

2 g
224

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION E IDENTIFICACION DE CEPAS
DE HONGOS PRODUCTORAS DE DEXTRANASA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

SERGIO RUBEN TREJO ESTRADA

MEXICO, D.F.



1989

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
PALEO DE COPIA



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

I N D I C E

INTRODUCCION	1
--------------	---

ANTECEDENTES

I. La Dextrana	3
II. Dextranasas	6
III. Producción de Dextranasas	9
IV. Caracterización morfológica, Taxonomía y Manejo de cepas	18
V. Las Cepas	20

MATERIAL Y METODOS

I. Procedimientos de Cultivo y Cinética de la Fermentación	22
II. Caracterización Morfológica y Taxonomía	27
III. Preservación y Mantenimiento de las Cepas	29

ESQUEMA DE TRABAJO	30
--------------------	----

RESULTADOS

I. Cultivo Sumergido. Resultados experimentales	31
II. Resultados de Morfología y Taxonomía	36

DISCUSION Y CONCLUSIONES

I. Las Cepas de <i>Penicillium purpurogenum</i>	42
II. Producción de Dextranasa	42
III. La especie <i>Penicillium purpurogenum</i>	43
IV. Las cepas de <i>Paecilomyces</i>	44
V. Cinética de la Fermentación	44
VI. Relación entre Consumo de Dextrana y Producción de Dextranasa	46
VII. Efecto del Calcio	47
VIII. Efecto del Tipo de Dextrana	48
IX. Morfología Micelial en Cultivo Sumergido	50

<i>X. Conclusiones</i>	50
<i>TABLAS Y FIGURAS</i>	52
<i>APENDICE</i>	88
<i>REFERENCIAS</i>	90

INTRODUCCION

Una de las más importantes áreas de la biotecnología actual, es sin duda alguna la tecnología de enzimas. El uso de estos catalizadores biológicos tiene ya una gran relevancia en los sectores alimentario y farmacéutico (Quintero, 1985).

La biotecnología enzimática abarca la producción, extracción, purificación e inmovilización de enzimas, y esto involucra un gran número de desarrollos en biología, química e ingeniería. El área biológica participa fundamentalmente en dos tipos básicos de desarrollo: la adaptación de enzimas a necesidades específicas, mediante la selección de fuentes microbianas y la obtención de mutantes; y el mejoramiento de metodologías para inducir a los microorganismos a la producción de enzimas selectas.

López-Munguía (1985), afirma que para evitar el rezago de la industria enzimática en México deben impulsarse actividades de investigación y propiciarse la vinculación con el sector productivo, y destaca la importancia de algunos criterios para el establecimiento de proyectos en tecnología enzimática:

1) La inclusión de la producción de enzimas en el desarrollo tecnológico, con el fin de tener autosuficiencia en materia de catalizadores.

2) El apoyo de investigaciones tendientes a la producción de enzimas de uso industrial, incluyendo microorganismos productores e hiperproductores.

3) La evaluación del impacto social de la tecnología enzimática hacia objetivos como:

- + Utilización de residuos agroindustriales.
- + Disminución de la dependencia de la petroquímica.
- + Uso más eficiente de materias primas.
- + Disminución de problemas de contaminación.
- + Reducción de costos energéticos de procesos.
- + Desarrollo de nuevos productos.
- + Incorporación de alimentos no convencionales, y mejoramiento nutricional de los ya existentes.

4) Establecer como prioritarias algunas aplicaciones no usuales de la tecnología de enzimas, que actualmente se encuentran en desarrollo en otros países.

Siguiendo este tipo de criterios, se estableció un proyecto de producción de dextranasas en el Departamento de Alimentos de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM.

Las dextranasas son enzimas producidas por microorganismos, que tienen aplicación industrial en varios sectores. En el sector alimentario, las dextranasas se utilizan principalmente en el proceso de refinación del azúcar y para disminuir la viscosidad provocada por dextranas de microorganismos contaminantes del jugo de caña. Los problemas ocasionados por la viscosidad en este proceso ocasionan importantes pérdidas de azúcar. La hidrólisis enzimática por dextranasas representa una alternativa de solución. También en los sectores químico-farmacéutico y clínico existen aplicaciones importantes de estas enzimas (Gálvez, 1986).

La magnitud de los problemas causados por gomas de dextrana en los ingenios cañeros mexicanos justifica la búsqueda de alternativas de solución, y el establecimiento de proyectos de investigación sobre el uso y la producción de dextranasas (Gálvez, 1986).

De acuerdo a lo anterior se inició la búsqueda de fuentes microbianas de la enzima. En una primera etapa del proyecto, llevada a cabo por Amanda Gálvez y Beatriz Bustos, se efectuó el aislamiento en placa de cepas dextranolíticas de hongos, seguido de una selección de aquellas que producían la enzima en forma extracelular. Dicha selección se llevó a cabo mediante el establecimiento de dos metodologías: a) La evaluación de la formación de un halo de decoloración asociado al crecimiento, en un medio que contiene dextrana azul, y b) La evaluación de la actividad enzimática de sobrenadantes de fermentaciones cortas (96 horas), efectuadas por cultivo sumergido en el medio Kosaric No. 1 (ver apéndice).

En una segunda etapa, y utilizando el criterio de "screening" o selección secundaria, se decidió trabajar con cuatro cepas de hongos filamentosos que resultaron ser las más importantes productoras de dextranasa en la selección primaria. El criterio de selección secundaria, implica la identificación o identificación preliminar de la(s) mejor(es) cepa(s), su manejo, y el estudio de algunos aspectos de su cultivo para la producción a nivel laboratorio. El resultado esperado es la selección de una sola cepa, sobre la que se pueden optimizar las condiciones de cultivo y escalar el proceso (Nakayama, 1981).

1977).

Las dextranas insolubles son producidas por *Streptococcus mutans*, una de las especies de *Streptococci* orales asociados con la caries dental, y son bien conocidas como gomas constituyentes de la placa dental bacteriana (Lawson y Sutherland, 1978).

2. Usos de las Dextranas.

A pesar de que las dextranas son un grupo de polisacáridos muy estudiados, sus aplicaciones reales en la industria son muy pocas y muchos, en cambio, sus usos potenciales.

Dentro de las aplicaciones de las dextranas nativas destacan: la recuperación secundaria de petróleo, la estabilización de agregados de suelo, la composición de defloculantes en productos de papel, la fabricación de suturas quirúrgicas, y en la estabilización e impartición de viscosidad de jarabes de uso alimentario.

Por otro lado, las dextranas no nativas de bajo peso molecular tienen aplicación importante en la industria farmacéutica, donde son utilizadas como sustitutos de plasma y mejoradores del flujo sanguíneo, en concentraciones de alrededor de 6% v/v. Las dextranas clínicas de este tipo son fabricadas a partir de dextranas de *Leuconostoc mesenteroides*, las cuales ofrecen ciertas ventajas, a saber: estabilidad a altas temperaturas, independencia de tipos sanguíneos y enfermedades transmisibles, y baja incidencia de reacciones adversas. Las dextranas con pesos moleculares entre 40000 y 70 000 daltons, presentes en sangre, son fácilmente desechadas por vía renal.

Otros usos comercialmente importantes de las dextranas no nativas son (Sandford, 1979):

- + Sulfato de dextrana, como agente anticoagulante.
- + Dextranas activadas para la inmovilización y preservación de enzimas por conjugación.
- + Dextran-hemoglobina para sustitución de sangre.
- + Dextranas entrecruzadas para la manufactura de geles insolubles como el Sephadex
- + Hierro-dextran, para el tratamiento de la anemia por deficiencia de hierro, en medicina humana y veterinaria.
- + Dextrana incorporada a emulsiones fotográficas para el mejoramiento del proceso de uso de plata.
- + Dextran-calcio, para el tratamiento de la hipocalcemia.

3. Problemas Ocasionados por Dextranas.

Las dextranas participan desfavorablemente en dos aspectos de suma importancia. Por un lado, su formación en la caña y el jugo de caña ocasiona problemas durante los procesos de refinación, cristalización, clarificación y evaporación. Además, como constituyentes de la placa dental bacteriana, desempeñan un papel en la promoción de la caries dental (Godfrey y Reichelt, 1983).

El problema de las dextranas en la industria azucarera esta bien estudiado. La dextrana forma una masa gelatinosa que puede bloquear la filtración y retardar la cristalización (Hontig, 1974). A nivel de la planta misma, al cabo de un día después del corte, y bajo condiciones favorables de cosecha y almacenamiento, la concentración de dextrana puede provocar deterioro y dificultades

durante el proceso de la molienda. Este deterioro ocasiona también una inmediata acción microbiana en el jugo extraído. Sin embargo, los efectos más dañinos de la producción de dextrana radican en la elongación de los cristales, que ocasiona la reducción del crecimiento por cristal y la formación de granos falsos; y en la disminución de la pureza del jugo, que se manifiesta en su polarización, debida al carácter dextrorrotatorio de la dextrana.

Otro problema del jugo de caña es el de la "acidez excesiva", asociado a caña dañada por frío, y relacionado con la formación de goma dextrana.

La dextrana ha sido identificada como la causa fundamental del retardo de la cristalización y la baja eficiencia de filtración, durante la refinación de caña almacenada. En Australia las pérdidas ocasionadas por dextrana se han estimado en un porcentaje superior al 10% de la producción de azúcar (Meade, 1977).

El otro gran problema es el que ocasionan las dextranas formadas por microorganismos de la flora oral. Las dextranas extracelulares que se encuentran en la placa dental parecen tener importancia en la formación de caries. En estudios efectuados con *Streptococcus mutans*, se ha demostrado que el potencial cariogénico de los microorganismos depende de la producción de dextranas que pueden iniciar la agregación celular, y promover la formación de placa (Staat et al, 1973).

4. Alternativas de Solución al Problema de la Dextrana en los Ingenios Azucareros.

a) Métodos Físicos y Químicos.

Se han empleado varios métodos para la eliminación de la dextrana en los ingenios azucareros. Dichos métodos están orientados tanto a la prevención del crecimiento de *Zeuconostoc*, como a la destrucción de la goma misma. Se ha visto por ejemplo, que la reducción al mínimo del tiempo que transcurre entre el corte y la molienda de la caña, disminuye los riesgos de formación de dextrana. Asimismo, se sabe que el almacenamiento del jugo de caña a pH ácido y temperaturas de 40 a 60°C, disminuye efectivamente el crecimiento microbiano y la síntesis del polisacárido (Meade, 1977).

Se han practicado también métodos de prevención del crecimiento microbiano mediante la utilización de agentes bacteriostáticos y bactericidas. Tal es el caso del SO₂, Busan 881, y fluoruro de amonio al 1% (Honig, 1984; Meade, 1977). Sin embargo, los métodos más comunes se basan en la destrucción de dextrana por la aplicación de cal al jugo de caña (Honig, 1974). Mientras que en el equipo (válvulas, uniones, tuberías, etc.), donde las bacterias y gomas se acumulan, el tratamiento periódico con vapor a altas temperaturas ha prevenido la infección del jugo (Meade, 1977).

b) El Método Enzimático.

En la búsqueda de soluciones que eviten el uso de agentes químicos y bacteriostáticos, se han realizado investigaciones para el tratamiento del jugo utilizando dextranasas. El tratamiento enzimático entre los procesos de extracción y clarificación, ha

permitido incrementar la tasa de procesamiento de 256 a 273 toneladas de caña por hora, y se ha reportado que la adición de 3 unidades de la enzima por cada 100 ml de jugo, es suficiente para eliminar el 68.5% de la dextrana en tan sólo 20 minutos a una temperatura de 40°C. Esto ha permitido concluir que los efectos dañinos de la dextrana en la manufactura del azúcar pueden ser exitosamente eliminados mediante el tratamiento con dextranasas (Meade, 1977; Ward, 1985).

II. Dextranasas.

1. Definición.

Dextranasa es la enzima que efectúa la reacción de hidrólisis de la dextrana, su nombre por convención, es: α -D-(1,6)-glucan hidrolasa EC 3.2.1.11 (Godfrey y Reichelt, 1983).

2. Mecanismo de Acción. Propiedades.

Las dextranasas se dividen en dos tipos, dependiendo del lugar donde escinden enlaces en el polisacárido. Así, se denominan endodextranasas si hidrolizan los enlaces internos, y exodextranasas si hidrolizan los enlaces de los extremos de la cadena (Wheatley y Moo-Young, 1977).

La enzima ataca los enlaces glucosídicos α (1-6) de la dextrana, dando como resultado oligosacáridos de varios tamaños. Estos oligosacáridos también pueden ser hidrolizados por la dextrana. Los productos de la hidrólisis dependen tanto del microorganismo como del tipo de dextrana (Fosado, 1986; Wheatley y Moo-Young, 1977). Así por ejemplo, la dextranasa de *Flavobacterium* sp hidroliza más fácilmente las dextranas lineales que las ramificadas (Fosado, 1986).

Sugiura et al (1973) y Walker y Deward (1975) examinaron los productos de la hidrólisis de dextrana, utilizando dextranasas de *Penicillium funiculosum*, y *Paecilomyces lilacinus*, respectivamente. En el primer caso se encontró isomaltosa, isomaltotriosa, isomaltotetraosa, isomaltopentaosa e isomaltodextrinas en la mezcla de reacción, mientras que en el segundo, los productos fueron isomaltosa, isomaltotriosa y D-glucosa. Se sabe que, en general, se encuentra una proporción mayor de disacáridos que de mono y trisacáridos (Jeanes et al, 1953).

Wheatley y Moo-Young (1977) demostraron que una combinación de exodextranasa y endodextranasa permite una mayor degradación de dextrana que la obtenida por la suma algebraica de las actividades individuales de cada una.

Estudios efectuados con dextranasas purificadas (Simonson y Libertá, 1975; Sugiura et al, 1973; 1974¹; 1974²; 1974³; 1975), nos permiten conocer algunas propiedades importantes de las dextranasas provenientes de *Penicillium funiculosum*, *Brevibacterium fuscum*, y *Fusarium moniliforme*:

+ Los puntos de ataque de la dextranasa de *P. funiculosum* en isomaltodextrinas, parecen estar situados primariamente en el segundo y tercer enlace glucosídico a partir del extremo no reductor del sustrato. Al incrementarse el grado de polimerización,

la enzima hidroliza también los cuarto y quinto enlaces glucosídicos.

+ El Co^{++} acelera la descomposición del complejo enzima-sustrato en el caso de la dextranasa de *P. funiculosum*.

+ La dextranasa de *B. fuscum* tiene mayor afinidad por dextranas de bajo peso molecular.

+ El pH óptimo es 5.5 para la dextranasa de *F. moniliforme*, 6.0 para la de *P. funiculosum*, y de 7.0 a 7.5 para la de *B. fuscum*. La temperatura óptima es de 55, 37, y 55°C, respectivamente.

+ La dextranasa de *B. fuscum*, tiene un peso molecular de 5.5×10^4 , y está compuesta por 429 residuos de 17 aminoácidos distintos, 11 moles de azúcares neutros y 3 moles de azúcares aminados.

+ La dextranasa de *P. funiculosum*, con un P.M. = 4.4×10^4 , está constituida por 349 residuos de 18 aminoácidos distintos, 10 moles de azúcares neutros, y 1 mol de azúcares aminados.

+ Las dextranas I y II de *P. funiculosum* tienen puntos isoeléctricos de 3.98 y 4.19 respectivamente, y 4.17 la de *B. fuscum*.

3. Actividad de Dextranasa.

La actividad de dextranasa puede medirse de diferentes maneras, ya sea siguiendo algún cambio en las propiedades físicas del sustrato (viscosidad por ejemplo), o por la producción de azúcares reductores a partir de la hidrólisis de dextrana (Fosado, 1986).

Así, Hattori e Ishibashi (1981) establecen sus unidades de actividad de dextranasa como unidades de viscosidad reducida, y las definen como la cantidad de enzima que reduce a la mitad la viscosidad específica de la muestra en un tiempo de 10 minutos. Las mediciones se realizan en un viscosímetro de Ostwald bajo condiciones definidas. Kosaric et al (1973), considera una unidad de dextranasa como la cantidad de enzima productora de 1 mg equivalente de isomaltosa anhidra a partir de dextrana con P.M. = 70000 en 1 hora a 40°C.

Hultin y Nordstrom (1940) y otros autores, determinan la actividad de la enzima midiendo su poder para liberar azúcares reductores en una mezcla de reacción durante la etapa de velocidad inicial de la hidrólisis. La determinación de azúcares reductores se hace habitualmente mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Se considera correcto expresar la cantidad de dextranasa como miliequivalentes de azúcares reductores/ml x min., por ejemplo: mg de glucosa/ml x min. o mg de isomaltosa/ml x min. (Fosado, 1986).

4. Aplicaciones de la Dextranasa.

a) En la Industria Azucarera.

Como se mencionó anteriormente (sección 1.4.(b)), los problemas ocasionados por la presencia de dextranas en los ingentos azucareros pueden ser efectivamente resueltos mediante el uso de dextranasas.

Scott (1975), reseña las experiencias de Tilbury en el uso de dextranasas para la eliminación de la viscosidad en el jugo de caña. Tilbury, produjo dextranasa desarrollando primero un cultivo de

Xeucosnotec mesenteroides en un medio con sacarosa. Una vez producida la dextrana, la bacteria fue separada, y se inóculo el polímero con un cultivo de *P. funiculosus*. El medio fue mantenido a un pH de 5.5 a 7.0, y 30°C, durante 4 o 5 días. La dextranasa obtenida en el filtrado se disolvió en un buffer acetato a pH 5.3, y se agregó al jugo de caña contaminado con dextrana. La mezcla se mantuvo a 40°C durante varios intervalos de tiempo. En la Tabla Ia., se muestran los resultados de varios ensayos considerando el porcentaje de remoción de la dextrana inicial. En dicha Tabla se ilustra el hecho de que para cada tipo de dextrana y en cada sistema utilizado resulta indispensable determinar la cantidad de dextranasa y el tiempo de reacción óptimos para lograr los mejores resultados. Así, se puede alcanzar el 100% de remoción de dextrana utilizando una concentración diez veces menor de dextranasa, pero incrementando el tiempo de reacción en 5 minutos.

En estudios preliminares realizados en Queensland, Australia, se descubrió que la ventaja principal del tratamiento enzimático radica en el incremento en la eficiencia de filtración del jugo tratado con 8 unidades de dextranasa. El costo del tratamiento enzimático fue estimado en 1.5 dolares por tonelada de azúcar (Ward, 1985).

Un ejemplo del tratamiento enzimático es la utilización de dextranasa 25-LCNovo^{TD} (Industri, Dinamarca), en el que se emplean 10 a 20 g de enzima por tonelada de caña procesada. Los mejores resultados se obtienen a pH entre 4.5 y 6.0, y a temperaturas de 50 a 60°C. El efecto máximo se consigue al adicionar la enzima al jugo crudo entre los procesos de extracción y clarificación, manteniendo la mezcla durante 15 minutos a temperaturas de entre 50 y 55°C, en un tanque colocado entre los calentadores primario y secundario previos al clarificador (Godfrey y Reichelt, 1983).

Tabla Ia. Degradación de dextrana en jugo de caña por la aplicación de dextranasa (Scott, 1975).

Cantidad inicial de dextrana	Dextranasa añadida (unidades/ml)	Período de incubación (minutos)	Remoción de dextrana (%)
1.440	30	30	78.9
1.260	30	30	69.8
0.907	30	30	88.1
0.500	30	30	98.2
2.020	30	15	74.7
0.982	30	15	91.0
0.566	30	15	82.4
0.230	30	15	100.0
0.796	30	15	81.3
0.676	12	15	65.3
0.654	12	10	73.0
0.476	12	10	69.0
0.672	12	20	69.2
0.510	3	20	100.0
0.672	3	10	62.5
0.510	3	10	87.2

b) Aplicaciones en el Area de Salud.

La detección y estudio de microorganismos productores de dextranasa de la placa dental bacteriana (Staat et al, 1973; Takahashi, 1982; Zinchenko et al, 1984), ha contribuido al desarrollo de formulaciones de productos dentales que incluyen esta enzima (Colgate-Palmolive, US 3630924; Merck & Co. Inc., US 3686393). La dextranasa puede remover la dextrana formada por microorganismos de la flora oral, evitando así la agregación celular y la promoción de caries.

Otra importante aplicación de la dextranasa en el área de la salud, consiste en su participación en la hidrólisis de dextranas nativas para la obtención de dextranas de pesos moleculares bajo y medio. Estas dextranas tienen gran aplicación clínica (ver sección I.2), tanto en estado libre (como sustitutos de plasma), como conjugadas formando complejos (Dextrana-Fe, Dextrana-Ca, etc.).

Alsop (1983), encontró que en una selección de dextranasas comerciales se producen diferentes distribuciones de pesos moleculares, dependiendo de la acción de cada una hacia los enlaces $\alpha(1-5)$ y $\alpha(1-3)$ del polímero. Así, se ha demostrado que las enzimas distribuidas por Beckmann producen una pequeña proporción de oligosacáridos en las primeras etapas de la hidrólisis, con una distribución de pesos moleculares comparable a la que ofrece una hidrólisis ácida.

Fosado (1986), analiza las características de la Dextrana- DL[®]. Esta enzima, producida a partir de cultivos de *Chaetomium gracile*, se distribuye en México por ENNEX S.A de C.V., y se presenta como un líquido no viscoso completamente soluble en agua. Con límites óptimos de 4.0 a 7.0 de pH, y 50 a 60°C de temperatura, los beneficios de este producto se ofrecen principalmente para la industria azucarera.

La dextranasa también tiene aplicaciones en tecnologías apropiadas. Tal es el caso de un producto que contiene dextranasa junto con otras enzimas y que, administrado con el alimento, promueve la secreción de leche en ganado vacuno (Kyowa Hakko Co. Ltd. US 4144354).

III. Producción de Dextranasa.

1. Microorganismos Productores.

Muchos microorganismos han sido identificados como productores de dextranasa. En las Tabla Iia, se muestran algunos de los más importantes.

En general, se sabe que las cepas de hongos filamentosos utilizadas para la producción de dextranasa producen una mayor cantidad de dextranasa extracelular cuando se comparan con cepas de levaduras y bacterias. En una selección de cepas de levaduras productoras de dextranasa efectuada en el laboratorio, se encontró que en ninguna de ellas se detectaba producción de la enzima en cultivo agitado, a pesar de que presentarían actividad en placas con dextrana azul (Amanda Gálvez, comunicación personal).

2. Medios de Cultivo.

A pesar de que existen pocos estudios publicados sobre la producción de dextranasas, se conoce un buen número de medios de cultivo desarrollados para distintos grupos de microorganismos productores. En las secciones subsecuentes nos referiremos exclusivamente a aquéllos trabajos en que se utilizan cultivos fúngicos.

Tabla IIa. Microorganismos productores de dextranasa.
(Referencias)

Hongos		Bacterias	
<i>Aspergillus candidus</i>	(10)	<i>Actinomyces israelii</i>	(59)
<i>Aspergillus carneus</i>	(25)	<i>Anthrobacter globiformis</i>	(57)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	(23)	<i>Bacteroides oralis</i>	(72)
<i>Aspergillus insuetus</i>	(79)	<i>Bacillus subtilis</i>	(78)
<i>Aspergillus luchuensis</i>	(31)	<i>Bacillus megatherium</i>	(78)
<i>Aspergillus nidulans</i>	(10)	<i>Brevibacterium fuscum</i>	(66)
<i>Aspergillus terreus</i>	(10)	<i>Erysphaga johnsonii</i>	(29)
<i>Aspergillus ustus</i>	(79)	<i>Flavobacterium multivorum</i>	(24)
<i>Chaetomium gracile</i>	(23)	<i>Flavobacterium spiritivorum</i>	(24)
<i>Chaetomium spirale</i>	(23)	<i>Oerksovia xanthineolytica</i>	(24)
<i>Fusarium moniliforme</i>	(50)	<i>Pireptomyces cinnamomensis</i>	(23)
<i>Fusarium solanii</i>	(9)	<i>Pireptomyces mutans</i>	(75)
<i>Gibberella fujikuroi</i>	(23)		
<i>Rhizoglyphus nigra</i>	(23)		
<i>Rhizoglyphus stamineus</i>	(35)		
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	(21, 28, 30, 54)		
<i>Paecilomyces marquandii</i>	(54)		
<i>Penicillium aculeatum</i>	(40)		
<i>Penicillium citrinum</i>	(10)		
<i>Penicillium chrysogenum</i>	(10)		
<i>Penicillium expansum</i>	(10)		
<i>Penicillium funiculosum</i>	(7, 21, 28, 30, 34, 79)		
<i>Penicillium italicum</i>	(10)		
<i>Penicillium janthinestrum</i>	(10)		
<i>Penicillium luteum</i>	(16)		
<i>Penicillium piscarium</i>	(79)		
<i>Penicillium purpurogenum</i>	(21, 34, 49)		
<i>Penicillium roquefortii</i>	(23)		
<i>Penicillium verruculosum</i>	(22, 30)		
<i>Spicaria violacea</i>	(22, 54)		
<i>Sporotrichum asteroides</i>	(23)		
<i>Verticillium coccorum</i>	(28)		

a) Fuente de Carbono.

La dextrana es el compuesto más utilizado como fuente de carbono en los medios formulados para producción de dextranasas. Esto se debe a que se ha demostrado su papel como inductor de la síntesis de la enzima, en concentraciones de 0.5 a 2.0 % (Madhu y Prabhu, 1984; Reese, 1972).

+ Inducción de la producción de dextranasa.

De las enzimas que una célula produce, algunas son constitutivas, pues se producen en concentraciones sustanciales bajo todas las condiciones de crecimiento. Otras, inducibles, se sintetizan sólo en presencia del sustrato o de análogos del sustrato. Gracias al proceso de inducción, las enzimas de este tipo son formadas sólo cuando son necesarias (Elander y Demain, 1981).

La regulación de la inducción enzimática se lleva a cabo mediante dos tipos de control, uno de tipo negativo, y otro positivo. El control negativo, se ejerce a nivel de la transcripción, y consiste en que la RNA polimerasa se encuentra bloqueada bajo condiciones normales de crecimiento, y se desbloquea sólo en presencia del inductor. En el control positivo, una proteína promotora de la acción de la RNA polimerasa se encuentra activada normalmente, pero puede desactivarse por la acción de un catabolito. Es por esto que a este tipo de control se le denomina represión catabólica (Friefelder, 1985).

Los mecanismos de control negativo han sido descritos sólo para procariontes. Se considera que los eucariontes han desarrollado diferentes mecanismos de control negativo, cuyos detalles continúan en estudio.

El control positivo, raro en procariontes, se encuentra mejor estudiado en sistemas celulares de eucariontes (Brock, 1987).

Se sabe que en algunos hongos, la regulación de la síntesis enzimática está dada por mecanismos de control negativo (inducción), y positivo (represión catabólica) simultáneamente. Tal es el caso de la regulación de la producción de celulasa por *Trichoderma viridae*, y de dextranasa por *Penicillium* (Reese, 1972).

En muchos microorganismos, la síntesis de una enzima puede estimularse o incrementarse si se adiciona el inductor al medio de cultivo. Aunque en la mayoría de los casos el inductor es el sustrato mismo de la enzima, un sustrato modificado puede funcionar también como inductor. Por otro lado, puesto que los polímeros no pueden entrar a la célula por impedimento estérico, parece muy posible que los productos de la hidrólisis sean los verdaderos inductores de las depolimerasas (Reese, 1972).

La inducción efectuada por los productos de la acción enzimática puede ser enmascarada por el papel que estos desempeñan en la represión catabólica. Dicha represión ocurre a concentraciones relativamente bajas (comparativamente con otros sistemas de control negativo), de los oligómeros inductores de la polimerasa correspondiente. Sin embargo, por debajo de una cierta concentración represora, puede manifestarse su capacidad de inducción. De hecho, el efecto inductor de un polisacárido sobre la síntesis de la polisacarasa resulta precisamente de su hidrólisis a disacáridos, los cuales nunca alcanzan concentraciones que actúen en la represión

catabólica, pues son consumidos inmediatamente después de su formación (Reese, 1972).

Para el caso de las dextranasas, se han encontrado varios inductores además de la dextrana. La cetodextrana, que es una dextrana oxidada, incrementa notablemente tanto la tasa de crecimiento celular como la síntesis de la enzima en cultivos de *Penicillium funiculosum* (Reese, 1972). Este incremento se asocia a una baja tasa de hidrólisis del sustrato, que ocasiona bajos niveles de reductores en el medio, mismos que permiten la inducción de la síntesis pero no la represión por catabolito (Brown, 1970).

Dasmohaptra y Thangamani (1975), proponen un mecanismo primario de inducción de la síntesis de dextranasa. Consideran que una pequeña proporción de la enzima, producida de manera constitutiva, libera productos de bajo peso molecular a partir de dextrana, los cuales pueden entrar a la célula e inducir la síntesis más importante de dextranasa.

Los productos de la hidrólisis enzimática de dextrana han sido empleados también como inductores. Madhu y Prabhu (1984) obtienen una alta actividad de dextranasa de *Penicillium aculeatum* cuando utilizan un concentrado de dichos productos como fuente de carbono. Fukumoto et al (1971) estudian el efecto inductor de algunos oligosacáridos en la producción de dextranasa por *P. luteum*. Sus resultados revelan que la isomaltosa, isomaltotriosa, isomaltopentaosa e isomaltohexaosa, son capaces de inducir la síntesis de la enzima, aunque en proporción menor a la dextrana a la misma concentración. Destaca sin embargo, el hecho de que el efecto inductor aumenta al incrementarse el peso molecular del oligosacárido.

