



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

"PRODUCCION DE AMILASA POR MICROORGANISMOS SELECCIONADOS A PARTIR DE ESTIERCOL DE BOVINO"

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
p r e s e n t a :

María Angela Ruiz Navarrete Muñoz



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.

TESIS 1979
ADG M.T. 372
PRONA 314
PRSC



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Prof. Alfredo Echegaray Alemán
VOCAL	Prof. Jorge Soto Soria
SECRETARIO	Prof. Pablo Pérez Gavilán E.
1er. SUPLENTE	Prof. Lilia Vierna de García
2do. SUPLENTE	Prof. Beatriz Luna Millán

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Departamento de Biotecnología.

SUSTENTANTE: María Angela Ruiz Navarrete Muñoz

ASESOR DEL TEMA: M. en C. Pablo Pérez Gavilán Es
calante

Con inmenso amor a mis padres

A Javier

A mis amigos

Agradezco al M. en C. Pablo Pérez Gavilán E. su -
Asesoría en la realización del presente trabajo

CONTENIDO

INTRODUCCION.

GENERALIDADES.

- A) Estructura del almidón.
- B) Hidrólisis enzimática del almidón.
- C) Las amilasas.
 - 1.- Alfa-amilasas.
 - 2.- Beta-amilasas.
- D) Las amilasas de vegetales y animales.
- E) Microorganismos amilolíticos.

METODOS Y MATERIALES.

- A) Método de selección.
- B) Diseño del medio de cultivo.
 - 1.- Fuente de carbono.
 - 2.- Fuente de nitrógeno.
 - 3.- Minerales.
 - 4.- Estiércol.
- C) Esquema del procedimiento general.
- D) Medición de la actividad amilolítica.
 - 1.- Soluciones.
 - 2.- Procedimiento.
 - 3.- Determinación de reductores.
- E) Influencia de la concentración de estiércol.

- F) Influencia de la temperatura y la agitación.
- G) Influencia de la relación C/N en el medio.
- H) Medición del nitrógeno protéico, durante la -
fermentación.

1.- Digestión.

2.- Determinación de NH_3 .

- I) Determinación de Nitrógeno total.
- J) Determinación de Nitrógeno soluble.
- K) Preparación de silos experimentales.
- L) Caracterización de los microorganismos.

1.- Cuenta de microorganismos.

2.- Aislamiento e identificación.

3.- Pruebas Bioquímicas.

RESULTADOS.

- A) Influencia de la concentración de estiércol.
- B) Influencia de la agitación y la temperatura.
- C) Influencia de la relación Carbono/nitrógeno -
en el medio de cultivo.
- D) Influencia del ajuste del pH.
- E) Distribución del nitrógeno protéico durante -
la fermentación estiércol/almidón.
- F) Degradación del almidón por los microorganismos
amilolíticos en el silo.

G) Cuenta de colonias.

H) Aislamiento e identificación.

DISCUSION.

APENDICE I.

APENDICE II.

BIBLIOGRAFIA.

INDICE DE FIGURAS.

INDICE DE CUADROS.

INTRODUCCION.

La estabilidad de las ecologías microbianas complejas como es el caso del estiércol de bovino, han sido poco estudiadas, así como la influencia en la estabilidad de dichas ecologías en función de las condiciones físicas y químicas a las que son expuestas.

El estudio de la microbiología del estiércol, ha llevado a utilizar este producto en la selección espontánea de floras microbianas mixtas a través del establecimiento de condiciones dadas de sustratos, temperaturas y pH para seleccionar aquellas que sirvan a los intereses que con ellas se persiguen.

En el caso que nos ocupa, se intentó seleccionar la flora capaz de digerir almidones en condiciones favorables para su escalamiento industrial, para poder ser utilizadas en la predigestión de los cereales, -- pretendiendo con esto mejorar su utilización por los rumiantes y los monogástricos.

La predigestión posee ventajas adicionales que a priori podrían deducirse, siendo las dos principales, la síntesis de vitaminas que serían de beneficio para la alimentación de los monogástricos y la síntesis de proteína microbiana a partir de nitrógeno no protéico.

En este trabajo se pretenden encontrar las condiciones en los cuales se pueden seleccionar microorga-

GENERALIDADES.

A) Estructura del almidón.

El almidón es una sustancia de reserva de las plantas, muy abundante en las semillas (cereales) y bulbos, donde se presenta en forma de granos. Es un polisacárido formado por D-glucosa que se presenta en dos formas la amilosa y la amilopectina. La amilosa consiste de cadenas largas no ramificadas, en las cuales, todas las unidades de D-glucosa están unidas por enlaces Alfa - (1 → 4). Las cadenas están polidispersas y varían en peso molecular. La amilosa no es soluble en agua, forma micelas hidratadas que dan un color azul con el yodo; en estas micelas el polisacárido está doblado en forma helicoidal. La amilopectina está muy ramificada. Las ramificaciones se presentan en promedio cada 12 residuos de glucosa. El enlace del esqueleto glicosídico es Alfa (1 → 4) pero en los puntos de ramificación hay enlaces Alfa (1 → 6). La amilopectina también produce soluciones coloidales o micelares que dan coloración violeta-rojizo con el yodo. Su peso molecular puede llegar a un millón. (Lenhinger, 1972).

B) Hidrólisis enzimática del almidón.

Para la hidrólisis del almidón se han utilizado-

gran variedad de métodos, como el tratamiento térmico a presión, la hidrólisis con ácidos o alcalis, o bien combinaciones de estos métodos.

Aunque los ácidos son catalizadores mas baratos- que las enzimas, por medio de la hidrólisis ácida se obtiene un producto contaminado con almidón insoluble residual que disminuye el rendimiento, así como sub- productos de inversión que poseen uniones glicosídi- cas distintas a las del almidón. La conversión del - almidón a azúcares simples se puede efectuar en dos - pasos, utilizando primero un tratamiento químico o fí sico, seguido por un tratamiento enzimático. Los sub productos de inversión obtenidos por el tratamiento á cido son resistentes al ataque por sistemas enzimáti- cos sacarificantes que se usan en el 2° paso de la -- conversión en azúcares simples.

La licuefacción enzimática y sacarificación del- almidón se utiliza en la producción industrial de glu cosa, en la obtención de maltosa, los jarabes de este disacárido tienen aplicación en el endurecimiento de- dulces, prefiriéndose a los de glucosa por su menor - tendencia a cristalizar y a que no son higroscópicos. En la industria cervecera, los materiales amiláceos,- usados como aditivos, deben licuarse primero añadien-

do amilasas termoestables. Las amilasas son usadas - también para desaderezar textiles, eliminando el almidon, así como en la clarificación de jugos de fruta- en la manufactura de gelatina y jarabes de chocolate. (Fogarty, 1971).

Se han obtenido jarabes con altos contenidos de- maltosa industrialmente sacarificando el almidon gela- tinizado con enzimas de malta, obteniéndose maltosa - como sacárido mas abundante. Las enzimas adecuadas- para este proceso se habían limitado a las enzimas de la malta. El uso de enzimas bacterianas tiene la ventaja de que evita la utilización de las enzimas de -- malta, que son empleadas ampliamente en la industria- cervecera, además de no requerir de un suelo agrícola. Otra ventaja mas, es el corto tiempo de generación de los microorganismos en contraste al tiempo de producción de cereales, lo cual hace que los microorganismos sean mas adecuados para el estudio de cepas que - produzcan mayor cantidad de enzima.

Existen ejemplos de la utilización de enzimas microbianas a nivel industrial. En uno de ellos (U.S.- P.O. 3,549,496, 1070) la hidrólisis se realizan en dos pasos: Primero se hidroliza parcialmente el almidon - gelatinizando por tratamiento dado o enzimático y posos

teriormente se realiza la conversión enzimática con un filtrado de cultivo de Bacillus polymyxa, que se usa como fuente de enzima, a temperatura de 40-60°C, - pH 5.8-7.0, por 24-48 hrs, obteniéndose un producto con alto contenido en maltosa.

Otro procedimiento (U.S.P.O. 3,551,293,1970) --- consta también de dos fases: en la primera se prepara una mezcla de almidón, Alfa-amilasa y agua hasta obtener una dispersión uniforme, ajustando el pH a 6.2-7.0 en presencia de Ca^{++} y esta mezcla en forma de flujo, se pasa a una zona pastificante donde existe una temperatura de 96-110°C a la que el almidón se pastifica e hidroliza con la enzima, durante 15 segundos en este paso se pierde enzima por desnaturalización. Posteriormente se enfría hasta 75-85°C, temperatura a la cual la enzima debe ser termoestable y el flujo es llevado a una zona de hidrólisis, en donde se añade más enzima, se ajusta al pH óptimo y se mantiene la temperatura a la que la enzima es termoestable con el fin de hidrolizar y licuar el almidón.

C) Las amilasas.

El término amilasa se utiliza para designar las enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces glico-

sídicos Alfa ($1 \rightarrow 4$) de polisacáridos tales como almidón y glucógeno o sus productos de degradación. -- Las amilasas, se han dividido en grupos, de acuerdo a su mecanismo de reacción. Se distingue entre endoamilasas y exoamilasas. (Fisher, 1960).

Las endoamilasas actúan desordenadamente en las uniones Alfa ($1 \rightarrow 4$), no atacan los puntos de ramificación Alfa ($1 \rightarrow 6$). Esta acción hace que haya una disminución rápida de la viscosidad y del peso molecular promedio del sustrato. Como productos iniciales, se obtienen oligosacáridos que se rompen posteriormente para producir maltosa, algo de glucosa, isomaltosa y productos con cadena ramificada de bajo peso molecular. Se conoce solo un tipo de endoamilasa, las Alfa-amilasas llamadas originalmente así porque el grupo reductor hemiacetálico liberado por la hidrólisis, está en la configuración óptica Alfa y mutarrotta hacia abajo.

Las exoamilasas son de origen vegetal o microbiano. Atacan los polisacáridos únicamente a partir de los extremos de las cadenas exteriores no reductoras, haciéndolo de manera regular, rompiendo, ya sea cada enlace glicosídico para producir únicamente Alfa-glucosa, o cada enlace alternado para producir maltosa.-

Las primeras enzimas se denominan glucoamilasa o gamma-amilasa y las últimas Beta-amilasas, ya que la maltosa producida se encuentra en la configuración óptica Beta. En ambos casos, la acción se detiene en el primer punto de ramificación, y que no son atacados los enlaces Alfa (1 → 6) y se obtienen dextrinas límite de elevado peso molecular.

1.- Alfa-amilasas.

(Alfa 1,4-glucano 4-glucano hidrolasa.) Número de la Comisión de Enzimas 3.2.1.1.

Las Alfa-amilasas se encuentran en mamíferos, plantas superiores, hongos, bacterias y crustáceos. (Caldwell y Adams, 1950, Fisher y Stein, 1960, Greenwood y Milne, 1968, Marshall, 1974). Las propiedades y la acción detallada de cada Alfa-amilasa, dependen de la fuente de enzima. Se han obtenido Alfa-amilasas muy purificadas o cristalinas a partir de páncreas porcino, páncreas y saliva humana, páncreas de rata, cebada malteada, sorgo malteado, trigo malteado, soya y de varios microorganismos entre los cuales están Aspergillus oryzae, Pseudomonas sacharophila, Bacillus subtilis, Bacillus coagulans y Bacillus stearothermophilus. (Greenwood y Milne, 1968).

La purificación de las Alfa-amilasas se ha reali

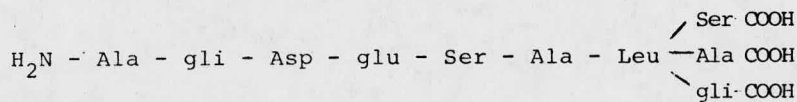
zado por varios métodos. En la mayoría de los casos se utilizan los procedimientos comunes de fraccionamiento con solventes y con sales. Otros métodos consisten en la absorción de la enzima sobre almidones o la cromatografía de intercambio iónico. Las recristalizaciones sucesivas dificultan la cristalización, hecho que es atribuido a la pérdida de varios iones divalentes (Ca^{++} , Zn^{++} , Ni^{++}) que producen un aumento en la solubilidad aparente de la enzima. (Fisher y Stein, 1960).

Las Alfa-amilasas constituyen un grupo bastante homogéneo de proteínas con características comunes que las diferencian de otras amilasas. Todas son proteínas débilmente ácidas, solubles en agua, de peso molecular aproximado de 50,000. (Fisher y Stein, 1960) Catalizan la misma reacción química. Difieren entre sí en varios aspectos: solo las enzimas de mamíferos, y tal vez las microbianas requieren cloruros u otros aniones monovalentes para su actividad. Se han reportado diferencias estructurales entre las amilasas por métodos inmunológicos, inyectando animales con la enzima, obteniendo un suero antidiastasa; se ha inoculado Alfa-amilasa de Bacillus subtilis a conejos para detectar las diferencias entre las amilasa producidas --

por distintas variedades del microorganismo. (Yamane - et al, 1973).

Composición de aminoácidos.- La composición química de las amilasas (Fisher y Stein, 1960) de diversas fuentes, varía ampliamente. La enzima de B. subtilis, no tiene grupos - SH. La de A. oryzae es pobre en aminoácidos básicos, es una glicoproteína rica en tirosina y otros hidroxiaminoácidos.

Se han realizado determinaciones de grupo final en la amilasa de A. oryzae. La enzima posee un único residuo de alanina en el grupo amino terminal. Los grupos terminales carboxilo pertenecen a serina, alanina y glicina. Se ha concluido que la Alfa-amilasa de A. oryzae en una molécula con estructura ramificada que se puede representar:



En el sitio activo parecen ser importantes los grupos carboxilo e imidazol en las Alfa-amilasas.

Las amilasas como metaloenzimas.- (Fisher y Stein, 1960).- Las Alfa-amilasas se estabilizan con Ca^{++} . Si se emplea EDTA, o cualquier agente quelante, se pierde la actividad enzimática. Las Alfa-amilasas de-

distinto origen obtenidas en forma pura contienen un - átomo-gramo de Ca por molécula. La pérdida de actividad amilolítica causada por eliminación de Ca^{++} es reversible. Si la enzima carece de calcio, se reduce el rango de pH en que es estable y se produce coagulación rápida al calentar. El Ca^{++} proporciona una arquitectura compacta a la enzima que la hace resistente a las - proteasas, subtilisina, tripsina o quimotripsina.

Propiedades de las Alfa-amilasas.- (Caldwell y Adams,- 1950, Greenwood y Milne, 1968).- Las Alfa-amilasas de plantas superiores, mamíferos, bacterias y hongos son estables en el rango de pH de 5.5 a 8.0. Los valores de pH para la actividad óptima de las enzimas de plantas superiores, bacterianas y fúngicas, está entre 5 y 6. Las Alfa-amilasas de mamíferos y de cangrejo, muestran actividad máxima en presencia de iones cloruro a pH 6.9-7.0. Las Alfa-amilasas de cereales se inacti--van rápidamente a pH 3.6.

La mayoría de las Alfa-amilasas pierden actividad a 50°C. La enzima de B. stearothermophilus es termoes table y mantiene el 70% de su actividad después de incubar 20 hrs. a 85°C. (Greenwood y Milne, 1968).

Los metales pesados como mercurio, plata, cobre y plomo inhiben la Alfa-amilasa. Las Alfa-amilasas de -

plantas superiores son inhibidas también por el molibdato de amonio y el ácido L-ascórbico.

