

liber. 1 ejemplar N. 29



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

" OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES PARA CULTIVO DE Bacillus subtilis, PARA PRODUCCION DE PROTEASAS Y AMILASAS EN LA INDUSTRIA "

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

presenta la alumna

Amelia María Guadalupe Farres González Sarabia

México, D.F.

6356

1979

807



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	PAG.
I.- Introducción .....	8
1.- Obtención de enzimas por fermentaciones	
industriales .....	8
1.1.- Historia .....	8
1.2.- Producción y aplicación de enzimas .....	11
1.2.1.- Fuentes de obtención .....	11
1.2.2.- Mercado .....	18
1.2.3.- Productores.....	19
1.2.3.- Avances tecnológicos.....	19
2.- Estrategias para incrementar la producción	
en los procesos de fermentación .....	21
2.1.- Enfoque genético .....	21
2.2.- Enfoque ecológico.....	22
2.2.1.- Modificaciones a los medios	
de cultivo .....	22
2.2.2.- Modificaciones a las condiciones	
de fermentación .....	23
3.- Antecedentes .....	25
3.1.- Condiciones para el desarrollo de	
Bacillus subtilis y producción de	
enzimas extracelulares .....	25

3.2.- Variaciones y control de pH durante la fermentación .....	28
4.- Estructura del proyecto .....	31
II.- MATERIALES Y METODOS.....	35
III.- RESULTADOS .....	39
a) Modificaciones al pH inicial.....	39
b) Modificaciones al amortiguador utilizado	
1) utilización de solución citrato-fosfato....	42
ii) utilización de amortiguador sin fosfatos...	42
iii) modificaciones al amortiguador de fosfatos.	46
c) Esterilización de sales por separado .....	53
IV.- DISCUSION.....	58
V.- CONCLUSIONES.....	74
VI.- BIBLIOGRAFIA.....	76

## T A B L A S, G R A F I C A S Y F I G U R A S.

	PAG.
TABLA 1. Enzimas obtenidas por fermentación.....	12
TABLA 2. Modificaciones al pH inicial.....	41
TABLA 3. Amortiguador citrato-fosfato.....	43
TABLA 4. Amortiguador sin fosfatos.....	45
TABLA 5. Amortiguador de fosfatos.....	47
TABLA 6. Esterilización de sales por separado y efecto de Calcio y fosfatos .....	56
FIGURA 1. Proceso de obtención de amilasa y proteasas bacterianas.....	34
GRAFICA 1. Crecimiento celular vs. tiempo en diferentes soluciones de fosfatos .....	48
GRAFICA 2. Nivel de azúcares reductores vs. tiempo en diferentes soluciones de fosfatos .....	49
GRAFICA 3. pH vs. tiempo en diferentes soluciones de fosfatos .....	50
GRAFICA 4. Potencia amilolítica (MWU/g) y potencia pro- teolítica (NU/g) vs. pH inicial.....	54
GRAFICA 5. Potencia amilolítica (MWU/g) y potencia pro- teolítica (NU/g) vs. pH final.....	54

## I N T R O D U C C I O N

No podemos analizar la producción de enzimas por fermentación de una manera aislada. Comparte con todos los procesos de fermentación un desarrollo histórico y una serie de características. Es por ello que se presenta en esta introducción primeramente un bosquejo histórico del desarrollo de la industria de fermentación, para pasar en seguida al campo específico de la producción de enzimas de origen microbiano y, finalmente, se presentarán los antecedentes del trabajo.

### 1.- OBTENCION DE ENZIMAS POR FERMENTACIONES INDUSTRIALES

#### 1.1.- Historia.

Aún sin conocer las causas que originaban el proceso de fermentación, éste era aplicado desde la antigüedad en diversas prácticas de obtención de alimentos y bebidas como: quesos, encurtidos, conservas, panes, licores, etc. Antes de Pasteur ya eran conocidas la fermentación alcohólica, la aeróbica de Aspergillus oryzae, se producía anaeróticamente levadura para panificación y se conocían algunas técnicas de inoculación y asepsia (Johnson, 1971).

Fue en 1836 cuando se atribuyeron por primera vez los fenómenos de putrefacción y fermentación a microorganismos (Gabriel y Fogel, 1955). Los descubrimientos de Pasteur sobre la importancia de éstos en las fermentaciones fueron muy relevantes; sin embargo, no hubo grandes innovaciones en el campo sino hasta comenzar el siglo XX. La Primera Guerra Mundial fue un evento determinante. Se inició en esta época la producción industrial de sustancias como glicerol, acetona, ácido cítrico y de las primeras enzimas, cuyo primer proceso industrial fue la obtención del "Taka-koji" que es una amilasa fungal obtenida a partir de Aspergillus oryzae (Windish, 1965). Jokichi Takamine lo patentó en 1894 (Faith, 1971) y se produjo a gran escala en 1914 (Prescott, 1959).

La Segunda Guerra Mundial y el descubrimiento de la penicilina dieron el siguiente gran impulso a la industria de fermentación. Este no hubiera sido posible de no haberse descubierto un gran número de técnicas que facilitaron los procesos de aereación y esterilización, además del diseño de pruebas a escala. En los últimos tiempos no se han producido cambios notables en la tecnología de fabricación.

Actualmente la lista de productos elaborados por fermentación es amplísima y aumenta a grandes pasos. Los productos son muy diversos, incluyendo antibióticos, esteroides, nucleótidos y proteínas, con aplicaciones y funciones

en campos como el de la medicina, la agricultura, la alimentación, el procesamiento de desechos y otros muchos (Aiba, 1973 y Perlman, 1974).

El inicio del desarrollo de la industrialización de la producción de enzimas se remonta al siglo XVIII. En 1752, Réaumur y posteriormente Schwann habían realizado observaciones de actividad proteolítica en jugos gástricos. La actividad de la amilasa fue observada por primera vez en el trigo en 1815 por Kirchoff y después en la ptialina en 1831. Fue Pasteur quien dividió a los "fermentos" en organizados y no organizados, incluyendo en estos últimos a los que Kuhn bautizó en 1878 como "enzimas". Sus propiedades, cinética, factores que las afectan, vienen siendo estudiadas desde entonces (Gabriel y Fogel, 1955).

En el terreno industrial, después del procedimiento de obtención de "koji" por Takamine se desarrollaron los primeros métodos para la obtención de enzimas bacterianas a escala comercial, cuyas patentes datan de 1917, hechas por Efron y Boidin (Prescott, 1959). Los métodos de obtención han variado mucho desde entonces. Los primitivos, ya fueran a partir de hongos o de bacterias, eran cultivos de superficie, que presentaban frecuentemente problemas de contaminación. Las diferentes variantes que han surgido son descritas por Windish (1965) y Rose (1961). En la actualidad, se prefiere el cultivo sumergido, patentado por Smythe, Dra

ke y Neubeck en 1950 (Prescott, 1959). Este método ha permitido reducir la contaminación y el tiempo de fermentación, además de facilitar la recuperación del producto.

### 1.2.- Producción y Aplicación de Enzimas.

En la tabla 1 se presenta una lista, que no pretende ser exhaustiva, de las enzimas obtenidas actualmente, así como de sus productores, aplicaciones y fuentes de obtención más comunes. Se analizarán algunos puntos a continuación.

#### 1.2.1.- Fuentes de obtención.

Todos los seres vivos utilizan enzimas para regular su metabolismo. Por lo tanto, prácticamente cualquier organismo es una fuente potencial de enzimas. No obstante, es necesario tener presente que para que pueda ser aprovechado industrialmente debe presentar ciertas características, como disponibilidad, sustrato barato y accesible, ciclo de vida corto, etc. Algunas enzimas se obtienen a partir de mamíferos, como renina, pepsina, pancreatina y tripsina. Otras, de angiospermas, como la bromelina y la papaína. La gran mayoría se obtiene a partir de microorganismos, que reúnen todos los requisitos para ser utilizados en la industria. Es verdad que, como menciona Faith (1971), no siempre las enzimas de origen microbiano son tan adecuadas para ciertos procesos como sus equivalentes obtenidos de otras fuentes.

T A B L A 1

E N Z I M A S O B T E N I D A S P O R F E R M E N T A C I O N E S

ENZIMA	FUENTE DE OBTENCION	USOS	PRODUCTOR
Amilasa	<u>Aspergillus oryzae</u>	Panificación. Jarabes. Textiles.	2
		Forrages. Auxiliar digestivo.	5
	<u>Aspergillus niger</u>	Producción de glucosa.	12
		Fermentación alcohólica.	15
	<u>Rhizopus sp.</u>	Preparación de cereales precocidos.	23
		Modificación de almidón para cubiertas de papel.	25
	<u>Bacillus subtilis</u>	Recuperación de desperdicios de azúcar.	26
		Adelgazar concentrados de café.	27
		Almidón soluble en frío para lavandería.	28
		Adelgazar concentrados de café.	29
		Almidón soluble en frío para lavandería.	33
		Remoción de papel tapiz.	36
		Determinación de glucógeno.	México: 8
	Licuefacción de purés vegetales.	10	
	Potencial: reducción de viscosidad en chocolate, confitería y clarificación de jugos.		
Amiloglucosidasa	<u>Rhizopus sp.</u>	Producción de glucosa.	5 8
		Sacarificación del mosto.	13 15
	<u>Aspergillus niger</u>	Producción de cerveza baja en calorías.	23 25
			36
			México: 10

ENZIMA	FUENTE DE OBTENCION	USOS	PRODUCTOR	
Catalasa	<u>Aspergillus niger</u> <u>Micrococcus lyso-</u> <u>deikticus.</u>	Esterilización de leche.	11	19
		Preparación de derivados de huevo.	26	28
			30	32
Celulasa	<u>Trichoderma koningi</u> <u>Trichoderma viride</u> <u>Aspergillus niger</u>	Auxiliar digestivo.	1	12
		Maceración de vegetales deshidratados.	23	25
		Potencial: obtención de glucosa y degradación de basura.	28	29
			36	
Citocromo c	<u>Candida sp.</u>	Uso médico.	30	
Colagenasa	<u>Clostridium histolyticum.</u>	Uso médico.		
Deaminasa del ácido adenílico	<u>Aspergillus oryzae</u>	Obtención de Inosín monofosfato.		
Estaquiasa	fungal	Potencial: reducción de flatulencia causada por leguminosas al aplicarse a las mismas.		
Estreptoquinasa	<u>Streptococcus sp.</u>	Uso médico	20	
5'-fosfodiesterasa	<u>Bacillus subtilis</u> <u>Penicillium citrinum</u> <u>Streptomyces griseus</u>	Producción de ácidos inosínico y guanílico.	34	37
Galactosa oxidasa	fungal	Determinación de azúcares en la industria analítica.		

ENZIMA	FUENTE DE OBTENCION	USOS	PRODUCTOR	
$\alpha$ -glucanasa	<u>Bacillus subtilis</u>	Cervecería.	36	
Glucosa isomerasa	<u>Arthrobacter sp.</u> <u>Bacillus coagulans</u> <u>Lactobacillus brevis</u> <u>Actinoplanes missouriensis</u> <u>Streptomyces sp.</u>	Transformación de glucosa a fructosa y obtención de licores de maíz altos en fructosa.	3 6 16	5 12 25
Glucosa oxidasa	<u>Aspergillus niger</u> <u>Penicillium chrysogenum</u>	Secado de huevo. Eliminación de glucosa en diversos alimentos. Eliminación de oxígeno en alimentos, cerveza, bebidas carbonatadas. Con catalasa: determinación de glucosa en análisis clínicos; eliminación de manchas.	1 19 20 23 32 36	
Hemicelulasa	<u>Trichoderma viride</u> <u>Aspergillus niger</u>	Clarificación de jugos. Separación de almidón en papas. Separación de cubierta de frijol de soya. Alimentos de zanahoria. Con celulasa: fractura de pozos petroleros, concentrados de café y forrajes. Potencial: pelar cítricos.	23 25 29 36	
Hialuronidasa	bacteriana	Difusión de medicamentos inyectables.		

ENZIMA	FUENTE DE OBTENCION	USOS	PRODUCTOR	
Invertasa	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Confitería. Melazas.	11 15 25 32 33 35 36	México: 14
Lactasa	<u>Saccharomyces fragilis</u>	Concentrados de leche entera. Helados. Potencial: panificación	12 19 23	
Lipasa	<u>Rhizopus sp.</u> <u>Mucor sp.</u>	Auxiliar digestivo. Quesos. Esterilización de lácteos. Tintorería. Degradación de balsa. Potencial: desengrasado de huesos para obtención de gelatinas de mejor calidad.	9 23 29 36	
Naringinasa	<u>Aspergillus niger</u>	Elimina sabor amargo de jugo de limón y de uva.	29	
Pectinasa	<u>Sclerotinia libertina</u> <u>Coniothyrium diploidiella</u> <u>Aspergillus spp.:</u> <u>A. niger, A. oryzae y</u> <u>A. flavus.</u>	Clarificación de vinos y jugos. Incrementa rendimiento en obtención de jugos. Concentrados de café.	4 23 28 32	17 25 29 36 México: 10
Pectinesterasa	fungal	Pectina baja en metoxilos. Clarificación de jugos.		
Penicilinasas	<u>Bacillus subtilis</u>	Degradación de penicilina	23	31

ENZIMA	FUENTE DE OBTENCION	USOS	PRODUCTOR
Proteasa	<u>Aspergillus niger</u>	Auxiliar digestivo. Panificación.	1
		Eliminar gelatina de películas y	2
	<u>Aspergillus oryzae</u>	recuperar plata. Saborización y	12
		eliminación de bruma del sake. Gra	15
	<u>Mucor sp.</u>	duación de cerveza. Ablandar car-	18
		ne. Recuperar desperdicios de car-	23
	<u>Rhizopus sp.</u>	ne. Ablandar tripas para embutido.	25
<u>Streptomyces griseus</u>		Adelgazar solubles de pescado. Hi-	26
		drolizados de proteínas lácteas. -	28
		Estabilización de leche evaporada.	29
		Detergentes. Lavado en seco. Remo	31
		jo y apelmbrado en curtiduría.	36
		Tratamiento de textiles. Forrajes.	México: 8
		Resolución de mezclas de aminoáci-	10
	dos.		
Pululanasa	<u>Aerobacter aerogenes</u>	Potencial: jarabes de maíz altos en maltosa.	
Queratinasa	<u>Streptomyces fradiae</u>	Apelmbrado en curtiduría	20
Renina microbiana	<u>Mucor sp.</u>	Elaboración de quesos	8 9 19 23 25 36 México: 10
Tanasa	fungal	Potencial: reducir bruma en cerveza.	
Ureatoxidasa	fungal	Determinación de ácido úrico	