Por otro lado, Reese (1972) compara el poder inductor de dextrana, isomaltosa y dipalmitato de isomaltosa, en la síntesis de dextranasa por *Penicillium funiculosum*. La producción de enzima cuando se utiliza el ester como inductor es 500 veces superior a la obtenida con isomaltosa, y sólo un poco mayor que la obtenida con dextrana.

Cualquier método que permita administrar el inductor en forma lenta al microorganismo en crecimiento permitirá mayor producción de enzima y reducirá la represión catabólica. Si el organismo posee una esterasa, los ésteres de disacáridos pueden resultar inductores más potentes que los disacáridos mismos, presumiblemente porque los ésteres no pueden efectuar represión catabólica pero pueden convertirse en el disacárido inductor bajo la acción de la esterasa (Reese, 1972).

El efecto de la concentración de dextrana en la producción de dextranasa ha sido estudiado por Tsuchiya et al (1952) y Fukumoto et al (1971), en cultivos de *Penicillium luteum*, *P. verrucosum* y *P. lilacinus*. La actividad de dextranasa extracelular alcanza su máximo cuando la concentración de dextrana en el medio de cultivo es de 2%. Sin embargo, el incremento en actividad enzimática que se obtiene al aumentar la concentración de dextrana de 1 a 2% no resulta muy significativo.

Madhu y Prabhu (1984), estudian el efecto de distintos tipos de dextrana en la producción de dextranasas. Las dextranasas utilizadas difieren en su origen y peso molecular. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla IIIa.

En dicha Tabla se observa que para una misma concentración de dextrana (1%), el poder que el polisacárido tiene como inductor de la producción de dextranasa se incrementa a medida que aumenta su

peso molecular.

Por otro lado, cuando se utilizan diferentes concentraciones de dextrana de un mismo tipo, se obtienen diferentes niveles de inducción. Así, para la dextrana de P.M. = 40×10^6 la concentración que induce la mayor producción de la enzima es 1.5%.

Tabla IIIa. Efecto de diferentes tipos de dextrana en la producción de dextranasa por *Penicillium aculeatum* (Madhu y Prabhu, 1984).

Fuente de Carbono. Inductor	Concentración (%)	Actividad de dextranasa (unidades/ml)
- Dextrana cruda de <i>Z. mesenteroides</i>	----- 1.0 -----	----- 74.0 -----
- Dextrana P.M. = 40×10^6	----- 0.5 -----	----- 26.5 -----
	----- 1.0 -----	----- 56.0 -----
	----- 1.5 -----	----- 74.5 -----
	----- 2.0 -----	----- 60.0 -----
- Dextrana P.M. = 275 000	----- 1.0 -----	----- 20.0 -----
- Dextrana P.M. = 175 000	----- 1.0 -----	----- 16.5 -----
- Dextrana Rallis P.M. = 150 000 + glucosa	----- 1.0 -----	----- 5.0 -----
- Dextrana P.M. = 17 500	----- 1.0 -----	----- 10.5 -----

b) Fuente de Nitrógeno.

Se han utilizado diversas fuentes de nitrógeno en la composición de medios de cultivo para la producción de dextranasa. Los más comunes son: extracto de levadura, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, peptona, licor de remojo de maíz, y Pharmamedia.

Fukumoto et al (1971) y Madhu y Prabhu (1984), estudiaron el efecto de la fuente de nitrógeno empleada, en la producción de dextranasa por cultivos fúngicos. En el primer estudio se encuentra que la peptona y el NaNO_3 dan los mejores resultados, pero en el segundo, se señala al extracto de levadura como la fuente más apropiada. En la Tabla IVa, se muestran los resultados obtenidos por Madhu y Prabhu (1984).

A pesar de su elevado precio, el extracto de levadura constituye la fuente de nitrógeno más utilizada en los medios de producción de dextranasa. Las concentraciones a las que se emplea van de 0.5 (Guilarte, 1986) a 1% (Kosaric, 1973).

c) Fuente de Fosfatos.

En los medios de producción de dextranasa, el KH_2PO_4 y su base conjugada son los compuestos más usados como fuente de fosfatos y/o buffer. El KH_2PO_4 como fuente de fosfatos se utiliza en diferentes concentraciones: 0.5% (Hultin y Nordstrom, 1949), 0.08% (Guilarte et

al, 1986), 0.2% (Fukumoto et al, 1971), 0.3% (Madhu y Prabhu, 1984), y 0.5% (Gulcho, 1974; Hattori e Ishibashi, 1981). Mientras que el buffer fosfatos se emplea a una concentración de 0.1 M (Kosaric et al, 1973).

Tabla IVa. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de dextranasa por *Penicillium aculeatum* (Madhu y Prabhu, 1984).

Fuente de Nitrógeno	Concentración (%)	Actividad de dextranasa (unidades/ml)
NaNO ₃	0.2	48.3
	0.3	58.3
NH ₄ NO ₃	0.1	45.0
	0.2	47.5
Peptona	0.2	40.0
	0.3	42.5
Extracto de levadura	0.2	70.0
	0.3	50.0
Licor de remojo de maíz	0.1	30.0

d) Sales inorgánicas.

Algunas sales inorgánicas han sido empleadas como constituyentes de medios de cultivo diseñados para la producción de dextranasas. Las más utilizadas son: CaCl₂, MgSO₄, MnSO₄, y FeSO₄. Madhu y Prabhu (1984), analizaron los efectos de sales inorgánicas y quelantes en la producción de dextranasa por *Penicillium aculeatum*.

Es importante conocer los efectos que algunos iones tienen en el crecimiento y la producción de metabolitos fúngicos. El Ca⁺⁺ adquiere especial importancia en sistemas de producción extracelular de enzimas, ya que, aunque se sabe que es un ión no esencial para el crecimiento fúngico, se conocen los papeles que desempeña como activador enzimático y modificador de la estructura de la membrana plasmática (Griffin, 1981).

e) Vitaminas

Aunque muy pocos autores reportan la utilización de vitaminas en el medio de cultivo, Simonson (1975) las incluye en el medio de cultivo de *Fusarium moniliforme*. Los compuestos usados son: tiamina, riboflavina, piridoxina, ácidos pantoténico y nicotínico, e inositol.

f) pH.

Se sabe que en cultivos de hongos, el pH del medio no tiene influencia en el pH citoplásmico, sus efectos sólo pueden observarse

en la superficie celular y en los componentes extracelulares. La mayor parte de dichos efectos se ejerce en realidad sobre los constituyentes del medio, aunque se conocen ejemplos en los compuestos metabólicamente activos de la membrana y pared celulares (Griffin, 1981).

Los hongos son organismos característicamente tolerantes de pH bajo, y la mayor parte presenta un pH óptimo de crecimiento entre 5.0 y 7.0 (Berry, 1975). Sin embargo, el pH puede tener efectos en la producción de una enzima extracelular independientemente de los que tenga en el crecimiento (Eveleigh y Montencourt, 1979).

Para la producción de dextranasa se han utilizado medios de cultivo cuyos valores de pH están entre 5.0 y 7.0, pero los estudios efectuados con respecto a la influencia de este parámetro sobre la producción de la enzima, sugieren valores más básicos. Así por ejemplo, Tsuchiya et al (1952) obtienen la mayor producción, a pH óptimo de 7.0 y 8.0 para *Paecilomyces lilacinus* NRRL 696, y *Penicillium funiculosum* NRRL 1132, respectivamente. Simonsen y Liberta (1975), obtienen la mayor actividad extracelular de dextranasa en cultivos de *Fusarium moniliforme*, cuando utilizan un pH inicial de 8.0, mientras que Fukumoto et al (1971), obtienen para *P. lutum*, un pH óptimo de producción de 5.0. Además, algunas especies productoras de dextranasa tienen un pH óptimo de crecimiento alrededor de 7.0. Tal es el caso de *Paecilomyces marquandii* y *Paecilomyces lilacinus* (Samson, 1974).

3. Condiciones de Cultivo.

a) Inóculo.

Actualmente se reconoce que la consistencia de los resultados experimentales en micología industrial recae en buena medida en la estandarización del inóculo. Se han utilizado varios tipos de inóculo en la iniciación de cultivos fúngicos. Ya sea micelio o esporas, el material biológico inicial debe tener la misma viabilidad y la misma concentración cuando se agrega al medio de cultivo (Griffin, 1981).

Cuando se dispone de una buena esporulación, la opción más conveniente es un inóculo de esporas. Su resistencia a condiciones adversas, y su viabilidad aún bajo condiciones severas de preservación, las hacen preferibles a los cultivos vegetativos (Hockenfull, 1980).

En cultivos de hongos productores de dextranasa, se han utilizado tanto inóculos vegetativos como esporas. Los cultivos miceliales se transfieren en fase de crecimiento a una concentración del 5% del volumen del cultivo siguiente (Gutcho, 1974; Kosaric et al, 1973).

La edad de las esporas y su concentración en el inóculo dependen de la cepa y de las condiciones de esporulación. Para la producción de dextranasa se han empleado esporas de 5 (Hultin y Nordstrom, 1949), 7 (Brown, 1970) y 10 días (Guilarte et al, 1986). La cantidad empleada como inóculo va de 1×10^6 esporas para 70 ml de medio de cultivo (Brown, 1970), a 1×10^7 para 25 ml (Guilarte et al, 1986).

b) Temperatura.

Las temperaturas de incubación empleadas para los cultivos de producción de la enzima han sido: 25°C (Hultin y Nordstrom, 1949; Brown, 1970), 25 a 28°C (Kosaric et al, 1973), y 30°C (Guilarte et al, 1986; Gutcho, 1974).

c) Agitación.

La mayor parte de los estudios orientados a la producción de dextranasa, se han efectuado a nivel de matraz agitado. En estos sistemas se ha utilizado para el medio de cultivo, un volumen del 20% de la capacidad del matraz. Las velocidades de agitación empleadas están entre 200 (Kosaric et al, 1973; Guilarte et al, 1986) y 300 rpm (Brown, 1970). Sin embargo, Dasmohaptra y Thangamanil (1975), reportan mayor producción de dextranasa de *Penicillium janthinellum* cuando utilizan cultivos estacionarios en lugar de agitados.

d) Tiempo de Cultivo.

El cultivo de hongos dextranolíticos se ha llevado a cabo utilizando diferentes tiempos de fermentación, a saber: 4 días (Kosaric et al, 1973); 5 a 9 días (Brown, 1970); 7 días (Guilarte et al, 1986); y 10 días (Gutcho, 1974; Hultin y Nordstrom, 1949).

4. Procesos de Producción de Dextranasa.

Además de las publicaciones científicas sobre la producción de dextranasas, existe una buena cantidad de procesos patentados por grupos de investigación de países como Estados Unidos (Baxter lab Inc. US 3627643; Lever Bros. Co. US 3663371; Brown R.G. US 3699002), Japon (Sankyo Co. US 3702805; Res. Found for Microbial Disease of Osaka University, GB 1433261) y la Unión Soviética (Lomonosov State University, SU 446543).

5. Cinética de la Producción de Dextranasa.

Una de las ventajas del trabajo a nivel laboratorio es que podemos estudiar una serie de aspectos del cultivo microbiano, que nos permitirán conocer la relación que guarda la síntesis de la enzima extracelular con parámetros como el crecimiento celular, el consumo de nutrientes, o la síntesis de proteínas.

Tanto el peso seco como el consumo de nutrientes pueden utilizarse para la estimación de la biomasa y el establecimiento de una cinética de crecimiento. Mientras que la determinación de proteínas totales en el medio de cultivo, se utiliza en la determinación de la actividad específica (actividad enzimática referida a la proteína total), parámetro que tiene especial importancia para la etapa de purificación de la enzima.

La producción de una enzima, y en general de cualquier metabolito, puede ser trofófica, si está asociada al crecimiento del microorganismo, o idiófática, si está dissociada de él. En el primer caso la producción de la enzima aparentemente no está sujeta

a ningún tipo de represión. En la producción idiofásica en cambio, la liberación tardía de la enzima puede presentarse en respuesta a la aparición diferida de un inductor en el medio de cultivo (Eveleigh y Montenecourt, 1979).

La producción de dextranasa no parece estar asociada al crecimiento celular. Los experimentos de Kosaric et al (1973), Dasmohaptra y Thangamanti (1975), y Guilarte et al (1985), sugieren que el carácter idiofásico de la producción se debe a que los oligosacáridos inductores producidos por hidrólisis de dextrana, aparecen con un desfase del crecimiento celular.

La asociación o disociación entre el crecimiento y la producción de un metabolito, puede ilustrarse en una gráfica de tasas volumétricas. En este tipo de gráficas, se relacionan las tasas de cambio de concentración (Δ concentración/ Δ tiempo) con el tiempo, lo que permite observar si el crecimiento, la producción y el consumo de nutrimentos coinciden o se encuentran desfasados. Sin embargo, la mejor representación de un sistema de este tipo, está dada por modelos matemáticos. En el Cuadro Ia. se muestran las ecuaciones que constituyen el modelo de Luedeking-Piret, en el cual se relaciona la tasa de formación de producto con la tasa de crecimiento celular (1), con la biomasa (2), o con ambas de manera simultánea (3), y que implican asociación, disociación o asociación parcial al crecimiento respectivamente (Aiba et al, 1973).

Cuadro Ia. Ecuaciones cinéticas para la síntesis de productos en procesos fermentativos (Aiba et al, 1973).

- 1) $\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt}$ ----- Asociado al crecimiento
- 2) $\frac{dP}{dt} = \beta x$ ----- Disociado del crecimiento
- 3) $\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta x$ ---- Combinado o parcialmente asociado al crecimiento

Donde:

$\frac{dP}{dt}$ = velocidad de síntesis o aparición de producto

$\frac{dx}{dt}$ = velocidad de crecimiento celular

x = biomasa

α = constante asociada al crecimiento

β = constante de independiente del crecimiento

Kosarić et al (1973), propusieron un modelo matemático distinto para describir la relación entre el crecimiento celular y la producción de dextranasa en cultivos de *Penicillium funiculosum*:

$$\frac{dP}{dt} = (k_1 t + k_2 + 1)\mu + k_1,$$

donde: $\frac{dP}{dt}$ = velocidad de aparición de producto

μ = velocidad específica de crecimiento celular

t = tiempo

k_1 y k_2 constantes.

Este modelo describe un comportamiento idiofásica de producción de la enzima.

6. Morfología en Cultivo Sumergido. Secreción de Enzimas.

Los hongos filamentosos presentan cuatro formas posibles de crecimiento en cultivo sumergido: células semejantes a levaduras; pequeños pellets compactos; grandes pellets flocosos y; crecimiento confluyente en forma filamentososa. La manifestación en el cultivo de estas diferentes formas de crecimiento está en función del organismo empleado, del método y cantidad de inóculo utilizados, de la composición del medio y, finalmente, de las condiciones de cultivo (pH, temperatura, aireación, etc.) (Solomons, 1980).

Las variaciones de la morfología, ocasionan importantes cambios bioquímicos, debido tanto a la forma misma de crecimiento, como a la alteración de las propiedades físicas del cultivo (transferencia de masa, transferencia de O₂, reología, etc) (Solomons, 1975). Sin embargo, la forma de crecimiento tiene sus implicaciones más directas en la tasa de crecimiento y en la concentración celular alcanzada en cultivo. Así, un crecimiento filamentososo, de cinética exponencial, permite alcanzar concentraciones celulares de hasta 60 g/l. El crecimiento en pellets, que sigue una cinética cúbica, solo permite niveles de 10 y 20 g/l (Rhigelato, 1975; Solomons, 1980)

Se conoce poco del transporte de enzimas (particularmente hidrolasas), a través de la membrana y la pared celular de hongos. Sin embargo, se ha hipotetizado que estas enzimas son selectivamente empaquetadas en vesículas, que subsecuentemente se funden con la membrana y liberan su contenido en el espacio cercano a la pared celular (Griffin, 1981).

La modificación de la membrana celular puede promover la liberación de metabolitos de la célula. Para favorecer la secreción de enzimas, se han utilizado polímeros y surfactantes (Eveleigh y Montencourt, 1979). En el caso de la dextranasa, la adición del surfactante Tween 80 (0.1%) al medio de cultivo duplicó la producción de la enzima en *P. funiculosum* (Reese, 1972).

IV. Caracterización Morfológica, Taxonomía y Manejo de las Cepas.

Una de los aspectos fundamentales de los desarrollos biotecnológicos consiste en el conocimiento y manejo adecuado de

los microorganismos que se utilizan.

a) Importancia de la Taxonomía en los Desarrollos Biotecnológicos

La identificación taxonómica de organismos de uso biotecnológico tiene gran importancia. Por un lado, podemos integrar a la especie identificada en el marco del conocimiento biológico, aportando información acerca de la morfología y la fisiología del organismo. Además, la determinación de la especie que se emplea resulta indispensable desde una perspectiva tecnológica.

El hecho de conocer con precisión el género y la especie del microorganismo que se va a utilizar abre las puertas de una gran variedad de información útil que sobre él existe. Por ejemplo (Nakayama, 1981):

- + Actividades biológicas
- + Productos e importancia económica
- + Patogenicidad
- + Producción de toxinas, antibióticos, etc.
- + Ubicación dentro de la legislación sanitaria de células y/o productos derivados.
- + Tipos de inóculo y su desarrollo
- + Manejo y preservación
- + Productos o procesos similares, utilizando la misma especie o especies relacionadas.

La información de este tipo, reviste especial interés si se busca el establecimiento de procesos con aplicación comercial.

b) Morfología y Estabilidad

Las cepas de uso industrial deben poseer ciertos atributos generales, independientemente de la naturaleza del producto y del proceso de ingeniería utilizados. Algunos de ellos son (Nakayama, 1981):

- Estar como cultivo puro, y tener:
- Producción abundante de unidades reproductivas (células, esporas, etc),
- Crecimiento vigoroso para fines de desarrollo del inóculo,
- Producción rápida y fácil recuperación del producto,
- Autoprotección contra contaminaciones microbianas (por pH o producción de inhibidores), y.
- Estabilidad biológica.

Estabilidad biológica, se refiere a la ausencia de cambios morfofisiológicos que afecten de forma alguna el proceso de producción o el producto mismo.

Una cepa productora de enzimas debe ser caracterizada morfofisiológicamente para establecer un control de su estabilidad. El control fisiológico puede basarse en los datos de cultivo y producción del metabolito, mientras que el morfológico habrá de basarse en las descripciones macro y microscópicas que del organismo se hagan.

Dentro de la morfología fúngica están incluidas tanto la morfología colonial como la microscópica. Verna y Herrero (1952), establecen los caracteres más importantes de una colonia fúngica. Pitt (1979) y Samson (1974), establecieron claves taxonómicas de los

géneros *Penicillium* y *Pezizomyces*, respectivamente. Dichas claves se basan tanto en las características de la colonia, como en el análisis microscópico de los organismos.

c) Manejo y Preservación.

La estabilidad de una cepa tiene gran importancia, no sólo en la etapa de producción, sino en las de esporulación y desarrollo de inóculo. La única manera de asegurar la estabilidad consiste en implementar un método adecuado de preservación del microorganismo.

En general, un buen método de preservación debe cumplir con dos requisitos: Asegurar una baja tasa de mutación, y mantener una alta viabilidad del cultivo (Hockenhuil, 1980).

Para *Aspergillus* y *Penicillium*, las técnicas de preservación más utilizadas en la actualidad son: 1) liofilización, 2) secado en tierra, y 3) congelación en N₂ líquido (Hockenhuil, 1980). Sin embargo, Pitt (1979) y Smith (1984) recomiendan el mantenimiento de cultivos en agar a -20°C como una buena opción para *Penicillium* y especies relacionadas.

V. Las Cepas.

Como se mencionó anteriormente (Introducción), en una etapa previa (A cargo de Amanda Gálvez y Beatriz Bustos) se efectuó el aislamiento de cepas productoras de dextranasa extracelular. A partir de esa selección primaria fueron seleccionadas cinco cepas de *Hyphomycetes*, cuya cinética fermentativa se caracterizó en el presente estudio. De ellas, dos fueron identificadas a nivel de especie y una a nivel de género.

El origen y el potencial dextranolítico de cada una de las cepas se muestran en la Tabla Va. Los resultados de actividad de dextranasa fueron obtenidos por Amanda Gálvez y Beatriz Bustos (comunicación personal) en cultivos de 96 horas de duración, utilizando el medio Kosaric No.1 (ver Apéndice). En la Tabla Va constan también la nomenclatura original de las cinco cepas, y la utilizada en este trabajo.

Así, los objetivos del presente estudio son:

1. La caracterización de cuatro cepas de hongos filamentosos con respecto a la producción de dextranasas en cultivo sumergido a nivel de matraz agitado.

2. La identificación taxonómica de los microorganismos (dos) que presentaron mayor producción de enzima en las selecciones primaria y secundaria.

3. El análisis de algunos aspectos de la producción de dextranasa por las dos cepas que resultaron elegidas en la selección secundaria. Dichos aspectos son:

- + El efecto del calcio en la producción de dextranasa.
- + El efecto de dos tipos de dextrana en la producción de dextranasa.
- + La relación entre el crecimiento y la producción de la enzima.

4. La caracterización morfológica de las cuatro cepas estudiadas, para fines de manejo y preservación.

Tabla Va. Características de las cepas utilizadas.

* Identificadas a nivel de especie en el presente estudio
 + Identificada a nivel de género en el presente estudio

C E P A S			
Nomenclatura original	Nomenclatura usada en el presente estudio	Fuente del Aislamiento	Actividad de dextranasa (unidades/ml) 96 hrs en medio Kosaric No.1
Penicillium A	Penicillium purpurogenum A	Aire	13.7
Penicillium B	Penicillium purpurogenum B	Soln. de dextran-sacarasa	15.7
Penicillium C	Penicillium purpurogenum C	Jugo de caña	20.0
6 Rosa	Paecilomyces lilacinus 6R	Dextrana cruda	8.7
Paecilomyces sp.	Paecilomyces sp.	CEPARIO F.Q. UNAM	2.5
Paecilomyces lilacinus NRRL 895	Paecilomyces lilacinus NRRL 895	COLECCION MICROBIANA	1.0
7 Verde	Penicillium sp. 7V	Guarapo	1.5

MATERIAL Y METODOS

1. Procedimientos de Cultivo. Cinética de la Fermentación.

La composición de los medios de cultivo utilizados durante el presente estudio, se muestra en el Apéndice. En lo sucesivo, nos referiremos al medio de cultivo por un nombre seguido del número de lista que le corresponde.

1. Desarrollo del Inóculo.

El inóculo para el cultivo sumergido consiste en esporas suspendidas en agua estéril. La cantidad utilizada es de 1×10^7 esporas para 50 ml de medio de cultivo.

a) Selección del medio de esporulación.

Con el fin de obtener esporas para la composición del inóculo, se seleccionó un medio de cultivo adecuado para la esporulación. Para dicha selección, se procedió a inocular placas de distintos medios sólidos de cultivo, con cada una de las cinco cepas estudiadas. Se utilizaron criterios de abundancia de esporas, homogeneidad del crecimiento y estabilidad de colonia, mismos que fueron evaluados a simple vista, y con ayuda de un microscopio estereoscópico (Zeiss, West Germany, 475052-9901). Los medios probados fueron: H-N No.5, H-N No.6, H-N No.7, Kosart No.4, ENA No.9 y ENA No.10.

El medio de cultivo seleccionado para la producción de esporas fue el H-N No.6.

b) Condiciones de Cultivo.

Una vez seleccionado el medio de cultivo, se procedió a preparar botellas planas para la esporulación. Las botellas de este tipo son las más adecuadas para el desarrollo del cultivo, ya que permiten la observación del crecimiento, además de facilitar la recuperación de las esporas. Un volumen de 30 ml de medio de cultivo, una vez solidificado, alcanza un espesor de aproximadamente 0.7 cm.

Las botellas son inoculadas por siembra en estría a partir de un cultivo madre (preservado en agar a -20°C), e incubadas a 25°C . El tiempo de incubación es de 8 a 10 días en el caso de *Penicillium purpurogenum* y *Penicillium* sp 7V, y de 12 días para los cultivos de *Paezilomyces lilacinus* 6R, *Paezilomyces lilacinus* NRRL 895, y *Paezilomyces* sp bc. Paralelamente se incuban cultivos en placa con el mismo medio de cultivo para la observación de la colonia gigante y el control de la estabilidad morfológica.

c) Resuspensión de Esporas.

Las esporas producidas en las botellas de esporulación son resuspendidas en agua destilada como a continuación se explica: se agregan 10 a 15 ml de agua destilada estéril por botella, se agita

suavemente y se obtiene una suspensión en un tubo de ensayo, de capacidad suficiente para que el volumen de la suspensión no ocupe más de la tercera parte. Para tener una suspensión homogénea, debe agitarse vigorosamente e impedirse la acumulación de las esporas.

d) Conteo de Esporas. Inoculación.

Con el fin de estandarizar el inóculo se efectúa un conteo de esporas a partir de la suspensión.

El conteo se realiza de la siguiente manera:

+ Una gota de la suspensión de esporas se coloca sobre cada una de las celdas de un hemocitómetro (o cámara de Neubauer), y se cubre con un cubreobjetos.

+ La muestra se analiza en un microscopio óptico. Dependiendo del tamaño y color de las esporas, pueden utilizarse los objetivos de 40 o 10 x.

+ Se cuentan las esporas contenidas en 10 cuadros ($0.04 \text{ mm}^2/\text{cu}$) de cada celda.

+ El total de esporas contado en 20 cuadros se encuentra en 80×10^{-6} ml de la muestra, lo que nos permite calcular el número de esporas que contiene 1 ml de suspensión.

El inóculo para cada matraz consiste de 1×10^7 esporas, contenidas en 1 ± 0.5 ml de suspensión.

2. Cultivo Líquido.

a) Medios de Cultivo.

Se utilizaron distintos medios líquidos de cultivo para la caracterización de las cinéticas fermentativas.

+ Caracterización del crecimiento y la producción.

Todas las cepas se cultivaron en el medio Kosaric No.4 para caracterizar la cinética de crecimiento y producción de dextranasa.

+ Diferenciación bioquímica de *Penicillium purpurosogenum*.

Los tres aislamientos originales de *Penicillium purpurosogenum* (A, B y C), fueron cultivados en el medio de Kosaric No.2, con el fin de caracterizar su cinética de crecimiento y producción de dextranasa.

+ Efecto del Ca^{++} .

Las cepas de *Paecilomyces lilacinus* BR y *Paecilomyces* sp. bc

fueron cultivadas en el medio Kosaric No.5, que carece de CaCl_2 , con el fin de evaluar su cinética en ese medio, y comparar los resultados con los obtenidos en medio No.4 (CaCl_2 0.04%). Ambos medios tienen como fuente de carbono dextrana grado industrial y difieren sólo en la presencia del Ca.

+ Efecto del tipo de dextrana.

El efecto que el tipo de dextrana tiene en la síntesis de dextranasa y otros parámetros fue probado en cultivos de *Penicillium lilacinus* 6R y *Penicillium* sp. bc. Para ello, ambas cepas se cultivaron en el medio Kosaric No.3, el cual incluye dextrana T 70 como fuente de carbono. Los resultados han de compararse con los obtenidos en el medio Kosaric No.4.

Los medios Kosaric Nos. 3 y 4, difieren únicamente en el tipo de dextrana que se usa como fuente de carbono. El medio No.3 contiene dextrana T 70 (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden), con un P.M. = 70 000 daltons, mientras que el No.4 incluye dextrana grado industrial (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA), cuyo peso molecular tiene valores desde 5×10^5 hasta 40×10^6 daltons.

b) Condiciones de Cultivo.

El cultivo líquido se efectuó en matraces Erlenmeyer. Una suspensión de esporas se utilizó para inocular por lo menos una unidad experimental, la cual consiste de un duplicado de matraces.

El cultivo se desarrollo bajo las siguientes condiciones:

+ Matraz Erlenmeyer de 250 ml, con 50 ml de medio de cultivo por matraz (20% de su volumen)

+ Agitación de 110 desplazamientos lineales (8.5 cm.) por minuto, en una agitadora marca New Brunswick Scientific Co. Inc. (Edison N. J. USA).

+ Temperatura controlada a 28 ± 1 °C.

+ Tiempo de duración del cultivo, 8 a 10 días.

c) Muestreo

La muestra del cultivo es tomada diariamente en condiciones de esterilidad. Su volumen oscila entre 1 y 2 ml, de forma tal que al octavo día de fermentación, el volumen total del cultivo sea aproximadamente del 30% del volumen inicial. Inmediatamente después, la muestra es centrifugada a 3000 g durante 5 minutos en una centrifuga Damon IEC HT (USA). La pastilla es enjuagada con agua destilada, y secada a 70°C durante 20 a 24 horas. El sobrenadante se divide en dos porciones, una se utiliza para la inmediata determinación de actividad de dextranasa, y la otra se congela a -20°C para la posterior cuantificación de carbohidratos totales y proteína soluble.

Es importante hacer notar que debido al pequeño volumen de la muestra, el peso seco de la pastilla de centrifugación no puede considerarse como una estimación confiable de la biomasa del cultivo. Sin embargo, los datos presentados en la sección de

resultados, son valores de peso seco estimados así.

3. Metodos Analíticos.

El análisis químico de las muestras se llevo a cabo mediante métodos espectrofotométricos, utilizando un espectrofotómetro marca Shimadzu UV-120-02 (Japan).

a) Evaluación de la Actividad de Dextranasa.

