

## Tesis de Posgrado

# Estudios fermentativos en cepas pertenecientes al género *Bacillus*

Castro, Guillermo Raúl

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Castro, Guillermo Raúl. (1991). Estudios fermentativos en cepas pertenecientes al género *Bacillus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2483\\_Castro.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2483_Castro.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Castro, Guillermo Raúl. "Estudios fermentativos en cepas pertenecientes al género *Bacillus*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2483\\_Castro.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2483_Castro.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS FERMENTATIVOS EN CEPAS PERTENECIENTES  
AL GENERO *BACILLUS*

Licenciado en Ciencias Químicas

Guillermo Raúl Castro

Tesis  
2483  
y.2

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR

**Dirección: Dr. Faustino Sifferiz**

**Lugares de trabajo**

**Laboratorio de Microbiología, Depto. de Química Biológica,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad de Buenos Aires**

**Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos  
(PROIMI) - Tucumán  
CONICET - FECIC - MIRCEN**

El presente trabajo está especialmente dedicado a:

la memoria de mi padre,  
la memoria de tío Pascual,  
mi madre,  
mis tías Margarita y Maruca,  
mi querido hijo Ariel.-

### Agradecimientos especiales

Al Dr. Faustino Sifferiz, por la confianza que supo depositar en mí, su calidez humana, así como por la libertad con la que ha permitido desenvolverme y crecer científicamente durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Beatriz S. Méndez, por su confianza y estímulo en los emprendimientos que acometí durante el período presente.

Al Dr. Julio M. Azcurra, quien me ha brindado un permanente estímulo científico a lo largo de mi carrera, abriéndome las puertas de su laboratorio y brindándome su sincera e inapreciable amistad.

Al Dr. Enrique Marshoff, quien como Director del Depto. de Biología del Instituto Antártico Argentino apoyó desinteresadamente el proyecto de investigación desarrollado en el presente trabajo desde sus inicios, brindándome su confianza y amistad.

A los Dres. Victoria Tafuri y Alberto Baldi por permitirme ingresar a sus respectivos laboratorios e iniciarme así en las tareas de investigación.

Al Ing. Danley Callieri, por el estímulo científico que supo brindarme a través de sus comentarios y críticas que fueron siempre de gran valor para mí.

Al Dr. Eduardo Charreau, por sus enseñanzas como docente y sus consejos en momentos difíciles.

Al Dr. Martín Crespi por la confianza que supo depositar en mí durante los primeros años de mi labor en investigación y su valiosa amistad.

A la Dra. Alicia Ragout, por sus enseñanzas en el manejo de fermentadores, su constante estímulo y su calidez humana.

Al Dr. Carlos M. Abate, con quien compartí largas horas de laboratorio y discusiones, las cuales dieron origen a una perdurable amistad.

A los Licenciados Marcela A. Ferrero y Luis M. Ducrey Santopietro, con quienes compartí largas horas de arduo trabajo, y me brindaron su comprensión en momentos muy difíciles.

A Pablo E. Andribet, Adrián O. Stettler y Gustavo F. García con quienes compartí intensas y agradables horas en el laboratorio.

Al personal Genética Bacteriana, particularmente a los Lic. Julia Pettinari, Mirtha Floccari, Gustavo Tiscornia y Pablo Cueto, por su buena voluntad y por generar un ambiente de agradable camaradería.

Al personal de Biología Celular por facilitar parte del equipamiento empleado en el desarrollo del presente trabajo, en particular al Dr. Juan Brusés, a los Lic. Eleonora Katz y Gustavo Ibarra quienes me brindaron su desinteresada amistad.

Al cuerpo de profesores e investigadores del Area de Microbiología del Depto. de Qca. Biológica y del PROIMI, quienes me brindaron su confianza y apoyo.

## Indice

<b>Objetivos.....</b>	<b>1</b>
<b>1.- Introducción</b>	
1.1.- Antecedentes.....	2
1.2.- Almidón.....	3
1.3.- Edulcorantes.....	6
1.4.- Enzimas de uso industrial.....	11
1.5.- Enzimas amilolíticas.....	14
1.6.- Producción de enzimas de uso industrial por cepas pertenecientes al Género <i>Bacillus</i> .....	18
1.7.- Taxonomía del Género <i>Bacillus</i> .....	20
1.8.- Cultivos microbianos.....	23
<b>2.- Materiales y Métodos</b>	
2.1.- Técnicas microbiológicas.....	29
2.1.1.- Medios de cultivo.....	29
2.1.2.- Aislamiento y selección de microorganismos.....	30
2.1.3.- Cepas de referencia.....	33
2.1.4.- Cultivos microbianos.....	33
2.1.5.- Caracterización microbiológica.....	34
2.1.5.1.- Estudios morfológicos.....	35
2.1.5.2.- Estudios bioquímicos.....	35
2.1.5.2.1.- Ensayos de degradación.....	35
2.1.5.2.2.- Ensayos de tolerancia.....	38
2.1.5.2.3.- Otros Ensayos.....	39
2.1.5.2.4.- Sistema Api.....	42
2.1.6.- Ensayo de sensibilidad a antibióticos.....	42
2.1.7.- Determinación de actividad dextrinizante en placa...	43
2.2.- Técnicas espectrofotométricas.....	44
2.2.1.- Determinación de Hidratos de Carbono.....	44
2.2.2.- Determinación de actividades enzimáticas.....	45
2.2.3.- Determinación de Proteínas.....	47

2.2.4.- Determinación de concentración celular.....	52
2.3.- Determinación de pH y temperatura óptimos.....	55
<b>3.- Resultados</b>	
3.1.- Relevamiento y selección de cepas.....	56
3.2.- Caracterización microbiológica.....	59
3.3.- Cultivo de <i>B. amyloliquefaciens</i> y <i>B. subtilis</i> .....	65
3.3.1.- Producción de $\alpha$ -Amilasa.....	65
3.3.2.- Producción de $\alpha$ -Glucosidasa.....	68
3.3.3.- Producción de Pululanasa.....	70
3.3.4.- Producción de $\beta$ -amilasas.....	71
3.3.5.- Producción de proteasas.....	72
3.4.- Propiedades de las enzimas en estudio.....	98
<b>4.- Discusión</b>	
4.1.- Relevamiento y selección de cepas.....	100
4.2.- Caracterización microbiológica.....	101
4.3.- Cultivos de <i>B. amyloliquefaciens</i> y <i>B. subtilis</i> .....	102
4.3.1.- Cultivos en lote	103
4.3.2.- Efecto de la temperatura y el pH en la producción de enzimas.....	109
4.3.3.- Cultivo continuo.....	110
4.3.4.- Comparación de las técnicas de cultivo.....	114
4.4.- Propiedades de las enzimas.....	116
<b>5.- Conclusiones.....</b>	<b>119</b>
<b>6.- Bibliografía.....</b>	<b>121</b>
<b>7.- Abreviaturas.....</b>	<b>132</b>



## OBJETIVOS

En el presente trabajo se persiguieron los siguientes objetivos:

- aislamiento de cepas salvajes pertenecientes al Género *Bacillus* productoras de enzimas amilolíticas.
- determinación de las capacidades amilolíticas de las mismas y su comparación respecto de las cepas de colección.
- caracterización microbiológica de las cepas aisladas de acuerdo a criterios internacionalmente empleados.
- caracterización de las actividades enzimáticas intervinientes en la degradación de almidones en las cepas seleccionadas.
- estudios de producción de las enzimas detectadas empleando distintos sistemas de cultivo.
- determinación de los efectos de la temperatura y el pH sobre las diferentes actividades enzimáticas detectadas.

## 1.- INTRODUCCION

### 1.1.- Antecedentes

La conversión de productos naturales efectuada por microorganismos ha sido empleada desde hace milenios por el hombre. Sin embargo, la utilización industrial de las capacidades biosintéticas de las células para la producción en gran escala es relativamente reciente, y se debe principalmente a la necesidad de resolver problemas globales concernientes a salud, alimentos y energía, entre otros.

Paralelamente a los avances de la Biología y la Química modernas, la importancia de los procesos microbiológicos ha experimentado un incremento notable en las últimas décadas. Ello se debe a la búsqueda de nuevas sustancias con mayor efectividad en su accionar, mayor capacidad microbiana de síntesis de moléculas activas respecto de los métodos químicos, sumado a una elevada selectividad biosintética a pesar de emplear materias primas con bajos niveles de pureza. Entre estas últimas debemos destacar la importancia de la degradación de polímeros naturales, como el almidón, en constituyentes de menor peso molecular, que ha sido y es motivo de estudio desde larga data debido a la importancia del mismo en diversas actividades del hombre.

Un grupo de sustancias de particular interés biotecnológico son las enzimas, cuyo explosivo auge a mediados de los años 70 ha tenido un gran impacto en la sociedad que puede observarse por la producción de vitaminas, aminoácidos, antibióticos, edulcorantes, etc...; y de las cuales pocas se han podido sintetizar en el laboratorio y ninguna enzima de uso industrial se ha sintetizado artificialmente (Phaff, 1981).

## 1.2.- Almidón

El almidón es el polímero vegetal de reserva más abundante en la naturaleza y desde la antigüedad distintas civilizaciones lo han empleado con diversos fines. Prueba de ello son los adhesivos encontrados en papiros egipcios que datan entre 3500-4000 años A.C., las descripciones persas de la obtención de "miel artificial" por degradación parcial de almidón utilizada en el tratamiento de heridas (975 años D.C.), o en los documentos chinos de papel cubiertos con una delgada cobertura de almidón que datan 300 años D.C. (Whistler, 1984).

Los primeros estudios sobre su composición química datan de principios del siglo XIX y demostraron que es un homoglucano compuesto por unidades  $\alpha$ -D-glucopiranosil con enlaces (1 $\rightarrow$ 4) y (1 $\rightarrow$ 6) de glucosa. Pero fue recién en la década del 40 cuando diversos grupos de investigación llegaron a la conclusión de que está constituido por dos tipos distintos de compuestos : amilosa y amilopectina (Radley, 1976).

La amilosa es un polímero lineal de glucosa con uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), cuya unidad repetitiva es la maltosa (4-O-( $\alpha$ -D-glucopiranosil)- $\alpha$ -D-glucopiranososa) (Figura 1a). La misma posee estructura helicoidal y un peso molecular promedio que oscila entre 20 a 60 kD. Entre sus propiedades fisicoquímicas más importantes se destacan la de precipitar de soluciones acuosas en presencia de elevadas concentraciones de alcoholes y la capacidad de formar complejos en soluciones de iodo-ioduro, los que presentan una coloración azul característica con un máximo de absorción a 650 nm (Whistler, 1984).

La amilopectina es un polímero ramificado que posee uniones  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6, estas últimas denominadas puntos de ramificación, en donde la unidad repetitiva es isomaltosa (6-O-( $\alpha$ -D-glucopiranosil)-D-glucopiranososa) y cuyas ramificaciones poseen en promedio 25 a 30 moléculas de glucosa

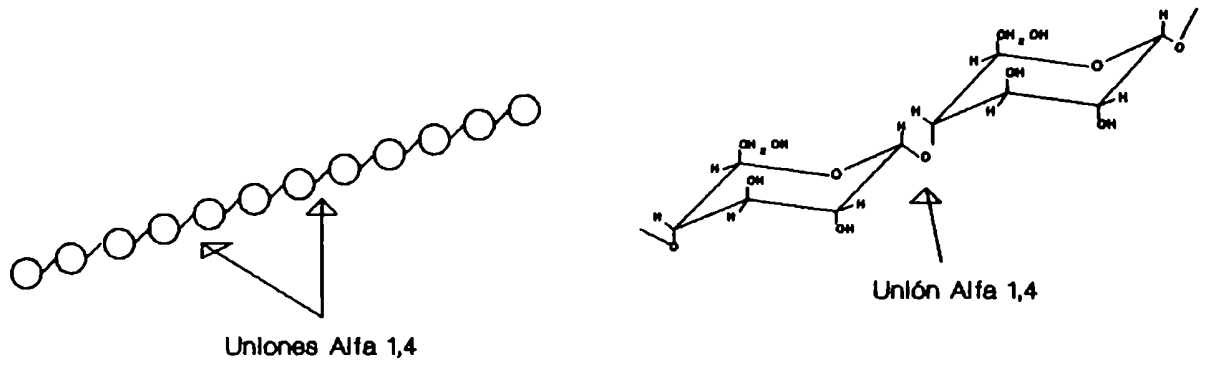
(Figura 1b). El polímero posee una estructura al azar y un peso molecular promedio que va de 100 a 1000 kD; es soluble en solventes polares y los complejos de iodo-ioduro son escasamente coloreados de rojo-violeta, con un máximo de absorción a 550 nm.

Actualmente se ha encontrado una tercera fracción, que posee características intermedias respecto a las anteriores, y que puede considerarse como una amilopectina menos ramificada. Las características estructurales de dicha fracción son dependientes del procesamiento del almidón (Whistler, 1984). En general, las proporciones de amilosa y amilopectina varían según la fuente de origen, aunque para los almidones de papa (*Solanum tuberosum*) y de maíz (*Zea mays*), comúnmente empleados en la industria, las composiciones son de aproximadamente 20 % de amilosa y 80 % de amilopectina (Zajac, 1989).

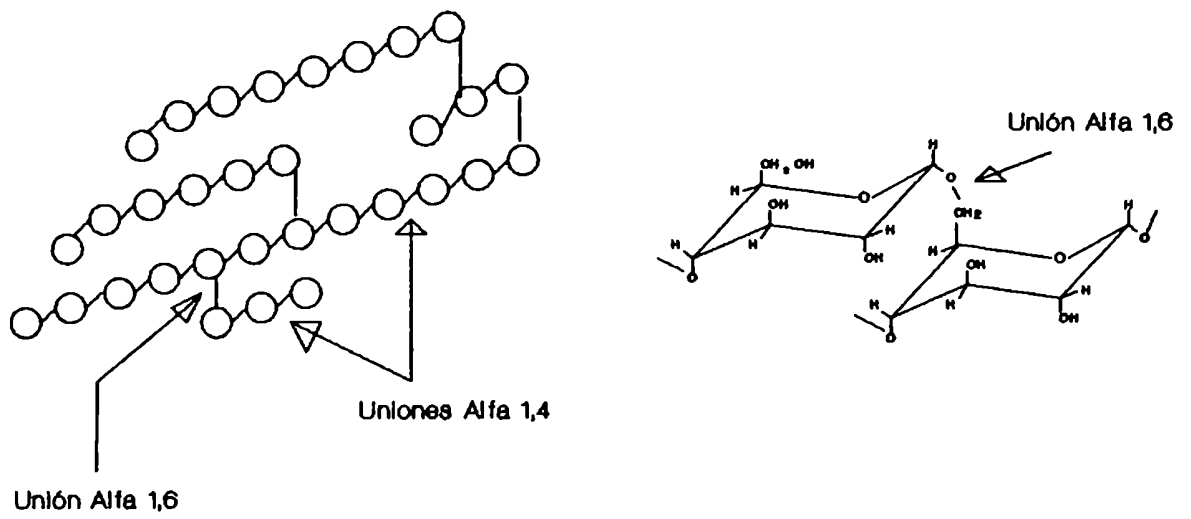
Para poner de manifiesto la importancia económica del almidón, es conveniente considerar la producción mundial anual estimada en  $8 \cdot 10^6$  Toneladas, siendo de aproximadamente 500.000 toneladas anuales en América Latina. Las fuentes de obtención y su distribución mundial se observan en las figuras 2a y 2b respectivamente (Zajac, 1989).

Actualmente, existen múltiples aplicaciones industriales de los almidones, ya sea en estado nativo o modificado por algún tratamiento físico o químico. Así, el nacimiento de los procesos enzimáticos industriales iniciado a partir de su conversión en jarabes de glucosa y/o fructosa con elevado poder edulcorante condujo a la búsqueda de sistemas con mayor eficiencia. Los mismos han propulsado el descubrimiento de enzimas con diferentes actividades catalíticas, posibilitando la transformación de almidón en moléculas con distintas

**Figura 1a.** Amilosa.



**Figura 1b.** Amilopectina.



propiedades y aplicaciones, a bajos costos y con mayores rendimientos.

Otra área de importancia industrial, debida principalmente a los elevados costos requeridos para la obtención de energía, es el uso de almidón o subproductos del mismo para la producción de solventes, etanol principalmente. A su vez, la producción de componentes de plásticos biodegradables, fabricación de papel, absorbentes especiales y aditivos en sistemas de recuperación terciaria de aceites, han ido incrementándose en los últimos años e implican una gran potencialidad.

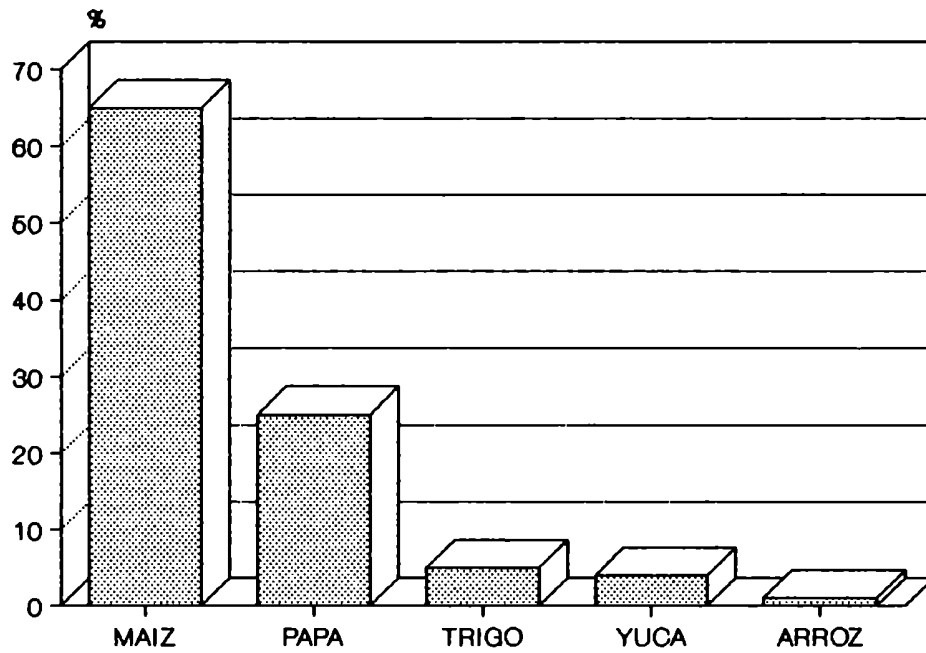
Por último, la tercer gran área de empleo de almidón es la industria alimentaria: tradicionalmente, los hidratos de carbono constituyen el 80% de las calorías consumidas por el hombre en su dieta diaria y dos tercios de ellas son obtenidas a partir de almidón o de la conversión del mismo (Knighth, 1969; Whistler, 1984).

### **1.3.- Edulcorantes**

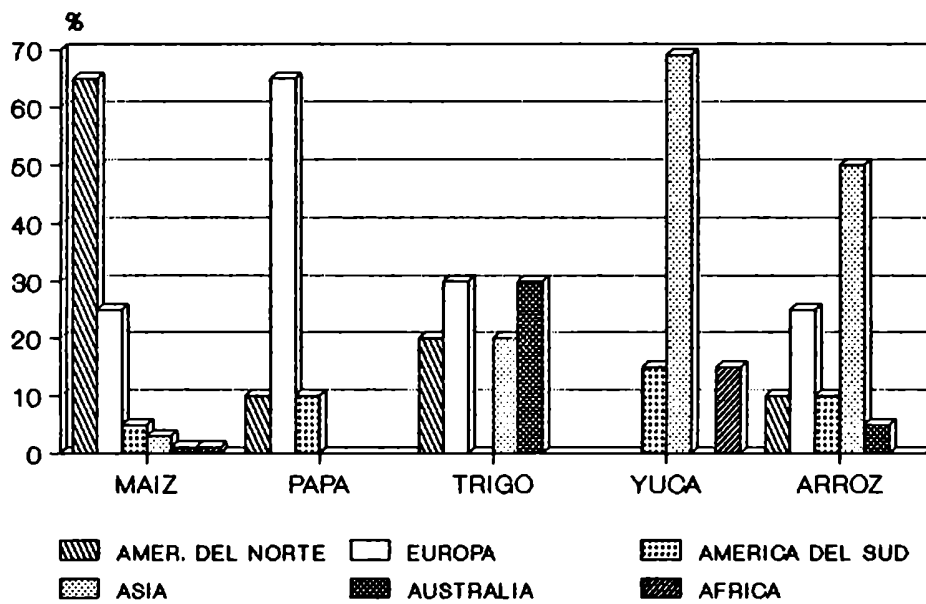
La degradación parcial o total del almidón en oligosacáridos tiene como resultado un tipo de compuestos con propiedades organolépticas particulares que se denominan comúnmente edulcorantes. Dichos productos se emplean como componentes de alimentos, bebidas, fármacos y principalmente en la producción de confituras. Ellos incluyen, jarabes líquidos y sólidos, maltodextrinas, fructosa y glucosa.

Tradicionalmente, la degradación de almidón en escala industrial se realizaba mediante hidrólisis química, la cual involucraba elevadas concentraciones de ácido y altas temperaturas. Dichas condiciones no sólo convierten a los polímeros en sus unidades monoméricas, sino que promueven la degradación de glucosa a productos no deseados como

**Figura 2a.** Producción mundial de almidón.



**Figura 2b.** Distribución geográfica de la producción de almidón.



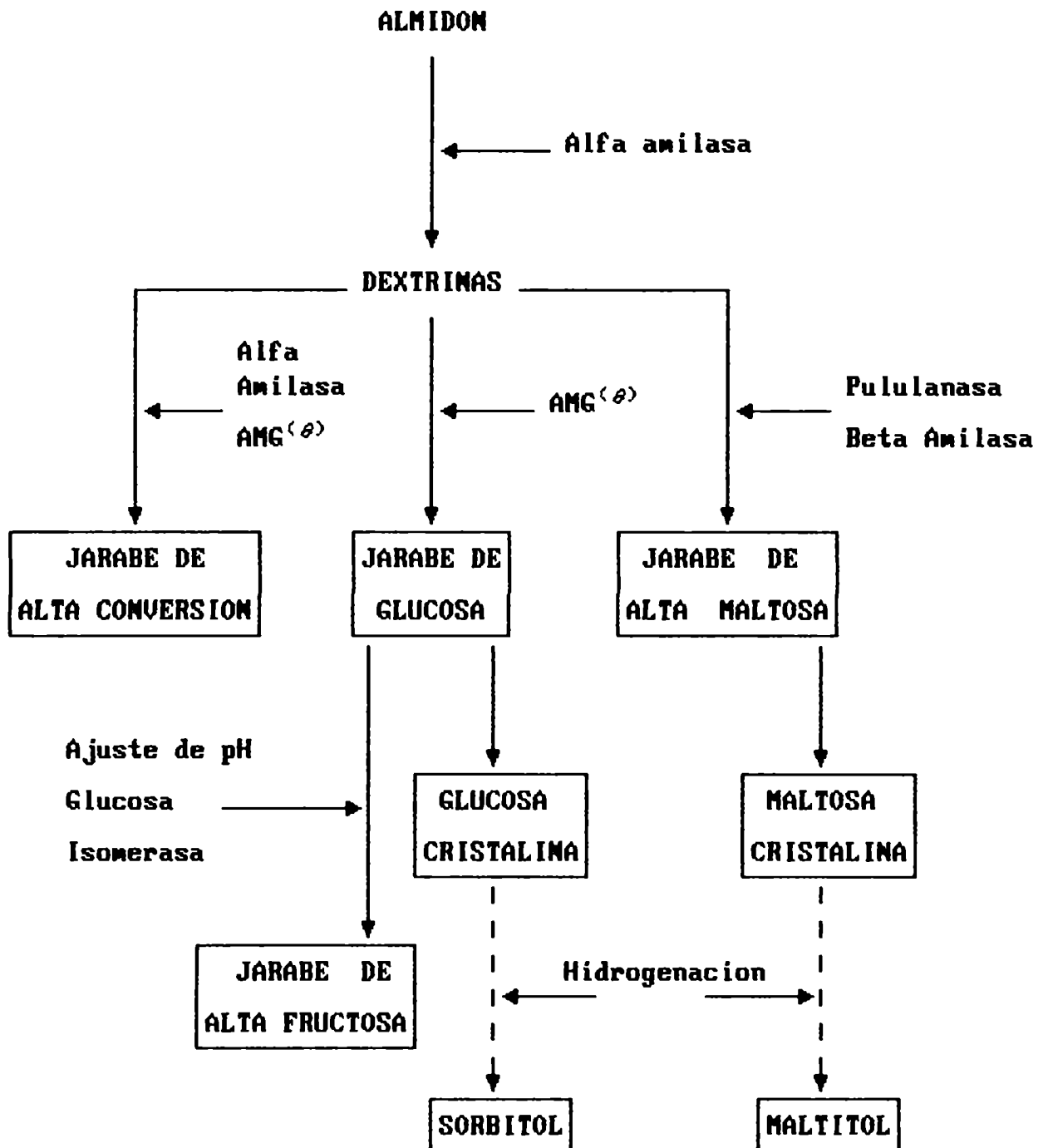
furfurales, ácido fórmico, etc...(Radley, 1976). Con la aparición en escena de las técnicas enzimáticas, las reacciones secundarias fueron reducidas y aumentó en forma considerable el rendimiento de la conversión desde 86 al 96-97 % de glucosa (Kooi y Armbuster, 1967). Actualmente los jarabes se obtienen a partir de almidón refinado empleando enzimas que hidrolizan en forma selectiva amilosa y amilopectina en cadenas de corta longitud. El control del proceso permite la obtención de diferentes "cortes" con distinta composición química y por lo tanto con diferentes propiedades de viscosidad, retención de agua, dulzura, pardeamiento por calor, etc.... Los más conocidos, debido a su masivo empleo por su elevado poder edulcorante son los jarabes de glucosa, los jarabes de alto contenido de maltosa (que poseen un mínimo contenido de glucosa y un 28-65 % de maltosa), y los jarabes de maltosa de alto contenido de fructosa (Hobbs, 1983). Un esquema de la obtención de los mismos se muestra en la Figura 3.

Las maltodextrinas son un conjunto de oligosacáridos, producto de la hidrólisis parcial del almidón, que poseen un elevado contenido polimérico y bajo poder edulcorante. Se emplean en coberturas de dulces y confituras, y como espesantes de alimentos en donde reemplazan a la albúmina bovina (Mc Donald, 1984).

La dextrosa, denominación comercial de la D-glucosa, posee una capacidad edulcorante equivalente a un 75-80 % de la sacarosa. Por efecto de la temperatura sus soluciones adquieren un color pardo no deseado, Sin embargo, por sus propiedades de elevada higroscopicidad, compresibilidad y contenido de humedad, es empleada en la confección de gelatinas, jaleas, coberturas de masas y chocolates (Hobbs, 1983).



FIGURA 3. Produccion de edulcorantes.



(θ) Amilogucosidasa.

La fructosa, resultado de la isomerización enzimática de la glucosa, es 1,3 a 1,7 veces más dulce respecto de la sacarosa y debido a que este producto está alcanzando precios competitivos en el mercado paulatinamente está desplazando el uso de glucosa y/o sacarosa. Por otro lado dado que puede metabolizarse sin insulina, se la utiliza en la preparación de alimentos para diabéticos.

La búsqueda de edulcorantes con propiedades especiales, como ser baja capacidad de producir caries o bajo poder calórico, ha motivado el desarrollo de una nueva área de productos: los hidrolizados hidrogenados de almidón, denominados alcoholes-azúcares, como ser maltitol, manitol, sorbitol (Figura 3), etc...(Appl y col., 1989).

La relevancia económica del área de edulcorantes originados como productos de la degradación de almidón puede observarse en la tabla I (Durand, 1982).

Tabla I. Producción de edulcorantes

	<u>C.E.E.</u>	<u>E.E.U.U.</u>	<u>JAPON</u>
<u>Producto</u>	<u>Toneladas</u>		
Jarabes de Glucosa	950.000	2.600.000	400.000
Maltodextrinas	50.000	70.000	35.000
Glucosa cristalina	250.000	600.000	140.000
Fructosa cristalina	12.700	4.200	- - -
Sorbitol	98.000	92.000	103.000
Manitol	2.000	4.000	700

#### 1.4.- Enzimas de uso industrial

Todas las formas conocidas de vida producen enzimas que pueden ser obtenidas de tres fuentes naturales diferentes: plantas, animales y microorganismos.

El concepto del empleo de enzimas en actividades industriales, se puede remontar al año 1894 cuando J. Takamine patentó en E.E.U.U. una enzima que denominó diastasa (actualmente amiloglucosidasa) de origen fúngico para la producción de etanol.

En los años 30 se inicia el empleo de pectinasas para la clarificación de jugos de fruta en Alemania (Mehlitz, 1930). Pero no fue sino hasta los años 50, en donde las industrias de licores comienzan la búsqueda de sistemas enzimáticos más eficientes con la finalidad de reemplazar las enzimas obtenidas de cereales, iniciándose los estudios en los sistemas microbianos.

En el período que va desde 1965 a 1975, comienza una expansiva etapa en la producción industrial de enzimas, a partir de los logros obtenidos con una proteasa producida por una cepa de *B. licheniformis*, que tuvo gran éxito en la industria de detergentes; de igual modo tres reninas microbianas fueron introducidas al mercado de consumo europeo. En ese mismo período, el elevado costo de la sacarosa y la gran disponibilidad de glucosa hizo posible el desarrollo del proceso industrial de isomerización a fructosa.

La industria cervecera comienza a aplicar enzimas como  $\alpha$ -amilasas, proteasas y  $\beta$ -glucanasas microbianas. Asimismo las industrias farmacéuticas inician el empleo de enzimas microbianas para la síntesis de antibióticos con mayor efectividad.

De las aproximadamente 2000 enzimas descritas, menos del 3% poseen alguna importancia industrial, pero en la década de los años 70 han sido patentados más de 100 diferentes procesos enzimáticos nuevos o modificaciones de los mismos (Aunstrup y

col., 1979; Taylor y col., 1979). En el mercado industrial son escasas las enzimas de origen animal y vegetal, ello es debido a los inconvenientes de producción que presentan: disponibilidad limitada en el caso de las enzimas de origen animal o variaciones de la producción estacionales-climáticas, en el caso de las de origen vegetal. Por otro lado, los conocimientos adquiridos en las últimas décadas sobre el metabolismo microbiano, las técnicas de manipulación genética, así como el desarrollo de nuevas técnicas de fermentación y recuperación de productos, sumado a los bajos costos de producción, han motivado la búsqueda de enzimas microbianas como catalizadores para su potencial uso industrial. Entre ellas se destacan en particular las enzimas intervinientes en la degradación de almidón, como se muestra en la Tabla II (Aunstrup, 1977; Stewart, 1987).

En 1982, se producían aproximadamente 1400 toneladas de enzimas, con una venta anual estimada cercana a los 350 millones de dólares norteamericanos (Stewart, 1987). Si se efectúa una discriminación por sectores, se puede comprobar que el 60 % de la producción corresponde a uso alimenticio, el 25 % a uso como componente en agentes deterivos, 10 % a uso farmacológico y un 5 % a otros rubros (Eveleigh, 1981). Sin embargo la producción en gran escala de enzimas está restringida a unas pocas, correspondiendo una cifra cercana al 80 % del mercado a 6 enzimas, como puede verse en la tabla III.

Se debe destacar además que el 60 % de la producción de enzimas se concentra en tres empresas de origen europeo (Katz y col., 1987), con la consecuente polarización tecnológica que ello representa.

Tabla II. Enzimas microbianas de importancia industrial en la degradación de almidones.

Enzimas	Microorganismos
Alfa-amilasas bacterianas	<i>Bacillus acidocaldarius</i> , <i>amyloliquefaciens</i> , <i>caldolyticus</i> , " <i>licheniformis</i> .
Alfa-amilasas fúngicas	<i>Aspergillus niger</i> , <i>oryzae</i> . <i>Paecilomyces subglobosum</i> . <i>Penicillium expansum</i> .
Alfa-glucosidasas	<i>Bacillus cereus</i> , <i>circulans</i> . <i>Mucor javanicus</i> .
Amilasas "sacarificantes" bacterianas.	<i>Bacillus amylosacchariticus</i> , <i>natto</i> , " <i>subtilis</i> Marburg.
Amilasas "maltogénicas" y enzimas desramificantes.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>cereus</i> , <i>circulans</i> , <i>megaterium</i> , <i>polymyxa</i> . <i>Pseudomonas deramosa</i> . <i>Streptomyces</i> spp. <i>Aerobacter aerogenes</i> .
Amiloglucosidasas	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Endomyces</i> sp. <i>Rizhopus</i> spp., <i>T. viridae</i> .

En América Latina, el desarrollo de procesos biotecnológicos es escaso, en consecuencia existe una gran deficiencia en la producción de enzimas de uso industrial. Es

así, que Argentina importa enzimas por un monto aproximado al millón de dólares norteamericanos al año (INDEC, 1990).

**Tabla III. Producción de enzimas industriales.**

Enzima	Origen	Cantidad**	Monto*	Referencia
Proteasas	fúngica y bacteriana	530	66	Taylor y col., 1979
$\alpha$ -Amilasa		380	12	
Glucoamilasa	fúngica	320	36	
Glucosa isomerasa	bacteriana	120	56	
Renina		26	64	
Pectinasa	fúngica	20	8.5	Aunstrup, 1979

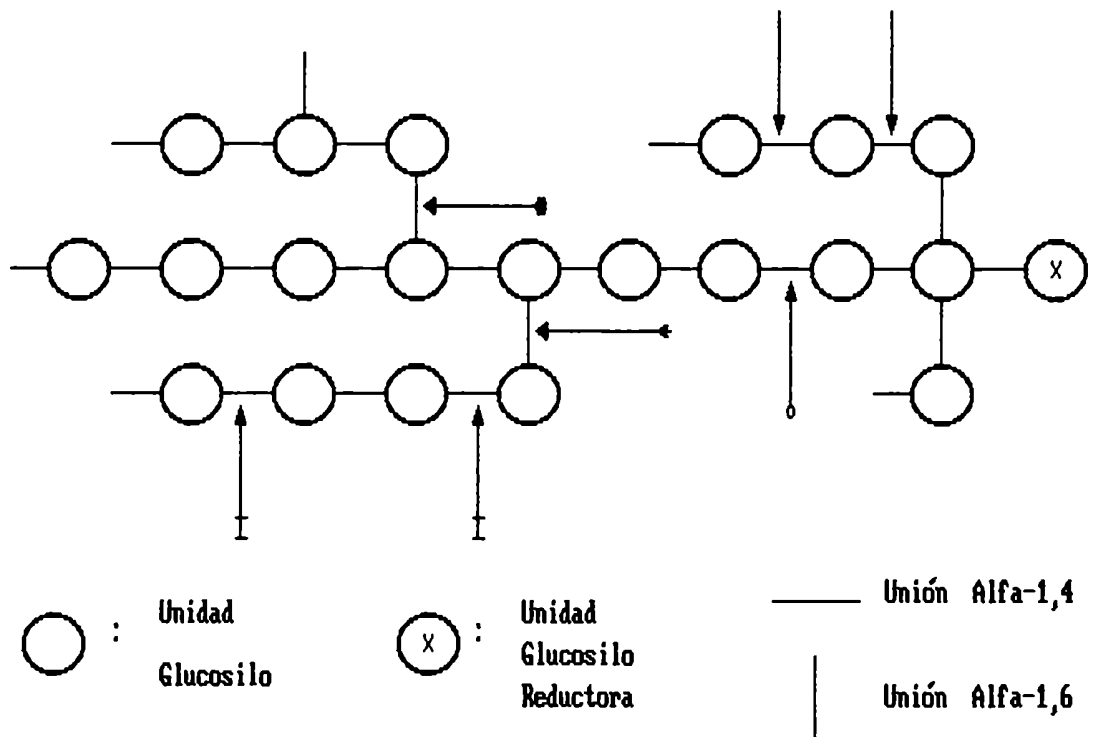
\* Cantidad expresada en toneladas anuales. \*Los montos están expresados en millones de dólares (E.E.U.U.).

### 1.5.- Enzimas Amilolíticas

Se denominan genéricamente enzimas amilolíticas a las proteínas con actividad catalítica capaces de degradar polímeros con configuración  $\alpha$ -D, almidón o sus componentes y oligómeros. Desde el punto de vista de su accionar, como se observa en la Figura 4, pueden ser clasificadas dependiendo del tipo de unión glucosídica que hidrolizan en las seis clases que se describen a continuación (Fogarty y Kelly, 1979):

1. Endo  $\alpha$ -1,4 glucanohidrolasas, son enzimas que hidrolizan las uniones  $\alpha$ -1,4 y no poseen actividad catalítica sobre las uniones  $\alpha$ -1,6. Ejemplo de ello son las  $\alpha$ -amilasas (1,4- $\alpha$ -D-glucan-4-glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.1), denominadas así en base a los productos de la reacción que retienen la configuración  $\alpha$ -D en el carbono 1 de la glucosa; estas enzimas actúan hidrolizando exclusivamente las uniones  $\alpha$ -1,4

FIGURA 4. Esquema de accion de enzimas amilolíticas.



Tipo de Glucosidasa	Nombre Común	Actividad Principal	Producto Principal	Símbolo
Endo Alfa-1,4	Alfa Amilasa	Alfa-1,4	Amilodextrinas	○ →
Exo Alfa-1,4	Beta Amilasa	Alfa-1,4	Beta-maltosa	⊥ →
	Gamma Amilasa	Alfa-1,4 (Alfa-1,6)	Glucosa (Amilosas)	→
Alfa-1,6	Isoamilasa	Alfa-1,6	Amilosas	■ →
	Pululanasa	Alfa-1,6 (Alfa-1,4)	Amilosas (Amilodextrinas)	→

localizadas en regiones internas de amilosa y amilopectina, sin producir niveles significativos de glucosa. Actúan mediante un mecanismo al azar y donde no exista impedimento estérico para su actividad catalítica (Greenwood y Milne, 1968).

2. Exo  $\alpha$ -1,4 glucanohidrolasas, son enzimas que actúan sobre las uniones  $\alpha$ -1,4, pero la presencia de uniones  $\alpha$ -1,6 detiene su actividad catalítica. Su accionar se produce desde los extremos no reductores del sustrato, hidrolizándolos en forma secuencial por un mecanismo procesivo. En el caso de las  $\beta$ -amilasas (1,4- $\alpha$ -D-glucan maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.2), el producto principal es maltosa. Estas enzimas ampliamente distribuidas en el reino vegetal (Fogarty y Kelly, 1980) han sido descritas en algunas especies pertenecientes al género *Bacillus* (Griffin y Fogarty, 1973; Higashihara y Okada, 1974; Takasaki, 1976). En cepas de *Bacillus subtilis* se ha hallado en oportunidades la presencia simultánea de  $\alpha$ -amilasas "sacarificantes" y "licuantes", las cuales no han sido caracterizadas en profundidad (Windish y Mhatre, 1965; Fogarty y Kelly, 1980). Las  $\beta$ -amilasas difieren en sus propiedades inmunológicas y electroforéticas de las  $\alpha$ -amilasas (Welker y Campbell, 1967a; Aunstrup, 1977). A principios de la década de los 80, se reportó la presencia simultánea de  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas en cepas pertenecientes al Género *Bacillus* (Stark y col., 1982), aunque el análisis de los productos de reacción indicarían la presencia de "una enzima" que presenta propiedades catalíticas comunes a  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa (Fogarty y Kelly, 1980). Estudios conducentes a la caracterización de este tipo de enzimas mediante la purificación de  $\beta$ -amilasa extracelular, permitieron la detección de tres fracciones (Shinke y col., 1975). Estos resultados pueden ser interpretados en el marco de un reciente trabajo donde se ha descrito la presencia de un único gen que codifica para  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasa (Uozumi y col., 1989).



3. Enzimas capaces de hidrolizar uniones  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6, son aquéllas cuyo principal producto es la glucosa. Ejemplo de éstas son las amiloglucosidasas (1,4- $\alpha$ -D-glucan glucohidrolasa, E.C. 3.2.1.3) las cuales pueden actuar sobre almidón hidrolizando las uniones  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 aunque a velocidades de reacción muy bajas (Fogarty y Kelly, 1980).

4. Enzimas  $\alpha$ -1,6 glucanohidrolasas, comúnmente denominadas desramificantes, hidrolizan las uniones  $\alpha$ -1,6 pero no presentan actividad catalítica sobre las uniones  $\alpha$ -1,4. Dentro de este grupo han sido descritas dos tipos de enzimas: pululanasa e isoamilasas. Las primeras, pululano 6-glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.41), cuyo nombre deriva de la actividad catalítica sobre pululano (polímero lineal de maltotriosas ligadas entre sí por uniones  $\alpha$ -1,6 glucosídicas), posee también actividad catalítica sobre amilopectina. Las isoamilasas, glucógeno 6-glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.68), actúan también sobre la amilopectina pero con la diferencia que no hidrolizan pululano (Lee y Whelan, 1971; Urlaub y Wober, 1975a).

5. Enzimas que hidrolizan uniones  $\alpha$ -1,4 oligosacáridos, como por ejemplo las  $\alpha$ -glucosidasas ( $\alpha$ -D-glucósido glucohidrolasa, E.C. 3.2.1.20).

