

TM  
Z5320  
FCB  
1987  
P43

TM  
Z5320  
FCB  
1987  
P43



1020066365

*[Handwritten mark]*



DIRECCION GENERAL DE  
ESTUDIOS DE POS GRADO



TM  
25320  
FCB  
1987  
P43



161759

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



PRODUCCION DE  $\alpha$ -AMILASA A PARTIR DE *Bacillus sp.*

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL  
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA

POR

Q. B. P. BENITO PEREYRA ALFEREZ

COMISION DE TESIS

APROBADA:

DIRECTOR:

M. en C. LUIS J. GALAN WONG.

SECRETARIO:

M. en C. LILIA H. MORALES RAMOS.

VOCAL:

DR. PEDRO A. E. WESCHE EBELING.

DIRECTOR EXTERNO:

M. en C. SERGIO FERNANDEZ D.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Industrial y Suelo. - Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Centro de Graduados del Instituto Tecnológico Regional # 1, Durango, Dgo., y en el Laboratorio de Microbiología y Bioquímica del -- Departamento de Investigación y Desarrollo - de Cervecería Cuauhtémoc, S.A. Monterrey, N.L.



...Y en delante, cuando busque  
un remontísimo ideal,  
cuando persiga un loco ensueño,  
cuando prepare un vuelo audaz,  
si a donde voy se me pregunta  
¡ Yá sé que contestar  
sin medir tiempos ni distancias  
ahí no'más!

José Santos Chocano.

## DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta aquí.

A Margarita y Daniel por ese gran amor que me dan día a día.

A mi Madre por su constante apoyo y ejemplo.

A mi Padre con respeto.

A mis Hermanos Jesús, María Cristina, José, Martha Zoila, Víctor Manuel y Emilio César por su cariño.

A mis abuelos Ventura y Lorenzo (QPD) por ser la raíz del árbol familiar.

A mis tios, Bonifacio, Joaquín, Eustolia, Irene y Lorenzo por su amistad.

A mis familiares políticos y carnales.

A mi Alma Mater por darme cobijo para realizar una de mis metas.

A mis amigos de la SECAL y GALERIA por esa gran amistad que saben dar.

## A G R A D E C I M I E N T O S

Al Q.B.P. M. en C. Luis J. Galán Wong por permitirme trabajar en su laboratorio, así como por su ayuda y amistad desinteresada.

Al Ing. M. en C. Sergio Fernández por su valiosa asesoría y permanente interés a lo largo de la realización de este trabajo.

A mi comisión de tesis, Q.B.P. M. en C. Lilia H. Morales Ramos, - Dr. Pedro A.E. Wesche Ebeling y Q.B.P. M. en C. Jorge M. Saldaña por la revisión y acertadas críticas al escrito.

A los Q.B.P., Gabriel Gallegos, Ricardo Moreno y Carlos Hernández por sus valiosos consejos para realizar algunos experimentos.

Al Dr. Hiram Medrano Roldán por permitirme realizar algunos experimentos en su laboratorio, por su amistad y consejos recibidos durante mi estancia en su laboratorio.

A los estudiantes de la carrera de Q.B.P., Gabriela López Granados, Pablo Velázquez Ortíz y Julio A. Paczka Flores por su valiosa ayuda y agradable compañía en el laboratorio durante la realización de este trabajo.

A Feliciano Molina y Minerva Morales por su gran ayuda como técnicos del laboratorio.

A Anita, secretaria de Graduados, por toda la ayuda recibida durante mi estancia en la maestría.

A Juan Francisco Contreras, Ricardo Gómez, Leonardo Castillo, -- Matty, Hugo, Iracheta, Jaime, Pacorro, Tomate, Yola, Monse y demás integrantes del LABORATORIO por su apreciable compañía.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

## I N D I C E

R E S U M E N . . . . .	1
I N T R O D U C C I O N . . . . .	2
A N T E C E D E N T E S . . . . .	4
M A T E R I A L Y M E T O D O S . . . . .	8
R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N . . . . .	15
C O N C L U S I O N . . . . .	49
L I T E R A T U R A C I T A D A . . . . .	50