En el Cuadro 1 se muestran las propiedades físicas de la enzima obtenida de diferentes fuentes. La enzima de B. subtilis forma dímeros con el zinc. Se puede obtener el monómero eliminando el Zn^{++} con EDTA. Requerimiento de aniones monovalentes.- (Marshall, --- 1974).- El pH de actividad óptima varía con el ión utilizado como activador. Los aniones monovalentes --- reaccionan en sitios distintos a los que intervienen en la formación del complejo enzima-substrato, ya que, el equilibrio no depende de la concentración de aniones. Los iones Cl^{-} disminuyen la solubilidad de las Alfa-amilasas y las estabilizan con respecto a la temperatura.

2.- Beta-amilasas.

(Alfa-1,4 glucano, malto-hidrolasa). Número de la Comisión de Enzimas 3.2.1.2. (French, 1960).

Las Beta-amilasas atacan enlaces glucosídicos alternos en las cadenas de almidón, comenzando por el extremo no reductor y continuando hasta que toda la cadena se convierte en maltosa, o hasta que la acción enzimática se detiene por irregularidades físicas o químicas en la cadena de almidón. Las cadenas de número im

PROPIEDADES FISICAS DE LAS ALFA AMILASAS
(Greenwood y Milne, 1968)

	Coefficiente de sedimentación S20 (x 10 ¹³)	Coefficiente de difusión D20 (x 10 ⁷)	Volumen parcial específico Vobs	Volumen parcial específico teórico V. calc.	Peso molecular
Pancreas porcino	4.5	8.1	0.7	-	45,000
Saliva humana	4.3	6.1	-	0.75	69,000
Saliva humana	4.6	7.1	-	0.72	55,200
Saliva humana	4.5	7.0	-	-	-
<u>Bacillus subtilis</u>					
monómero	4.3	7.4	-	-	-
monómero	4.6	8.0	-	0.72	48,200
monómero	-	-	-	-	48,200
dímero	6.5	5.7	0.72	-	96,900
dímero	-	-	-	-	97,600
<u>Bacillus stearothermophilus</u>	0.76	3.9	0.69	0.71	15,600
<u>Aspergillus oryzae</u>	4.7	7.4	0.70	0.72	51,000
<u>Pseudomonas saccharophila</u>	4.7	-	-	-	-
Cangrejo	1.3	-	-	-	-
Avena, arroz, trigo	-	-	-	-	45,000
Cebada germinada	-	-	-	-	45,000
Sorgo germinado	4.3	7.0	0.68	-	48,000
Trigo germinado	-	-	-	-	45,000
Trigo germinado soya	-	-	-	-	45,000

par producen un residuo de maltotriosa que es posteriormente convertido en maltosa y glucosa. La maltosa producida en muy grandes cantidades produce inhibición de la enzima.

Las Beta-amilasas tienen importancia en las industrias cervecera, vinatera y de la panificación donde el almidón se convierte en azúcar fermentable. Participan en la movilización de reservas amiláceas durante la germinación de las semillas.

Fuentes de obtención.- Las Beta-amilasas se encuentran en vegetales superiores casi exclusivamente; están presentes en la malta de cebada, cebada no germinada, trigo, centeno, soya y camote. Se han cristalizado las enzimas de camote, cebada, trigo y soya. En todos los casos parecen ser proteínas simples que no requieren de cofactores, metales o grupos activos no protéicos.

Durante la germinación se incrementa el nivel de las Beta-amilasas de trigo y centeno, liberándose simultáneamente Alfa-amilasa.

Las enzimas de cereales tienden a contaminarse con trazas de una impureza similar a la Alfa-amilasa, por su endo-acción (enzima Z). Siempre se debe efectuar una prueba para observar si existe esta carbohidrasa. (Marshall, 1974).

Las propiedades de las Beta-amilasas de distintas fuentes se muestran en el Cuadro 2. Se observa que -- son esencialmente idénticas. La actividad se destru-- ye por reactivos que contienen cobre y mercurio de lo-- que se concluye que en el sitio activo están presentes-- grupos -SH.

Las enzimas son relativamente estables el ácido, -- propiedad que se utiliza para eliminar contaminantes -- de Alfa-amilasa.

Las propiedades físicas de las Beta-amilasas se -- muestran en el Cuadro 3.

D) Las amilasas de vegetales y de animales.

Acción de la Alfa-amilasa de la malta.-

Esta enzima se prepara calentando extractos de -- malta a una temperatura a la que se inactiva la Beta-a-- milasa. La temperatura es diferente para todos los ex-- tractos de malta; se usa el calentamiento a 70°C, 15 -- minutos. (Myrbach, 1948).

La acción de la Alfa-amilasa de la malta, sobre -- diferentes almidones, amilosa, Beta-dextrina y glucóge-- no se puede comprender si suponemos que la enzima tie-- ne gran afinidad por las cadenas cortas. La curva de -- hidrólisis del almidón es bifásica, la primera fase --

CUADRO 2

PROPIEDADES DE LAS α -AMILASAS CRISTALINAS
(French, 1960)

Propiedad	Fuente			
	Trigo	Malta	Camote	Soya
Actividad por mg N	1450	1660	2500	3000
Actividad por mg enzima	198	235	378	--
% N	14.3	14.1	15.1	--
Grupos -SH	+	+	+	+
pH óptimo de actividad	5.3	5.2	4-5	6.0
pH óptimo de estabilidad	4.5-9.2	4.5-8	-	5-8
Energía de activación				
0 - 20°	13,000	16,200	-	-
20 - 40°	9,300	5,530	-	-
Punto isoeléctrico	6.0	6.0	4.77	-
Absorción máxima (m)	280	280	-	-
Inactivación por Cu y Hg	+	+	+	+

CUADRO 3

CONSTANTES FÍSICAS DE LAS α -AMILASAS
(Greenwood y Milne, 1968)

Constantes físicas					
Fuente	Estado ^a	Coefficiente de sedimentación S20 (x 10 ¹³)	Coefficiente de difusión D20 (x 10 ⁷)	Volumen parcial específico Vobs	Peso molecular
Cebada malteada	P	3.4 - 4.8	-	-	20,000-80,000
Cebada malteada	P	4.6,6.2,6.8	-	-	-
Sorgo malteado	P	4.24	-	0.715	55,900
Soya	P	4.67	7.47	0.75	61,700
Camote	C	8.9	5.77	0.749	152,000
Camote	C	-	-	-	50,000
Trigo	P	4.58	6.49,6.51,6.44	0.733	64,200

a P: purificada
C: cristalizado

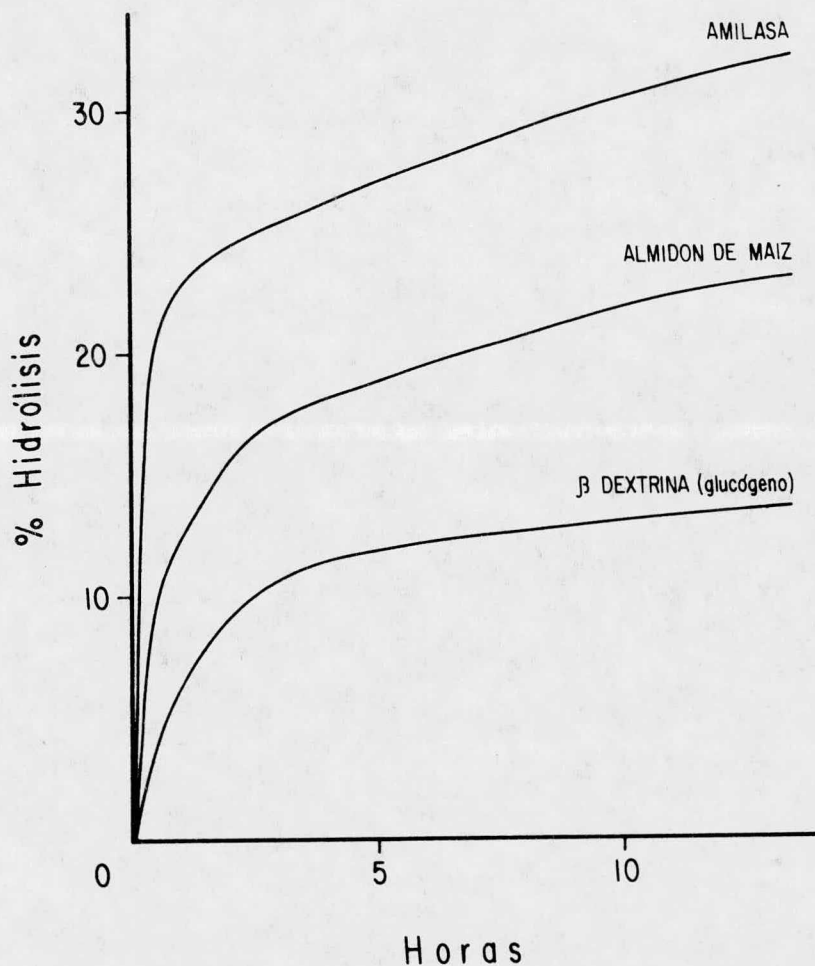
muestra una rápida producción de grupos reductores y - hay disminución de la viscosidad. La mezcla de reacción no se colorea con yodo. Se forman pocos azúcares fermentables. Cuando se rompe el 17% de enlaces glicósidos, se presenta la segunda fase, la de sacarificación en la que se producen azúcares fermentables. (Fig. 1)

Las anomalías en las cadenas (puntos de ramificación) actúan como puntos finales. La acción de la enzima sobre los almidones de papa, maíz y cebada es --- prácticamente la misma. (Fig. 1).

Acción de la amilasa de malta.-

La amilasa de malta es en realidad una mezcla de Alfa y Beta-amilasa. Utilizando esta mezcla de enzimas y diferentes almidones se ha hecho evidente que se producen mezclas de dextrinas límite. Estas dextrinas tienen cadenas de tres a siete unidades de D-glucosa - pero puede haber cadenas de diez a doce unidades. Parece que todas las dextrinas límite aisladas tienen una constitución anormal y que no están formadas sólo - por uniones maltosa. Los enlaces Alfa (1 → 6) producen la formación de dextrinas aunque parece que intervienen en algún grado la presencia de grupos fosfato - en la formación de las dextrinas.

FIG. 1 ACCION DE LA α -AMILASA DE MALTA
(Tomado de Myrbach, 1948)



Acción de la amilasa pancreática y de la amilasa salival.-

El tratamiento del almidón de papa con amilasa -- pancreática, produce sacáridos de alto peso molecular, tetra y trisacáridos así como maltosa. Se obtiene --- gran rendimiento de dextrina límite.

La Alfa-amilasa salival produce maltosa y glucosa por la acción secundaria de la maltasa al igual que la pancreática. Las enzimas animales no producen glucosa.

E) Microorganismos amilolíticos.

Los microorganismos amilolíticos han sido aislados de diversas fuentes: del suelo, del rumen, y del estiércol.

La síntesis de Alfa-amilasa por cultivos de Bacillus subtilis, han sido estudiadas por diversos autores. Coleman y Elliot, 1962, encontraron que Bacillus subtilis requiere para producir amilasa, almidón, maltosa, lactosa o galactosa como fuente de carbono. La fuente de carbono, los iones Fe^{+3} y los iones amonio, estimulan la producción de enzima. La Alfa-amilasa es secretada al medio.

La Alfa-amilasa de B. subtilis, se puede usar industrialmente en la licuefacción y sacarificación enzi

mática del almidón. La recirculación de amilasas en el proceso reduce el costo de producción y facilita el control de la reacción. Linko et al, 1975, lograron la recirculación de la enzima de B. subtilis inmovilizándola en carboximetilcelulosa activada con bromuro de cianógeno. La conversión del almidón se efectuó a temperatura de 60°C a pH 6 en presencia de Cl^- y Ca^{++} . En este proceso se requiere que la enzima no se inactive, por lo cual no se puede utilizar temperaturas elevadas.

Anteriormente se había reportado que las Beta-amilasas sólo existían en plantas superiores. Robyt et al, 1964, reportaron una enzima productora de maltosa, encontrada en un cultivo de Bacillus polymyxa, similar a las Beta-amilasas, pero que no requiere de un extremo no reductor para atacar el substrato, su pH óptimo es 6.8. Higashihara y Okada, 1974, obtuvieron una Beta-amilasa del caldo de cultivo de Bacillus megaterium aislado del suelo, estos autores purificaron la enzima por precipitación con sulfato de amonio y por cromatografía en columna, encontraron un pH óptimo de 6.5 inhibición por reactivos que atacan uniones disulfuro y encontraron que la enzima desprende maltosa del extremo no reductor al igual que la Beta-amilasa vegetal.

Takasaki, 1976, encontró que una bacteria aislada del suelo producía una enzima similar a la Beta-amilasa vegetal y además producía una pululanasa que es una enzima que rompe ramificaciones Alfa (1-6). La bacteria fué identificada como Bacillus cereus var. mycoides. La bacteria crece en polipeptona como fuente de nitrógeno y usa como fuente de carbono para la producción de ambas enzimas almidón, dextrina, maltosa o glucosa. El pH óptimo es de 6-6.5 y la temperatura óptima es cercana a 50°C. Takasaki, en 1976, purificó ambas enzimas por diversas técnicas y encontró que la amilasa libera maltosa en forma Beta, pero que a diferencia de la enzima vegetal tiene un pH óptimo de 7 y un peso molecular menor. La pululanasa, libera maltosa, maltotriosa y maltotetrosa de la Beta dextrina - límite. Ambas enzimas, fueron inhibidas por reactivos que atacan grupos sulfhidrilo.

Usando como fuente de aislamiento estiércol y --- muestras de suelo, Kuo y Hartman, 1966, seleccionaron una cepa de Thermoactinomyces vulgaris por su producción de amilasa termoestable. Estos autores optimizaron un procedimiento para la producción de éstas -- enzimas en un medio con fuente de nitrógeno orgánico y maltosa o almidón como fuente de carbono. El pH ópti-

mo fué de 6.5-7.5. Un hongo que produce dos enzimas - termoestables amilasa y proteasa ha sido reportado por Upton y Fogerty, 1977, el cultivo de Thermomonospora viridis se efectuó en un medio con almidón de maíz y - peptona micológica, con pH inicial de 7. Los mejores - rendimientos se obtuvieron incubando 48 horas cuando - el pH es de 8.2.

Aspergillus oryzae, es un hongo que se ha utiliza do mucho como fuente de amilasas, proteasas y nuclea-- sas. Yabuky et al, 1977, encontraron un sistema de in ducción rápida para la síntesis de Alfa-amilasa por es te organismo. El cultivo se efectuó inicialmente en - condiciones de inanición, posteriormente se indujo la - producción de Alfa-amilasa, usando maltosa como induc- tor óptimo, lográndose velocidades máximas de produc- ción. La enzima de A. oryzae tiene las propiedades de las Alfa-amilasas, produce dextrinización del almidón - y sacarificación de las dextrinas, siendo la velocidad de sacarificación mayor que la de dextrinización.

Se han aislado a partir del rumen varios microor- ganismos amilolíticos. La digestión del almidón en el rumen es esencial para la utilización máxima de gra-- nos alimenticios por el rumiante.

Hungate et al, 1952, encontraron un alto número -

de Streptococcus bovis en ganado de engorda con dietas basadas en cebada. Durante la investigación sobre la digestión del almidón por la oveja, Mac Pherson, 1953, obtuvo varias cepas de Streptococcus bovis. La Alfa-amilasa extracelular, producida por una cepa de S. Bovis, fué descrita por Hobson y Mac Pherson, 1952, quienes estudiaron también la Alfa-amilasa de Clostridium butyricum aislados del rumen bovino.

Bacteroides amylophilus, ha sido descrito como -- bacteria amilolítica por Hamlin y Hungate, 1956. Esta bacteria se aisló del rumen bovino; es bastante específica para el almidón, fermenta únicamente almidón y -- maltosa. Crece en un medio con peptona-extracto de levadura en presencia del carbohidrato fermentable. Los principales productos de fermentación son los ácidos -- acético, fórmico y succínico, CO₂. Produce trazas de etanol y ácido láctico. Utilizando preparaciones crudas de la enzima de B. amylophilus, obtenidas por precipitación con sulfato de amonio, Mc Wethy y Hartman, 1977, encontraron 6 isoenzimas amilolíticas. Una de ellas se purificó y sus propiedades resultaron similares a las de la Alfa-amilasa. La enzima degradó gránulos de maíz en cierto grado y casi no tuvo actividad en gránulos de almidón de papa.