6. Ciclodextrina glicosiltransferasas, las cuales al actuar sobre almidón producen polímeros cíclicos con uniones D-glucosilo denominados dextrinas de Schardinger (Kato y col., 1988).

### 1.6.- Producción de enzimas de uso industrial con cepas del Género *Bacillus*

El género *Bacillus* es uno de los más importantes protagonistas en la producción de enzimas de empleo industrial debido principalmente a que en la mayoría de los casos éstas son de tipo extracelular (Priest, 1977). Entendiendo por enzimas extracelulares aquéllas que siendo sintetizadas por las células, se localizan mayoritariamente en el medio cercano a las mismas sin mayores alteraciones en las estructuras celulares que las compatibles con los procesos de crecimiento y reproducción (Pollack, 1962).

Las razones de mayor importancia que justifican el papel del género *Bacillus* en la producción industrial son:

- Excreción de una gran variedad de proteínas en el medio de cultivo (Priest, 1977).
- Requerimientos nutricionales mínimos con velocidades de crecimiento relativamente altas (Debavov, 1982).
- Amplia variedad de especies, con una gran diversidad metabólica (Claus y Berkeley, 1986).
- Carencia de patogenicidad en mamíferos de la mayoría de las especies del género, con excepción de *B. anthracis* (Gordon, 1977).
- Ausencia de toxinas en proteínas purificadas (Debavov, 1982).
- Sistemas que permiten su manipulación genética (Piggot y Hoch, 1985).

Actualmente enzimas provenientes de cepas seleccionadas de este género, se producen a escala industrial (tabla IV). En el inicio de los estudios sobre producción y cinética de enzimas extracelulares producidas por cepas del género *Bacillus*, en particular de  $\alpha$ -amilasas, se detectaron dos tipos de enzimas que se pueden diferenciar primariamente por su actividad catalítica sobre almidón, denominándose: licuantes y sacarificantes (Matzuzaki y col., 1974). Las primeras producen

una disminución de la viscosidad de la solución de almidón, mientras que las segundas producen un incremento del poder reductor de al menos de dos órdenes de magnitud mayores que las licuantes (Priest, 1977).

Estudios posteriores permitieron detectar otras actividades enzimáticas que intervienen en la degradación de  $\alpha$ -glucanos, como las  $\beta$ -amilasas (Higashihara y Okada, 1974; Marshall, 1974a; Shinke y col., 1974), las isoamilasas y las pululanasas (Griffin y Fogarty, 1973; Nakamura y col., 1975; Urlaub y Wöber, 1975a, 1975b) que actualmente están cobrando importancia desde el punto de vista industrial.

Tabla IV. Enzimas de uso industrial producidas por cepas del género *Bacillus*.

Enzima	Especie	Aplicación
Amilasas		
licuantes	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Panificación,
	<i>B. licheniformis</i>	Ind. alimentaria,
	<i>B. stearothermophilus</i>	Ind. cervecera,
sacarificantes	<i>B. subtilis</i> var.	Ind. papelera,
	<i>amylosacchariticus</i>	Ind. textil.
Proteasas		
alcalinas	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Detergentes,
	<i>B. licheniformis</i>	Ind. alimentaria,
	<i>B. pumilus</i>	Ind. cervecera.
	<i>B. subtilis</i>	
Proteasas neutras	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Curtiembres.
	<i>B. subtilis</i>	
	<i>B. thermoproteolyticus</i>	
Estearasas	<i>B. subtilis</i>	Ind. alimenticia y farmacéutica.
Glucosa isomerasa	<i>B. coagulans</i>	Ind. alimenticia.

(Fuente: Debavov, 1982).

Otras enzimas detectadas y caracterizadas que se encuentran asociadas a los procesos de degradación de almidón son las  $\alpha$ -glucosidasas, cuya actividad ha sido evidenciada en diferentes especies del género *Bacillus*. Se localizan en algunos casos extracelularmente (Suzuki y col., 1976) y en otros están unidas a la membrana celular (Urlaub y Wober, 1978). Estas enzimas, si bien no poseen un interés comercial inmediato, son importantes por su papel en el metabolismo de los organismos empleados para la producción de las enzimas intervinientes en la degradación de  $\alpha$ -glucanos (Aunstrup, 1978).

Se debe destacar que 32 de las 34 especies conocidas del género *Bacillus* son capaces de degradar almidón y una gran mayoría pueden degradar caseína (Claus y Berkeley, 1986). A su vez, estudios realizados en algunas cepas han permitido detectar más de una actividad enzimática relacionada con la hidrólisis de  $\alpha$ -glucanos (Urlaub y Wöber, 1975b; Sata y col., 1987a, b).

### 1.7.- Taxonomía del género *Bacillus*

El género *Bacillus* está constituido por una elevada cantidad de especies (Claus y Berkeley, 1986) que poseen una gran diversidad metabólica. Cepas de este género han sido aisladas de habitats muy disímiles, como suelos de zonas desérticas, fuentes termales y fondos marinos, aunque mayoritariamente se encuentran en la rizósfera (Norris y col., 1986).

A pesar de la existencia de un gran número de especies y de que los primeros estudios realizados en el género datan del siglo XIX, su taxonomía es compleja. Los esquemas taxonómicos que comprenden ensayos morfológicos y bioquímicos clásicos (Gordon, 1977; Claus y Berkeley, 1986), no permiten identificar algunas cepas a nivel de especie de manera definitiva, principalmente a aquellas que presentan caracteres

intermedios, respecto a las cepas empleadas como referencia (Priest y col., 1988a). A su vez, dichos esquemas presentan a menudo problemas de normalización entre laboratorios, lo que dificulta la extrapolación de datos (Logan y Berkeley, 1984). Otros esquemas taxonómicos sistematizados y específicos como el sistema comercial Api 50 CH (anónimo, 1983), poseen la ventaja de la normalización. Sin embargo, en muchos de los casos sólo permiten identificar a nivel de especie empleando pocos caracteres distintivos, además de poseer un elevado costo para su empleo rutinario en el laboratorio. Estas situaciones vuelven compleja la identificación cuando se estudian cepas altamente relacionadas entre sí. No obstante, estudios sistemáticos empleando taxonomía numérica (Priest y col., 1988a,b) con cepas representativas del género, lograron construir matrices para la identificación probabilística de grupos y especies muy relacionados. Uno de los parámetros más difundidos en su empleo con ese fin es el coeficiente de similitud ( $S_j$ ) (Colwell y Austin, 1981), que se define así:

$$S_j = \frac{\alpha}{\alpha + \beta + \delta}$$

En donde  $\alpha$  es el conjunto de reacciones positivas en las cepas a comparar,  $\beta$  y  $\delta$  son los conjuntos de reacciones que presentan caracteres positivos para una de las cepas y negativos para la restante.

En el Género *Bacillus*, uno de los más ampliamente empleados en biotecnología es el grupo *subtilis* constituido por las especies *subtilis*, *amyloliquefaciens*, *licheniformis* y *pumilus* (Priest y col., 1987). Las tres primeras son las responsables mayoritarias de la producción industrial de enzimas por cepas de este género.

Desde el punto de vista taxonómico, las especies *Bacillus licheniformis* y *B. pumilus* se diferencian de las restantes en

base a varios caracteres bioquímicos sencillos (Claus y Berkeley, 1986). No es el caso de la especie *amyloliquefaciens* (Fukumoto, 1943; Welker y Campbell, 1967), que ha sido considerada en numerosos trabajos debido a estudios incompletos como una subespecie (Robyt y Ackerman, 1973) o como perteneciente a la especie *subtilis*.

Trabajos posteriores empleando hibridización de ADN-ADN (Seki y col., 1975), así como estudios bioquímicos y moleculares más profundos complementados con un tratamiento estadístico adecuado, han permitido establecer la diferenciación entre ambas especies (Priest y col., 1987 y 1988a).

### 1.8.- Cultivos microbianos

En los procesos biotecnológicos, resulta de fundamental importancia el conocimiento de la cinética de crecimiento de los organismos y de la producción de metabolitos, ya que permiten la predicción del desarrollo de la fermentación, la evaluación de las velocidades, de los rendimientos y de las productividades, suministrando información útil para establecer las estrategias de producción y optimización del proceso (Aiba y col., 1965).

En un cultivo de microorganismos en medio líquido con agitación constante se puede establecer una serie de suposiciones y restricciones que permiten desarrollar modelos sencillos de estudio:

- 1.- Los microorganismos se encuentran distribuidos uniformemente en el recipiente de cultivo.
- 2.- No se producen fenómenos de adherencia celular.
- 3.- El reactor se encuentra perfectamente agitado.
- 4.- La población celular consiste en una cantidad discreta de "partículas", cuyo tamaño es despreciable frente al volumen del reactor.
- 5.- No se producen alteraciones genéticas en la población durante el cultivo.
- 6.- Todas las células son viables.
- 7.- La cantidad de materia (biomasa) que contienen los organismos es una constante a un tiempo dado y depende del metabolismo celular, así como de las condiciones de cultivo.
- 8.- Los microorganismos producen en el cultivo una serie de respuestas específicas, como resultado de los cambios del medio (ambiente).
- 9.- No existe inhibición del crecimiento celular por los productos.

El comportamiento cinético de una población es determinado por un complejo conjunto de factores genéticos y ambientales. Entre estos últimos se destacan las denominadas

condiciones de operación: composición de medio, temperatura, pH, etc..., y la modalidad de cultivo (en lote o continuo).

Se puede definir el cultivo en lote como aquél que se realiza en un sistema cerrado, o sea sin transporte de materia entre el medio circundante y el cultivo, con la excepción del intercambio gaseoso que se realiza sin restricciones. En esta modalidad de trabajo, inicialmente se cargan en el reactor los nutrientes y luego se inocula con una determinada cantidad de células viables iniciándose así el cultivo. Primeramente se produce un reacondicionamiento de la composición macromolecular de las células al nuevo ambiente en donde son cultivadas denominándose a dicha etapa fase de latencia. A continuación las células comienzan a reproducirse a una velocidad que es la máxima en las condiciones experimentales imperantes, esta fase se denomina de crecimiento exponencial. Posteriormente la limitación del crecimiento provocada por falta de algún nutriente determina el cese del mismo, denominándose dicha etapa fase estacionaria. A continuación de la misma se presenta la etapa de muerte celular producida por acción de enzimas autolíticas que son inducidas por las condiciones de inanición pre-existentes.

El crecimiento de una población microbiana puede ser representado por:

$$\mu \cdot x = dx/dt \quad (\text{Ec. 1})$$

En donde  $\mu$  simboliza la velocidad específica de crecimiento y es una constante durante la etapa de crecimiento exponencial,  $x$  es la concentración de biomasa y  $t$  el tiempo. La velocidad específica de crecimiento depende del microorganismo en cuestión y de todos los factores que determinan el ambiente en que se desarrolla la población. Otro parámetro relacionado con el crecimiento celular es el tiempo de duplicación ( $t_d$ ), que se define como el intervalo de tiempo entre dos divisiones celulares sucesivas:

$$t_d = \ln 2/\mu \quad (\text{Ec. 2})$$

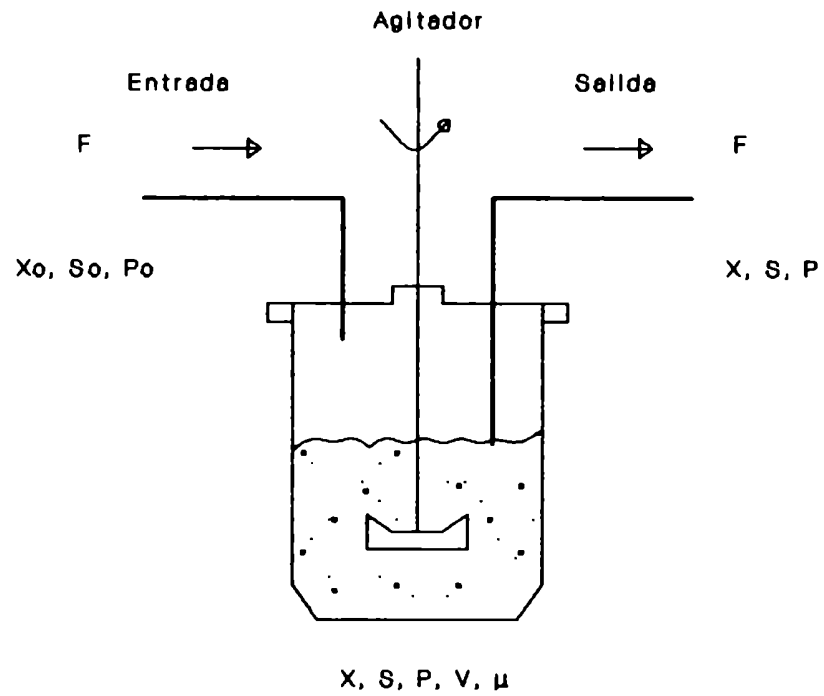


El cultivo por lotes ofrece como principal característica su simplicidad, tanto desde el punto de vista del equipamiento como de operación. Sin embargo, esta modalidad de cultivo presenta diversas limitaciones como ser: la falta de control del investigador sobre los parámetros de cultivo y el hecho de que los microorganismos se desarrollen en un medio cambiante, producto de su metabolismo. Una técnica que permite superar estos inconvenientes es el cultivo continuo, ya que posibilita mantener la población celular en un estadio fisiológico definido, constante y seleccionable.

Adicionalmente el cultivo continuo presenta una productividad mayor que el cultivo por lote, posee mayores posibilidades de automatización y permite obtener productos de calidad más uniforme. Sin embargo, presenta algunos puntos adversos como ser una creciente complejidad de equipos, mayores riesgos de contaminación y la posibilidad de cambios poblacionales debidos a la selección de mutantes durante tiempos de operación prolongados. Los procesos fermentativos continuos pueden realizarse en diversos equipos y con distintos sistemas de control de operación. El tanque agitado es el fermentador continuo más empleado debido a su simpleza y costos. Básicamente consiste en un reactor que contiene las células y que posee una entrada para el suministro de medio de cultivo, una salida para el efluente, así como equipamiento auxiliar de control de parámetros asociados al crecimiento celular y/o la producción de metabolitos (agitación, pH, temperatura, etc...), un diagrama sencillo del mismo puede verse en la Figura 5.

Los fermentadores continuos se basan principalmente en el quimiostato, sistema en el cual el control del proceso se efectúa sobre la composición química del sistema, lo que se logra manteniendo constante la composición de la corriente de alimentación y su velocidad de flujo. La composición del medio de cultivo a la entrada del bioreactor determina, por la limitación de alguno de sus componentes, la densidad celular.

**Figura 5.** Esquema de un quimlostato simple de una sola etapa.



$X$  = densidad celular (g/l).                       $F$  = flujo (l).  
 $S$  = conc. de sustrato (g/l).                       $V$  = volumen del reactor (l).  
 $P$  = conc. de producto (g/l).                       $D$  = velocidad de dilución (1/h).  
 $\mu$  = velocidad específica de crecimiento (1/h).

Por otro lado, la variación de la velocidad de alimentación permite regular la velocidad de división celular y por consiguiente la cinética de crecimiento de la población. Por lo tanto, se pueden controlar el crecimiento celular y la densidad de población en forma independiente.

El tratamiento cuantitativo del quimiostato cuyo desarrollo teórico corresponde a los estudios simultáneos efectuados por Monod y Novick-Szilard en 1950, se basa en la aplicación de balances de masa y ecuaciones cinéticas, considerándose además dos suposiciones adicionales:

1.- La función que describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento y la concentración de sustrato limitante es de tipo hiperbólico.

2.- La conversión de sustrato en componentes celulares (rendimiento) es constante. Definiéndose rendimiento ( $Y$ ) a la cantidad de biomasa formada por unidad de sustrato consumido. A partir de estas hipótesis se pueden plantear una serie de ecuaciones:

Variación de la composición = entradas - salidas - consumo +  
+ producción (Ec. 3)

Balance de células:

$$d(xV)/dt = Fx_0 - Fx + \mu xV \quad (\text{Ec. 4})$$

Como la operación se efectúa a volumen constante ( $V$ ):

$$dx/dt = F(x_0 - x)/V + \mu x \quad (\text{Ec. 5})$$

El cociente de los parámetros  $F$  y  $V$ , se define como velocidad de dilución,  $D$ :

$$D = F/V \quad (\text{Ec. 6})$$

considerando que en el medio de alimentación no hay células,  $x_0 = 0$ , entonces

$$dx/dt = - Dx + \mu x \quad (\text{Ec. 7})$$

Balance de nutriente limitante:

$$ds/dt = D(s_0 - s) - \mu x / Y_{x/s} \quad (\text{Ec. 8})$$

En donde  $Y_{x/s}$  (rendimiento), se define como la masa celular producida por unidad de sustrato consumido.

Balance de producto, considerando que el mismo no se suministra en la alimentación ( $p_0 = 0$ ):

$$dp/dt = -Dp + Q_p \quad (\text{Ec. 9})$$

Para completar la descripción del quimiostato se recurre a expresiones de tipo cinético y en ausencia de inhibidores se emplea comúnmente la ecuación de Monod (1950):

$$\mu = \mu_M (s / K_s + s) \quad (\text{Ec. 10})$$

Las ecuaciones precedentes describen el comportamiento en el quimiostato operado en cualquier régimen. Sin embargo, en la mayoría de los casos la operación se efectúa en estado estacionario, donde el valor de las variables es independiente del tiempo, por lo que las ecuaciones anteriores resultan:

De la ecuación 7:  $\mu = D \quad (\text{Ec. 11})$

De la ecuación 8:  $x = Y_{x/s} D (s_0 - s) / \mu \quad (\text{Ec. 12})$

Introduciendo la ecuación 11 en la 12:

$$x = Y_{x/s} (s_0 - s) \quad (\text{Ec. 13})$$

De la ecuación 9:  $Q_p = Dp \quad (\text{Ec. 14})$

Reemplazando s de la ecuación 13:

$$x = Y_{x/s} \{s_0 - D K_s / (\mu_M - D)\} \quad (\text{Ec. 15})$$

$$P = Q_p / D \quad (\text{Ec. 16})$$

Puede observarse de la ecuación 11, que el valor de  $\mu$  puede variar entre ciertos intervalos modificando la velocidad de dilución (D), cambiando el flujo de alimentación (F). Esto último permite controlar la velocidad de crecimiento específica de los organismos en estudio. Por otro lado, la ecuación 15 revela que la concentración final de sustrato (s) depende sólo del parámetro de operación D, de las constantes características del microorganismo y su medio ( $\mu_M$  y  $K_s$ ), y por lo tanto es independiente del valor de sustrato inicial ( $S_0$ ) (Calcott, 1981).

## 2.- MATERIALES Y METODOS

### 2.1- Técnicas microbiológicas

#### 2.1.1.- Medios de cultivo

Los reactivos empleados en la preparación de medios de cultivo fueron de grado microbiológico (Merck o similar), excepto cuando se efectúe la aclaración pertinente.

La esterilización de los medios de cultivo se realizó a 1,22 Newton/m<sup>2</sup> durante 15 minutos cuando el volumen de los mismos fue inferior a 500 ml, con volúmenes mayores, la duración fue de 30 a 120 minutos. Las soluciones acuosas de las fuentes de carbono fueron esterilizadas por separado y se agregaron asépticamente al medio previamente esterilizado. En los ensayos realizados en placa, los medios de cultivo se suplementaron con agar (15 g/l).

En todos los casos los componentes de los medios están expresados en gramos por litro.

##### 2.1.1.1.- Medios complejos

Medio nutritivo: extracto de carne 3,0, peptona de caseína 5,0, pH= 7,0 ± 0,2.

Medio de Luria: Triptona 10,0, extracto de levadura 5,0, NaCl 10,0, pH= 7,1 ± 0,1.

Medio Müller-Hinton: almidón soluble 1,50, extracto de carne 2,0, peptona de caseína 17,5, pH= 7,3 ± 0,1.

Medio de microcultivo: peptona 5,0, extracto de levadura 20,0, D(+)-Glucosa 10,0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0, monolaurato de sorbitano 0,1, pH= 6,7 ± 0,2.

### 2.1.1.2.- Medios sintéticos

Componente	Medio		
	MZ <sup>(*)</sup>	MT <sup>(**)</sup>	MP <sup>(*)</sup>
Almidón	5,00-30,00	5,00-15,00	4,0-10,00
NH <sub>4</sub> Cl	--	0,54	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,00	--	1,00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05	0,022	0,002
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001	--	--
HCl	--	--	0,036
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	--		0,0001
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,010	0,003	0,001
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,200	0,120	0,020
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	--	0,002	--
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,010	--	0,005
KNO <sub>3</sub>	--	--	5,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,00	--	1,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,00	3,50	0,50
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	--	--	0,0001
Na-citrato	1,00	--	--
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	--	8,00	
pH	6,9 ±0,1	6,9 ±0,1	7,1 ±0,2

(\*) Zhang y col., 1983. (\*\*) Darland, 1971. (\*\*) Norris y col., 1981.

### 2.1.1.3.- Medios sintéticos suplementados

Los medios sintéticos suplementados (MS) se prepararon empleando los medios mínimos previamente descritos, con el agregado de triptona (5,0) y extracto de levadura (3,0).

### 2.1.2.- Aislamiento y selección de microorganismos

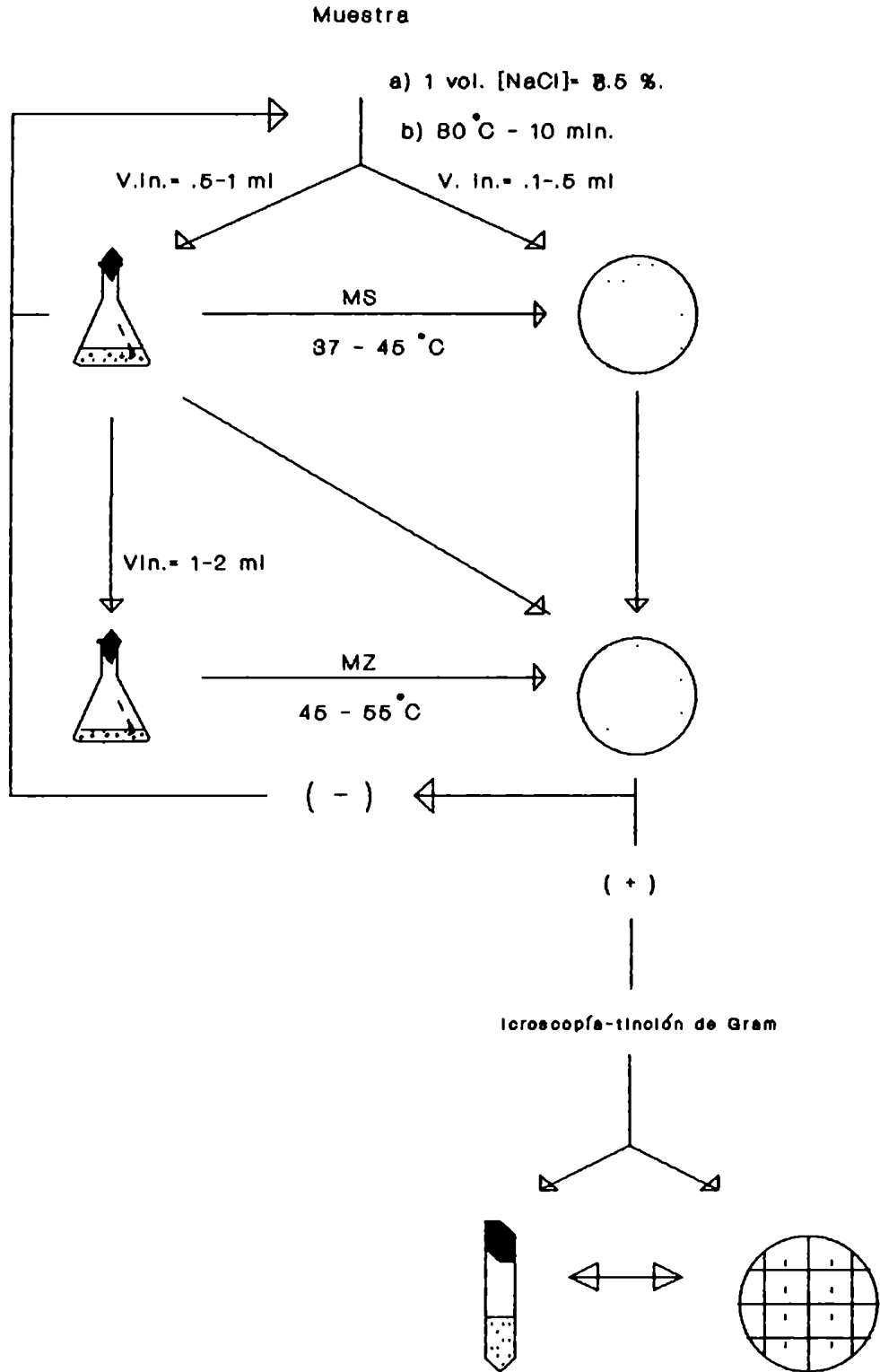
Con el objeto de aislar cepas salvajes pertenecientes al Género *Bacillus*, que presenten actividad degradadora de almidón, se recolectaron muestras naturales de distintos orígenes. Las mismas, se colocaron en tubos de ensayo, las sólidas en cantidad aproximada de un gramo, fueron resuspendidas en 4,0 ml de solución fisiológica ([NaCl]= 145

mM). Para las muestras líquidas, la relación de volúmenes fue unitaria entre ambas, procediendo de acuerdo al esquema de aislamiento de cepas que se muestra en la Figura 6. En primer lugar, se calentaron en baño de agua a 80 °C durante 10 minutos (Claus y col., 1986). Alícuotas de las mismas se sembraron en medios enriquecidos (MS), líquidos y agarizados incubándose entre 37 y 45 °C. En la etapa siguiente sólo se utilizó medio salino (MZ), con temperaturas de incubación de 45 a 55 °C. Para el caso de los ensayos en medio sólido se empleó el mismo protocolo que en el anterior. Las muestras cuyo crecimiento fue negativo fueron sembradas nuevamente en medio fresco, aumentando el volumen de inóculo y descartándose en el caso de no detectarse crecimiento al cabo de 48 a 72 horas de incubación.

Las colonias aisladas que exhibían actividad amilolítica fueron repicadas cinco veces como mínimo en forma consecutiva, empleando medios líquidos y agarizados alternativamente. Los cultivos fueron controlados por microscopía, morfología de las colonias y tinción de Gram.

La selección de cepas se efectuó en medio sintético modificado (Zhang y col., 1983), reemplazando maltosa por almidón de maíz comercial (10,0 g/l). Las placas sembradas se incubaron entre 40 y 45 °C durante 36 a 48 horas, revelándose a continuación. Cada una de ellas contenía una cepa de colección productora de amilasas como control positivo. Para una selección primaria se escogieron aquellas colonias cuya relación entre el diámetro promedio del halo y su cociente con el diámetro promedio de la colonia fue mayor. Las cepas surgidas del relevamiento se transfirieron a medio líquido (almidón de maíz comercial 30,0 g/l) y se incubaron en iguales

**Figura 6.** Esquema de aislamiento de cepas.





condiciones que las precedentes, determinándose la capacidad amilolítica (actividad dextrinizante). Los ensayos se realizaron por duplicado.

### 2.1.3.- Cepas de referencia

En el presente trabajo se emplearon cepas de colección como control para la caracterización microbiológica y actividad de  $\alpha$ -amilasa de las cepas salvajes seleccionadas:

Género *Bacillus*

<i>B. brevis</i> ATCC 8185	<i>B. cereus</i> ATCC 14579
<i>B. coagulans</i> ATCC 5038	<i>B. globigii</i> IA 30
<i>B. licheniformis</i> ATCC 21424	<i>B. megaterium</i> ATCC 12872
<i>B. polymyxa</i> ATCC 10401	<i>B. pumilus</i> ATCC 2589
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 7953	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633
<i>B. subtilis</i> IAM 1521	<i>B. subtilis</i> NCIB 8565

Otros microorganismos

<i>Escherichia coli</i> HB 101	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
--------------------------------	---

### 2.1.4.- Cultivos Microbianos

Se realizaron en un fermentador de un litro de capacidad (Gallenkamp, Inglaterra), con control de los siguientes parámetros: agitación, temperatura, pH, aereación y velocidad de alimentación. El volumen de trabajo usado fue de 500 ml. El pH fue ajustado empleando soluciones de  $\text{NH}_4\text{OH}$  o/y  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (1,5 M). El oxígeno disuelto fue determinado con un electrodo galvánico. El medio de cultivo empleado fue MZ (Zhang y col., 1983) modificado.

En la modalidad de operación de cultivo continuo, las muestras fueron obtenidas en estado estacionario, considerado al efectuar el recambio del volumen del fermentador por cinco veces en las mismas condiciones experimentales.

Los experimentos en los que se estudió el efecto de la temperatura y el pH en la producción de enzimas se

desarrollaron utilizando la técnica de cultivo continuo, empleándose una velocidad de dilución constante.

#### **2.1.4.1.- Preparación del inóculo**

Las cepas se sembraron en Erlenmeyers de 250 ml de capacidad, conteniendo 50 a 70 ml de medio de cultivo MZ. Los cultivos se incubaron en un baño agitado (Aproximadamente 180 rpm) y termostatzado a la temperatura de trabajo en cada caso. A diferentes tiempos se retiraron alícuotas para efectuar controles microscópicos y de crecimiento en medio sólido empleando medio de cultivo MZ enriquecido. Al alcanzar el cultivo la fase exponencial tardía, luego de aproximadamente 12 horas, se procedió a repicar la cepa en iguales condiciones experimentales empleando un inóculo del 5 % (v/v). Luego de dos repiques consecutivos la cepa fue sembrada en el fermentador manteniendo el mismo porcentaje de inóculo.

#### **2.1.5.- Caracterización Microbiológica**

La caracterización microbiológica de las cepas se efectuó de acuerdo a las técnicas descriptas en la literatura (Gordon, 1977; Norris y col., 1981; Claus y col., 1986; Mac Faddin, 1980). Las cepas se cultivaron sucesivamente en medio agarizado (MS) por 48 horas a 40 °C y en medio líquido (Erlenmeyers de 25 ml de capacidad con 5 ml de medio) e incubadas en baño agitado (180 rpm) termostatzado a 40 °C durante 12 horas, repitiendo este procedimiento dos veces; en cada etapa se realizaron controles microscópicos y morfológicos.

##### **2.1.5.1.- Estudios morfológicos**

La morfología de las colonias se examinó en placas de agar nutritivo después de 48 hs. de incubación a 37 °C. La morfología celular fue observada luego de realizar tinción de Gram (Priest y col., 1988a). La morfología de las esporas se

estudió empleando la tinción de verde de malaquita (Cowan, 1974).

#### **2.1.5.2.- Estudios bioquímicos**

##### **2.1.5.2.1.- Ensayos de degradación**

Se realizaron a 37 °C desarrollándose por 24 a 36 horas de incubación.

##### **2.1.5.2.1.1.- De aceite de oliva**

Se empleó el siguiente medio de cultivo, expresado en g/l: solución A, compuesta por peptona 5,0, extracto de levadura 3,0,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,10, agar 15,0 disueltos en 500 ml de agua destilada. Solución B, compuesta por una emulsión de aceite de oliva (10,0 ml) en 490 ml de agua destilada. Las dos soluciones se mezclan después de la esterilización.

Las placas así preparadas presentan una turbidez característica debido al aceite emulsionado; la aparición de halos traslúcidos en torno a las colonias se considera como señal de degradación del aceite.

##### **2.1.5.2.1.2.- De ADN**

La composición del medio empleado en este ensayo se detalla a continuación y expresado en g/l está compuesto por: triptona 20,0, NaCl 5,0, ácido desoxiribonucleico (ADN) 2,0 y agar 15,0.

La detección de la actividad degradativa agregando verde de metilo (cuyo intervalo de viraje es de 4,2 a 6,3 unidades de pH) al medio de cultivo en una concentración de 5 g/l . El mismo se purificó previamente, mediante 5 extracciones consecutivas con  $\text{Cl}_2\text{CH}$  (en relación 1:1 en volumen). De la solución acuosa purificada se adicionaron 10 ml por litro de medio de cultivo, antes de esterilizar. Se considera como positiva, la formación de halos más claros en torno a las colonias, en contraste con el medio de cultivo que permanece de color verde (Smith y col., 1969).

### 2.1.5.2.1.3.- De almidón

La detección de actividad amilolítica en placa se realizó en medio sintético suplementado (MS) y el revelado se efectuó mediante alguno de los tres procedimientos siguientes:

- Revelado en frío: se dejan las placas a 5 °C durante 36 a 48 horas produciéndose la precipitación del almidón por lo que la placa adquiere color blanco. Las colonias con actividad amilolítica presentan un halo transparente.
- Revelado con solventes: se cubre la placa con etanol (95%, comercial) produciéndose la precipitación del almidón en 30 minutos a 25 °C. La reacción es positiva cuando aparecen halos claros.
- Revelado con solución de lugol: la interacción entre soluciones de lugol ( $[I_2]_{(aq.)} = 2,0 \text{ g/l}$ ,  $[KI]_{(aq.)} = 20,0 \text{ g/l}$ ) y almidón, produce complejos de color azul. La ausencia de coloración alrededor de las colonias indican la degradación del polímero.

### 2.1.5.2.1.4.- De carboximetilcelulosa

Los estudios de degradación de carboximetilcelulosa (CMC) se efectuaron empleando el medio de cultivo que se detalla a continuación, expresado en g/l: peptona 5,0, extracto de levadura 3,0, NaCl 2,0, CMC 10,0, agar 15,0. El revelado de las placas se efectuó cubriendo las mismas con 2 ml de solución acuosa de rojo Congo (2,0 g/l) e incubando durante 5 minutos a 25 °C, luego de descartar el colorante, se lavan dos veces con solución de NaCl (1 Molar). Se considera como señal de degradación de CMC, la presencia de un halo traslúcido en torno a la colonia, que contrasta con el color rojo del resto de la placa (Skipper y col., 1985).

### 2.1.5.2.1.5.- De caseína

Los experimentos de degradación de caseína se efectuaron en el medio de cultivo, expresado en g/l y constituido por la solución A: peptona 5,0, extracto de levadura 3,0, NaCl 1,0, agar 15,0. Solución B: caseína 10,0. Luego de esterilizar,

ambas soluciones fueron mezcladas asépticamente en proporción de 1:1 (v/v). La presencia de halos de clarificación alrededor de las colonias se considera señal positiva (Claus y Berkeley, 1986).

#### **2.1.5.2.1.6.- De dextrano**

Las pruebas de degradación de dextrano se efectuaron en el siguiente medio de cultivo, que contiene en g/l: triptona 2,0, extracto de levadura 2,0, NaCl 2,0, dextrano 10,0. El revelado de las placas se efectuó agregando etanol (95 %, comercial) a 25 °C durante 30 minutos, produciéndose la precipitación del polímero. Las colonias que se encuentren rodeadas de halos transparentes se consideran como degradadoras de dextrano.

#### **2.1.5.2.1.7.- De gelatina**

Los experimentos se desarrollaron simultáneamente en tubos de ensayo y placas de Petri, empleando el siguiente medio de cultivo (expresado en g/l): extracto de levadura 3,0, peptona 5,0, gelatina 4,0 y agar 15,0. La temperatura de incubación fue de 30 °C y la duración del ensayo 7 días. El revelado de las placas se efectuó cubriendo la superficie del medio de cultivo con una solución de HgCl<sub>2</sub> (150 g/l) en HCl (1,7 N). Zonas de clarificación se consideran señal positiva. El cambio observado en los tubos de ensayo fue la liquefacción del medio a 25 °C, que es considerada como señal positiva.

#### **2.1.5.2.1.8.- De poli-oxietilén sorbitanos**

Los ensayos de degradación de monolauratos y monooleatos de poli-oxietilén sorbitanos (comercialmente conocidos como Tween 20 y Tween 80, respectivamente) se realizaron en el siguiente medio de cultivo, expresado en g/l: peptona 5,0, extracto de levadura 3,0, NaCl 2,0, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,20, Tween 10 ml/lit y agar, 15,0.

La aparición de precipitados blancos en torno a las colonias por formación de complejos entre ácidos grasos y Ca<sup>2+</sup>, es considerada como señal positiva (Sierra, 1957).

El revelado se efectuó cubriendo la superficie de las placas durante un minuto con solución de lugol, y descartando a continuación el líquido remanente. Esta técnica aumenta la resolución del ensayo clásico (Sierra, 1957), probablemente debido a la formación de complejos entre  $(I_3)^{1-}$  y  $Ca^{2+}$  libre.

#### 2.1.5.2.1.9.- De pululano

Las condiciones del ensayo de degradación de pululano y su revelado fueron las mismas que en el caso de dextrano (Morgan y col., 1979).

#### 2.1.5.2.1.10.- De urea

Los experimentos se desarrollaron en el medio que se detalla a continuación y que expresado en g/l está compuesto por: peptona 1,0, D(+)-glucosa 1,0, NaCl 2,0,  $KH_2PO_4$  2,0, urea 20,0, extracto de levadura 0,1, rojo de fenol 0,01 y agar 15,0.

La hidrólisis de urea produce la alcalinización del medio de cultivo provocando el viraje del indicador ácido-base (6,4 a 8,2) de color amarillo a color rosado-rojo (Mac Faddin, 1980).

#### 2.1.5.2.2.- Ensayos de tolerancia

Los ensayos de tolerancia se realizaron en todos los casos empleando como medio basal agar nutritivo y observando crecimiento microbiano.

En los ensayos a distintas temperaturas las lecturas de los resultados se efectuaron entre las 48 y las 96 hs.

Los experimentos de crecimiento empleando distintas concentraciones de NaCl (20,0, 50,0 y 70,0 g/l) se efectuaron a 40 °C, incubándose por 72 hs.

Los diferentes pH ensayados se ajustaron empleando una solución de HCl (1,0 M) en el medio de cultivo antes de esterilizar. Las placas fueron incubadas, efectuándose lecturas cada 12 horas con un máximo de 96 horas (Priest y col., 1988a).

### **2.1.5.2.3.- Otros ensayos**

#### **2.1.5.2.3.1.- Crecimiento anaeróbico**

Se ensayó en un medio que contenía, expresado en g/l: triptosa 20,0, D(+)-glucosa 10,0, NaCl 5,0, tioglicolato de sodio 15,0, extracto de levadura 15,0. El medio se distribuyó en tubos de ensayo y, luego de efectuar la siembra de la cepa a ensayar, la superficie del medio de cultivo se cubrió con 1,0 ml de parafina. A continuación, se incubó por 7 días a 37 °C. La aparición de turbidez en el medio de cultivo es indicativa de crecimiento microbiano y se considera señal positiva (Claus y Berkeley, 1986).

#### **2.1.5.2.3.2.- Crecimiento en agar Mac Conkey**

El experimento se desarrolló en un medio que contenía, en g/l: peptona 20,0, NaCl 5,0, Lactosa 10,0, sales biliares 1,5, rojo neutro 0,03, cristal violeta 0,001 y agar 15,0. Las placas sembradas con los microorganismos en estudio se incubaron por 10 días a 37 °C. La aparición de colonias se considera como señal positiva (Gordon, 1977).

#### **2.1.5.2.3.3.- Desaminación de fenil-alanina**

La composición del medio empleado en este ensayo expresado en g/l fue: D,L-fenilalanina 2,0, extracto de levadura 3,0, NaCl 5,0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0 y agar 15,0. Alícuotas de 4,0 ml de medio de cultivo estéril fueron colocados en tubos de ensayo, dejándolos solidificar en forma oblicua. Los tubos inoculados se incubaron por 24 a 36 horas a 37 °C. Se revela agregando 4 ó 5 gotas de solución de FeCl<sub>3</sub> (120 g/l) en HCl concentrado (25 ml/l). La aparición de color verde brillante en la superficie del medio de cultivo se considera señal positiva (Mac Faddin, 1980).

#### **2.1.5.2.3.4.- Ensayo de catalasa**

En este ensayo se siguió el siguiente protocolo: una alícuota de 10 µl, proveniente de un cultivo microbiano líquido de 12 horas, fue colocado en un portaobjetos, posteriormente se agregaron dos gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %, V/V). El

desprendimiento gaseoso indica actividad de catalasa (Mac Faddin, 1980).

#### **2.1.5.2.3.5.- Producción de dihidroxiacetona**

La prueba se realizó en un medio que contenía, expresado en g/l: triptona 5,0, extracto de levadura 15,0,  $K_2HPO_4$  3,0, glicerol 20,0 ml y agar 15,0. Las placas de Petri sembradas con las cepas en estudio, se incubaron a 37 °C durante 3 días. El revelado se efectuó cubriendo las mismas con una solución compuesta por 35,0 g de  $CuSO_4$ , 173,0 g de tartrato de sodio y potasio, y 50 g de NaOH en un volumen de un litro. Luego de incubar las placas por 15 minutos, se efectúa su lectura. La aparición de un halo rojo en torno al crecimiento celular se considera como señal positiva.