R E S U M E N

La  $\alpha$ -amilasa es una enzima de interés industrial, particularmente en la elaboración de cerveza, por tal motivo nos propusimos aislar un microorganismo que produjera esta enzima. Se aisló de suelo una cepa de *Bacillus cereus* que produce  $\alpha$ -amilasa, caso interesante por que la mayoría de estas bacterias producen  $\beta$ -amilasa. Por tanto, la cepa se designó *Bacillus cereus* FCB- -- UANL. Esta enzima fué caracterizada, encontrándose una máxima actividad a 70°C y pH 5-6. Las cinéticas enzimáticas para almidón fueron:  $K_M = 3.12$  mg/ml y  $V_{max} = 3.3$  mg/ml. 5 min. El peso molecular realizado en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio fué estimado en 59 Kd. El tiempo y perfil de hidrólisis -- del almidón confirman que se trata de una  $\alpha$ -amilasa. Las condiciones de cultivo para una óptima producción de la enzima a nivel matráz fueron: pH inicial 5, 40°C, 7% de inóculo y maltosa al 0.2%. En este medio produjo 6.2 mg/ml de azúcar reductor en forma de glucosa. El microorganismo sintetizó la enzima desde la fase de crecimiento exponencial, alcanzándose la máxima acumulación a las 24 h. Cuando se hizo crecer sobre suero de leche, produjo 4.8 mg/ml de azúcar reductor. Se probaron harinas, y de éstas la de soya al 1% resultó ser la mejor. Al utilizar la  $\alpha$ -amilasa en el proceso de maceración y comparando su efecto con una enzima comercial demostró gran potencial económico, porque alcanzó valores muy semejantes a los obtenidos con  $\alpha$ -amilasa comercial, pero con menor cantidad de enzima.

## I N T R O D U C C I O N

Takamine, en 1951, fué el primero en utilizar extractos enzimáticos de origen bacteriano, los cuales consistían de enzimas proteolíticas y amilolíticas de *Bacillus subtilis*, *B. macerans* y *B. polymixa*.( Rose, 1961; Taylor y Richardson, 1979).

El gran consumo de enzimas de origen microbiano, tales como pectinasas, amilasas, celulasas, isomerasas y proteasas ha motivado la búsqueda de nuevos métodos de cultivo y cepas que sobreproduzcan la enzima deseada ó que sintetice una con mejores características catalíticas.( Skimer, 1975; Townshend, 1981).

Entre las enzimas de mayor consumo están las que hidrolizan el almidón, y de ellas la de mayor importancia industrial es la  $\alpha$ -amilasa. Esta enzima es muy requerida por la industria cervecera, papelera, textil, farmacéutica y alimenticia.

Tradicionalmente, la elaboración de cerveza depende de las enzimas de la malta y levadura, pero no existe razón para no adicionar enzimas de otro origen. El tipo de enzima que se utilizaba ( algunas fábricas de cerveza aún lo hacen ) era la de origen fúngico ( Pfisterer, 1974; Woodward, 1978 ), pero la  $\alpha$ -amilasa fúngica se inactiva a temperaturas superiores a 60°C, por tal motivo, hoy en día se prefiere utilizar la de origen bacteriano ( Woodward, 1978 ) ya que, en el proceso de maceración de malta y adjuntos, la temperatura del macerador se encuentra entre 68-72°C, y la  $\alpha$ -amilasa bacteriana es muy termoes

Las principales cepas utilizadas en la producción a nivel industrial de la  $\alpha$ -amilasa son *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus licheniformis* las cuales son capaces de producir grandes cantidades de exoenzimas (Amory, et al, 1987 ).

Por lo anterior, algunos grupos de investigación, siguen buscando cepas nativas que sobreproduzcan la  $\alpha$ -amilasa de manera natural, que utilice sustratos muy baratos y, sobre todo, que la enzima sea secretada en grandes cantidades y con alta actividad específica.

Por lo antes expuesto, nos hemos planteado como objetivo lo siguiente:

Aislar una cepa de *Bacillus sp.*, que produzca una  $\alpha$ -amilasa altamente eficiente en el proceso de maceración.

Hipótesis: Es posible aislar una cepa de *Bacillus sp.* que produzca una  $\alpha$ -amilasa con mayor actividad que las comerciales.

Importancia: Las enzimas amilolíticas de origen bacteriano, representan un extraordinario potencial económico en la industria cervecera, textil y papelera, así como en la farmacéutica y alimenticia.

## A N T E C E D E N T E S

Van Lanen y Le Mense en 1946, reemplazaron la malta por licores de ciertas cepas de *Aspergillus niger*. Dichos investigadores indicaron que se podría obtener un apreciable ahorro en las destilerías si se utilizara la  $\alpha$ -amilasa fúngica en la producción de cerveza y etanol.

