | 40 | 40 | * |
| B-20 | 40 | 40 | 40 |
| B-30 | 12 | 6 | 5 |
| B-55 | 14 | 5 | 6 |

* No hay crecimiento.

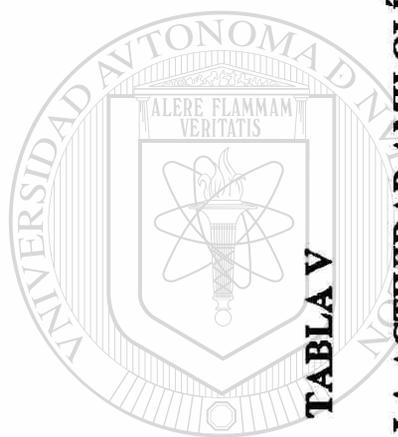


TABLA V

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA DE
VARIAS CEPAS NATIVAS EN CULTIVOS AGITADOS**

| CEPA | %T | Actividad (u/ml) | | |
|------|----|---------------------------|------|------|
| | | Temperatura de hidrólisis | | |
| | | 40°C | 60°C | 80°C |
| B-8 | 14 | 2600 | 2400 | 108 |
| B-30 | 15 | 2934 | 2571 | 108 |
| B-55 | 15 | 3334 | 3314 | 0 |

TABLA VI

COMPOSICIÓN GENERAL DE LAS PEPTONAS

| COMPONENTE (g/100 g) | CARNE | CASAMIN O ÁCIDOS | TRÍPTICASA | SOYA | EXTRACTO DE LEVADURA |
|-------------------------|--------|------------------------|------------|---------|-------------------------|
| Nitrógeno total | 12.8 | 8.0 | 11.7 | 9.2 | 10.5 |
| Amino nitrógeno | 3.3 | 6.4 | 3.5 | 1.8 | 4.8 |
| Carbohidratos | + | 0.0 | 0.0 | 37.0 | 8.2 |
| Cloruros (como NaCl) | 2.3 | 37.2 | 0.5 | 4.4 | 1.3 |
| Calcio | 0.05 | 0.05 | 0.35 | 0.05 | 0.01 |
| Hierro | 0.02 | 0.0045 | 0.03 | 0.02 | 0.005 |
| Potasio | 1.4 | 0.4 | 0.24 | 3.99 | 3.0 |
| Magnesio | 0.05 | 0.003 | 0.03 | 0.19 | 0.2 |
| Fósforo | 0.6 | 0.32 | 0.65 | 0.38 | 1.16 |
| Azufre | 1.0 | 0.066 | 0.73 | 0.39 | -- |
| Vitamina (mcg/g) | | | | | |
| Biotina | 0.18 | 0.018 | 0.083 | 0.35 | 1.0 |
| Colina | 1980.0 | 0.0 | 0.0 | 3.05 | 2000.0 |
| Cianocobalamina | 0.5 | 0.00006 | 0.45 | 0.00115 | 0.01 |
| Ácido fólico | 1.17 | 0.0057 | 0.67 | 0.81 | 10.0 |
| Niacina | 212.0 | 0.10 | 8.0 | 33.0 | 400.0 |
| Ácido pantoténico | 8.9 | 0.26 | 2.2 | 7.6 | 100.0 |
| Piridoxina | 3.2 | 0.024 | 5.75 | 4.3 | 50.0 |
| Tiamina | + | 0.105 | + | 1.9 | 100.0 |
| PABA | 0.66 | -- | 0.21 | 5.4 | 6.0 |

FUENTE:

Becton. Dickinson de México, S.A. de C.V 1974. Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos BBL. 5a. Ed. Editores Asociados, S.A. México
 12.D.F.
 Bridson. E.Y. y A. Brecker (15).

TABLA VII
COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS DE LAS PEPTONAS
CON ALFA-AMILASA SACARIFICANTE DE *Bacillus subtilis*

| Aminoácido (g/100g) | ALFA-AMILASA | CASAMINOACIDOS | TRIPTICASA | SOYA | EXTRACTO DE LEYADURA |
|---------------------|--------------|----------------|------------|------|----------------------|
| Alanina | 6.11 | 2.4 | -- | -- | 3.0 |
| Arginina | 5.29 | 1.4 | 2.6 | 4.6 | 2.0 |
| Ácido aspártico | 16.44 | 3.7 | 5.1 | 5.8 | 4.5 |
| Cistina | 0.32 | 0.3 | 0.3 | 0.5 | 0.45 |
| Ácido glutámico | 11.02 | 14.2 | 17.0 | 9.3 | 6.7 |
| Glicina | 4.82 | 1.0 | 1.8 | 2.8 | 2.3 |
| Histidina | 3.69 | 0.7 | 2.4 | 1.6 | 1.2 |
| Isoleucina | 6.15 | 2.7 | 5.0 | 2.5 | 2.3 |
| Leucina | 6.09 | 3.5 | 7.1 | 3.2 | 3.0 |
| Lisina | 4.87 | 3.7 | 5.3 | 3.6 | 3.5 |
| Metionina | 1.80 | 1.7 | 2.4 | 0.6 | 0.7 |
| Fenilalanina | 4.36 | 0.7 | 3.8 | 3.6 | 1.7 |
| Prolina | 2.60 | 4.0 | 11.5 | 3.4 | 1.7 |
| Serina | 8.46 | 9.6 | -- | -- | 2.3 |
| Treonina | 6.24 | 2.5 | 3.5 | 1.8 | 2.3 |
| Triptófano | -- | 0.0 | 0.9 | 0.7 | 0.5 |
| Tirosina | 5.84 | 3.1 | 2.3 | 1.9 | 1.6 |
| Valina | 4.61 | 4.1 | 5.6 | 2.0 | 2.5 |

FUENTES: Becton, Dickinson de México, S.A. de C.V. 1974. Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos BBL. 5a.Ed. Editores Asociados, S.A. México 12, D.F.
 Bridson, E.Y. y A. Brecker (15).
 Takagi, T., H. Toda y T. Isemura (92).

TABLA VIII

TOLERANCIA AL INCREMENTO EN LA TEMPERATURA DE HIDRÓLISIS DE LA ENZIMA ALFA-AMILASA PRODUCIDA POR VARIAS CEPAS NATIVAS

| CEPA | Actividad (u/ml) | | | |
|------|---------------------------|-------|------|------|
| | Temperatura de hidrólisis | | | |
| | 50°C | 60°C | 70°C | 80°C |
| B-3 | 56 | 56 | 61 | 0 |
| B-8 | >400 | >4000 | 3522 | 108 |
| B-16 | 153 | 374 | 46 | 0 |
| B-30 | 364 | 3641 | 3522 | 108 |
| B-55 | >400 | 3976 | 3762 | 0 |



TABLA IX

INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA

| CEPA | Actividad (u/ml) | Velocidad de agitación (rpm) |
|-------------|-------------------------|-------------------------------------|
| B-8 | 3117 | 2400 |
| B-30 | 3820 | 2571 |
| B-55 | 1278 | 314 |

JANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA X

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA POR TRES CEPAS NATIVAS

| Temperatura de incubación °C | Tiempo horas | Cepa B-8 | | Cepa B-30 | | Cepa B-30 | |
|------------------------------|--------------|----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|
| | | % T | Actividad* u/ml | % T | Actividad* u/ml | % T | Actividad* u/ml |
| 35 | 0 | 82 | 0 | 82 | 0 | 80 | 0 |
| | 24 | 38 | 1142 | 70 | 0 | 39 | 37 |
| | 48 | 26 | 3970 | 15 | 4000 | 10 | 1278 |
| | 72 | 13 | 2571 | 11 | 3330 | 7 | 1133 |
| 45 | 0 | 82 | 0 | 82 | 0 | 80 | 0 |
| | 24 | 30 | 1368 | 78 | 1425 | 29 | 548 |
| | 48 | 26 | 1250 | 36 | 316 | 27 | 1857 |
| | 72 | 20 | 210 | 33 | 195 | 24 | 158 |
| 55 | 0 | 83 | 0 | 81 | 0 | 83 | 0 |
| | 24 | 81 | 0 | 77 | 0 | 81 | 0 |
| | 48 | 76 | 222 | 60 | 111 | 32 | 338 |
| | 72 | 72 | 115 | 63 | 57 | 28 | 134 |

* Wilson - Ingledew (70°C)

TABLA XI

EFFECTO DEL pH DEL MEDIO DEL CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA POR TRES CEPAS NATIVAS Y LA CEPA DE REFERENCIA B-L

| pH | Tiempo horas | Cepa B-8 | | Cepa B-30 | | Cepa B-55 | | Cepa B-L | |
|-----|--------------|----------|----------------|-----------|----------------|-----------|----------------|----------|----------------|
| | | %T | Actividad u/ml | %T | Actividad u/ml | %T | Actividad u/ml | %T | Actividad u/ml |
| 6.0 | 0 | 80 | 0 | 78 | 0 | 81 | 0 | 80 | 0 |
| | 24 | 26 | 1668 | 12 | 0 | 6 | 250 | 28 | 1736 |
| | 48 | 40 | 2970 | 7 | 28 | 4 | 157 | 22 | 3792 |
| 7.0 | 0 | 81 | 0 | 80 | 0 | 80 | 0 | 82 | 0 |
| | 24 | 28 | 1921 | 22 | 0 | 6 | 250 | 27 | 1578 |
| | 48 | 28 | 3970 | 7 | 78 | 5 | 338 | 21 | 3970 |
| 8.0 | 0 | 80 | 0 | 80 | 0 | 81 | 0 | 79 | 0 |
| | 24 | 27 | 1605 | 16 | 416 | 7 | 0 | 25 | 1736 |
| | 48 | 11 | 3970 | 13 | 287 | 7 | 210 | 29 | 3970 |

TABLA XII
PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA EN DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO
POR VARIAS CEPAS NATIVAS

| Fuente de nitrógeno | Cepa B-8 | Cepa B-30 | Cepa B-55 |
|----------------------|---------------|----------------|---------------|
| | Biomasa mg/ml | Actividad u/ml | Biomasa mg/ml |
| Peptona de carne | 44.16 | 421.0 | 52.0 |
| Peptona de soya | 45.49 | 1825.0 | 1756.0 |
| Peptona de caseína | 37.18 | 52.0 | 552.0 |
| Extracto de levadura | | 169.0 | 658.0 |

Notas: Temperatura de incubación de 45°C. Actividad enzimática a 70°C.
 -- No determinado.

TABLA XIII

INFLUENCIA DEL INDUCTOR EN LA PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA EN DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO

| CEPA | B-8 | B-30 | B-55 |
|---------------------|------------------------------|------|------|
| FUENTE DE NITRÓGENO | Actividad enzimática (u/ml)* | | |
| Casaminoácidos | 166 | 98 | 0 |
| Casitona | 237 | 98 | 129 |
| Harina de soya | 325 | 148 | 0 |
| Harina de trigo | 105 | 32 | 0 |
| Peptona de soya | 309 | 206 | 43 |
| | Inductor: almidón | | |
| Casaminoácidos | 285 | 239 | 0 |
| Casitona | 71 | 0 | 0 |
| Harina de soya | 295 | 110 | 0 |
| Harina de trigo | 76 | 30 | 0 |
| Peptona de soya | 253 | 181 | 34 |
| | Inductor: maltosa | | |

* Wilson-Ingledew (80°C)

TABLA XIV

INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA POR LA CEPA B-8 A 45°C

| FUENTE DE NITÓGENO | INDUCTOR | Actividad enzimática (u/ml) | |
|---------------------------|----------|-----------------------------|------|
| | | 70°C | 80°C |
| Agitación: 125 rpm | | | |
| Casaminoácidos | Maltosa | 518 | 285 |
| Harina de soya | Almidón | 854 | 325 |
| Peptona de soya | Almidón | 836 | 309 |
| Agitación: 250 rpm | | | |
| Casaminoácidos | Maltosa | 335 | 185 |
| Harina de soya | Almidón | 183 | 243 |
| Peptona de soya | Almidón | 387 | 193 |

**PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA EN HARINA Y PEPTONA DE SOYA
POR LA CEPA B-8 A 45°C**

TABLA XV

| pH | Actividad enzimática (u/ml)* |
|-----------|--|
| | Harina de soya Peptona de soya |
| | Inductor: almidón |
| 6 | 1274 741 |
| 7 | 1458 900 |
| | Inductor: maltosa |
| 6 | 185 565 |
| 7 | 245 598 |

* Wilson-Ingledew (80°C)

TABLA XVI

**PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA EN HARINAS POR LA CEPA B-8 A 45°C.
EFECTO EL USO DEL AGUA POTABLE EN EL MEDIO DE CULTIVO**

| FUENTE DE NITRÓGENO | | Actividad enzimática (u/ml)* |
|---------------------|------|------------------------------|
| Inductor: almidón | | |
| Harina de soya | 1295 | 1546 |
| Harina de trigo | 35 | 24 |
| Inductor: maltosa | | |
| Harina de soya | 148 | 251 |
| Harina de trigo | 0 | 14 |

* Wilson-Ingledeew (80°C)

TABLA XVII

ACTIVIDAD DE LA ALFA-AMILASA PRODUCIDA POR LA CEPA B-8 AL CRECER EN UN MEDIO CON HARINA DE SOYA COMO FUENTE DE NITRÓGENO

| AGUA | | Actividad enzimática (u/ml)* | |
|----------------------|-------------------|------------------------------|------|
| | | 80°C | 85°C |
| DESTILADA POTABLE | Inductor: almidón | 1321 | 1227 |
| | | 1521 | 1395 |
| DESTILADA POTABLE | Inductor: maltosa | 198 | 0 |
| | | 254 | 241 |

TABLA XVIII

CONDICIONES FISIOLÓGICAS MÁS PROPICIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA TERMORRESISTENTE POR LA CEPA B-8

| COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO | |
|---|------------|
| Constituyente | g/l |
| Harina de soya | 50.00 |
| KH_2PO_4 | 0.75 |
| K_2HPO_4 | 1.75 |
| CaCO_3 | 0.10 |
| Almidón soluble | 10.0 |
| Agua potable | 1.0 |
| CONDICIÓN DE INCUBACIÓN | |
| Factor | g/l |
| Temperatura | 45°C |
| Agitación | 125 rpm |
| pH | 7.0 |
| Tiempo | 48 horas |

NOTA: Se requiere extraer la enzima con buffer de fosfatos y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

TABLA XIX

COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS Y DE CRECIMIENTO DE LA CEPA B-8 CON VARIAS ESPECIES DE *Bacillus*

| PRUEBA | <i>subtilis</i> | <i>licheniformis</i> | <i>cereus</i> | B8 |
|---|-----------------|----------------------------------|---------------|---------|
| MORFOLOGÍA | | | | |
| 1 Gram | + | + | + | + |
| 2 Motilidad | + | + | + | + |
| Espora: | | | | |
| 3 Forma | Oval | Oval | Oval | Oval |
| 4 Posición | Central | Central | Central | Central |
| 5 Distensión del esporangio | - | - | - | - |
| 6 Ensanchamiento | - | - | - | - |
| FISIOLOGÍA | | | | |
| Crecimiento en: | | | | |
| 7 NaCl 7% | + | + | + | + |
| 8 Agar anaeróbico | - | + | + | + |
| 9 A 45°C | + | + | d | + |
| 10 Temperatura máxima de crecimiento (°C) | 45-55 | 50-55 | 35-45 | 55 |
| BIOQUÍMICA | | | | |
| Ácido de: | | | | |
| 11 Arabinosa | + | + | - | - |
| 12 Xilosa | + | + | - | - |
| 13 Manitol | + | + | - | + |
| 14 Glucosa | + | + | + | + |
| 15 Indol | - | - | - | - |
| 16 Voges Proskauer | + | + | + | + |
| 17 Citratos | + | + | + | - |
| 18 Agar Citrato de Simmons | + | + | + | + |
| 19 Nitrato a nitrito | + | N ₂ ,N ₂ O | | |
| 20 Amilasa | + | + | + | + |
| 21 Catalasa | + | + | + | + |
| 22 Yema de huevo | - | - | + | - |
| 23 Caseína hidrolizada | + | + | + | + |
| 24 Ureasa | d | d | d | - |
| 25 Gelatinasa | + | + | + | + |

Continuación de la tabla XIX

CRECIMIENTO

Bacillus subtilis

Colonias en medio con agar son redondas o irregulares; superficie mate; y viene a ser espesor grueso o densa y opaco.