#### **2.1.5.2.3.6.- Producción de gas**

La producción de gas a partir de la fermentación de glucosa se observó en un medio de cultivo que contenía, en g/l: peptona 10,0, extracto de carne 1,0, NaCl 5,0, D(+)-glucosa 10,0. Alícuotas de 5,0 ml de medio de cultivo fueron distribuidas en tubos de ensayo conteniendo tubos de Durham, e incubando a 37 °C por 24 a 48 horas. La formación de burbujas en los tubos de Durham es considerado como señal positiva (Mac Faddin, 1980).

#### **2.1.5.2.3.7.- Producción de indol**

Esta prueba se desarrolló en un medio cuya composición, en g/l fue: peptona de caseína 20,0, NaCl 5,0.

Los tubos de ensayo con 5,0 ml de medio se incubaron a 37 °C por 48 horas. Al cabo de ese lapso, una alícuota de 2,0 ml del mismo es retirada, a continuación se le agregan 5 gotas de un reactivo que contiene 150 ml de n-butanol, 10,0 g de p-dimetilaminobenzaldehído y 50 ml de HCl concentrado. La formación de un anillo rojo en la fase alcohólica se considera como prueba positiva del ensayo (Mac Faddin, 1980).



#### 2.1.5.2.3.8.- Reacción de Voges Proskauer-Rojo de metilo

El ensayo se desarrolló en un medio de cultivo que contenía, en g/l: peptona 7,0, D(+)-glucosa 5,0,  $K_2HPO_4$  5,0,  $KH_2PO_4$  2,5. Alícuotas de 5,0 ml del medio previamente esterilizado se distribuyeron en tubos de ensayo, los que una vez sembrados se incubaron a 37 °C por 48 a 72 horas.

El revelado es efectuado sobre una alícuota de 2,5 ml de cultivo por agregado de los siguientes: Primero se adicionan 0,6 ml de una solución de  $\alpha$ -naftol (50,0 g/l) empleando etanol absoluto como solvente; a continuación se agregan 0,2 ml de solución de KOH (40 %) se agita y luego de 10 a 15 minutos se observa el cambio producido. La formación de color rojo es considerada reacción positiva del ensayo de Voges Proskauer. El ensayo de rojo de metilo (intervalo de viraje de 4,4 a 6,2 unidades de pH) se realizó luego de 72 horas de cultivo, se tomó una alícuota de 2,5 ml del mismo, a la que se le agregaron 5 gotas de una solución alcohólica del indicador (3,0 g/l). El viraje del mismo se considera resultado positivo. (Mac Faddin, 1980).

#### 2.1.5.2.3.9.- Reducción de nitratos

En el ensayo de reducción de nitratos se empleó el siguiente medio de cultivo, expresado en g/l: extracto de carne 3,0, peptona 5,0 y  $KNO_3$  1,0.

Los cultivos (5,0 ml), se incubaron a 37 °C por 12 a 24 horas. La reducción de nitrato se evidenció agregando 1 ml de solución conteniendo  $\alpha$ -naftilamina (0,5 %), dimetil- $\alpha$ -naftilamina (0,6 %), adicionando a continuación 1 ml de una solución de ácido p-aminobenceno-sulfónico (8,0 gr) en ácido acético (5,0 M). La aparición de coloración roja es considerada señal positiva (Gordon, 1977).

#### 2.1.5.2.3.10.- Utilización de citrato

Se empleó el medio de cultivo cuya composición en g/l fue:  $MgSO_4$  0,2,  $(NH_4)_2H_2PO_4$  1,0,  $K_2HPO_4$  1,0, citrato de sodio 2,0, NaCl 5,0, Azul de bromotimol 0,08 y agar 15,0. Los

cultivos fueron incubados a 37 °C y el crecimiento microbiano fue seguido durante 24 a 48 horas. La aparición de color azul indica la utilización de citrato (Bailey y Scott, 1966).

#### **2.1.5.2.4.- Sistema Api**

El fundamento del sistema Api 50 CH (Anónimo, 1983) radica en la distinta capacidad microbiana de metabolizar hidratos de carbono. Para las diversas reacciones se emplean 50 cavidades que contienen cada una de ellas, una determinada fuente de carbono y el indicador ácido-base rojo de fenol (cuyo intervalo de viraje está entre 6,4 a 8,2). Una vez sembrada cada cápsula con una concentración celular aproximada a  $10^7$  células/ml, se incubaba a 37 °C, efectuándose lecturas a las 24, 36 y 48 horas. La utilización de la fuente de carbono por el microorganismo en estudio provoca la acidificación del medio de cultivo con el consiguiente viraje del indicador, lo que se considera como señal positiva.

#### **2.1.6.- Ensayo de sensibilidad a antibióticos**

Los ensayos se efectuaron en placas de Petri conteniendo 20 ml de medio Müeller-Hinton. Se sembraron alícuotas de 0,1 a 0,2 ml provenientes de cultivos desarrollados durante 12 horas de crecimiento, cuyas densidades ópticas fueron equivalente a 0,50 - 0,75 (560 nm).

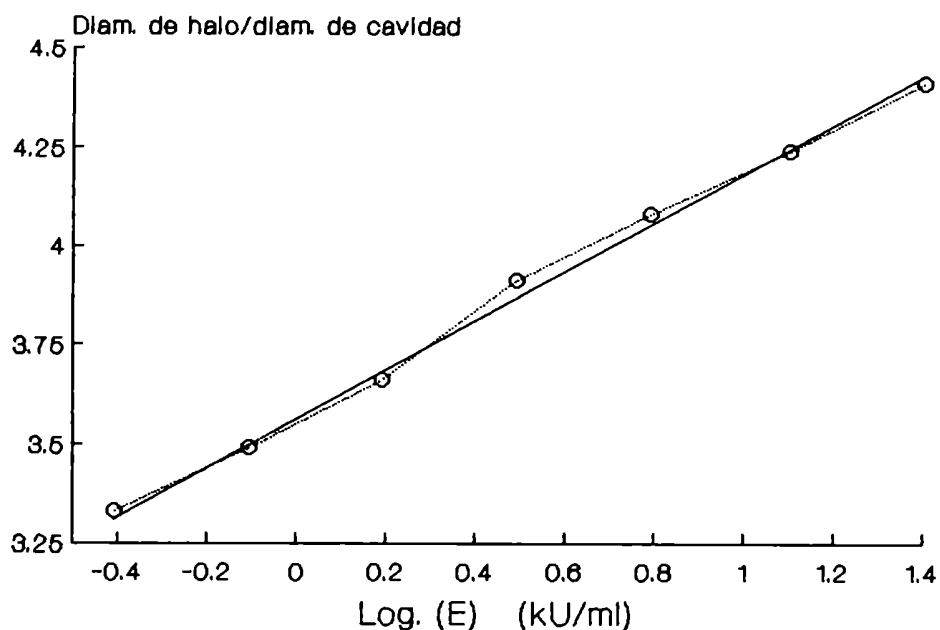
Se ensayaron cinco antibióticos por placa usando discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro humedecidos en ellos, mantenidos a 25 °C por 30 minutos, y a continuación los cultivos fueron incubadas a 37 °C.

El diámetro promedio de la zona de inhibición fue estimada luego de 16 a 18 horas de incubación. La resistencia o sensibilidad a los distintos antibióticos fue establecida de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (boletín O.M.S., 1977). Para cada cepa ensayada las pruebas se realizaron por duplicado.

### 2.1.7.- Determinación de actividad dextrinizante en placa

Con el objeto de cuantificar la concentración de  $\alpha$ -amilasa en medios agarizados, se realizó una curva de calibración empleando una enzima comercial obtenida de una cepa de *Bacillus sp.* (Sigma Chemical Co., St. Louis, E.E.U.U.). La enzima (aproximadamente 200 mg) se disolvió en una solución reguladora de fosfato de potasio (100 mM, pH= 7,00), efectuándosele diluciones seriadas empleando el mismo solvente. Alícuotas de 50  $\mu$ l se ensayaron colocándolas en cavidades de 5 mm de diámetro realizados en el agar conteniendo almidón soluble (10,0 g/l) e incubados durante 30 minutos a 45  $\pm$ C. Al cabo de ese lapso, las placas fueron reveladas con solución de lugol, obteniéndose una relación lineal ( $r= 0.98$ ) entre el diámetro del halo respecto del logaritmo de la concentración de enzima (figura 7). Las unidades enzimáticas se determinaron de acuerdo a las especificaciones suministradas por el fabricante.

**Figura 7.** Relación entre diámetro de halo y concentración de enzima.



## **2.2.- Técnicas espectrofotométricas**

Se realizaron en espectrofotómetros de doble haz (Beckmann modelo 25 o similar), empleando cubetas de 1 cm de paso óptico.

Las experiencias de cinética enzimática se realizaron empleando un equipo de termostatación de cubetas. Todas las determinaciones fueron efectuadas por triplicado.

### **2.2.1.- Determinación de Hidratos de Carbono**

Estas determinaciones se efectuaron en los sobrenadantes obtenidos al centrifugar los cultivos a  $10.000 \times g$  durante 10 minutos a  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.2.1.1.- Determinación de Almidón**

El polisacárido se determinó por la técnica de índice de azul (Radley, 1976) a  $640 \text{ nm}$  con una solución acuosa de  $\text{I}_2/\text{KI}$  ( $2,0 - 20,0 \text{ g/l}$ ). Se realizó una curva de calibración empleando un estándar de almidón soluble (grado analítico) de  $500 \text{ mg/ml}$ , y la reacción fue lineal hasta una concentración de  $50 \text{ } \mu\text{g/ml}$  del mismo ( $r = 0,998$ ).

#### **2.2.1.2.- Determinación de Azúcares Reductores**

Los mismos fueron dosados por el método denominado del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) en medio alcalino (Miller, 1959). En la realización de la curva de calibración se utilizó como estándar maltosa (grado analítico) de  $30,0 \text{ } \mu\text{moles/ml}$ , observando respuesta lineal hasta  $15,0 \text{ } \mu\text{moles/ml}$  a  $590 \text{ nm}$  ( $r = 0,995$ ).

#### **2.2.1.3.- Determinación de Glucosa**

Este hidrato de carbono se cuantificó por el sistema enzimático acoplado de glucosa oxidasa-peroxidasa (Werner y col., 1970). Para ello se realizó una curva de calibración empleando un estándar de glucosa ( $1,00 \text{ mg/ml}$ ). La respuesta lineal fue observada en el intervalo comprendido entre  $1,00$  a  $10,00 \text{ } \mu\text{g/ml}$  ( $r = 0,998$ ).

### **2.2.2.- Determinación de Actividades Enzimáticas**

En las determinaciones enzimáticas ensayadas se verificaron las condiciones de velocidad inicial de reacción y se efectuaron los siguientes blancos:

- 1.- De sustrato endógeno: las muestras a dosar fueron incubadas en las condiciones de ensayo establecidas para cada enzima en ausencia de sustrato.
- 2.- De enzima: los reactivos se incubaron en ausencia de muestra.

Los ensayos enzimáticos se efectuaron en las fracciones que definimos como extracelular, a la proveniente de los sobrenadantes de las muestras centrifugadas a  $10.000 \times g$  (10 minutos,  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ); y total, y en la muestra total obtenida del fermentador sin realizar ningún tratamiento.

#### **2.2.2.1.- Actividad de Alfa-Amilasa**

Fue dosada por la medida de su actividad dextrinizante (Manning y col., 1961): 200  $\mu\text{l}$  de sustrato (almidón soluble, 500  $\mu\text{g/ml}$ ) disuelto en solución reguladora de fosfato de sodio (100 mM,  $\text{pH} = 7,0$ ) y NaCl (15 mM), fueron incubados con un volumen de 50  $\mu\text{l}$  de muestra durante 7 minutos y medio a  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . La reacción fue detenida por el agregado de 200  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{I}_2$  (2,0 g/l) y KI (20,0 g/l) en HCl 20 mM; posteriormente se adicionó agua destilada en cantidad necesaria para obtener un volumen final de 2,0 ml. Las lecturas se efectuaron a 640 nm.

Se definió una unidad enzimática de  $\alpha$ -amilasa (E.C. 3.2.1.1) como la cantidad de enzima necesaria para desramificar 10  $\mu\text{g}$  de almidón en 30 minutos, determinada por el decaimiento de color del complejo iodo-almidón.

#### **2.2.2.2.- Actividad de Alfa-Glucosidasa**

Fue determinada empleando una solución de 500  $\mu\text{l}$  conteniendo maltosa (5,00 mg/ml), EDTA (1,35 mM), solución reguladora de acetato de sodio (100 mM,  $\text{pH} = 6,0$ ) e incubando con 150  $\mu\text{l}$  de muestra a  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. A intervalos

regulares de tiempo se analizó glucosa empleando la técnica enzimática previamente descrita (Dahlqvist, 1984).

Una unidad de  $\alpha$ -glucosidasa (E.C. 3.2.1.20) se define como la cantidad de enzima que produce un  $\mu$ mol de glucosa por minuto en nuestras condiciones experimentales.

#### **2.2.2.3.- Actividad de Beta-Amilasa**

Para determinar actividad de  $\beta$ -amilasa se ensayó la capacidad sacarificante, evaluándola como aparición de azúcares reductores (Stark y col., 1982). Para ello se incubaron a 45 °C, 300  $\mu$ l de una mezcla de reacción conteniendo almidón soluble (10,0 mg/ml), disuelto en solución reguladora de fosfato (100 mM, pH = 6,0), NaCl (15,0 mM), EDTA (1,00 mM) y 100  $\mu$ l de muestra; el tiempo de reacción fue de 30 minutos y la misma se detuvo por agregado de solución alcalina del reactivo de DNS previamente descrito.

Una unidad de  $\beta$ -amilasa (E.C. 3.2.1.2) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir un  $\mu$ mol de azúcar reductor determinado como maltosa por minuto a 45 °C (técnica de DNS).

#### **2.2.2.4.- Actividad de Isoamilasa**

Se ensayó empleando 250  $\mu$ l de una solución, que contenía glucógeno (10,0 mg/ml),  $\text{CaCl}_2$  (2,0 mM), solución reguladora de fosfato de potasio (200 mM, pH = 6,0) y 250  $\mu$ l de muestra. La mezcla de reacción fue incubada a 40 °C durante 60 minutos, retirándose alícuotas a intervalos regulares y determinándose azúcares reductores por la técnica de DNS previamente descrita (Gunja-Smith y col., 1970).

Se define una unidad de isoamilasa (E.C. 3.2.1.41) como la cantidad de enzima necesaria para producir un micromol de azúcar reductor, determinado como maltosa, por minuto, en las condiciones experimentales especificadas anteriormente.

#### **2.2.2.5.- Actividad de Proteasas**

Se determinó empleando como sustrato azocaseína de acuerdo a una técnica previamente descrita (Rowley y Bull,

1977), siendo la misma modificada de la siguiente manera: 100  $\mu$ l de una solución con azocaseína (5,0 mg/ml),  $\text{CaCl}_2$  (1,0 mM) y solución reguladora de fosfato de potasio (200 mM, pH= 6,9) se incubaron a 40  $^{\circ}\text{C}$  por una hora con 100  $\mu$ l de la muestra a ensayar. La reacción se detuvo por el agregado de 800  $\mu$ l de TCA (solución de 50,0 g/l) incubándose durante 30 minutos a 0  $^{\circ}\text{C}$ . A continuación las muestras fueron centrifugadas a 10.000 x g durante 3 minutos (5  $^{\circ}\text{C}$ ). Alícuotas de 500  $\mu$ l de cada uno de los sobrenadantes se neutralizaron con 800  $\mu$ l de solución de NaOH (1,0 M). Posteriormente se determinó la absorbancia en espectrofotómetro a 440 nm.

Se define una unidad de proteasas como la cantidad de enzima necesaria para solubilizar 1,0  $\mu$ g de proteína por minuto.

#### **2.2.2.6.- Actividad de Pululanasa**

Fue ensayada en 1,00 ml de mezcla de reacción que contenía 250  $\mu$ l de pululano (20,0 mg/ml), 500  $\mu$ l de solución reguladora de citrato de sodio (100 mM, pH= 6,0) y 250  $\mu$ l de muestra. Se incubó a 45  $^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, al cabo de los cuales se ensayaron azúcares reductores en alícuotas de la mezcla de reacción, por la técnica de DNS previamente descripta (Bender y Wallenfels, 1966).

Una unidad de pululanasa (E.C. 3.2.1.41) se define como la cantidad de enzima requerida para producir un  $\mu$ mol de azúcares reductores (determinados como maltosa) por minuto, en las condiciones experimentales antes mencionadas.

#### **2.2.3.- Determinación de Proteínas**

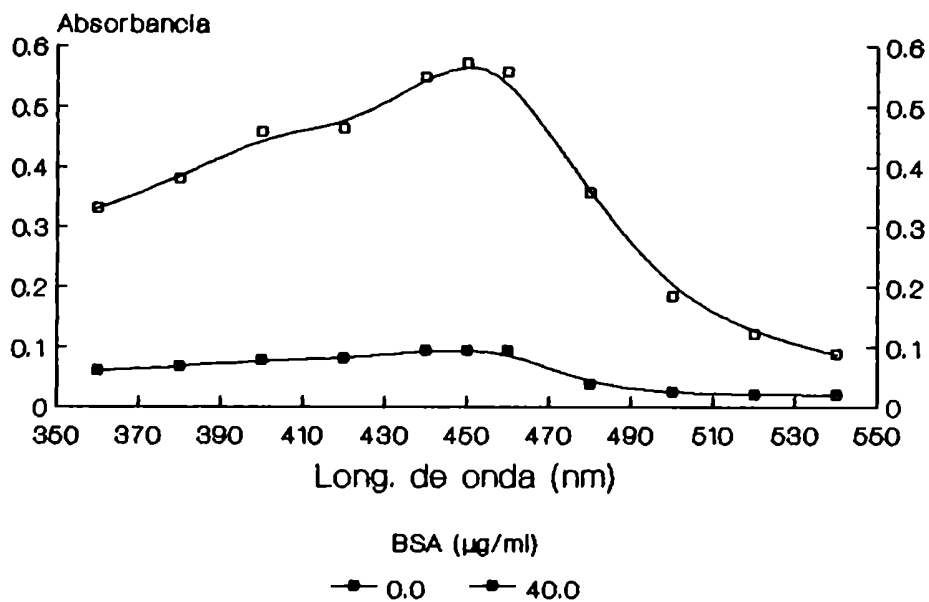
Se realizó en semimicroescala (1,00 ml), empleando como estándar de calibración Albúmina de suero bovino (fracción V). La misma fue preparada en una concentración de 100 mg/ml empleando solución fisiológica (NaCl= 145 mM) como solvente y cuantificada a 280 nm [ $\epsilon(280, 1,0 \%) = 6,6$ ] (Kirschenbaum, 1970). Alternativamente se emplearon las siguientes técnicas:

1.- Método basado en la interacción del colorante azul de Coomassie (Bradford, 1976) con proteínas, modificado de acuerdo a lo descrito posteriormente (Sedmak y Grossberg, 1977). Las lecturas se efectuaron a 595 nm.

2.- Método de Lowry (Lowry y col., 1951).

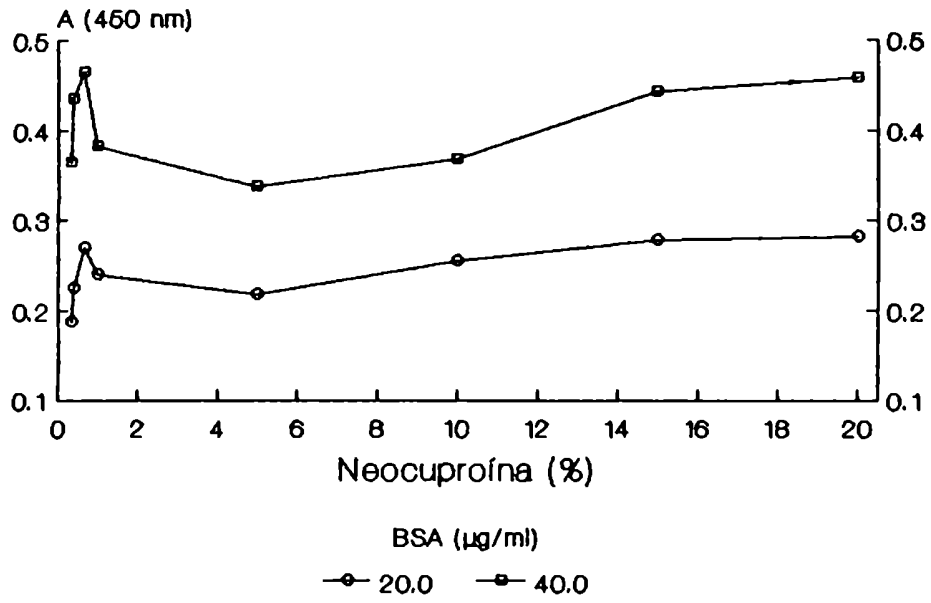
3.- Método de Neocuproína, el cual fue desarrollado en nuestro laboratorio, y cuyo principio se basa en la reducción en medio alcalino de  $\text{Cu}^{2+}$  por residuos aminoacídicos, produciéndose  $\text{Cu}^{+}$  el que es complejado por 2,9 dimetil-1,10 fenantrolina, comúnmente conocido como neocuproína (Smith y col., 1952). Se procedió a la optimización de las condiciones experimentales, a saber: selección de longitud de onda, tiempo de incubación, concentración de reactivos y pH (figuras 8 a 13).

**Figura 8.** Barrido espectral.

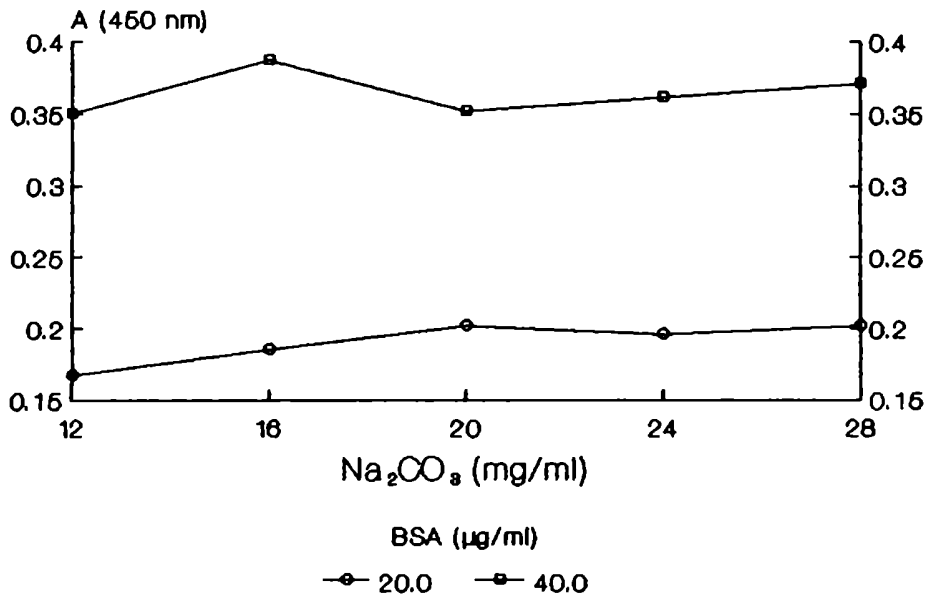


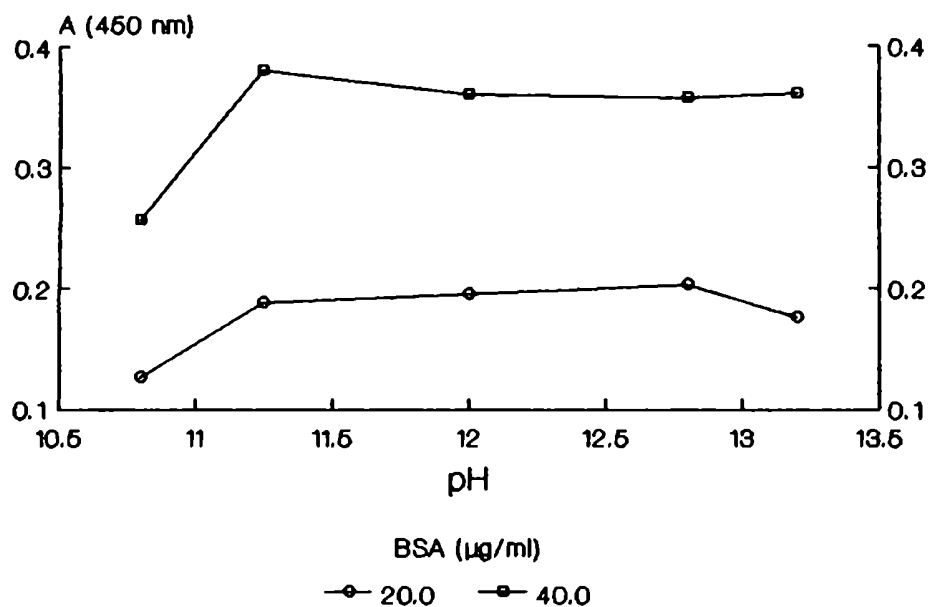
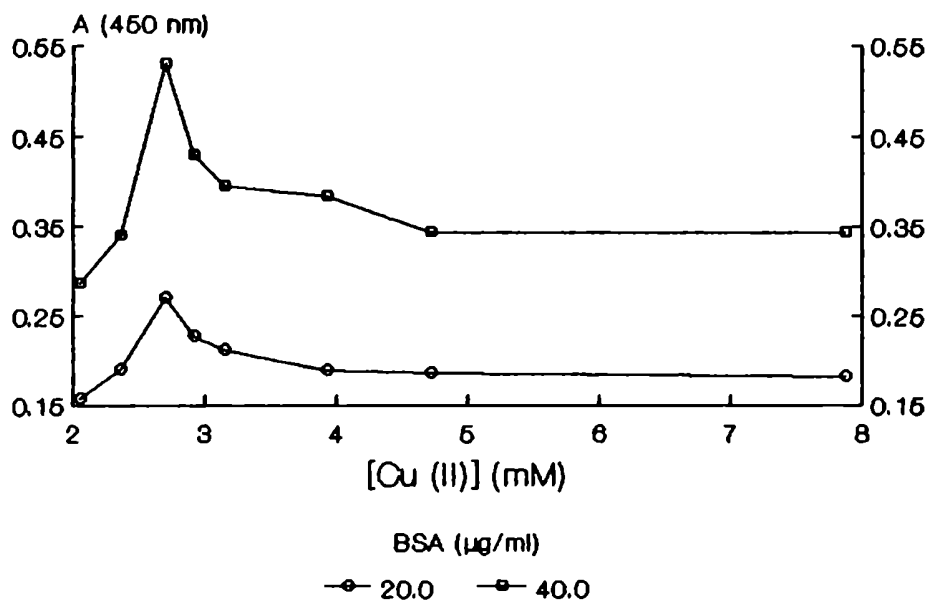


**Figura 9.** Efecto de la concentración de neocuproína.

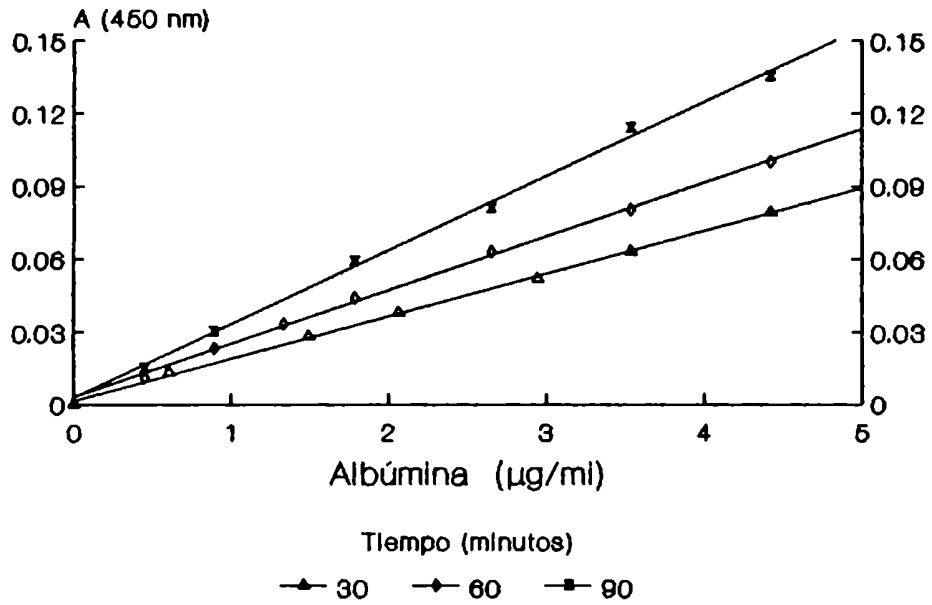


**Figura 10.** Efecto de la concentración de Carbonato de sodio.

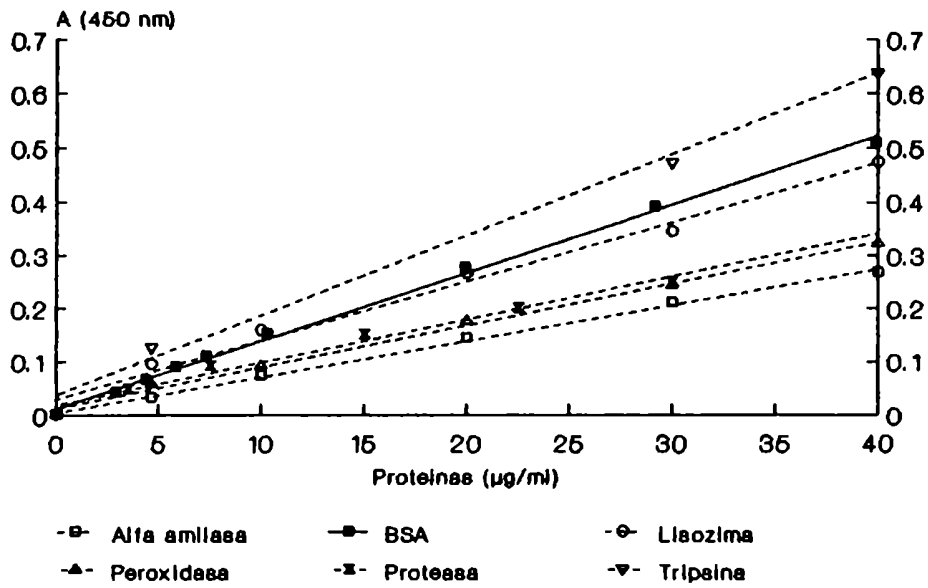


**Figura 11.** Efecto del pH.**Figura 12.** Efecto de la concentración de Cu(II).

**Figura 13.** Tiempo de reacción.



**Figura 14.** Curva de calibración.



Las condiciones experimentales se seleccionaron con el objeto de obtener una lectura mínima de los blancos de reactivos, y por otro lado, que fuera máxima y lineal la respuesta obtenida con la concentración de proteínas. Estas fueron: solución reguladora de pH a 11,25 unidades, compuesta por  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (226 mM), NaOH (60 mM) y tartrato de sodio (42 mM),  $\text{Cu}^{2+}$  (2,7 mM) y clorhidrato de neocuproína (640 nM); con una temperatura de incubación de 40 °C, longitud de onda de 450 nm y el tiempo de incubación de 30 a 60 minutos (dependiendo de la concentración de proteínas a ensayar).

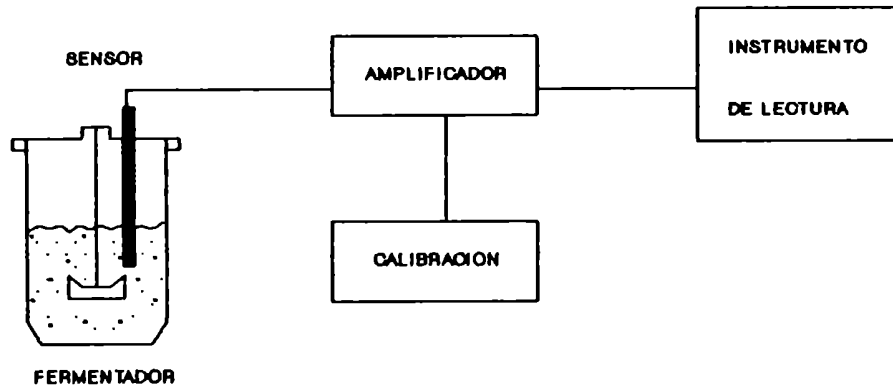
El intervalo de concentración de proteínas para la cual fue optimizada esta técnica es de 0,5 a 40,0 µg/ml ( $r = 0,995$  a  $0,998$ ); a su vez, se ensayaron las respuestas con diversas proteínas (figuras 13 y 14).

#### **2.2.4.- Determinación de crecimiento celular**

El crecimiento microbiano fue determinado por turbidimetría a 560 nm (Spectronic 20 o similar) en el intervalo de 0,05 a 1,00 unidades de densidad óptica. En el caso de obtener densidades superiores a este último valor, se efectuaron diluciones apropiadas de las muestras con solución fisiológica ( $[\text{NaCl}] = 145$  mM).

Alternativamente, y con el objeto de determinar el crecimiento celular en el fermentador, se desarrolló un equipo, basado en medidas turbidimétricas diseñado y construido en nuestro laboratorio, cuyo diagrama sencillo se observa en la figura 15.

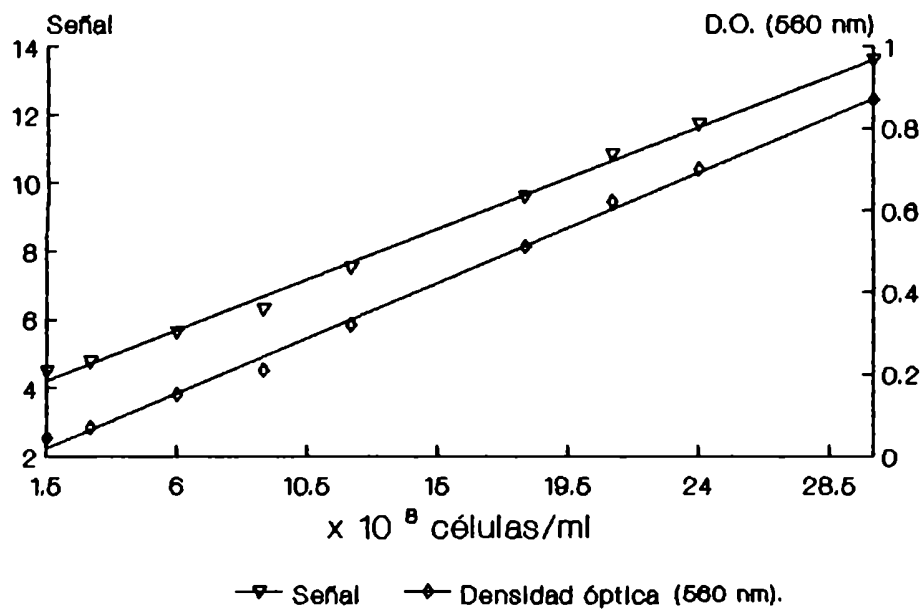
Figura 16. Esquema del detector celular.



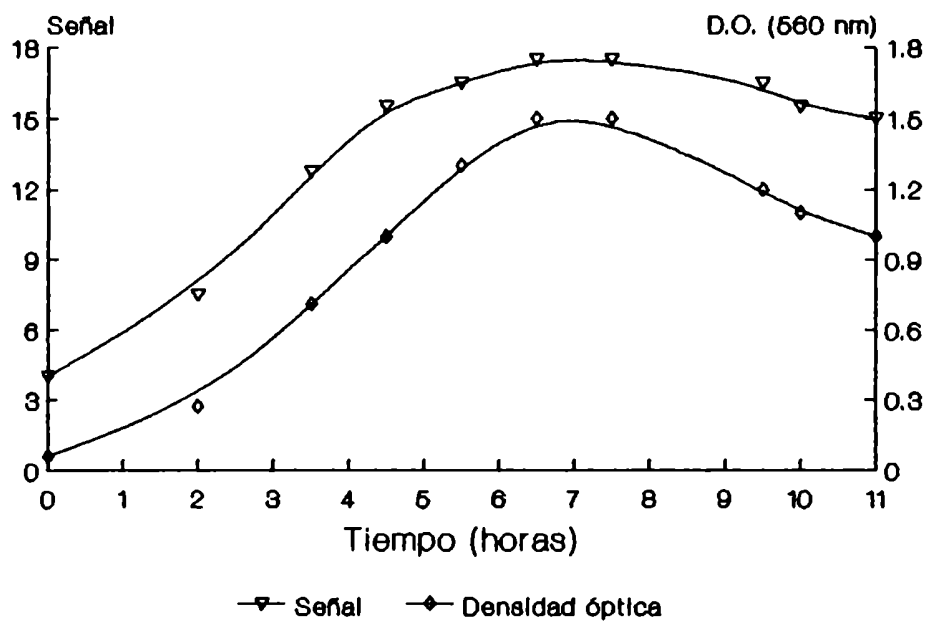
La calibración del equipo se realizó empleando la escala de Mc Farland (Barry, 1980), como se muestra en la figura 16. Por otro lado, con el objeto de estudiar el comportamiento del dispositivo en condiciones de alta y baja absorbancia de medio de cultivo, se realizaron curvas de crecimiento microbiano a 37 °C, empleando para ello una cepa de colección (*B. subtilis* IAM 1521) con medio de cultivo MZ utilizando almidón (10,0 g/l) o glucosa (5,0 g/l) como fuente de carbono, y efectuando simultáneamente determinaciones de densidad óptica (figuras 17 y 18).

Las características destacables de este equipo son su fácil instalación y operación, destacándose la posibilidad de esterilización en el fermentador; calibración rápida, medición continua y directa, posición variable dentro del fermentador, relación lineal entre la señal obtenida y la densidad óptica (560 nm), con una lectura máxima equivalente de 2,0 unidades, y por último respuesta similar en medios con diferentes absorbancias.

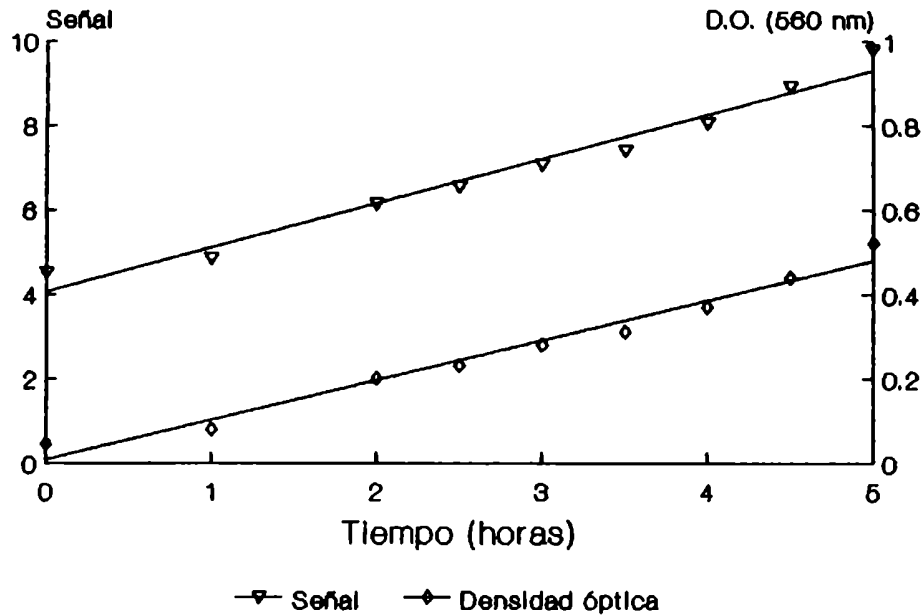
**Figura 16.** Curva de calibración del detector celular.



**Figura 17.** Curva de crecimiento con almidón.



**Figura 18.** Curva de crecimiento con glucosa.



### 2.3.- Determinación de pH y Temperatura óptimos.

Con el objeto de estudiar el efecto de la temperatura y el pH en la actividad enzimática se procedió a la purificación parcial de las muestras, empleando los sobrenadantes provenientes de la centrifugación a 10.000 x g por 20 minutos (4 °C) que denominamos fracción extracelular. Para ello, hemos utilizado la adición de solventes como 2-propanona y/o etanol utilizados a diferentes concentraciones, los cuales poseen la propiedad de precipitar proteínas de fase acuosa. La precipitación se efectúa a 5 °C por un período de 12 a 16 horas, a partir del cual las muestras son centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C descartándose el sobrenadante. El precipitado es disuelto en solución reguladora adecuada para la determinación de cada enzima.

### 3.- RESULTADOS

#### 3.1.- Relevamiento y selección de cepas

Se procedió al aislamiento de cepas nativas partiendo de diversas fuentes naturales. Para ello fue diseñado un esquema de trabajo que permitió seleccionar cepas termoresistentes productoras de enzimas amilolíticas (figura 6). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla V.

Tabla V. Relevamiento de cepas productoras de amilasas.