La actividad de dextranasa del sobrenadante del cultivo fué estimada por la medición de azúcares reductores liberados a partir de dextrana T 70 (Farmacia, AB Uppsala, Sweden), con P.M. = 70 000 daltons. Los azúcares fueron determinados por una modificación del método original del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Summer, 1924), que está basada en el método reportado por Kosaric et al (1973).

La solución de dextrana esta compuesta de 2.5% ^v de dextrana T 70 en un buffer de acetatos 0.1 M a pH = 5.4.

La evaluación de la actividad enzimática consiste en el cálculo de las velocidades iniciales de reacción, esto es, la cuantificación de los azúcares reductores liberados por unidad de tiempo durante la etapa de velocidad inicial de hidrólisis de dextrana. Para ello, se utilizaron primariamente dos protocolos:

1) A un volumen de 1 ml del sobrenadante del cultivo o de su dilución, se le adicionan 2 ml de solución de dextrana, se agita y se incuba en un baño a 40°C. A partir de esta mezcla se toman muestras de 0.5 ml a diferentes tiempos de reacción, por ejemplo: 0, 5, 10 y 15 minutos. La muestra se adiciona de inmediato a 0.5 ml de reactivo de DNS, y se calienta en un baño de ebullición por 5 minutos para el desarrollo de color. Una vez fría, se mide densidad óptica a 540 nm.

La dilución de la enzima o del sobrenadante debe permitir lecturas de D.O. en un rango de 0.1 - 0.9.

2) Un volumen de 0.333 ml de la solución de dextrana se adiciona a 0.167 ml de sobrenadante (o una dilución de éste), se agita y se incuba en un baño a 40°C. Paralelamente es incubado un blanco de reacción, que consiste en una mezcla con la misma relación 2:1 dextrana-sobrenadante, pero utilizando una muestra de sobrenadante en la que previamente se inactiva la enzima. Al cabo de 10 minutos de incubación se procede a agregar 0.5 ml de reactivo de DNS. El desarrollo de color y la medición de densidad óptica se efectúan de igual forma que en el protocolo (1).

La inactivación de la enzima para el blanco de reacción, se efectúa por calor, colocando la muestra del sobrenadante en un baño de ebullición durante 2 minutos.

La actividad enzimática de la mayor parte de las muestras se determinó siguiendo el protocolo (2). Las razones de esta elección fueron las siguientes:

+ Para las concentraciones de enzima que se manejaron, la relación entre liberación de azúcares y tiempo, es perfectamente lineal, por lo menos hasta los 15 minutos de reacción. De esta

mánera, una única determinación de azúcares reductores liberados a los 10 minutos de incubación representa una buena estimación de la velocidad inicial de la reacción enzimática.

+ De hecho, si para una misma muestra del cultivo se siguen ambos protocolos, se obtienen valores iguales de velocidad inicial de reacción.

+ El protocolo (2) permite la determinación de un mayor número de muestras en el mismo tiempo.

La concentración de azúcares reductores determinada por el método del DNS se basa en una curva estándar de glucosa, cuya ecuación es:

$$D.O. 540 \text{ nm} = (0.62693 \text{ l/g de glucosa})(\text{g de glucosa/l}) - 0.01297,$$

que tiene un coeficiente de correlación $r^2 = 0.99975$

b) Actividad de Dextranasa. Unidades.

Una Unidad de Actividad de Dextranasa (U.A.D.) está definida como un micromol de glucosa liberado por minuto en la mezcla de reacción:

$$U.A.D. = 1 \mu\text{mol glucosa/ minuto}$$

La actividad de dextranasa en el presente estudio, se expresa como la concentración de U.A.D. en el sobrenadante de fermentación, y está definida como las Unidades de Actividad de Dextranasa (U.A.D.) por mililitro de sobrenadante:

$$\text{Actividad de dextranasa} = U.A.D. / \text{ml de sobrenadante del cultivo}$$

c) Determinación de Carbohidratos Totales.

La cuantificación de los carbohidratos totales del sobrenadante de la fermentación, se llevó a cabo siguiendo el método del Fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al (1956).

Utilizando glucosa como estándar, se obtuvo una curva cuya ecuación:

$$D.O. 490 \text{ nm} = (0.010575 \text{ ml}/\mu\text{g de glucosa})(\mu\text{g de glucosa/ml}) + 0.01583$$

tiene un coeficiente de correlación $r^2 = 0.9959$.

d) Determinación de Proteína Soluble Total.

La proteína soluble total del sobrenadante se cuantificó siguiendo el método simplificado de Lowry (Peterson, 1977).

La curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) está descrita por la ecuación:

$$D.O. 750 \text{ nm} = (0.00748 \text{ ml}/\mu\text{g BSA})(\mu\text{g BSA/ml}) + 0.03503,$$

con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.9958$

II. Caracterización Morfológica y Taxonomía.

Las observaciones conducentes a la caracterización de la morfología colonial, se llevaron a cabo con ayuda de un microscopio estereoscópico (Zeiss, West Germany, 475052-9901).

Para la taxonomía y la caracterización microscópica de las cepas se utilizó un microscopio óptico, binocular (Zeiss, West Germany, 473015-9901), calibrado para mediciones en una sola dimensión.

a) Morfología Colonial.

Los caracteres de colonia (como forma, tamaño, consistencia, etc.), se describen siguiendo los criterios de Verna y Herrero (1952), Pitt (1979), y Samson (1974). Los colores descritos se basan en la clave de Kornerup y Wanscher (1978).

La morfología colonial de las cepas de *Penicillium purpurogenum* y *Penicillium* sp. TV, se describe para cultivos en los siguientes medios: CYA No. 8, ENA No. 9, G25N No. 11, H-N No. 6.

Para las cepas de *Pezizomyces*, los medios utilizados para la descripción de la colonia son: ENA Nos. 9 y 10, y H-N No. 6.

b) Identificación Taxonómica de *Penicillium*.

La identificación a nivel de género de *Penicillium purpurogenum* (A, B y C) y *Penicillium* sp. TV, se llevó a cabo siguiendo la clave de Von Arx (1971).

Pitt (1979), establece una clave para la identificación a nivel de especie de las cepas pertenecientes al género *Penicillium*.

Los caracteres utilizados por Pitt (1979) en la clasificación de *Penicillium*, se basan principalmente en caracteres microscópicos, de manera secundaria en los datos de crecimiento en diferentes medios de cultivo y, en tercer término, en las descripciones de morfología colonial. A continuación se exponen de manera resumida los criterios utilizados en la clasificación e identificación de *Penicillium* a nivel de especie.

+ Caracteres microscópicos.

- Estructura del conidióforo

- Estructura del penicilo { monoverticilado
biverticilado
terverticilado

- Dimensiones, forma y características de { Hifas
Estípites
Ramas y rámulas
Métulas
Fialides
Conidios

- Número de ramas, rámulas, métulas y fialides por verticilo.

+ Datos de Crecimiento a los 7 días de incubación

- Registro de formación de colonia
y medición de su diámetro
en diferentes medios y temperaturas
de cultivo

CYA No. 8 a 25°C
EMA No. 9 a 25°C
G25N No. 11 a 25°C
CYA No. 8 a 37°C
CYA No. 8 a 5°C

+ Caracteres de la
colonia

Tamaño y forma de colonia
Color del micelio
Forma de la conidiogénesis
Forma del crecimiento micelial
Textura de la colonia
Color del reverso de la colonia
Exudados y pigmentación soluble.

Para el examen de los cultivos, Pitt (1979) sugiere una metodología:

i) Medición del diámetro de colonia utilizando la técnica de luz transmitida. El diámetro debe medirse exactamente a los 7 días de cultivo y expresarse en milímetros.

ii) Los caracteres de colonia se registran a simple vista o en estereoscopia, utilizando un atlas para la descripción de los colores.

iii) La observación de los caracteres microscópicos se efectúa por microscopía óptica. Se utilizan distintos aumentos para el análisis microscópico.

+ El objetivo de 10x se utiliza para la ubicación de campos visuales, y para la descripción de hábitos funiculosos o coremiales.

+ Con el objetivo de 40x se pueden efectuar observaciones del penicillo completo, y la medición del estípote.

+ Para apreciar formas y texturas, y realizar las mediciones de ramas, mêtulas, filalides y conidios, debe utilizarse el objetivo de 100x o inmersión.

iv) Se recomienda la tinción con fuchsin ácido, y el montaje en lactofenol.

c) Identificación Taxonómica de *Pezizomyces*.

Para la identificación a nivel de género de la cepa *Pezizomyces lilacinus* 6R, se utilizaron las claves de Von Arx (1971), y Samson (1974).

Al hacer la primera revisión del género *Pezizomyces*, Samson (1974) establece una clasificación basada en caracteres de morfología microscópica y colonial.

La metodología de Samson se basa en el análisis de cultivos en medio EMA No. 10, incubados durante 14 días a 25°C. Los caracteres utilizados en la clasificación son:

+ Caracteres de la colonia	{	Diámetro Forma Color Color del reverso Olor Textura Pigmento soluble
----------------------------	---	--

+ Color, forma y dimensiones de	{	Hifas Conidióforos Fialides Conidios
---------------------------------	---	---

+ Presencia forma y dimensiones de ascosporas, clamidosporas y ascomas.

III. Preservación y mantenimiento de las cepas.

Con el fin de mantener la estabilidad de las cepas utilizadas en el presente estudio se implementaron dos métodos de preservación. Ambos métodos son considerados como apropiados para *Penicillium* y géneros relacionados por la Commonwealth Mycological Society (Smith, 1984).

1. Método de preservación de esporas en tierra estéril.

+ Un poco de tierra de río es cernida (malla #10), y secada a 90°C por tres días.

+ La tierra es colocada en frascos viales (5ml aprox.), a que ocupe un poco más de la mitad del volumen del frasco.

+ Se agrega un volumen de agua equivalente en peso al 10% de la tierra del frasco.

+ Se esteriliza tres veces por una hora, a 15 lb de presión y 121°C.

+ Se agregan 0.5 ml de una suspensión de esporas en agua destilada estéril.

+ Se mantiene a temperatura ambiente durante 3 a 5 días, al cabo de los cuales se coloca en refrigeración a 4°C.

Las esporas se mantienen viables y con una baja tasa de mutación por un espacio de uno a cinco años. Para el desarrollo de una colonia, basta con colocar algunas partículas de tierra del preservado en un medio de cultivo apropiado.

2. Método de preservación en agar a -20°C.

Las cepas son mantenidas en agar a -20°C. Para ello son cultivadas en tubo inclinado hasta obtener una colonia madura.

La edad de los cultivos sometidos a congelación, y el medio de cultivo utilizado, dependieron de las características de crecimiento de cada una de las cepas. Para la preservación de *Penicillium purpurogenum* (A, B y C) y *Penicillium* sp. 7V, se utilizaron cultivos en medios H-N Nos. 6 y 7, y CMEAM No. 12, incubados durante 7 días a 25°C. Para la preservación de las cepas de *Pezizomyces* se emplearon cultivos de 14 días de edad, cultivados en medios H-N Nos. 6 y 7, a 25°C.

ESQUEMA DE TRABAJO.

Siete cepas de
Hyphomycetes

{	Penicillium A	(Penicillium purpurogenum A)
	Penicillium B	(Penicillium purpurogenum B)
	Penicillium C	(Penicillium purpurogenum C)
	6 Rosa	(Paecilomyces lilacinus 6R)
	Paecilomyces sp bc	
	Paecilomyces lilacinus NRRL 895	
	Penicillium sp 7V	(7 Verde)

Caracterización morfológica
de la colonia

Diferenciación bioquímica
las cepas Penicillium A, B y C

Cepa A

Caracterización de la
cinética de crecimiento
y producción de dextranasa
(Medio Kosaric No. 4)

Preservación
de cultivos

Selección de las mejores
cepas productoras

1o P. A -- { Identificación } -- P. purpurogenum A } Toxigénicas
P. B -- { taxonómica } -- P. purpurogenum B }
P. C -- { } -- P. purpurogenum C }
2o 6. R -- { } -- Paecilomyces lilacinus 6R }
3o Paecilomyces sp

Selección de
Paecilomyces lilacinus 6R y Paecilomyces sp bc
(No toxigénicas)

Estudios previos a optimización
sobre la producción de dextranasa

Efecto del Ca⁺⁺
{ Medios Kosaric }
Nos. 4 y 5

Efecto del tipo Asociación
de dextrana crecimiento-producción
{ Medios Kosaric } (Medio Kosaric No. 5)
{ Nos. 3 y 4 }

RESULTADOS.

Los resultados del presente estudio se dividen para su exposición en dos secciones. En la sección I se muestran los resultados de la caracterización de las cepas en cultivo líquido en matraz agitado, en cada uno de los medios utilizados. En la sección II se muestran los datos de crecimiento y morfología colonial de todas las cepas, así como los de morfología microscópica y taxonomía para aquellas que se identificaron a nivel de especie.

Para la validación estadística de las diferencias encontradas experimentalmente se utilizó la prueba de *t* de Student, para la diferencia significativa de medias.

I. Cultivo sumergido. Resultados experimentales.

1. Diferenciación fisiológica de *P. purpurogenum* A, B y C.

Los tres aislamientos originales de *Penicillium purpurogenum* (*Penicillium* A, B y C), resultaron ser idénticos tanto en morfología colonial, como en morfología microscópica. Para demostrar si se trataba de variantes fisiológicas se efectuaron cultivos en matraz agitado, utilizando el medio Kosaric No.2, y se analizaron la producción de dextranasa y de peso seco celular. Los resultados se muestran en la Tabla Ir. y en las Figuras 1 y 2. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) en cuanto a producción de dextranasa (Fig. 1.) o a producción de enzima por peso seco (Fig. 2). En experimentos posteriores se utilizó exclusivamente a la cepa *Penicillium purpurogenum* A, considerando que los resultados pueden extrapolarse a B y C.

2. Caracterización de las Cepas como Productoras de Dextranasa.

La caracterización de las cepas como productoras de dextranasa en cultivo sumergido, se efectuó utilizando el medio Kosaric No.4. En estos cultivos fueron estudiadas las concentraciones de dextranasa, peso seco, carbohidratos totales y proteína soluble durante la fermentación. En lo que sigue, se hace una relación de las tablas y figuras donde se muestran los resultados de la cinética de la fermentación de cada cepa:

<i>Penicillium purpurogenum</i> A	Tabla IIIr. -- Figura 3
<i>Penicillium</i> sp. TV	Tabla IIIr. -- Figura 4
<i>Paecilomyces</i> sp. bc	Tabla VIr. -- Figura 6
<i>Paecilomyces lilacinus</i> 6R	Tabla VIIIr. -- Figura 10
<i>Paecilomyces lilacinus</i> NRRL 995	Tabla Xr. -- Figura 13

En la Tabla Or se muestran los resultados de la determinación de proteína soluble y carbohidratos totales en los medios de cultivo Kosaric Nos. 4 y 5. Estos resultados son pues los valores iniciales (tiempo = 0) de dichos parámetros.

En las Tablas de resultados se escriben, además de los

resultados numéricos, algunas observaciones sobre aspecto y morfología del micelio en cultivo sumergido.

En la figura 3 se observa una curva de producción de dextranasa que llega a su máximo entre las 65 y las 90 horas de cultivo. A partir de ese momento, la cantidad de enzima en el sobrenadante de la fermentación disminuye progresivamente. La producción de dextranasa se encuentra asociada en *Penicillium purpurogenum* A. No ocurre lo mismo con respecto a la proteína soluble, cuya concentración se incrementa hasta alcanzar su máximo a las 135 horas. De esta forma, la actividad específica de dextranasa, que alcanza 104.3 UAD/mg prot a las 90 horas de cultivo se reduce a 39.1 UAD/mg prot (la tercera parte aprox.) a las 135 horas (Tabla IIIr.).

En la figura 4 y en la Tabla IIIr, se muestra la escasa producción de dextranasa obtenida en cultivos de *Penicillium* sp. IV. Tanto la producción de proteína extracelular como el consumo de carbohidratos fueron bajos, sin embargo, la producción de biomasa fue elevada e incluso superior a la presentada por *Penicillium purpurogenum* A.

Los resultados de la caracterización del cultivo de *Paezilomyces* sp. bc se muestran en la figura IVr y en la figura 5. En la figura 5 se puede apreciar una disociación entre el crecimiento y la producción de dextranasa. Así, a las 65 horas de cultivo, cuando apenas empieza la producción extracelular de la enzima, la biomasa ha alcanzado su máximo nivel, y más de la mitad de los carbohidratos se ha consumido. La concentración de proteína soluble en el medio de cultivo se incrementa más lentamente que la producción de dextranasa, de tal suerte que la actividad específica aumenta hacia el final de la fermentación.

Un comportamiento parecido se presenta en la cepa *Paezilomyces lilacinus* 6R (figura 10, Tabla VIIIr). En este caso existe también una disociación entre la producción de dextranasa y los parámetros relacionados con el crecimiento (consumo de carbohidratos y producción de biomasa). La producción de proteína soluble se estabiliza hacia las 135 horas de cultivo, mientras que la producción de dextranasa continúa en aumento hasta el final de la fermentación. En ese momento (135 hrs.), la actividad específica de la enzima alcanza un valor de 101.03 UAD/mg prot (Tabla VIIIr).

En el caso de *Paezilomyces lilacinus* NRRL 895 (figura 13 y Tabla Xr), la producción de la enzima tampoco está asociada al crecimiento celular, y sí en cambio a la secreción de proteína.

Las cepas fueron comparadas con respecto a los niveles de actividad de dextranasa, actividad específica de dextranasa, actividad de dextranasa por carbohidratos consumidos, consumo de carbohidratos, y proteína soluble en el sobrenadante de la fermentación. Las cinéticas comparativas de cada uno de estos parámetros, se muestran en las Figuras 20, 21, 22, 23 y 24.

En la figura 20 se compara la producción de dextranasa en las cinco cepas analizadas. En dicha gráfica se observa que la producción de la enzima en cultivos de *Penicillium purpurogenum* A sigue una cinética diferente al resto de las cepas. *Penicillium purpurogenum* A produce la mayor concentración de dextranasa en las primeras 65 horas de cultivo. A partir de ese momento, la cantidad de enzima disminuye progresivamente. El resto de las cepas produce la enzima extracelular más lentamente. La máxima concentración de dextranasa (19.2 UAD/ml) se alcanza en cultivos de *Paezilomyces lilacinus* 6R a las 135 horas.

En la figura 21, en la cual se muestra la cinética comparativa

de la actividad específica de dextranasa, se aprecia un comportamiento semejante al de la figura 20. En este caso, es la cepa *Penicillium purpurogenum* A la que alcanza mayor actividad específica (104.81 UAD/mg prot.), a las 90 horas de cultivo.

La cinética comparativa de producción de dextranasa con respecto al consumo de carbohidratos se muestra en la figura 22. En ella se observa que la cepa que produce la mayor cantidad de enzima, con respecto a la dextrana que metaboliza, es *Paecilomyces lilacinus* BR (2.1 UAD/mg carb, 185 horas de cultivo).

En la figura 23 se muestra que, con excepción de *Penicillium* sp 7v, las cuatro cepas restantes consumen la totalidad de los carbohidratos iniciales en 90 horas de cultivo.

La concentración de proteína soluble presenta un mismo patrón de comportamiento durante los cultivos de las cinco cepas estudiadas (figura 24). En todos ellos, las proteínas alcanzan su mínima concentración hacia las 40 horas de cultivo. A partir de ese momento, las proteínas secretadas incrementan la concentración hasta el final de la fermentación. Las cepas *Paecilomyces* sp bc, *Paecilomyces lilacinus* BR y *Penicillium purpurogenum* A, presentan una elevada producción de proteína extracelular.

En la Tabla Xlr, se sintetizan los resultados de producción de dextranasa en medio No.4, por las cinco cepas estudiadas. En dicha Tabla, se muestran los valores máximos alcanzados por cada cepa con respecto a actividad de dextranasa, actividad específica de dextranasa, y actividad de dextranasa por carbohidratos consumidos.

Las cepas *Paecilomyces* sp bc y *Paecilomyces lilacinus* BR fueron seleccionadas para estudios posteriores. La cepa *Penicillium purpurogenum* A se descartó por pertenecer a una especie asociada a la producción de rubratoxina, una potente micotoxina (Pitt, 1979; Smith, 1985).

3. Efecto del Ca^{++} en la Producción de Dextranasa.

Para conocer el efecto del Ca^{++} en la producción de dextranasa, las cepas *Paecilomyces lilacinus* BR y *Paecilomyces* sp bc fueron cultivadas en un medio sin Ca^{++} (Kosaric No.5). En dichos cultivos fue analizada la producción de dextranasa y peso seco celular, el consumo de carbohidratos, y la concentración de proteína soluble. Los resultados de la cinética de fermentación de esas cepas en medio Kosaric No.5 se muestran en la Tabla VIIr y la Figura 7 (*Paecilomyces* sp bc); y en la Tabla IXr y la Figura 11 (*Paecilomyces lilacinus* BR).

Comparando los resultados obtenidos de las fermentaciones en el medio que contiene $CaCl_2$ (No.4), con los obtenidos en las que se utilizó el medio sin $CaCl_2$ (No.5), podemos apreciar el efecto del Ca^{++} tanto en la actividad, como en la actividad específica de dextranasa. Las Figuras 14 y 15 muestran dicho efecto en cultivos de *Paecilomyces* sp bc y *P. lilacinus* BR, respectivamente.

El Ca^{++} tuvo efecto sólo en uno de los parámetros evaluados en cultivos de *Paecilomyces lilacinus* BR. En dichos cultivos (Figura 15) la actividad específica de dextranasa fue significativamente mayor ($p < 0.01$) en el medio Kosaric No.5 (sin $CaCl_2$) que en el medio No.4 ($CaCl_2$ 0.04%). El efecto del ión, se manifiesta a partir de las 90 horas de cultivo y hasta el final

de la fermentación.

4. Efecto del Tipo de Dextrana en la Producción de Dextranasa.

Tanto *Paecilomyces* sp. bc como *P. lilacinus* 6R fueron cultivados en un medio (Kosaric No. 3), cuya fuente de carbono es la dextrana T 70, con un P.M. = 70 000 daltons. Los resultados de cinética de crecimiento y producción de dextranasa en ese medio se muestran en las Tablas IVr y Vr, y en las Figuras 5 y 9.

Con el fin de conocer el efecto que el tipo de dextrana tiene sobre la producción de dextranasa, deben compararse los resultados del cultivo en medio Kosaric No. 3 (dextrana T 70 P.M. = 70 000), con los obtenidos en el medio Kosaric No. 4 (dextrana grado industrial P.M. = 5×10^6 - 40×10^6). Dicho efecto puede apreciarse en las Figuras 16 y 17.

En la Figura 16 se ilustra el efecto del tipo de dextrana en la actividad de dextranasa, en cultivos de *Paecilomyces* sp. bc (a), y *Paecilomyces lilacinus* 6R (b). En ambos casos, a partir de las 111 horas de cultivo la producción de enzima fue significativamente mayor ($p < 0.01$) en el medio Kosaric No. 3 (con dextrana T 70), que en el medio Kosaric No. 4 (con dextrana grado industrial).

En la Figura 17 se ilustra el efecto que el tipo de dextrana tiene sobre la actividad de dextranasa por peso seco, producida en cultivos de *Paecilomyces* sp. bc (a), y *Paecilomyces lilacinus* 6R (b).

La producción de dextranasa por unidad de biomasa es significativamente superior ($p < 0.01$) cuando se utiliza medio Kosaric No. 3 (dextrana T 70), que cuando se emplea el No. 4. Estos resultados se manifiestan a partir de las 90 horas de cultivo en el caso de *Paecilomyces* sp. bc, y de las 136 horas en el caso de *Paecilomyces lilacinus* 6R.

5. Relación entre Consumo de dextrana y Producción de Dextranasa.

Para conocer la relación que guarda la producción de dextranasa con respecto al crecimiento en cultivos de *Paecilomyces* sp. bc y *P. lilacinus* 6R, asumimos que la concentración de carbohidratos consumidos constituye una buena estimación de la biomasa. Así, para los cultivos de ambas cepas en el medio Kosaric No. 5, se calcularon las tasas volumétricas de cambio de actividad de dextranasa y consumo de carbohidratos. La relación entre las tasas volumétricas y el tiempo se ilustra en las Figuras 8 y 12.

En la figura 8 se muestra un desfase entre la tasa de cambio de concentración de dextranasa y la tasa de consumo de carbohidratos, en cultivos de *Paecilomyces* sp. bc. Dicho desfase se hace particularmente evidente entre las 40 y las 136 horas de cultivo. De igual forma, la figura 12 ilustra la disociación que existe entre la producción de enzima y el consumo de dextrana, en el caso de *Paecilomyces lilacinus* 6R. En este caso, la disociación es mayor entre las 90 y las 230 horas de cultivo.

Con el fin de apreciar más claramente la relación que existe entre el crecimiento y la producción de dextranasa, recurrimos a las ecuaciones del modelo Luedeking-Piret (Aiba et al., 1973).

Para el caso del cultivo de *Paecilomyces lilacinus* 6R,

utilizamos la ecuación de asociación parcial crecimiento-producción:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta$$

mientras que para *Paezilomyces* sp. bc. utilizamos la ecuación de disociación:

$$\frac{dP}{dt} = \beta x$$

en donde:

$\frac{dP}{dt}$ = velocidad de síntesis o aparición de producto.

$\frac{dx}{dt}$ = velocidad de crecimiento celular

x = biomasa o estimador de biomasa

α = constante asociada al crecimiento

β = constante independiente del crecimiento.

todos ellos, términos que podemos sustituir por sus aproximaciones:

$$\frac{dP}{dt} \cong \frac{\Delta D}{\Delta t} = \Delta \text{ Actividad de dextranasa} \\ \Delta \text{ tiempo}$$

$$\frac{dx}{dt} \cong \frac{\Delta Cc}{\Delta t} = \Delta \text{ Carbohidratos consumidos} \\ \Delta \text{ tiempo}$$

$$x \cong Cc = \text{Carbohidratos consumidos}$$

$$\alpha \cong \alpha$$

$$\beta \cong \beta$$

En la Figura 18 se ilustra la relación entre $\frac{\Delta D}{\Delta t} Cc$ y $\frac{\Delta Cc}{\Delta t} Cc$,

según la ecuación: $\frac{\Delta D}{\Delta t} Cc = \alpha \frac{\Delta Cc}{\Delta t} Cc + \beta$.

Los incrementos (Δ), se calculan a partir de la Tabla IXr de *Paezilomyces lilacinus* 6R. Del ajuste por mínimos cuadrados obtenemos: $\alpha = 0.87601$ y $\beta = 0.01056$

con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.9015$.

Así, en cultivos de *Paezilomyces lilacinus* 6R, existe una disociación parcial entre el consumo de carbohidratos y la producción de dextranasa.

En la Figura 19 se ilustra la relación entre $\frac{\Delta D}{\Delta t}$ y Cc , según la ecuación $\frac{\Delta D}{\Delta t} = \beta Cc$.

Los incrementos (Δ) se calculan a partir de la Tabla VIIr. de

Paecilomyces sp. bc. Del ajuste por mínimos cuadrados obtenemos $\beta = 0.01723$, y una correlación $r^2 = 0.9243$.

De lo anterior se deduce que, en cultivos de *Paecilomyces* sp. bc la producción de dextranasa se encuentra totalmente disociada del consumo de carbohidratos.

II. Resultados de Morfología y Taxonomía.

En la Tabla XIIr, se muestran los datos de crecimiento y diámetro de colonias de las cinco cepas analizadas, en siete diferentes medios sólidos de cultivo. Las descripciones de morfología colonial, y de morfología y medidas microscópicas, se exponen, por separado para cada cepa en las secciones correspondientes.

La descripción de los colores se basa en el atlas de colores de Kornerup y Wanscher (1978). A continuación del nombre del color, se escribe el código de la clave seguida por ese autor.

1. *Penicillium purpurogenum*.

a) Caracterización Colonial.

La descripción de la morfología se efectúa para colonias desarrolladas en cultivos de 7 días de edad.

- CYA No. 8 25°C. Colonia circular, plana, de bordes definidos. El crecimiento es denso, uniforme y de media profundidad. El micelio es de color blanco o amarillo. La conidiogénesis, abundante, cubre de color verde mate (26-3E a 26-4E) a toda la colonia. La textura de la colonia le da un aspecto velutinoso, y en algunas ocasiones se presentan surcos poco pronunciados hacia la parte central. La mayor parte de los conidióforos emergen directamente del sustrato, aunque algunos se originan en hifas aéreas. Estas hifas se encuentran entrelazadas en funículos laxos, distribuidos en toda la superficie de la colonia, y se acumulan hacia la parte central, donde en ocasiones presentan una pigmentación roja o amarilla.

El reverso de la colonia presenta pigmentación que va de un color rojo oscuro en el centro (9-7F), a uno rojo claro (8-8C) en la periferia. Al 7° día de cultivo, aproximadamente en el 60% de las colonias se presenta la liberación de un pigmento rojo soluble, que difunde al medio, y antes de 10 días de incubación, en el 100% existe ya una pigmentación de toda la placa. Un cultivo líquido con 5 días de incubación permite recuperar una buena cantidad del pigmento.

En la Figura 25 se muestra la colonia de *Penicillium purpurogenum* en CYA.