Bacillus licheniformis

Las colonias en medios con agar son opacas con superficie mate o rugosa; comúnmente presentan excrecencias como pelos; usualmente se adhiere fuertemente el agar; su elevación y lóbulos consisten en su mayor parte de limo que a menudo se acumula en la colonia, especialmente en glucosa-agar.

Bacillus cereus

El bacilo tiende a presentarse en cadenas; la estabilidad de las cadenas determina la forma de la colonia, la cual varía grandemente en diferentes cepas. Por un extremo la colonia tiene una apariencia mate o semejante a vidrio esmerilado y un margen ondulado. En el otro extremo las colonias forman excrecencias como raíces las cuales se extienden ampliamente sobre la superficie del agar. Las excrecencias son enredadas o eumarañadas de manera irregular o formando curvas dextrógiras o levógiras en diferentes cepas.

CEPA B-8.

Medio de cultivo: Agar almidón.

Temperatura: 37°C.

Colonias grandes, en el centro una estrella blanca, con bordes crema, granulosa, ligeramente elevada del centro opaca, redonda, seca, dura.

Medio de cultivo: Caldo tripticasa-extracto de levadura.

Temperatura: 35°C

Cultivo estático: Formación de una película densa que tiende a ascender por las paredes del recipiente. No hay turbidez.

Cultivo agitado: Crecimiento disperso uniformemente en el líquido (turbidez uniforme).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



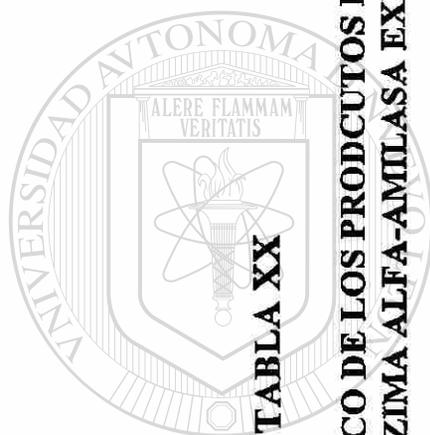


TABLA XX

ANÁLISIS CROMATOGRAFICO DE LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN POR LA ENZIMA ALFA-AMILASA EXPERIMENTAL

| Temperatura de Hidrólisis | % Azúcares reductores | | |
|---------------------------|-----------------------|---------|--------------|
| | Maltosa | Glucosa | Fructosa |
| 70°C | 72.50 | 11.25 | 14.25 |
| 80°C | 51.75 | 9.00 | 16.50 |
| 90°C | 38.25 | 0.00 | 13.50 |
| | | | Total |
| | | | 98.00 |
| | | | 77.25 |
| | | | 51.75 |

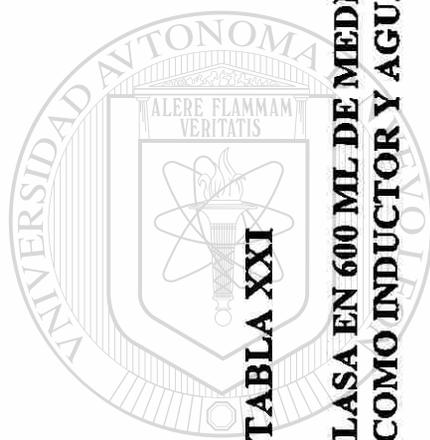


TABLA XXI

**PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA EN 600 ML DE MEDIO DE CULTIVO
UTILIZANDO ALMIDÓN COMO INDUCTOR Y AGUA POTABLE**

| FUENTE DE NITRÓGENO | pH | Actividad (u/ml) |
|-----------------------------|-------------|-------------------------|
| Peptona de soya | 6.75 | 783 |
| Extracto de levadura | 6.80 | 751 |
| Harina de soya | 6.70 | 855 |

TABLA XXII

RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE EL PROCESO EN LA PRODUCCIÓN ALFA-AMILASA EN UN FERMENTADOR CON UN VOLUMEN DE SEIS LITROS DE MEDIOS DE CULTIVO

| Tiempo | Turbidez % T | Peso seco mg/ml | Azúcares mg/ml | Actividad* w/ml | pH | D.O. mgO₂/l |
|---------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------|-----------------------------------|
| 0 | 77 | 1.35 | 7.500 | 15.0 | 6.95 | 17 |
| 4 | 52 | 1.96 | 7.620 | 21.8 | 6.95 | 16 |
| 8 | 35 | 2.36 | 5.950 | 197.4 | 6.95 | 6 |
| 12 | 30 | 2.50 | 4.490 | 197.5 | 6.92 | 8 |
| 15 | 26 | 3.06 | 3.480 | 279.8 | 6.92 | 7 |
| 23 | 26 | 3.46 | 1.770 | 346.7 | 6.92 | 9 |
| 25 | 28 | 2.48 | 1.640 | 211.0 | 6.95 | 10 |
| 26 | 27 | 2.42 | 1.610 | 295.0 | 6.95 | 10 |
| 28 | 28 | 2.30 | 1.520 | 390.5 | 6.95 | 10 |
| 30 | 30 | 2.26 | 1.450 | 398.0 | 6.95 | 10 |
| 36 | 32 | 2.26 | 1.380 | 583.0 | 6.97 | 14 |
| 49 | 37 | 2.24 | 1.240 | 490.0 | 7.05 | 10 |

* Actividad a 80°C

TABLA XXIII
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PROTEASAS
DURANTE LA PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASAS

| Tiempo de Producción Horas | 3 | 7 | 24 |
|--|-----|-----|-----|
| Diámetro de la zona de hidrólisis (mm) | | | |
| 4 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 15 | 0.4 | 0.7 | 1.0 |
| 26 | 0.3 | 0.6 | 0.9 |
| 36 | 0.4 | 0.8 | 1.1 |

TABLA XXIV

ACCIÓN AMILOLÍTICA DE LA ALFA-AMILASA EXPERIMENTAL SOBRE LA CEBADA Y LA MALTA A 80°C

| Sustrato | Estado físico | Tiempo de decoloración (min.) | |
|----------|---------------|-------------------------------|--------------|
| | | Control | Alfa-amilasa |
| Cebada | Particulada | 180.0* | 120.0** |
| | Gelatinizada | 180.0* | 100.0** |
| Malta | Particulada | 20.0 | 3.5 |
| | Gelatinizada | 170.0* | 5.0 |

* Color azul oscuro

** Color pardo

ENZIMA: 6,314 U/ML

Temperatura de hidrólisis 80°C

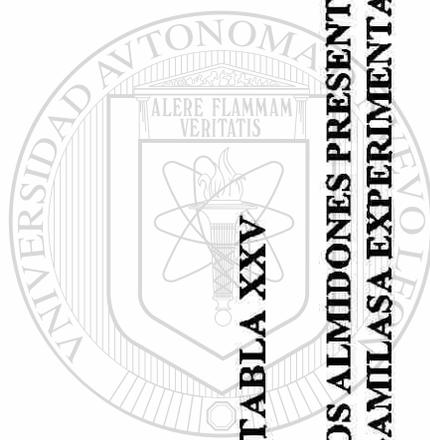


TABLA XXV

**GRADO DE HIDRÓLISIS DE LOS ALMIDONES PRESENTES EN LA MALTA
POR LA ALFA-AMILASA EXPERIMENTAL**

| Sustrato | Estado físico | Azúcares reductores (g/100 ml) | |
|----------|---------------|--------------------------------|--------------|
| | | Control | Alfa-amilasa |
| Malta | Particulada | 7.27 | 16.32 |
| | Gelatinizada | 2.09 | 7.34 |

Temperatura de hidrólisis de 80°C.

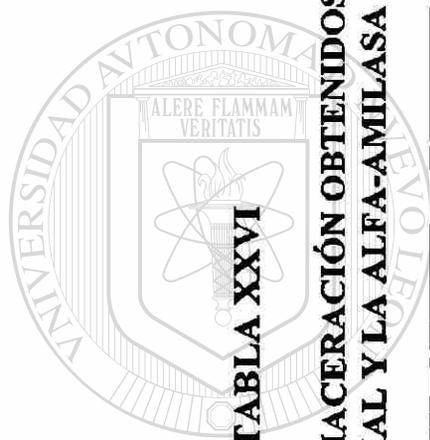


TABLA XXVI

DATOS EXPERIMENTALES DE MACERACIÓN OBTENIDOS MEDIANTE EL USO DE UN EXTRACTO COMERCIAL Y LA ALFA-AMILASA EXPERIMENTAL

| ANÁLISIS | MOSTO EXTRACTO COMERCIAL | ALFA-AMILASA EXPERIMENTAL |
|-----------------|---|--------------------------------------|
| Gravedad | 14-15°P | 14°P |
| Color | 5.25 | 5.00 |
| pH | 5.40 | 5.38 |

TABLA XXVII

DATOS EXPERIMENTALES DE MACERACIÓN OBTENIDOS MEDIANTE EL USO DE UN EXTRACTO COMERCIAL Y LA ALFA-AMILASA EXPERIMENTAL

| MOSTO | °P | MALTOSA % | GLUCOSA % | FRUCTOSA % |
|----------------------------|------|--------------|--------------|---------------|
| A | 15.4 | 9.39 | 0.94 | 0.11 |
| B | 15.1 | 7.83 | 1.48 | 0.20 |
| C | 14.3 | 8.75 | 0.94 | 0.12 |
| D | 15.8 | 9.32 | 0.83 | 0.14 |
| E | 14.1 | 9.02 | 0.76 | 0.12 |
| Enzima experimental | 14.0 | 0.097 | 0.015 | 0.019 |

TABLA XXVIII
CONTENIDO DE NITRÓGENO DE LAS HARINAS UTILIZADAS

| COMPONENTE (g/100g) | HARINA SOYA | HARINA TRIGO |
|---------------------|----------------|-----------------|
| Nitrógeno total | 5.30 | 3.33 |
| Proteína | 29.50 | 18.96 |

Datos proporcionados por el Departamento de Servicios Profesionales de la Facultad de Ciencias Químicas, U.A.N.L.

TABLA XXIX
COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGUA POTABLE

| DETERMINACIÓN | VALOR |
|---|-------|
| Conductividad específica (Micromhos/Cm) | 600.0 |
| Dureza total (como ppm de CaCO ₃) | 290.0 |
| Dureza de calcio (como ppm de CaCO ₃) | 240.0 |
| Dureza de magnesio (como ppm de CaCO ₃) | 30.0 |
| Alcalinidad a la fenolftaleína (como ppm de CaCO ₃) | 0.0 |
| Alcalinidad al naranja de metilo (como ppm de CaCO ₃) | 160.0 |
| Cloruros (como ppm de Cl ⁻) | 35.0 |
| Sulfatos (como ppm de SO ₄ ²⁻) | 146.0 |
| Potencial de hidrógeno (pH) | 7.6 |

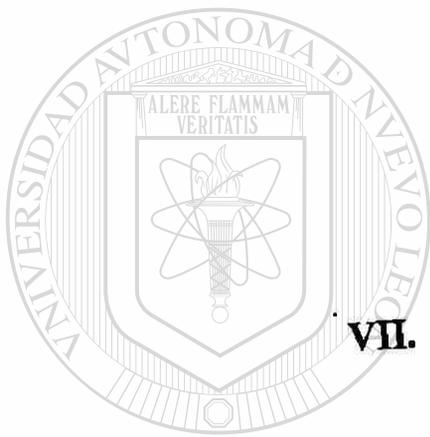
Datos proporcionados por el Departamento de Servicios Profesionales de la Facultad de Ciencias Químicas, U.A.N.L.

TABLA XXX

PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA EN PROCESOS DE FERMENTACIÓN SEMEJANTES AL REALIZADO

| MICROORGANISMO | FUENTE DE NITRÓGENO | ACTIVIDAD ENZIMÁTICA | REFERENCIA |
|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|------------|
| <i>B. amyloquefaciens</i> | Extracto de levadura | 6500.0 LAU/ml ¹ | 4 |
| <i>B. caldolyticus</i> | Casitona | 18000.0 U/g ² | 28 |
| <i>B. subtilis</i> | Peptona | 1440.0 KNU/ ³ | 31 |
| <i>B. subtilis</i> | Cebada/Malta | 770.0 u/ml ⁴ | 59 |
| <i>B. stearothermophilus</i> | Peptona | 21.3 U/mg ⁵ | 88 |
| <i>B. licheniformis</i> | Extracto de levadura/Casitona | | Tesis |
| | Matraz | 4000.0 u/ml ⁶ | |
| | Fermentador | 583.0 u/ml ⁶ | |

- 1 LAU.- Una unidad liquificante de alfa-amilasa hidroliza 1ug de almidón soluble/min. en las condiciones de la hidrólisis.
- 2 U.- Correlaciona la concentración de amilasa en una unidad arbitraria y la diferencia de absorbencia con el reactivo de iodo, antes y después del período de incubación.
- 3 KNU.- Una unidad (NU) es definida como la cantidad de enzima que en condiciones estándar, en una hora hidroliza 5.26 mg de almidón.
- 4 u.- Una unidad de actividad es la cantidad de enzima que libera grupos reductores de una solución al 1% de almidón soluble de Lintner (Merck) en tres minutos, correspondiendo a 1 mg de maltosa.
- 5 U.- Una unidad sacarificante es la cantidad de enzima requerida para liberar 1 mg de maltosa por minuto.
- 6 u.- Una unidad de alfa-amilasa es la cantidad de enzima que hidrolizará 0.1 mg de almidón en 10 minutos, cuando 4.0 mg de almidón estén presentes.