Muestras		Aislamientos		Porcentajes		
Origen	Cant.	T.	A.+	T./M.	A.+/M.	A./T.
Tierra	27	650	492	24	18	75,7
Agua	8	73	15	9	2	20,5
Otros	4	18	8	5	2	44,4
Totales	39	741	515	19	13.2	69,5

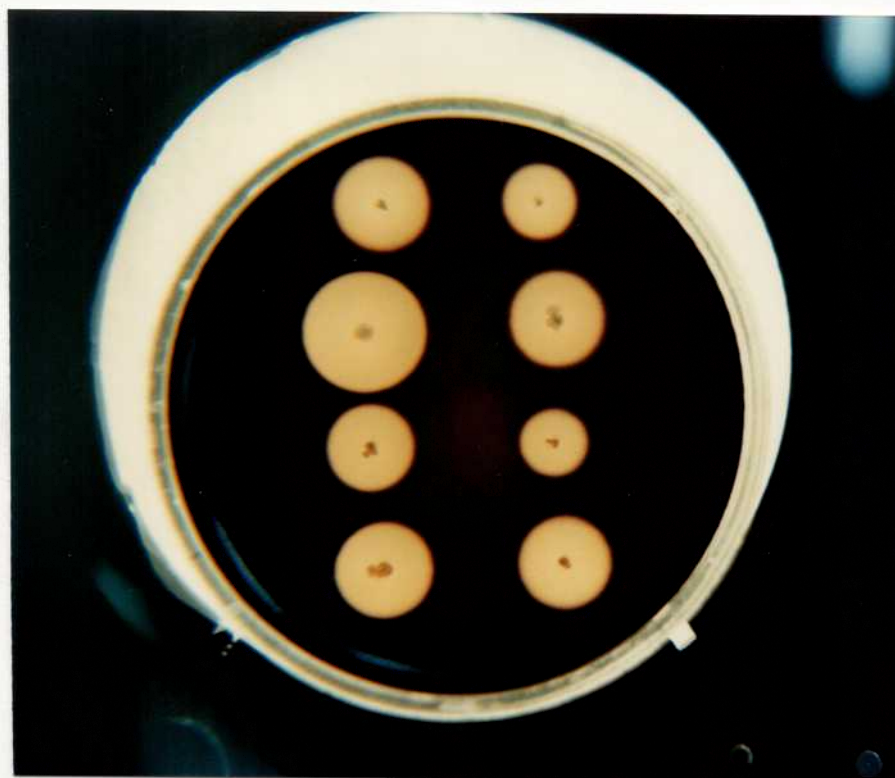
Abreviaturas: Cant., cantidad; T., clones totales; A +, clones amilasa positivos; M., muestra.

Los ensayos en placa para determinar degradación de almidón, se efectuaron primeramente y con fines comparativos, mediante las tres técnicas descritas en materiales y métodos, empleando para ello una cepa microbiana de colección productora de  $\alpha$ -amilasa (*B. subtilis* NCIB 8565). Los resultados obtenidos fueron concordantes entre las mismas, por lo que se procedió a emplear la técnica de lugol para la detección de actividad amilolítica dada la rapidez de la misma y el mayor contraste entre los halos de hidrólisis de almidón y el color azul resultante de la formación del complejo. En aquellos clones en que se detectó la hidrólisis de almidón se realizaron estudios comparativos de producción de amilasas, adoptándose como criterio para la selección de cepas al cociente entre el diámetro promedio del halo producido por la acción del revelador y el diámetro promedio de la colonia.



Mediante sucesivas transferencias se seleccionaron 50 clones cuya relación entre los diámetros promedio fueran mayores. De estos se escogieron 8 clones, por poseer la capacidad de crecer en medio sintético a 45 °C y actividad de  $\alpha$ -amilasa comparable con la de las cepas de colección empleadas como control (*B. subtilis* ATCC 6633 y NCIB 8565) (figura 19).

Figura 19. Relevamiento de cepas productoras de amilasas.



Posteriormente los 8 aislamientos se cultivaron en diferentes medios sintéticos definidos, observándose que la producción de amilasas fue mayor en el medio MZ, por lo que fue elegido para los experimentos posteriores.

En los aislamientos seleccionados, que se denominaron MIR acompañados del número de colonia, se estudió la producción de amilasa. Para los cultivos en medio líquido se emplearon frascos Erlenmeyers de 50 ml de capacidad conteniendo 10 ml de medio de cultivo, incubándose a 45 °C con agitación. A las 12 horas de iniciado el cultivo se retiraron muestras determinándose el crecimiento microbiano, proteínas y  $\alpha$ -amilasa en los extractos libres de células. Los ensayos en placa se realizaron de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Los resultados de los experimentos se muestran en la tabla VI.

Tabla VI. Actividad amilolítica de los aislamientos seleccionados.

Cepa	Activ. Enzimática		D.O.	Prot.	Activ. Específica	
	Placa	Líquido			AA/Prot.	AA/D.O.
MIR 5	7,9	6,60	1,05	11,5	0,57	6,29
MIR 41	23,4	14,40	0,85	10,0	1,44	16,94
MIR 61	7,8	4,80	0,68	12,8	0,38	7,06
MIR 213	16,1	13,00	1,90	18,6	0,70	6,84
MIR 310	9,4	16,80	1,28	14,6	1,15	13,13
MIR 419	7,3	12,60	0,75	10,7	1,18	16,80
MIR 550	16,9	20,50	1,82	13,2	1,55	11,26
MIR 621	13,7	17,20	1,68	13,5	1,27	10,24
ATCC 6633	7,6	5,40	1,75	10,3	0,52	3,09
NCIB 8565	18,0	12,50	1,15	9,8	1,28	10,87

Abreviaturas: D.O., densidad óptica (560 nm); Prot., proteínas ( $\mu\text{g/ml}$ ); AA, la actividad de  $\alpha$ -amilasa se expresa en kU/ml.

De los ocho aislamientos se consideraron como características de importancia en la selección de una cepa promisorio productora de  $\alpha$ -amilasa, poseer una alta actividad enzimática extracelular en medio líquido, así como elevadas actividades específicas en función de la concentración celular y de la concentración de proteínas en el medio de cultivo. En función de estos resultados y de los observados en la tabla VI, se seleccionó la cepa MIR 41, por producir la máxima actividad específica en función de la concentración celular y una de las más elevadas actividades específicas respecto de la concentración de proteínas.

En un ensayo posterior se estudió el crecimiento de las ocho cepas seleccionadas, reemplazando el almidón por diferentes  $\alpha$ -glucanos, a saber: amilopectina (10,0 g/l), glucógeno (5,0 g/l) y pululano (5,0 g/l). Con excepción de la cepa MIR 5, la cual no fue capaz de degradar glucógeno, las restantes crecieron determinándose densidades ópticas comprendidas en el intervalo de 0,6 a 2,3 unidades, dependiendo del glucano y del aislamiento.

Por los resultados mostrados en la tabla VI se consideró la cepa MIR 5 interesante para su estudio, ya que posee una baja actividad dextrinizante respecto de las otras cepas seleccionadas, y es llamativa su incapacidad para degradar glucógeno aunque es capaz de degradar pululano.

### 3.2.- Caracterización microbiológica

Se realizó de acuerdo a los criterios internacionales establecidos para microorganismos pertenecientes al género *Bacillus*, efectuándose 97 ensayos para las cepas en estudio, los que se muestran en las tablas VII y VIII.

Tabla VII. Ensayos morfológicos y bioquímicos en las cepas seleccionadas.

Ensayo	Cepa	
	MIR 5	MIR 41
<b>Morfología de colonia</b>		
1. Rugosa/lisa	+	+
2. Lisa	+	-
3. Rizoidal	-	-
4. Opaca	+	+
5. Pigmentada	+	+
6. Motilidad	-	-
<b>Morfología celular</b>		
7. Extremos redondeados	+	+
8. Células aisladas	+	+
9. Formación de cadenas	+	-
10. Vacuolas	-	-
11. Espora elipsoidal	+	+
12. Espora cilíndrica	-	-
13. Espora central	+	+
14. Espora terminal	-	+
15. Espora deformante	-	-
<b>Degradación de</b>		
16. Aceite de oliva	+	+
17. ADN	+	-
18. Almidón	+	+
19. Caseína	+	+
20. CMC	+	-
21. Gelatina	+	+
22. Pululano	+	+
23. Tween 20	+	+
24. Tween 80	-	-
25. Urea	-	-
<b>Crecimiento</b>		
26. pH= 4,5	+	-
27. pH= 6,0	+	+
28. pH= 7,0	+	+
29. 30 °C	+	+
30. 37 °C	+	+
31. 45 °C	+	+
32. 50 °C	+	+
33. 60 °C	-	-
34. NaCl (2,0 %, p/v)	+	+
35. NaCl (5,0 %, p/v)	+	+
36. NaCl (7,0 %, p/v)	-	+
<b>Otros ensayos</b>		
37. Catalasa	+	+
38. Crec. anaeróbico	-	-
39. Crec. en Mac Conkey	-	-
40. Desaminación de F	-	+
<b>Otros ensayos</b>		
41. Gram positivo	+	+
42. Gram variable	+	+

**Tabla VII continuación. Ensayos morfológicos y bioquímicos en las cepas seleccionadas.**

Ensayo	Cepa	
	MIR 5	MIR 41
<b>Otros ensayos</b>		
43. Producción de DHA	+	+
44. Producción de indol	-	-
45. Prod. de gas (glucosa)	-	-
46. Reducción de nitratos	+	-
47. Rojo de metilo	+	+
48. Utilización de citrato	-	-
49. Voges-Proskauer	+	+

Abreviaturas: ADN, ácido desoxiribonucleico; CMC, carboximetil celulosa; DHA, dihidroxiacetona; F, fenilalanina.  
 Símbolos: - y + resultados negativos y positivos respectivamente.

**Tabla VIII. Ensayos bioquímicos empleando el sistema Api 50 Ch en las cepas seleccionadas.**

Ensayo	Cepa	
	MIR 5	MIR 41
<b>Utilización de</b>		
1. Adonitol	-	-
2. Almidón	+	+
3. Amigdalina	+	+
4. D-Arabinosa	-	-
5. L-Arabinosa	+	+
6. D-Arabitól	-	-
7. L-Arabitól	-	-
8. Arbutina	+	+
9. Celobiosa	+	+
10. Eritritol	-	-
11. Esculina	+	+
12. D-Fructosa	+	+
13. D-Fucosa	-	-
14. L-Fucosa	-	-
15. Galactosa	+	-
16. Galactitol	-	-
17. $\beta$ -Gentobiosa	-	+
18. Glicerol	+	+
19. Glucógeno	-	+
20. Gluconato	-	-
21. 2-Ceto-gluconato	-	-
22. 5-Ceto-gluconato	-	-
23. D-Glucosa	+	+
24. N-acetil-glucosamina	-	-
25. $\alpha$ -Metil-D-glucósido	+	+
26. Inositol	+	+
27. Inulina	+	-
28. Lactosa	+	+
29. D-Lixosa	-	-
30. Maltosa	+	+

Tabla VIII continuación. Ensayos bioquímicos empleando el sistema Api 50 CH en las cepas seleccionadas.

Ensayo	Cepa	
	MIR 5	MIR 41
Utilización de		
31. Manitol	+	+
32. D-Manosa	+	+
33. $\alpha$ -Metil-manósido	-	-
34. Melibiosa	+	+
35. Melizitosa	-	-
36. D-Rafinosa	+	+
37. Rhamnosa	-	-
38. Ribosa	+	+
39. Sacarosa	+	+
40. Salicina	+	+
41. Sorbitol	+	+
42. L-Sorbosa	-	-
43. D-Tagatosa	-	-
44. D-Turanosa	+	+
45. Trehalosa	+	+
46. Xilitol	-	-
47. D-Xilosa	+	+
48. L-Xilosa	-	-
49. $\beta$ -Metil-xilosido	-	-

Símbolos: - y + resultados negativos y positivos respectivamente.

Debido a la falta de coincidencia en la totalidad de los ensayos efectuadas con las cepas en estudio, respecto a los mismos considerados en las diferentes especies pertenecientes al Género *Bacillus* descritas en la literatura (Gordon, 1977; Claus y col., 1986; Logan y col., 1984; Priest y col., 1987, 1988a), se procedió a efectuar un tratamiento estadístico sencillo empleando el coeficiente de Jaccard ( $S_j$ ) (Colwell y Austin, 1981). Para efectuar el cálculo del  $S_j$  se utilizaron los resultados de los ensayos obtenidos de la literatura (Claus y col., 1986; Logan y col., 1984; Priest y col., 1988a). Los resultados de cada prueba se consideraron negativos cuando el porcentaje de positivos para la especie considerada estuviera comprendido entre 0 y 49 %, y son considerados positivos cuando el porcentaje fuera mayor o igual al 50 %. Los resultados del cálculo de los coeficientes

realizados sobre 92 ensayos, cuyo valor fue superior a 0,6 se muestran en la tabla IX.

Tabla IX. Coeficientes de Jaccard de las cepas en estudio.

Cepas	MIR 5	MIR 41
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0,763	0,821
<i>B. circulans</i>	0,606	0,631
<i>B. lentus</i>	0,683	0,702
<i>B. licheniformis</i>	0,734	0,714
<i>B. megaterium</i>	0,719	0,677
<i>B. polymyxa</i>	0,703	0,656
<i>B. pumilus</i>	0,645	0,633
<i>B. subtilis</i>	0,831	0,783
MIR 5	1,000	0,800

Los resultados obtenidos con las cepas en estudio, muestran una alta homología de las mismas con los grupos *circulans*, *lentus*, *megaterium* y *subtilis*, sin embargo se debe notar que los mayores valores se observan en el grupo *subtilis*. En este grupo se identificaron las cepas por su mayor homología en el coeficiente de Jaccard con las especies aceptadas oficialmente por el Comité Internacional en Bacteriología Sistemática (Claus, 1986). Por lo que la cepa MIR 5 es identificada como *subtilis* ( $S_j = 0,831$ ) y la cepa MIR 41 como *amyloliquefaciens* ( $S_j = 0,821$ ). Por otro lado, se debe notar que existe un elevado coeficiente de Jaccard entre ambas cepas aisladas ( $S_j = 0,800$ ).

Las pruebas de sensibilidad a antibióticos efectuadas con cepas de colección así como con las cepas en estudio, permitieron establecer una elevada correlación entre la cepa MIR 5 y las cepas pertenecientes a la especie *subtilis* (ATCC 6633, NCIB 8565, IAM 1521). Los resultados obtenidos para el grupo *subtilis* y las cepas en estudio se muestran en la Tabla X.

Tabla X. Pruebas de sensibilidad a antibióticos.

Cepas	Subt.	MIR 5	Lich.	Pum.	MIR 41
<b>ANTIBIOTICOS (µg)</b>					
1. Amicacina (30)	S	S	S	S	S
2. Ampicilina (10)	S	S	S	S	R
3. Carbencilina (100)	S	S	S	S	S
4. Cefalosporina C (30)	S	R	S	S	S
5. Cefotaxima (30)	S	S	S	S	R
6. Ceftazidina (30)	R	R	R	R	R
7. Ceftriaxona (30)	R	R	S	S	S
8. Cefuroxima (30)	S	S	S	S	S
9. Clindamicina (2)	S	S	R	S	S
10. Colistina (10)	S	S	R	R	R
11. Dicloxacilina (5)	S	S	S	S	S
12. Eritromicina (15)	S	S	R	S	S
13. Gentamicina (10)	S	S	S	S	S
14. Mezlocilina (75)	S	S	S	S	R
15. Netilmicina (30)	S	S	S	S	S
16. Norfloxacina (10)	S	S	S	S	S
17. Penicilina (6)	R	R	R	S	R
18. Rifampicina (5)	S	S	R	S	R
19. Ticarcilina (75)	S	S	S	S	R

Abreviaturas: Subt., *B. subtilis* NCIB 8565; Lich., *Bacillus licheniformis* ATCC 21424; Pum., *B. pumilus* ATCC 2589.  
 Símbolos: R, resistente y S, sensible.

Por otro lado, las pruebas de sensibilidad a antibióticos efectuadas en cepas de *Bacillus polymyxa*, *B. circulans* y *B. subtilis*, aisladas y caracterizadas en nuestro laboratorio, permitieron comprobar la presencia de perfiles característicos de cada cepa. En base a ello, se procedió a emplear el perfil de sensibilidad a antibióticos como uno de los criterios de control microbiológico de los cultivos durante las fermentaciones.



### 3.3.- Cultivo de *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*.

#### 3.3.1.- Producción de Alfa Amilasa

##### 3.3.1.1.- Cultivo por lotes

Las actividades totales y extracelulares de  $\alpha$ -amilasa detectadas en los cultivos por lote de *B. subtilis* MIR 5 mostraron diferente perfil de actividad (Figura 23). Sin embargo, las actividades enzimáticas en función de la concentración celular presentan una relación lineal (Figura 24).

Las actividades extracelulares y totales de  $\alpha$ -amilasa en *B. amyloliquefaciens* MIR 41 en cultivos por lotes controlados mostraron un elevado paralelismo (Figura 31). Si se comparan las curvas de crecimiento celular y actividad enzimática (Figuras 28 y 31 respectivamente) se puede establecer una relación lineal entre ambas como en el caso anterior (Figura 32). Los resultados obtenidos luego de 12 horas de alcanzada la fase estacionaria de crecimiento muestran un aumento en la concentración de la enzima extracelular de 23 % en promedio respecto del inicio de la misma (Figura 31). De esta manera, la síntesis mayoritaria de  $\alpha$ -amilasa es observada en la fase exponencial de crecimiento.

En *B. amyloliquefaciens* MIR 41, la actividad específica de  $\alpha$ -amilasa en función de la concentración de proteínas alcanzó su máximo valor en el inicio de la fase estacionaria, y fue aproximadamente un 100 % mayor respecto de la actividad específica obtenida entre las 24 y 28 horas (Figura 32). Una tendencia similar se observó al considerar la actividad específica en función de la concentración celular. A su vez, si efectuamos el cociente entre la actividad enzimática extracelular y total, se observa un máximo en la fase estacionaria temprana (Figura 33).

### 3.3.1.2.- Efecto de la temperatura y el pH

Para estudiar el efecto de la temperatura y el pH sobre la producción de  $\alpha$ -amilasa en *B. amyloliquefaciens* MIR 41 se utilizó un quimiostato con una velocidad de dilución de 0,15 - 0,16 h<sup>-1</sup>. El análisis de las muestras obtenidas en condiciones de estado estacionario, empleando temperaturas de cultivo de 36, 40 y 44 °C, revelaron que la producción de  $\alpha$ -amilasa se encuentra afectada por el pH y la temperatura (Figuras 41, 42 y 43). La máxima actividad enzimática fue detectada en todos los casos a pH 6,8 observándose una disminución del 21 % a 40 °C y del 47 % a 44 °C de la misma en la fracción extracelular, respecto de 36 °C considerado como 100 % (41,2 kU/ml).

Los perfiles obtenidos a las tres temperaturas ensayadas son similares. Sin embargo, se debe notar que a 44 °C no se observa un máximo de actividad como en los restantes casos. Si se considera la actividad específica de  $\alpha$ -amilasa calculada en función de la concentración de proteínas (Figura 38), la variación de la misma respecto de la temperatura es mucho mayor: 2,82, 2,24 y 1,31 kU/ $\mu$ g de proteína a 36, 40 y 44 °C respectivamente. Sin embargo, la relación obtenida entre la actividad extracelular/total con la excepción de los puntos de pH extremos es mayor a 44 °C que a las restantes temperaturas (Figura 44). La concentración de proteínas detectadas en el medio de cultivo (Figura 38), en ausencia de significativos niveles de lisis celular, en general aumenta con el incremento de temperatura.

### 3.3.1.3.- Cultivo continuo

En *B. amyloliquefaciens* MIR 41 se estudio la síntesis de  $\alpha$ -amilasa en un quimiostato a los valores de pH y temperatura correspondientes a la mayor actividad enzimática observada. Los resultados obtenidos revelan que la producción de

$\alpha$ -amilasa disminuye al aumentar la velocidad de dilución cuando se utiliza almidón como fuente de carbono (Figuras 62). Similares resultados fueron obtenidos en *B. subtilis* MIR 5.

La máxima actividad enzimática de  $\alpha$ -amilasa producida por *B. amyloliquefaciens* MIR 41, al igual que la actividad específica calculada en base a la concentración de proteínas en el medio de cultivo, se detecta a la menor velocidad de dilución utilizada ( $D= 0,11 \text{ h}^{-1}$ ). Sin embargo, se observa que la máxima productividad se obtiene a  $D= 0,16 \text{ h}^{-1}$  (Figura 66), de manera coincidente con el máximo del cociente de actividades enzimáticas extracelular-total, observándose que en todos los casos el porcentaje de  $\alpha$ -amilasa extracelular supera el 75 % de la actividad enzimática total.

Resultados similares han sido obtenidos en la producción de  $\alpha$ -amilasa producida por *B. subtilis* MIR 5 (Figura 53). Sin embargo, la productividad máxima de  $\alpha$ -amilasa se alcanza en  $D= 0,25 \text{ h}^{-1}$  para esta cepa.

### **3.3.2.- Producción de Alfa-Glucosidasa**

#### **3.3.2.1.- Cultivo por lotes**

Son significativamente escasos los trabajos que describen la producción de otras enzimas vinculadas a la degradación de  $\alpha$ -glucanos, en particular de almidones, en el Género *Bacillus* (Marshall, 1975; Aunstrup, 1978).

En los primeros estadios de crecimiento celular de *B. subtilis* MIR 5 y *B. amyloliquefaciens* MIR 41 en cultivo por lotes, fue detectada una marcada disminución de la concentración de almidón (Figuras 21 y 29), asociado al aumento de la concentración de glucosa en el medio de cultivo (Figuras 22 y 30). Las bajas concentraciones celulares y la escasa actividad de  $\alpha$ -amilasa detectadas en esta etapa del cultivo hicieron presuponer la existencia de  $\alpha$ -glucosidasas. Es así que en ambas cepas fue detectada dicha actividad enzimática (Figuras 26 y 34), observándose que la expresión de

la actividad es temporal y diferente respecto del perfil de expresión de  $\alpha$ -amilasa (Figura 23 y 31).

En *B. amyloliquefaciens* MIR 41 la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa se detecta principalmente en la fracción total (Figura 34). Alcanzando un máximo la actividad extracelular en la fase estacionaria (28 horas de cultivo).

Experimentos similares realizados con *B. subtilis* MIR 5 permitieron detectar actividad de  $\alpha$ -glucosidasa, con un perfil temporal similar al obtenido para *Bacillus amyloliquefaciens* MIR 41. Sin embargo, en este caso las curvas obtenidas de actividad total y extracelular muestran un gran paralelismo entre sí (Figura 26). Y comparativamente, los niveles de actividad extracelular máximos detectados en *B. subtilis* MIR 5 (65 U/l) duplican a los respectivos producidos por *B. amyloliquefaciens* MIR 41 (30 U/l) y esa diferencia es aproximadamente 20 veces mayor, considerando la actividad específica en función de la concentración celular.

### 3.3.2.2.- Efecto de la temperatura y el pH

Los estudios de los efectos de la temperatura y el pH sobre la producción de  $\alpha$ -glucosidasa realizados en *B. amyloliquefaciens* MIR 41 utilizando cultivo continuo, a velocidad de dilución 0,15 a 0,16 h<sup>-1</sup>, arrojaron los siguientes resultados: al igual que en el caso de la producción de  $\alpha$ -amilasa existe un notorio efecto del pH y de la temperatura en la síntesis de la misma (Figuras 42, 43 y 44). A las distintas temperaturas ensayadas se observa que la actividad máxima se detecta a 36 °C y a pH 6,8. Actividades enzimáticas aproximadamente 5 y 14 veces menores se observaron a 40 y 44 °C respectivamente. Un fenómeno similar al descrito para  $\alpha$ -amilasa se detectó para la relación de actividades extracelular-total de  $\alpha$ -glucosidasa (Figuras 42, 43 y 44).

### 3.3.2.3.- Cultivo continuo

La producción de  $\alpha$ -glucosidasa empleando *B. subtilis* MIR 5 no se ve afectada prácticamente por la velocidad de dilución en el intervalo comprendido entre  $D= 0,11$  y  $0,45 \text{ h}^{-1}$  (Figura 55). Sin embargo, se observa que a  $D= 0,45 \text{ h}^{-1}$  la producción de enzima extracelular se incrementa levemente y disminuye la actividad en la fracción total.

Los ensayos en quimiostato realizados a  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  y pH 6,8 con velocidades de dilución variables, empleando *Bacillus amyloliquefaciens* MIR 41 mostraron los siguientes resultados: la producción de  $\alpha$ -glucosidasa presenta un máximo relativo a  $D= 0,16 \text{ h}^{-1}$ , observándose una disminución de la producción de la misma con el aumento de la velocidad de dilución (Figura 63). La productividad de la enzima alcanza un máximo a  $D= 0,33 \text{ h}^{-1}$ , mientras que la actividad extracelular es máxima a  $D= 0,24 \text{ h}^{-1}$  (Figura 67).

### 3.3.3.- Producción de Pululanasa

#### 3.3.3.1.- Cultivo por lotes

Estudios en cultivos por lote permitieron detectar actividad de pululanasa en *B. amyloliquefaciens* MIR 41, localizándose en la fracción celular el 93 a 96 % de la actividad enzimática total (Figura 35). La actividad de pululanasa en *B. amyloliquefaciens* MIR 41 presenta un perfil temporal, coincidiendo los máximos valores de actividad enzimática, 189 U/l, con una rápida disminución de almidón (Figura 29), y el incremento en la concentración de azúcares reductores (Figura 30). Con posterioridad se produce la disminución de la actividad de pululanasa previo al comienzo de la fase estacionaria y en forma paralela decae la concentración de los azúcares reductores.

La actividad de pululanasa no pudo ser detectada en cultivos de *B. subtilis* MIR 5.

### 3.3.3.2.- Efecto de la temperatura y el pH

Los estudios del efecto de la temperatura y el pH en la síntesis de pululanasa con *B. amyloliquefaciens* MIR 41, en condiciones de estado estacionario utilizando cultivo continuo ( $D = 0,15 - 0,16 \text{ h}^{-1}$ ) se obtuvieron los siguientes resultados: el análisis de las curvas de actividad de pululanasa ensayadas en la fracción total (Figura 49) revela que la síntesis de la misma tiende a un máximo al elevarse la temperatura de cultivo de 36 a 44 °C. De esta manera la mayor actividad fue encontrada a 44 °C y en condiciones de pH ácido: 5,6 unidades; no detectándose actividad en la fracción extracelular.

### 3.3.3.3.- Cultivo continuo

Estudios realizados en *B. amyloliquefaciens* MIR 41 empleando cultivo continuo, en condiciones de estado estacionario y variando la velocidad de dilución permitieron detectar la máxima de actividad de pululanasa, 81 U/l, empleando una velocidad de dilución de  $0,24 \text{ h}^{-1}$  y detectándose únicamente en la fracción total (Figura 64), como ocurría en los cultivo por lotes. Si se comparan las actividades enzimáticas en cultivo por lotes y continuo, se observa en este última modalidad una disminución de la expresión de la actividad de pululanasa cercana a un 60 %. A su vez, la productividad máxima de esta enzima se detecta a la velocidad de dilución de  $0,24 \text{ h}^{-1}$  (Figura 68).

### 3.3.4.- Producción de beta Amilasa

#### 3.3.4.1.- Cultivo por lotes

Estudios en cultivo por lotes empleando *B. subtilis* MIR 5 permitieron detectar actividad de  $\beta$ -amilasa (Figura 25). La misma es expresada por las células desde el comienzo de la fase exponencial de crecimiento y posteriormente, al alcanzar la fase estacionaria disminuye en más de un 50 % su actividad. El máximo de actividad coincidió con el de excreción y se

obtuvo a las 6 horas de iniciado el cultivo. El perfil de Síntesis muestra que la localización de la enzima es mayoritariamente extracelular: 63,0 a 88,0 % respecto de la actividad total (Figura 25).

La actividad de  $\beta$ -amilasa no pudo ser detectada en cultivos efectuados con *B. amyloliquefaciens* MIR 41.

#### 3.3.4.2.- Cultivo continuo

Fue estudiada la producción de  $\beta$ -amilasa en quimiostato, observándose que la actividad enzimática no estuvo prácticamente afectada por la velocidad de dilución. La máxima concentración obtenida fue de 814 U/l, de las cuales el 57 % fue extracelular (Figura 54). La productividad de  $\beta$ -amilasa tiende a un máximo cerca de la velocidad de dilución crítica ( $D = 0,47 \text{ h}^{-1}$ ) poseyendo 40 % de actividad extracelular.

#### 3.3.5.- Presencia de proteasas.

##### 3.3.5.1.- Cultivo por lotes

Con el objeto de estudiar la posible degradación por vía enzimática de las enzimas amilolíticas producidas por las cepas seleccionadas, se procedió a la determinación de actividad de proteasas en las muestras libres de células, obteniéndose los siguientes resultados: empleando *Bacillus subtilis* MIR 5 se puede observar el incremento en la concentración de proteasas durante el transcurso del cultivo, cuya actividad alcanza un máximo en la fase estacionaria (Figura 27). Similares resultados fueron obtenidos en *B. amyloliquefaciens* MIR 41 (Figura 36).

##### 3.3.5.2.- Efecto de la temperatura y el pH

En los estudios de sobre el efecto del pH y la temperatura en la Síntesis de enzimas amilolíticas empleando *Bacillus amyloliquefaciens* MIR 41, se utilizó la modalidad de cultivo continuo, operando en condiciones de estado

estacionario ( $D = 0,15 - 0,16 \text{ h}^{-1}$ ). Los resultados obtenidos fueron los siguientes: la síntesis de proteasas extracelulares, revela una máxima actividad a  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y con un pH de 6,8 unidades. En este caso la variación de la actividad enzimática es cercana al 10 % en el intervalo de pH y temperatura analizado (Figura 50).

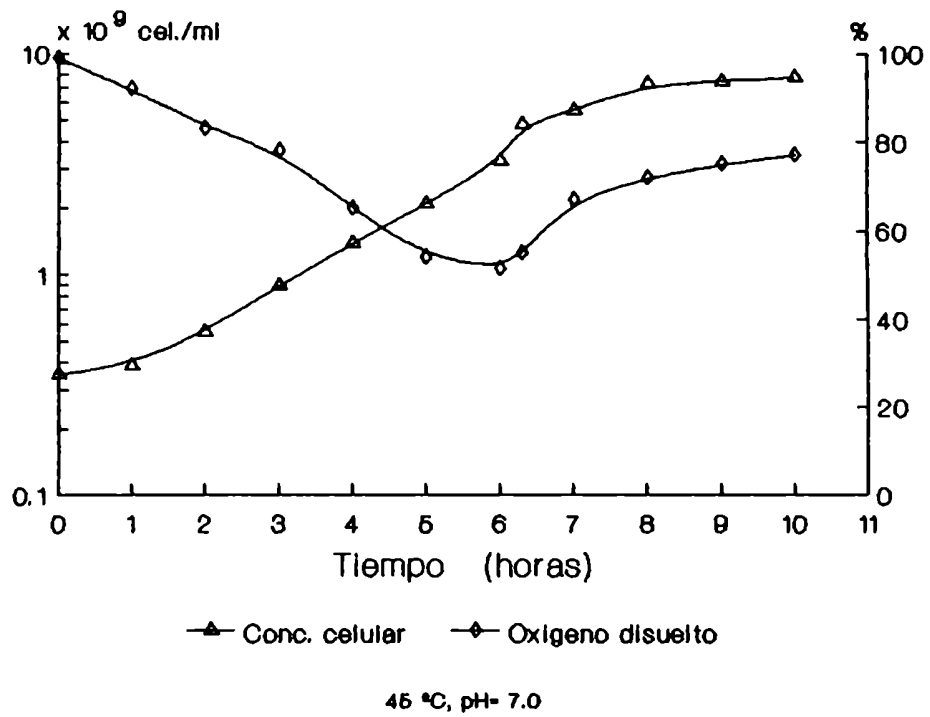
### 3.3.5.3.- Cultivo continuo

En *B. amyloliquefaciens* MIR 41, la máxima actividad de proteasas extracelulares (1,9 kU/l) fue detectada a la menor velocidad de dilución empleada ( $D = 0,11 \text{ h}^{-1}$ ), disminuyendo rápidamente con el incremento de la velocidad de dilución, con un mínimo cercano a los 0,5 kU/l en  $D = 0,44 \text{ h}^{-1}$  (Figura 65). Similares resultados se obtuvieron en los cultivos de *Bacillus subtilis* MIR 5.

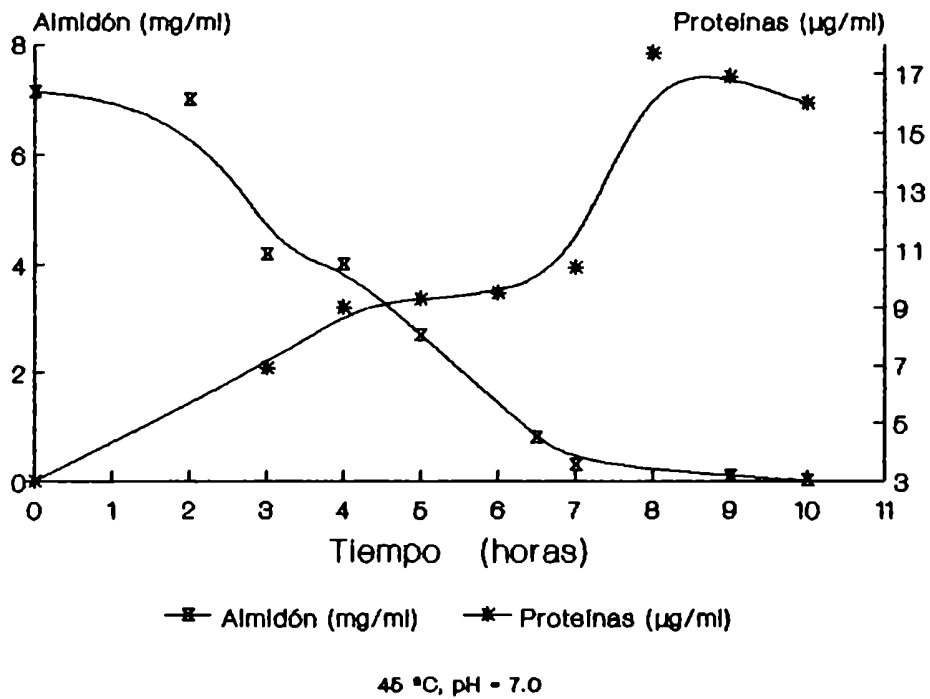
Considerando la actividad enzimática máxima en *Bacillus amyloliquefaciens* MIR 41, se observa que se duplica la misma respecto del máximo obtenido en la modalidad de cultivo por lotes.



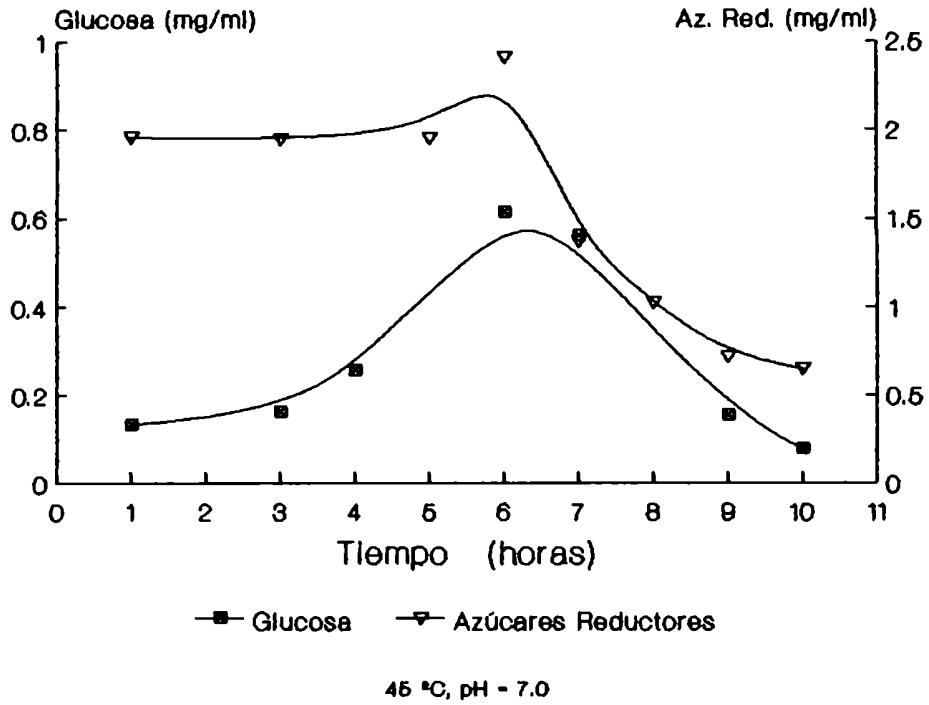
**Figura 20.** Crecimiento celular y oxígeno disuelto. *B. subtilis* MIR 5.



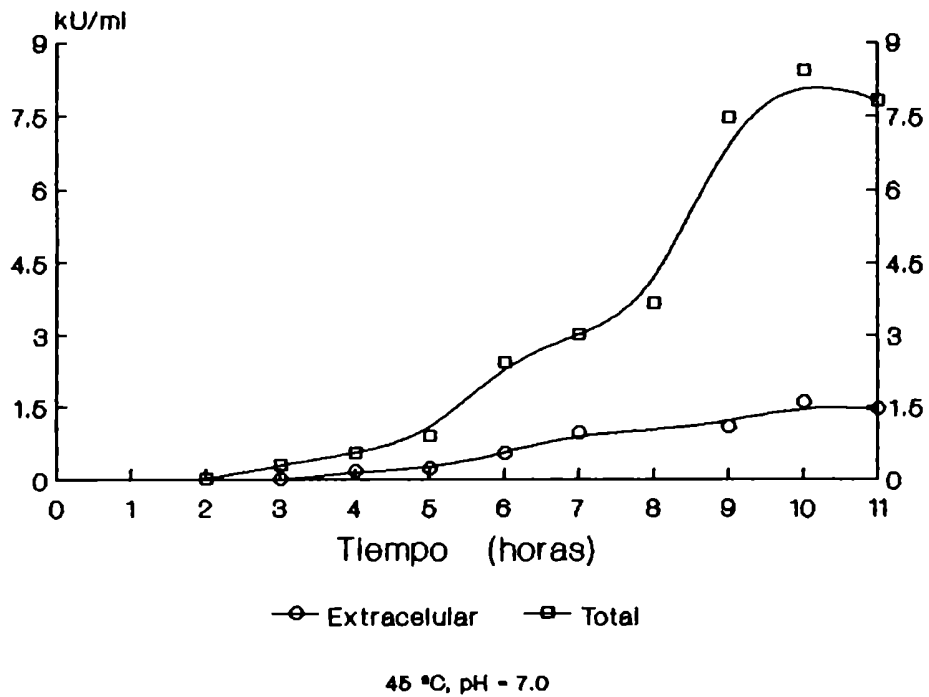
**Figura 21.** Concentración de almidón y proteínas extracelulares. *B. subtilis* MIR 5.



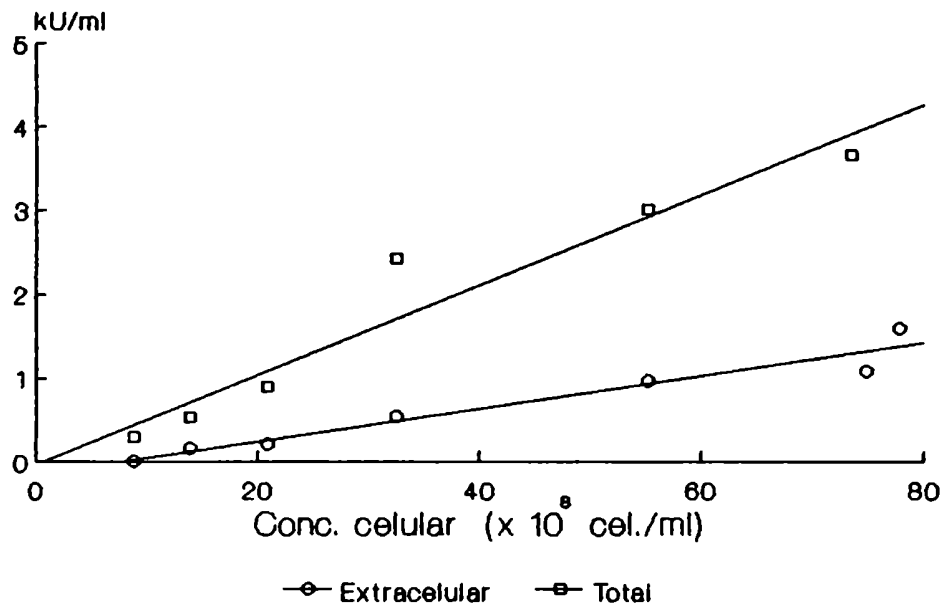
**Figura 22.** Hidratos de carbono. *B. subtilis* MIR 5.