LISTA DE PRODUCTORES

- |                                   |                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1.- Aktie Bolaget Astra, Hungría  | 19.- Kyowa Makko Kogyo, Japón     |
| 2.- Brogal, Hungría               | 20.- Lederle, E.U.                |
| 3.- Car-Mi, E.U.                  | 21.- Meito Sangyo, Japón          |
| 4.- Ciba Geigy, Suiza             | 22.- Merck, Alemania              |
| 5.- Clinton Corn Processing, E.U. | 23.- Miles, E.U.                  |
| 6.- Corning Glass, E.U.           | 24.- Nagase, Japón                |
| 7.- CIC International, E.U.       | 25.- Novo Industri A/S, Dinamarca |
| 8.- Daas Pfizer, E.U.             | 26.- Premier Malt, E.U.           |
| 9.- Dairyland Food, E.U.          | 27.- Publicker Industries, E.U.   |
| 10.- Enmex S.A., Mexico           | 28.- Rohm G.m.b.H., Alemania      |
| 11.- Fermco Labs., E.U.           | 29.- Rohm & Haas, E.U.            |
| 12.- Gist Brocades, Holanda       | 30.- Sankyo, Japón                |
| 13.- Glaxo Labs., Gran Bretaña    | 31.- Schenley Labs., E.U.         |
| 14.- Glucosa S.A., México         | 32.- Searle Biochemicals, E.U.    |
| 15.- Grain Processing, E.U.       | 33.- Standard Brands, E.U.        |
| 16.- ICI, E.U.                    | 34.- Takeda, Japón                |
| 17.- I.G.Farbenind, Alemania      | 35.- Universal Foods, E.U.        |
| 18.- Kaken Chemical, Japón        | 36.- Wallerstein Labs., E.U.      |
|                                   | 37.- Yamase, Japón                |

REFERENCIAS

AUTOR	OBSERVACIONES
1) Beck y Scott, 1974.	Información sobre usos potenciales
2) Cassida, 1968.	Cuadro básico de información
3) Faith et al., 1971.	
4) Perlman, 1974.	Mayor parte información sobre productores
5) Sweigart, 1978.	Información sobre glucosa isomerasa
6) Underkoffler, 1977.	Información sobre fuentes de obtención

### 1.2.2.- Mercado.

La información contenida en la tabla 1 permite ver que la mayoría de las enzimas actualmente en el mercado están destinadas a la industria de alimentos. En ella han desempeñado un importante papel, revolucionando sectores enteros durante los últimos 15 años. Sin embargo, su papel se acrecentará sin duda con las nuevas técnicas de inmovilización y control computarizado de procesos (Trauberman, 1975). La innovación de estos últimos y el surgimiento de nuevos productos ha sido posible gracias a la actividad enzimática. - Quizás el ejemplo más notable sea el de la obtención de licor de maíz alto en fructosa, proceso inexistente hace unos pocos años y que ha sido factible gracias a la enzima glucosa isomerasa. Producido por primera vez en 1970, alcanzó - una producción en E.U. de más de 4,405,528,600 kg en 1975 (Urquidí, 1975)

Las necesidades alimenticias de una población mundial en crecimiento acelerado pueden solventarse en parte con la ayuda de estos catalizadores orgánicos, y se garantiza un mercado prometedor. En la hemicelulasa, la celulasa (Spano, 1975) y la lactasa (Kretchmer, 1972) quizá podrán encontrarse en un futuro no muy lejano soluciones realmente importantes a los problemas de escasez de alimentos, eliminación de desechos y contaminación ambiental.

Otros sectores, como los de textiles, curtiduría y detergentes no dejan de ser importantes (Faith et al., 1971). En este último se espera un gran auge, tras haberse levantado la prohibición de la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos del uso de enzimas en detergentes, que provocó un desplome en la producción de proteasas, que había alcanzado un nivel máximo en 1971 (Perlman, 1974).

### 1.2.3.- Productores.

Los productores citados en la primera tabla son los de importancia mundial y se mencionan también los nacionales, que son sólo tres y que por ahora poseen tecnología extranjera: Enmex, S.A., Glucosa S.A. y la subsidiaria de Daas Pfizer. La producción nacional es reciente: Enmex, S.A. fue el primero e inició sus actividades en 1971 con la producción de amilasa y renina microbiana. Actualmente produce además proteasas y nectinasas. Pfizer, por su parte, produce amilasas y proteasas.

### 1.2.4.- Avances tecnológicos.

Johnson (1971) describe rápidamente los progresos técnicos logrados en el proceso de fermentación. En términos generales, han consistido en la sustitución del cultivo de superficie por el sumergido y en la producción de filtros más eficientes para lograr mayor asepsia. Hockenhuil (1971) menciona además la introducción de la fermentación continua en sustitución de la producción por lotes y la aparición de

medios de cultivo menos complejos y más económicos. En cuanto al proceso de recuperación, la tecnología de membranas introducida recientemente ha sido un éxito para hacerlo más eficiente (Gregor, 1978).

Se ha avanzado también en las preparaciones comerciales de las enzimas. Entre los nuevos procedimientos figura el reportado por Nelson hace más de 60 años, pero explotado en los últimos 15: la inmovilización (Sweigart, 1978). En ella se fija la enzima a un soporte, de naturaleza diversa según el método: adsorción sobre o dentro de acarreadores, enlace covalente a éstos o entrecruzamiento de la enzima sobre o dentro de los mismos; encapsulación y entrecruzamiento directo enzima-enzima (Messing, 1975). La inmovilización favorece el control del proceso de catálisis y el diseño de controles automáticos para el mismo; por otra parte, se ahorra enzima al permitirse su reutilización y aumentar su vida media (Trauberman, 1975). A pesar de las ventajas de esta innovación, para la mayoría de las enzimas es aún muy alto el costo, comparado con el de las enzimas solubles que se utilizan actualmente. No obstante, a futuro seguramente cobrará importancia al ser necesario ahorrar energéticos y materiales y ante el alza continua de costos. El éxito de la glucosa isomerasa mencionado antes fue factible gracias a este proceso (Sweigart, 1978).

## 2.- Estrategias para incrementar la producción en los procesos de fermentación.

### 2.1.- Enfoque genético.

Una vez establecido un proceso de fermentación, conocidas las mejores condiciones de aireación, agitación, tipo de fermentador, etc., hay dos tipos de estrategias para mejorar los rendimientos: la genética y la ecológica.

Demain (1973) afirma que por lo general la capacidad productora de una cepa sólo puede ser incrementada mediante la manipulación genética. Para ello es requisito conocer las rutas metabólicas y los parámetros genéticos y de regulación que las modulan. De hecho, el mismo autor en 1971 señala que los aumentos de cientos y miles de veces en la producción de metabolitos se deben a las técnicas genéticas, principalmente a la mutación. Señala que la mutación ha sido importante para la producción de metabolitos secundarios, ha ayudado a producir nuevas sustancias y a eliminar productos indeseables.

Las técnicas genéticas de mutación, selección e hibridización son revisadas por Calam (1970). Un ejemplo del enfoque genético para incrementar la producción está en los trabajos de Bailey (1975) y Yeh (1977), que utilizan agentes mutagénicos. Merrick (1975) trabaja con una técnica factible sólo en organismos que presentan frecuencias altas de recombinación: la hibridización, cuyo objetivo es amplificar los efectos de la mutación o de alelos naturales.

## 2.2.- Enfoque ecológico.

Denominamos enfoque ecológico a las modificaciones relativas a composición del medio de cultivo y a parámetros físicos del medio. Se analizará cada tipo por separado.

### 2.2.1.- Modificaciones a los medios de cultivo.

Todo medio de cultivo debe contener fuentes de Carbono (C) y Nitrógeno (N), elementos llamados macronutrientes, y ciertas sales minerales, denominadas micronutrientes. En ocasiones deberán añadirse, además, cofactores importantes para el desarrollo. La selección de materias primas estará en función de costo, disponibilidad y requerimientos específicos del organismo en cuestión. Las fórmulas deben estudiarse continuamente, ya que determinadas circunstancias económicas, e incluso políticas, pueden determinar cambios importantes en precio y disponibilidad; por tanto, es conveniente tener variantes.

El mejor conocimiento de las vías metabólicas del organismo permite apreciar el efecto que algunos nutrientes pueden tener como inductores, represores, favorecedores de la formación de ciertos catabolitos, etc. (Demain, 1971). Se ve claramente, pues, la interrelación entre los factores genéticos y los medioambientales. Algunos ejemplos de trabajos con el enfoque ecológico son los de: López (1977), Markkanen (1976), Mitra (1975) y Puc (1977).

Los trabajos de Mitra y Markkanen son ejemplos intere-

santes, en los que la alimentación cambia en el curso de la fermentación, con el fin de provocar crecimiento al inicio y después inducir la formación del metabolito deseado.

### 2.2.2.- Modificaciones a las condiciones de fermentación.

Se considera como tales modificaciones a factores como pH, presión osmótica, osmolalidad, aereación, agitación, temperatura. Aunque un proceso de fabricación esté establecido hace mucho tiempo y proporcione buenos resultados, la alta variabilidad de los sistemas biológicos hace que casi cada cepa tenga condiciones óptimas de desarrollo particulares; por otra parte, cada metabolito tiene también condiciones óptimas de producción. Finalmente, debe buscarse el menor costo de fabricación.

Las modificaciones a condiciones de fermentación ya establecidas pueden no dar incrementos en rendimiento tan espectaculares como los que proporciona la manipulación genética mencionada por Demain (1971), pero si suficientes para disminuir costos e incrementar ganancias en forma importante para cada empresa en particular. En Puc (1977), encontramos un interesante ejemplo que ilustra la relación entre osmolalidad y concentración y tipo de nutrimentos, logrando grandes ahorros al trabajar con carbohidratos más baratos. Por su lado, Markkanen (1975) proporciona un ejemplo de interacción entre aereación, pH y temperatura en el que aumenta la producción y disminuye gastos de energía.

En general, la modificación genética de las cepas de interés industrial resulta lenta y costosa, ya que requiere de personal calificado y de materiales y condiciones muy particulares. En cambio, la modificación de los factores medioambientales para incrementar rendimientos es un experimentación no tan complicada como la anterior y no requiere de personal tan especializado. Es cierto que muchas veces hay que trabajar empíricamente, pero así se ha encontrado, en algunos casos, una interesante serie de sorpresas en la investigación para la industria (Hockenull, 1971 y Windish, 1965),

Por lo tanto, con base en las consideraciones anteriores, el objetivo de este trabajo consiste en estudiar cómo mejorar la producción de las enzimas alfa amilasa y proteasas obtenidas a partir de una cepa de Bacillus subtilis, mediante cambios en el medio de cultivo. En este caso, los cambios conducen a modificar el parámetro pH por varios caminos. Este factor se seleccionó por ofrecer perspectivas de mejorar los rendimientos en la producción sin alterar en forma sustancial el proceso de obtención ni requerir excesivos gastos adicionales.

Las enzimas obtenidas son importantes, pues como se ha visto ya en la tabla 1, tienen una amplia gama de aplicaciones. La fermentación que se intenta modificar produce las dos enzimas, pero en la preparación comercial tiene mayor valor la actividad proteolítica.

### 3.- Antecedentes.

#### 3.1.- Condiciones para el desarrollo de *Bacillus subtilis* y producción de enzimas extracelulares

El *Bacillus subtilis* utilizado en la industria es un bacilo grande, cuyas dimensiones son de 1 a 1.5 $\mu$  de ancho por 4 a 8 $\mu$  de largo; es Gram positivo, forma endosporas, es saprofito y quimiorganotrófico y crece mejor en condiciones aerobias (Davis et al., 1973). Tolera grandes variaciones de temperatura, entre 15 $^{\circ}$  y 50 $^{\circ}$ C (Herrera, 1968) pero su óptimo está entre los 25 $^{\circ}$  y 30 $^{\circ}$ C (Sadoff, 1972). No obstante, es de señalarse que en la mayoría de las publicaciones consultadas trabajan a 37 $^{\circ}$ C (Chambliss, 1977, Markkanen, 1976, López, 1977, por ejemplo). Sus endosporas resisten durante algunos momentos temperaturas superiores a 110 $^{\circ}$ C. En cuanto a pH, parece "preferir" el medio ligeramente ácido y el pH inicial más frecuente reportado por los autores mencionados antes es de 6.5.

Esta bacteria no parece tener requerimientos especiales respecto a fuentes de Carbono o Nitrógeno ni de sales minerales para su desarrollo, ya que las cantidades requeridas se encuentran como impurezas en otros constituyentes del medio, principalmente en la harina de soya (Windish, 1965). Sin embargo, algunos autores señalan el posible requerimiento del ión Manganeso ( $Mn^{++}$ ) al considerarlo factor crítico para iniciar el crecimiento (Salle, 1973). Este ión

participa, junto con el Magnesio ( $Mg^{++}$ ), en la regulación de fenómenos de transporte (Hutner, 1972), la esporulación (Hutner, 1972, Lapage, 1970, Sadoff, 1972, Salle, 1973) y para la integración del ribosoma (Tempest, 1970).

Específicamente la producción de enzimas parece requerir Zinc ( $Zn^{++}$ ) en el caso de la alfa amilasa (Underkoffler, 1977) y esta misma necesita en forma absoluta de Calcio ( $Ca^{++}$ ) (Barker et al., 1976, Murrell, 1967, Underkoffler, 1977). Por su parte, Windish (1965) sugiere que ciertas concentraciones de fosfatos estimulan la producción de alfa amilasa.

