



184
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Aislamiento y caracterización
bioquímica de levaduras
amilolíticas termotolerantes.

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

QUE PRESENTA

Alejandro Ruíz Sánchez

FALLA DE ORIGEN

México, D. F., 1991



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 está 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.

Indice	1
Introducción	1
Glucoamilasa	4
Alfa amilasa	5
Almidón	8
Materiales y métodos	10
Método de enriquecimiento	10
Cinética de crecimiento	11
Características microscópicas de las levaduras aisladas	12
Pruebas bioquímicas	13
Actividad amilolítica de las levaduras	33
Ensayos de alfa amilasa	33
Cuantificación de la Glucoamilasa	34
Determinación de azúcares totales	35
Determinación de proteína	36
Determinación de almidón	37
Substratos	38

Resultados	43
Discusión y conclusiones	61
Bibliografía	64

INTRODUCCION

Las levaduras se pueden clasificar dentro de los Ascomicetos, Basidiomicetos o los Deuteromicetos. Las levaduras Ascomiceticas se caracterizan por su reproducción sexual al producir ascas con endosporas. Las levaduras Basidiomiceticas forman esporas externas (basidiosporas) en basidios. Todas las levaduras y los organismos parecidos a levaduras en los cuales la reproducción sexual no se ha observado en Deuteromicetos (Hongos Imperfectos).

De las 400 especies de levaduras conocidas cerca del 25% son capaces de utilizar el almidón como fuente de carbono y energía. Esto no necesariamente significa que sean capaces de desdoblar el almidón en forma eficiente (Spencer y Van Uden, 1977), ya que solamente una parte del almidón puede ser accesible a las amilasas extracelulares de estas levaduras. Lipomyces starkeyi IGC 3944. produce amilasas extracelulares capaces de hidrolizar el 90% del almidón suministrado al medio mientras que el rendimiento (Y/almidón) en la levadura Lipomyces kononenkoae fué casi del 100% (Spencer y Van Uden, 1977).

Se han encontrado muy pocas levaduras con capacidad de producir alfa-amilasa y glucoamilasa. Estas incluyen a

Saccharomycopsis fibuligera (Endomycopsis fibuligera),
Saccharomycopsis capsularis y más recientemente Lipomyces
kononenkoae, Lipomyces starkeyi y Schwanniomyces castelii.

Otra levadura capaz de producir ambas enzimas y, además de poseer la capacidad de producir etanol a partir de almidón, es Schwanniomyces alluvius; se ha reportado que con esta especie se obtienen 187 U/ml de alfa amilasa y 5.4 U/ml de glucoamilasa. En contraste, las levaduras del género Lipomyces sp no son fermentativas (Wilson et al, 1982).

Para la producción de proteína de origen unicelular, Schwanniomyces alluvius tiene características propicias como su rápido crecimiento y eficiente conversión del almidón. Además, Schwanniomyces alluvius no es patógeno, excreta gran cantidad de amilasas y puede utilizarse en la producción industrial de amilasas. Se puede obtener un rendimiento de 0.51 g de biomasa/g de almidón, siendo este muy similar al que se alcanza cuando las levaduras se desarrollan en un medio rico en glucosa.

La producción de proteína unicelular se lleva a cabo de manera indirecta por muchos microorganismos después de un pretratamiento hidrolítico del almidón, por lo tanto existen grandes ventajas de contar con microorganismos amilolíticos, como es el caso de Schwanniomyces alluvius, que por sí mismos son eficientes para producir biomasa. Otras ventajas incluyen su fácil manejo, comparado con las algas y los hongos filamentosos, así como la aceptabilidad de la biomasa como alimento (Calleja et al, 1986).

Las amilasas extracelulares producidas por Schwanniomyces castelii constituyen un sistema amilolítico capaz de hidrolizar totalmente el almidón. Schwanniomyces castelii ha sido estudiada para la producción de biomasa y amilasas en cultivos por lote y continuos, habiéndose encontrado que la glucosa inhibe la síntesis de enzimas amilolíticas a través de la represión catabólica (Pasari et al, 1988).

Así mismo se han utilizado cultivos mixtos integrados por Saccharomycopsis fibuligera, que es una levadura amilolítica, y Saccharomyces cerevisiae una levadura no amilolítica que utiliza azúcares para fermentar el almidón hasta etanol (Abouzied y Reddy, 1987).

Kiyoshi et al (1978) encontraron levaduras que crecen a 40°C (termofílicas), las cuales asimilan metanol y Travassos (1971) menciona levaduras entéricas que crecen a partir de 37°C y que son termofílicas, pertenecientes a la especie Saccharomycopsis gutulata y Candida sloffii.

Por otra parte se han descrito diversas enzimas amilolíticas producidas por levadura. Estas incluyen:

a) La alfa amilasa que cataliza la hidrólisis de enlaces alfa (1-4) con una actividad del tipo "endo".

b) La beta amilasa, que hidroliza de manera recurrente los enlaces (1-4) a partir de las extremidades no reductoras de las cadenas de amilopectina y amilosa, liberando maltosa. Esta enzima actúa sobre los enlaces (1-6) y, por lo tanto, su acción se detiene en los puntos de ramificación. La hidrólisis de la amilopectina produce una mezcla que contiene

de 50 a 69 por ciento de maltosa y su residuo conocido como dextrina limitante.

c) La glucoamilasa, que hidróliza los enlaces alfa (1-4) a partir del extremo no reductor, liberando glucosa y además presenta una actividad desramificadora al hidrolizar los enlaces alfa (1-6) (Majunath, 1983).

GLUCOAMILASA

El nombre bioquímico completo de la glucoamilasa según la Comisión de enzimas es: alfa-1,4-glucosa glucohidrolasa E. C. 3.2.1.3.

La glucoamilasa se caracterizó en 1951 como una enzima que hidroliza las uniones alfa-1,4-glicosídicas, removiendo sucesivamente glucosa de la terminación no reducida de la cadena. Subsecuentemente se demostró que la enzima también hidrolizaba las uniones alfa-1,6 y alfa-1,3, pero lo hacía de una manera muy lenta.

En la literatura se han descrito numerosos ensayos para la determinación de la actividad de la glucoamilasa, casi todos ellos se basan en la determinación de la liberación de glucosa, la cual puede ser establecida enzimáticamente utilizando la peroxidasa oxidada de glucosa o la hexoquinasa acoplada a la glucosa deshidrogenasa 6-fosfato; químicamente se puede usar el reactivo de cobre alcalino o la reducción del 3,5-dinitrosalicilato. Sin embargo, los métodos químicos no son específicos, ya que no distinguen entre la glucosa, los compuestos reducidos y otros azúcares reducidos.

La mayoría de los investigadores emplean el reactivo de oxidasa para la determinación de glucosa.

Las formas multimoleculares de las glucoamilasas parecen tener propiedades físicas similares, y las glucoamilasas que se han estudiado poseen un peso molecular similar que se encuentra en un intervalo de 40 000 a 80 000.

Las glucoamilasas en general son estables en un rango de pH de 3-6 , y presentan una actividad óptima entre un pH 4-5.

Según Majunath (1983) los grupos carbohidratos parecen desempeñar un papel importante en la estabilidad de la estructura contra la inactivación por calor o almacenamiento.

ALFA AMILASA

Las enzimas alfa-amilasas (1,4-alfa glucohidrolasas E. C. 3.2.1) catalizan la hidrólisis de las uniones alfa-1,4 glucosídicas en los polisacáridos de tres o más unidades de D-glucosa con uniones alfa-1,4, produciendo maltosa y oligosacáridos grandes. Existen muchos métodos de ensayo y definiciones para la actividad de una enzima alfa-amilasa, cada uno con su propia unidad de actividad.

Se ha pensado que los métodos de ensayo y definición de una unidad enzimática son diferentes, no son homogéneos. Sin embargo, pueden estar correlacionadas en función a la temperatura de incubación, el tiempo de incubación, el factor de dilución y los métodos de medición.

La acción de la amilasa se caracteriza por los cambios simultáneos de las siguientes propiedades de los substratos:

- 1) Disminución de la viscosidad.
- 2) Cambio del color de reacción del Iodo.

3) Cambio en el poder óptico rotatorio.

4) Decremento de la turbidez de la solución de glucógeno.

La mayoría de los reportes se basan en uno de los siguientes métodos para detectar la actividad de la alfa amilasa:

1) La formación de azúcares reductores del almidón.

2) El decremento de la reacción específica entre el Iodo y el almidón residual.

3) Un grupo cromogénico es unido al substrato y la formación de este dentro de la fracción soluble se mide por un cambio en la densidad óptica.

Los métodos que utilizan substratos de peso molecular bajo con una estructura definida como la maltotretosa y la maltoheptulosa han sido recomendados en años recientes, pero estos métodos se desarrollaron y se probaron inicialmente para aplicaciones clínicas.

El método colorimétrico de Nelson que utiliza Cobre (Cu) da resultados más exactos que aquellos obtenidos en la medición de azúcares reducidos empleando el 3,5-Dinitrosalicilato alcalino. Así mismo, este método da valores idénticos para las maltodextrinas; la medición de la aparente producción de maltosa en una reacción con amilasa, es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente. Se han hecho mejoras en las técnicas de ensayo de la alfa-amilasa, que han permitido obtener valores más precisos de la actividad enzimática. Sin embargo, no ha sido posible correlacionar cada método y sus resultados correspondientes.

En general las enzimas se ensayan basándose en su reacción

con el sustrato bajo ciertas condiciones de prueba. Las condiciones de ensayo incluyen, el tiempo de incubación, la temperatura de incubación, el pH y en algunas ocasiones la concentración del sustrato no reaccionante se mide utilizando un método de Iodo o bien se mide la concentración del producto usando un método de azúcares reductores para encontrar el grado de la alfa amilasa.

Una Unidad Internacional (UI), es la medida más comúnmente aceptada, se mide como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 micromol de sustrato/minuto bajo condiciones estandarizadas de concentración de sustrato, pH óptimo, ausencia de inhibidores y presencia de activadores.

Resulta imposible comparar el resultado de diferentes métodos ya que cada uno de ellos tiene sus propias condiciones de incubación y unidades de actividad enzimática (Young, 1987).

Las diferencias de los métodos de ensayo son:

- 1.- Tiempo de incubación.
- 2.- Temperatura de incubación.
- 3.- Método de medición.

