

6
223



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION DE UNA CEPA BACTERIANA
SILVESTRE PRODUCTORA DE DEXTRANASAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

ALONSO IGLESIAS PILAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1994



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof.: EDUARDO BARZANA GARCIA.
Vocal	Prof.: AGUSTIN LOPEZ MUNGUIA CANALES.
Secretario	Prof.: AMANDA GALVEZ MARISCAL.
1er. suplente	Prof.: MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE.
2do. suplente	Prof.: MARCOS FRANCISCO BAEZ HERNANDEZ.

Lugar donde se desarrollo el tema:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO..

Asesor del tema:

AMANDA GALVEZ MARISCAL.

Supervisor técnico:

BISERKA SVESTAROVA PEKARKOVA.

MARTHA DOLORES BIBBINS MARTINEZ.

Sustentante:

PILAR ALONSO IGLESIAS.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. M. Amanda Gálvez M. por su confianza y gran apoyo en el desarrollo de este trabajo, así como por su amistad.

A la M. en C. Biserka Svestarova P. por su invaluable ayuda en la realización de esta tesis.

A la M. en C. M. del Carmen Wachter R. por su dedicada colaboración.

A la M. en C. Martha D. Bibbins M. por sus acertadas sugerencias, pero sobre todo por su amistad.

A la QFB Gabriela Isunza por su ayuda en la realización de las hidrólisis de la dextrana en jugo de caña y amistad.

A la Biol. Idalia Flores por su asesoría siempre oportuna y valiosa amistad.

Al jurado de esta tesis, por sus sugerencias durante la revisión del manuscrito

Al Pas. de QFB: Marcos Ordaz, a la Pas de QFB. Martha Giles y al M. en C. Adelfo Escalante por su apoyo en la realización del manuscrito.

A todos mis grandes amigos del departamento de alimentos y biotecnología con los que compartí entrañables momentos, y que de una u otra manera, colaboraron para que este trabajo se haya terminado.

A mis queridos padres..

ÍNDICE.

RESUMEN.	5
INTRODUCCIÓN.	6
OBJETIVO.	9
ANTECEDENTES.	
I. DEXTRANAS.	10
II. MICROBIOLOGÍA DEL AZÚCAR DE CAÑA.	14
III. DEXTRANASAS.	
Producción.	16
Mecanismo de acción de las dextranasas.	19
Aplicación de las dextranasas.	21
MATERIAL Y MÉTODOS.	
I. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE UN MICROORGANISMO PRODUCTOR DE DEXTRANASAS.	22
II. PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA.	
Medio de fermentación y producción de la enzima.	24
Muestreo.	24
Medición de la actividad enzimática.	25
Optimización del medio de cultivo.	25
Cinética de fermentación	27
Caracterización de la dextranasa.	27
Evaluación de las reacciones de hidrólisis de dextrana.	27

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

I. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN.	28
II. PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA.	
Fermentaciones preliminares en matraces Erlenmeyer.	35
Optimización del medio de cultivo.	37
III. CARACTERIZACION DE LA ENZIMA.	
Efecto del pH y de la temperatura.	42
Cinética enzimática.	46
Hidrólisis de la dextrana en jugo de caña.	48
CONCLUSIONES.	50
REFERENCIAS.	51
APÉNDICE I.	53

LISTA DE FIGURAS.

Fig. 1. Reacción de la síntesis de la dextrana efectuada por la enzima dextranacarasa.	11
Fig. 2. Mecanismo de acción de las dextranasas II de <i>P. funiculosus</i> sobre isomaltodextrinas.	20
Fig. 3. Crecimiento del microorganismo con factores de crecimiento.	34
Fig. 4. Cinética de crecimiento de <i>Corynebacterium simplex</i> en fermentaciones preliminares con el medio base.	36
Fig. 5. Cinética de crecimiento de <i>Corynebacterium simplex</i> en fermentaciones con el medio optimizado.	40
Fig. 6. Efecto del pH sobre la actividad de la dextranasa de <i>Corynebacterium simplex</i> (Temperatura 40° C).	43
Fig. 7. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la dextranasa de <i>Corynebacterium simplex</i> .	44
Fig. 8. Estabilidad de la dextranasa de <i>Corynebacterium simplex</i> a la temperatura.	45
Fig. 9. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de la dextranasa.	47
Fig. 10. Disminución de la viscosidad del jugo de caña adicionado con dextrana industrial.	49

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Microorganismos productores de dextranasas.	18
Tabla 2. Composición de los medios de cultivo para la técnica de Box-Wilson.	26
Tabla 3. Características morfológicas.	29
Tabla 4. Características metabólicas de la cepa aislada.	30
Tabla 5. Cuadro comparativo de la cepa aislada con cepas clasificadas.	31
Tabla 6. Resultados de la actividad sobre dieciséis medios distintos.	38
Tabla 7. Resultados finales de la técnica de Box-Wilson.	39

RESUMEN

Las dextranasas son enzimas que poseen la capacidad de hidrolizar la dextrana producida por bacterias, tales como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.* y *Leuconostoc mesenteroides* entre otras a partir de la sacarosa. En los ingenios azucareros se presentan problemas importantes por la generación de dextranas entre los que se encuentran la elevación de la viscosidad del jugo de caña, obstrucción de las tuberías por deposición de material insoluble, lo que acarrea como consecuencia la disminución en el rendimiento del proceso. La utilización de dextranasas para la degradación de las gomas y así evitar la elongación de los cristales de sacarosa y deposición de dextrana sobre ellos es una estrategia para resolver el problema. Las dextranasas comerciales son obtenidas por cepas fungales como *Penicillium funiculosum* y *Chaetomium gracile* los cuales cuentan con una alta productividad, pero no sólo este tipo de microorganismos es capaz de sintetizar tales enzimas, también algunas bacterias (como *Lactobacillus bifidus* y *Arthrobacter globiformis*) y levaduras (*Lipomices starkeyi*) pero no son utilizadas comercialmente para producir dextranasas por contar con un bajo rendimiento. Es por lo anterior que este trabajo propone encontrar una nueva cepa bacteriana, a través de procedimientos de aislamiento y selección, capaz de sintetizar dextranasas a partir de muestras de jugo de caña. Como resultado se obtuvo una cepa bacteriana silvestre productora de dextranasas la cual fue identificada como *Corynebacterium simplex*. El medio de cultivo se optimizó mediante el diseño factorial Box-Wilson en donde se evaluó el efecto, a partir de muestras de jugo de caña de ingenios azucareros mexicanos, de distintas fuentes de carbono y nitrógeno sobre la producción de la enzima. Se alcanzaron niveles de 4.2 UD/ml de sobrenadante. La dextranasa de *Corynebacterium simplex* tiene un pH óptimo de 5.4 y es estable a 40 °C. Esta cepa no ha sido previamente reportada como productora de dextranasas.

INTRODUCCIÓN.

El interés por la biotecnología se ha incrementado notablemente en la última década, aun cuando los procesos biotecnológicos han sido empleados por el ser humano desde la antigüedad, como lo es el empleo de los microorganismos en procesos fermentativos que durante siglos se han realizado en base a prácticas empíricas. No es sino hasta mediados de este siglo que se puede considerar el surgimiento de la biotecnología como una disciplina científica que nos puede ayudar a resolver problemas en muy diversas áreas como son salud, alimentación, energía, aprovechamiento de desechos orgánicos y contaminación ambiental por mencionar algunas.

El aislamiento y selección de sistemas celulares de microorganismos tanto de vegetales como de animales para la producción de enzimas que se adapten a necesidades específicas así como el conocimiento de los sistemas y procesos biológicos, consiguen el desarrollo de esta nueva rama de la ciencia.

Las razones para el empleo de enzimas obtenidas de los microorganismos son su especificidad, eficiencia, condiciones de operación y las diversas reacciones en las que pueden intervenir. Por otro lado su aplicación puede ser en forma aislada o dentro de los microorganismos intactos para el caso de enzimas intracelulares. Se conoce la existencia de más de 2000 enzimas de las cuales sólo algunas enzimas han sido aisladas, purificadas y cristalizadas. Debido a la naturaleza proteica de las enzimas son afectadas por los mismos factores que afectan las proteínas como son la temperatura, disolventes, sales, pH, etc. Las enzimas se han dividido en 6 grupos de acuerdo al tipo de reacciones que catalizan. Uno de estos grupos son las hidrolasas en donde entran las dextranasas. Estas enzimas degradan la dextrana el cual es un polímero de glucosa con enlaces en posición alfa (1-6) sintetizados por microorganismos como *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc dextranicum* a partir de la sacarosa dejando como subproducto a la fructosa. La formación de la dextrana resulta un grave inconveniente en la industria azucarera ya que su formación trae consigo una serie de problemas como son la elevación de la viscosidad del jugo, obstrucción de tuberías y bombas, deposición de material insoluble en el equipo y disminución del rendimiento en el proceso de refinamiento. Como una forma de solucionar este problema se ha recurrido a la aplicación de dextranasas en los ingenios azucareros, práctica que aún es poco común en México. Los pocos ingenios que las emplean utilizan dextranasas de importación obtenidas

de cepas fungales como *Penicillium funiculosum* y *Chaetomium gracile*. Este tipo de microorganismos tiene el inconveniente de requerir para su desarrollo de mayor tiempo que una bacteria o levadura, y en el caso de *Penicillium* puede llegar a producir antibióticos o micotoxinas.

Por lo anterior se plantea la búsqueda de una cepa bacteriana que sintetice esta enzima y que cuente en lo posible con una productividad comparable a las cepas fungales sin requerir para la producción un largo tiempo.

La técnica a seguir para el aislamiento y selección podría definirse como el muestreo de diversos ambientes para posteriormente seleccionar, aislar, estudiar y conservar el microorganismo que pueda cubrir los objetivos planteados.

El criterio debe cubrir los siguientes puntos:

1. El investigador deberá ser suficientemente creativo y contar con conocimientos para seleccionar el medio ambiente donde llevará a cabo los muestreos así como el medio selectivo donde deberá desarrollarse el organismo para su estudio.
2. El organismo deberá sintetizar la enzima en suficiente cantidad en un periodo de tiempo corto y preferentemente en cultivos sumergidos, para el caso de dextranasas.
3. El organismo deberá crecer y producir la enzima no requiriendo de nutrientes costosos.
4. El organismo deberá ser fácil de removerse del medio de fermentación.
5. Se buscará que la enzima sea preferentemente extracelular y que pueda ser aislada de manera fácil.
6. El organismo no deberá ser patógeno ni producir toxinas u otros materiales biológicos activos.
7. Deberá ser genéticamente estable y no susceptible a bacteriófagos.