Las enzimas cuya producción se intenta estimular en este caso son propias de la fase estacionaria de crecimiento, pero son especialmente abundantes en las esporas y células esporuladas (Nakayama, 1977). La esporulación es común, pero no obligatoria, en este género. Ocurre después del crecimiento exponencial, en cuanto se agotan los nutrientes que estimulan el crecimiento vegetativo. Se presentan varios eventos morfológicos y bioquímicos, descritos en Sadoff (1972), así como de regulación, como la modificación del aparato de traducción estudiada por Chambliss (1977). La síntesis de proteínas se altera totalmente debido a fenómenos como inducción, represión catabólica, inhibición por retroalimentación y a la modificación de enzimas por la acción de proteasas.

El B. subtilis produce básicamente tres actividades proteolíticas (Markkanen, 1974): una es la proteasa neutra, otra es la proteasa alcalina o de la esporulación y la última es la proteasa ácida. La proteasa alcalina es absolutamente necesaria para la esporulación (Sadoff, 1972) mientras que la neutra es más abundante y termolábil (Markkanen, 1975). Las tres son extracelulares, como la mayoría de las proteasas microbianas, y pertenecen al grupo de proteasas sensibles a metales o a quelantes, según la clasificación de Harley. Estas varían en cuanto a especificidad, mecanismo de acción y el rango de tolerancia a pH (Morihara, 1974). Todas alcanzan su máxima producción en la fase estacionaria de crecimiento, aunque pueden empezar a producirse antes.

La alfa amilasa de B. subtilis es una endoamilasa que ataca los enlaces  $\alpha(1-4)$  y contiene  $\text{Ca}^{++}$  firmemente unido a la molécula (Windish, 1965). Su síntesis también alcanza el máximo en la fase estacionaria, pero empieza antes que la de la proteasa (Markkanen, 1974).

Existen otras enzimas que abundan en esporas y células esporuladas; entre otras están la glucosa deshidrogenasa (Fujita, 1977) y la  $\beta$ -glucanasa (Markkanen, 1976). La comprensión del proceso de regulación del fenómeno de la esporulación será, sin duda, un factor importante en la búsqueda de incremento en los rendimientos de metabolitos relacio

nados con este proceso. La adición de sustancias que estimulen la producción de esporas, como el acetato de potasio utilizado por Fujita (1977) para estimular la producción de glucosa deshidrogenasa y esporas, puede conducir a la formación de mayor cantidad de metabolitos secundarios. De main (1971) denomina metabolitos secundarios a todos aquellos producidos durante el proceso de esporulación y según él las proteasas y alfa amilasa entrarían en esta clasificación. Sin embargo, Weinberg (1970) considera como tales sólo a micromoléculas.

### 3.2.- Variaciones y control del pH durante la fermentación.

El pH del medio de cultivo está determinado, principalmente, por sus componentes, cada uno de los cuales contribuye a su variación en diferente proporción. Se pueden regular los cambios de pH al balancear la composición del medio, poniendo atención en aquellos constituyentes que lo afecten más. Para el caso específico que aquí se trata el agua de cocimiento de maíz y la lactosa lo afectan determinantemente, alterando la secuencia de pH durante la fermentación y consecuentemente la producción de enzima. Así, tenemos que a mayor contenido de lactosa, menor será el pH y habrá mayor producción, ocurriendo lo inverso con el agua de cocimiento de maíz. Más aún, mientras más rápido descienda el pH, la cantidad de enzima obtenida será mayor (Yeh, 1977).

Las variaciones durante la fermentación provienen de los metabolitos liberados por el organismo y de las transformaciones provocadas en los componentes del medio. Los cambios pueden ser bruscos o paulatinos y afectan en forma diferente al microorganismo y al producto, cuyos pH óptimos no siempre coinciden. Es por ello que un control adecuado de este parámetro puede conducir a un incremento en rendimiento (Johnson, 1971). La magnitud y la velocidad de los cambios de pH afectan a todos los procesos metabólicos, incluyendo el de la esporulación. Cada cepa posee una curva de pH característica dependiendo de los ácidos a los que haya convertido a los carbohidratos sencillos según su constitución génica. Por lo general, para las diferentes especies del género Bacillus, al agotarse los carbohidratos sencillos e iniciarse la fase estacionaria el pH tiende a alcalinizarse (Murrell, 1967). Sin embargo, en esto es difícil encontrar un consenso en los diversos autores por la diversidad de cepas y medios utilizados; así, Windish (1965) reporta un pH óptimo para la producción de alfa amilasa de 6.8 a 7.2 y un descenso brusco al llegar a 7.4, mientras que Markkanen (1974) logra el máximo entre 6.0 y 7.0. En Enmex, el óptimo en el fermentador está entre 6.4 y 6.8, pero la temperatura es ligeramente menor a la trabajada por los autores citados (32°C).

Existen diferentes métodos de control de pH. Entre éstos se encuentran: la adición lenta de cloruro de amonio que contribuye además a aumentar la cantidad de Nitrógeno; la adición de Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), sosa ( $\text{NaOH}$ ) y ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ) (Aiba, 1973). Se hizo referencia antes al efecto del medio como elemento importante de control de este parámetro. Los ensayos en este sentido son muy antiguos, según refiere Prescott (1959). Sin embargo, siempre hay nuevos intentos al descubrirse y estudiarse más a fondo las interacciones entre los constituyentes del medio, el proceso de esterilización (Sidler, 1977), el papel de los iones (Williams, 1971), etc. Asimismo, al regular el pH deben considerarse factores como aereación, agitación, temperatura, que de alguna manera lo afectan (Markkanen, 1975 y Yeh, 1977).

En la actualidad, el control y regulación del pH durante la fermentación se han facilitado enormemente al encontrarse en el mercado sensores automáticos, los que además tienen la capacidad de mantener el valor deseado de este parámetro agregando los ácidos o bases necesarios automáticamente (Sidler, 1977).

En la fermentación con la que se trabaja en este caso no existe ningún control automático. En ocasiones se hace necesario ajustar el pH inicial debido a variaciones en la materia prima. El comportamiento de la curva de pH carac-

terística de cada cepa se puede modificar, además, por la adición de antiespumante. La regulación de los cambios, normalmente, se debe a los Fosfatos Monosódico y Disódico del medio que actúan formando una solución amortiguadora, en este caso tendiente a la neutralidad. El Carbonato de Calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) contribuye también a amortiguar las oscilaciones (Hockenhull, 1959). El proceso de esterilización, al favorecer reacciones químicas entre los constituyentes del medio también afecta tanto al pH inicial como a la secuencia posterior.

#### 4.- Estructura del proyecto.

La información anterior sugiere el diseño de diferentes tipos de experimentos que conduzcan al incremento en la producción enzimática al variar las condiciones de cultivo. Las pruebas se realizarán en el laboratorio, en matraces agitados. Se pueden clasificar de la siguiente manera:

##### a) Modificaciones al pH inicial

- i) con ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ )
- ii) con cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )
- iii) con ácido clorhídrico y cloruro de amonio
- iv) con ácido cítrico

b) Modificaciones a la solución amortiguadora utilizada

- i) utilización de solución citrato -fosfato
- ii) utilización de amortiguador sin fosfatos
- iii) modificaciones al amortiguador de fosfatos

c) Esterilización de sales por separado

El material empleado pertenece a Emmex, S.A., en cuyas instalaciones se llevarán a cabo los experimentos. Los métodos y materiales de cultivo son los que se utilizan en esta empresa normalmente. Las condiciones en que se llevan a cabo las pruebas han sido determinadas previamente por el equipo técnico de la empresa para alcanzar la producción óptima de las enzimas deseadas.

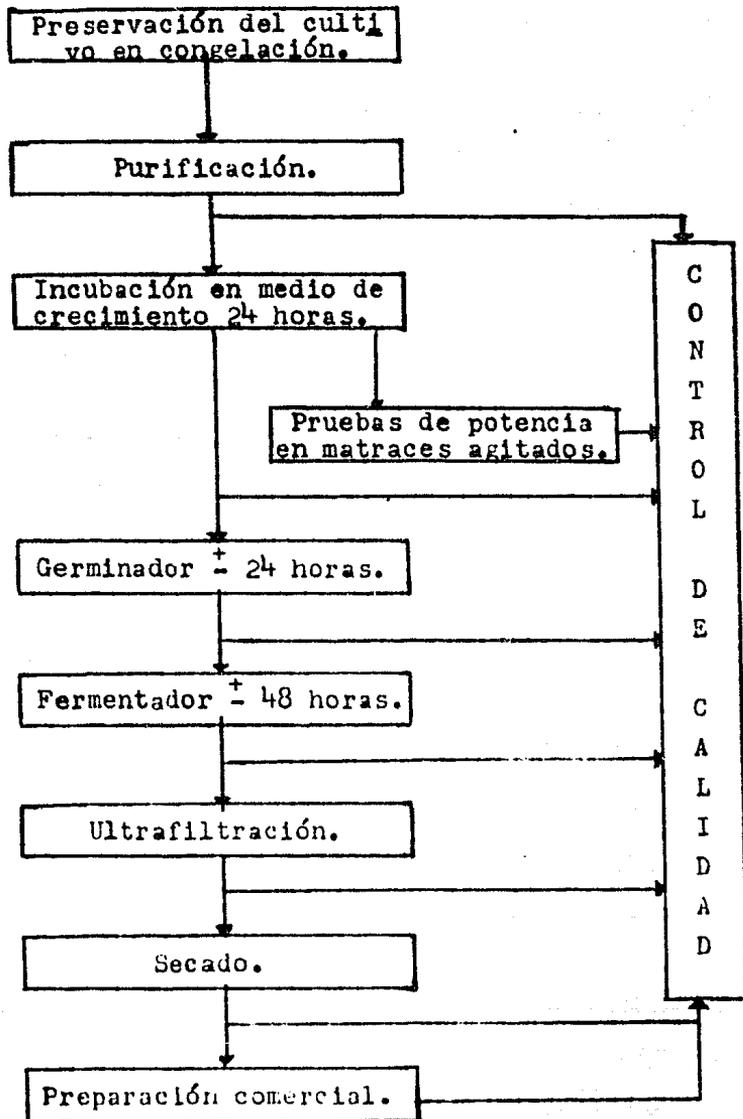
El llevar a cabo este tipo de estudios dentro de una empresa tiene la ventaja de utilizar cepas, materias primas y condiciones cuyo éxito en la producción ya ha sido corroborado en otras ocasiones.

En la figura 1 puede verse, a grandes rasgos, en qué consiste el procedimiento de elaboración de estas enzimas, incluyendo las fases de laboratorio y de fabricación. Básicamente, se propaga el cultivo tras haberse seleccionado una colonia aislada y comprobado los rendimientos en pruebas de laboratorio con matraces agitados. Hay una etapa de crecimiento, primero en el laboratorio y después en la planta, de donde pasa al fermentador. Allí se alcanza la fase estacionaria de crecimiento y, por consiguiente, la

producción máxima de enzimas. El proceso de recuperación incluye varios pasos, con el fin de concentrar al máximo los productos y eliminar impurezas. Finalmente se preparan las presentaciones comerciales. Todo el proceso debe ser vigilado por el Departamento de Control de Calidad.

FIGURA 1

## PROCESO DE OBTENCION DE AMILASA Y PROTEASAS BACTERIANAS



## MATERIALES Y METODOS

### 1.- Microorganismo utilizado.

Bacillus subtilis, mutante obtenido en Elkhart, Indiana, E.U., por radiación ultravioleta; clave 14.2F<sub>2</sub>.

### 2.- Medio de cultivo.

- a) Preservación en congelación: "Litmus Milk" (Difco).
- b) Propagación y selección de colonias: agar bacteriológico (Bioxon), caldo nutritivo (Bioxon) y peptona (Wilson).
- c) Crecimiento: caldo nutritivo (Bioxon) en agua destilada, en matraces de 2,800 ml con fondo plano y tapón de algodón y gasa.
- d) Fermentación:
  - 1) Testigo.- Incluye lactosa, harina de soya, harina de pescado, agua de cocimiento de maíz, carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), fosfato monosódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato de diamonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ ) (DAP).
  - 11) Las variantes se señalan en las tablas correspondientes a resultados, 2 a 6.

### 3.- Procedimiento de inoculación y fermentación.

El medio de preservación se esteriliza según las instrucciones del fabricante en tubos de ensayo con tapón de rosca de 25 ml de capacidad. Se inoculan con una colonia

proveniente del medio de propagación y transferida con asa de sembrar, o con dos mililitros provenientes del medio de crecimiento. Este, a su vez, debe ser esterilizado durante 30 minutos a 120°C. Posteriormente se inoculara con 2 ml de un matraz de crecimiento anterior o de "Litmus Milk". Se incuba durante 24 horas a 32°C en un agitador recíprocante. De este cultivo se toman 2 ml, con los que se inoculan matraces Bellco, de 250 ml de capacidad, con tres baffles y tapados con gasa doble, que contienen el medio de fermentación. Estos se incuban durante 48 horas a 32°C en un agitador rotatorio NEW BRUNSWICK G 10, a 310 r.p.m. En los casos en los que se pretende elaborar una curva de desarrollo durante la fermentación, se extraen muestras a diferentes tiempos. Al final, se someten a los análisis indicados más adelante.

#### ANALISIS DEL MEDIO DE FERMENTACION

5.- Pureza del medio de cultivo.- Para detectar contaminantes se elabora una laminilla, se tiñe con la técnica de Gram y se observa directamente al microscopio. Se siembra, además, un control en medio de propagación, que se incuba durante 24 horas a 32°C.

6.- pH.- Se utiliza un potenciómetro BECKMAN ZEROMATIC SS 3 y se mide a 30°C.

7.- Nivel de azúcares reductores.- Se usa el método Schoor le modificado por Enmex.

8.- Crecimiento.- Se expresa en Densidad Optica leyendo ab sorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro BECKMAN. Las lecturas directas son en transmitancia y se transforma a absorbancia siguiendo las tablas contenidas en Laskin et al. (1973). Las diluciones son de 1 g en 100 ml de agua destilada, según recomiendan Chambliss (1977), Glaser (1977) y López (1977).

9.- Actividad amilolítica.-Se aplica el método de Wohlge-muth (1908), citado por Prescott (1959) y modificado en En mex. Esta prueba está basada en el tiempo requerido para que una preparación de alfa amilasa bacteriana hidrolice un sustrato de almidón hasta una dextrina de tamaño defini do. El tamaño de la dextrina se indica por el color de un complejo dextrina-yodo. Se define a una unidad Wohlgemuth modificada (MWU) como la cantidad de enzima que dextriniza 100 mg de almidón soluble (Lintner, Merck) a una dextrina de tamaño definido en treinta minutos bajo las condiciones de la prueba.