La alfa amilasa se ha encontrado en:

- 1) Organos y fluidos animales.
- 2) Plantas superiores.
- 3) Muchos microorganismos (Berfeld, 1951).

ALMIDON

El almidón es un recurso renovable que no es tóxico, es fácilmente degradable por diversos microorganismos, sus cualidades pueden ser pronosticadas y son constantes, es aceptado por humanos y animales para consumo. Es fácil separarlo y purificarlo de las materias primas.

En la industria el almidón se ha utilizado como fuente de edulcorante desde el siglo XIX, mediante hidrólisis con ácido sulfúrico. Este método se ha modificado, y actualmente se emplean preparaciones enzimáticas más eficaces. Este proceso ofrece un sinnúmero de ventajas, como es la especificidad que evita la presencia de productos de oxidación como el hidroximetil furfural (HMF).

El almidón está constituido por dos polímeros de la D-Glucosa: la amilosa, polímero lineal, en el que las unidades de glucosa están asociadas por enlaces alfa (1-4) y la amilopectina, polímero ramificado, en el que las cadenas principales, resultado de los enlaces alfa (1-4), contienen ramificaciones correspondientes a enlaces alfa (1-6). Los dos polímeros se encuentran en proporciones que varían de 1:3 a 1:4 en los gránulos de 200 micras.

En el presente trabajo se aislaron y se caracterizaron levaduras amilolíticas termotolerantes, que crecían a 35°C y que además, producen alfa-amilasa y glucoamilasa, al mismo tiempo.

Cuadro 1. En este cuadro podemos observar las características de cada una de las diferentes amilasas.

SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE LAS AMILASAS			
PROPIEDADES	ALFA AMILASA	BETA AMILASA	GLUCOAMILASA
Mecanismo	Ataque-endo	Ataque-exo	Ataque-exo
Productos	Mezcla de oligosacáridos	Maltosa	Glucosa
Decremento de la viscosidad	Rápido	Lento	Lento
Decremento de la tensión de iodo	Rápida	Lenta	Lenta
Punto de acción en la ramificación	Puede evitar los puntos de ramificación alfa-1,6	Puede evitar los puntos de ramificación alfa-1,4	Puede romper los puntos de ramificación alfa-1,4
Especificidad en las uniones	alfa-1,4	alfa-1,4	alfa-1,4 alfa-1,3 alfa-1,6

Adaptada de Majunath P. et al, 1983.

MATERIALES Y METODOS.

METODO DE ENRIQUECIMIENTO (Casas-Campillo y Larrea, 1971).

Se realizó a partir de muestras en diferentes sustratos mencionados a continuación; suelo pozol, nixtamal, bebidas fermentadas, etc., mediante enriquecimiento en cultivos sumergidos. Para ello se prepararon diluciones de cada muestra (1:10, 1:100, 1:1000) en agua estéril y destilada, alícuotas de 1 ml de cada dilución se incorporaron a 50 ml de cada solución mineral (medio MM) contenida en matraces Erlenmeyer de 250 ml. La composición del medio mineral MM fue la siguiente:

1.- K_2HPO_4	5 g
2.- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.5 g
3.- $CaCl_2 \cdot H_2O$	0.8 g
4.- NH_4Cl	7 g
5.- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	80 mcg
6.- KI	200 mcg
7.- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	400 mcg
8.- $MnSO_4 \cdot H_2O$	800 mcg
9.- $NaMo \cdot H_2O$	400 mcg
10.- $ZnSO_4 \cdot H_2O$	800 mcg
11.- Almidón	10 g
12.- Extracto de levadura	200 mg
13.- Estreptomicina	30 mcg/ml (se agrega después de esterilizar)

- 14.- Rosa de Bengala 60 mcg/ml
15.- Aforar a 1000 ml
16.- Ajustar el pH a 4.5

Los matraces con el medio MM inoculado se colocaron en una agitadora con un baño de agua a 40°C; después de 24-72 horas se tomaron alicuotas y se transfirieron a un nuevo medio MM, repitiendo la operación tres veces.

A continuación, los cultivos se sembraron en placas de agar del mismo medio, se incubaron a temperaturas de 35-40°C, después de 24-48 horas se observaron las colonias aisladas al microscopio. Este mismo procedimiento se continuó hasta obtener cultivos puros.

Los cultivos puros se conservaron en tubos inclinados conteniendo medio MM.

CINETICA DE CRECIMIENTO.

A un tubo inclinado que contenía un cultivo puro se le agregó medio MM, se agitó y se puso 0.5 ml de este a un matraz de 125 ml con 25 ml de medio MM, se dejaron durante 24 horas en agitación a 35°C y después de 24 horas se tomó una alicuota de 0.5 ml y se trasladó a un nuevo matraz. El matraz se dejó 24 horas en agitación.

Se contaron las células por medio de un hemocitómetro y se registró el número de células por ml en el cultivo, a continuación se tomó una alicuota que contenía 2.5×10^7 células, ésta alicuota se inoculó a matraces de 125 ml que contenían 25 ml de medio MM incubando a 35°C con agitación (150 rpm).

Posteriormente se tomaron muestras de los matraces cada tres horas y se observó la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro.

A una de las cepas aisladas, se le midió su cinética de crecimiento.

CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS DE LAS LEVADURAS AISLADAS

(Kreger-Van Rij, 1984).

Para la identificación de las levaduras es necesario conocer: la morfología colonial, la morfología microscópica y las características bioquímicas.

Las características morfológicas coloniales son las siguientes:

- a) Tamaño.
- b) Forma.
- c) Bordes.
- d) Superficie.
- e) Color.
- f) Luz reflejada.
- g) Luz transmitida.
- h) Aspecto.
- i) Elevación.
- j) Consistencia.

Las características celulares son:

- 1) Reproducción vegetativa.

- 2) Forma y tamaño de las células.
- 3) Pseudomicelio o micelio verdadero.
- 4) Reproducción sexual.

Las pruebas morfológicas, tanto microscópicas como las coloniales se utilizan para determinar el género, mientras que las pruebas bioquímicas son necesarias para identificar la especie.

Las bases fisiológicas de las pruebas para el crecimiento aeróbico se basan en las siguientes características:

- 1.- La utilización de sustratos: crecimiento y respiración.
- 2.- La entrada de los sustratos en el interior de las células de levadura.

Las pruebas bioquímicas son las que a continuación se mencionan:

1.- UTILIZACION DE SUBSTRATOS.

Las pruebas fisiológicas se emplean para observar la habilidad de las levaduras para utilizar compuestos orgánicos como fuente de energía y como material para sintetizar componentes celulares.

FERMENTACION DE AZUCARES.

Los tubos de Durham dan condiciones semianaeróbicas, el crecimiento aeróbico en la superficie del medio permite la inducción enzimática, las células de levaduras se sedimentan y bajo las condiciones de concentración baja de oxígeno se forman en el fondo del tubo, las burbujas de gas (CO₂).

Los substratos fermentados incluyen: hexosas, derivados de las hexosas y pentosas.

CRECIMIENTO AEROBICO.

En los medios en donde hay una fuente de Carbono o de Nitrógeno, el crecimiento aumenta con un incremento en biomasa por el agrandamiento del número de células. Bajo condiciones óptimas de laboratorio, se puede analizar las siguientes fases de del crecimiento:

- i) lag
- ii) exponencial
- iii) estacionario
- iv) muerte

En las pruebas de crecimiento aeróbico las que nos dan respuesta positiva, las levaduras utilizan los substratos prueba, simultáneamente se sintetizan los constituyentes celulares y para suministrarse energía por medio de la respiración.

RESPIRACION AEROBICA DE SUBSTRATOS ORGANICOS.

La respiración comprende en todos los procesos en los cuales las levaduras oxidan los compuestos orgánicos, liberando energía para la síntesis de ATP. Los signos externos de este tipo de respiración son:

- 1) La desaparición del substrato del medio.
- 2) La formación de CO₂ por las levaduras.

PRUEBAS DE CRECIMIENTO EN SUBSTRATOS DE CARBONO.

Azúcares (Hexosa, pentosas y glucósidos).

Alditales (D-Manitol).

Acidos Orgánicos (Succinato).

Polisacáridos (Almidón e Inulina).

Compuestos de 1 Carbono (Metanol).

Compuestos de 2 Carbonos (Etanol y Acetato).

2. - ENERGIA DE LOS SUBSTRATOS.

Algunos substratos (por ejemplo la Sacarosa) se introducen a través de la pared al plasma por medio de un acarreador (permeasa), este mecanismo permite que el acarreador tome al substrato introduciendolo al citoplasma.

PRUEBAS..

El procedimiento consiste en:

1. - Siembra de las levaduras en una caja de Petri.

a) Definir si el cultivo es puro.

b) Formación de ballistosporas.

c) Prueba de DBB en medio sólido.

La secuencia involucra la siembra de una suspensión de levaduras (en 5 ml de agua estéril) en una placa de extracto de levadura-papa-dextrosa la cual es incubada por 2 días a 25°C y después a temperatura ambiente con la tapa de la caja de Petri. Esto es con la intención de separar las colonias sobre toda la superficie de la placa. Las ballistosporas son visibles como imágenes al espejo de las colonias en la tapa.

2.- CRECIMIENTO EN MEDIO LIQUIDO.

En un tubo con YPD con agua se inocula la levadura y se incuba por 2-3 días a 25°C. La formación de una película (seca, lisa o rugosa), de un anillo y de una sedimentación. Las células son estudiadas en una preparación bajo el microscopio (100x), realizándose anotaciones del método de reproducción, la forma y el tamaño de las células.

3.- CULTIVO CON PLACA DE DALMAU EN AGAR MORFOLOGICO.

Se inocula una placa de agar con una superficie seca, con una delgada estria y con dos puntos de inoculación (bien separados en la placa), luego se cubre con un cubreobjetos estéril una sección central de la estria y uno de los puntos de la inoculación. Las placas se incuban a 25°C por 3-6 días. Después de 3 días se hace una descripción de la colonia del cubreobjetos en el punto de inoculación y se observan las células en una preparación en agua bajo el microscopio. Después de 6 días las secciones cubiertas son estudiadas al pasar la placa bajo el microscopio (400x).

4.- CULTIVOS SEMBRADOS EN PLACAS DE PAPA Y HARINA DE MAIZ.