Bacteroides ruminicola es amilolítico también y se presenta en cantidades elevadas en el rumen (Bryant et al, 1958). Estos investigadores describieron también un nuevo género y especie Succinomonas amylolytica, que hidroliza el almidón y se encuentra en números elevados en el rumen cuando se alimenta a los animales con dietas amiláceas; sus productos de fermentación a partir de glucosa fueron ácido succínico, ácido acético y trazas de ácido propiónico.

Algunas cepas de Selenomonas ruminantium var, lactilycas son digestoras del almidón (Bryant, 1956), los productos de fermentación varían de acuerdo a la cepa, pero todas producen ácido acético y ácido propiónico. Hobson y Mann, 1961, aislaron del rumen ovino esta misma bacteria y encontraron cepas que fermentaban el glicerol. Miembros del género Butyrivibrio, han sido reportadas como amilolíticas (Bryant y Small, 1956) y se han aislado del rumen. Clarke, 1959, describe el aislamiento de Lactobacillus bifidus que hidroliza el almidón y produce ácidos acético y láctico a partir de glucosa. Prevost Y Doetch, 1960, aislaron un coco anaerobio estricto que se presenta en cadenas muy largas y que exhibe pleomorfismo, este microorganismo fue identificado como perteneciente al género Peptostrep-

tococcus. Produce a partir de glucosa o almidón, ácido acético, fórmico y láctico.

Del contenido ruminal de ovejas, Elías, 1971, aisló Catenabacterium ruminatium, que produce ácido y gas del almidón y nitritos de nitratos. Produce también H_2S .

También se han aislado del rumen Clostridium lockheadii (Hungate, 1957), que es anaerobio y el anaerobio facultativo Bacillus licheniformis (Appleby, 1955); ambos son amilolíticos pero no se presentan siempre en números elevados.

Microorganismos aislados del estiércol.-

Utilizando un método de tubo rodado para el cultivo de anaerobios, Salanitra et al, 1974, aislaron varios microorganismos del ciego del pollo y entre ellos identificaron miembros del género Peptostreptococcus, Eubacterium y Bacteroides, que son amilolíticos y anaerobios. Aislaron también miembros del género Propionibacterium que no son amilolíticos. Utilizando el mismo método para el cultivo de anaerobios, Salanitra et al, 1974, encontró en un medio que contenía fluido ruminal numerosos anaerobios aislados del ciego del pollo. Estos microorganismos, tienen requerimientos nutricionales similares a los anaerobios ruminales. En-

tre muchos otros microorganismos encontró Bacteroides-fragilis que es amilolítico.

Kenworthy, 1973, en su trabajo sobre flora intestinal del cerdo, encontró que el almidón de papa es metabolizado por microorganismos en el ciego e intestino delgado, particularmente por Clostridium butyricum, que parece ser la fuente principal de amilasa en el contenido fecal del cerdo. Salanitro et al, 1977, compararon varios tipos de medios para el aislamiento de bacterias fecales del cerdo y encontraron que en un medio con fluido ruminal al 40% se pueden recuperar el mayor porcentaje de bacterias. Identificaron tentativamente miembros del género Eubacterium, Clostridium y Propionibacterium, esta población constituye el 90% de las bacterias, el 8% incluye varias especies de anaerobios y E. Coli.

Fermentación del almidón in vitro.-

Los métodos de fermentación in vitro han demostrado que, la población bacteriana del rumen digiere dietas ricas en almidón. Salisbury et al, 1961 y Trei et al, 1970, reportaron que la aplicación de vapor de agua al almidón o a dietas amiláceas produce la hidratación del almidón y aumenta el grado de asimilación de éste por las bacterias del rumen.

Las amilasas pueden atacar directamente gránulos de almidón a velocidad lenta. Walker y Hope, 1963, describen la acción de amilasas de diversas fuentes sobre los granos de almidón. Las Alfa-amilasas salival, pancreática y de B. subtilis, degradaron gránulos de almidón en grados distintos, se encontró que la adsorción de la enzima a los gránulos es desfavorable a la hidrólisis del grano. Las enzimas cristalinas tuvieron la misma capacidad de hidrolizar gránulos de almidón que la fuente de enzima cruda. Las amilasas de A. orizae y de camote no degradaron los gránulos.

Walker y Hope, 1964, examinaron la acción sobre gránulos de almidón, de las Alfa-amilasas extracelulares de Streptococcus bovis y de Clostridium butyricum, aislados del rumen de ovinos, así como de los sistemas intracelulares de amilasa de bacterias mixtas del rumen. Las amilasas purificadas de S. bovis y C. butyricum tienen la misma capacidad de hidrolizar gránulos de maíz que el filtrado del cultivo y su acción es similar a la de la amilasa salival. Las bacterias mixtas del rumen } fueron tomadas de ovejas alimentadas con dietas ricas en granos a las que se habían eliminado los protozoarios. Este cultivo mixto contiene una amilasa que degrada granos de almidón de maíz y de pa

pa. Cuando tomaron bacterias mixtas del rumen de ovejas alimentadas con la misma dieta pero que poseía protozoarios ciliados, la amilasa de los microorganismos, no tuvo efecto sobre los gránulos.

El mecanismo de la fermentación de gránulos de almidón por microorganismos del rumen se ha estudiado -- por varias técnicas. La observación microscópica de -- los microorganismos sobre los gránulos de almidón muestran una influencia in situ sobre la superficie de los gránulos. En animales alimentados con dietas de relaciones concentrado: Forraje variadas en los cuales se reporta que con dietas ricas en almidón aumenta el ácido propiónico. Balch y Rowland, 1957, Moore et al, -- 1962, prepararon un sedimento bacteriano representativo microscópicamente por centrifugación diferencial, -- del fluido ruminal de ovejas alimentadas con maíz y forraje en relación 3:1. El sedimento se cultivó en anaerobiosis en un medio con almidón, urea y sales minerales. Esta cultivo posee propiedades amilolíticas, a pesar de existir entre los distintos tipos de bacterias algunas no amilolíticas. Debido a la simbiosis en el cultivo mixto no se requirió añadir vitaminas. El máximo de fermentación ocurrió al reajustar el pH del medio a pH = 6.8.

Posteriormente, Loper et al, 1966, desarrollaron una técnica para estimar el almidón gravimétricamente. Encontraron que las condiciones para obtener una digestión de maíz satisfactoria in vitro, son: un medio nutritivo con almidón, minerales y nitrógeno no protéico amortiguado a 6.8, en un tiempo de incubación de 24 -- horas..

En los medios de cultivo para estudiar la digestión del almidón, se utiliza comunmente, urea, pero -- los datos reportados por Acord, 1967, indican que la a dición de sulfato de amonio, cloruro de amonio, acetato de amonio y fosfato de amonio produce resultados equivalentes a la urea en la digestión in vitro del almidón por microorganismos ruminales. Sólo algunos ami noácidos tuvieron el mismo efecto que la urea.

MÉTODOS Y MATERIALES.

A) Método de selección.

La selección, se realizó tomando en cuenta que el estiércol contiene microorganismos amilolíticos, junto con una población heterogénea. La hipótesis de selección se fundamenta en que, a partir de esta flora heterogénea, es posible aumentar el número de microorganismos amilolíticos, utilizando como única fuente de carbono el almidón. El método se basa en la fermentación de un medio de cultivo que se describirá posteriormente, por los microorganismos del estiércol y re-
siembra a medio de cultivo nuevo cada tres días, en dos ocasiones.

La razón de realizar un enriquecimiento de este tipo, es que se tienen en mente las limitaciones existentes para llevar los resultados de laboratorio a volúmenes industriales, por lo tanto las condiciones de fermentación, tanto en el control de parámetros físicos, como en la elección de sustratos para el medio de cultivo, se forzaron en el primer caso, hacia los más simples y en el segundo, hacia los más económicos.

B) Diseño del medio de cultivo.

1.- Fuente de Carbono.- Como fuente de carbono y de energía, se usó almidón. Para conocer la cantidad de almidón necesaria para que los microorganismos se pu

dierandesarrollar, se tomó en consideración lo expues
to por S. Aiba, 1973.

- a) Los microorganismos contienen un 50% de carbono.
- b) En anaerobiosis se incorpora un 10% de sustrato carbonado en las células.
- c) Se querían obtener alrededor de 10 g. de cel/lt.

Entonces:

$$10 \text{ g. cel/lt.} \times 1/2 \times 100/50,0 = 10 \text{ g. C}$$

Tomando en cuenta que el almidón está compuesto -- por unidades de glucosa unida por puentes glicosídicos, se consideró un peso de hexosa anhidra ($C_6H_{10}O_5$) de 162 g. de los cuales 72 g. son carbono, es decir:

$$10 \text{ g. C} \times \frac{162 \text{ g. hex.}}{72 \text{ g. C.}} = 22.5 \text{ g. de hexosa} \\ \sim 20 \text{ g de almidón}$$

2.- Fuente de nitrógeno.- Se procuró utilizar una fuente de nitrógeno barata y fácil de adquirir, se utilizó sulfato de amonio, (antes se hizo una prueba con urea, pero no dió resultado). Para calcular la cantidad de -- sulfato de amonio necesaria, se consideró que el 10% -- del peso seco de los microorganismos es nitrógeno.

$$10 \text{ g. de cel.} \text{ ----} 1 \text{ g. de nitrógeno}$$

$$\text{peso molecular del } (NH_4)_2 SO_4 = 132 \text{ g}$$

$$132 \text{ g.} \text{ ----} 28 \text{ g. N}$$

$$X \text{ ----} 1 \text{ g. N} \quad X = 4.7 \text{ g.}$$

$$\sim 5.0 \text{ g. de } (NH_4)_2 SO_4$$

Se agregó al medio inicial 6 g. de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$

3.- Minerales.- Para suministrar los minerales indispensables para los microorganismos se usaron las sa---

les que contiene la saliva artificial (Troelsen, 1969)

En el Cuadro 4, se muestra la composición de la saliva artificial y la composición del medio de cultivo. -

4.- Estiércol.- El estiércol ^{se obtiene} ~~fué~~ obtenido de vacas --- Holstein estabuladas cuya dieta consistía en 3 Kg. de concentrados de cereal y forraje seco. El estiércol -- utilizado ~~fué~~ ^{que se utiliza} sin almacenamiento previo.

CUADRO 4
COMPOSICION DE LA SALIVA ARTIFICIAL
Y DEL MEDIO SELECTIVO

	<u>Saliva artificial</u> *	<u>Medio de selección</u>
Bicarbonato de sodio	19.60 g.	19.60 g.
Fosfato dibásico de potasio trihidratado	14.00 g.	-----
Fosfato monobásico de potasio	-----	14.00 g.
Cloruro de potasio	1.14 g.	1.14 g.
Cloruro de sodio	0.95 g.	0.95 g.
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.24 g.	0.24 g.
Cloruro de calcio	-----	0.24 g.
Urea	1.83 g	-----
Glucosa	1.83 g.	-----
Sulfato de amonio	-----	12 g.*
Almidón	-----	40 g.
Agua destilada	2000 ml.	2000 ml.

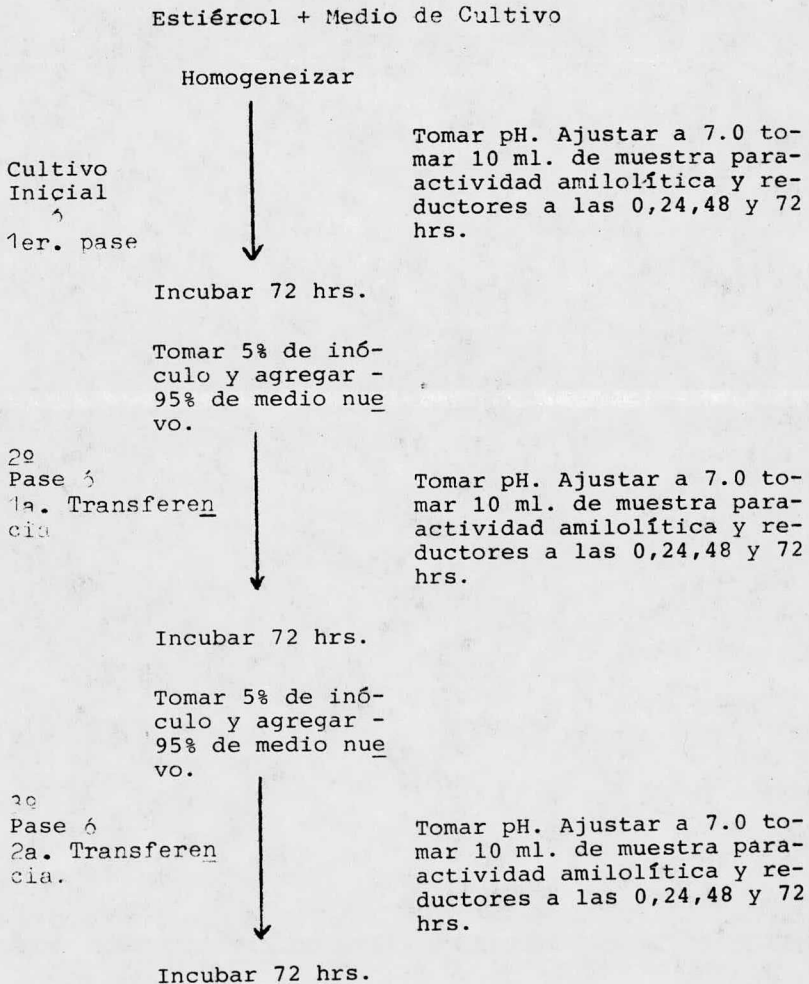
* La cantidad de sulfato de amonio fue variada para ajustar las distintas relaciones de C/N.

Al medio de selección se le agregó CaCl_2 como estabilizador de las amilasas producidas.

* Troelsen, 1969.

C) Esquema del procedimiento general.

Para estudiar la influencia de los diferentes parámetros, se siguió el esquema siguiente:



D) Medición de la actividad amiolítica.

1.- Soluciones.- Amortiguador de fosfatos pH 6.8 - -

Se toman 490 ml. de una solución de KH_2PO_4 0.2 M. Se agregan 510 ml. de una solución de Na_2HPO_4 0.2 M. Se comprueba el pH con el potenciómetro y se ajusta con HCL 1.0 N ó NaOH 1N si es necesario.

2.- Procedimiento (Tietz, 1972).- Solución de almidón

1.2 g./100ml. en agua. Con agitación, se suspenden - -

3.0 g. de almidón soluble de Litner en 20-30 ml. de amortiguador, para formar una suspensión homogénea sin

grumos. A esta suspensión se agregan lentamente de 150

a 200 ml. de amortiguador hirviendo, agitando enérgica

mente. Cuando la temperatura asciende a 80-85°C, las

partículas se disolverán formando un sol homogéneo de

almidón opalescente. Se calienta la solución con agi-

tación hasta ebullición. Se hierve 3 minutos. Se - - -

transfiere a un matríz volumétrico de 250 ml. se deja-

enfriar la sol a 30-35°C y se completa el volúmen con

amortiguador hasta 250 ml. La solución es estable tres

o cuatro semanas si está refrigerada.