- EMA No. 9 25°C. Colonia semicircular u ovalada, plana, de bordes poco definidos. Crecimiento esparcido, poco compacto, de aspecto velutinoso a terroso. Conidiogénesis muy abundante, de color verde (27-4E), similar al de CYA, pero de menor intensidad. Los conidióforos emergen tanto del micelio subsuperficial, como de hifas aéreas dispuestas homogéneamente en toda la superficie de la colonia.

El reverso es incoloro, y la pigmentación soluble ausente. En la mayoría de las colonias se presentan gotas de exudado de color amarillo claro o ambarino, que son más abundantes hacia el centro.

- G25N No.11 25°C. Colonias muy pequeñas, ovales, planas, con bordes definidos. La colonia es de color blanco rosado, de aspecto velutinoso, con un crecimiento únicamente micelial, no hay conidiogénesis. El reverso es incoloro y la pigmentación soluble ausente.

- CYA No.8 37°C. Colonias circulares de color rosa (92-A a 9-3A), de bordes definidos. El crecimiento es compacto y de aspecto velutinoso. La colonia está emergida del medio de cultivo. La conidiogénesis es ausente o presente sólo en la periferia de la colonia. Si está presente, se presenta una pigmentación verde similar a la de CYA 25°C. El reverso es de color rojo oscuro (9-7E) y la pigmentación soluble, similar a la que se presenta en el crecimiento a 25°C, aunque más abundante.

- CYA No.3 5°C. Se presenta solo germinación para formación de microcolonias o, más comunmente, no hay germinación.

b) Caracterización Microscópica.

Los caracteres microscópicos se describen para el crecimiento en CYA No.3 a 25°C. a los 7 días de cultivo.

La estructura microscópica corresponde a la de un *Penicillium* biverticilado, simétrico, con penicillo o escobilla terminal (subgenero *Biverticillium*).

Las dimensiones del penicillo son, en promedio, 22 μ de ancho por 26 μ de largo. Esta estructura, más larga que ancha del penicillo, responde al hecho de que tanto métulas como fíalides se presentan apretadas.

El estípote de los conidióforos cuya base se encuentra en el sustrato, suele ser más largo que aquel de los conidióforos que se originan en hifas aéreas. En el primer caso, se presentan estípotes de 100 a 250 μ de largo, por 2.0 a 3.0 μ de ancho, y en el segundo, de 70 a 200 μ de largo, por 2 a 3 μ de ancho.

Las métulas, 3 a 5 por verticilo, miden de 3.5 a 13.0 μ de largo (11.2 en promedio), por 1.5 a 3.0 μ de ancho. Tanto las métulas como el estípote son del tipo no vesiculado.

Las fíalides son acerosas, con cóculas finas y alargadas. Sus medidas son: 1.5 a 2.3 μ de ancho (2.0 en promedio), por 3.5 a 13.0 μ de largo (11.4 en promedio). Las fíalides se encuentran en número de 3 a 5 por metula.

Los conidios son subesferoidales a elipsoidales, finamente rugosos, y miden de 2.3 a 3.0 μ (2.7 en promedio) en su dimensión mayor. El conidióforo en su totalidad presenta un color verde pálido, aunque los conidios están más intensamente pigmentados.

En la Figura 26 se presenta una microfotografía del conidióforo de *Penicillium purpurogenum* A.

c) Ubicación Taxonómica.

El género *Penicillium*, se caracteriza por tener conidióforos distintivamente diferenciados, de estructura penicilada, y por presentar por conidiogénesis un color verde de colonia.

Dentro del género *Penicillium*, la especie *Penicillium purpurosogenum* se encuentra ubicada dentro del subgénero *Biverticillium*. Este subgénero se caracteriza por la presencia en el conidióforo de sólo dos verticilos, la simetría del penicillo, y la longitud similar de setulas y fialides.

Dentro de *Biverticillium*, a *Penicillium purpurosogenum* se la distingue por la estructura apretada o angosta del penicillo (más largo que ancho), el estípote generalmente mayor de 60 μ , y la liberación de un pigmento soluble de color rojo cuando se cultiva en medio CYA No. 8.

Reino: Fungi
División: Eumycota
Subdivisión: Deuteromycotina
Clase: Hyphomycetes
Orden: Moniliales
Familia: Moniliaceae
Genero y especie: *Penicillium purpurosogenum*

2. *Paecilomyces lilacinus* GR.

a) Caracterización Colonial

Se hace la descripción de colonias cultivadas por 14 días.

EMA Nos. 9 y 10 a 25°C. Colonia plana, circular, de bordes definidos, de aspecto seco y velutinoso y de olor indistinto. El crecimiento es de media densidad a esparcido, y medianamente flooso. El micelio es de color blanco. La conidiogénesis, que cubre casi toda la colonia, le da un color rosa grisáceo (10-3B a 11-3B) en el centro, y rosa claro (10-2A) en la periferia.

El reverso de la colonia es incoloro, y no se presentan ni pigmento soluble ni exudados.

Los conidióforos emergen del micelio sumergido, salvo en la parte central de la colonia donde existen agregaciones de hifas aéreas. La conidiogénesis es notablemente mayor hacia el centro de la colonia.

Las características de la colonia de cultivos en EMA No. 9 y EMA No. 10 fueron similares. Las únicas diferencias estuvieron dadas por crecimiento y esporulación ligeramente mayores en el medio No. 9.

En la Figura 27 se ilustra la colonia de *P. lilacinus* GR en EMA No. 10.

H-N No. 6 25°C. Colonia plana, circular, con un crecimiento más compacto que en medio EMA. Esporulación abundante que cubre toda la colonia desde los primeros días de cultivo.

El color de la colonia, rosa intenso (10-3B a 10-2A), está dado por la conidiogénesis. El reverso es incoloro, y la pigmentación soluble y exudados están ausentes.

b) Caracterización Microscópica.

Esta descripción se hace a partir de preparaciones de colonias

de 14 días de edad, cultivadas en medio EMA no.10 a 25°C.

Micelio vegetativo hialino, liso, septado, de 2.0 a 3.0 μ de ancho.

Clamidosporas ausentes.

Conidióforos de aspecto penicilado que, a diferencia de las hifas, se encuentran pigmentados de un color vináceo o rojo suave, y presentan paredes gruesas, marcadamente rugosas.

Los estípites son septados, de 2.0 a 3.0 μ de ancho (2.9 μ en promedio), y de 340 a 600 μ de largo (440 en promedio). Los de menor longitud (350 μ aprox.), pertenecen a conidióforos que se originan en el micelio aéreo.

Los verticilos, terminales o subterminales, generalmente se presentan como uno terminal, y dos a cuatro laterales subterminales.

Las fíalides, 2 a 4 por verticilo, miden de 2.0 a 2.5 μ (2.3 en promedio) en su parte más ancha, y de 7.0 a 9.0 μ de longitud (7.7 en promedio). Su estructura, cilíndrica, de base elipsoidal y cuello angosto, se parece más a la descrita para *Paecilomyces marquandii*, por lo que puede pensarse que se trata de una forma intermedia, forma cuya existencia es reconocida por Samson (1974).

Los conidios se presentan en cadenas cortas, y "en masse", aparecen pigmentados del mismo color vináceo del resto del conidióforo. Sus formas son variadas, subesferoidales a fusiformes, y ligeramente rugosas. Sus medidas son: 2.0 a 3.5 μ de largo por 2.0 a 2.5 μ de ancho (3.0 x 2.1 μ en promedio).

En la Figura 28 se muestra una microfotografía de *P. lilacinus* CR.

c) Ubicación Taxonómica.

El género *Paecilomyces*, se caracteriza por un buen crecimiento en medios sintéticos, hifas lisas, hialinas y septadas. Las estructuras conidiógenas son sinemáticas o mononemáticas, y consisten en su mayoría en conidióforos verticilados o irregularmente ramificados, que tienen terminalmente fíalides conidiógenas cilíndricas o ampuliformes. Los conidios se presentan en cadenas secas, hialinas o ligeramente pigmentadas, lisas o equinuladas, de varias formas. Clamidosporas presentes o ausentes.

Dentro del género *Paecilomyces*, la especie *Paecilomyces lilacinus* corresponde a la sección *Isariioidea*, pues presenta sólo el estado imperfecto, mesofilia, y un olor indistinto de colonia.

Paecilomyces lilacinus se caracteriza por presentar un conidióforo bien diferenciado, penicilado, parecido al de *Penicillium*, que suele ser pigmentado y rugoso a diferencia de las hifas vegetativas. *Paecilomyces lilacinus* difiere de *Paecilomyces marquandii*, en que el segundo presenta clamidosporas en el micelio vegetativo.

Reino: Fungi
División: Eumycota
Subdivisión: Deuteromycotina
Clase: Hyphomycetes
Orden: Moniliales
Familia: Moniliaceae
Género y especie: *Paecilomyces lilacinus*

3. Paecilomyces sp. bc.

Caracterización colonial.

Se hace la descripción de colonias cultivadas por 14 días.

EMA Nos. 9 y 10 25°C. Colonia circular, de bordes definidos, de color blanco. El crecimiento es floccoso, de aspecto marcadamente algodonoso. No hay conidiogénesis. Reverso incoloro, sin pigmento soluble ni exudados.

H-N No. 6 a 25°C. Colonia circular, plana, de bordes definidos. El crecimiento es denso y de aspecto velutinoso. La conidiogénesis, abundante, le da a la colonia un color rosa pálido brillante (8-2A a 9-2A).

En la figura 29 se muestra una fotografía de la colonia de *Paecilomyces* sp. bc.

4. Paecilomyces lilacinus NRRL 395.

Caracterización colonial.

Descripción de colonias cultivadas por 14 días.

EMA Nos. 9 y 10 25°C. Colonia circular plana, de bordes definidos. Crecimiento de densidad media, de aspecto velutinoso a floccoso. El micelio es de color blanco, y la conidiogénesis, moderada, da a la porción central de la colonia un color rosa claro (10-2A a 11-2A). El reverso de la colonia es incoloro, y no existen pigmento soluble o exudados.

H-N No. 6 25°C. Colonia circular, plana, de bordes definidos. Crecimiento denso de aspecto velutinoso. Los conidióforos cubren toda la colonia, dándole un color rosa grisáceo (10-2A a 10-3B).

Las colonias de *Paecilomyces lilacinus* NRRL 395 en ambos medios de cultivo, tienen un gran parecido con las de *Paecilomyces lilacinus* 6R.

5. Penicillium sp. 7V.

Caracterización Colonial.

Se describen colonias de 7 días de cultivo.

CYA No. 8 25°C. Colonia circular, de bordes definidos, de aspecto velutinoso y profundamente sulcada. Presenta un crecimiento muy denso y con abundante conidiogénesis de diversos colores según la edad: En el centro de la colonia (a manera de borla), un color amarillo pálido (2-3A), y en el resto, diferentes tonos de verde, que van desde el verde limón (28-5E) en la porción central, al verde azulado (25-4D) en la periferia.

El reverso de la colonia es de color amarillo grisáceo (2-2B), pero no se presentan pigmento soluble o exudados.

EMA No.9 25°C. Colonia circular, plana, de bordes no definidos, de aspecto velutinoso y crecimiento disperso. La esporulación, abundante cubre toda la colonia, y le da una coloración verde mate (26-3E a 26-4E), que es mas intensa hacia el centro de la colonia.

G25N No.11 25°C. Colonia circular con marcada zonación concéntrica. Una zona central algodonosa de color beige (5-2B), y otra periférica, velutinoso, profundamente sulcada y de color café (5-3C). El reverso de la colonia manifiesta los surcos y presenta un intenso color naranja (5-4A a 5-4C), al igual que el pigmento difusible.

CYA No.8 37°C. Colonias muy pequeñas, blancas, protuberantes y convolutas.

CYA No.8 5°C. Colonias pequeñas, ovoidales, planas y de color blanco.

En la figura 30 se muestra una fotografía de la colonia de *Penicillium* sp 7V.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Las aplicaciones que la dextranasa tiene en el área de salud (Alsop, 1983) y en la industria azucarera (Meade, 1977; Scott, 1975), así como su potencial empleo en la solución de algunos problemas que se presentan en los ingenios azucareros mexicanos (Gálvez, 1986), justifican plenamente la búsqueda y caracterización de fuentes microbianas de la enzima.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, se ubican en el proyecto iniciado por Amanda Gálvez y Beatriz Bustos en el Departamento de Alimentos de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM. En ese sentido, la utilización de condiciones diferentes de cultivo (mayor duración, medios y pH distintos), así como la identificación taxonómica de las mejores cepas, permiten que este trabajo de selección secundaria aporte los elementos necesarios para la elección del microorganismo más apropiado para la producción de la dextranasa.

I. Las Cepas de *Penicillium purpurogenum*.

Siete cepas fueron manejadas originalmente (Tabla Va). Tres de ellas (*Penicillium* A, B y C), identificadas como pertenecientes a la especie *Penicillium purpurogenum*, resultaron similares tanto en morfología colonial como en los datos de crecimiento en los medios de Pitt (1979). Para demostrar si se trataba de variantes fisiológicas, se llevaron a cabo experimentos de diferenciación en medio Kosaric No. 2, cuyos resultados se muestran en la Tabla I y en las Figuras 1 y 2. Dichos resultados indican que no se trata de variantes fisiológicas sino de la misma cepa, y que el hecho de que fueran aisladas de diferentes fuentes puede deberse en realidad a su presencia en ellas, o simplemente a contaminaciones durante el proceso de aislamiento. Sin embargo, A, B y C, se manejaron en lo sucesivo por separado, como si se tratara de tres cepas diferentes. En experimentos posteriores se utilizó exclusivamente a *Penicillium purpurogenum* A, asumiendo que los resultados así obtenidos, son igualmente válidos para B y C.

II. Producción de Dextranasa

I. Condiciones de Producción.

En el estudio de A. Gálvez y Beatriz Bustos (1989), las cepas que resultaron ser las mejores productoras de dextranasa, fueron los aislamientos denominados *Penicillium* A, B y C (*P. purpurogenum*) y 6 rosa (*Paecilomyces lilacinus* BR); así como la cepa *Paecilomyces* sp. bc, proveniente del cepario de la Facultad de Química de la UNAM. En ese trabajo, la actividad de la enzima se midió al cuarto día de cultivo en el medio de Kosaric No. 1.

En el presente estudio, con el fin de caracterizar la fermentación para la producción de dextranasa de todas las cepas, duplicamos el tiempo de cultivo y empleamos el medio Kosaric No. 4. Este medio, se distingue del No. 1, en que contiene una dextrana de tipo distinto (Grado industrial), a diferente concentración (1%), y un pH más elevado (7.0).

2. Comparación entre cepas.

En la Figura No.20 se pone de manifiesto que, bajo las condiciones señaladas, las cepas *Penicillium purpurogenum* A, *Paecilomyces lilacinus* 6R y *Paecilomyces* sp bc alcanzan los mayores niveles de producción de dextranasa extracelular. Tanto *Paecilomyces lilacinus* NRRL 895, como *Penicillium* sp 7V, carecieron de una producción importante de la enzima.

Penicillium purpurogenum A resulta ser la cepa más productiva en lo que a dextranasa se refiere pues, como se muestra en la Figura 20, alcanza una alta producción de la enzima en un corto tiempo de fermentación (90 horas). A partir de ese momento, la actividad enzimática en el sobrenadante disminuye paulatinamente, hasta reducirse a la mitad al octavo día de cultivo. Las cinéticas de cultivo de las cepas restantes presentan un comportamiento distinto. En ellas, la producción de dextranasa comienza tardíamente, y aumenta en el tiempo, hasta alcanzar su máximo valor en el último día de la fermentación.

En las Figuras 21 y 22 se comparan las cinéticas de actividad específica de dextranasa y actividad enzimática por carbohidratos consumidos, de las cinco cepas analizadas. En estas gráficas se aprecia un comportamiento similar al observado en la Figura 20.

En la Tabla XIr, se resumen los resultados de producción de dextranasa por cultivos de las cinco cepas en medio Kosaric No.4. En dicha Tabla se muestran los valores máximos alcanzados respecto a actividad de dextranasa, actividad específica de dextranasa y actividad de dextranasa por carbohidratos consumidos. Los resultados revelan que las cepas de *Paecilomyces lilacinus* 6R, *Penicillium purpurogenum* A y *Paecilomyces* sp bc, en ese orden, son las mejores cepas productoras de la enzima. Aunque la mayor actividad de dextranasa se obtiene en cultivos de *Paecilomyces lilacinus* 6R, utilizando *Penicillium purpurogenum* A se alcanza el máximo valor de actividad específica.

Resulta importante señalar que, aún cuando *Penicillium purpurogenum* y *Paecilomyces lilacinus* alcanzan niveles similares de producción de dextranasa, la primera lo hace en la mitad del tiempo. Es por eso que en términos de productividad, *Penicillium purpurogenum* A resulta ser la cepa más apropiada para la obtención de la enzima.

Cabe hacer notar que, el hecho de que se haya caracterizado la producción de dextranasa por la cepa de colección *Paecilomyces lilacinus* NRRL 895, responde a la necesidad de comparar esos resultados con los del resto de las cepas. Representa ésta la única alternativa de comparación de nuestros datos con los obtenidos por otros autores que utilicen la misma cepa de colección.

Lo anterior se debe a la diversidad de métodos que existen para evaluar la actividad de dextranasa, que dan lugar a un gran número de unidades definidas no comparables entre sí.

III. La especie *Penicillium purpurogenum*.

La especie *Penicillium purpurogenum* ha sido previamente reportada como productora de dextranasa (Kosaric et al, 1973; Preobrazhenskaya y Manikova, 1975). Sin embargo, se le conoce

también como productora de una micotoxina denominada rubratoxina (Pitt, 1979; Smith, 1985).

La rubratoxina producida por *P. purpurogenum* en maíz, trigo y harina, resultó ser hepatotóxica y nefrotóxica en experimentos efectuados con ratones. En pollos, además de los problemas en hígado y riñón, ocasionó fuertes hemorragias internas (Pohland y Mislivec, 1976).

Las aplicaciones de células y productos derivados de esta especie quedan entonces excluidas de las áreas de salud y alimentación. Así, consideramos que la cepas de *Penicillium purpurogenum*, (A, B y C), deben ser descartadas de los estudios tendientes al establecimiento y escalamiento de los sistemas de producción y aplicación de dextranasas.

IV. Las cepas de Paecilomyces.

Si bien existen antibióticos producidos por *Paecilomyces* (Samson, 1974), la F.D.A. (Food & Drug Administration, USA), no reporta toxinas producidas por especies pertenecientes a este género (Pohland y Mislivec, 1976).

Godfrey y Reichelt (1983) afirman que, en una lista estatutaria de enzimas permitidas en la Gran Bretaña, se incluiría seguramente a las dextranasas producidas por *Paecilomyces lilacinus* y *Penicillium funiculosum*. Así, tanto *Paecilomyces lilacinus* 6R, como *Paecilomyces* sp. bc podrían emplearse como productores de dextranasa a gran escala. Además, *Paecilomyces lilacinus* (y sus sinónimos *Spicaria violacea* y *Penicillium lilacinus*), es una especie ampliamente estudiada con respecto a su actividad dextranólítica (Hultin y Nordstrom, 1949; Tsuchiya et al, 1952; Walker y Deward, 1975; Guilarte et al, 1986), y al mecanismo de acción de la enzima que produce (Walker y Deward, 1975). Existe pues una cantidad importante de información que puede aprovecharse para el establecimiento del proceso.

V. Cinética de la Fermentación.

Para visualizar la cinética de la fermentación de las cepas en los diferentes medios en que se cultivaron, fue necesaria la estimación de algunos parámetros del cultivo, como actividad enzimática, peso seco, carbohidratos totales y proteína soluble. De la dinámica de dichos cultivos, cabe destacar los siguientes aspectos:

+ En todas las Figuras que muestran valores de peso seco y consumo de carbohidratos, (3,5,6,7,10,11,13), se puede apreciar que ambos parámetros están asociados, ya que alcanzan sus máximos valores al mismo tiempo de cultivo. Puesto que el peso seco no se puede considerar como confiable (por el pequeño volumen de muestra), y dado que la dextrana es la única fuente de carbono presente en el medio de cultivo, asumiremos que el consumo de carbohidratos constituye un buen estimador de la biomasa.

+ El consumo de carbohidratos muestra una cinética similar en los cultivos de todas las cepas estudiadas (Figura 23). Debido a esto existe una similitud entre las Figuras 20 y 22, en las que se

ilustran las cinéticas comparativas de actividad de dextranasa y actividad de dextranasa por carbohidratos consumidos, respectivamente.

+ La Figura 24 muestra la cinética comparativa de concentración de proteína soluble en los cultivos de las cinco cepas estudiadas. En ella se ilustra como la proteína soluble disminuye en las primeras 40 horas de cultivo, como consecuencia del consumo de aminoácidos y péptidos presentes en el extracto de levadura. A partir de ese momento, la aparición en el medio de proteínas extracelulares, incrementa notablemente los resultados de la determinación de proteína.

+ Aún cuando no se conozca la fracción de proteína total que está dada por proteínas extracelulares (Figura 24) en las etapas finales del cultivo (90 a 135 horas), debe ser esa fracción la que representa la mayor parte de la proteína soluble, junto con otra fracción producida por la lisis celular.

+ Al observar la cinética comparativa de producción de dextranasa (Figura 20) con la de concentración de proteína (Figura 24), se puede apreciar que las cepas más productoras de dextranasa no son necesariamente las que mayores niveles de proteína alcanzan. Considerando lo expuesto en el punto anterior, esto significa que la proporción de proteína extracelular que corresponde a la dextranasa, es distinta en las diferentes cepas estudiadas.

+ Lo anterior se traduce evidentemente en las diferencias que existen entre la actividad de dextranasa y la actividad específica de la enzima para la misma cepa. Así por ejemplo, la cepa *Paecilomyces* sp. bc, tercera mejor productora de la enzima (Figura 20 y Tabla XIr), produce más proteína extracelular que cualquier otra cepa (Figura 24), lo que significa una baja actividad específica (Figura 21 y Tabla XIr). Una alta actividad específica de dextranasa facilita la purificación, caracterización y utilización práctica de la enzima.

+ En ninguna de las cinéticas analizadas, se muestra una relación directa entre crecimiento (expresado ya sea como peso seco o como carbohidratos consumidos) y producción de dextranasa, salvo en el caso de *Penicillium purpurogenum* A (Figura 3). En los cultivos de esta cepa, la enzima se produce en asociación al consumo de carbohidratos y a la producción de peso seco micelial. Sin embargo, la falta de evaluaciones diarias de la concentración de carbohidratos nos impidió establecer cuantitativamente la asociación crecimiento-producción en cultivos de *Penicillium purpurogenum* A.

+ Exclusivamente en cultivos de *Penicillium purpurogenum* A se presenta una disminución de la concentración de dextranasa en el curso de la fermentación. Al comparar las figuras 1 y 2 se puede apreciar que dicha disminución no está relacionada con algún proceso de lisis celular. De hecho, los resultados de la Tabla Ir revelan una concentración estable de biomasa durante la misma fase en que ocurre la desaparición de la enzima.

Es muy probable que dos distintos tipos de procesos respondan por la desaparición de dextranasa del sobrenadante de la fermentación. Por un lado, un proceso de represión por catabolito

puede inhibir la biosíntesis de la enzima, y por otra parte, la secreción de proteasas ocasionar la degradación de enzimas solubles. En ese sentido, solo la cuantificación de azúcares reductores en el caldo de cultivo nos indicaría la posibilidad de represión catabólica, y la evaluación de actividad proteolítica la degradación de la dextranasa.

VI. Relación entre Crecimiento y Producción de Dextranasa.

Para establecer con propiedad el tipo de relación que existe entre el crecimiento y la producción de dextranasa, debemos basarnos en una estimación confiable del crecimiento (el consumo de carbohidratos, por ejemplo), y tener por lo menos estimaciones diarias de ese parámetro. Estos requisitos sólo se cumplen en los cultivos de *Paecilomyces* sp. bc y *Paecilomyces lilacinus* 6R en medio Kosaric No.5. Las cinéticas de crecimiento y producción en dichos cultivos, se muestran en las Figuras 11 y 7. En ambos casos la producción de dextranasa comienza tardíamente y se incrementa paulatinamente en el tiempo, mientras que los parámetros relacionados con el crecimiento (consumo de carbohidratos y biomasa) permanecen estables desde fases tempranas del cultivo.

En las Figuras 8 y 12 se grafican las tasas volumétricas de consumo de carbohidratos y producción de dextranasa en los cultivos de *Paecilomyces* sp. bc y *Paecilomyces lilacinus* 6R respectivamente. En ellas se muestra una disociación entre el crecimiento (consumo de carbohidratos) y la producción de dextranasa, pues las tasas volumétricas de cada uno de esos parámetros se encuentran desfasadas. Sin embargo, es la utilización del modelo de Luedeking-Piret (Figuras 18 y 19), lo que nos permite reconocer que:

a) En cultivos de *Paecilomyces lilacinus* 6R la producción de dextranasa está parcialmente disociada del crecimiento.

b) En cultivos de *Paecilomyces* sp. bc la producción de dextranasa está completamente disociada del crecimiento.

En el primer caso (a), la tasa de producción de dextranasa está asociada simultáneamente con la tasa de consumo de carbohidratos (tasa de crecimiento) y con la concentración de carbohidratos (biomasa) al tiempo t . En el segundo caso (b), la producción de la enzima depende exclusivamente de la concentración de carbohidratos, parámetro que funciona como estimador de la biomasa.

El hecho de que la producción de dextranasa no esté asociada al crecimiento, no parece ser una característica exclusiva de las cepas utilizadas en el presente estudio. Kosaric et al (1973) y Guillarte et al (1988) describen comportamientos similares en cultivos de *Penicillium funiculosum*, y *Dasmohaptra* y *Thangamani* (1975), en cultivos de *Penicillium ganthinellum*.

Para explicar la disociación entre crecimiento y la producción de dextranasa, Kosaric et al (1973) sugieren que la aparición tardía de la enzima durante la fermentación puede deberse a que:

a) La dextranasa no es en realidad una enzima extracelular, sino una enzima cuya liberación está asociada a la lisis celular. En este caso, la dextranasa puede estar unida a la membrana y en esa condición degradar el sustrato, lo que permitiría que los productos de la acción enzimática entraran a la célula. Al comenzar la lisis la enzima puede liberarse al medio de cultivo.

b) Si la dextranasa es una enzima realmente extracelular, su síntesis empieza tardíamente, pues está asociada a un proceso de diferenciación celular.

El mismo autor descarta la idea de que la dextranasa intracelular sea la que se libere durante el período de lists, dado que, en experimentos en los que se han medido sus niveles, estos se mantienen iguales durante toda la fermentación. Además, el carácter polimérico de la dextrana impide su entrada a la célula y consecuentemente la acción de dextranasas intracelulares sobre ella.

Por otro lado, Dasmohaptra y Thangamanil (1975) sugieren que existe una pequeña proporción de dextranasa constitutiva, que al actuar sobre la dextrana libera los oligosacáridos responsables de la inducción de la síntesis de la fracción inducible de la enzima.

Puesto que sólo se han formulado hipótesis para explicar la disociación que existe entre la producción de dextranasa y el crecimiento, consideramos que las respuestas se obtendrán mediante la realización de estudios tendientes a la elucidación de los mecanismos de regulación de la síntesis y liberación de la dextranasa.

Desde una perspectiva biotecnológica lo que procede es la búsqueda de soluciones que orienten el proceso hacia su aplicación industrial y comercial. En ese sentido, la disociación entre producción de dextranasa y crecimiento implica necesariamente tiempos largos de fermentación, lo que se traduce en la elevación de costos durante el proceso. Para aumentar la productividad es necesario disminuir el tiempo requerido para la obtención de buenas cantidades de la enzima. Para ello se proponen algunas soluciones, cuya viabilidad se podrá evaluar a través de experimentos a nivel laboratorio, a saber:

+ Utilización de inóculos miceliales que permitan reducir o suprimir la fase lag debida a la germinación de esporas.

+ La optimización del medio de cultivo y la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento.

+ La búsqueda de inductores más potentes. Deberán hacerse estudios con dextranas de distinto peso molecular, de estructura modificada (cetodextran, por ejemplo), y con disacáridos o ésteres de disacáridos. Es posible que una combinación de inductores ofrezca más ventajas y mejores resultados. De hecho, podrían probarse diferentes concentraciones de un hidrolizado enzimático de dextrana que redujera la fase lag de producción de dextranasa debida a la inducción. Un hidrolizado de este tipo puede tener una distribución de oligosacáridos apropiados para inducir la síntesis de la enzima más rápidamente.

+ Dado que la producción de dextranasa depende de la biomasa, deberán buscarse niveles elevados de concentración celular. Para ello, se sugiere utilizar fuentes de carbono de bajo costo (glucosa, por ejemplo), que permitan un rápido crecimiento, y que, combinadas con inductores apropiados, incrementen los rendimientos de la enzima.

VII. Efecto del Ca^{++} .

Tanto *Panicomyces lilacinus* 6R como *Panicomyces* sp bc fueron cultivados en medio Kosaric No. 4 (CaCl₂ 0.4%) y en medio Kosaric

No.5 (sin CaCl_2). La ausencia de calcio sólo tuvo efecto incrementando la actividad específica de dextranasa obtenida en cultivos de *P. lilacinus* 6R (Figura 15 b). En el medio que carece de calcio se obtuvieron valores significativamente superiores a los encontrados en el medio que lo contiene.