El agar de papa y la harina de maíz (fundido) es vertido en una pequeña capa en dos portaobjetos que están sobre un metal en forma de U o sobre un vidrio redondo en una caja de Petri estéril. Después de la solidificación, la levadura es inoculada en cada portaobjeto y se cubren con un cubreobjeto estéril. Se agrega agua portaobjetos y se cubren con un cubreobjetos estéril. Se agrega agua al interior de la placa de Petri para prevenir que no se

seque. La placa es incubada por 5-7 días a 25°C. Para la observación del crecimiento, se toma cada portaobjetos, se limpia con papel filtro y después el portaobjetos se pasa bajo el microscopio y se examina a 100x, 400x o 1000x de aumento.

5.- FORMACION DE ASCOSPORAS.

El medio de esporulación en tubos es incubado con levadura a 25°C a temperatura ambiente. El medio de acetato requiere de una inoculación gruesa porque ahí no crece. Los cultivos son examinados después de 3 días, 1, 2 y 3 semanas.

Puede observarse la conjugación de las células, así como la forma del asca y las ascosporas, el número de esporas por asca y la liberación de las mismas. Los cultivos pueden ser rojos, rosas o café en la presencia de muchas esporas. Algunas esporas tienen un color café bajo el microscopio.

6.- REACCIONES DE FERTILIZACION.

7.-FERMENTACION.

La solución de azúcar es inoculada directamente con la levadura en los tubos Durham. Los tubos son incubados a 25°C y son observados todos los días durante 14 días. Después de la lectura de las pruebas, los tubos se agitan, llevándose registros del volumen de gas producido. Un tubo totalmente lleno (100%). La fermentación es vigorosa cuando el tubo se llena en 2-4 días; ligera cuando se llena después de 10-14 días, y débil cuando nunca se llena totalmente con gas.

8.- ASIMILACION DE LOS COMPUESTOS DE CARBONO.

a) En un medio líquido en cultivos estáticos, los tubos conteniendo medio basal más 0.5% de uno de los compuestos de Carbono son inoculados con una gota de la suspensión de levadura. La suspensión se hace con agua estéril y teniendo una densidad de 2°. Un tubo conteniendo medio basal sin compuestos de Carbono actúa como blanco y no muestra crecimiento; otro tubo conteniendo medio basal más glucosa indica si la levadura crece en este tipo de medio basal. Los tubos son incubados a 25°C y leídos después de 1, 2 y 3 semanas utilizando una carta blanca con líneas negras de 3/4 mm de espesor.

Los resultados se interpretan de acuerdo a la siguiente notación:

- 3°: Crecimiento en el tubo obliteradas completamente las líneas.
- 2°: Las líneas aparecen como bandas difusas.
- 1°: Las bandas se distinguen pero tienen distintos bordes.
- 2° son considerados positivos.
- 1° son débiles o negativos.

b) En medio líquido en cultivo agitado.

Los tubos inoculados son agitados a 25°C y son leídos después de 3, 7 y 21 días.

c) Auxograma-Carbono.

Dos ml de una suspensión de levadura en agua estéril es mezclada en una caja de Petri con una gota de una solución estéril de 10% de extracto de levadura en agua y 15 ml de medio basal fundido y enfriado a 40°C. Después de la solidificación, la placa se guarda a 25°C por unas horas para obtener una superficie de agar seca. Pequeñas cantidades de los diferentes compuestos de carbono son entonces probados mediante su depósito en diferentes sitios del agar. Estos puntos son marcados en el exterior de la caja de Petri. En una caja de Petri de 10 cm, pueden probarse 7 compuestos de Carbono. Las placas son incubadas a 25°C.

Se observan después de 2-3 días y otra vez después de 2 días a temperatura del cuarto.

9.- ASIMILACION DE LOS COMPUESTOS DE NITROGENO.

a) Asimilación de Nitrato en un medio líquido.

Una gota de suspensión de la levadura es inoculada dentro del tubo conteniendo medio basal más 0.078% de Nitrato de Potasio. El tubo se incuba por una semana a 25°C. Si hay crecimiento (2. o 3.), un segundo tubo con medio es inoculado e incubado por una semana. El resultado de esta prueba es considerada como decisiva.

b) Auxograma de Nitrógeno.

El procedimiento para la prueba es el mismo que el que se utiliza para el auxograma de Carbono, pero el medio basal es diferente y contiene Glucosa en vez de Sulfato de Amonio. La peptona es utilizada como un control positivo.

10.- División de la Arbutina.

Tubos inclinados de Arbutina con agar son inoculados y se incuban a 25°C por 7 días. Si la Arbutina es degradada, se desarrolla un color café oscuro de la Aglucona (Hidroxiquinona) con iones férricos.

11.- Crecimiento en medio libre de vitaminas.

Un tubo con medio líquido sin vitaminas es inoculado con una suspensión de levadura.

El tubo es inoculado a 25°C por una semana. Si no hay crecimiento en este tiempo, la reacción es negativa. Si hay crecimiento, una asada de este cultivo se inocula en un tubo con medio fresco y se incuban otra semana. Si ocurre crecimiento después de este tiempo, la reacción es positiva.

a) Requerimientos para vitaminas especiales.

El medio para esta prueba es el medio basal más las vitaminas con excepción de la que está a prueba. El método de la prueba es el mismo que en el punto anterior.

12.- Crecimiento en medio osmótico.

a) En Agar-extracto de Levadura-Glucosa 50% (p/p).

La levadura es inoculada en tubos inclinados, incubados durante una semana a 25°C y examinados para su crecimiento.

b) El crecimiento en NaCl 10% más glucosa en base nitrogenada de levadura (YNB), se mide mediante el inóculo de 0.1 ml de la suspensión de la levadura (como se utilizó en las pruebas de asimilación en medio líquido) en el tubo con medio. Después de la incubación por una semana a 25°C se registra el crecimiento.

13.- Crecimiento a 37°C en medio sólido.

La levadura es inoculada en tubos inclinados conteniendo glucosa-extracto de levadura-peptona agar y se incuba por 2-4 días a 37°C. Si el crecimiento es ligero, se hace de nuevo un subcultivo incubándolo por 2-4 días, a 37°C. El último resultado obtenido se considera decisivo.

a) Temperatura máxima de crecimiento.

La levadura se inocula en tubos con glucosa-extracto de levadura-agua. Los tubos se incuban en baños de agua a diferentes temperaturas con intervalos de 1°C.

14.- Formación de Almidón.

La formación de compuestos semejantes al almidón se denota por la adición de una gota de lugol en la solución para un cultivo de una semana de la levadura en el medio base nitrogenada de levadura más glucosa. La presencia de reacción positiva muestra un color azul-púrpura o verde en el medio, en las células o en ambos. Un color café típico del glucógeno, puede enmascarar la reacción ligera del almidón. Cuando el tubo es expuesto por algunas horas a la luz, el color café puede desaparecer permaneciendo el color azul.

15.- Prueba de Ureasa.

a) Prueba de ureasa en medio líquido.

Un tubo con medio de Urea es inoculado con la levadura e incubado por 5 días a 25°C. La reacción de ureasa es positiva si el color se torna de rojo a pùrpura.

b) Prueba de Ureasa en medio sólido.

A un tubo inclinado con Urea en agar se inòcula la levadura incubado a 25°C por 5 días. Un profundo color rosa indica una reacción positiva.

16.- Hidrolìsis de los lípidos.

La degradaciòn de los lípidos, es decir la acciòn de la lipasa, se prueba por el crecimiento de la levadura en una placa con una capa de agar-Gorodkova sobre sebo de carne.

Si el lípido es roto, la liberaciòn de àcidos grasos da sales de Calcio insolubles con los iones de Calcio presentes en el medio lo cual se muestra como un depòsito opaco. La levadura se inocula en dos líneas en el agar y se incuba por 4 días a 25°C.

17.- Prueba de DBB.

a) En medio sólido.

La levadura crece en glucosa-extracto de levadura-peptona agar por 3 días a 25°C y 4 días a temperatura ambiente, se inòculan luego a 60°C por 16 horas.

El reactivo de DBB es añaído sobre la superficie del agar. Un rojo oscuro o un color rojo-violeta de las colonias después de dos minutos a temperatura ambiente indica una reacción positiva.

18.- Crecimiento en presencia de 100 ppm y 1000 ppm de Cicloheximida.

La levadura se inocula en un medio basal conteniendo base nitrogenada de levadura y glucosa a la que se le agrega Cicloheximida (100 ppm y 1000 ppm) y se incuba a 25°C. Los cultivos se leen después de 1, 2 y 3 semanas y en cultivo agitado.

Una semana después, al igual que las pruebas de asimilación.

2. y 3. positivo, 1. es negativo.

19.- Crecimiento en un medio con ácido acético al 1%.

Las placas se inoculan con 1 ml de la suspensión de la levadura. La placa se incuba a 25°C durante 3-6 días y se examinan para ver si hay crecimiento visible.

A continuación mencionaremos la forma de preparar y la manera de proceder para la identificación de las levaduras aisladas.

1.- Sembrado de levaduras en cajas de Petri.

Medio de glucosa-extracto de levadura-peptona agar.

Disolver 20 g de glucosa, 10 g de Bacto-peptona, 5 g de Bacto-extracto de levadura y 2% (p/v) de agar en 1000 ml de agua destilada. El pH no se ajusta. El medio se dispersa en las cajas de Petri y se esterilizan a 15 lbs de presión.

2.- Crecimiento en medio líquido.

Medio: Glucosa-extracto de levadura-peptona en agua (ver medio 1, no añadir agar).

3.- Medio.

Medio de agar para estadio morfológico (DIFCO B-393).

El medio se hidrata suspendiendo 35 g de Bacto-Yeast Morphology agar en 1000 ml de agua destilada fría. Se calienta para disolverlo completamente. Se agrega a tubos o frascos y se esteriliza por 15 min a 15 lbs de presión. La reacción final del medio es a pH-5.6.

4.- Cultivos de papa y harina de maiz agar.

Medio: Papa dextrosa agar DIFCO (b-13).

Para rehidratar el medio se suspenden 39 g de Bacto-papa-dextrosa-agar en 1000 ml de agua destilada calentándola hasta ebullición, con el fin de disolver el medio completamente. Se distribuye en tubos o frascos, y se esteriliza por 15 minutos a 15 libras de presión (121°C). El medio tiene una reacción final a pH-5.6.

Medio: Harina de Maiz agar (B-386).

Para rehidratar el medio se suspenden 17 g de Bacto-harina de maiz-agar en 1000 ml de agua destilada. El medio se disuelve calentando hasta ebullición. Se agrega a tubos o frascos y se esteriliza en el autoclave por 15 min a 15 libras de presión (121°C). La reacción final del medio es a un pH-6.0.