3.- Determinación de reductores.- Tomar una muestra de

medio fermentado. Centrifugar 3,000 r.p.m. Con el - -

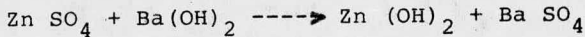
sobrenadante obtenido se sigue el siguiente esquema:

Problema:

Medio fermentado 5 ml.
Sol. de almidón al 1.2% 5 ml.
Amortiguador 5 ml.
Agua -----

Incubar a 39°C. Tomar muestras de 1 ml. a los 0', 30', 60' y 90'. Determinar reductores por el método - Nelson Somogyi, 1944. La actividad se reporta como la diferencia en mg. de glucosa a los 90'-mg de glucosa - al tiempo 0.

Se precipitan las proteínas añadiendo hidróxido - de Bario y sulfato de Zinc, las proteínas forman pro- teinatos de Zn y Sulfato de Bario.



En el sobrenadante se encuentran los azúcares re- ductores.

La glucosa reduce el ion cúprico a cuproso con -- formación de óxido cuproso (Cu₂O). La reacción no es- estequiométrica y depende de la alcalinidad, tiempo y temperatura de calentamiento y concentración de reacti- vos. La reoxidación de ión cuproso por oxígeno se im- pide incorporando 18% de sulfato sódico al reactivo pa- ra disminuir la solubilidad del oxígeno. Después se a- ñade ácido arsenomolibdico que se reduce con el ión cu

proso formando óxidos inferiores de molibdeno, estos -
óxidos producen un color azul que se lee a 540 nm.

La preparación de los reactivos se encuentra en -
el apéndice 1.

E) Influencia de la concentración de estiércol.

Se probaron tres concentraciones de estiércol fres-
co: 10%, 20%, y 30% del volúmen total. Estos experi-
mentos se llevaron a cabo incubando a 37°C, siguiendo,
el esquema de selección. Se ajustó el pH a 7 cada 24
hrs.

F) Influencia de la temperatura y la agitación.

Se realizaron cuatro experimentos utilizando dos-
temperaturas: a 37°C y a la temperatura ambiente (18°C)
haciendo fermentaciones estáticas o agitadas.

Se realizó al mismo procedimiento de selección, a
justando el pH a 7.0 cada 24 hrs., se usó una concen-
tración de estiércol del 30%.

G) Influencia de la relación C/N en el medio.

Se probaron tres relaciones carbono/Nitrogeno en-
el medio de cultivo.

C/N = 6.4 almidón 20 gr.
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6 gr.

C/N 4.6 almidón 20 gr.
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 9 gr.

C/N = 3.5 almidón 20 gr.
 $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$ 12 gr.

Estas fermentaciones se hicieron ajustando el pH, a 7.0 cada 24 hrs. durante el cultivo inicial a las -- transferencias sucesivas, usando el 30% de estiércol e incubando a 37°C en forma estática.

H) Medición del nitrógeno protéico durante la fermentación.

La determinación del N protéico, se efectuó diariamente en matraces que contenían las condiciones siguientes: 30% de estiércol fresco, relación C/N en el medio de cultivo de 4.5, las fermentaciones se hicieron en forma estática a 37°C, el pH se ajustó a diario a 6.5, después se siguió el diagrama de transferencias ya indicado.

La proteína en el medio se obtuvo por diferencia entre el nitrógeno total y el nitrógeno soluble presen

tes en el medio fermentado. El nitrógeno total se midió con el método que se describe a continuación:

Se realiza una digestión Kjeldhal, (Vogel, 1960), el amonio formado en este paso se convierte en hidróxido de amonio en presencia de álcali concentrado, el hidróxido de amonio reacciona con fenol e hipoclorito sódico (reacción de Berthelot), para formar el indofenol - azul.

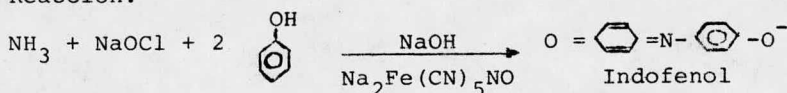
1.- Digestión.- Se miden de 5 a 10 ml. de muestra, se colocan en un matraz Kjeldhal, se agregan 20 ml. de H_2SO_4 concentrado, 3 gr. de mezcla catalizadora (sulfato de potasio, 200 gr., sulfato de cobre 20 gr., óxido de selenio 5 gr.), se agregan perlas de vidrio para regular la ebullición. Se lleva a hervir en una parrilla o mechero en una campana de vidrio con extractor de aire. La digestión total se alcanza cuando la solución es totalmente transparente. Este paso tiene por objeto oxidar la materia orgánica por calentamiento. El catalizador sirve para acelerar la oxidación y elevar el punto de ebullición del ácido sulfúrico; los elementos C, H y S se oxidan a CO_2 , H_2O y SO_2 y en el N se convierte en $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.

2.- Determinación de NH_3 .- (Tietz, 1972). El $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ formado se libera en presencia de álcali en exceso.



El amoniaco en una porción alícuota reacciona con fenol y hipoclorito sódico en un medio alcalino para formar el indofenol azul. Se utiliza como catalizador el nitroprusiato sódico.

Reacción:



Se coloca 1 ml. de la muestra, se le agregan 5 ml. de la solución de fenol nitroprusiato y 5 ml. de la sol. de hipoclorito. Se deja reaccionar 30 min. a temperatura ambiente y se lee en un colorímetro a 625 nm. Curva estándar.- Se disuelven 0.3883 gr. de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 1 lt. de agua, conteniendo de tal manera 100 mg/l de NH_3 . Se diluye esta solución 1:10 para tener 10 mg NH_3 /l.

µg. NH_3	0	2	4	6	8	10
ml. de dilución 1:10 de sol estándar	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
H_2O	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0

Se traza la curva estándar, graficando D.O. contra concentración de NH_3 y se extrapolan los valores de -- D.O. de las muestras se obtienen los µg de NH_3 /ml. presentes.

I) Determinación de nitrógeno total.

Se toman 10 ml. de medio fermentado. Se realiza la digestión Kjeldhal. Se añaden 400 ml. de agua. Se toman 2 ml. de esta dilución y se agregan 8 ml. de NaOH-2N. Se utiliza 1 ml. para la determinación de NH_3 por el método del indofenol.

J) Determinación de nitrógeno soluble.

El N soluble se midió siguiendo dos procedimientos ambos se compararon entre sí.

Uno de los procedimientos se basó en que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es la única fuente de nitrógeno. Se obtuvo una muestra de 1 ml. del medio fermentado. se diluyó 1:100 con agua destilada. Se miden 2 ml. y se colocan en un tubo, se agregan 8 ml. de agua destilada. Se usa 1 ml. de esta última dilución para efectuar el método del indofenol.

El otro método consistió en tomar 5 ml. del líquido fermentado, añadir 5 ml. de sol. saturada de ZnSO_4 .-- Mezclar y centrifugar, coleccionar el sobrenadante, añadir 5 ml. de ZnSO_4 para laverlo, mezclar, centrifugar y coleccionar este sobrenadante. Mezclar ambos sobrenadantes, - tomar 10 ml. y realizar la digestión Kjeldahl. Añadir -- 400 ml. de agua. Tomar 2 ml. agregar 8 ml. de NaOH 2N y medir 1 de esta dilución para efectuar el método del indo-

fenol.

Con ambos métodos se obtienen resultados similares.

El Nitrógeno protéico se calculó con la fórmula siguiente:

$$N \text{ protéico} = N \text{ total} - N \text{ soluble.}$$

En algunos casos (en el cultivo inicial) se determinó directamente la proteína por el procedimiento siguiente:

Se toman 5 ml. de medio y se precipitó la proteína con 5 ml. de sol. saturada de $Zn SO_4$. Se agita y --- se centrifuga, el sobrenadante se colectó, se lavó el precipitado con 5 ml. de $Zn SO_4$ se mezcló y centrifugó-colectando el sobrenadante para determinar N soluble.

Al precipitado se le añadieron los 20 ml. de H_2SO_4 necesarios para la digestión y se transfirieron a un matráz Kjeldahl añadiendo 3 g. de catalizador. Se digiere. Se enfría y se añaden 400 ml. de agua destilada, se toman 2 ml., se agregan 8 ml. de Na OH 2N y se toma 1 ml. para el método del indofenol.

Este último método nos da idea de que los resultados obtenidos por la fórmula está cerca de la realidad. No se siguió haciendo porque es muy impráctico, ya que --- aunque se trata de evitar se pierde algo del ---

precipitado, o bien, no se lava bien y queda en él algo de sulfato de amonio. Se encontró un error del 5 - 6% entre la determinación directa y el cálculo por medio de la fórmula.

K) Preparación de silos experimentales.

Para observar la degradación del almidón de maíz por el fermentado amilolítico se prepararon silos de maíz que contenían tres porcentajes diferentes de fermentado respecto a la cantidad de grano.

Se utilizó maíz molido. Se hizo una prueba previa añadiendo a una cantidad de maíz en vasos de precipitado diferentes porcentajes de fermentado, obteniéndose mezcla del siguiente aspecto: Hasta 20% seco, de 30 - 50% aspecto semi-húmedo, de 60% en adelante la mezcla tenía un aspecto francamente húmedo. así que se probaron las concentraciones de 30, 40 y 50% de fermentado.

Los silos fueron preparados de la manera siguiente:

Se pesó 1 Kg. de maíz para cada concentración y se le agregó el fermentado en porcentaje respectivo (300 ml. al que tendría 30% y así sucesivamente). Se preparó, un control sin fermentado pesando 1 Kg. de maíz y añá-

diendo 400 ml. de agua. Se llenaron frascos etiquetados de tamaño igual empacando la mezcla para no permitir que quedara al aire y se cerraron herméticamente.

El fermentado se preparó en una serie de 6 matraces de 500 ml. que contenían un volúmen de 250 ml. Para el cultivo inicial se usó 30% de estiércol, el medio tenía C/N de 4.5, la fermentación se realizó incubando a 37°C en forma estática ajustando el pH del medio cada 24 hrs a 6.5. Se siguió el esquema de pases sucesivos en el mismo medio. Se usó el fermentado con una actividad amilolítica de 25.8 mg/ml fermentado/90min.

Se midieron los reductores en la mezcla ensilada maíz-fermentado a los días 0, 3, 6, 12, 14, 18, 20, 24 28 y 31 de ensilaje de acuerdo a la técnica que sigue:

Abrir el frasco correspondiente y homogeneizar el contenido. Pesar 5 g. de mezcla fermentada. Añadir 50-ml. de agua destilada. Agitar magnéticamente 15 minutos tomar 1 ml., agregar 9 ml. de agua destilada, de aquí se toma 1 ml. y se sigue el método de Nelson Somogyi, - 1944, para determinar glucosa.

L) Caracterización de los microorganismos.

1.- Cuenta de microorganismos,- Se realizó con el fermentado del tercer pase. Se tomaron por duplicado---

muestras de 1 ml. y se hicieron diluciones seriadas en agua estéril. Se hicieron diluciones hasta 10^{-12} . Se sembraron únicamente las diluciones 10^{-7} hasta 10^{-12} en medio para cuentas totales y para contar microorganismos amilolíticos. Se incubó a 37°C . Se hizo la -- cuenta una vez que aparecieron las colonias. Para facilitar las cuentas en almidón y observar la hidrólisis se añadió solución de Lugol.

2.- Aislamiento e identificación.- Los medios utilizados anteriormente contienen 0.05% de cisteína para crear un ambiente anaerobio. Se lograron aislamientos convenientes en las últimas diluciones.

Para el estudio de anaerobios se usó el método de roll tube de Hungate (1969), en el cual el medio sólido se distribuye en una capa delgada sobre la superficie interna de tubos de ensaye que contienen una atmósfera anaerobia, desplazando el aire con CO_2 . El método realizado en el siguiente:

- 1) Hacer diluciones seriadas con agua estéril.
- 2) Sembrar 1 ml. de las diluciones 10^{-7} - 10^{-12} .
- 3) Agregar el medio que se va a utilizar, fundido a 45°C . Mezclar.
- 4) Introducir una corriente de CO_2 , de manera que no se formen burbujas en el medio.

5) Cerrar el tubo por medio de un tapón de hule-estéril .

6) Rodar el tubo en una charola con agua fría pa-
ra solidificar.

7) Se incubaron a 37°C los tubos verticalmente.

Los medios utilizados con la técnica de roll tube fueron:

Medio almidón --- $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ con cisteína.

Extracto de levadura ---peptona con cisteína.

Rogosa S L agar.

Una vez aisladas las colonias se picaron para examinar la pureza, morfología y tinción de gram y de esporas. Se subcultivaron posteriormente para poder efectuar una identificación presuntiva haciendo pruebas bioquímicas. Todas las pruebas de fermentación y las fisiológicas se incubaron a 37° C.

3.- Pruebas bioquímicas.- Se probaron las cepas para fermentación de glucosa , lactosa, sacarosa, glicerol, manitol, sorbitol, xilosa, maltosa, galactosa, fructosa.

Se sembró en caldo nitrato para observar producción de nitritos.

Se usó medio SIM para observar producción de H_2S , de indol y movilidad.

Se hizo prueba de catalasa.

Se sembró en un medio con 0.5% de glucosa y se incubó una semana para el estudio de los productos de -- fermentación por cromatografía de gases. Cottyn (1968).

RESULTADOS.

A) Influencia de la concentración de estiércol.

Los resultados de la actividad amilolítica, de la evolución de los azúcares reductores en el medio y del pH obtenidos durante la fermentación están en el Cuadro 5. Estos parámetros nos permiten evaluar la producción de amilasa, ya que al observar como, a partir de un medio en el que se tiene una cantidad casi nula de reductores, en el caso de existir actividad amilolítica, con el tiempo se liberarían reductores al medio, aumentando así su actividad. La actividad amilolítica nos indica - además si se ha mantenido esta actividad o se ha aumentado, así como si existe algún inhibidor que pudiera de crementar la actividad de la enzima.

En el cultivo inicial, la actividad amilolítica es elevada en las tres concentraciones de estiércol probadas. En el caso del experimento con 30% de estiércol - en el 1° y el 2° pases la actividad amilolítica es mayor que en los otros casos.

La variación de los reductores en el medio durante el cultivo inicial muestra un incremento de los reductores a las 24 hrs. seguido de una caída de éstos en los tres experimentos. Este hecho sugiere que en el cultivo inicial heterogéneo, una población amilolítica hace aumentar los reductores al degradar el almi-

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE ESTIERCOL.
 EVOLUCION DE LA GLUCOSA LIBRE EN EL MEDIO Y DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA
 DURANTE LA FERMENTACION.

		0 Horas			24 Horas			48 Horas			72 Horas		
		Glucosa mg/ml	Actividad mggluc/ml 90 min.	pH	Glucosa mg/ml	Actividad mggluc/ml 90 min.	pH	Glucosa mg/ml	Actividad mggluc/ml 90 min.	pH	Glucosa mg/ml	Actividad mggluc/ml 90 min.	pH
1° Pase	1A	2.48	5.26	7.0	15.80	6.70	6.0	ND	ND	ND	16.32	29.30	7.0
	1B	4.40	5.52	7.0	19.65	25.98	5.7	ND	ND	ND	14.74	37.90	7.0
	1C	5.08	13.34	7.0	28.25	15.62	5.6	ND	ND	ND	12.28	29.13	7.0
2° Pase	2A	1.03	0.88	7.4	1.58	1.66	7.8	5.00	3.07	7.2	9.30	2.63	7.0
	2B	0.79	0.97	7.5	2.20	0.17	7.5	4.73	2.28	7.0	5.61	3.51	7.0
	2C	2.10	9.65	7.5	16.67	17.55	7.1	17.90	9.82	7.2	30.74	6.84	7.0
3° Pase	3A	1.84	0	7.5	2.46	0.27	7.3	1.93	1.85	7.0	10.70	4.74	5.6
	3B	2.10	0	7.2	9.82	4.23	5.4	10.53	9.83	6.0	12.29	18.25	6.9
	3C	6.14	7.02	7.2	9.48	16.85	5.2	11.76	23.34	6.4	20.00	15.09	6.8

1A, 2A, 3A: con 10% de estiércol.