10.- Actividad proteolítica.-Se utiliza el método de North rup modificado en Enmex. Esta técnica se basa en la diges tión de una solución regulada (pH 7.4) de caseína (Nutri-tional Biochemicals) durante 35 minutos a 40°C, seguida de una precipitación de la caseína no digerida y filtración.

La cantidad de caseína hidrolizada se mide colorimétrica-  
mente tras haber añadido reactivo de fenol Folin-Ciocalteu  
(Sigma). Una unidad Northrup (NU) se define como la cantid  
dad de enzima que provoca una hidrólisis del 40% del sus-  
trato de caseína bajo las condiciones de la prueba.

## RESULTADOS

### a) Modificaciones al pH inicial.

En numerosas ocasiones es necesario ajustar el pH inicial de un fermentador. En el caso que aquí se trata, el pH del medio es de 6.3 a 6.4, por lo general. Si hay necesidad de corregirlo se añade HCl diluido (ácido muriático) o NaOH (sosa cáustica).

Con el fin de determinar si este pH y este tratamiento son realmente los más adecuados para comenzar la fermentación se planearon los experimentos que a continuación se explican.

Al medio de cultivo normal se le agregaron 1 ó 3 ml de HCl 1M, inmediatamente antes de inocular, obteniéndose los valores de pH inicial que se muestran en la tabla 2. El pH fue determinado a 30°C. Las cantidades de HCL se seleccionaron, tras probarse varias, por su facilidad de manejo y por proporcionar decrementos paulatinos de este parámetro. Se logró un ligero aumento en la producción de proteasa y pequeñas disminuciones en la de amilasa. Los pH finales son ligeramente más ácidos que el del testigo, a diferencia de los casos, analizados más adelante, en que se agregó  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , en que son más ácidos todavía.

Por otra parte, se pensó que la adición de sustancias podría cumplir dos funciones: disminuir el pH e incrementar la provisión de Carbono y Nitrógeno (Aiba et al., 1973). Para ello se utilizaron ácido cítrico y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . El primero, a la misma molaridad que el HCl, mientras que el segundo se probó en diferentes molaridades y cantidades, tal como se puede ver en la tabla 2.

La adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1M en cualquier cantidad disminuye tanto la actividad amilolítica como la proteolítica. Lo mismo pasa con una molaridad 5 veces mayor. La acidez final es en todos los casos inferior a la del testigo. El número de matraces es muy pequeño, pero no se consideró pertinente repetir estos experimentos siendo tan notablemente perjudiciales los tratamientos.

Cuando se agrega  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5M mezclado con HCl 1M se eleva la actividad amilolítica respecto al testigo, mientras que la proteasa no se afecta. El incremento logrado en la actividad amilolítica es bastante bueno como para pensar en la adopción del tratamiento a escala industrial, pero tendría que ser en una fermentación en que sea más importante obtener actividad amilolítica que proteolítica.

En los casos en los que se añadió ácido cítrico se observa una tendencia a la alcalinización del pH final. El tratamiento resulta negativo para la actividad proteolítica aunque hay aumentos en la amilolítica, si bien no muy importantes.

T A B L A 2

M O D I F I C A C I O N E S A L P H I N I C I A L

TRATAMIENTO			pHi	pHf	MWU	%	e(MWU)	m	NU	$\bar{x}$	e(NU)	m
HCl 1M	3 ml		5.9	6.2	30862	95.7	8500	7	<u>18.3</u>	<u>102.1</u>	2.2	7
Testigo			6.2	6.3	32239	100.0	12700	7	17.1	100.0	3.6	7
HCl 1M	1 ml		6.1	6.1	40515	92.5	6100	15	19.9	100.2	2.0	15
Testigo			6.3	6.3	43791	100.0	5400	15	19.8	100.0	3.6	15
NH <sub>4</sub> Cl 1M	5 ml		6.3	5.9	18843*	50.0	0	2	20.2	81.5	0.0	2
Testigo			6.4	6.3	37723	100.0	250	2	24.8	100.0	0.4	2
NH <sub>4</sub> Cl 1M	10 ml		6.2	6.2	24246*	64.3	20	2	15.7	64.3	0.2	2
Testigo			6.4	6.3	37723	100.0	250	2	24.8	100.0	0.4	2
NH <sub>4</sub> Cl 5M	2ml		6.3	5.9	35995*	68.6	5400	3	15.8	80.0	1.6	3
Testigo			6.4	6.2	52480	100.0	2100	4	24.3	100.0	2.7	4
NH <sub>4</sub> Cl 5M	1 ml + HCl 1M	2 ml	6.1	6.0	<u>35715</u>	<u>134.3</u>	1300	2	13.5	99.2	2.1	4
Testigo			6.4	6.4	26580	100.0	1100	4	13.5	100.0	0.0	4
Acido cítrico	1M	3 ml	5.8	6.4	<u>43081</u>	<u>115.3</u>	10300	14	19.8	79.8	3.1	14
Testigo			6.3	6.3	37364	100.0	7900	14	24.8	100.0	4.3	14
Acido cítrico	1M	1 ml	6.1	6.5	<u>36407</u>	<u>102.6</u>	6200	9	15.4	74.5	1.9	10
Testigo			6.3	6.3	35466	100.0	4200	10	20.7	100.0	4.8	10

pHi= pH inicial	MWU= unidades Wohlgenuth modificadas	% = porcentaje de actividad
pHf= pH final	NU= unidades Northrup	respecto al testigo
* = diferencias significativas	e= error típico (en MWU y NU)	m= matraces analizados
X <sup>2</sup> 0.95		N= mejoría en actividad

b) Modificaciones al amortiguador utilizado.

i) utilización de solución citrato - fosfato..

En un medio de cultivo normal se encuentra presente una solución amortiguadora formada por los fosfatos monosódico y disódico (Hockenhull, 1959), según se ha mencionado ya antes. Las cantidades utilizadas corresponden a un pH de 7.0 a 23°C (Gomori, 1954). Se pensó que las necesidades de fosfatos de Bacillus subtilis podrían ser cubiertas con los fosfatos disódico y de diamonio, puesto que este organismo no presenta requerimientos especiales de este elemento (Lapage, 1970). En cambio, se podría utilizar una solución amortiguadora que contuviera más fuentes de C. Se seleccionó el de citrato-fosfato propuesto por Gomori (1954) y las concentraciones utilizadas se encuentran, junto con los resultados, en la tabla 3.

A simple vista nos damos cuenta de que estos ingredientes no son adecuados para la producción de ninguna de las 2 enzimas. La alcalinización final del medio es notable, a pesar de lo cual en el caso de la solución IV, cuyo pH a 23°C es de 7.0, como en el testigo, el valor en NU no se afecta.

ii) utilización de amortiguador sin fosfatos.

La acción combinada del  $\text{Ca}^{++}$  y los fosfatos para controlar el ritmo de las oscilaciones de pH ha sido ya mencionada. A últimas fechas, empero, se ha encontrado que la pre

TABLA 3

AMORTIGUADOR CITRATO FOSFATO

TRATAMIENTO		pHi	pHf	MWU	%	e(MWU)	m	NU	%	e(NU)	m		
Solución	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	ácido cítrico	pH a 23°C										
I Testigo	1.1258	0.3800	6.4	6.3	7.1	19100	73.9	7700	9	9.5	52.5*	2.0	9
				6.3	6.3	25853	100.0	7100	10	18.1	100.0	1.6	10
II Testigo	1.0785	0.2629	6.6	6.3	7.1	19246	81.6	7500	3	7.7	48.8*	1.1	6
				6.3	6.3	23582	100.0	4700	5	15.8	100.0	1.7	6
III Testigo	1.2047	0.1765	6.8	6.4	7.1	24483	65.2*	8800	3	12.8	81.1	1.4	5
				6.3	6.3	37602	100.0	5200	5	15.8	100.0	1.2	6
IV Testigo	1.2814	0.1266	7.0	6.6	7.2	26605	73.4	19600	6	14.1	97.2	3.9	8
				6.3	6.4	36254	100.0	25500	6	14.5	100.0	1.8	8
pHi= pH inicial		MWU= unidades Wohlgenuth modificadas				% = porcentaje de actividad respecto al testigo							
pHf= pH final		NU= unidades Northrup				m = matraces analizados							
* = diferencia significativa		e= error típica (en MWU y en NU)											
χ <sup>2</sup> <sub>0.95</sub>													

sencia de fosfatos en el medio favorece reacciones con el  $\text{CaCO}_3$ , incluso en cantidades tan pequeñas como las que pueden encontrarse en el agua potable (Sidler, 1977). El  $\text{Ca}^{++}$  es importante para la estabilización de las amilasas (Underkoffler, 1977) sobre todo si actúan a altas temperaturas (Atkinson, 1976). Si este ión es atrapado por los fosfatos, la actividad amilolítica disminuirá; además, Sidler encontró que también se afecta la actividad proteolítica. Por esto diseñó un medio en el que la actividad amortiguadora de los fosfatos es desempeñada por otras sales, principalmente cloruros. Su composición se detalla, junto con los resultados, en la tabla 4. Puede verse que no incluye  $\text{CaCO}_3$ ; sin embargo, el no utilizarlo determina un pH excesivamente ácido. Por ello se usó el 50% de la cantidad normal de este compuesto para lograr una alcalinización del pH inicial que lo aproximara más al del testigo; si se usaba la cantidad normal la alcalinización era excesiva.

En la tabla 4 de resultados se ve que el medio, tal como lo usa Sidler, no es adecuado para ninguna de las dos enzimas. Agregándole  $\text{CaCO}_3$  se logra no afectar la proteasa y disminuir ligeramente el decremento del tratamiento anterior, en el que además es marcada la acidez tanto inicial como final.

T A B L A 4

A M O R T I G U A D O R S I N F O S F A T O S

C O M P O S I C I O N

FeCl <sub>3</sub>	5.0 mg	NaCl	1.0 g
MgCl <sub>2</sub>	5.0 mg	NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
CaCl <sub>2</sub>	2.5 mg	MnCl <sub>2</sub>	0.2 g
Cantidades para 1 litro de agua destilada, del que se añade 1 ml al medio de cultivo.			

(Sidler, 1977)

R E S U L T A D O S

TRATAMIENTO	pHi	pHf	MWU	$\bar{x}$	e(MWU)	m	NU	$\bar{x}$	e(NU)	n			
Medio sin fosfatos (Sidler, 1977)	5.3	5.4	10746	64.2	1130	3	10.5	75.2	1.3	5			
Medio sin fosfatos + 0.3 g CaCO <sub>3</sub>	6.4	6.4	13261	79.2	70	3	<u>14.3</u>	<u>102.2</u>	0.7	5			
Testigo	6.3	5.9	16751	100.0	190	3	14.0	100.0	0.6	5			
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%; vertical-align: top;">                     pHi= pH inicial                      pHf= pH final                 </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;">                     MWU= unidades Wohlgemuth modificadas                      NU= unidades Northrup                      e= error típico (en MWU y en NU)                 </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> <math>\bar{x}</math>= porcentaje de actividad respecto al testigo                      m= número de matraces analizados                      N= mejoría de actividad                 </td> </tr> </table>											pHi= pH inicial pHf= pH final	MWU= unidades Wohlgemuth modificadas NU= unidades Northrup e= error típico (en MWU y en NU)	$\bar{x}$ = porcentaje de actividad respecto al testigo m= número de matraces analizados N= mejoría de actividad
pHi= pH inicial pHf= pH final	MWU= unidades Wohlgemuth modificadas NU= unidades Northrup e= error típico (en MWU y en NU)	$\bar{x}$ = porcentaje de actividad respecto al testigo m= número de matraces analizados N= mejoría de actividad											

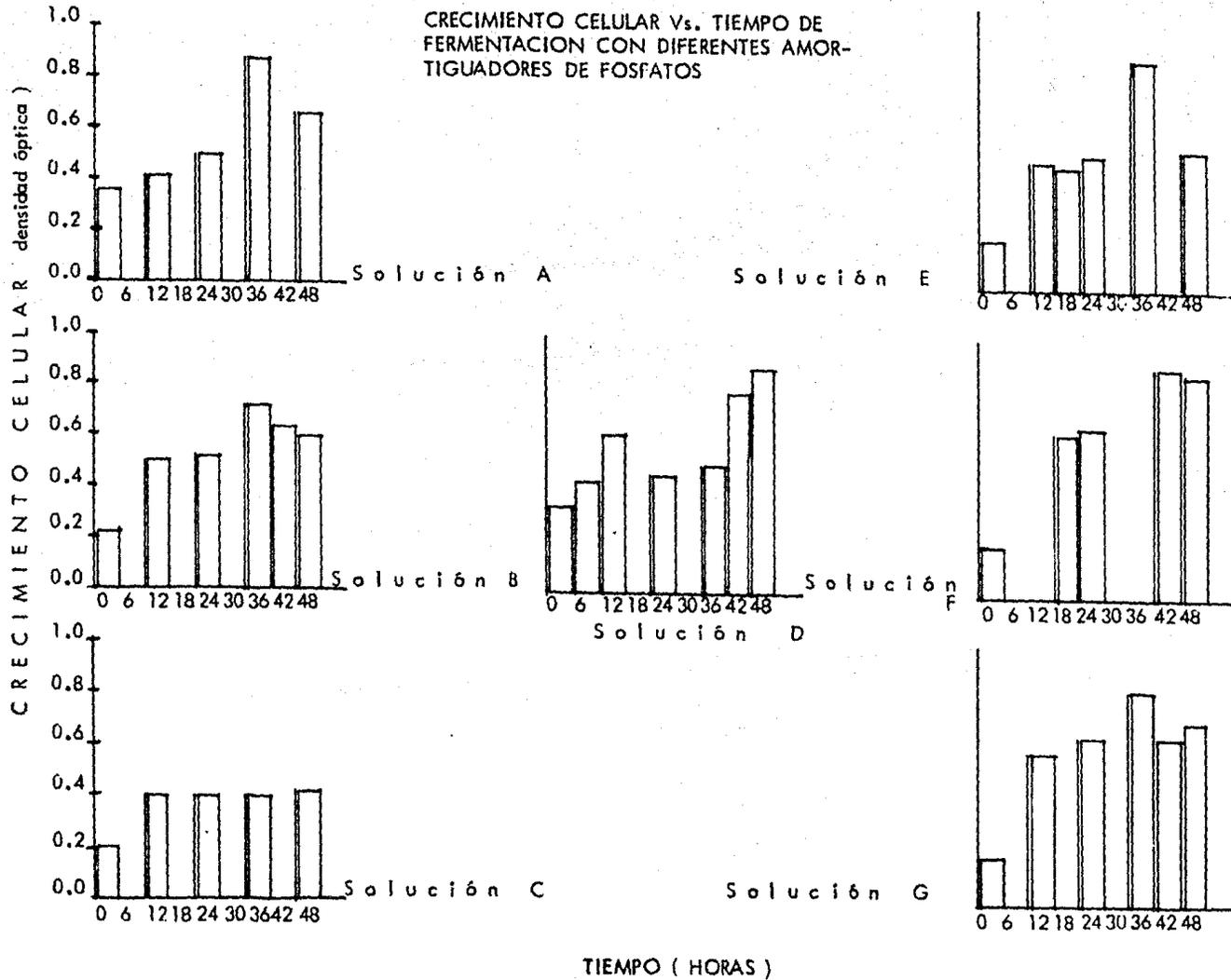
### iii) modificaciones al amortiguador de fosfatos.