5.- Medio para la formación de ascosporas.

Medio Extracto de malta agar.

Se disuelven 12 g de agar en 400 ml de agua destilada y se calienta. Entonces se disuelven 20 g de polvo de extracto de malta en la solución caliente. Se dispone en tubos o botellas y se esteriliza por 15 min a 15 libras de presión y se inclinan.

Los tubos inclinados se guardan en el refrigerador hasta utilizarse.

Acetato Agar (Fowell).

Se añade 0.5% de Acetato de Sodio trihidratado y ajustar el pH hasta 6.5-7.0. Añadir 2% de agar y calentarlo hasta disolver el agar. Se agrega a tubos, se esteriliza por 15 min a 15 libras de presión y se inclinan.

V-8 Agar.

Se funden 14 g de agar en 340 ml de agua destilada, en otro recipiente conteniendo 350 ml de jugo V-8 y a 5 g de levadura se le agrega 10 ml de agua destilada. La suspensión se agita y se agrega en tubos.

La esterilización es a 15 lbs de presión por 15 min.

Corodkova Agar (modificado).

A 100 ml de agua de la llave se le agrega 0.1% (p/v) de glucosa, 1% de peptona, 0.5% de Cloruro de Sodio y 2% de agar.

Se calienta hasta que el agar se disuelve y se agrega a tubos, se esteriliza por 15 minutos a 15 libras de presión y se inclinan. Algunos prefieren 0.25% de glucosa y añaden 1% de extracto de malta.

Extracto de levadura-Extracto de malta.

Se disuelven 3 g de extracto de levadura, 3 g de extracto de malta, 5 g de peptona y 10 g de glucosa en 1000 ml de agua y 2 % (p/v) de agar.

Metschnikowia.

Una lata de jugo V-8 se disuelve con un volumen igual de agua y ajustar a un pH-5.5 con NaOH. El jugo diluido se filtra a través de un papel Whatman No. 1 y se diluye desde 1:2 hasta 1:29 al que se le añade 2% de agar. Después se disuelve el agar, el medio se agrega a tubos y se esteriliza por 15 min a 110°C.

6.- Reacciones de cruzamiento.

Medio: Extracto de malta agar (ME agar) ver número 5.

YM agar. Ver No. 5.

7.- Fermentación.

Medio.

Se disuelven 4.5 g de extracto de levadura y 7.5 g de peptona en 1000 ml de agua destilada, se añade suficiente azul de bromotímol para dar el color verde adecuado. Se agregan 2 ml a tubos de 150x12 mm que llevan pequeños tubos invertidos. Los tubos se esterilizan por medio de una autoclave durante 15 min a 15 libras de presión. De un concentrado de azúcar se hace una esterilización por filtración y a cada tubo se añade 1 ml.

8.- Asimilación de compuestos de Carbono.

Se prepara un medio concentrado diez veces, el cual se prepara por la disolución de 6.7 g de medio base nitrogenado de levadura y 5 g del compuesto de Carbono en agua desmineralizada. La solución se esteriliza por filtración y 0.5 ml se añaden asépticamente a 4.5 ml de agua desmineralizada en tubos los cuales han sido esterilizados previamente a 110°C por 15 min. Se prepara el medio con los siguientes compuestos:

Glucosa, galactosa, L-sorbose, sacarosa, maltosa, celobiosa, trehalosa, lactosa, D-arabinosa, D-ribosa, L-ramnosa, glicerol, eritriol, ribitol, galacticol, D-manitol, D-glucitol, metil-D-glucosido, salicina, ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico, inositol, metanol, 2-cetogluconato, glucosamina, glucono-delta-lactona.

Las soluciones de ácidos orgánicos tienen un pH de 5.6.

Se prepara un medio con almidón soluble, disolviendo 0.459 g en 90 ml de agua desmineralizada que se calienta y se coloca en tubos que contendrán 4.5 ml de la solución en tubos. Estos se esterilizan en autoclave por 15 min a 120°C. A cada tubo se le agrega 0.5 ml del concentrado diez veces (esterilizado por filtración) de la solución de la base nitrogenada de levadura.

9.- Asimilación de compuestos nitrogenados.

Medio.

Se prepara un medio concentrado diez veces, al disolver 11.7 g de medio con fuente de Carbono y 0.78 g de KNO₃ en agua desmineralizada. La solución es esterilizada por filtración y 0.5 ml se añaden asépticamente a 4.5 ml de agua desmineralizada en

tubos los cuales han sido esterilizados antes a 110°C por 15 min.

En la prueba se pueden utilizar los siguientes compuestos:

✓ Nitrato de Potasio, Nitrato de Sodio, Etilamina, Cada~~ver~~ina y Creatina.

10.- Degradación de la Arbutina.

Medio.

Arbutina al 0.5%; extracto de levadura; agar 1.5%, agua de llave.

Se disuelven los ingredientes, agregarlos a tubos y esterilizar por 15 min. a 120°C. Usualmente los ingredientes contienen suficiente fierro para mostrar reacciones positivas; si la cantidad de fierro no es suficiente, se añade a cada tubo directamente después de la esterilización 2-4 gotas de una solución de Citrato de Amonio ferrico al 1%.

1.- Crecimiento en medio libre de vitaminas.

Se prepara el medio concentrado diez veces mediante la disolución de 16.7 g de Bacto-base de levadura libre de vitamina en 100 ml de agua destilada, la cual puede ser calentada ligeramente para efectuar la disolución completa de los ingredientes.

La solución final se prepara pipeteando asépticamente 0.5 ml de la solución concentrada en 45 ml de agua destilada en tubos de 16 mm con tapón de algodón.

12.- Crecimiento en medio osmótico.

Medio a.

50% (p/p) de glucosa-extracto de levadura agar.

Se disuelven 500 g de glucosa en 50 ml al 1% de extracto de levadura. Añadir 3% (p/p) de agar y disolver por evaporación o en baño de agua. Después de disolver el agar, se reparten alícuotas de 5-6 ml en tubos de 16 mm con tapón de algodón. Los tubos se esterilizan por 15 minutos a 10 lbs de presión y se inclinan.

Medio b.

10% de NaCl más 5% de glucosa en base nitrogenada de levadura.

Se disuelven 5 g de glucosa y 10 g de Cloruro de Sodio en 100 ml de agua destilada. Esta solución se agrega en alícuotas de 4.5 ml en tubos de 16 mm con tapón de algodón y se esteriliza durante 15 minutos a 15 lbs de presión. A cada tubo se le añade 0.5 ml de una solución esterilizada por filtración de 6.7 g de Bacto-base nitrogenada disuelta en 100 ml de agua destilada. La solución se mezcla por agitación y es entonces cuando está lista para ser utilizada.

Medio c.

Prueba tolerancia a Cloruro de Sodio.

El medio base contiene 2% (p/v) de glucosa, 1% (p/v) de peptona y 0.5% (p/v) de extracto de levadura disuelto en agua. El medio final se agrega a tubos y se esteriliza en la autoclave.

13.- Crecimiento a 37°C en medio sólido.

Glucosa-extracto de levadura-peptona agar.

Se disuelven 20 g de glucosa, 10 g de Bacto-peptona y 5 g de Bacto extracto de levadura en 1000 ml de agua destilada, añadir 2% (p/v) de agar.

14.- Formación de almidón.

a) Prueba en medio líquido.

Después de 24-28 días se examinan los cultivos de asimilación de Carbono que inicialmente contenían azúcares o alcoholes polihídricos por la presencia de compuestos amiloides.

b) Prueba en agar en tubos.

Se disuelve 0.2 % de Sulfato de Amonio, 0.2% de Fosfato de Potasio Monobásico, 0.1% de Sulfato de Magnesio Heptahidratado, y 2% de glucosa en agua destilada. Se ajusta el pH de la solución a 4.5. Se prepara e iguala el volumen de 4% de agar en agua destilada. Las dos porciones separadas del medio se esterilizan por 15 min a 10 lbs de presión. Se añaden las dos porciones juntas asépticamente cuando el agar esté licuado. Se mezclan gradualmente las soluciones para evitar espuma. Se prepara en cajas de Petri 1 gota de autolizado de levadura y una gota de una solución cien veces concentrada.

Solución de Ioduro de Lugre: Se disuelven 2 g de Iodo y 2 g de Ioduro de Potasio en 300 ml de agua destilada.

15a.- Prueba de Ureasa en medio líquido.

Medio A.

Peptona 0.1%

NaCl 0.5%

KH₂PO₄ 0.2%

Glucosa 0.1%

Rojo de fenol 0.2%

Agua desmineralizada.

Se esteriliza por 20 min a 20°C. Ajustar la reacción a pH-6.8.

Medio B.

Urea 50%

Agua desmineralizada.

Se esteriliza mediante filtración.

100 ml A + 4 ml B, alícuotas de 0.5 ml se agregan a tubos bajo condiciones asépticas.

15 b.- Prueba de Ureasa en medio sólido.

Disolver 1 g de peptona, 1 g de glucosa, 5 g de Cloruro de Sodio y 2 g de Fosfato de Potasio Monobásico y 0.012 g de Rojo de Fenol y 1 litro de agua destilada y se ajusta la reacción a pH 6.8. Se añaden 20 g de agar y se disuelven, después se toman alícuotas de 4.5 ml y se agrega a tubos de 16 mm con tapón de algodón. Se esteriliza en la autoclave por 15 min a 15 lbs de presión. Después de esterilizar en la autoclave se le añade 0.5 ml de una solución de Urea al 20% esterilizada por filtración. Después se mezcla a tubos inclinados.

16.- Degradación de lípidos.

17.- Prueba de DBB.

a) En medio sólido.

Medio: glucosa-extracto de levadura-peptona agar o Sabouraud dextrosa agar conteniendo 0.5% de extracto de levadura.

b) En medio líquido.

El medio consiste en 5 ml de base nitrogenada de levadura con 0.5% de glucosa (pH-7.0).

Reactivo:

El reactivo de DBB se prepara añadiendo 15 ml de amortiguador deaminometano (hidroximetil) 0.25 M tris (pH-7.0) a 15 mg de DBB (o-dianisidina tetrazotizada; 20% puro).

18.- Crecimiento en presencia de 100 ppm y 1000 ppm de Cicloheximida.