1B, 2B, 3B: con 20% de estiércol.

1C, 2C, 3C: con 30% de estiércol.

Las fermentaciones se efectuaron en forma estática, incubando a 37°C, se ajustó el pH a 7 cada 24 hrs. en un medio con relación C/N = 6.4.

ND: No determinado

dón, una vez liberados los reductores, éstos son consumidos por una flora no amilolítica que hace que baje la cantidad total de reductores en el medio. Durante el 2º y 3º pase, existe un claro aumento de los reductores en el medio con respecto al tiempo, indicando - que los microorganismos amilolíticos se están desarrollando.

Se debe resaltar el hecho de que, como se observa en el Cuadro 5, al bajar el pH de 7 ó 7.5, a valores de 6 ó menores se aumenta la actividad, esto sucede a las 24 hrs. en el cultivo inicial y en la 2ª - - transferencia. En la primera transferencia ocurrió - que el pH aumentó a las 24 hrs. Esto produjo en los - experimentos de 10% y 20% una actividad de amilasa pobre y se liberaron al medio pocos reductores. En el - experimento con 30% de estiércol, el pH llegó a 7.0 y se observó una mayor producción de amilasa. Esto último puede atribuirse a que la mayor concentración de - estiércol ayuda a que baje rápidamente el pH y mejora la actividad y la producción de enzima.

B) Influencia de la agitación y la temperatura.

En el Cuadro 6 se encuentran anotados los resultados obtenidos en el tercer pase del ex-

CUADRO C

EFFECTO DE LA AGITACION Y LA TEMPERATURA EN LA EVOLUCION DE LA GLUCOSA LIBRE
EN EL MEDIO DE CULTIVO Y EN LA ACTIVIDAD AMIOLITICA.

	0 Horas			24 Horas			48 Horas			72 Horas		
	Glucosa mg/ml	Actividad mggluc/ml 90 min.	pH	Glucosa mg/ml	Actividad mggluc/ml 90 min.	pH	Glucosa mg/ml	Actividad mggluc/ml 90 min.	pH	Glucosa mg/ml	Actividad mggluc/ml 90 min.	pH
3° Pase A ⁻ T ⁻ 3A	0.79	0.25	7.3	0.96	0	7.3	3.51	3.86	6.4	4.39	2.28	7.0
A ⁺ T ⁻ 3B	1.05	0.35	7.3	8.25	18.25	6.8	9.47	11.23	6.4	12.81	12.46	6.8
A ⁻ T ⁺ 3C	1.56	5.98	7.3	14.04	29.83	6.0	12.98	29.13	6.6	13.16	20.53	6.9
A ⁺ T ⁺ 3D	1.49	0	7.3	2.01	10.97	7.2	5.61	11.76	5.1	10.53	8.77	7.0

A⁻T⁻ = 3A: estático, incubado a temperatura ambiente (20°C).

A⁺T⁻ = 3B: agitado, incubado a temperatura ambiente.

A⁻T⁺ = 3C: estático, incubado a 37°C.

A⁺T⁺ = 3D: agitado, incubado a 37°C.

Las fermentaciones se efectuaron en un medio con relación C/N = 6.4, concentración de estiércol = 30%. El pH fué ajustado cada 24 hrs.

perimento.

Se trabajó con 4 diseños distintos para observar el efecto de la agitación y la temperatura sobre la producción de amilasa. Los denominaremos así: $A^- T^-$, se efectuó a temperatura ambiente y sin agitar; $A^+ T^-$ se efectuó a temperatura ambiente y agitando; $A^- T^+$, sin agitar e incubando a $37^\circ C$ y $A^+ A^+$ efectuando con agitación e incubando a $37^\circ C$.

De los resultados del Cuadro 6 se puede observar que en el diseño $A^- T^-$ existe una pequeña actividad de amilasa y se liberan muy pocos reductores en el medio, lo cual indica que se produce poca amilasa en estas condiciones. El diseño $A^- T^+$ muestra una actividad de amilasa mayor así como una liberación de reductores mayor que con $A^+ T^-$ y T^+ .

En el caso de $A^- T^-$ notamos también que el pH baja con mayor lentitud (48 hrs.) con respecto a los demás. De nuevo es evidente que una vez que el pH del medio ha llegado a valores de 7 aproximadamente, se produce mas amilasa.

C) Influencia de la relación carbono/nitrógeno en el medio de cultivo.

Se midió la actividad amilolítica y la producción

CUADRO 7

EFFECTO DE LA RELACION CARBONO/NITROGENO EN EL MEDIO DE CULTIVO.
EVOLUCION DE LA GLUCOSA LIBRE EN EL MEDIO Y DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA
DURANTE LA FERMENTACION.

		0 Horas			24 Horas			48 Horas			72 Horas		
		Glucosa mg/ml	Actividad mggluc/ml 90 min.	pH	Glucosa mg/ml	Actividad mggluc/ml 90 min.	pH	Glucosa mg/ml	Actividad mggluc/ml 90 min.	pH	Glucosa mg/ml	Actividad mggluc/ml 90 min.	pH
1° Pase	1A	6.15	5.98	7.2	19.83	21.20	5.6	27.36	17.10	6.7	29.07	18.81	7.0
	1B	5.13	4.44	7.1	17.78	23.25	5.3	34.20	10.26	6.6	34.20	17.10	6.7
	1C	5.30	7.18	7.1	13.00	10.60	5.5	23.94	13.68	6.5	29.07	18.81	6.7
2° Pase	2A	2.22	4.10	7.3	14.36	8.20	6.0	16.07	10.26	6.3	20.52	2.05	7.0
	2B	1.37	3.25	7.2	22.57	4.80	5.9	21.55	5.13	6.6	19.84	0	6.9
	2C	1.45	3.30	7.3	10.77	4.27	5.6	13.34	7.18	6.3	16.76	3.42	6.9
3° Pase	3A	0.85	3.70	7.2	9.75	5.64	6.0	10.26	13.68	6.5	16.76	15.73	7.0
	3B	0.85	5.81	7.3	12.14	18.64	5.6	15.40	25.30	6.6	23.94	20.52	7.0
	3C	0.87	3.91	7.2	10.60	13.34	5.9	13.17	12.50	6.4	22.57	8.20	7.0

1A, 2A, 3A: C/N = 6.4

1B, 2B, 3B: C/N = 4.5

1C, 2C, 3C: C/N = 3.5

Las fermentaciones fueron realizadas con 30% estiércol, en forma estática, incubando a 37°C. Se ajustó el pH cada 24-hrs. a 7.0.

de reductores en tres experimentos, en el experimento A, hay una relación C/N = 6.44, en el B, la relación C/N es de 4.5 y en el C, la relación C/N es de 3.5. Estos resultados se encuentran en el Cuadro 7 (actividad amilolítica, y cambio de pH con el tiempo).

La actividad de amilasa en el cultivo inicial - en el caso de la relación C/N = 6.4 y en el caso de C/N=4.5 son similares. La actividad de la amilasa en la relación de C/N =3.5 fue siempre menor durante todo el experimento.

En la primera transferencia notamos un mismo patrón, la actividad de amilasa se eleva un poco en las primeras 48 horas, cayendo a valores muy bajos en las 72 hrs., esto sucede en los tres modelos.

En la 2ª transferencia, la actividad amilolítica, es más elevada en el caso de C/N = 4.5, con respecto a los otros dos.

Se liberan mas reductores en los tres casos en el cultivo inicial. En la 1ª y 2ª transferencia es clara la elevación de reductores en el medio en todos los matraces.

El pH baja a las 24 hrs. a valores hasta de 5.3, y la actividad de amilasa y los reductores en el medio aumentan.

De acuerdo a estos resultados se eligió la relación C/N = 4.5 para fermentaciones subsecuentes ya que con esta relación se favorece la actividad amilolítica y la liberación de reductores al medio.

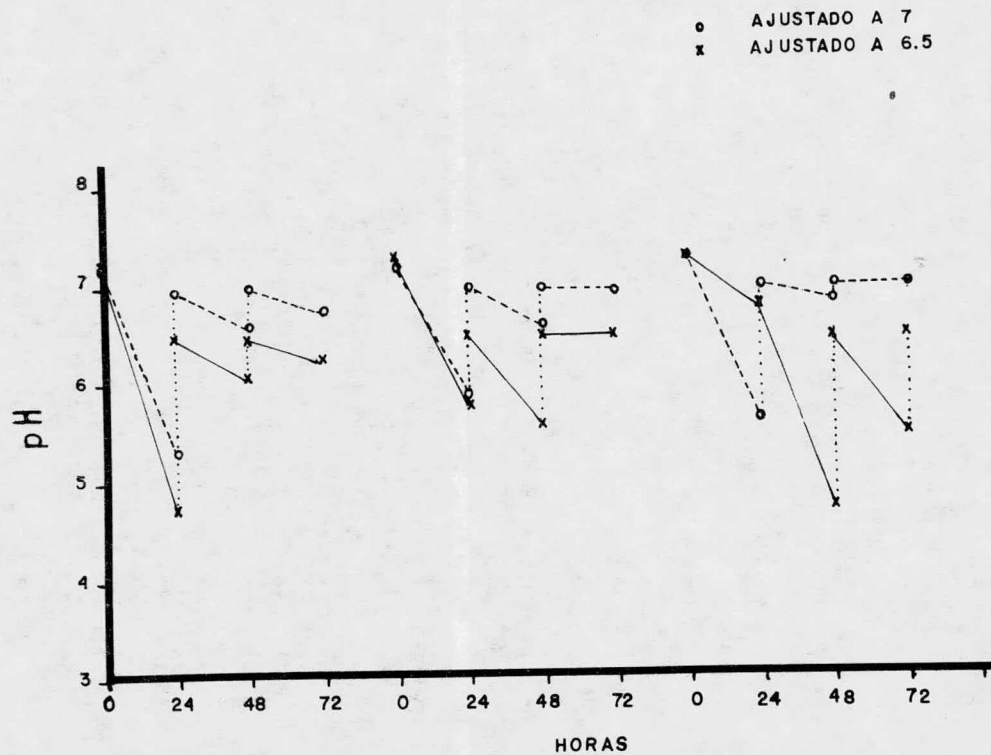
D) Influencia del ajuste del pH.

En el esquema general de las fermentaciones, se mencionó la realización de ajuste de pH cada 24 horas. Según se ve en la Figura 2, la generación de acidéz por la fermentación se vé afectada si el pH se restablece con NaOH a 7 o a 6.5, siendo este segundo valor el que favorece una variación mayor en la acidéz del medio principalmente en el 3ºpase. Lo que significa que la fermentación se acelera cuando ajustamos a un pH menor cada 24 horas.

E) Distribución del nitrógeno protéico durante la fermentación estiércol-almidón.

En nitrógeno protéico en el cultivo inicial o primer pase, muestra una tendencia ondulatoria durante los 3 días de fermentación. A las 24 horas., la cantidad de nitrógeno desciende ligeramente respecto a la cantidad inicial, aumenta a las 48 horas y desciende nuevamente a las 72 horas. La cantidad de nitrógeno -

FIG. 2 EFECTO DEL AJUSTE DEL pH CADA 24 HORAS
EN EL PATRON pH VS. TIEMPO



CUADRO 8

DISTRIBUCION DEL NITROGENO DURANTE LA FERMENTACION

	<u>0 Horas</u>			<u>24 Horas</u>			<u>48 Horas</u>			<u>72 Horas</u>		
	Nitrogeno $\mu\text{g/ml}$			Nitrogeno $\mu\text{g/ml}$			Nitrogeno $\mu\text{g/ml}$			Nitrogeno $\mu\text{g/ml}$		
	Total	Soluble	Protéico	Total	Soluble	Protéico	Total	Soluble	Protéico	Total	Soluble	Protéico
1°		897.60	584.70		988.20	483.00		860.60	598.70		967.65	512.71
Pase	1482.35			1471.23			1459.30			1480.13		
		890.70	592.11		998.11	473.11		914.11	545.17		973.40	506.70
2°		1196.70	121.50		1165.29	145.76		1031.88	328.60		1111.76	315.66
Pase	1318.05			1311.06			1360.47			1427.42		
		1195.76	122.29		ND	ND		1047.53	312.94		ND	ND
3°		1188.92	138.97		1198.23	168.82		1198.23	228.11		1017.05	392.83
Pase	1327.94			1367.06			1426.35			1409.88		
		1195.76	132.17		ND	ND		1215.52	210.82		998.11	411.77

Del Nitrogeno soluble y protéico, se dan dos resultados de determinaciones diferentes.

Fermentaciones realizadas en un medio con relación C/N = 4.5, en forma estática, incubando a ---
37°C, con 30% de estiércol inicial

protéico en este cultivo primario es mayor que en los siguientes. Esto es explicable, ya que en el estiércol existe proteína proveniente de los desechos alimenticios, como granos y rastrojo, además de la proteína microbiana que existe en este material, esta proteína, se diluye al hacer la primera transferencia. (Cuadro 8)

Durante la 1° transferencia ó 2° pase, la proteína se mantiene constante a las 24 horas, asciende a -- las 48 horas y se mantiene la cantidad a las 72 horas, en este caso ya existe aumento debido a la proliferación de microorganismos.

En la 2° transferencia ó 3° pase ocurre algo similar, la cantidad de proteína llega a un máximo a las - 72 horas.

F) Degradación del almidón por los microorganismos amilolíticos en el silo.

El aspecto de los silos, fué cambiado con el tiempo. El maíz sufrió un aclaramiento y microscópicamente se notaba mas degradado. El silo adquirió un olor a queso. El silo con mejor aspecto fué el que contenía el 30% de fermentado, también tenía un olor muy agradable.

En cuanto a los reductores (Cuadro 9), se observa

ACCION DE LOS MICROORGANISMOS AMILOLITICOS EN EL ENSILADO

SOBRE EL ALMIDON DE MAIZ

Concen. Fermentado	<u>DIAS</u>									
	0	3	6	12	14	18	20	24	28	31
30%	10.62	18.12	12.12	2.25	5.37	8.62	6.37	9.25	6.20	7.80
40%	10.12	39.50	15.50	7.87	12.37	17.75	16.87	37.50	17.55	20.25
50%	9.50	22.25	12.50	2.00	5.25	5.87	8.75	16.75	9.00	11.80
0%	10.00	9.75	10.00	0.25	4.25	3.50	4.50	4.12	3.00	3.15

Concentración en mg glucosa/g almidón ensilado.

que en todas las concentraciones de fermentado en el silo se producen más reductores que en caso del control. En los tres experimentos con el fermentado existen dos máximos, uno a los tres días, el otro a los 24 días de ensilado. En todos los casos, incluso en el control, el valor de los reductores desciende en el 12º día de ensilaje.

No se pueden comparar los resultados del 40% con los del 30 y 50% ya que en primer caso se usó un maíz más molido que en los otros casos; esto nos dice que mientras mas fino sea el grano se facilita mas la acción amilolítica.

Los patrones de producción de reductores entre el 30 y 50% la que libera mas reductores en ese día.

G) Cuenta de colonias.

En el medio extracto de levadura-peptona, aparecieron dos tipos de colonias unas cremosas, circulares-elevadas, de color blanco amarillento, suaves, en la superficie del medio, además de otras colonias hundidas en el medio de forma lenticular, blancas. En ocasiones aparecieron en este medio colonias pequeñas---

pardas circulares ligeramente hundidas en el medio, - así como levaduras.

En el medio almidón-sulfato de amonio, aparecieron colonias lenticulares blancas o circulares blancas, que estaban hundidas en el medio. Junto a éstas aparecieron colonias satélite pequeñas en el área de hidrólisis de almidón. Los resultados de las cuentas en ambos medios están a continuación:

Colonias lentejas.