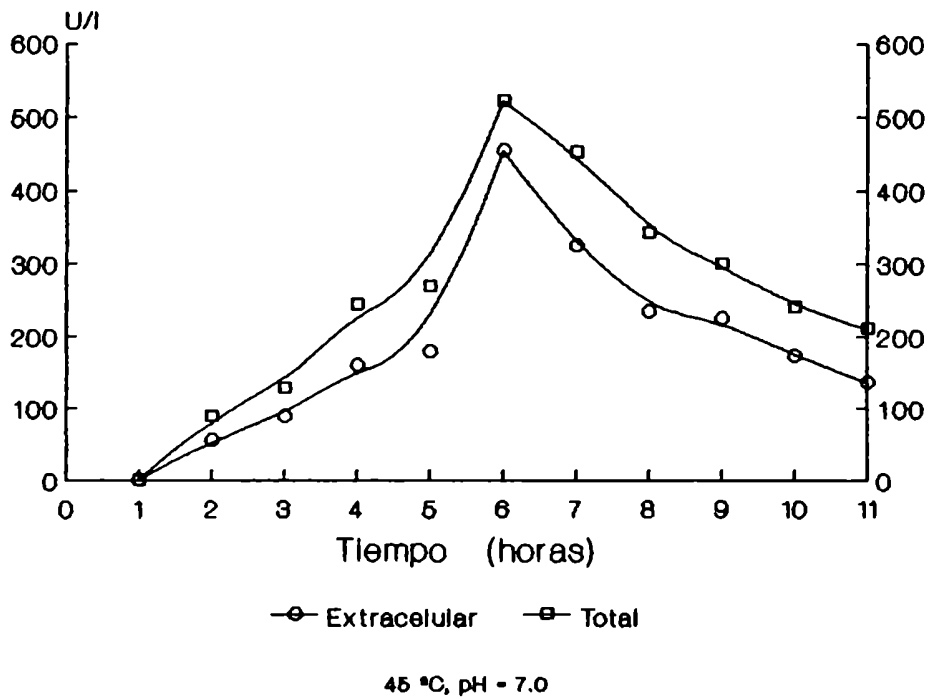
**Figura 23.** Actividad de alfa amilasa. *B. subtilis* MIR 5.



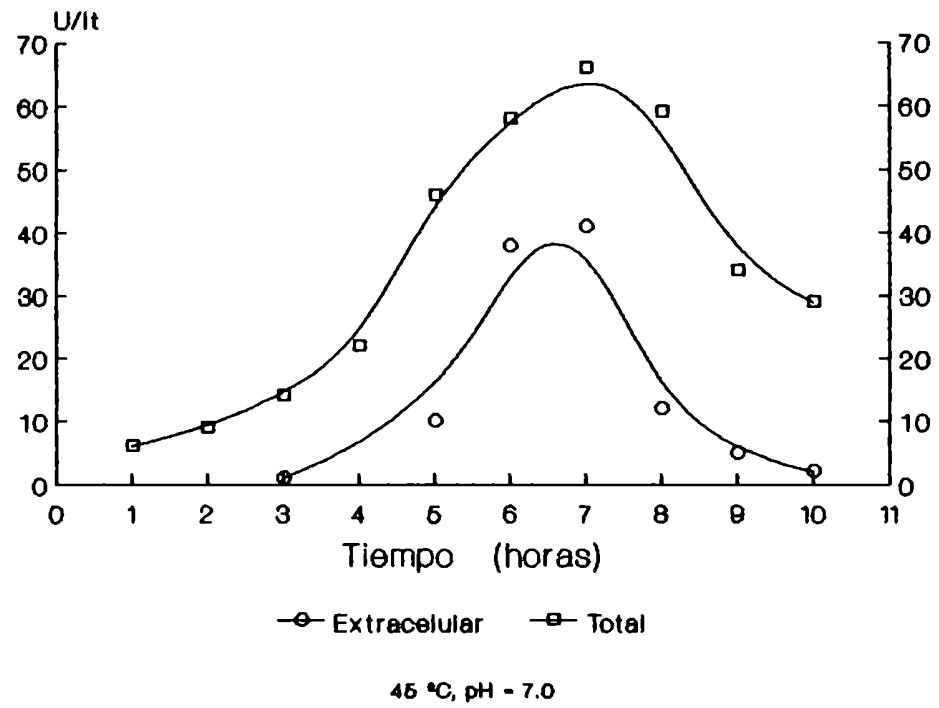
**Figura 24.** Síntesis de alfa amilasa en cultivo por lote. *B. subtilis* MIR 5.



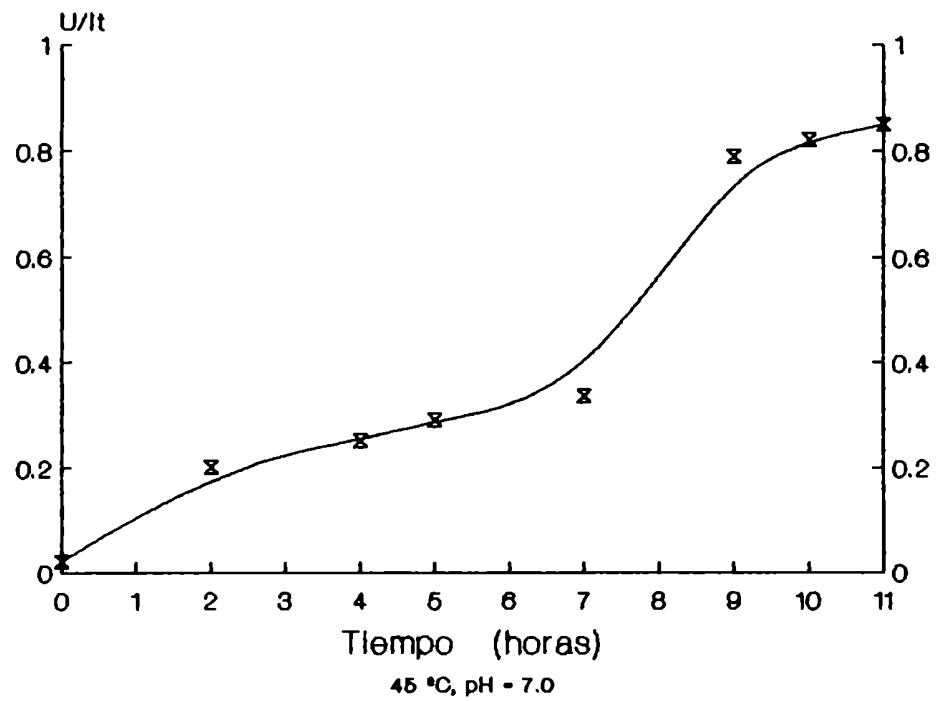
**Figura 25.** Actividad de beta amilasa. *B. subtilis* MIR 5.



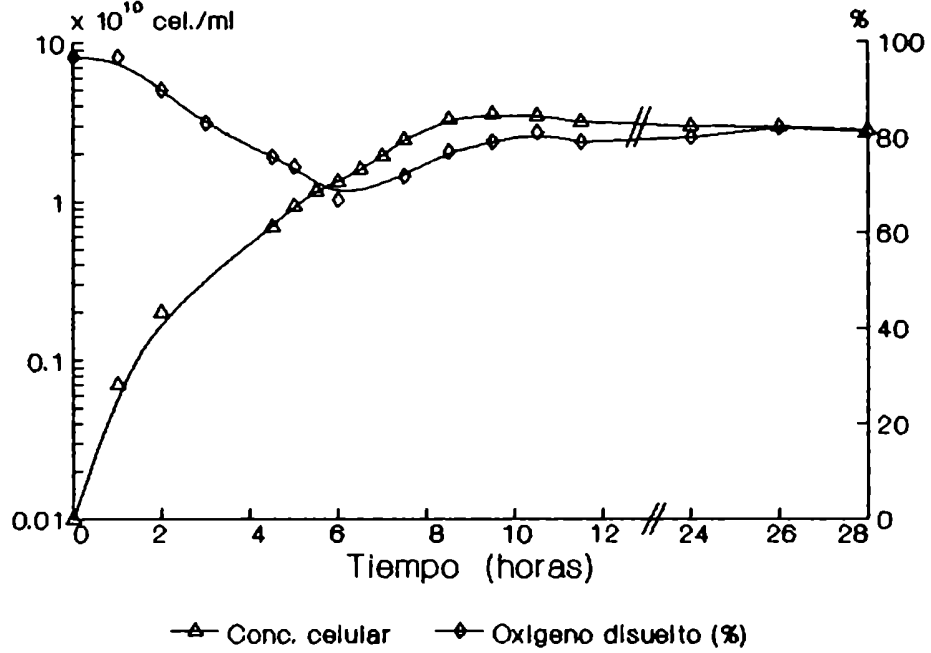
**Figura 26.** Actividad de alfa glucosidasa. *B. subtilis* MIR 5.



**Figura 27.** Actividad de proteasas. *B. subtilis* MIR 5.

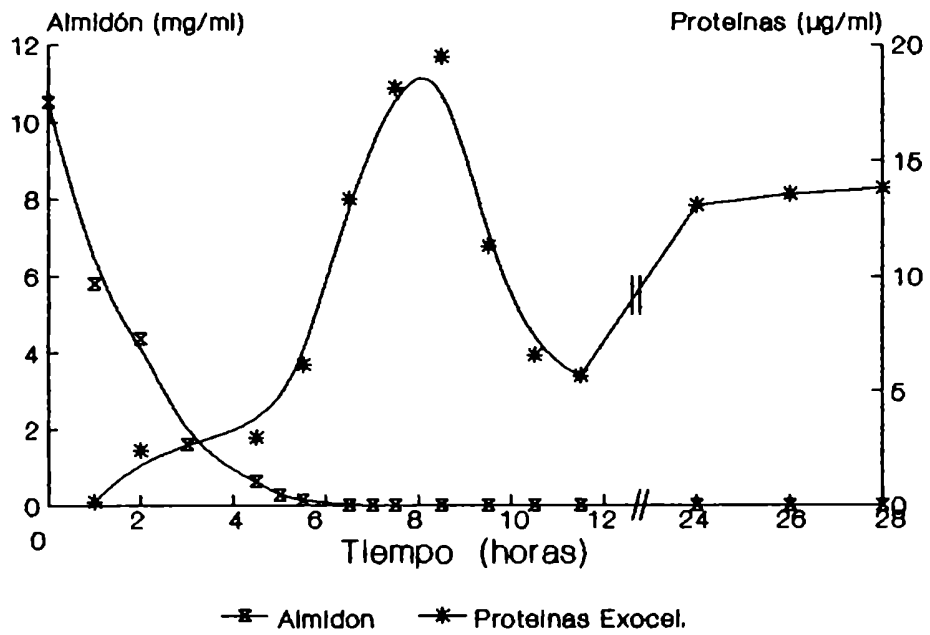


**Figura 28.** Crecimiento celular y oxígeno disuelto. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



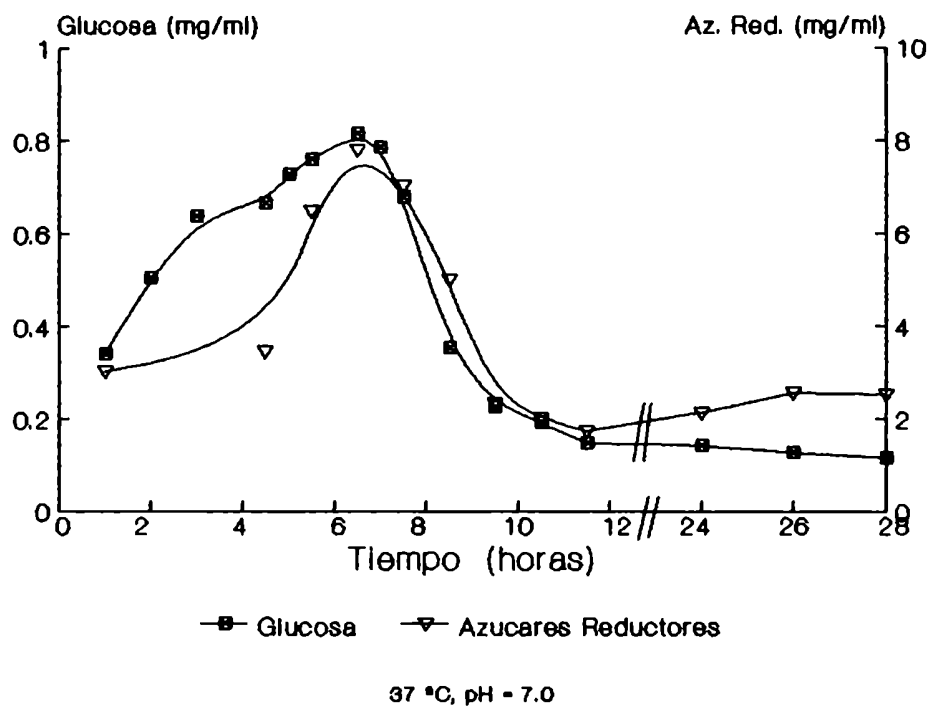
37 °C, pH = 7.0

**Figura 29.** Concentración de almidón y proteínas extracelulares. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.

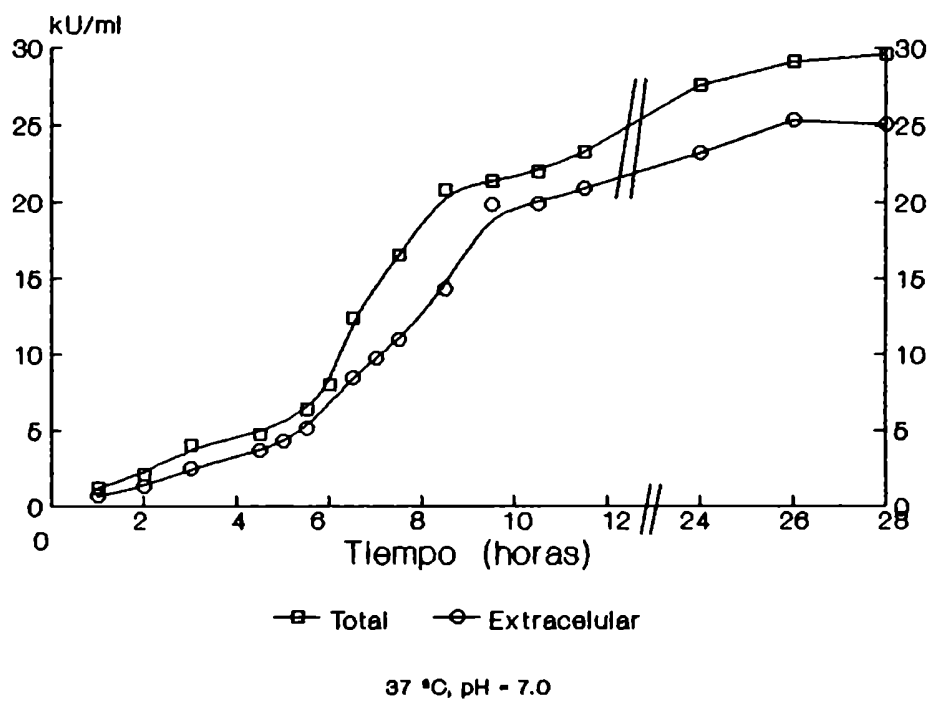


37 °C, pH = 7.0

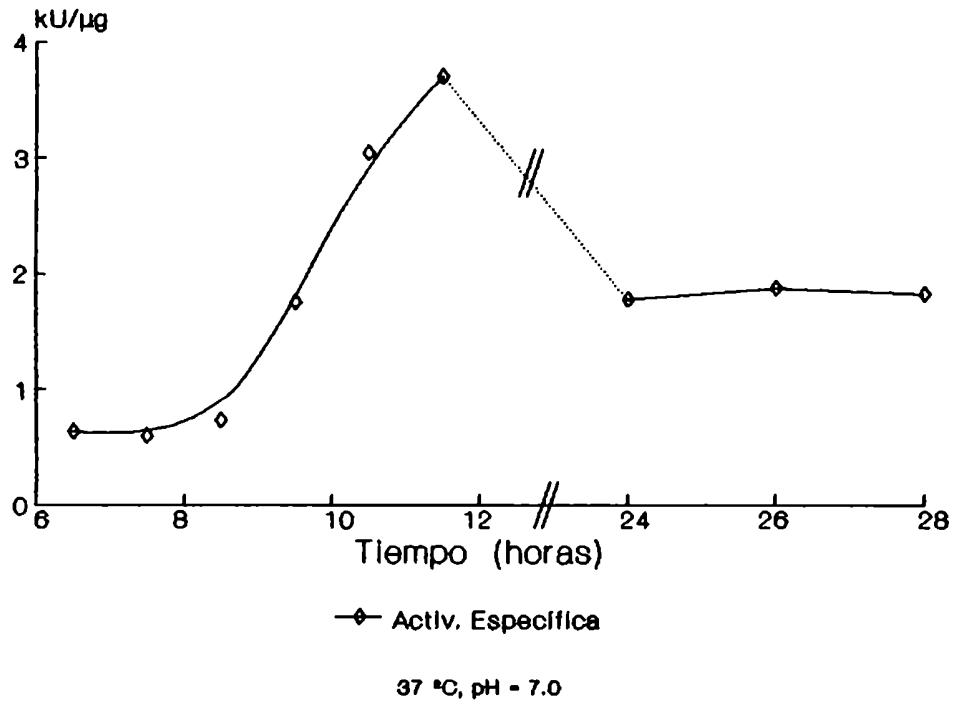
**Figura 30.** Hidratos de carbono residuales. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



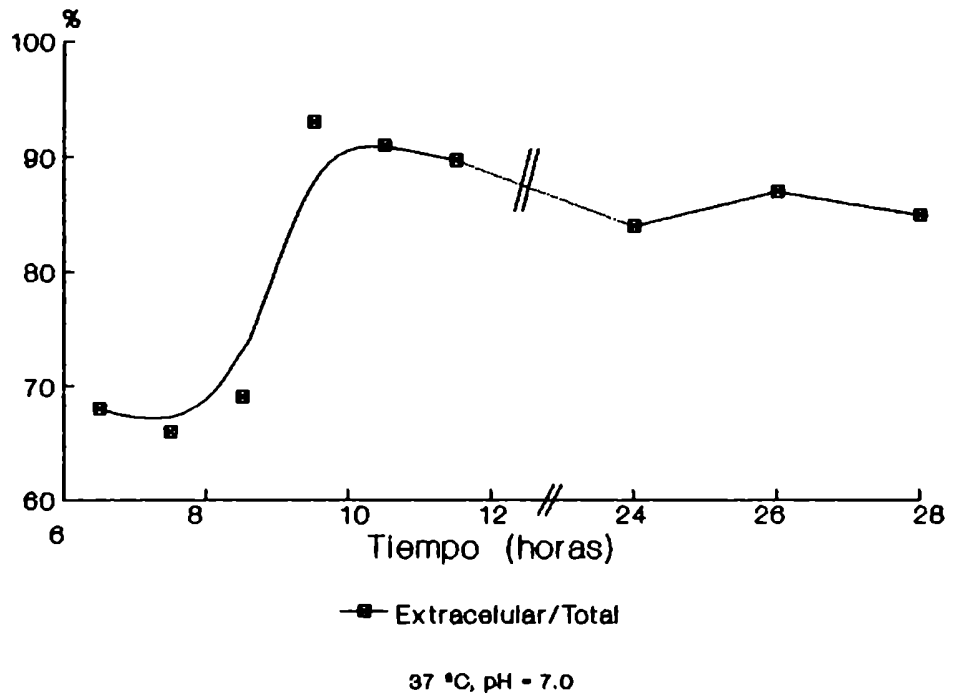
**Figura 31.** Actividad de alfa Amilasa. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



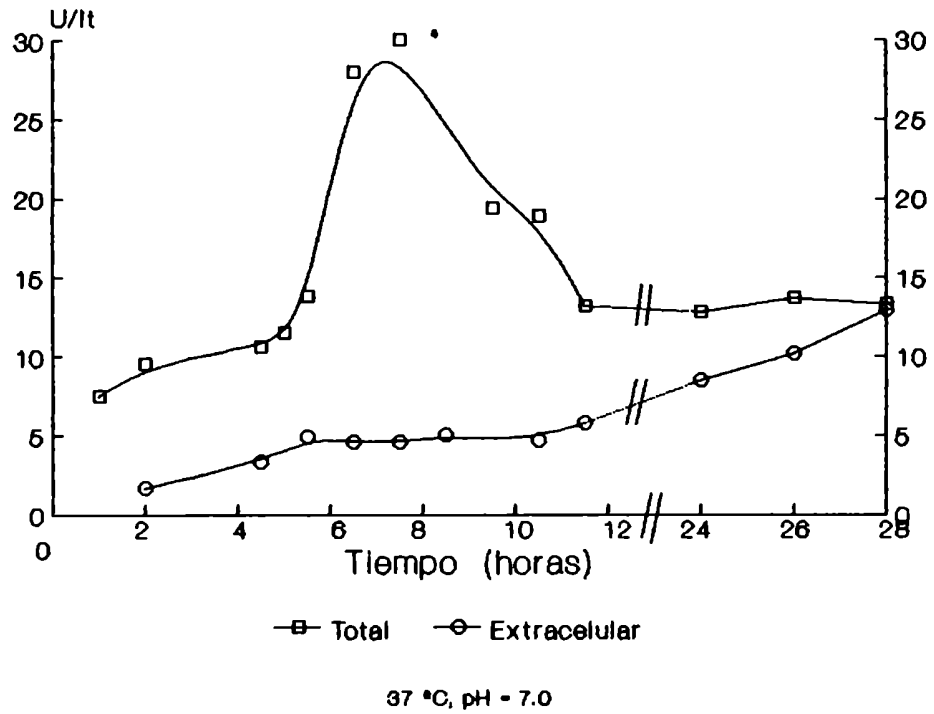
**Figura 32.** Actividad específica de alfa amilasa. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



**Figura 33.** Relación de actividades extracelular/total de alfa amilasa. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



**Figura 34.** Actividad de alfa Glucosidasa. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



**Figura 35.** Actividad de pululanasa. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.

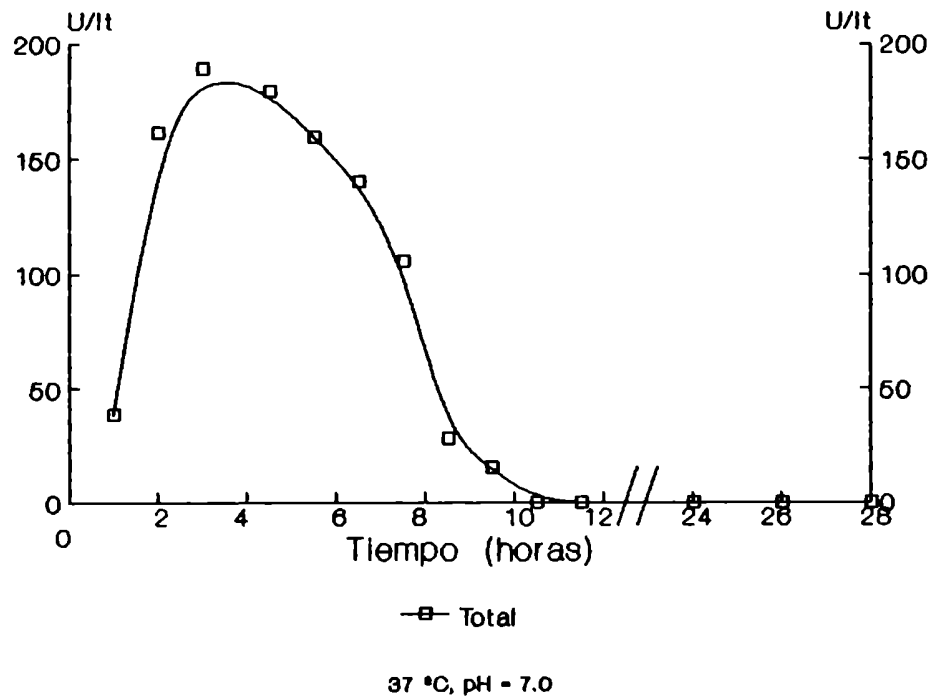
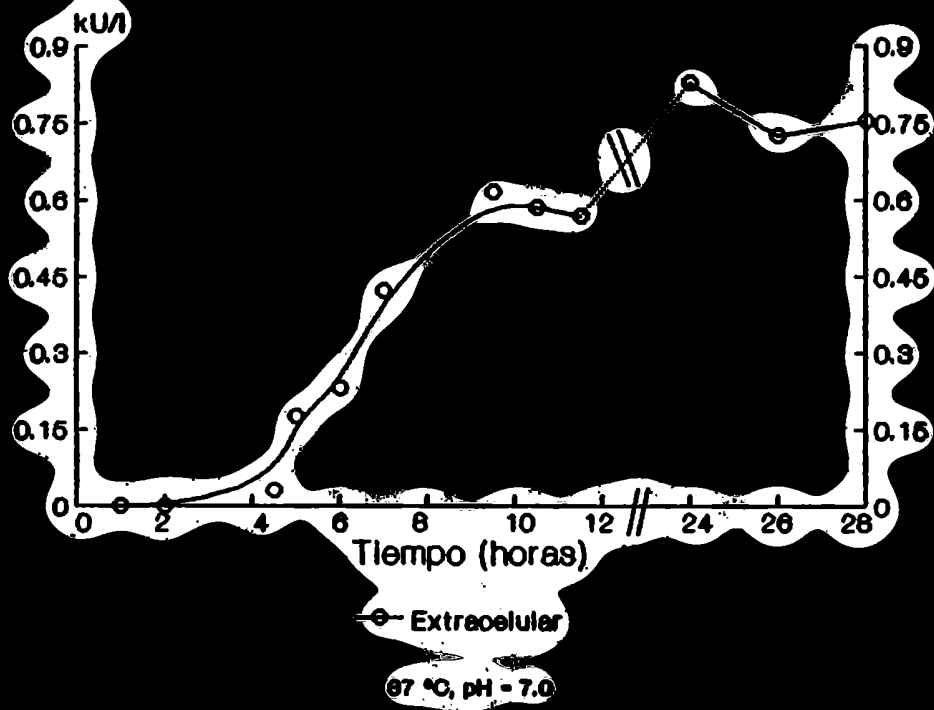
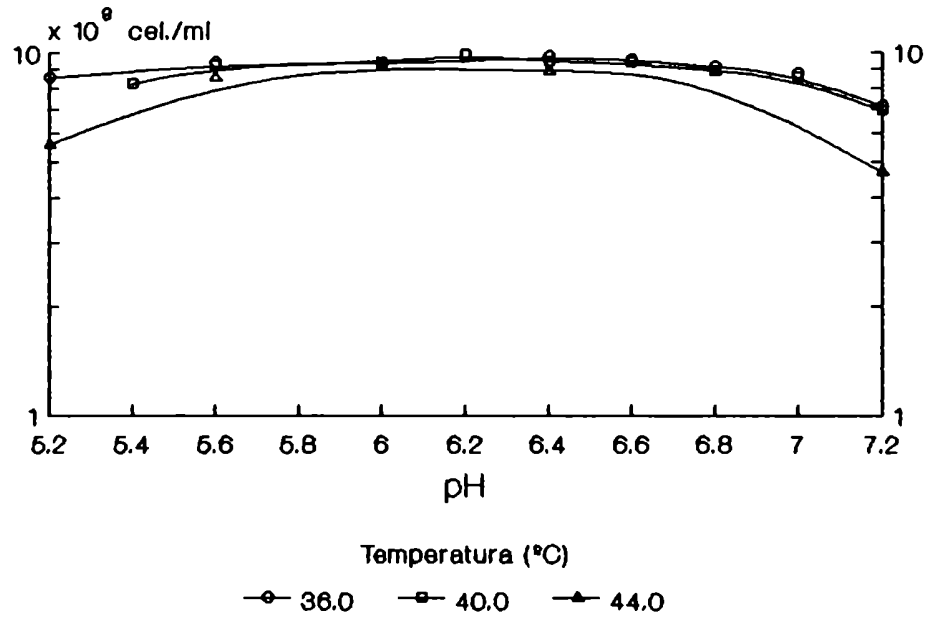




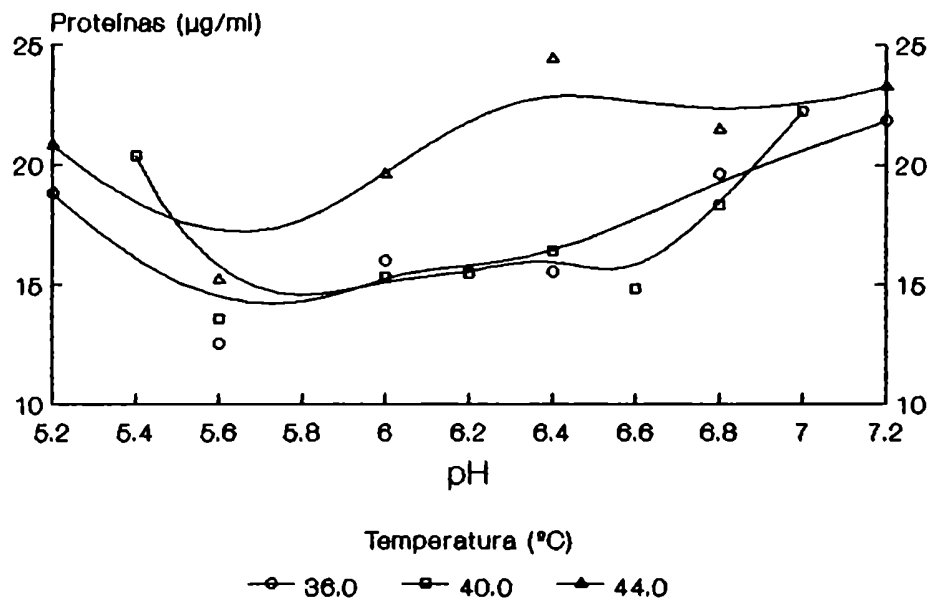
Figura 38. Actividad de proteasas. *B. amyloliquefaciens* MIR 41



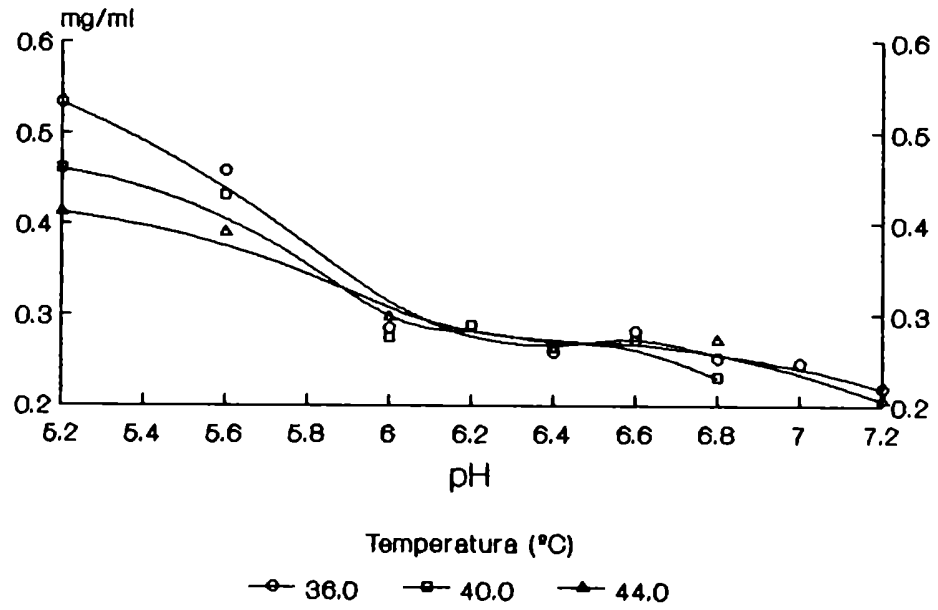
**Figura 37.** Concentración celular. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



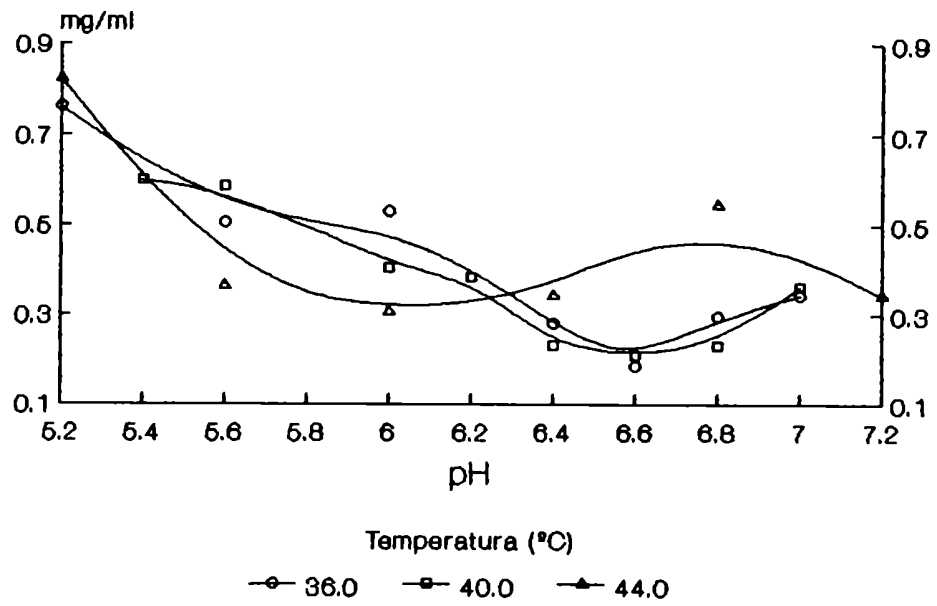
**Figura 38.** Concentración de proteínas extracelulares. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



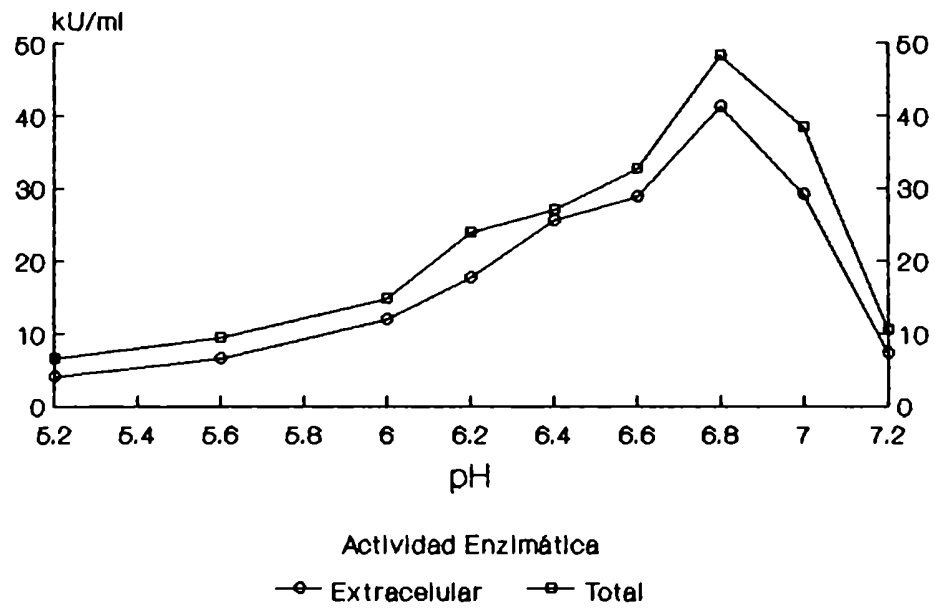
**Figura 39.** Concentración de glucosa residual. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



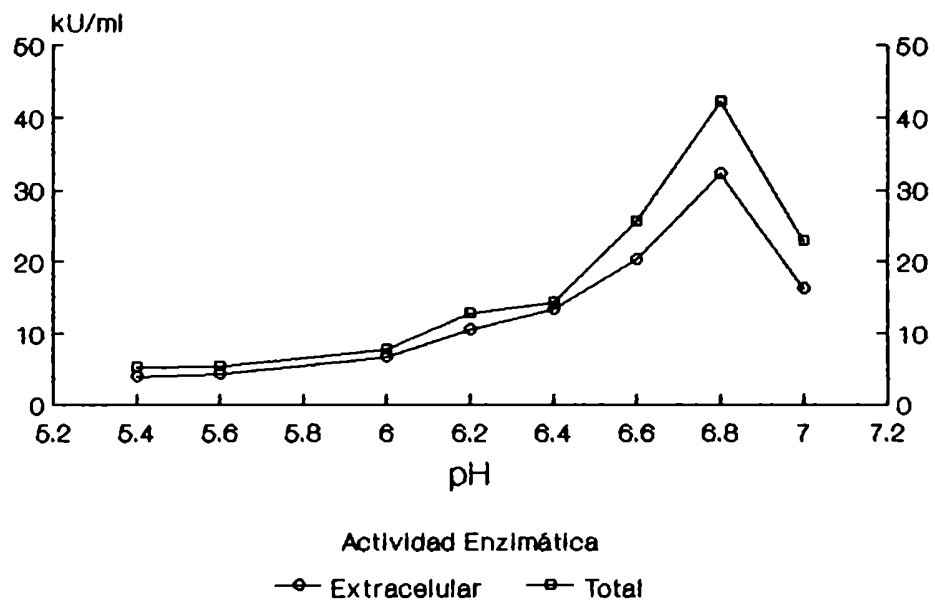
**Figura 40.** Concentración de azúcares de reductores residuales. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



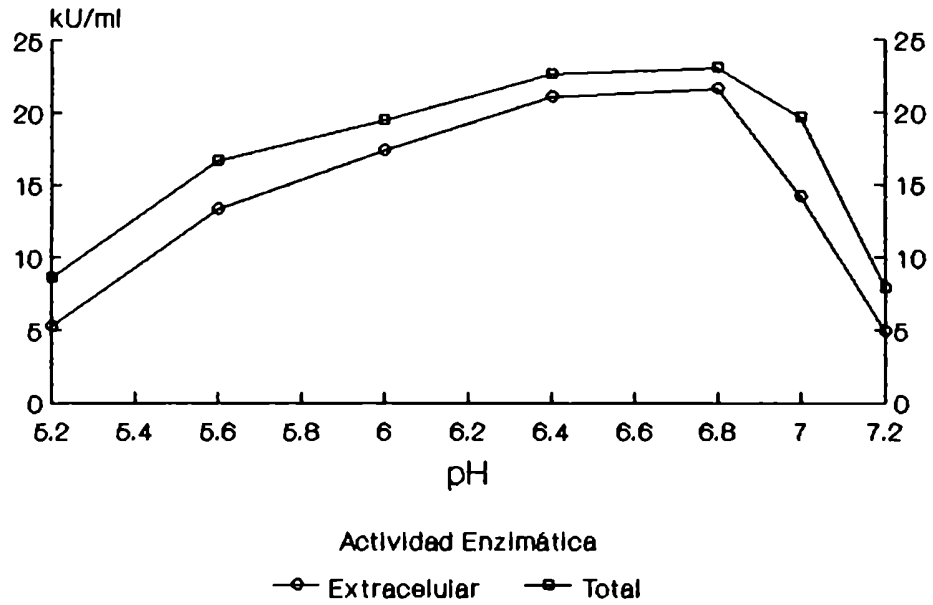
**Figura 41.** Efecto del pH en la actividad de alfa amilasa a 36 °C.  
*B. amyloliquefaciens* MIR 41.



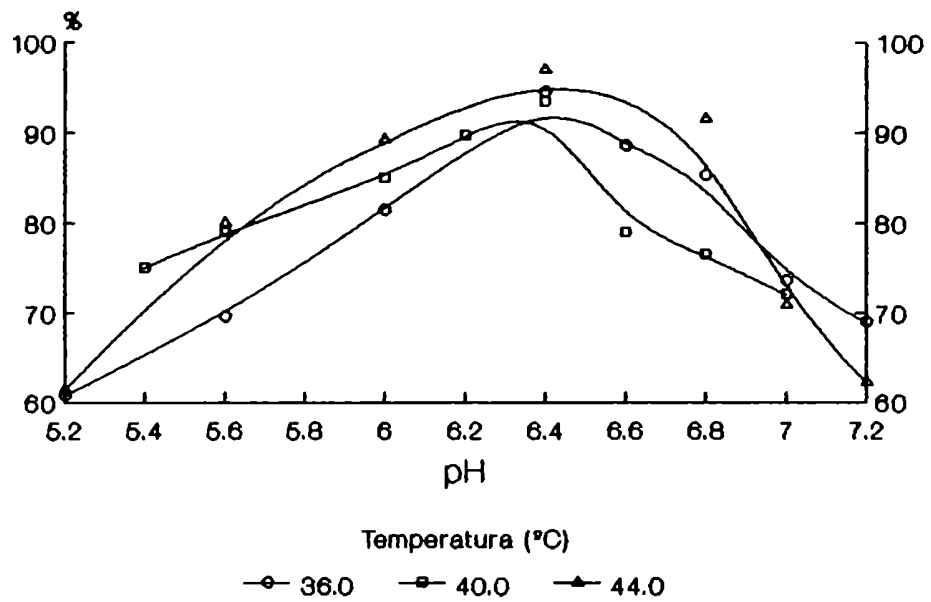
**Figura 42.** Efecto del pH en la actividad de alfa amilasa a 40 °C.  
*B. amyloliquefaciens* Mir 41.