Medio:

La cicloheximida se disuelve en acetona. 0.1 g (para 100 ppm o 1 g (para 1000 ppm) en 2.5 ml de acetona. La solución de acetona se añade a la solución de 6.7 g de la base nitrogenada de levadura Difco y 10 g de glucosa en 100 ml de agua desmineralizada antes de esterilizar por 15 min a 110°C.

19.- Crecimiento en un medio con Acido acético al 1%.

Medio:

Glucosa al 10%, triptona al 1%, extracto de levadura al 1% agar al 2% y agua desmineralizada.

La solución es esterilizada por 15 min a 110°C. Después se enfria hasta 45-50°C, se añade 1 ml de ácido acético por cada 100 ml de agar. Después se mezcla, se llenan las placas.

Solución stock de vitaminas.

Se disuelven 0.2 mg de biotina, 40 mg de pantotenato de Calcio, 0.2 mg ácido fólico, 200 mg de Inositol, 40 mg de Niacina, 20 mg de ácido p-aminobenzoico, 40 mg de hidrocloreuro de piridoxina, 20 mg de riboflavina y 100 mg de Tiamina, en 1000 ml de agua destilada y se esteriliza mediante filtración.

ACTIVIDAD AMILOLITICA DE LAS LEVADURAS.

PREPARACION DE ENZIMA CRUDA.

Se dejan crecer cultivos de 50 ml de medio MM en matraces de 250 ml a 35° y 40°C en un baño de agua en agitación. Los cultivos se centrifugan a 6 000xg durante 10 minutos y el sobrenadante que contiene la enzima extracelular, se colecta y se utiliza para los análisis, al igual que la preparación de enzima cruda.

ENSAYOS DE ALFA AMILASA (Wilson et al, 1982).

El sustrato consiste de 0.2% de almidón soluble disuelto en una solución amortiguadora de $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 0.05 M (pH 4.5) hirviendo y enfriado hasta 40°C. El reactivo de Iodo se prepara fresco por diluciones de 1 ml de solución stock (0.5% I₂ en 5% KI) en 500 ml de agua desionizada que contiene HCl 5 N. Para el ensayo, 1 ml de solución de enzima se pone en un tubo de ensayo y se calienta hasta 40°C en un baño metabólico se añade 2.0 ml de almidón, la reacción se detiene pasados 10 minutos y se toma una

muestra de 0.2 ml a la que se le agrega 5 ml de reactivo de Iodo. La absorbancia se mide a 620 nm contra un control (0.2 ml de agua en 5 ml de reactivo de Iodo). El control utiliza 1.0 ml de solución reguladora en lugar de la enzima. la actividad de la enzima alfa-amilasa se calculó a partir de la absorbancia utilizando la siguiente ecuación:

Unidades de alfa amilasa = ((Control-Testigo)/Control)40D

En donde D es el factor de dilución de la enzima y 40 representa los 4.0 mg de almidón presente en la reacción multiplicado por 10.

La unidad de alfa amilasa se define como la cantidad de enzima que hidroliza 0.1 mg de almidón en 10 min a 40°C cuando 4.0 mg de almidón están presentes, la actividad que resulta de la absorbancia menor a 0.125 después de 10 minutos requiere dilución para dar reacciones lineales sobre periodos de 10 minutos.

CUANTIFICACION DE LA GLUCOAMILASA (Wilson et al, 1982).

La liberación de glucosa del almidón se midió por el ensayo de la oxidasa de glucosa peroxidasa (Sigma Bulletin No. 510). El sustrato utilizado es almidón soluble 0.5% disuelto en una solución amortiguadora de KH_2PO_4 -NaOH (pH 4.5) hervido y enfriado a 40°C. Para el ensayo, a 5.0 ml de sustrato de almidón se le añadieron 1.0 ml de la dilución de enzima precalentada, y después de calentar a 40°C durante 10 minutos la reacción se detuvo, y se tomó una muestra de 0.5 ml, la cual se pasó a un tubo de ensayo y se hizo hervir durante 5 min.

Después se enfrió en un baño de hielo, se añadieron 5 ml de oxidasa de glucosa peroxidasa y el tubo se incubó a 40°C por 30 minutos. La absorbancia se midió a 450 nm contra un blanco (0.5 ml de solución amortiguadora más reactivo de oxidasa de glucosa peroxidasa). En el control se utilizó 1.0 ml de solución amortiguadora en lugar de la enzima.

La actividad de la Glucoamilasa se determina a partir de las absorbancias utilizando la ecuación siguiente:

Unidades de Glucoamilasa = ((Testigo-Control)/Estandar) x 1.667D

donde D es el factor de dilución y 1.667 es el factor de conversión al tomar unidades definidas como la cantidad de enzima que se libera en un micromol de glucosa en 10 minutos a 40°C donde 25 mg de almidón están presentes. El estandar es el mismo que el utilizado en el ensayo de la oxidasa de glucosa peroxidasa.

La actividad enzimática la cual resulta de la absorbancia mayor de 0.73, esta no es lineal en los 10 minutos de reacción y requiere de dilución antes del ensayo.

DETERMINACION DE AZUCARRES TOTALES (Dubois, 1956).

Reactivos:

- 1.- Fenol 5% p/v, se funden los cristales a 50°C y se afora a 100 ml de agua destilada.
- 2.- H₂SO₄ concentrado.
- 3.- Patrón de glucosa 0.1 mg/ml (100 mcg/ml).

Se agregó 1 ml de muestra a tubos de 15x150 mm. Se preparó al mismo tiempo un control conteniendo 1 ml de agua destilada y un conjunto de estándares de glucosa entre 0 y 100 mcg/ml (de glucosa por ml). Se adicionó a todos los tubos 1 ml de fenol al 5% p/v. Mediante una pipeta de flujo rápido se adicionaron 5 ml de H₂SO₄ concentrado, dirigiendo el flujo del ácido sobre la superficie del líquido, y se agitó el tubo. Los tubos se dejaron reposar durante 10 minutos, se agitaron y se colocaron en un baño de agua a 25-30°C durante 10-20 minutos antes de leer a 488 nm.

Preparación del patrón:

Se pesan 0.1 g de dextrosa Baker anhidra, disolver y aforar a 1000 ml con agua destilada, obteniéndose una concentración de 0.1 mg/ml-100 mcg/ml.

La concentración de azúcares totales se calculó interpolando la AS en la curva tipo de la muestra. El color de la reacción permanece estable durante varias horas.

DETERMINACION DE PROTEINA.

Reactivos:

- 1) NaOH 2 N (Solución).
- 2) CuSO₄.5H₂O 2.5% p/v.
- 3) Patrón de proteína estandar, seroalbumina bovina.

Procedimiento:

Se ponen 2 ml de la muestra en tubos de ensayo adicionándoles 1 ml de NaOH 2 N. El tubo se pone en un baño con agua a ebullición durante 5 minutos, y se enfría con agua fría. Se adiciona 1 ml de

CuSO₄ 2.5% p/v. agitando con un vortex para romper el precipitado; la suspensión se deja reposar durante 5-30 minutos y se centrifuga a 10, 000 rpm durante 5 minutos. El control de reactivos contenía 2 ml de agua destilada en lugar de la suspensión, y un conjunto de disoluciones de proteína patrón (Ej. 2, 4, 6, 8 mg de proteína) se trataron en forma semejante. incluyendo la etapa de calentamiento (lo cual no es estrictamente necesario pero es un buen principio para tratar las muestras y los patrones de manera idéntica). Se determinó la densidad óptica de los sobrenadantes de las suspensiones y de los patrones de proteína contra un testigo en un espectrofotómetro usando una absorbancia de 555 nm y un paso de luz de 1 cm.

El principal defecto del método de Biuret es su relativa carencia de sensibilidad.

DETERMINACION DE ALMIDON (Winfield, 1977. Nadahara et al, 1982).

Curva de calibración.

Se preparó una solución patrón de almidón de 1 mg/ml adicionando 1 g de almidón seco grado analítico en 500 ml de agua destilada, y se calentó a ebullición durante 5 minutos aforando luego a 1000 ml.

Se prepararon soluciones patrón de la solución madre en un rango de concentración de 0 a 1000 mcg/ml, se adicionaron 9 ml de agua destilada y 0.1 ml de solución de Iodo-Potasio (2 gramos de Iodo y 20 g de Yoduro de Potasio). Se agitó la mezcla y se dejó reposando durante 5 minutos protegiendola de la luz.

Se leyó la absorbancia a 600 nm.

Determinación de almidón.

En un tubo de ensayo de 15x150 mm se adicionaron 0.1 ml de la muestra y se agregaron 9.9 ml de agua (dilución 1:100); se adicionaron 0.1 ml de la solución de iodo, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos. Se leyó la As a 600 nm. Se interpoló en la curva tipo para obtener la concentración del almidón. La concentración obtenida se multiplico luego por 100, y en base a estos datos se obtuvo la cantidad de almidón consumido en función del tiempo de incubación.

Los substratos que se utilizaron para el aislamiento de las levaduras son los siguientes:

SUELO.

Las levaduras son comunes en muchos tipos de suelo. Muchas levaduras indígenas del suelo son Fungi Imperfecti (Deuteromycota). Las especies del género Candida, Rhodotorula y Cryptococcus son probablemente las levaduras indígenas más abundantes en el suelo. Hay especies de Lipomyces, Schwanniomyces, Kluyveromyces, Schizoblastoporon, Hansenula, Candida y Cryptococcus, las cuales se han aislado exclusivamente del suelo. El hecho de que estos organismos se hayan encontrado solamente en el suelo sugiere pero no prueba, que el suelo es su habitat natural. Muchas otras levaduras son organismos aóctonos del suelo. Muchas de las levaduras se encuentran en la capa superior del suelo a una profundidad de 2-10 cm. Debajo de los 30 cm es muy

raro encontrarlas. Las poblaciones de levaduras son bajas en el suelo debido a la pérdida de viabilidad cuando son expuestas a radiación ultravioleta, grandes temperaturas debido a la absorción de la radiación solar, y la desecación por la evaporación del agua en la superficie del suelo. La distribución vertical de las levaduras en los suelos depende de la compactación del suelo, de su porosidad, contenido de humedad y la actividad de los animales (Atlas, 1981).

BEBIDAS FERMENTADAS.