Colonias cremosas.

E. de levadura Almidón

E. de levadura Almidón

50 x 10¹⁰ 20 x 10⁹

12 x 10⁸ 43 x 10¹⁰

Colonias pequeñas pardas.

Levadura

E. de levadura

E. de levadura

23 x 10⁸

10 x 10¹⁰

H) Aislamiento e identificación.

Las cepas que aparecieron repetitivamente se agruparon tentativamente e identificaron presuntivamente a base a su morfología, tinción de gram y a sus reacciones de fermentación. Los resultados se muestran en el Cuadro 10.

Los datos del Cuadro, indican que hay tres grupos principales de microorganismos.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS Y MORFOLOGICAS
DE LAS CEPAS CRECIDAS EN DIFERENTES MEDIOS

	Extracto de Lev. cisteína			Almidón (NH ₄) ₂ SO ₄		Extracto de Lev. Roll Tube.			Rogosa Roll Tube.	
	Levadura	Creмоса	Lenteja	Blanca Pequeña	Lenteja	Creмоса	Lenteja	Parda Pequeña	Creмоса	Parda
Características Coloniales.	Elevada blanca - circular grande	Creмоса suave - en la - superf.	Lenticu blanca - profunda.	Pequeña blanca.	Lenticu lar húndida.	Blanca - circu - lar bor - de claro.	Pequeña o circu lar ad - herida.	Pequeña cirular pequeña suave.	Suave - blanca - circular	Pequeña suave - natosa - b.pardus.
Gram	+	+ Joven - Viejo	+	- Viejo	+ Joven	+ Joven - Viejo	+	+	+	+
Morfología	Levadura	Bacilos cadena - filamen - tosa.	Bacilos abulta - miento.	Bacilos alarga - dos del - gados.	Bacilos y cade - na cor - ta.	Cadena - bacilos medianos.	Bacilos largos - abulta - miento.	Cocos - en cade - na, ais - lados.	Bacilos alarga - dos.	Cocos - en cade - na muy - corta.
Esporas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+ gas	+	+ gas	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+ gas	+	+	+	+ gas	+	-	+	-
Sacarosa	-	+ deb	+	+ deb	+	+ deb	+	-	+ deb	-
Glicerol	-	+ deb	-	+ deb	+ deb	+ deb	-	-	+ deb	-
Manitol	-	+ gas	+ deb	+ gas	+	+	+	-	+	-
Sorbitol	-	+ deb	+ deb	+ deb	+ deb	+ deb	+	-	+ deb	-
Xilosa	-	+ deb	+ deb	+ deb	-	-	-	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Galactosa	ND	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Fructosa	ND	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Almidón	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
Movilidad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reduc.de NO ₃	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Catalasa	ND	+	+	+	+	+	ND	-	+	-
Productos de Fermentación.	Acético	Prop.	Prop.	Prop.	Prop.	Prop.	Prop.	ND	Prop.	ND
	Butírico.	Acético	Butírico.	Acético.	Butírico.	Acético.	Butírico.		Acético.	
	Prop.	Butírico.	Acético.	Butírico.	Acético.	Butírico.	Acético.		Butírico.	

1) Bacilos gram +, no móviles anaerobios facultativos, se presentan en cadenas largas no esporulados fermentadores, que forman las colonias cremosas blancas. Se identificaron presuntivamente comparando sus reacciones con las reportadas por Prevot (1957) , como pertenecientes al género Catenabacterium que corresponde, a bacilos curvos o rectos que se presentan en cadenas grandes o filamentos no ramificados, inmóviles, gram +, atacan carbohidratos y sus productos de fermentación son los siguientes: ácidos fórmico, acético, propiónico, butírico y láctico, son anaerobios.

Posiblemente se trate de Catenabacterium contortum.

2) Bacilos gram +, delgados, a veces semejates a estreptococos, anaerobios facultativos, cuyo cremimiento es mejorado en CO₂, forman colonias lenticulares blancas y fermentan almidón. Se identifican como pertenecientes al género Propionibacterium (Delwiche, 1957), que corresponden a bacterias no móviles, no esporuladas, gram positivas que en condiciones anaerobias en medio neutro crecen como bacilos difteroides cortos semejantes a veces a estreptococos. Son catalasa +. Se desarrollan lentamente, apareciendo colonias después de 5 días, anaerobios aereotolerantes, requieren vita-

mina B. ácido pantoténico y biotina. Fermentan ácido láctico, carbohidratos y alcoholes polihidroxílicos - produciendo ácido propiónico, acético y CO₂.

Posiblemente Propionibacterium technicum.

3) Cocos gram + inmóviles en cadenas muy cortas, anaerobios que forman la colonia parda suave que creció bien en Rogosa SL agar. Coincide con el género Peptostreptococcus (Kluyver and Van Niel, 1957), que incluye cocos anaerobios gram + no móviles en cadenas. Podría tratarse de Peptostreptococcus parvulus.

Se muestran las fotografías correspondientes a un cultivo en almidón-sulfato de amonio (Figuras 3 y 4). En la fig. 5 se observan microorganismos crecidos en peptona-extracto de levadura (colonia cremosa). En la fig. 6 se muestran microorganismos crecidos en medio Rogosa S.L. agar en forma anaeróbica.

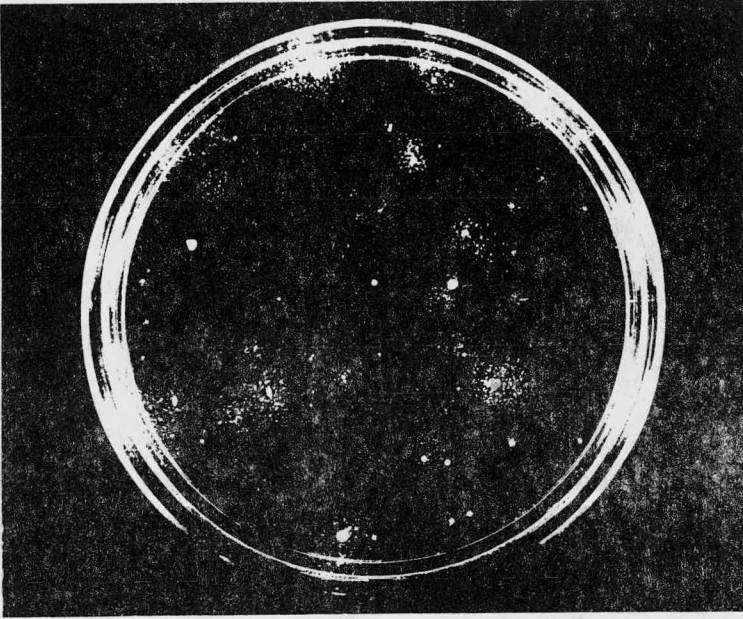


Fig. 3.- Placa de almidón sulfato de amonio. Se observan colonias de microorganismos amilolíticos con un halo de digestión, alrededor del cual crecen microorganismos satélite.

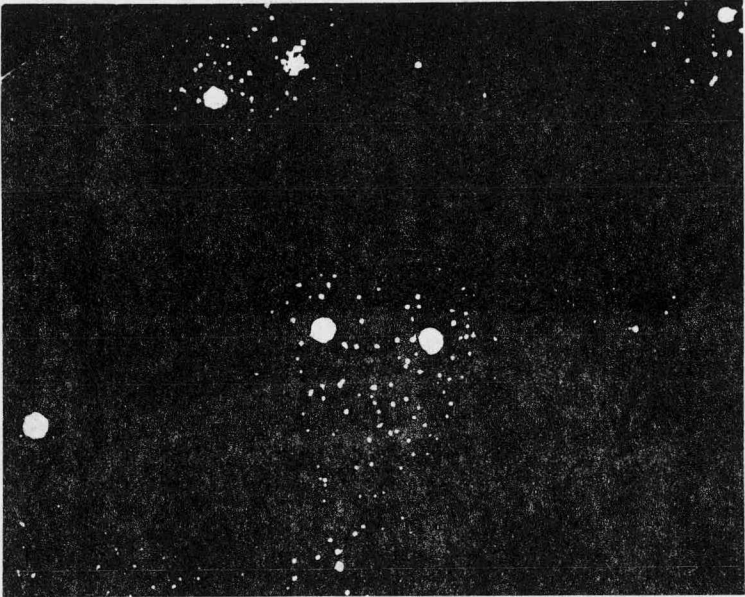


Fig. 4.- Magnificación de la foto anterior. La misma placa de --
almidón sulfato de amonio. Se observa la presencia de colonias -
satélite alrededor de la colonia central.

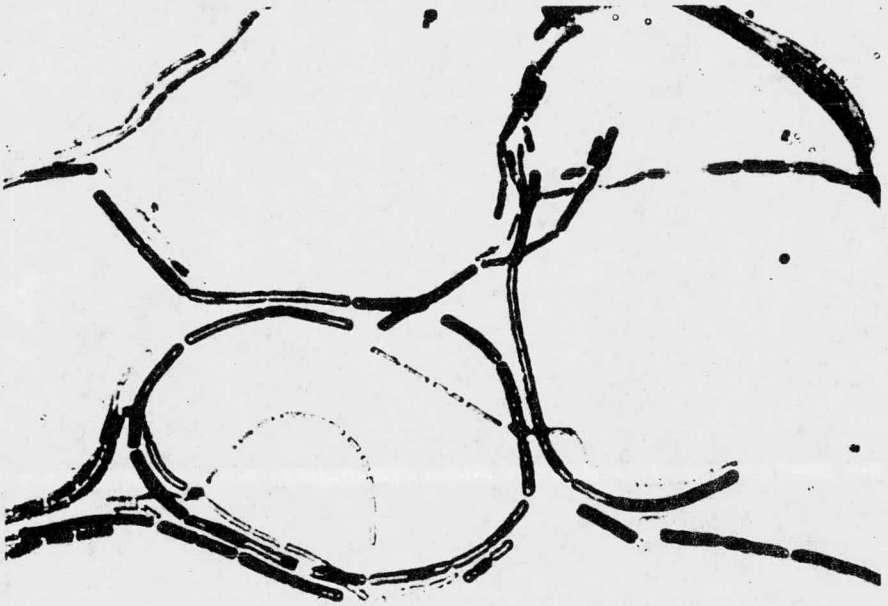


Fig. 5.- Microorganismos formadores de las colonias cremosas.
Tomados de una placa de Peptona-Extracto de Levadura a las -
24 hrs.

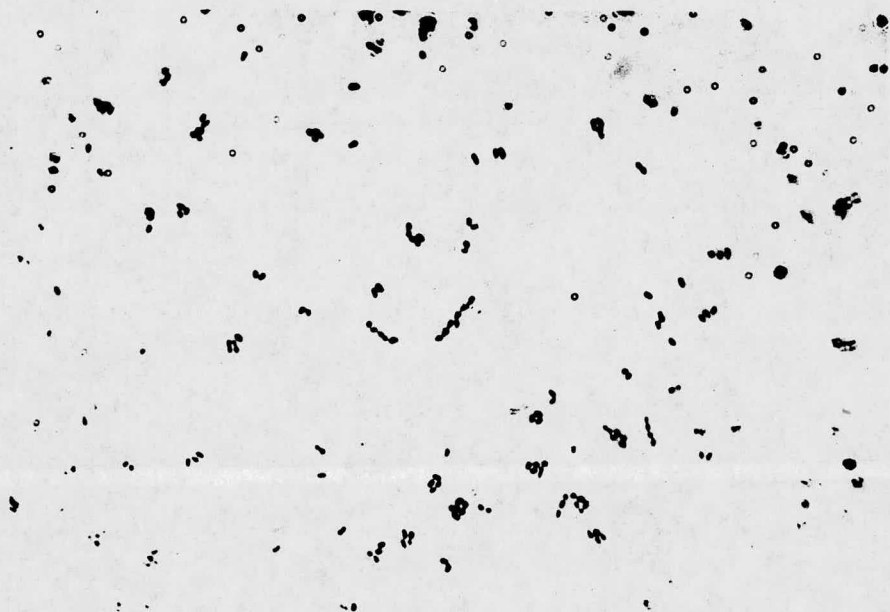


Fig. 6.- Microorganismos que crecieron en condiciones anaeróbicas (Rolling Tube, a las 96 hrs)

DISCUSSION.

Muchas de las ecologías microbianas anaeróbicas - complejas que existen en la naturaleza, se establecen en forma espontánea, ejemplo de esto, es el rumen, el estiércol, la fermentación que se establece en los silos, etc. Las razones para que sea tan diferente una de otra parece ser las condiciones del medio ambiente en que se desarrollan, entendiéndose por medio ambiente las condiciones de pH, temperatura, tipo de sustrato y capacidad de remoción de los metabolitos principales, así pues, en el rumen se establece una temperatura de 39°C, un pH de 6.5, tipo de sustratos diversos y alta capacidad de remoción de los productos. En estas condiciones se establece una flora amilolítica, celulolítica, proteolítica, compuesta por 35 especies diferentes de microorganismos, establecida en forma espontánea a través de la contaminación natural de los alimentos y produciendo como metabolitos principales, ácido acético, propiónico y butírico, sin embargo, si nosotros cambiamos el sustrato por uno solo (melaza de caña) y no tenemos sistema eficiente de remoción de -- productos, la ecología cambia en forma radical en muy pocos días y se convierte en una flora de levaduras -- que tiene como principal metabolito el alcohol.

Con lo anterior se desprende que partiendo de un

sustrato complejo como es el caso del estiércol era posible seleccionar una combinación de microorganismos - capaces de digerir el almidón, estableciendo unas condiciones iniciales dadas, siendo estas primeras las -- más sencillas desde el punto de vista de poderlas llevar a grandes volúmenes sin mayores dificultades, si - esta fermentación tenía una utilidad tecnológica.

Bajo estas bases se logró el objetivo fijado, ya que la actividad amilolítica del estiércol, se mantuvo al nivel inicial a pesar de haberse diluido la fermentación inicial 400 veces (Cuadros 5 y 7).

Al observar detenidamente el cuadro 5 correspondiente al efecto de la concentración del estiércol sobre la actividad amilolítica y el cuadro 7 correspondiente al efecto de la relación carbono/nitrógeno, se nota que la actividad a las 0 horas del segundo pase o primera transferencia debe corresponder a la actividad de las 72 horas del primer pase o cultivo inicial, corregido por la dilución 1:20. Esto significa que la actividad a las 0 horas del segundo pase debe ser alrededor del 5% de la actividad detectada a las 72 horas del primer pase o cultivo inicial. Al hacer los cálculos necesarios, en el caso del cuadro 5 se obtiene 3%, 2.6% y 33.12% para 10, 20 y 30% de estiércol respecti-

vamente. Con este mismo razonamiento se puede analizar la actividad a las 72 horas del segundo pase con la actividad a las 0 horas del tercer pase, observándose también que la actividad esperada es mucho menor que la encontrada por el efecto de la dilución, cuando la concentración de estiércol es de 30%. En el caso del cuadro 7, haciendo los cálculos para las 0 horas del segundo pase y las 72 horas del primer pase se obtiene 21.79%, 19.41% y 21.79% para las relaciones carbono/nitrógeno de 6.4; 4.5 y 3.5 respectivamente. A las 0 horas del tercer pase, que corresponden a las 72 horas del segundo pase tenemos: 180.48% y 114.3% para las relaciones 6.4 y 3.5 respectivamente. En la relación carbono/nitrógeno 4.5 se observa una inhibición completa de la actividad a las 72 horas del segundo pase y la aparición de la actividad en la forma diluída 1:20, es decir a las 0 horas del tercer pase.