Se ha repetido ya en varias ocasiones la importancia de los fosfatos en la solución amortiguadora, mayor que la nutritiva. Así como se probaron diferentes pH iniciales, en esta serie de experimentos se pretendía ver si las concentraciones de fosfatos monosódico y disódico utilizadas eran efectivamente las que proporcionaban mejores condiciones de amortiguación. Se consultó la tabla de Gomori (1954) y se seleccionaron concentraciones que en solución proporcionaban un valor de pH en el rango del testigo. Las soluciones así obtenidas se agruparon como de "nivel alto" de fosfatos, por ser cantidades muy superiores a las utilizadas normalmente, ya que se calcularon directamente de la tabla. Las concentraciones agrupadas como de "nivel bajo" se redujeron proporcionalmente para dar el mismo valor de pH a 23°C, pero con pesos más parecidos al del testigo. Las concentraciones y resultados pueden verse en la tabla 5.

Nivel alto de fosfatos.- En las gráficas 1, 2 y 3 se ilustran, respectivamente, las variaciones en crecimiento celular, nivel de azúcares reductores y pH durante el curso de la fermentación. No se presenta gráfica de actividad enzimática debido a que sólo se detectó a partir de las 36 horas y siempre proporcionó un incremento similar en cuanto a forma pero diferente en magnitud para cada caso. En estas gráficas se puede observar que las oscilaciones de pH

GRAFICA 1

CRECIMIENTO CELULAR Vs. TIEMPO DE FERMENTACION CON DIFERENTES AMORTIGUADORES DE FOSFATOS

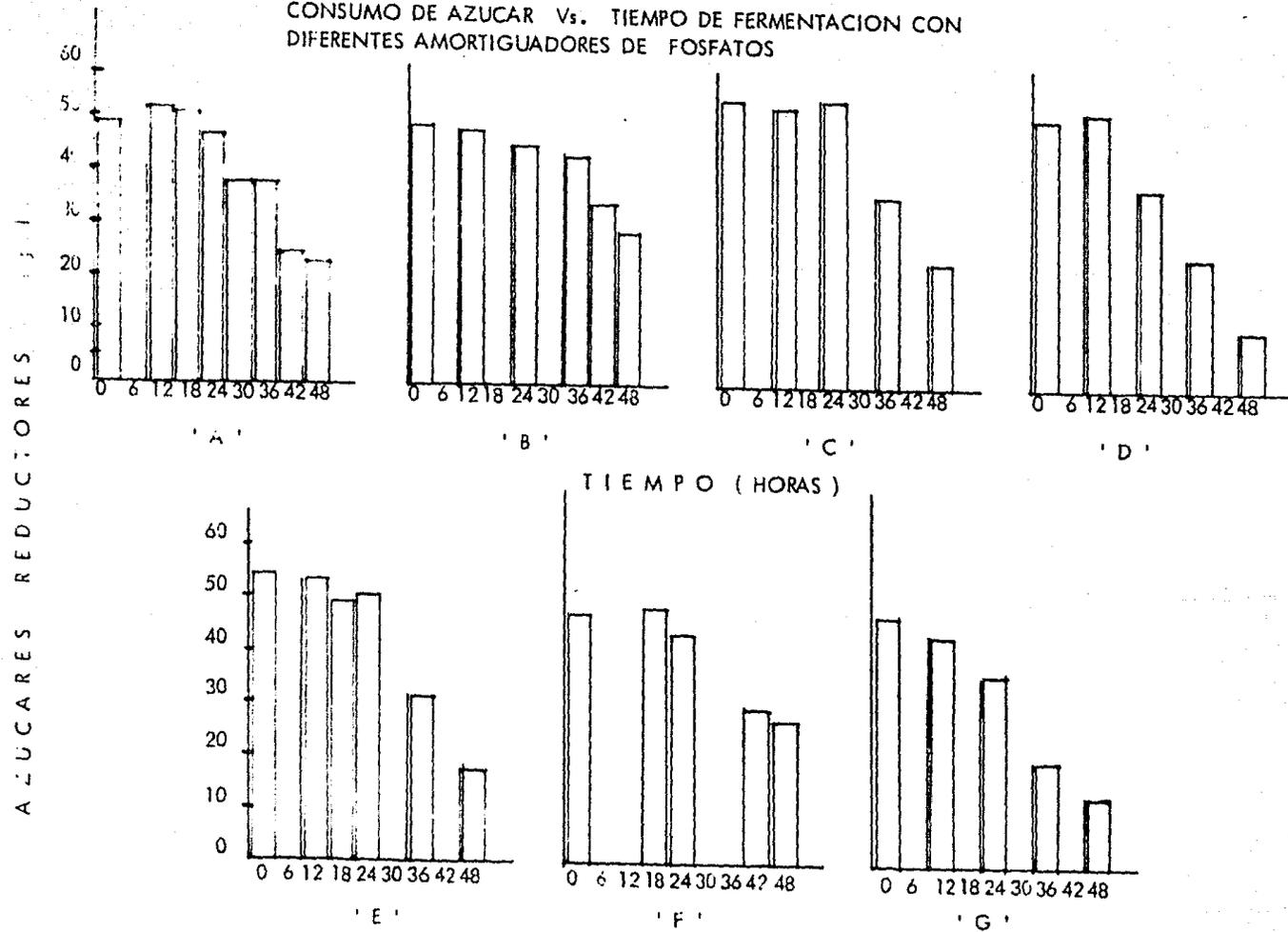


T A B L A 5

A M O R T I G U A D O R D E F O S F A T O S

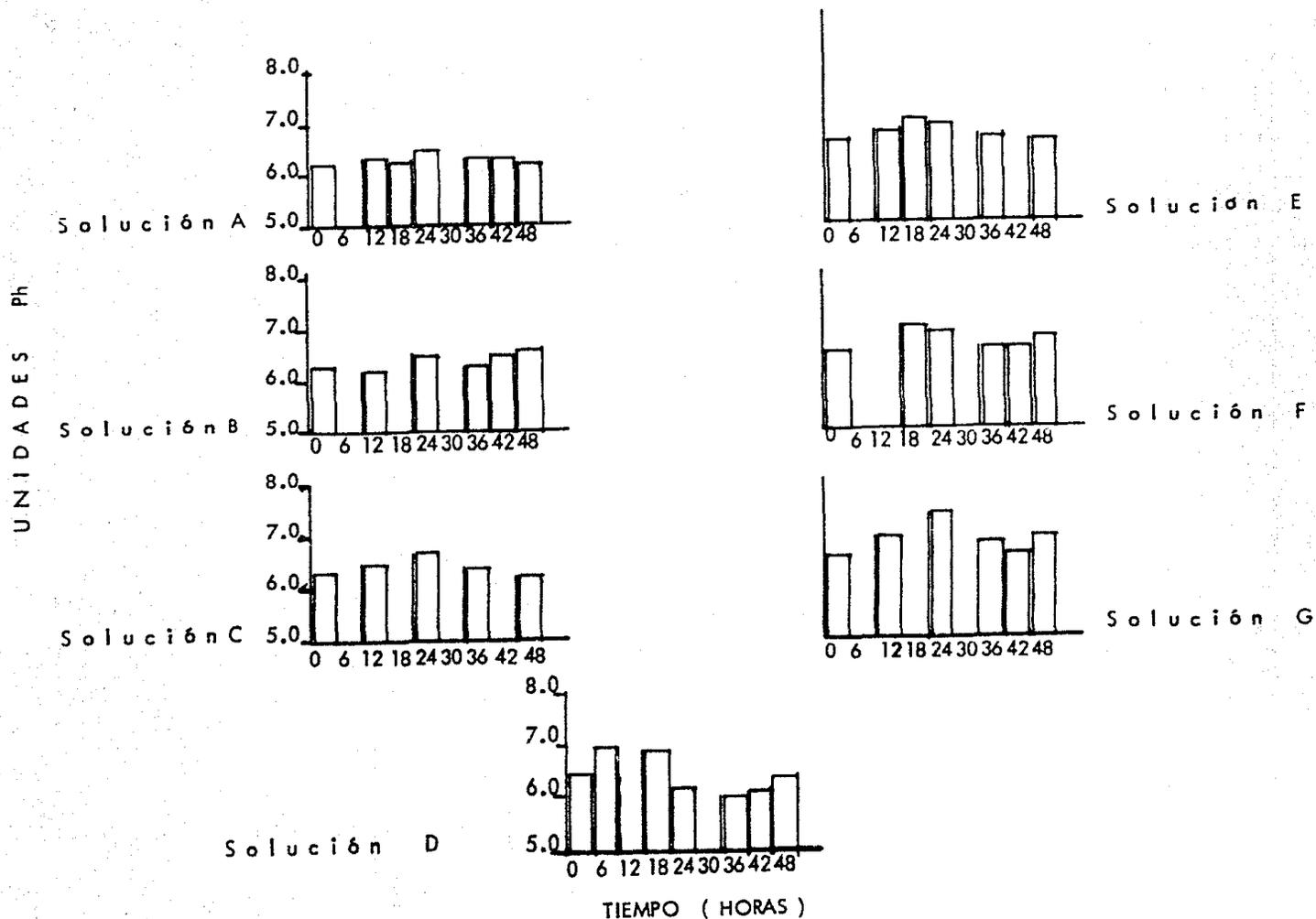
Solución	TRATAMIENTO		pH a 23°C	pHi	pHf	MWU	%	e(MWU)	m	NU	%	e(NU)	m
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)											
<b>NIVEL ALTO</b>													
A	0.8217	0.4450	6.4	6.4	6.2	32058	77.2	4100	4	14.9	94.5	3.7	4
Testigo				6.4	6.4	41514	100.0	5400	4	15.8	100.0	3.7	4
B	0.6777	0.6174	6.6	6.2	6.6	25142	101.9	9200	6	16.0	105.9	3.6	8
Testigo				6.4	6.4	25636	100.0	9900	6	15.1	100.0	2.7	8
C	0.6115	0.6954	6.8	6.3	6.3	30375	58.2*	9300	7	16.0	87.4	2.7	8
Testigo				6.4	6.4	44533	100.0	8000	8	18.3	100.0	1.3	8
D=Testigo	0.1000	0.1500	7.0	6.4	6.4	33446	100.0	11500	6	18.9	100.0	2.9	8
E	0.3359	1.0217	7.2	6.6	6.5	22465	76.7	6800	6	14.4	94.1	0.1	8
Testigo				6.4	6.4	29293	100.0	19700	6	15.3	100.0	2.9	8
F	0.2279	1.1479	7.4	6.6	6.7	30126	95.8	13500	4	8.9*	46.4	5.5	4
Testigo				6.4	6.4	31462	100.0	12600	4	19.2	100.0	2.6	4
G	0.0000	0.0000		6.7	6.6	53623	97.5	6600	4	12.3	60.9	0.1	4
Testigo				6.4	6.4	54989	100.0	4100	4	20.2	100.0	2.5	2
<b>NIVEL BAJO</b>													
B'	0.1129	0.1029	6.6	6.2	6.5	53095	92.2	6600	9	26.2	133.7	4.2	9
C'	0.1019	0.1159	6.8	6.3	6.5	47644	82.8	4900	10	22.2	113.3	2.6	10
Testigo				6.4	6.4	57556	100.0	2400	10	19.5	100.0	2.2	10
pHi= pH inicial pHf= pH final * = diferencia significativa $\chi^2_{0.95}$				MWU= unidades Wohlgemuth modificadas NU= unidades Northrup e= error típico (en MWU o en NU)				%= porcentaje de actividad respecto al testigo m= matraces analizados N= mejoría de actividad					

GRAFICA 2  
 CONSUMO DE AZUCAR Vs. TIEMPO DE FERMENTACION CON  
 DIFERENTES AMORTIGUADORES DE FOSFATOS



GRAFICA 3

Ph Vs. TIEMPO DE FERMENTACION CON DIFERENTES AMORTIGUADORES DE FOSFATOS



y la concentración de fosfatos afectan el crecimiento celular y, por consiguiente, el consumo de azúcares. Todo esto afectará, sin duda, la producción de enzimas extracelulares.

Los resultados presentados en la tabla 5 permiten ver que las condiciones actuales de trabajo proporcionan los mejores rendimientos de potencia proteolítica, aunque en el caso del tratamiento B hay una ligera mejoría. En el caso F se produce un gran descenso, significativo si se aplica una prueba de  $X^2_{0.95}$ , con un grado de libertad. Lo mismo sucede para el caso G, en el que no se han añadido fosfatos a excepción del de diamonio. Para la amilasa, en cambio, la situación es distinta. Tanto en la solución F como en la G los resultados son casi iguales a los del testigo. Con el tratamiento B también se presenta un ligero incremento, como ocurrió con la proteasa, y en el resto de las soluciones los resultados son malos para la producción.