Dentro de los nuevos microorganismos aislados por este ensayo se encuentran los extremadamente termofílicos extraídos de manantiales de aguas calientes como respiraderos submarinos volcánicos o géisers. Estos microorganismos sintetizan enzimas para subsistir en

estos medios, soportando altas temperaturas, característica muy importante ya que como sabemos un inconveniente de trabajar con enzimas radica en que al ser de naturaleza proteica su rango de estabilidad a temperaturas elevadas limita su aplicación. Un ejemplo de un microorganismo aislado empleando la técnica de aislamiento y selección en un cráter azufrado es una archaeobacteria la cual puede crecer a $\text{pH} = 2$ y $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ oxidando el sulfuro a ácido sulfúrico.(8)

OBJETIVO GENERAL.

Obtener una bacteria productora de dextranasas a través de un procedimiento de aislamiento y selección utilizando un medio de cultivo con dextrana como única fuente de carbono.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Aislar e identificar una cepa bacteriana productora de dextranasa extracelular.

Verificar que la cepa seleccionada sea capaz de producir la enzima en forma extracelular en fermentaciones sumergidas.

Optimizar la composición del medio de cultivo para la producción de la dextranasa con la bacteria seleccionada.

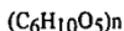
Caracterizar a la dextranasa en términos de efecto de pH, temperatura y cinética enzimática con dextrana como sustrato.

Evaluar su potencial para hidrolizar dextrana en ingenios azucareros.

ANTECEDENTES

I. DEXTRANAS.

El interés por la dextrana se encuentra históricamente relacionado con la producción del azúcar. Desde las primeras décadas de establecida la industria azucarera, resultaba un inconveniente el incremento de la viscosidad de los licores azucarados. Durante muchos años las razones de este fenómeno resultaron ignoradas hasta que Pasteur comprobó el origen microbiano del mismo. Posteriormente, el alemán Scribebler, definió la composición química del producto de esta actividad microbiana como un polímero de glucosa de fórmula general:



En razón de la dextrorrotación de su solución acuosa lo denominó dextrana. El microbiólogo ruso Cienkowski dio el nombre de *Leuconostoc mesenteroides* a las bacterias sintetizadoras de dextrana (1). Posteriormente otros investigadores demostraron que la dextrana es formada por un amplio grupo de microorganismos que producen varias clases de polisacáridos extracelulares bacterianos compuestos exclusivamente por unidades de monómeros alfa-D-glucopiranosos unidos por enlaces alfa (1-6) que cuentan con estructuras variables: desde polímeros lineales hasta los altamente ramificados, en función del microorganismo que lo sintetiza el cual puede ser del género *Leuconostoc* especies *mesenteroides* y *dextranicum*, tribu *Streptococcea* y la familia *Lactobacillacea* (2).

La síntesis de la dextrana es realizada por una enzima glucosiltransferasa: La dextransacarasa (alfa-1,6, glucan: D-fructosa-2-glucosiltransferasa, E.C. 2.4.1.5) de origen microbiano de acuerdo con la siguiente reacción, de transferencia de unidades glucosil a partir de sacarosa formando un polímero de glucosa y fructosa como subproducto:

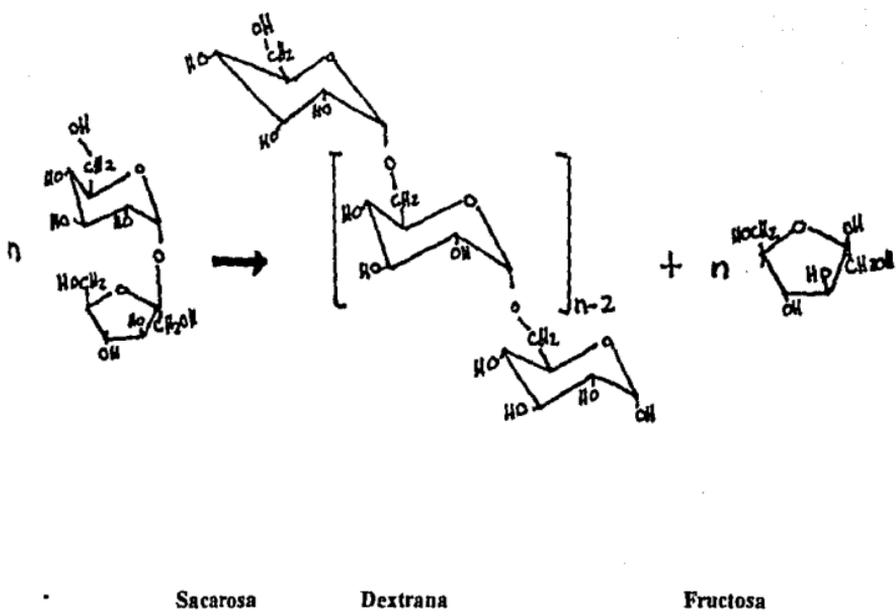


Fig. 1- Reacción de la síntesis de la dextrana efectuada por la enzima dextransacarasa (alfa-1,6, glucan: D-fructuosa-2- glucosil- transferasa).

Las cadenas de dextrana se clasifican de acuerdo al grado de ramificación el cual varía dependiendo del origen de la dextranosa. Así una dextrana típica de *L. mesenteroides* (NRRL B-512F) contiene un 95% de enlaces alfa (1-6) y 5% de enlaces alfa (1-3) entre las unidades D-glucopiranosas por lo que es prácticamente lineal y soluble en agua, mientras que una dextrana producida por *S. mutans* contiene un 84% de enlaces alfa (1-3) lo que la hace insoluble (19). Este tipo de dextrana se encuentra presente en la placa dental lo cual permite a los microorganismos de la flora oral fijarse en el esmalte dental provocando la desmineralización de los dientes por los ácidos secretados por los microorganismos depositados. Por otro lado la dextrana favorece la formación de "típicos" que actúan como soporte de las asociaciones microbianas productoras de algunos alimentos fermentados y kefirano.

Seymour y Knapp (1980) señalan que las dextranas pueden ser divididas en tres clases, en base a sus características estructurales, determinadas por medio de metilación, oxidación con periodato y por resonancia magnética nuclear de carbono 13:

Clase I: Son las dextranas que contienen una cadena principal de residuos glucosídicos consecutivos con enlaces alfa (1-6) con ramificaciones en las posiciones 2, 3 ó 4.

Clase II: Dextranas que contienen enlaces consecutivos alfa (1-3) y alfa (1-6) con ramificaciones en los enlaces alfa (1-3).

Clase III: Son dextranas con enlaces consecutivos alfa (1-3) y ramificaciones alfa (1-6).

Los polímeros con enlaces alternados alfa (1-6) y alfa (1-3) en una cadena lineal se conocen como alternano mientras que los que cuentan con un alto porcentaje de enlaces alfa (1-3) en cadenas lineales se denominan mutano (10).

La dextrana cuenta con un gran número de aplicaciones industriales de acuerdo a su peso molecular. Algunos usos de las dextranas son los siguientes:

- Recuperación de productos secundarios del petróleo (Sparks, 1962; Cypert, 1963)
- Lodos para perforación (Monaghan, 1959; Monaghan, 1962; Muelles, 1963; Owen, 1952)
- Cubiertas protectoras de semillas (Peake, 1956)
- Desfloculantes en productos papeleros (De Waals, 1945)
- Proceso de chapado de metales (Botton, 1961)
- Suturas quirúrgicas (Novak, 1956)

Espesantes y estabilizantes en la industria alimentaria (Wadsworth y Hughes, 1946).
Expansores de volumen de plasma y mejoradores de flujo sanguíneo.

Sin embargo existen casos en los cuales la síntesis de dextrana acarrea graves problemas. Uno de ellos se presenta en la industria azucarera, en donde el desarrollo de la dextrana (por contaminación con microorganismos de la flora natural de la caña de azúcar entre los cuales se puede mencionar *Leuconostoc mesenteroides*) aumenta la viscosidad del guarapo ó jugo de caña lo que dificulta su manejo, sobreviniendo una cristalización lenta con lo que se provoca la elongación de los cristales de sacarosa.

II. MICROBIOLOGÍA DEL AZÚCAR DE CAÑA.

Los microorganismos presentes en la caña de azúcar provienen principalmente del suelo y de los desechos de plantas en degradación. La flora se ve influenciada principalmente por factores como: temperatura, humedad y temporada de corte de la caña. Bevan y Bond (5), aislaron aproximadamente 50 diferentes microorganismos de la caña verde y 17 microorganismos de caña quemada.

Las bacterias que se encuentran en hoja y tallos comúnmente son especies de *Lactobacillus*, *Xantomonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Actinomyces*. Especies de hongos como *Penicillium*, *Rhizopus* y *Aspergillus* así como levaduras *Sacharomyces*, *Torula* y *Pichia*.

La sacarosa esta expuesta a la acción enzimática de la dextranasa bacteriana desde el momento en que se corta la caña hasta el momento de ser clarificado el jugo influenciando toda la secuencia de operaciones en el proceso de obtención de la sacarosa.

Durante la cosecha de la caña en el cual esta se quema para remover hojas se incrementa la temperatura 55-85 °C, pero aparentemente el quemado no destruye a muchos microorganismos termosensibles ya que se ha detectado gran variedad de ellos después del quemado como: *Leuconostoc mesenteroides*, el cual además crece marcadamente con el tiempo después del quemado. La acidificación de la caña es el resultado del crecimiento de *Leuconostoc* y otras bacterias formadoras de ácido en la caña recién cosechada, estos microorganismos producen azúcar invertido, ácido láctico y acético, y frecuentemente gomas entre las cuales se encuentra principalmente la dextrana (6).

La dextrana puede llegar a originar una serie de problemas durante el proceso de producción, las cuales se centran fundamentalmente en el aumento de la viscosidad de las masas cocidas, aumento en el tiempo de cocción de estas, dificultades en la purga que demanda más agua de lavado, pérdida de azúcar en mieles finales, que demanda a su vez más vapor para poder mantener la misma producción y se obliga a reducir los grados Brix de la corrida de los licores crudos en las refineries. Como alternativa para contrarrestar el "cuello de botella" que se origina en el área de filtración lo que por su parte provoca a su vez mayores necesidades de vapor para producir la misma cantidad que se obtendría sin diluir.

Como medida para reducir este problema se recurre a realizar una programación adecuada entre el corte de la caña en los campos y la entrada de la caña al batey para la molienda, pero esto no es suficiente. Aunque se reduce considerablemente la oportunidad para el desarrollo de la microflora, la formación de gomas, aún en bajas cantidades, es inevitable (21).

Por lo anterior se ha intensificado el interés por encontrar soluciones a los inconvenientes de la contaminación microbiana. La más atractiva por su bajo costo consiste en añadir sustancias bactericidas, como sales cuaternarias de amonio y compuestos organofosforados, sin embargo esta práctica puede introducir riesgos toxicológicos en el proceso. Otra solución que ya es empleada en algunos países es la aplicación de enzimas dextranasas capaces de romper los enlaces alfa (1-6) disminuyendo la viscosidad del jugo rápidamente al disminuir el peso molecular de la goma.