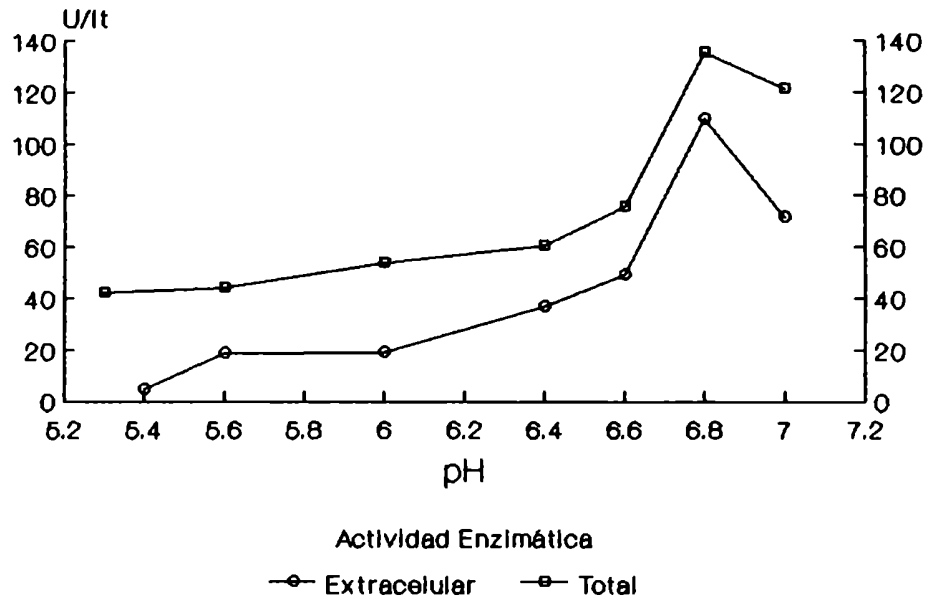
**Figura 43.** Efecto del pH en la actividad de alfa amilasa a 44 °C.  
*B. amyloliquefaciens* MIR 41.



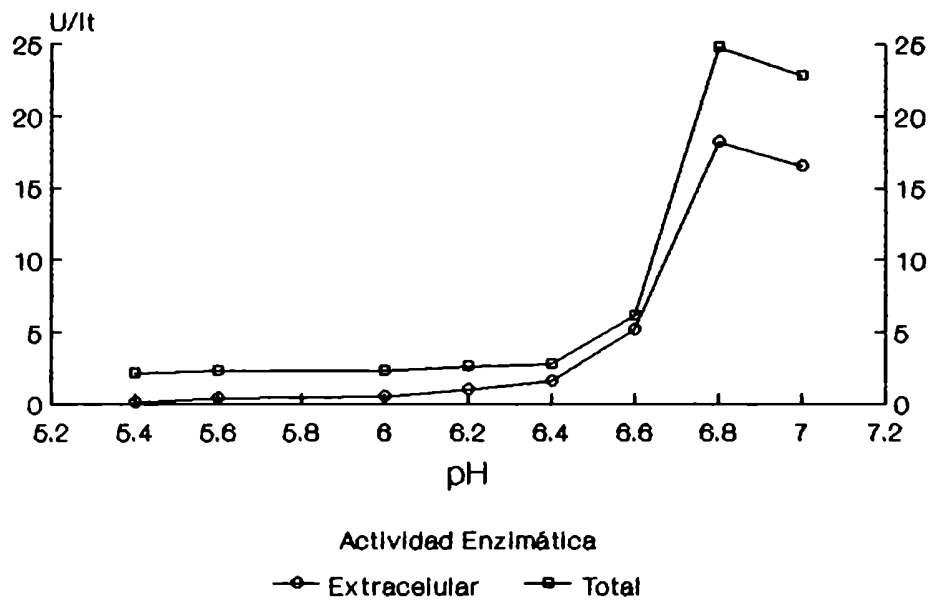
**Figura 44.** Relación de actividad extracelular/total de alfa amilasa.  
*B. amyloliquefaciens* MIR 41.



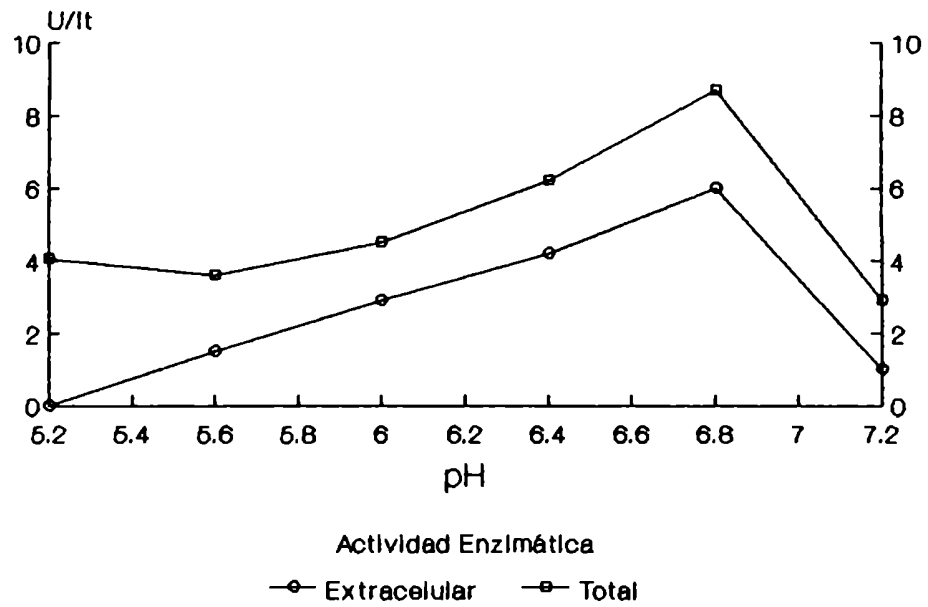
**Figura 45.** Efecto del pH en la actividad de alfa glucosidasa a 36 °C.  
*B. amyloliquefaciens* MIR 41.



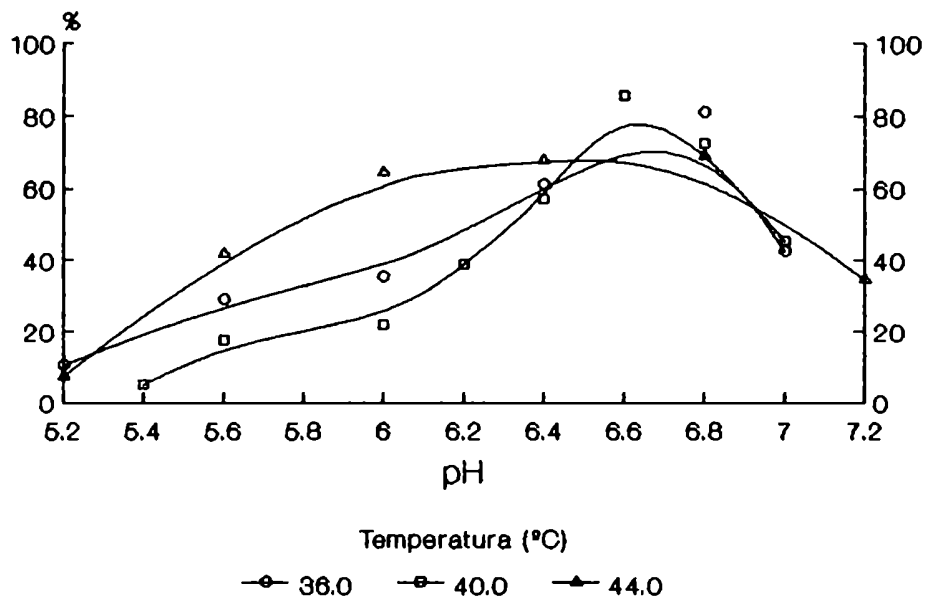
**Figura 46.** Efecto del pH en la actividad de alfa glucosidasa a 40 °C.  
*B. amyloliquefaciens* MIR 41.



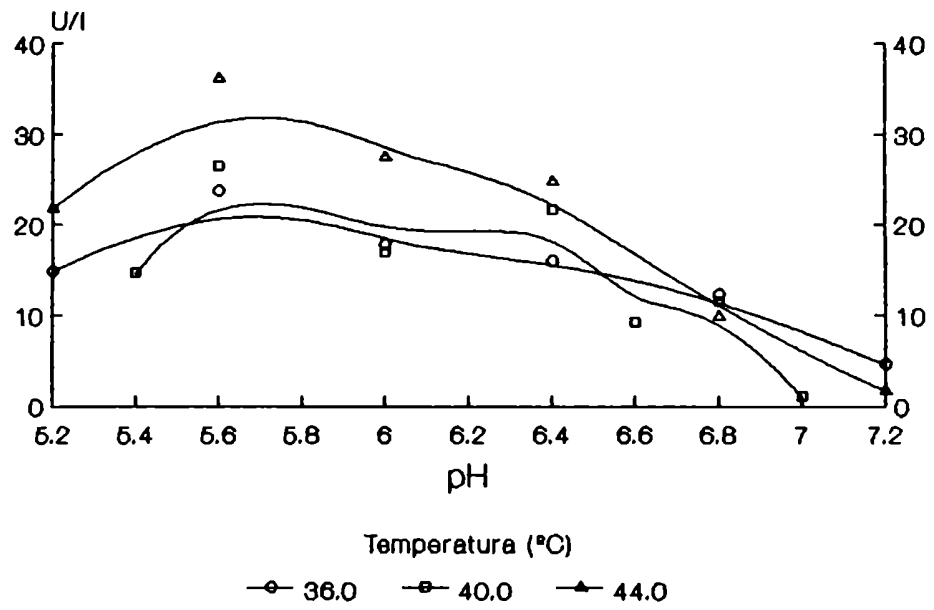
**Figura 47.** Efecto del pH en la producción de alfa glucosidasa a 44 °C.  
*B. amyloliquefaciens* MIR 41



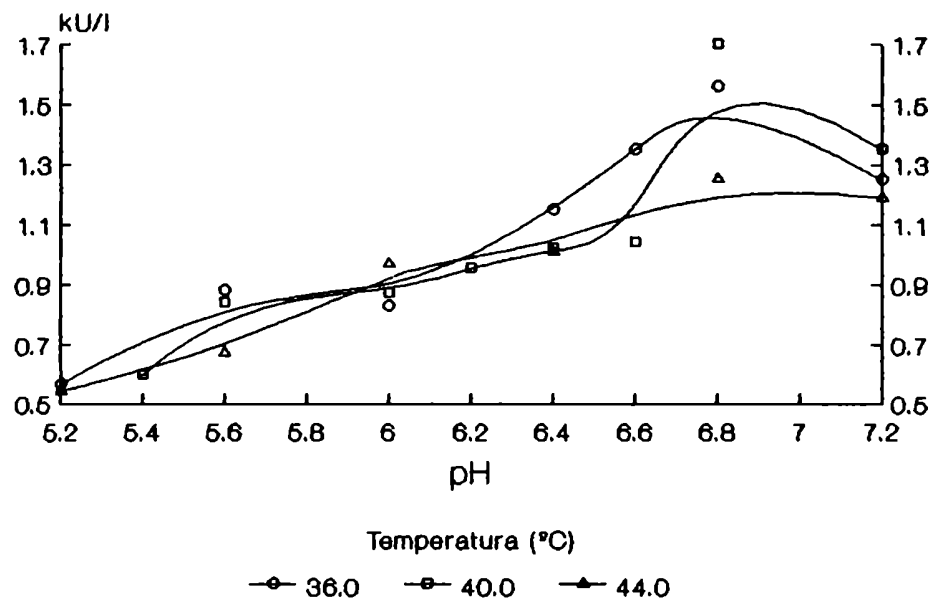
**Figura 48.** Relación de actividad extracelular/total de alfa glucosidasa.  
*B. amyloliquefaciens* MIR 41.



**Figura 49.** Efecto del pH en la actividad de pululanasa.  
*B. amyloliquefaciens* MIR 41.

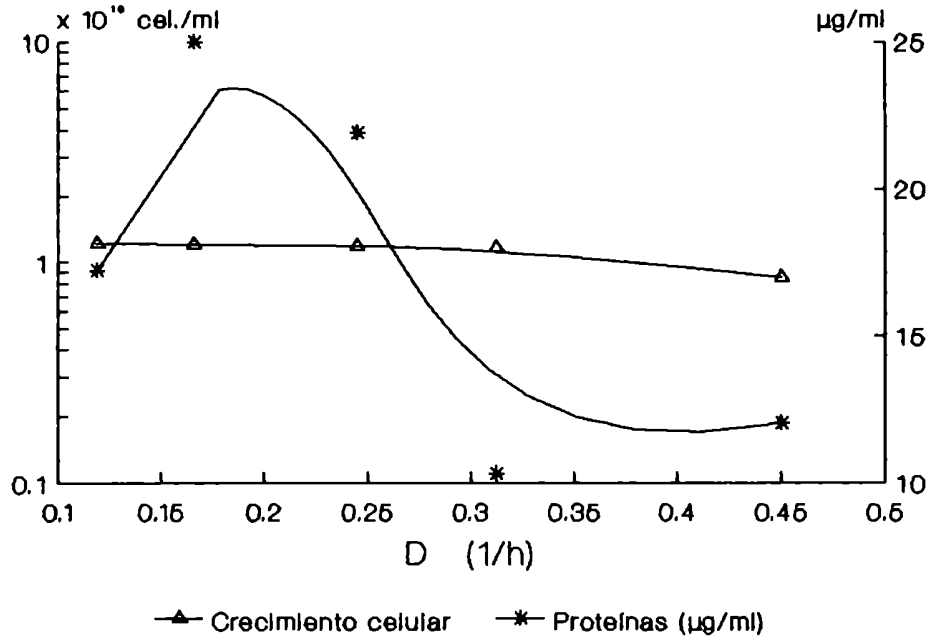


**Figura 50.** Efecto de la temperatura en la actividad de proteasas.  
*B. amyloliquefaciens* MIR 41.

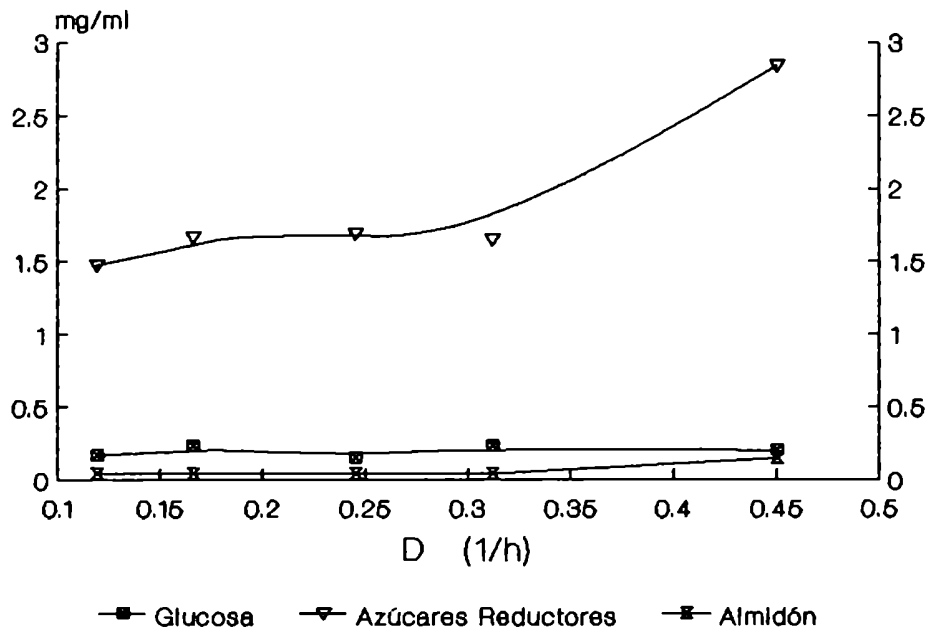




**Figura 51.** Crecimiento celular y proteínas extracelulares.  
*B. subtilis* MIR 5.

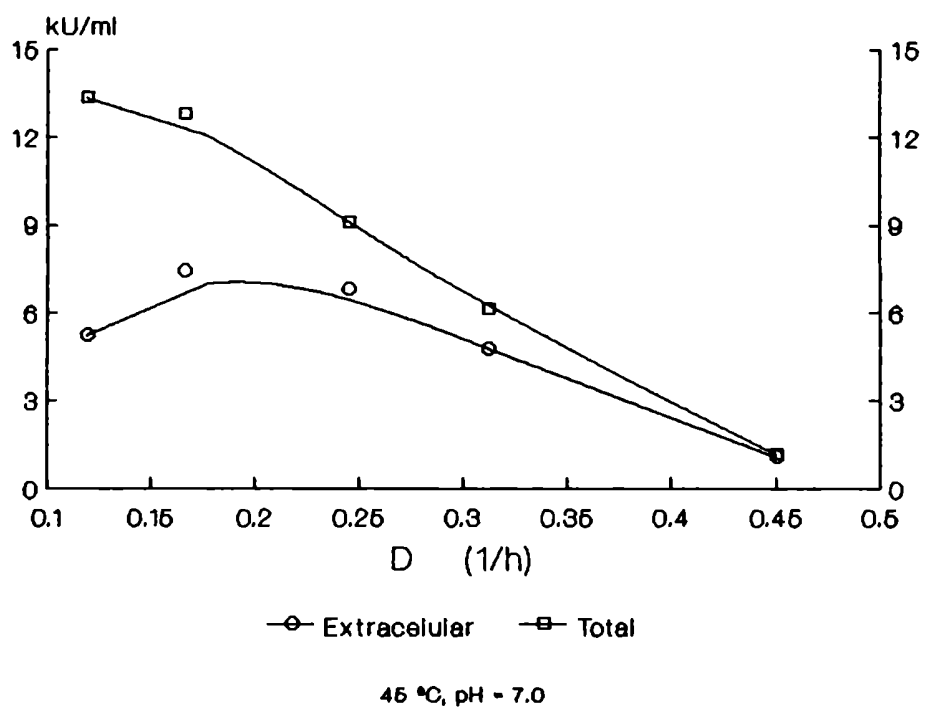


**Figura 52.** Hidratos de carbono residuales. *B. subtilis* MIR 5.

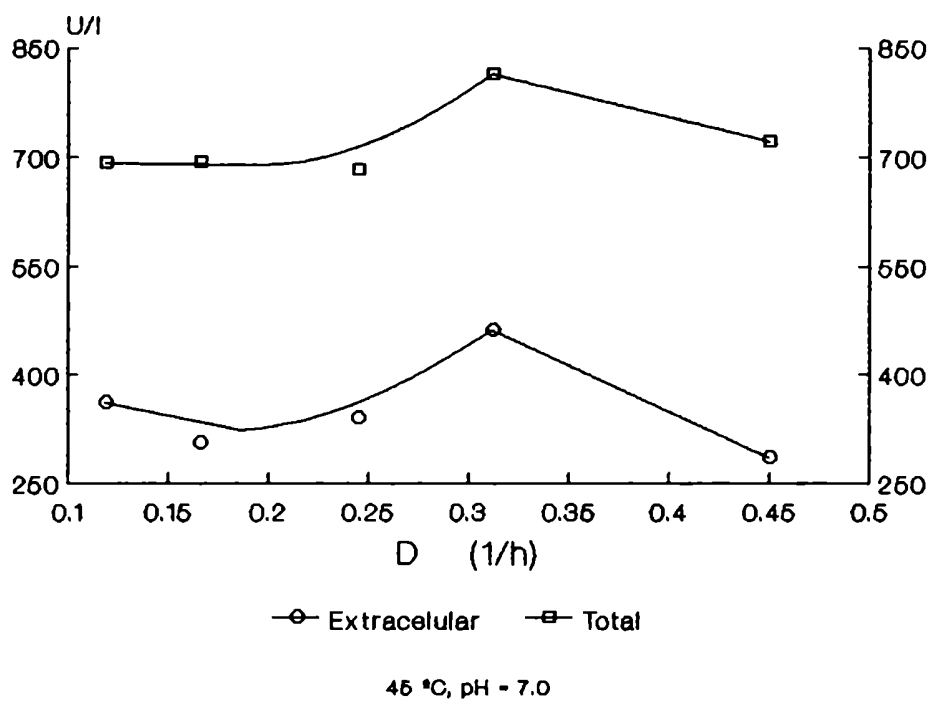


45 °C, pH - 7.0

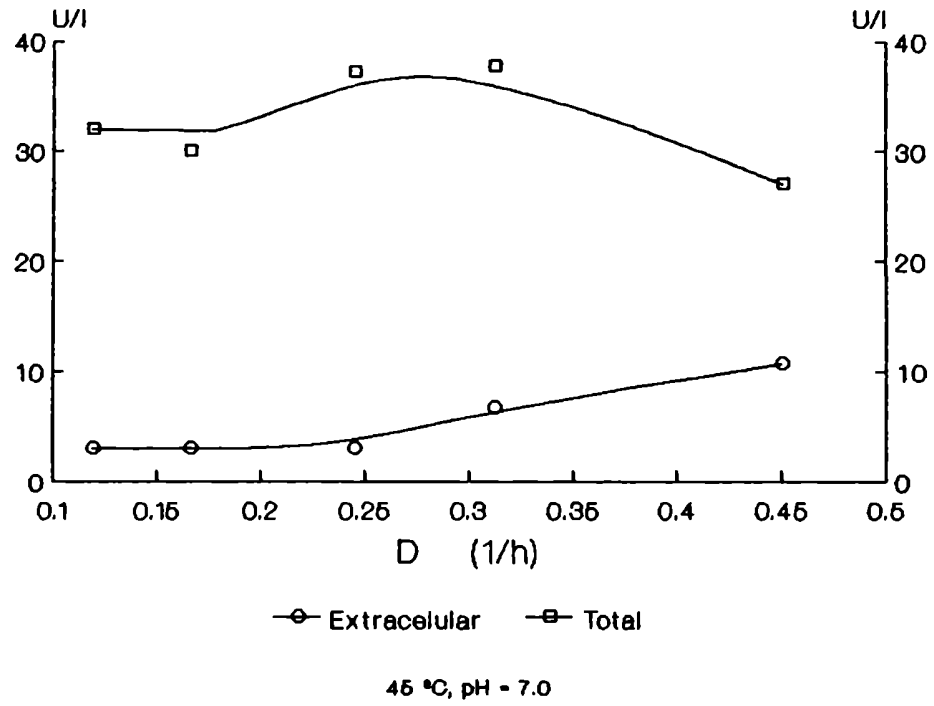
**Figura 53.** Actividad de alfa Amilasa. *B. subtilis* MIR 5.



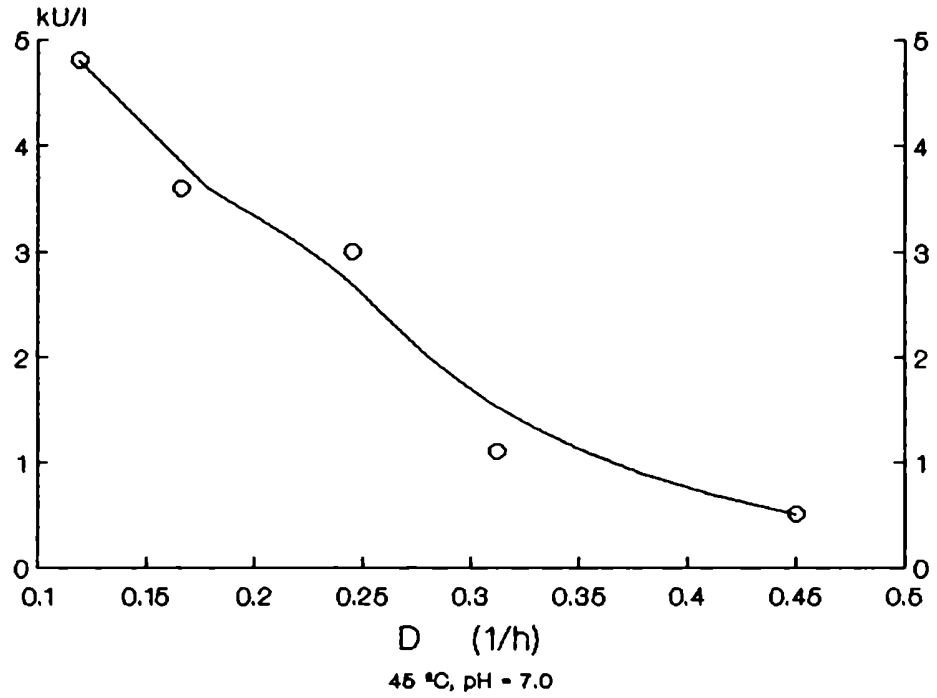
**Figura 54.** Actividad de beta Amilasa. *B. subtilis* MIR 5.



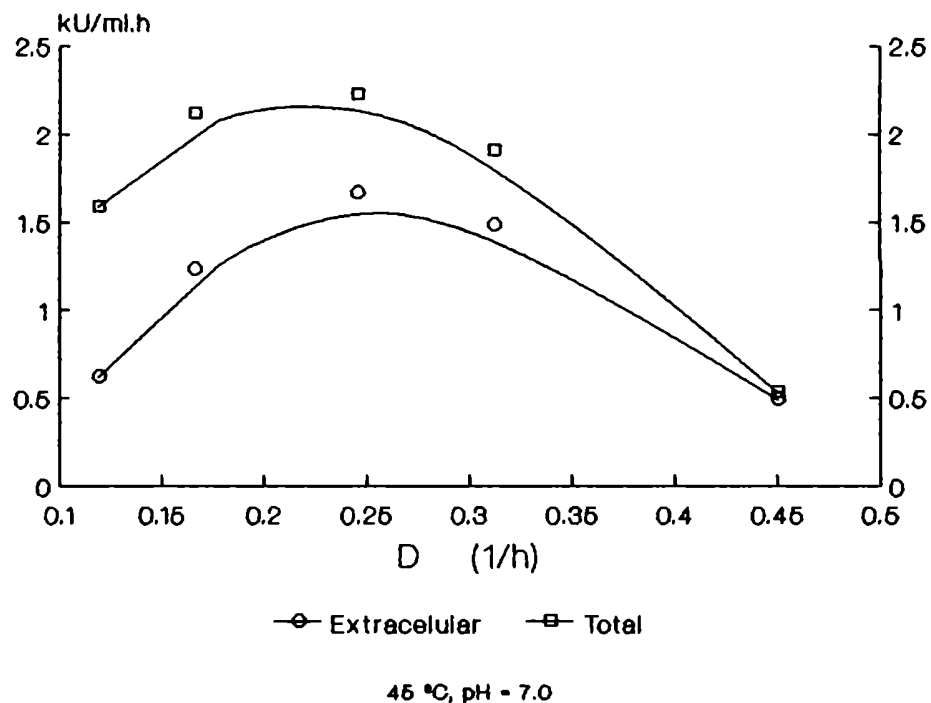
**Figura 55.** Actividad de Alfa glucosidasa. *B. subtilis* MIR 5.



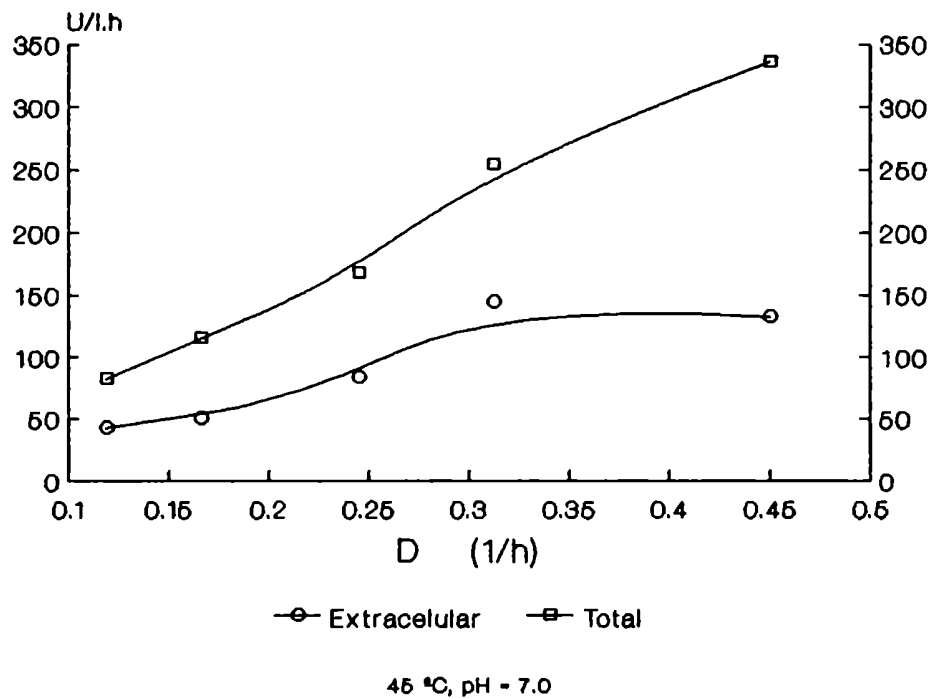
**Figura 56.** Actividad extracelular de proteasas. *B. subtilis* MIR 5.



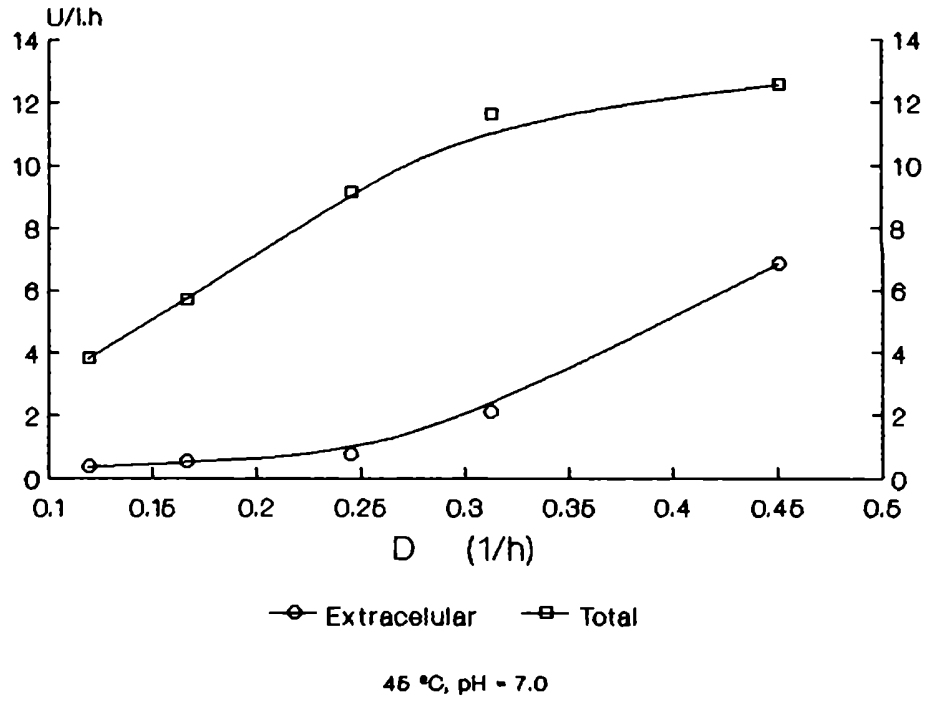
**Figura 57.** Productividad de alfa Amilasa. *B. subtilis* MIR 5.



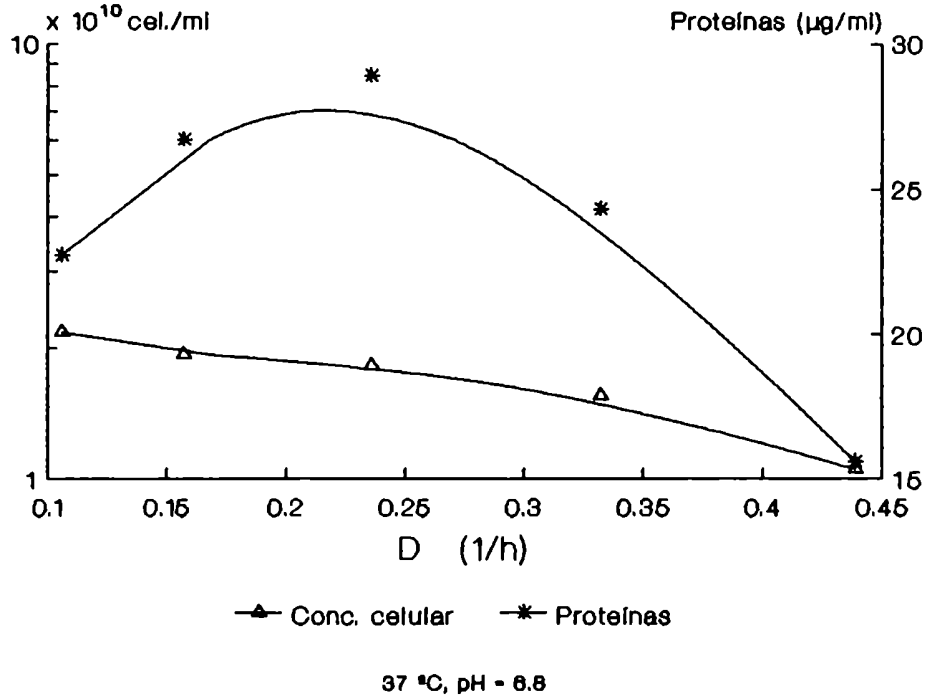
**Figura 58.** Productividad de beta Amilasa. *B. subtilis* MIR 5.



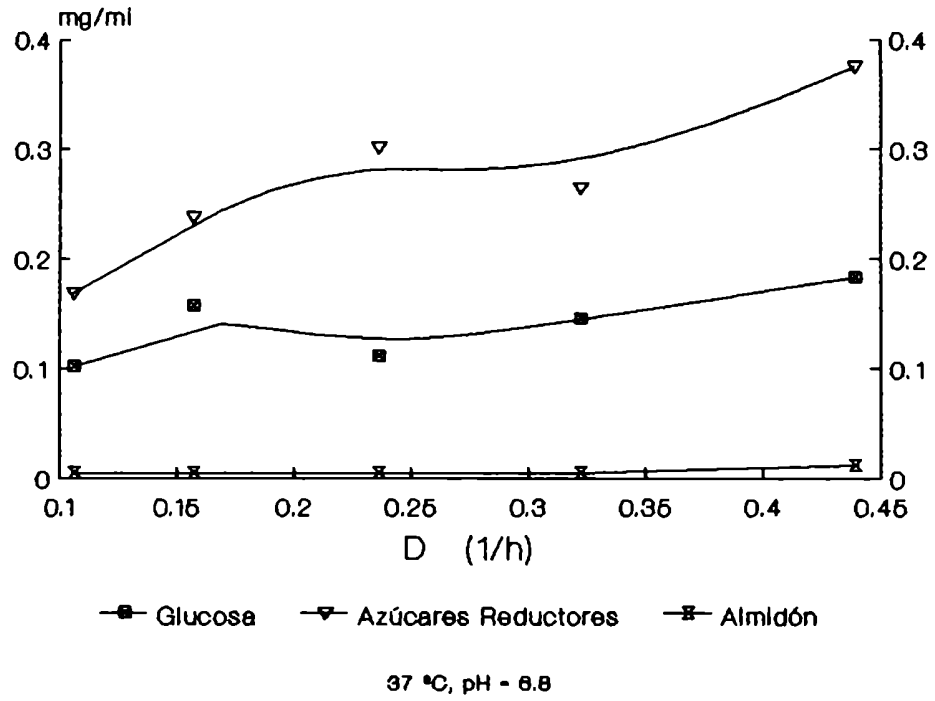
**Figura 59.** Productividad de alfa glucosidasa. *B. subtilis* MIR 5.



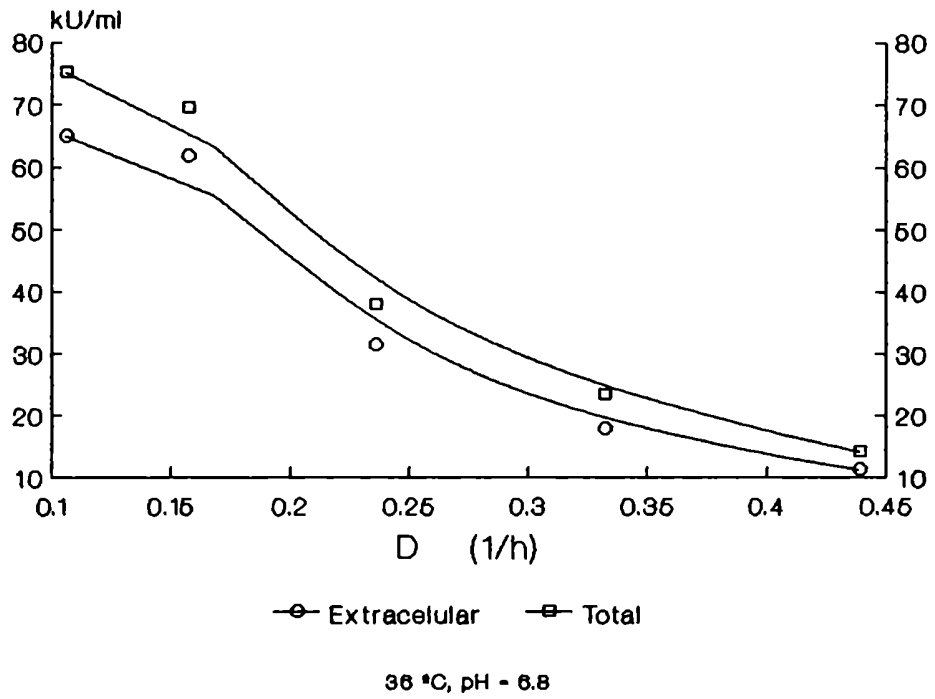
**Figura 60.** Crecimiento celular y proteínas extracelulares. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



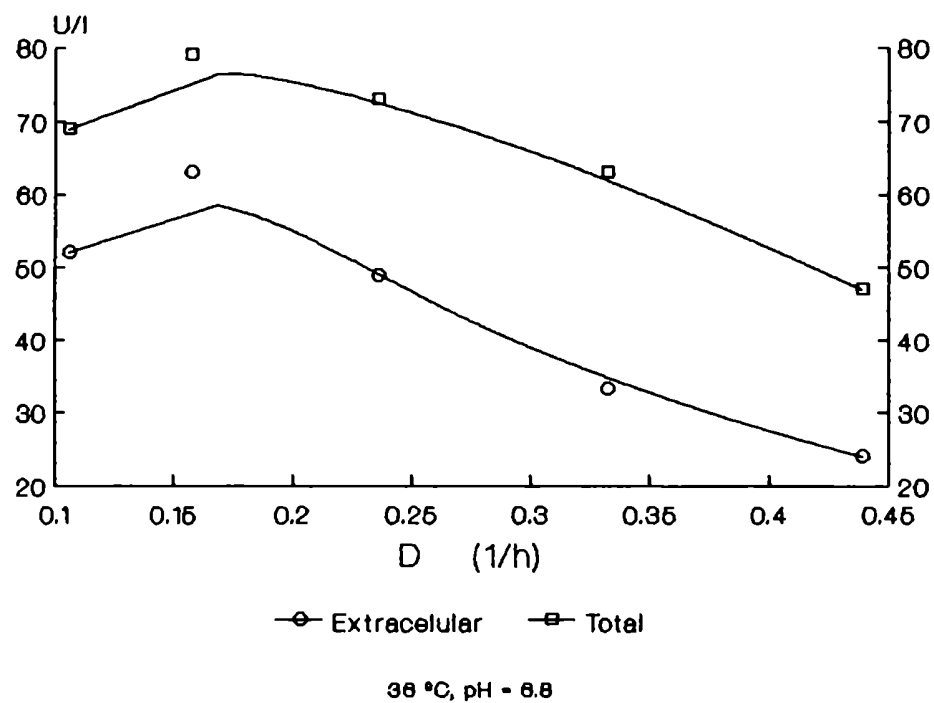
**Figura 61.** Hidratos de carbono residuales. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



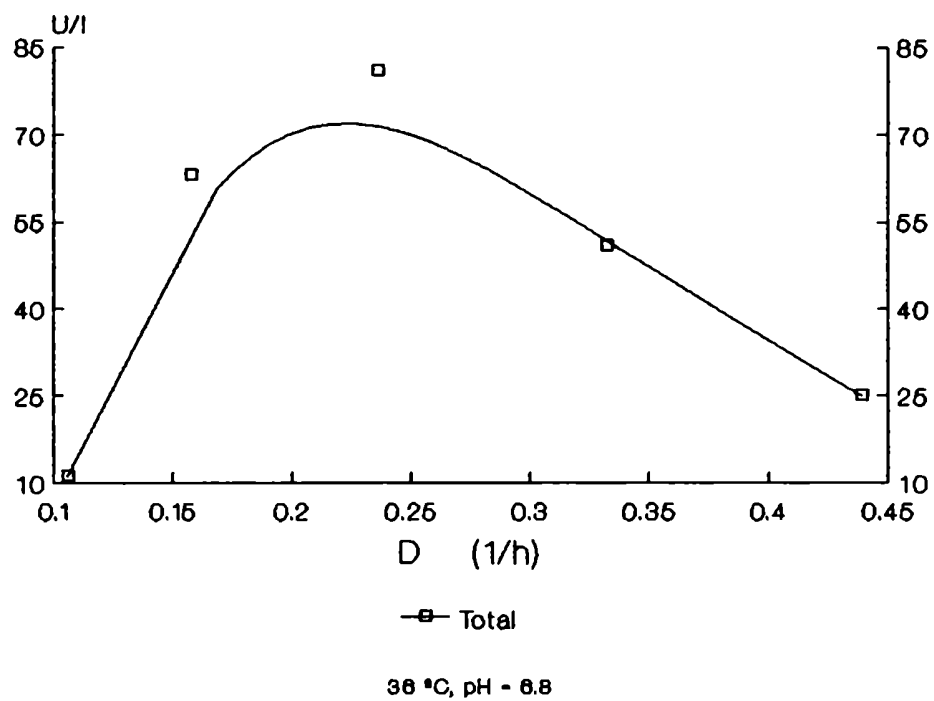
**Figura 62.** Actividad de alfa Amilasa. *B. Amyloliquefaciens* MIR 41.