En cuanto a crecimiento celular (gráfica 1) puede verse que las curvas son bastante parecidas para todos los casos. Se ha suprimido la fase lag, que debe ocurrir en el medio de crecimiento; empieza la fermentación en la etapa logarítmica y se alcanza la etapa estacionaria, aunque esto no se ve muy claro en todas las curvas.

Las curvas de consumo de azúcar (gráfica 2) son también similares entre sí. Los valores finales son ligeramente más altos a los alcanzados normalmente en el fermentador (20 vs. 10 mg/ml), lo que podría indicar que los tiempos de fermentación en los matraces son cortos. A gran escala pueden cotejarse los niveles de azúcar y dejar correr la fermentación hasta que alcance el nivel mínimo de azúcar posible. En el laboratorio la igualación del tiempo de fermentación es importante para poder comparar los resultados.

La capacidad amortiguadora en cada caso es variable como puede verse en la gráfica 3. Por consiguiente, también lo son las oscilaciones de pH. Las mayores fluctuaciones se registran, como sería de esperar, en ausencia de fosfatos (G). El testigo (D) sufre también grandes cambios pero el resto de las soluciones no varía mucho. Es de destacar que el pH máximo se alcanza siempre entre las 20 y 24 horas, cuando cambia el tipo de desarrollo de la fase log a estacionaria.

Las condiciones óptimas de pH inicial y final no coinciden para las dos enzimas, como puede verse en las gráficas 4 y 5 en las que se han promediado todos los casos en los que se utilizaron fosfatos. La amilasa parece producirse en mayor cantidad cuando el pH inicial es casi neutro y el final es más ácido, mientras que la proteasa se produce

en la misma cantidad independientemente del pH final y el pH inicial actualmente en uso parece ser el más adecuado. De cualquier manera, las diferencias no son muy notables.

Nivel bajo de fosfatos.- La gran diferencia en cuanto a la cantidad de fosfatos respecto al testigo podría hacer pensar que son las cantidades de estos iones y no los cambios de pH las que provocan los malos rendimientos. Por este motivo, se probaron dos soluciones que habían dado buenos resultados, la B y la C, reduciéndoles proporcionalmente los fosfatos para que dieran el mismo pH en solución acuosa a 23°C, pero con valores más parecidos al testigo, denominándoles B' y C'.

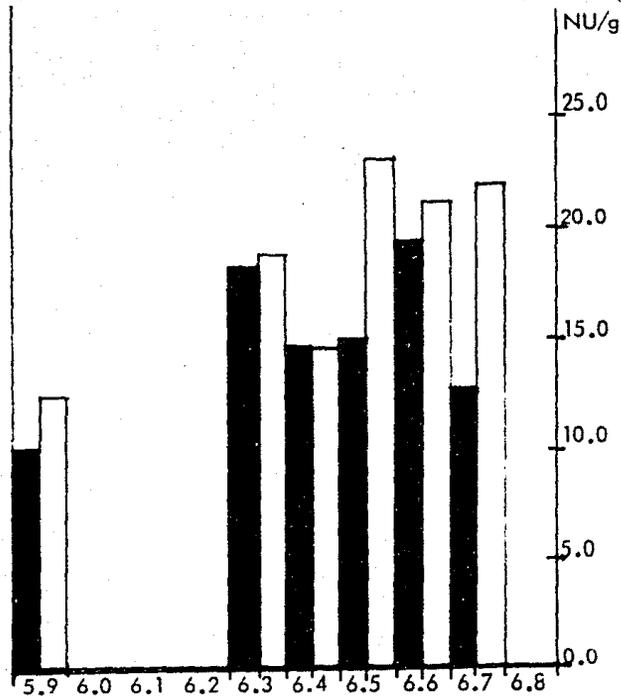
Los resultados constituyen una interesante sorpresa, sobre todo para la potencia proteolítica, tan importante en la preparación comercial. La solución B' proporciona mejores resultados que la C', la que aunque no dé un aumento espectacular sí mejora con respecto al testigo. La actividad amilolítica se ve afectada negativamente, pero no de manera significativa.

c) Esterilización de sales por separado.

Se ha mencionado antes que la interacción de los fosfatos y el  $\text{Ca}^{++}$  afectaría especialmente a la amilasa. Esta interacción es especialmente factible durante el proceso de esterilización. Con el fin de comprobar los efectos de es

GRAFICA 4

Potencia amilolítica ( MWU/g ) y potencia proteolítica ( NU/g ) vs. pH inicial con diferentes amortiguadores de fosfatos

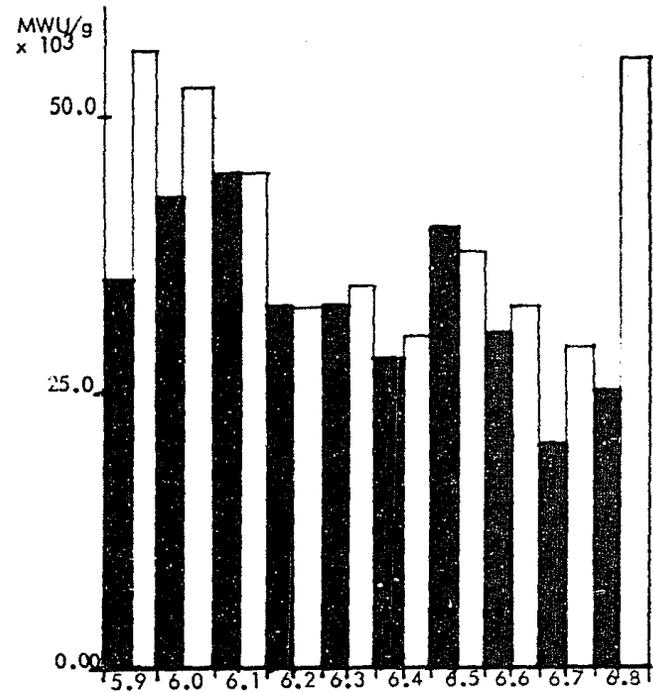


pH INICIAL

■ NU/g  
□ MWU/g

GRAFICA 5

Potencia amilolítica ( MWU/g ) y potencia proteolítica ( NU/g ) vs. pH final con diferentes amortiguadores de fosfatos



pH FINAL

tas reacciones se diseñó una serie de experimentos en los que, o no se añadían estos ingredientes, o se esterilizaban por separado en presencia y en ausencia de la otra sal. Los tratamientos y resultados pueden verse en la tabla 6.

Un problema que se presenta para la esterilización por separado es la falta de solubilidad del  $\text{CaCO}_3$ . En los casos en que se esterilizaba de esta manera se disolvían 5 g en 50 ml de agua destilada, y se añadían 10 ml de esta solución a 40 ml de medio de cultivo, completando el volumen normal de 50 ml. Sin embargo, en la pipeta siempre quedaban pequeñas cantidades adheridas a las paredes, lo que podría crear el problema de que el medio contuviera cantidades insuficientes de este compuesto.

Se puede ver que la ausencia de  $\text{Ca}^{++}$  afecta negativamente a las dos enzimas. El porcentaje de decremento es mayor para la proteasa que para la amilasa, contrariamente a lo esperado. La ausencia de fosfatos también afecta a ambas negativamente; en el caso de la proteasa la diferencia resulta significativa si se aplica una prueba de  $\chi^2_{0.05}$ , con un grado de libertad.

La esterilización de  $\text{CaCO}_3$  por separado produce considerables aumentos para las dos enzimas. La actividad de la amilasa casi se duplica si la esterilización y la fermentación ocurren sin fosfatos. Estos resultados se encuen

T A B L A 6

ESTERILIZACION DE SALES POR SEPARADO  
Y EFECTO DE CALCIO Y FOSFATOS

TRATAMIENTO	pHi	pHf	MWU	%	e(MWU)	m	NU	%	e(NU)	m
Ausencia de $\text{CaCO}_3$	6.1	6.3	13806	86.5	2100	3	10.2	81.6	0.9	5
Testigo	6.3	6.4	15046	100.0	3400	3	12.5	100.0	0.6	5
Ausencia de fosfatos	6.5	7.1	31134	84.1	9300	4	9.4	52.8*	1.6	4
Testigo	6.3	6.4	37004	100.0	16800	4	17.7	100.0	1.7	4
Esterilización de $\text{CaCO}_3$ por separado sin fosfatos en el medio	6.2	6.8	39794	197.2*	14300	5	13.0	136.3	3.3	5
Testigo	6.3	6.4	20176	100.0	2900	5	9.5	100.0	2.8	5
Esterilización de $\text{CaCO}_3$ por separado con fosfatos en el medio	5.9	6.4	46455	107.7	18300	7	20.5	137.7	4.7	7
Testigo	6.3	6.4	43120	100.0	18800	7	14.9	100.0	4.7	7
Esterilización de fosfatos por separado sin $\text{CaCO}_3$ en el medio	-	6.0	15433	120.5	1000	5	14.7	102.8	3.1	5
Testigo	-	6.3	12608	100.0	3000	5	14.3	100.0	0.7	5
Esterilización de fosfatos por separado con $\text{CaCO}_3$ en el medio	-	6.4	34771	145.2*	9100	5	13.9	86.5	4.3	5
Testigo	-	6.3	23955	100.0	10600	5	16.1	100.0	0.5	5
Esterilización de cada sal por separado	-	6.0	31854	107.2	9300	7	11.3	92.6	1.2	7
Testigo	-	6.4	29715	100.0	8900	7	12.2	100.0	1.8	7
Esterilización de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ por separado	-	6.2	39690	140.9*	17100	3	12.6	83.0	1.2	4
Testigo	-	6.4	28161	100.0	8000	4	15.0	100.0	0.9	4

pHi= pH inicial

pHf= pH final

\* = diferencia significativa

$\chi^2$   
0.95

MWU= unidades Wohlgemuth modificadas

NU= unidades Northrup

e= error típico (en MWU o en NU)

%= porcentaje de actividad respecto al testigo

m= matraces analizados

N= mejoría de actividad

tran encerrados en un recuadro por ser, sin duda, los más interesantes de todos y los de mayor factibilidad de inclusión en el proceso industrial.

Si son los fosfatos los que se esterilizan por separado se producen también aumentos en la amilasa, pero el rendimiento de proteasa no mejora notablemente e incluso disminuye cuando está presente el  $\text{CaCO}_3$ .

Al separar para la esterilización a todas las sales y añadirlas inmediatamente antes de inocular, casi no hay diferencia en actividad amilolítica, aunque aumenta ligeramente, mientras que la proteolítica disminuye un poco. Esta forma de esterilizar los ingredientes del medio afecta el curso del pH durante la fermentación, según se deduce de las grandes diferencias del pH final con el testigo.

Finalmente, tenemos el caso de la esterilización del fosfato de diamonio por separado. En éste, se produce un descenso de cierta consideración en la actividad proteolítica pero en cambio, como señala el asterisco, el incremento en actividad amilolítica es significativo si se aplica una prueba de  $\chi^2_{0.95}$  con un grado de libertad.

## DISCUSION

Las condiciones ideales para la producción de enzimas extracelulares no han sido plenamente esclarecidas y son aún fuente de ideas contradictorias (Glenn, 1976). La regulación y control adecuado del pH, paralelamente a otros avances en el diseño de reactores, fueron factores definitivos en el desarrollo de la industria de fermentación (Elsworth, 1960). Sin embargo, la estrategia de control de pH no ha sido explotada plenamente (Johnson, 1971).

En este trabajo se experimentaron diversas formas de modificación al pH, inicialmente o durante la fermentación; se experimentaron también modos de esterilización de los componentes del medio más directamente implicados en el control de este parámetro.

En total, se realizaron 30 modificaciones a las condiciones normales y sólo 9 mejoraron la producción de amilasa mientras que 8 lo hicieron con la proteasa (estos resultados se encuentran subrayados en las tablas). Algunos de los valores obtenidos son suficientemente interesantes como para pensar en su aplicación a gran escala.

Las modificaciones al pH inicial se realizaron con HCl por ser el utilizado por la industria normalmente cuando es necesario ajustar este parámetro. Se trabajó únicamente con descensos en el pH, ya que la experiencia previa de la

empresa con pH alcalino era negativa. La adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  se realizó por estar mencionado por Aiba et al. (1973) como sustancia reguladora de pH y útil para incrementar la fuente de N. El ácido cítrico se utilizó teniendo la idea de incrementar la fuente de C y disminuir el pH simultáneamente, siguiendo la misma idea de Aiba con respecto al N.

Los resultados obtenidos en cuanto a modificaciones al pH inicial no son muy claros respecto a las ventajas que podría representar esta reducción. En primer lugar, debemos consignar que el ácido cítrico cumple con el cometido de disminuir el pH inicial en forma tan eficiente como lo logra el HCl, ya que las mismas cantidades logran la misma reducción. Esto es de hacerse notar pues esta sustancia no es mencionada por ninguna de las fuentes, por ejemplo Aiba et al. (1973), Hockenhull (1959), Sidler (1977), como adecuada para disminuir el pH inicial, independientemente de que el costo que tiene resulta no competitivo con sustancias como el HCl. En cambio, el  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , en las diferentes variantes utilizadas, no cumple con este cometido.

Al analizar los resultados debemos tener en mente que el HCl no es metabolizado, mientras que los demás compuestos sí lo son. Este metabolismo provoca modificaciones al pH final: el ácido cítrico lo alcaliniza, mientras que el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  lo acidifica en comparación con el testigo.

Probablemente es el metabolismo y no la concentración de hidrogeniones el factor que afecta el rendimiento de la

elaboración de enzimas. No obstante, no hay que olvidar que en puntos cercanos a la neutralidad algunas décimas de unidades de pH afectan considerablemente la expresión del metabolismo (Harrison, 1974).

En el caso del HCl, en el que la acidificación inicial del medio sí desempeña un papel importante, se obtiene una mejoría ligera en la producción de proteasas. Empero, las diferencias con respecto al testigo son muy pequeñas.

El ácido cítrico logra una mejoría en la producción de amilasa. Algunas fuentes de C están reportadas como inductoras de amilasa, a pesar de no ser sustratos de esta enzima; tal es el caso de la lactosa (Windish, 1965), desconociéndose el mecanismo. El ácido cítrico, sin embargo, no está mencionado entre ellas. No obstante, de alguna manera debe interferir en la regulación de vías metabólicas, o su propio metabolismo afectar las oscilaciones del pH del medio, como indicaría la alcalinización final de éste, y por este motivo se altera la producción final de enzima. De cualquier manera, se desconoce el mecanismo de regulación de la elaboración de esta enzima, que posiblemente sea por represión catabólica (Meers, 1973) y todo lo que se dice sobre la intervención del ácido cítrico es mera especulación.