El pozol es una masa de maíz fermentada en agua, consumida como bebida ceremonial y alimento básico por poblaciones indígenas del sureste de México, y como bebida refrescante por los mestizos de la misma región del país. El pulque es una bebida alcohólica que se obtiene por fermentación del aguamiel, que es secreción azucarada de varias especies de magueyes pulqueros; es consumida como bebida embriagante y complemento dietético tanto por indígenas como por mestizos en las regiones del país en donde crecen dichos magueyes. El tepache es una bebida fermentada, refrescante, de consumo generalizado en México. Aunque originalmente era preparada con maíz, en la actualidad se hace con frutas como la piña, la manzana y otras, las cuales son dejadas a fermentar en agua endulzada.

En México existen numerosos grupos indígenas que utilizan diversos alimentos y bebidas fermentadas con fines nutricionales, estimulantes, medicinales y rituales.

Pozol.

El pozol (del nahuatl pozolli, espumoso) es un producto alimenticio de origen maya preparado por fermentación de masa de maíz, la cual, desleída en agua, es consumida como alimento básico por varios grupos de población antes mencionados.

Preparación:

Esta consiste en aproximadamente un kilo y medio de granos de maíz, preferentemente blanco (Zea mays L.) se hierven durante más o menos una hora en unos dos litros de agua conteniendo cal (alrededor de 10% de Ca(OH)_2 peso/volumen). Cuando los granos se han hinchado y sus pericarpios se pueden quitar fácilmente con los dedos, los granos enfriados son frotados con las manos y enjuagados con agua varias veces para que, una vez escurrido el exceso de agua, se obtenga el nixtamal. El nixtamal es molido en un metate para obtener una masa mortajada. La masa es entonces moldeada en bolsas de varias formas y tamaños, algunas de ellas hasta de un kilogramo, las cuales son envueltas, preferentemente, en hojas de platano (Musa sp), de platanillo (Heliconia sp), o de hoja blanca (Calathea lutea (Aubl. Meyr)), con objeto de reducir la desecación de la masa durante el tiempo que dure la fermentación (1-5 días o más). El pozol es desleído en agua, en proporción 1:2 o 1:3 aproximadamente, y se bebe solo o adicionado de sal, de miel o de diversas clases de chiles secos (Capsicum annuum) L. que han sido previamente tostados y molidos.

Levaduras que se encuentran en el pozol:

Candida kruseyi (Cast.) Berhout, Trichosporon cutaneum de Beurm., Gougerot y Vaucher Ota, Hansenula fabianii Wickerham, Kluyveromyces fragilis (Jorgensen) Van der Walt, Candida tropicalis y Saccharomyces cerevisiae Hansen.

Pulque.

El pulque (del nahuatl *polihqui*, podrido, descompuesto) es una bebida alcohólica que se obtiene por fermentación del aguamiel, que es la secreción azucarada de varias especies de magueyes pulqueros, principalmente Agave atrovirens Karw. Es una bebida típica de México consumida por la población indígena y mestiza en muchas regiones del país, particularmente en los lugares en donde pueden ser cultivados los magueyes por los tlachiqueros; el aguamiel es transportado en recipientes hechos de piel de becerro o de cerdo y es vaciado a los tinacales.

Levaduras presentes en el pulque:

Saccharomyces cerevisiae, Pichia membranaefaciens, Candida parapsilopsis, Kloeckera apiculata (Reesimens Kloecker) Janke.

Tepache.

Aunque hay diversas maneras de preparar el tepache, la más frecuente es aquella en la que esta se obtiene no de maíz, como se hacía en tiempos pasados, sino de diversas frutas como la piña, la manzana, la naranja y otras. Estas se pueden fermentar durante un

tiempo variable en barriles de madera, llamados tepacheras, en agua endulzada con piloncillo. Las tepacheras son tapadas con telas de manta de cielo u otro dispositivo. Después de uno o varios días se obtiene una bebida refrescante de sabor dulce y agradable, pero si la fermentación se prolonga demasiado tiempo, se vuelve una bebida embriagante y posteriormente adquiere un sabor agrio desagradable, debido a la formación de vinagre.

Levaduras del tepache:

Torulopsis incospicua Lodder et Kreger-Van-Rij, Saccharomyces cerevisiae Hansen (Ulloa y Herrera, 1982).

RESULTADOS

Se obtuvieron 5 cepas de levaduras AEP4, AEP6, 18P1, 15P1 y 18P1. Estas levaduras son capaces de hidrolizar el almidón y además sintetizan alfa-amilasa y glucoamilasa. Estas levaduras crecen a 35°C.

Se aislaron de pozol, tuvieron un crecimiento en el medio M₁ almidón-extracto de levadura a 35°C y pH 4.5, como se puede observar en el Cuadro 2. Se encontró que la relación (Diámetro del halo/diámetro de la colonia) es mayor para Schwanniomyces alluvius 2.2 que para las levaduras aisladas, en donde encontramos la máxima relación en la levadura AEP6 con una relación de 1.8. Los mínimos se obtuvieron en las levaduras AEP4, 15P1, 18P1 y 18P4 (Cuadro 3).

También hay que constatar que se trató de aislar levaduras amilolíticas termotolerantes de estiércol, suelo, hojas, ríos, pulque, tepache, no obteniéndose ningún resultado.

En el Cuadro 4 podemos ver que el óptimo crecimiento de S. alluvius se da a 27°C, mientras que las levaduras aisladas (15P1, 18P1, 18P4, AEP6 y AEP4) tienen su máximo crecimiento a 35°C.

Las características coloniales y microscópicas (Figura 5 y 6) se presentan en el Cuadro 6. Por medio de las características morfológicas (Cuadro 7) y fisiológicas (Cuadro 8) pudimos constatar que las cepas aisladas corresponden a la especie Candida fabianii.

En la Figura 1 se presentan los azúcares totales, y se puede observar que Schwanniomyces alluvius tiene a las 24 horas la concentración más baja de azúcares totales de 2.28 mg/ml. Sin embargo, a las nueve horas ARP6 y 18P4 tienen una concentración de azúcares totales de 2.9 y 2.93 respectivamente. A partir de las nueve horas se estabiliza la concentración de azúcares totales.

Las levaduras que degradaron en mayor cantidad el almidón fueron ARP4, ARP6 y Schwanniomyces alluvius. Empero, en la Figura 2, podemos ver que ARP4 empieza a degradar el almidón a partir de las 3 horas, mientras que S. alluvius lo empieza a hacer desde las 6 horas y ARP6 los hace a partir de las 9 horas. Se observó una degradación del 40% del almidón suministrado con estas levaduras y un mínimo de 30% en la cepa 15P1.

En la cinética de crecimiento, se observó que el máximo crecimiento se obtuvo con la cepa 18P1 cuya biomasa llegó a 5.2 g/l y la más baja se logró con S. alluvius con una biomasa de 2.8 g/l.

Con las cepas 15P1, 18P4, ARP4 y ARP6 se obtuvo una biomasa de 4.8, 4.0, 3.7 y 3.2 respectivamente.

En la Figura 3 está representada en UK la concentración celular y en el Cuadro 4 está representado el crecimiento en g/l.

La producción de alfa-amilasa por S. alluvius fue de 266 U/ml y una actividad específica de 532, en tanto que ARP6 produce 54 U/ml y una actividad específica de 79.4.

El último es 5 veces menor que el de S. alluvius. Además, AEP6 tiene 10.95 U/ml que es la mayor concentración de U/ml de Glucoamilasa de las levaduras aisladas, así como de la actividad específica que fué de 79.935. Sin embargo, S. alluvius no produce la misma cantidad de U/ml de Glucoamilasa comparado con las levaduras aisladas, representando 5 veces más la producción de Glucoamilasa en las cepas aisladas que en S. alluvius.

Se presenta un máximo en la producción de proteína en todas las levaduras a las 12 horas, obteniéndose la máxima producción en AEP6 de 0.68 mg/ml de proteína en el sobrenadante y la mínima producción con las cepas 18P4 y AEP4 con una concentración de 0.23 mg/ml. Además la cepa 18P1, S. alluvius y 15P1 tuvieron una concentración, a las 12 horas, de 0.6, 0.53 y 0.45 respectivamente (Figura 4).

Cuadro 2.- En esta tabla observamos el crecimiento de las 5 cepas aisladas del pozol en medio mineral-extracto de levadura-almidón y su actividad amilolítica en este medio. La temperatura fuè de 35°C y pH 4.5.

CRECIMIENTO EN ALMIDON.

No. de cepa	Crec. con almidón	Actividad amilasa
AEP4	•	•
ARP6	•	•
18P1	•	•
18P4	•	•
15P1	•	•

Cuadro 3.- En este cuadro podemos constatar que la relación entre los halos y el tamaño de las colonias fué de 1.5-1.8, mientras que en Schwanniomyces alluvius la relación entre el halo y el tamaño de la colonia fué de 2.2.

RELACION HALO/COLONIA.		
Levadura	Temperatura	Relación halo/colonia
<u>S. alluvius</u>	27	2.2
AEP6	35	1.8
AEP4	35	1.6
15P1	35	1.5
18P1	35	1.5
18P4	35	1.5

Cuadro 4.- El crecimiento para las levaduras aisladas que nos dió mejor resultado fué a 35°C mientras que para Schwanniomyces alluvius la temperatura más óptima fué a 27°C.

CRECIMIENTO EN ALMIDON.

Levadura	Temperatura (°C)	Crecimiento
<u>S. alluvius</u>	27	****
	35	***
	40	**
AEP4	27	***
	35	****
	40	***
AEP6	27	***
	35	****
	40	***
18P1	27	***
	35	****
	40	***
18P4	27	***
	35	****
	40	***
15P1	27	***
	35	****
	40	***

Cuadro 9.- Cantidad de precipitación.

	ASP4	1EP4	1EP1	15P1	<u>S. alluvius</u>	ASP5	Finca
g/l	UK	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	metros
.002	42	.12E	.032	.02	.02	.00E	0
.2	125	--	.041	.064	.066	.00E	3
.6	300	.6	.123	.8	.296	.2	6
.8	500	1.36	2.60	1.6	.416	.40E	9
.9	600	2.4	4.0	3.2	--	.73E	12
2.0	1750	3.0	4.0	--	1.04	.96	15
3.0	2250	4.0	—	4.8	1.24	1.2	18
3.2	2000	—	5.2	--	2.4	2.0	21
					2.8	3.2	24

Cuadro 6.- Actividad α -ilicilic..