VII. FIGURAS

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

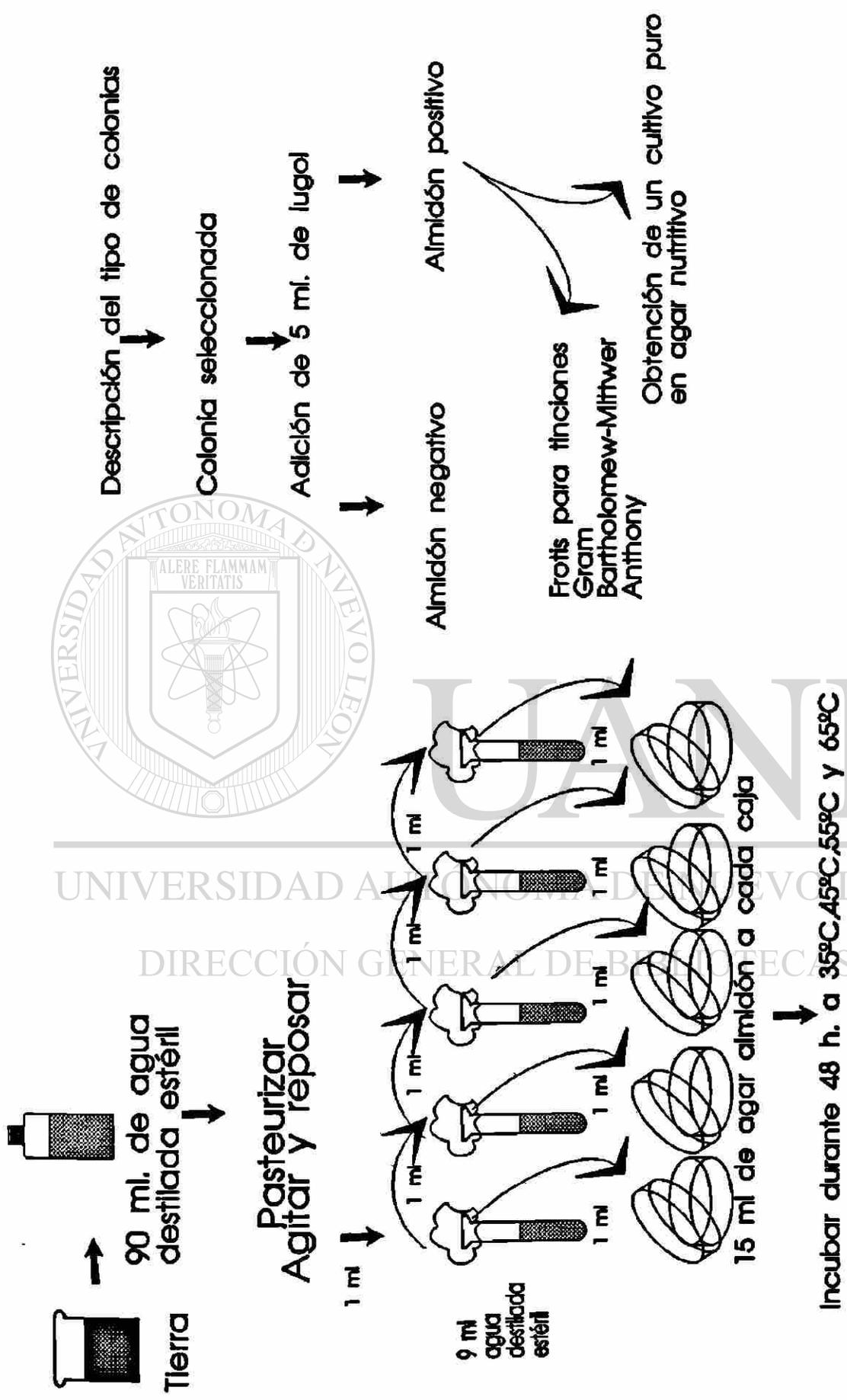


Figura No. 1 Método de aislamiento para la obtención de un cultivo puro de una bacteria productora de amilasa.

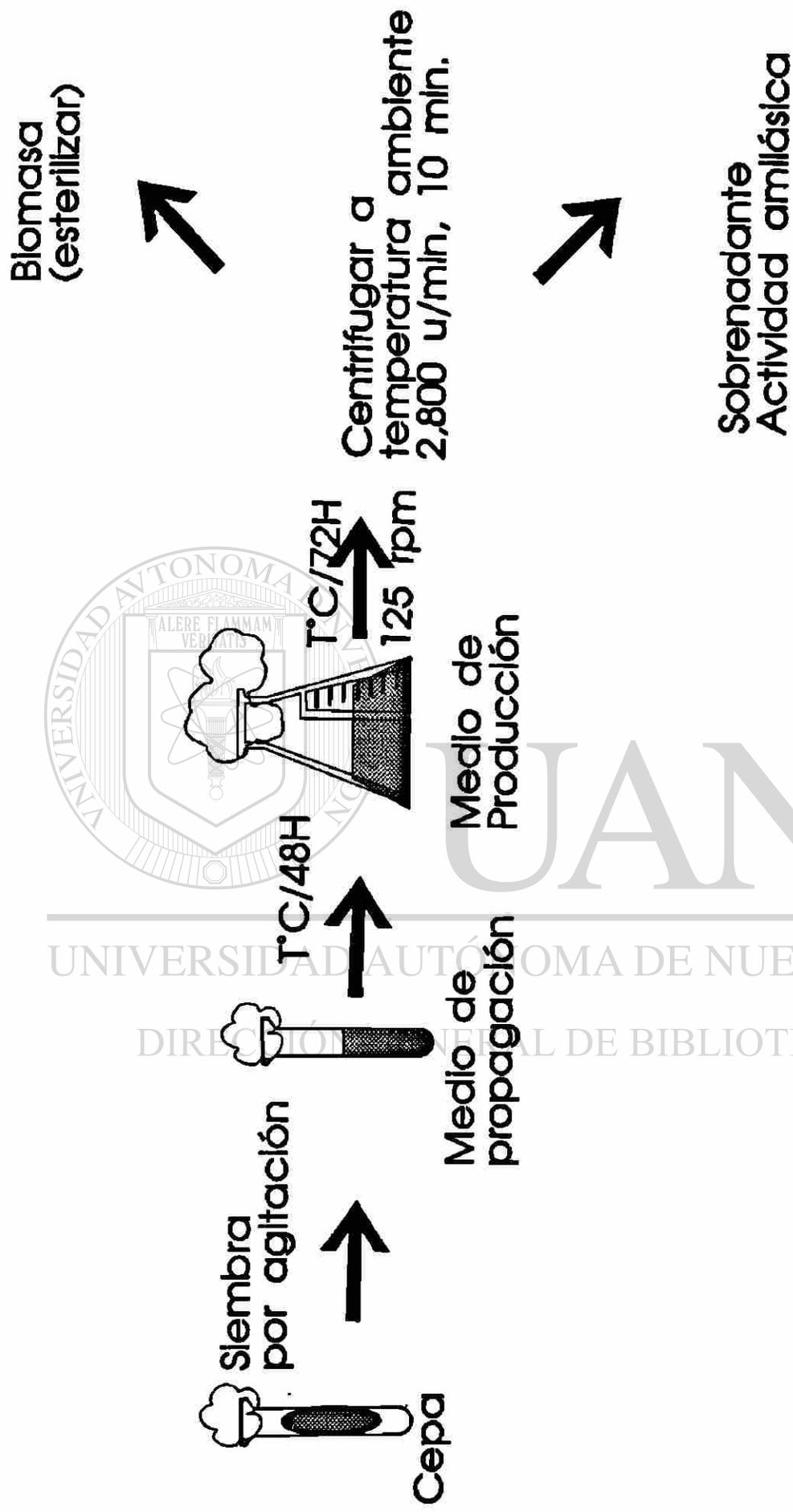


Figura No. 2 Ensayo preliminar para la selección de la cepa productora de amilasa.

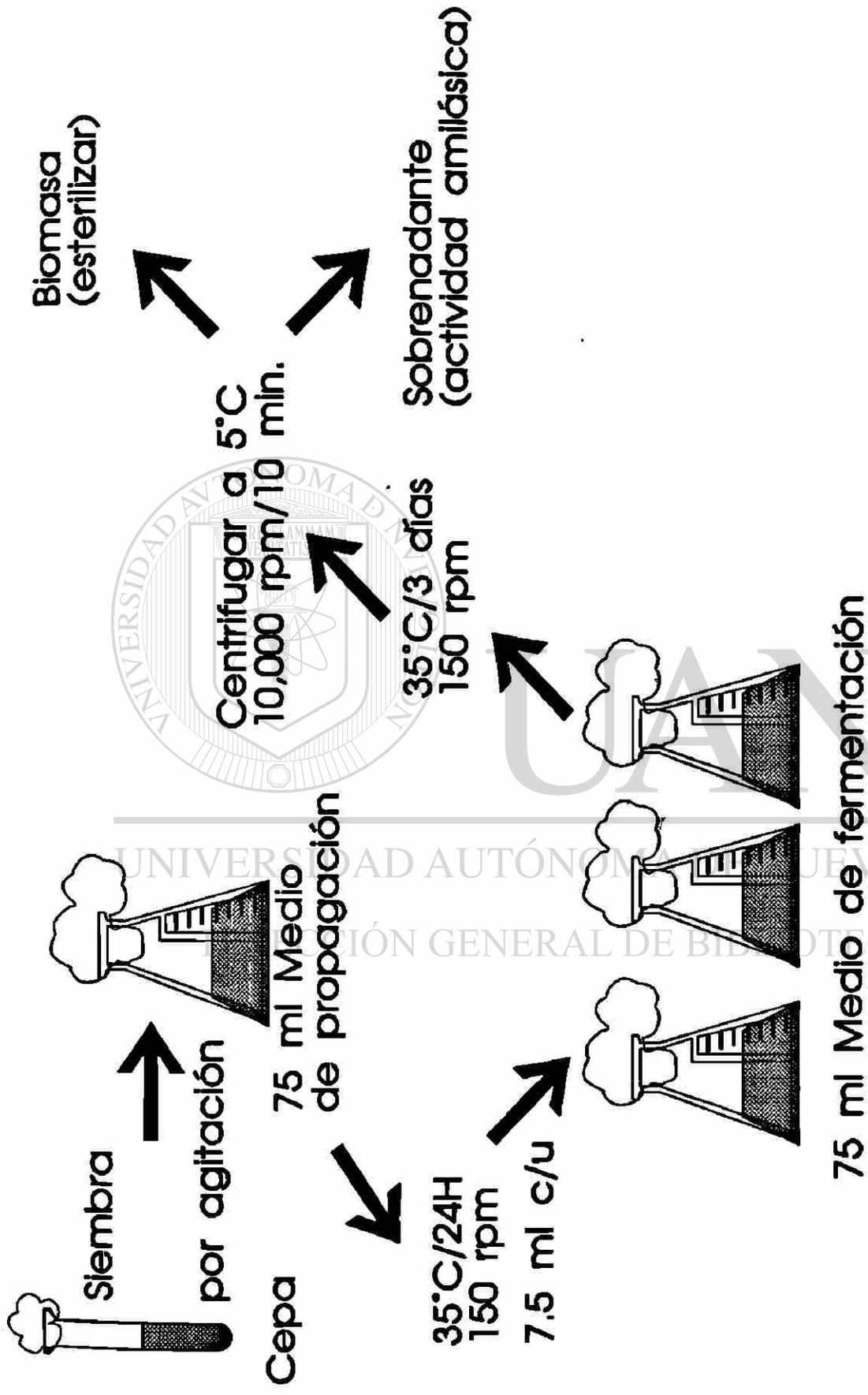


Figura No. 3 Procedimiento empleado para confirmar la selección de la cepa productora de amilasa.

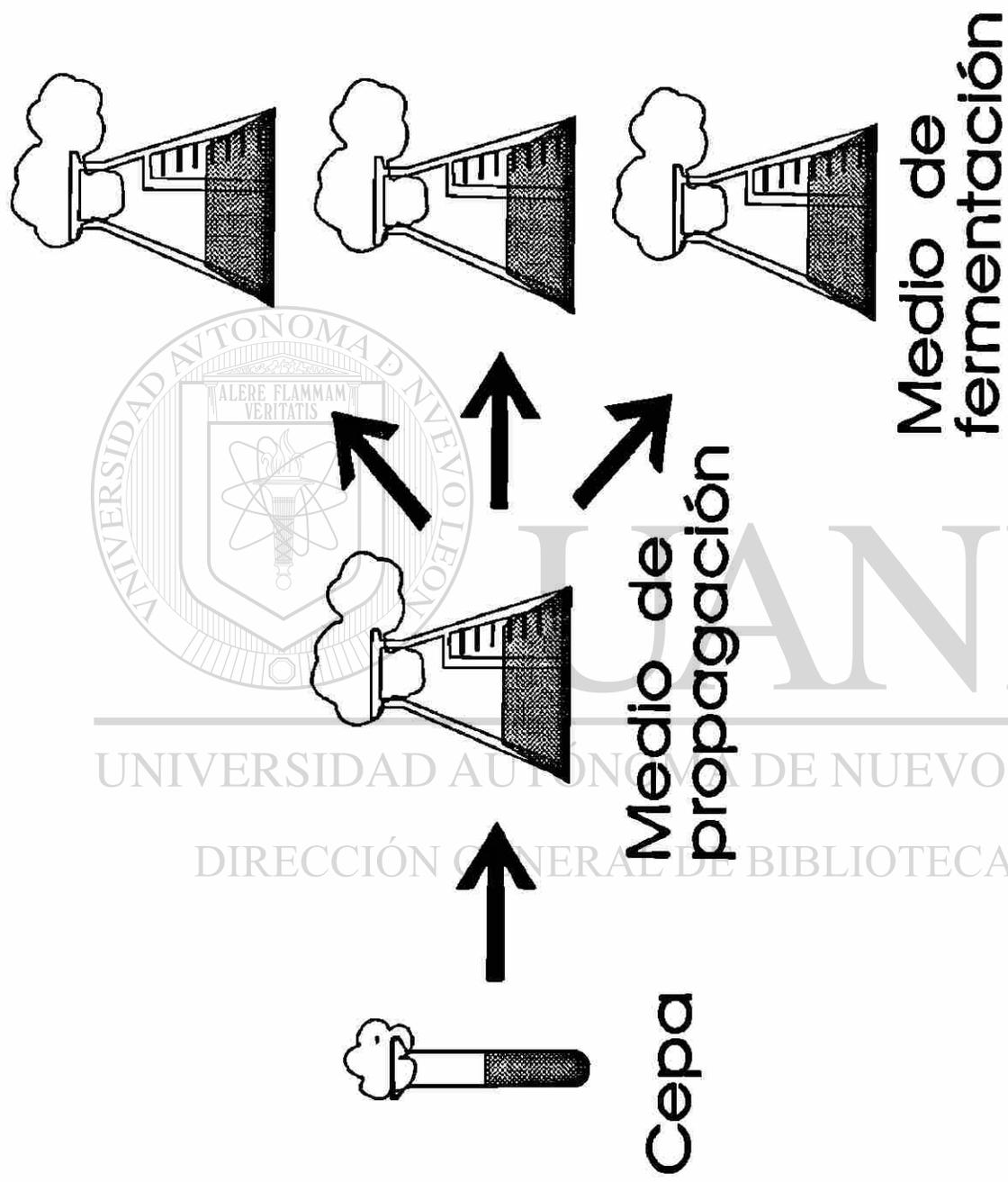
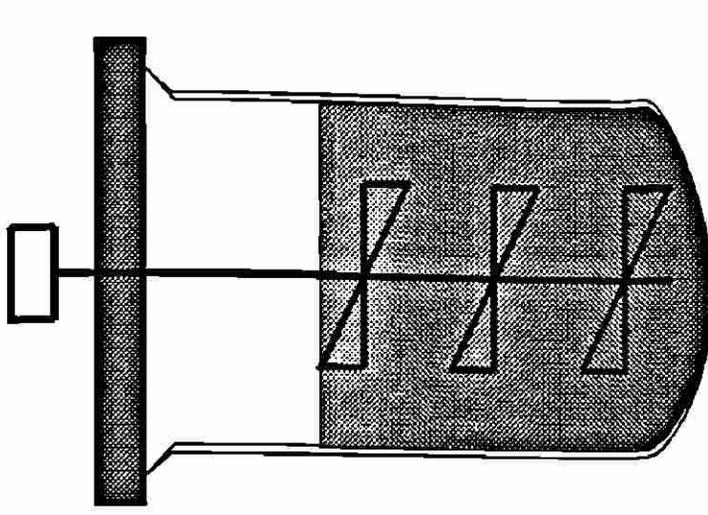
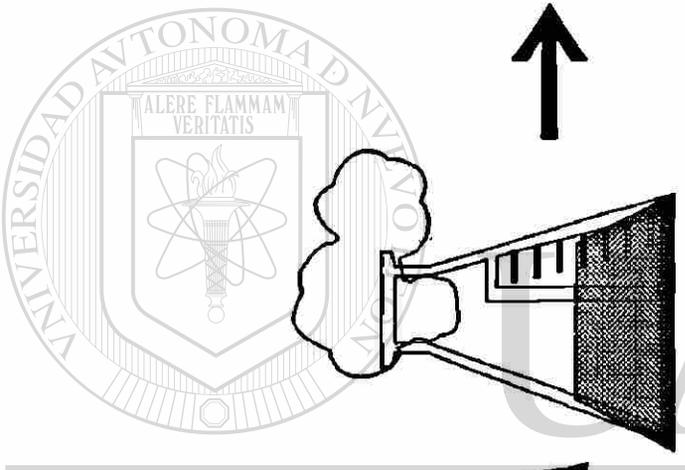