El efecto del CaCl_2 en la producción de dextranasa no puede verse como un efecto del ión Ca^{++} exclusivamente. Esto se debe a que los experimentos se efectuaron sin un control apropiado de la osmolaridad del medio, y a que resulta imposible precisar si las diferencias en crecimiento o producción se deben al CaCl_2 o a la acción que este tiene sobre los demás componentes del medio. Sin embargo, Griffin (1981) afirma que gran parte del conocimiento que existe sobre el control de la fisiología fungica a través de los constituyentes del medio de cultivo, han sido obtenidos mediante experimentos planteados en esa forma.

En los cultivos de *Paecilomyces lilacinus* 6R, la ausencia del CaCl_2 del medio de cultivo permite el incremento de la actividad específica de dextranasa, pero no afecta la actividad de la enzima. El incremento en la actividad específica se debe en realidad a que en el medio sin calcio (Kosaric No.5), la producción de proteína extracelular es significativamente menor ($p < 0.01$) a la encontrada en el medio con calcio (Kosaric No.4), a partir de las 90 horas de cultivo (ver Tablas VIII y IXr.). Esto significa que a pesar de que la ausencia de CaCl_2 ocasionó la disminución en la cantidad de proteínas secretadas, la producción de dextranasa extracelular permaneció sin cambio. Así, resulta importante observar que la fracción de proteína total que está dada por la dextranasa, aumenta considerablemente al suprimirse el calcio del medio de cultivo.

Es posible que este efecto se deba parcialmente a que la acción del calcio sobre el transporte a nivel de membrana de alguna forma regula la secreción de proteínas y la proporción que ciertas enzimas secretadas tienen con respecto al total de proteínas extracelulares.

De acuerdo a lo anterior, consideramos que en los estudios efectuados en el futuro con esas dos cepas, deberá suprimirse al calcio de la composición del medio de cultivo. Además, de esa forma se elimina el problema operativo que significa la esterilización por separado del medio y la sal de calcio, procedimiento que resulta indispensable si se quiere evitar la formación de abundantes cristales de fosfato de calcio en el medio completo.

Por otra parte, el calcio tuvo un efecto determinante en la morfología micelial que se presentó en cultivo sumergido. Ambas cepas tuvieron un crecimiento en forma de pellets esféricos en el medio con calcio (Kosaric No.4), y un crecimiento filamentosos confluyente en el medio que carece del compuesto (Kosaric No.5).

VIII. Efecto del Tipo de Dextrana.

La producción de dextranasa por *Paecilomyces lilacinus* 6R y *Paecilomyces* sp bc se vio claramente influida por el tipo de dextrana utilizada como fuente de carbono e inductor. En la figura 16 se ilustra como esas dos cepas producen una mayor cantidad de enzima extracelular cuando se cultivan en un medio que contiene dextrana T70, en lugar de dextrana grado industrial. Dicho efecto podrá deberse en realidad a que la dextrana de bajo peso molecular (T 70) permitiera alcanzar mayores niveles de concentración celular, y por consiguiente mayor producción de dextranasa. Sin embargo, si

se relaciona la actividad de dextranasa con el peso seco, y se grafica la actividad de dextranasa por peso seco contra el tiempo (Figura 17), la comparación de las cinéticas obtenidas en ambos medios presenta diferencias similares e incluso superiores a las que se encuentran en la Figura 16.

De lo anterior se desprende que el aumento en la producción de dextranasa debido a la utilización de dextrana T70 no responde a un incremento en el peso seco celular, sino que es independiente de la biomasa producida. Así, podemos considerar que el tipo de dextrana tiene un efecto a nivel de la inducción misma de la síntesis de la enzima.

Los resultados anteriores no coinciden con los obtenidos por Madhu y Prabhu (1984), quien encuentra que en cultivos de *P. aculeatum*, el incremento en la producción de dextranasa está asociado al incremento en peso molecular de la dextrana utilizada como inductor.

El efecto que el tipo de dextrana tiene sobre la producción de dextranasa, sólo puede explicarse si atendemos a la estructura química de los dos tipos de dextrana utilizados en el estudio.

Por un lado, la dextrana grado industrial tiene un peso molecular entre 200 y 1000 veces mayor que el de la dextrana T 70. Además, la primera, con un peso molecular que oscila entre 5×10^6 y 40×10^6 daltons, posee una variedad de estructuras que dependen de su grado de ramificación dado por la presencia de enlaces $\alpha(1,3)$ y $\alpha(1,4)$. La dextrana T 70 en cambio, al igual que otras dextranas de peso molecular controlado, ha sido sometida a tratamientos de hidrólisis ácida o enzimática (Alsop, 1933), que necesariamente le dan una estructura diferente a la de una dextrana nativa.

Por otra parte sabemos que los verdaderos inductores de la síntesis de dextranasa, son los oligosacáridos producidos por la hidrólisis de dextrana. Así, para diferentes estructuras de dextrana, las distribuciones de oligosacáridos producidas por la acción de una misma enzima deben ser diferentes.

En el caso de las dextranasas de *P. lilacinus* GR y *Paezilomyces* sp bc, es posible que su acción sobre la dextrana T 70 produzca, ya sea mayor cantidad, o diferente distribución de oligosacáridos que los obtenidos por la hidrólisis de la dextrana grado industrial. De esa forma, los inductores más potentes serían los oligosacáridos producidos por la degradación de dextrana T 70.

El tipo de dextrana influyó también la morfología del crecimiento en cultivo sumergido. El crecimiento de las cepas *Paezilomyces lilacinus* GR y *Paezilomyces* sp bc fue en forma de pellets en el medio Kosaric No.3 (con dextrana T70), y claramente filamentosos en el medio Kosaric No.4 (con dextrana grado industrial). Este hecho puede haber repercutido en los diferentes niveles de dextranasa alcanzados en ambos medios.

El hecho de que exista un efecto claro del tipo de dextrana en la producción de dextranasa, nos lleva a pensar en la necesidad de efectuar más experimentos en esa dirección. Además, el elevado costo comercial de las dextranas de peso molecular controlado (como la dextrana T70) impide la formulación de medios de producción costeables, y por ello es recomendable que se efectúen experimentos con dextranas crudas o comerciales de distintos pesos moleculares, que permitan obtener buenas cantidades de dextranasa a partir de medios de cultivo apropiados para la producción.

IX. Morfología Micelial en Cultivo Sumergido.

La morfología del micelio en cultivo sumergido se vio claramente influida por el tipo de dextrana y por la presencia de calcio en el medio de cultivo. En el caso del crecimiento en pellets, el análisis microscópico reveló que al momento de la germinación las esporas parecen agregarse. Una vez formados, los pellets aumentan de diámetro durante los primeros tres a cinco días de cultivo, y después se oscurecen y contraen. El crecimiento filamentosos parte de una etapa en que los túbulos de germinación surgen de manera independiente a partir de esporas disgregadas.

Es posible que algunos efectos que no se manifiestan a nivel de matraz agitado, lo hagan en escalas superiores. Así, la morfología del micelio puede repercutir en los fenómenos de transferencia de O_2 y de nutrientes, e incidir directamente en la producción de metabolitos (Griffin, 1981; Solomons, 1975).

En el caso particular de los cultivos de *Paecilomyces lilacinus* 6R y *Paecilomyces* sp. bc, la composición del medio de cultivo tuvo efectos claros sobre la morfología del micelio, y probablemente afectó la producción de dextranasa. Podemos pensar entonces que la composición del medio y las condiciones de cultivo influirán seguramente sobre la morfología y la producción de enzima durante las fases de optimización y escalamiento. Este hecho debe considerarse como un precedente que conduzca al establecimiento de un registro de la morfología que se presenta en cultivo sumergido. Dicho control permitiría conocer las causas y efectos de los diferentes tipos de crecimiento.

CONCLUSIONES.

1) Las tres cepas de *Penicillium* (A, B y C) originalmente consideradas, pertenecen a la especie *Penicillium purpurogenum*, y no presentan comportamiento de variantes fisiológicas. Esto nos permite asegurar que se trata de la misma cepa.

2) La cepa que produce la mayor cantidad de dextranasa en el menor tiempo de cultivo, es decir la más productiva, resulta ser *Penicillium purpurogenum* A. Sin embargo, la posible producción de rubratoxina impide su utilización en las áreas alimentaria y de la salud.

3) La cepa más apropiada para la producción industrial de dextranasa es *Paecilomyces lilacinus* 6R. Esta cepa es la mejor productora de la enzima, además de que mediante su cultivo se obtiene la mayor pureza en términos de actividad específica de dextranasa.

4) En cultivos de *P. lilacinus* 6R, tanto la ausencia de calcio como el tipo de dextrana utilizada como fuente de carbono influyeron en la producción y la actividad específica de la dextranasa producida. Asimismo dichos parámetros afectaron la morfología del hongo en cultivo sumergido.

5) La producción de dextranasa por *Paecilomyces lilacinus* 6R está parcialmente disociada del consumo de dextrana.

6) La producción de dextranasa en *Panicilomyces* sp. bc está totalmente disociada del consumo de dextrana.

TABLEA Or. Concentración de carbohidratos y proteína soluble en los medios Kosaric Nos. 4 y 5 (valores iniciales). Resultados de 3 muestras.

Carbohidratos totales (ng/ml) $\bar{x} \pm \bar{s}$	12.37071 =1.4587
Proteína soluble (10- g/ml) $\bar{x} \pm \bar{s}$	10.6626 =1.2903

TABLEA Ir. Resultados de crecimiento y producción de tres aislamientos de *Penicillium purpurogenum* (A, B y C) en medio Kosaric No.4. Análisis de 4 experimentos por duplicado.

Tiempo (horas)	A			B			C		
	Peso seco (ng/ml) $\bar{x} \pm \bar{s}$	Actividad de dextranasadextransasa (UAD/ml) $\bar{x} \pm \bar{s}$	Actividad de dextranasadextransasa por Peso seco (UAD/ug) $\bar{x} \pm \bar{s}$	Peso seco (ng/ml) $\bar{x} \pm \bar{s}$	Actividad de dextranasadextransasa (UAD/ml) $\bar{x} \pm \bar{s}$	Actividad de dextranasadextransasa por Peso seco (UAD/ug) $\bar{x} \pm \bar{s}$	Peso seco (ng/ml) $\bar{x} \pm \bar{s}$	Actividad de dextranasadextransasa (UAD/ml) $\bar{x} \pm \bar{s}$	Actividad de dextranasadextransasa por Peso seco (UAD/ug) $\bar{x} \pm \bar{s}$
24	10.26670 1.70000	0.00404 0.00066	0.00377 0.00052	6.85000 0.75000	0.04242 0.00186	0.00626 0.00048	7.90000 2.60000	0.04375 0.00520	0.00652 0.00223
48	21.90000 1.56670	0.03711 0.00133	0.00171 0.00018	17.60000 1.93330	0.04375 0.00398	0.00249 0.00005	19.63333 0.78667	0.17120 0.00976	0.00984 0.00090
70	19.33335 2.83335	6.50707 0.35859	0.33229 0.02937	17.48667 0.64666	3.60527 0.45818	0.20543 0.01960	17.86333 0.47000	4.76480 0.18261	0.27919 0.01753
96	21.87999 5.03331	9.65417 0.85075	0.45320 0.07560	23.66669 1.45002	3.83741 1.67999	0.37894 0.09340	23.03333 0.74667	10.24515 0.57770	0.44613 0.03993
119	27.33134 2.26666	10.58327 0.12550	0.38352 0.01694	28.83334 4.03333	11.25555 0.50201	0.39601 0.03799	26.66667 1.46667	10.67938 0.52939	0.40281 0.04203
144	26.06669 0.60002	9.39659 0.01394	0.38372 0.00937	23.66665 5.06665	8.46269 0.48017	0.30766 0.07043	24.53333 0.53333	9.07625 0.40439	0.36977 0.00644
168	22.56665 0.43335	3.34603 0.04648	0.15630 0.00198	27.33334 3.83330	9.07394 0.37136	0.29542 0.51920	30.56667 1.03333	7.96754 0.49129	0.20042 0.00727
192	27.03330 0.70000	3.67441 0.57106	0.13044 0.01283	29.46667 0.93335	3.27339 0.11953	0.28073 0.09103	27.23333 0.10000	8.74445 0.19257	0.32112 0.00925
216	33.30000 2.50000	4.73245 0.47910	0.10546 0.01373	29.03334 0.96660	8.40043 0.28561	0.32100 0.01651	29.26667 1.53333	6.14810 0.02656	0.21060 0.01013
238	29.11002 1.26663	5.35926 0.29748	0.18263 0.01700	23.37667 0.33667	5.30934 0.01662	0.20463 0.00205	28.63333 0.29333	5.17113 0.21639	0.18953 0.00641

Crecimiento filamentoso confluyente, micelio de color café rojizo. Liberación de un pigmento de color naranja

Producción de Dextranasa

por tres aislamientos de *P. purpurogenum*

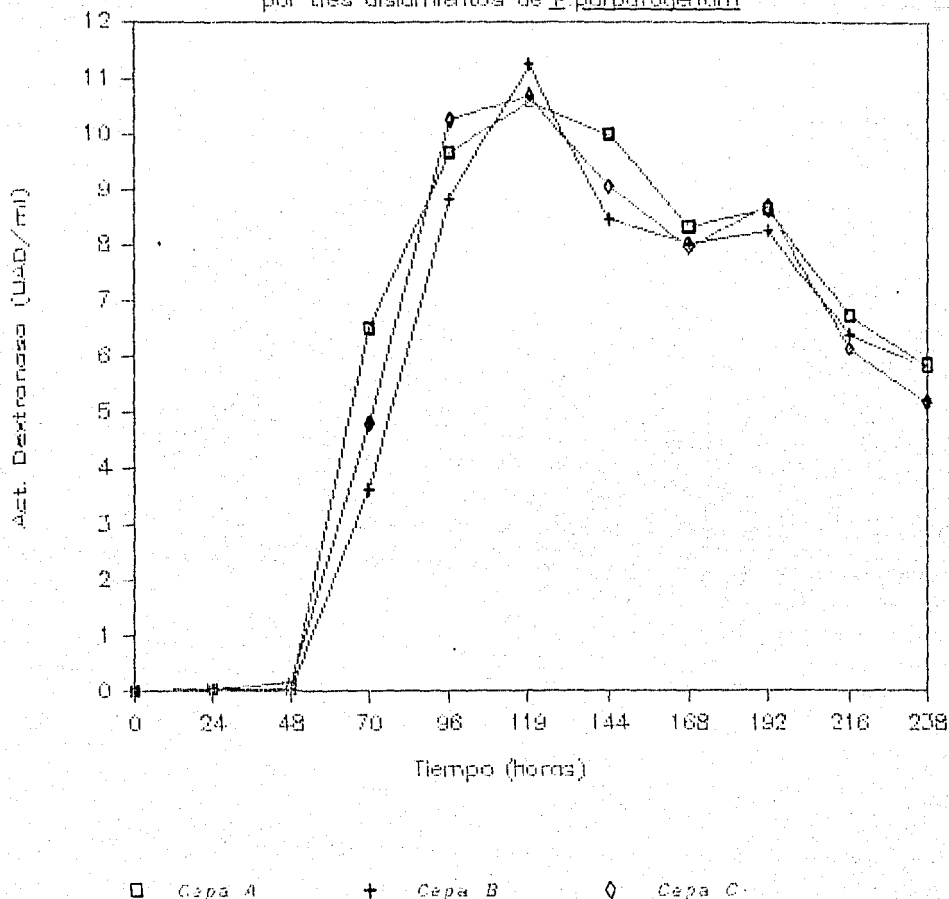


Figura 1. Cinética de producción de dextranasa de tres cepas de *Penicillium purpurogenum*. Cultivo en medio Kosaric No. 2. Se grafican promedios de dos experimentos por duplicado.

Actividad de dextranasa/biomasa

por tres aislamientos de *P. purpurogenum*

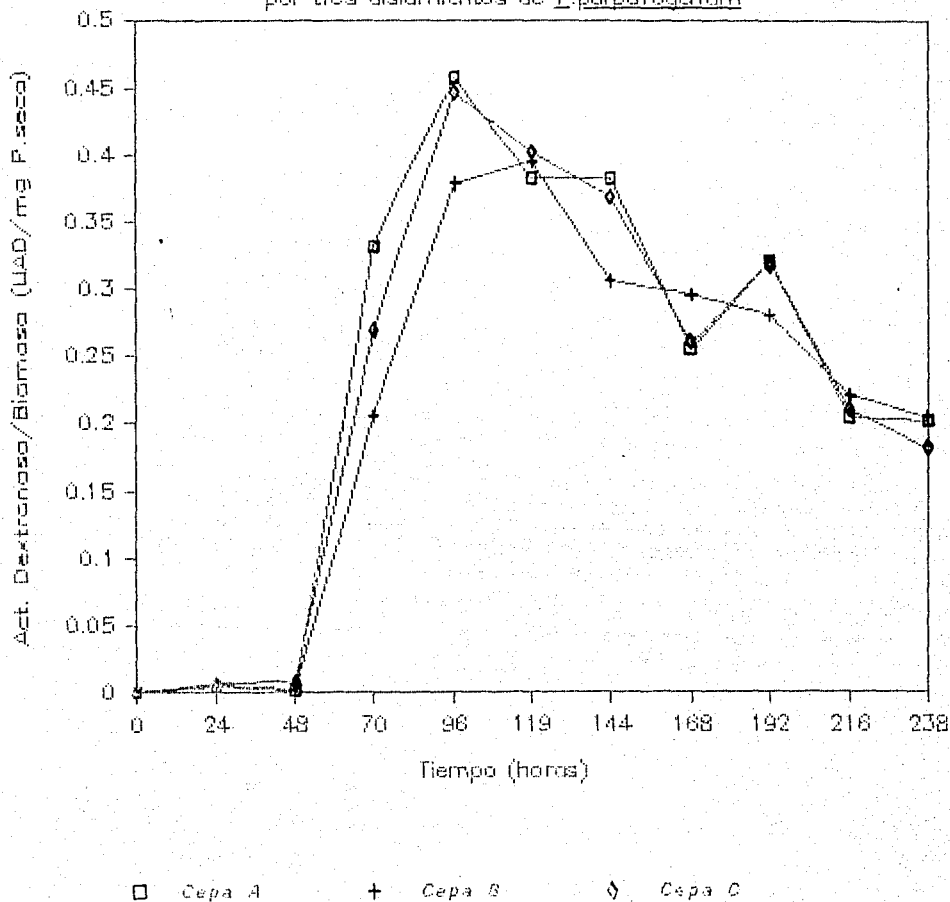


Figura 2. Cinética de producción de dextranasa por peso seco de tres aislamientos de *Penicillium purpurogenum*. Cultivo en medio Kosaric No.2. Se grafican promedios de los experimentos por duplicado.

TABLA IIr. Resultados de crecimiento y producción de *Penicillium purpurosenum* en medio Kosaric No.4. Análisis de 4 experimentos por duplicado

Tiempo (horas)	Peso seco (mg/ml)	Actividad de dextranasa (UAD/ml)	Carb. totales consumidos (mg/ml)	Proteína soluble (10 g/ml)	Actividad de dextranasa (Carb. totales (UAD/mgC.)	Actividad específica de dextranasa (UAD/mg de proteína)
	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$
15	5.78125 5.29726	0.00000			0.00000	0.00000
40	12.30625 4.21989	1.54130 0.76751	5.75425 1.55074	0.07538 0.06429	0.28828 0.13607	20.22412 10.01553
65	23.35833 3.23932	17.54116 1.04336				
90	20.67500 3.69566	17.30637 2.17381	10.13596 0.16025	0.17914 0.03167	1.75959 0.23545	104.30573 31.00060
111	25.42917 3.44522	16.37902 2.49011				
136	19.53393 1.97635	15.34683 2.17324	10.25653 0.21948	0.20981 0.03600	1.49878 0.22859	81.65783 29.90331
160	20.02917 3.45786	12.59146 4.19408				
185	14.52083 2.99818	8.13252 3.86524	9.83123 0.09260	0.21626 0.02012	0.62516 0.35849	39.11070 21.32379

Crecimiento filamentosos confluentes. Micelio muy abundante de color café rojizo. Liberación de un pigmento color naranja

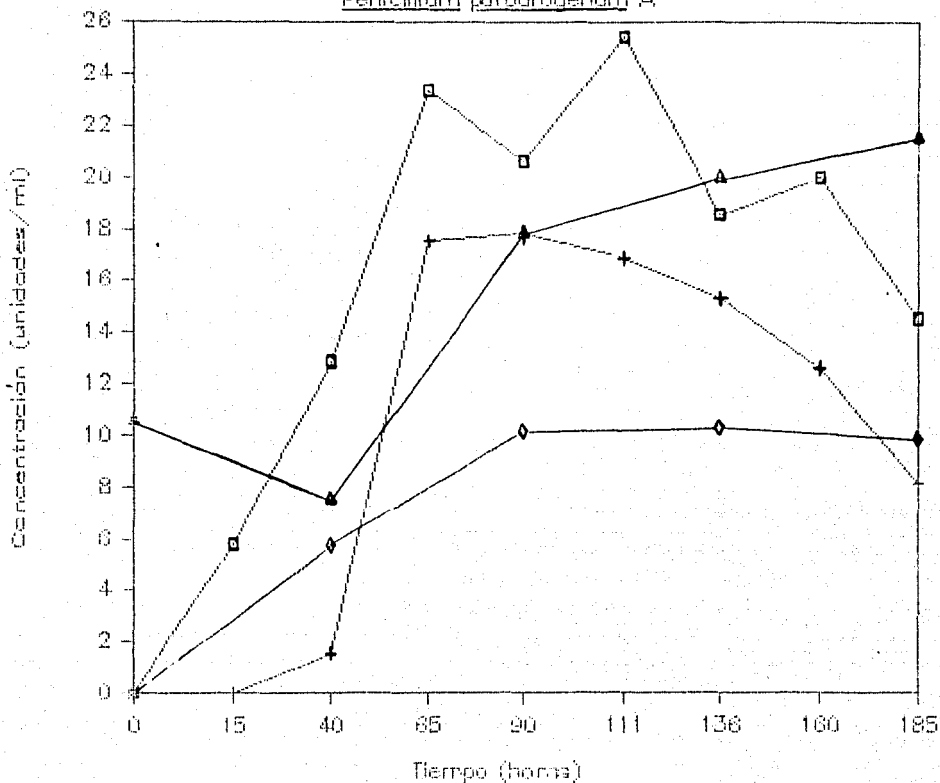
TABLA IIIr. Resultados de crecimiento y producción por *Penicillium sp 7V*, en medio Kosaric No. 4. Análisis de 4 experimentos por duplicado.

Tiempo (horas)	Peso seco (mg/ml)	Actividad de dextranasa (UAD/ml)	Carb. totales consumidos (mg/ml)	Proteína soluble (10 g/ml)	Actividad de dextranasa (Carb. totales (UAD/mgC.)	Actividad específica de dextranasa (UAD/mg de proteína)
	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$
15	5.06111 4.13332	0.00000			0.00000	0.00000
40	15.20556 3.76731	0.36212 0.01375	2.30641 0.65548	0.04790 0.01060	0.01684 0.06901	1.10504 0.47205
65	25.38462 2.91691	0.11176 0.01918				
90	14.15567 2.10120	0.24163 0.01285	3.11318 0.72218	0.07272 0.00543	0.28152 0.21922	3.36137 0.44050
111	8.93205 3.79381	0.29785 0.01600				
136	11.20000 1.18498	0.32795 0.04427	2.15708 0.74554	0.09168 0.00418	0.17192 0.53320	1.59451 0.89449
160	15.04667 3.45212	0.36390 0.03877				
185	14.08571 2.15759	0.34214 0.03838	2.16496 0.79656	0.09646 0.00776	0.19142 0.06989	3.56050 0.41918

Crecimiento en pellets compactos, esféricos, de color blanco. No hay liberación de pigmento

Crecimiento y producción

Penicillium purpurogenum A

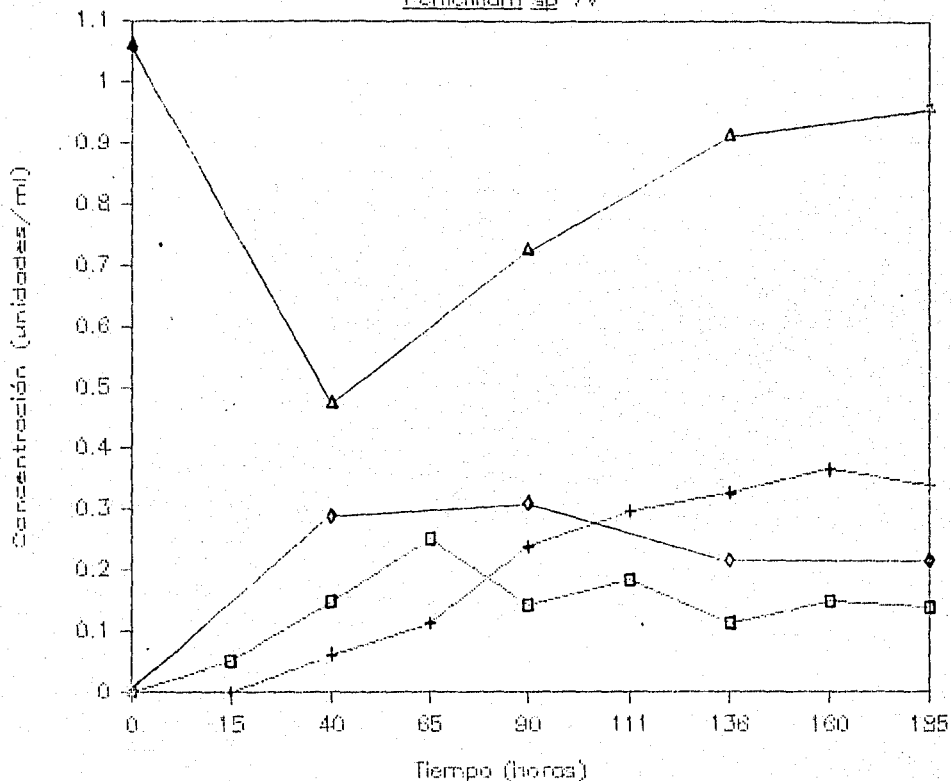


- | | |
|------------------------------------|------------------------------------|
| □ Biomasa (mg/ml) | + Actividad (UAD/ml) de dextranasa |
| ◇ Carbohidratos consumidos (mg/ml) | △ Proteína total (10 g/ml) |

Figura 1. Cinética de crecimiento y producción de dextranasa de *Penicillium purpurogenum* A. Cultivo en medio Kosaric No.4. Se grafican promedios de cuatro experimentos por duplicado.

Crecimiento y producción

Penicillium sp 7V



- Peso seco (mg/ml)
- ◇ Carbohidratos consumidos (mg/ml)
- + Actividad de Dextranasa (UAD/ml)
- △ Proteína total (10 g/ml)

Figura 4. Cinética de crecimiento y producción de dextranasa de *Penicillium* sp 7V. Cultivo en medio Kosaric Ho.4. Se grafican promedios de tres experimentos por duplicado.

TABLA IVr. Resultados de crecimiento y producción de *Paezilomyces S2* bc en medio Kosaric No. 3. Análisis de 3 experimentos por duplicado.

Tiempo (horas)	Peso seco (mg/ml)	Actividad de dextranasa (UAD/ml)	Actividad de dextranasa por Peso seco (UAD/mg)
	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$
15	6.51009 4.76431	0.00000	0.00000
40	10.88067 3.25206	0.47119 0.10472	0.04655 0.01358
65	13.49897 3.83144	2.66167 0.13129	0.21754 0.07424
90	9.38565 2.72786	6.66468 0.77531	0.77449 0.24778
111	6.90667 1.92988	11.64253 1.77941	1.82074 0.53469
136	9.42667 2.58735	14.87518 1.93229	0.72381 0.60839
160	8.33733 3.38777	17.30797 2.58652	2.39724 0.99694
185	10.12143 1.03495	20.32750 1.65571	2.03403 0.15945

Crecimiento en pellets compactos, esféricos, de color blanco. No hay liberación de pigmento

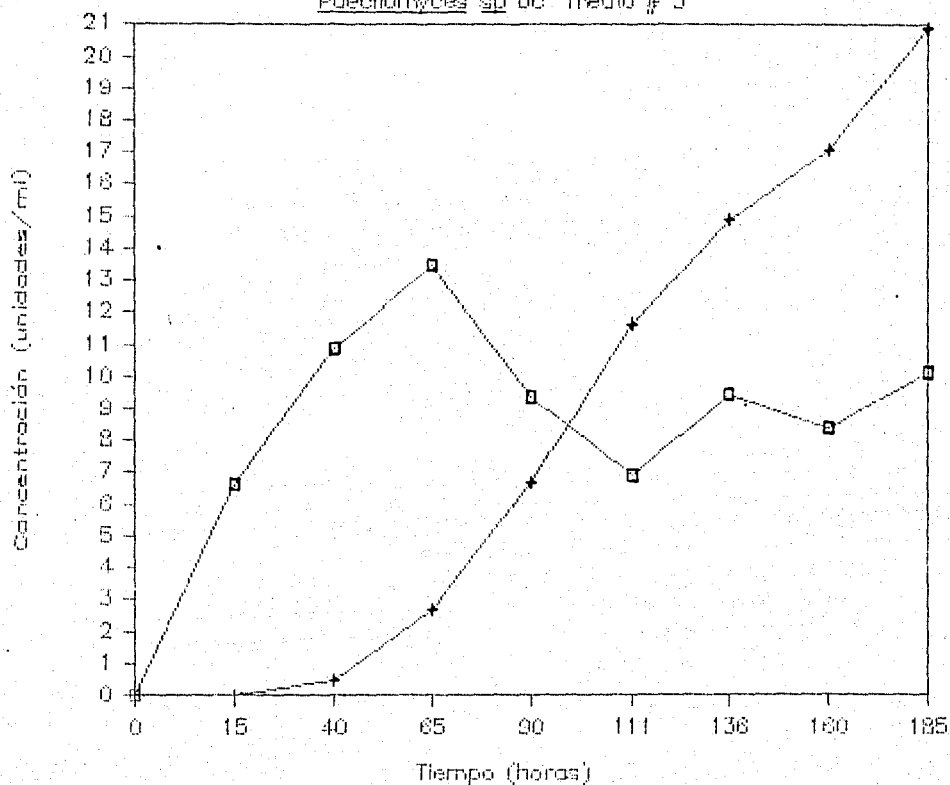
TABLA Vr. Resultados de crecimiento y producción de *Paezilomyces lilacinus* 6R en medio Kosaric No. 3. Análisis de 3 experimentos por duplicado.