Levadura	U/ml alfa amilasa	Act. esp. (U/ml/sg de proteina)	U/ml Glucosidasa	Act. esp. (U/ml/mg de proteina)	td	ru (VSC)
<u>S. elluvius</u>	266	532	2.3	13.2	5.58	0.124
ASP4	11.1	55.5	11.9	44.83	5.77	0.12
ASP6	54	79.4	10.95	79.935	4.96	0.142
1BP4	13	65	9.5	22.012	5.54	0.125
15P1	14	31.11	10.0	52.613	4.07	0.17
1BP1	14	23.33	9.04	54.481	3.95	0.18

Cuadro 7. Características coloniales y microscópicas de las cepas aisladas.

HABITAT	ISOLAMIENTO NUMERO	CARACTERISTICAS COLONIALES	MICROSCOPIA
ROZOL	ASP4	Color blanco, superficie rugosa, borde filamentosos.	Pseudomicelio, forma ovalada con generación multipolar.
	ASP5	Color blanco, superficie rugosa, borde filamentosos.	Pseudomicelio, forma ovalada con generación multipolar.
	IRP1	Color blanco, superficie rugosa, borde filamentosos.	Pseudomicelio, forma ovalada con generación multipolar.
	IBP4	Color blanco, superficie rugosa, borde filamentosos.	Pseudomicelio, forma ovalada con generación multipolar.
	15 F1	Color blanco, superficie rugosa, borde filamentosos.	Pseudomicelio, forma ovalada con generación multipolar.

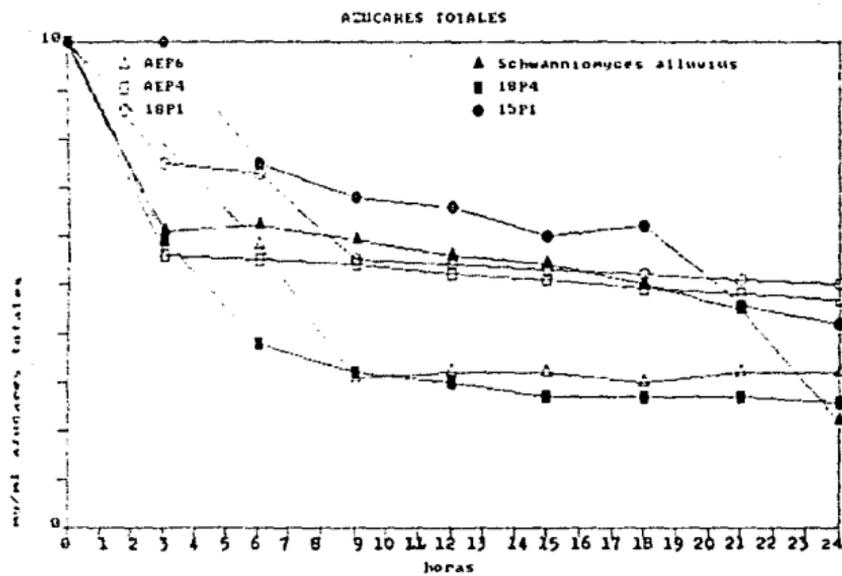


Figura 1. Azúcares totales.

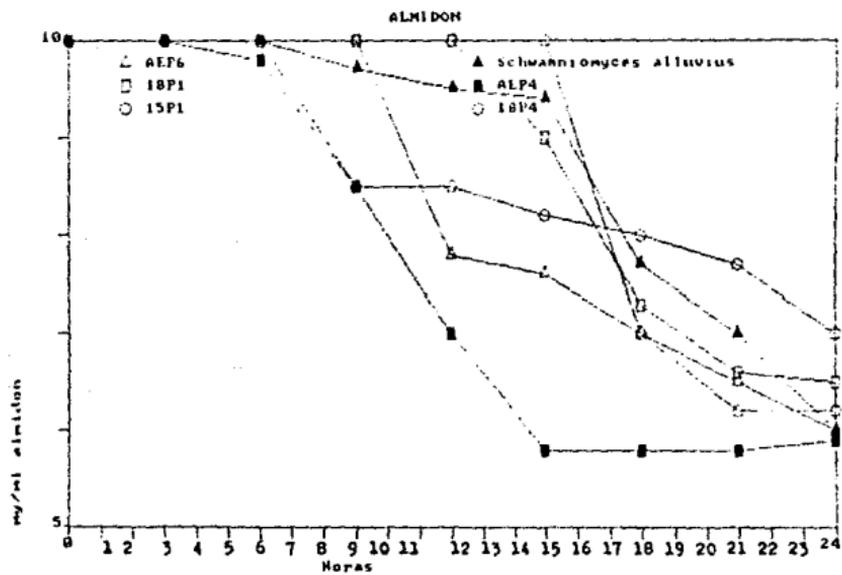


Figura 2. Almidón.

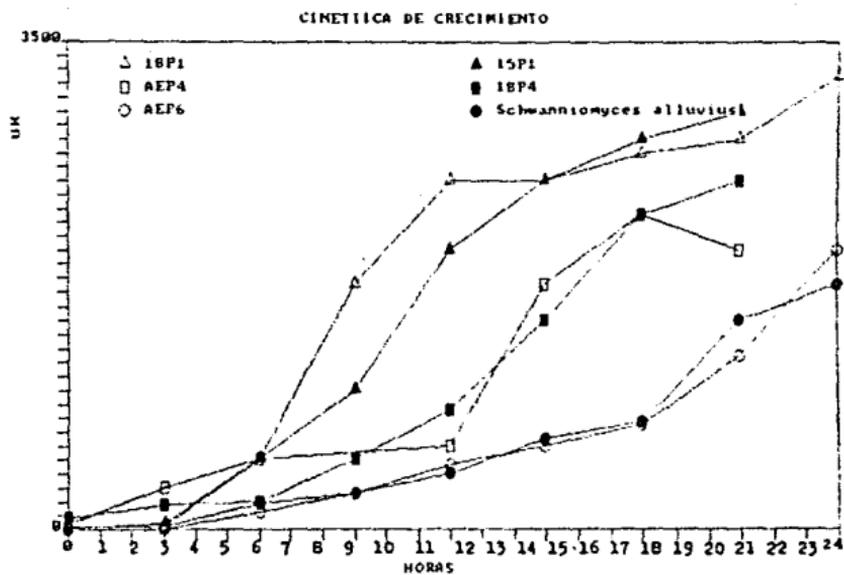


Figura 3. Cinética de crecimiento.

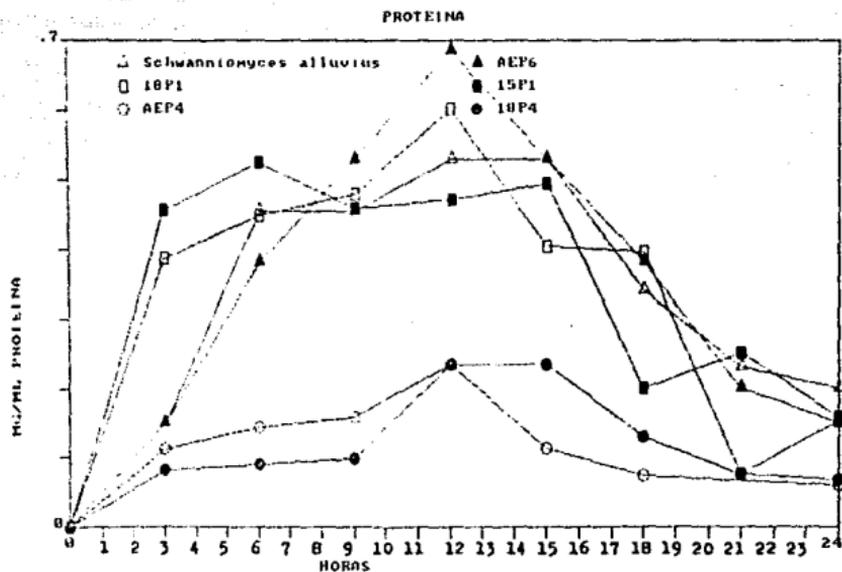


Figura 4. Proteína en el sobrenadante.

Pseudomicelio.

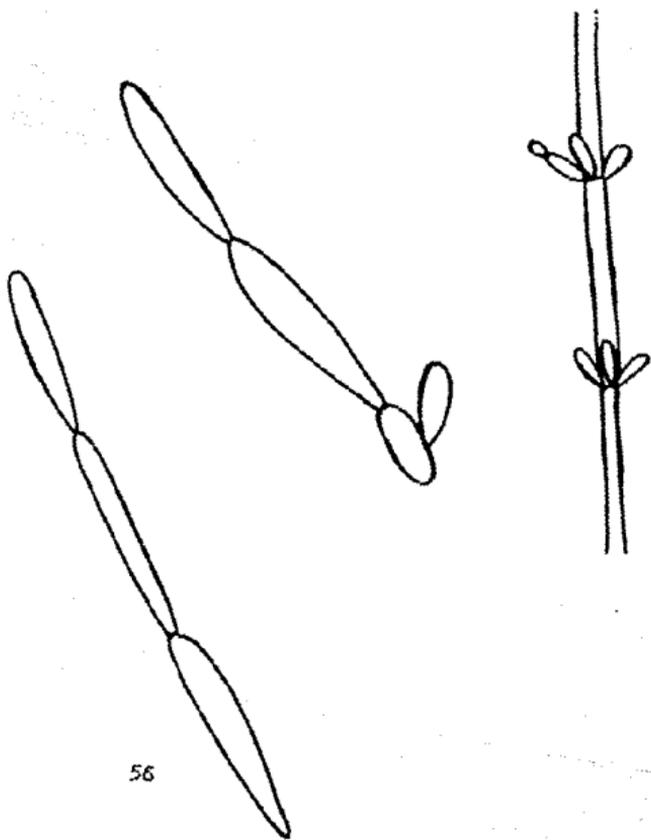
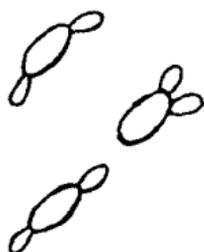


Figure 5.

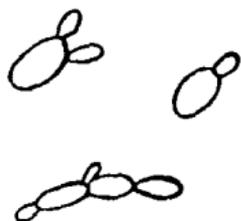
AEP4



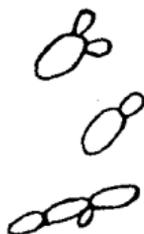
AEP6



18P1



18P4



15P1



Figura 6. Morfología microscópica de las levaduras aisladas.

Cuadro 8.- Características coloniales de las cinco cepas siguientes.