Posteriormente, en 1951, Julian Corman y H.M. Tsuchiva utilizaron dos cepas de *Aspergillus sp.* para producir etanol a partir de cebada macerada, e iniciaron estudios acerca de las condiciones de fermentación de los cultivos mixtos, y encontraron que era necesario una buena relación entre la cantidad de almidón,  $\alpha$ -amilasa y maltasa para obtener buenos resultados. Los inóculos utilizados fueron de 3.2% de *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-567 y demostraron una correlación positiva entre la cantidad de maltasa y alcohol.

En 1963, Welker y Campbell publicaron un estudio acerca de la síntesis "de novo" de  $\alpha$ -amilasa a partir de *Bacillus - - - stearothermophilus* y encontraron que el pH óptimo de síntesis fué de 6.7. Además, observaron que la glucosa ( $2 \times 10^{-3} M$ ), sacarosa ( $10^{-3} M$ ) ó glicerol ( $4 \times 10^{-3} M$ ) no estimularon la producción de la enzima. En ese mismo año encontraron, Welker y Campbell, que la cepa *B. stearothermophilus* 1503-4 es parcialmente constitutiva, ya que ciertos oligosacaridos (maltosa, maltotriosa, maltohexosa, maltopentosa y maltotetrosa) estimularon la producción de  $\alpha$ -amilasa en un medio químicamente definido. Posteriormente, Yamaguchi, et al (1974), estudiando el control genético de la producción de la  $\alpha$ -amilasa en *B. subtilis*, lograron incrementar cinco veces la síntesis debido a la introducción del gene amy R de *B. subtilis* Natto 1212 en la cepa de *B. subtilis* Marburg. Los estudios de Yamaguchi, et al fueron tomados por Yoneda, et al (1974) para intentar obtener una cepa de *B. subtilis* que fuese sobreproductora de  $\alpha$ -amilasa. Así, obteniendo DNA de *B. subtilis* var *amylosacchariticus*, encontraron que el DNA de éste tenía casi la misma capacidad para transformar a la cepa Marburg; alcanzando una productividad alrede-



dor de 50 U/mg de células. Los análisis genéticos, revelaron -- que el gene regulador ( amy R ) era el mismo para la cepa de -- *B subtilis* Marburg y *amylosacchariticus*. No obstante, sus resul<sup>u</sup>tados sugieren la presencia de otro gene que está involucrado en la producción de la  $\alpha$ -amilasa.

Los elementos genéticos y bioquímicos que gobiernan la sín<sup>u</sup>tesis y producción de la enzima, empiezan a tener gran auge en 1975 cuando Gould May y Elliot encontraron que - - - - - -- *B. amyloliquefaciens* es capaz de secretar cantidades significan<sup>u</sup>tes de  $\alpha$ -amilasa y proteasa durante 15 min en completa ausencia de síntesis de proteína. Esto significa, aparentemente, que la enzima ya preformada tarda ese período de tiempo en ser excreta<sup>u</sup>da. La liberación de la enzima fué independiente de la energía pero sensible a temperatura. Sekeguchi, et al observaron que -- uno de los genes que afecta la producción de la enzima está localizado después de amy B, y que cuando este gene se encuentra presente, se pierde un componente proteínico de membrana celu<sup>u</sup>lar. En 1975, Saito y Yamamoto estudiaron los factores que regu<sup>u</sup>lan la producción de  $\alpha$ -amilasa en *B. licheniformis*, sus resulta<sup>u</sup>dos revelan que la maltotriosa es un buen inductor de la  $\alpha$ -ami<sup>u</sup>lasa, ya que se obtuvieron 356 U/0.25 ml de medio y solo 192 -- U/0.25 ml cuando se usó almidón soluble.

La utilización de  $\alpha$ -amilasa microbiana en la industria cer<sup>u</sup>vecera, se inició cuando se incrementó la cantidad de almidón - ( adjuntos ) en el macerado. Este exceso de almidón provoca un incremento de glucosa y maltosa, los cuales serán fermentados - para producir etanol. La  $\alpha$ -amilasa más requerida por las fáabri<sup>u</sup>cas de cerveza es de origen bacteriano, ya que las fúngicas se inactivan a 60°C ( Woodward, 1978 ). Un año antes, se reportó - que el consumo de cerveza ligera " light " se había hecho muy - popular en los Estados Unidos de Norteamérica. La elaboración de esta cerveza se realiza utilizando  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosi<sup>u</sup>dasa provenientes de fuentes microbianas ( Owader y Bierman, -- 1977 ). En este proceso se adicionan los dos tipos de enzima al macerador y el almidón es digerido completamente hasta glucosa, por tanto, la levadura transforma el azúcar a etanol y no que--

dan fracciones de dextrinas, como cuando solo se usa  $\alpha$ -amilasa ( Prescott, 1962; Casida, 1968; Pfisterer, 1974; Narziss, 1976; Fogarty, 1983; Stewart, 1985 ).