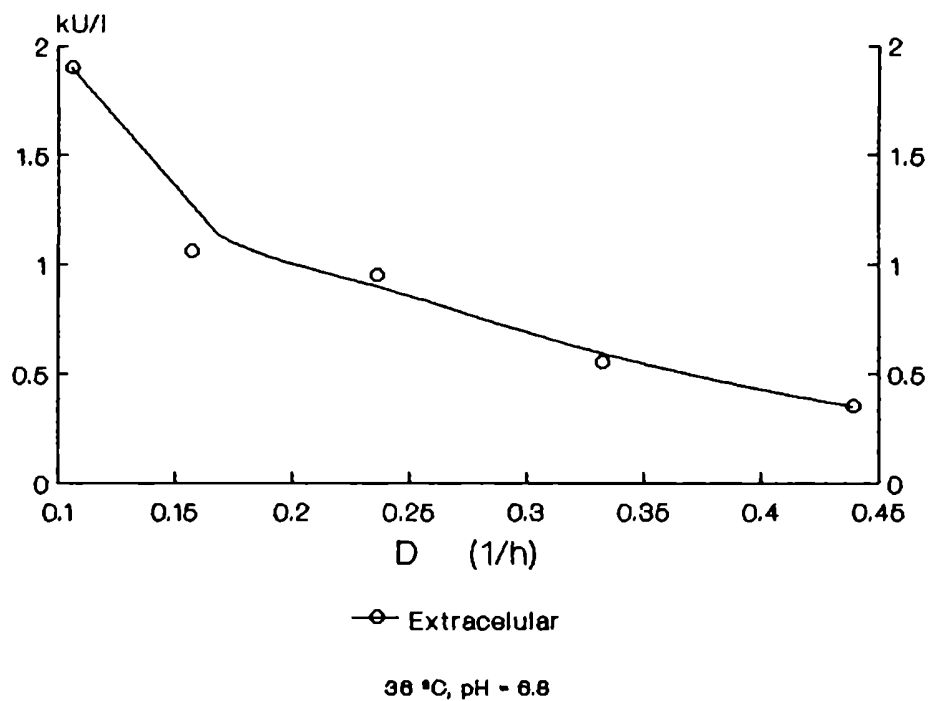
**Figura 63.** Actividad de alfa Glucosidasa. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



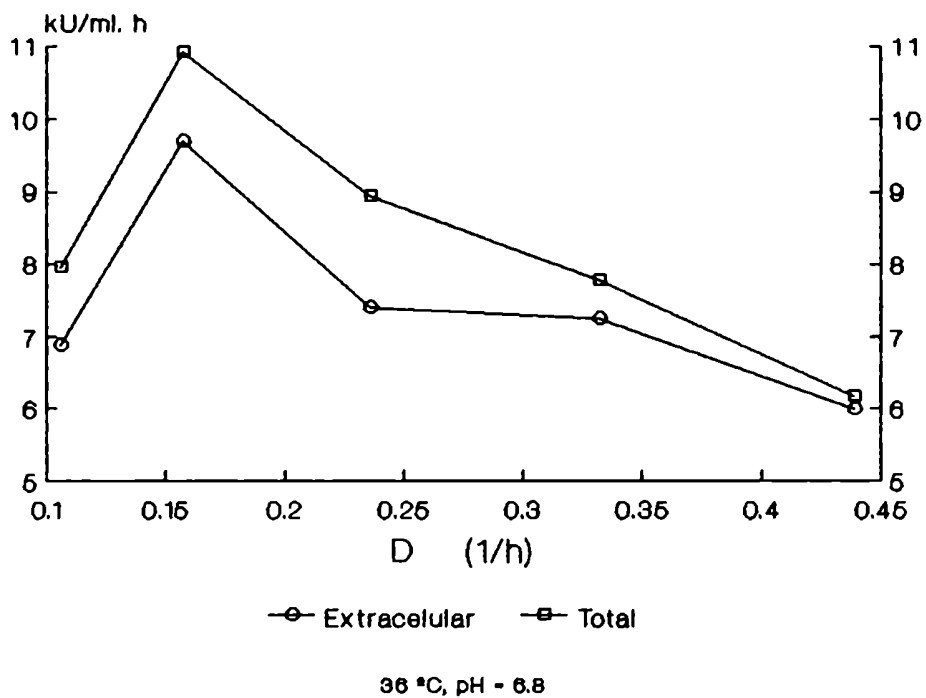
**Figura 64.** Actividad de pululanasa. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



**Figura 65.** Actividad de proteasas. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.

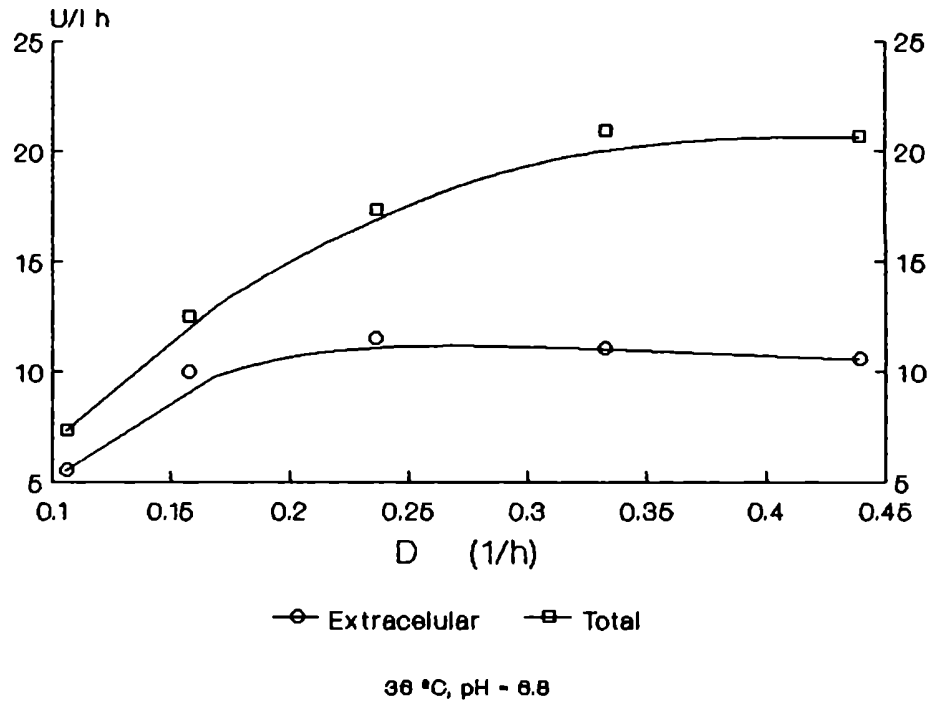


**Figura 66.** Productividad de alfa Amilasa. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.

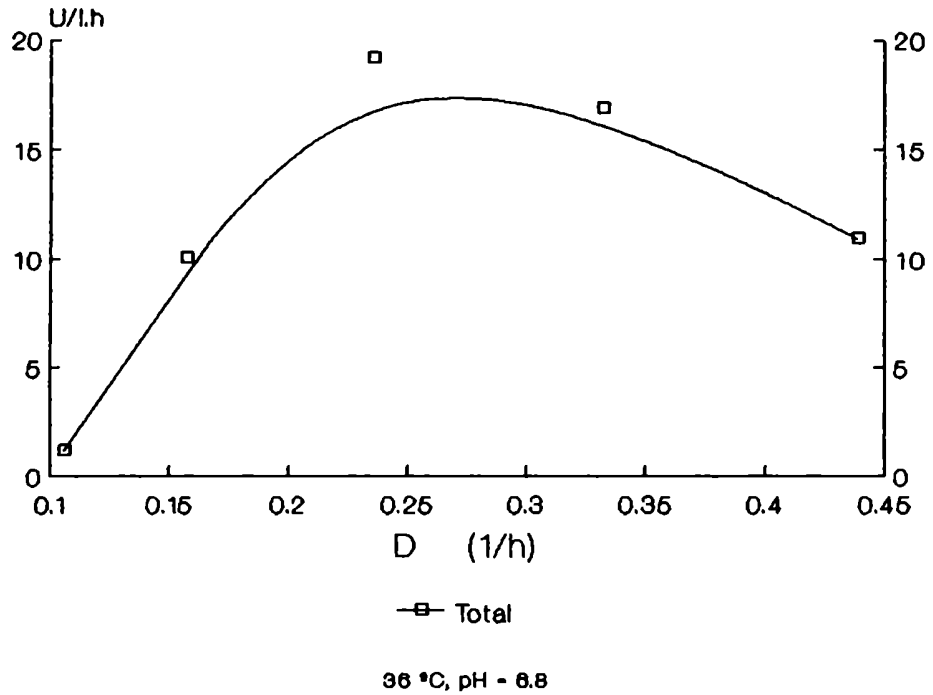




**Figura 67.** Productividad de alfa Glucosidasa. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



**Figura 68.** Productividad de Pululanasa. *B. amyloliquefaciens* MIR 41.



### 3.4.- Propiedades de las enzimas en estudio

Con el objeto de determinar la temperatura y el pH óptimo de reacción de  $\alpha$ -amilasa en *B. subtilis* MIR 5 y *B. amyloliquefaciens* MIR 41 se procedió a purificar parcialmente la fracción extracelular, obteniéndose los siguientes resultados:

#### 1.- Purificación parcial de $\alpha$ -amilasa producida por *Bacillus subtilis* MIR 5.

	Vol. (ml)	Prot. ( $\mu$ g/ml)	$\alpha$ -Amil. kU/ml	A.E. (kU/ $\mu$ g)	Purif.	kU Tot.	Rend. (%)
Sob.	50,0	10,1	13,6	1,35	1,0	680,0	100,0
A. 50%	5,0	4,5	62,6	13,8	10,2	313,0	46,0
A. 40%	1,0	2,7	78,5	29,1	21,6	78,5	11,5

Abreviaturas: Vol., volumen; Prot., proteínas extracelulares;  $\alpha$ -Amil.,  $\alpha$ -amilasa; A.E., actividad específica; Purif., purificación; kU Tot., unidades amilolíticas totales; Rend., rendimiento; A. 50%, acetona 50 %; A. 40%, acetona 40 %.

#### 2.- Purificación parcial de $\alpha$ -amilasa producida por *Bacillus amyloliquefaciens* MIR 41.

	Vol. (ml)	Prot. ( $\mu$ g/ml)	$\alpha$ -Amil. kU/ml	A.E. (kU/ $\mu$ g)	Purif.	kU Tot.	Rend. (%)
Sob.	50,0	15,8	32,3	2,0	1,0	1615	100,0
A. 50%	5,0	9,3	117,8	12,6	6,3	589	36,5
A. 40%	1,5	3,5	169,0	48,3	24,2	169	10,5

Abreviaturas: Vol., volumen; Prot., proteínas extracelulares;  $\alpha$ -Amil.,  $\alpha$ -amilasa; A.E., actividad específica; Purif., purificación; kU Tot., unidades amilolíticas totales; Rend., rendimiento; A. 50%, acetona 50 %; A. 40%, acetona 40 %.

Los precipitados obtenidos de la purificación parcial de los sobrenadantes de cultivo fueron disueltos en solución reguladora de fosfatos (100 mM, pH= 7,0). En las fracciones se ensayaron actividades de proteasas, no detectándose en los precipitados resultantes del tratamiento con acetona.

Las determinaciones de los pH óptimos de las enzimas se realizaron en condiciones de temperatura óptima, empleando soluciones reguladoras 100 mM de acetato de sodio (pH= 4,0 a 5,6), citrato de sodio (3,0 a 6,2), fosfato de sodio (5,8 a 8,0) y borato de sodio (pH= 8,1 a 9,0) (Mc Kenzie, 1969). Los resultados obtenidos sobre las temperaturas y pH óptimos de las enzimas ensayadas se observan en la tabla XI.

Tabla XI. Temperatura y pH óptimo de reacción.

Enzima	T(°C)	pH
$\alpha$ -Amilasa (MIR 5)	45	7,5
$\alpha$ -Amilasa (MIR 41)	47-49	6,4-7,0
$\beta$ -Amilasa (MIR 5)	55	5,8-6,0
$\alpha$ -Glucosidasa (MIR 5)	52	6,5
$\alpha$ -Glucosidasa (MIR 41)	37	6,2-6,4
Pululanasa (MIR 41)	52-55	5,8

#### 4.- DISCUSION

##### 4.1.- Relevamiento y selección de cepas

La posibilidad de optimizar procesos biotecnológicos empleando microorganismos con mejores características de producción, es uno de los motivos por lo cual es de gran importancia el aislamiento de microorganismos a partir de fuentes naturales. En particular, en el caso de la producción de enzimas es de público conocimiento que las empresas productoras poseen sus propias colecciones microbianas, no registradas en los bancos de microorganismos y, en el caso de emplear cepas pertenecientes a los mismos, éstas son modificadas para su uso.

Por otro lado, el aislamiento y preservación de un considerable número de microorganismos con capacidad amilolítica posibilita la futura realización de estudios, de los cuales podría obtenerse un mayor conocimiento sobre algunas de las características de diversas especies pertenecientes al Género *Bacillus*, lo que es de primordial importancia considerando las dificultades taxonómicas del género.

Un tercer argumento en favor del aislamiento de cepas de fuentes naturales, es la ausencia de trabajos sobre microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* de origen sudamericano pese a la gran diversidad y abundancia natural del mismo.

Las cepas aisladas, en algunos casos presentaron producción de  $\alpha$ -amilasa más elevada que las observadas en las cepas de colección empleadas como control corroborando en principio, la utilidad del aislamiento de cepas de la naturaleza. Los resultados de las 8 cepas seleccionadas obtenidos en cultivo por lotes comparadas con la producción de  $\alpha$ -amilasa en placa de las mismas, indican que la producción de enzima empleando similares condiciones de cultivo no se

correlacionan linealmente con la producción enzimática extracelular detectada en medio líquido. Ello podría ser atribuido a gradientes de concentración de nutrientes y productos producidos en medios agarizados en torno a las colonias (Prosser y Tough, 1991); asimismo debe considerarse la transferencia de gases (oxígeno y CO<sub>2</sub>) como un factor importante en la producción de enzimas (Gandhi y col., 1975; Markkaanen y col., 1975). Además, debido a que la producción de  $\alpha$ -amilasa a escala industrial se efectúa en medio líquido, la técnica en placa debe ser considerada como una etapa preliminar en la selección de cepas, utilizada debido a la practicidad en el manejo y a la posibilidad de comparar gran número de aislamientos; sin embargo, la etapa de cultivo en medio líquido es decisoria para la selección final.

Por otro lado, en las técnicas de relevamiento de cepas y producción de  $\alpha$ -amilasas debe contemplarse la posible existencia de otras actividades relacionadas a la degradación de  $\alpha$ -glucanos, como:  $\alpha$ -glucosidasas,  $\beta$ -amilasas, isoamilasas y pululanases entre otras, encontradas en varias especies pertenecientes al género *Bacillus* (Marshall, 1975; Priest, 1977), y cuyas actividades podrían alterar la expresión de  $\alpha$ -amilasa mediante mecanismos de inducción y/o represión por catabolito (Windish y Mhatre, 1965; Fogarty y Kelly, 1980).

#### 4.2.- Caracterización microbiológica

La taxonomía del género *Bacillus* es altamente compleja y se han descripto más de 150 especies sobre la base de estudios fisiológicos y/o ecológicos simples (Gordon, 1977). Debido a su gran abundancia en la naturaleza y a la diversidad de habitats, muchas cepas salvajes no han podido clasificarse entre las especies oficialmente aceptadas, 43 en total (Claus y Berkeley, 1986). Estudios moleculares realizados empleando hibridización de ADN y mapeo genómico con enzimas de restricción en varias especies, mostraron la existencia de una

gran diversidad genética (Priest y col., 1988a), confirmando los estudios fisiológicos previos. Los estudios taxonómicos más modernos, empleando métodos estadísticos y un número considerable de caracteres, postulan que *Bacillus* podría ser subdividido en tres o más géneros microbianos (Logan y col., 1981) y consideran a las especies en grupos (*clusters*), que poseen un conjunto de caracteres en común (Priest y col., 1988a y b).

Por estos motivos, en el presente estudio, fueron efectuados un elevado número de ensayos (97) con la finalidad de obtener una mayor certeza en la identificación de los microorganismos aislados. El análisis taxonómico de las cepas empleando el coeficiente de Jaccard y su comparación con las especies oficialmente aceptadas permitió la identificación de las mismas. Sin embargo, se observa un elevado coeficiente de Jaccard entre las cepas MIR 5 y MIR 41 (tabla IX). Este hecho indica que MIR 5 y MIR 41 son más similares entre sí que cada una de ellas respecto a las especies tipo con las cuales presentan mayor similitud.

#### 4.3.- Cultivo de *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*.

Las técnicas empleadas para la selección de cepas, basadas en la actividad dextrinizante, permitieron evidenciar microorganismos con elevada actividad de  $\alpha$ -amilasa. Sin embargo, en los primeros estadios de los cultivos por lotes de *B. amyloliquefaciens* MIR 41 y *B. subtilis* MIR 5, se detectó una marcada disminución de la concentración de almidón asociado a un aumento de la concentración de azúcares reductores y glucosa en el medio de cultivo. Sumado a ello, las bajas concentraciones celulares y una escasa producción de  $\alpha$ -amilasa en esta etapa del cultivo, hicieron presuponer la existencia de diferentes actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de  $\alpha$ -glucanos. Es así, que en *Bacillus amyloliquefaciens* MIR 41 fue detectada la presencia de

$\alpha$ -glucosidasa y pululanasa, y en *B. subtilis* MIR 5 se detectaron actividades de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\beta$ -amilasa. Además se ha observado que la expresión y localización de las diferentes enzimas es temporal y distinta en cada cepa.

#### 4.3.1.- Cultivos en lote.

##### 4.3.1.1.- Producción de $\alpha$ -amilasa

Estudios sobre la producción de  $\alpha$ -amilasa realizados en cultivos en lote han arrojado resultados contradictorios; en algunos casos la actividad mayoritaria de esta enzima se ha detectado en la fase exponencial de crecimiento (Toda y col., 1979; Davies y col., 1980; Khovrychev y col., 1987), mientras que en otros casos fue detectada en la fase estacionaria (Welker y Campbell, 1967b; Saito y Yamamoto, 1975; Thirunavukkarasu y Priest, 1985). Una de las causas posibles de la síntesis y expresión de  $\alpha$ -amilasa puede ser la composición del medio de cultivo. Es así, que cultivos realizados en presencia de almidón soluble presentaron mayor actividad de  $\alpha$ -amilasa que otros realizados en presencia de maltosa y glucosa (Emanuilova y col., 1984; Yoo y col., 1988a) y, recientemente, se ha detectado sólo una proteína extracelular,  $\alpha$ -amilasa, en la fase exponencial de crecimiento empleando almidón como fuente de carbono (Pazlarová, 1987). Dichos resultados podrían ser atribuidos a un efecto de represión por catabolito descrito previamente (Priest, 1977), debido a que la concentración de glucosa remanente en el cultivo debe ser un balance entre la concentración de glucosa producida por hidrólisis de almidón y/o malto-oligosacáridos y el consumo de glucosa debido a las células. También debe considerarse el efecto de inhibición de la actividad enzimática debido a la presencia de glucosa en el medio de cultivo como otra causa posible que impediría la detección de actividad de  $\alpha$ -amilasa (Sata y col., 1987a; Yoo y col., 1988a). Con respecto a la fuente de nitrógeno, se ha descrito

que la síntesis de  $\alpha$ -amilasa en presencia de nitrógeno inorgánico se produce en forma paralela al crecimiento celular alcanzando un máximo al final de la fase exponencial de crecimiento (Coleman y col. 1966), mientras que en medios de cultivo enriquecidos la expresión de  $\alpha$ -amilasa se produce en la fase estacionaria (Emanuilova y col., 1984; Srivastava y Baruah, 1986).

Por estos antecedentes, y con la finalidad de obtener elevados niveles de  $\alpha$ -amilasa en la fase exponencial, que posibilita la utilización ventajosa de cultivo continuo, se decidió emplear medio sintético definido con almidón como fuente de carbono, y una sal de amonio como fuente de nitrógeno.

En las condiciones experimentales previamente descriptas, la actividad de  $\alpha$ -amilasa en cultivo por lotes, tanto utilizando *Bacillus subtilis* MIR 5 como *B. amyloliquefaciens* MIR 41 está ligada al crecimiento celular, detectándose la mayor producción y actividad específica en el inicio de la fase estacionaria. En particular, la producción de  $\alpha$ -amilasa por *B. amyloliquefaciens* MIR 41 fue un tercio mayor que la informada para *B. subtilis* NCIB 8565, cepa considerada como buena productora (Gandhi y Kjaegaard, 1975).

#### 4.3.1.2.- Producción de $\alpha$ -glucosidasa

La actividad de  $\alpha$ -glucosidasa en cultivo por lote de *B. amyloliquefaciens* MIR 41 muestra un perfil diferente respecto de la obtenida para  $\alpha$ -amilasa, debido a que la expresión de la actividad máxima total se alcanza en la fase exponencial tardía produciéndose a continuación una brusca caída de la misma. La disminución en la concentración de  $\alpha$ -glucosidasa podría ser atribuible al proceso de esporulación que involucra un elevado recambio de proteínas asociado con la aparición de la actividad de proteasas (Priest, 1989). Además, si la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa fuera inducible, al disminuir la



concentración de oligosacáridos en el medio de cultivo, los cuales actuarían como inductores, la enzima dejaría de sintetizarse. Esta interpretación es coincidente con estudios previos que han demostrado la inducibilidad por malto-oligosacáridos de estas enzimas (Urlaub y Wöber, 1978; Mc Wethy y Hartman, 1979).

Los perfiles de actividad de  $\alpha$ -glucosidasa extracelular y total en *B. amyloliquefaciens* MIR 41 no son similares, ello podría explicarse por la posible existencia de más de una enzima, (Thirunavukkarasu y Priest, 1984; Yoshigui y col., 1986).

Experimentos similares realizados con *Bacillus subtilis* MIR 5 permitieron detectar actividad de  $\alpha$ -glucosidasa extracelular y total; las curvas de actividad presentan en este caso un gran paralelismo entre sí coincidiendo con resultados descritos por otros autores (Wang y Hartman, 1976; Mc Wethy y Hartman, 1979; Kelly y col., 1980).

Algunos autores consideran que  $\alpha$ -glucosidasa es una proteína integral de membrana (Urlaub y Wöber, 1978) mientras que otros la localizan en el citoplasma o extracelular (Kelly y Fogarty, 1980; Suzuki y Tanaka, 1981). Cultivos en lote de *B. subtilis* MIR 5 y *B. amyloliquefaciens* MIR 41, mostraron que la mayor parte de la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa producida en la fase exponencial de crecimiento se encuentra en la fracción unida a células.

Comparando los resultados de los cultivos en lote, se observa que el porcentaje de excreción y los niveles de actividad extracelular máximos de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa son muy diferentes en ambas cepas en estudio. La producción de  $\alpha$ -amilasa por *B. amyloliquefaciens* MIR 41 (29,5 kU/ml) es 3,5 veces mayor que en el caso de *B. subtilis* MIR 5 (8 kU/ml), y aproximadamente 2 veces mayor considerando la actividad específica en función de la concentración celular. En cambio, la producción de  $\alpha$ -glucosidasa en *B. subtilis* MIR 5 (65 U/l)

duplica a la producida por *Bacillus amyloliquefaciens* MIR 41 (30 U/l); esa diferencia es aproximadamente 20 veces mayor, si se considera la actividad específica en función de la concentración celular. Otro hecho que debe tomarse en cuenta es la presencia de  $\beta$ -amilasa en *B. subtilis* MIR 5, cuyo accionar produce maltosa, sustrato por el cual  $\alpha$ -glucosidasa posee mayor afinidad y posee mayor poder de inducción para la síntesis de esta enzima (Fogarty y Kelly, 1980).

Por otro lado, los resultados en ambas cepas estudiadas concuerdan con observaciones anteriores, en las cuales la presencia de elevados niveles de  $\alpha$ -glucosidasa en el cultivo se correlacionaban con bajos niveles de expresión de  $\alpha$ -amilasa y viceversa (Sata y col., 1987). A su vez, podría ser que la producción de  $\alpha$ -amilasa en *B. subtilis* MIR 5 fuese muy sensible al efecto de represión por glucosa, producto de la actividad enzimática de  $\alpha$ -glucosidasa.

#### 4.3.1.3.- Producción de pululanasa

En el Género *Bacillus*, la localización de pululanasa también es contradictoria. Se han detectado pululanases unidas a la membrana celular (Takasaki, 1976; Suzuki y Chisiro, 1983), o localizadas en la fracción extracelular (Kambrourova y Emanuilova, 1987; Takasaki, 1987).

Los cultivos en lote de *B. amyloliquefaciens* MIR 41 muestran que la actividad de pululanasa se detecta únicamente en la fracción total, por lo que puede considerarse como una proteína unida a membrana. La actividad de esta enzima presenta un perfil temporal con un máximo en las primeras horas del cultivo, desapareciendo abruptamente al comienzo de la fase estacionaria. Este resultado podría estar relacionado con la rápida disminución de la concentración de almidón por un proceso de desramificación característico de estas enzimas y el incremento en la concentración de azúcares reductores que provocaría una disminución de su síntesis (Jensen y Norman,

1984). Este hecho sumado a la proteólisis y/o recambio de proteínas de membrana podría explicar estos resultados. Similares características de producción han sido descriptas en otros microorganismos (Wallenfels y col., 1966; Takasaki, 1976). Por otro lado, los niveles máximos de actividad de pululanasa obtenidos en *B. amyloliquefaciens* MIR 41 (189 U/l) son comparables a los informados en bacterias seleccionados especialmente por poseer elevada actividad enzimática: 214 U/l (Suzuki y Chisiro, 1983) y 250 U/l (Hyun y Zeikus, 1985).

La actividad de pululanasa en *B. amyloliquefaciens* MIR 41 se encuentra vinculada a las células, por lo que puede a priori, pensarse como un impedimento para su producción con fines industriales; sin embargo, esta dificultad podría ser superada por tratamientos posteriores como ser el uso de solventes o shock osmótico. Algo similar se observó en microorganismos anaerobios en los cuales enzimas consideradas "extracelulares" permanecen asociadas a las células, liberándose luego por efecto de condiciones de cultivo que llevan a una parcial desintegración de la pared celular (Hyun y Zeikus, 1985; Antranikian y col., 1987). Un enfoque similar podría ser aplicado en *B. amyloliquefaciens* MIR 41.

Previamente no ha sido descripta en la literatura la presencia de pululanasa en cepas de *B. amyloliquefaciens*. Pero existe un único trabajo informando sobre la actividad de otra enzima desramificante en *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350: isoamilasa (Urlaub y Wöber, 1975), no detectada en nuestros cultivos. Esta diferencia podría ser atribuida a las discrepancias taxonómicas entre *B. amyloliquefaciens* MIR 41 y la cepa previamente descripta. Por otro lado, dentro del grupo *subtilis*, al cual pertenecen las especies *amyloliquefaciens*, *licheniformis*, *subtilis* y *pumilus*, la diferencia por caracteres taxonómicos entre especies en algunos casos es sutil. El estudio de la cepa MIR 41 permitió clasificarla como perteneciente a la especie *amyloliquefaciens*. Sin embargo,

como lo demuestra el coeficiente de Jaccard, la coincidencia entre los caracteres taxonómicos de la especie tipo *amyloliquefaciens* y *B. amyloliquefaciens* MIR 41 es parcial. Comportándose en algunos ensayos de acuerdo con lo informado para la especie *subtilis*, en donde se ha descrito en algunas cepas la presencia de pululanasa (Takasaki, 1987). Análogo razonamiento puede ser efectuado en *B. subtilis* MIR 5. Además la ausencia de actividades enzimáticas desramificantes, como pululanasa o isoamilasa, justificaría la incapacidad de *B. subtilis* MIR 5 para degradar glucógeno.

#### 4.3.1.4.- Producción de $\beta$ -amilasa

Estudios de producción de  $\beta$ -amilasa empleando cultivo por lotes en una cepa de *Clostridium*, permitieron detectar actividad extracelular en la fase exponencial de crecimiento, la cual decae al alcanzar la fase estacionaria (Hyun y Zeikus, 1985). Probablemente, la expresión de esta enzima está reprimida por la presencia de oligosacáridos producto de la degradación parcial del almidón (Nanmori y col., 1987). Resultados similares se obtuvieron en cultivos por lote empleando *B. subtilis* MIR 5, en los cuales se detectó actividad extracelular de  $\beta$ -amilasa expresada por las células desde el inicio de la fase exponencial. Posteriormente, al alcanzar la fase estacionaria, la actividad disminuye en más de un 50 %, este hecho podría ser atribuido como en el caso de  $\alpha$ -glucosidasa a la presencia de proteasas en el cultivo y al elevado recambio de las proteínas de membrana durante el proceso de esporulación.

La confirmación de la presencia de  $\beta$ -amilasa en la especie *subtilis* tendría una gran importancia taxonómica, ya que permitiría diferenciar las especies *subtilis* de *amyloliquefaciens*, debido a que esta última carece de este tipo de actividad enzimática (Priest y col., 1987).

#### 4.3.1.5.- Producción de proteasas

En los cultivos en lote de ambas cepas, se ha detectado en la fase exponencial tardía una mayor actividad de proteasas extracelulares, siendo éstas indeseables en la producción de otras enzimas. De todos modos los niveles de actividad de proteasas son bajos comparados con los de literatura, debido probablemente a mecanismos de represión de su producción mediados por citrato, iones amonio y glucosa (Frankena y col., 1986).

#### 4.3.2.- Efecto de la temperatura y el pH en la producción de enzimas.

Los experimentos sobre los efectos de la temperatura y el pH en la producción de enzimas amilolíticas utilizando cultivo continuo, realizados empleando *B. amyloliquefaciens* MIR 41, revelan importantes alteraciones en la producción de las enzimas amilolíticas detectadas y en los niveles de exportación de enzimas dados por las relaciones de actividades extracelular/total. En particular, en el caso del efecto del pH se puede especular con una posible vinculación entre la excreción de estas enzimas y el potencial electroquímico de membrana, donde la concentración de protones juega un papel preponderante (Murén y Randall, 1985; Andersson y Hahn-Hägerdal, 1988).

La relación obtenida entre las actividades extracelular/total de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa con excepción de los puntos de pH extremos, es mayor a la temperatura de trabajo más elevada (44 °C). Además la concentración de proteínas detectada en el medio de cultivo en ausencia de significativos niveles de lisis celular, es directamente proporcional a la temperatura. Estos resultados podrían ser atribuidos a un aumento de la fluidez de la membrana celular con el incremento de la temperatura de cultivo, (Svodobodová y Svoboda, 1988a; Svodobodová y col., 1988b). Como consecuencia del aumento de

la fluidez se produciría la liberación de proteínas en el medio de cultivo, no asociada a los mecanismos de exportación de las mismas.

Por otro lado, la disminución de la producción de  $\alpha$ -amilasa con el incremento de la temperatura se debería principalmente a la disminución de la síntesis de la enzima como se puede deducir a partir de la concentración de  $\alpha$ -amilasa unida a membrana, y no a un proceso de alteración del mecanismo de excreción, el cual no se ve mayormente afectado debido a que el mismo puede estimarse a partir de la relación de actividades extracelulares y totales.

En particular, podemos concluir que en la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* MIR 41, la producción de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa tiende a un máximo a menores temperaturas (36 °C) y pH cercano a la neutralidad (6,8 unidades), aunque se debe mencionar que a ese pH se detecta la mayor actividad relativa de proteasas, aunque en bajos niveles.

La síntesis en condiciones óptimas de pululanasa se produce a mayores temperaturas (44 °C) y pH ácidos (5,6 unidades).

#### **4.3.3.- Cultivo continuo.**

##### **4.3.3.1.- Producción de $\alpha$ -amilasa**

Con el advenimiento y el desarrollo de las técnicas de cultivo continuo (Pirt, 1975; Calcott, 1981), la posibilidad de producir enzimas a partir de microorganismos ha cobrado un notable interés (Toda y col., 1979; Frankena y col., 1986). En particular, estudios sobre la producción de enzimas amilolíticas empleando cultivo continuo se han realizado en diversos géneros microbianos (Antranikian y col., 1987; Boze y col., 1987) y en varias especies pertenecientes al género *Bacillus* (Wouters y Buysman, 1977; Davis y col., 1980; Lancaster y col., 1987). Sin embargo, en un trabajo desarrollado en *B. subtilis* empleando glucosa como fuente de

carbono, concluyen que la técnica de cultivo continuo no es aconsejable para la producción de  $\alpha$ -amilasa extracelular debido a la inestabilidad de la producción y a la selección de mutantes no productoras (Heineken y O'Connor, 1972). Similares conclusiones se obtuvieron en cultivos continuos limitados por nitrógeno (Meers, 1972). Por otro lado, estudios realizados empleando almidón como fuente de carbono limitante, permitieron obtener elevados y constantes niveles de  $\alpha$ -amilasa extracelular a bajas velocidades de dilución (Emanuilova y col., 1984; Thirunavukkarasu y Priest, 1984; Khorychev y col., 1987). En base a ello se decidió emplear en este trabajo almidón como fuente de carbono. Posiblemente, la presencia de almidón como fuente de carbono y los bajos niveles de glucosa en el medio de cultivo actúen como presión de selección a favor de la síntesis y excreción de esta enzima en ausencia de represión catabólica e inhibición por los productos. Los resultados obtenidos utilizando cultivos de *B. subtilis* MIR 5 y *Bacillus amyloliquefaciens* MIR 41 son coincidentes en este sentido detectándose las mayores actividades de  $\alpha$ -amilasa extracelulares y unidas a las células a velocidades de dilución cercanas a  $0,10 \text{ h}^{-1}$ . En ambas cepas, se observa una gran disminución en la concentración de enzima extracelular al incrementarse la velocidad de dilución. Un perfil similar se observa en la concentración de enzima unida a células, lo que podría interpretarse como una disminución en la síntesis y expresión de esta enzima, no debida al mecanismo de excreción de las mismas.

Por otro lado, el análisis de muestras mediante ensayos en placa y perfiles de sensibilidad a antibióticos, determinados en los cultivos de *Bacillus amyloliquefaciens* MIR 41 y *B. subtilis* MIR 5 durante el transcurso de cultivo continuo, no permitieron detectar la presencia de mutantes no productores de  $\alpha$ -amilasa y/o variaciones morfológicas de las cepas.

#### 4.3.3.2.- Producción de $\alpha$ -glucosidasa

La producción de  $\alpha$ -glucosidasa en condiciones de cultivo continuo ha sido estudiada previamente en una cepa de *Clostridium*, alcanzándose el máximo de actividad extracelular a una velocidad de dilución de  $0,10 \text{ h}^{-1}$ , a partir de la cual decae rápidamente (Antranikian y col., 1987). Un perfil similar se observó en *B. amyloliquefaciens* MIR 41. La síntesis de  $\alpha$ -glucosidasa es baja a velocidades de dilución cercanas a  $0,10 \text{ h}^{-1}$ ; un leve incremento de la misma permite alcanzar un máximo de actividad, obtenida a  $D= 0,16 \text{ h}^{-1}$ . A mayores velocidades de dilución la producción de  $\alpha$ -glucosidasa disminuye probablemente debido a cambios en el metabolismo celular (Snay y col., 1989).

Por otro lado, en otro trabajo mencionado en la literatura sobre la producción de  $\alpha$ -glucosidasa por *B. licheniformis* en cultivo continuo la actividad fue detectada mayoritariamente en la fracción conteniendo a las células, y expresada con una actividad prácticamente constante a partir de  $0,15 \text{ h}^{-1}$  (Priest y Thirunavukkarasu, 1985). Los resultados obtenidos en *B. subtilis* MIR 5 muestran una concentración de enzima total similar a las diferentes velocidades de dilución utilizadas ( $D= 0,10 - 0,45 \text{ h}^{-1}$ ). Y debido a los bajos niveles de actividad enzimática y bajas concentraciones de azúcares reductores presentes en el medio de cultivo podría considerarse a  $\alpha$ -glucosidasa como parcialmente inducible en esta cepa.

#### 4.3.3.3.- Producción de Pululanasa

Contrastando con el número de publicaciones sobre  $\alpha$ -amilasa, existe un único estudio sobre la producción de pululanasa en cultivo continuo, realizado en una cepa de *Clostridium* (Antranikian y col., 1987). En dicho estudio, se detectó actividad de pululanasa extracelular, con un máximo de



actividad situado a  $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$  disminuyendo rápidamente a velocidades de dilución mayores. El estudio realizado en condiciones de estado estacionario empleando un quimiostato con la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* MIR 41, permitió la detección de actividad de pululanasa en la fracción total con un máximo situado en  $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ .

#### 4.3.3.4.- Producción de $\beta$ -amilasa

Al igual que en el caso de pululanasa, existe un sólo trabajo que aborda la producción de  $\beta$ -amilasa en cultivo continuo, desarrollado en *Clostridium thermosulfurogenes* empleando almidón como fuente de carbono, donde fue demostrado que la producción de enzima es estable por lo menos durante 18 semanas, y que su producción presenta un máximo a bajas velocidades de dilución, cercana a  $0,15 \text{ h}^{-1}$  (Nipkow y col., 1989). Los resultados obtenidos en quimiostato empleando *Bacillus subtilis* MIR 5, muestran un perfil de producción de  $\beta$ -amilasa casi constante (16 % de variación entre el máximo y el mínimo de las actividades enzimáticas totales), con un máximo situado en  $D = 0,31 \text{ h}^{-1}$ . La producción de enzima detectada como actividad máxima total se incrementa en un 56 % en la modalidad de cultivo continuo, sin embargo la producción de enzima extracelular máxima en ambos modos de cultivo es aproximadamente la misma. Esto lleva a considerar que el mecanismo de procesamiento que permite la liberación de esta enzima medio extracelular podría ser alterado por las condiciones de cultivo continuo.

Por otro lado, la relación de actividades extracelular/total de  $\beta$ -amilasa a lo largo de las velocidades de dilución barridas es prácticamente constante.

#### 4.3.4.- Comparación de las técnicas de cultivo.

Al comparar las modalidades de cultivo, continuo y por lotes, en la producción de enzimas amilolíticas, se observa:

- Las actividades totales y extracelulares máximas de  $\alpha$ -amilasa son mayores en cultivo continuo que en cultivo en lote en ambas cepas en estudio.
- La actividad máxima total de  $\beta$ -amilasa en *B. subtilis* MIR 5 es aproximadamente 30 % mayor en cultivo continuo que en cultivo en lote, sin embargo, las actividades extracelulares son aproximadamente las mismas empleando ambas metodologías de cultivo. Debido a que las condiciones experimentales de cultivo continuo son más controladas y no se producen efectos temporales como en el caso del cultivo en lote, sería conveniente emplear el cultivo continuo para la producción de  $\beta$ -amilasa en esta cepa.
- En *B. amyloliquefaciens* MIR 41 el uso de la técnica de cultivo por lotes permite detectar una mayor actividad enzimática de pululanasa (57 %) respecto a cultivo continuo. Esto podría ser atribuido a las condiciones de operación prefijadas para la producción de  $\alpha$ -amilasa, las que son desfavorables de acuerdo a lo que se estableció en los experimentos de pH y temperatura para la producción de pululanasa.
- Si se comparan la relación de actividades dextrinizante/ sacarificante en *Bacillus subtilis* MIR 5, en cultivo por lotes y en continuo en el máximo de actividad total de  $\beta$ -amilasa las relaciones son aproximadamente 5/1 y 7,5/1 respectivamente, mientras que en el máximo de actividad total de  $\alpha$ -amilasa la mismas relaciones son 35/1 y 19/1 respectivamente. Los resultados obtenidos indican que la producción simultánea de ambas enzimas puede ser efectuada modificando las condiciones de cultivo.
- El porcentaje de  $\alpha$ -amilasa extracelular producida por *B. amyloliquefaciens* MIR 41 supera en todos los casos el 75 % de

la actividad enzimática total en cultivo continuo, mientras que en cultivo por lotes se encuentra entre 66 a 88 %. Dependiendo del estadio celular del cultivo el porcentaje extracelular de la misma, siendo estas oscilaciones un agravante para la producción de la enzima. Si se efectúa un similar tratamiento, no se observan grandes variaciones entre los valores obtenidos de la misma relación en  $\alpha$ -glucosidasa por ambas modalidades de cultivo.

- Comparando las actividades específicas máximas de  $\alpha$ -amilasa en *B. amyloliquefaciens* MIR 41, calculada respecto de la concentración de proteínas, entre ambas modalidades de cultivo, se obtiene una disminución de un tercio en cultivo por lotes respecto del continuo. En el caso de la actividad específica de  $\alpha$ -glucosidasa es aproximadamente 2 veces mayor en cultivo continuo.