Tamaño	4-6 mm
Forma	Circular
Bordes	Filamentosos
Superficie	Ruqosa
Color	Blanco
Luz reflejada	Mate
Luz transmitida	Opaco
Aspecto	Semihumedas
Elevación	Umbilicada
Consistencia	Suave

Temperatura 35°C

pH 4.5

Cuadro 9.- Pruebas Bioquímicas.

INDICES	TIPO DE SUSTRATOS
Fermentación	Glucosa + Galactosa - Sacarosa + Maltosa +W Lactosa - Rafinosa +W
Asimilación de compuestos de Carbono	Galactosa - Sacarosa + Maltosa + Celobiosa + Trehalosa + Lactosa - L-Sorbosa - Inulina - DL-ac. lac. + Rafinosa + Almidón soluble + D-Xilosa + L-Arabinosa - D-Ribosa - L-Ramnosa - Melibiosa -

Continuación del cuadro 9.- Pruebas bioquímicas.

INDICES	TIPO DE SUSTRATO
Asimilación de compuestos de Carbono	D-Arabinosa - alfa-metil-D-glucosida + Eritritol - Ribitol - D-Manitol + Ac. Succ. + Ac. Cit. + Inositol - Melizitosa + Salicina +
Asimilación de Nitrato: + Crecimiento en medio libre de vitaminas: - Crecimiento en NaCl 10% más 5% de glucosa en base Nitrogenada de levaduras: + Crecimiento a 37°C: +	

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

La capacidad de degradar el almidón no está muy distribuido entre las levaduras. La mayoría de ellas son capaces solamente de producir una de las enzimas que degradan el almidón. Por ejemplo, Saccharomyces cerevisiae es capaz de producir solamente glucoamilasa. Las levaduras que degradan el almidón se han estudiado como microorganismos para la conversión de materiales que contienen almidón a proteína unicelular o etanol (Laluce et al, 1988).

Laluce et al (1988) aislaron a partir de muestras colectadas de fabricas de harina de yuca y del suelo que se encuentra alrededor de las fabricas, que está frecuentemente expuesto a los desechos ricos en almidón, cepas de Saccharomyces cerevisiae. Estas cepas tenían tasa de fermentación del almidón y la dextrina, un 5% más rápida que Schwanniomyces alluvius. Ello se puede deber a una menor producción de glucoamilasa con respecto a S. cerevisiae. Con respecto a nuestro trabajo, Schwanniomyces alluvius produjo una menor cantidad de U/ml de glucoamilasa, lo que podría ser una ventaja tanto para el aprovechamiento del almidón como lo mencionan Laluce et al (1988) como para la producción de esta enzima para fines industriales.

Ogden y Tubb (1985) presentan datos donde proponen el potencial de S. cerevisiae en la producción de biomasa de levadura u otros

productos asociados al crecimiento de desperdicios que contienen almidón. Las cepas de S. cerevisiae con habilidad para utilizar el almidón pueden tener un amplio rango de aplicaciones en la industria. En cuanto a la cepa AEP6 fué la que presentó mayor capacidad para degradar el almidón, así como una mayor producción de glucoamilasa, utilización de azúcares totales, producción de proteína. Esta cepa tiene una gran posibilidad de utilizarse en otros procesos.

Ogden y Tubb (1985) demostraron que Saccharomyces cerevisiae utiliza el 62% del almidón y Lipomyces utiliza el 92%. Nosotros obtuvimos un 40% de utilización del almidón a 35°C y pH 4.5.

En las cepas aisladas se obtuvo 5 veces más U/ml de glucoamilasa que la producida por Schwanniomyces alluvius. Un dato muy parecido lo obtuvo Laluece et al (1988) con Saccharomyces cerevisiae, que produjo 5 veces más enzimas amilolíticas que S. alluvius. Pero Saccharomyces cerevisiae produce solamente glucoamilasa mientras que nuestras levaduras producen además alfa amilasa.

Se han aislado levaduras entéricas termofílicas, que crecen a 37°C o a más (Travassos y Cury, 1971), así como levaduras termofílicas que asimilan el metanol (Kiyoshi et al, 1978), aisladas de suelos tropicales en el sudeste de Asia.

En este trabajo, se aislaron levaduras capaces de degradar el almidón a 35°C y a pH 4.5, lo que les confiere un gran atractivo, porque al crecer a alta temperatura existe la posibilidad de una mayor transferencia de calor y de oxígeno en un fermentador.

Wilson e Ingledew (1982) reportaron la actividad enzimática de

alfa amilasa en S. alluvius de 187 U/ml con una actividad específica de 4 785 U/ml de proteína, mientras que nosotros encontramos un valor de la actividad de 266 U/ml y una actividad específica de 532. En cuanto a la actividad de la glucoamilasa, Wilson e Ingledew reportaron 5.4 U/ml y una actividad específica de 138, muy semejante a la actividad específica obtenida por nosotros en S. alluvius, que fué de 132.25 y con una actividad enzimática de 5.4 U/ml.

Las levaduras aisladas en este trabajo presentaron una actividad enzimática menor que S. alluvius con respecto a la alfa amilasa. Sin embargo, la actividad de la glucoamilasa fué hasta 5 veces mayor que en S. alluvius, y la actividad específica alcanzó una proporción igual.

La capacidad de la Candida aislada de crecer a 35°C, degradar el almidón y crecer a pH 4.5, permiten pensar que esta levadura podría utilizarse en el futuro a nivel industrial.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abouzied, M. M. and C. A. Reddy. 1987. Fermentation of starch to ethanol by a complementary mixture of an amylolytic yeast and Saccharomyces cerevisiae. Biotechnol. Lett. 9(1):59-62.

- 2.- Atlas, R. M. and B. Bartha. 1981. Microbial Ecology. Addison Wesley, London.

- 3.- Calleja, G. B., M. Yaguchi, S. Levy-Rick, J. R. H. Seguin, C. Roy and C. V. Lusena. 1986. Single-cell protein production from potato starch by the yeast Schwanniomyces alluvius. J. Ferment. Technol. 64(1):71-75.

- 4.- Casas-Campillo C. y S. Larrea. 1971. Obtención de proteína de origen unicelular utilizando hidrocarburos de petróleo. Rev. Inst. Mex. Petróleo, México. 3(1):58-71.

- 5.- Collins, C. H. 1967. Microbiological Methods. Butterworths, London.

- 6.- Dubois, C. A. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. An. Chem. 28(3):350-356.

7.- Dhanwant, K. S., S. V. Kamaljit and K. S. Sanjeev. 1987. Production of α -amylase by Saccharomycopsis fibuligera (Syn. Endomycopsis fibuligera). J. Ferment. Technol. 65(4):387-394.

8.- Keith, O. and R. S. Tubb. 1985. A strain of Saccharomyces cerevisiae which grows efficiently on starch. Enz. Microb. Technol. 7:135-137.

9.- Kiyoshi, M., M. Yamamura, Sh. Shimizu, K. Ogawa y N. Sekine. 1978. Screening method for thermophilic and high growth rate methanol yeasts. J. Gen. Appl. Microbiol. 24:155-164.

10.- Kreger-Van Rij. 1984. The yeasts a taxonomic study. Elsevier Science Publisher. B. V., Amsterdam.

11.- Laluce, C., M. Bertolini, J. R. Ernandes, A. V. Martini and A. Martini. 1988. New amylolytic yeast strains for starch and dextrin fermentation. Appl. Env. Microbiol. 54(10):2447-2451.

12.- Lehninger, A. L. 1985. Bioquímica. Omega, Barcelona.

13.- Majunath, P., B. C. Shenoy and M. R. Raghavendra. 1983. Fungal glucoamylases. J. Appl. Biochem. 5:235-260.

14.- Malfait, M. H., G. Moulin and P. Galzy. 1986. Ethanol inhibition of growth, fermentation and starch hydrolysis in Schwanniomyces castellii. J. Ferment. Technol. 64(4):279-284.

- 15.- Martín, P. M. R. 1987. Evaluación nutricional y sensorial de un alimento fermentado a base de maíz. Tesis para obtener el título de QPB. CINVESTAV, México.
- 16.- Martínez, C. J. 1986. Segundo curso internacional de lópicos sobre taxonomía y genética de las levaduras y su aplicación en Biotecnología. CINVESTAV, IPN. México.
- 17.- Meyer, K. H. 1951. The present status of starch degradation and synthesis. Adv. Enzymol. 12:379-428.
- 18.- Nadahara, H., Y. Koyama, T. Yoshida, S. Pighiang Kura, R. Ueda and H. Taguchi. 1982. Growth and enzyme production in a solid-state culture of Aspergillus oryzae. J. Ferment. Technol. 60(40):311-319.
- 19.- Pasari, A. B., A. R. Korus and C. R. Heimsch. 1988. Kinetics of the amylase system of Schwanniomyces castelii. Enzyme Microbiol. Technol. 10:156-160.
- 20.- Quintero, R. R. y A. López. 1987. Tecnología enzimática. Aplicaciones en alimentos y medicina. UNAM, México.
- 21.- Spencer-Martins, I. and N. Van Uden. 1977. Yields of yeasts growth on starch. Eur. J. Appl. Microbiol. 4:29-35.

22.- Stewart, G. C. 1974. Some thoughts on the microbiological aspects of brewing and other industries utilizing yeast. Appl. Microbiol. 17:233-264.

23.- Takuo, S., K. Koo, S. Kiyoshi and T. Katsuragi. 1986. Use of protoplast fusion for the development of rapid-fermenting strains of Saccharomyces diastaticus. Agric. Biol. Chem. 50(2):297-306.

24.- Travassos, L. R. G. and A. Cury. Termophilic enteric yeasts. Ann. Rev. Microbiol. 24(4):49-74.

25.- Ulloa, M. y T. Herrera. 1982. Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesquino, pulque y topache. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Auton. Méx. 47:145-163.

26.- Wilson, J. F. and W. M. Ingledew. 1982. Isolation and characterization of Schwanniomyces alluvius amylolytic enzymes. Appl. Env. Microbiol. 44(2):302-307.

27.- Winfield, B. A. 1977. Determination of starch in refuse and compost. Compost Science. 14(3):1978.

28.- Wilson, J. J., G. G. Khachatourians and W. M. Ingledew. 1982. Schwanniomyces alluvius: SCP and ethanol from starch. Biotechnol. Letters. 4(5):333-338.

29.- Young, J. Y. 1987. Comparison of alfa amylase activities from different assay methods. Biotechnol. Bioeng. 30:147-151.