Es difícil explicar el efecto del  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Solo, parece actuar como inhibidor de la producción de amilasa. El pH final y las oscilaciones de este parámetro durante la fer-

mentación seguramente influyeron en la expresión del metabolismo y la actividad de la enzima, siguiendo con las ideas ya expuestas, pues aún en el caso en que el pH final es casi igual al del testigo el descenso en actividad es tan grande como en las otras situaciones. Por otra parte, cuando se combina con HCl el metabolismo del  $\text{NH}_4\text{Cl}$  combinado con la ligera acidificación inicial provocaría determinado tipo de cambios en el microambiente celular que serían los que determinarían el incremento, bastante notable, de la producción de amilasa (Srere y Nosbach, 1974).

El mismo tipo de factores que se han mencionado antes debe ser el responsable de los decrementos en unidades Northrup. Cabría esperar que la presencia de N fácilmente asimilable hiciera innecesaria la producción de enzimas proteolíticas. Esta opinión se debilita ante la evidencia del papel que desempeñan estas proteasas en la fase de esporulación (Murrell, 1967) si bien algunos autores consideran que las pruebas aportadas no son suficientemente claras (Glenn, 1976).

Los datos obtenidos no permiten enunciar una hipótesis que explique los hechos. Los autores consultados no dan ninguna explicación del posible efecto de estas sustancias, ya sea que interfieran directamente en las vías metabólicas o alteren el metabolismo las variaciones en la concentración de hidrogeniones.

Al utilizar el amortiguador citrato-fosfato se pretendía incrementar la fuente de C sin variar el rango de actividad de la solución amortiguadora. No se encontraron antecedentes en que se hubiera manejado este tipo de solución para la producción de esta enzima. La falta de éxito en su uso podría explicarse, en parte, por los mismos factores que afectan la producción de enzimas en presencia de ácido cítrico. La metabolización de este compuesto debe disminuir la acción amortiguadora de la combinación ácido cítrico-fosfato disódico. La falta de fosfatos no afecta porque las cantidades usadas son mucho mayores que las usadas normalmente. Quizás este exceso sí las pudo afectar.

Es evidente, sobre todo en la solución IV, cuyas cantidades de fosfato disódico y ácido cítrico proporcionan un valor de pH a 23°C igual al del testigo (7.0), la tendencia a la alcalinización tanto inicial como final. Los valores alcalinos, no obstante, corresponden a los mencionados por la literatura como óptimos para la producción de amilasa, o sea, entre 6.8 y 7.2 (Markkanen, 1974 y Windish, 1965). El ascenso en la producción de proteasas en este último caso quizás podría explicarse por la falta de especificidad de la prueba de Northrup para la determinación de actividad proteolítica. Se han mencionado antes las tres proteasas que produce Bacillus subtilis. Es posible que la mayor actividad detectada con este tratamiento corresponda a la pro

teasa alcalina, al estar el pH más cercano a su óptimo (Morihara, 1974). La preponderancia de una u otra proteasa debe tomarse en cuenta al elaborar las preparaciones comerciales, por lo que este factor debe tomarse en cuenta una vez que se analice la costeabilidad. Cuando se pensó en utilizar esta combinación citrato-fosfato se consideró que resultaría más cara que la de fosfatos, por lo que su utilización sólo resultaría posible si los incrementos obtenidos fueran muy grandes, lo cual no se logró.

Es necesario hacer algunas aclaraciones con respecto a la solución que carece de fosfatos en su composición, inclusive del de diamonio, y que se tomó de Sidler (1977). El autor pretendía obtener mejores rendimientos de proteasa neutra y amilasa termoestables en Bacillus stearothermophilus. Aunque la amilasa y proteasas producidas por B. subtilis y otros del mismo género son termoestables, a pesar de que el organismo no sea termofílico (Atkinson, 1976), la temperatura de cultivo de Sidler es mucho mayor que la de este caso (55°C vs. 32°C). Por otra parte, aquél trabaja con controles automáticos de pH que lo mantienen constante en 6.8 mediante adición de potasa (KOH), de manera que resuelve el problema de la acidez tan grande que se obtiene con la solución salina que él maneja.

En el presente trabajo, al carecer de un control similar sobre este parámetro, las oscilaciones aparentemente

fluctúan en un rango una unidad inferior al testigo, según se desprende de ver el pH inicial y final. Este debe ser el factor que explique los considerables descensos en la producción de las dos enzimas. Por otra parte, la alcalinización con 0.3 g de  $\text{CaCO}_3$  parece ser insuficiente, además de que posiblemente no complete la cantidad de  $\text{Ca}^{++}$  necesaria para la actividad amilolítica, ya que ésta resulta sensiblemente afectada en forma negativa, mientras que la proteolítica no. La insuficiencia de  $\text{Ca}^{++}$  puede ser más acentuada para la célula, pues en el medio hay  $\text{Mg}^{++}$ , que al parecer impide la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  (Lapage, 1970).

Como la actividad proteolítica se recupera al añadirse un poco de  $\text{CaCO}_3$  y, consecuentemente, alcalinizarse un poco el medio, a pesar de la ausencia de fosfatos, nos damos cuenta de que la falta de estas sales no es perjudicial para las enzimas. Lo que no queda suficientemente claro es si el  $\text{Ca}^{++}$  es más importante como elemento constituyente de estas macromoléculas o como regulador de las condiciones del medio de la manera que sugiere Hockenhull (1959).

Por otra parte, la concentración de iones  $\text{NH}_4^+$  es sólo la mitad de la normal, al haberse eliminado el fosfato de diamonio. Esto debe afectar tanto a la producción enzimática como al crecimiento celular. Finalmente, otro factor a considerar es la excesiva acidez que debe alterar a ambas enzimas en su producción.

De acuerdo con los resultados obtenidos este amortiguador no puede utilizarse en este momento pero no debe descartarse su utilización futura, optimizándolo, quizás, de manera que el pH del medio tienda más hacia la neutralidad. Esto podría hacerse variando las concentraciones de sales utilizadas o añadiendo más  $\text{CaCO}_3$ , lo cual de cualquier manera debe hacerse por las razones antes mencionadas. La razón principal por la que se cree conveniente la experimentación con esta solución es que contiene abundante  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$  que son iones a los que varios autores conceden especial importancia, como se ha mencionado antes (pág. 25). Además, tanto el  $\text{Mg}^{++}$  como el  $\text{Mn}^{++}$ , ya que uno puede sustituir al otro (Hutner, 1972), pueden colaborar a regular el pH junto con los fosfatos, cuando se usan, y con el  $\text{CaCO}_3$  (Hockenhull, 1959). En este caso no fue posible detectar la importancia de estos iones en la producción de enzimas, puesto que no era el objetivo que se perseguía y requeriría de otro tipo de experimentos. Sin embargo, es algo que se debe considerar en pruebas posteriores, ya que todos los fenómenos en que participan están indefectiblemente ligados a la producción de enzimas. Para terminar, debe decirse que una ventaja adicional de trabajar con esta solución sería el costo, ya que los componentes son baratos y fáciles de obtener.

Como se habrá notado, los valores obtenidos en unidades de actividad enzimática son muy bajos, incluyendo los

del testigo. Esto parece deberse a una degeneración del cultivo, cuyas causas pueden ser variadas (Sánchez, 1978) y a esto se debería el valor tan alto del error típico (e), particularmente en MWU, especialmente notable en las tablas referentes a la disminución del pH y a esterilización de sales por separado (tablas 2 y 6).

En los experimentos relativos a la modificación del amortiguador de fosfatos parece haberse demostrado que las oscilaciones del pH durante la fermentación son necesarias para la producción de estas enzimas. Esto estaría en oposición a lo sugerido por Johnson (1971) y lo logrado por Siedler (1977), quienes hablan de pH continuo. Por otra parte, se ve que los fosfatos en cantidades altas son adecuados para mantener el pH, si no continuo, por lo menos en un rango estrecho y definido, así que podrían considerarse como una forma de control continuo de este parámetro, sin necesidad de vertir al recipiente en que ocurre la fermentación sustancias del exterior, que implican siempre un ligero riesgo de contaminación.

Aunque en este caso sí podríamos afirmar que las diferencias en valores de pH durante la fermentación son la causa de las diferencias en rendimiento, debemos tener en cuenta las cantidades de fosfatos, que no coinciden para ningún caso y que también podrían afectar los resultados.

Si el pH oscila en un rango alcalino, la proteasa se ve afectada negativamente en forma significativa ( $\chi^2_{0.95}$ ), tal como ocurre en las soluciones F y G. Estos dos casos son totalmente opuestos en la composición de fosfatos: en el primero, éstos superan la concentración del testigo en diez veces, mientras que en el segundo no hay. Pero como ambos coinciden en fluctuar en el rango más alcalino que el testigo, debe ser este factor el causante del decremento en producción y no las diferencias en fosfatos.

En las soluciones F y G se alcanza también el máximo crecimiento (gráfica 1). Obsérvese que para el caso de la proteasa podemos hablar de una relación inversa crecimiento-actividad enzimática, no así para la amilasa. Windish (1965) señala que esta relación sí se había encontrado para la amilasa siempre y cuando la lactosa no fuera la fuente de C, por lo que no coinciden estos resultados con los suyos. El crecimiento está expresado en Densidad Óptica (D.O.), tal como lo hacen algunos autores (Kinoshita et al., 1967 y Wolnak, 1967) debido a que las técnicas sugeridas para estimar el peso seco requerían material fuera de nuestro alcance (Demain, 1964 y Nakayama, 1977).

Quizá valdría la pena señalar en este momento que, aunque en ningún caso se cuantificó el número de células esporuladas, la inspección rutinaria de preparaciones para análisis de pureza del cultivo permitía notar un gran número

de bacilos en esta fase de desarrollo. Por tanto, podemos decir que sí parece existir la relación producción de enzimas líticas-esporulación, aceptada por algunos (Markkanen, 1974 y Sadoff, 1972, por ejemplo) pero cuestionada por otros (Glenn, 1976). No podemos discernir qué tratamiento favorece más esta expresión de la información génica.

Son considerables los aumentos en actividad proteolítica obtenidos con las soluciones B' y C', y no es fácil explicarlos. Puede verse que el pH inicial coincide con el de las soluciones B y C, respectivamente, que tienen el mismo pH en solución a 23°C. Aunque el pH final no coincide, es bastante similar. Empero, ya se había dicho antes que las cantidades pequeñas de fosfatos, como las que contienen el testigo o las soluciones B' y C', no son suficientes para mantener el pH en un rango pequeño. Este comportamiento corresponde a lo predicho por la ecuación de Henderson-Hasselbach, ya que las soluciones B' y C' o el testigo son más diluídas y, por tanto, su capacidad amortiguadora es menor (Morris, 1974). De esta manera, suponemos que hubo más fluctuaciones de pH en las soluciones de nivel bajo de fosfatos que las ocurridas en las soluciones B y C, y que esto condujo al aumento de actividad. Estas oscilaciones deben ser más favorables que las que se presentan en el testigo (D).

Algo muy importante es que estos tratamientos no conducirían a ningún aumento en costos, sino por el contrario, los reducirían ligeramente ya que las cantidades de fosfatos empleadas son menores a las consumidas actualmente. A pesar de que la actividad de la amilasa disminuye en algunas unidades, las preparaciones comerciales elaboradas a partir de esta fermentación tienen especificaciones más estrictas en cuanto a NU que a MWU, por lo que quedaría fácilmente dentro de los límites requeridos. Tendríamos entonces un aumento de 30% en potencia proteolítica, que representaría un incremento mayor de ganancia, puesto que aunque el costo disminuye en un porcentaje menor, el precio que alcanza el kilogramo de este producto es bastante alto.

La proteasa parece requerir fosfatos para su producción, pues de otra manera se producen descensos estadísticamente significativos, excepto en un caso que se analizará más adelante. La amilasa, en cambio, parece insensible a la presencia o ausencia de estas sales. Sin embargo, Windish (1965) señala que los fosfatos, especialmente a una concentración 0.1 M son considerados estimulantes para la producción de alfa amilasa, a pesar de que estos valores son mucho mayores que los necesarios para el crecimiento. Las cantidades de fosfatos utilizadas en la solución B corresponderían a una solución 0.1 M de cada una de las sales. Quizá si se utilizara esta misma solución, o incluso la del testigo, pero con

niveles bajos y multiplicadas por tres tanto la cantidad de fosfato monosódico como de disódico, se obtendría una solución aproximadamente 0.1 M de todos los fosfatos, buscándose obtener el incremento de que habla el autor mencionado. Sin embargo, la situación es confusa ya que éste no aclara a qué fosfatos se refiere.

Se ha visto ya que los resultados obtenidos al esterilizar sales por separado proporcionan algunas mejoras notables. Por otra parte, se ha mencionado ya la idea de Siedler (1977) de que durante la esterilización los fosfatos reaccionan de manera que alterarán después la producción de enzimas. En el fermentador de la empresa se practica la esterilización por separado del fosfato de diamonio a raíz de un descubrimiento accidental motivado por un olvido. Desde entonces, se instituyó como rutina habitual, al notarse un incremento en los rendimientos de amilasa.

En los experimentos realizados para este trabajo coincide este aumento, pero sólo para la actividad amilolítica, en la que se descubrió. Este dato es importante pues reafirma que las pruebas a escala sobre las que se basa este trabajo están bien diseñadas y que los resultados, por lo tanto, son aplicables a escala industrial con confianza.

La esterilización de  $\text{CaCO}_3$  por separado, a pesar del problema de solubilidad que se plantea y, por consiguiente, de posible disminución de las cantidades añadidas al medio

de cultivo, proporciona mejoras especialmente notables en el caso de la proteasa. Es importante señalar que cuando el tratamiento se aplica en ausencia de fosfatos se duplica la producción de amilasa. En este caso, el pH final coincide con el señalado por la literatura como óptimo para la producción de esta enzima, aunque las condiciones son diferentes (Markkanen, 1975 y Windish, 1965). Quizás los resultados se ven afectados no sólo por el atrapamiento de iones de  $\text{Ca}^{++}$ , sino también por las oscilaciones de pH, que deben ser considerables en ausencia de fosfatos, como se ha visto en la solución G de experimentos anteriores (tabla 5). De ser la primera explicación la correcta, se confirmaría en estos resultados lo sugerido antes, del atrapamiento de iones del que habla Sidler (1977).