Figura No. 4 Método para preparar el inóculo a nivel matraz



FERMENTADOR
Medio de Producción

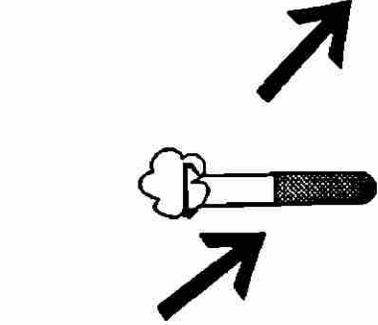


600 ml

Medio de propagación



60 ml



6 ml



Cepa

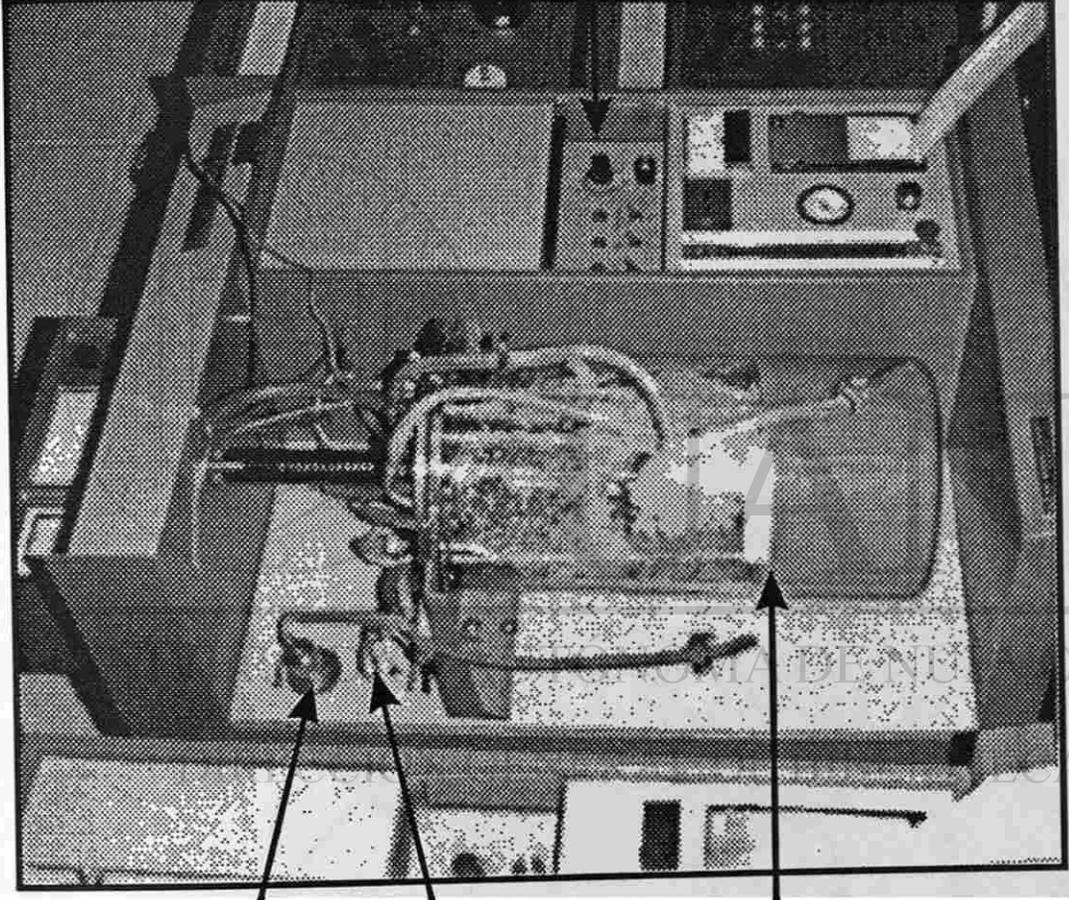
Figura No. 5 Método para preparar el inóculo a nivel semipiloto.

Filtro de aire
(salida)

Agua
Enfriamiento
(entrada)

Vaso de
Fermentación

Controles



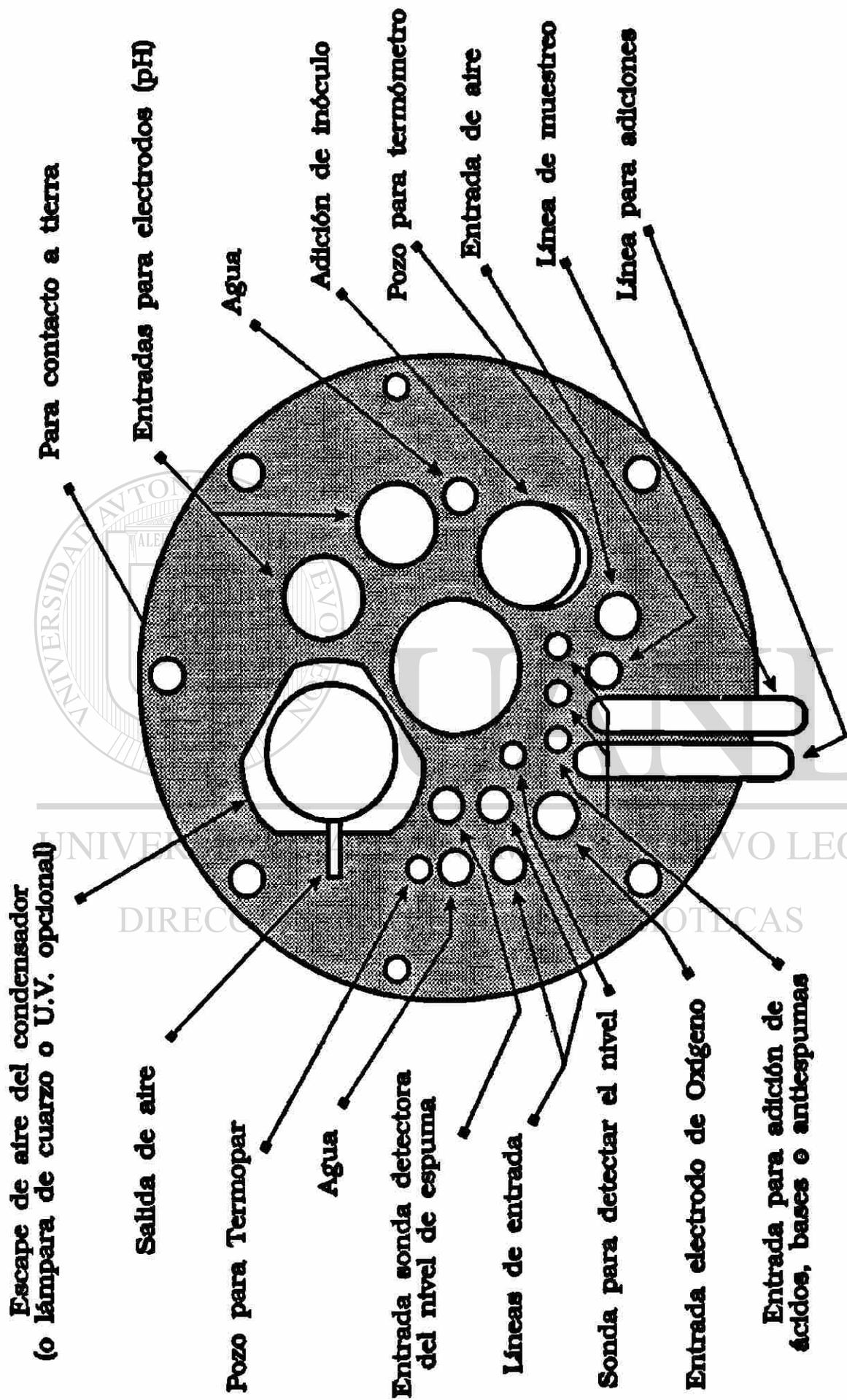
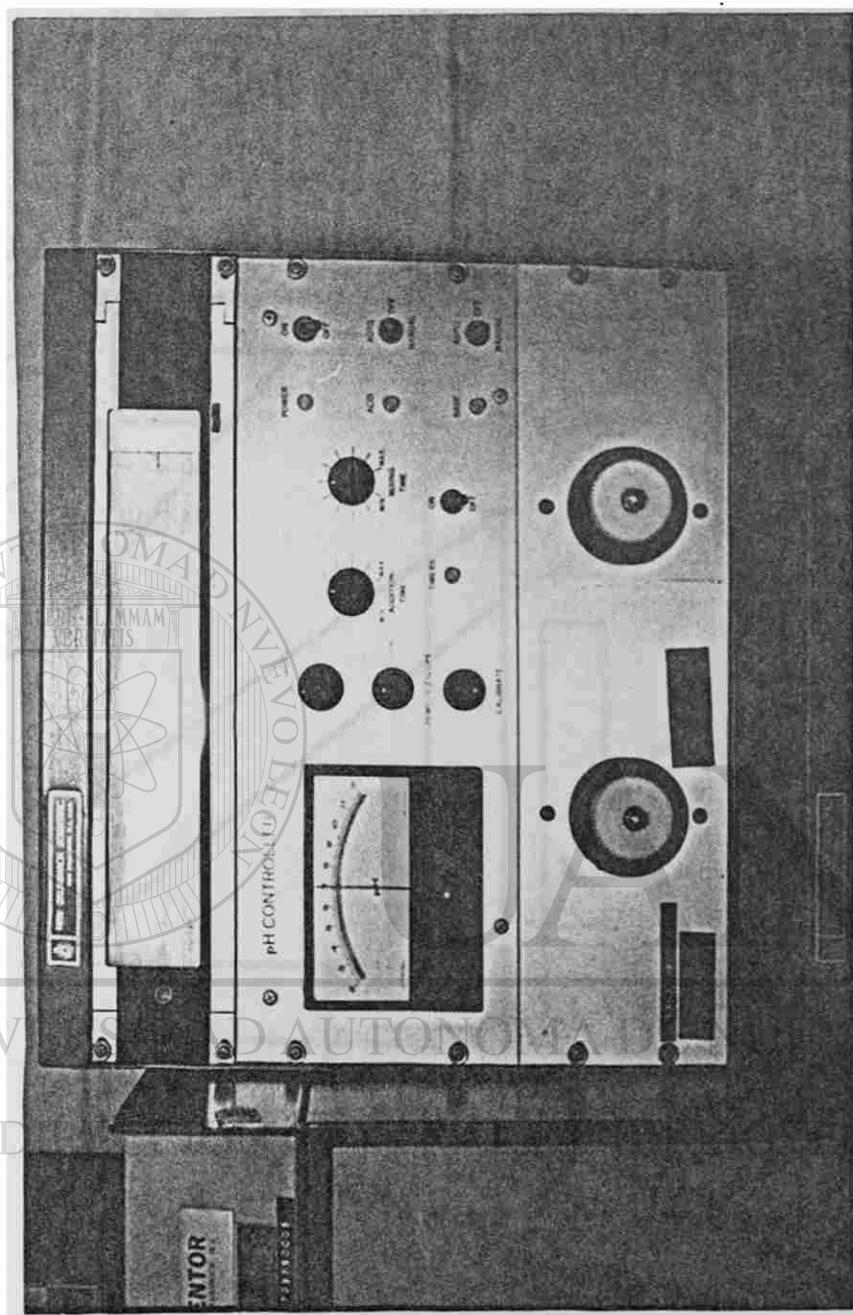
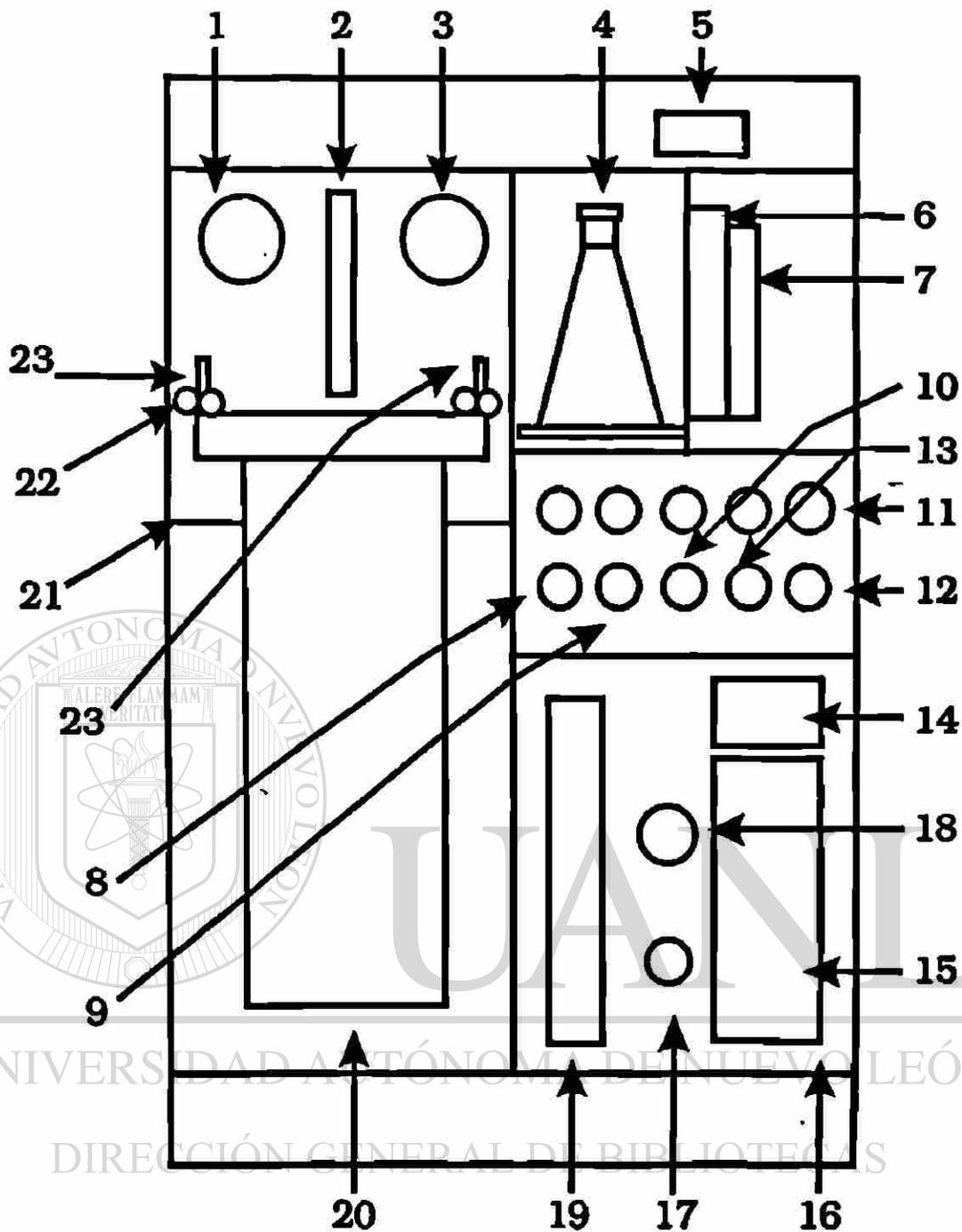


Figura No.7 Esquema de la tapa del Vaso de Fermentación.