Tiempo (horas)	Peso seco (mg/ml)	Actividad de dextranasa (UAD/ml)	Actividad de dextranasa por Peso seco (UAD/mg)
	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$
15	4.70667 2.16584	0.00000	0.00000
40	11.84467 1.39859	0.56433 0.05072	0.04395 0.00925
65	14.12821 3.42695	5.30715 0.71258	0.42428 0.05858
90	9.22008 1.91023	11.41392 0.79353	1.31926 0.41617
111	11.56 1.64488	16.38743 0.34059	1.44571 0.24372
136	8.76667 1.34367	19.4895 0.9362	2.33586 0.54434
160	14.47867 2.57694	22.19847 0.30866	1.58956 0.32466
185	10.99143 1.57588	22.13524 0.35396	2.05556 0.29214

Crecimiento en pellets compactos, esféricos, de color blanco. Liberación de un pigmento de color rosa o lila.

Crecimiento y producción

Paecilomyces sp. bc medio # 3



□ Peso seco (mg/ml)

+ Actividad (UAD/ml)
de dextranasa

Figura 5. Cinética de crecimiento y producción de dextranasa de *Paecilomyces* sp. bc. Cultivo en medio Kosaric No.3. Se grafican promedios de tres experimentos por duplicado.

TABLA VIIr. Resultados de crecimiento y producción por *Paezilomyces sp bc*, en medio Kosaric No. 4. Análisis de 4 experimentos por duplicado.

Tiempo (horas)	Peso seco (g/ml)	Actividad de dextranasaccharosidos (UAD/g)	Carb. totales (g/ml)	Proteína soluble (10 g/ml)	Actividad de dextranasa de /Carb. dextranasa totales (UAD/g de (UAD/gC.)proteína)	Actividad específica de dextranasa de /Carb. dextranasa totales (UAD/g de (UAD/gC.)proteína)
$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$
15	5.11429 2.35093	0.06000			0.00000	0.00000
40	12.46429 2.33930	0.15284 0.03270	5.76423 0.67417	0.05784 0.02330	0.02696 0.00665	3.85860 3.84618
65	17.04872 3.23173	1.43235 0.33107				
90	12.71571 2.76953	4.49562 0.64058	9.23495 0.30494	0.21230 0.01151	0.48698 0.05991	21.07544 2.21723
111	9.42857 2.12671	8.28576 1.36927				
136	7.10000 0.54314	10.24050 0.73992	9.17149 0.39487	0.25591 0.01351	1.19346 0.13206	42.79540 2.72545
160	7.91714 1.39180	13.01392 0.65437				
185	7.29184 2.19303	15.26877 1.83516	9.25254 0.22435	0.24676 0.01432	1.65500 0.23514	51.44459 8.68358

Crecimiento filamentosos confluyente con algunas agregaciones de micelio. Micelio de color blanco. No hay liberación de pigmento.

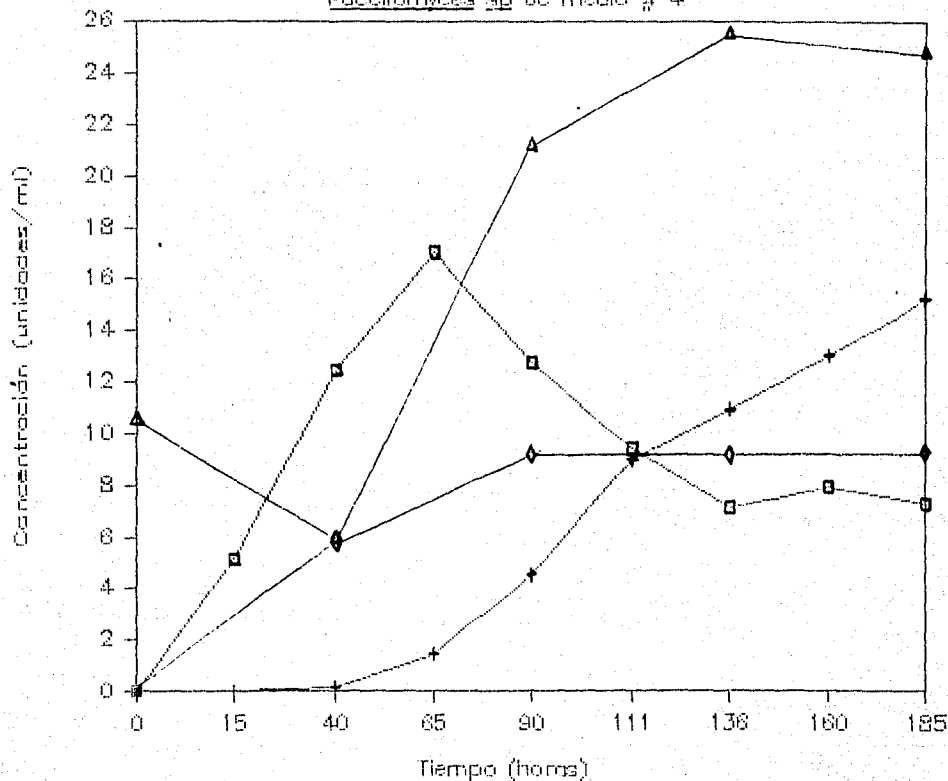
TABLA VIIr. Resultados de crecimiento y producción por *Paezilomyces sp bc*, en medio Kosaric No. 5. Análisis de 4 experimentos por duplicado.

Tiempo (horas)	Peso seco (g/ml)	Actividad de dextranasaccharosidos (UAD/g)	Carb. totales (g/ml)	Proteína soluble (10 g/ml)	Actividad de dextranasa de /Carb. dextranasa totales (UAD/g de (UAD/gC.)proteína)	Actividad específica de dextranasa de /Carb. dextranasa totales (UAD/g de (UAD/gC.)proteína)
$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$
15	1.21111 0.79188	0.00000	2.21071 2.30482	0.06011 0.00799	0.00000	0.00000
40	12.10939 4.43359	9.11259 0.04383	3.61293 0.91159	0.05215 0.01016	0.03465 0.01804	2.14226 0.70185
65	17.55500 1.93154	1.23497 0.19000	9.13833 0.32023	0.14143 0.05892	0.14028 0.02716	10.96076 5.13496
90	11.52153 2.46704	4.57214 0.35236	9.18366 0.44625	0.23146 0.02520	0.48953 0.08170	19.89219 4.17282
111	10.31624 1.53946	3.25520 1.43113	9.23165 0.13072	0.29020 0.01920	0.81338 0.12326	26.97471 5.13082
136	9.16667 1.98839	11.48910 0.82952	8.99577 0.68098	0.29464 0.01813	1.29745 0.10474	39.01534 0.78646
160	8.54989 1.17392	12.53526 1.38823	10.07922 0.90921	0.26101 0.00334	1.21290 0.19190	46.59388 7.52391
185	7.90317 0.95868	16.43611 2.07172	9.91091 1.24268	0.25960 0.00467	1.61297 0.30486	60.19570 5.01634

Crecimiento en pellets compactos, esféricos, de color blanco. No hay liberación de pigmento.

Crecimiento y producción

Paeclomyces sp bc medio # 4



□ Peso seco (mg/ml)

+ Actividad de dextranasa (UAD/ml)

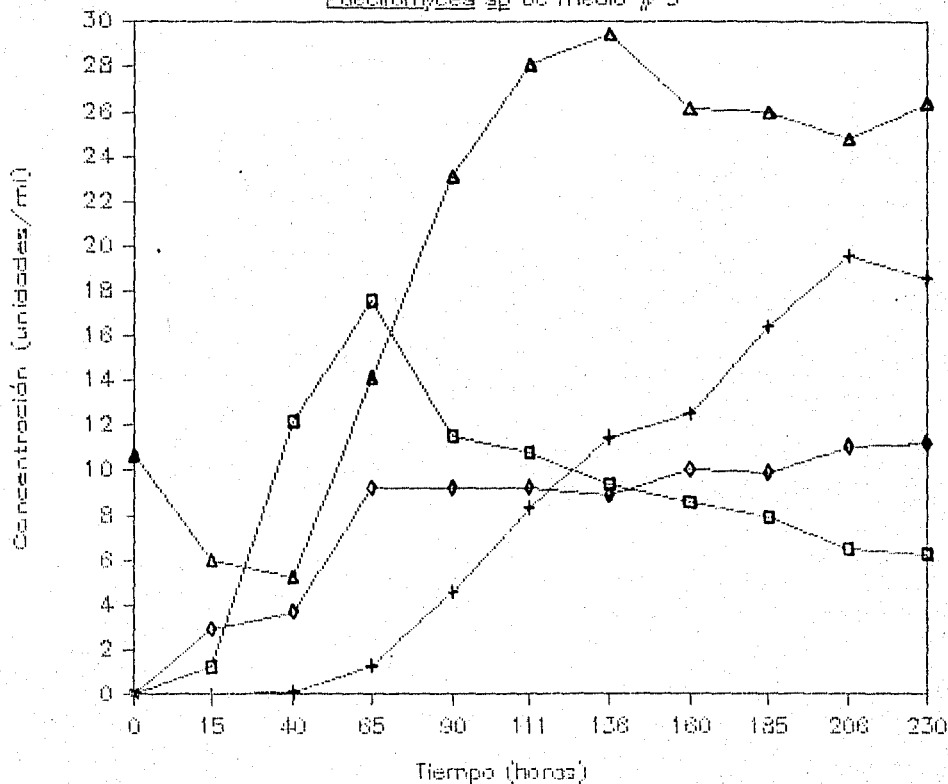
◇ Carbohidratos consumidos (mg/ml)

△ Proteína total (10 g/ml)

Figura 5. Cinética de crecimiento y producción de dextranasa de *Paecilomyces sp bc*. Cultivo en medio Kosaric No.4. Se grafican promedios de cuatro experimentos por duplicado.

Crecimiento y producción

Penicillium sp bc medio # 5



□ Peso seco (mg/ml)

+ Actividad (UAD/ml)
de dextranasa

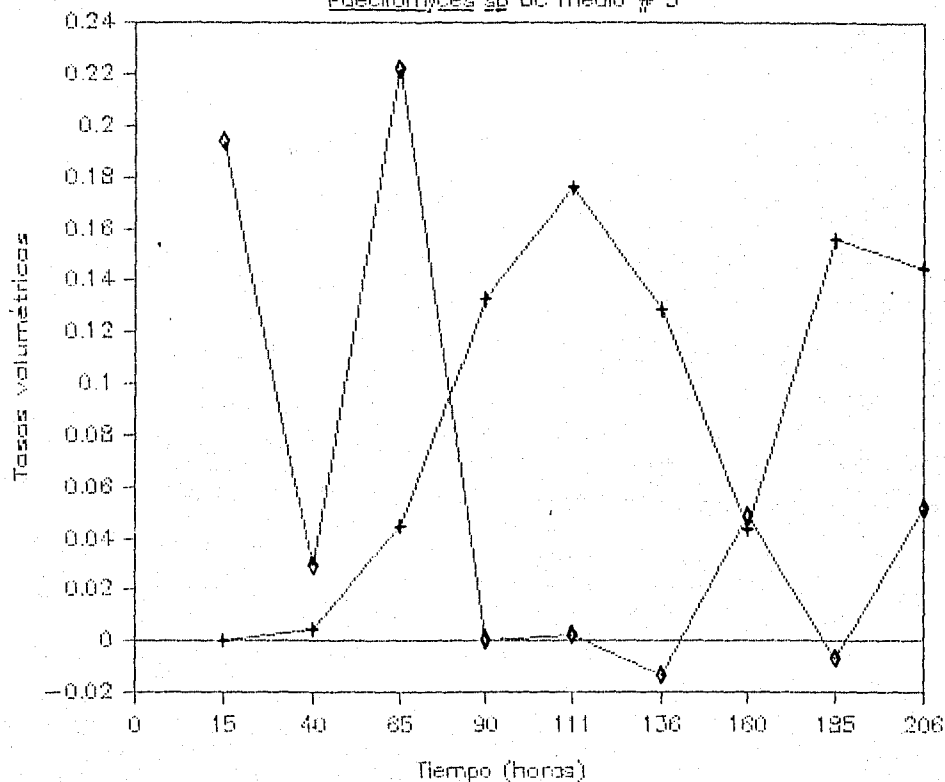
◇ Carbohidratos consumidos (mg/ml)

△ Proteína total (10 g/ml)

Figura 7. Cinética de crecimiento y producción de dextranasa de *Penicillium* sp bc. Cultivo en medio Kosaric No.5. Se grafican promedios de cuatro experimentos por duplicado.

Tasas de crecimiento y producción

Paezilomyces sp bc medio # 5



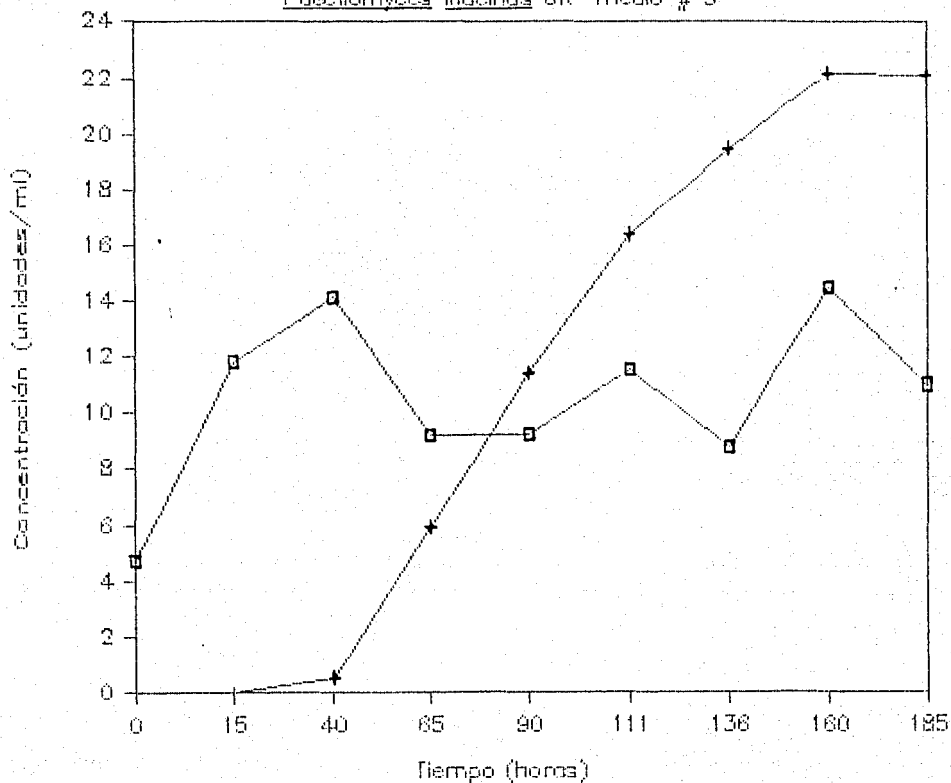
+ Δ Act. destranasa/ Δ tiempo (UAD/ml*hr)

◇ Δ Consumo de carbohidratos/ Δ tiempo (mg/ml*hr)

Figura 3. Relación tasas volumétricas-tiempo en *Paecilomyces* sp bc cultivado en medio Kosaric No. 5. Los incrementos (Δ), se calculan a partir de los promedios expuestos en la Tabla Vr.

Crecimiento y producción

Penicillium lilacinus 6R medio # 3



□ Peso seco (g/ml)

+ Actividad de dextranasa (UAD/ml)

Figura 2. Cinética de crecimiento y producción de dextranasa de *Penicillium lilacinus* 6R. Cultivo en medio Kosaric No.3. Se grafican promedios de tres experimentos por duplicado.

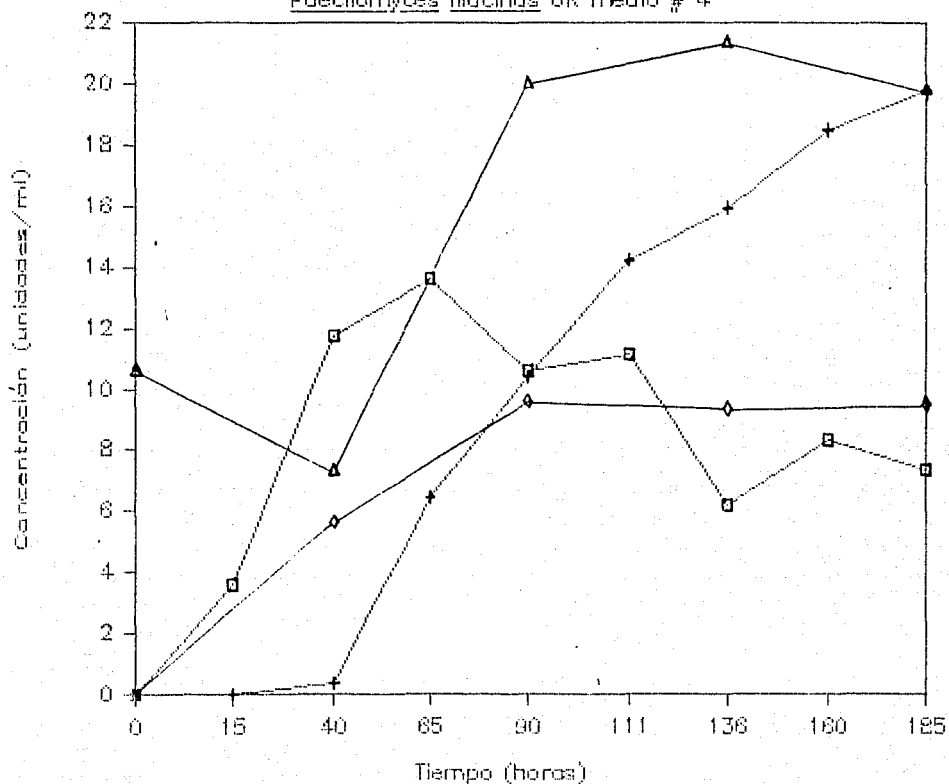
TABLE VIII. Resultados de crecimiento y producción por *Pascillovces lilacibus* CR en medio Kosaric No. 4. Analisis de 4 experimentos por duplicado.

Tiempo (horas)	Peso seco (ag/ml)	Actividad de dextranasa (UAD/ml)	Carb. totales consumidos (ag/ml)	Proteína soluble (10 g/ml)	Actividad de dextranasa /Carb. totales (UAD/ag de proteína)	Actividad específica de dextranasa (UAD/agC.)
	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$
15	3.63417 2.39363	0.00000			0.00000	0.00000
40	11.74375 2.65391	0.39334 0.15829	5.64281 1.07879	0.07380 0.00815	0.06829 0.91377	5.29341 1.87172
65	11.63548 1.03149	8.45229 0.62294				
90	10.58375 3.25201	10.41582 0.39175	3.41173 0.41069	0.20689 0.01469	0.02826 0.13542	51.89639 4.18266
111	11.13942 3.83197	14.23337 1.43933				
138	8.23125 3.25953	15.97073 1.47820	3.37083 0.20499	0.21401 0.02118	1.70313 0.14601	74.81792 4.53887
160	3.12000 4.51195	13.48799 1.42058				
185	7.37257 5.07504	12.81592 2.12806	3.48962 0.09853	0.13898 0.02909	2.03937 0.22339	101.03276 13.71990

Crecimiento filamentosos confluyente con algunas agregaciones de micelio. Micelio de color blanco o crema. Liberación de un pigmento de color rosa o lila.

Crecimiento y producción

Paeclomyces lilacinus SR medio # 4



- Peso seco (ng/ml)
- ◇ Carbohidratos consumidos (ng/ml)
- + Actividad de dextranasa (UAD/ml)
- △ Proteína total (10 g/ml)

Figura 10. Cinética de crecimiento y producción de dextranasa de *Paecilomyces lilacinus* SR. Cultivo en medio Kosaric No.4. Se grafican promedios de cuatro experimentos por duplicado.

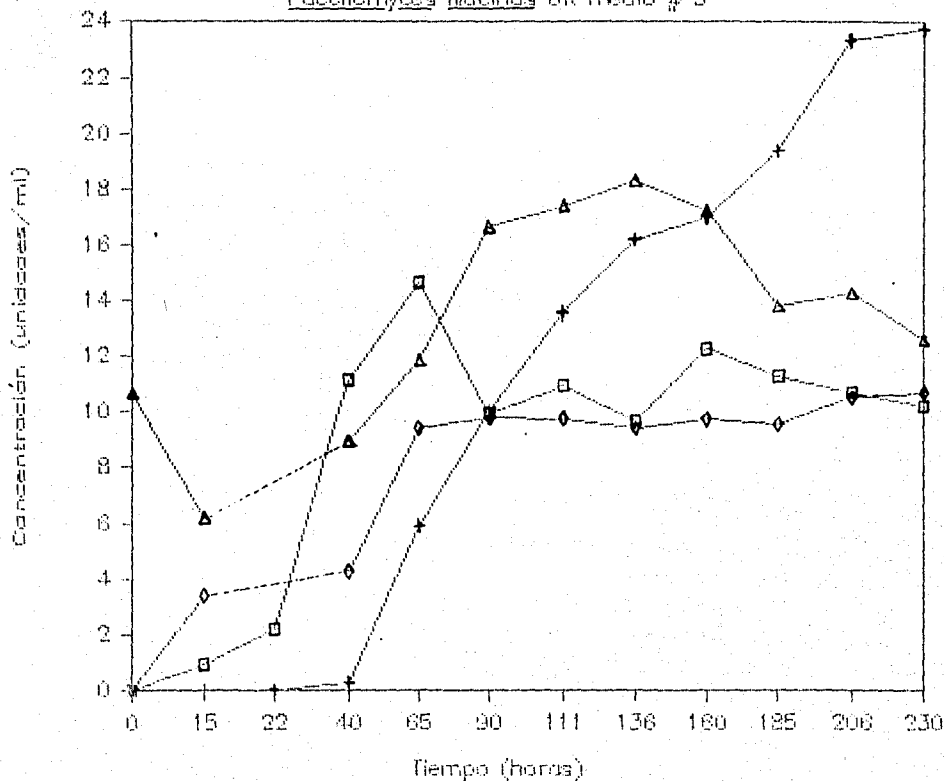
TABLA IX. Resultados de crecimiento y producción por *Paezilomyces lilacinus* CR en medio Kosaric No. 5. Análisis de 4 experimentos por duplicado.

Tiempo (horas)	Peso seco (mg/ml)	Actividad de dextranasa (UAD/ml)	Carb. totales (mg/ml)	Proteína soluble (10 g/ml)	Actividad de dextranasa de	Actividad específica de dextranasa (UAD/mg de proteína)
$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$
15	0.95556 0.30712	0.00000	3.37143 1.47590	0.08165 0.01112	0.00000	0.00000
40	11.15544 2.89500	0.28103 0.09357	4.27598 1.29656	0.08983 0.01784	0.06914 0.32062	3.06380 0.58701
65	14.85539 0.97972	5.93009 0.74943	9.44875 0.72599	0.11895 0.00598	0.53401 0.02606	46.81691 7.37701
90	9.36157 1.44874	10.06144 0.52862	9.81330 0.46455	0.16643 0.01538	1.02685 0.35277	61.13562 7.87398
111	10.91675 2.97567	13.58521 1.12924	9.75859 0.00000	0.17403 0.02257	1.31463 0.02533	75.31907 12.53113
136	9.71111 1.51414	16.18539 0.89229	9.41937 0.41588	0.18320 0.02168	1.72387 0.15235	89.97432 14.01559
160	12.29667 1.31779	16.93594 1.42649	9.75348 0.24974	0.17240 0.01402	1.54712 0.14682	93.24518 6.39867
185	11.31429 0.57745	19.41317 1.68396	9.51643 0.42407	0.13794 0.00999	2.01273 0.07074	139.44118 7.89555
207	10.66667 0.06667	21.37298 0.45154	10.53486 0.00000	0.14248 0.00027	2.21363 0.04286	164.04906 3.47690
230	10.25330 0.61333	21.77140 0.00000	10.72018 0.19432	0.12653 0.01444	2.13431 0.32214	174.19408 3.74875

Crecimiento en pellets pequeños, floccosos de color blanco o crema. No hay liberación de pigmento.

Crecimiento y producción

Paezilomyces lilacinus SR medio # 5



□ Peso seco (mg/ml)

+ Actividad (UAD/ml)
de dextranasa

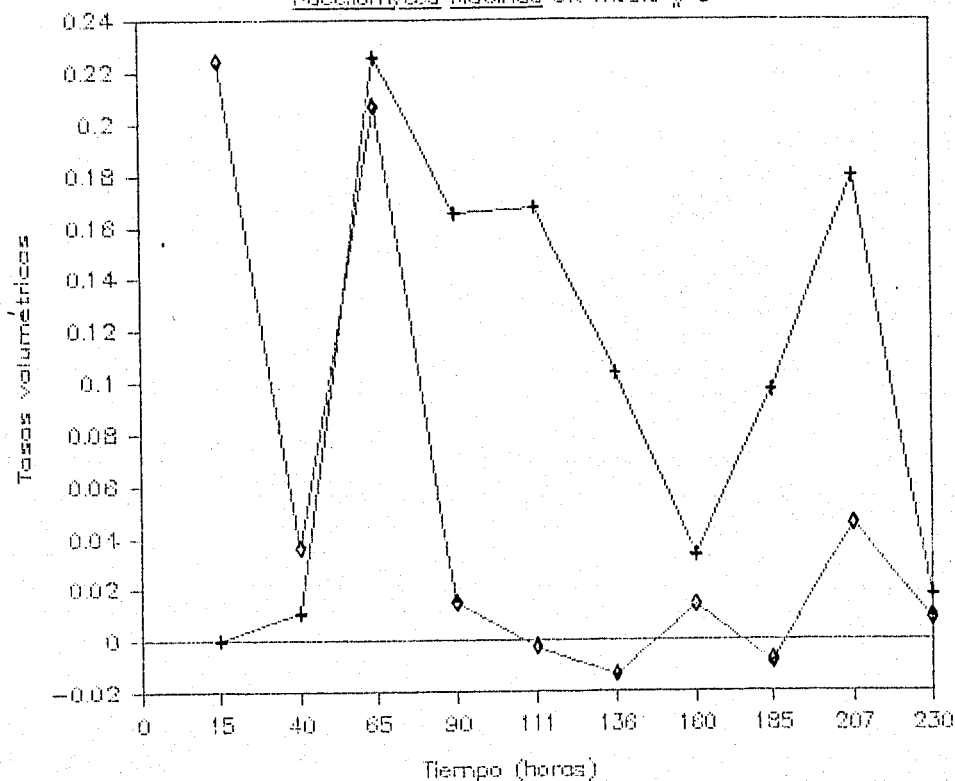
◇ Carbohidratos (mg/ml)
consumidos

△ Proteína total (10 g/ml)

Figura 11. Cinética de crecimiento y producción de dextranasa de *Paecilomyces lilacinus* SR. Cultivo en medio Kozaric No. 5. Se grafican promedios de cuatro experimentos por duplicado.

Tasas de crecimiento y producciones

Paezilomyces lilacinus 6R medio # 5



+ $\Delta \text{Act. dextranasa} / \Delta \text{tiempo}$ (UAD/ml*hr)
 ◇ $\Delta \text{Consumo de carbohidratos} / \Delta \text{tiempo}$ (mg/ml*hr)

Figura 12. Relación entre tasas volumétricas y tiempo en *Paecilomyces lilacinus* 6R, cultivado en medio Kosaric No.5. Los incrementos (Δ), se calcularon a partir de la Tabla VIIIr.