Si se postula que este efecto es debido a una acumulación de metabolitos que inhiben la actividad de amilasa y no la producción de la enzima, se podría explicar primeramente la gran liberación de reductores que estuvieron en el segundo y tercer pase, y en el cuadro 5 el decremento de la actividad amilolítica ob

tenido durante el segundo y tercer pase. Al no encontrar el efecto de la dilución se indicaría que la concentración real de la enzima a las 72 horas del segundo pase, es 20 veces mayor que la encontrada. Asimismo, resultaría que a las 72 horas del primer pase sería 6.6 veces mayor que la detectada.

Los microorganismos anaerobios o anaerobios facultativos se desarrollan mejor cultivándolos en condiciones estáticas, hecho que fué corroborado por -- nuestros experimentos, en los cuales encontramos que las mejores actividades de enzimas se presentan en -- los cultivos realizados incubando a 37°C y sin agitación (Cuadro 6)

La relación carbono/nitrógeno de 4.5 encontrada como óptima es similar a la reportada por Pacheco, -- 1976 de 3.5 a 4.0 para microorganismos fermentadores de melaza y urea en condiciones anaerobias, que procedían del estiércol.

El nitrógeno microbiano representado por el nitrógeno protéico en el Cuadro 8, va aumentando durante la fermentación en los 3 pases realizados. Esto -- es particularmente notorio en el segundo y tercer pase, lo cual puede atribuirse a la proliferación de microorganismos digestores del almidón, en el medio de-

cultivo.

Se debe hacer notar que durante los cultivos no fué necesario añadir vitaminas para que se desarrollaran los microorganismos, debido a la simbiosis existente entre la flora mixta seleccionada, por lo que nuestros resultados concuerdan con los de Moore et al, 1962.

Por otro lado la acción de los microorganismos amilolíticos seleccionados, sobre el ensilado se manifiesta por una elevación mayor en los reductores presentes en las 3 concentraciones de fermentado usadas, en comparación con los resultados obtenidos en el caso de los silos control. Este resultado coincide con los reportados por Walker y Hope, 1964 que encuentran que las bacterias ruminales mixtas contienen un sistema enzimático, que ataca los gránulos de almidón de maíz.

Tomando en cuenta que los microorganismos seleccionados y aislados provienen del estiércol, debemos notar que microorganismos de los géneros Propionibacterium y Peptostreptococcus han sido aislados por diversos investigadores a partir del ciego de pollos Salanitro et al, 1974, de estiércol de cerdo Salanitro et al, 1977, y del intestino grueso de ratones Harris

et al, 1976. Miembros del género Catenabacterium han sido reportados por Elías, 1971, como integrantes del contenido ruminal de ovejas y bovinos, por lo que es posible también encontrarlos en el estiércol.

El hecho de haber logrado obtener un cultivo mixto con actividad amilolítica, nos lleva a pensar en varias posibilidades. Chandler et al, 1975 inocularon intraruminalmente vacas Holstein lecheras con microorganismos ruminales vivos adaptados a la fermentación de almidón, logrando una producción 9.7% mayor en la leche y en la grasa durante 8 semanas. Estos autores lograron adaptar los microorganismos ruminales por métodos in vitro realizando un procedimiento similar al reportado en este trabajo, la diferencia es que se -- realizaban las transferencias a medio nuevo de cultivo diariamente durante 21 a 28 días, el medio usado -- por estos autores poseía 85% de concentrado de almidón y la fuente de nitrógeno era protéica.

Una posible aplicación de este trabajo es la inoculación de vacas lecheras con el cultivo amilolítico mixto obtenido durante el tercer pase, para observar el efecto sobre la producción de leche y grasa en estos animales.

Otra posibilidad sería aplicarlo a animales mono

CUADRO 11

GANANCIA DE PESO, CONSUMO DE ALIMENTO Y CONVERSION ALIMENTICIA
DE RATAS ALIMENTADAS CON DIFERENTES CARBOHIDRATOS

		Caseína		Gluten	
		6%	15%	9%	15%
Maíz	G.T.P.	45.69	140.00	10.25	28.83
	C.A.	290.00	361.00	286.00	331.00
	CONV.	6.35	2.57	27.90	11.48
Dextrina	GTP.	41.4	123.22	10.53	35.23
	C.A.	314.00	401.00	331.00	323.00
	CONV.	7.58	3.25	31.43	9.17
Papa	GTP.	58.37	94.53	14.01	44.83
	C.A.	375.00	362.00	358.00	431.00
	CONV.	6.42	3.82	25.55	9.61
Pregelatinizado	GTP.	40.26	129.43	13.94	31.97
	C.A.	249.00	359.00	284.00	290.00
	CONV.	6.18	2.77	20.38	9.07
Amilosa	GTP.	59.69	118.66	16.80	47.88
	C.A.	377.00	367.00	253.00	344.00
	CONV.	6.31	3.09	15.06	7.18
Amilo-pectina	GTP.	48.36	116.64	12.86	36.50
	C.A.	282.00	308.00	260.00	383.00
	CONV.	5.83	2.64	20.21	7.75
Maltosa	GTP.	38.37	147.50	8.46	29.7
	C.A.	294.00	376.00	238.00	298.00
	CONV.	7.66	2.55	28.13	10.03
Glucosa	GTP.	36.73	113.50	12.81	30.20
	C.A.	368.00	364.00	315.00	347.00
	CONV.	10.02	3.20	28.17	12.64

Duración del experimento 28 días.

Promedio de 10 animales por tratamiento

Datos calculados de trabajo de G. Reussner, J.

Andros y R. Thiessen.

* C.A.
GTP.

CONV. Conversión GTP. Ganancia total de peso
Alimenticia C.A. Consumo de alimento

gástricos como el cerdo, utilizando el cultivo mixto - amilolítico como predigestor de los granos amiláceos - empleados en la elaboración de los alimentos para estos animales. Reussner et al, 1963 realizaron un experimento en ratas utilizando fracciones diferentes del almidón, que se pueden considerar como si el almidón - estuviera cada vez más digerido. En este trabajo los autores prueban 2 fuentes de proteína (Cuadro 11): caseína al 6% y 15% y gluten al 9 y 15%, se observa que con un porcentaje de proteína elevado se mejora la conversión alimenticia, es decir la relación que existe - entre alimento consumido/ganancia total de peso. En - el caso de la caseína al 15% se observa un efecto benéfico en el almidón de papa a nivel de pregelatinizado, amilosa, amilopectina y maltosa, ya que mejora la conversión alimenticia en ese sentido. Es curioso que -- con glucosa no se obtuvo máxima eficiencia.

El cultivo amilolítico obtenido en el tercer pase podría aplicarse para realizar la predigestión de alimentos amiláceos, y así mejorar la conversión alimenticia de animales monogástricos.

En el Cuadro 12 se muestran los resultados de un experimento preliminar en el que se usan dietas con -- maíz digerido por el fermentado amilolítico obtenido -

CUADRO 12

GANANCIA DE PESO Y CONVERSION ALIMENTICIA
DE RATONES ALIMENTADOS CON MAIZ PREDIGERIDO

	Digerido		No digerido	
	♀	♂	♀	♂
Sexo				
No. Animales	4	5	5	5
Ganancia (g) (21 días)	9.52 ^a	7.82	6.54 ^b	12.88
Conversión g Alimento/g ganancia	7.47	8.69	11.06	6.31

ab Letras diferentes son estadísticamente significativas P 0.01

El análisis de varianza mostró interacción significativa entre sexo y alimentación.

El maíz era el 60% de las dietas (Proteína 15%).

y maíz no digerido por este fermentado, en ratones - hembras y machos.

Se observa que se obtuvo significancia en cuanto a ganancia de peso en las hembras, pero no hubo diferencia estadísticamente significativa en los machos, - a pesar de que los machos alimentados con maíz no digerido tuvieron ganancias mayores que los alimentados con maíz digerido; la dispersión de los datos hizo insignificante la diferencia. La conversión alimenticia en las hembras alimentadas por maíz no digerido - fué mejor que con el lote alimentado con el maíz digerido.

Por otro lado, la diferencia que pudiera existir sería debida al mayor aporte energético por parte del alimento predigerido.

La utilidad de la predigestión del maíz en términos prácticos tiene aún muchas perspectivas de estu--dio.



APENDICE I.

REACTIVOS. Método de Nelson Somogyi, 1944.

1.- Sulfato de Zn, solución al 5% p/v. Se disuelven - 50 g. de $Zn\ SO_4 \cdot 7\ H_2O$ en agua y se diluye la solución a vol. de 1 lt.

2.- Hidróxido bórico: Solución aproximadamente 0.3 N. Se disuelven 50 g. de $Ba\ (OH)_2 \cdot H_2O$ en agua y se diluye la solución a volumen de 1 lt. Se deja en reposo - durante 2 días en un recipiente cubierto; se decanta o se filtra. Se guarda en frasco de polietileno y se -- protege del bióxido de carbono del aire. Esta solu--- ción se equilibra frente a la solución de $Zn\ SO_4$ como sigue: Se vierten con pipeta, 10 ml. de la solución - de sulfato de Zn en un matríz y se diluyen con 25 ml. - de agua. Se agrega fenolftaleína como indicador y se valora lentamente con la solución de hidróxido de bario, mezclando enérgicamente hasta color rosa definido permanente. Se diluye el más concentrado de los reactivos, si es necesario, de manera que 10 ml. de solución de sulfato de Zinc requieren 10.0 ± 0.1 ml. de solución de hidróxido de bario para alcanzar el punto final.

3.- Sulfato de cobre, solución. Se disuelven 28 g. de $Na_2\ HPO_4$ y 40 g. de tartrato sodicopotásico ($KNa\ C_4H_4-$

$O_6 4 H_2O$) en 700 ml. de agua. Se agregan 100 ml. de NaOH 1N. Se agregan agitando, 80 ml. de solución al 10% (p/v) de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Se agregan 180 g. de sulfato sódico anhidro. Se mezcla bien para que se disuelva y se diluye el volúmen a 1 lt. Se deja en reposo 48 hrs. se filtra para separar las sales de cobre que pudieran precipitar. El reactivo puede usarse por tiempo indefinido.

4.- Solución de arsenomolibdato. Se disuelven 50 g. de molibdato de amonio $(NH_4)_6 Mo_7 O_{24} \cdot 4H_2O$, en una mezcla de 900 ml. de agua y 42 ml. de ácido sulfúrico concentrado. Se disuelven aparte 6 g. de arseniato sódico $(Na_2H AsO_4 \cdot 7 H_2O)$ en 50 ml. de agua y se agrega esta solución a la primera. Se mezcla bien y se incuba a $37^\circ C$ durante 48 hrs. Se guarda en un frasco color ámbar a temperatura ambiente. El color debe ser a amarillo; si es azul verdoso se deshecha.

5.- Estándares de glucosa. Se transfiere 1 g. de glucosa anhidra a un matríz volumétrico de 100 ml. se disuelve y se diluye hasta la marca. Estándares de trabajo:

Se introducen 10 ml. de la solución anterior en un matríz aforado de 100 ml. se diluye hasta la marca. Se toman diferentes cantidades (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y-

1.0 ml.) de la solución de trabajo, se completa a 1 ml. con agua destilada.

PROCEDIMIENTO.

- 1.- Se introducen 1 ml. de muestra problema o de la dilución de la solución estándar en 1 lt.
- 2.- Añadir 1 ml. de sulfato de zinc al 5% y 1 ml. de $\text{Ba}(\text{OH})_3$ 0.3N.
- 3.- Centrifugar a 5,000 r.p.m., cinco minutos.
- 4.- Del sobrenadante se toma 1 ml. Se añade 1 ml. de reactivo de sulfato de cobre y 1 ml. de NaOH 1N.
- 5.- Colocar en baño maría con agua hirviendo 20 minutos.
- 6.- Dejar enfriar y añadir 6 ml. de agua destilada.
- 7.- Añadir 1 ml. de reactivo arsenomolibdato.
- 8.- Desarrollar el color 10 minutos y leer a 540 nm. - en colorímetro.

APENDICE II.

I) Tinciones empleadas: Reactivos y Métodos. (Cowan, Steel, 1974) .

1.- Tinción de Gram Reactivos.

Oxalato de sodio-cristal violeta

Sol. A cristal violeta 10 g.

etanol al 95% 100 ml.

Sol. B oxalato de amonio al 1% en agua.

Para usar, mezclar 20 ml. de A y 80 ml. de B.

2.- Lugol-yodo

Yodo 5 g.

Yoduro de potasio 10 g.

Agua 100 ml.

Disolver el KI y el yodo en 10 ml. de agua, ajustar el volúmen con agua destilada. Para usar, diluir 1:5 con agua destilada

3.- Alcohol acetona.

Alcohol 50 ml.

Acetona 50 ml

4.- Safranina.

Solución acuosa al 0.5%

Método:

Aplicar el oxalato de amonio-cristal violeta 1 minuto

Lavar con agua.

Aplicar la solución de Lugol.

Lavar con agua.

Decolorar con alcohol acetona

Lavar bien con agua

Contrateñir con safranina por 1 min.

5.- Tinción para esporas (Shaefer, Fulton, Cowan, -
1974)

Empapar el portaobjetos con una solución de ver
de malaquita al 5% y vaporizar 1 minuto. Se pue
de omitir la vaporización dejando actuar el co-
lorante 10 minutos.

Lavar con agua corriente

Teñir con safranina al 5% durante 15 seg.

Enjuaga con agua y dejar secar

Los cuerpos bacterianos se tiñen de rojo, las es
poras de verde.

II) Preparación de los medios de cultivo y pruebas -
de caracterización.

Medio para cuentas totales. Peptona-extracto de
levadura. (Hungate, 1969)

Bacto peptona	10 g.
Extracto de levadura	2.5 g.
Glucosa	2.0 g.

Agar	20 g.
Cisteína	0.5 g.
Agua	1,000 ml.

Disolver los ingredientes por calentamiento. Esterilizar a 115°C, 20 minutos.

Medio para amilolíticos.

NaHCO ₃	9.8 g.
KH ₂ PO ₄	7.0 g.
KCl	0.57 g.
NaCl	0.5 g.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.12 g.
CaCl ₂	0.12 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.5 g.
Cisteína	0.5 g.
Almidón	20.0 g.
Agar	15.0 g.
Agua	1,000 ml.

El almidón se prepara mezclándolo con agua hirviendo unos 60 ml. hasta formar una crema suave. Se agrega a las sales con el agar fundido, se mezcla y se esteriliza al 115°C por 10 minutos.

Base agar rojo de fenol. Para observar fermentación de carbohidratos. (Difco Manual 1960).

Extracto de carne	1 g.
-------------------	------

Peptona	10 g.
NaCl	5.0 g.
R rojo de fenol	0.025 g.
Agar	15 g.
Agua	1,000 ml

Se añade 1% del carbohidrato. Colocar en tubos y esterilizar a 15 lb, 15 minutos. Para bacterias aerobias se usa el medio inclinado, las anaeróbicas se pueden inocular en el medio fundido a 45°C.

Caldo nitrato	(Lavage et al, 1970)
Extracto de carne	3 g.
Peptona	5 g.
KNO ₃	1 g.

Para determinar la reducción de nitrato a nitrito, se inoculan tubos de caldo nitrato con un cultivo puro de la cepa que se estudia. Se incuban los tubos a 37°C por 24 hrs. El medio se prueba para presencia de nitritos añadiendo unas gotas de solución de ácido sulfanílico y de solución de alfa-naftilamina. El reactivo de ácido sulfanílico se prepara disolviendo 8 g. de este ácido en 1,000 ml. de ácido acético 5 N. El reactivo de la alfa-naftilamina consiste en 5 g. de este compuesto, disueltos en 1,000 ml. de ácido acético 5 N. Se añaden unas 2 gotas de cada reactivo. Un color rosa o rojo in

dica la presencia de nitrito reducido a partir de nitra
to.