No obstante, es curioso que los resultados no sean tan espectaculares cuando los que se esterilizan por separado son los fosfatos. Es probable que al esterilizar la solución de fosfatos ocurran transformaciones químicas que resulten inhibitorias para la formación de proteasas. Esto explicaría también el hecho de que al esterilizar la totalidad de las sales por separado los aumentos sean también menos notables. La similitud del resultado del tratamiento de esterilización de todas las sales por separado con el de la esterilización del  $\text{CaCO}_3$  en presencia de fosfatos indicaría que es la interacción de éstos con el  $\text{Ca}^{++}$  la responsable de

esta falta de espectacularidad en los aumentos. También es de notarse el hecho de que en el caso en que se esteriliza el  $\text{CaCO}_3$  aparte y en ausencia de fosfatos, se produzca un incremento considerable en proteasa, puesto que la ausencia de fosfatos por sí sola produjo un decremento significativo ( $\times 0.95^2$ ) en la actividad.

Los resultados en los que está involucrado el  $\text{Ca}^{++}$  son difíciles de explicar pues aún no está clara la función de este catión en fenómenos como regulación de potenciales de membrana, regulación de permeabilidad celular y de producción de enzimas extracelulares (Williams, 1970) así como su papel en el proceso de esporulación (Murrell, 1967), fenómenos todos que están involucrados en el problema que nos ocupa.

La interpretación de estos resultados no es fácil al carecer de más elementos y de otro tipo de datos experimentales. Posiblemente sería interesante analizar desde el punto de vista químico los productos que se detecten durante la esterilización y comprobar así la hipótesis de formación de inhibidores o de productos que no permiten la fluctuación óptima de pH.

Es importante señalar algunos aspectos que se encuentran repetidamente en la literatura y que, aunque no fueron tratados en este trabajo, sería conveniente explorar para lograr incrementos en esta misma fermentación. Entre ellos

están: la adición de  $Mg^{++}$  y/o  $Mn^{++}$  y la de algún factor promotor de la esporulación. También, los cambios en la aereación y control de pH tras la fase de crecimiento, así como los cambios en la alimentación después de este momento.

Sintetizando, podemos afirmar que se han logrado algunas mejoras interesantes para la producción de alfa amilasa y de proteasas bacterianas. Algunos tratamientos convendría explotarlos exclusivamente para la producción de amilasa. El mercado para el consumo de estas enzimas es importante y crece continuamente. Los costos también lo hacen. Se debe, pues, aprovechar cada aumento en rendimientos, por pequeño que éste sea.

## CONCLUSIONES

- a) La disminución del pH inicial no es buena, por lo que se puede considerar el pH de 6.3 a 6.4 como óptimo para iniciar la fermentación. Un ligero descenso hecho a base de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5M y HCl 1M resulta conveniente para incrementar la producción de amilasa en un 30%.
- b) La metabolización del ácido cítrico provoca disminución en rendimiento de las dos enzimas ya que alcaliniza el pH.
- c) La utilización de amortiguador sin fosfatos no es adecuada pues la fórmula utilizada conduce a excesiva acidez y es insuficiente en  $\text{Ca}^{++}$ .
- d) Las fluctuaciones de pH durante la fermentación son necesarias para la producción de estas enzimas. Un rango especialmente adecuado para la obtención de proteasas es el obtenido al cambiar ligeramente las concentraciones de fosfato monosódico y disódico, soluciones B' y C'; estas modificaciones son importantes pues proporcionan un incremento en rendimientos considerable e incluso resultan más económicos.
- e) La esterilización de sales por separado es muy conveniente pero el tratamiento debe seleccionarse según la enzima que se desee producir en mayor cantidad:

- 1) Esterilización de fosfato de diamonio o de  $\text{CaCO}_3$  sin fosfatos para obtener amilasa.
- ii) Esterilización de  $\text{CaCO}_3$  con fosfatos para obtener proteasa, más importante comercialmente.
- f) No están claras las causas que provocan el incremento en rendimientos al esterilizar las sales por separado.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Aiba, S., Humphrey, A.E. y Millis, N.F., 1973. Biochemical Engineering. Academic Press, N.Y.; 434.
- 2.- Atkinson, A., 1976. Thermostable Enzymes. J. appl. Chem. Biotechnol. 26; 576-583.
- 3.- Bailey, M.J. y Markkanen, P.H., 1975. The use of mutagenic agents in improvement of  $\alpha$ -amylase production by Bacillus subtilis. J. appl. Chem. Biotechnol. 25; 73-79.
- 4.- Barker, S.A., Burns, R.F., Somers, P.J., 1976. Stabilization of enzymes to heat, pH and proteolytic attack. J. appl. Chem. Biotechnol. 26; 576-583.
- 5.- Calam, C.T., 1970. Improvement of microorganisms by mutation, hybridization and selection. Meth. Microbiol. 3A; 435-460.
- 6.- Beck, C. y Scott, D., 1974. Enzymes in food, for better or for worse. En: Whittaker, J. (Ed.), 1974. Food related enzymes. Adv. Chem. 136; 1-30.
- 7.- Cassida, L.E., 1968. Industrial Microbiology. J. Wiley & sons, N. Y.; 460.
- 8.- Chambliss, G.H. y Legault-Demare, L., 1977. Functional modifications of the translational system of B. subtilis during sporulation. J. Bact. 132; 13-22.
- 9.- Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H. y Wood, B., 1973. Microbiology. Harper & Row, U.S.A.; 1562.
- 10.- Demain, A.L., 1964. Extracellular GMP and GDP in B. subtilis broths. Biotech. Bioeng. 6; 361-365.
- 11.- Demain, A.L., 1971. Overproduction of microbial metabolites and enzymes due to alteration of regulation. Adv. Biochem. Eng. 1; 113-139.
- 12.- Demain, A.L., 1973. Mutation and the production of secondary metabolites. Adv. appl. Microbiol. 16; 177-201.
- 13.- Elsworth, R., 1960. Developments in fermenter design and fermentation control. Progr. Ind. Microbiol. 2; 103-130.

- 14.- Faith, W.T., Neubeck, C.E. y Reese, E.T., 1971. Production and application of enzymes. *Adv. Biochem. Eng.* 1; 77-111.
- 15.- Fujimori, H., Ohnishi, M., Sakoda, M., Matsano, R., Hiromi, K., 1977. Reaction mechanism of saccharifying  $\alpha$ -amylase from *B. subtilis* with maltose as a substrate. *J. Biochem.* 82; 417-427.
- 16.- Fujita, Y., Ramaley, R. y Freese, E., 1977. Location and properties of glucose dehydrogenase in sporulating cells and spores of *B. subtilis*. *J. Bact.* 132 (1); 282-293.
- 17.- Gabriel, M.A. y Fogel, S., 1955. *Great Experiments in Biology*. Prentice Hall, U.S.A.; 317.
- 18.- Glaser, L. y Lindsay, B., 1972. Relation between cell wall turnover and cell growth in *B. subtilis*. *J. Bact.* 130; 610-619.
- 19.- Glenn, A., 1976. Production of extracellular proteins by bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 30; 41-62.
- 20.- Gomori, G., 1954. Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Meth. Enzymol.* 1; 138-146.
- 21.- Gregor, H.P. y Gregor, C., 1978. Synthetic membrane technology. *Sci. Amer.* 239(1); 88-101.
- 22.- Harrison, D.E.F. y Topiwala, H.H., 1974. Transient and oscillatory states of continuous culture. *Adv. Biochem. Eng.* 3; 167-220.
- 23.- Herrera, T. y Ruiz Oronoz, M., 1968. *Botánica Criptogámica*. Herrero, México; 301.
- 24.- Hockenull, D.J., 1959. The influence of medium constituents in the biosynthesis of penicillin. *Progr. Ind. Microbiol.* 1; 1-28.
- 25.- Hockenull, D.J., 1971. Observations on fermentation development. *Progr. Ind. Microbiol.* 9; 113-154.
- 26.- Hutner, S.H., 1972. Inorganic Nutrition. *Ann. Rev. Microbiol.* 20; 313-346.
- 27.- Johnson, M.J., 1971. Fermentation yesterday and tomorrow. *Chem. Tech.* 1 (JUN); 338-341.

- 28.- Kinoshita, K., Shiro, T., Yamazaki, A., Kamashiro, I., Takenishi, T., y Tsuroda, T., 1967. Industrial production of disodium 5'-guanylate. *Biotech. Bioeng.* 9; 329-342.
- 29.- Kretschmer, N., 1972. Lactosa and lactase. *Sci. Amer.* 227(4); 70-78.
- 30.- Lapage, S.P., 1970. Media for the maintenance and preservation of bacteria. *Meth. Microbiol.* 3A; 1-133.
- 31.- Laskin, A. y Lechevalier, H., (Eds.), 1973. Handbook of Microbiology II. Chemical Rubber Press, U.S.A.; 1060.
- 32.- López, J. y Thoms, B., 1977. Role of sugar uptake and metabolic intermediates on catabolic repression in *B. subtilis*. *J. Bact.* 129 (1); 217-224.
- 33.- Markkanen, P.H. y Bailey, M.J., 1974. Simultaneous production of  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -glucanase and proteolytic enzymes by *B. subtilis*. *J. appl. Chem. Biotechnol.* 24; 93-103.
- 34.- Markkanen, P.H. y Bailey, M.J., 1975. Effect of alteration of aeration and temperature on production of  $\alpha$ -amylase by *B. subtilis*. *J. appl. Chem. Biotechnol.* 25; 863-865.
- 35.- Markkanen, P.H., Reinwall, A. y Linko, M., 1976. Increase of  $\beta$ -glucanase production by *B. subtilis* by use of starch feeding during fermenter cultivation. *J. appl. Chem. Biotechnol.* 26; 41-46.
- 36.- Meers, J.L., 1973. The regulation of  $\alpha$ -amylase production in a strain of *B. licheniformis*. *J. appl. Chem. Biotechnol.* 23; 159-168.
- 37.- Merrick, M.L., 1975. Hibridization and selection for increased penicillin titre in wild-type isolates of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 91; 278-286.
- 38.- Messing, R.A., 1975. Immobilized enzymes for industrial reactors. Academic Press, N.Y.; 232.
- 39.- Mitra, G. y Wilke, C., 1975. Continuous cellulase production. *Biotech. Bioeng.* 17; 1-13.
- 40.- Morihara, K., 1974. Comparative specificity of microbial proteinases. *Adv. Enzymol.* 41; 179-243.

- 41.- Morris, J.G., 1974. A Biologist's Physical Chemistry. Addison-Wesley, London; 390.
- 42.- Murrell, W.G., 1967. Biochemistry of the bacterial endospore. *Adv. Microb. Physiol.* 1; 133-251.
- 43.- Nakayama, T., 1977. A procedure to remove protease activity from B. subtilis sporulating cells and their crude extracts. *Analyt. Biochem.* 78; 175-180.
- 44.- Perlman, D., 1974. Prospects for the fermentation industries 1974-1983.
- 45.- Prescott, S.C., 1959. Industrial Microbiology. McGraw Hill, U.S.A.; 945.
- 46.- Puc, A. y Sošič, H., 1977. Carbohydrate nutrition of Claviceps purpurea for alkaloid production related to the osmolality of media. *European J. Appl. Microbiol.* 4; 283-287.
- 47.- Rose, A.H., 1961. Industrial Microbiology. Butterworths, London; 286.
- 48.- Sadoff, H.L., 1972. The antibiotics of Bacillus spp. and their possible role in sporulation. *Progr. Ind. Microbiol.* 11; 1-27.
- 49.- Salle, A.J., 1973. Fundamental Principles of Bacteriology. McGraw Hill, U.S.A.; 1095.
- 50.- Sánchez, S. y Lara, F., 1978. Mejoramiento genético de cepas productoras de antibióticos. *R. Mex. ciencias farm.* 9(1); 11-16.
- 51.- Sidler, W. y Zuber, H., 1977. The production of extracellular thermostable proteinase (neutral) and  $\alpha$ -amylase by B. stearothermophilus. *European J. Appl. Microbiol.* 4; 255-266.
- 52.- Spano, L.A., Medeiros, J. y Mandels, M., 1975. Enzymatic hydrolyzation of cellulosic wastes to glucose. U.S. Army Natuck Labs., U.S.A.; 31.
- 53.- Srere, L.A. y Mosbach, K., 1974. Metabolic Compartmentation. *Ann. Rev. Microbiol.* 28; 61-84.

- 54.- Sweigert, D., 1978. What's new for immobilized enzymes. Food Eng. (MAY); 80-83.
- 55.- Tempest, D.W., 1970. The role of continuous culture in microbiological research. Adv. Microb. Physiol. 4; 223-251.
- 56.- Trauberman, L., 1975. Immobilized enzymes put to work in analysis and control. Food Eng. (FEB); 58-60.
- 57.- Underkoffler, L.A., 1977. Microbial Enzymes. En: Miller, B. y Litsky, W. (Eds.), 1977. Industrial Microbiology. Mc Graw Hill, U.S.A.; 128-164.
- 58.- Urquidi, R.L., 1975. Enzymes. Food Processing (OCT); 37-44.
- 59.- Weinberg, E.D., 1970. Biosynthesis of secondary metabolites. Adv. Microb. Physiol. 4; 1-45.
- 60.- Williams, R.J.P., 1971. Biochemistry of group IA and IIA cations. En: Gould, E.R.F. (Ed.), 1971. Bioinorganic chemistry. Adv. Chem. 100; 155-173.
- 61.- Windish, W. y Mhatre, N.S., 1965. Microbial amylases. Adv. Appl. Microbiol. 2; 273-303.
- 62.- Wolnak, B., Andreen, B.H., Chisholm, J.A. y Saadeh, M., 1965. Fermentation of methane. Biotech. Bioeng. 9; 57-76.
- 63.- Yeh, E.C. y Zawodniack, L.A., 1977. Development of MC 131 culture. Miles Labs. Interoffice communication.