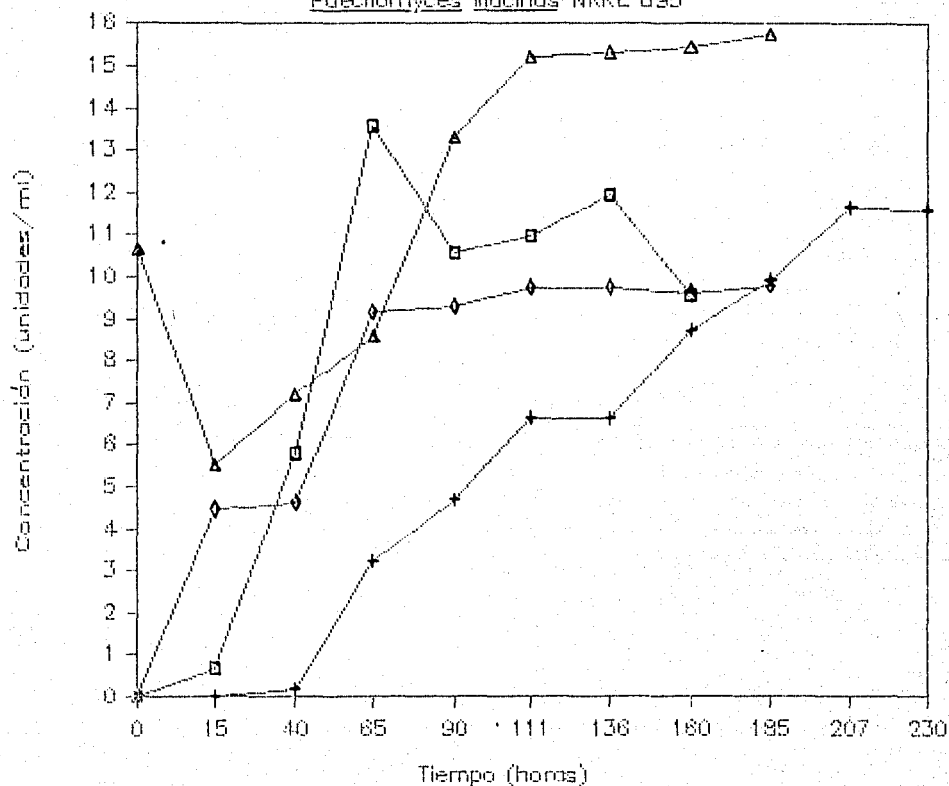
TABLA Nr. Resultados de crecimiento y producción por *Paezilomyces lilacinus* NRRL 895 en medio Rosaric No. 4. Análisis de 4 experimentos por duplicado.

Tiempo (horas)	Peso seco (mg/ml)	Actividad de dextranasa (UAD/ml)	Carb. totales consumidos (mg/ml)	Proteína soluble (10 g/ml)	Actividad dextranasa de (Carb. dextranasa totales (UAD/mg de (UAD/mgC.)proteína)	Actividad específica de dextranasa (UAD/mgC.)proteína)
	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$	$\bar{x} \pm \bar{s}$
15	0.55333 0.22030	0.00090	4.46997 1.04269	0.05525 0.00389	0.00000	0.00000
40	5.77867 3.50291	0.15846 0.04120	4.61552 1.30513	0.07197 0.00506	0.02973 0.04303	1.71404 0.34441
65	13.59776 1.30720	3.21657 0.14952	9.15002 0.15694	0.08584 0.00558	0.35420 0.02399	37.95061 3.89148
90	10.59247 1.36953	4.65226 0.79987	9.30759 0.21252	0.13342 0.02223	0.43633 0.03148	10.34647 1.43070
111	10.95567 3.02232	6.65940 0.27225	0.74173 0.57888	0.15239 0.03046	0.63549 0.07113	46.35465 10.82106
136	11.35000 2.29171	6.64070 1.41498	9.72721 0.51538	0.15339 0.03492	0.73675 0.03525	49.32882 1.78845
160	9.57500 3.15924	8.70461 9.38129	9.62556 0.44335	0.15449 0.01747	0.92037 0.39177	58.13023 9.08537
195		9.32306 0.46453	9.78277 0.31581	0.15749 0.01812	1.01624 0.06767	51.58908 7.73220
207		11.65289 0.07304				
230		11.59977 0.11239				

Crecimiento filamentosos confluyente con agregaciones miceliales a manera de pellets de color crema. Liberación abundante de un pigmento de color rosa o lila.

Crecimiento y producción

Paecilomyces lilacinus NRRL 895



- | | | | |
|---|----------------------------------|---|----------------------------------|
| □ | Peso seco (mg/ml) | + | Actividad (UAD/ml) de dextranasa |
| ◇ | Carbohidratos consumidos (mg/ml) | △ | Proteína total (10 g/ml) |

Figura 13. Cinética de crecimiento y producción de dextranasa de *Paecilomyces lilacinus* NRRL 895. Cultivo en medio Eosaric No.4. Se grafican promedios de tres experimentos por duplicado.

Efecto del Ca^{++} en *P. lilacinus* 6R

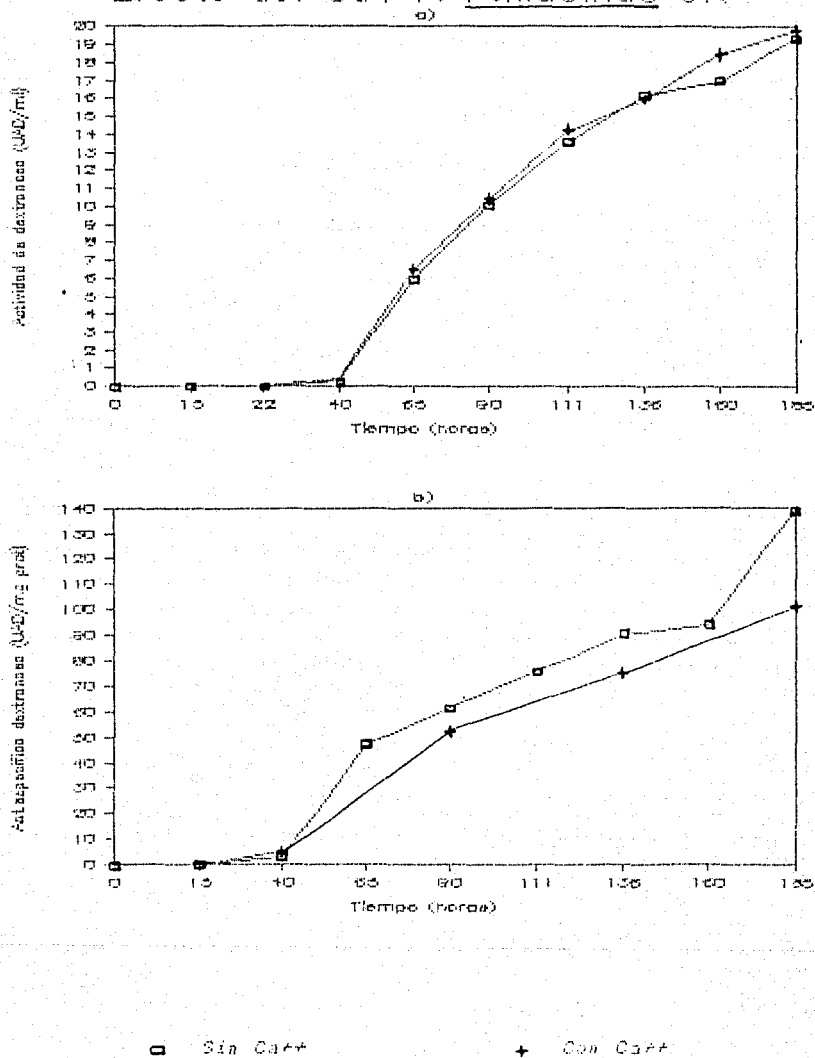


Figura 15. Efecto del Ca^{++} en la producción (a) y en la actividad específica (b) de dextranasa de *Pseudomonas lilacinus* 6R. Cultivo en medios Rosaric Nos. 4 (CaCl_2 0.1%) y 5 (sin CaCl_2). Se grafican promedios de cuatro experimentos por duplicado.

Efecto del tipo de dextrana I.

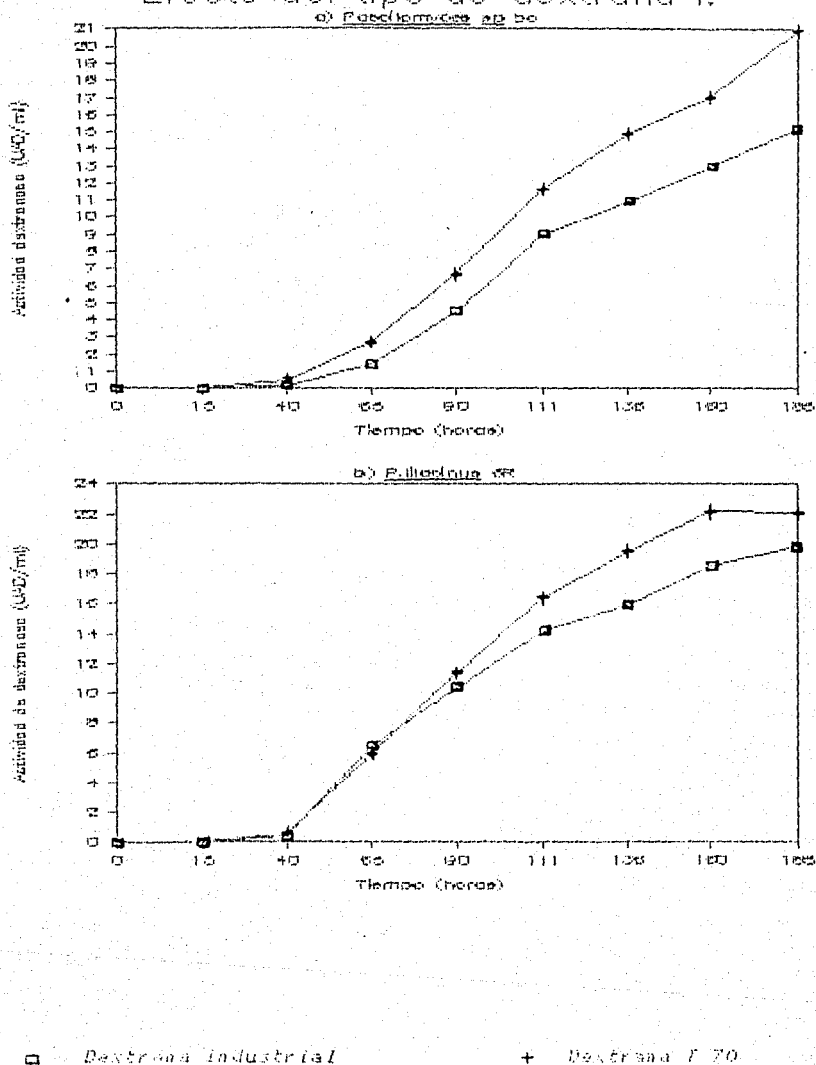


Figura 16. Efecto del tipo de dextrana en la producción de dextranosa por *Pseudomonas sp. bc* (a) y *P. fluorescens SR* (b). Cultivo en medios Kosaric Nos. 1 (dextrana I 70 PH = 70 000) y 4 (dextrana industrial PH = 5×10^6 - 40×10^6). Se grafican promedios de cuatro experimentos por duplicado.

Efecto del tipo de dextrana II.

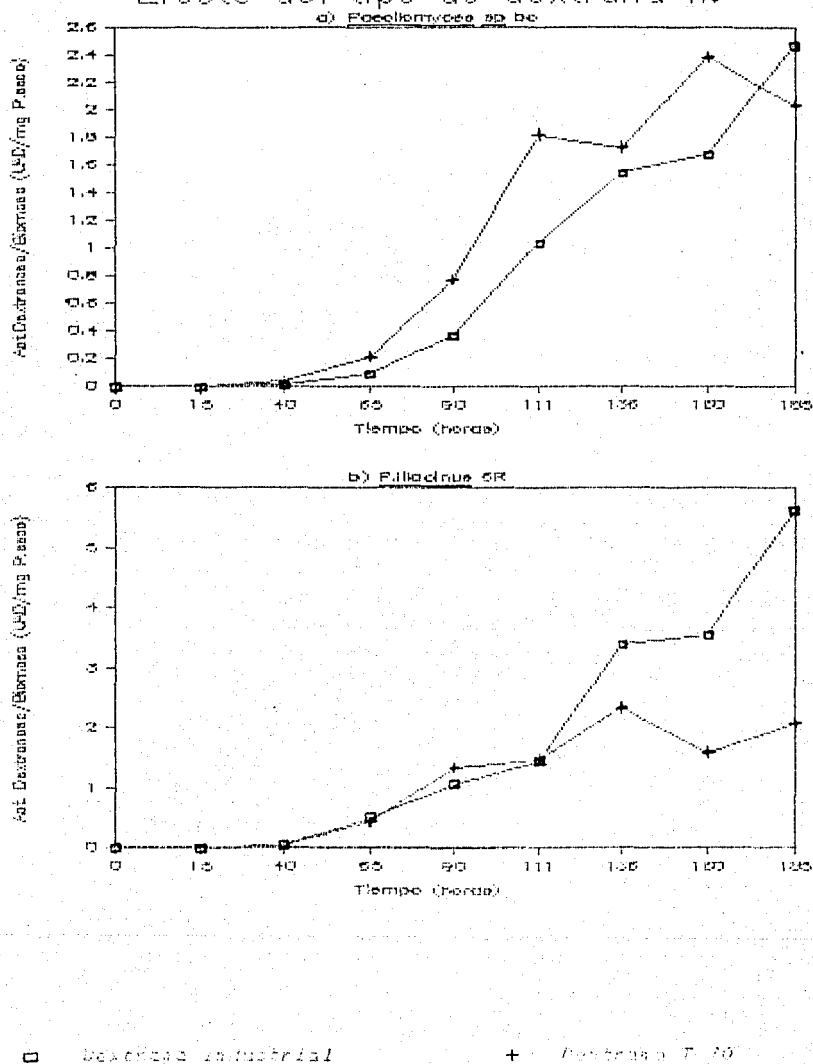
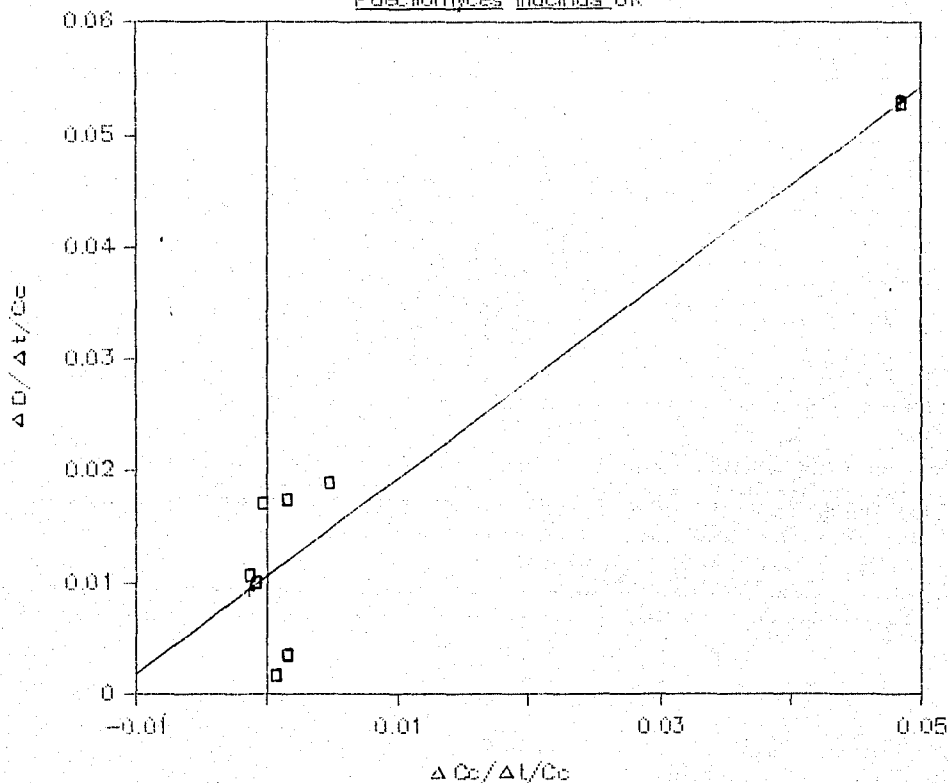


Figura 17. Efecto del tipo de dextrana en la producción de dextranasa por unidad de biomasa por *Pseudomonas sp. bc* (a) y *Pilobolus SR* (b). Cultivo en medio Rotario Nos. 3 (dextrano T 70 PH = 70×10^{-6}) y 4 (dextrano industrial PH = 5×10^{-6} - 40×10^{-6}). Se grafican promedios de cuatro experimentos por triplicado.

Asociación producción — crecimiento

Penicillium lilacinus 6R



$$\Delta D / \Delta t = \Delta \text{Act. dextranasa} / \Delta \text{tiempo (UAD/ml/ahr)}$$

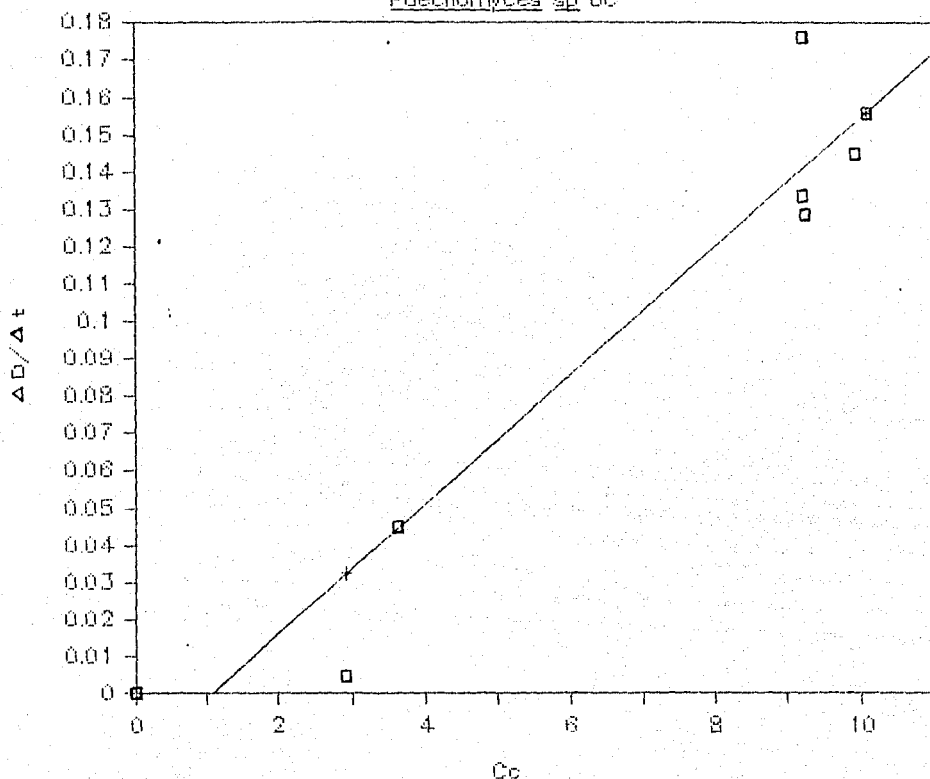
$$\Delta C_c / \Delta t = \Delta \text{Carbohidratos consumidos} / \Delta \text{tiempo (mg/ml/ahr)}$$

$$C_c = \text{Carbohidratos consumidos (mg/ml)}$$

Figura 18. Asociación entre la producción de dextranasa y el crecimiento (consumo de carbohidratos) en P. lilacinus 6R relación entre la tasa de cambio de actividad de dextranasa y la tasa específica de cambio de consumo de carbohidratos. Los incrementos (Δ) se calcularon a partir de los promedios expuestos en la Tabla VIIIr. El ajuste por mínimos cuadrados da una recta con correlación $r^2 = 0.7918$.

Asociación producción – crecimiento

Faecilomyces sp bc



$$\Delta D/\Delta t = \Delta \text{Act. dextranasa} / \Delta \text{tiempo (HAD/ml·hr)}$$

$$C_c = \text{Carbohidratos consumidos (mg/ml)}$$

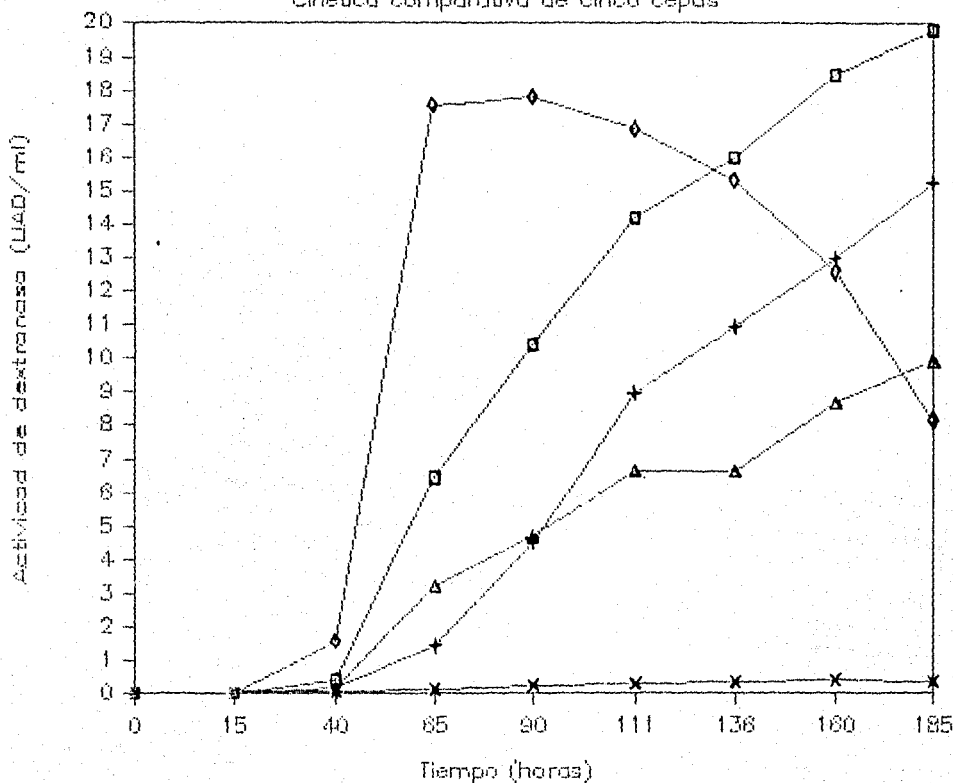
Figura 19. Asociación entre la producción de dextranasa y el crecimiento (consumo de carbohidratos) en *Faecilomyces sp bc*. Relación entre la tasa de cambio de actividad de dextranasa y la concentración de carbohidratos consumidos. Los incrementos (Δ) se calcularon a partir de los promedios expuestos en la Tabla Vr. El ajuste por mínimos cuadrados da una recta con correlación $r^2 = 0.9243$

TABLA XIr. Producción de dextranasa por cinco cepas. Valores máximos alcanzados durante el cultivo en medio Kosaric No. 4. Entre paréntesis se indica el tiempo de cultivo (en horas) al que se alcanzó ese resultado

C E P A	Actividad de dextranasa (UAD/ml)	Actividad específica de dextranasa (UAD/mg de proteína)	Actividad de dextranasa /Carb. totales (UAD/mgC.)
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
<u>Penicillium purpurogenum</u> A	17.0064 (70)	104.0057 (70)	1.7576 (70)
<u>Paecilomyces lilacinus</u> 6R	19.3169 (135)	101.0128 (135)	2.0884 (135)
<u>Paecilomyces</u> sp. bc	15.2683 (135)	61.6646 (135)	1.5750 (135)
<u>Paecilomyces lilacinus</u> NRRL395	9.2331 (135)	63.6881 (135)	1.01694 (135)
<u>Penicillium</u> sp. 7V	0.3689 (160)	3.5945 (111)	0.1815 (135)

Producción de dextranasa

Cinética comparativa de cinco cepas

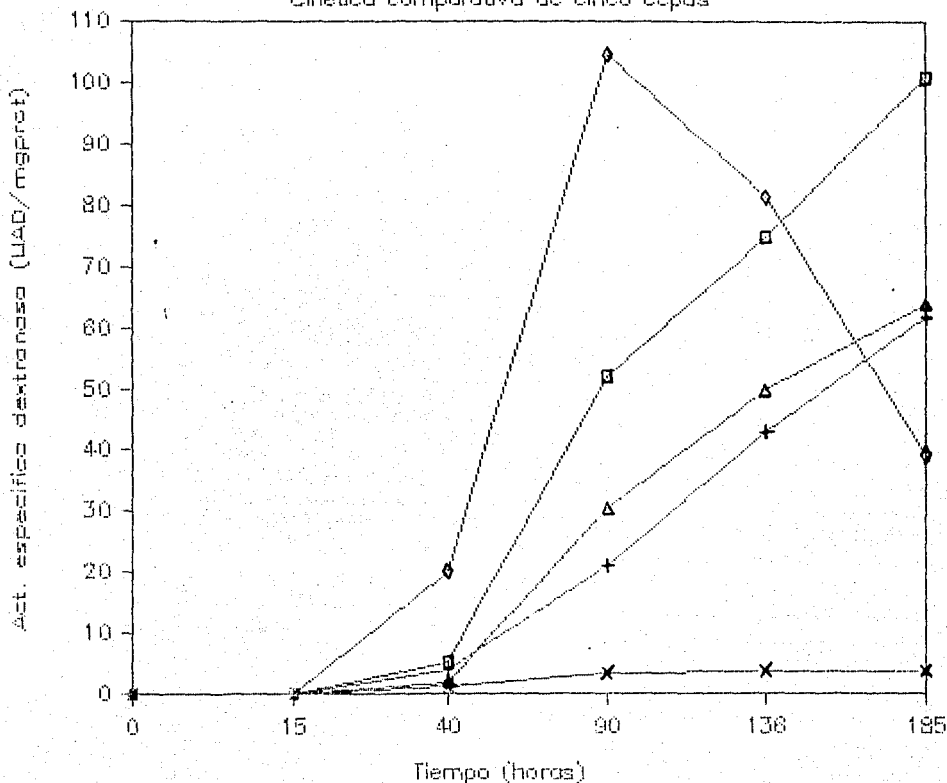


□ *Penicillium lilacinus* 6R + *Penicillium sp* bc
 ◇ *Penicillium purpurogenum* A △ *P. lilacinus* HRRL 893
 x *Penicillium sp* 7V

Figura 20. Cinética comparativa de producción de dextranasa por cinco cepas. Cultivo en medio Kosaric Ho.4. Se grafican promedios de tres y cuatro experimentos por duplicado.

Actividad específica de dextranasa

Cinética comparativa de cinco cepas

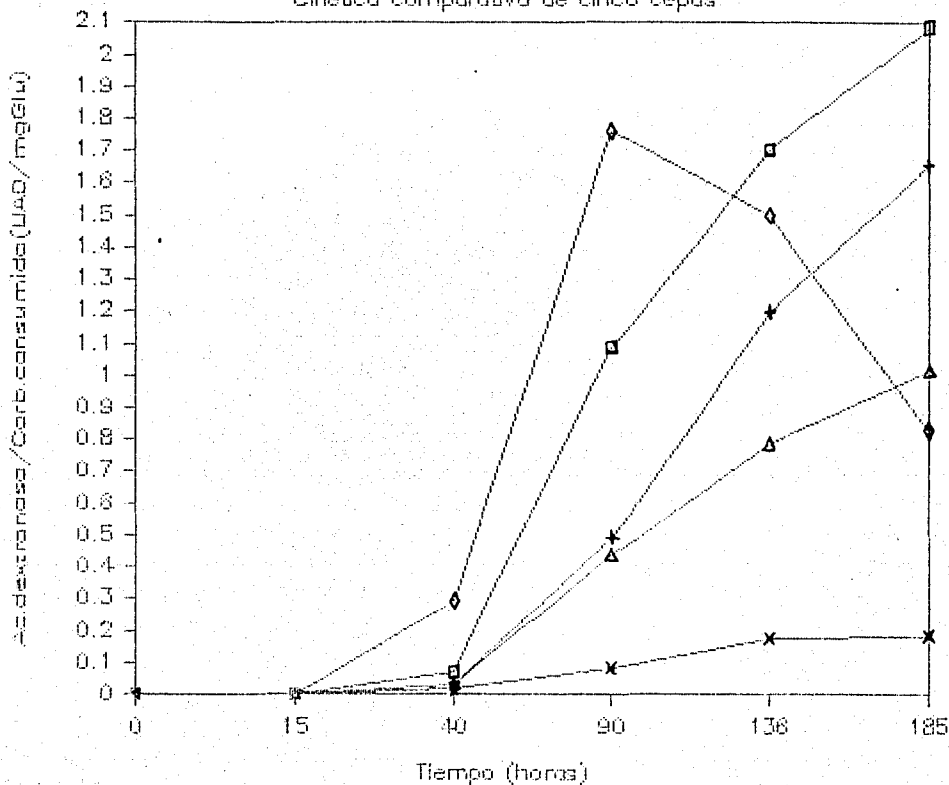


□ *Paecilomyces lilacinus* 6R + *Paecilomyces* sp. bc
 ◇ *Penicillium purpurogenum* A △ *P. lilacinus* NRRL 393
 x *Penicillium* 39 7V

Figura 21. Cinética comparativa de actividad específica de dextranasa por cinco cepas. Cultivo en medio Kozaric No. 4. Se grafican promedios de tres y cuatro experimentos por duplicado.