**Figura No.8 Indicador y controlador modular de pH
Modelo pH 22 New Brunswick Scientific Co., Inc.**

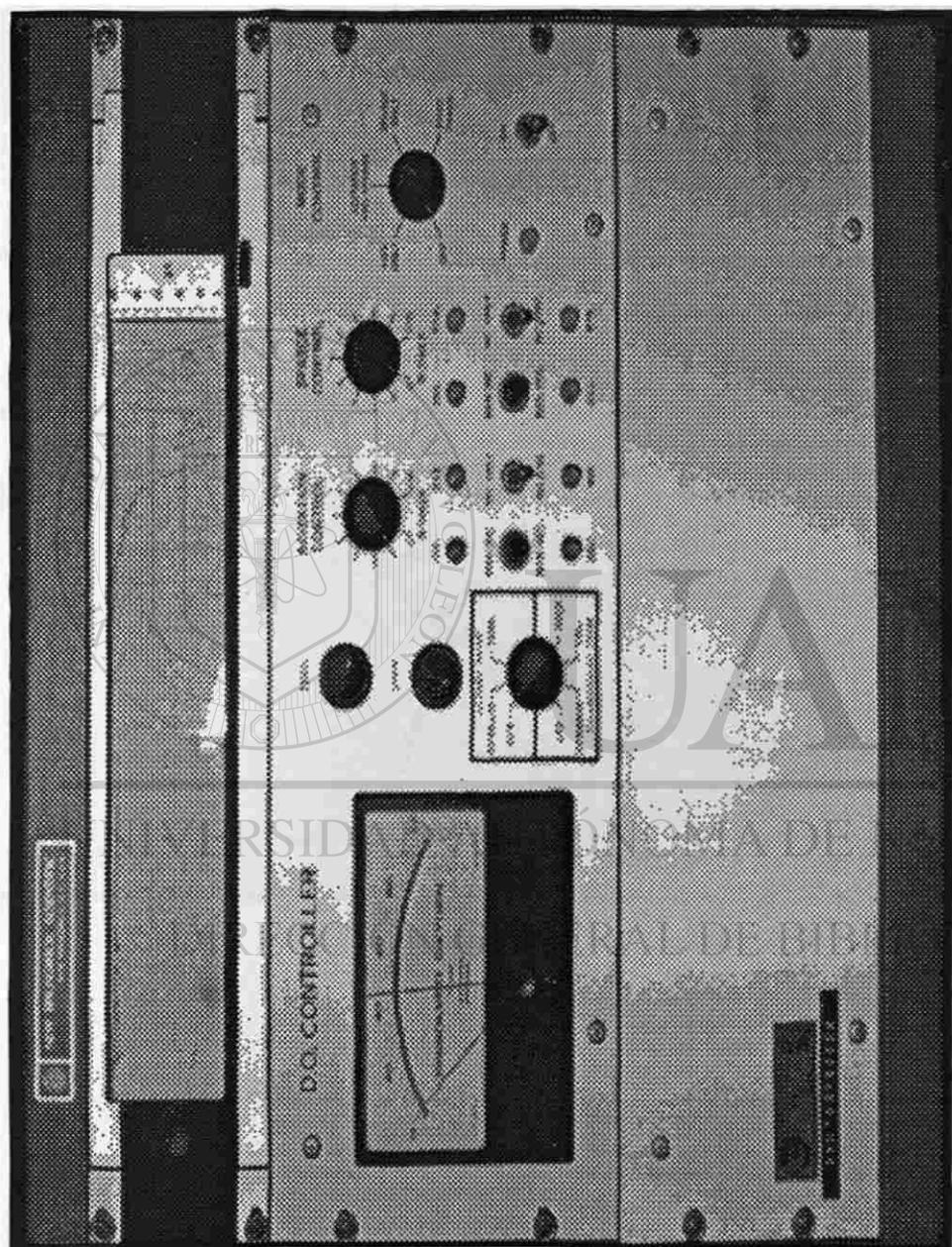


- 1.- Filtro para aire
- 2.- Acoplamiento Transmisión
- 3.- Filtro de salida de aire
- 4.- Control de espuma
- 5.- Recipiente antiespumante
- 6.- Panel de control bomba

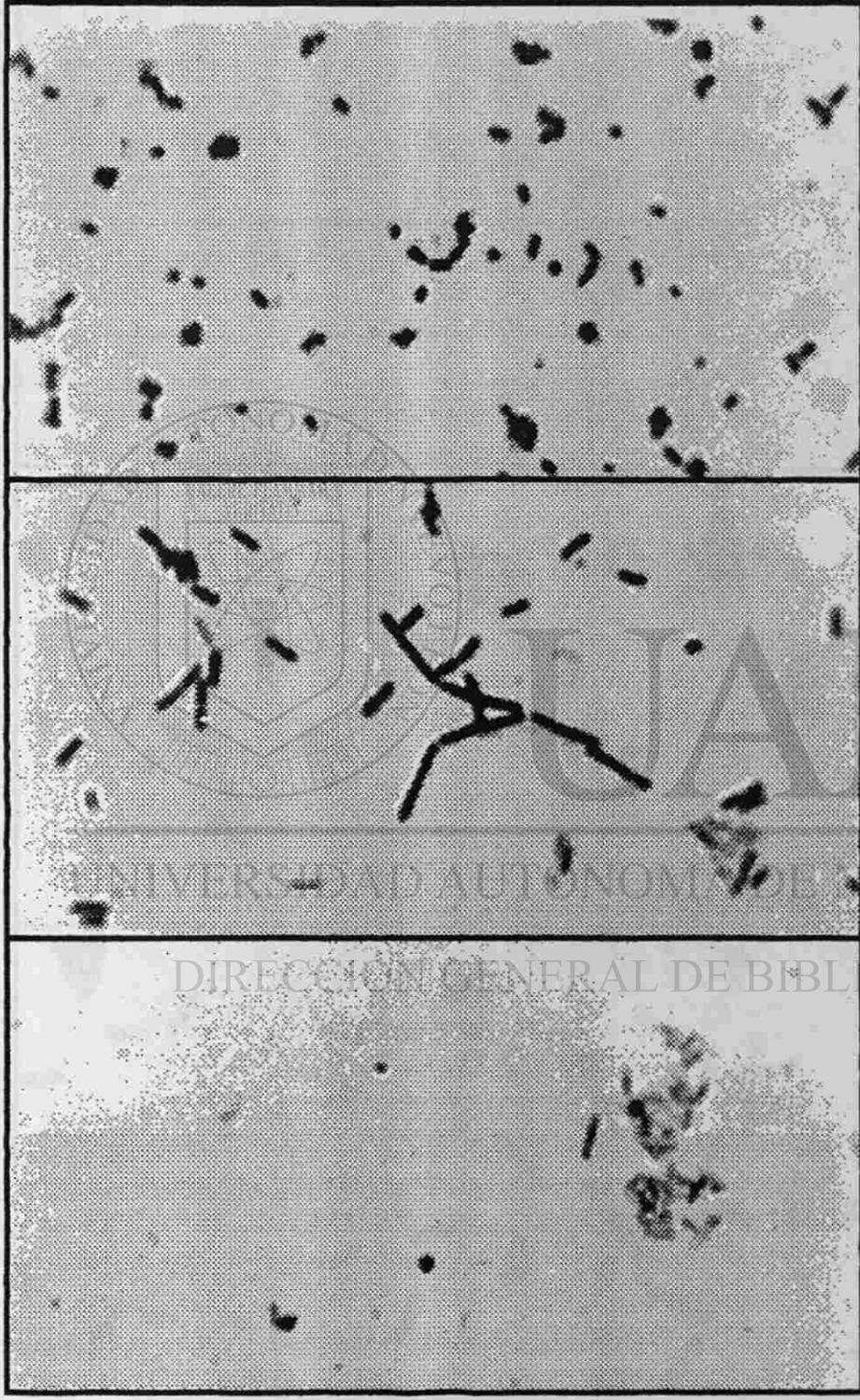
- 7.- Bomba P.A.
- 8.- Boton encendido
- 9.- Calefacción
- 10.- Transmisión
- 11.- Control de temperatura
- 12.- Agitación
- 13.- Control enfriamiento
- 14.- Tacometro
- 15.- Registrador de temperatura

- 16.- Panel control inferior
- 17.- Reg. presión aire
- 18.- Manometro
- 19.- Medidor de flujo
- 20.- Recipiente 14 L.
- 21.- Soporte recipiente
- 22.- Abrazaderas recipiente
- 23.- Líneas de agua

Figura No.9 Controles del fermentador, Microferm, serie MF-114.



**Figura No.10 Analizador de Oxígeno disuelto
New Brunswick Scientific Co., Inc.**



(a)

(b)

(c)

Figura No.11 Variaciones morfológicas de la cepa B-8 al incubarse a diferentes temperaturas. (a) 35°C (b) 45°C (c) 55°C



(a)

(b)

(c)

Figura No.12 Variaciones morfológicas de la cepa B-30 al incubarse a diferentes temperaturas.

(a) 35°C (b) 45°C (c) 55°C

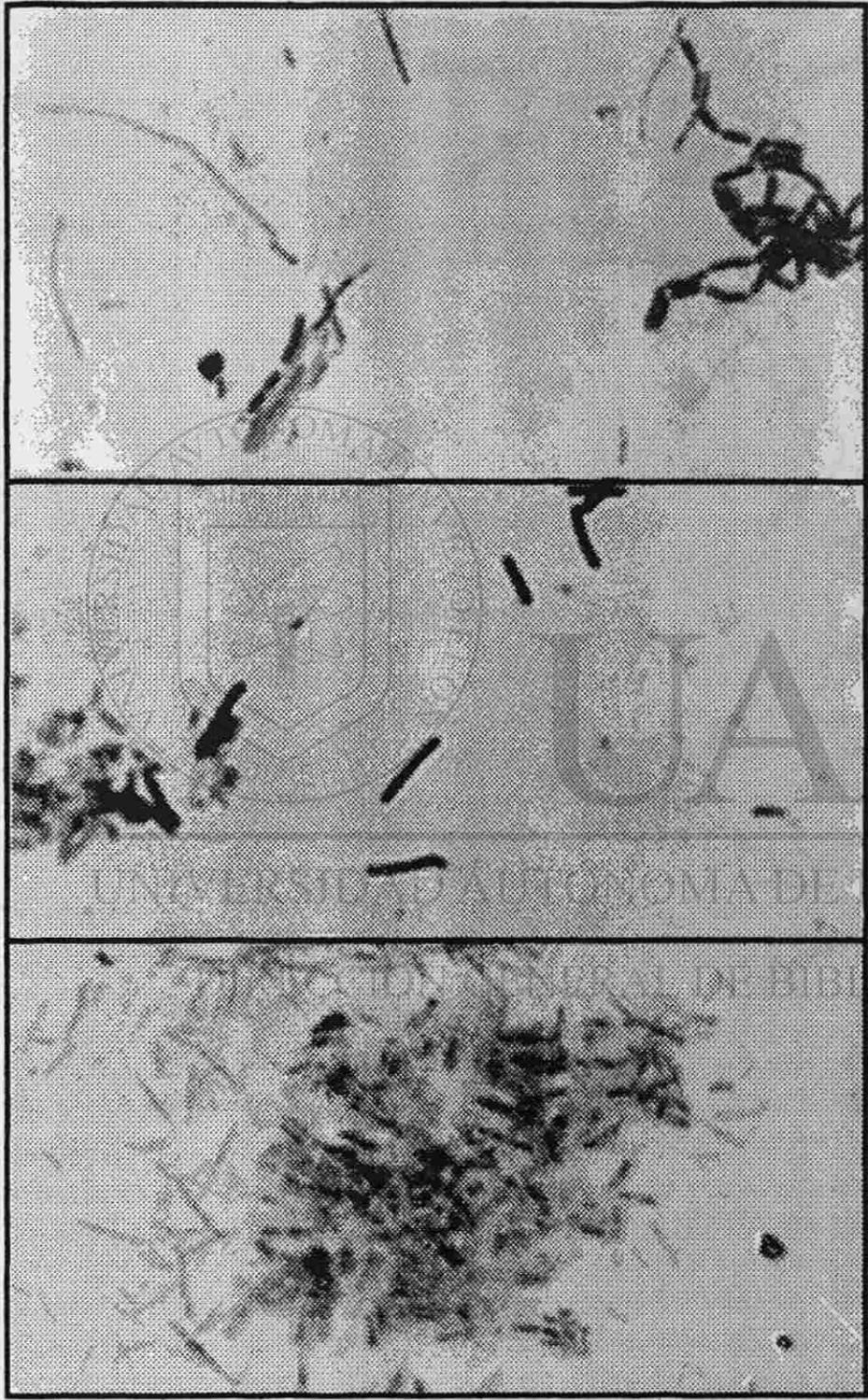


(a)

(b)

(c)

Figura No. 13 Variaciones morfológicas de las cepas B-55 al incubarse a diferentes temperaturas.
(a) 35°C (b) 45°C (c) 55°C

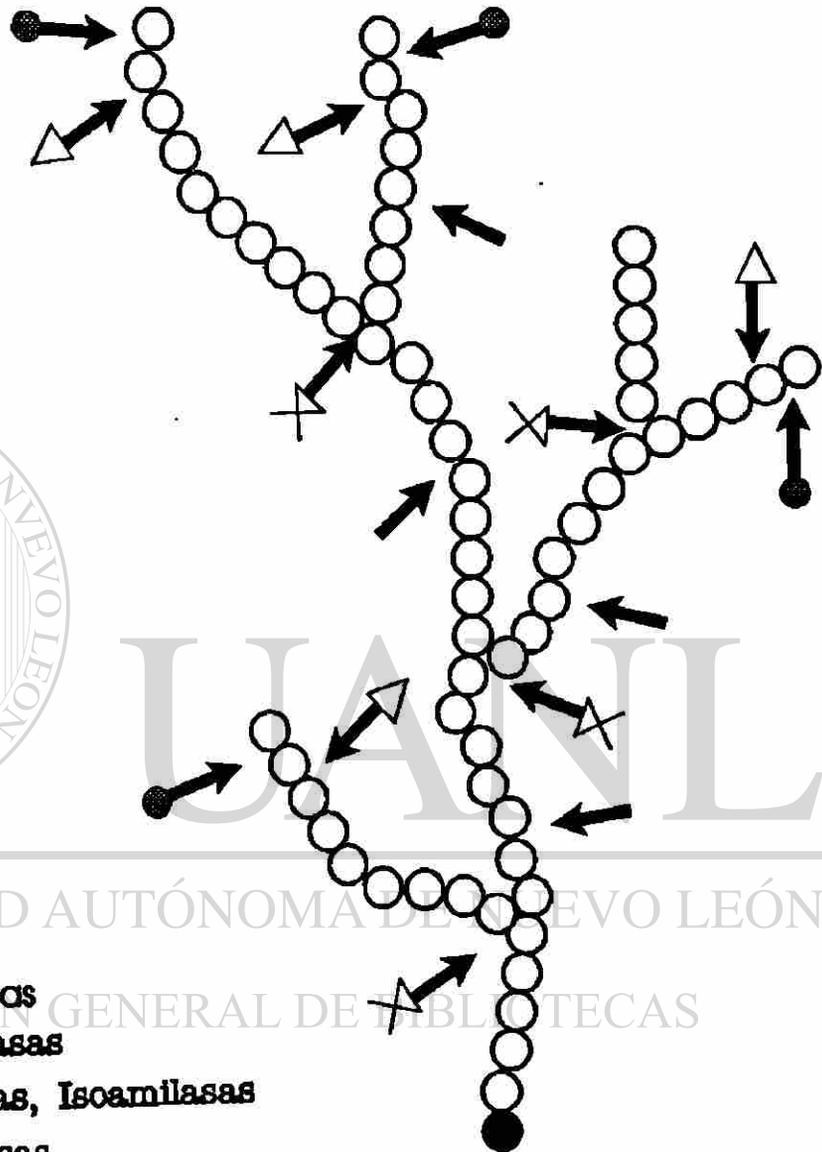
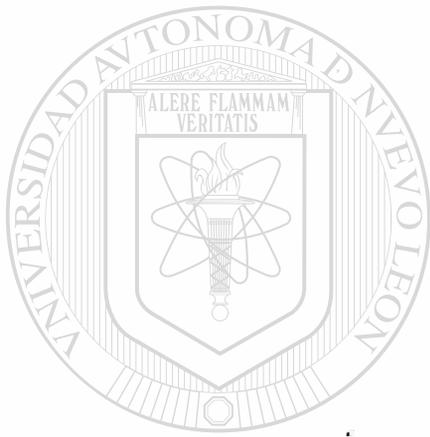


(a)

(b)

(c)

Figura No. 14 Variaciones morfológicas de la cepa B-8 durante la producción de α -amilasa. (a) 24 hrs. (b) 48 hrs. (c) 72 hrs.



- ← α -Amilasas
- ←● Glucoamilasas
- ←X Pululanasas, Isoamilasas
- ↔ β -Amilasas

Figura No. 15 Mecanismo de hidrólisis del almidón por las amilasas.

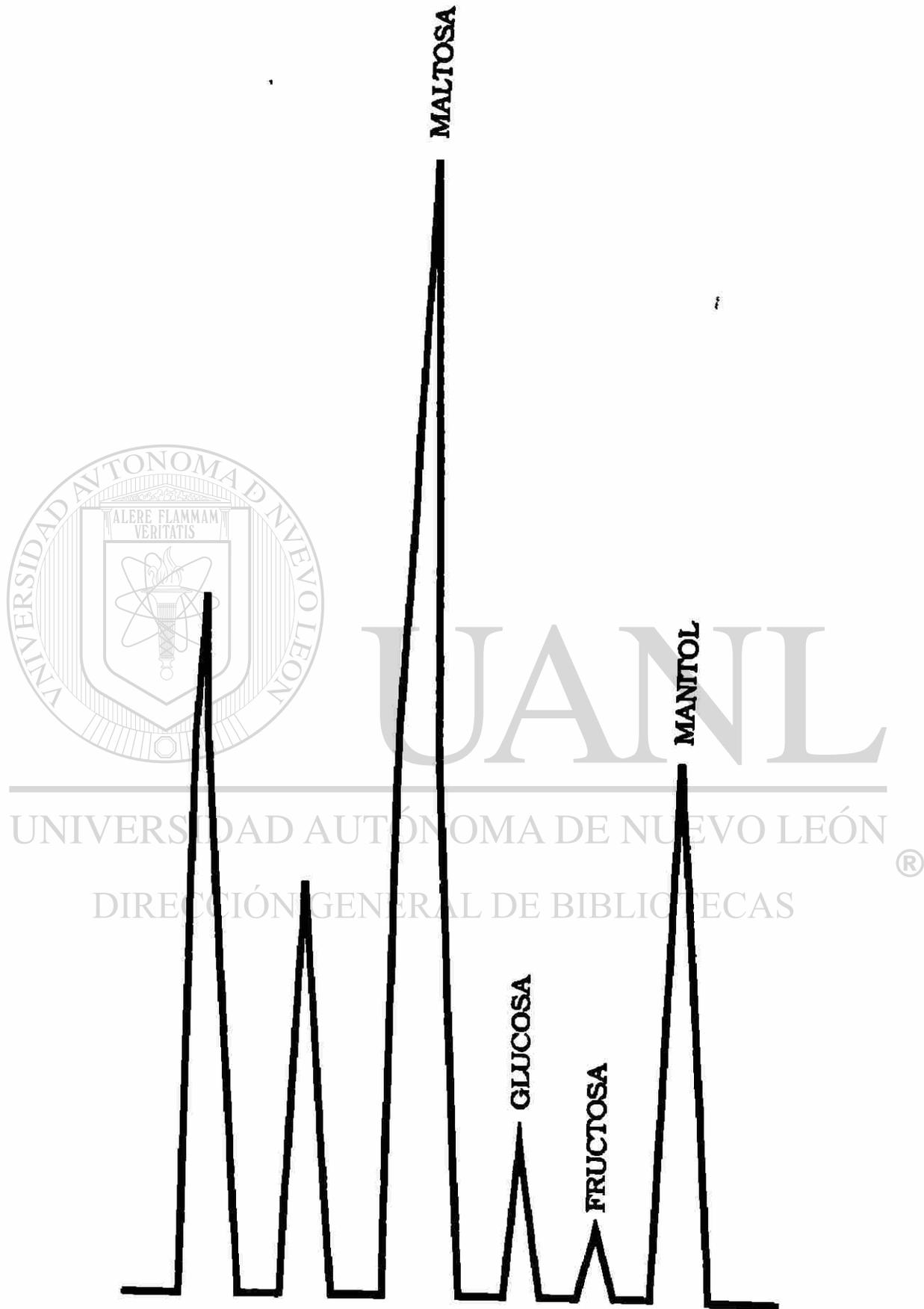


Figura No.16 Perfil cromatográfico de los carbohidratos resultantes de la actividad enzimática



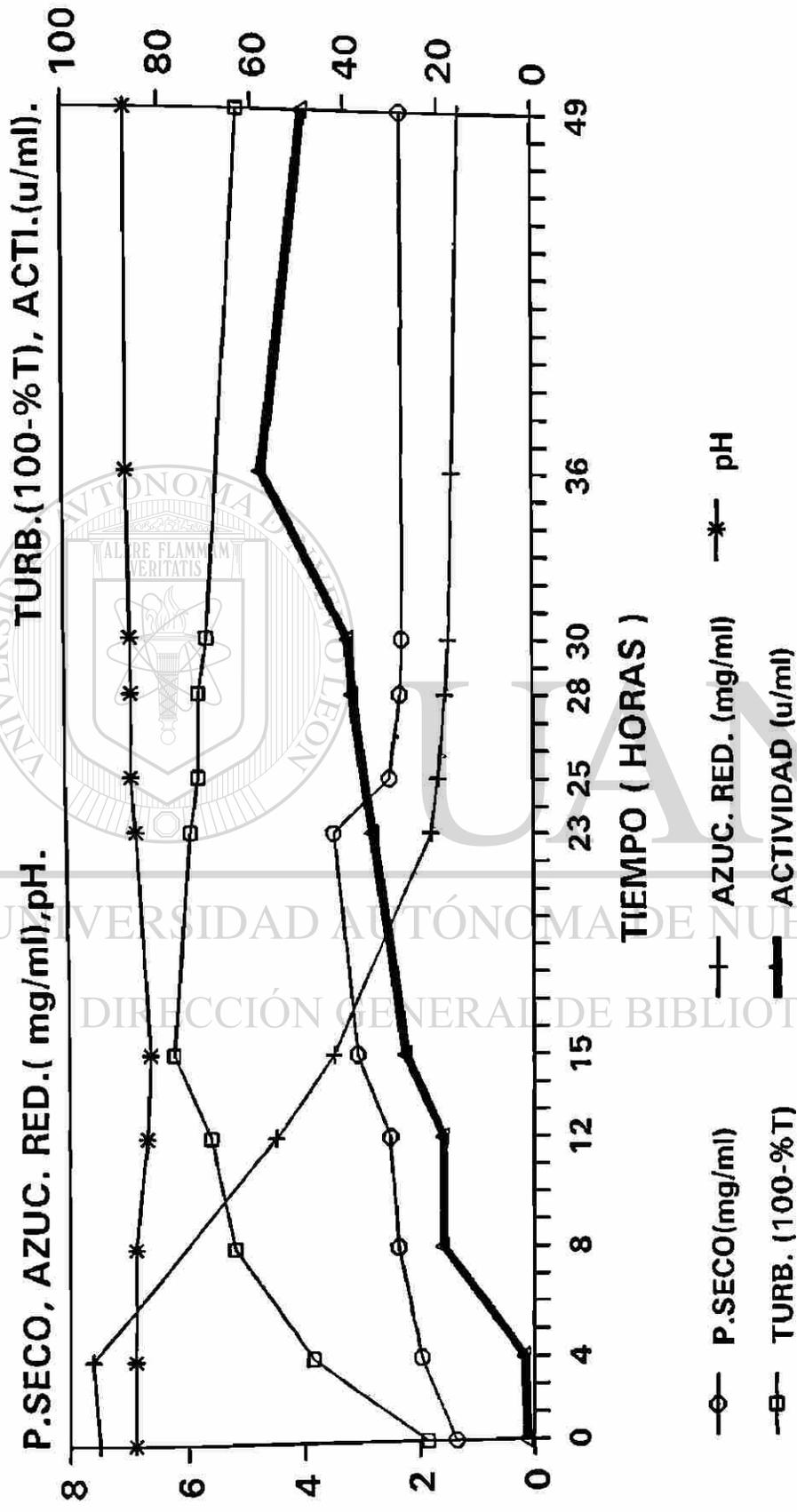
VIL GRAFICAS

UANL

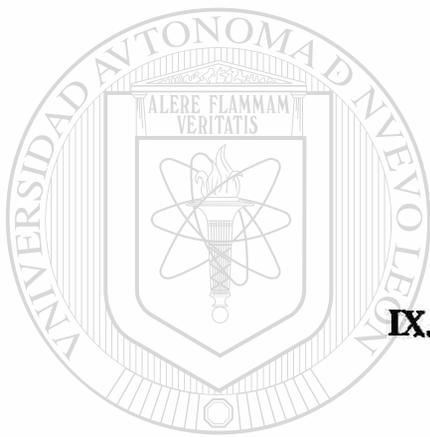
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**GRAFICA 1.-
 GRAFICA DE PROCESO PARA PRODUCIR ALFA-
 AMILASA EN UN FERMENTADOR DE 6 LITROS.**



IX.- APENDICE

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IX. APENDICE

1. COLORANTES.

1.1.- Cristal violeta.

a) Solución madre de cristal violeta.

| | |
|--|------------------|
| Cristal violeta, colorante al 85% | 25.0 g. |
| Alcohol etílico de 95 | 100.0 ml. |

b) Solución madre de oxalato

| | |
|--------------------------|------------------|
| Oxalato de amonio | 1.0 g. |
| Agua destilada | 100.0 ml. |

Solución para empleo inmediato: Diluir la solución madre de cristal violeta en proporción de 1:10 con agua destilada y mezclar con 4 volúmenes de solución madre de oxalato. Guarde en frascos con tapa de vidrio.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2.- Safranina.

| | |
|------------------------------|------------------|
| Safranina O | 2.5 g. |
| Alcohol etílico de 95 | 100.0 ml. |

Solución para empleo inmediato: Diluir la safranina madre en proporción 1:5 ó 1:10 con agua destilada; guardar en frasco con tapón de vidrio.

1.3.- Lugol. (Solución de yodo Gram)

Cristales de yodo **1.0 g.**

Yoduro de potasio **2.0 g.**

Disolver completamente en 5 ml. de agua destilada y

agregar:

Agua destilada **240.0 ml.**

Bicarbonato de sodio,
solución acuosa al 5% **60.0 ml.**

Mezclar bien; guardar en un frasco de vidrio de color

oscuro.

1.4.- Verde de Malaquita. Solución acuosa saturada.

Nota: Solubilidad en agua 7.6% a 26°C

Verde de malaquita **7.6 g.**

Agua destilada **100.0 ml.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1.5.- Safranina 0.25%

Safranina O **0.25 g.**

Agua destilada. **100.0 ml.**

2. REACTIVOS.

2.1.-Reactivo de Kovac.

| | |
|--------------------------------|----------|
| Alcohol n-amílico | 75.0 ml. |
| Ac. clorhídrico concentrado | 25.0 ml. |
| Para-Dimetilamino benzaldehído | 5.0 g. |

Disolver el aldehído en el alcohol por calentamiento ligero en un baño de agua a 50-55°C. Enfriar y añadir el ácido. Protéjase de la luz. Almacenar a 4°C.

2.2.- Rojo de Metilo.

Solución A

| | |
|---------------------|-----------|
| Rojo de metilo | 0.1 g. |
| Alcohol etílico 95% | 300.0 ml. |

Hidróxido de sodio N/20 15.0 ml.

Añadir agua destilada a la solución A y obtener un volumen total de 500 ml.

2.3.-Alfa Naftol 5%

| | |
|---------------------|-----------|
| Alfa Naftol | 5.0 g. |
| Alcohol etílico 95% | 100.0 ml. |

2.4.-Hidróxido de potasio 40%

| | |
|-----------------------------|------------------|
| Hidróxido de potasio | 40.0 g. |
| Agua destilada | 100.0 ml. |

2.5.-DimetilAlfa Naftilamina 0.6%

| | |
|---------------------------------|-------------------|
| Dimetil alfa-naftilamina | 6.0 g. |
| Acido acético 5 N | 1000.0 ml. |

Disolver con calentamiento ligero.

2.6.-Acido Sulfanílico 0.8%

| | |
|--------------------------|-------------------|
| Acido Sulfanílico | 8.0 g. |
| Acido acético 5 N | 1000.0 ml. |

Disolver por calentamiento ligero.

2.7.-Fenolftaleína 0.5%

| | |
|------------------------|------------------|
| Fenolftaleína | 0.5 g. |
| Alcohol etílico | 100.0 ml. |

2.8.-Lugol

| | |
|--------------------------|-------------------|
| Yodo | 50.0 g. |
| Yoduro de potasio | 100.0 g. |
| Agua destilada | 1000.0 ml. |

Mezclar el yodo y el yoduro de potasio en un mortero y triturar con la mano del mortero hasta que estén finamente pulverizados. Añadir agua destilada en

pequeñas porciones para ir disolviendo componentes.
Verter la solución en una probeta, lavar el mortero con agua destilada y añadir los líquidos de lavado también a la probeta y completar los 1000 ml. Mezclar bien.

2.9.-Solución Buffer de Fosfatos pH 6.0

| | |
|--|------------|
| Fosfato diácido de potasio | 3.0 g. |
| Fosfato monoácido de potasio 3H ₂ O | 0.6 g. |
| Agua destilada | 1000.0 ml. |

Disolver en una pequeña cantidad de agua destilada y aforar a un litro.

2.10.- Oxibac.

Para limpieza de equipo y maquinaria:

30 ml. de Oxibac por cada 10 litros de agua.

Para desinfección de paredes y pisos:

75 ml. de oxibac por cada 10 litros de agua destilada.

2.11.- Solución Buffer de Fosfatos para extracción.

| | |
|--|---------------------|
| Fosfatos diácido de potasio | 1.5 g. |
| Fosfato monoácido de potasio 3H ₂ O | 3.5 g. |
| Agua destilada | Aforar a 1000.0 ml. |

2.12.- Cloruro de calcio 20%

| | |
|--------------------------------------|------------------|
| Cloruro de calcio dihidratado | 20.0 g. |
| Agua destilada | 100.0 ml. |

2.13.- Suero Fisiológico.

| | |
|---|------------------|
| Solución acuosa de cloruro de sodio al 0.85% | |
| NaCl | 0.85 g. |
| Agua destilada | 100.0 ml. |

2.14.- Solución Buffer de Fosfatos pH 6.0 (Wilson-Ingledew)

Fosfato diácido de potasio **0.05 M**

NaOH **0.05 M**

Mezclar las soluciones A y B hasta que den un pH de 6.0

2.15.- Almidón Soluble 0.2% (Wilson-Ingledew)

Almidón soluble Merck **0.2 g.**

Solución buffer de fosfatos pH 6.0 **100.0 ml.**

Mezclar el almidón con la solución buffer y calentar a ebullición. Posteriormente se enfría a la temperatura que se requiere para la determinación enzimática.

2.16.- Solución Stock de Iodo (Wilson-Ingledew)

Yodo al 0.5% en una solución de yoduro de potasio al 5% en agua destilada.

2.17.- Reactivo de Yodo (Wilson-Ingledew)

| | |
|-------------------------------|------------------|
| Solución Stock de Yodo | 1.0 ml. |
| Agua destilada | 500.0 ml. |

El agua destilada debe ser previamente acidificada con ácido clorhídrico 5N.