- Calculando la actividad específica en función de la concentración celular en *B. amyloliquefaciens* MIR 41, la actividad específica de  $\alpha$ -amilasa es aproximadamente 3 veces mayor en cultivo continuo respecto de cultivo por lotes en  $\alpha$ -amilasa y 2 veces mayor en  $\alpha$ -glucosidasa. Mientras que la actividad específica de pululanasa por célula es 3 veces mayor en cultivo por lotes que en cultivo continuo.

- El máximo de producción de proteasas extracelulares en cultivo continuo presentan un bajo nivel de actividad. Sin embargo, duplican aproximadamente la producción de cultivo por lotes. Este hecho podría ser atribuido a la disminución de los niveles de glucosa en el cultivo, informados como causantes de represión por catabolito (Frankena y col., 1986).

Los resultados descriptos, obtenidos con las cepas en estudio indican que la utilización de cultivo continuo es una potencial alternativa para la producción de algunas enzimas amilolíticas como  $\alpha$ -amilasas y  $\alpha$ -glucosidasas debido a la temporalidad de la expresión de las mismas y a la posibilidad

del control en el ciclo celular que permite esta técnica. De manera contraria, la óptima producción de pululanasa debe ser efectuada en cultivo por lotes. Sin embargo la producción en esta modalidad de cultivo posee el inconveniente asociado a los mecanismos de esporulación como lo es la producción y liberación en el medio de cultivo de enzimas líticas (Dubnau, 1985), mientras que en condiciones de cultivo continuo no han sido observados los fenómenos de esporulación, confirmando así los resultados informados en un trabajo previo (Dawes y col., 1970).

Las discrepancias surgidas en la localización y tipo de enzima, así como en los perfiles de producción de las mismas, entre cepas altamente relacionadas como *B. subtilis* MIR 5 y *B. amyloliquefaciens* MIR 41, podrían ser explicadas considerando que diferentes cepas poseen diferentes sistemas de regulación metabólica. Sin embargo, estudios genéticos y moleculares que involucren la expresión y regulación genómica podrían permitir la obtención de modelos más generalizados de degradación de  $\alpha$ -glucanos.

#### 4.4.- Propiedades de las enzimas

En la literatura ha sido descripta una gran variedad de condiciones de reacción de  $\alpha$ -amilasas producidas por microorganismos pertenecientes al género *Bacillus*. Comprenden temperaturas óptimas desde 40 °C hasta 95 °C, y pH óptimos desde 3,5 hasta 10,5 (Ingle y Boyer, 1978; Fogarty y Kelly, 1980).

Si comparamos los resultados de temperatura óptimos de  $\alpha$ -amilasa obtenidos en las dos cepas seleccionadas, podemos observar una gran similitud entre ambas.

En base al pH óptimo de  $\alpha$ -amilasa producida por *Bacillus subtilis* MIR 5, 7,5 unidades de pH, esta puede ser clasificada como una  $\alpha$ -amilasa alcalina. Y su potencialidad industrial

radica en su uso como componente de detergentes (Ingle y Erikson ,1978).

En el caso de la  $\alpha$ -amilasa producida por *Bacillus amyloliquefaciens* MIR 41, debido a que el pH óptimo de reacción es levemente ácido, esta podría ser empleada en la producción de jarabes edulcorantes, aunque por la temperatura óptima de reacción su utilización más favorable podrían ser las industrias de panadería (Aunstrup, 1977).

Si se comparan la temperatura y el pH óptimo de actividad de  $\beta$ -amilasa producida por *B. subtilis* MIR 5 respecto de los pocos datos obtenidos de la literatura, podemos concluir que la temperatura óptima de 55 °C es la más alta observada y comparable a la temperatura óptima de  $\beta$ -amilasa producida por *Pseudomonas* sp. (45-55 °C) y a la producida por *Bacillus* sp. (55 °C) (Fogarty y Kelly, 1980). Sin embargo los pH óptimos en las cepas antes mencionadas son superiores a 6,4 unidades de pH, lo cual es inconveniente en la etapa de sacarificación de almidones que se efectúa en condiciones ácidas de reacción, inferiores a pH 6,0 (Radley, 1976). Por otro lado, en *Bacillus megaterium* se ha descrito la presencia de  $\beta$ -amilasa, cuya actividad máxima se obtiene a pH 6,0, sin embargo la temperatura óptima es levemente inferior (Fogarty y Kelly, 1980). Por lo tanto, las características de pH y temperatura de  $\beta$ -amilasa producida por *B. subtilis* MIR 5, posibilitarían que la misma pueda ser empleada con mayores rendimientos en los procesos de sacarificación que actualmente se encuentran en operación, respecto de las descritas en la literatura.

Al comparar la temperatura y el pH óptimos de las  $\alpha$ -glucosidasas producidas por las cepas seleccionadas, se observa que a pesar de que poseen óptimos pH muy cercanos entre sí (6,2 - 6,4 y 6,5), las temperaturas óptimas de reacción difieren notablemente: 37 y 52 °C. Es llamativa la elevada temperatura óptima de la enzima producida por *B. subtilis* MIR 5, debido a que las temperaturas óptimas de los

microorganismos descritos en la literatura son cercanas a los 40 °C (Aunstrup, 1977).

Hasta la fecha, no han sido descritos procesos industriales que involucren la utilización de  $\alpha$ -glucosidasas (Aunstrup, 1978); sin embargo podría existir la posibilidad de su empleo en los procesos de sacarificación, en conjunto con  $\beta$ -amilasa con la finalidad de reducir los tiempos de reacción.

La condiciones óptimas de reacción de la pululanasa producida por *B. amyloliquefaciens* MIR 41 , 52-55 °C y 5,8 unidades de pH, la hacen comparable con la temperatura óptima reportada en la literatura producida por una pululanasa de *Bacillus* sp. N° 202-1 con 55 °C (Fogarty y Kelly, 1980). Sin embargo el pH óptimo de esta última, 8,5 a 9,0, no permiten su posible utilización en los procesos de sacarificación, en donde el pH empleado es inferior a 6,0 (Jensen y Norman, 1984). Y en el caso de *Streptomyces* sp. N° 280, cuyo pH óptimo se encuentra comprendido entre 5,0 a 6,0 unidades, su temperatura óptima es de 50 °C, levemente inferior a la obtenida por *Bacillus amyloliquefaciens* MIR 41.

## 5.- CONCLUSIONES

Los aspectos mas salientes del presente trabajo pueden resumirse de la siguiente manera:

- Se aislaron diversas cepas pertenecientes al Género *Bacillus*, cuya capacidad amilolítica es comparable y en algunos casos superior a las de cepas de colección.
- Se efectuó la caracterización microbiológica de dos cepas seleccionadas de acuerdo a los criterios internacionales más modernos establecidos para el Género *Bacillus*, estableciéndose que pertenecen a las especies *subtilis* y *amyloliquefaciens*.
- Se efectuó la caracterización del sistema amilolítico de *Bacillus amyloliquefaciens* MIR 41, el cual está compuesto por  $\alpha$ -amilasa, pululanasa y  $\alpha$ -glucosidasa.
- Se efectuó la caracterización del sistema amilolítico de *Bacillus subtilis* MIR 5 que está constituido por  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasas y  $\alpha$ -glucosidasa.
- En las cepas estudiadas, las enzimas detectadas poseen distinta localización subcelular, es así que  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasa han sido detectadas mayoritariamente extracelulares;  $\alpha$ -glucosidasa y pululanasa unidas a membrana.
- Se ha demostrado que la producción de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasa es conveniente realizarla en operación de continuo, mientras que la producción de pululanasa y  $\alpha$ -glucosidasa mediante cultivo por lotes. De forma mas genérica, la producción de enzimas extracelulares es conveniente producirlas en la modalidad de cultivo continuo, mientras que la producción de las enzimas unidas a las células es conveniente producirlas en cultivos por lotes.
- La técnica de cultivo continuo en *B. subtilis* MIR 5, permite la producción simultánea de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasa. Y a su vez, al variar la velocidad de dilución varían las concentraciones relativas de cada enzima y por lo tanto se pueden obtener extractos enzimáticos de distinta composición.

- La presencia de  $\beta$ -amilasa en *Bacillus subtilis* MIR 5 podría ser empleada con características diagnósticas de especie dentro del grupo *subtilis* para diferenciarla de la especie *amyloliquefaciens*.
- La técnica de sensibilidad a antibióticos permite obtener perfiles característicos de cada cepa, por lo que podría ser empleada como una técnica rápida en el control del proceso fermentativo.
- Se desarrolló una técnica de determinación de proteínas, que posee las siguientes características: alta sensibilidad, comparable a los métodos habitualmente empleados en el laboratorio; puede ser efectuada en una sola etapa y por lo tanto automatizable; rapidez en las determinaciones; bajos costos de reactivos; y vida media de los reactivos a temperatura ambiente superior a 30 días.
- Se desarrolló un equipo que permite determinar la concentración celular *in situ* en fermentadores a escala de laboratorio, con sensibilidad comparable a las técnicas turbidimétricas actualmente en uso.
- Se efectuó una mejora técnica que incrementa la sensibilidad del método de placa utilizado para la selección de microorganismos productores de esterasas.





## 6.- BIBLIOGRAFIA

- Aiba, S.; Humphrey, A.E. & Millis, N.F. (1965). Biochemical Engineering. Academic Press. Nueva York.
- Andersson, E. & Hahn-Hägerdal, B. (1988). High concentrations of PEG as a possible uncoupler of the proton motive force:  $\alpha$ -amylase reduction with *Bacillus amyloliquefaciens* in aqueous two phase systems and PEG solutions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29: 329-336.
- Anónimo (1983). Api 50 CH. Api system-Biomerieux, Verclieu, Francia.
- Antranikian, G.; Herzberg, C. & Gottschalk G. (1987). Production of thermostable  $\alpha$ -amylase, pullulanase and  $\alpha$ -glucosidase in continuous culture by new *Clostridium* isolate. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1668-1673.
- Appl, R.; Knechtell, H. & Thomas, A. (1989). Studying the make-up of corn sweeteners. Candy Ind. 154: 32-48.
- Aunstrup, K. (1977). Enzymes of industrial interest. Traditional products. En Annual Reports in Fermentations Processes, pp. 181-204. Editado por D. Perlman. Academic Press. Nueva York, E.E.U.U.
- Aunstrup, K. (1978). Enzymes of industrial interest; traditional products. En Annual Reports on fermentation Processes, pp. 125-154. Editado por D. Perlman. Academic Press, Nueva York, E.E.U.U.
- Aunstrup, K.; Andresen, O.; Falch, E.A. & Nielsen T.K. (1979). Production of microbial enzymes. En Microbial Technology. pp. 282-309. Editado por H.J. Peppler and D. Perlman. Academic Press. Orlando, E.E.U.U.
- Bailey, R.W. & Scott, E.G. (1966). Diagnostic Microbiology. C.V. Mosby Company. Inglaterra.
- Barry, A.L. (1980). Procedure for testing antibiotics in agar media-theoretical considerations. En Antibiotics in laboratory Medicine. pp. 1-23. Editado por V. Lorian. The Williams and Wilkins Co.. Baltimore. E.E.U.U.
- Bender, H. & Wallenfels K. (1966). Pullulanase (an amylopectin and glycogen debranching enzyme from *Aerobacter aerogenes*). Methods in Enzymol. 8: 555-562.
- Bergmeyer, H.U. (1984).  $\alpha$ -amylase. En Methods of enzymatic analysis (3<sup>o</sup> ed.), Vol IV. pp. 146-177. Editado por H.U. Bergmeyer. Verlag-Chemie. R.F.A.
- Bernfeld, P. (1955). Alpha and Beta amylases. Methods in Enzymol. 1: 149-187.
- Beutler, H.O. (1984). Maltose. Methods of enzymatic analysis (3<sup>o</sup> ed.), vol. VI, pp. 119-126. Editado por H.U. Bergmeyer. Verlag-Chemie. Alemania.
- Boze, H.; Moulin, G. & Galzy, P. (1987). Influence of culture conditions on the cell yield and amylases biosynthesis in continuous culture by *Schwanniomyces castelli*. Arch. Microbiol. 148: 162-166.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- Button, D.K. (1985). Kinetics of nutrient-limited transport and microbial growth. Microbiol. Rev. 49: 270-297.
- Calcott, P.H. (1981). Continuous culture of cells (Vol. I & II). CRC Press, Boca Raton, Florida, E.E.U.U.

- Carrol, B. & Chennng, H. (1964). Determination of amylose  
sortion of Congo Red. *Methods in Carbohydrate Chem.*  
4: 178-179.
- Claus, D. & Berkeley, R.C.W. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872.  
En *Bergey's manual of systematic bacteriology* (9<sup>th</sup> ed.),  
vol. II. pp. 1105-1140. Editado por P.H.A. Sneath.  
The Williams & Wilkins Co., Baltimore. E.E.U.U.
- Coleman, G. & Grant, M.A. (1966). Characteristics of  $\alpha$ -amylase  
formation by *Bacillus subtilis*. *Nature (Londres)*  
211: 306-307.
- Colwell, R.R. & Austin, B. (1981). Numerical Taxonomy. En  
*Manual methods for general bacteriology*. pp. 441-449.  
Editado por P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow,  
E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg y G. Briggs Phillips.  
American Society for Microbiology, Washington D.C., E.E.U.U.
- Cowan, S.T. (1974). *Cowan and Steel's manual for the  
identification of medical bacteria* (2<sup>a</sup> ed.). Cambridge  
University Press. Cambridge, U.K.
- Chandra A.K.; Medda, S. & Bhadra A.K. (1980). Production of  
extracellular thermostable  $\alpha$ -amylase by *Bacillus  
licheniformis*. *J. Ferment. Technol.* 58: 1-10.
- Dahlqvist, A. (1984).  $\alpha$ -Glucosidases. En *Methods of enzymatic  
analysis* (3<sup>rd</sup> ed.), vol. IV, pp. 208-215. Editado por H.U.  
Bergmeyer. Verlag-Chemie. Alemania.
- Davies, P.E.; Cohen, D.L. & Whitaker A. (1980). The production  
of  $\alpha$ -amylase in batch and chemostat culture by *Bacillus  
stearothermophilus*. *Antonie van Leewenhoek* 46: 391-398.
- Dawes, I.W. & Thornley, J.H.M. (1970). Sporulation in *Bacillus  
subtilis*. Theoretical and experimental studies in continuous  
culture systems. *J. Gen. Microbiol.* 62: 49-66.
- Debavov, V.G. (1982). The industrial use of *Bacilli*. En *The  
molecular biology of the Bacilli*, vol. I, pp.331-370.  
Editado por D. Dubnau. Academic Press, Florida, E.E.U.U.
- De Mendoza, D. & Cronan, J.E. Jr. (1983). Thermal regulation  
of membrane lipid fluidity in bacteria. *Trends Biochem. Sci.*  
86: 49-52.
- Durand, G. (1982). *Les enzymes, production et utilisations  
industrielles*. Gauthier-Villars, Paris, France.
- Dygert, S.; Li, H.L.; Florida, D. & Thoma, J.A. (1965).  
Determination of reducing sugar with improved precision.  
*Anal. Biochem.* 13: 367-374.
- Emanuilova, E. & Toda, K. (1984).  $\alpha$ -Amylase production in  
batch and continuous cultures by *Bacillus caldolyticus*.  
*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 301-305.
- Eveleigh, D.E. (1981). The microbiological production of  
industrial chemicals. *Scientific American* 245: 154-178.
- Fogarty, W.M. & Kelly, C.T. (1979). Starch degrading enzymes  
of microbial origin, distribution and characteristics. En  
*Progress in industrial Microbiology*, pp. 87-148. Editado por  
M.J. Ball. Elsevier. Amsterdam, Holanda.
- Fogarty, W.M. & Kelly, C.T. (1980). Amylases,  
Amyloglucosidases and related glucanases. En *Economic  
Microbiology*, pp. 115-170. Editado por A.H. Rose. Academic  
Press, Londres, Inglaterra.

- Frankena, J.; Konigstein, G.M.; Van Verseveld, H.W. & Stouthamer, A.H. (1986). Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 106-112.
- Frazier, N.C. (1926). A method for the detection of changes in due to bacteria. *J. of Infectious Diseases* 39: 302-309.
- Fukumoto, J. (1943). Studies on the production of bacterial amylase. I. Isolation of bacteria secreting potent amylase and their distribution. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 19: 487-503.
- Gandhi, A.P. & Kjaergaard, L. (1975). Effect of carbon dioxide on the formation of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus subtilis* growing in continuous and batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 17: 1109-1118.
- Glassner, D.A.; Grulke, E.A. & Oriel, P.J. (1989). Characterization of an immobilized biocatalyst system for production of thermostable amylase. *Biotechnol. Progress* 5: 31-39.
- Gordon, R.E. (1977). The Genus *Bacillus*. En Handbook of Microbiology, vol. I. pp. 319-336. Editado por A. Laskin & H.A. Lechevalier. CRC press, Boca Raton, E.E.U.U.
- Green, D.M. & Colarusso, L.J. (1964). The physical and genetic characterization of a transformable enzyme: *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase. *Biochim. Biophys. Acta* 89: 277-290.
- Greenwood, C.T. & Milne, E.A. (1968). Starch degrading and syntetizing enzymes. *Adv. in Carbohyd. Chem.* 23: 228-349. Academic Press. Nueva York, E.E.U.U.
- Griffin, P.J. & Fogarty, W.M. (1973). Preliminary observations on the starch degrading system elaborated by *Bacillus polymyxa*. *Biochem. Soc. Trans.* 1: 397-400.
- Gunja-Smith, Z.; Marshall, J.J.; Smith, E.E. & Whelan, W.J. (1970). A glycogen-debranching enzyme from *Cytophaga*. *Febs Lett.* 12: 96-100.
- Hao, J.; Pazlarová, J.; Strnadová, M.; Tichy, P. & Chaloupka, J. (1988). Effect of temperature on  $\alpha$ -amylase formation and DNA replication in *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol.* 33: 230-233.
- Heineken, F.G. & O'Connor, R.J. (1972). Continuous studies on the biosynthesis of alkaline protease, neutral protease and  $\alpha$ -amylase by *Bacillus subtilis* NRRL-b3411. *J. Gen. Microbiol.* 73: 35-44.
- Herbert, D.; Elsworth, R. & Telling, R.C. (1956). The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. *J. Gen. Microbiol.* 14: 601-622.
- Higashihara, M. & Okada, S. (1974). Studies on  $\beta$ -amylase of *Bacillus megaterium* n<sup>o</sup> 32. *Agric. Biol. Chem.* 38: 1023-1029.
- Hoobs, L. (1983). Technology: sweeteners in confections. *Candy Ind.* 148: 48-53.
- Hyun, H.H. & Zeikus, J.G. (1985). General biochemical characterization of thermostable pullulanase and glucoamylase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1168-1173.

- Ingle, M.B. & Erickson, R.J. (1978). Bacterial  $\alpha$ -amylases. En Adv. in Applied Microbiology 24: 257-278. Editado por D. Perlman. Academic Press. New York, E.E.U.U.
- Jensen, B.F. & Norman, B.E. (1984). *B. acidopullulyticus* Pullulanase: aplicacion and regulatory aspects for use in the food industry. Process Biochem. 19: 129-134.
- Kambourova, M.S. & Emanuilova, E.I. (1987). Biosynthesis and properties of extracellular pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* G-82. En Extracellular enzymes of microorganisms, pp. 195-199. Editado por J. Chaloupka & V. Krumphanzl. Plenun Press. Londres-Nueva York.
- Kanno M. (1986). A *Bacillus acidocaldarius*  $\alpha$ -amylase that is highly stable to heat under acidic conditions. Agric. Biol. Chem. 50: 23-31.
- Kato, Y.; Katsuhiko, M.; Hara, K.; Hashimoto, H.; Nakajima, T.; Kobayashi, S. & Kainuma, K. (1988). The structure of high molecular weight dextrans obtained from potato starch by treatment with *Bacillus macerans* enzyme. J. Ferment. Technol. 66: 159-166.
- Katz, J. & Bercovich N. (1987). Enzimas: adaptaci3n local y aprendizaje de tecnologa. Revista del Banco Provincia de Buenos Aires 7: 14-26.
- Khovrychev, M.P.; Lirova, S.A. & Rabotnova I.L. (1987). Biosynthesis of thermostable  $\alpha$ -amylase under continuous cultivation. Mikrobiologiya (U.R.S.S.) 56: 425-430.
- Kelly, C.T.; Hefferman, M.E. & Fogarty, W.M. (1980). A novel  $\alpha$ -glucosidase produced by *Bacillus amylolyticus*. Biotechnol. Lett. 2: 351-356.
- Kelly, C.T. & Fogarty, W.M. (1983). Microbial  $\alpha$ -glucosidases. Process Biochem. 18: 6-12.
- Kirschembaum, D.M. (1970). Molecular data. En Handbook of Biochemistry. pp. c-71-c-98. Editado por H. Sober. Chemical Rubber Co. Cleveland, E.E.U.U.
- Knigh, J.W. (1969). Starch Industry. Pergamon Press, Oxford, Inglaterra.
- Kooi, E.R. & Armbuster, F.C. (1967). Production and use of dextrose. En Starch: Chemistry and Technology (vol. II). pp. 551-568. Editado por R.L. Whistler & E.F. Paschall. Academic Press. Nueva York, E.E.U.U.
- Kumar, S.U.; Rehana, F. & Nand, K. (1990). Production of an extracellular thermostable calcium-inhibited  $\alpha$ -amylase by *Bacillus licheniformis* MY 10. Enz. Microb. Technol. 12: 714-716.
- Kuriki, T.; Park, J.H.; Okada, S. & Imanaka, T. (1988). Purification and characterization of thermostable pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and molecular cloning and expresison of the gene in *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2881-2883.
- Lancaster, M.J.; Keevil, C.W.; Elwood, P.C. & Berkeley, R.C.W. (1987). Environmental control of protein export of *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. Reveals two types of extracellular proteins. Arch. Microbiol. 147: 158-162.
- Lancaster, M.J.; Keevil, C.W.; Elwood, P.C. & Berkeley, R.C.W. (1988). Effect of environmental phosphate concentration on protein export of *B. licheniformis* NCIB 6346. Arch. Microbiol. 150: 547-551.

- Lee, E.Y.C. & Whelan, W.J. (1971). Glycogen and starch debranching enzymes. En *The enzymes*, vol. V. pp. 191-254. Editado por P.D. Boyer. Academic Press. Nueva York, E.E.U.U.
- Lelieveld, H.L.M. (1982). The use of continuous culture for selection and isolation of microorganisms producing extracellular enzymes adapted to extreme environments. *Biotech. Bioeng.* 24: 1419-1425.
- Liebs, P.; Riedel, K.; Graba, P.J.; Schrapel, D. & Tischler, U. (1988). Formation of some extracellular enzymes during the exponential growth of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol.* 33: 88-95.
- Logan, N. A. & Berkeley, R.C.W. (1984). Identification of *Bacillus* strains using the Api system. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1871-1882.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Madi, E.; Antranikian, G.; Ohmiya, K. & Gottschalk, G. (1987). Thermostable amylolytic enzymes from a new *Clostridium* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1661-1667.
- Manning, G.B. & Campbell, L.L. (1961). Thermostable  $\alpha$ -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biol. Chem.* 236: 2952-2957.
- Mäntsälä, P. & Zalkin, H. (1979). Membrane-bound and soluble extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 254: 8540-8547.
- Markkaanen, P.H. & Bailey M.J. (1975). Effect of aeration and temperature on production of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 25: 863-865.
- Marshall, J.J. (1974). Characterization of *Bacillus polymyxa* amylase as an exo-acting (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucan maltohydrolase. *FEBS Lett.* 46: 1-4.
- Marshall, J.J. & Rabinowitz M.L. (1974). Enzyme stabilization by covalent attachment of carbohydrate. *Arch. Biochem. Biophys.* 167: 777-779.
- Marshall, J.J. (1975). Starch: old and new enzymes. *Die Stärke* 27: 377-383.
- Matzusaki, H.; Yamane, K. & Maruoi, B. (1974). Hybrid  $\alpha$ -amylases produced by transformants of *Bacillus subtilis*. I. Purification and characterization of extracellular  $\alpha$ -amylases produced by parental strains and transformants. *Biochim. Biophys. Acta* 365: 235-247.
- Mc Wethy, S.J. & Hartman, P.A. (1979). Extracellular maltase of *Bacillus brevis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1096-1102.
- Mc Donald, M. (1984). Uses of glucose syrups in the food industry. En *Glucose syrups: Science and Technology*. pp. 247-265. Editado por S.J. Dziedic & M.W. Kearsley. Elsevier Applied Science Pub. Nueva York, E.E.U.U.
- Mc Faddin, J.F. (1980). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Mc Kenzie, H.A. (1969). pH and Buffers (Ch. 20). En *Data for Biochemical Research* (2 $^{\circ}$  ed.). pp. 476-504. Editado por R.M.C. Dawson, D.C. Elliot, W.E. Elliot, K.M. Jones. Oxford University Press. E.E.U.U.
- Meers, J.L. (1972). The regulation of  $\alpha$ -amylase production in *Bacillus licheniformis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 38: 585-590.

- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Monod, J. (1950). Le technique de culture continue; theorie et applications. *Ann. Inst. Pasteur* 79: 390.
- Morgan, F.J.; Adams, K.R. & Priest, F.G. (1979). A culture method for the detection of pullulan-degrading enzymes in bacteria and its application to the genus *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* 46: 291-294.
- Murao, S.; Oyama, K. y Arai, M. (1979).  $\beta$ -Amylases from *Bacillus polymyxa* No.72. *Agric. Biol. Chem.* 43: 719-726.
- Murén, E.M. & Randall, L.L. (1985). Export of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* requires the proton motive force. *J. Bacteriol.* 164: 712-716.
- Nakamura, N.; Watanabe, K. & Horikoshi, K. (1975). Purification and some properties of alkaline pullulanase from a strain of *Bacillus* n<sup>o</sup> 202-1, an alkalophilic microorganism. *Biochim. Biophys. Acta*, 397: 188-193.
- Nanmori, T.; Numata, Y. & Shinke, R. (1987). Isolation and characterization of a *Bacillus cereus* mutant strain hyperproductive of exo- $\beta$ -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 768-771.
- Napier, E.J. (1977). U.S. patent 4,011,136.
- Nipkow, A.; Shen, G.J. & Zeikus, J.G. (1989). Continuous production of thermostable  $\beta$ -amilase with *Clostridium thermosulfurogenes*: effect of culture conditions and metabolite levels on enzyme synthesis and activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 689-694.
- Norris, J.R.; Berkeley, R.C.W.; Logan N.A. & O'Donnell A.G. (1981). The Genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. En A handbook on habits, isolation and identification of bacteria. pp. 1711-1742. Editado por M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, H.G. Schlegel. Springer-Verlag, Berlin. Alemania.
- Novick, A. & Szilard, L. (1950). Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sc. (Nueva York)* 36: 708-713.
- O.M.S. (1977). Expert Comitte on biological standardization. Technical Report Series 610: 98-128.
- Pazlarová, J. (1987). Exocellular protein and  $\alpha$ -amylase secretion in *Bacillus subtilis*. En: Extracellular enzymes of microorganisms. Editado por J. Chaloupka y V. Krumphanzl. Plenun Press, Londres y Nueva York.
- Phaff, H.J. & Rombouts, F.M. (1976). Lysis of yeast cell walls. Lytic  $\beta$ -(1,3)-glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. *Eur. J. Biochem.* 63: 109-116.
- Piggot, P.J. & Hoch, J.A. (1985). Revised genetic linkages map of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 49: 158-179.
- Pirt, S.J. (1975). Principles of microbe and cell cultivation. Blakwell Scientific Publications. Londres, Inglaterra.
- Plant, A.R.; Morgan, H.W. & Daniel, R.M. (1986). A highly stable pullulanase from *Thermus aquaticus* YT-1. *Enz. Microb. Technol.* 8: 668-672.
- Pollack, M.R. (1962). The bacteria. Editado por I.C. Gensalua & R.Y. Stanier. 4: 121-178. Academic Press. Nueva York, E.E.U.U.
- Priest, F.G. (1977). Extracelular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* 41: 711-753.

- Priest, F.G. & Thirunavukkarasu, M. (1985). Synthesis and localization of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase in *Bacillus licheniformis* grown in batch and continuous culture. *J. Appl. Bacteriol.* 58: 381-390.
- Priest, F.G.; Goodfellow, M.; Shute, L.A. & Berkeley, R.C.W. (1987). *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 69-71.
- Priest, F.G.; Goodfellow, M. & Todd, C. (1988a). A numerical classification of the Genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1847-1882.
- Priest, F.G. & Alexander, B. (1988b). A frequency matrix for probabilistic identification of some *Bacilli*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 3011-3018.
- Prosser, J.I. & Tough, A.J. (1991). Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Critical Rev. Biotech.* 10: 253-274.
- Radley, J.A. (1976). Starch production technology. Applied Science Publishers. Londres, Inglaterra.
- Rey, M.W.; Requadt C.; Mainzer, S.E.; Lamsa, M.H.; Ferrari, E.; Lad P.J. & Gray, G.L. (1986). Homologous  $\alpha$ -amylases of *Bacillus* and their generation of their hybrids in vivo. En *Bacillus Molecular Genetic and Biotechnology applications*. pp. 229-239. Editado por A.H. Ganesan y J.A. Hoch, Academic Press. Florida, E.E.U.U.
- Robytt, J.F. & Ackerman, R. (1973). Structure and function of amylases. II. Multiple forms of *B. subtilis*  $\alpha$ -amylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 155: 445-451.
- Rothsein, D.M.; Devlin, P.E. & Cate, R.L. (1986). Expression of  $\alpha$ -amylase in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 168: 839-842.
- Rowley, B.I. & Bull, A.T. (1977). Isolation of a Yeast-lysing *Arthrobacter* species and the production of the lytic enzyme complex in batch and continuous-flow fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 19: 879-899.
- Rutten, R. & Daugulis, A.J. (1987). Continuous production of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in a two stage fermentor. *Biotechnol. Lett.* 9: 505-510.
- Saito, N. (1973). A thermophilic extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 155: 290-298.
- Saito, N. & Yamamoto, K. (1975). Regulatory factors affecting  $\alpha$ -amylase production in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 121: 848-856.
- Sata, H.; Taniguchi, H. & Maruyama, Y. (1987a). Regulation of amylase synthesis in *Bacillus circulans* F-2. *Agric. Biol. Chem.* 51: 1521-1527.
- Sata, H.; Taniguchi, H. & Maruyama, Y. (1987b). Production of  $\alpha$ -glucosidase and its role in regulation of amylase production in *Bacillus circulans* F-2. *Agric. Biol. Chem.* 51: 3275-3279.
- Sato, H.H. & Park, Y.K. (1980). Purification and characterization of extracellular isoamylase from *Flavobacterium* sp. *Starch* 32: 132-136.
- Sedmak, J.J. & Grossberg, S.E. (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Blue G-250. *Anal. Biochem.* 79: 544-552.

- Seki, T.; Oshima, T. & Oshima, Y. (1975). Taxonomic study of *Bacillus* by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization and inter specific transformation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 25: 258-270.
- Shinke, R.; Nishira, H. & Mugibayashi, N. (1974). Isolation of  $\beta$ -amylase producing microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 38: 665-666.
- Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 23: 15-22.
- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Nueva York)* 71: 522-525.
- Skipper, N.; Sutherland, M.; Davies, R.W.; Kilburn, D.; Miller Jr., R.C.; Warren, A. & Wong, R. (1985). Secretion of bacterial cellulase by yeast. *Science* 230: 958-960.
- Smith, G.F. & Mc Curdy, W.H. (1952). 2,9-dimethyl-1,10-phenantroline. New specific in spectrophotometric determination of cooper. *Anal. Chem.* 24: 371-373.
- Smith, P.B.; Handcock, G.A. & Rhoden, D.L. (1969). Improved medium for detecting deoxyribonuclease-producing bacteria. *Appl. Microbiol.* 18: 991-993.
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J. & Klenck, D.C. (1985). Measurement of protein using bichinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Snay, J.; Jeong, J.W. & Ataai, M.M. (1989). Effects of growth conditions on carbon utilization and organic by-product formation in *B. subtilis*. *Biotech. Progress* 5: 63-69.
- Somogyi, M. (1945). A new reagent for the determination of sugar. *J. Biol. Chem.* 160: 61-68.
- Srivastava, R.A.K. & Baruah, J.N. (1986). Culture conditions for production of thermostable amylase by *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 179-184.
- Stark, J.R.; Stewart, T.B. & Priest, F.G. (1982). Characterization of extracellular  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases from *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 15: 295-298.
- Stewart, G.G. (1987). The biotechnological relevance of starch-degrading enzymes. *Crit. Rev. in Biotech.* 5: 89-93.
- Street, H.V. (1963). Amylase. *En Methods of enzymatic analysis* (1<sup>st</sup> ed.), pp. 854-858. Edited by H.U. Bergmeyer. Verlag-Chemie. Alemania.
- Sugimoto, T.; Amemura, A. & Harada, T. (1974). Formation of extracellular isoamylase and intracellular  $\alpha$ -glucosidase and amylase(s) by *Pseudomonas* SB15 and a mutant strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 28: 336-339.
- Suzuki, Y.; Yuki, T.; Kishigami, T. & Abe, S. (1976). Purification and properties of extracellular  $\alpha$ -glucosidase of a thermophile, *Bacillus Therrmoglucoosidius* KP 1006. *Biochim. Biophys. Acta* 445: 386-397.
- Suzuki, A. & Tanaka, R. (1981). Production of p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside hydrolysing  $\alpha$ -glucosidase by *Bacillus cereus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11: 161-165.
- Suzuki, Y.; Nakamura, N.; Kishigami, T. & Abe, S. (1980). *Bacillus Therrmoglucoosidius*  $\alpha$ -glucosidase. Temperature dependence of activity & stability. *J. Biochem. (Tokio)* 87: 745-751.



- Suzuki, Y.; Aoki, R. & Hayashi, H. (1982). Assignment of a p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside-hydrolysing  $\alpha$ -glucosidase of *Bacillus cereus* ATCC 7064 to an exo-oligo-1,6-glycosidase. *Biochim. Biophys. Acta* 704: 476-483.
- Suzuki, Y. & Chisiro, M. (1983). Production of extracellular thermostable pullulanase by an amylolytic obligately thermophilic soil bacterium, *Bacillus stearothermophilus* KP 1064. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 24-29.
- Suzuki, Y. & Tomura, Y. (1986). Purification and characterization of *Bacillus coagulans* oligo-1,6-glycosidase. *Eur. J. Biochem.* 158: 77-83.
- Suzuki, Y.; Fujii, H.; Uemura, H. & Suzuki, M. (1987a). Purification and characterization of extremely thermostable exo-oligo-1,6-glycosidase from a caldoactive *Bacillus* sp. KP 1228. *Starch* 39: 17-23.
- Svobodová, J. & Svoboda, P. (1988). Membrane fluidity in *Bacillus subtilis*. Physical change and biological adaptation. *Folia Microbiol.* 33: 161-169.
- Svobodová, J.; Julák, J.; Pilar, J. & Svoboda, P. (1988). Membrane fluidity in *Bacillus subtilis*. Validity of homeoviscous adaptation. *Folia Microbiol.* 33: 170-177.
- Takamine, J. (1894). Patente 525, 819-25. E.E.U.U.
- Takasaki, Y. (1976). Productions and utilizations of  $\beta$ -amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*. *Agric. Biol. Chem.* 40: 1515-1522.
- Takasaki, Y. (1985). An amylase producing maltotriose from *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* 49: 1091-1097.
- Takasaki, Y. (1987). Pullulanase-amylase complex enzyme from *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* 51: 9-16.
- Taylor, M.J. & Richardson T. (1979). Application of microbial enzymes in food systems and in Biotechnology. En *Advances in Applied Microbiology*, vol. 25. pp. 7-35. Academic Press. Orlando, E.E.U.U.
- Thirunavukkarasu, M. & Priest, F.G. (1984). Purification and characterization of an extracellular and a cellular  $\alpha$ -glucosidase from *Bacillus licheniformis*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 3135-3141.
- Thorne, C.J.R. (1978). Techniques for determining protein concentration. En *Techniques in protein and enzyme Biochemistry*, B104. pag. 1-18. Elsevier-North Holland Biomedical Press. Amsterdam, Holanda.
- Toda, K.; Takeuchi, T. & Sano H. (1979). Growth rate dependence of enzyme synthesis in chemostat culture:  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -galactosidase, acid phosphatase and  $\beta$ -fructosidase. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 29: 747-755.
- Uozumi, N.; Sakurai, K.; Sasaki, T.; Takekawa, S.; Yamagata, H.; Tsukasgoshi, N. & Udaka, S. (1989). A single gene directs synthesis of a precursor protein with  $\beta$ - and  $\alpha$ -amylase activities in *Bacillus polymyxa*. *J. Bacteriol.* 171: 375-382.
- Urlaub, H. & Wöber, G. (1975a). Identification of isoamylase, a glycogen-debranching enzyme, from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Febs Letters* 57: 1-4.
- Urlaub, H. & Wöber, G. (1975b). Utilization of branched  $\alpha$ -glucans in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biochem. Soc. Trans.* 3: 1076-1078.

- Urlaub, H. & Wöber, G. (1978).  $\alpha$ -glucosidase, a membrane-bound enzyme of  $\alpha$ -glucan metabolism in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biochim. Biophys. Acta* 522: 161-173.
- Vallee, B.L.; Stein, E.A.; Sumerwell W.N. & Fisher, E.H. (1959). Metal content of  $\alpha$ -amylases of various origins. *J. Biol. Chem.* 234: 2901-2905.
- Vehmäänperä, J.; Nybergh, P.M.A.; Tanner, R.; Pohjonen, Bergelin R. & Korhola M. (1987). Industrial production of  $\alpha$ -amylase by genetically engineered *Bacillus*. *Enz. Microb. Technol.* 9: 546-549.
- Volesky, B. & Luong, J.H.T. (1985). Microbial enzymes: production, purification and isolation. *Crit. Rev. in Biotech.* 2: 119-146.
- Wallenfels, K.; Bender, H. & Rached, J.R. (1966). Pullulanase from *Aerobacter aerogenes*, production in a cell-bound state: purification and properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 22: 254-266.
- Wang, L.H. & Hartman, P.A. (1976). Purification and some properties of an extracellular maltase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 108-118.
- Welker, N.E. & Campbell, L.L. (1967a). Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 94: 1124-1130.
- Welker, N.E. & Campbell, L.L. (1967b). Comparison of the  $\alpha$ -amylase *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Bacteriol.* 94: 1131-1135.
- Werner, W.; Rey, H.G. & Wielinger, H. (1970). Properties of a new chromogen for the determination of glucose in blood according of the glucose oxidase-peroxidase method. *Fresenius Zeitung für Analytische Chemie*, 252: 224-228.
- Windish, W.W. & Mhatre N.S. (1965). Microbial amylases. En *Advances in Applied Microbiology*, 7: 273-304. Editado por W.W. Umbreit. Academic Press. Nueva York, E.E.U.U.
- Whistler, R.L. (1984). History and future expectation of starch use. En *Starch: chemistry and technology* (2<sup>o</sup> ed.). pp. 1-9. Editado por R.L. Whistler, J.N. Bemiller y E.F. Paschall. Academic Press. Orlando, E.E.U.U.
- Wouters, J.T.M. & Buyjman, P.J. (1977). Production of some exocellular enzyme by *B. licheniformis* 749/c in chemostat culture. *FEMS Letters* 1: 109-112.
- Yoneda, Y. and Maruo, B. (1975). Mutation of *Bacillus subtilis* causing hyperproduction of  $\alpha$ -amylase and protease and its synergistic effect. *J. Bacteriol.* 124: 48-54.
- Yoshigi, N.; Chiakano, T. & Kamimura, M. (1986). Production of  $\alpha$ -glucosidases I and II from *Bacillus cereus* NY-14. *Agric. Biol. Chem.* 50: 1335-1337.
- Yoo, Y.J.; Cadman, T.W.; Hong, J. & Hatch, R.T. (1988a). Kinetics of  $\alpha$ -amylase synthesis from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnol. Bioeng.* 31: 357-365.
- Yoo, Y.J.; Cadman, T.W.; Hong, J. & Hatch, R.T. (1988b). Fed-batch fermentation for the production of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnol. Bioeng.* 31: 426-432.
- Zajac, P. (1989). Almidón de maíz. Obtención y utilización. Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba.

Zhang, Q.; Tsukagoshi, N.; Shigeyoshi, M. & Udaka, S. (1983)  
Increased production of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of glycine.  
Appl. Environ. Microbiol. 46: 293-295.

## 7.- Abreviaturas

ADN	Acido desoxiribonucleico.
BSA	Albúmina de suero bovino.
CMC	Carboximetilcelulosa.
DHA	Dihidroxiacetona.
EDTA	Acido etilendiamin tetraacético.
EGTA	Acido etilenglicol tetraacético.
F	Fenil-alanina.
PMSF	Floruro de fenilmetilsulfonilo.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TCA	Acido tricloro-acético.
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano.