



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**

---

---

- AMILASAS MICROBIANAS -  
AISLAMIENTOS DE MICROORGANISMOS  
PRODUCTORES Y ESTUDIO BIOQUIMICO  
DE LAS ENZIMAS

**HORTENCIA AGUILAR BALLESTEROS**  
**ROSA MARIA GARCIA AGUILAR**  
**Ma. REYNA GUADALUPE MATA VELASCO**  
**Ma. JUANA YOLANDA PEREZ SANGHEZ**

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**  
**(Bioquímico Microbiólogo)**

1 9 7 8



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

CLAS TESIS 1978  
ABO M.T. 6.  
FECHA \_\_\_\_\_  
RSE \_\_\_\_\_  
• \_\_\_\_\_



JURADO ASIGNADO:

Presidente : Profr. Carlos del Río Estrada  
Vocal : Profr. Alfredo Echegaray Alemán  
Secretario : Profr. Jorge Soto Soria  
1er. Suplente: Profra. Lilia Vierna García  
2o. Suplente : Profra. Beatriz Medina Jiménez

Sitio donde se desarrolló el tema:  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA EXPERIMENTAL  
FACULTAD DE QUIMICA

Sustentantes:

Hortencia Aguilar Ballesteros  
Rosa María García Aguilar  
Ma. Reina Guadalupe Mata Velasco  
Ma. Juana Yolanda Pérez Sánchez

Asesor: Dr. Carlos del Río Estrada

Supervisor Técnico: Profr. Jorge Soto Soria



AL DR. CARLOS DEL RIO ESTRADA

NUESTRO AFECTO Y GRATITUD POR SU DIRECCION Y VALIOSAS SUGERENCIAS PROPORCIONADAS DURANTE LA ELABORACION DE ESTE - TRABAJO.

CON SINCERO AGRADECIMIENTO A LA  
DRA. ERIKA R. ABNEY S. Y AL BIO-  
LOGO PEDRO J. CAMPOS M. (DEPAR-  
TAMENTO DE BIOLOGIA EXPERIMEN-  
TAL, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM)  
POR SU VALIOSA ORIENTACION Y ACER-  
TADA AYUDA EN EL DESARROLLO DEL  
PRESENTE TRABAJO.

AGRADECEMOS AL DR. FELIX  
CORDOBA ALVA, JEFE DEL DE-  
PARTAMENTO DE BIOLOGIA EX-  
PERIMENTAL, FACULTAD DE --  
MEDICINA, UNAM, ASI COMO A  
LA DRA. CONCEPCION AGUNDIS  
SU COOPERACION AL PERMITIR  
QUE PARTE DEL PRESENTE TRA-  
BAJO SE REALIZARA EN EL DE--  
PARTAMENTO A SU CARGO.

A LOS PROFESORES  
ALFREDO ECHEGARAY A.  
Y JORGE SOTO SORIA  
POR SU COLABORACION

AL SR. CESAR CONTRERAS  
POR SU HOSPITALIDAD Y  
FACILIDAD BRINDADAS EN  
SU LABORATORIO.

## INDICE

	Página
I. INTRODUCCION.....	1
II. GENERALIDADES.....	2
III. MATERIALES Y METODOS.....	31
IV. RESULTADOS.....	66
V. DISCUSION.....	155
VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	164
VII. BIBLIOGRAFIA.....	166

## I. INTRODUCCION

La aplicación de las enzimas es cada día mayor, dado que se han descubierto nuevas formas de uso y se han desarrollado técnicas de obtención y purificación que permiten disponer de preparaciones enzimáticas de gran utilidad, que pueden ser incluidas en diversos procesos industriales, lo que representa beneficios que se reflejan --- principalmente en un incremento de la cantidad de muchos productos industrializados.

Por lo que se refiere a las enzimas amilolíticas, su campo de aplicación se ha visto notablemente aumentado en tiempos recientes; puesto que además del empleo tradicional que se les ha dado desde tiempo inmemorial de una manera empírica, es decir, a través de ciertos materiales que las contienen, pero sin atribuir los efectos producidos a una actividad enzimática; se les ha encontrado tal variedad de usos que su consumo se ha extendido a las industrias: alimentaria, farmacéutica, textil, etc.

A pesar de la creciente demanda de enzimas por parte de la industria nacional, la producción de estas no se ha modificado, por lo que se tiene que recurrir a su importación, lo que representa una considerable fuga de divisas para nuestro país; solo en el año de 1975 se tuvieron que importar amilasas (de malta, fungal y bacteria

na) por una cantidad del orden de 7, 747, 048 millones de pesos (5).

El objeto del presente trabajo, es iniciar un estudio para la obtención de amilasas en nuestro país, a partir de microorganismos aislados de suelos, aguas negras, aire, etc., que pudieran sustituir a las de importación y realizar un estudio preliminar sobre su purificación y propiedades bioquímicas, sin profundizar en su producción industrial.

## II. GENERALIDADES

Las amilasas son enzimas que hidrolizan el almidón y glucógeno dando diversos productos como dextrinas, maltosa o glucosa. Según su modo de acción se dividen en:

**$\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1,  $\alpha$ -1,4-glucán 4-glucanohidrolasa).** Su acción principal consiste en producir una rápida y desordenada degradación del almidón en fragmentos más pequeños, llamados dextrinas. Su ataque se localiza únicamente en las uniones  $\alpha$ -1,4 glucosídicas.

**$\beta$ -amilasa (EC 3.2.1.2,  $\alpha$ -1,4-glucán maltohidrolasa).** Es de acción más específica, únicamente rompe el enlace  $\alpha$ -1,4 glucosídico alternado, del extremo no reductor de la cadena del polisacárido produciendo maltosa.

$\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.3,  $\alpha$ -1,4-glucán glucohidrolasa). Ataca también el enlace  $\alpha$ -1,4 del extremo no reductor de la cadena del polisacárido, rompiendo cada --- unión para producir glucosa (89).

#### A. HISTORIA

El empleo de las amilasas data de los tiempos más remotos, pues se sabe que pueblos primitivos como los sumerios, babilonios, egipcios, griegos, romanos y germanos; fabricaban ya en el siglo VII a de C., una cerveza a partir de cebada y de una especie de cereal llamada ---- "emmer" (40).

En el Japón fueron empleados microorganismos en la hidrólisis del almidón, para obtener productos alimenticios y bebidas alcohólicas, al cultivar el hongo Aspergillus oryzae sobre arroz u otros cereales. Este microorganismo también fué utilizado en países del lejano --- oriente, en la fabricación del Koji y el Saké (cerveza - de arroz).

En China se elaboraba una pasta de arroz, llamada "levadura china", rica en microorganismos amilolíticos, cuyo principal componente era Mucor rouxii.

En México los indígenas del norte y noroeste del

país como yaquis, tarahumaras, pimas, tepehuanos y huichos obtienen una bebida fermentada llamada "Tecuín", que se preparaba moliendo maíz tostado, negro o azul, a lo -- que agregaban miel o jarabe de tuna. Otra bebida mexicana es el "Sendechó" usada por los pueblos de raza otomí y mazahua, el cual después de fermentado era hervido con piloncillo (30).

"Pozol", bebida usada como alimento básico (durante las jornadas en el campo, en las comidas y en viajes largos a manera de provisión), por grupos indígenas: chontales, mayas, lacandones, zapotecos; que comprenden los estados de Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero y Quintana Roo. Se prepara con maíz remojado en agua de cal durante la noche, cocido en agua y posteriormente molido junto con cacao quedando solamente una masa que se separa en pequeñas porciones, envueltas en hojas de plátano dejándolas fermentar 4 a 5 días (24).

Los Incas, preparaban una bebida de maíz fermentado y hervido, conocida con el nombre de "Chicha", y los indígenas actuales en Bolivia y Perú (cholos) preparan -- chicha morada y chicha de jora (26). ~~4~~

En Venezuela se da el nombre de "Acupe" a una -- bebida de maíz ligeramente fermentada, que se hace remojando maíz durante 2 a 3 días hasta que germina. Se muele y se deja fermentar con un poco de dulce.



Una bebida fermentada a base de maíz, mandioca o yuca es el "Cachiri" o "Caxiri", conservada en olla de barro e ingerida durante festividades religiosas y funerarias, es propia de los indios uanana del Río Icana, al norte del río Amazonas, Brasil (24).

"Champuz", es una bebida preparada en Colombia y Perú con maíz o arroz, fermentada, endulzada y aromatizada.

→ Todas estas experiencias se realizaron en forma empírica, pues los primeros descubrimientos sobre amilasas, no fueron realizados sino hasta 1816, en que ---- Kirchoff notó que el almidón hervido podía ser transformado en azúcar por la acción de los granos de cereales. Payen y Persoz (1833), dieron al principio activo el nombre de diastasa e hicieron una extensa descripción de -- sus propiedades. Schwarzer (1870), por estudios de inactivación térmica de la amilasa de malta, observó que disminufa mucho más rápidamente la actividad sacarogénica -- que la dextrinizante. La presencia de dos amilasas en la malta fué reconocida por Märcker (1879) y Bourquelot --- (1887), y confirmada por Wijsman (1890). En 1922 Ohlsson demostró la existencia de dos amilasas, dextrinogénica y sacarogénica, llamadas por Kuhn (1925)  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa respectivamente. Posteriormente en 1930 consiguió la separación de estos dos componentes. Kneen y col. (1943), encontraron que el ion calcio es un factor de estabilidad -

Peb

para la  $\alpha$ -amilasa y de inestabilidad para la  $\beta$ -amilasa (91).

En la actualidad, las amilasas siguen siendo estudiadas pues se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza: animales, plantas superiores y microorganismos, de ahí que se hayan establecido métodos para determinar su estructura molecular, mecanismos de acción, extracción, purificación, etc., principalmente las de -- origen microbiano, debido a su gran aplicación industrial. ←

#### B. MECANISMO DE ACCION

Las amilasas de acuerdo al tipo de ataque enzimático que realicen sobre el almidón, han sido divididas en endoamilasas y exoamilasas.

Endoamilasas.- Son aquellas enzimas cuyo ataque al almidón se efectúa en zonas específicas de la secuencia interna de la molécula (alfa amilasa e isoamilasa).

Exoamilasas.- Su acción sobre el almidón se realiza por las terminaciones no reductoras de la cadena -- (beta amilasa y glucoamilasa).

La hidrólisis es en forma específica, según el tipo de enzima de que se trate, así como del componente

del almidón que sea atacado. La acción de las amilasas no se verifica sobre los gránulos del almidón intactos, sino que es necesario que el almidón sea gelatinizado - (calentado en solución acuosa) con lo cual el sustrato tiene pérdida de birrefringencia y cristalinidad, habiendo a la vez un aumento en su solubilidad, lo cual permite el ataque enzimático. La beta amilasa no tiene acción sobre los gránulos del almidón, pero la alfa amilasa sí tiene efecto, aunque pequeño sobre ellos (37, 39).

El almidón está formado por dos fracciones: amilosa y amilopectina (20, 98) las cuales difieren entre sí en el tamaño y los tipos de enlaces presentes en cada una.

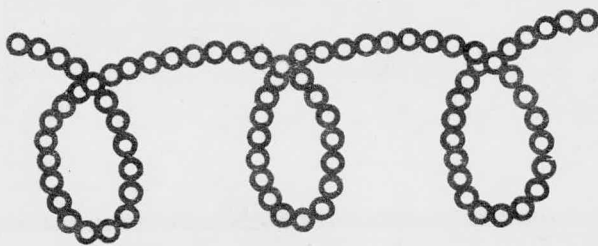
Amilosa.- Es una cadena lineal formada por monómeros de glucosa, unidos entre sí por enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos (48); presenta en su molécula un enrollado helicoidal, teniéndose una vuelta completa cada seis moléculas de glucosa (61), aunque hay opiniones diversas al respecto. Esta fracción es la responsable de la coloración azul que presenta el almidón con el yodo, ya que esto se debe a que la molécula de amilosa hidratada atrapa a las moléculas de yodo. Según sea el grado de hidrólisis de la molécula se presentarán diferentes coloraciones: azul oscuro, púrpura, rojo, café y amarillo; al contacto con una solución yodo-yodurada. La amilosa está

formada por 1,100 a 4,000 unidades de glucosa (20, 61, 89).

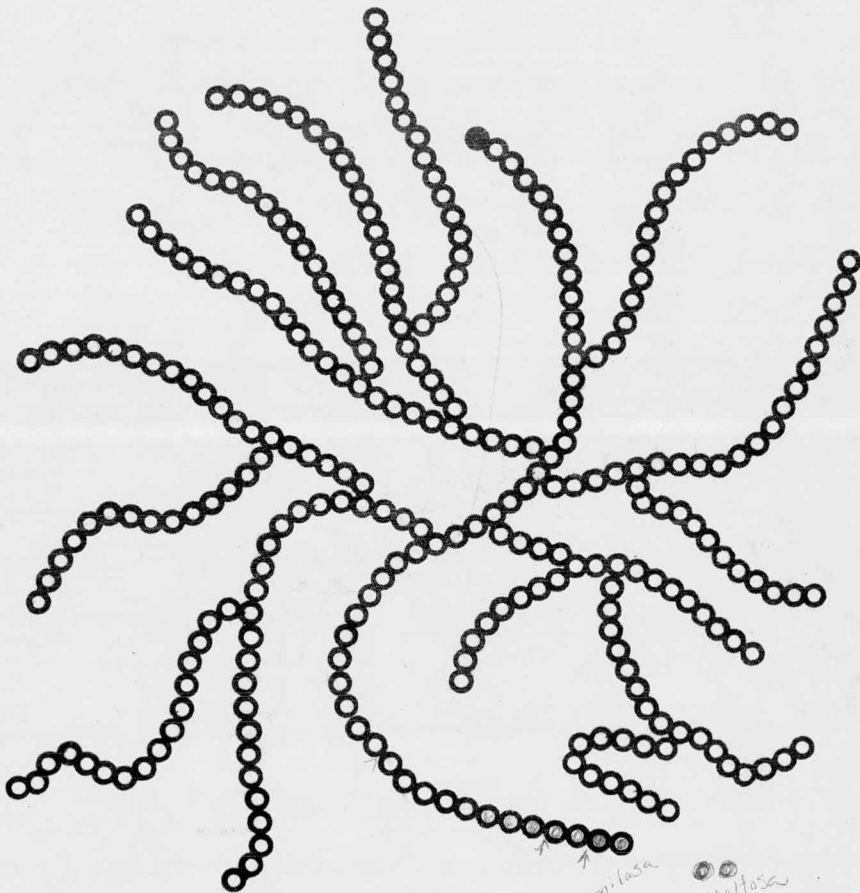
**Amilopectina.**- Es la parte ramificada del almidón, formada por aproximadamente 100,000 monómeros de glucosa, unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos en las partes lineales y  $\alpha$ -1,6 glucosídicos en las partes ramificadas. Presenta cadenas laterales con 25 unidades de glucosa (61). La amilopectina presente color café frente a una solución de yodo.

Las amilasas varían en su velocidad de acción -- sobre el sustrato, pero su forma de ataque al mismo es -- igual en cada caso, no importa su procedencia. Las características de la acción sobre el sustrato son: (77, 80, - 89, 83).

Alfa amilasa.- Actúa sin un orden determinado sobre las uniones  $\alpha$ -1,4 glucosídicas, produciendo dextrinas de bajo peso molecular (Dextrinización) y disminuyendo rápidamente la viscosidad de las soluciones de almidón (Licuefacción). Las dextrinas pueden ser normales (si -- proceden de amilosa) o ramificadas (amilopectina o glucógeno). Se produce después una sacarificación de las dextrinas, obteniéndose oligosacáridos como maltohexosa, maltopentosa, maltotetrosa o maltotriosa, según el tipo de actividad de la enzima sobre el sustrato (35, 48, 76). -- Siendo los productos finales de la hidrólisis maltosa y glucosa (en pequeña cantidad), la cual procede de la acción



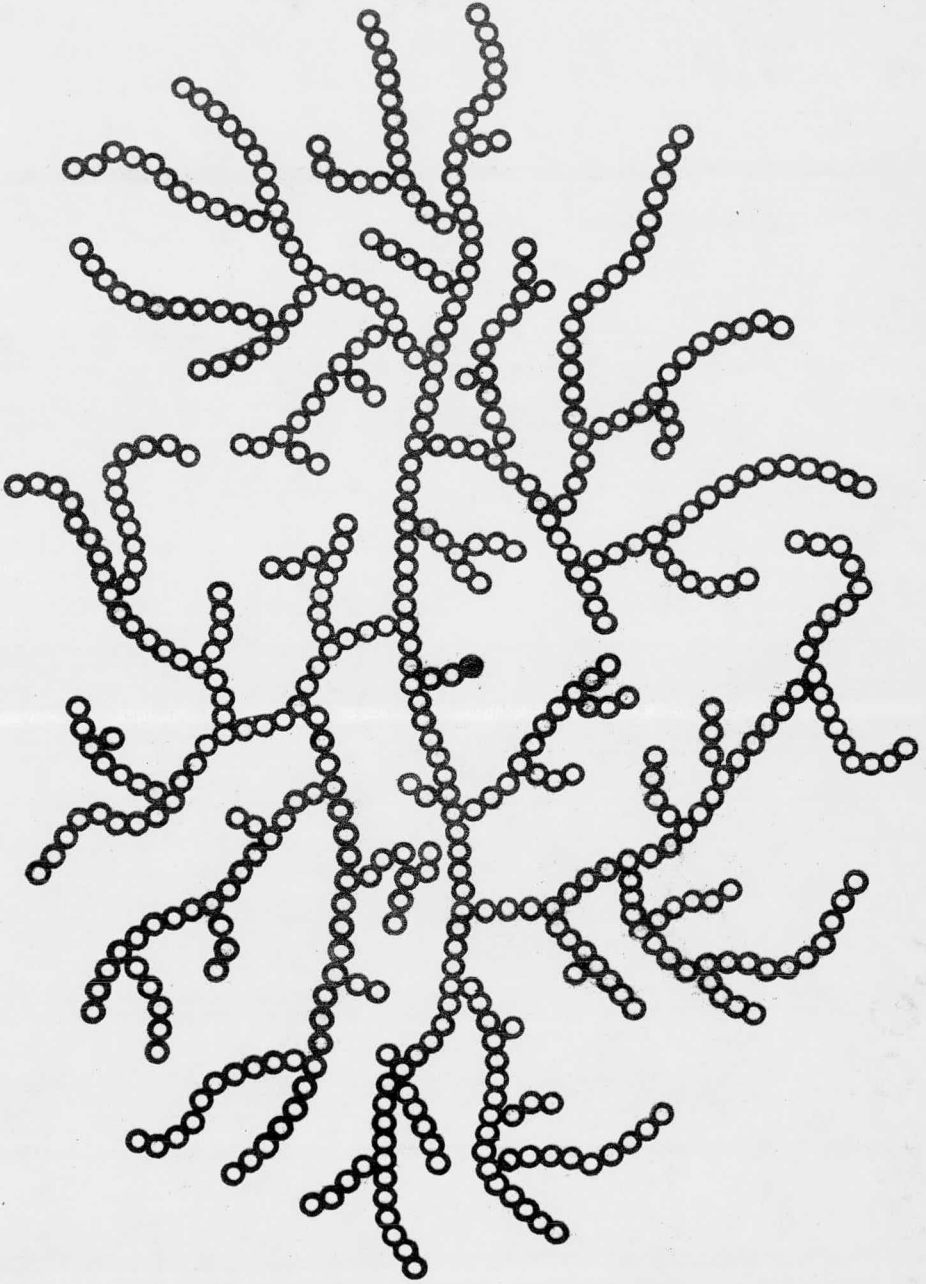
amilosa



amilopectina

*amylasa*  
*maltosa*  
*1.5x*

COMPONENTES DEL ALMIDON



ESTRUCTURA DEL GLUCOGENO

de la alfa amilasa sobre la maltotriosa (94, 100). ←

Beta amilasa.- El rompimiento del sustrato es a partir de la terminación no reductora de la cadena, su acción se localiza en los enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos alternados, con formación de maltosa como producto principal, la cual es removida para que la enzima prosiga su ataque al sustrato, la acción de la enzima es bloqueada cuando las cadenas libres han sido hidrolizadas a 2 ó 3 unidades de glucosa del punto ramificado (uniones  $\alpha$ -1,6 de la amilopectina y glucógeno), formándose la dextrina limitante. Con oligosacáridos de menor peso molecular, la acción termina hasta la completa conversión a maltosa.

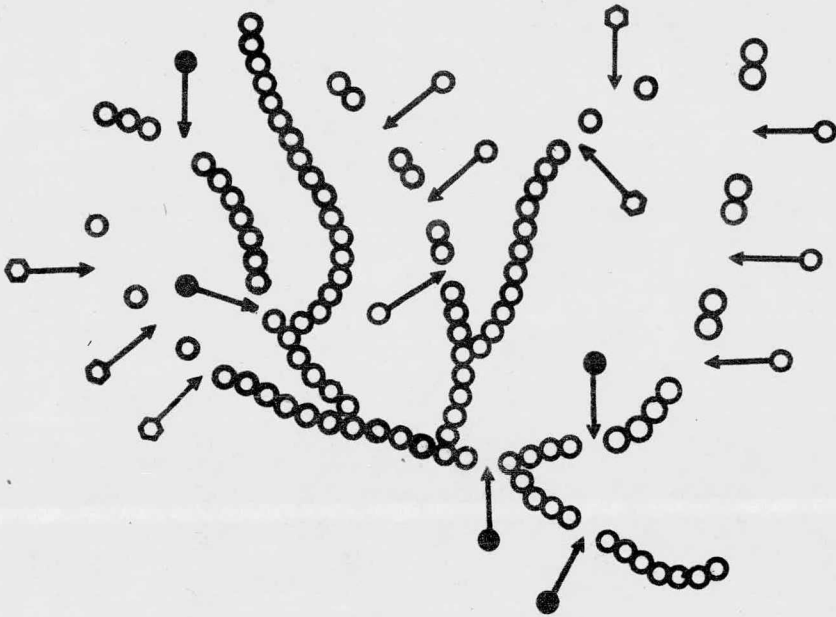
Gama amilasa o Glucoamilasa.- Únicamente rompe el enlace  $\alpha$ -1,4 glucosídico del extremo no reductor de la cadena para producir  $\alpha$ -glucosa (116).

Todas las enzimas mencionadas son incapaces de actuar sobre las uniones  $\alpha$ -1,6, de ahí que se produzcan dextrinas límite de alto peso molecular.

Debido a la formación de azúcares fermentables, a las beta y gama amilasas, se les llama Sacarificantes.

Actualmente se han reportado otras enzimas amilolíticas, aunque no ha sido bien estudiada su forma de acción:

## MECANISMO DE ACCION DE LAS AMILASAS



● → alfa amilasa

○ → beta "

○ → gama "

Cada círculo representa una molécula de glucosa .



Amiloglucosidasa de Aspergillus niger. Es capaz de hidrolizar las uniones  $\alpha$ -1,4,  $\alpha$ -1,6 y  $\alpha$ -1,3 de oligosacáridos como maltosa, isomaltosa y nigerosa para producir glucosa.

Isoamilasa o Amilo 1,6 dextrinasa.- Actúa rompiendo los enlaces internos 1,6 glucosídicos de la molécula de almidón (116).

### —▷ C. ASPECTOS BIOQUÍMICOS

Según la fuente de procedencia de la amilasa, se verá afectada en mayor o menor grado, por la influencia de diversos factores como: presencia de algunos iones, pH, temperatura y agentes desnaturizantes (84).

#### 1. Influencia de los iones.

Las amilasas son afectadas grandemente por la presencia de iones como  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Cd}^{++}$ , así como por  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Fe}^{+++}$ . Las alfa amilasas requieren  $\text{Ca}^{++}$  como cofactor. El metal estabiliza a la enzima contra la desnaturización por calor o álcalis (64, 71).

El  $\text{Ca}^{++}$  está unido fuertemente a la molécula de la amilasa, especialmente en las enzimas fúngicas, siendo sumamente difícil de remover y cuando se elimina, la enzima

se inactiva (74) o disminuye su actividad, siendo más -- sensible a los agentes desnaturalizantes (6). En algunas amilasas el calcio no previene la inactivación por temperatura (119, 122). ↵

Por electroforesis se han encontrado los siguientes iones unidos a la amilasa:  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  y  $\text{Zn}^{++}$  -- (102). Algunos iones combinados inhiben la actividad de la enzima, como en el caso de  $\text{Zn}^{++}/\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}/\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Zn}^{++}/\text{Mn}^{++}$ ; pero  $\text{Zn}^{++}/\text{Ca}^{++}$  la estimula (23, 64, 78).

↵ Los iones zinc sirven como puentes de enlace -- entre los monómeros de la alfa amilasa de Bacillus subtilis (97), reportándose también en esta amilasa los sitios de enlace del  $\text{Ca}^{++}$ -proteína (71). Se ha encontrado que -- estos iones mantienen la estructura del sitio activo, indirectamente, a través de la conformación de la proteína, pero no juegan papel de coenzima (89). ↵

↵ Los iones  $\text{Cl}^-$  son requeridos para la actividad -- de la alfa amilasa animal y bacteriana, pero las amilasas vegetales y fúngicas no los necesitan (6, 89). ↵

Los iones  $\text{Cu}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$  inactivan la beta amilasa, pero la alfa amilasa mantiene su actividad (4), también el calcio afecta la actividad amilolítica de la beta amilasa.

Los iones  $\text{I}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^-$  y metales pesados afectan

la actividad amilolítica (89).

## 2. Efecto de Temperatura y pH.

Las amilasas microbianas, especialmente las bacterianas, presentan una gran resistencia al calor, aumentando ésta en presencia del sustrato o de iones calcio.

Las temperaturas óptimas de actividad son elevadas en amilasas microbianas, mientras que en las amilasas vegetales y animales son menores, ya que se destruyen rápidamente a 60 ó 70°C (13, 89, 117).

El efecto del pH es muy grande, ya que generalmente resultan inactivadas a valores de pH extremos. La amilasa vegetal y animal es inactivada a pH ácido, mientras que la microbiana (hongos) en ácido es estable (121), encontrándose sus valores de pH óptimo de actividad en el rango ácido (6, 42, 69, 78, 118).

## 3. Agentes desnaturalizantes.

La actividad de la enzima se ve afectada por algunos factores como los detergentes y agentes quelantes.

El Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) es un detergente, el cual causa la inactivación de la beta amilasa de malta (75). Se reporta también la inactivación de la amilasa por compuestos fluorados como el 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (12), por urea, EDTA, ácido oxálico y azul -

de metileno (amilasa de Aspergillus awamori). (28, 82, 89, 108, 122).

Como el objeto principal de este trabajo es el estudio de amilasas microbianas, es nuestro propósito - dar a conocer algunas características y propiedades de las mismas.

✓ Para su estudio [ las amilasas microbianas se pueden dividir en tres grupos: amilasas de hongos, amilasas de levaduras y amilasas de bacterias. ]

#### AMILASAS DE HONGOS

→ Muchos son los hongos productores de amilasas, pero solo algunos han sido extensamente estudiados, como es el caso de Aspergillus oryzae cuya amilasa obtenida - por un procedimiento de concentración fué denominada Taka diastasa por Takamine (1898). La amilasa de A. oryzae, - no pierde su actividad a 45°C, de calentamiento durante una hora, pero sí a 65°C, su temperatura óptima es de --- 40°C. A valores de pH de 2.5 y 10 pierde totalmente su - actividad. La estabilidad máxima es a pH de 6.4 y su pH óptimo es de 5 a 5.5. 4

Preparaciones de la amilasa de este hongo, han - sido obtenidas por numerosos investigadores. De todos -- ellos citaremos a:

Cajocarú y col. quienes estudiaron el efecto de algunos factores de estabilidad de la enzima amilolítica de este hongo, obteniendo mayor actividad con  $\text{CaCl}_2$ , ---  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{CoCl}_2$  a pH de 5.5 y  $50^\circ\text{C}$  (19). Kundu determinó - que según la composición del medio y el pH, A. oryzae -- secreta  $\alpha$  o  $\beta$  amilasa o ambas (58). Qureshi y col. estudiaron el efecto de las fuentes de nitrógeno en la obtención de  $\alpha$ -amilasa, utilizando compuestos inorgánicos -- como:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{KNO}_3$ ; y compuestos orgánicos -- como peptona y levadura con los que obtuvo una máxima -- producción de  $\alpha$ -amilasa (88). El efecto de la aereación y los elementos huella tales como  $\text{Cr}^{++}$ ,  $\text{Mo}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ , en la biosíntesis de Taka-amilasa también han sido investigados (23, 59).

➤ Otros hongos productores de amilasa son:

Aspergillus niger, A. awamori, A. flavus, A. aureus, A. kawachi, A. terrícola, A. terreus, Penicillium sp., Rhizopus japonicus, Rh. delemar, Mucor rouxii. A los que con el fin de obtener una mayor concentración de amilasa en el medio de cultivo, se les han descrito fuentes adecuadas de nitrógeno y carbono, sales minerales, temperatura y pH apropiados. ➤

#### AMILASAS DE LEVADURAS

➤ En relación con las levaduras, se pensaba que no

contenían sino huellas de amilasa y se les consideraba incapaces de hidrolizar el almidón. Wickerham y col. en 1944, señalaron la existencia de una amilasa extracelular en Endomycopsis fibuliger (91). La enzima fué obtenida por Sánchez Marroquín (91) inoculando un medio conteniendo almidón soluble e incubando a 28°C por 3 a 8 días. La temperatura óptima para las  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas fué de 50°C y los valores óptimos de pH fueron respectivamente 5 a 6 y 4 a 5 (91). ~~4~~

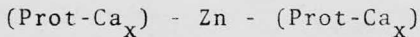
#### → AMILASAS DE BACTERIAS

Se han descrito diferentes bacterias productoras de amilasas, de las cuales citaremos las siguientes:

→ Bacillus subtilis.- Hopkins y col. encontraron que la amilasa de esta bacteria es muy similar a la  $\alpha$ -amilasa de malta. La enzima es muy estable en el rango de pH de 5.8 a 10.8, teniendo un óptimo de 6.5 a 7.0. Difiere de la mayoría de las amilasas en su termoestabilidad, pues produce rápida licuefacción del almidón a altas temperaturas (95°C). Produce un rápido decrecimiento de la viscosidad del almidón y lo hidroliza formando dextrinas. ~~4~~

Bendetskii realizó ensayos para determinar el mecanismo de acción de la  $\alpha$ -amilasa de esta bacteria durante la hidrólisis del almidón (10). Boyer e Ingle purificaron la enzima, tres isoenzimas fueron encontradas

por electroforesis en gel de poliacrilamida. La enzima fué estable a pH de 7.5 a 10 (15). La  $\alpha$ -amilasa de Bacillus subtilis puede ser precipitada, dializada o filtrada en gel sin pérdida de actividad. La adición de NaCl al 10% y de timol al 0.1%, previno la pérdida de actividad a temperatura ambiente (36). La producción de una enzima alcalina, con peso molecular de 70,000, pH óptimo de 10.5 y temperatura óptima de 55°C, por microorganismos alcalófilos fué descrita por Horikoshi (49). El efecto de iones metálicos como activadores en la velocidad de reacción de  $\alpha$ -amilasa, fué estudiado por Mahmoud y col., quienes encontraron que la actividad enzimática se incrementa en presencia de  $Zn^{++}$  (32.5 ppm) o  $Ca^{++}$  (205 ppm). La necesidad de más altas concentraciones de  $Ca^{++}$  que  $Zn^{++}$  se apoya en la evidencia de que el  $Zn^{++}$  une dos moléculas de metaloproteína de calcio: (65, 97).



Otros factores tales como: cantidad de inóculo, amortiguadores, fuentes de nitrógeno (urea, peptona, extracto de salvado), y carbono, aereación, adición de ácido giberélico (107) y de agua de mar al medio de cultivo, han sido estudiados.

Bacillus polymyxa produce una enzima distinta a la de B. macerans, no solo por su acción sobre el almidón al cual transforma en sustancias reductoras, sino también

en las condiciones óptimas de temperatura y pH requeridas para su actividad. Su pH óptimo es de 6.8 y se inactiva a 50°C (105).

Se le han considerado varias propiedades a la enzima de Bacillus stearothermophilus como: peso molecular, composición de aminoácidos, propiedades electroforéticas y enzimáticas, termoestabilidad, etc. (119).

La enzima de Bacillus coagulans tiene un peso molecular de 11,000, es termoestable (80-100°C) y puede obtenerse en un medio conteniendo glicerol, extracto de levadura y cal (93).

→ Bacillus licheniformis, B. cereus, B. circulans, B. megatherium, Clostridium acetobutylicum, Rhizobium sp, Pseudomonas saccharophila, Vibrio parahaemolyticus, Streptomyces sp., S. albus, S. flavus, S. aureofaciens se han reportado también como bacterias amilolíticas.

→ La presencia de calcio y de otros iones divalentes en varias preparaciones de  $\alpha$ -amilasas microbianas, ha sido reportada por varios investigadores, estableciendo que estas enzimas son resistentes a ataques proteolíticos, sin embargo en presencia de agentes quelantes las  $\alpha$ -amilasas son susceptibles a degradación proteolítica. Parece ser que el Zn aparentemente no se requiere para la protección de la enzima, sino para inducir la dimerización de la



molécula de  $\alpha$ -amilasa (53, 54, 96, 97). 4

#### → PURIFICACION DE AMILASAS

Se han descrito varios métodos para la extracción y purificación de las amilasas microbianas, basados principalmente en la precipitación con sulfato de amonio, acetona o rivanol (2-etoxi-6,9-diamino acridina), y en el empleo de columnas de intercambio iónico: DEAE-celulosa, DEAE-sephadex, y de adsorción (amberlita, almidón celita), principalmente, con los que se ha obtenido un alto grado de purificación (45, 44, 66, 73, 106).

#### → D. BIOSINTESIS DE AMILASAS MICROBIANAS 4

La amilasa es una enzima inducible, según la -- fuente de carbono utilizada para el cultivo de los microorganismos (3, 72, 116). Se ha observado un incremento en la producción cuando la fuente de carbono es almidón (118), aunque hay también inducción por la presencia de maltosa, glucógeno, isomaltosa, peptona, extracto de levadura, licor de maíz, tripticasa y caseína (34), esta inducción varía según la cepa microbiana de que se trate (57).

→ En general los factores que afectan la producción

de la amilasa microbiana son: fuente de carbono y nitrógeno, pH, temperatura, iones metálicos, tipo de cultivo (estático o agitado, aereado, sincronizado, etc.) y la cantidad de inóculo, así como las condiciones específicas de cada microorganismo (52, 59). ~~A~~

Los estudios de la biosíntesis microbiana de amilasa fueron iniciados por Fukumoto (1943); según la cepa microbiana la fase de máxima producción de amilasa, se presentará a diferentes tiempos, por ejemplo: en B. subtilis y en B. circulans el nivel máximo de producción es a las 20 horas, cuando el cultivo está en la fase logarítmica; pero en otras cepas la producción es hasta la fase estacionaria o hasta tiempo después de alcanzada ésta (21, 104). Hay cepas que alcanzan su máximo hasta las 72 horas, a los 4, 5 ó 6 días (A. niger) (3). En B. polymyxa el máximo de actividad de la enzima fué al final del ciclo de cultivo (58).

La producción de la amilasa está regulada por un mecanismo de represión catabólica (104), por lo cual en algunas cepas es inhibida por la presencia de azúcares como maltosa y glucosa (68). Por medio de estudios genéticos se han encontrado genes reguladores en B. subtilis para alfa amilasa. ~~A~~

Para la mayor producción de amilasa se han utilizado cepas mutantes, producidas por diversos agentes como luz ultravioleta, N-metil-N'-nitro-nitroso-guanidina

(2), etilenimina (90). También se han hecho estudios acerca de sustancias estimulantes de la producción de amilasas, como el ácido giberélico (107) y algunas iminas como la espermina.

Algunos agentes como la N-Bromo succinimida, yodo, yodo-acetato, 2,4-dinitrofluorobenceno, mercurio y glicina inhiben la producción de amilasa por el microorganismo, esto pasa también por la presencia de glucosa (12, 68, 74).

Para la producción industrial de amilasa microbiana se utiliza frecuentemente el medio de Czapeck-Dox (3), realizándose en cultivo sumergido a tiempos variables según el microorganismo (95, 112); los más empleados son B. subtilis, A. oryzae, A. awamori, y otros en menor frecuencia.

Varios desperdicios agrícolas (harina de cáscara de trigo, maíz, trigo, arroz y almidón) se han utilizado como sustrato en la producción de amilasa por A. terreus y Penicillium citrinum (22, 57, 72).

#### → E. DETERMINACION DE LA ACCION AMIOLITICA ✓

→ La acción de las amilasas está caracterizada por los cambios simultáneos en las siguientes propiedades del

sustrato:

- a). Disminución de la viscosidad.
- b). Incremento del poder reductor
- c). Cambio del color con solución acuosa de yodo.
- d). Cambio en la actividad óptica rotatoria.

Los métodos descritos en la literatura para determinación de la actividad amilolítica, se basan en algunos de los fenómenos anteriores, principalmente de los tres primeros.

La actividad amilolítica se expresa como:

- a). Licuefacción.
- b). Sacarificación. → *no para  $\alpha$ -amilasa*
- c). Dextrinización.

dependiendo del método usado.

Los valores numéricos obtenidos por un método dado, difieren de los otros métodos, dependiendo de las condiciones: pH, temperatura, volumen de los reactivos y naturaleza del sustrato. ↙

Para la determinación de la licuefacción se emplean los métodos Viscosimétricos, los cuales muestran la acción amilolítica aun a grados de hidrólisis extremadamente bajos. Myrbäck y Gjorling, encontraron que cuando la viscosidad de una cierta pasta de almidón ha goteado

la mitad del valor inicial, solamente alrededor de 0.1% de las uniones glucosídicas fueron rotas (74). ~~4~~

El método sacarificante se basa en la determinación de azúcares reductores formados durante la hidrólisis del almidón.

Los reactivos utilizados más frecuentemente para caracterizar azúcares reductores, son los siguientes:

A. Reactivos con sales metálicas: (cationes).

I. Reactivo de Trommer: solución alcalina de sulfato cúprico en hidróxido de sodio. Tiene por base la formación de óxido cuproso. Existen varias modificaciones de este reactivo, tales como:

1. Reactivo de Fehling: solución alcalina de sulfato cúprico y tartrato sódico potásico. El ion cúprico es reducido a ion cuproso, formándose óxido cuproso rojo, insoluble, que puede ser determinado cuantitativamente.
2. Reactivo de Benedict: que es una solución -- acuosa de sulfato cúprico, citrato sódico y carbonato de sodio; el citrato estabiliza al  $\text{Cu}^{++}$  durante la reacción, evitando que precipite en forma de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , que es insoluble y de color azul celeste.

3. Reactivo de Barfoed: solución ácida de una sal de cobre (acetato de cobre en ácido -- acético).

II. Reactivo de Nylander: solución alcalina de subnitrato de bismuto y tartrato doble de sodio y potasio. El ion  $\text{Bi}^{+++}$  queda reducido a bismuto metálico negro, que precipita.

III. Reactivo de Knapp: solución alcalina de cianuro mercúrico e hidróxido de sodio. Esta solución es reducida por calentamiento con la solución de azúcares, depositándose mercurio metálico.

IV. Reactivo de Tollens: solución amoniacal de nitrato de plata. El  $\text{AgOH}$  es reducido a plata metálica (16).

B. Reactivos con aniones:

Los azúcares reductores pueden también oxidarse por el ion ferricianuro ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ ), que es reducido a ferrocianuro ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$ ), como en el método de ---- Hagedorn-Jensen.

C. Reactivos orgánicos:

El ácido 3,5-dinitro salicílico puede reducirse en - solución alcalina caliente, a ácido 3-amino-5-nitro

salicílico, de color anaranjado que puede medirse - colorimétricamente (62).

→ El poder dextrinizante es medido por los cambios de color de la mezcla de reacción, con solución acuosa de yodo (32). ↗

#### F. IMPORTANCIA INDUSTRIAL DE LAS AMILASAS

Las amilasas son usadas en grandes cantidades - para propósitos industriales, por lo que sus actividades catalíticas han sido estudiadas no solo por su interés - académico, sino también por su aplicación industrial.

#### INDUSTRIA ALIMENTARIA

Con frecuencia el uso de almidón hidrolizado, - permite preparar alimentos con texturas más suaves, mejo rar emulsificación y aumentar el poder edulcorante. La hidrólisis se lleva a cabo algunas veces por métodos quí micos (ácidos orgánicos o minerales), pero con mezclas - de enzimas selectas puede obtenerse un control más refi- nado, ya que así es posible lograr un balance entre dex- trinas y azúcares intermedios, para alcanzar la viscosi- dad y sabor dulce deseados. Aplicaciones típicas son:

→ 1. Preparación de alimentos para enfermos y niños, como cereales, en los cuales se usa amilasa funga. El cereal se calienta a una temperatura de 65 a 70°C y se agrega a la amilasa, la hidrólisis se lleva a cabo en 4 minutos, después de lo cual se eleva la temperatura a 100°C, con lo que el producto se seca y la enzima se inactiva (116).

→ 2. Elaboración de leche malteada, dulces, jugos, helados y aditivos para repostería, por ejemplo: el jarabe de chocolate puede hacerse tratando suspensiones de cocoa con amilasa funga o bacteriana; la suspensión de cocoa se ajusta a pH de 6.2 a 6.6 con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ó  $\text{HCl}$  y se calienta a 85-90°C durante 30 minutos. La masa gelatinizada se enfría a 60°C antes de agregar la amilasa, obteniéndose un producto con mejor sabor y solubilidad en leche (116).

→ Los almidones pueden ser hidrolizados por amilasas de malta y fúngica, para obtener mieles de bajo equivalente de dextrosa (D.E.), conteniendo más o menos 80% de carbohidratos fermentables (31).

Algunas bebidas dulces con sabor a café, son preparadas por tratamiento de extractos de café con proteasa y amilasas, con las que se degradan proteínas y carbohidratos en el extracto, reduciéndose la formación



de espuma durante el proceso de embotellamiento (99). D

El jugo de frutas recientemente exprimido, suele ser turbio debido a la presencia de almidón en suspensión, el cual puede eliminarse mediante una adecuada mezcla de amilasas. Esta debe ser activa y estable a pH ácido. - Dicho tratamiento (Clarificación) es particularmente útil con el jugo de manzana que se expende con un aspecto claro y brillante (114).

3. En la producción de pan, es común agregar  $\alpha$ -amilasa para modificar el almidón de la harina, de lo que resulta mayor volumen de la hogaza y más blandura en la miga del pan. Esto se puede hacer con la amilasa fungal, ya que la amilasa bacteriana continuaría actuando con el almidón, a temperaturas algo elevadas dentro del horno y produciría un migajón blando pero algo chicloso 4 (114).

#### INDUSTRIAS CERVECERA Y DE BEBIDAS DESTILADAS

En estas industrias, se hace uso de malta de cebada para transformar el almidón gelificado, en azúcares y polisacáridos más pequeños, sobre los cuales puede actuar la levadura. Es poco probable que en la fabricación de la cerveza, la malta llegue a ser desplazada, pero ---

existen indicaciones de que otras fuentes de amilasas (microbianas), resultan más eficientes en la producción de etanol no potable. En la producción de whisky o de alcohol industrial, la cantidad de malta empleada (8-12%), puede influir desventajosamente en el macerado, en este caso se emplean con éxito enzimas fungales. Esta aplicación de las amilasas de hongos, se realiza en algunas -- destilerías que producen la enzima a partir de Aspergillus niger, en el propio equipo de fermentación (114, 41). ~~4~~

#### OTRAS INDUSTRIAS

— Las amilasas microbianas, también son adicionadas a detergentes de uso doméstico e industrial ( $\alpha$ -amilasa de B. subtilis) a depiladores de cuero de animales y a pastas de almidón para la elaboración de adhesivos.