Ac.dextranasa/Carbohidratos consumidos

Cinética comparativa de cinco cepas

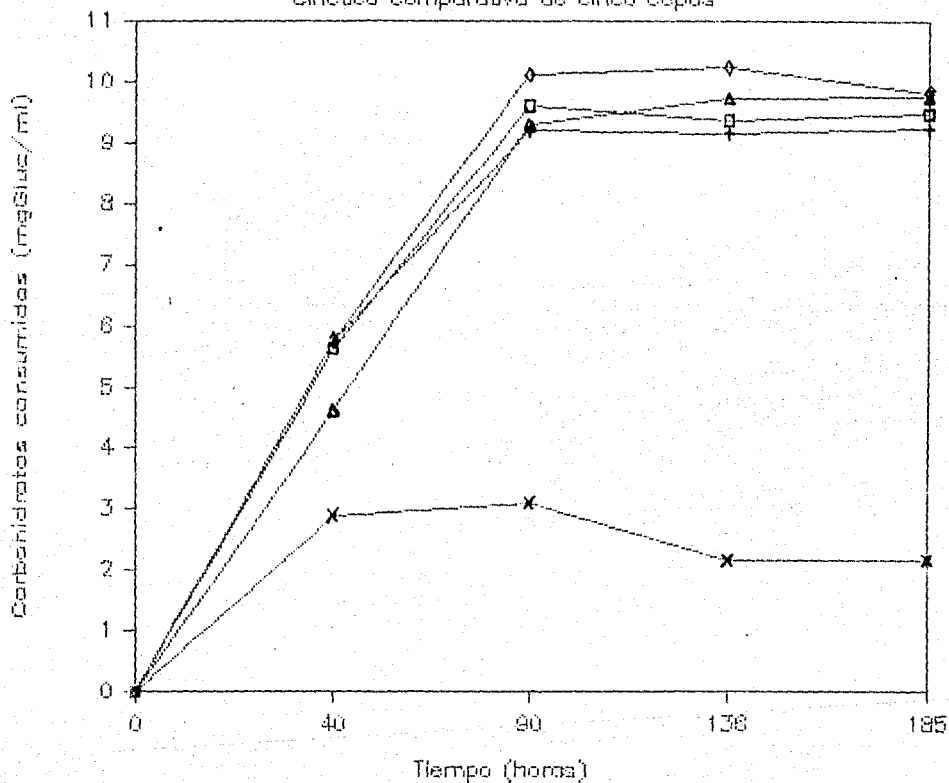


- *Paecilomyces lilacinus* 6R + *Paecilomyces* sp bc
 ◇ *Penicillium purpurogenum* A △ *P. lilacinus* NRRL 895
 × *Penicillium* sp 79

Figura 22. Cinética comparativa de actividad de dextranasa por carbohidratos consumidos, por cinco cepas. Cultivo en medio Kosaric No.4. Se grafican promedios de tres y cuatro duplicados

Consumo de carbohidratos

Cinética comparativa de cinco cepas

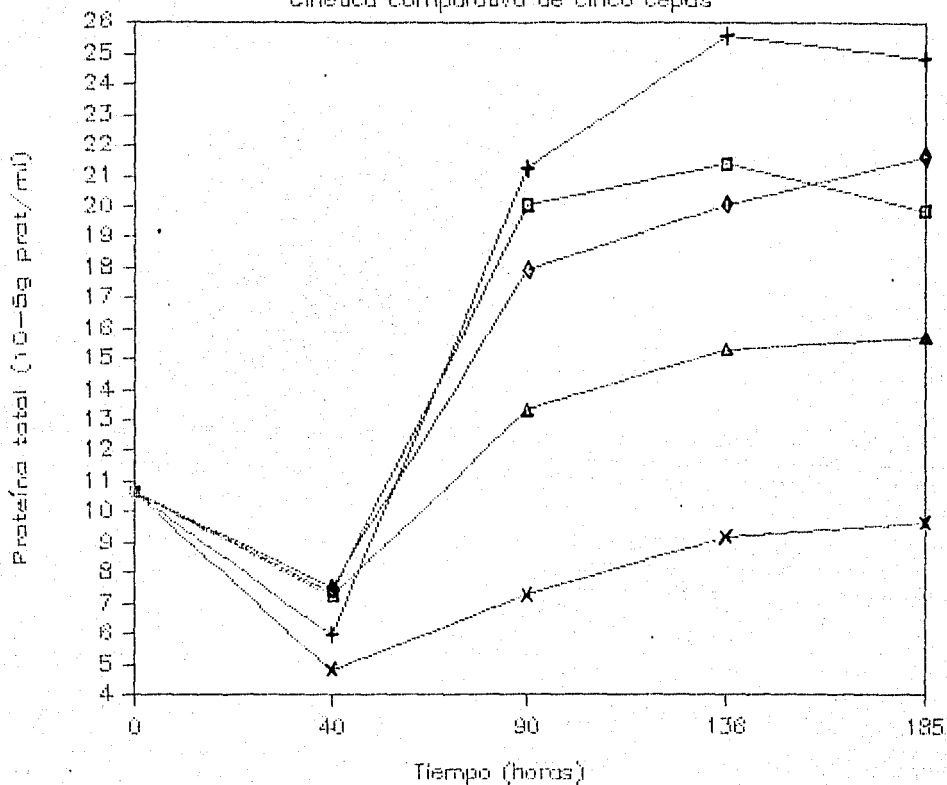


- *Paecilomyces lilacinus* 6R + *Paecilomyces* sp 6C
◇ *Penicillium purpurogenum* A △ *P. lilacinus* HRRL 893
x *Penicillium* sp 7V

Figura 23. Cinética comparativa de consumo de carbohidratos por cinco cepas. Cultivo en medio Kosaric No. 4. Se grafican promedios de tres y cuatro experimentos por duplicado.

Proteínas totales

Cinética comparativa de cinco cepas



- *Paecilomyces lilacinus* 6R + *Paecilomyces* sp bc
 ◇ *Penicillium purpurogenum* A △ *P. lilacinus* HRRL 325
 × *Penicillium* sp 7V

Figura 24. Cinética comparativa de proteínas totales por cinco cepas. Cultivo en medio Kosaric No.4. Se grafican promedios de tres y cuatro experimentos por duplicado.

TABLA XII. Datos de crecimiento de cinco cepas en medio sólido. Los resultados se expresan en mm.
 R = Rango de crecimiento (mínimo-máximo); \bar{x} = Promedio; \bar{s} = Desviación st.
 Entre paréntesis se escribe el número de colonias medidas en esa condición

MEDIO DE CULTIVO - TEMPERATURA DE INCUBACIÓN

C E P A Tiempo de incubación (días)	H-N No.6 25 C	EMA No.9 25 C	EMA No.10 25 C	CYA No.8 25 C	CYA No.8 37 C	CYA No.8 5 C	G25W No.11 25 C
<u>Penicillium</u> <u>purpurescens</u> A,B,C (7)	R = 20-23 \bar{x} = 22.38 \bar{s} = 0.98 (15)	R = 35-42 \bar{x} = 38.93 \bar{s} = 2.08 (15)		R = 28-32 \bar{x} = 29.7 \bar{s} = 1.29 (18)	R = 7-11.5R = 0-MC \bar{x} = 7.37 \bar{s} = 1.44 (13)		R = 3-4.5 \bar{x} = 3.77 \bar{s} = 0.44 (18)
<u>Paecilomyces</u> <u>tilaccus</u> 8R (14)	R = 34-38 \bar{x} = 35.83 \bar{s} = 1.34 (5)	R = 71-75 \bar{x} = 73.22 \bar{s} = 1.13 (9)	R = 65-70 \bar{x} = 67.5 \bar{s} = 1.0872 (6)				
<u>Paecilomyces</u> sp 3C (14)	R = 43-45 \bar{x} = 44.0 \bar{s} = 0.71 (6)	R = 70-73 \bar{x} = 70.83 \bar{s} = 1.07 (6)	R = 64-67 \bar{x} = 65.33 \bar{s} = 0.94 (6)				
<u>Paecilomyces</u> <u>tilaccus</u> 395 (14)	R = 32-37 \bar{x} = 34.26 \bar{s} = 1.14 (6)		R = 60-65 \bar{x} = 63.02 \bar{s} = 1.04 (6)				
<u>Penicillium</u> sp (7)	R = 18-21 \bar{x} = 19.23 \bar{s} = 0.76 (6)	R = 34-39 \bar{x} = 36.88 \bar{s} = 1.88 (8)		R = 34-39 \bar{x} = 35.5 \bar{s} = 1.41 (9)	R = 3.5-4.2R = 3 \bar{x} = 4.01 \bar{s} = 0.34 (6)		R = 21-24 \bar{x} = 22.06 \bar{s} = 0.76 (9)

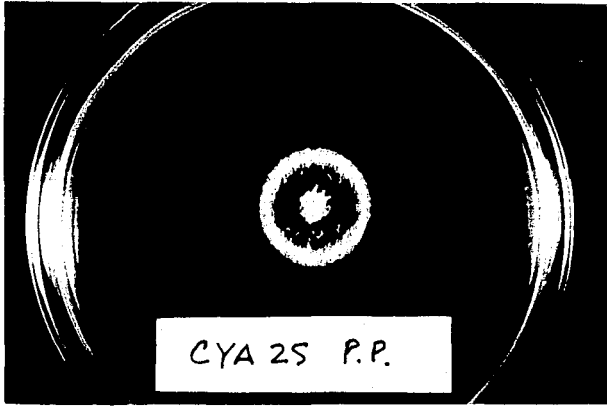


Figura 25. Colonia de *Penicillium purpurogenum* A en medio CYA a los 5 días de cultivo a 28 °C.



Figura 26. Conidioforo de *Penicillium purpurogenum* A.

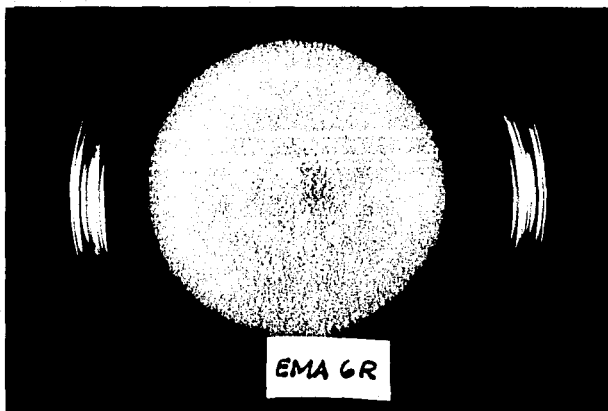


Figura 27. Colonia de *Paecilomyces lilacinus* 6R en medio EHA No.10 a los 14 días de cultivo a 28 °C.



Figura 28. Conidioforo de *Paecilomyces lilacinus* 6R.

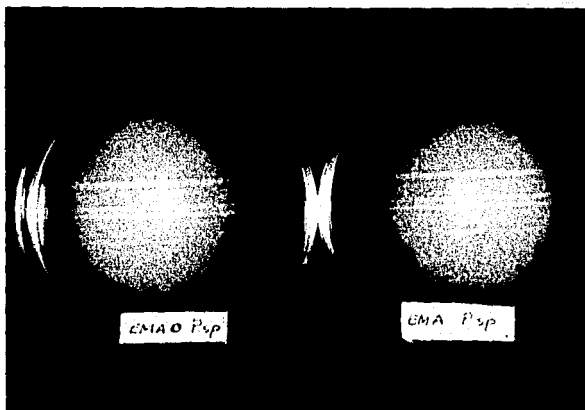


Figura 29. Colonia de *Paecilomyces* sp. bc en medio EMA. No.10 a los 14 días de cultivo a 28 °C.

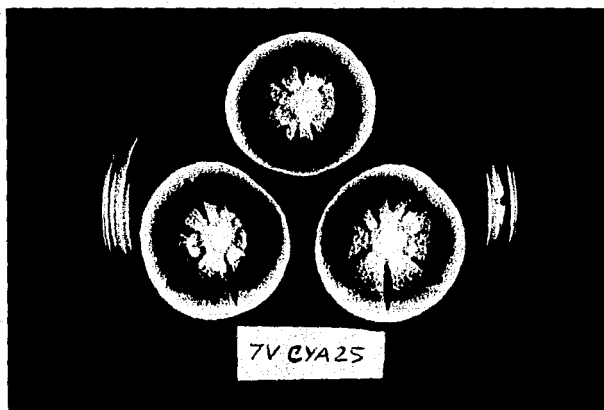


Figura 30. Colonia de *Penicillium* sp. 7V en medio CYA a los 7 días de cultivo a 28 °C.

APENDICE.

Composición de Medios de Cultivo.

Composición de los medios Kosaric. Los medios Nos. 2 al 5 son modificaciones del medio original (No. 1) de Kosaric (1973).

Peso en gramos para 1 l. de medio en buffer fosfatos 0.1 M.

Medio Kosaric No.	Dextrana T 70	Dextrana G.I.	MgCl ₂	CaCl ₂	Extracto de levadura	pH
1. (Original)	20.0	----	0.2	0.4	10.0	5.8
2.	5.0	----	0.2	0.4	10.0	7.0
3.	10.0	----	0.2	0.4	10.0	7.0
4.	----	10.0	0.2	0.4	10.0	7.0
5.	----	10.0	0.2	----	10.0	7.0

6. Medio H-N. Modificado de Hultin & Nordstrom (1949)

Compuesto	--	Peso (g)
Dextrana G.I.	--	10.0
CNH ₄) ₂ SO ₄	--	2.0
KH ₂ PO ₄	--	0.5
Mg SO ₄	--	0.1
Agar L.I.	--	18.0

+ 1 l. de H₂O dest

7. Medio H-N. Modificado de Hultin & Nordstrom (1949)

Compuesto	--	Peso (g)
Dextrana T 70	--	10.0
CNH ₄) ₂ SO ₄	--	2.0
KH ₂ PO ₄	--	0.5
Mg SO ₄	--	0.1
Agar L.I.	--	18.0

+ 1 l. de H₂O dest.

8. Medio CYA. Pitt (1979)

Compuesto	--	Peso (g)
K ₂ HPO ₄	--	1.0
* Solución Czapek	--	1.0 ml.
Extracto de levadura	--	5.0
Sacarosa	--	30.0
Agar	--	15.0

+ 1 l. de H₂O dest.

* Solución Czapek.

NaNO ₃	--	30.0 g
KCl	--	5.0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	--	5.0 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	--	0.1 g

En 100 ml. de solución con H₂O dest.

9. Medio EMA. Pitt (1979).

Compuesto	--	Peso (g)
Extracto de malta	--	20.0
Peptona de soya	--	1.0
Glucosa	--	20.0
Agar	--	15.0
+ 1 l. de H ₂ O dest.		

11. Medio G25N. Pitt (1979).

Compuesto	--	Peso (g)
K ₂ HPO ₄	--	0.75
Solución Czapek	--	7.5 ml.
Extracto de levadura	--	3.75
Glicerol	--	250.0
Agar	--	12.0
+ 750 ml. de H ₂ O dest.		

10. Medio EMA. Onions et al (1981)

Compuesto	--	Peso (g)
Extracto de malta	--	20.0
Agar	--	15.0
+ 1 l. de H ₂ O dest.		

12. Medio CMEAM para preservacion. Pitt (1979)

Compuesto	--	Peso (g)
K ₂ HPO ₄	--	1.0
Solución Czapek	--	10.0 ml.
Sacarosa	--	20.0
Extracto de malta	--	40.0
Agar	--	15.0
+ 1 l. de H ₂ O dest.		

Procedencia de los reactivos utilizados.

Dextrana T 70. = Dextrana T 70. Pharmacia[®] AB Uppsala Sweden

Dextrana G.I. = Dextrana grado industrial. Sigma[®] Chemical Co. Inc. St Louis Mo. U. S. A.

Extracto de levadura g. b. Bioxon (Bioxon[®] de Mexico S. A. Oax. Oax)

Extracto de malta g. b. Bioxon (Bioxon[®] de Mexico S. A. Oax. Oax)

Agar = Agar bacteriológico Bioxon (Bioxon[®] de Mexico S. A. Oax. Oax.)

Agar L.I. = Agar bacteriológico libre de inhibidores. Merck (Merck de Mexico S. A. Edo. Mex.)

Los demás reactivos utilizados son todos grado analítico (R. A.)

REFERENCIAS

1. - Aiba, S., Humphrey, A.E., Millis, N.F. (1973). *Biochemical Engineering*. Academic Press Inc. N.Y., cap. 4.
2. - Alsop, R.M. (1983). *Industrial production of dextrans*. *Progress in Industrial Microbiology*. Vol. 18. Ed. M.E. Bushel, Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam. p. 1-40.
3. - Arx, J.A. von (1970). *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*. J.Cramer, Lehre: 1974-(2a. ed.).
4. - Baxter Lab. Inc. *High strength dextranase and its preparation from culture filtrate starting materials*. US. Pat 3627643.
5. - Berry, D.R. (1975). *The environmental control of the physiology of filamentous fungi*. En: *The Filamentous Fungi*. Vol. 1. *Industrial Mycology*. Eds. Smith, J.E. y Berry, D.R. Edward Arnold Publishing, U.K.
6. - Brock, T.D., Smith, D.W., Madigan, M.T. (1987) *Microbiología*. Prentice-Hall Hispanoamericana, cap. 9.
7. - Brown, R.G. (1970). *Stimulation of dextran production by oxidized dextran*. *Can. J. Microbiol.* Vol. 16. p. 841.
8. - Colgate-Palmolive. *Preparation containing dextranase*. US Pat. 3630924.
9. - Danilova, T.I., Maksimov, V.I., Molodova, G.A., Sazonova, N.N. (1978). *Dextranase from *Fusarium solanii**. *Prikl. Biochim. Mikrobiol.* 14 (5); p. 694.
10. - Dasmpaptra, B., Thangamanii, A. (1975). *Production of an extracellular dextranase by *Penicillium janthinellum**. *Indian J. Microbiol.*, 14 (4), p. 177.
11. - Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Roberts, P.A., Smith, E. (1956). *Colorimetric method for determination of sugar and related substances*. *Anal. Chem.* 28, p. 350.
12. - Elander, R.P., Demain, A.L. (1981). *Genetics of microorganisms in relation to industrial requirements*. Cap. 5a, p.235. En: *Biotechnology. A comprehensive treatise*, Vol. 1 *Microbial Fundamentals*. H. J. Rehm y G. Reed Eds. Verlag Chemie, RFA.
13. - Eveleigh, D.E., Montenecourt, B.A. (1979). *Increasing yields of extracellular enzymes*. *Advances in Applied Microbiology*. Vol. 25, p.57.
14. - Fosado, M (1986). *Dextransasas y su aplicación en la industria de los alimentos*. Tesis. Facultad de Química, UNAM.
15. - Friefelder, D., Snyder, L.A., Hartl, D.L. (1985). *General Genetics*. Jones and Bartlett Publishers Inc. Boston, USA.

- 16.- Fukumoto, J., Tsuji, J., Tsuru, D. (1971). Studies on mold dextranases I. *Penicillium luteum*: its production and some enzymatic properties. *J. Biochem.* 69, p. 1113.
- 17.- Galvez, M.A. (1988)., Establecimiento de un sistema de producción y aplicación de dextranasas. Anteproyecto de Tesis doctoral. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- 19.- Godfrey, T., Reichelt, J. (1983). Industrial Enzymology. The Applications of Enzymes in Industry. The Nature Press.
- 20.- Griffin, D.H. (1981). Fungal Physiology. John Wiley & Sons. Caps. 4, 5 y 6.
- 21.- Guilarte, B., Rodríguez, J., Cuervo, R., Pacheco, N. (1986). Aislamiento y caracterización de microorganismos productores de dextranasa. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 28, p.331.
- 22.- Gutcho, S.J. (1974). Microbial Enzyme Production. Noyes Data Co. London, U.K.
- 23.- Hattori, A. Ishibashi, K. (1981). Screening of dextranase producing microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 45 (10). p. 2347.
- 24.- Hayward, A.C., Sly, L.I. (1984). Characterization of a dextranolytic biotype of *Flavobacterium multivorum* from soil. *J. Appl. Bacteriol.* 57, p.505.
- 25.- Hiraoka, N. Fukumoto, J. Tsuru, D. (1972). Studies on mold dextranases. III. Purification and some enzymatic properties of *Aspergillus carneus* dextranase. *J. Biochem.* 71, p. 57.
- 26.- Hockenfull, D.J.D. (1980) Inoculum development with particular reference to *Aspergillus* and *Penicillium*. En: Fungal Biotechnology. Eds, Smith, J.E., Berry, D.R. y Kristiansen, B. Academic Press. p.1.
- 27.- Honig, P. (1974) Principios de Tecnología Azucarera. Tomo I. C.E.C.S.A. México, p. 38.
- 28.- Hultin, E., Nordstrom, L. (1949). Investigations on dextranase I on the occurrence and assay of dextranase. *Acta Chemica Scandinava* 3, p. 1405.
- 29.- Janson, J.C. (1975). Studies on dextran-degrading enzymes. Isolation and identification of a dextranase producing strain of *Sytophaga johnsonii* and studies on the formation of membrane bound enzyme. *J. Gen. Microbiol.* 88, p. 205.
30. Jeanes, A., Wilham, C.A., Jones, R.W., Tsuchiya, H.M., Rist, C.E. (1953). Isomaltose and Isomaltotriose from enzymic hydrolyzates of dextran. *J. Bacteriol* Vol. 75, p.5911.
- 31.- Joshi, V.K., Tamahne, D.V. (1975). Fermentative production of dextranase by *Aspergillus luchuensis*. *Indian J. Exp. Biol.* 13 (1), p. 55.

32. - Kyowa Hakko Kogyo Co-Ltd. Promoting secretion of milk of livestock. US. Pat 4144354.

33. - Kornerup, A., Wanschler, J.H. (1978). Methuen Handbook of Colour. 3a. edicion. Eyre-Methuen, London, U.K.

34. - Kosaric, N., Yu, K., Zajic, J.E. (1973). Dextranase Production from *Penicillium funiculosum*. Biotech. & bioeng. Vol. XV, p. 729.

35. - Lares, A., Spencer M.A., Van Uden, N. (1983). Use of D-Glucosamine and 2-Deoxyglucose in the selective isolation of mutants of the yeast *Zygomycetes starkeyi* derepressed for the production of extracellular endodextranase. Z. Allg. Mikrobiol., Vol. 23, No. 9, p. 601.

36. - Lawson, C.J., Sutherland, I.W. (1978). Polysaccharides. Primary Products of Metabolism. Ed. A.H. Rose. Economic Microbiology Vol.2. Academic Press. London, U.K.

37. - Lever Bros. Co. Microbial production of dextranase. US. Pat. 3663371.

38. - Lomonosov State University, Moscow. All-Union proteins biosynthesis. Res-Inst. SU. Pat. 446543.

39. - López-Munguía, C.A. (1985). Enzimas libres e inmovilizadas de aplicación industrial. En: Prospectiva de la Biotecnología en México. Comp. Rodolfo Quintero. Fundación Javier Barros Sierra, A.C., CONACYT.

40. - Madhu, Prabhu, K.A. (1984). Studies on dextranase by *Penicillium aculeatum*. Enzyme Microb. Technol. 6, p. 217.

41. - Meade, G.P. (1977). Cane Sugar Handbook. 10 edicion. J. Wiley. N.Y., cap. 17.

42. - Merck & Co. Microbial production of dextranase. US. Pat. 3686393.

43. - Mitchell, J. R. (1979) Rheology of Polysaccharide solutions and gels. En: Polysaccharides in Food. Blanshard J.M.V. y Mitchell J.R. eds. Butterworths U.K.

44. - Nakayama, K. (1981). Sources of industrial microorganisms. Cap. 6a, p. 355. En: Biotechnology. A comprehensive treatise. Vol. 1. Microbial Fundamentals. H. J. Rehm y G. Reed Eds. Verlag Chemie RFA.

45. - Onions, A.H., Allsopp, D., Eggins H.O.W. (1981). Smith's Introduction to Industrial Mycology, 7a. ed. John Wiley & Sons.

46. - Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of the Lowry et. al. wich is more generally applicable. Anal. Biochem. 83, p. 346.

47. - Pitt, J.I. (1979). The Genus *Penicillium* and its Telomorphic States *Supenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press-London, U.K.

48. - Pohland, A.E., Mislivec, P. (1976). Metabolites of various *Penicillium* species encountered on foods. En: *Mycotoxins and Other Related Food Problems*. Eds. Rodricks, J.V., F.D.A., *Advances in Chemistry series No. 149*. Amer. Chem. Soc. USA.

49. - Preobrazhenskaya, M.E., Manikova, A.I. (1975). Dextranase of *Penicillium purpurogenum*. *Dukl. Akad. Nauk. SSSR. Ser. Biol.* 224: p. 483.

50. - Quintero, R. (1985). *Prospectiva de la biotecnología en México*. En: *Prospectiva de la Biotecnología en Mexico*. Comp. Rodolfo Quintero. Fundación Javier Barros Sierra A.C. CONACYT-México.

51. - Reese, E.T. (1972). Enzyme production from insoluble substrates. En: *Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 3. Enzyme Engineering*. Ed. Wingard L.B. J. Wiley & Sons, N.Y.

52. - Res. Found. for Microbial Diseases of Osaka University. Dextranase production. JA. 17-4-72 (39048/72).

53. - Righelato, R.G. (1975). Growth kinetics of mycelial fungi. En: *The Filamentous Fungi Vol. 1. Industrial Mycology*. Eds. Smith, J.E. y Berry, D.R. Edward Arnold Publishing. Cap. 5.

54. - Samson, R.A. (1974). *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology No.6*. Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters.

55. - Sandford, P.A. (1979). A survey of possible new polysaccharides. En: *Polysaccharides in Foods*. Eds. Blanshard, J.M.V. and Mitchell J.R. Butterworths pub.

56. - Sankyo Co. Ltd Production of dextranase. JA. 3-10-68. (43/72026).

57. - Sawai, T. Ikagi, I., Nawa, A. (1976). Identification of an isomaltodextranase producing bacterium *Arthrobacter globiformis*. *Agr. Biol. Chem.* 40 (6), p. 1249.

58. - Scott, D. (1975). Miscellaneous applications of enzymes. En: *Enzymes in Food Processing*. Ed. Gerald Reed. 2a. edición. Academic Press.

59. - Schachtele (1975). Characterization of a dextranase produced by an oral strain of *Actinomyces israelii*. *Infect. Immun.* 12 (3), p. 556.

60. - Simmon, L.G., Liberta, A.E. (1975). New sources of fungal dextranase. *Mycologia Vol. 67*, p. 845.

61. - Smith, D. (1984). Maintenance of Fungi. En: *Maintenance of Microorganisms. A manual of laboratory methods*. Eds. Kirsop B. E. y Snell, J.J.S. Academic Press Inc. p. 83.

62.- Smith, J.E. (1985) Mycotoxin hazards in the production of fungal products and byproducts. En: *Comprehensive Biotechnology* Vol. 4. Moo-Young, M. ed. Pergamon Press.

63.- Solomons, G.L. (1975). submerged culture production of mycelial biomass. En: *The Filamentous Fungi*. Vol. 1. Industrial Mycology. Eds. Smith, J.E. y Berry, D.R. Edward Arnold Publishing Cap. 12.

64.- Solomons, G.L. (1980) fermenter design and fungal growth. En: *Fungal Biotechnology*. Eds. Smith, J.E., Berry, D.R. y Kristiansen, B. Academic Press. p.55.

65.- Sugiura, M. et.al. (1973). Purification of dextranase from *Penicillium funiculosum* and its enzymatic properties. *Biochim et Biophys Acta*, 109, p. 299.

66.- Sugiura, M. et.al. (1974¹). Studies on dextranase II. New exodextranase from *Brevibacterium fuscum* var *dextranolyticum*. *Biochim et Biophys Acta*, 350, p. 61.

67.- Sugiura, M., Ito, A. (1974²). Studies on dextranase III. Action patterns of dextranase from *Penicillium funiculosum* on substrate and inhibition on hydrolysis reaction by substrate analogues. *Chem. Pharm. Bull.* 22 (7), p. 1593.

68.- Sugiura, M. et.al. (1974³). Studies on dextranase V. Activation of dextranase from *Penicillium funiculosum* IAM 7013 by Co⁺⁺. *Chem. Pharm. Bull.* 22 (12), p. 2953.

69.- Sugiura, M., Ito, A. (1975). Studies on dextranase VI. Some physicochemical properties and aminoacid compositions of dextranases from *Brevibacterium fuscum* var *dextranolyticum* and *Penicillium funiculosum* IAM 7013.

70.- Staat, R.H. et.al. (1973). Detection on preliminary studies on dextranase-producing microorganisms from human dental plaque. *Infect. and Immun.* 3 (6), p. 1009.

71.- Sumner, J.B. (1924). The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicylic acid.

72.- Takahashi, N. (1982). Isolation and properties of dextranases of *Bacteroides oralis* Iz 4-9. *Microbiol. Immunol.*, Vol. 26, No. 5, 1982, p. 375.

73.- Tsuchiya, H.M. et.al. (1952). Dextran degrading enzymes from molds. *J. Bacteriol.* Vol. 64, p. 513.

74.- Verna, L.C., Herrero, I.J. (1952). *Micología*. Ed. Ateneo.

75.- Walker, G.J., Deward, M.D. (1975). The action pattern of *Penicillium lilacinus* dextranase. *Carb. Res.*, 39, p. 303.

76.- Ward, O.P. (1985). *Hydrolytic Enzymes*. En: *Comprehensive*

Biotechnology Vol. 3: The Practice of Biotechnology: Current commodity products. Ed. Moo-Young, M. Pergamon Press.

77.- Wheatley, M.A., Moo-Young, M. (1977). Degradation of polysaccharides by endo-exoenzymes: dextranase model systems. *Biotech. & Bioeng.* Vol. 19, p. 219.

78.- Zevenhuisen, L.P.T.M. (1968). Cell bound exodextranase of *Bacillus* species. *Carb. Res.*, 5, p. 310.

79.- Zichenko, O.N., Lobanok, A.G., Shisholo, V.I. (1934). Hydrolysis of streptococcal polysaccharides by micromycete dextranase. *Apl. Biochem. Microbiol.* Vol. 20, No. 3, p. 300.