III. DEXTRANASAS.

Las dextranasas son enzimas que son capaces de hidrolizar los enlaces alfa (1-6) del polisacárido bacteriano conocido como dextrana. Su clasificación es alfa (1-6)-D-glucan hidrolasa (E.C.3.2.1.11.). Las dextranasas son sintetizadas por adaptación por numerosas especies de hongos, levaduras y bacterias. Cabe mencionar que se ha reportado actividad dextranolítica en diversos órganos del cuerpo humano en orden decreciente: bazo, riñón, pulmones, cerebro y músculo.

PRODUCCIÓN.

Las dextranasas son producidas por varios microorganismos y requieren de inducción. En la tabla No. 1, se enlistan especies bacterianas que han sido reportadas en la literatura como productoras de dextranasas.

La producción de las dextranasas se ve influenciada por las siguientes características:

Composición del medio de cultivo.- En términos generales la composición del medio requiere:

Dextrana.- Se debe añadir como inductor de la enzima y la concentración va de 0.5-2 %.

Fuente de Nitrógeno.- Puede emplearse extracto de levadura, peptona, NaNO_3 ó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La concentración varía de 0.2-1 %.

Fuente de Fósforo.- Generalmente se utiliza KH_2PO_4 ó una solución amortiguadora de fosfatos. La concentración puede variar de 0.05-0.1 %.

Fuente de Magnesio.- Como fuente de magnesio se emplea $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ó $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. La concentración varía de 0.02-0.05 %.

Elementos traza. Como sales de FeSO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 y CuSO_4 .

Cantidad de inóculo.- Generalmente se emplea un volumen del 5-10 %.

pH del medio de cultivo.- El pH varía ampliamente dependiendo del tipo de microorganismo, el cual puede ser entre 3.5-8.

Agitación y aireación.- Los cultivos pueden ser agitados o no.

Temperatura de incubación.- Las temperaturas oscilan dependiendo del tipo de microorganismo entre 20-37 °C.

Tiempo de fermentación.- Es variable también de acuerdo al microorganismo el cual puede ser 2 a 14 días de fermentación.

Tabla No. 1. Microorganismos productores de dextranasas.

Microorganismo.	Referencia.
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Guilarte et al., 1986.
<i>P. funiculosum HI-4</i>	" "
<i>P. aculeatum.</i>	Madhu y Prabhu, 1983.
<i>P. purpurogenum</i>	Shukla et al., 1989.
<i>P. funiculosum SH-ST</i>	Kosaric et al., 1973.
<i>P. verruculosum.</i>	Tsuchiya et al., 1952.
<i>P. lilacinus NRRL 396</i>	Tsuchiya et al., 1952.
<i>Chaetomium gracile</i>	Hattori et al., 1980.
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Gálvez y López-Munguía., 1991.
<i>Spicaria violacea</i>	Tsuchiya et al., 1952.
<i>Cytophaga johnsonii</i>	Janson., 1975.
<i>Fusarium miniliforme</i>	Simonson y Liberta., 1975.
<i>Verticillium coccorum</i>	Hattori e Ishibashi., 1981.
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Koenig y Day., 1988.
<i>Arthrobacter globiformis.</i>	Sawai et al., Ohya et al., 1975.
<i>Lactobacillus bifidus</i>	Bailey y Clarke., 1958.
<i>Brevibacterium fuscum var.</i>	Sugiura et al., 1974.
<i>Flavobacterium multivorum.</i>	Haward y Sly., 1984.
<i>Flavobacterium sp.</i>	Kobashi et al., 1983.
<i>Celvibrio fulva.</i>	Ingelman., 1984.
<i>Pseudomonas spp.</i>	Richards y Straemer., 1974.
<i>Aspergillus carneus.</i>	Hiraoka y Fukumoto et al., 1972.
<i>Acromobacter spp.</i>	Hattori e Ishibashi., 1981.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS DEXTRANASAS.

Dependiendo del sitio donde se hidroliza el polisacárido, las dextranasas se dividen en dos tipos: endodextranasas, cuando hidrolizan enlaces al azar y exodextranasas que hidrolizan a partir del extremo reductor de la cadena.

La enzima ataca principalmente los enlaces glucosídicos alfa (1-6) de la dextrana dando como resultado oligosacáridos de varios tamaños: isomaltosa, isomaltotriosa, isomaltotetraosa, etc. las cuales van a seguir siendo hidrolizadas por la enzima, teniendo preferencia por las cadenas más largas.

Del patrón de acción de las dextranasas de *P. funiculosum* (Fig. 2) sobre distintas maltodextrinas planteado por Sugiura e Ito en 1974, se puede deducir que los puntos de ataque son primeramente al 2º y 3º enlaces glucosídicos, a partir del extremo no reductor del sustrato que al incrementar el grado de polimerización del mismo, el hidrolizado enzimático también ataca al 4º y 5º enlaces glucosídicos (27).

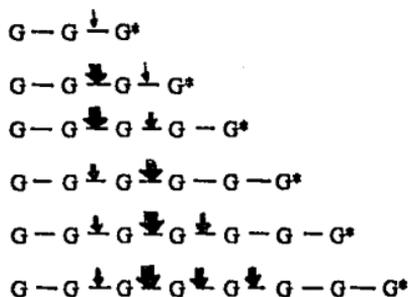


Fig. 2. Mecanismo de acción de las dextranasas de II de *P. funiculosum* sobre isomaltodextrinas.

G :Glucosa.

G* :Extremo reductor.

— : Enlace glucosídico alfa (1-6)

⚡ : Hidrólisis muy rápida.

⚡ : Hidrólisis rápida.

⚡ : Hidrólisis lenta cuando se sustituye el extremo reductor por un radical alcohol.

APLICACIÓN DE LAS DEXTRANASAS.

En la práctica clínica las dextranasas pueden ser utilizadas para reducir la incidencia de caries dental, ya que remueven la capa de dextrana insoluble que permite fijar microorganismos propios de la flora oral, causantes de la desmineralización de los dientes por la formación de metabolitos ácidos.

Estas enzimas también pueden ser utilizadas para la producción de dextranas de peso molecular controlado, dextranas clínicas de 50 000 a 70 000 daltons que normalmente se producen por medio de hidrólisis ácida lo cual no puede ser totalmente controlable.

En la industria azucarera la aplicación de dextranasas constituye una solución potencial para resolver los problemas debido a la contaminación microbiana en los ingenios azucareros. Las dextranasas comerciales provienen de *Chaetomium gracile* y *Penicillium funiculosum* y son producidas por las empresas Novo Nordisk (Dextranase), Miles (Dextranex Dx) y Amano (Sugarcase). Su aplicación se lleva a cabo en tanques a temperaturas de 50-55° C y pH de 5-5.5 cuando el jugo tiene 35° Brix de goma o más, en meladura y mieles se usa a razón 9.2 a 52.5 Kg/1000 TM de caña para ingenios de crudos. En refineries de 50-90 Kg/100 TM de azúcar crudo o refinada a procesar, en diluciones similares y dosificado de forma continua. (9)

MATERIALES Y METODOS.

I. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE UN MICROORGANISMO PRODUCTOR DE DEXTRANASAS.

1. Aislamiento.

Para el aislamiento del microorganismo productor de dextranasas se utilizaron como fuente natural muestras de jugo de caña (guarapo), del Ingenio Casasano "La abeja", localizado en el Edo. de Morelos, así como muestras de jugo de caña de diversos centros comerciales. Las muestras se trataron como se indica a continuación :

Se inocularon cantidades determinadas de las muestras en un medio de cultivo sólido inicial que contenía:

10 g/l de dextrana industrial (5-40 millones de daltons en promedio) (Sigma Chemical Co. Inc. St. Louis Mo, USA), 15 g/l de agar, 2.4 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 1 g/l de K_2HPO_4 , El pH del medio de cultivo se ajustó a 7.0. La incubación se realizó a 30° C, durante 24 y 48 h.

Se aislaron colonias características mediante resiembras sucesivas en placas con medio de cultivo sólido con la siguiente composición: 5 g/l de dextrana azul 2000 (Pharmacia, Suecia), 5 g/l dextrana industrial (5-40 millones de daltons en promedio), 15 g/l de agar, 5 g/l de extracto de levadura (Merck, Alemania) 1.0 g K_2HPO_4 y ajustando a pH 7.0. La temperatura de incubación fué de 30 °C. La enzima secretada hacia el medio difunde y se produce un halo incoloro alrededor de la colonia, donde se ha hidrolizado la dextrana azul. El colorante liberado en este proceso difunde y forma un círculo azul oscuro alrededor de la zona decolorada.

Se seleccionaron las colonias que producían el mayor tamaño de halo incoloro.

2. Identificación del microorganismo aislado.

a) Características morfológicas.

Las características morfológicas se determinaron mediante el uso del microscopio óptico Zeiss (Alemania Occidental Mod. 475052-9901). Para este fin se realizó la técnica de Gram tanto para los cultivos de 24 h como de 48 h. Se observaron:

- Forma del microorganismo
- Tipo de agrupación.
- Presencia de esporas.
- Tamaño.
- Gram.

Posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas útiles para la identificación del microorganismo, entre éstas se encuentran:

Prueba de la catalasa.

Presencia de cápsula.

Reducción de nitratos.

Prueba de SIM.

Prueba de la Ureasa.

Prueba de la Oxidasa.

Requerimientos de factores de crecimiento.

Crecimiento en NaCl en concentraciones del 5 y 10 %.

Prueba de la leche tornasolada.

Prueba de RMVP.

Crecimiento a 10, 30 y 40 °C.

Hidrólisis de gelatina.

Hidrólisis de almidón.

Formación de ácido a partir de: L-arabinosa, celobiosa, dextrana, dextrinas, fructosa, galactosa, glucosa, inositol, inulina, lactosa, maltosa, manosa, manitol, ramnosa, sacarosa, salicina, sorbitol, sorbosa, trehalosa y xilosa.

La composición de los medios, así como las técnicas empleadas para cada prueba se encuentran detalladas en el apéndice I.

II. PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA.

MEDIO DE FERMENTACIÓN Y PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA.

La productividad de la cepa se evaluó en un medio líquido con dextrana como única fuente de carbono y que fué modificado de acuerdo con lo encontrado en la literatura acerca de los requerimientos de distintas cepas bacterianas a partir del medio descrito por Kosarit (1973) (18). El cual contiene (g/l): dextrana industrial (de alto PM) 5.0, dextrana T-70 5.0, extracto de levadura 1.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.2, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KCl 0.5, CaCl_2 0.4. Todos los reactivos fueron de grado analítico. El CaCl_2 se esterilizó por separado del medio de fermentación. La esterilización se llevó a cabo a 121 °C durante 15 min.

El inóculo se preparó de la siguiente manera.-

Se sembró por estría una colonia en tubos inclinados utilizando como medio dextrana industrial (de alto PM) 10.0, 2.4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0 de K_2HPO_4 , 15.0 de agar, todo expresado en g/l.. Se incubó durante 48 hrs a 30 °C.