Las amilasas bacterianas se usan siempre que el almidón tiene que eliminarse o hidrolizarse parcialmente a temperaturas elevadas. Este es el caso al quitar el -apresto de las telas acondicionadas con almidón en la -- industria textil y modificar el almidón para el revestimiento de papeles (114).

En el campo Farmacéutico, las preparaciones de amilasa fungal (Taka-diastrasa), son empleadas como ayuda durante la digestión, cuando existe deficiencia de amilasas pancreática y salival, y como anti-inflamatoria (81).

## III. MATERIALES Y METODOS

Material:

- 3.1 Cristalería en general.
- 3.2 Agitador de tubos de ensayo VORTEX-GENIE.
- 3.3 Centrífugas: Andreas Hettich, modelo Se-DGE 2116. Refrigerada, Internacional PR-2; cabezal: 296 a 25,000 x g.
- 3.4 Columnas para filtración molecular con camisa de refrigeración: 40 cm de largo x 1.5 cm de diámetro, y 25 cm de largo x 1.5 cm de diámetro.
- 3.5 Colector de fracciones RADI-RAC LKB.
- 3.6 Congelador REVKO ULTRA LOW (0 a -50°C).
- 3.7 Espectrofotómetros: CARL ZEISS PM Q-II, y PYE -- UNICAM SP-1800.
- 3.8 Mesa de agitación rotatoria Kinet: 100 rpm.
- 3.9 Sistema AMICON para ultrafiltración molecular.
- 3.10 Sonicador Branson, tipo LTH-1620-18, frecuencia 25 KHZ.

Reactivos:

Se obtuvieron de casas comerciales:

Merck: Acrilamida, Almidón soluble, Amido negro (colorante para proteínas), Bis-acrilamida (N,N'-meti

len-bis-acrilamida), Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), Maltosa, N,N,N',N'-tetrametilen diamina (TEMED).

Sigma: Ovoalbúmina, Gamma globulina de ratón, Amilasa de malta.

Bio-Rad Laboratories: Biogel P-100.

#### 4. MICROORGANISMOS.

Las cepas empleadas en este trabajo, fueron ais- *Acobaldado del pezón de la Pa. al. G. y el agar amilolítico y para el cultivo*

ladas de diversas fuentes, las cuales se seleccionaron - en base al criterio de que los microorganismos amilolíticos se localizarían en mayor proporción en lugares en -- los cuales hubiese almidón, ya que la producción de amilasa es inducida por la mayor o menor cantidad de éste - en el hábitat microbiano, aunque el muestreo se extendió también a fuentes diversas.

El muestreo de suelos fué realizado de acuerdo a las técnicas de Sánchez Marroquín (92) y Echegaray A. (29). Para muestras líquidas se emplearon frascos estériles, guardándose la muestra en refrigeración, no más de 24 horas, y en algunos casos llevando la placa de -- cultivo al lugar del muestreo. El aislamiento de los - microorganismos del aire, se realizó dejando cajas de - petri con el medio, abiertas durante 30 minutos en el -

lugar deseado.

Las muestras sólidas, con crecimiento microbiano, fueron aisladas tomando directamente con el asa y sembrando en placas de agar almidón.

Fuentes de Aislamiento.

1. Suelos de cultivo de: maíz, frijol, haba, chilacayote alfalfa (regada con aguas negras), chile. (Col. Pedro Ma. Anaya, Tula, Hgo.).
2. Suelos de plantas de: dalia, gladiola, malvón, malva, hoja elegante, papa, camote, coliflor, epazote y alfalfa (Xochimilco, D.F.).
3. Suelo de un campo de mezquites (Tepetitlán, Tula, -- Hgo.).
4. Suelos de milpa y establo (Xochimilco, D.F.).
5. Suelo de un pirul (Schinus molle).
6. Suelo de jardín (Copilco, U. Vicente Guerrero, UCTM, Col. Ajusco y Fac. de Química, UNAM.).
7. Suelo de cultivo de maíz (Cuernavaca, Mor.).
8. Suelo de basureros (UNAM., U. Vicente Guerrero, Ajusco).
9. Muestras de basura fermentada, en diferentes lapsos

de tiempo (1a., 2a. y 3a. semana).

10. Suelo de porqueriza (Tula, Hgo.).
  11. Estiércol seco.
  12. Aire de basureros (UNAM., U. Vicente Guerrero).
  13. Aire del Laboratorio de Microbiología, Fac. Química, UNAM.
  14. Alimentos enmohecidos: tortilla, pan, arroz cocido, elote, plátano, durazno, manzana, coco.
  15. Papas en estado de putrefacción.
  16. Pulque.
  17. Agua de lavado de papas, aguas negras (drenaje) y agua de charco con materia en descomposición.
  18. Hongos contaminantes en estudio de Micrococcus.
  19. Cepa pura de Aspergillus niger. (Prácticas de Biosíntesis Microbiana de Aplicación Industrial).
5. MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo utilizados fueron escogidos y elaborados en base a las necesidades de selección de microorganismos productores de amilasas, empleándose como carbohidrato principal almidón, para inducir la síntesis de la enzima (8, 11, 112, 116).

Los medios de cultivo fueron de acuerdo a la literatura consultada, haciéndose variaciones de los ingre-  
dientes y concentraciones de éstos, según las observacio-  
nes hechas sobre la marcha de trabajo, por lo cual se --  
probó un cierto número de medios para el aislamiento, cul-  
tivo y conservación de microorganismos.

El medio inicial fué de acuerdo a la formulación de las prácticas de Biosíntesis Microbiana de Aplicación Industrial, Facultad de Química, UNAM., 1974, (Medio A). El medio B se realizó de acuerdo a Bailey (9). Los me--  
dios subsecuentes (C a J) son variaciones de los anterio-  
res, así como las formulaciones de Prescott (87), Under-  
kofler (110) y referencias bibliográficas recientes (7,  
11, 112, 116).

#### I. MEDIOS UTILIZADOS PARA EL AISLAMIENTO DE LAS CEPAS.

<u>M e d i o</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>
Almidón soluble	2.0 g	2.0 g	3,4,5 g	5.0 g
Peptona	0.5 g	0.5 g	0.2 g	0.2 g
Extracto de levadura	0.5 g	0.5 g	0.2 g	0.2 g
Maltosa	0.0	0.1 g	0.1 g	0.0
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.1 g	0.2 g	0.1 g	0.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g	0.2 g	0.1 g	0.2 g
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0.0	0.2 g	0.1 g	0.2 g
Agar	2.0 g	2.0 g	2.0 g	2.0 g
Agua destilada	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

✓  
a/s

<u>Medio</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>H</u>	<u>I</u>
Almidón soluble	2.0 g	2.0 g	1.0 g	1.0 g	1.0 g
Peptona	0.2 g	0.0	0.0	0.2 g	0.0
Extracto de levadura	0.2 g	0.0	0.0	0.2 g	0.2 g
Maltosa	0.0	0.0	0.2 g	0.0	0.0
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.2 g	0.01 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g	0.01 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0.2 g	0.02 g	0.01 g	0.01 g	0.01 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.0	0.2 g	0.2 g	0.0	0.0
Agar	2.0 g	2.0 g	2.0 g	2.0 g	2.0 g
Agua destilada	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml

## II. MEDIOS SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO Y CONSERVACION DE LAS CEPAS.

<u>Medio</u>	<u>J</u>	<u>K</u>
Almidón soluble	2.0 g	1.0 g
Peptona	0.2 g	0.2 g
Extracto de levadura	0.2 g	0.2 g
Maltosa	0.0	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01 g	0.1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.01 g	0.1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.02 g	0.01 g
Agar	2.0 g	2.0 g
Agua destilada	100 ml	100 ml

Cuando se empleó medio líquido se suprimió el agar. Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos.



## M E T O D O S

## AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.

Para el aislamiento de los microorganismos productores de amilasas, se emplearon los siguientes métodos:

6.1. Método de dilución: las diluciones se prepararon en tubos conteniendo 9 ml de agua destilada o agua peptonada al 0.1% estériles. Al primer tubo se le agregó 1 g de muestra, se mezcló perfectamente, con una pipeta estéril se tomó 1 ml de esta dilución ( $10^{-1}$ ) y se colocó en un segundo tubo. Este proceso se repitió hasta obtener una dilución de  $10^{-6}$ . La siembra de las muestras fue realizada en placas de agar-almidón utilizando las diluciones de  $10^{-4}$  (0.1 ml),  $10^{-5}$  (0.3 ml) y  $10^{-6}$  (0.5 ml).

6.2. Método de estrías: la muestra diluida previamente ( $10^{-1}$ ), se sembró por estrías con el asa en la superficie del agar.

Las cajas sembradas por ambos métodos, se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 horas.

Las colonias aisladas fueron resembradas en tubos de ensayo conteniendo el medio de conservación (inclinado) para su estudio posterior. Se almacenaron en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  después de su crecimiento.

## SELECCION DE MICROORGANISMOS.

Una vez hecho el aislamiento y conservación de las cepas microbianas, se procedió a realizar la selección primaria de aquellos microorganismos productores de amilasas.

6.3. Las cepas fueron sembradas en el medio K, dejándose crecer durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 días a 28°C. - Después de cada tiempo se probó la hidrólisis del almidón agregando solución yodo-yodurada: 1 g de  $I_2$ , 3 g de KI, - 300 ml de  $H_2O$  (Solución de Lugol), midiéndose la longitud del halo de transparencia.

La medición de la longitud de los halos de hidrólisis alrededor de la colonia microbiana, permitió seleccionar las cepas a las cuales se les aplicaron las siguientes pruebas, para una segunda selección.

6.4. Influencia del pH en la actividad amilolítica de las cepas seleccionadas.

Cada una de las cepas se sembró en placas de agar-almidón con los diferentes valores de pH: 5, 6, 7, 8 y 9; los cuales fueron obtenidos con HCl ó NaOH 1N, antes de esterilizar el medio.

Una vez sembradas las placas fueron incubadas -

durante 6 días a 28°C. Los resultados se expresan en mm de hidrólisis obtenidos al agregar solución de Lugol.

#### 6.5. Determinación de la Actividad Amilolítica: disminución de la viscosidad (Licuefacción).

Por este método, se determinó el tiempo necesario para la licuefacción de una pasta de almidón comercial ("Linnit") gelatinizada; la técnica fué la siguiente:

La pasta de almidón se preparó por adición de 5.5 g de almidón en 100 ml de agua destilada, se calentó hasta ebullición durante unos minutos con agitación constante, para conseguir la completa gelificación del almidón; aun caliente, se distribuyó en tubos de ensayo (0.9 ml) y cuando adquirieron una temperatura de aproximadamente 37°C, se agregó 0.1 ml del sobrenadante obtenido por centrifugación a 3,500 rpm, durante 20 minutos, de un cultivo de 6 días; mezclándose perfectamente. Los tubos se mantuvieron en refrigeración durante 5 minutos (tiempo necesario para que la mezcla solidificara). Posteriormente los tubos se incubaron a 28°C, hasta que se licuó el gel de almidón.

Los tiempos de escurrimiento se registraron en cada caso, y aquellos sobrenadantes en los cuales la licuefacción del almidón fué extremadamente rápida, se diluyeron 1:10 y 1:20.

La medición de los halos de hidrólisis a diferentes valores de pH para cada cepa, así como la determinación del tiempo de licuefacción del almidón, permitieron reducir el número de cepas, las cuales se sometieron a las siguientes determinaciones:

6.6. Efecto de las variaciones de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  en la actividad amilolítica.

Para esta determinación, al medio de agar-almidón (K), se le adicionó  $\text{CaCl}_2$  a diferentes concentraciones: - 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.15 y 0.2%.

Con el propósito de eliminar el calcio que pudiera estar como impureza de los reactivos, una vez preparado el medio (sin  $\text{CaCl}_2$ ), se agregó oxalato de sodio en proporción de 2, 3 y 4 mM.

Las cepas seleccionadas se sembraron en cada una de las concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  y oxalato de sodio, incubándose a  $28^\circ\text{C}$  durante 6 días. Después de este tiempo se midió el halo de hidrólisis agregando solución de Lugol.

6.7. Prueba de Catalasa.

Paralelamente a la determinación anterior, se investigó la presencia de catalasa en las cepas microbianas.

6.8. Efecto del sonicado sobre la actividad --  
amilolítica.

Para la obtención de mayor concentración de enzi  
ma en el medio de cultivo, algunas cepas fueron sonicadas  
bajo diferentes condiciones:

Algunas cepas se cultivaron en matraces erlenme-  
yer con medio líquido de almidón, algunas en condiciones  
agitadas y estáticas, mientras que otras únicamente se --  
cultivaron sin agitación. El período de incubación fué --  
el normal (6 días a 28°C).

Después, 2 ml de cada cultivo se colocaron en -  
tubos de ensayo conteniendo:

- Perlas de vidrio: las suficientes para cubrir  
la suspensión de células.
- Polvo de carborundum (carburo de silicio).
- Polvo de vidrio.

Controles: únicamente 2 ml del cultivo.

Todos los tubos fueron sonicados durante 20 mi-  
nutos a temperatura ambiente, con una frecuencia de 25 -  
KHz, a excepción de un control para cada cepa.

La enzima fué separada por centrifugación: 3,500  
rpm, durante dos períodos de 20 minutos cada uno, el so-

brenadante se pasó por fibra de vidrio.

La actividad amilolítica se determinó cualitativamente por el siguiente procedimiento:

6.9. Método Dextrinizante (cambio de color con solución de Lugol).

El sustrato utilizado fué una solución de almidón soluble al 0.1%. A 5 ml de esta solución se le agregó 1 ml de la enzima problema, manteniéndose la mezcla a temperatura ambiente.

Cada minuto se tomó una gota de la mezcla con micropipeta (0.025 ml), colocándose en una placa excavada que previamente contenía una gota (0.025 ml) de solución de Lugol.

Por este procedimiento se observó el tiempo necesario para que la reacción Almidón-Yodo fuera negativa -- (coloración amarilla). La reacción presenta sucesivamente los colores: azul-negro, violeta, café rojizo, café, ámbar, ámbar claro y amarillo; según sea la actividad de la enzima (76).

#### DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA

6.10. Método Sacarogénico.

Para la determinación de azúcares reductores -- (maltosa) formados por la acción de la amilasa sobre el almidón, se empleó el método Yodimétrico de Underkofler et al. (111).

Se colocó la enzima (obtenida como en el caso anterior) sobre una solución de almidón al 0.1%, dejándose actuar diferentes tiempos. La reacción fué detenida por introducción de los tubos en agua hirviendo, durante 1 minuto. Se tomó 1 ml de la mezcla anterior y se llevó a un volumen final de 5 ml con agua destilada, procediéndose al análisis.

Los valores obtenidos se compararon con los de una curva patrón de maltosa.

Este método se empleó en los siguientes experimentos:

1. Las cepas 25, 29, 83 y 84 fueron cultivadas en medio líquido durante 6 días a 28°C. La enzima se -- separó en la forma acostumbrada (centrifugación a 3,500 rpm, durante dos períodos de 20 minutos cada uno); 1 ml del sobrenadante se mezcló con 5 ml de solución de almidón :

a). Se dejó actuar durante 5, 5, 10, 15 y 30 - minutos a temperatura ambiente.

b). Se incubó a temperatura ambiente y a 28°C durante 30 y 60 minutos.

2. Las cepas 16, 20, 25, 24, 29, 32, 83 y 84 se sembraron en matraces erlenmeyer conteniendo medio líquido de almidón, se incubaron 6 días a 28°C. Estas cepas fueron sometidas a sonicación durante diferentes tiempos: 5, 15, 30 y 60 minutos, para lo cual, cada cultivo fué repartido en tubos de ensayo (5 ml). La enzima se separó por centrifugación: 1 ml del sobrenadante se mezcló con 1 ml de solución de almidón, determinándose los azúcares reductores formados a 50, 60 y 90 minutos de acción, a temperatura ambiente.

3. La actividad de las cepas anteriores fué comparada con la de amilasa de malta, mediante la obtención de azúcares reductores (maltosa), por la acción de:

Amilasa de Malta (1 mg/ml)	Almidón (0.1%)
1 ml	1 ml
1 "	5 "
1 "	10 "

Se dejó actuar la enzima 30, 60 y 90 minutos.



PURIFICACION DE LA ENZIMA (33, 39, 60, 69, 101, 109).

Una vez conocidos los datos de actividad, cualitativos y cuantitativos, se escogieron dos cepas microbianas que mostraron resultados más interesantes.

6.11. Precipitación de la enzima con sulfato de amonio.

Cada una de las cepas seleccionadas fué sembrada en dos matraces que contenían 150 ml de medio líquido --- (3 asadas de cultivo microbiano), bajo sus condiciones -- óptimas de pH y concentración de iones calcio, en cultivo agitado (aereado), incubando a 28°C, durante 6 días. Después de este tiempo uno de los matraces (de cada cepa) se sometió a sonicación por 60 minutos a temperatura ambiente y 25 KHz.

La masa celular (cultivos sonicados y no sonicados), fué separada por centrifugación a 8,000 rpm a 4°C, durante 60 minutos. El sobrenadante se filtró sobre fibra de vidrio, precipitándose con sulfato de amonio a -- 0°C.

La precipitación se hizo agregando sulfato de -- amonio en forma sólida, poco a poco, hasta llegar a un -- 90% de saturación, en que se observó formación de un precipitado. Se hizo la separación por centrifugación a ---

8,000 rpm a 0°C durante 60 minutos.

Las fracciones: precipitado y sobrenadante se dializaron (usando una membrana de papel celofán) contra agua destilada a 4°C. El agua de diálisis fué removida diariamente. La identificación del sulfato de amonio residual presente en la muestra, se realizó por medio de una solución de BaCl<sub>2</sub> al 2%.

Una vez terminada la diálisis se verificó la actividad presente en cada una de las muestras, colocando 0.2 ml del dializado sobre 1 ml de solución de almidón al 0.1%, por el método de dextrinizante (6.9.).

#### ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS PARA LA PURIFICACION DE LA ENZIMA

Material: Cultivo en medio líquido, durante 6 días a 28°C sin sonicar, centrifugado a 10,000 rpm, a 0°C durante 1 hora.

Determinaciones: Proteínas.- Método de Lowry (63).

Actividad.- Poder dextrinizante (6.9.).

Estudios: Concentración con sacarosa

- Electroforesis en gel (1, 70, 79, 113, 115).
- Concentración por filtración molecular (Amicón).
- Determinación del grado de pureza (Columna Bio-gel P-100). (86).

### 6.12. Concentración por sacarosa.

1. El extracto microbiano libre de células se concentró en una membrana de diálisis puesta sobre sacarosa cristalina (diálisis negativa); el volumen inicial fué de 100 ml y el volumen final de 15 y 15 ml. Ambos extractos (de las dos cepas) se llevaron a un volumen de 15 ml con agua destilada.

2. Se efectuó la determinación de proteínas y actividad enzimática del volumen reducido.

3. Se llevó a cabo la centrifugación del volumen reducido a 10,000 rpm durante 15 minutos a 0°C; midiéndose proteínas y actividad del precipitado y sobrenadante.

4. Se realizó electroforesis del sobrenadante en geles sin ninguna adición y con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), en acrilamida al 5%.

### 6.13. Electroforesis en gel.

Antes de efectuarse la electroforesis, se investigó la inactivación de la amilasa microbiana con SDS al 0.1 y 0.5%.

a). Se colocaron 0.9 ml de enzima, 0.1 ml de SDS al 5% (concentración final de SDS: 0.5%)

y 4.50 ml de solución de almidón.

- b). 0.98 ml de enzima, 0.02 ml de SDS al 5% (concentración final de SDS: 0.1%) y 4.54 ml de solución de almidón.
- c). 1 ml de enzima y 4.54 ml de solución de almidón.
- d). 1 ml de SDS y 4.54 ml de solución de almidón.

Se agitaron perfectamente los tubos y se determinó la actividad.

La electroforesis en disco fué realizada en geles de acrilamida a diferentes concentraciones y condiciones; y en geles de agar al 1.5%.

- A. Geles sin ninguna adición: al 5 y 7% de acrilamida, utilizando amortiguador a pH de 8.6 - para el desplazamiento.
- B. Geles con SDS: 0.5% de SDS y 5% de acrilamida. El amortiguador fué a pH de 7.2.

Los amortiguadores usados fueron de fosfatos al 0.1 M.

Los geles fueron preparados de acuerdo con Abney (1).

El tiempo de migración fué de 1 hora, a 15 mA; después el gel se partió a la mitad (longitudinalmente):

Una parte del gel se tiñó con Amido negro (colorante para proteínas) durante 30 a 45 minutos, se lavó -- con agua destilada y se colocó en una solución aclaradora-fijadora (ácido acético-alcohol metílico-agua destilada), hasta la completa eliminación del exceso de colorante.

Las muestras se conservaron en ácido tricloroacético al 10% (TCA).

La otra parte del gel fué utilizada para determinar la localización de la enzima por su actividad sobre geles de agar-almidón al 1% (Zimograma).

El gel se colocó sobre el agar-almidón durante 1 y 12 horas, revelándose al cabo de este tiempo con solución de Lugol y midiéndose la zona de hidrólisis o transparencia del gel.

Se prepararon controles de acrilamida y colorantes solos (azul de bromocresol y azul de bromo timol).

5. Se dializó el sobrenadante obtenido de la centrifugación (Paso 3), contra agua destilada, durante 24 horas con agitación continua, a 4°C. Una vez dializado, se precipitó con sulfato de amonio de 0 a 50% y de 50 a 75% de saturación, a 0°C haciéndose centrifugaciones en ambos casos a 10,000 rpm durante 60 minutos, a 0°C.

Se separaron y dializaron los precipitados y "

sobrenadantes contra agua destilada a 4°C y con agitación.

Una vez terminada la diálisis se determinaron -- proteínas y actividad amilolítica en cada fracción. Para la medición de actividad se agregaron 75 microlitros de -  $\text{CaCl}_2$  al 0.2%.

6.14. Determinación de la actividad amilolítica en presencia de Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF).

Con objeto de estudiar la presencia de enzimas - proteolíticas que romperían las proteínas presentes, incluyendo las amilasas, se trató el extracto microbiano libre de células con PMSF, el cual es un inhibidor de proteasas que se une a los residuos de aminoácidos que tienen grupos -SH, impidiendo de esta forma la actividad proteolítica.

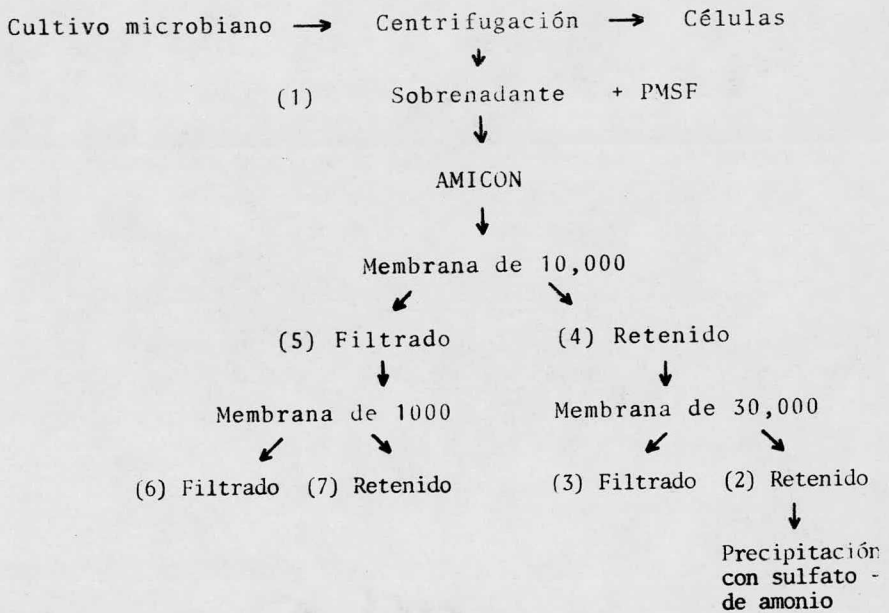
La concentración de PMSF (0.1M en propanol) fué de 11 microlitros por ml de extracto microbiano, que parece no afectar la actividad amilolítica.

6.15. Concentración por ultrafiltración molecular en amicón.

El extracto microbiano fué separado de las células por medio de dos períodos de centrifugación a 10,000 rpm, de 60 minutos. Se determinó la actividad amilolítica

antes de centrifugar así como la cantidad de proteínas presentes en cada fracción.

Al sobrenadante se le agregó PMSF (11 microlitros/ml) y se procedió a su concentración por ultrafiltración molecular en AMICON (membranas de celulosa con poros para distintos pesos moleculares). Las membranas utilizadas fueron para tamaños moleculares de 1,000, -- 10,000 y 30,000 nm.



En cada uno de los pasos se realizó determinación de la actividad amilolítica y contenido de proteínas.

Según la fracción que se trate se usaron diferentes volúmenes de extracto microbiano frente a 1 ml de almidón al 0.1%.

A las fracciones (3) y (7) se les hicieron geles de acrilamida al 5 y 7% sin adición y con SDS. El gel de almidón utilizado para el Zimograma fué al 1.5%.

La fracción (2) se precipitó con sulfato de amonio de 0 a 50% y de 50 a 75% de saturación a 0°C. Esta fracción fué usada para pasarla por una columna de Biogel



P-100 y determinar el grado de pureza aproximado de la amilasa excretada por el microorganismo.

6.16. Determinación del grado de pureza de la amilasa en columna de Biogel P-100.

El Biogel P-100 es un polímero de acrilamida que permite el paso rápido de moléculas grandes, pero tiene cierta selectividad para retener moléculas pequeñas. Presenta poros de paso molecular de 50,000 a 100,000 Å (nm). (86).

#### Preparación de la columna y del Biogel P-100

Se usaron dos columnas: una de 25 cm de largo x 1.5 cm de diámetro (por la que se pasó dos veces el extracto de la cepa 84) y otra de 40 cm de largo x 1.5 de diámetro (extractos de las cepas 23 y 84).

Se colocó un papel filtro en la parte inferior de la columna como soporte del Biogel P-100, que se preparó de la siguiente manera:

Aproximadamente 100 ml de una suspensión de Biogel se lavó repetidamente con 2 litros de agua destilada dejándose sedimentar y decantando posteriormente, en cada lavado. Después se lavó con 1 litro de amortiguador de fosfatos 0.5M a pH 7.0 (mismo que se usó para eluir la muestra). Se resuspendió en el amortiguador y se vació -

lentamente a la columna, cuidando de que quedara perfectamente empacada. Se lavó durante toda la noche con el -- amortiguador.

### Preparación de la muestra

A 100 microlitros de la fracción (2), volumen - que depende de la cantidad de proteínas presentes, se le agregaron 10 mg de sacarosa (para aumentar la densidad de la muestra) agitándose perfectamente hasta disolución completa; y las sustancias de peso molecular conocido (testigos): Ovoalbúmina (PM 40,000) y gamma globulina de ratón (PM 160,000): 1 mg en 10 microlitros (para la cepa 84); y Dextran-azul (PM aproximado 2,000 000): 2 mg en 500 microlitros (para la cepa 25), este es un polímero de carbohidratos teñido de azul, que sirve como marco de referencia para estandarizar la técnica (85).

La mezcla fué colocada en la parte superior de la columna que estaba a 8.5°C y se tapó, permitiendo que el - amortiguador empezara a caer sobre ella para eluirla. Una vez que empezó a salir la muestra se recolectó en los tubos colectores. El volumen recolectado por tubo fué de - 100 ó 300 microlitros. El tiempo de colección fué de 6, 7 y 12 minutos.

La presión usada fué la hidrostática o la de una bomba compresora.

En cada uno de los tubos se investigó la presencia de proteínas en el espectrofotómetro (Densidad Óptica a 280 nm), así como la actividad amilolítica.

Los tubos más representativos (mayor actividad), se pasaron nuevamente por la columna. El experimento se detuvo cuando la lectura de proteínas persistió en cero.

#### CULTIVOS SONICADOS

Sólo se les determinó proteínas y actividad amilolítica, así como electrofóresis en gel de acrilamida -- (6.13.).

#### BIOQUIMICA DE LA ENZIMA

Se realizaron determinaciones encaminadas a conocer un poco de la bioquímica de la amilasa producida por las cepas microbianas seleccionadas. Las determinaciones que se llevaron a cabo fueron:

- Comparación de los efectos de la sonicación en la actividad de la amilasa.
- Determinación del pH óptimo de actividad de la amilasa.
- Determinación de la temperatura óptima de actividad de las amilasas microbianas.
- Pérdida de actividad de las amilasas a su tempe-

ratura óptima de actividad.

- Determinación de la influencia del Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF) en la resistencia a la incubación de la amilasa microbiana, en su temperatura óptima.
- Influencia de: sacarosa, maltosa y PMSF sobre la actividad amilolítica.

6.17. Comparación de los efectos de la sonicación en la actividad de la amilasa.

Las cepas seleccionadas se cultivaron durante 6 días en medio líquido, con aereación (agitación), a 28°C, posteriormente se sonicaron a 25 KHz durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Se determinó la actividad amilolítica (Método 6.9) antes y después de ser sometidas a sonicación sin adición y con  $\text{CaCl}_2$  al 0.02% (75 microlitros), la cantidad de proteínas se determinó por el método de Lowry (63), en el caso de los residuos celulares fué necesario tratarlos con 1 ml de NaOH 5N.

Una vez sonicadas, las cepas se centrifugaron a 10,000 rpm a 0°C, durante 60 minutos, separándose el sobrenadante para ser precipitado con sulfato de amonio de 0 a 70% de saturación. La diálisis de los precipitados y sobrenadantes se efectuó contra agua destilada a 4°C, con

agitación continua, cambiando el agua de diálisis hasta que la reacción con  $\text{BaCl}_2$  fué negativa.

Se midió la actividad amilolítica después de dializados.

6.18. Determinación del pH óptimo de actividad de la amilasa.

Se realizó utilizando los siguientes valores de pH:

3.5, 4, 4.5 y 5: Obtenidos con amortiguador de acetatos de Walpole 0.1 M (62).

5.5, 6, 6.5 y 7: Amortiguador de fosfatos de Sørensen - 0.1 M (62).

7, 7.5, 8, 8.5 y 9: Amortiguador de Barbitol sódico --- 0.1 M (62).

La muestra utilizada fué extracto crudo de enzima: 1 ml.

Se usó como sustrato 5 ml de solución de almidón soluble al 1% y 3 ml del amortiguador para el pH deseado.

Se determinó el pH de la solución de almidón, -- del extracto microbiano, así como del conjunto enzima-sustrato amortiguador.

pH del amortiguador	pH real de la mezcla	
	Cepa 23	Cepa 84
3.5	3.62	3.71
4.0	4.10	4.12
4.5	4.56	4.58
5.0	5.03	5.02
5.5	5.81	5.85
6.0	6.18	6.21
6.5	6.62	6.65
7.0	7.10	7.09
7.5	7.52	7.55
8.0	8.03	8.08
8.5	8.35	8.40
9.0	8.56	8.72

Después de iniciada la reacción (a temperatura ambiente), se tomaron muestras de la mezcla a diferentes intervalos de tiempo, midiendo la actividad por el método dextrinizante (6.9). En el momento en que uno de los tubos mostró una coloración amarilla, la reacción fué determinada por adición de 6 gotas (aproximadamente 160 microlitros) de Lugol a cada tubo de reacción.

La actividad se determinó por medio de la comparación de colores entre los tubos al contacto con el lugol, otorgándose unidades arbitrarias según la coloración (20, 77, 89).

Coloración	Unidades Arbitrarias
Azul-negro	0
Violeta	1.0
Café rojizo oscuro	1.5
Café rojizo	2.0
Café	3.0
Ambar	4.0
Ambar claro	4.5
Amarillo	5.0

A las coloraciones intermedias se les otorgaron fracciones de unidad para catalogarlas.

6.19. Determinación de la temperatura óptima de actividad de las amilasas microbianas.

Esta determinación se efectuó utilizando extracto microbiano libre de células (centrifugación a 3,500 rpm, - durante 30 minutos a temperatura ambiente), de las cepas - seleccionadas.

Las temperaturas usadas fueron: 4, 15, 25, 30, - 40, 50, 60, 70, 80 y 92°C.

0.2 ml del extracto microbiano fueron agregados a 1 ml de la solución de almidón al 1%, agitando e introduciendo rápidamente el tubo de ensayo en el baño de agua

a la temperatura deseada.

Se tomaron alícuotas a determinados tiempos (5 ó 10 minutos) para determinar la actividad amilolítica de la enzima, en base a la desaparición de la coloración entre el almidón y el Lugol (Método 6.9). Este procedimiento se aplicó también a muestras a las que se les adicionó 75 microlitros de  $\text{CaCl}_2$  al 0.02%.

La actividad se reporta en unidades Internacionales ya que se cuantificaron proteínas.

6.20. Pérdida de actividad de las amilasas a su temperatura óptima de actividad.

La determinación se realizó sometiendo 3 ml del extracto crudo, libre de células, a diferentes tiempos de calentamiento: 1, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos, a temperaturas de 70°C (cepa 23) y 60°C (cepa 84).

En el caso de la cepa 84 fué necesario hacer la determinación a 6 y 10 minutos, además de los tiempos establecidos para la prueba.

Después del tiempo de incubación se tomó una alícuota de 0.1 ml de la enzima y se colocó en un tubo de ensayo el cual contenía 0.5 ml de solución de almidón al 1%. Se hizo simultáneamente la determinación con adición de 75 microlitros de  $\text{CaCl}_2$ , agitándose rápidamente en el agitador Vortex.



La medición de la actividad se hizo como en el caso anterior, reportándose también en Unidades Internacionales.

6.21. Influencia del Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF) en la resistencia a la incubación de la amilasa microbiana a su temperatura óptima.

El motivo de esta determinación fué observar si la enzima se inactiva realmente por el efecto del calor o por acción de las proteasas, producidas por el mismo microorganismo y presentes en el extracto microbiano, las cuales podían ser activadas por el calentamiento y provocar la inactivación de la amilasa.

Se agregaron 11 microlitros de PMSF (0.1M en -- propanol) por ml de extracto libre de células. La secuencia seguida fué igual que en la anterior, utilizando los mismos tiempos de calentamiento de la enzima y parando la reacción por adición de Lugol (igual que en la determinación de pH), determinándose la actividad en unidades Internacionales.

6.22. Influencia de la sacarosa sobre la actividad amilolítica.

El rango de concentración de sacarosa para la -- prueba fué: 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08,

0.09 y 0.1 mg por cada 0.2 ml de extracto.

El extracto microbiano libre de células (centrifugación a 3,500 rpm, 30 minutos), fué dializado durante 12 horas a 4°C y en agitación constante.

A 0.2 ml de enzima, colocados en un tubo de ensayo, se les agregó sacarosa en forma sólida, agitándose -- rápidamente para disolver la sacarosa, la mezcla se dejó en reposo 3 minutos después de lo cual se adicionó 1 ml - de solución de almidón al 1%. La determinación se hizo - sin y con adición de  $\text{CaCl}_2$  (75 microlitros).

Se determinó la actividad en la forma acostumbrada, reportándose en Unidades Internacionales.

6.23. Influencia de la maltosa sobre la actividad de la amilasa microbiana (7).

La maltosa fué agregada en diferentes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg, al extracto microbiano. Las cantidades de maltosa elegidas para la prueba, - se determinaron en base a la concentración inicial de la misma agregada al medio de cultivo, en el cual la cepa -- microbiana se desarrolló.

La determinación fué realizada a temperatura -- ambiente.

A 1 ml del sustrato (almidón al 0.1%) se le agregó la maltosa agitándose perfectamente, después se adicionaron 75 microlitros de  $\text{CaCl}_2$  y 0.2 ml de la enzima.

Simultáneamente se hizo la determinación a un control sin maltosa.

Se determinó la actividad en cada una de las muestras, reportándose en Unidades Arbitrarias.

6.24. Influencia del Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF) sobre la actividad de la amilasa.

La actividad de la amilasa se determinó a diferentes concentraciones de PMSF (0.1M en propanol): 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40 y 50 microlitros.

A 0.2 ml del extracto, se agregó el PMSF, dejándose durante 2 minutos, posteriormente se agregó 1 ml del sustrato (almidón al 0.1%).

La prueba se efectuó sin y con adición de  $\text{CaCl}_2$ . La medición de la actividad se hizo en Unidades Arbitrarias.

#### IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS.

6.25. Se realizaron pruebas Morfológicas y Bioquímicas.

Para la observación al microscopio de los microorganismos que se estudiaron, se usaron las siguientes -- técnicas de coloración:

- a). Tinción simple
- b). Tinción de Gram.
- c). Tinción de esporas

Los hongos y actinomicetos se estudiaron mediante microcultivos teñidos con azul de metileno de Loeffler.

Los reactivos y procedimientos son los usuales - en Microbiología (18).

Las pruebas efectuadas para la identificación de algunos microorganismos, de acuerdo con el Manual de Bergey (17), fueron:

- Características de crecimiento en: caldo simple, gelosa simple, gelosa glucosa, gelosa glucosa nitrato.
- Crecimiento en caldo simple con NaCl a diferentes concentraciones: 2, 3, 4, 5, 7 y 10%.
- Crecimiento en papa.
- Crecimiento a diferentes temperaturas: 40, 45, - 50, 60 y 70°C.
- Hidrólisis de gelatina, almidón y caseína.
- Producción de indol, acetil metil carbinol, ureasa.

- Utilización de sales de amonio y citratos.
- Reducción de nitratos a nitritos.
- Fermentación de azúcares: glucosa, arabinosa, xilosa, sacarosa, rafinosa, ramnosa, dulcitol, inositol.

Los medios de cultivo y reacciones específicas, son las indicadas por Jacobs (51).

#### IV. R E S U L T A D O S

##### 7.1. Aislamiento de microorganismos.

Cada una de las muestras utilizadas aportó diferente cantidad de cepas microbianas, obteniéndose un mayor número de aquellas con un alto contenido de almidón, variando el número de las mismas de acuerdo al lugar de procedencia. En total se aislaron 211 cepas (ver esquema).

Considerando la gran cantidad de colonias microbianas (sin que se encontraran aisladas) que crecieron en los medios de cultivo empleados inicialmente, fué necesario sustituirlos por otros, reduciéndose finalmente a dos medios de cultivo (J y K).

El tiempo de cultivo fué decidido en base a la literatura (3) y la medición de los halos de hidrólisis a diferentes tiempos (3, 4, 5 y 6 días de crecimiento) observándose la máxima producción de enzima a los 6 días.

##### 7.2. Selección de microorganismos.

Las cepas microbianas cuyo halo de transparencia fué apenas perceptible o negativo (zonas de reacción negativa almidón-yodo) se desecharon, mientras que aquellas que mostraron un halo francamente notorio y de mayor longitud fueron seleccionadas y conservadas en refrigeración.

La determinación de la longitud de los halos de hidrólisis alrededor de la colonia microbiana permitió - preseleccionar 73 cepas amilolíticas. Los resultados se muestran en la Tabla I.

## ESTUDIOS PARA SELECCION DE MICROORGANISMOS

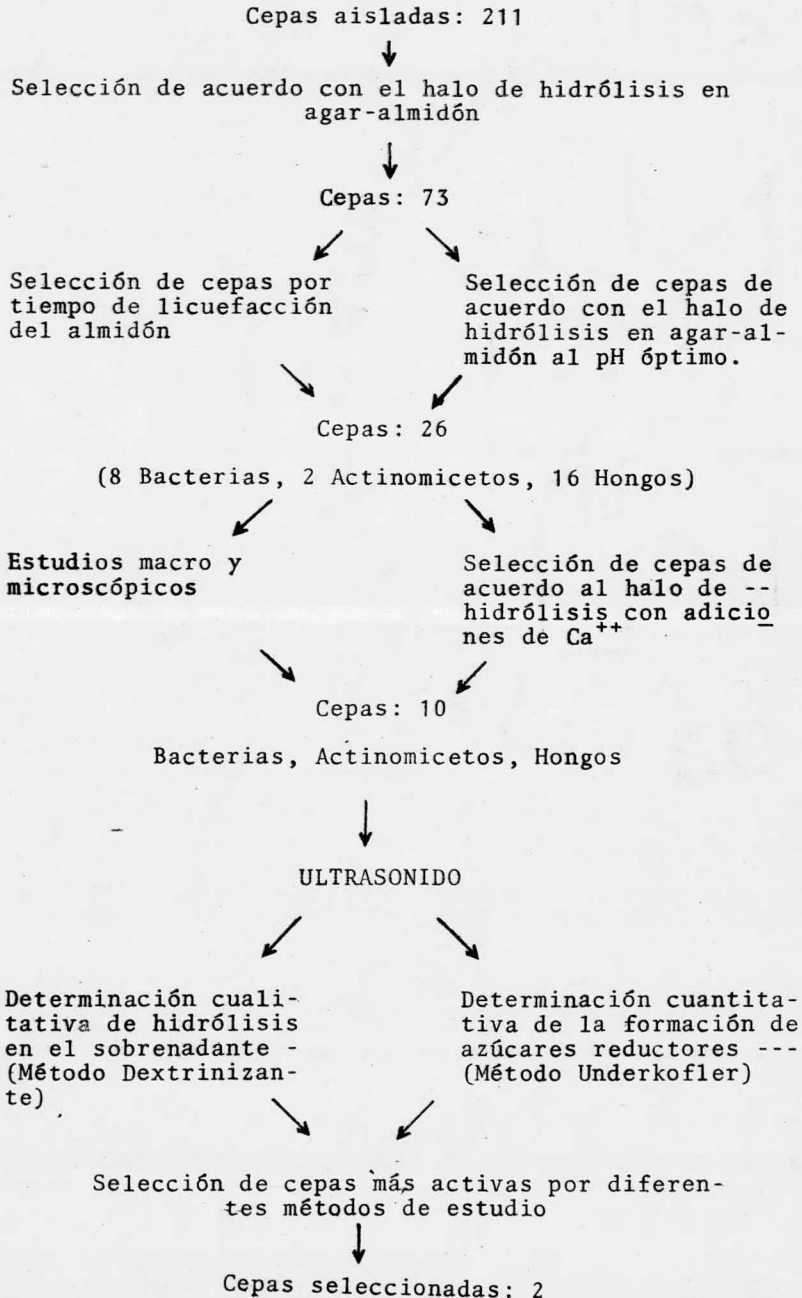




Tabla 1. Fuente de aislamiento y longitud del halo de hidrólisis de las 73 cepas seleccionadas.

Cepa No.	Fuente de aislamiento	Longitud del halo de hidrólisis (mm)
1	Suelo de establo	8.0
2	Suelo de jardín	5.0
3	Aire del laboratorio de Microbiología	5.0
4	Pan enmohecido	6.0
5	Suelo de cultivo de maíz	6.0
6	Aire	10.0
7	Pan enmohecido	5.0
8	Coliflor	5.0
9	Papa en estado de putrefacción	3.0
10	Pan enmohecido	3.0
11	Cultivo de maíz	2.0
12	Suelo de porqueriza	3.0
13	Suelo de porqueriza	3.0
14	Tortilla	6.0
15	Suelo de basurero	3.0
16	Suelo de porqueriza	6.0
17	Suelo de basurero	8.0
18	Cultivo de maíz	2.0
19	Pan enmohecido	3.0
20	Suelo de jardín	8.0
21	Suelo de jardín	4.0
22	Papa en estado de putrefacción	5.0
23	Suelo de milpa	10.0
24	Cultivo de frijol	8.0
26	Pan enmohecido	2.0
27	Suelo de milpa	3.0
28	Suelo de jardín	6.0
29	Suelo de milpa	8.0
30	Suelo de establo	2.0
31	Coco enmohecido	4.0
32	Suelo de porqueriza	7.0
33	Cultivo de maíz	2.0
34	Suelo de jardín	3.0
35	Agua de lavado de papa	3.0
36	Elote enmohecido	9.0
37	Suelo de milpa	5.0
38	Durazno enmohecido	2.0
39	Aire	5.0
40	Cultivo de maíz	3.0
41	Suelo de jardín	6.0
42	Cepa pura de <u>Aspergillus niger</u> (Colección Fac. Química)	2.0

Tabla 1. (Continuación).

Cepa No.	Fuente de aislamiento	Longitud del halo de hidrólisis (mm)
43	Suelo de porqueriza	4.0
44	Basura fermentada	2.0
45	Suelo de porqueriza	4.0
46	Basura fermentada	5.0
51	Basura fermentada	3.0
52	Suelo de milpa	2.0
53	Cultivo de malvón	5.5
54	Cultivo de habas	5.0
55	Suelo de porqueriza	6.0
57	Suelo de basurero	5.0
58	Suelo de milpa	4.5
59	Suelo de jardín	3.0
60	Cultivo de malvón	5.5
61	Suelo de porqueriza	2.0
63	Cultivo de papa	7.0
64	Cultivo de malvón	3.0
65	Pan enmohecido	3.0
66	Suelo de milpa	5.0
67	Suelo de milpa	2.0
68	Suelo de basurero	4.0
70	Suelo de porqueriza	6.0
72	Suelo de porqueriza	2.0
73	Elote enmohecido	3.0
74	Suelo de milpa	6.0
75	Aire	2.0
77	Suelo de basurero	5.0
79	Aire	6.0
80	Suelo de basurero	6.0
81	Papa en estado de putrefacción	5.0
82	Suelo de basurero	4.0
83	Suelo de basurero	2.0
84	Aire	10.0

7.3. Influencia del pH en la actividad amilolítica de las cepas seleccionadas.

Los resultados de esta prueba aplicada a las 73 cepas seleccionadas, indican el pH óptimo de cada una de ellas para su máxima actividad. Tabla 2, Gráficas 1-17.

Tabla 2. Efecto de las variaciones de pH en la actividad amilolítica en las cepas estudiadas. Los números indican el radio de hidrólisis en mm en las placas de agar-almidón.

Cepa No.	pH				
	5	6	7	8	9
1*	1	7	6	6	5
2	4	6	5	3	2
3	1	3	4	9	7
4	3	4	4	5	4
5	1	6	6	7	7
6*	11	10	10	9	9
7	3	3	4	4	2
8	0.5	3	3	4	2
9*	2	5	7	6.5	5
10	1	1	3	2	1
11	1	2	0	0	0
12	7	5	4	3	3
13*	7	6	4.5	4.5	4
14	3.5	3.5	4	3	1
15	2.5	6	7	5.5	5
16*	8	5	5	5	4.5
17*	5	5	5	2	0
18	0	0	5	1	0
19*	2	8	10	4	3
20*	0	8	9	6	3
21	0	10	6	3	1
22	1	2	12	8	6
23*	0	19	18	16	10
24*	0	18	16	16	12
26	0	9	9	6	0
27	0	7	5	5	2
28	0	10	12	11	6
29*	0	10	11	15	15
30*	0	3	2	5	4.5

Tabla 2. (Continuación).

Cepa No.	pH				
	5	6	7	8	9
31*	1	7	16	10	4
32*	0	16	17	17	9
33	0	4	3	0	0
34	2	2	3	2	0
35	5	5	7	7	6
36	6	3	2	0	0
37	5	6	8	7	7
38	5	7	5	5	5
39*	0	16	16	20	13
40	1	3	4	2	0
41	0	6	5	5	5
42	3	2	2	0	0
43	2	5	6	10	3
44	0	5	5	6	3
45	4	5.5	7	13	10
46	3	4	5	6	6
51	14	8	8	6	5
52	5	5.5	5	4	3
53	2	4	4	5	4
54	5	5	4	4	3.5
55	7	10	8	8	6
57	1	2	6	9	8
58	3	4	4	6	3
59	5	4	4	3	2.5
60*	0	5	7	6	5
61	4	4	6	6	5
63	5	8.5	15	10	7
64*	8	10	6	5	2
65	0	10	8	8	5
66*	0	3	5	6	5
67*	5	6	5	5	4
68	3	5	4	0	0
70*	7	5	4	3	2
72*	0	19	18	17	17
73*	0	15	15	16	12
74*	5	8	5	4	3
75	0	5	6	7	1
77	7	5	5	5	5
79*	2	10	6	5	3
80	5	5	6	5	5
81	6	6	8	7	7
82*	14	12	7	3	0
83	2	10	7	3	0
84*	0	20	17	17	15

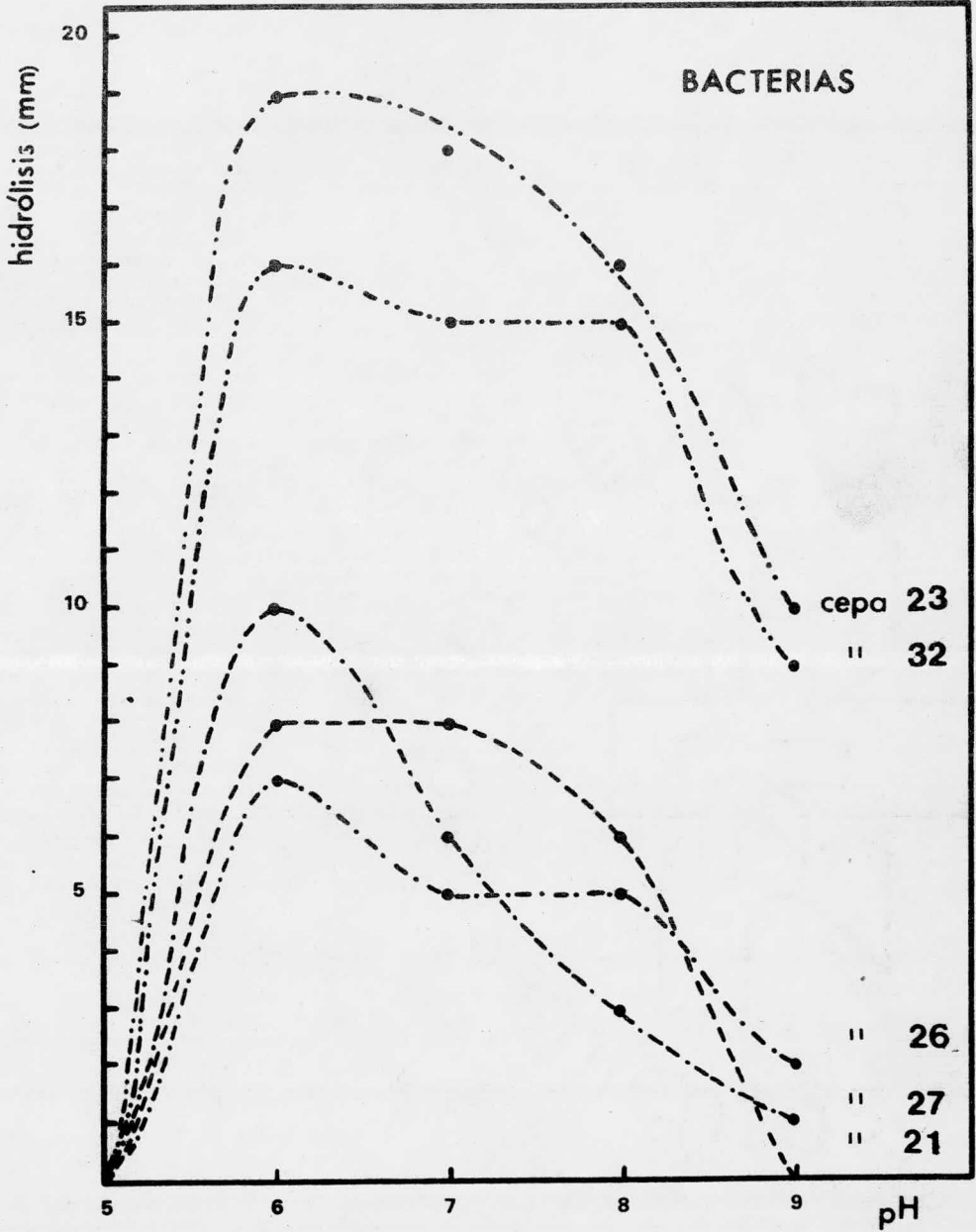
\*Cepas seleccionadas para estudio posterior.

GRAFICAS 1-17

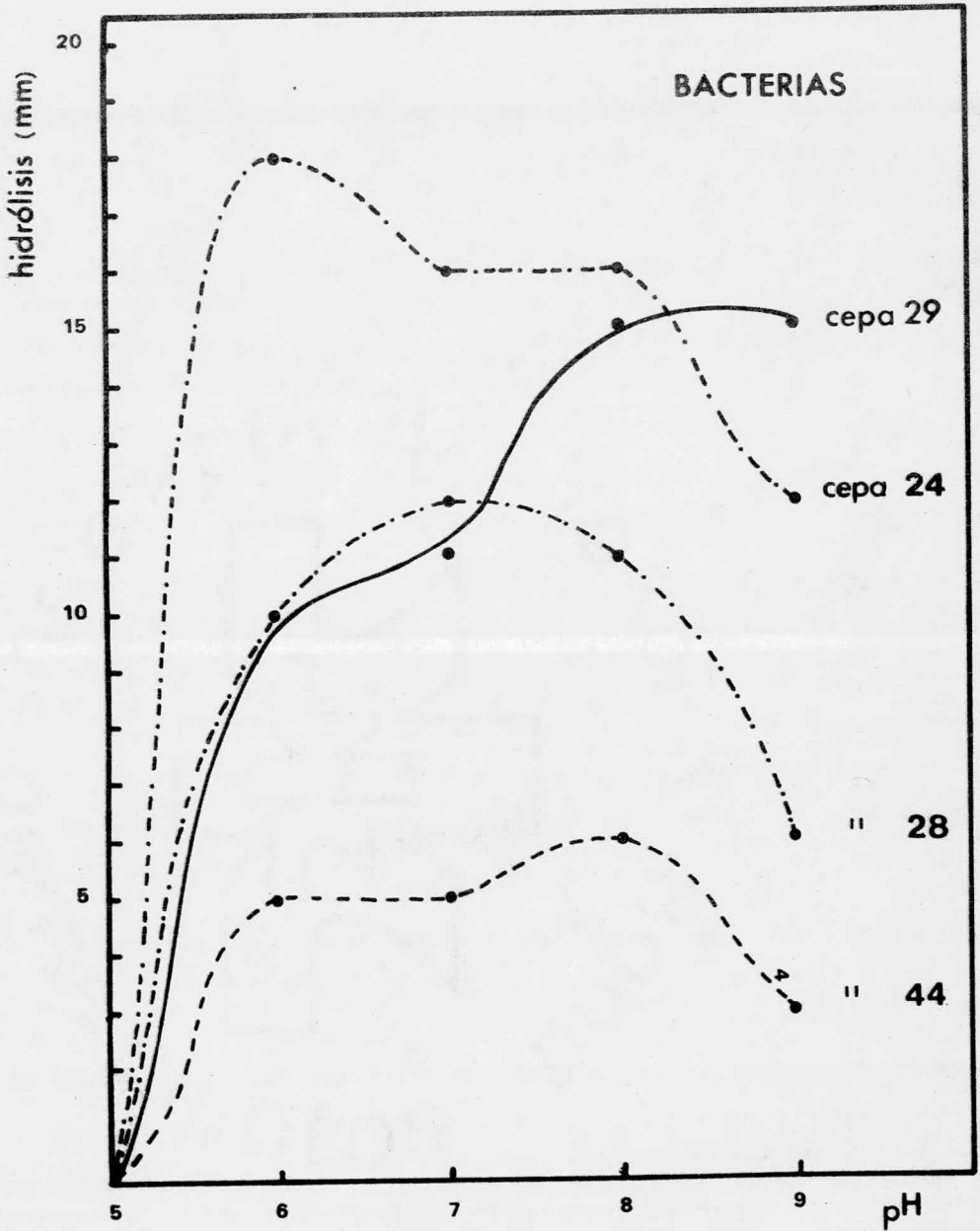
Efecto de las variaciones de pH en la actividad  
amilolítica de las cepas estudiadas.

B. Subh 4

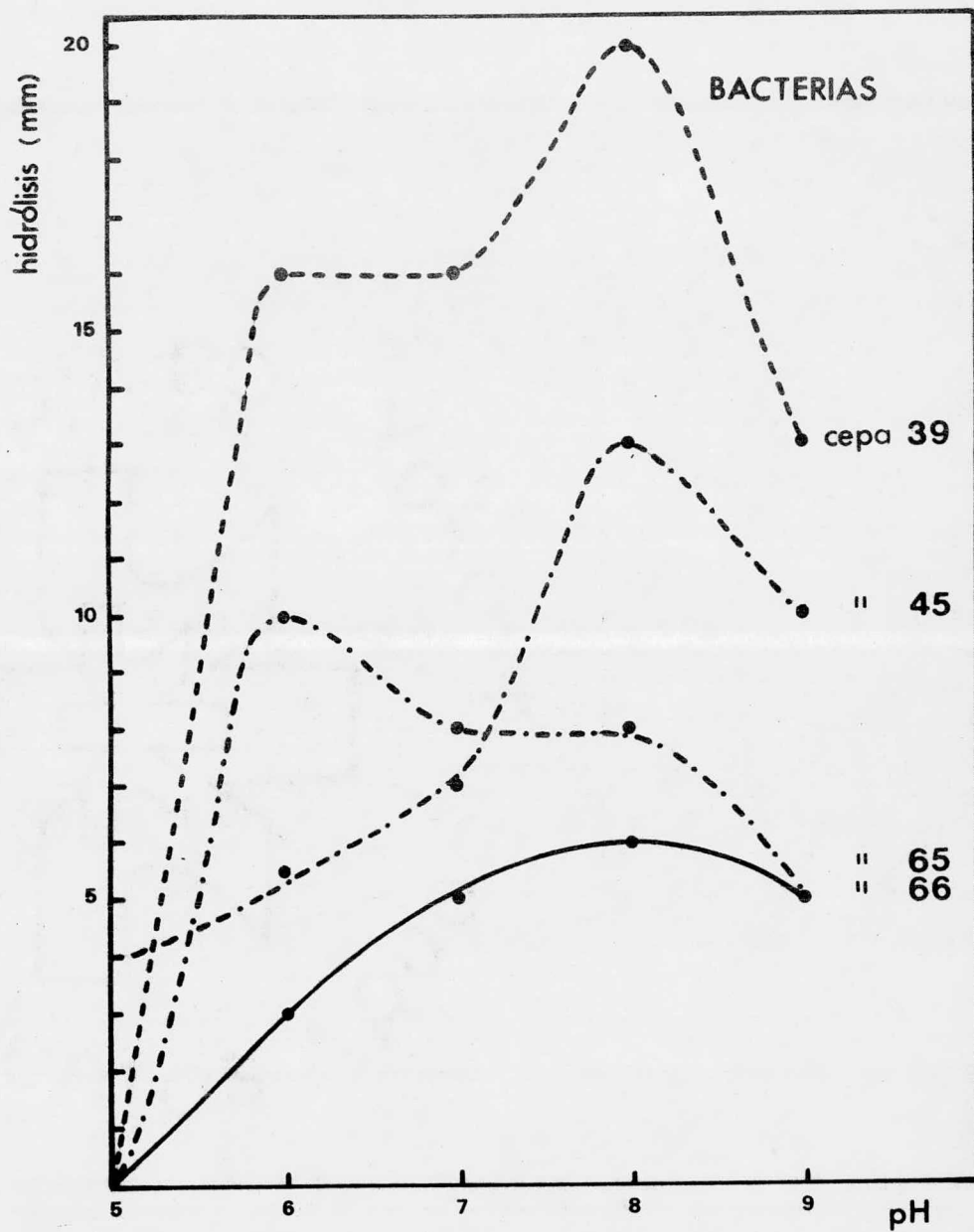
GRAFICA 1



GRAFICA 2

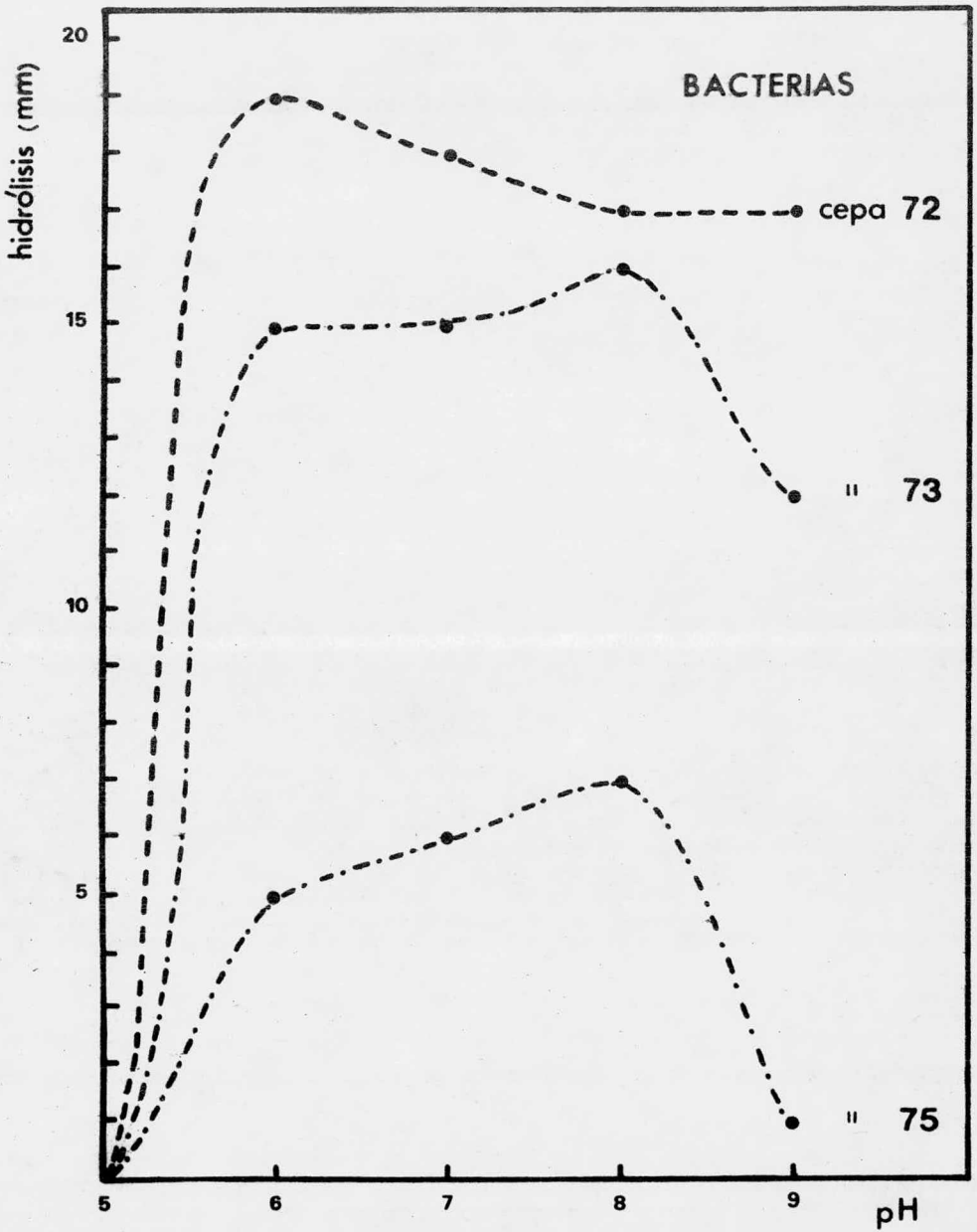


GRAFICA 3

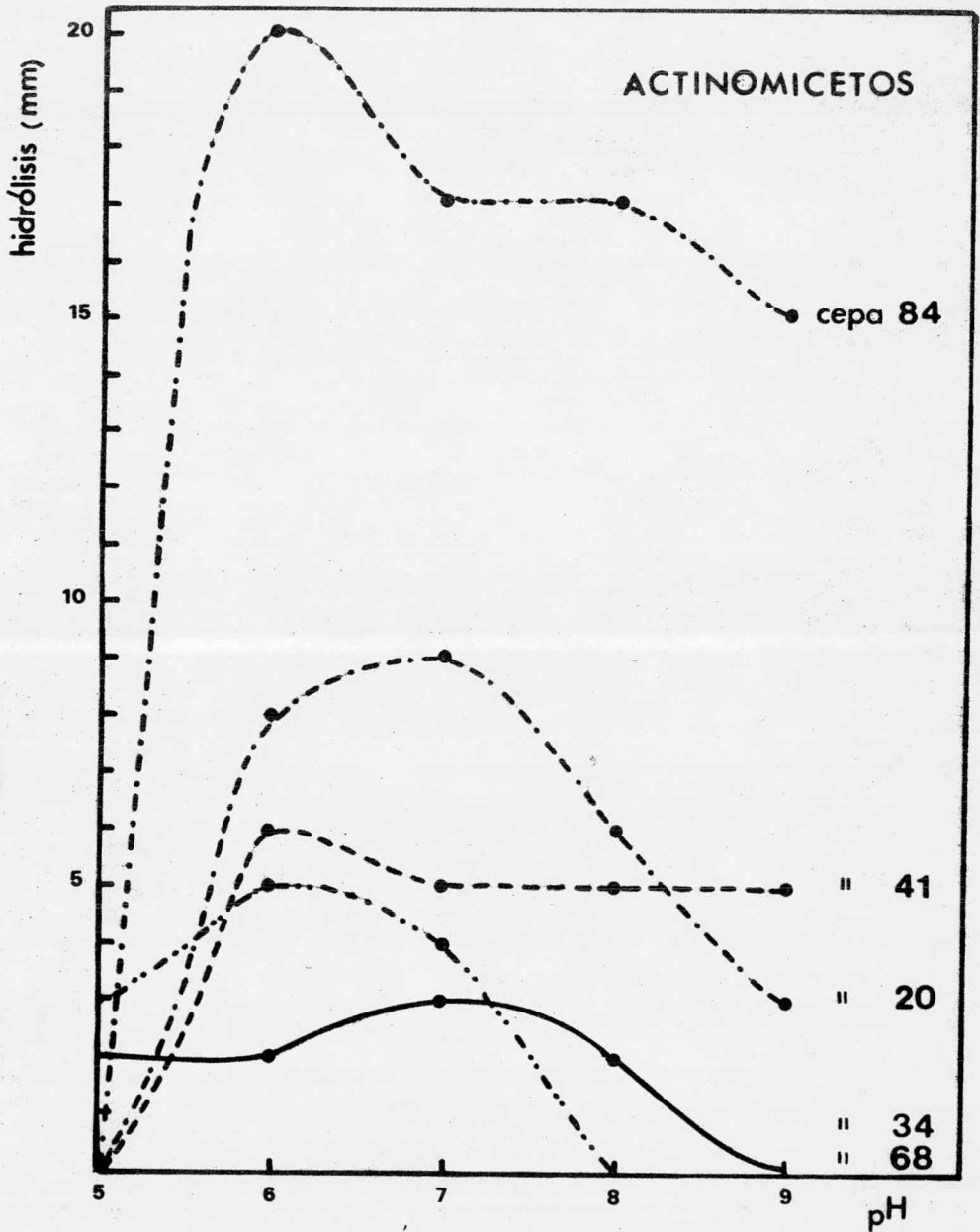




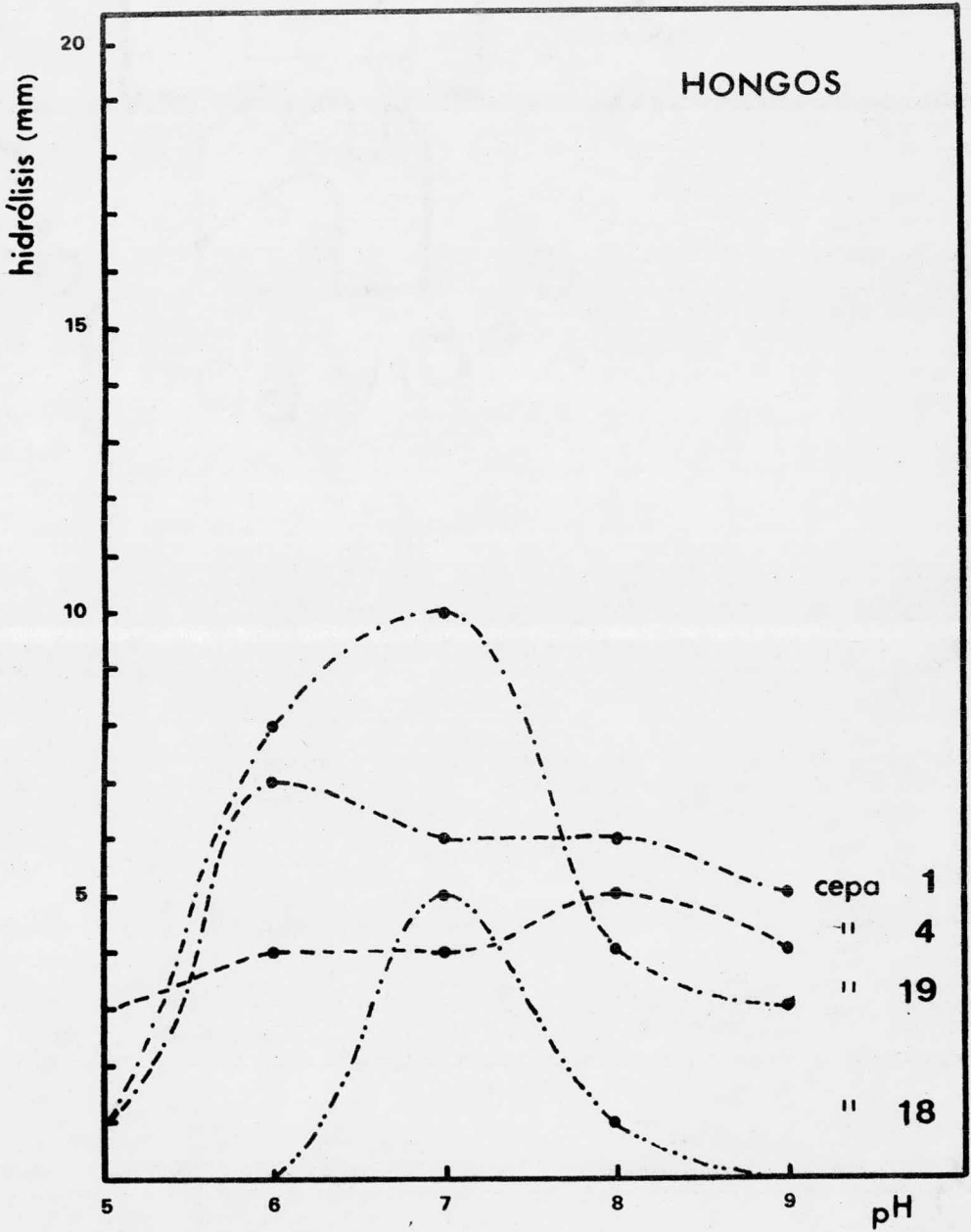
## GRAFICA 4



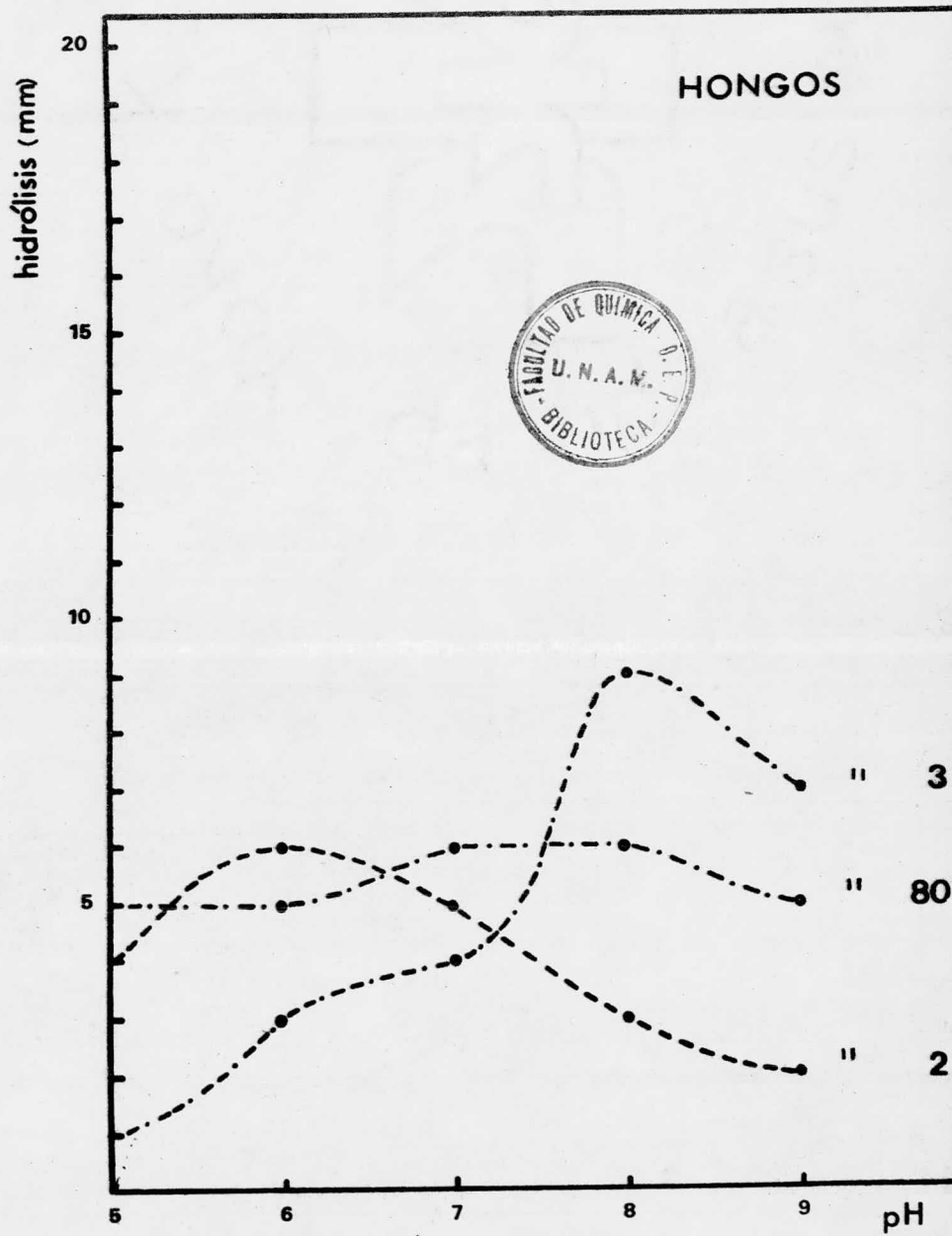
## GRAFICA 5



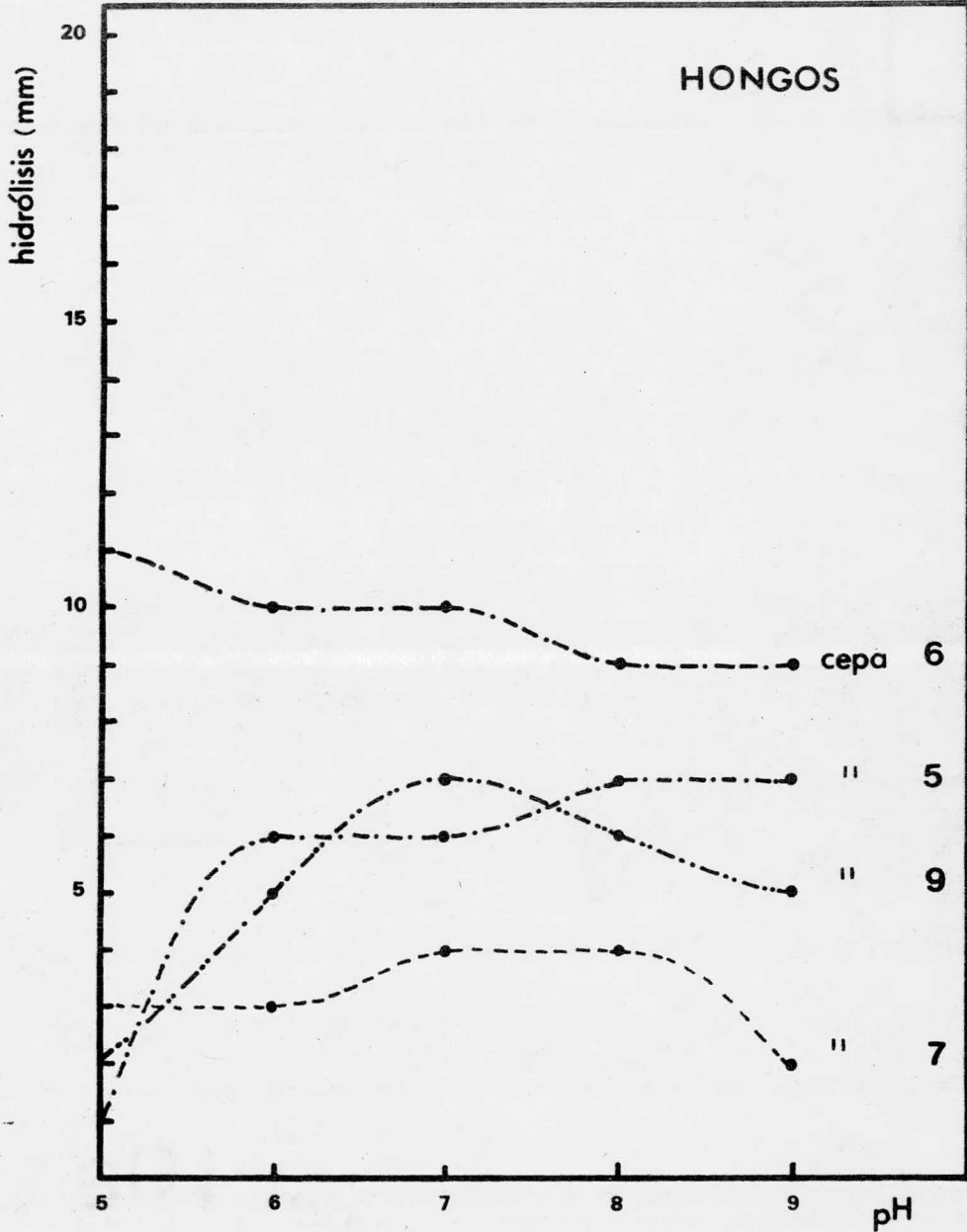
## GRAFICA 6

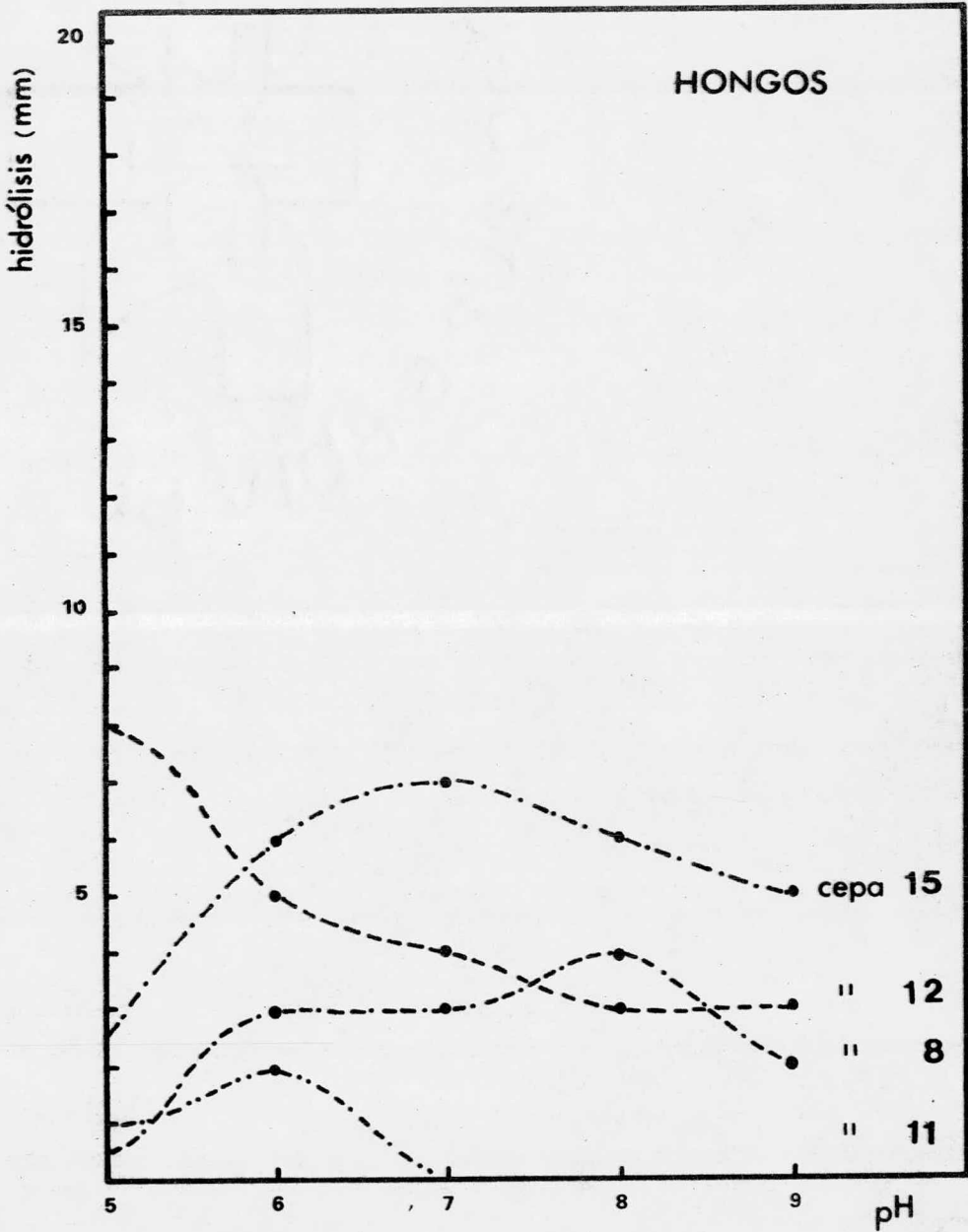


## GRAFICA 7

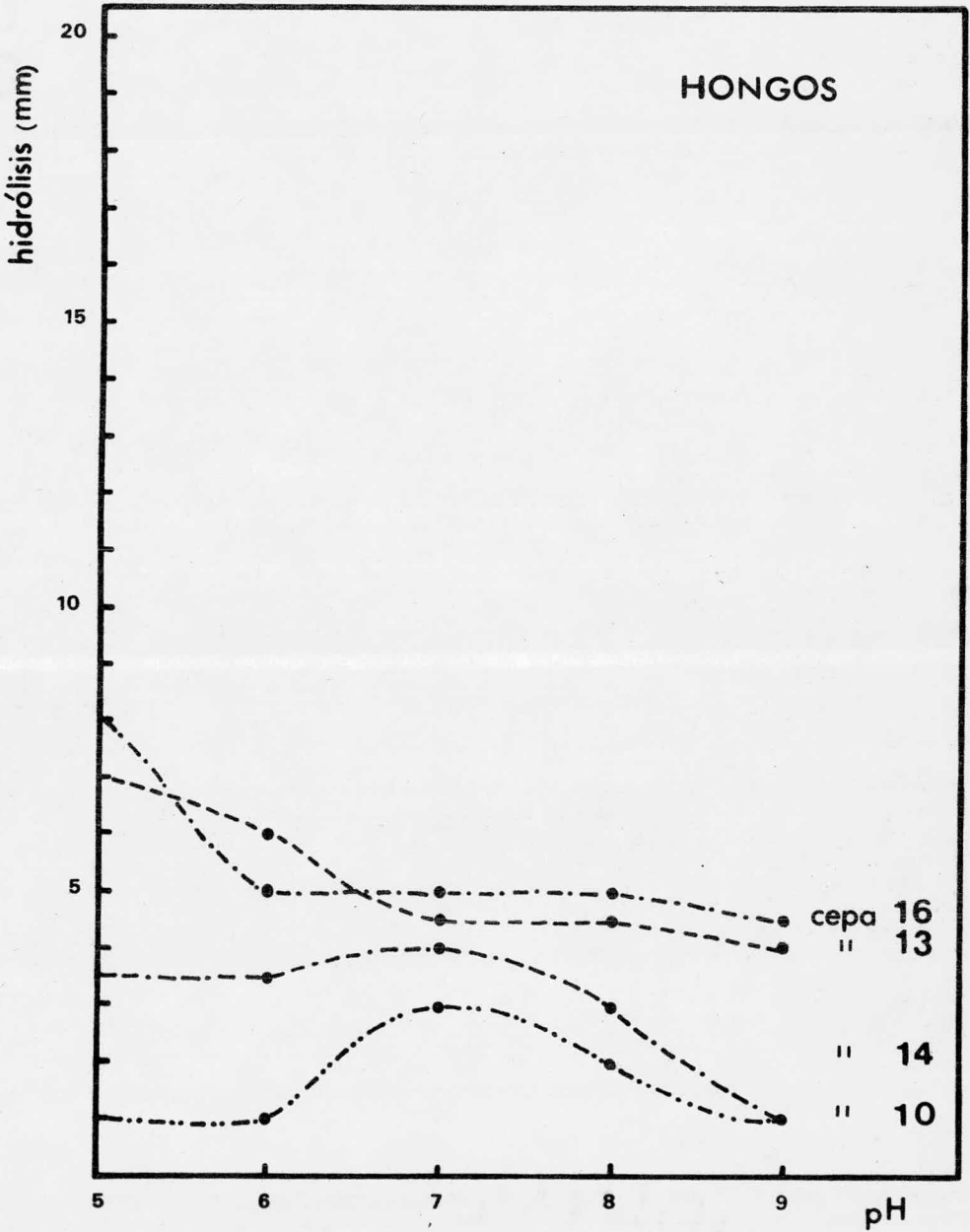


## GRAFICA 8

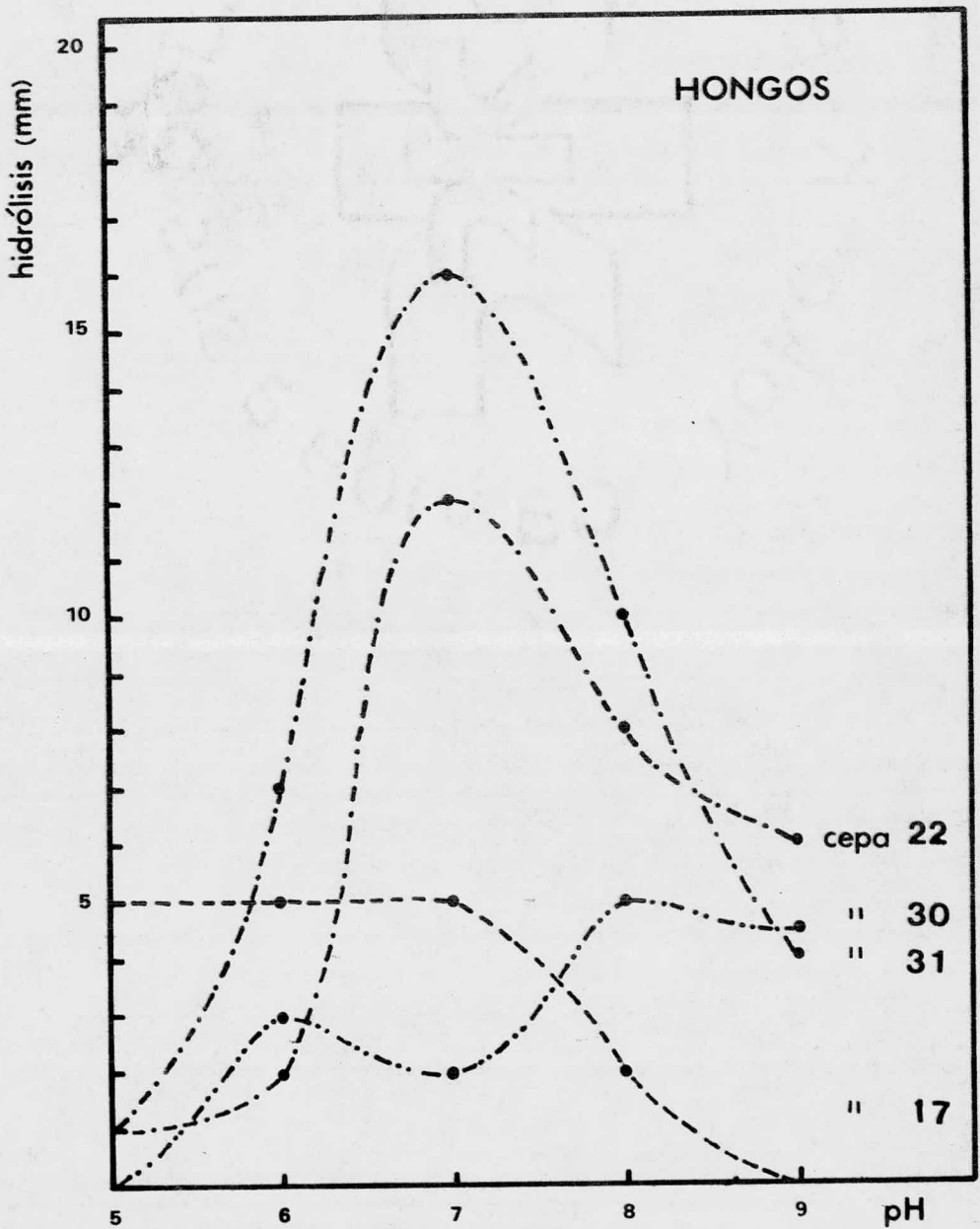




## GRAFICA 10

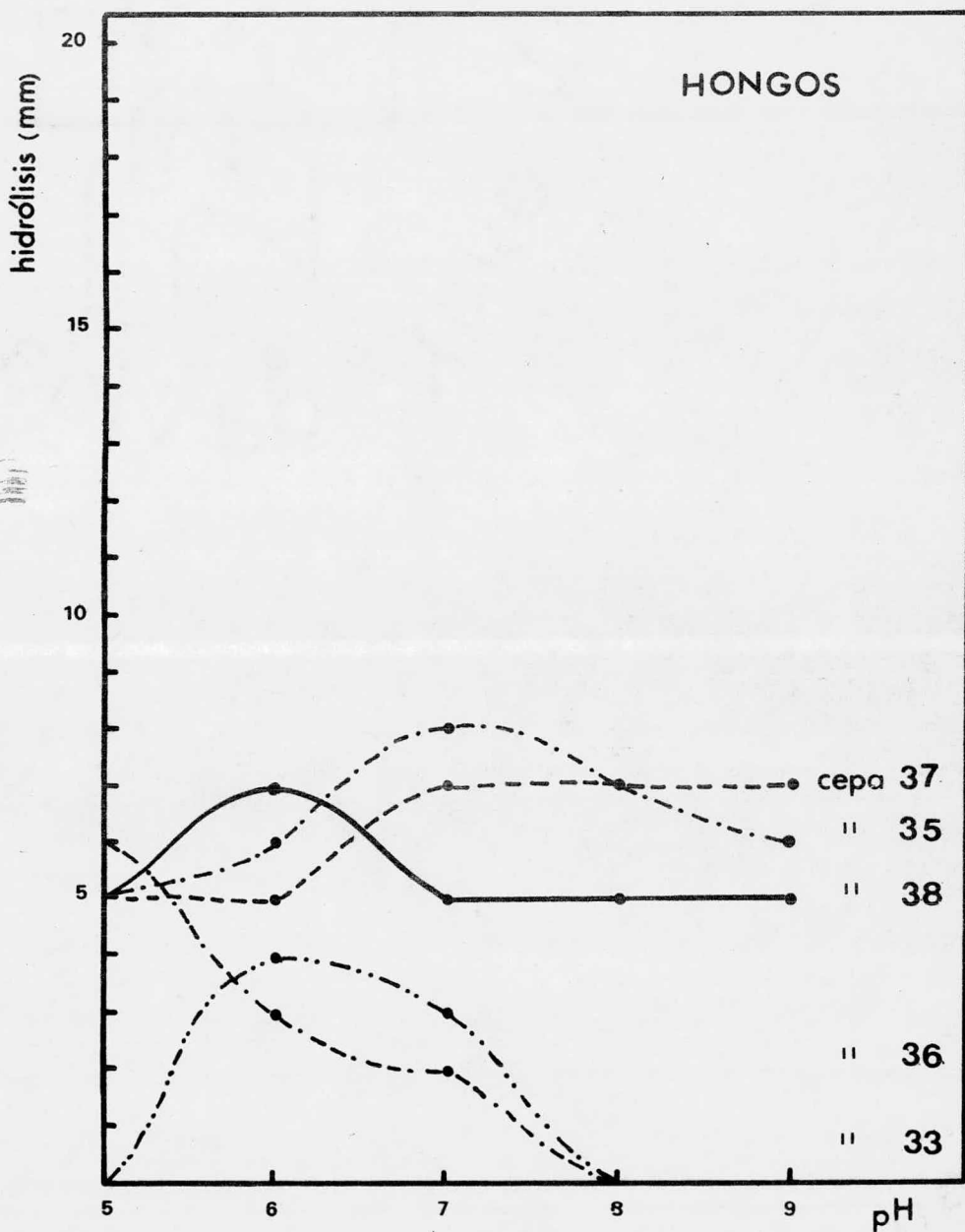


GRAFICA 11

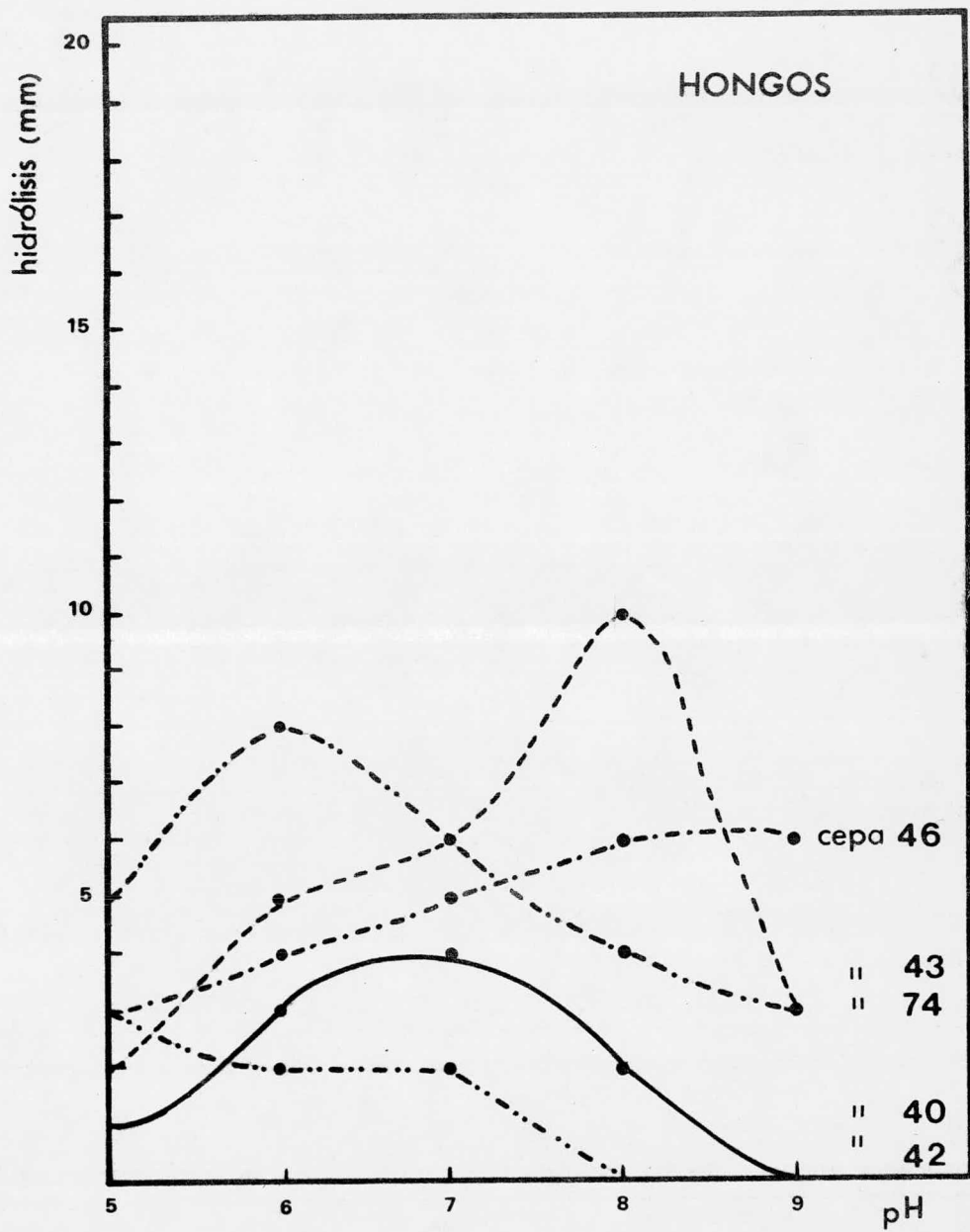




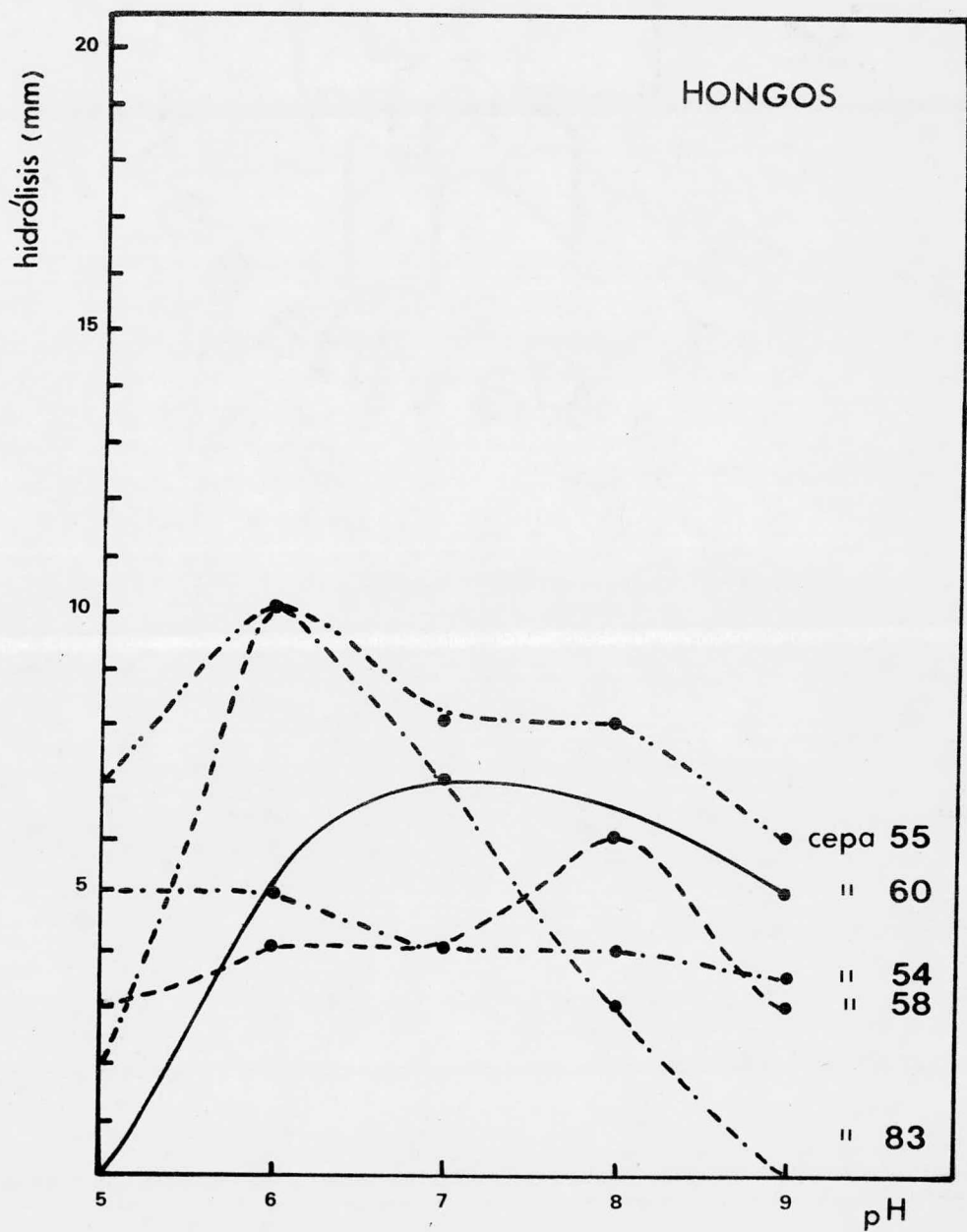
## GRAFICA 12

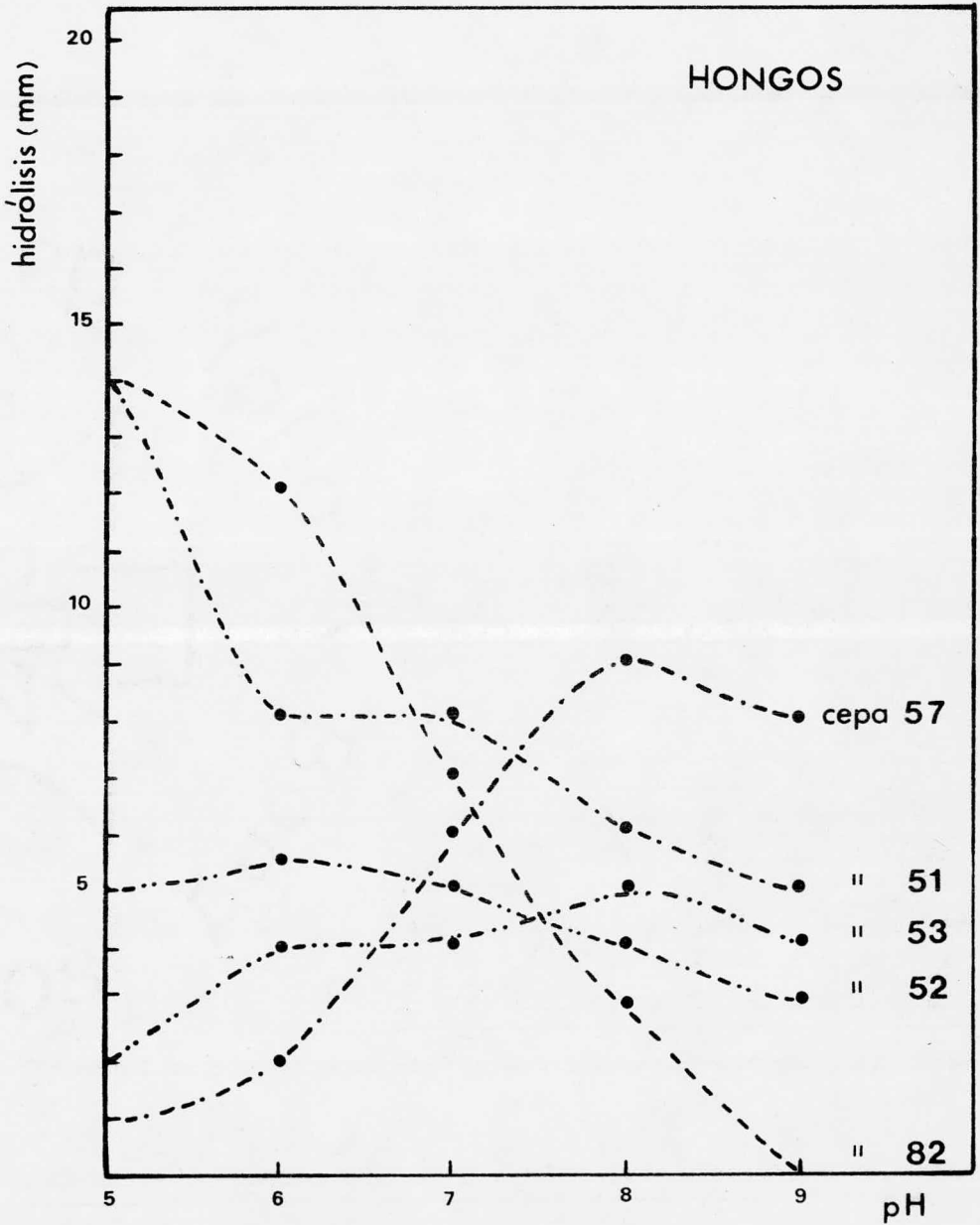


## GRAFICA 13



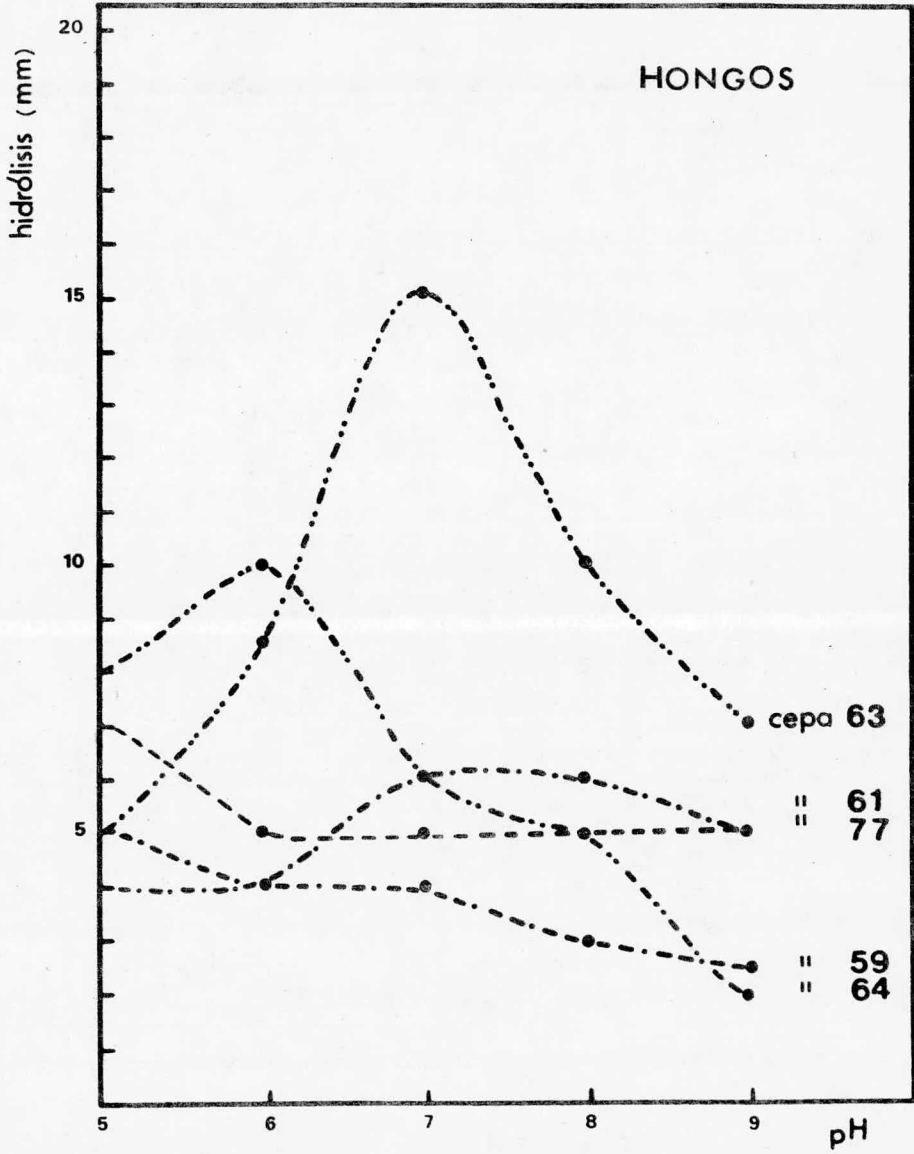
GRAFICA 14



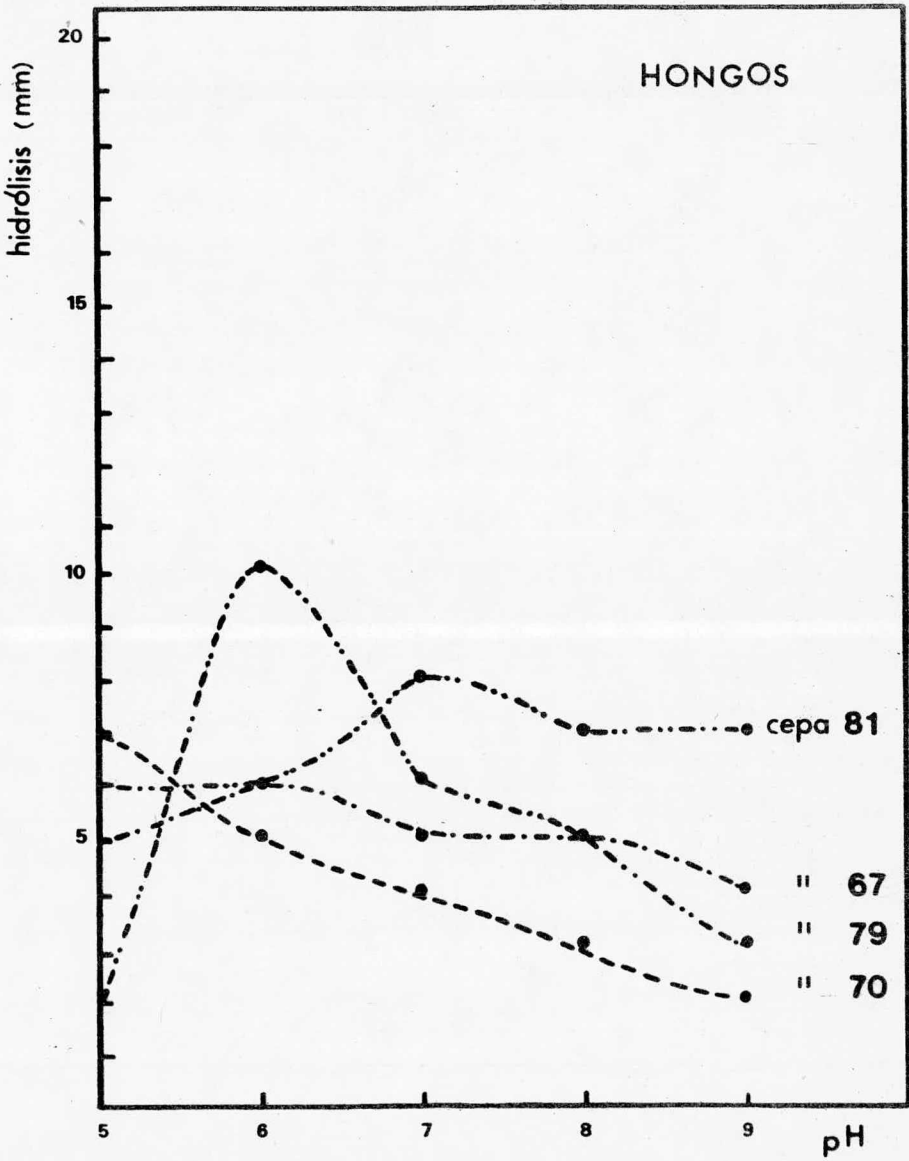


GRAFICA 16

88.



GRAFICA 17



7.4. Determinación de la actividad amililftica: disminución de la viscosidad (licuefacción).

El objeto de este estudio fué determinar la -- actividad de la amilasa liberada al medio de cultivo -- por cada microorganismo.

Los resultados indican el tiempo de licuefacción del almidón. Tabla 3.

Las unidades de actividad pueden obtenerse dividiendo, 100 entre el tiempo de actividad.

Tabla 3. Determinación de la actividad amilolftica. Disminución de la viscosidad (Licuefacción).

Cepa No.	Tiempo de licuefacción (min.)		
	Sin dilución	1:10	1:20
1*	10	35	--
2	25	>120	--
3	>120	--	--
4	>120	--	--
5	30	>120	--
6*	5	45	--
7	5	40	--
8	9	50	--
9*	9	50	--
10	10	60	--
11	35	76	--
12	80	>120	--
13*	12	55	--
14	50	>120	--
15	35	>120	--
16*	1	27	--
17*	2	39	--
18	3	45	--
19*	10	55	--
20*	< 1	47	--
21	>120	--	--
22	35	>120	--

Tabla 3. (Continuación).

Cepa No.	Tiempo de licuefacción (min.)		
	Sin dilución	1:10	1:20
23*	5	25	--
24*	< 1	15	30
26	>120	--	--
27	25	69	--
28	>120	--	--
29*	< 5	15	20
30*	10	32	--
31*	20	60	--
32*	< 5	15	30
33	75	--	--
34	70	--	--
35	75	--	--
36	>120	--	--
37	>120	--	--
38	>120	--	--
39*	< 5	35	40
40	97	--	--
41	90	--	--
42	>120	--	--
43	>120	--	--
44	58	>120	--
45	60	>120	--
46	>120	--	--
51	>120	--	--
52	45	--	--
53	20	--	--
54	>120	--	--
55	>120	--	--
57	>120	--	--
58	>120	--	--
59	45	--	--
60*	10	>120	--
61	>120	--	--
63	>120	--	--
64*	15	--	--
65	90	--	--
66*	18	--	--
67*	12	>120	--
68	31	--	--
70*	33	--	--
72*	15	>120	--
73*	< 5	65	--
74*	28	>120	--
75	>120	--	--

\* Cepas seleccionadas para estudio posterior.



Tabla 3. (Continuación).

Cepa No.	Tiempo de licuefacción (min.)		
	Sin dilución	1:10	1:20
77	>120	--	--
79*	5	40	>120
80	>120	--	--
81	>120	--	--
82*	>120	--	--
83	>120	--	--
84*	< 5	--	--

Considerando el pH óptimo para la máxima actividad amilolítica y el tiempo de licuefacción, se escogieron 26 cepas las cuales se indican con un asterisco (\*) - en las Tablas 2 y 3. A estas cepas seleccionadas se les hicieron las siguientes determinaciones:

#### 7.5. Efecto de las variaciones de la concentración de iones calcio en la actividad amilolítica.

Las concentraciones de iones calcio en este experimento están expresadas en %, mientras que las de oxalato de sodio en milimoles, de acuerdo a los datos reportados en la literatura (14, 11).

Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla 4 y gráficas 18-20.

#### 7.6. Prueba de catalasa.

Con el objeto de estudiar los requerimientos de oxígeno en las 26 cepas seleccionadas, se efectuó la -- prueba de producción de catalasa; como en todos los casos resultó positiva se suprimió la tabla.

Tabla 4. Efecto de la presencia de  $\text{Ca}^{++}$  en la actividad amilolítica. Los números indican el radio en mm de hidrólisis en placas de agar-almidón.

CEPA No.	A D I C I O N E S															
	mmoles OXALATO				% $\text{Ca}^{++}$											
	4	3	2	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	0.15	0.2
1	4	6	5	5	5	5	7	7	7	7	7	9	6	5	5	5
6	7	8	8	9	10	20	10	10	9	8	11	12	15	9	9	9
9	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	4	4
13	5	5	6	6	6	6	7	8	7	7	7	7	7	7	5	4
16	4	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	8	7	6	5
17	4	4	4	5	6	7	7	8	7	6	6	6	6	6	5	5
19	4	5	5	5	4	9	10	8	8	7	7	7	6	5	5	5
20	2	2	2	3	4	5	8	4	4	4	3	3	3	2	2	2
23	4	4	5	7	10	12	12	11	11	11	9	9	7	7	7	7
24	3	3	5	5	6	7	7	7	9	9	9	10	9	5	5	5
29	6	7	7	8	9	10	10	8	8	8	8	7	2	1	1	1
30	3	3	3	4	4	6	6	6	7	7	7	6	5	4	4	4
31	3	3	3	5	13	14	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3
32	4	8	11	12	12	13	12	12	12	11	11	10	9	9	2	0
39	1	3	8	8	8	8	9	9	10	12	12	11	11	10	1	1
60	3	3	4	5	5	6	6	6	6	5	5	5	5	4	4	3
64	5	5	5	8	9	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6
66	0	0	0	0	4	5	5	5	4	3	3	2	2	2	1	0
67	3	3	4	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5
70	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	2	2
72	2	3	8	9	10	10	10	11	13	12	10	9	8	8	1	0
73	6	7	14	15	15	13	13	12	12	11	11	11	11	11	5	4
74	3	4	4	4	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5
79 →	3	4	4	7	10	6	6	5	4	4	4	4	4	4	4	4
82	3	3	6	6	12	7	7	6	6	6	6	6	6	6	4	4
84	2	6	10	17	20	12	12	11	11	10	9	0	0	0	0	0

7.7. Efecto del sonicado sobre la actividad amilolítica.

Una vez observado el efecto de los iones sobre algunas cepas microbianas, se eligieron diez que mostraron mayor actividad amilolítica, y fueron las siguientes: 6, 23, 24, 29, 31, 32, 72, 73, 83 y 84.

Estas se sometieron a sonicación con diferentes abrasivos para liberar la amilasa intracelular y tenerla en mayor concentración (Método 6.8.).

Las cepas 6, 23, 24, 29 y 31 se cultivaron en forma agitada y estática.

Debido a que no se observó una variación notable entre los cultivos agitados y estáticos, se decidió cultivar las cepas 72, 73, 83 y 84 sin agitar.

Los resultados se muestran en la siguiente Tabla (Método 6.9.).

Tabla 5. Efecto del sonicado con diversos abrasivos sobre la actividad amilolítica de algunas cepas microbianas. Los valores indican tiempos de hidrólisis de una solución de almidón (min.).

Cepa No.	Cultivo	Sin soni- car	S o n i c a d o			
			Sin adición	Perlas de vidrio	Polvo de vidrio	CSi
6	estático	23	16	21	25	20
	agitado	23	140	149	210	140
23	estático	6	5	5	5	4
	agitado	4	4	7	10	14
24	estático	17	12	6	9	10
	agitado	22	14	14	14	20
29	estático	6	6	5	5	5
	agitado	3	3	4	3	5
31	estático	180	196	60	110	60
	agitado	52	65	31	65	97
32	estático	9	8	5	8	6
72	estático	7	8	6	7	5
73	estático	16	10	11	12	11
83	estático	22	24	26	52	17
84	estático	32	24	14	12	14

#### 7.8. Determinación cuantitativa de la actividad amilolítica.

De acuerdo con los resultados obtenidos se eligieron 4 cepas (23, 29, 83 y 84), a las que ya no se sometieron a sonicación y su actividad amilolítica fué registrada en forma cuantitativa mediante la determinación de azúcares

reductores, expresados en mg de maltosa (Método 6.10.).

Estas 4 cepas sólo se eligieron como un estudio preliminar en la determinación del tiempo necesario para observar la formación de azúcares reductores y la temperatura de esta prueba.

Los resultados se indican en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Determinación de azúcares reductores producidos por la amilasa a diferentes tiempos de incubación frente a una solución de almidón al 0.1%, a temperatura ambiente. Los valores indican mg de maltosa.

Cepa No.	Tiempo de incubación (min.)				
	3	5	10	15	30
23	1.4	1.4	1.4	1.4	4.5
29	0.6	0.9	0.9	0.9	1.7
83	0.6	1.4	1.4	1.7	2.0
84	0.9	1.1	2.0	2.0	2.4

Tabla 7. Determinación de azúcares reductores producidos por la amilasa al incubar a temperatura ambiente y a 28°C, 30 y 60 minutos frente a una solución de almidón al 0.1%. Los valores corresponden a mg de maltosa.

Cepa No.	Temperatura ambiente		28°C	
	30 min	60 min	30 min	60 min
23	2.0	2.0	2.1	3.8
29	2.0	2.0	3.6	2.7
83	3.8	1.1	1.4	1.4
84	10.2	8.3	5.5	4.4

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, se decidió determinar la actividad amilolítica por formación de azúcares reductores a 30, 60 y 90 minutos a temperatura ambiente de las cepas: 16, 20, 23, 24, 29, 32, 83 y 84. Tratadas con ultrasonido a diferentes tiempos, sin ningún material adicional. Los resultados se muestran en la tabla 8 y gráficas: 29-34.

Tabla 8. Efecto del sonicado sobre la actividad amilolítica. Determinación de azúcares reductores a - 30, 60 y 90 minutos; obtenidos por la acción de la enzima de diversas cepas sobre una solución de almidón al 0.1%. Los valores indican concentración de maltosa en mg.

Cepa No.	Sonicado t.(min.)	Tiempo de acción (min.)		
		30	60	90
16	-	2	2	2
"	5	2.5	2.5	2.7
"	15	2.2	3	4.1
"	30	4.4	5	5.2
"	60	5.8	6.9	6.9
20	-	8.1	8.1	8.1
"	5	5	5	5
"	15	5.8	5.8	5.8
"	30	5.5	5.5	5.5
"	60	5.5	5.5	5.8
23	-	6.4	6.5	6.7
"	5	8.3	8.3	7.7
"	15	8.6	8.6	8.9
"	30	8.6	8.6	8.6
"	60	8.6	8.6	8.6
24	-	7.2	7.5	7.7
"	5	6.9	6.9	7.2
"	15	7.2	7.2	7.5
"	30	7.2	7.2	7.5
"	60	7.2	7.7	7.7
29	-	7.2	7.5	7.5
"	5	6.9	7.2	7.2
"	15	7.5	7.5	8.1
"	30	7.5	7.7	8.1
"	60	7.2	7.2	7.2
32	-	7.5	7.5	7.5
"	5	6.6	6.9	7.2
"	15	5.8	5.8	5.8
"	30	7.2	7.5	7.5
"	60	6.6	6.6	6.6
83	-	2.5	2.7	2.7
"	5	2.7	3	3.3
"	15	3.3	3.3	3.6
"	30	3.3	3.3	3.6
"	60	3.6	3.8	4.4
84	-	7.8	9.2	9.2
"	5	5	4.4	5
"	15	4.4	5	5
"	30	11	11	11.6
"	60	11.6	11.6	11.6



7.9. Determinación de la actividad amilolítica de amilasa de malta para comparación con amilasas microbianas.

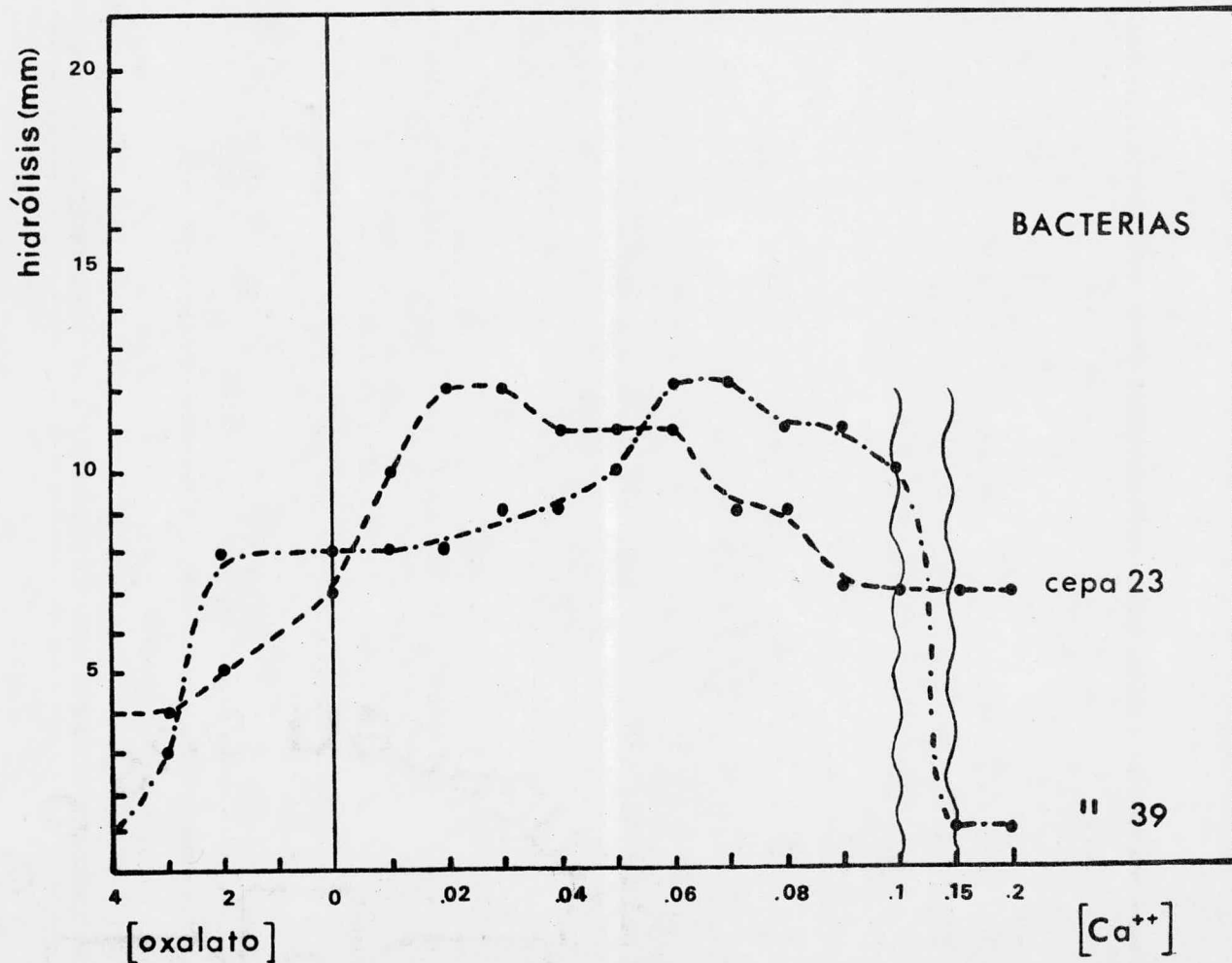
Tabla 9. Determinación de azúcares reductores a 30, 60 y 90 minutos, sobre una solución de almidón al 0.1%. Los valores indican mg de maltosa.

Enzima (1 mg/ml)	Almidón	Tiempo de acción (min.)		
		30	60	90
1 ml	1 ml	1.0	0.8	0.6
"	5 "	0.6	0.3	0.3
"	10 "	0.0	0.2	0.3

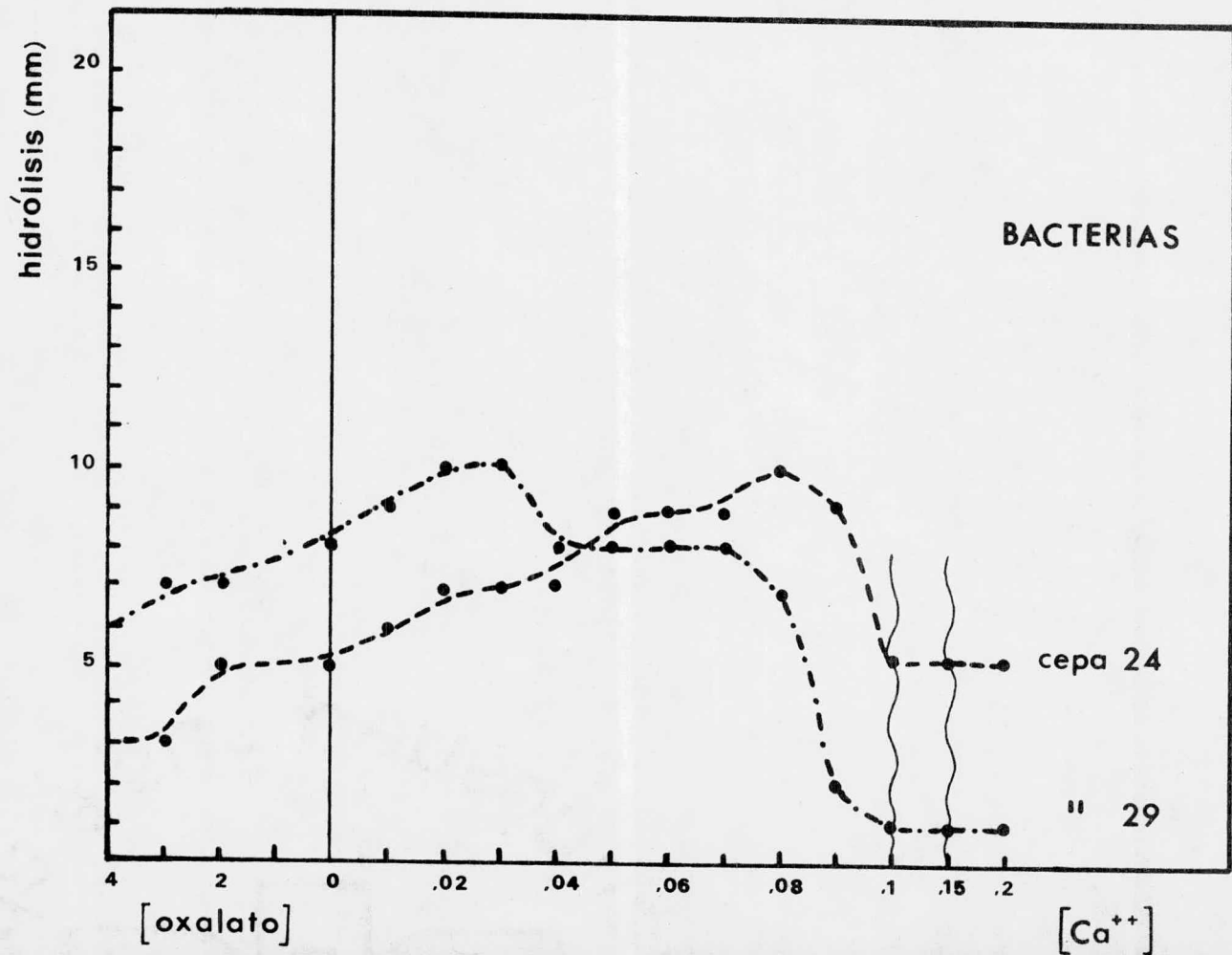
GRAFICAS 18-28

Efecto de la presencia de  $\text{Ca}^{++}$  en la actividad  
amilolítica de las cepas seleccionadas.

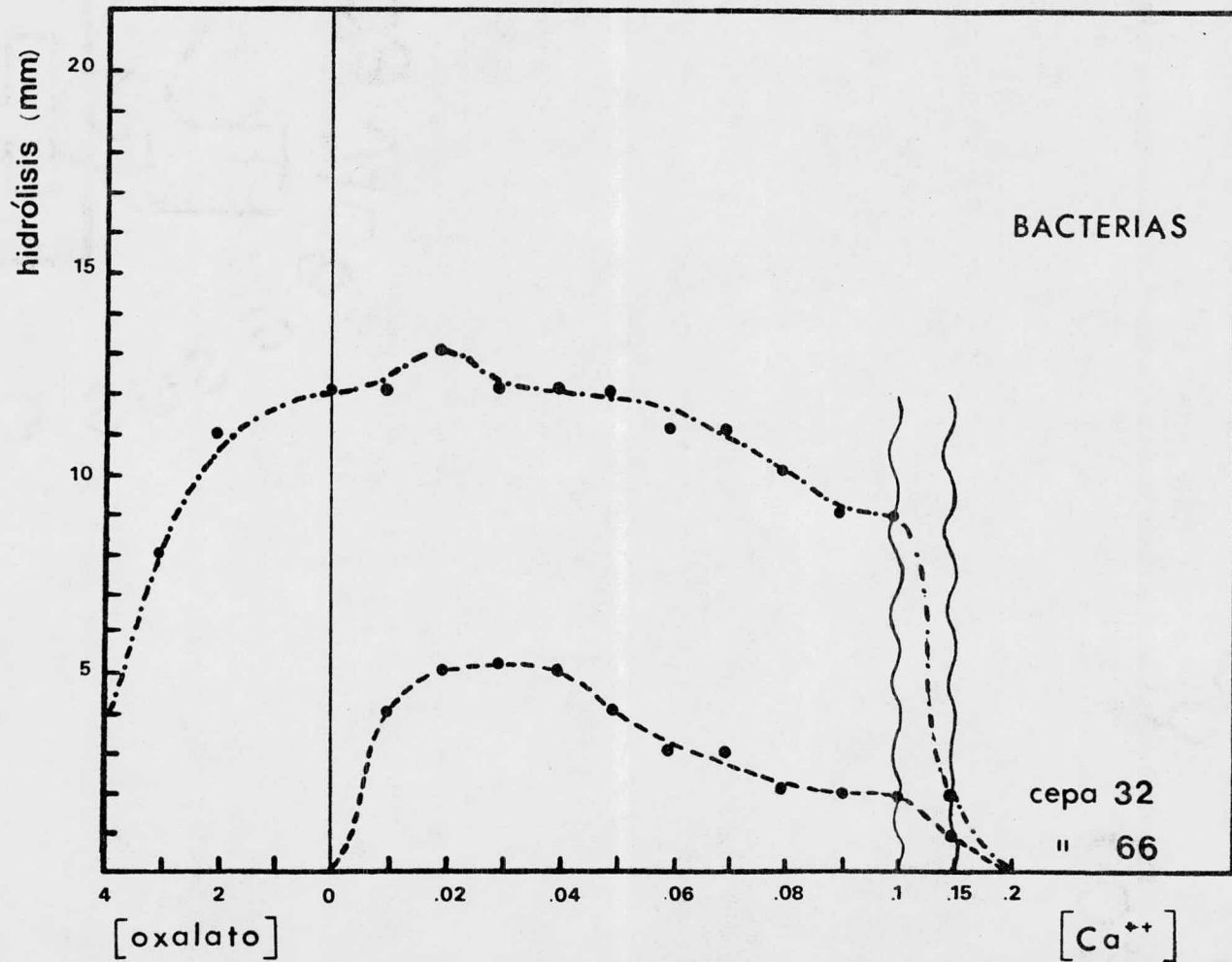
GRAFICA 18



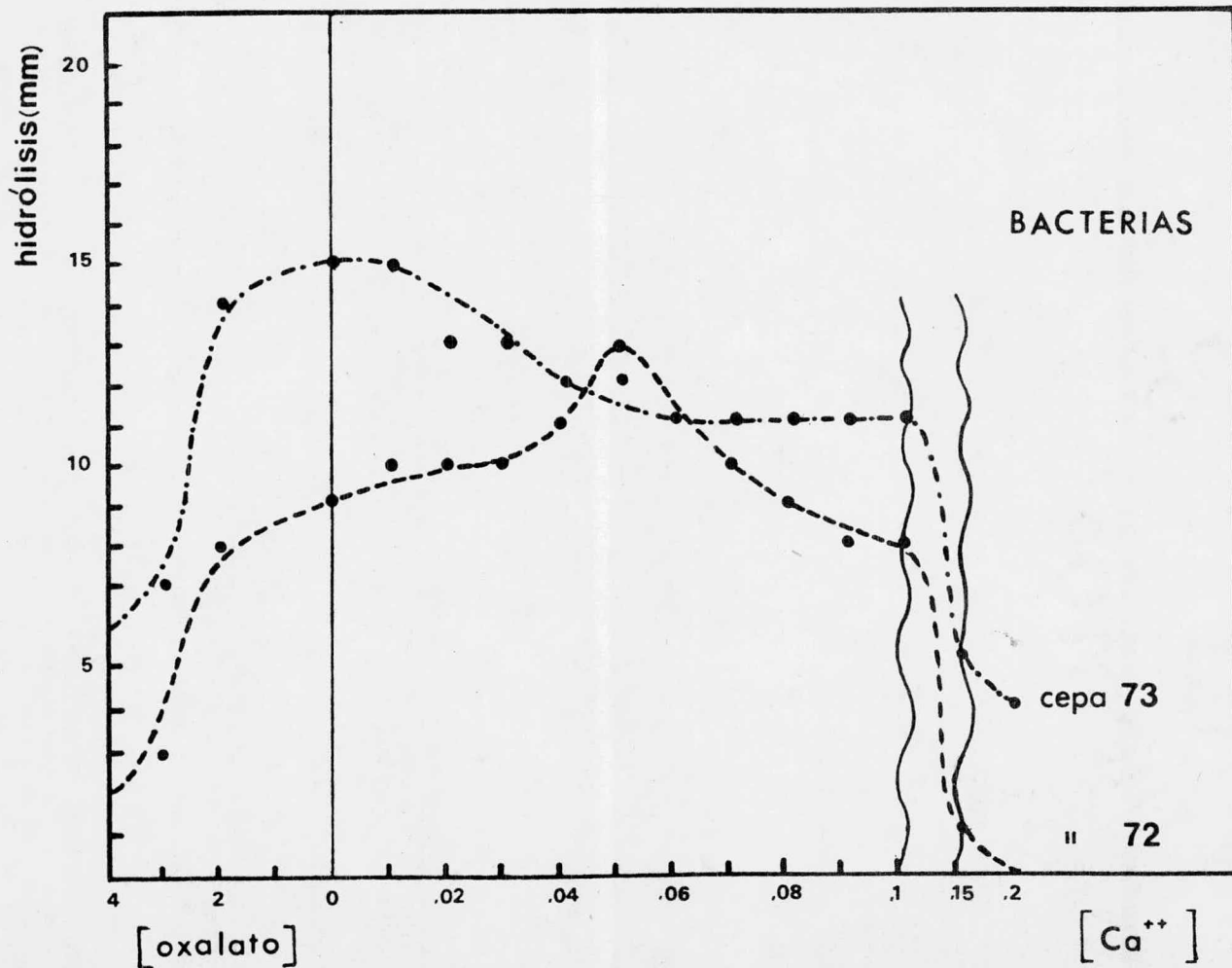
GRAFICA 19



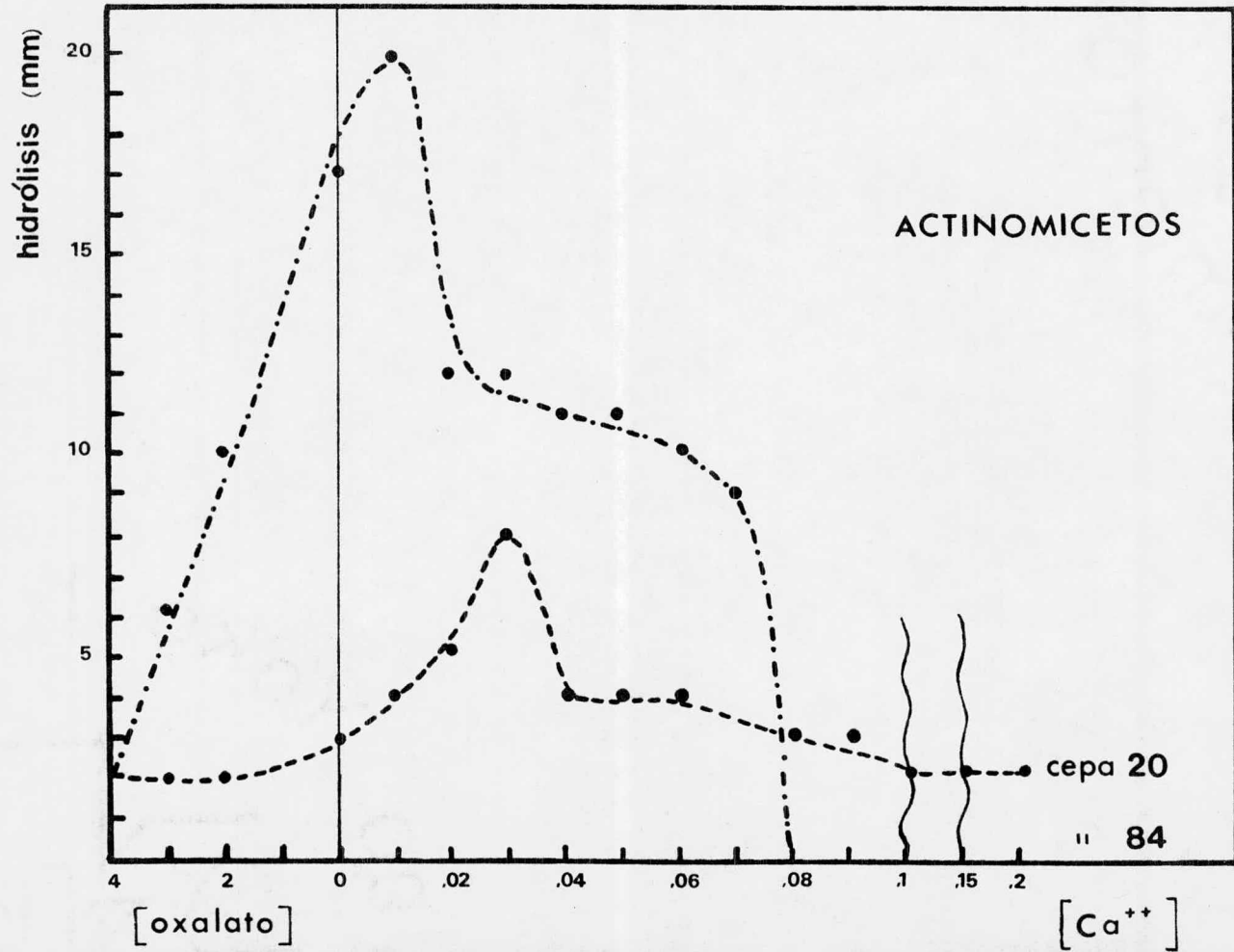
GRAFICA 20



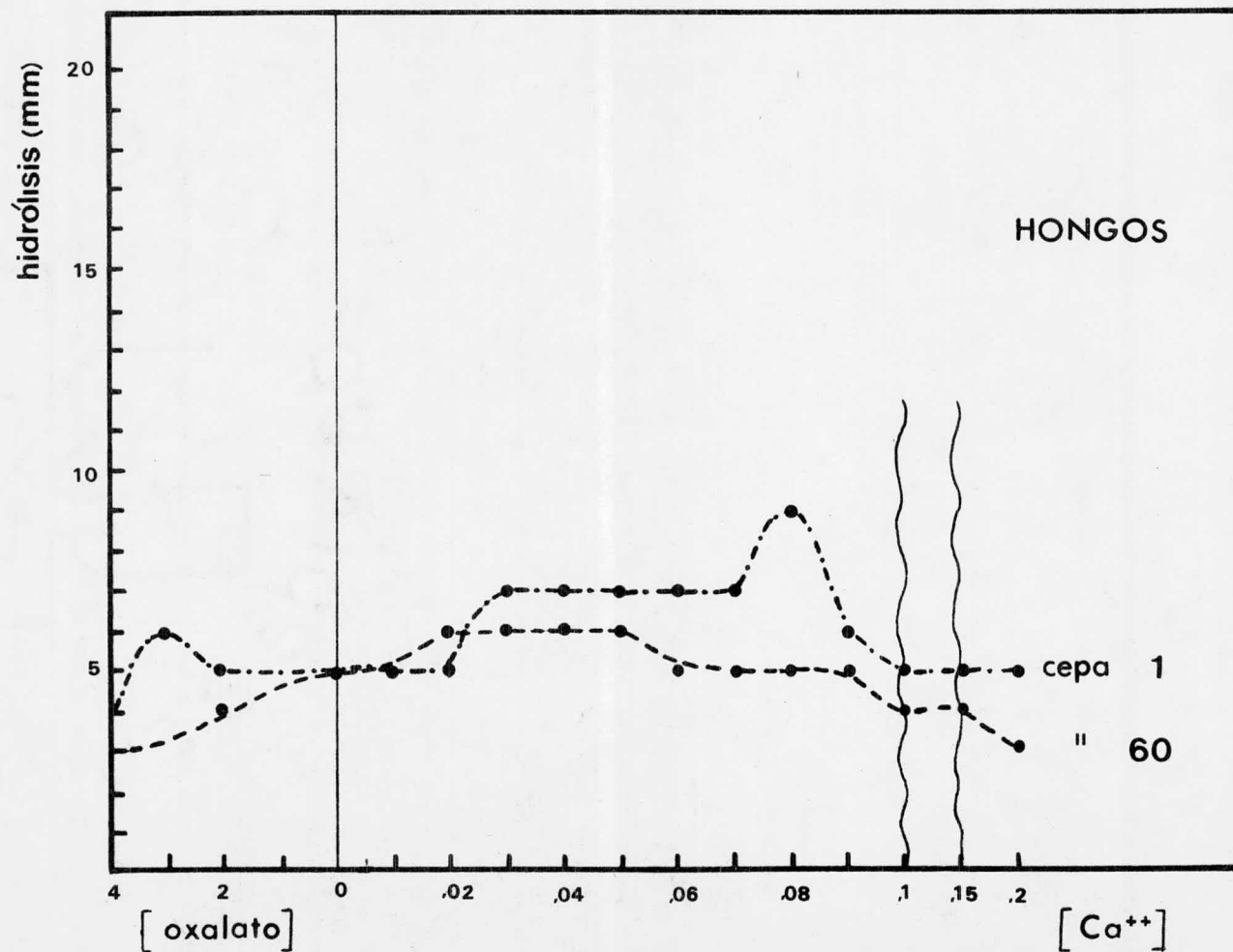
GRAFICA 21



GRAFICA 22

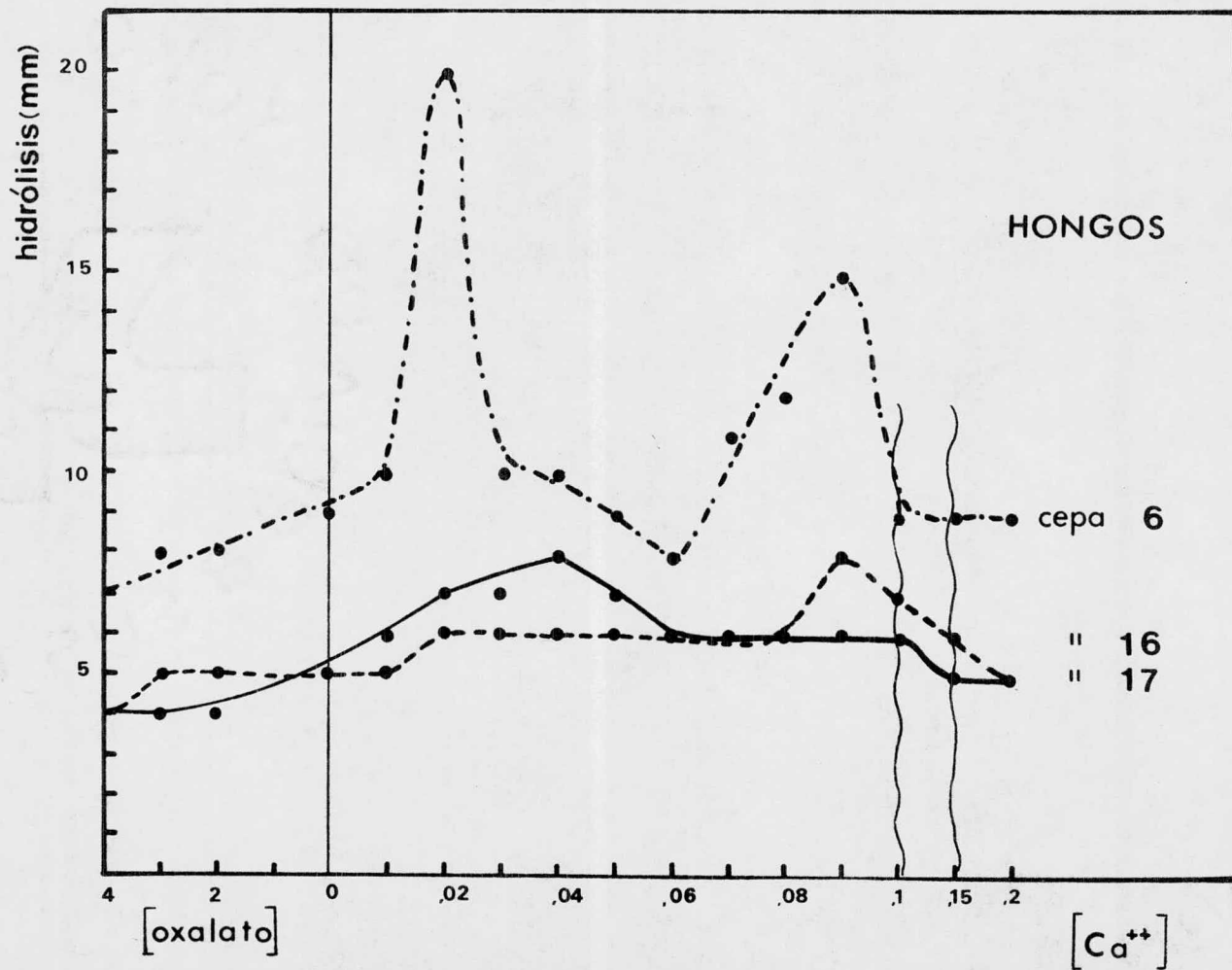


GRAFICA 23

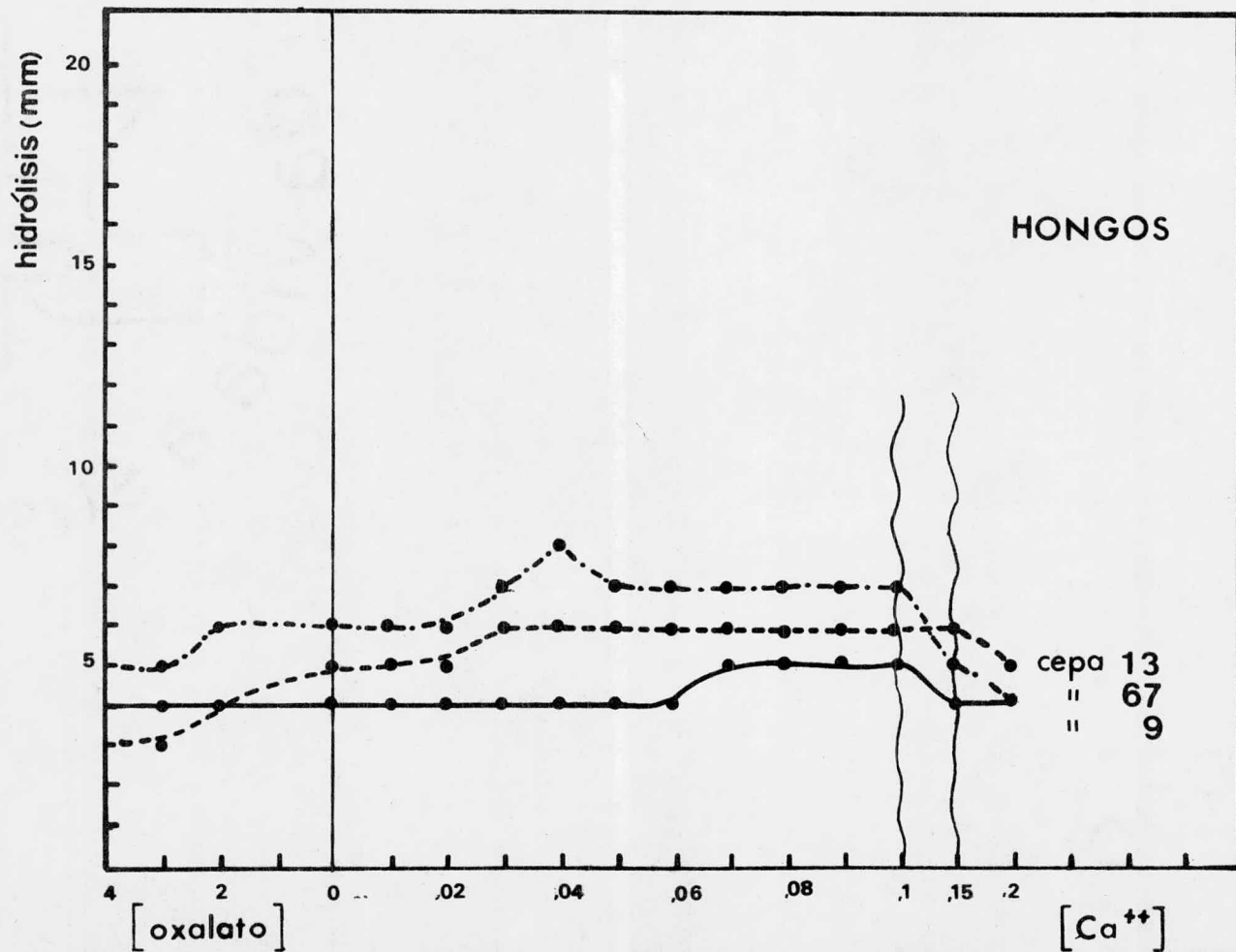




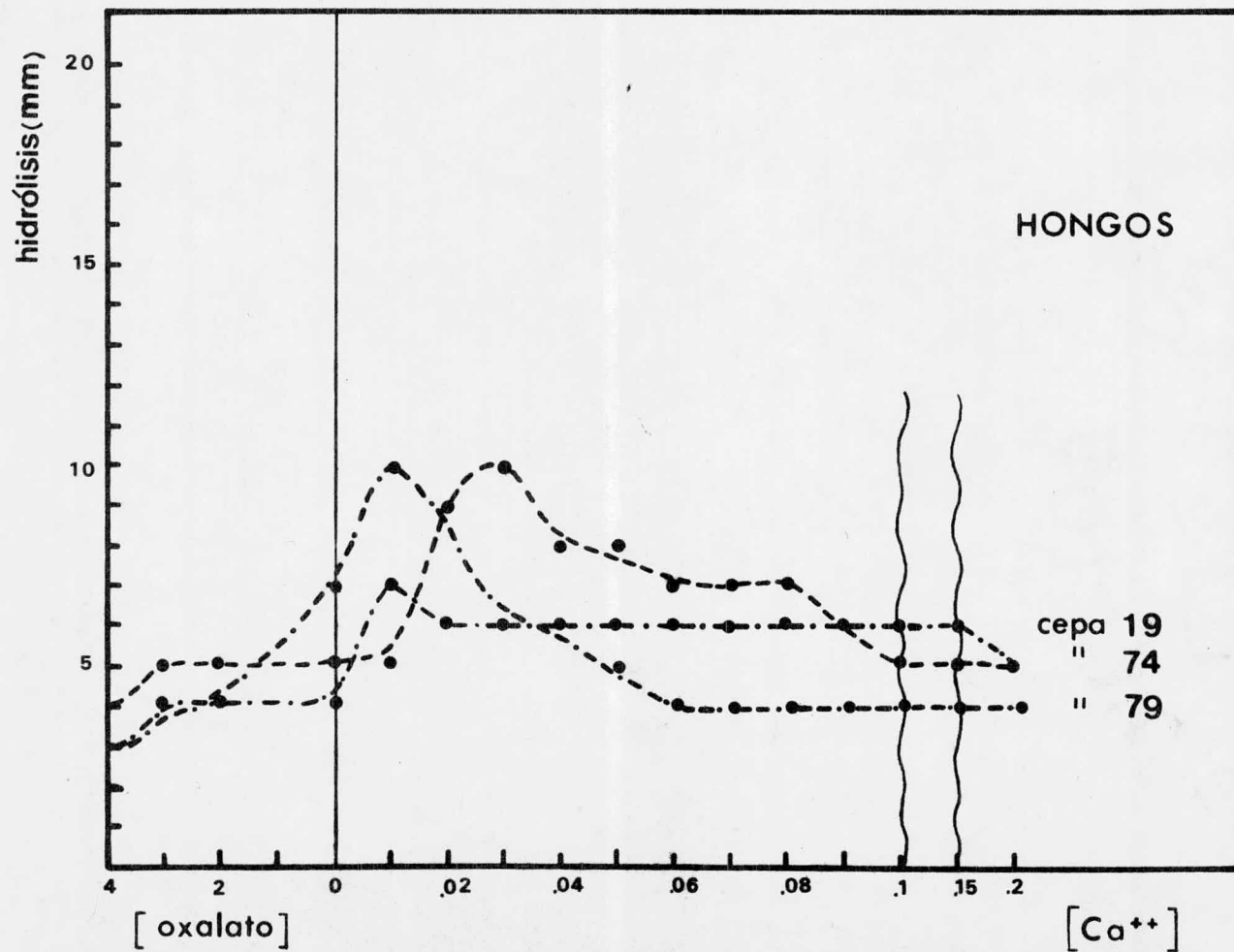
GRAFICA 24



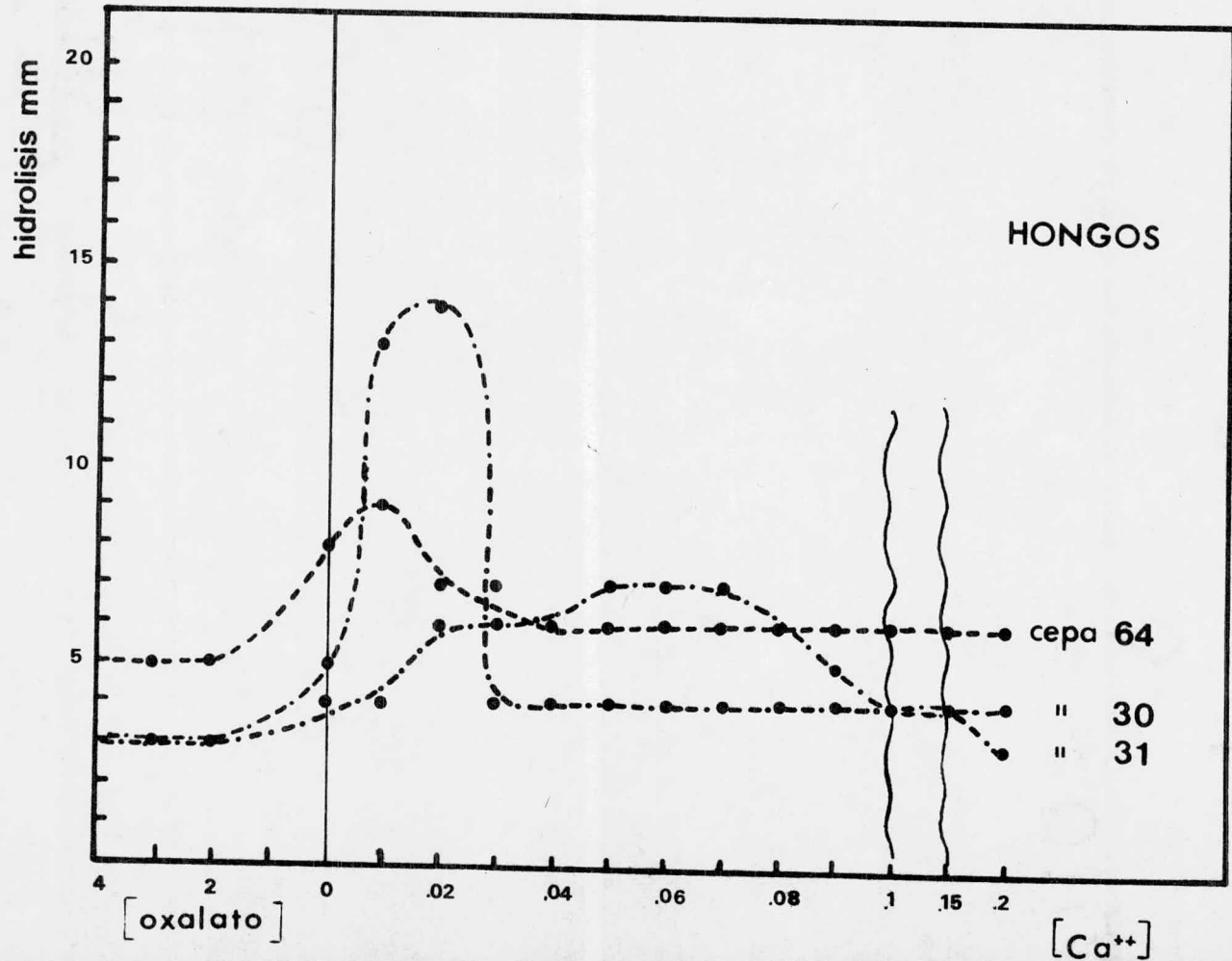
GRAFICA 25



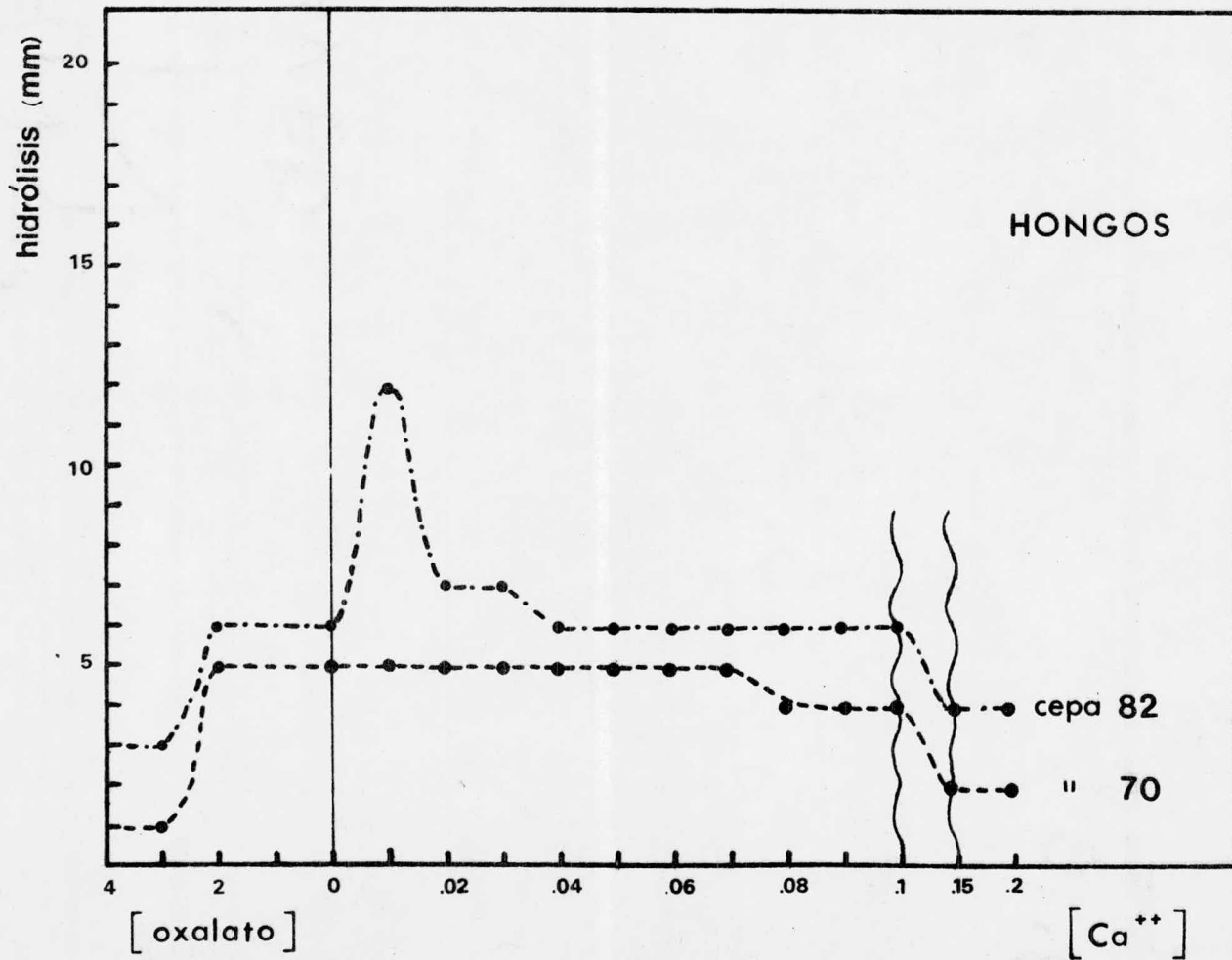
GRAFICA 26



GRAFICA 27



GRAFICA 28



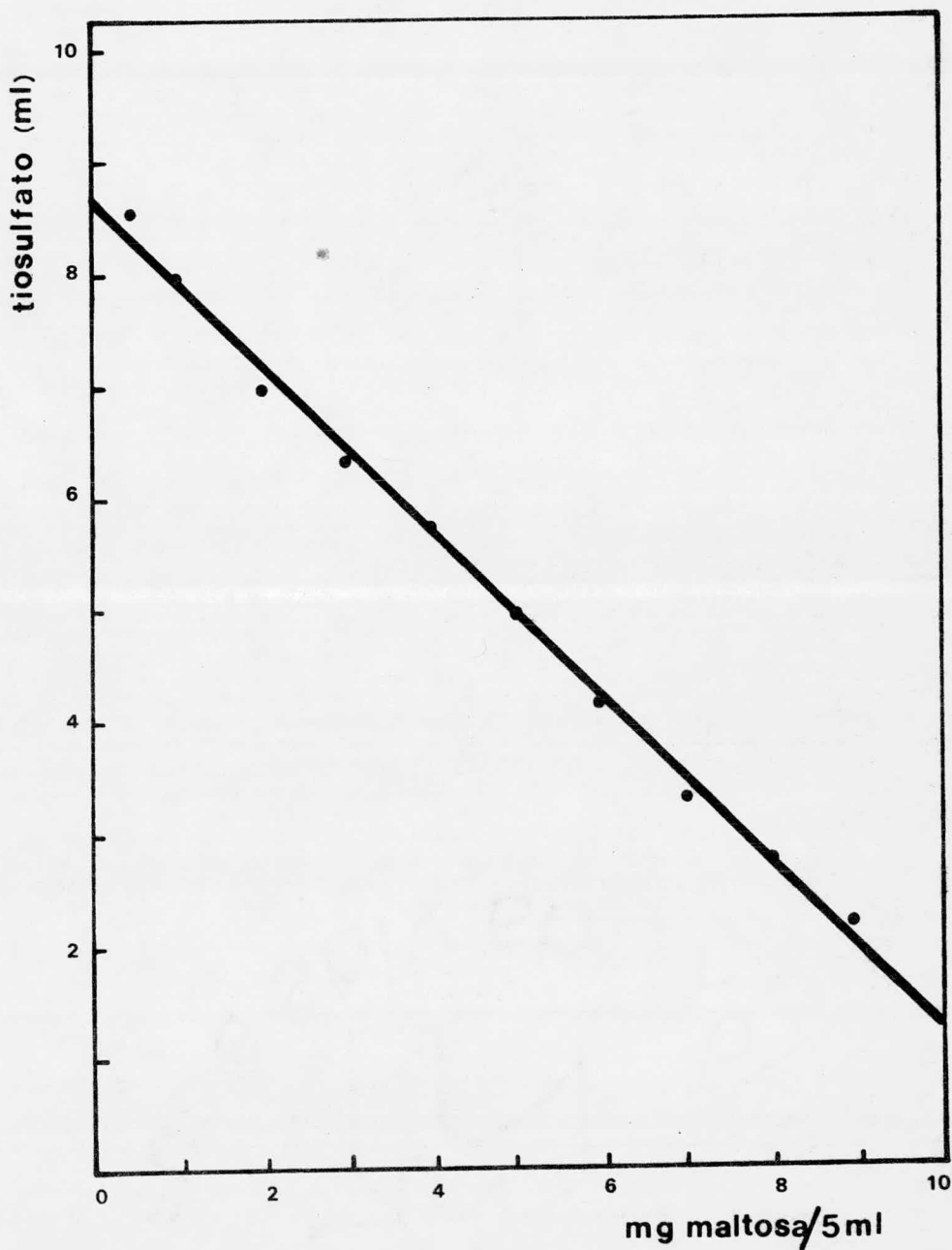
GRAFICAS 29-34

Efecto del sonicado sobre la actividad amilolítica  
de diversas cepas microbianas.

GRAFICAS 29-34

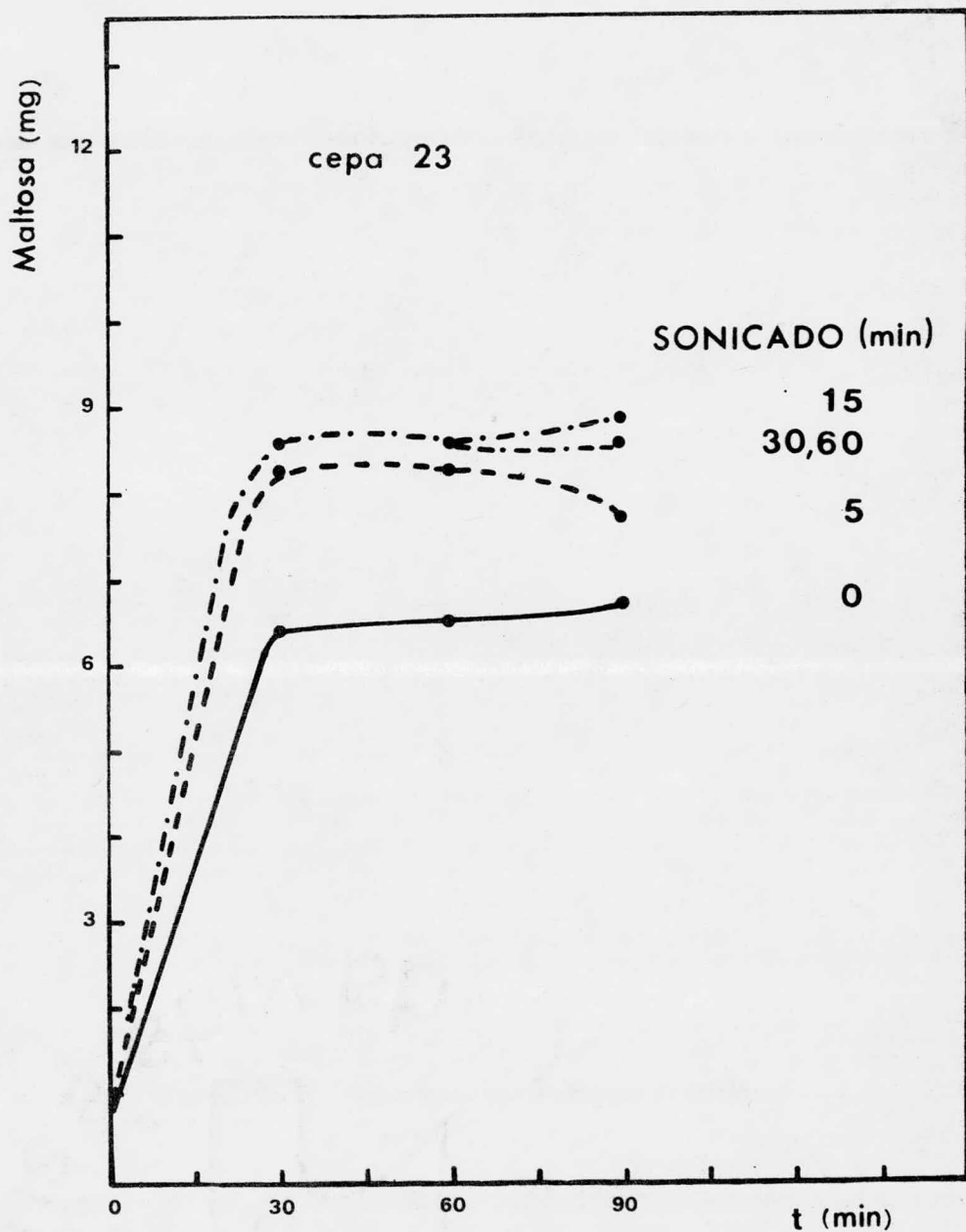
Efecto del sonicado sobre la actividad amilolítica  
de diversas cepas microbianas.

## CURVA PATRON DE MALTOSA

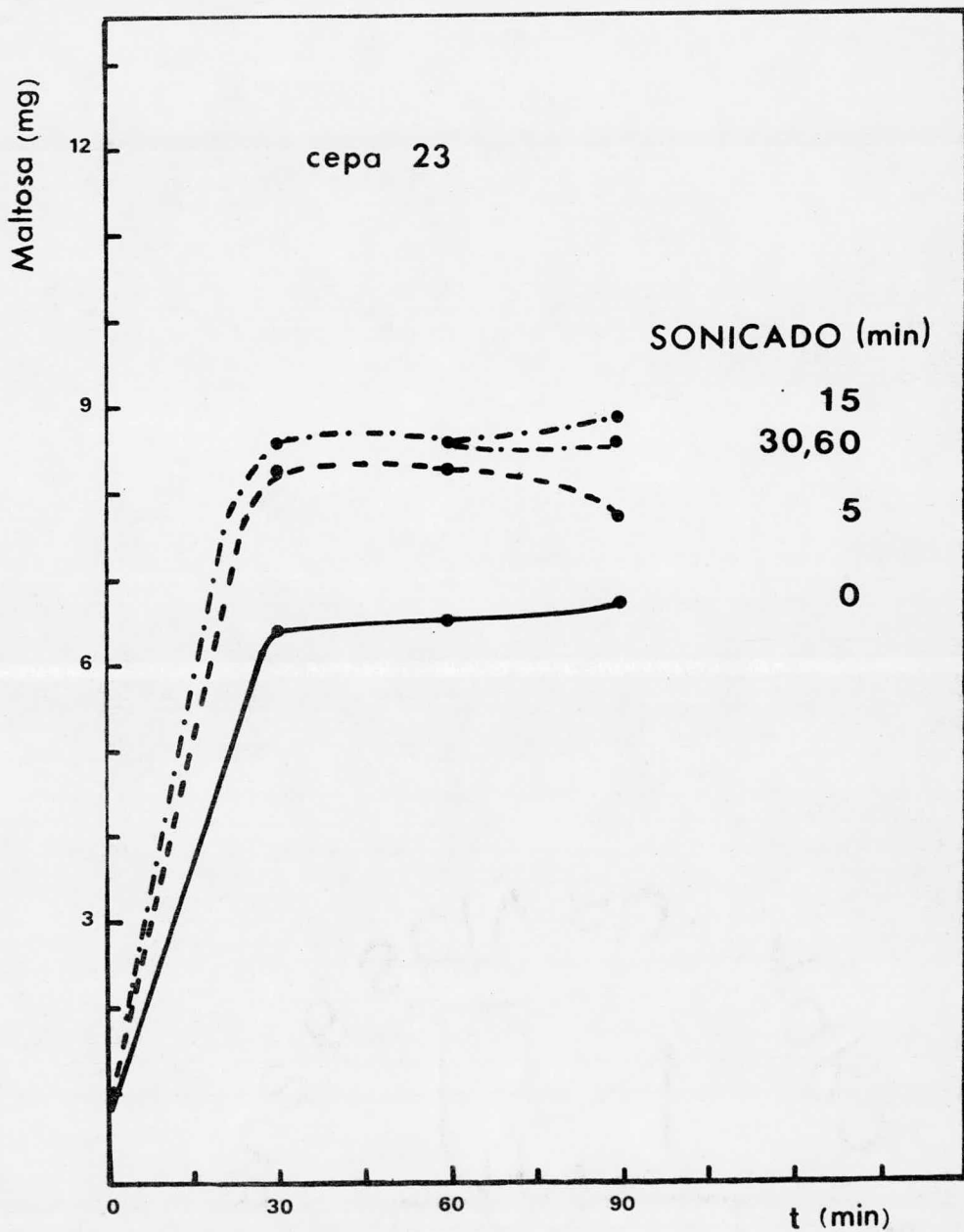




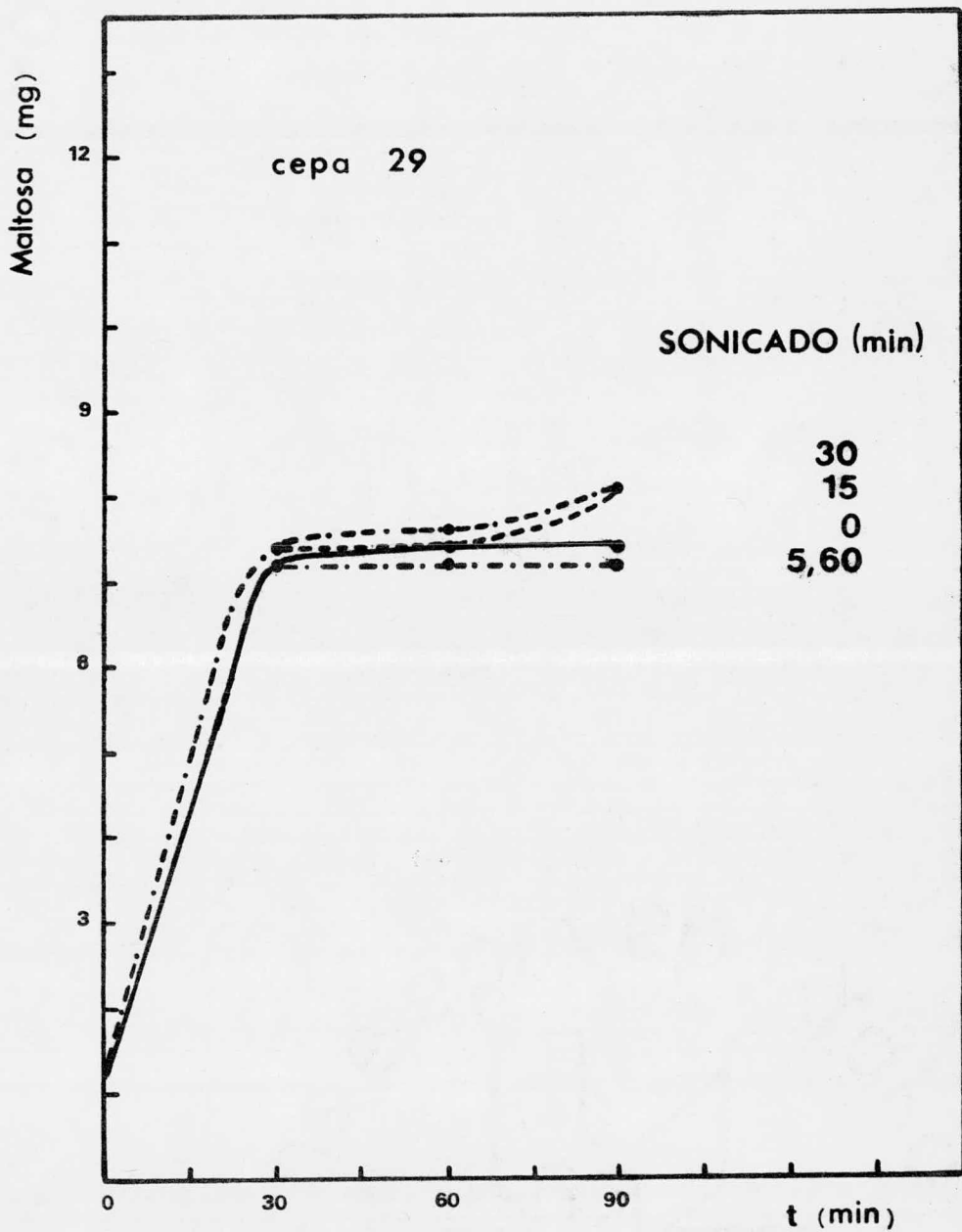
## GRAFICA 29



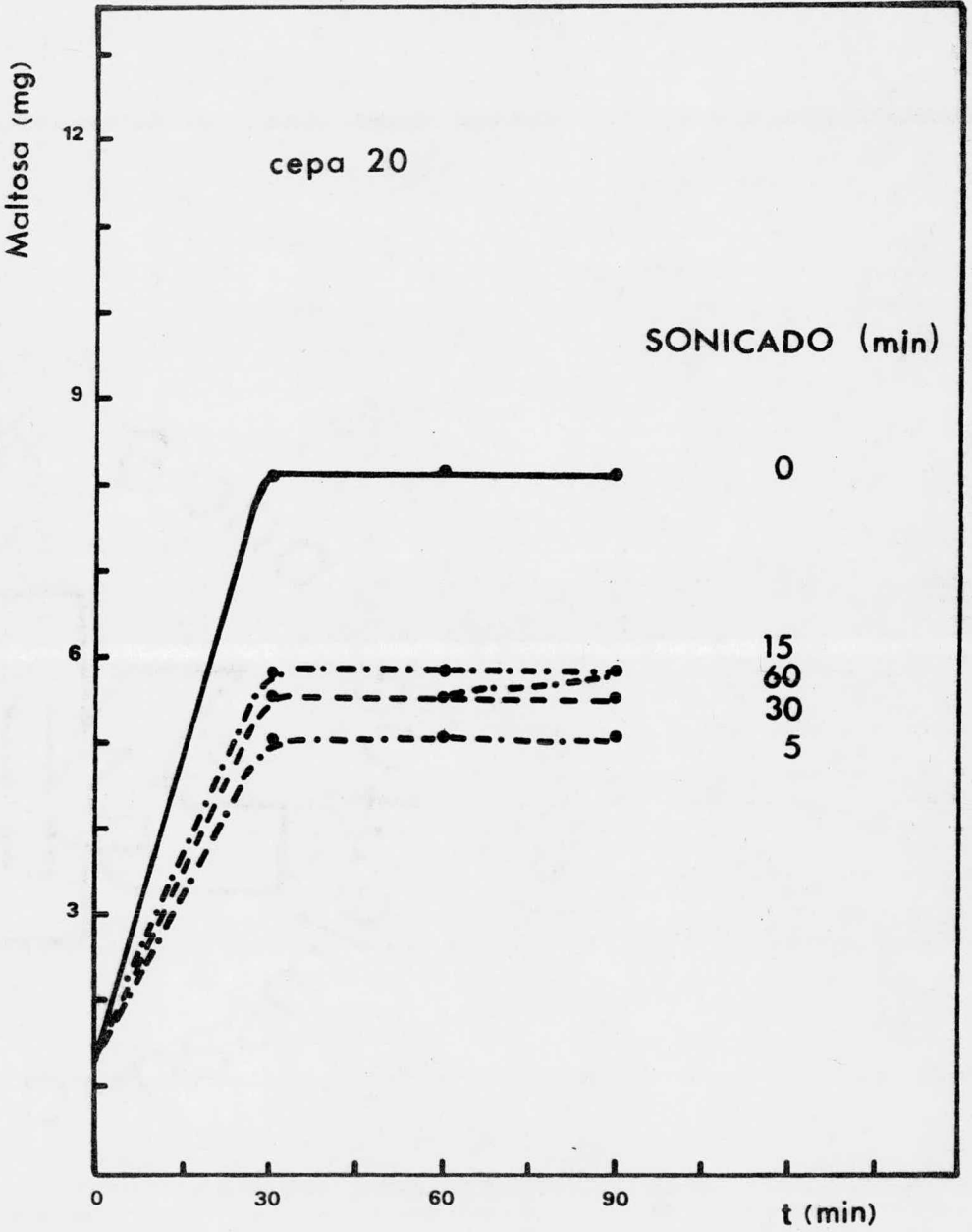
## GRAFICA 29



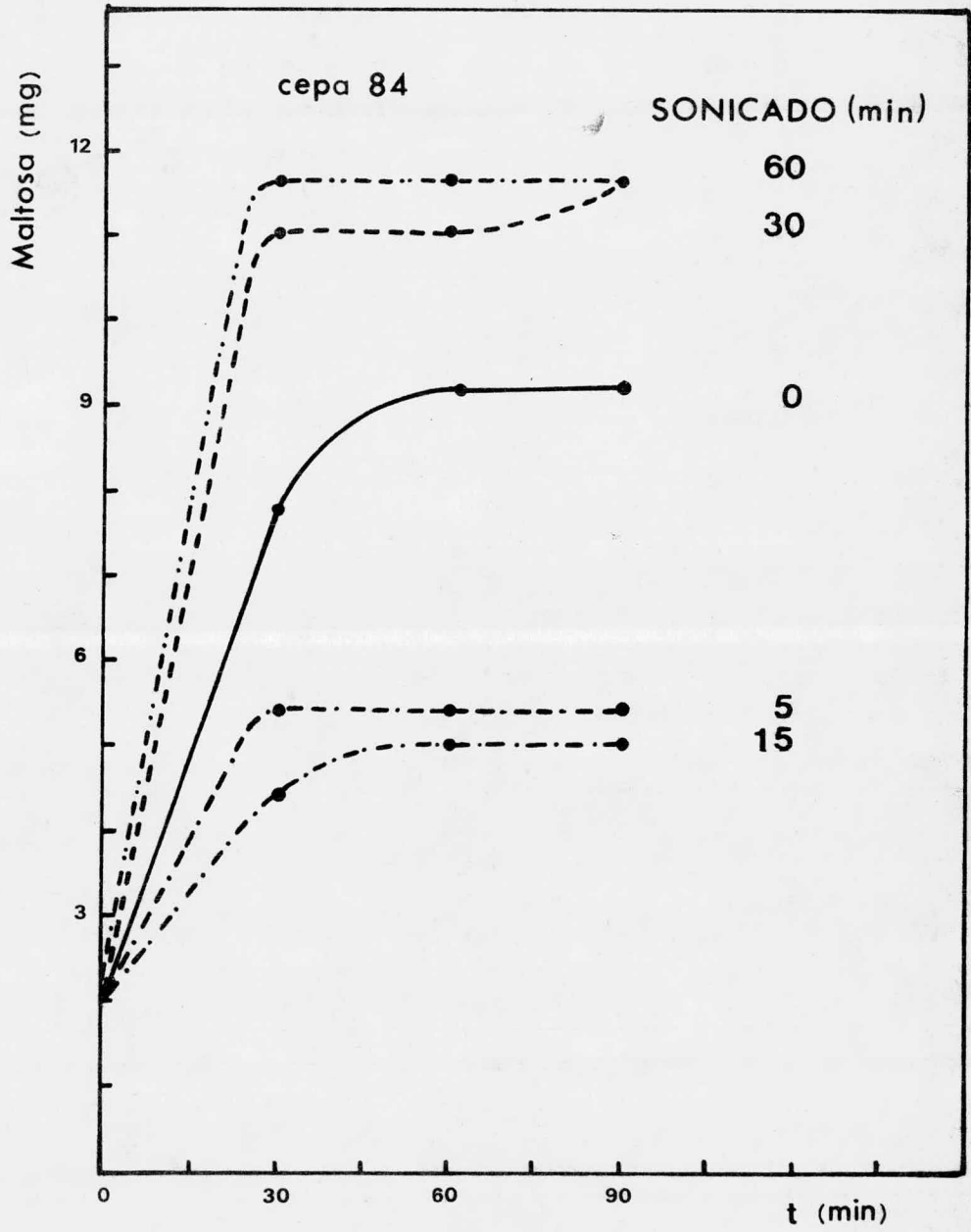
## GRAFICA 30

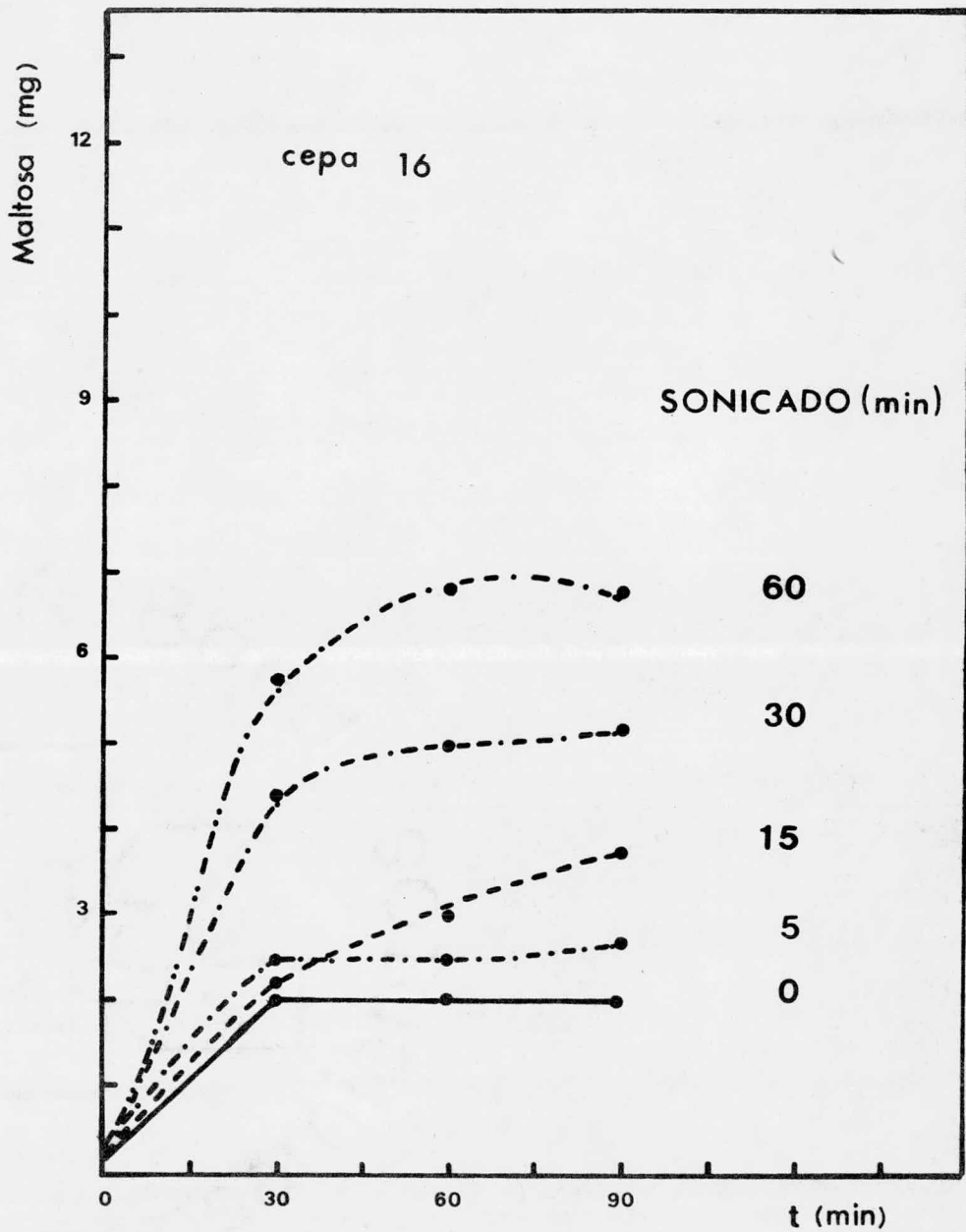


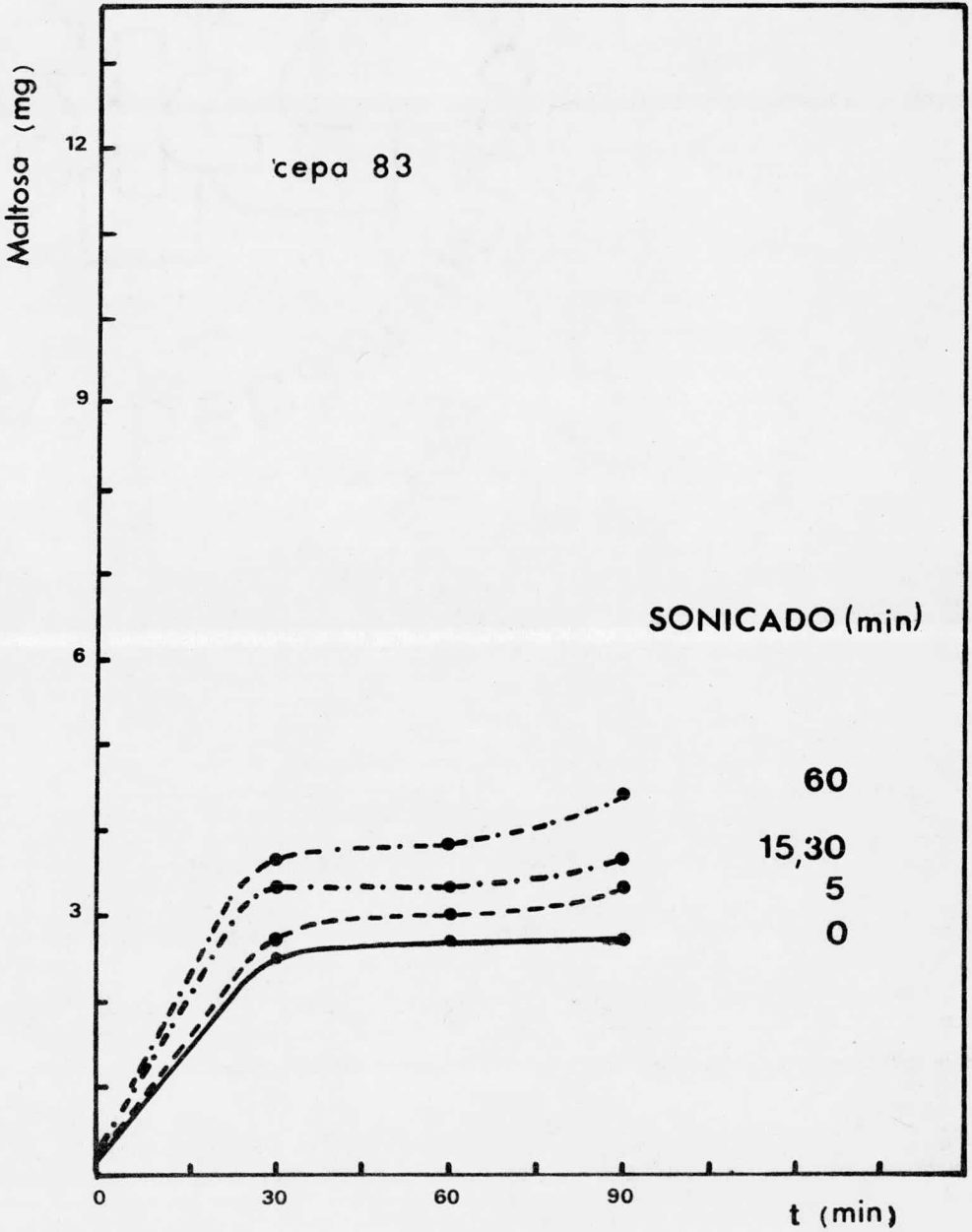
GRAFICA 31



GRAFICA 32







## BIOQUIMICA DE LA ENZIMA

Los resultados que a continuación se muestran están expresados en dos tipos de unidades:

-Unidades Internacionales (U.I.) expresadas en:  
mg de almidón/mg de enzima/minuto (1).

-Unidades Arbitrarias.

Las primeras fueron posibles debido a que a las muestras se les determinó cantidad de proteínas y tiempo de hidrólisis del almidón; mientras que en las segundas solo se determinó el tiempo de hidrólisis de las muestras que alcanzaron primeramente el punto final de reacción -- (color amarillo) haciéndose una comparación posterior de los colores obtenidos por las demás mezclas en ese instante, expresándose en este caso por medio de números de --- acuerdo a la coloración presentada al contacto con Lugol, la cual indica el grado de hidrólisis del almidón. Las - unidades otorgadas se indican en el método 6.18. Página 59.

## PURIFICACION DE LA ENZIMA

a). Precipitación de la Enzima con Sulfato de Amonio.

La precipitación con sulfato de amonio a 0°C llegó hasta 90% de saturación, no obteniéndose resultados en ninguna de las muestras de las cepas 23 y 84.



- b). Desplazamiento Electroforético en geles de Acrilamida sin adición y con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS).

Antes de iniciar el desplazamiento electroforético se investigó la inactivación de las amilasas microbianas (cepas 23 y 84) adicionando SDS al 0.1 y 0.5%. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 10. Inactivación de las Amilasas Microbianas con SDS.

Cepa No.	Proteínas mg/ml	Actividad (U.I.)		
		Sin SDS	SDS 0.1%	SDS 0.5%
23	1.8	1.40	1.40	0.19
84	2.1	0.16	0.05	0.03

La determinación de proteínas por medio de electrofóresis en geles de acrilamida sin adición y con SDS no fué posible, ya que una vez hecha la emigración y la tinción de los geles con Amido negro no aparecieron bandas que indicaran la presencia de proteínas.

Lo anterior pasó con todos los genes que se prepararon de muestras de extracto crudo, no sonicadas, soni ca da s, concentradas por sacarosa y por ultrafiltración mo le cu la r en Amicon, de las cepas 23 y 84.

La localización de la actividad amilolítica por medio de la colocación del gel de acrilamida (emigrado - electroforéticamente con la muestra) sobre una placa de agar-almidón al 1% (Zimograma) no mostró ningún dato fide digno, ya que los geles sin muestra dan reacción falsa -- positiva en la placa de agar-almidón al ser revelados con Lugol, pues aparece una zona amarillenta que abarca la si lueta del gel, no permitiendo esto apreciar un resultado verdadero.

Los resultados anteriores hicieron pensar la posibilidad de que la enzima fuera un agregado de monómeros de bajo peso molecular los cuales se hubiesen difundido a través del gel de acrilamida al 5%, así que se utilizaron geles con una malla más cerrada, obteniéndose resultados similares.

En los geles de agar al 1.5% tampoco aparecieron bandas de proteínas al teñirse con Amido negro.

Lo anterior fué el motivo de realizar la concentración de la muestra por medio de la eliminación del volumen líquido en membrana de diálisis sobre sacarosa y -- por ultrafiltración molecular en Amicon (membranas cali-- bradas de celulosa).

## CONCENTRACION POR ULTRAFILTRACION MOLECULAR EN AMICON

La concentración en Amicon (ultrafiltrador molecular) permitió obtener 4 fracciones de diferentes tamaños moleculares, con actividad amilolítica.

Para determinar la actividad se usaron 20 microlitros de extracto microbiano frente a 1 ml de almidón al 0.1%. Todas las muestras tienen inhibidor de proteasas PMSF 0.1M en propanol (11 microlitros/ml de extracto).

Los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Ultrafiltración Molecular en AMICON.

Frac- ción	Proteí- nas mg/ml	Actividad U.I.	Capacidad enzimática *	Actividad por Vol. total	Volumen total ml
23-1	--	--	2.20	227.04	103.20
23-2	6.30	9.07	60.24	192.76	3.20
23-3	9.25	0.02	0.14	0.81	5.80
23-4	1.05	4.12	19.38	197.67	10.20
23-5	1.05	0.00	0.00	0.00	92.00
84-1	4.70	0.36	2.61	272.75	104.50
84-2	12.30	3.06	38.46	123.07	3.20
84-3	2.32	0.04	0.10	0.70	7.00
84-4	7.33	1.14	0.93	9.30	10.00
84-5	2.73	0.24	0.70	65.45	93.50

\* mg almidón hidrolizado/ml enzima/min.

Los números 23 y 84 indican la cepa microbiana de la cual procede la muestra.

Los números 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 denotan las fracciones - filtradas y retenidas:

1. Extracto microbiano inicial sin pasar por el ultrafiltrador.
2. Fracción retenida por la membrana de poro de 30,000 nm.
3. Fracción filtrada " " " " " " " "
4. Fracción retenida " " " " " " " 10,000 nm.
5. Fracción filtrada " " " " " " " "
6. Fracción filtrada " " " " " " " 1,000 nm.
7. Fracción retenida " " " " " " " "

Las fracciones 6 y 7 no mostraron actividad.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las diferentes fracciones, la mayor actividad amilolítica se encontró en la fracción 2, por lo que en ésta se ensayó la precipitación con sulfato de amonio a 0°C, de 0 a 50 y de 50 a 75% de saturación, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 12. Precipitación con Sulfato de Amonio.

Cepa No.	Fracción	Proteínas	Actividad (U.I.)
23	0-50 precipitado	2.3	0.31
	50-75 "	0.8	0.001
	0-75 sobrenadante	0.2	*
84	0-50 precipitado	1.9	0.02
	50-75 "	1.8	0.002
	0-75 sobrenadante	1.0	*

\* No cambió la coloración azul-negro en 24 horas.

DETERMINACION DEL GRADO DE PUREZA DE LA AMILASA EN COLUMNA  
DE BIOGEL P-100

Una vez obtenidas las fracciones con tamaño molecular mayor de 30,000 nm, las muestras se filtraron en la columna de Biogel P-100 para conocer su grado de pureza y a la vez determinar, de ser posible, su peso molecular aproximado. Los resultados se muestran en las gráficas 35 para la cepa 23; 36 y 37 para la cepa 84.

La gráfica 35 (extracto de la cepa 23) muestra una serie de máximos con una área localizada de actividad amilolítica, la cual no corresponde a la elevación mayor de proteínas, el máximo en la densidad óptica corresponde al Dextran azul usado para medir el volumen de exclusión de la columna.

En la gráfica 36 (extracto de la cepa 84) se observan los resultados de una primera filtración, tomándose en cuenta aquellos máximos más representativos, se llevó a cabo una segunda filtración, obteniéndose la gráfica 37, la cual muestra crestas y valles, tanto de proteínas como de actividad amilolítica que no son continuos. En este caso se usaron globulina de ratón y ovoalbúmina como marco de referencia.

En ambas cepas se obtuvieron resultados que muestran la presencia de la amilasa de los extractos, así como una serie de proteínas diferentes.

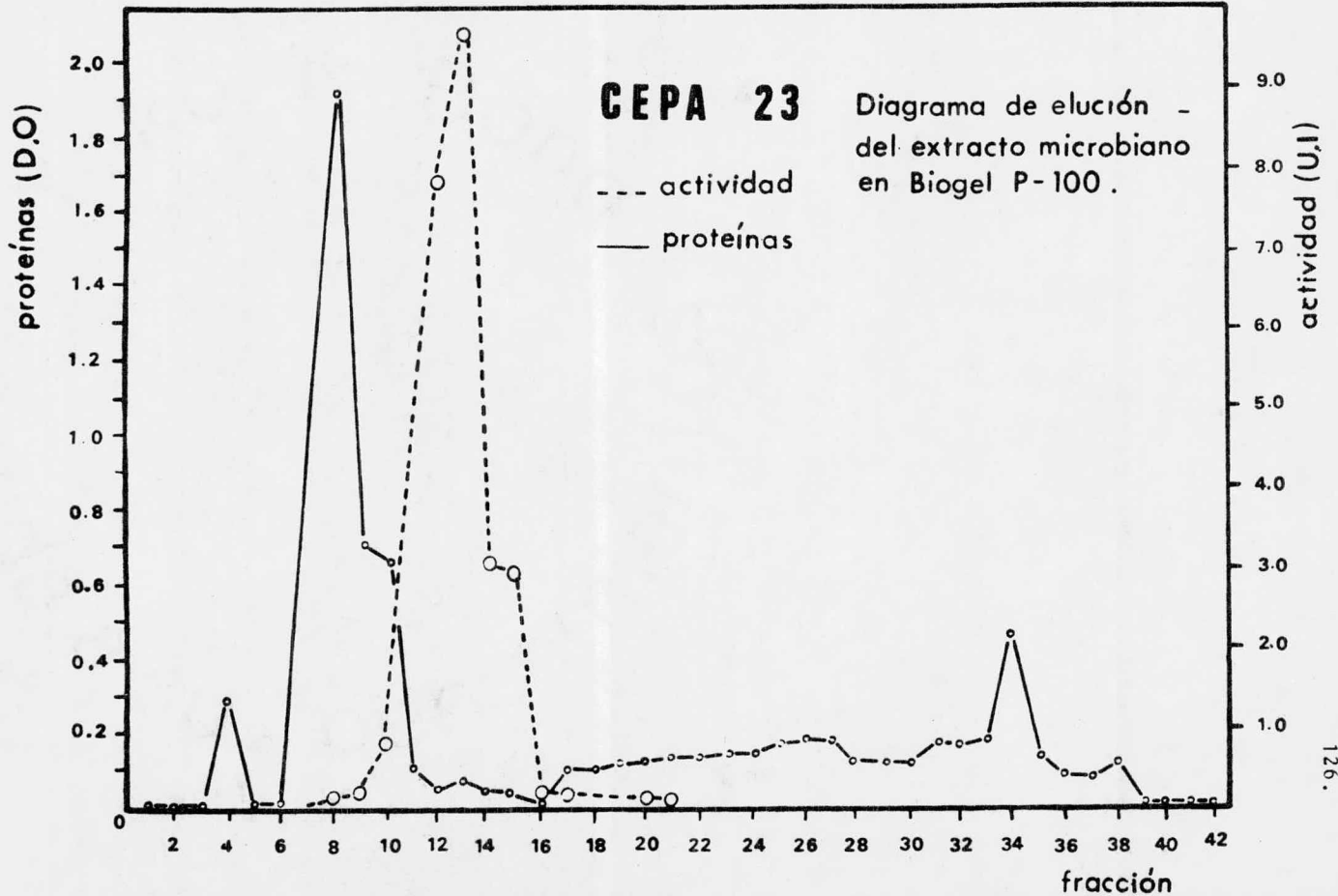
No fué posible determinar el peso molecular de las amilasas por el poco grado de pureza de las muestras, como se observa en las gráficas.

#### BIOQUIMICA DE LA ENZIMA

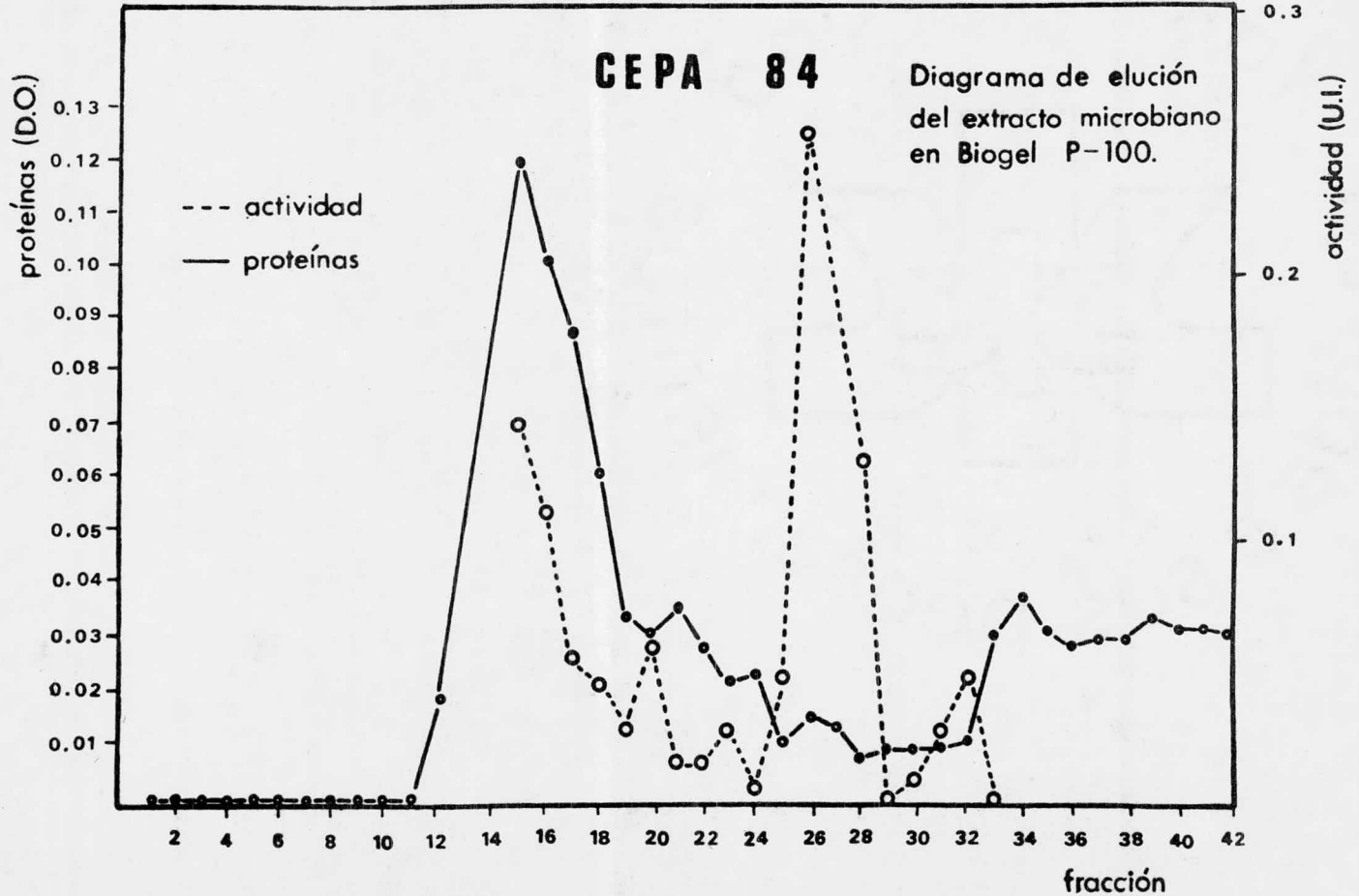
COMPARACION DE LOS EFECTOS DE LA SONICACION EN LA ACTIVIDAD DE LA AMILASA.

La actividad de las muestras sonicadas y no sonicadas fué determinada usando 0.2 ml de extracto microbiano y 1 ml de solución de almidón al 1% (10 mg/ml). Los resultados se muestran en las tablas 13 (cepa 23) y 14 (cepa 84).

GRAFICA 35



GRAFICA 36





GRAFICA 37

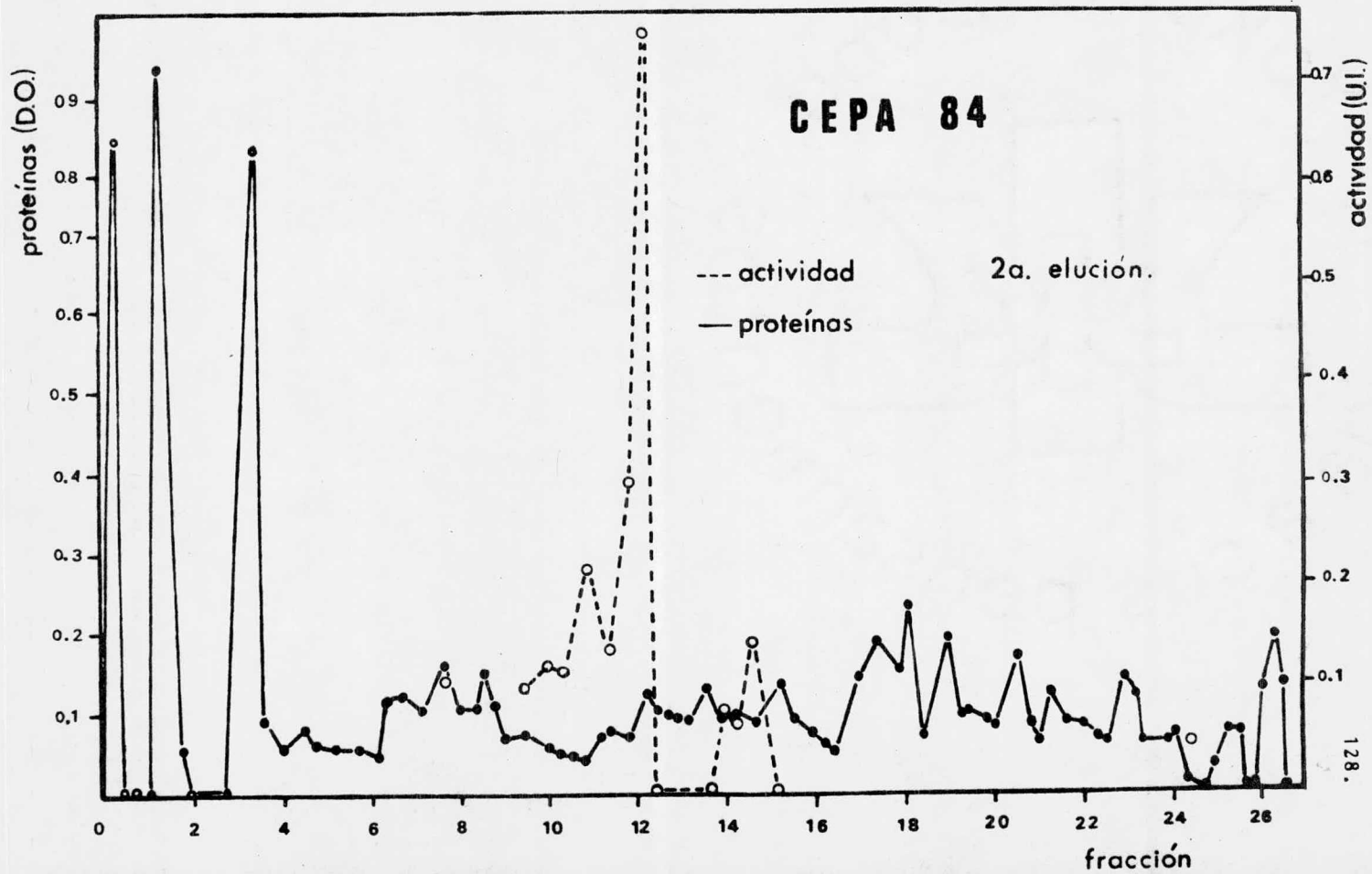


Tabla 13. Comparación de los efectos de la sonicación en la actividad de la amilasa de la cepa 23.

Fracción	Proteínas mg/ml	Actividad (U.I.)	
		Sin CaCl <sub>2</sub>	Con CaCl <sub>2</sub>
Cultivo inicial (al terminar tiempo de incubación)	1.5	1.98	1.98
Cultivo no sonicado (antes de sonicación)	1.5	1.75	1.66
Cultivo sonicado	1.4	1.11	1.11
Centrifugación a 10,000 rpm durante 60 min.			
Células (cultivo no sonicado)	0.6	0.22	0.26
Sobrenadante (culti vo no sonicado)	1.15	0.72	0.72
Células (cultivo sonicado)	0.43	0.10	0.10
Sobrenadante (culti vo sonicado)	1.20	0.70	0.69
Precipitación del sobrenadante con sulfato de amonio (0 a 70% de saturación)			
Precipitado no so nicado	0.60	0.42	0.61
Sobrenadante no sonicado	0.75	*	*
Precipitado sonicado	0.15	2.40	3.14
Sobrenadante sonicado	0.80	*	*

\* Permaneció un color café rojizo hasta las 24 horas de iniciada la reacción, por lo que no se determinó la actividad.

Tabla 14. Comparación de los efectos de la sonicación en la actividad de la amilasa de la cepa 84.

Fracción	Proteínas mg/ml	Actividad (U.I.)	
		Sin CaCl <sub>2</sub>	Con CaCl <sub>2</sub>
Cultivo inicial (al terminar tiempo de incubación)	2.0	0.83	0.83
Cultivo no sonicado (antes de sonicación)	2.0	0.32	0.55
Cultivo sonicado	2.25	0.40	0.41
Centrifugación a 10,000 rpm durante 60 min.			
Células (cultivo no sonicado)	0.45	0.14	0.22
Sobrenadante (culti vo no sonicado)	1.0	0.52	0.59
Células (cultivo sonicado)	0.15	0.57	0.54
Sobrenadante (culti vo sonicado)	1.35	0.37	0.30
Precipitación del sobrenadante con sulfato de amonio (0 a 70% de saturación)			
Precipitado no sonicado	1.35	*	*
Sobrenadante no sonicado	1.15	*	*
Precipitado sonicado	1.70	*	*
Sobrenadante sonicado	0.85	*	*

\* Permaneció un color café rojizo hasta las 24 horas de iniciada la reacción.

DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE ACTIVIDAD DE LAS AMILASAS  
MICROBIANAS (Cepas 23 y 84).

El tiempo de incubación (temperatura ambiente) para cada cepa, varió de acuerdo a la velocidad de hidrólisis del almidón, siendo para la cepa 23 sin adición de  $\text{CaCl}_2$  25 minutos y 19 minutos con  $\text{CaCl}_2$ . Para la cepa 84 estos tiempos fueron de 34 minutos sin  $\text{CaCl}_2$  y 31 minutos con  $\text{CaCl}_2$ .