2.18.- Acido Clorhídrico 5N.

| | |
|--------------------------------------|-------------------|
| Acido clorhídrico sp.gr. 1.19 | 411.8 ml. |
| Agua destilada Aforar a | 1000.0 ml. |

2.19.- Acido Clorhídrico 1N.

| | |
|--------------------------------------|-------------------|
| Acido clorhídrico sp.gr. 1.19 | 82.36 ml. |
| Agua destilada Aforar a | 1000.0 ml. |

2.20.- Hidróxido de Sodio 1N.

Se disuelven 100 g de lentejas de hidróxido de sodio puro en 100 ml de agua destilada. Se tapa el matraz y se deja reposar toda la noche a temperatura ambiente. El carbonato se separa en forma de un precipitado insoluble. Se filtra la solución.

Hidróxido de sodio libre de carbonato 50.0 ml

Agua destilada libre de carbonato.

Aforar a 1000.0 ml.

2.21.- Fenol 5%

| | |
|-----------------------------------|------------------|
| Fenol (reactivo analítico) | 5.0 g |
| Agua destilada | 100.0 ml. |

2.22.- Acido sulfúrico concentrado sp.gr. 1.84

2.23.- Reactivo de Somogyi de baja alcalinidad.

Disolver 12g de sal de Rochelle y 24 g de Na₂CO₃ en 250 ml de agua previamente hervida. Disolver , con agitación, 4.0 g de CuSO₄.5H₂O en 50 ml de agua, seguido de 16 g de NaHCO₃. Hervir agua destilada para eliminar el aire, enfriar y disolver 180 g de Na₂SO₄ anhidro y agregarlo a la solución de cobre alcalina; agregar agua destilada hervida hasta completar un litro. El reactivo es almacenado a 37°C durante una semana antes de usarse, y decantado para separar cualquier precipitado que se forme; de esta manera, el reactivo es estable.

2.24.- Reactivo de arsenomolibdato de Nelson.

Disolver 25 g de molibdato de amonio en 450 ml de agua y agregar 21 ml de H₂SO₄ al 96%, seguido de una solución de Na₂HAsO₄.7H₂O (3.0 g en 25 ml de agua). La mezcla es incubada durante 24 horas a 37°C y almacenada en un frasco de vidrio café.

3. MEDIOS DE CULTIVO.

[1] Medio de propagación.

(TETRAUT-STARK, 1954)

| | |
|----------------------------------|------------------|
| Trypticasa (casitone) | 1.0 g. |
| Extracto de levadura | 0.5 g. |
| Agua destilada | 100.0 ml. |
| Ajustar el pH a 6.8 - 7.2 | |

[2] Medio de producción.

(TETRAUT-STARK, 1954)

| | |
|------------------------------|------------------|
| Trypticasa (casitone) | 2.0 g. |
| Extracto de levadura | 2.0 g. |
| Almidón soluble | 0.1 g. |
| Agua destilada | 100.0 ml. |

Ajustar el pH 6.8 - 7.2

[3] Variante del medio anterior.

(TETRAUT-STARK, 1954)

| | |
|--|------------------|
| Trypticasa (casitone) | 2.0 g. |
| Extracto de levadura | 2.0 g. |
| Almidón soluble | 0.1 g. |
| Agua destilada | 100.0 ml. |
| Ajustar el pH a 6.0, 7.0 y 8.0 según se requiera. | |

[4] Almidón - Peptona de carne.

| | |
|-------------------------------------|------------------|
| Peptona de carne Sigma | 2.8 g. |
| Almidón soluble Merck | 1.0 g. |
| CaCO₃ | 0.01 g. |
| Buffer fosfatos pH 6.0 0.05M | 100.0 ml. |

[5] Maltosa - Peptona de carne.

| | |
|--|------------------|
| Peptona de carne Sigma | 2.8 g. |
| CaCO₃ | 0.01 g. |
| Buffer fosfatos pH 6.0 | 100.0 ml. |
| Maltosa esterilizada por filtración | 0.2 g. |

Nota: Agregar la solución de maltosa después de esterilizar el medio de cultivo.

[6] Almidón - Peptona de soya.

| | |
|--|-------------------------|
| Peptona de soya (soytone Merck) | 4.32 g. - 5.0 g. |
| Almidón soluble Merck | 1.0 g. |
| CaCO₃ | 0.01 g. |
| Buffer fosfatos pH 6.0 | 100.0 ml. |

[7] Maltosa - Peptona de soya.

| | |
|--|-------------------------|
| Peptona de soya (soytone)Merck | 4.32 g. - 5.0 g. |
| Maltosa (esterilizada por separado) | 0.2 g. |
| CaCO₃ | 0.01 g. |
| Buffer fosfatos pH 6.0 | 100.0 ml. |

[8] Almidón - Caseína (hidrolizado enzimático).

| | |
|---------------------------------|------------------------|
| Peptona de caseína Merck | 5.8 g. - 6.0 g. |
| Almidón soluble Merck | 1.0 g. |
| CaCO₃ | 0.01 g. |
| Buffer fosfatos pH 6.0 | 100.0 ml. |

[9] Maltosa - Caseína (hidrolizado enzimático).

| | |
|--|------------------------|
| Peptona de caseína Merck | 5.8 g. - 6.0 g. |
| Maltosa (esterilizada por separado) | 0.2 g. |
| CaCO₃ | 0.01 g. |
| Buffer fosfatos pH 6.0 | 100.0 ml. |

[10] Almidón - Extracto de Levadura.

| | |
|-------------------------------|------------------|
| Extracto de levadura | 5.0 g. |
| Almidón soluble Merck | 1.0 g. |
| CaCO₃ | 0.01 g. |
| Buffer fosfatos pH 6.0 | 100.0 ml. |

[11] Maltosa - Extracto de Levadura.

| | |
|--|------------------|
| Extracto de levaduras | 5.0 g. |
| Maltosa (esterilizada por separado) | 0.2 g. |
| CaCO₃ | 0.01 g. |
| Buffer fosfatos pH 6.0 | 100.0 ml. |

[12] Almidón - Harina de soya.

| | |
|-------------------------------|------------------|
| Harina de soya | 5.0 g. |
| Almidón soluble Merck | 1.0 g. |
| CaCO₃ | 0.01 g. |
| Buffer fosfatos pH 6.0 | 100.0 ml. |

[13] Almidón - Harina de trigo.

| | |
|-------------------------------|------------------|
| Harina de trigo | 5.0 g. |
| Almidón soluble Merck | 1.0 g. |
| CaCO₃ | 0.01 g. |
| Buffer fosfatos pH 6.0 | 100.0 ml. |

[14] Almidón - Casaminoácidos

| | |
|------------------------------|---------------|
| Casaminoácidos | 6.0 g. |
| Almidón soluble Merck | 1.0 g. |

| | |
|-------------------------------|------------------|
| CaCO₃ | 0.01 g. |
| Buffer fosfatos pH 6.0 | 100.0 ml. |

[15] Maltosa - Casaminoácidos.

| | |
|--|------------------|
| Casaminoácidos | 6.0 g. |
| Maltosa (esterilizada por separado) | 0.2 g. |
| CaCO₃ | 0.01 g. |
| Buffer fosfatos pH 6.0 | 100.0 ml. |

[16] Almidón - Harina de soya - Buffer,

| | |
|-------------------------------|-----------------|
| Harina de soya | 5.0 g. |
| Almidón soluble Merck | 1.0 g. |
| CaCO₃ | 10.0 mg. |
| Buffer fosfatos pH 7.0 | 50.0 ml. |

[17] Almidón - Harina de soya - Agua potable.

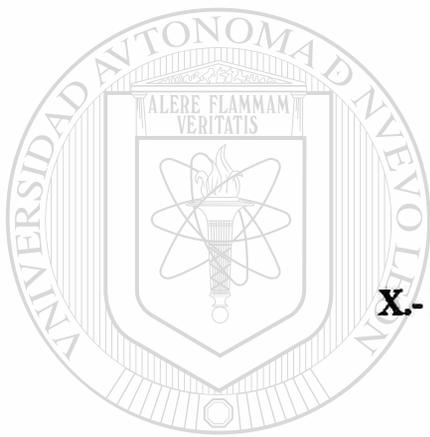
| | |
|-------------------------------------|-----------------|
| Harina de soya | 5.0 g. |
| Almidón soluble Merck | 1.0 g. |
| CaCO₃ | 10.0 mg. |
| K₂HPO₄ | 0.175 g. |
| KH₂PO₄ | 0.175 g. |
| Agua potable | 50.0 ml. |

[18] Maltosa - Harina de soya - Buffer.

| | |
|---------------------------------------|-----------------|
| Harina de soya | 5.0 g. |
| Maltosa (solución estéril 20%) | 0.5 ml. |
| CaCO₃ | 10.0 mg. |
| Buffer fosfatos pH 7.0 | 50.0 ml. |

[19] Maltosa - Harina de soya - Agua potable.

| | |
|--|-----------------|
| Harina de soya | 5.0 g. |
| Maltosa (Solución estéril al 20%) | 0.5 ml. |
| CaCO₃ | 10.0 mg. |
| KH₂PO₄ | 0.075 g. |
| K₂HPO₄ | 0.175 g. |
| Agua potable | 50.0 ml. |



X.- BIBLIOGRAFIA

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

~~UNIVERSIDAD~~
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

X BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Aiba, S., A. E. Humphrey y N. F. Millis. 1973, *Biochemical Engineering*, 2nd. ed. Academic Press, Inc. New York.
- 2.- Aiba, S., K. Kitai y T. Imanaka. 1983. Cloning and expression of thermostable alpha-amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis* . *Appl. Environ. Microbiol.* 46(5):1059-1065.
- 3.- Aiba, S., M. Zhang y M. K. Ohnishi. 1987, Production of alpha-amylase in transformant of *Bacillus stearothermophilus* improvement of recombinant plasmid that can be used at higher temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* 30(8):978.
- 4.- Alam, S., J. Hong y W. A. Weigand. 1989. Effect of yeast extract on alpha-amylase synthesis by *Bacillus amyloliquefaciens* . *Biotech. Bioeng.* 33:780-785.
- 5.- Andersson, E. y B. Hahn-Hägerdal. 1988. High concentrations of PEG as a possible uncoupler of the proton motive force: alpha-amylase production with *Bacillus amyloliquefaciens* in aqueous two-phase systems and PEG solutions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:329-336.
- 6.- Andersson, E., A. C. Johansson y B. Hahn-Hägerdal. 1985. Alpha-amylase production in aqueous two-phase systems with *Bacillus subtilis* . *Enzyme Microbiol. Technol.* 7(7):333-338.
- 7.- Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos. 1990. Importación. Tomo II. INEGI.
- 8.- Baig, M. A., J. Pazlarova y J. Votruba. 1984. Kinetics of alpha-amylase production in a batch and fed-batch culture of *Bacillus subtilis* . *Folia Microbiol.* 29(5):359-364.
- 9.- Bailey, M. J. y P. H. Markkanen. 1975. Use of mutagenic agents in improvement of alpha-amylase production by *Bacillus subtilis* . *J. appl. Chem. Biotechnol.* 25:73-79.

- 10.- Bailey, J. E. y D. F. Ollis. 1977. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Mc. Graw Hill Kogakusha, LTD.
- 11.- Bajpai, P. y K. Bajpai. 1989. High temperature alkaline amylase from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Bioeng.* 33(1):72-78.
- 12.- Bajpai, P. y U. Sharma. 1989. Production of alpha-amylase in a low cost medium by *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13. *J. Ferment. Bioeng.* 67(6):422-423.
- 13.- Banasik, O. J. 1971. Automated analysis of malt diastasic power and alpha-amylase activity. *Wallerstein Lab. Commun.* 34(113):45-52.
- 14.- Belakhov, V. V. y N. N. Momot. 1984. Design of equipment for the immobilization of alpha-amylase by a carboxylic exchanger. *Khim.-Farm. Zh.* 18(8):980-982.
- 15.- Bridson, E. Y. y A. Brecker. 1970. Design and formulation of microbial culture media, p. 229-295. *En* J. Norris y D. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 3A. Academic Press, Inc. New York.
- 16.- Casida, L. E. 1964. *Industrial Microbiology*. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- 17.- Chamblise G. H., W. L. Nicholson y M. J. Weickert. 1989. Regulation of *Bacillus subtilis* alpha-amylase synthesis glucose catabolite repression elimination by cis, trans mutation. (Conference abstract). *Folia Microbiol.* 34(5):364.
- 18.- Chandra, A. K., S. Medda y A. K. Bhadra. 1980. Production of extracellular thermostable alpha-amylase by *Bacillus licheniformis*. *J. Ferment. Technol.* 58(1):1-10.
- 19.- Chevalier, P. y J. De la Noue. 1987. Enhancement of alpha-amylase production by immobilized *Bacillus subtilis* in an airlift fermentor. *Enzyme Microbiol. Technol.* 19(1):53-56.
- 20.- Cherney, J. H. 1989. Use of 2-ethoxyethanol and alpha-amylase in the neutral detergent fiber method of feed analysis. *J. Dairy Sci.* 72(11):3079-3084.
- 21.- Collin, C. H. 1969. *Métodos Microbiológicos*. Editorial Acribia. Zaragoza (España).

- 22.- Cowan, S. T. 1974. **Cowan-Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria**, 2nd ed. Cambridge University Press.
- 23.- Crowe, N. L., I. Alli y B. E. Baker, 1985, Solubilization of Nitrogenous Constituents of Brewer's Spent Grain. *J. Inst. Brew.* 91:148-150.
- 24.- Dancer, B. N. y J. Mandelstam. 1975. Criteria for categorizing early biochemical events occurring during esporulation of *Bacillus subtilis* . *J. Bacteriol.* 121:411-415.
- 25.- Dawson Peter. 1972. Continuous synchronous culture-The production of extracellular enzymes by continuous phased culture of *Bacillus subtilis*. *Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today* 121-128.
- 26.- Dhawale, M. R., J. J. Wilson y G. G. Khachatourians. 1982. Improved method for detection of starch hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(3):747-750.
- 27.- Difco Laboratories Incorporated. 1953. **The Difco Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures.** 9th ed.; Difco Laboratories Incorporated. Detroit, Mich.
- 28.- Emanuilova, E. I. y K. Toda. 1984. Alpha-amylase production in batch and continuous cultures by *Bacillus caldolyticus* . *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19(5):301-305.
- 29.- Faith, W. T., C. E. Neubeck y E. T. Reese. 1971. Production and application of enzymes. *Adv. Biochem. Eng.* 1:77-111.
- 30.- Fujio, Y., P. Suyanadona, P. Attasampunna y S. Ueda. 1984. Alcoholic fermentation of raw cassava starch by *Rhizopus koji* without cooking. *Biotechnol. Bioeng.* 27:315-319.
- 31.- Gandhi, A. P. 1982. Studies on the production of alpha-amylase by *Bacillus subtilis* growing in the batch and chemostat cultures. *J. Food Science and Technology* 19:177-180.
- 32.- Ghildyal, N. P., P. Prema, S. Srikanta, K. R. Sreekantiah and S. Y. Ahmed. 1980. Studies on the production of alpha-amylase in submerged culture. *J. Food Science and Technology* 17:165-167.

- 33.- Ghosh, S. B. y A. K. Chandra. 1981. Alpha-amylase by *Bacillus apiarius* CBML152, production of thermostable alpha-amylase by *Bacillus apiarius* CBML 152. Adv. Biotechnol. (Proc. Int. Ferment. Symp. 6th) . 3:313-321.
- 34.- Gibbs, B. M. y D. A. Shapton. 1968. Identification methods for microbiologists: Part B, (2). Society for Applied Bacteriology Technical Series. Academic Press, Inc. New York.
- 35.- Gibson, T. y R. E. Gordon. 1975. Endospore-forming rods and cocci, p. 529-575. En R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (ed.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 36.- Gunsalus, I. C. y R. Y. Stainer. 1960. The bacteria. A treatise on structure and function. Vol. II. Metabolismo. Academic Press, Inc. New York.
- 37.- Gunsalus, I. C. y R. Y. Stainer. 1962. The bacteria. A treatise on structure and function. Vol. III. Biosynthesis. Academic Press, Inc. New York.
- 38.- Guo Y, F. Lou, Z. Peng, Z. Yuan y R. A. Korus. 1990. Kinetics of growth and alpha-amylase production of immobilized *Bacillus subtilis* cells in an airlift bioreactor. Biotechnol. Bioeng. 35(1):99-102.
- 39.- Gutcho, S. J. 1974. Microbial Enzyme Production. Immobilized and Engineering Techniques. Chemical Technology, Review No.28. Noyes Data Corporation.
- 40.- Hang, Y. D., D. F. Splittstoesser y E. E. Woodams. 1975. Utilization of brewery grain liquor by *Aspergillus niger* . Appl. Microbiol. 30(5):879-880.
- 41.- Herbert, D., P. J. Phipps y R. E. Strange. 1971. Chemical analysis of microbial cells, p. 214-216, 272-278. En J. Norris y D. Ribbons (ed.), Methods in microbiology, vol. 5B. Academic Press, Inc. New York.
- 42.- Hudson, J. R. 1972. Recent Changes in brewing technology. Proc. IV I.F.S.: Ferment. Technol. Today, p. 629-632.

- 43.- Hwang, P. T. 1973. Alpha-amylase production by *Bacillus subtilis* . Taiwan Sugar 20(5):189-192. ~~1973~~
- 44.- Kanno, M. 1986. A *Bacillus acidocaldarius* alpha-amylase that is highly stable to heat under acidic conditions. Agric. Biol. Chem. 50(10):2633-2635.
- 45.- Kallio, P., A. Palva y I. Palva. 1987. Enhancement of alpha-amylase production by integrating and amplifying the alpha-amylase gene of *Bacillus amyloliquefaciens* in the genome of *Bacillus subtilis* . Appl. Microbiol. Biotechnol. 27:64-71.
- 46.- Kim, J., T. Nanmori y R. Shinke. 1989. Thermostable, raw-starch-digesting amylase from *Bacillus stearothermophilus* . Appl. Environ. Microbiol. 55(6):1638-1639.
- 47.- Komaki, T. 1968. Studies on enzymatic liquefaction and saccharification of starch. Part IV.- Preparation and properties of insoluble starch particle remained in saccharified liquid of starch after treatment with bacterial alpha-amylase and glucoamylase. Agric. Biol. Chem. 32(2):123-129.
- 48.- Krishnan, T. y A. K. Chandra. 1982. Effect of oil cakes on alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* CUMC 305. Appl. Environ. Microbiol. 44(2):270-274.
- 49.- Krishnan, T. y A. K. Chandra. 1983. Correlation between alpha-amylase production and sporulation in *Bacillus licheniformis* CUMC 305 with respect to the effect of some carbohydrates and phenylmethylsulfonyl fluoride treatment. Zentralbl. Mikrobiol. 138(6):475-485.
- 50.- Krishnan, T. y A. K. Chandra. 1983. Purification and characterization of alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC 305. Appl. Environ. Microbiol. 46(1):430-437.
- 51.- Lehninger, A. L. 1979. Bioquímica, 2a. ed. Ediciones Omega, S. A., Barcelona.

- 52.- Lenders, J. P. y R. R. Crichton. 1984. Thermal stabilization of amylolytic enzymes by covalent coupling to soluble polysaccharides. *Biotechnol. Bioeng.* 36:1343-1351.
- 53.- Linton, J. M. y I. R. Sibald. 1971. The acceptability of mixtures of spent yeast and brewer's grains as components of cattle diets. *Brew. Dig.* 56(3):58.
- 54.- Lloyd, N. E., R. E. Lodge y R. A. Wynes. 1974. U. S. Patent 3,524,798 August 18, 1970. Assigned to Standard Brands, Inc. *En* S. J. Gutcho, Microbial enzyme production. Noyes Data Corporation.
- 55.- Loginova, L. G., I. A. Tsaplina, M. Beshkov, P. Kosturkova, A. Tonkova y E. Emanuilova. 1989. On the alpha-amylase and proteolytic production of a thermophilic strain of *Bacillus brevis* 174. *Dokl. Bolg. Akad. Nauk.* 42(6):89-91.
- 56.- Mahmoud, S. A. Z., S. M. Taha, R. M. Attia y S. H. El Gammal. 1975. Studies on carbon and nitrogen sources for commercial production of bacterial alpha-amylase. *Rev. Microbiol.* 6(4):73-76.
- 57.- Malik, Muhammad Afzal y Chaudhary, Mahmood Islam. 1977. Effect of carbon source on the production of alpha-amylase. *Pak. J. Biochem.* 10(1):14-18.
- 58.- Manonmani, H. K., T. R. Shamala y K. R. Sreekantiah. Development of an alpha-amylase production medium by utilizing agro-industrial wastes, *J. Food Science and Technol.* 20(july-august):168-171.
- 59.- Markkanen, P. H. y M. J. Bailey. 1974. Simultaneous production of alpha-amylase, beta glucanase, and proteolytic enzymes by *Bacillus subtilis* . *J. appl. Chem. Biotechnol.* 24:93-103.
- 60.- Markkanen, P. H. y M. J. Bailey. 1975. Effect of aeration and temperature on production of alpha-amylase by *Bacillus subtilis* . *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 25:863-865.
- 61.- Markkanen, P. H. y T. M. Enari. 1972. Effect of phosphate on alpha-amylase production and sporulation by *Bacillus subtilis* . *Acta Chem. Scand.* 26(9):3543-3548.

- 62.- Mathewson, P. R. y Y. Pomeranz. 1981. Rapid analysis of alpha-amylase in barley malts using a colorimetric assay. *Brew. Dig.* 56(10):24-26.
- 63.- Merck, E. 1985. Manual de medios de cultivo Merck. Frankfurter Strasse 250, D-6100 Darmstadt 1 (R. F. de Alemania).
- 64.- Meyrath, J. y G. Suchanek. 1972. Inoculation techniques. Effect due to quality and quantity of inoculum. p. 160-209. *En* J. Norris y D. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 7B. Academic Press, Inc. New York.
- 65.- Miller, B. M. y W. Litsky. 1976. *Industrial microbiology*. McGraw Hill, Inc.
- 66.- Moat, A. G. 1979. *Microbial physiology*. "A Wiley-Interscience publication". John Wiley & Sons, Inc. New York.
- 67.- Montville, T. J. 1983. Dual-substrate plate diffusion assay for proteases. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:200-204.
- 68.- Mukhopadhyay, A., S. K. Chakrabarti y P. K. Bajpai. 1990. Treatment and clarification of fermented broth in bacterial enzyme production alpha-amylase production by *Bacillus* sp.; purification by flocculation. *Biotechnol. Tech.* 4(2):121-126.
- 69.- Ory, R. L. y A. J. St. Angelo (editors). 1977. *Enzymes in food and beverage processing*. ACS Symposium Series 47. American Chemical Society. VanNostrand Reinhold (U.K.) Co. Ltd.
- 70.- Park, Y. K. y B. C. Rivera. 1982. Alcohol production from various enzyme converted starches with or without cooking. *Biotechnol. Bioeng.* 24:495-500.
- 71.- Pazlarova, J., M. A. Baig y J. Votruba. 1984. Kinetics of alpha-amylase production in a batch and fed-batch culture of *Bacillus subtilis* with caseinate as nitrogen source and starch as carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20(5):331-334.

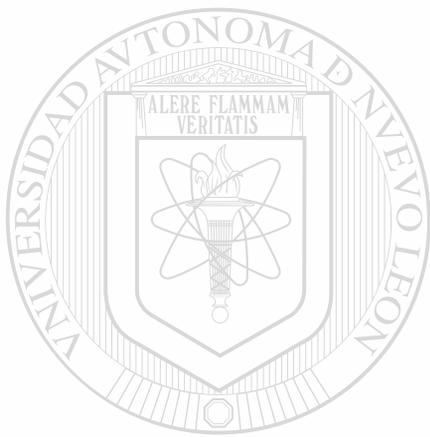
- 72.- Pollock, M. R. 1964. Exoenzymes, p. 121-178. *En* I. C. Gunsalus y R. Y. Stainer (ed), The bacteria, vol. IV. Academic Press Inc., New York.
- 73.- Prescott, S. C. y C. G. Dunn. 1962. Microbiología Industrial. 3a. ed. Editorial Aguilar.
- 74.- Priest, F. G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* 41(3):711-753.
- 75.- Priest, F. G. 1984. Aspects of microbiology 9, Extracellular enzymes. American Society for Microbiology. J. A. Cole, C. J. Knowles y D. Schlessinger (Coordinating eds.). VanNostrand Reinhold (U.K.) Co. Ltd. Wokingham.
- 76.- Prit, S. J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications.
- 77.- Qadeer, M. A., J. I. Anjum y R. Akhtar. 1980. Biosynthesis of enzymes by solid substrate fermentation. II. Production of alpha-amylase by *Bacillus subtilis* 3 Pak. *J. Sci. Ind. Res.* 23(1-2):25-29.
- 78.- Ramesh, M. V. y B. K. Lonsane. 1990. Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid-state fermentation transfer and techno-economic implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33(5):501-505.
- 79.- Ramgren, M., E. Andersson y B. Hahn-Hägerdal. 1988. Alpha-amylase production with *Bacillus subtilis* in presence of PEG and surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29(4):337-340.
- 80.- Rehana, F., P. Venkatasubbaiah y K. Nand. 1989. Preliminary studies on the production of thermostable alpha-amylase by a mesophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Chem. Mikrobiol., Technol. Libensm.* 12(1):8-13.
- 81.- Ribbons, D. W. 1970. Quantitative relationship between growth media constituents and cellular yields and composition, p 297-304. *En* J. Norris y D. Ribbons (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 3A. Academic Press, Inc. New York.

- 82.- Ronald, W. J. 1974. Industrial starches. Noyes Data Corporation.
- 83.- Roychoudhury, S., S. J. Parulekar y W. A. Weigand. 1989. Cell growth and alpha-amylase production characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnol. Bioeng.* 33:197-206.
- 84.- Schramm, M. y A. Loyter. Purification of alpha-amylase by precipitation of amylase-glycogen complexes, p 533-537. *En* E. F. Neufeld y V. Ginsburg (ed.) *Complex Carbohydrates* S. P. Colowick y N. O. Kaplan (eds) *Methods in Enzymology* Vol. VIII.
- 85.- Scriban, R. 1985. *Biotecnología*. Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V. México, D. F.
- 86.- Seeley, H. W. y P. J. Vandermark. 1975. *Microbios en acción. Manual de laboratorio para microbiología*. 2a. ed. Editorial Blume.
- 87.- Sillis, A. M. y G. G. Stewart. 1982. Production of amylolytic enzymes by several yeast species. *J. Inst. Brew.* 88:313-316.
- 88.- Srivastava, R. A. K. y J. N. Baruah. 1986. Culture conditions for production of thermostable amylase by *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol* 52(1):179-184.
- 89.- Srivastava, R. A. K., J. N. Nigam, K. R. Pillai y J. N. Baruah. 1981. Production of extracellular high heat-stable amylase by thermophilic *Bacillus* sp. *Indian J. Microbiol.* 21(2):131-139.
- 90.- Stainer, R. Y., E. A. Adelberg y J. L. Ingraham. 1976. *The microbial world*. 4th ed. Prentice Hall, Inc. New Jersey.
- 91.- Suzuki, Y., N. Ito, T. Yuuki, H. Yamagata y S. Udaka. 1989. Amino acid residues stabilizing a *Bacillus* alpha-amylase against irreversible thermoinactivation. *J. Biol. Chem.* 294(32):18933-18938.
- 92.- Takagi, T., H. Toda y T. Isemura. 1971. Bacterial and mold amylases, p. 235-271. *En* P. D. Boyer (ed), *The enzymes*, vol V. Academic Press Inc., New York.
- 93.- Terui, G. 1972. *Fermentation Technology Today*. Society of Fermentation Technology, Japan.

- 94.- Tetraut, P. A. y E. U. Stark. 1974. U. S. Patent 2,695,863 (1954) Assigned to Purdue Research Foundation. *En* S. J. Gutcho, Microbial enzyme production. Noyes Data Corporation.
- 95.- Thatcher, F. S. y D. S. Clark. 1973. Análisis microbiológico de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza (España).
- 96.- The practical Brewer. 1977. A manual for the brewing industry. 2nd. ed. Master Brewers Association of The Americas.
- 97.- Ueda, S., C. T. Zenin, D. A. Monteiro y Y. K. Park. 1981. Production of ethanol from raw cassava starch by a non conventional fermentation method. *Biotechnol. Bioeng.* 23:291-299.
- 98.- Urabe I, H. Nanjo y H. Okada. 1973. Effect of acetylation of *Bacillus subtilis* alpha-amylase on the kinetics heat inactivation. *Biochim. Biophys. Acta.* 302(1):73-79.
- 99.- Vadeavella, C. V. y E. J. Del Rosario. 1981. Alpha-amylase production in shake flask culture of *Bacillus subtilis* NRRL 3411. *Bull. Philipp. Biochem. Soc.* 4(1-2):45-55.
- 100.- Varella, B. R. V. Concone, J. T. Senise y R. A. Doin. 1984. Continuous enzymatic cooking and liquefaction of starch using the technique of direct resistive heating. *Biotechnol. Bioeng.* 26:654-657.
- 101.- Wang, D. I. C., C. L. Cooney, A. L. Demian, P. Dunnill, A. E. Humphrey y M. D. Lilly. 1979. Fermentation and enzyme technology. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- 102.- Wieg J., J. Hall y P. Varga. 1969. Brewing beer with enzymes. *Process Biochem.* 33:38.
- 103.- Wei, D., S. J. Parulekar, B. Stsrk y W. A. Weigand. 1989. Plasmid stability and alpha-amylase production in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis* TN106(pAT5). *Biotechnol. Bioeng.* 33(8):1010.
- 104.- Weickert, M. J. y G. H. Chambliss. 1989. Genetic analysis of the promoter region of the *Bacillus subtilis* alpha-amylase. *J. Bacteriol.* 171(7):3656-3666.

- 105.- Wilson, J. J. y W. M. Ingledew. 1982. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amyolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(2):301-307.
- 106.- Wilson, J. J., G. G. Khachatourians y W. M. Ingledew. 1982. *Schwanniomyces* : SCP and ethanol from starch. *Biotechnol. Letters.* 4(5):333-338.
- 107.- Wynes, R. A. y N. E. Lloyd. 1974. U. S. Patent 3,414,479 December 3, 1968. Assigned to Standard Brands, Inc. *En S. J. Gutcho, Microbial enzyme production.* Noyes Data Corporation.
- 108.- Yoneda, Y, K. Yamane y B. Maruo. 1973. Membrane mutation related to the production of extracellular alpha-amylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50(3):765-770.
- 109.- Yoo, Y. J., T. W. Cadman, J. Hong y R. T. Hatch. 1981. Fed-batch fermentation for the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* . *Biotechnol. Bioeng.* 31:426-432.
- 110.- Zhang, Q., N. Tsukagoshi, S. Miyashiro y S. Udaka. 1983. Increased production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of glycine. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(1):293-295.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

taller de encuadernación

ENCUADERNACIONES PROFESIONALES

Tacuba N°1645 Ote.entre Félix U.Gómez y Héroes del 47

Tel.44-85-25 Monterrey, Nuevo León



**BIBLIOTECA, DIVISION
ESTUDIOS SUPERIORES**

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