Posteriormente las colonias obtenidas en 2 tubos se inocularon en un matraz Erlenmeyer que contenía un volumen de 20 ml del medio de fermentación, se incubó durante 24 hrs a 30 °C y 100 rpm. Al término del periodo de incubación el volumen total de este matraz se transfirió al medio de fermentación en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 80 ml del medio, dando lugar a un volumen final de 100 ml. La fermentación se llevó a cabo a 30 °C, con un agitación de 100 rpm durante 62 hrs (Incubadora New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA)

MUESTREO.

El cultivo se muestreó en condiciones de esterilidad para conocer la cinética de crecimiento así como la cinética de producción de la enzima tomando 5.0 ml en tiempos determinados. Inmediatamente después de tomada la muestra ésta se sometió a centrifugación 10 000 rpm en una centrífuga Damon IEC HT (USA).

MEDICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

La actividad enzimática se determinó por la cuantificación de extremos reductores liberados durante la hidrólisis, con el reactivo del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Sumner, 1935) (28). sobre una solución de dextrana T-70 (peso molecular controlado de 70, 000 daltons) (Farmacia, Upsala, Suecia) en amortiguador de acetatos pH de 5.4 a 40 °C. Se utilizó una curva estándar de 0.0 g/l a 2.0 g/l de glucosa.

Para este estudio se definió en particular una unidad dextranasa (UD) como la cantidad de enzima necesaria para liberar el equivalente a una micromol de glucosa por min en las condiciones arriba estipuladas.

Para evaluar la actividad de la cepa en las muestras se centrifugó la biomasa durante 10 min a 10 000 rpm. El sobrenadante que contiene a la dextranasa se dosificó para añadirlo a 2.0 ml de sustrato (solución al 2.5 % de dextrana T-70) en tubos de ensaye mantenidos a 40 °C. A fin de llevar a cabo la determinación de actividad se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo, la reacción de hidrólisis sobre la dextrana se detiene al añadir 0.5 ml de la solución de reacción en 0.5 ml de DNS. El color se desarrolla al someter los tubos a un baño a ebullición durante 5 min.

Las lecturas se realizaron por medio de un espectrofotometro a 540 nm (Perkin-Elmer, Mod. Lamba 3A USA)

OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo utilizado fue el de Kosaric (1973) (18), el cual se modificó en base a fermentaciones preliminares a partir del cual se genero el medio base. Se observó que el microorganismo producía un halo marcado cuando se desarrollaba en placas con dextrana azul con un PM promedio de 2 000 000 mientras que en un medio que contenía solo dextrana industrial con PM promedio de 5 000 000 - 40 000 000 el microorganismo no producía la enzima, de lo anterior se penso que si mezclaban estas dos dextranas tal vez el microorganismo después de hidrolizar la dextrana con peso molecular bajo seguiría hidrolizando la dextrana industrial Se hicieron pruebas y el resultado fue positivo. La proporción de ambas fue optimizada al incluirla en la técnica de Box-Wilson con un diseño factorial 2ⁿ (Box and Wilson, 1951) (7)

Cada composición del medio de cultivo se ensayó por duplicado. En la tabla No. 2 aparecen los factores seleccionados y los dos niveles (alto y bajo) ensayados en este trabajo. El nivel base de este experimento aparece en la parte baja de la tabla.

Tabla No. 2.								
COMPOSICION (g/l) DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA LA TECNICA DE BOX-WILSON.								
Dextrana Ind.	7.0				3.0			
Dextrana T-70.	7.0		3.0		7.0		3.0	
Ext. de Lev.	2.2	0.2	2.2	0.2	2.2	0.2	2.2	0.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.2	0.2	2.2	0.2	2.2	0.2	2.2	0.2

Nivel base: Dextrana Ind. 5.0 g/l; Dextrana T-70, 5.0 g/l; Extracto de levadura 1.2 g/l y (NH₄)₂SO₄ 1.2 g/l.

CINETICA DE FERMENTACIÓN.

La cinética de fermentación se describió al evaluar periódicamente la producción de la enzima, el pH y la cantidad de biomasa. El desarrollo de biomasa se siguió por medio de lecturas a 650 nm.

CARACTERIZACION DE LA DEXTRANASA.

La dextranasa presente en el sobrenadante se caracterizó en términos de pH y temperatura óptimos, así como su estabilidad térmica a pH de 5.4 que fue determinado como el óptimo. También fueron evaluados sus parámetros cinéticos básicos.

EVALUACION DE LAS REACCIONES DE HIDROLISIS DE DEXTRANA.

Se disolvió dextrana industrial (Sigma Chem. Co) en guarapo a una concentración de 15 g/l.

La reacción de hidrólisis se evaluó a cabo utilizando un viscosímetro Cannon-Fenske No. 100 que contenía 10 ml de jugo tratado. El viscosímetro se sumergió en un baño de agua con temperatura constante a 55 °C. En el tiempo cero se añadió la enzima para observar a distintos intervalos la disminución del tiempo de caída de la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSION.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN.

1. Aislamiento.

De las muestras de jugo de caña se aislaron microorganismos capaces de utilizar la dextrana como única fuente de carbono. De los cuales se seleccionaron los que presentaban el mayor desarrollo de halo.

De esta manera se seleccionó y aisló una bacteria, capaz de formar el halo con mayor velocidad.

2. Identificación.

La cepa seleccionada fué sometida a una serie de pruebas bioquímicas a fin de identificar el género y la especie a los que pertenece. Los resultados se conjuntan en las tablas No. 3 a la 5. Su morfología se observó en el microscopio electrónico (Fot. 1).

El microorganismo encontrado es pleomorfo y presenta formas bacilares cuando es incubado en condiciones óptimas durante 24 h y formas cocoides después de 48 h de incubación. Se determinó su crecimiento en presencia y ausencia de ciertos factores de crecimiento, características que ayudan para su identificación. La explicación completa de como se realizaron estas pruebas se encuentra reportada en el Apéndice I. El resultado se ilustra en la Figura 3: Cada curva de crecimiento representa el desarrollo del microorganismo en presencia y ausencia de los diferentes factores de crecimiento. Las curvas de crecimiento en presencia de los diferentes factores de crecimiento fueron similares a la de la curva patrón, por lo que se dedujo que el microorganismo no los requiere

Tabla No. 3. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.

Microorganismo pleomorfo.

Tamaño de bacilo: 0.5 x 1.3 micras.

Tamaño del coco: 0.6 micras.

Agrupación en forma bacilar: En cadena.

Presencia de esporas: Negativo.

Gram: Negativo.

Tabla No. 4. Características metabólicas de la cepa aislada.

PRUEBA	RESULTADO
Catalasa.	+
Cápsula.	+
Reducción de nitratos.	+
Indol.	-
Ácido sulfhídrico.	-
Ureasa.	-
Oxidasa.	-
No requiere de factores de crecimiento.	
Leche tornasolada.	Baja el potencial, lo decolora.
Rojo de metilo.	-
Voges-Proskahuer.	-
Crecimiento con NaCl 5 %	-
10 %	
Crecimiento a 10 ° C.	-
30 ° C.	+
40 ° C.	-
Hidrólisis de gelatina.	+ (lenta).
Hidrólisis de almidón.	-
Formación de ácido de:	
Almidón. -	Maltosa. -
L-Arabinosa. -	Manosa. -
Celobiosa. -	Manitol. -
Dextrana. -	Ramnosa. -
Dextrinas. -	Sacarosa. -
Fructosa. -	Salicina. -
Galactosa. -	Sorbitol. -
Glucosa. -	Sorbosa. -
Inositol. -	Trehalosa -
Inulina. -	Xilosa -
Lactosa. -	

Tabla No. 5. CUADRO COMPARATIVO DE LA CEPA AISLADA CON CEPAS CLASIFICADAS.			
Prueba	<i>A. globiformis</i>	<i>C. simplex</i>	Microorganismo desconocido
Tamaño del bacilo (micras)..	0.5-0.8 x 1.4	0.5-0.9 x 1-4.	0.5 x 1.3 prom.
Tamaño del coco (micras).	0.6-0.8	Muy pequeños.	0.6 prom.
Pleomórfico.	+	+	+
Movilidad.	-	(Flagelo subpolar o varios laterales.)	(Un flagelo.)
Espora.	-	-	-
Gram	-	-	-
Cápsula.	?	?	+
Reducción de nitratos.	V	+	+
Indol.	-	?	-
Ac. Sulfhídrico.	-	?	-
Hidrólisis de almidón.	Débil.	-	-
Ureasa.	+	-	-
Oxidasa.	-	?	-
Catalasa.	+	?	+
Aerobia.	+	?	+
Temp. óptima de crecimiento. (°C)	25-33	25-30	30
Tolerancia NaCl.	No crece a 8 %	?	No crece a 5 y 10 %.
Hidrólisis de gelatina.	+	Lentamente.	Lentamente.
Habitat.	Suelo.	Suelo.	Suelo.
Factores de crecimiento.	d(biotina)	-	-
Rojo de metilo.	?	?	-
Voges-Proskauer.	?	?	-
Producción de ácido a partir de:			
Almidón.	-	-	-
L-Arabinosa.	-	-	-
Celobiosa.	-	-	-
Dextrana.	-	-	-

Cont. Tabla No. 5. CUADRO COMPARATIVO DE LA CEPA AISLADA CON CEPAS CLASIFICADAS.

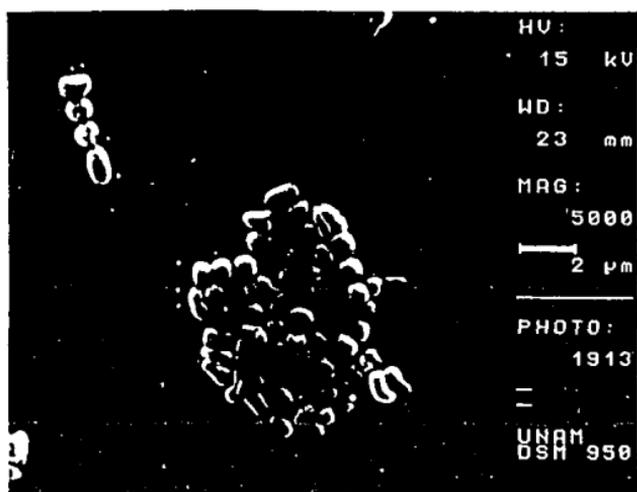
Prueba.	<i>A. globiformis.</i>	<i>C. simplex.</i>	Microorganismo desconocido
Dextrinas.	-	-	-
Fructosa.	-	-	-
Galactosa.	-	-	-
Glucosa.	-	-	-
Inositol.	-	-	-
Lactosa.	-	-	-
Maltosa.	-	-	-
Manosa.	-	-	-
Manitol.	-	-	-
Ramposa.	-	-	-
Sacarosa.	-	-	-
Salicina.	-	-	-
Sorbitol.	-	-	-
Sorbosa.	-	-	-
Trehalosa.	-	-	-
Xilosa	-	-	-

(V = Variable.)
(? = Se desconoce)

Yamada y Komagata, 1972, (30).