Medio SIM (Difco Manual 1960)

Extracto de carne	3 g.
Peptona	30 g.
Fierro neptonizado	0.2 g.
Tiosulfato de sodio	0.025 g.
Agar	3 g.
Agua	1,000 ml.

Esterilizar a 15 lb, 15 minutos.

Este medio se emplea para observar la producción de ácido sulfhídrico, la producción de indol y la movilidad. - La movilidad se puede apreciar por ser un medio semisólido, la producción de H₂S por ennegrecimiento del medio - y la producción de indol añadiendo 1 ml. de eter etílico sobre la superficie del medio, se agrega 1 ml. de reactivo de Ehrlich, la presencia de color púrpura en la inter fase en 5 minutos indica indol.

El reactivo de Ehrlich se prepara disolviendo 1 g. de p-dimetilaminobenzaldéido en 95 ml. de etanol al 95% y 20 ml. de ácido clorhídrico concentrado.

Gelatina nutritiva	(Lapage et al, 1970)
Extracto de carne	3 g.

Peptona	5 g.
Gelatina	120 g.
Agua	1,000 ml.

Añadir el agua a la gelatina y dejar por 15 min. calentar para disolver la gelatina, añadir y disolver los demás ingredientes. Ajustar el pH a 7. Esterilizar a 121°C durante 15 min.

Inocular el medio e incubar a 37°C, por 15 días, cada 3 días enfriar el tubo para observar si hay licuefacción.

Actividad de catalasa. (Cowan, Steel, 1974)

Crece el microorganismo en extracto de levadura, peptona inclinado, incubar por 24 hrs. a 37°C. Añadir 1 ml. de H₂O₂ al 1% por la pendiente y examinar inmediatamente y después de 5 min para observar producción de gas si hay actividad de catalasa. Los cultivos incubados anaeróbicamente deben exponerse al aire al menos por 30 min. antes de añadir el H₂O₂.

Rogosa SL. (Rogosa et al, 1951)

Triptona	10 g.
Extracto de levadura	5 g
Dextrosa	10 g.
Arabinosa	5 g.

Sacarosa	5 g.
Acetato de Sodio	15 g.
Citrato de Amonio	2 g.
Fosfato monopotásico	6 g.
Mg SO ₄ .7H ₂ O	0.54 g.
Mn SO ₄	0.12 g.
Fe SO ₄	0.03 g.
Monooleato de sorbitol	1 g.

Suspender en 1,000 ml. de agua destilada fría. -
Añadir 1.32 ml. de ácido acético glacial, calentar a
ebullición con agitación ocasional y hervir 3 min. No
requiere autoclaveado. pH final: 5.4 a 25°C.

Este medio se puede solidificar por la adición -
de agar al 2.5%.

BIBLIOGRAFIA

Acord C.R., Mitchell G.E., Little C.O. and Karr M.E.
(1966).

"Nitrogen sources for starch digestion by rumen
microorganisms".

J. Dairy Sci. 49: 1519-1522

Aiba S., Humphrey A., Mills N., (1973).

"Biochemical Engineering".

Academic Press. New York, P. 27-30

Appleby G.C. (1955).

"The isolation and classification of proteolytic
bacteria from the rumen of the sheep"

J. Gen Microbiol 12: 526-530

Balch D.A. and Rowland S.J. (1957).

"Volatile fatty acids and lactic acid in the ---
rumen of dairy cows receiving a variety of diets".

Brit. J. Nutrition, 11: 288-296

Bryant M.P. and Small N. (1956).

"The anaerobic monotrichous butyric acid producing
curved rod-shaped bacteria of the rumen"

J. Bact 72: 16-22

Bryant M.P. (1956).

"The characteristics of strains of Selenomonas --
isolated from bovine rumen contents".

J. Bact. 72: 162-168

Bryant M.P., Small N., Bowma C. and Chu H. (1958).

"Bacteroides ruminicola n.s.p. and Succinimonas -
amylolytica the new genus and species"

J. Bact., 76: 15-23

Caldwell M.L. and Adams M. (1950)

"Action of certain alpha amylases".

C.S. Hudson and S.M. Cantor (ed).

Advances in Carbohydrate Chemistry.

Academic Press. New York, 5: 229-266

Chandler P.T., John E. y Miller C.N. (1975)

"Lactational response of dairy cows inoculated with
live adapted rumen microorganisms".

J. of Dairy Sci 58: 1660-1665

Clarke R.T.J. (1959)

"A dextran fermenting organism from the rumen
closely resembling Lactobacillus bifidus"

J. Gen. Microbiology, 20: 549-553

Coleman G. and Elliott W.H. (1962)

"Studies on Alfa-amylase formation by Bacillus - subtilis.

Biochem. J. 83: 256-263

Cottym B.G. and Boueque Ch. V. (1968)

"Rapid method for the gas chromatographic determination of volatile fatty acids in rumen fluid"

J. Agric. and Food Chem . 16: 105

Cowan S.T. and Stell K.J. (1974)

"Manual for the identification of medical bacteria".

Cambridge University Press, London. 2^o. Ed.

Delwiche E.A. (1957)

"Genus Propionibacterium"

R.S. Breed, E.G.D. Murray and N.R. Smith . -----

Bergey's Manual of determinative bacteriology.

Williams and Wilkins Co. Baltimore. 7^o. Ed.

Pag. 569-576

Difco Manual of dehydrated culture media and reagents -
for microbiological and clinical laboratories pro

cedures. (1960)

Difco, Labs. 9th Ed.

Elías Iglesias A. (1971).

"The rumen bacteria of animals fed on a high --
molasses urea diet".

Tesis doctoral. University of Aberdeen. England

Fisher E.H. and Stein E.A. (1960)

"Alpha-amylases".

P.D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback (ed.)

The enzymes. Academic Press. New York, -----

4: 313-340

Fogarty W.M. (1971)

"Application and potential of enzymes in industry
and medicine".

Tech. Ireland, 2: 19-22

French D. (1960)

"Beta-amylases"

P.D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback (ed.)

The enzymes. Academic Press. New York,

4: 345-365

Greenwood C.T. and Milne E.A. (1968)

"Starch degrading and synthesizing enzymes a discussion on their properties and action pattern".

M.L. Wolfrom and R.S. Tipson (ed.)

Advances in Carbohydrate Chemistry. Academic - Press. New York, 23: 305-307.

Hamlin L.J. and Hungate R.E. (1966)

"Culture and physiology of a starch-digesting -- bacterium (Bacteroides amylophylus n.s.p.) from the bovine rumen".

J. of Bacteriology, 72: 548-554

Harris M.A., Reddy C.A. and Carter R.C. (1976)

"Anaerobic bacteria from the large intestine of - mice".

Appl. Envirom. Microb. 31: 907-912

Higashihara M. and Okada S. (1974)

"Studies on Beta-amylase of Bacillus megaterium - Strain N^o 32".

Agr. Biol. Chem. 38: 1023-1029

Hobson P.N. and Mac Pherson N. (1952)

"Amylases of Clostridium butyricum and a Streptoco

ccus isolated from the rumen of the sheep".

Bioch, J. 52: 671-679

Hobson P.N. and Mann S.O. (1961)

"The isolation of glicerol fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep".

J. Gen. Microb., 25: 227-240

Hungate R.E., Dougherty R.W., Bryant M.P. and Cello --
R.M. (1952)

"Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep".

Cornell Vet., 423-449

Hungate R.E. (1957)

"Microorganisms in the rumen of cattle fed a constant ration".

Canad. J. Microb., 3: 289-298

Hungate R.E. (1969)

"A roll tube method for cultivation of strict anaerobes".

J.R. Norris and D.W. Ribbons (ed.)

Methods in microbiology, Academic Press, London,

3B: 117-132

Kenworthy R. (1973)

"Intestinal microbial flora of the pig".

D. Perlman (ed.)

Advances in applied microbiology. Academy Press

London, 16: 31-54

Kluyver and Van Niel. (1957)

"Genus Peptostreptococcus"

R.S. Breed, E.G.D. Murray, and N.R. Smith.

Bergey's Manual of determinative bacteriology.

Williams and Wilkins Co. Baltimore 7^o Ed. 533-541

Kuo N.J. and Harman P.A. (1966)

"Isolation of amylolytic strains of -----

Thermoactinomyces vulgaris and production of ----

Thermophilic actinomycete amylases".

J. Bact. 92: 723-726

Lapage S.P., Shelton J.E. and Mitchell T.G. (1970)

"Media for the maintenance and preservation of bac
teria".

J.R. Norris, D.W. Ribbons, (ed.)

Methods in Microbiology, Academic Press. London,

3A: 1-133

Lehninger A.L. (1972).

"Biochemistry".

Worth Publishers New York.

Linko Y, Saarinen P. and Linko M. (1975)

"Starch conversion by soluble and immobilized ---
Alpha-amylase"

Biotechnology and Bioengineering. XVII: 153-165

Loper D.C., Little C.O. and Mitchell G.E. (1966)

"In vitro procedure for studying starch digestion
by rumen microorganisms"

J. Anim. Sci. 25: 128-131.

Mac Pherson M.J. (1953)

"Isolation and identification of amylolytic ----
Streptococci from the rumen of sheep".

J. Pathol. Bacteriology, 66: 95-102

Marshall J.J. (1974)

"Application of enzymic methods to the structural
analysis of polysaccharides"

R.S. Tipson and D. Horton (ed.)

Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemis

try, Academic Press. New York, 30: 285-302

Mc Wethy S.J. and Hartman T.A. (1977)

"Purification and some properties of extracellular Alpha-amylase from Bacteroides amylophilus"
J. Bacter. 129: 1537-1544

Moore J.E., Johnson R.R. and Dehority B.A. (1962)

"Adaptation of an in vitro system to the study of starch fermentation by rumen bacteria"
J. Nutrition. 76: 414-422

Myrback K. (1948)

"Products of the enzymic degradation of starch - and glycogen"
W.W. Pigman and M.L. Wolfrom (ed.)
Advances in Carbohydrate Chemistry. Academic -- Press, New York, 3: 251-310

Nelson N. (1944)

"A photometric adaptation of the Somogyi method - for determination of glucose"
J. Biol. Chem. 153: 375-380

Pacheco V. (1976)

"Fermentación láctica del proceso Biofermel"
Tesis para el grado de Maestría. Facultad de
Química. UNAM.

Prevost P.J. and Doetch R.N. (1960)

"Biological characteristics of and obligate -
anaerobic amylolytic coccus"
J. Gen. Microb. 22: 259-264

Prevot . (1957)

"Genus Catenabacterium"
R.S. Breed, E.G.D. Murray and N.R. Smith (ed.)
Bergey's manual of determinative bacteriology
Williams and Wilkins Co. Baltimore. 7^o. Ed.
P. 560-563

Reussner G., Andros J. y Thiessen T. (1963)

"Studies on the utilization of various starches
and sugars in the rat".
J. Nutr. 80: 291-298

Robyt J. and French D. (1964)

"Action pattern and specificity of amylase from -
Bacillus polymyxa".

Arch. Biochem. Biophys. 104: 338-343

Rogosa M., Mitchell J.A. and Wiseman R.F. (1951)

"A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli".

J. Dental. Res. 30: 682-689

Salanitro J.P., Blake I.G. and Muirhead P.A. (1974)

"Studies on the cecal microflora of commercial -- broiler chickens"

Appl. Microbiol. 28: 439-447

Salanitro J.P., Fairshilds I.G. and Zgornichi Y.D. ---
(1974)

"Isolation, culture characteristics and identification, of anaerobic bacteria from the chicken --- cecum".

Appl. Microb. 27: 678-687

Salanitro J.P., Blake I.G. and Muirhead P.A. (1977)

"Isolation and identification of fecal bacteria - from adult swine"

Appl. Env. Microb. 33: 79-84

Salisbury R.L., Hoeffler J.A., and Luecke R.W. (1961)

"Effect of heating starch on its digestion by -
rumen microorganisms"

Anim. Sci. 20: 569-572

Takasaki Y. (1976)

"Productions and utilizations of Beta-amylase --
and pullulanase from Bacillus cereus var mycoides"

Agr. Biol. Chem. 40: 1515-1522

Takasaki Y. (1976)

"Purifications and enzymatic properties of Beta--
amylase and pullulanase from Bacillus cereus var
mycoides.

Agr. Biol. Chem. 40: 1523-1530

Tietz N.W. (1972)

Química, Clínica Moderna. Ed. Interamericana, -
México.

Trei J., Hale W.H. and Theurer B. (1970)

"Effect of grain processing on in vitro gas pro--
duction".

J. Anim. Sci. 30: 825-831

Troelsen, J.E. (1969)

"Outline of procedure for in vitro digestion of --
forage samples".

Research Station, Swift Current, Saskatchewan ---
1: 22-26

United States Patent Office. (1970)

Armbruster F.C. and Jacaway W.A. 3,549,496

United States Patent Office (1970)

Seidman M. and Royal C.L. 3,551,293

Upton M.E. and Fogarty W.M. (1977)

"Production and purification of thermoestable amy-
lase and protease of Thermomonospora viridis". --
Appl. and Env. Microb. 33: 59-64

Vogel A.I. (1960)

Química Analítica Cuantitativa. Vol. 1, Editorial
Kapelusz. Buenos Aires.

Walker G.J. and Hope P.M. (1963)

"The action of some Alpha-amylases on starch -- granules".

Biochem. J. 86: 452-462

Walker G.J. and Hope P.M. (1964)

"Degradation of starch granules by some amylolytic Bacteria from the rumen of sheep".

Biochem. J. 90: 398-407

Yabuki M., Ono N., Hoshino K. and Fukui S. (1977)

"Rapid induction of Alpha-amylase by nongrowing - mycelia of Aspergillus oryzae".

Appl. Envir. Microb. 34: 1-6

Yamane K., Yamaguchi K. and Maruo B. (1973)

"Purification and properties of a cross reacting material related to Alpha-amylase and biochemical comparison with the parent Alpha-amylase".

Bioch. et. Bioph. Acta. 295: 323-340

INDICE DE FIGURAS

		Pág.
FIGURA 1	Acción de la α -amilasa de malta	19
FIGURA 2	Efecto del ajuste del pH cada 24 h en el patrón pH vs tiempo	57
FIGURA 3	Placa de almidón-sulfato de amonio	66
FIGURA 4	Magnificación de la placa de almidón-sulfato de amonio	67
FIGURA 5	Microorganismos formadores de las colonias cremosas	68
FIGURA 6	Microorganismos que crecieron en condiciones anaerobias	69

INDICE DE CUADROS

		Pág.
CUADRO 1	Propiedades físicas de las Alfa-amilasas	13
CUADRO 2	Propiedades de las β -amilasas -- cristalinas	16
CUADRO 3	Constantes físicas de las β -amilasas	17
CUADRO 4	Composición de las saliva artificial y del medio de cultivo . .	34
CUADRO 5	Efecto de la concentración de <u>es</u> <u>tiércol</u>	50
CUADRO 6	Efecto de la agitación y la temperatura	52
CUADRO 7	Efecto de la relación carbono/ <u>ni</u> <u>trógeno</u> en el medio de cultivo .	54
CUADRO 8	Distribución del nitrógeno durante la fermentación	58
CUADRO 9	Acción de los microorganismos -- amilolíticos en el ensilado sobre el almidón de maíz	60
CUADRO 10	Características bioquímicas y -- morfológicas de las cepas crecidas en diferentes medios	63
CUADRO 11	Ganancia de peso, consumo de <u>ali</u> <u>mento</u> y conversión alimenticia -	

	de ratas alimentadas con diferen <u>tes</u> carbohidratos	76
CUADRO 12	Ganancia de peso y conversión -- alimenticia de ratones alimenta- dos con maíz predigerido	78