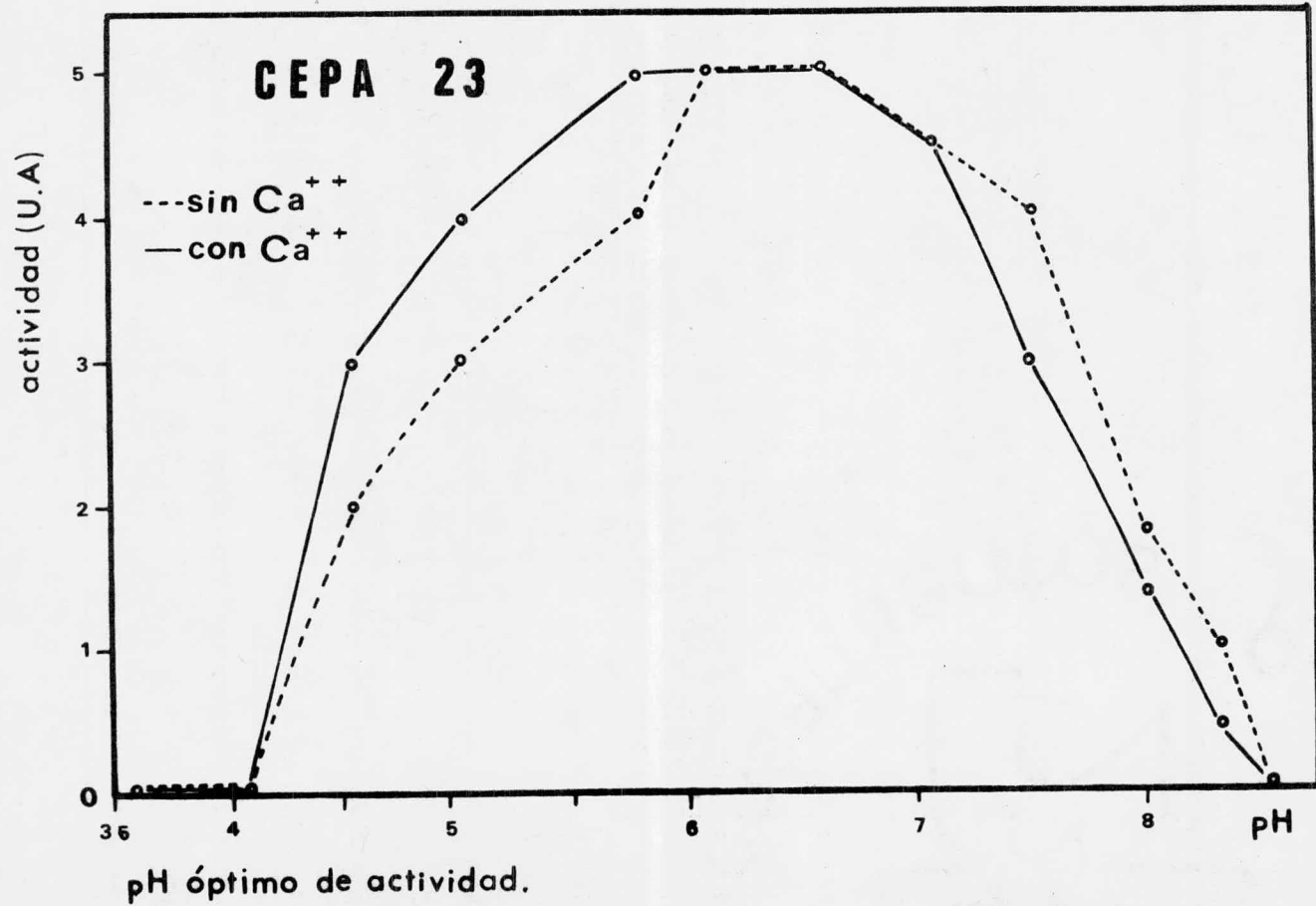
Los resultados obtenidos se expresan en Unidades Arbitrarias en la tabla 15 y gráficas 38 y 39.

Tabla 15. Determinación del pH óptimo de actividad de las amilasas microbianas.

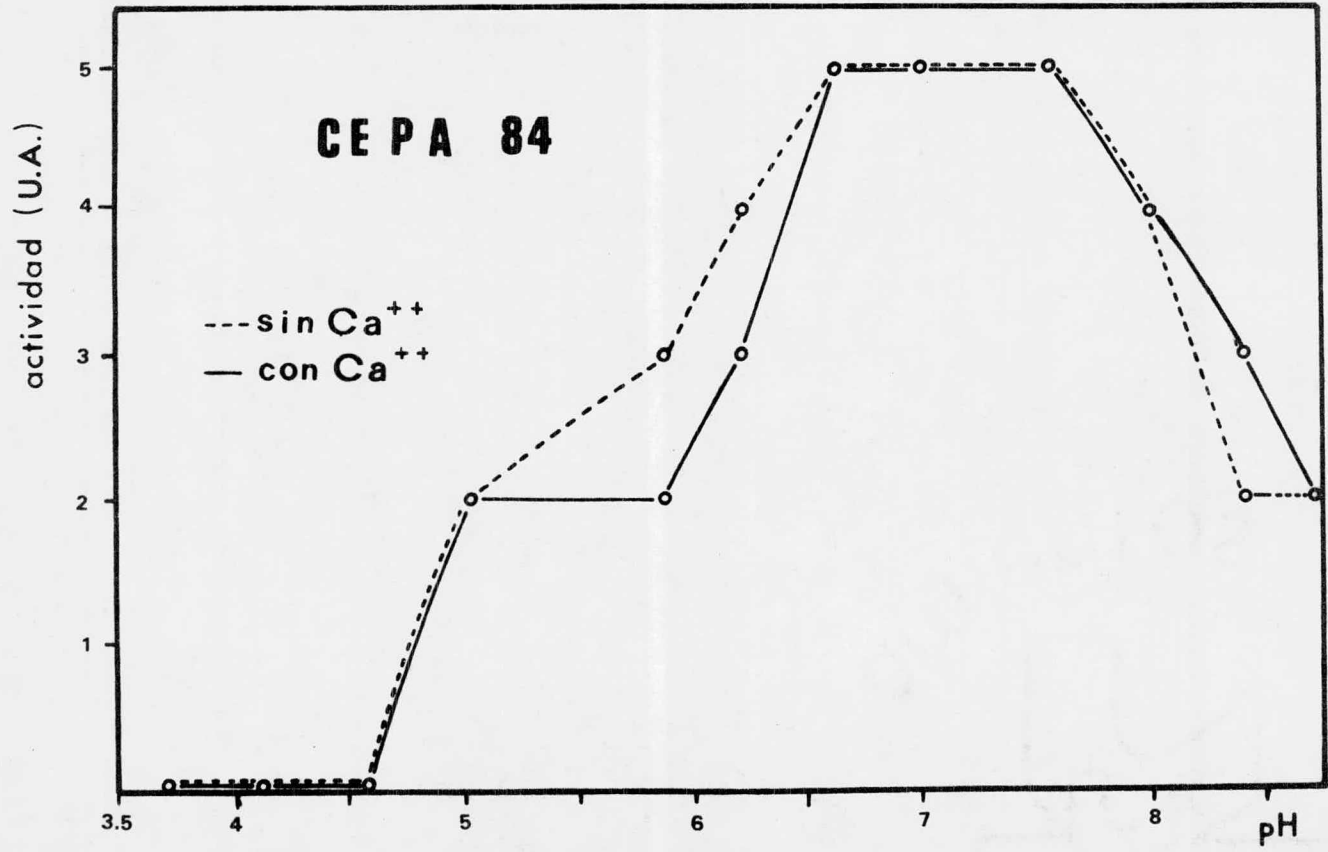
Cepa 23			Cepa 84		
Actividad			Actividad		
pH	Sin $\text{CaCl}_2$	Con $\text{CaCl}_2$	pH	Sin $\text{CaCl}_2$	Con $\text{CaCl}_2$
3.62	0.0	0.0	3.71	0.0	0.0
4.10	0.0	0.0	4.12	0.0	0.0
4.56	2.0	3.0	4.58	0.0	0.0
5.03	3.0	4.0	5.02	2.0	2.0
5.81	4.0	5.0 (20')	5.85	3.0	2.0
6.18	5.0 (25')	5.0 (19')	6.21	4.0	3.0
6.62	5.0 (26')	5.0 (22')	6.65	5.0 (37')	5.0 (32')
7.10	4.5	4.5	7.09	5.0 (37')	5.0 (31')
7.52	4.0	3.0	7.55	5.0 (34')	5.0 (33')
8.03	2.0	1.5	8.08	4.0	4.0
8.35	1.0	0.5	8.40	2.0	3.0
8.55	0.0	0.0	8.72	2.0	2.0

('): minutos.

GRAFICA 38



GRAFICA 39



**CEPA 84**

--- sin Ca<sup>++</sup>  
— con Ca<sup>++</sup>

pH óptimo de actividad.

DETERMINACION DE LA TEMPERATURA OPTIMA DE ACTIVIDAD DE  
AMILASAS MICROBIANAS (Cepas 23 y 84).

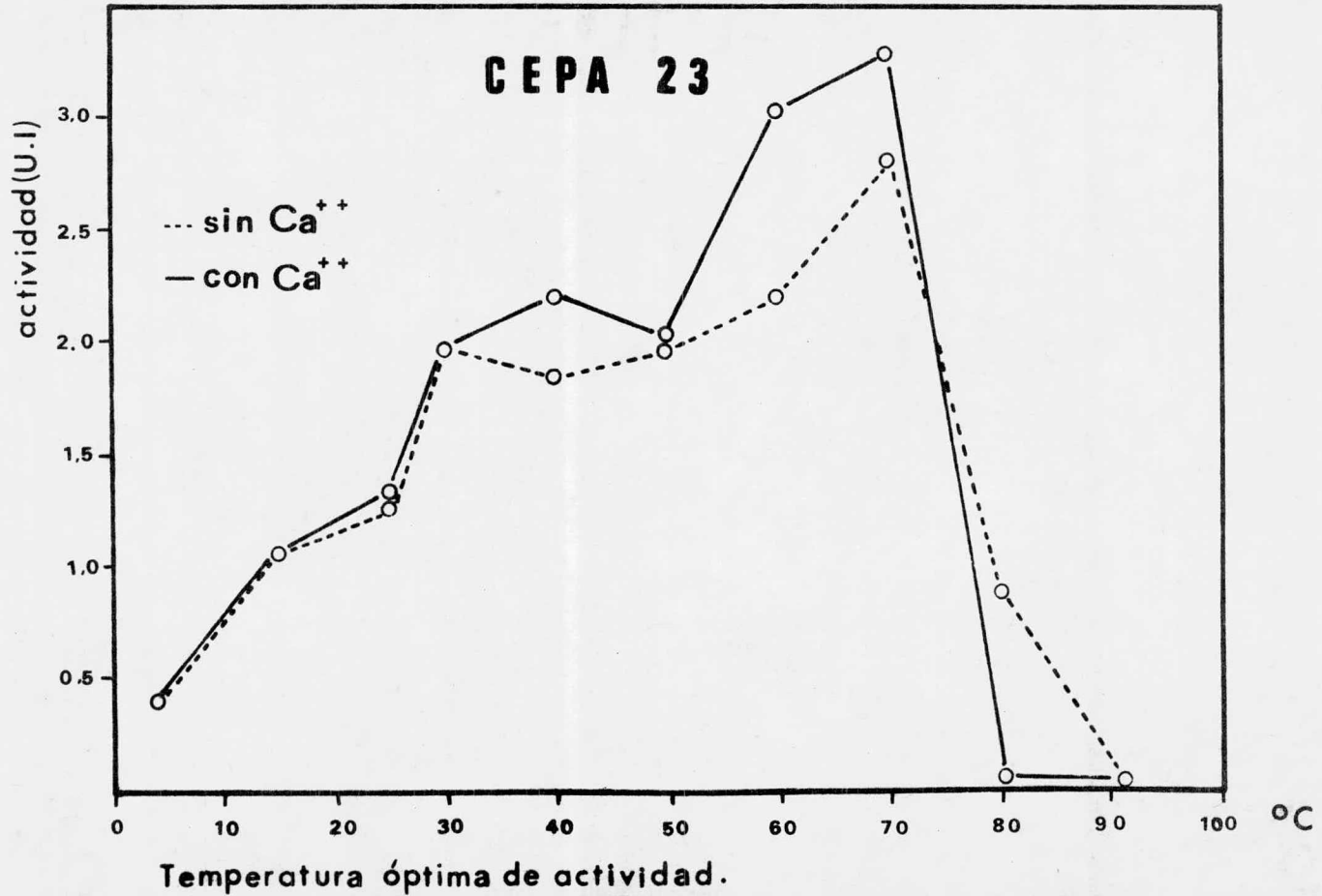
Para la presente determinación se utilizó extracto crudo microbiano, no dializado, frente a una solución de -- almidón al 1%. Los resultados se muestran en la tabla 16 y en las gráficas 40 y 41.

Tabla 16. Determinación de la temperatura óptima de actividad de las amilasas microbianas.

Temperatura °C	Cepa 23		Cepa 84	
	Actividad (U.I.)			
	Sin CaCl <sub>2</sub>	Con CaCl <sub>2</sub>	Sin CaCl <sub>2</sub>	Con CaCl <sub>2</sub>
4	0.40	0.40	0.19	0.19
15	1.04	1.04	0.34	0.39
25	1.28	1.34	1.78	2.08
30	1.96	1.96	1.25	1.25
40	1.85	2.22	1.08	1.08
50	1.96	2.08	1.13	1.25
60	2.22	3.03	1.92	1.92
70	2.80	3.33	*	*
80	0.83	*	*	*
92	*	*	*	*

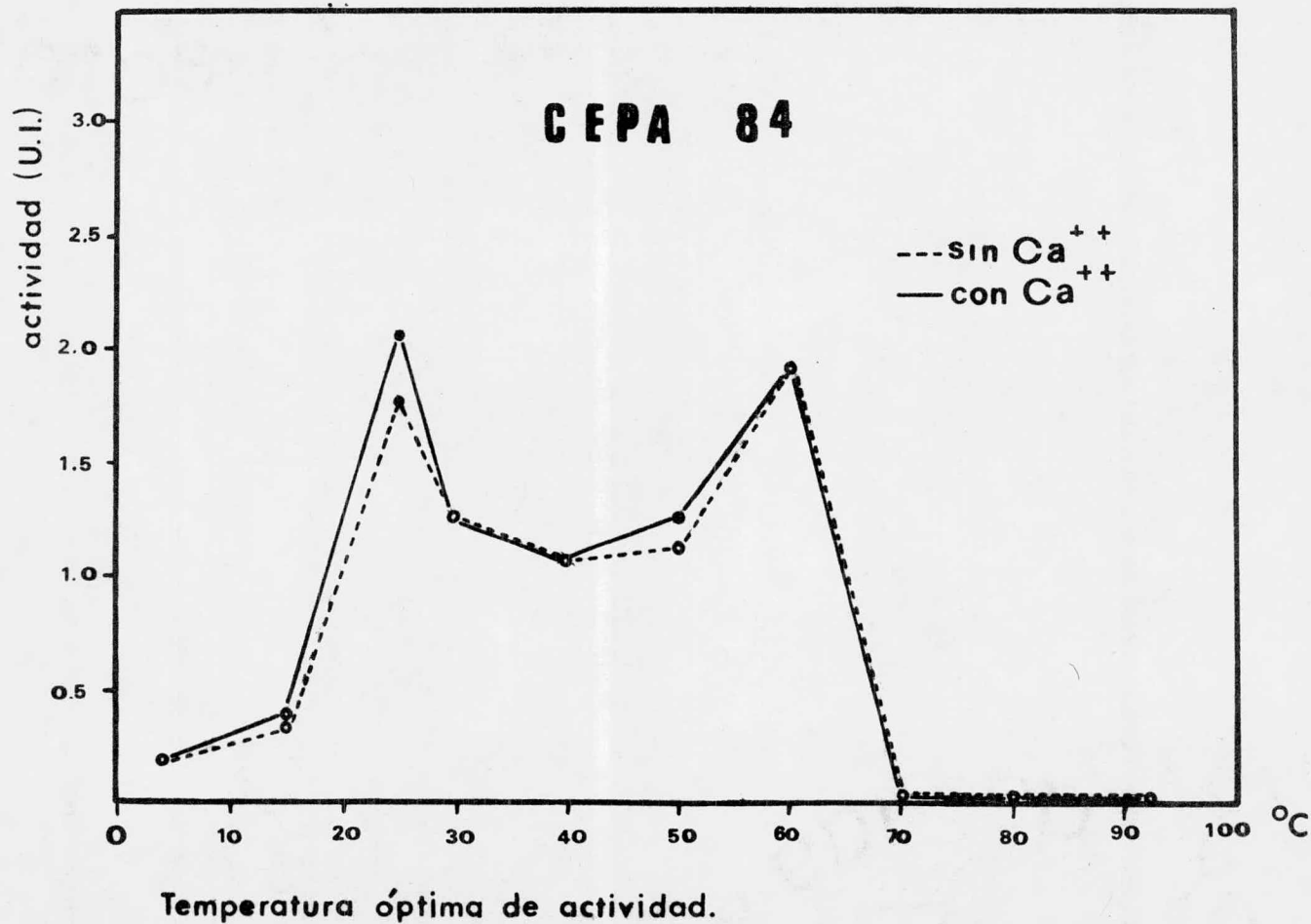
\* Permaneció un color café rojizo hasta las 24 horas, por lo que no se determinó la actividad.

GRAFICA 40





GRAFICA 41



PERDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LAS AMILASAS A SU TEMPERATURA  
OPTIMA DE ACTIVIDAD

Una vez hecha la determinación de la temperatura óptima de actividad de las amilasas (70°C para la cepa 23 y 60°C para la cepa 84), se procedió a determinar la resistencia de ambas enzimas al calentamiento. Las muestras se dializaron para eliminar iones divalentes que pudieran afectar la actividad enzimática. Se adicionaron 11 microlitros de Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF) 0.1M en propanol por cada ml de extracto.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla y en las gráficas 42 y 43.

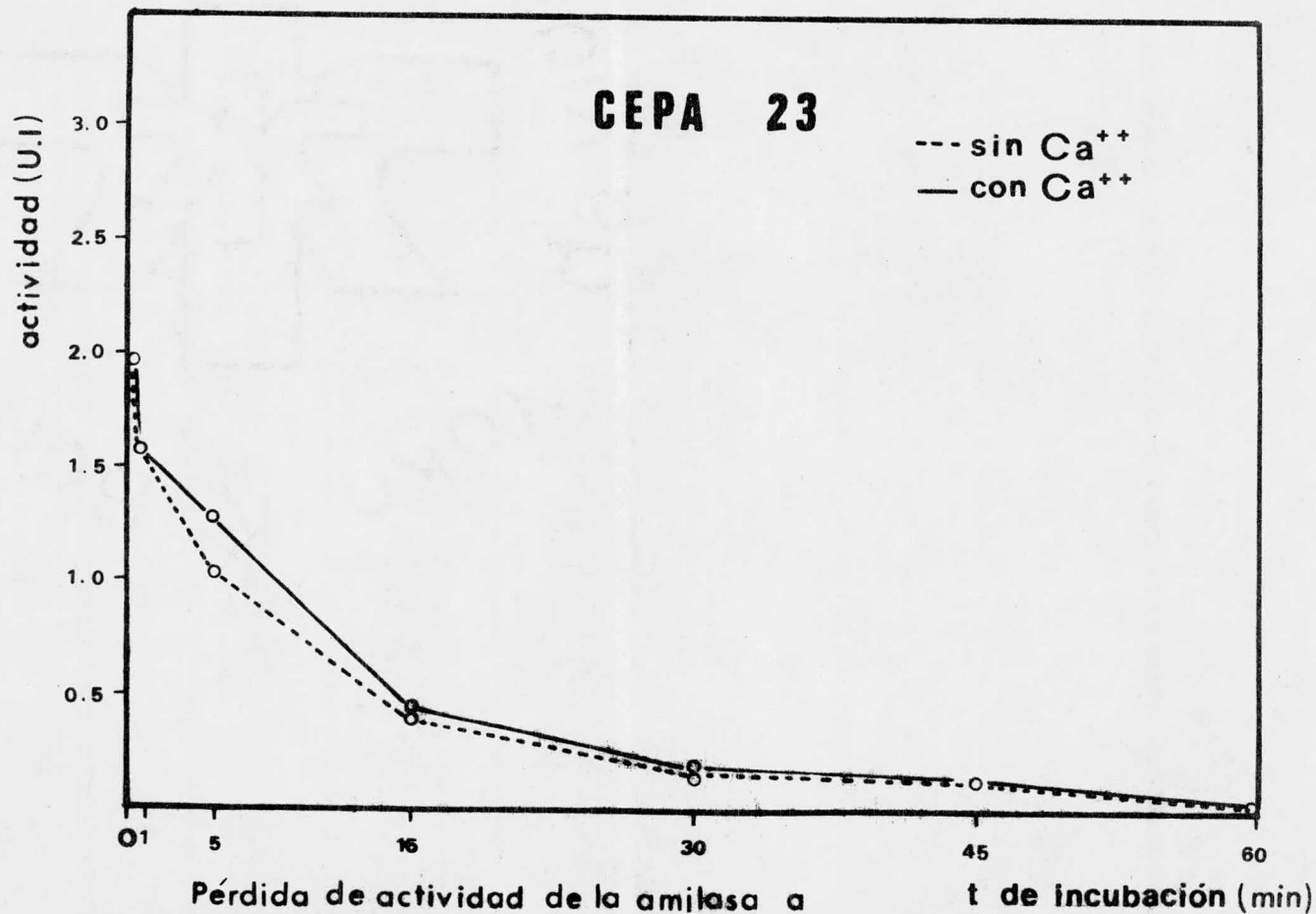
Tabla 17. Pérdida de actividad de las amilasas a su temperatura óptima de actividad.

Tiempo de calentamiento (minutos)	Cepa 23 (70°C)		Cepa 84 (60°C)	
	Actividad (U.I.)			
	Sin CaCl <sub>2</sub>	Con CaCl <sub>2</sub>	Sin CaCl <sub>2</sub>	Con CaCl <sub>2</sub>
0	1.96	1.96	0.83	0.96
1	1.58	1.58	0.27	0.23
5	1.07	1.28	**	**
15	0.40	0.43	**	**
30	0.18	0.19	**	**
45	0.13	0.14	**	**
60	*	*	**	**

\* Permaneció un color café rojizo a las 4 horas de iniciada la reacción por lo que no se determinó la actividad.

\*\* Después de 4 horas aún se presentó coloración azul-negro al agregar Lugol.

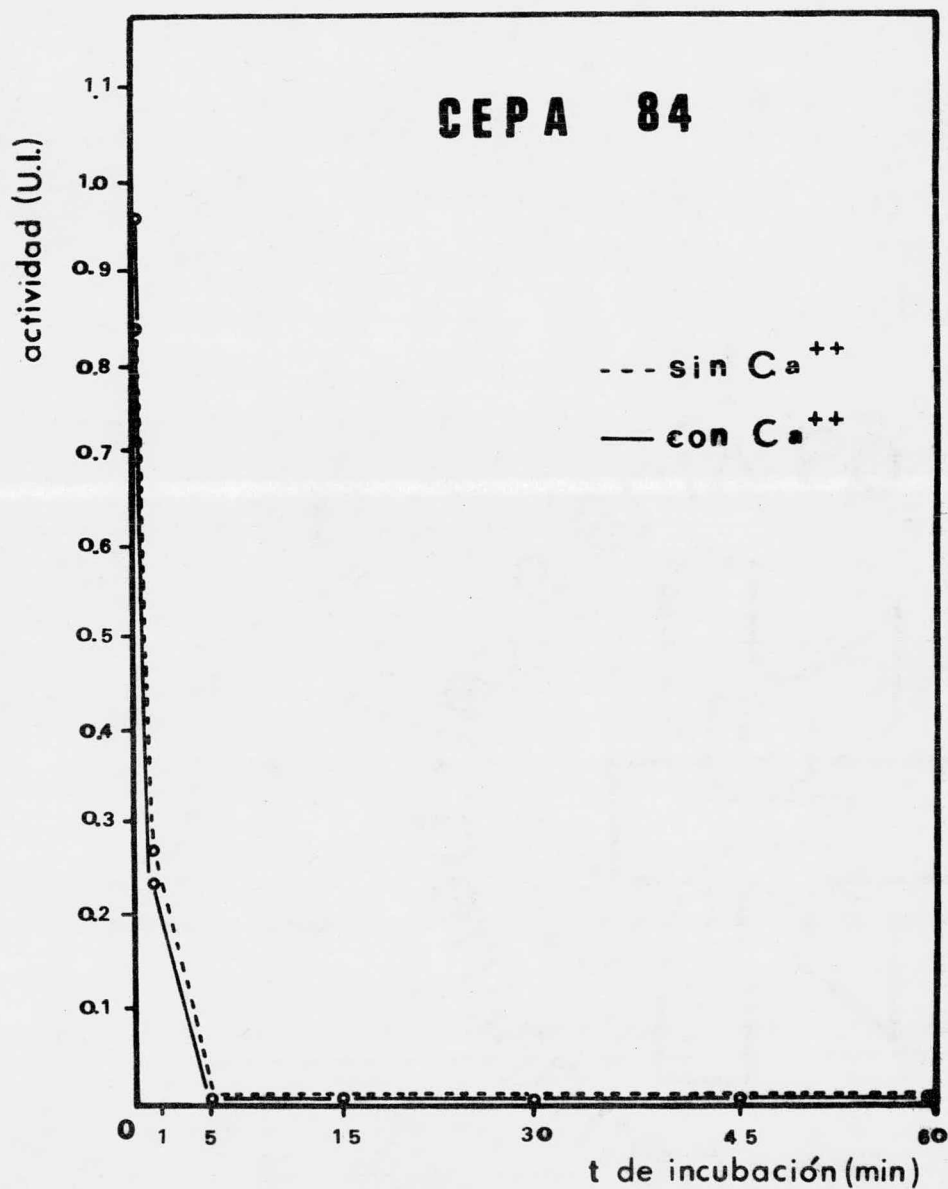
GRAFICA 42



Pérdida de actividad de la amilasa a su Temperatura óptima.

## GRAFICA 43

Pérdida de actividad de la amilasa a  
su Temperatura óptima



INFLUENCIA DEL FENIL METIL SULFONIL FLUORURO (PMSF) EN LA RESISTENCIA A LA INCUBACION DE LAS AMILASAS EN SU TEMPERATURA OPTIMA.

Las muestras usadas para esta determinación no fueron dializadas. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 18 y en las gráficas 44, 45 y 45'.

Tabla 18

Tiempo de calentamiento (minutos)	Actividad (U.I.)			
	Sin PMSF		Con PMSF	
	Sin CaCl <sub>2</sub>	Con CaCl <sub>2</sub>	Sin CaCl <sub>2</sub>	Con CaCl <sub>2</sub>

## Cepa 23

Temperatura óptima de actividad: 70°C

0	1.33	1.50	1.20	1.20
1	0.81	0.81	0.66	0.66
5	0.61	0.61	0.54	0.55
15	0.17	0.17	0.14	0.14
30	0.15	0.15	0.06	0.06
45	0.04	0.04	0.04	0.04
60	0.02	0.02	*	*

## Cepa 84

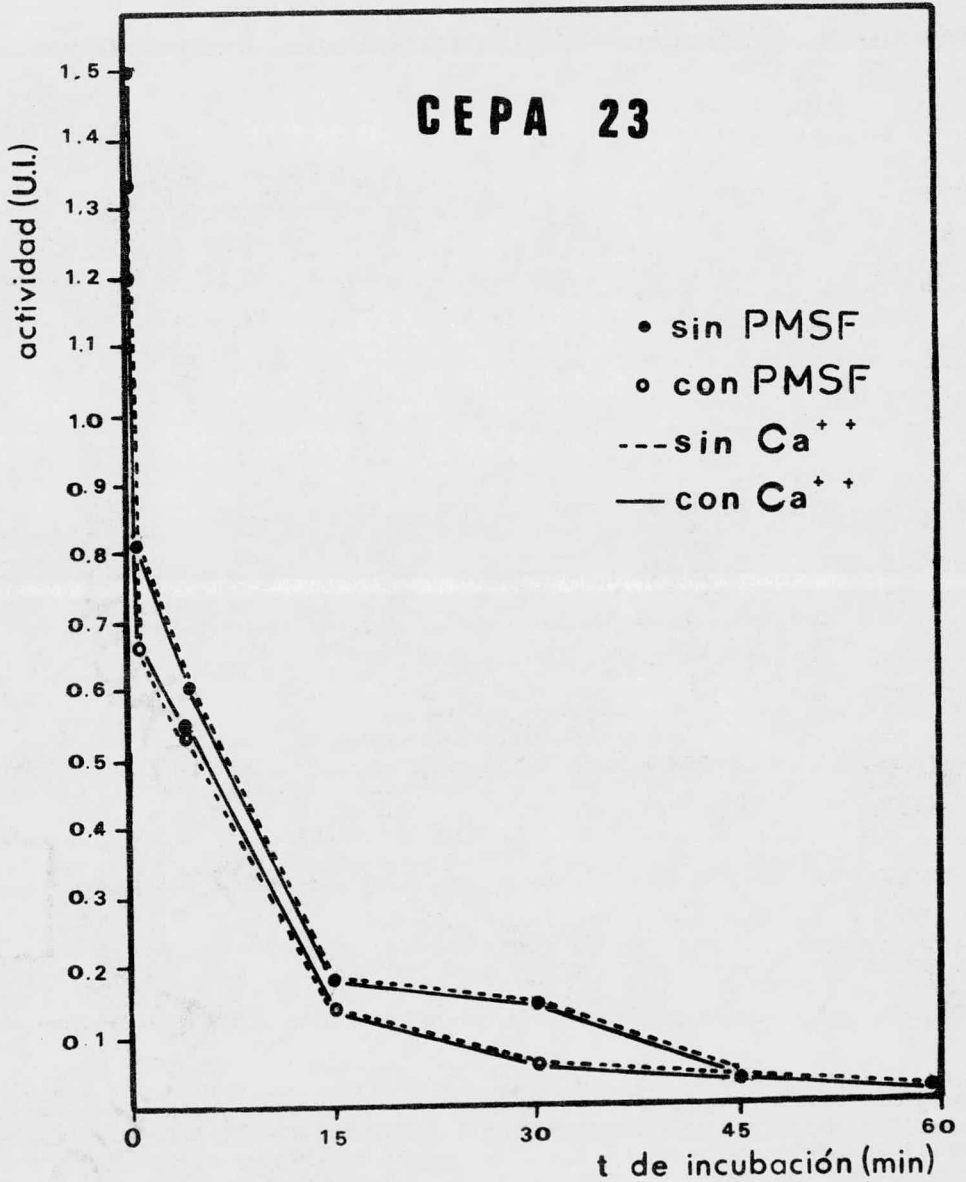
Temperatura óptima de actividad: 60°C

0	0.71	0.83	0.52	0.50
1	0.50	0.50	0.45	0.45
5	*	*	0.47	0.48
15	*	*	*	*
30	*	*	*	*
45	*	*	*	*
60	*	*	*	*

\* Permaneció un color azul-negro al agregar Lugol, hasta las 24 horas, por lo que no se determinó la actividad.

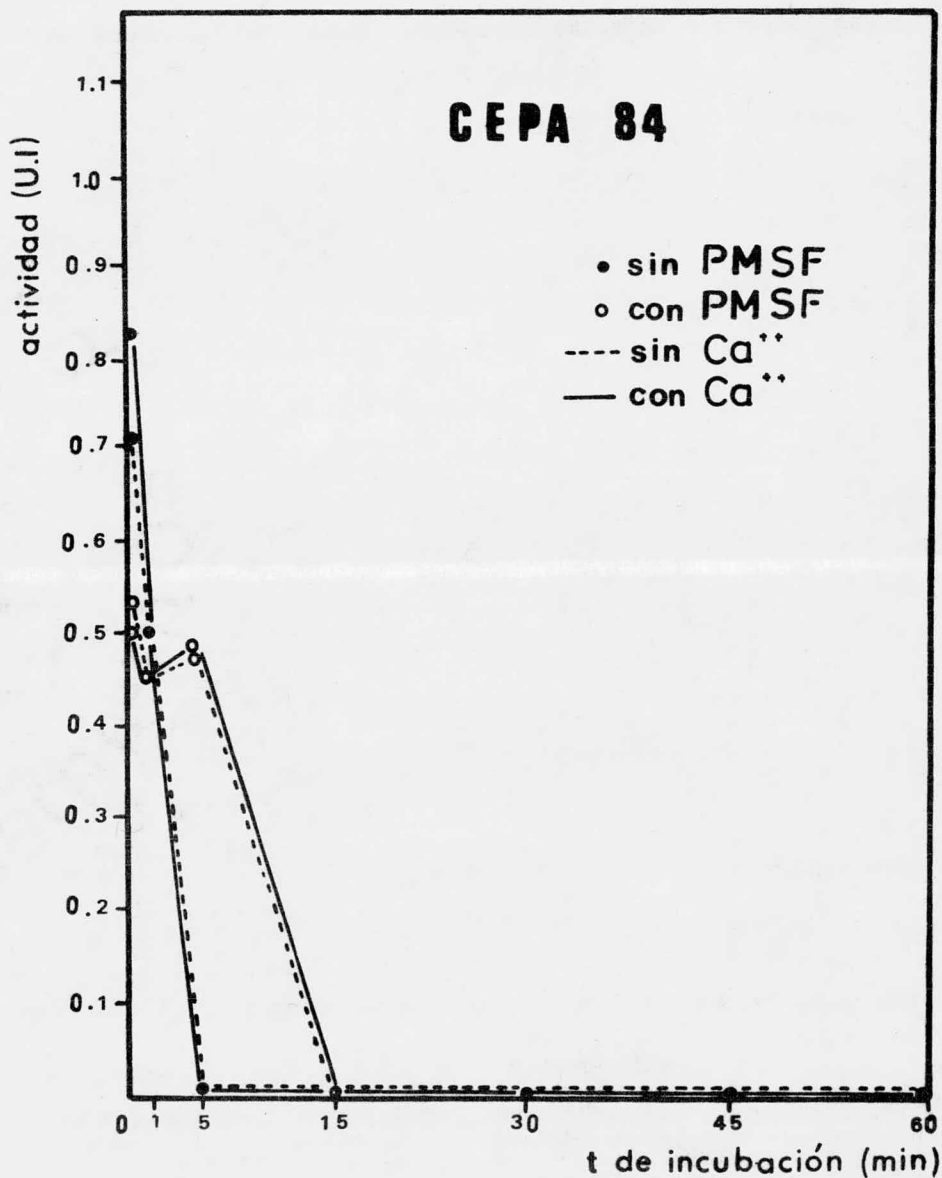
## GRAFICA 44

Influencia del PMSF en la resistencia  
a la Incubación



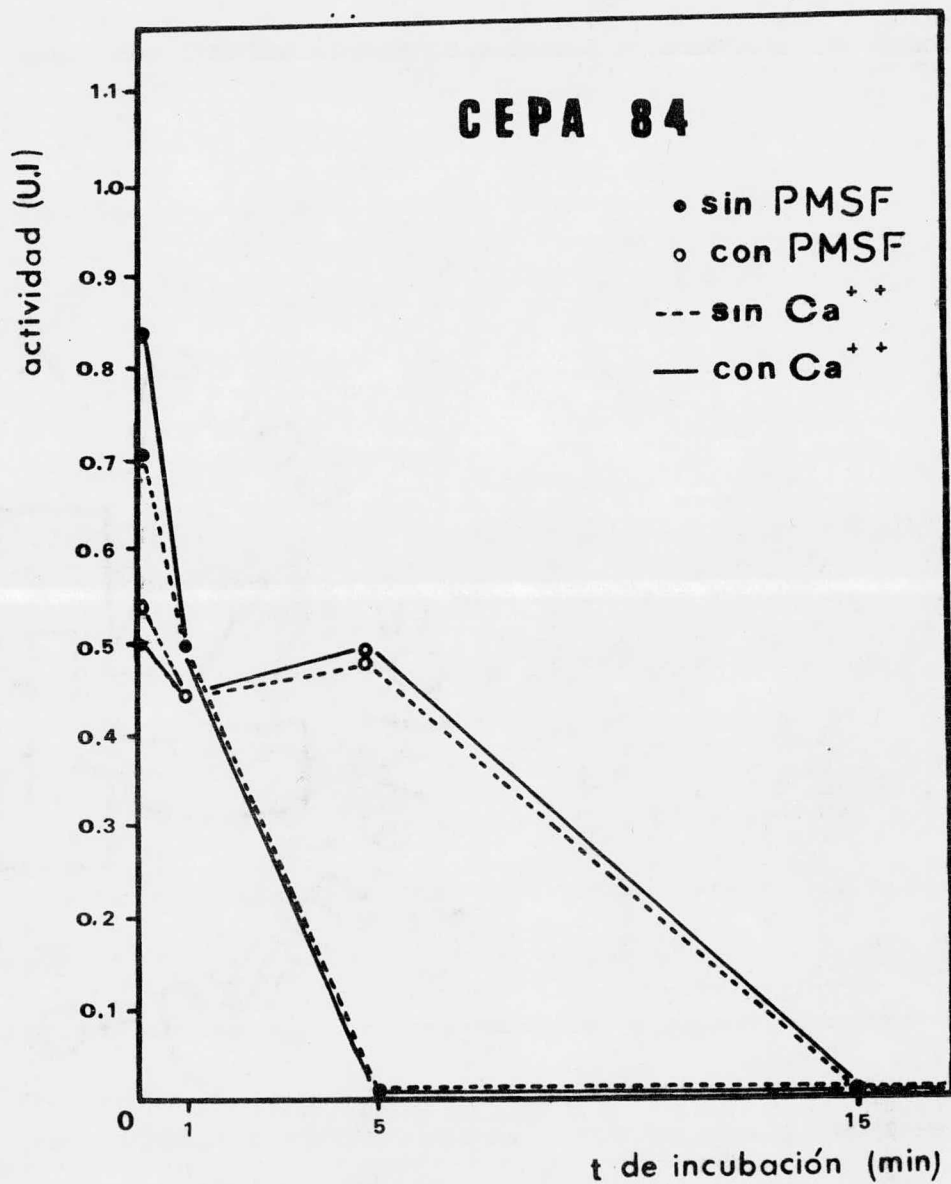
## GRAFICA 45

Influencia del PMSF en la resistencia  
a la Incubación.



## GRAFICA 45'

Influencia del PMSF en la resistencia  
a la Incubación.





## INFLUENCIA DE LA SACAROSA SOBRE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA

La determinación se realizó utilizando muestras dializadas e incubadas a temperatura ambiente. Los resultados se muestran en la tabla 19. Gráfica 46.

Tabla 19

mg de Sacarosa por cada 0.2 ml de extracto	Cepa 23		Cepa 84	
	Actividad (U.I.)			
	Sin CaCl <sub>2</sub>	Con CaCl <sub>2</sub>	Sin CaCl <sub>2</sub>	Con CaCl <sub>2</sub>
0.00	1.11	1.19	0.71	0.83
0.01	1.11	1.19	0.59	0.62
0.02	1.11	1.11	0.59	0.59
0.03	1.11	1.11	0.55	0.55
0.04	*	*	0.27	0.27
0.05	*	*	0.17	0.17
0.06	*	*	0.16	0.16
0.07	*	*	0.15	0.15
0.08	*	*	0.12	0.11
0.09	*	*	0.10	0.09
0.10	*	*	0.08	0.08

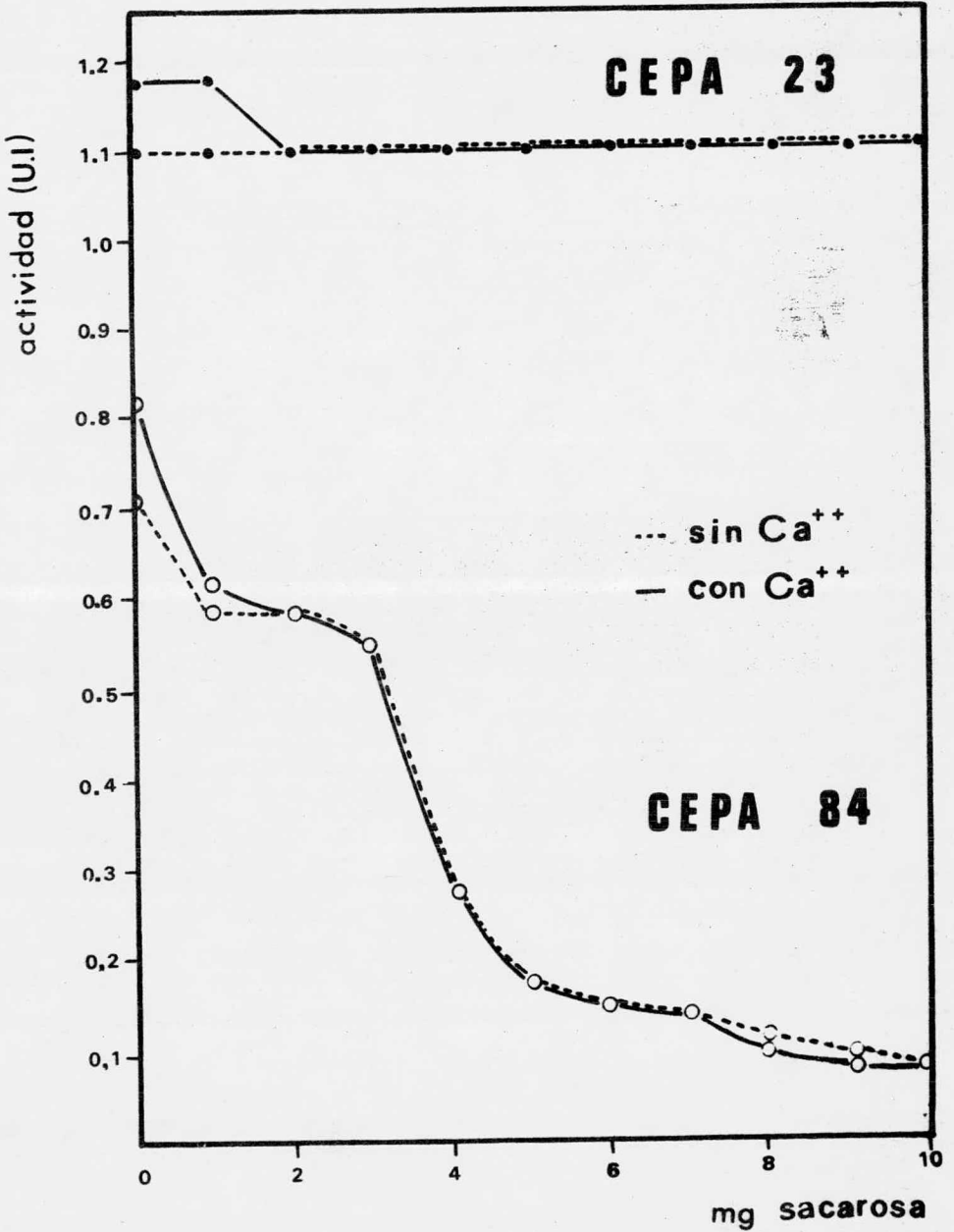
\* El valor (1.11) se repite en las determinaciones subsecuentes.

## INFLUENCIA DE LA MALTOSA SOBRE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA

Para determinar la actividad se usó muestra no dializada y solución de almidón al 0.1%. El tiempo de incuba-

## GRAFICA 46

Influencia de la Sacarosa en la actividad  
amilolítica .



ción para la cepa 23 fué de 3 minutos en ausencia y presencia de  $\text{CaCl}_2$  y de 30 minutos para la cepa 84 sin adición y con  $\text{CaCl}_2$  (Tabla 20, Gráfica 47).

Los resultados expresados en unidades arbitrarias se presentan a continuación:

Cepa 23: En todos los casos se registró un color amarillo (Unidad arbitraria 5.0), tanto sin adición como con  $\text{CaCl}_2$ .

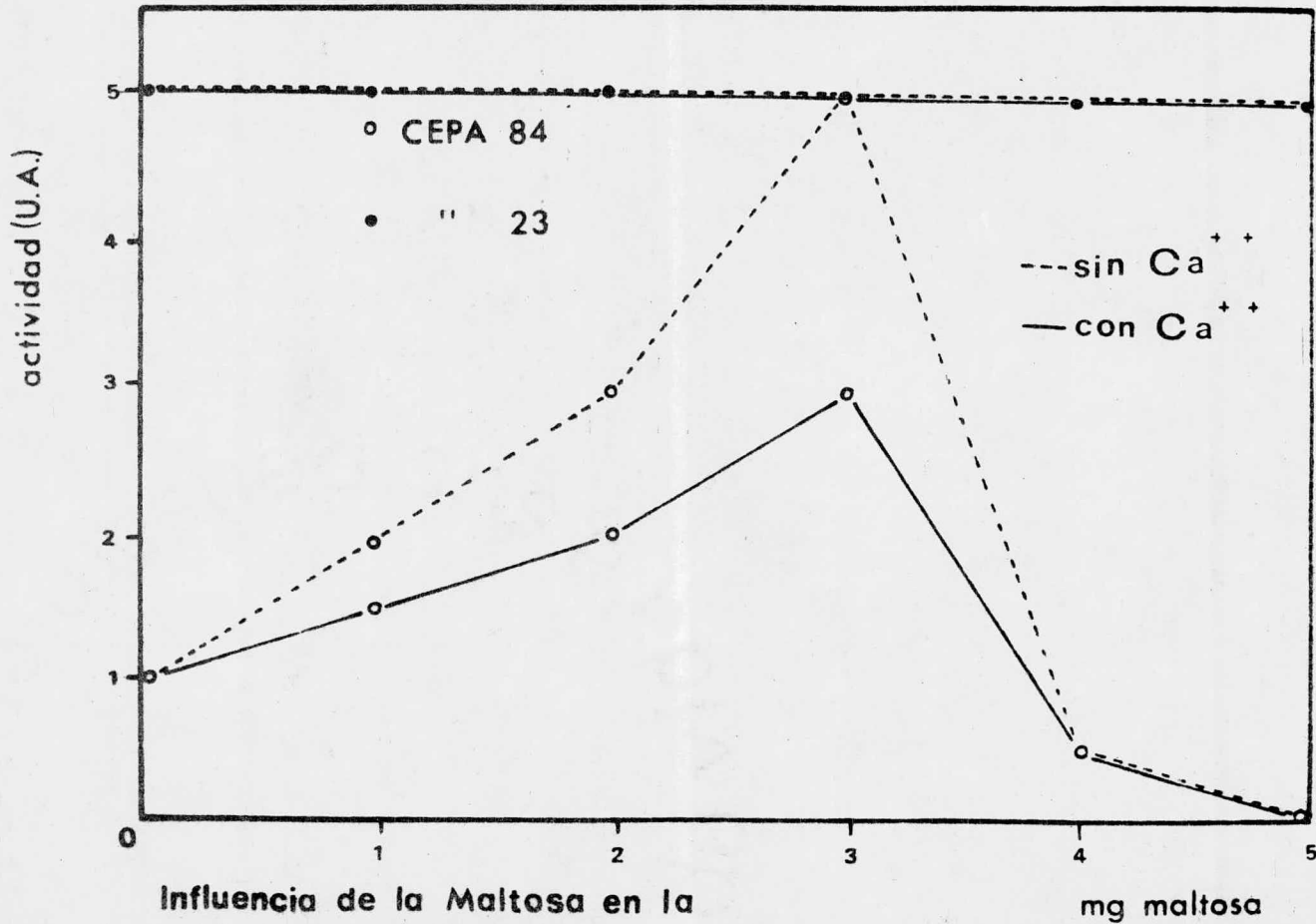
Tabla 20. Influencia de la Maltosa en la actividad de la Amilosa de la Cepa 84. (Gráfica 47).

mg de maltosa por cada 0.2 ml de extracto	A c t i v i d a d (Unidades Arbitrarias)	
	Sin $\text{CaCl}_2$	Con $\text{CaCl}_2$
0.0	1.0	1.0
0.1	2.0	1.5
0.2	3.0	2.0
0.3	5.0	3.0
0.4	0.5	0.5
0.5	0.0	0.0

#### INFLUENCIA DEL FENIL METIL SULFONIL FLUORURO (PMSF) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA AMILASA

La actividad amilolítica de los extractos microbianos de las cepas 23 y 84 es afectada por la presencia de PMSF, siendo mayor el efecto sobre la actividad de la

GRAFICA 47



Influencia de la Maltosa en la actividad amilolítica.

mg maltosa

cepa 84. (Tabla 21).

Los resultados obtenidos son los siguientes:

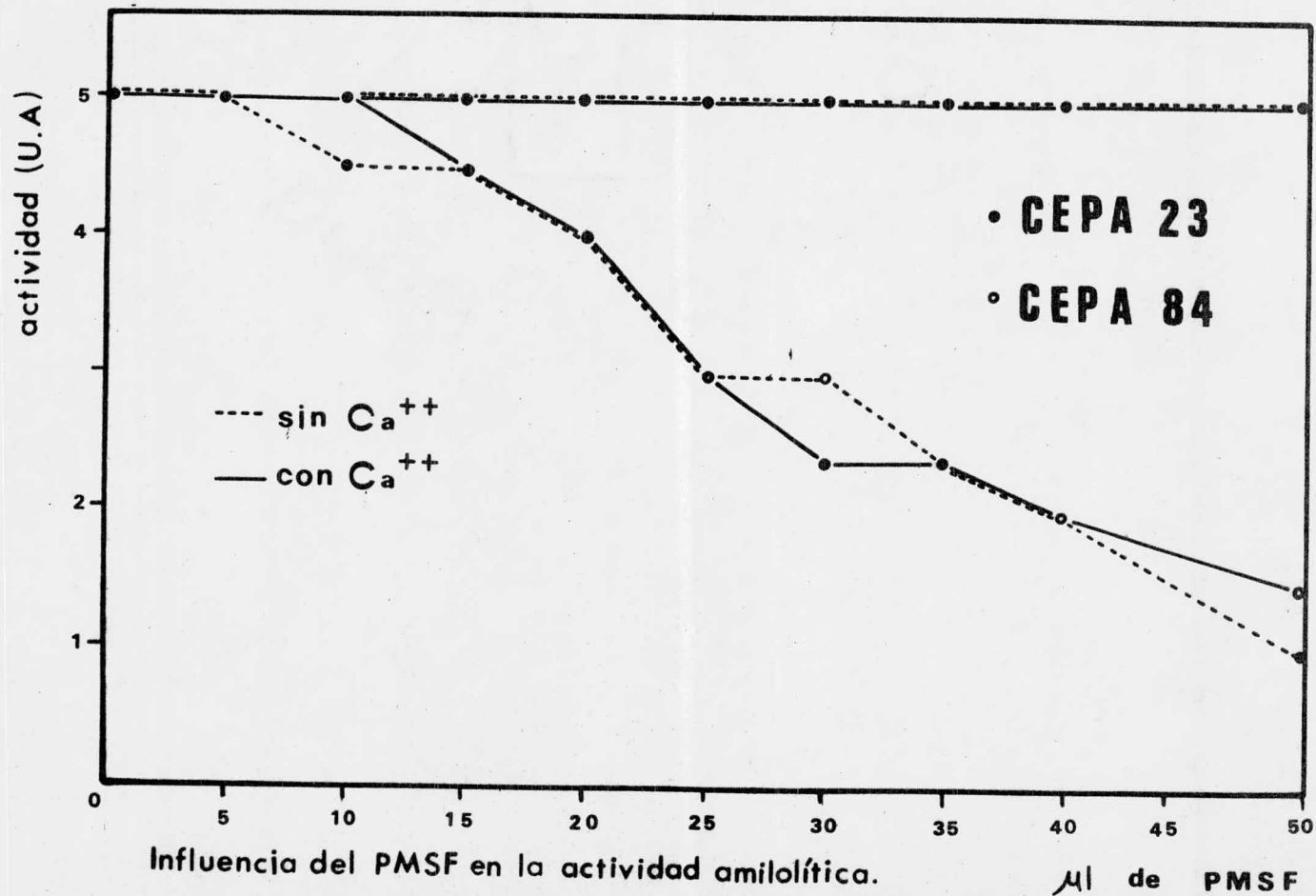
Cepa 23: En todos los tubos de reacción sin y con adición de PMSF y  $\text{CaCl}_2$ , el almidón fué -- hidrolizado en 2 minutos, siendo este mismo da to el tiempo de incubación para que se lleve a cabo la reacción.

Tabla 21. Influencia del PMSF sobre la actividad de la amilasa de la cepa 84. (Gráfica 48).

PMSF/0.2 ml de extracto (microlitros)	Actividad (Unidades Arbitrarias)	
	Sin $\text{CaCl}_2$	Con $\text{CaCl}_2$
0	5.0	5.0
5	5.0	5.0
10	4.5	5.0
15	4.5	4.5
20	4.0	4.0
25	3.0	3.0
30	3.0	2.5
35	2.5	2.5
40	2.0	2.0
50	1.0	1.5

La cepa 84 dió reacción positiva sin PMSF a los 30 minutos con  $\text{CaCl}_2$  y a los 45 sin  $\text{CaCl}_2$ , siendo estos datos los tiempos de incubación para que se lleve a cabo la reacción.

GRAFICA 48



## IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS

Los microorganismos identificados comprenden las 26 cepas a las cuales se les determinó la Influencia de  $Ca^{++}$  en la actividad amilolítica. De estas cepas 8 pertenecen al -- grupo de las bacterias, 2 a actinomicetos y 16 a hongos.

Bacterias.- Las cepas 23, 24, 29, 32, 39, 72 y 73 son bacilos esporulados, mientras que la cepa 66 es un bacilo Gram negativo, no esporulado. Los resultados de las observaciones morfológicas de estos microorganismos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 22. Clasificación Inicial de las cepas bacterianas de acuerdo con sus características morfológicas y de cultivo.

Prueba	C E P A S			
	23, 29	24,32,39,72	73	63
Gram	Variable	+	+	-
Movilidad	+	+	+	+
Tamaño	4.8 x 0.8 $\mu$	4.8 x 0.8 $\mu$	2.4 x 0.8 $\mu$	0.8 x 0.16
Formación de esporas	+	+	+	-
CALDO NUTRI--TIVO				
a. Crecimiento superficial	Nulo	Nulo	Película	Nulo
b. Opacidad	Regular	Regular	Nula	Regular
c. Sedimento	Viscoso	Granular	Granular	Viscoso
d. Cantidad de sedimento	Escaso	Moderado	Abundante	Abundante
AGAR NUTRI--TIVO				
1. Crecimiento	Moderado	Moderado	Abundante	Lento
2. Forma	Rizoide	Irregular	Rizoide	Circular
3. Superficie	Rugosa Húmeda	Opaca	Rugosa	Brillante
4. Elevación	Plana	Plana	Plana	Convexa
5. Borde	Lobulado	Ondulado	Filamentoso	Entero

A continuación se presentan los resultados obtenidos de las reacciones bioquímicas de las cepas bacterianas, así como tablas comparativas para la identificación de Bacillus y Serratia (17, 51).

Tabla 23. Reacciones Bioquímicas de Bacilli.

P R U E B A	A B C D E F G H	C E P A S					
		23	24	29	32	39	72 73
Crecimiento en:							
Agar	+ + + + + + + +	+	+	+	+	+	+
Glucosa Agar	+ + + + + + + +	+	+	+	+	+	+
Glucosa Nitrato Agar	- - - - -	-	-	-	-	-	-
Caldo nutritivo	+ + + + + + + +	+	+	+	+	+	+
NaCl 2%	- - - - -	+	-	+	+	+	+
" 3"	- - - - -	+	-	+	+	+	-
" 4"	- - - - -	+	-	+	+	+	+
" 5"	- + + - + +	-	+	-	+	+	+
" 7"	- + - - -	-	+	-	-	-	+
" 10"	- - - - +	-	+	-	-	-	-
Papa	+ + + - - + V -	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de:							
Almidón	+ + + + + + + +	+	+	+	+	+	+
Gelatina	+ + + + - + + +	+	+	+	+	+	+
Caseína	+ + + + - V † +	+	+	+	+	+	+
Producción de:							
Indol	- - - - -	-	-	-	-	-	-
Ureasa	- - - + - - -	-	-	-	-	-	-
Utiliz. citratos	- - + - - - V	-	-	-	-	-	+
Voges Proskauer	† - + - - - -	-	-	-	-	-	+
Red. NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> a NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- + + + - V V V	+	-	+	-	-	+
Fermentación de:							
Glucosa	+ ⊕ + ⊕ ⊕ +	⊕	+	⊕	+	+	+
Arabinosa	† ⊕ + + +	+	+	+	+	+	+
Xilosa	† ⊕ + + +	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a:							
40°C	+ + + + +	+	+	+	+	+	+
45°C	+ + + - + +	+	+	+	+	+	+
50°C	+ + + - + + +	+	+	+	+	+	+
70°C	- - - - V	-	-	-	-	-	-



A). Bacillus coagulans, B). Bacillus macerans, C). B. lich-  
niformis, D). B. firmus, E). B. lentus, F). B. stearothermo-  
philus, G). B. circulans, H). B. pantothenicus.

Tabla 24. Reacciones Bioquímicas de Serratia y -  
 cepa 66.

P r u e b a	<u>Serratia</u>	Cepa 66
Producción de:		
Indol	-	-
Ureasa	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-
Prueba del Rojo de Metilo	+	+
Voges Proskauer	-	-
Utiliz. Citratos	+	+
Hidrólisis de:		
Almidón	+	+
Caseína	+	+
Gelatina	+	+
Fermentación de:		
Glucosa	⊕	⊕
Lactosa	+	+
Sacarosa	+	+
Inositol	d*	-
Rafinosa	-	-
Ramnosa	-	-
Arabinosa	-	-
Manitol	+	+
Dulcitol	-	-

\* Reacción débil.

Actinomicetos.- Las cepas 20 y 84 pertenecen a este grupo. Los resultados de sus características morfológicas y reacciones bioquímicas se indican en la Tabla 25.

Algunas características diferenciales de Actinomicetos se presentan a continuación:

Tabla 25. Características Morfológicas y Bioquímicas de las cepas 20 y 84.

Características	C e p a	
	20	84
Morfología	Esporas en cadena	Esporas en cadena
Color del micelio aéreo (color de la colonia)	Gris	Amarillo
Color del micelio vegetativo (reverso de la colonia)	Gris oscuro	Verde
Color en el medio	-	Amarillo
Catalasa	+	+
Hidrólisis de:		
Almidón	+	+
Caseína	+	+
Gelatina	-	+
Red. $\text{NO}_3^-$ a $\text{NO}_2^-$	+	+
Crecimiento en:		
Asparragina Agar	+	+
60°C	-	-

Hongos.- Los hongos aislados no se identificaron, solo se realizó la observación microscópica de la morfología de sus estructuras reproductivas.

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE ACTINOMICETOS (9, 17, 51).

- Nocardia: Aerobio obligado.  
 Colonias parecidas a bacterias: lisas, compactas o de consistencia suave.  
 El micelio vegetativo se fragmenta en artrosporas.  
 No produce conidias.  
 Algunas especies son ácido-resistentes.  
 Patógeno para hombre y animales.  
 No hidroliza la caseína.
- Actinomyces: Anaerobio o microaerofílico.  
 El micelio vegetativo se fragmenta en artrosporas. No produce conidias.  
 No ácido-resistente.  
 Parásito en hombre y animales.  
 No proteolítico y no diastásico.
- Streptomyces: Aerobio.  
 El micelio vegetativo no se fragmenta en artrosporas. Produce conidias -- cuyas cadenas nacen de la hifa aérea.  
 Generalmente saprofiticos.  
 Hidroliza caseína.
- Micromonospora: Aerobio.  
 Micelio no septado. Produce conidias terminales y únicas sobre conidióforos cortos.  
 No crecen entre 50 y 65°C.  
 No ácido resistente.  
 Proteolítico y diastásico.
- Thermoactinomyces: Aerobio.  
 En algunos aspectos es similar a Micromonospora especialmente en su capacidad para producir una sola conidia en hifas terminales.  
 Crece entre 50 y 60°C.

## V. D I S C U S I O N

Durante el curso de este estudio se lograron aislar 211 cepas microbianas productoras de amilasas de diferentes fuentes: suelos, aguas negras y diversos materiales en descomposición. Como era de esperarse, de todos los -- microorganismos que se aislaron en los diferentes medios -- de cultivo, los que mayor poder hidrolizante mostraron fue ron los procedentes de muestras con alto contenido de almi dón (elote enmohecido, cultivos de papa, maíz, frijo, etc.).

Se seleccionaron 73 cepas cuyo poder amilolítico en agar-almidón varió de 2 a 10 mm al ser revelado con so lución de yodo en agua.

La influencia del pH en la actividad amilolítica de estas <sup>B. subtil</sup> cepas es variable, observándose que para la mayo ría de las bacterias, existen valores de pH de 6 y 8 de -- máxima actividad, aunque en algunos casos es 7; mientras -- que para los hongos los valores óptimos de pH son 5, 6, 7 y 8. Por los resultados obtenidos, bajo las condiciones - establecidas, se observa que de los microorganismos estu diados, las bacterias presentan una actividad amilolítica mayor (expresada en mm de hidrólisis).

Después de determinar el pH óptimo para la produc ción de amilasa por las cepas microbianas, se procedió a - analizar la actividad de la enzima liberada al medio de --

cultivo, mediante la disminución de la viscosidad de una pasta de almidón. La actividad enzimática (tiempo de licuefacción del gel de almidón) de las amilasas difiere de una cepa a otra, pues se observó que algunos extractos -- hidrolizan rápidamente al almidón: 1 a 5 minutos mientras que otros lo hacen lentamente: 60 a más de 120 minutos.

Las cepas microbianas más prometedoras fueron seleccionadas de acuerdo con:

- {
- Halo de hidrólisis de agar-almidón (grande) en su pH óptimo.
  - Tiempo de licuefacción del gel de almidón (corto), debido a la exoamilasa.
  - Combinación de los dos parámetros anteriores.

De acuerdo con estos criterios se redujo el número de cepas a 26.

{ Como se sabe, el ion calcio es un factor de activación y estabilidad para las amilasas por lo que se estudió su efecto en la producción y actividad de la enzima, observándose claramente que la concentración de este ion influye en forma distinta para cada microorganismo.

{ -Las bacterias generalmente requieren de 0.01 a 0.08% de iones calcio, notándose que a mayores concentraciones muchas de las cepas pierden actividad. Únicamente una cepa presenta su máxima actividad cuando no se adicionan iones calcio al medio de cultivo.

-Los hongos se ven poco afectados por la presencia de iones calcio, pues una vez alcanzada su máxima actividad a cierta concentración (0.01 a 0.05%), se mantiene constante aún a mayores concentraciones. Existen algunas excepciones en las que parece no influir el ion calcio. -- Dos cepas muestran dos máximos lo cual pudiera deberse a dos enzimas que difieren en la concentración de iones calcio necesaria para su actividad.

En lo referente a la sonicación de las cepas estudiadas y de acuerdo con los resultados, se encontró que no es necesario agregar ningún abrasivo para liberar la amilasa, puesto que no se observó una variación notable en la actividad. Lo mismo sucedió con cultivos agitados y estáticos, por lo que esta última condición se estableció para los siguientes experimentos.

Con el objeto de verificar el mecanismo de hidrólisis del almidón, además de los métodos mencionados anteriormente, también se estudio la amilolisis analizando la formación de azúcares reductores, valorando la cantidad de maltosa formada. De acuerdo con los experimentos iniciales, que sirvieron de guía para la cuantificación de una cantidad apreciable de maltosa (20 minutos), se efectuaron incubaciones a los 30 y 60 minutos. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente y a 28°C, y al observar que no había variación con el cambio de temperatura, las demás determinaciones se continuaron a temperatura ---

ambiente.

Los resultados de la extracción de la endoamilasa por medio del sonicado, indican que en general un tratamiento de 30 a 60 minutos aumenta la concentración de la enzima sin pérdida de actividad, valorando ésta por la formación de azúcares reductores. Solo en un caso la sonicación mostró efecto negativo quizá debido a una acción desnaturalizante sobre la enzima.

Al establecer una comparación entre las amilasas microbianas que nos ocupan y la amilasa de malta, se nota inmediatamente una superioridad de las amilasas microbianas, ya que la amilasa de malta pierde actividad al ser incubada a temperatura ambiente entre 60 y 90 minutos, mientras que las amilasas microbianas siguen activas después de este tiempo. Además se observó que la amilasa de malta es fácilmente inhibida por exceso de sustrato.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las -- pruebas realizadas anteriormente, se seleccionaron solo las cepas 23 y 84 ya que presentaron mejor actividad amilolítica, para proseguir con el estudio, procurando profundizar en los aspectos de purificación de la enzima y su comportamiento bioquímico.

Con el objeto de purificar las enzimas de las dos cepas, se ensayó la precipitación con sulfato de amonio a diferentes concentraciones, a una temperatura de 0°C, no -

lográndose la floculación de la enzima ni con un 90% de saturación. Los resultados negativos de la precipitación con sulfato de amonio, sugirieron la idea de la existencia de una enzima de bajo peso molecular, por lo cual se determinó primero la cantidad de proteínas presentes correlacionando este dato con la actividad amilolítica e investigando la composición proteínica de los extractos por desplazamiento electroforético en gel de acrilamida sin y con adición de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) para poder determinar con cierta aproximación el peso molecular de ambas amilasas. La ubicación de las enzimas se estudió por medio de zimogramas sobre placas de agar-almidón, encontrándose ciertas dificultades ya que en algunos casos el gel produjo reacciones falsas positivas.

Con el fin de conocer el rango de tamaño molecular en el cual se encuentran las enzimas obtenidas, se efectuó la ultrafiltración molecular en el sistema Amicón. Con este procedimiento se concentraron las muestras al reducir su volumen y se efectuó nuevamente la precipitación con sulfato de amonio (75% de saturación), que ahora sí tuvo éxito. La fracción mayor de 30,000 nm (retenida por la membrana) mostró la mejor actividad amilolítica y fue filtrada a través de una columna de Biogel P-100 para verificar su grado de pureza y tener una idea aproximada de su peso molecular. En el caso de la cepa 84 el perfil proteico indica la presencia de muchas moléculas, algunas



de las cuales muestran actividad amilolítica, lo cual indica la presencia de varias amilasas o quizá formas poliméricas de una misma. Con la cepa 23 también se encontró una variedad de proteínas, pero la actividad se localizó en una sola de ellas.

Posteriormente se estudiaron los siguientes efectos:

Sonicación: afecta a la cepa 84 y no muestra ningún efecto sobre la cepa 23.

pH óptimo de actividad: para ambas enzimas muestra ciertas diferencias sobre todo si se considera la adición de iones calcio. Con la cepa 84 el óptimo de actividad va de 6.65 a 7.55 sin y con adición de iones calcio. En la cepa 23 el óptimo de pH queda restringido a los valores entre 6.18 y 6.62 sin iones calcio y se amplía a un rango mayor de 5.81 a 6.62 al adicionar  $\text{CaCl}_2$ .

Temperatura: mostró un efecto activador y es notable la observación de que la cepa 23 tiene su óptimo a 70°C y aún la cepa 84 tuvo un óptimo a 60°C. La amilasa de la cepa 23 indica una tremenda posibilidad industrial por su termoestabilidad; en el caso de la cepa 84 se presentan dos óptimos, uno a 25°C y otro a 60°C, lo cual también es una ventaja para su aplicación. Con esta idea en mente se determinó la resistencia de estas enzimas al calentamiento, observándose que la enzima bacteriana (cepa 23)

resistió una incubación de 45 minutos a 70°C, aunque tuvo una disminución en su actividad amilolítica. Por otra -- parte la enzima del actinomiceto (cepa 84), resultó inactivada al cabo de un minuto de incubación a su temperatura óptima de actividad (60°C). Este resultado podría deberse a que los actinomicetos siendo conocidos productores de -- proteasas, estas podían activarse a altas temperaturas y -- romper a la enzima; por este motivo se decidió investigar este posible efecto utilizando Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF) conocido inhibidor de proteasas. Los resultados mostraron que en el caso de la cepa 23 no hay diferencia -- con la adición de PMSF, o sea que no hay ninguna inactivación de las amilasas por proteólisis. En la cepa 84 aunque el PMSF afecta ligeramente a la amilasa al fin del experimento, se nota que la enzima mantiene su actividad por más tiempo, de lo cual se puede deducir que el inhibidor -- de proteasas sí protege a la amilasa.

Se investigó también la influencia de la presencia de disacáridos, tales como maltosa (que por ser producto final de la acción de ciertas amilasas podría afectar -- la actividad enzimática) y sacarosa. Estos disacáridos -- solo muestran cierta inhibición sobre la amilasa de la cepa 84 sin observarse ningún efecto en la cepa 23, que resiste la presencia de estos azúcares.

Finalmente, la cepa 23 varía poco en actividad --

con la adición de iones calcio, los cuales sí modifican la actividad de la cepa 84.

Con el objeto de conocer la posición de los microorganismos en estudio, se procedió a efectuar la investigación morfológica micro y macroscópica así como las pruebas bioquímicas correspondientes, (de 26 cepas) con fines taxonómicos, encontrándose que las cepas bacterianas aisladas pertenecen a las siguientes especies:

Cepas:	23, 29	:	<u>Bacillus macerans</u>
"	32, 39, 72:		<u>B. coagulans</u>
"	73	:	<u>B. licheniformis</u>
"	66	:	<u>Serratia sp.</u>

La cepa 24 probablemente pertenece a alguna variedad de B. coagulans, ya que prácticamente coincide con las características de esta especie, aunque muestra algunas diferencias.

En lo que corresponde a actinomicetos (cepas 20 y 84) podemos suponer que pertenecen al género Streptomyces, aunque por la complejidad de su taxonomía no se trató de investigar la especie correspondiente.

De las cepas de hongos estudiadas prácticamente todos corresponden al género Penicillium, aunque se aislaron también hongos de los géneros Aspergillus y Fusarium, pero por su poca actividad amilolítica no se continuó su estudio.

De toda la información obtenida con los estudios efectuados, llegamos a la conclusión de que se ha logrado el aislamiento de varias cepas microbianas productoras de amilasas activas que actuando a valores de pH ligeramente ácidos, resisten temperaturas elevadas y sugieren su utilización con fines industriales, posiblemente en la saccharificación de granos amiláceos para la industria de fermentaciones, especialmente en la fabricación de cerveza o de bebidas alcohólicas de destilación (vodka, ginebra, -- whisky, etc.).

## VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se presenta un estudio del aislamiento de cepas amilolíticas, de donde, de 211 microorganismos aislados, se seleccionaron 73 y se estudiaron más profundamente 2, que fueron clasificadas dentro de los géneros Bacillus y Streptomyces y que mostraron mayor actividad amilolítica.

Se efectuó con poco éxito el empleo de ultrasonido para la liberación de la amilasa intracelular.

Las amilasas microbianas estudiadas resultaron más estables que la amilasa de malta, comparándolas a -- temperatura ambiente; además mientras que la de malta se inactiva a 50°C, el óptimo de las amilasas microbianas - se encuentra entre 60 y 70°C.

Se hicieron diversos estudios de las amilasas - incluyendo el efecto de iones calcio, pH y temperatura - óptimos, así como la purificación con sulfato de amonio.

Por determinación de peso molecular, se concluye que las amilasas estudiadas tienen un peso molecular mayor de 30,000; observándose que la amilasa de Streptomyces parece ser un agregado de monómeros.

Se encontró que la cepa 84 (Streptomyces), produce una mezcla de enzimas entre las cuales existen pro-

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Abney, E.R. (1977). Comunicación personal. Laboratorio de Biología Experimental Facultad de Medicina. UNAM. (México).
2. Aizawa, M.; Kenryo, N. and Schuichi, S. (1977). Photo control of enzyme activity of  $\alpha$ -amylase. Arch. Biochem. and Biophys. 180: 41-48.
3. Allam, A.M.; Elzainu, T.; Khalil, N. (1973). Studies on the formation of alpha amylase by Aspergillus niger. Microbiología Española 26 (4): 189-196.
4. Andejczuk, H. (1966). Application of Cu ions for the determination of  $\alpha$ -amylase in the presence of  $\beta$ -amylase. Bull. Acad. Pol. Sci. Biol. 17 (8): 471-473.
5. Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos. (1975). Secretaría de Industria y Comercio.
6. Arai, M. (1969). Acid-stable  $\alpha$ -amylase from black Aspergilli. VI. Carbohydrate and metal content. Agr. Biol. Chem. 33 (6): 922-928.
7. Barton, L.L.; Geogi, C.E. and Lineback, D. (1972). Effect. of the maltose on glucoamylase formation by Aspergillus niger. J. Bacteriol. 111 (3): 771-777.
8. Barton, L.L. (1969). The influence of nitrogen and carbon sources on the production of glucoamylase by Aspergilli. J. Gen. Appl. Microbiol. 15 (3): 327-344.
9. Bailey, R.; Scott, E. (1970). Diagnostic Microbiology. 3a. Ed. The C.V. Mosby Co. Saint Louis (USA).
10. Bendetskii, K.K., Yavorenko, V.L., Korchagina, G. (1975). Amyolytic enzymes from Aspergillus batatae. Biokhimiya, 39 (5): 968-974.
11. Bendoya, O. (1964). Production and characteristics of a bacterial amyolytic preparation. SB. VYS. SK. Chem. Technol. Praze Potravini Technol 8 (3): 51-60.

12. Benner, K., and Myrbäck, K. (1952). Inactivation of saccharase and salivary amylase by 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. *Arkiv. För Kemi* 4 (2): 7-9.
13. Bliesmer, B. and Hartman, P. (1973). Differential heat stabilities of Bacillus amylases. *J. Bacteriol.* 113 (1): 526-528.
14. Boyer, E. (1971). Extracellular transglucosidase and  $\alpha$ -amylase of Streptococcus sp. *J. Bacteriol.* 106 (2): 561.
15. Boyer, E., Ingle, M.B. (1972). Extracellular alkaline  $\alpha$ -amylase from a Bacillus sp. *J. Bacteriol.* 116 (3): 992-1000.
16. Browne, G.A., Zerban, F.W. (1945). *Sugar Analysis*. 3a. Ed., John Wiley & Sons Inc. (New York).
17. Breed, R., Murray, E.G. (1957). *Bergey's Manual Determinative Bacteriology*, 7a. Ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
18. Burdon, K. (1976). *Microbiologia*. 1a. Ed. Publicaciones Culturales S.A. (México).
19. Cajocar, C., Gazea, M., Patroscu, A. (1973). Effect of some factors on the stability of amylolytic and proteolytic enzymes produced by Aspergillus oryzae. *Ind. Aliment. (Bucarest)* 24 (4): 187-189.
20. Caldwell, M.L. and Adams, M. (1946). Amylases enzymes and their role in wheat technology. J.A. Anderson. Am. Asoc. of Cereal Chemists Interscience Publishers Inc.
21. Coleman, G. and Grant, M.A. (1966). Characteristics of  $\alpha$ -amylase formation by Bacillus subtilis. *Nature* 211 (5046): 306-307.
22. Chahal, D.S. and Didhu, R.S. (1972). Production of amylase by isolates of Aspergillus and Penicillium. II Use of agricultural raw materials as substrates. *Labdev J. Sci. Technol. Part B Life Sci.* 10: 27-9.
23. Chaudhory, M.I., Qureshi, E.I., Malik, M.A. (1969). Effect of trace elements on the production of  $\alpha$ -amylase. *J. Biochem.* 2 (2): 67-71.

24. Cruz Ulloa S., Ulloa, M. (1973). Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural. 34: 423.
25. Darnall, D.W. and Birnbaum, E.R. (1973). Lanthanide ions activate  $\alpha$ -amylase. Biochemistry 12 (18): 3489-3491.
26. Diccionario Enciclopédico Ilustrado. (1965). Vol. III 1a. Ed., Bibliográfica Omega, Buenos Aires (Argentina).
27. Dunn, G. (1974). A model for starch breakdown in higher plants. Phytochemistry (Oxf.) 13 (8): 1341-1346.
28. Durmishide, S.V. and Kvesitadee, G.I. (1973). Properties of glucoamylase in Aspergillus awamori. Scobsshch. Aka. Nauk. Gruz. SSR. 69 (2): 440-463.
29. Echegaray Alemán A. (1975). Prácticas de Laboratorio de Microbiología Agrícola. Facultad de Química, UNAM.
30. Enciclopedia de México. (1966). Vol. I, 1a. Ed., Editorial Instituto de la Enciclopedia en México. (México).
31. Ehrenthal, I. and Block, G. Highly fermentable noncrystallizing syrups. (Anheuser-Busch, Inc.) Ger. Patent. 1, 442, 186. 10 Feb. 1972, Appl. P 14 42 186. 4 -41, 20 Sept. 1962.
32. Fuwa, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as substrate. J. Biochem. 41: 583-603.
33. Fukui, T. (1969). Preparation and properties of crystalline glucoamylase from Endomyces species. Agr. Biol. 33 (6): 884-891.
34. Funjio, Y. (1970). Isoamylase production by Aerobacter aerogenes. Effect of nitrogen source. J. Ferment. Technol. 48 (1): 8-13.
35. Feniksova, R.A. and Ermoshina, G.A. (1971). Products of starch hydrolysis by Aspergillus oryzae 3-9-15  $\alpha$ -amylase. Prikladnaya Biokhimiya I Mikrobiologiya 7 (1): 19-29.
36. Galas, E., Krystynowicz, A., Florianowicz, T. (1970). Thermostable  $\alpha$ -amylase. Postepy Mikrobiol. 9 (3): 493-6.



37. Geddes, W.F. (1946). The amylases of wheat and their significance in milling and baking technology. *Advances in Enzymology* 6: 415-63.
38. Griffin, P.J. and Fogarty, W.M. (1974). Enzyme production by Bacillus polymyxa in an extract of peat. II. The effects of nitrogen and others factors on amylase and protease production. *Prod. R. IR. Acad. Sect. B.* 74 (30/31): 523-540.
39. Grootegoed, J.A., Lauwers, A.M., Heinen, W. (1973). Separation and partial purification of extracellular amylase and protease from Bacillus caldolyticus. *Arch. Mykrobiol.* 90 (3): 223-232.
40. Hahen, H. (1956). *Bioquímica de las Fermentaciones*. 1a. Ed. Editorial Aguilar. (Madrid).
41. Hanson, A.M., Bailey, T.A. et al. (1955). *J. Agr. Food Chem.* 3: 866.
42. Harhash, A.W. (1968). Studies on amylase in Fusarium moniliforme. *Bull. Fac. Sci. Cairo.* 41: 67-77.
43. Hasegawa, A., Miwa, N., Oshima, T. (1976). Studies on an  $\alpha$ -amylase from a thermophilic bacterium. I. Purification and characterization. *J. Biochem.* 79: 35-42.
44. Hasegawa, A. and Imahori, K. (1976). Studies on an  $\alpha$ -amylase from a Thermophilic Bacterium. II. Thermal stability of the thermophilic  $\alpha$ -amylase. *J. Biochem. (Tokyo)* 79 (3): 469-477.
45. Heinen, W., Lauwers, A.M. (1973). Variability of the molecular size of extracellular amylase produced by intact cells and protoplast of Bacillus caldolyticus. *Arch. Microbiol.* 106 (3): 201-207.
46. Ho, Bing-Wang, Guo., Jun-Jun., Fang Yi-Chen (1973). Studies on the screening of glucoamylase producing strains of Monascus and their fermentation conditions. *Acta. Microbiol. Sin.* 13 (2): 142-150.

47. Holmbergh, O. (1950). Some observations on the purification of malt amylase. *Arkiv. För Kemi* 2 (5): 125-128.
48. Hopkins, R.H. (1946). The actions of the amylases. *Advances in Enzymology* 6: 389.
49. Horikoshi, K. (1971). Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganism. II. Alkaline amylase produced by *Bacillus* No. A 40 - 2 *Agric. Biol. Chem.* 35 (11): 1783-1791.
50. Imanishi, A. (1966). Calcium binding by bacterial  $\alpha$ -amylase. *J. Biochem. (Tokyo)* 60 (6): 381-390.
51. Jacobs, M. Gerstein, M.J. (1960). *Handbook of Microbiology*. Van Nostrand Co. Inc. New York.
52. Johanides, V. (1969). Effect of the inoculum preparation on the glucoamylase synthesis by *Aspergillus niger* and *A. oryzae* cultivated on semisolid media. *Acta Biol. Jugoslav. Ser B. Mikrobiol* 6 (1): 71-76.
53. Kakiuchi, K., Hamaguchi, K. and Isemura, T. (1965). Association and dissociation of *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase molecule. III. The effects of pH and salts on the Monomer-Dimer transformation. *J. Biochem.* 57: 167-175.
54. Kakiuchi, K., Kato, S. et al. (1964). Association and dissociation of *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase molecule. II. Studies on monomer-dimer transformation by Gel Filtration. *J. Biochem* 55:102-109.
55. Kneen, E. and Sandstedt, R.M. (1946). Applications of the amylases in milling and baking technology. *Enzymes in heat Technology*. J.A. Anderson. Am. Asoc. of Cereal Chemist Intercience Publishers Inc. (New York): 89-105.
56. Kol'tsova, Z.V., Oreshikin, E.N., and Lazarev, J. (1972). Fractionation of glucoamylase and  $\alpha$ -amylase produced by *Endomycopsis* sp 20-9. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 8 (6): 869-873.

57. Korshunov, V.V. (1973). Effect of the medium composition by Aspergillus terricola 3-374. Prikl. Biokhim. Mikrobiol 9 (6): 877-882.
58. Kundu, A.K. (1970). Production of amylase in liquid culture by a strain of Aspergillus oryzae. Appl. Microbiol. 19 (4): 598-603.
59. Kvesitadze, G.I. (1968). Aeration effect on  $\alpha$ -amylase biosynthesis of A. oryzae. 3-9-15. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 5 (4): 433-436.
60. Kurushima, M. (1969). Studies on the fungal amylases. I Purification of  $\alpha$ -amylase. Nippon Nogei Kagaku Kaishi 45 (7): 429-436.
61. Lehninger, A.L. (1976). Biochemistry. 2a. Ed. Worth Publishers, Inc. New York.
62. Lynch, J.M., Mellor, R. (1975). Métodos de Laboratorio 2a. Ed. Editorial Interamericana, S.A. (México).
63. Lowry, O.H., et al. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
64. Mahmoud, S.A. (1967). Studies of some factors affecting bacterial amylases production. J. Bot. UAR 10: 33-41.
65. Mahmoud, S.A. (1968). Effect of metal ion activators on the reaction velocity of bacterial  $\alpha$ -amylase. J. Bot. UAR 11: 41-48.
66. Markovitz, A., Klein, G. and Fischer, G. (1956). Purification, crystallization and properties of the  $\alpha$ -amylase of Pseudomonas saccharophila. Biochim. Biophys. Acta 19: 267-273.
67. Masuo, A., et al. (1977). Photo control of enzyme activity of  $\alpha$ -amylase. Arch. Biochem. Biophys. 180: 41-48.
68. Meers, J.L. (1972). The regulation of  $\alpha$ -amylase production in Bacillus licheniformis. A. Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol. 38: 585-90.

91. Sánchez-Marroquín, A. (1947). Estudios sobre la amilasa de Endomycopsis fibuliger. Anal. Esc. Nac. Cien. Biol. (México) 4: 325-328.
92. Sánchez-Marroquín, A. (1961). Principios de Microbiología Industrial. 1a. Ed. Editorial Químic. (México).
93. Smalley, H.  $\alpha$ -amylase. Ger. Patent. 1, 945, 413, 19 - Mar. 1970. Brit. Appl. 09. Sept. 1968.
94. Sproessler, B. and Uhlig, H. (1972). The activity of microbial amylases. Getreide Menl. Brot. 26 (8): 224-231.
95. Starichkai, F.K. and Lendel, Z. (1966). Industrial method for isolation of amylase from a submerged culture of Aspergillus oryzae. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 2 (3): 258-263.
96. Stein, E.; Fischer, E. (1958). The resistance of  $\alpha$ -amylase towards proteolytic attack. J. Biol. Chem. 232: 867-879.
97. Stein, E.; Fischer, E. (1960). Bacillus subtilis  $\alpha$ -amylase, a Zinc-protein complex. Biochi. Biophys. Acta 39: 287-296.
98. Street, H.V. (1963). Amylase. Methods in enzymatic analysis. Edited by H.U. Bergmeyer (Alemania).
99. Suzuki, S. Coffee - flavored soft drink. (Oyawa and Co., LTD) Japan Kokai. Patent. 7348.668. 10 Jul. 1973, Appl. 21 Oct. 1971; 4pp. (1971).
100. Svanborg, K, and Myrbäck, K. (1953). Starch degradation by  $\alpha$ -amylases. Arkiv. för Kemi. 6 (9): 113-121.
101. Taha, S.M. (1967). Purification and chemical composition of  $\alpha$ -amylase from Bacillus subtilis (5-3217) Egyptian strain. J. Bot. UAR. 10: 25-32.
102. Taha, S.M. (1968). Factors influencing amylase production by a local strain of Bacillus subtilis (5-3217). J. Bot. UAR. 11: 49-58.
103. Takeo, K.; Ichi, Y. and Takashi, K. (1970). The preparation and isolation of cyclodextrins. Sci. Rep. Kyoto. Prefect. Univ. Agr. 22: 106-110.

104. Takana, S. (1969). Regulation of amylase synthesis by Vibrio parahaemolyticus Biken. J. 12 (2): 119-124.
105. Tilden, E.B., and Hudson, C.S. (1942). Preparation and properties of the amylases produced by Bacillus macerans and B. polymyxa. J. Am. Chem. Soc. 64: 527-44.
106. Toda, H. and Akabori, S. (1963). Chromatography of Taka amylase A on diethylaminoethyl-cellulose column. J. Biochem. 53: 102-110.
107. Tang, Yu-Wei. (1973). The effect of the giberllic acid on the production amylase in Bacillus subtilis. Sci. Sin. 16 (4): 512-518.
108. Tsyperovychio, S., Halych, L.P., and Kolesnyk, L.O. (1975). Denaturation stabilization of  $\alpha$ -amylase from Aspergillus oryzae. Ukr. Biokhim. Zh. 47 (4): 453-457.
109. Tulaganov, A., Zakirov, M.Z. (1973). Partial separation of amylases and proteases of A. oryzae. Uzb. Biol. Zh. 17 (3): 65-66.
110. Underkofler, L.A. and Hickey, R.J. (1954). Industrial Fermentations. Vol. II. Chemical Publishing Co. New York.
111. Underkofler, L.A.; Guymon, J.F.; Rayman, M.M. (1943). A semi-micro method for the determination of reducing sugars in fermentation media. Iowa State College J. Sci. 17: 251-256.
112. Ustinnikov, B.A. et al. (1970). Features of the cultivation of the fungus A. niger NRRL-337. Vyssh. Ucheb. Zaved. Pishch. Tekhnol. 3: 98-100.
113. Vecher, A.S. (1969). Electrophoresis of amylase from Actinomyces. Mikrobiologiya 38 (6): 999-1001.
114. Webb, F. (1964). Biochemical Engineering. Van Nostrand Co. Inc. London.
115. Weber, K. and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244 (16): 4406 - 4412.

116. Windish, W.W. and Mhatre, N.S. (1965). Microbial Amylases. *Advances in Applied Microbiology* 7: 273-297.
117. Yamamoto, T. and Nishida, A. (1966). Reversibility of heat inactivation of Bacillus subtilis  $\alpha$ -amylase. *Agr. Biol. Chem.* 30 (10): 994-1003.
118. Yurkevich, V.V. and Shurygina, N.N. (1972). Mechanism of the starch effect on  $\alpha$ -amylase biosynthesis. in Aspergillus oryzae. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 8 (5): 515-519.
119. Yutani, K. et al. (1973). Composition of thermostable  $\alpha$ -amylase from B. stearothermophilus grow at different temperatures. *J. Biochem.* (Tokyo): 74 (3): 573-579.
120. Yutani, K. (1969). Stability of the conformation of saccharifying bacterial  $\alpha$ -amylase. *J. Biochem.* (Tokyo) 65 (2): 201-208.
121. Zherebtsov, N.A. (1964). Acidic inactivation of  $\alpha$ -amylase in media containing calcium ions. *Izv. Vyssh. Ucher Zavedenii. Pishch. Tekhnol.* 4: 55-59.
122. Zherebtsov, N.A. et al. (1974). Isolation and study of properties of acid stable  $\alpha$ -amylase of A. awamori. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 10 (2): 236-241.