Bergeys D:H., 1984 (4).

Saway et al., 1976 (23).



Fot. 1. Fotografía del microorganismo aislado e identificado como *Corynebacterium simplex* (Microscopio electrónico) Tiempo de crecimiento 24 hrs.

CURVA DE CRECIMIENTO

pruebas bioquímicas

Corynebacterium simplex

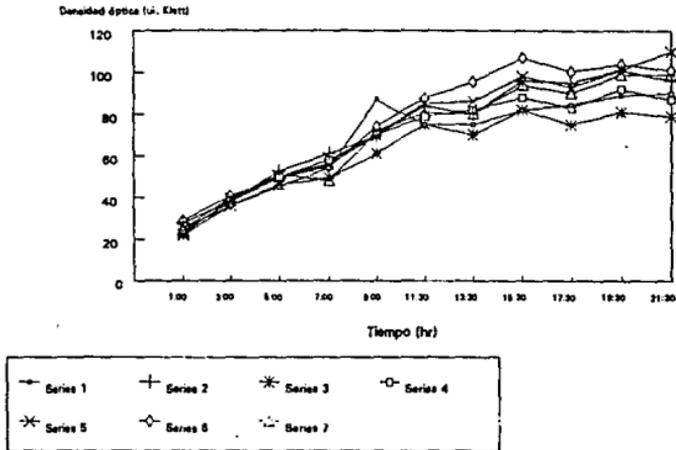


Fig. 3. Crecimiento del microorganismo con factores de crecimiento. 1) Biotina; 2) Tiamina; 3) Biotina, tiamina y ác. nicotínico; 4) Biotina, tiamina y ác. pantoténico; 5) Biotina y tiamina; 6) Tiamina y Vitamina B 12; 7) Referencia sin vitaminas.

En la tabla No. 5 se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas de la cepa aislada y se comparan con los de *Arthrobacter globiformis* y *Corynebacterium simplex*. De este estudio se puede deducir que el aislado presenta características muy semejantes a los de *Corynebacterium simplex*, por lo tanto fue identificado como *C. simplex*. Es muy importante mencionar que este microorganismo no ha sido reportado anteriormente como productor de dextranasas, así como tampoco se conocen reportes de que sea patógeno o que pueda producir derivados tóxicos que puedan dañar la salud.

II. PRODUCCION DE LA ENZIMA.

FERMENTACIONES PRELIMINARES EN MATRACES ERLLENMEYER.

La cepa aislada en este estudio se sometió a una serie de fermentaciones sumergidas preliminares, utilizando como medio el referido anteriormente como una modificación del descrito por Kosaric et al (1973) determinándose la cinética de fermentación por la medición del crecimiento microbiano, la actividad enzimática del sobrenadante y variación del pH. Durante la fermentación el pH del medio disminuyó de 6.8 a valores alrededor de 4.7 a las 40 horas y se estabilizó a partir de este tiempo. La biomasa alcanzó un valor máximo también a las 40 horas, y a partir de este tiempo la lisis fue evidente y se llevó a cabo rápidamente. La actividad enzimática presentó un valor máximo alrededor de las 20 horas después de las cuales la actividad disminuyó marcadamente, aún antes de que el cultivo llegara a etapa de lisis. La actividad enzimática se inició desde las etapas más tempranas de la fermentación y aumentó rápidamente al parecer asociada con el crecimiento del microorganismo. Fig.4.

Cin. Ferm. Standar
 Ferm. standar.
Corynebacterium simplex

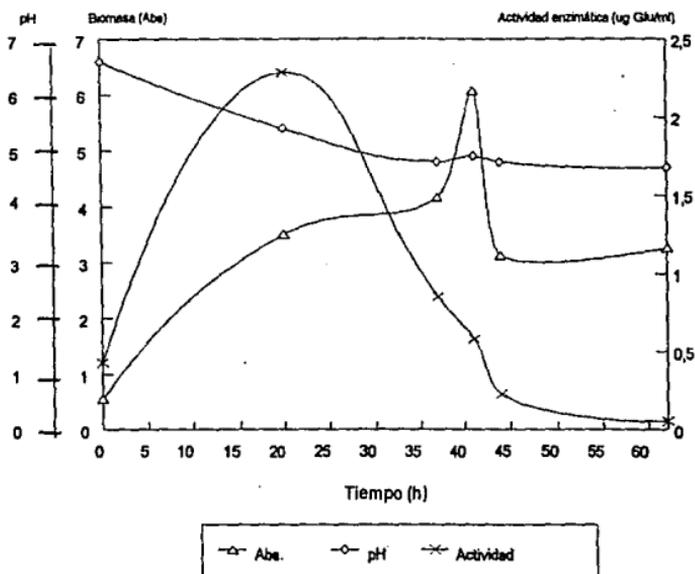


Fig. 4. Cinética de crecimiento de *Corynebacterium simplex* en fermentaciones preliminares con el medio base.

OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo se optimizó con el diseño experimental de Box-Wilson, se utilizaron las siguientes unidades de variación:

2 g/l - Dextrana Industrial.

2 g/l - Dextrana T-70.

1 g/l - Extracto de levadura.

1 g/l - Sulfato de amonio.

La composición de los medios se encuentra reportada en la tabla No. 2, en la sección de Materiales y Métodos. Además de los medios reportados en ella se emplearon como patrones dos medios que contenían sólo un tipo de dextrana (un matraz con 10 g/l de dextrana industrial y un matraz con 10 g/l de dextrana T-70). Las actividades obtenidas en el sobrenadante de la fermentación con los 16 distintos medios de cultivo más los controles se muestran en la tabla no. 6 y se expresan como unidades de dextranasa por ml de sobrenadante (UD/ml).

Tabla No. 6. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD SOBRE DIECISEIS MEDIOS DISTINTOS.

	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	(UD/ml).	Coef. de correlación
I	-	-	-	-	0.00	0.837
II	-	-	-	+	0.00	0.919
III	-	-	+	-	2.97	0.922
IV	-	-	+	+	4.66	0.992
V	-	+	-	-	0.00	0.896
VI	-	+	-	+	0.00	0.825
VII	-	+	+	-	2.83	0.989
VIII	-	+	+	+	4.34	0.998
IX	+	-	-	-	2.20	0.968
X	+	-	-	+	0.00	0.856
XI	+	-	+	-	2.99	0.999
XII	+	-	+	+	4.09	0.999
XIII	+	+	-	-	0.00	0.897
XIV	+	+	-	+	0.00	0.890
XV	+	+	+	-	2.62	0.999
XVI	+	+	+	+	3.73	0.999

Controles: Medio estándar. 1.05 UD/ml.

De acuerdo a los resultados se obtiene la ecuación de correlación óptima:

$$Y = 1.90 + 0.051 X_1 - 0.211 X_2 + 1.629 X_3 + 0.201 X_4$$

Y = actividad enzimática.

X₁ = Dextrana Industrial.

X₂ = Dextrana T-70.

X₃ = Extracto de levadura.

X₄ = (NH₄)₂SO₄

Los coeficientes de correlación al ser multiplicados por su correspondiente unidad de variación nos indica: Aumentar 0.062 g/l la dextrana industrial, 1 g/l el extracto de levadura y 0.123 el (NH₄)₂SO₄ y por otro lado disminuir 0.258 g/l la dextrana T-70. Enseguida se prepararon los medios de cultivo restantes siguiendo la recomendación de los primeros resultados aunque sólo se variaron la concentración de dextrana T-70 y extracto de levadura por ser considerados los factores más significativos. (Los demás componentes se

mantuvieron igual al medio base o estándar reportados en la tabla no. 2.). Los resultados se encuentran reportados en la tabla No. 7.

Tabla No. 7., Resultados finales de la técnica de Box-Wilson.

	Dextrana industrial	(NH ₄) ₂ SO ₄	Dextrana T-70	Extracto de levadura.	Actividad (UD/ml).
Medio base	5.0	1.2	5.00	1.2	1.05
XVII	5.0	1.2	4.74	2.2	4.23
XVIII	5.0	1.2	4.48	3.2	3.37
XIX	5.0	1.2	4.22	4.2	3.34
XX	5.0	1.2	3.97	5.2	3.02
XXI	5.0	1.2	3.71	6.2	2.29
XXII	5.0	1.2	3.45	7.2	2.46
XXIII	5.0	1.2	3.19	8.2	2.14
XXIV	5.0	1.2	2.93	9.2	2.08
XXV	5.0	1.2	2.68	10.2	1.67
XXVI	5.0	1.2	2.42	11.2	1.91

Este diseño factorial permitió aumentar la actividad inicial de 1.05 a valores de 4.23 UD/ml, al disminuir la proporción de dextrana T-70 y aumentar el extracto de levadura. Este aumento de más del 400 % resultó ser muy interesante y la nueva composición del medio de cultivo se utilizó para continuar con la caracterización de la cepa.

La cinética de fermentación de *Corynebacterium simplex* con el medio optimizado se muestra en la Fig. 5. La cepa mostró en este caso una actividad de 4.23 UD/ml con una productividad de 0.114 UD/ml hr.

Cinética de fermentación

medio optimizado

Corynebacterium simplex

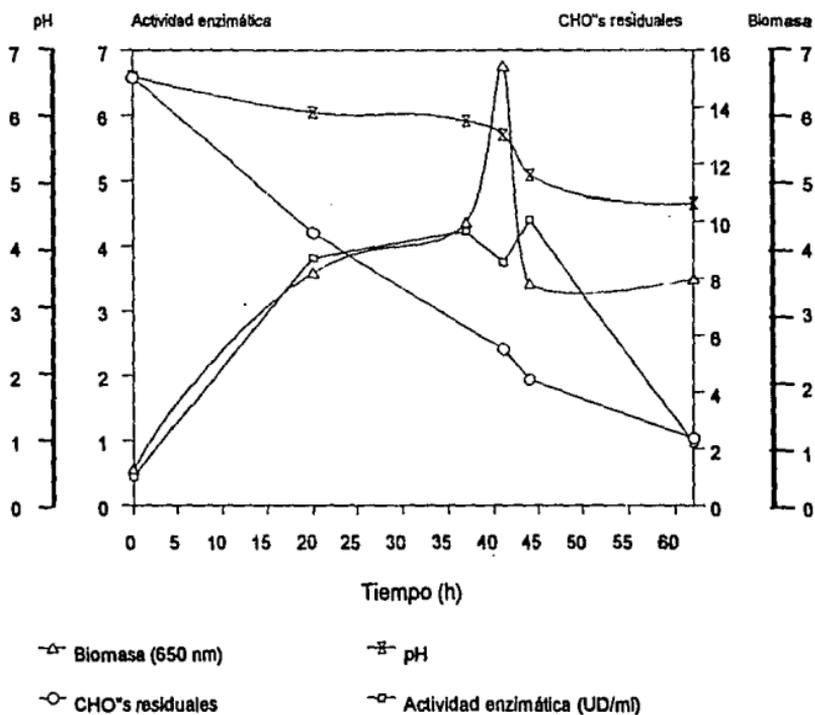


Fig. 5. Cinética de crecimiento de *Corynebacterium simplex* en fermentación con el medio optimizado.

Esta gráfica presenta perfiles similares a los mostrados por las fermentaciones preliminares con respecto a los valores de pH y producción de biomasa. El tiempo de duplicación de biomasa resulta cercano a las 26 horas. La actividad enzimática en este medio optimizado muestra como se esperaba una actividad importante desde los primeros tiempos de muestreo y en este caso podría decirse que la producción enzimática está asociada al crecimiento.

III. CARACTERIZACION DE LA ENZIMA.

EFFECTO DEL pH Y DE LA TEMPERATURA.

El pH óptimo de actividad de *Corynebacterium simplex* fué de 5.4, similar al que se ha reportado para otras dextranasas de diferente origen. La enzima conserva un 80% de su actividad a un valor de pH de 7.0 en las condiciones del ensayo estipuladas anteriormente (Fig. 6)

La temperatura óptima de actividad se presentó a 55 °C y fué medida en un ensayo de actividad de 9 minutos de incubación (Fig. 7). Para conocer si esta dextranasa mostraba una estabilidad térmica adecuada a la temperatura que sería empleada para su aplicación comercial se realizó una incubación a diferentes temperaturas durante 90 minutos (Fig. 8). Como resultado se obtuvo que a 50 °C al enzima cuenta con una vida media de 57.75 min, a 55 °C de 43.31 min y a 60 °C de 12.60 min mientras que a 40 °C la enzima es completamente estable a tiempos de por lo menos 90 min. Estos valores se determinaron apartir de la ecuación $kt_{1/2} = 2.3 \log 1/0.5$ de donde se despeja $t_{1/2} = 0.693/k$, k representa la constante de primer orden de la velocidad de desnaturalización.

pH OPTIMO
Corynebacterium simplex

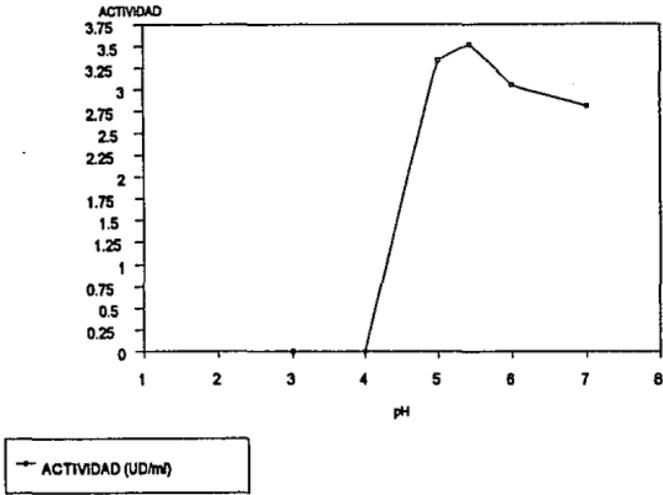


Fig.. 6. Efecto del pH sobre la actividad de la dextranasa de *Corynebacterium simplex*. (Temperatura 40° C).

TEMPERATURA OPTIMA

Corynebacterium simplex

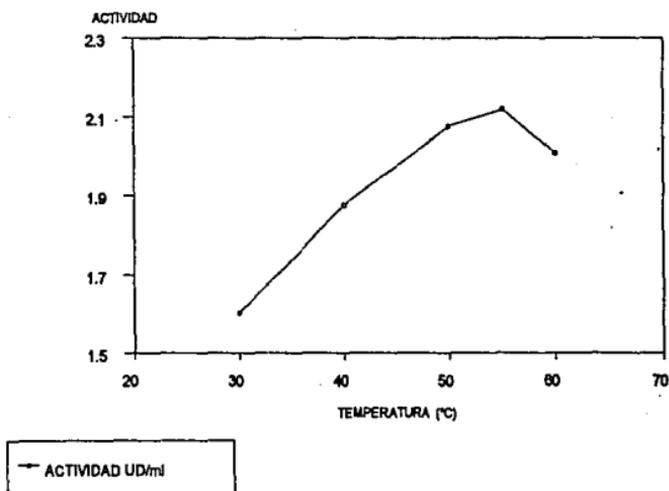


Fig. 7. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la dextranasa de *Corynebacterium simplex* (pH de 5.4)

Estabilidad de la dextranasa. *Corynebacterium simplex*

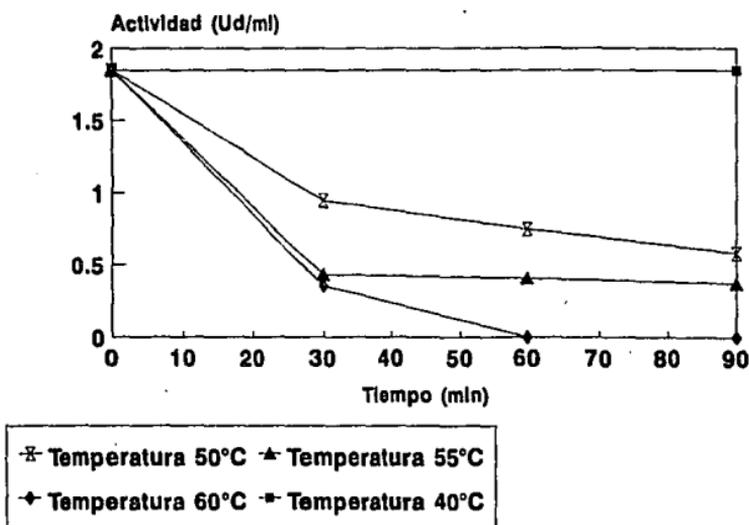


Fig 8 Estabilidad de la dextranasa de *Corynebacterium simplex* a la temperatura (Dextrana T-70 al 2.5 % pH=5.4)

CINETICA ENZIMATICA.

El efecto de la concentración de sustrato (dextrana T-70) sobre la velocidad inicial de la dextranasa de *Corynebacterium simplex* se muestra en la Fig. 9. La dextranasa presenta una Km promedio de 0.277 % (2.77 g/l) y una V max promedio de 3.759 UD/ml las cuales se calcularon utilizando el sobrenadante de la fermentación sin purificar ni concentrar, sobre dextrana T-70. La cinética enzimática desarrolla un comportamiento que puede ser descrito por el modelo de Michaelis-Menten. La Km de esta enzima está en el intervalo que normalmente presentan las constantes de otras dextranasas, entre ellas las dextranasas fungales de *P. lilacimus* estudiadas en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM. (Gálvez y López. 1991).

Efecto de la concentración dextrana T-70
sobre dextranasa.
Corynebacterium simplex

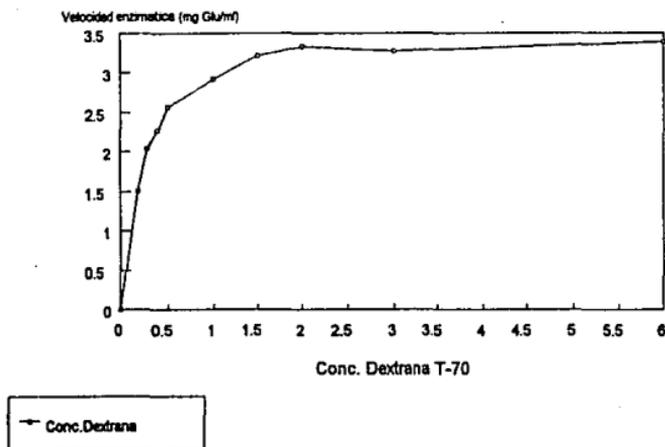


Fig. 9. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de la dextranasa.

HIDROLISIS DE LA DEXTRANA EN JUGO DE CAÑA.

Para examinar las posibilidades de utilizar esta enzima en un proceso industrial se llevó a cabo una hidrólisis sobre dextrana industrial adicionada a un jugo de caña. Se determinaron los tiempos de caída en un viscosímetro capilar. La dextranasa fue dosificada con 1.04 UD/g de dextrana industrial (Peso molecular promedio de 5- 40 millones en promedio). Las condiciones de hidrólisis fueron 55° C, ya que es la temperatura a la que se lleva a cabo el proceso en el ingenio y un pH de 5 que es el natural del jugo de caña. Aún a estas temperaturas que claramente implicarían una desnaturalización parcial de la enzima (de acuerdo con las observaciones de las Fig. 6 y 7), los datos obtenidos muestran una disminución notable y de forma asintótica en los tiempos de caída del jugo en el capilar. Estos tiempos disminuyeron 3 veces el tiempo original en reacciones de hidrólisis llevadas a cabo durante 100 min, lo que indica que la enzima tiene un efecto importante sobre la viscosidad de la goma, aún a 55° C. (Fig. 10).

Hidrólisis enzimática
jugo de caña
Corynebacterium simplex

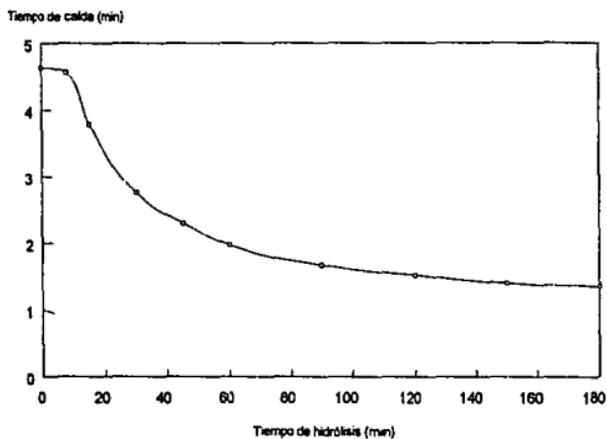


Fig. 10. Disminución de viscosidad de jugo de caña adicionado con dextrana industrial (15 g/l) en viscosímetro capilar Cannon-Fenske No. 100, T=55 °C, pH=5.0 natural del jugo de caña.

CONCLUSIONES.

1. Se aisló y seleccionó una cepa bacteriana capaz de producir rápidamente un halo a fin de examinar sus posibilidades para producir la enzima en fermentaciones sumergidas por lotes.
2. Esta bacteria productora de dextranasa fue identificada mediante sus características metabólicas como *Corynebacterium simplex*, que no ha sido reportada previamente como productora de esta enzima.
3. Con un medio de cultivo modificado que contenía dextrana de peso molecular controlado y dextrana de alto peso molecular (grado industrial) y basándose en experiencias preliminares en nuestro laboratorio, se obtuvieron actividades enzimáticas cercanas a 1 UD/ml de sobrenadante.
4. Se llevó a cabo una optimización del medio de cultivo mediante el uso de un experimento factorial 2^n que mostró la importancia del efecto de la fuente de carbono y de la fuente de nitrógeno en la producción enzimática. La actividad enzimática después de la optimización mostró valores de 4.2 UD/ml lográndose un aumento en la actividad enzimática de 400 % al modificar las proporciones de dextrana T-70 y extracto de levadura.
5. La cepa de *Corynebacterium simplex* produce una dextranasa con temperatura y pH óptimos de 55°C y 5.4 respectivamente. Esta enzima tiene una buena estabilidad a 40°C.
6. La cinética de esta enzima se ajustó al modelo de Michaelis-Menten y mostró un valor de K_m de 2.8 g/l (dextrana T-70) similar a otras dextranasas fungales estudiadas.
7. En un experimento que simuló las condiciones del tanque de retención donde se añadiría la dextranasa, se utilizó la enzima de *Corynebacterium simplex* en un proceso de hidrólisis de un jugo de caña añadido con dextrana industrial a una temperatura de 55°C y a pH de 5. La enzima fue capaz de disminuir la viscosidad del jugo a un 30% del valor original en un período de 100 minutos, lo que resulta interesante para una posible aplicación industrial, a pesar de su termoestabilidad.

REFERENCIAS.

1. Almazan O. A. Bell y L. González (1968). Estudio sobre la producción de dextrana técnica en Cuba. Mem. XXXVIII Conf. Atac, Cuba.
2. Alsop R. M. (1983) Industrial production of dextrans. Progress in industrial microbiology, Vol. 18. Microbiol. polisaccharides. Ed. by M. E. Bushell. Elsevier, Amsterdam p. 1-7.
3. Bayley R. W., Clarke R. T. J. (1959) A bacterial dextranase. Bioch. Vol. 72. p. 49-54.
4. Bergey D. H. (1984) Manual of sistematic bacteriology. Seccion 15, Vol. 2. Ed. Board and Trustees of Bergey's Manual Trust. USA. p. 1300.
5. Bevan D. and Bond, J. (1971) Microorganisms in fiel and Mill. A preliminary survey. Proc. Conf. Queensl. Soc. Sugar Cane Technol. 38 Th. p. 137-143.
6. Bibbins M. M. D. (1990) Caracterización de enzimas extracelulares de microorganismos aislados en la caña de azucar. Tesis de Lic. Fac. de Quím. UNAM.
7. Box. G. E. P. and Wilson, K. B. (1951) On the experimental attainment of oprimum conditions. J. Royal Statistica; Soc. Ser. B. 13 (1). p. 1-45.
8. Cheetam, P. S. J. (1987) Screening for novel biocatalyst. Enzyme Microb. Technol. Vol. 9. April. p. 194-213.
9. Fosado, M. M. (1986) Dextranasas y su aplicación en la Tecnología de alimentos. Tesis de Lic. Fac. de Quím. UNAM.
10. Gálvez, M. M. A. (1992) Desarrollo de un sistema para la producción y aplicación de dextranasas. Tesis doctoral. UNAM.
11. Gálvez, M. M. A., López-Munguía, C. A. (1991). Production and characterization of dextranase from and isolated *Paecilomyces lilacinus* strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 327-331.
12. Guilarte, B., Rodriguez, J., Cuervo, R. y Pacheco, N. (1986) Aislamiento y caracterización de microorganismos productores de dextranasa. Rev. Lat-amer. Micobiol. 28: 331-337.
13. Hattori, A. and Ischibashi, K. (1981) Screening of dextranase producing microorganisms. Agric. Biol. Chem. 45 (10): 2347-2349.
14. Hiraoka, N., Fukumoto, J. And Tsuru, D. (1972) Studies on mold dextranses III. Purification and some enzymatic properties of *Aspergillus carneus*; J. Biochem. 71:57-64.
15. Ingelman, B. (1948) Enzymatic Brekdown of dextran; Acta Chemica Scand. 2: 803-812.

16. Janson, J. C. (1975) Dextran degrading enzymes, isolation and identification of a dextranase producing strain of *Cytophaga johnsonii* and studies on the formation of the surface bound enzyme. Journal of general microbiology. Vol. 88. p. 205-208.
17. Koenig, D. W. and Day, D. F. (1988) Production of dextranase by *Lipomices starkeyi*. Biotechnol. Letters 10 (2):117-122.
18. Kosaric, N., Yu, k. and Zajic, J. F. (1973) Dextranase production from *Penicillium funiculosum*. Biotech. and Bioengineering Vol. XV, p. 729-741.
19. López-Munguía, C.A. (1979) Production, purification et immobilization de la dextranasacharase de *Leuconostoc mesenteroides*. Tesis Doctoral, Insa Toulouse, Francia (1979).
20. Madhu and Prabhu, K. A. (1984) Studies of dextranases from *Penicillium aculeatum*. Enz. Microbiology Technol. 6 (5) p. 217-220.
21. Meade, G. P. (1948) Cane sugar handbook. J. Wiley, N. Y. p. 405-413.
22. Richards, G. N. and Streamer M. (1974) Studies on dextranases IV. Mode of action of dextranase D on oligosaccharides; Carbohydrates Research 32, 251-260.
23. Saway, T., Yamaki, T. and Toshihide, O. (1976) Purification and some properties of *Artrobacter globiformis* exo 1-6 alfa glucosidase. Agr. Biol. Chem., 40 (7):1293-1299.
24. Shukla, G. L., Madhu and Prabhu, K. A. (1989) Study of some parameters for the production of dextranase by *Penicillium aculeatum*. Enz. Microbiology Technol. 11(8): 533-536.
25. Simonson, L. G. et al (1975) Characterization of an extracellular dextranase from *Fusarium moniliforme*. Applies. Microbiology. p. 855-861.
26. Sugiura, M., Ito, A. and Yamaguchi, T. (1974) New exodextranase from *Brevibacterium fuscum* var. Dextranolyticum. Biochem. Biophys. Acta 350:61-70.
27. Sugiura M. and Ito, A. (1974) Studies on dextranase III Action patterns of dextranase from *Penicillium funiculosum* on substrate and inhibition on hydrolysis reaction by substrate analogues. Chem. Pharm. Bull. 22 (7):1593-1599.
28. Sumner, J. B. and Howell, S. T. (1934) A method for determination of saccharase activity. J. Biol. chem. 108: 51-54.
29. Tsuchiya, H. M., Jeanes A., Bricker, H. M. And Wilham, C. A. (1952) Dextran degrading enzymes from molds. J. Bacteriol. 64: 513-519.
30. Yamada, K. and Komagata, K. (1972). Taxonomic studies on Coryneform bacteria. IV Morphological, cultural, biochemical and physiological characteristics. J. Gen. Appl. Microbiol., 18:399-416

APENDICE I.

Prueba de la catalasa.

La mayoría de los microorganismos que se desarrollan en condiciones aeróbicas presentan la enzima catalasa.

Reactivo.- Peróxido de hidrógeno al 30 %.

Método.

Agregar directamente 1 ml de H₂O₂ al 30 % a un cultivo puro que se encuentra en pico de flauta, densamente inoculado. Observar inmediatamente formación de burbujas (liberación de gas).(2)

Presencia de cápsula. Tinción Negativa.

La producción de cápsula detectable es frecuentemente dependiente de la composición del medio y de la edad del cultivo. La mayoría de las cápsulas son polisacáridos y se detectan cuando el crecimiento del microorganismo se encuentra en un período estacionario en presencia de un exceso de carbohidratos utilizables.

Reactivos.-

Solución de Nigrosina al 2 %.

Solución de fucsina fenicada diluida: 10 ml en 150 ml de agua destilada.

Método.

En un cubre objetos perfectamente limpio y libre de residuos grasos colocar una capa muy fina de la colonia del microorganismo. No fijar. Aplicar una gota de fucsina fenicada en un extremo del portaobjetos extender sobre toda la capa de la muestra hasta llegar al otro extremo del portaobjetos. Lavar con agua destilada y agregar nigrosina extender, cuando la nigrosina se haya secado completamente observar bajo un objetivo de inmersión. (1)

Reducción de nitratos.

Si un microorganismo que crece en presencia de oxígeno, es capaz de reducir a los NO se puede considerar como una bacteria anaerobia facultativa.

Medio empleado.-

Agua peptonada con adición de 1 % de Nitrato de Potasio (grado analítico). El medio se distribuye en tubos con tubos invertidos Durham, y se esteriliza en autoclave por 15 min. a 121 °C y 15 lb.

Reactivos.- Reactivos Griess-Ilosvay.

Reactivo 1.

Acido sulfanílico 1 g
Acido Acético 100 ml

Reactivo 2.

a-Naftol 1 g
Etanol 95 % 100 ml

Método.

Agregar 1 ml de cada reactivo a los tubos con el cultivo y al control (tubo sin inocular).

Fase 1.

Prueba positiva.

Color rosado a rojo intenso.

Nitrato (NO_3) reducido a nitrito (NO_2) por el organismo.

Prueba negativa.

No se ha desarrollado color.

Seguir con la fase 2.

Fase 2.

Prueba negativa.

Al añadir al medio zinc (Zn) forma un complejo con el nitrato dando una coloración que va de rosado a rojo intenso. indica que el nitrato presente no ha sido reducido por el organismo.

Prueba positiva.

Si al añadir el zinc (Zn) No hay un desarrollo de color, significa ausencia de nitrito (NO_3) en el medio.

El organismo redujo el nitrato (NO_3) en nitrito (NO_2) y luego redujo nuevamente el nitrito.(1 y 2).

Prueba de RMVP.

Prueba de Rojo de Metilo sirve para distinguir entre aquellos microorganismos que producen y mantienen una alta concentración de ácidos de aquéllos que producen inicialmente una menor cantidad y que además son capaces de atacar a estos mismos ácidos volviendo el medio neutro a alcalino.

Prueba de Voges y Proskauer algunos microorganismos producen acetil metil carbinol y lo oxidan a diacetilo el cual al combinarse con arginina, creatina o creatinina da una coloración rosa.

Medio empleado. -

Se utiliza medio preparado por Bioxon de México, S.A. de C.V. (No. del Medio en el catalogo 122-1).

Formula aproximada en gramos por litro:

Peptona especial No. 1	. 7.0
Dextrosa	5.0
Fosfato dipotásico	5.0
pH final 6.9±0.2	

Preparación:

Disolver 17 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Distribuir y esterilizar 121 °C a no más de 15 lb de presión durante 15 min.

Reactivos:

Indicador Rojo de Metilo.-	
Rojo de metilo	0.1 g
Etanol	300 ml
Diluir a 500 ml de agua destilada.	

Reactivo Voges-Proskauer.-

Preparación de hidróxido de potasio: Se disuelve 40 g de hidróxido de potasio en 100 ml de agua destilada.

Preparación de alfa-naftol: Disolver 5 g de alfa-naftol en 100 ml de etanol absoluto.

Método.

Indicador Rojo de Metilo.-

A 5 ml de un cultivo de 5 días, se le agregan 5 gotas de solución indicadora. Reacción positiva color rojo, si el color es amarillo la prueba es negativa.

Reacción Voges-Proskauer.-

A 5 ml del cultivo se le agregan 5 ml del reactivo, que contiene sulfato cúprico y amonio. La aparición en 20 min de un color rojo de eosina indica la presencia de acetil-metil-carbinol. (3)

PRUEBA SIM.

Es un medio simisólido que detecta la producción de sulfuro, indol y movilidad del microorganismo.

Producción de sulfuro de hidrógeno.- Es el producto de la descomposición de compuestos orgánicos azufrados como cisteína y cistina, o por la reducción de compuestos inorgánicos azufrados como el sulfito.

Producción de Indol.-El indol es producido por el desdoblamiento de la molécula de triptófano el cual es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias. La peptona es recomendada para esta prueba ya que es rica en triptófano.

Prueba de motilidad.- Las bacterias tienen motilidad por medio de sus flagelos. Las bacterias pueden contener uno o muchos flagelos, además de que su localización varía con la especie. (1).

Medio empleado.-

Se utiliza medio preparado Bioxon (No. de Cat. 101-)

Formula aproximada en gramos por litro:

Peptona de caseína	20.0
Peptona de carne	6.1
Sulfuro de Hierro y Amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.5
pH final	7.3-0.2

Preparación:

Suspender 30 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar durante 10 min y hervir a ebullición durante un minuto. Distribuir en tubos de ensaye a una altura de 4 cm y esterilizar en autoclave a 121 °C a 15 lb durante 15 min.

Reactivos.-

Reactivo de Kovacs para la prueba de Indol.

Alcohol isoamílico	150 ml
p-Dimethylaminobenzaldehído	10 g
Acido clorhídrico concentrado	50 ml

Disolver el aldehído en el alcohol, después agregar lentamente el ácido. Mantener en refrigeración. (1).

Método.

Sembrar la cepa pura en estudio por picadura, alcanzando ésta unos 3/4 de la longitud de la columna. Incubar a 30 °C durante 18-24 hrs y leer los resultados.

Ennegrecimiento nos indica producción de sulfuros. Desarrollo solo a lo largo de la punción, inmovilidad. La movilidad del germen se revela por una turbidez difusa en el seno del medio, y la producción de Indol por medio del reactivo de Kovacs, que da una coloración roja púrpura si es positiva.

PRUEBA DE LA UREASA.

Sirve para determinar la capacidad de un microorganismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa.

Medio empleado.-

Caldo preparado por Productos BBL (1/4 lb. BBL 11796).
El cual se prepara de acuerdo a la fórmula de Rustigian y Stuart.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Urea	20.00
Fosfato monopotásico	9.10
Extracto de levadura	0.10
Rojo fenol	0.01
pH final	6.8±0.2

Preparación:

Se usan 3.87 g para cada 100 ml. de agua destilada. Cuando el polvo se haya disuelto se pasa a través de un filtro bacteriológico estéril. Se distribuye en porciones de 2 ml en tubos pequeños estériles.

Normalmente el medio completo tiene un color rosa pálido y un pH neutro de 6.8 a 7.0, cuando se ataca la urea por el microorganismo se produce amoníaco que alcaliniza el medio, lo que se puede apreciar con el cambio de color púrpura intenso a rojo azulado lo cual se pone en evidencia por el cambio de color del indicador rojo fenol. (4).

PRUEBA DE LA OXIDASA.

Determinar la presencia de la enzima oxidasa.

Reactivos.-

Diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina 8 mM

El reactivo deberá permanecer en un frasco oscuro y bajo refrigeración.

Método.

Colocar en un trozo de 6 cm de papel de filtro Whatman No. 1 en una caja de Petri. Agregar de 2 a 3 gotas de reativo de Kovacs en el centro del papel. Hacer un extendido con el asa de inoculación de una colonia sospechosa, en el papel impregnado con el reactivo. Las colonias oxidasa positivas toman un color rosado mientras que las oxidasa negativas no experimentan ningún cambio de color. (4)

REQUERIMIENTO DE FACTORES DE CRECIMIENTO

Numerosas vitaminas son necesarias para satisfacer los requerimientos para el desarrollo de muchos microorganismos. Entre ellas se pueden mencionar biotina, ácido pantoténico y ácido nicotínico.

Fórmula en gramos por litro de los medios empleados para determinar los requerimientos para los factores de crecimiento del microorganismo en estudio.

Medio de propagación.

Formula en gramos por litro de agua destilada.

Extracto de levadura	2.2
Sulfato de amonio	2.2
Fosfato diácido potásico	1.0
Sulfato de magnesio hepta-hidratado	0.5
Cloruro de potasio	0.5
Cloruro de calcio	0.4
Dextrana industrial	3.0
(5-40 mill. de daltons en prom.)	

Dextrana T-70 3.0

pH aproximado 7.0, Temperatura de incubación 30 °C. Agitación de 100 rpm.

Medio de cultivo con requerimientos y control.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Sulfato de amonio	10.0
Fosfato diácido de potasio	2.4
Dextrana T-70	1.0
Factores de crecimiento	20 microg/ml

pH aproximado de 7.0, Temperatura de incubación 30 °C. Agitación 100 rpm.

Factores de crecimiento:

Los factores que se mencionan a continuación se utilizaron por que se ha visto que algunos microorganismos de este género requieren de estas vitaminas en las combinaciones mencionadas a continuación, que fué como se adicionaron al medio mencionado:

1. Biotina
2. Tiamina
3. Biotina, tiamina y ác. nicotínico.
4. Biotina, tiamina y ác. pantoténico.
5. Biotina y tiamina.

Método.

Se inocula el microorganismo productor de dextranasas y se incuba durante 24 hrs a 30 °C. Se centrifuga a 3000 rpm durante 30 min con el fin de obtener sólo las células del microorganismo, el paquete celular se lava con amortiguador de fosfatos, pH de 7.0 (esta operación se repite 3 veces). Con las células resuspendidas en el amortiguador de fosfatos se inoculan matraces con brazo lateral con el objeto de seguir el crecimiento con el uso del colorímetro de Klett, utilizando el filtro rojo a una longitud de onda de 540 nm.

Aparatos empleados:

Centrifuga Damon/IEC Division.

Incubadora con agitación, New Brunswick Scientific, Edison N.J., USA.

Colorímetro Klett.

CRECIMIENTO EN NaCl.

La tolerancia del microorganismo a concentraciones elevadas de sal se detecta en un medio apropiado.

Medio empleado.

Caldo nutritivo Bioxon de México, S.A. de C.V. Cat. 103-1

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Peptona de gelatina 5.0

Extracto de carne de res 3.0

pH final 6.9 ± 0.2

Medio con NaCl.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Caldo nutritivo 8.0

Cloruro de sodio 5.0 y 10.0

Esterilizar a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 lb durante 15 minutos. (3)

PRUEBA DE LECHE TORNASOLADA.

La leche tornasolada es un medio diferencial que se emplea para determinar varias funciones metabólicas de un organismo: fermentación de la lactosa, caseólisis y coagulación de la caseína.

Medio empleado.

Leche tornasol BBL 11342.

Método.

Se agregan 100 g de polvo a un litro de agua destilada, de preferencia precalentada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se distribuyen 2 ml/tubo. Se esteriliza de $113\text{-}115\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min.

Interpretación.

a) Rojo rosado.

1. Reacción ácida.

2. Fermentación de la lactosa.

b) Azul púrpuro.

1. No hay fermentación de la lactosa.

2. No hay cambio en el indicador del pH tornasol, igual que el tubo no inoculado.

c) Azul.

1. Reacción alcalina.

2. No hay fermentación de la lactosa.

3. El organismo ataca las sustancias nitrogenadas que se encuentran en el medio.

d) Blanco.

Reducción del tornasol a una leucobase.

e) Formación de cuajo, coagulación de la proteína de la leche.

f) Digestión.

Se ha digerido la proteína de la leche.

Aclaración del medio.

g) Gas (CO_2 y H_2)

Burbujas en el medio.

El coágulo puede desintegrarse.

h) Fermentación turbulenta.

El coágulo ácido se fragmenta por la abundante producción de gas. (4).

CRECIMIENTO A 10, 30 Y 40 °C.

Medio empleado.

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Dextrana industrial 10.0

(5-40 mill. de daltons prom.)

Sulfato de amonio 2.4

Fosfato diácido de potasio 1.0

Agar 15.0

pH final 7.0

Colocar los tubos a incubación a las temperaturas de 10, 30 y 45 °C.

HIDROLISIS DE GELATINA

Se emplea para la identificación de microorganismos proteolíticos.

Medio empleado.

Gelatina Bioxon. (Cat. 158-1)

Caldo nutritivo con adición del 10-15 % de gelatina. pH 7.2. Esterilizar en autoclave 20 min a 115 °C. (15 lb)

Método.

Se inoculan los tubos y se dejan crecer durante 30 días a una temperatura de 30 °C. (3).

HIDROLISIS DE ALMIDÓN.

Reactivo.

Solución de Iodo.

Iodo	1.0 g
Ioduro de potasio	2.0 g
Agua destilada	300.0 ml

Medio empleado.

Caldo nutritivo (Bioxon) adicionado 1-5 % de almidón soluble mas 1.5 % de Agar.

Método.

Adicionar 5-6 gotas del reactivo sobre las colonias. Si se tiñe el medio de azul el resultado es negativo, mientras que si aparecen zonas claras indicara que el almidón ha sido hidrolizado. (3)

FORMACIÓN DE ÁCIDO A PARTIR DE CARBOHIDRATOS.

Fermentación de carbohidratos.

Medio empleado.

Base de caldo rojo fenol (1/4 lb. BBl 11505)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada.

Peptona Trypticase	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo Fenol	0.018
pH final 7.4±	

Preparación:

Se disuelven 15 gramos del polvo en un litro de agua destilada, agregandole de 5-10 gramos de carbohidratos. Para investigar la formación de gases, utilizar tubos Durham invertidos. Esterilizar 116-118 °C no más de 12 lb de presión durante 15 min.

La formación de color amarillo es indicio de fermentación (4)

Referencias.

Apendice I.

- (1) Harrigan, W.F. y McCance Margaret E. Laboratory Methods in Food an Dairy Microbiology. Ed. Academic Press, 1976. 15-16, 68, 71, 311, 316.
- (2) Mac Faddin Jean F. Prueba Bioquímicas de Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Ed. Medica Panamericana, S.A. 1984. 39, 145-147.
- (3) Manual Bioxon., Bioxon de México, S.A. de C.V. 41, 60-61.
- (4) Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos BBL. Becton Dickinson de México, S.A. de C.V. 121-125, 132, 148, 154-158.