En 1977, Glymph y Stutsenberger realizaron un trabajo acerca de la producción, purificación y caracterización de  $\alpha$ -amilasa de *Thermomonospora curvata* y encontraron que la máxima producción de la enzima, en medios a base de sales minerales y almidón ocurrió a pH 7.5 y 53°C. El pH y temperatura óptimos para la actividad de la enzima pura fué de 5.5 a 6 y 65°C. El peso molecular de 62 Kd y la  $K_M$  para almidón fué de 0.39 mg/ml.

Los requerimientos de *Thermomonospora curvata* para la producción de  $\alpha$ -amilasa son muy diferentes a los de *T. viridis* y *T. vulgaris*, estos últimos requieren de una compleja fuente de nitrógeno, como peptona, mientras que *T. curvata* produce grandes cantidades de la enzima en medios químicamente definidos. En ese mismo año, Yabuki, et al estudiaron la rápida inducción de la  $\alpha$ -amilasa en *Aspergillus oryzae*. El micelio fué preparado de un cultivo de 20 h. Durante una hora de inducción, la formación de la  $\alpha$ -amilasa intra y extracelular, ocurrió casi a la misma concentración ( 70-80  $\mu$ g/g cel. h ) sin detectar el período lag. Después de una hora de inducción, hubo un marcado incremento en la concentración extracelular y alcanzó una máxima de 300  $\mu$ g/g cel. h. Lo anterior fué realizado con la finalidad de disminuir tiempos de producción, los cuales son de 18-24 h.

Posteriormente Ghosh y Chandra ( 1980 ), reportaron un trabajo sobre la producción de una  $\alpha$ -amilasa termoestable producida por *Bacillus apiarius* CBML 152. Aislaron, aproximadamente, 200 cepas de bacilos amilolíticos a partir de aguas de deshecho y la selección se realizó en base a termoestabilidad y actividad de la enzima. Con *B. apiarius* CBML 152, la máxima producción se realizó a 38°C y pH 6.4 - 7.5. La enzima, parcialmente pura, tuvo su actividad óptima a 60°C y pH 6-7.

Los compuestos que podían influir en la producción de la enzima, fué uno de los objetivos alcanzados por Krishnan y Chan

dra en 1982, quienes probaron el efecto del aceite de diversas semillas sobre la producción de  $\alpha$ -amilasa por *S. licheniformis* CUMC 305. Ellos probaron el aceite de 8 semillas, entre ellas, nuez, mostaza y algodón. El máximo incremento en la producción ocurrió con aceite de nuez entre 0.5-1%.

En ese mismo año, Jeffrey Wilson y Michael Ingledew aislaron y caracterizaron una enzima amilolítica de *Schwanniomyces alluvius* para la producción industrial de etanol a partir de almidón. La  $\alpha$ -amilasa presentó su máxima actividad a pH 6.3 y estabilidad entre 4.5-7.5,  $K_M=0.364$  mg/ml.

De las levaduras productoras de etanol a partir de almidón las más sobresalientes son *Saccharomycopsis fibuligera* S. - - *alluvius*, ésta última produce el 70% de lo calculado cuando crece en almidón al 2%.

Krishnan y Chandra (1983) caracterizaron la  $\alpha$ -amilasa de *S. licheniformis* CUMC 305 la cual fué purificada 212 veces. La enzima presentó una actividad máxima a 90°C y pH 9, a 100°C perdió 9% de su actividad. También probaron el efecto de diversos cationes sobre la actividad de la enzima,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ , la estimularon, mientras que  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Al}^{+3}$  la inhibieron, pero en 1984, Obi y Odibo aislaron una amilasa a partir de un actinomiceto, la cual no es inhibida por  $\text{Mn}^{+2}$  pero sí por  $\text{Hg}^{+2}$ .

La maltosa fué el único producto detectable de la acción de la enzima sobre el almidón, lo cual sugiere que se trata de una  $\beta$ -amilasa.

## MATERIAL Y METODOS

### 1.- AISLAMIENTO DE BACILOS AMILOLITICOS:

Se tomaron muestras de suelo, 1 g, y se realizaron diluciones sucesivas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ), se tomó 1 ml y se inoculó en cajas petri con agar almidón, el cual contiene (%):  $K_2HPO_4$ , 0.3;  $KH_2PO_4$ , 0.1; caldo nutritivo, 0.8; extracto de levadura, 0.3 y almidón soluble, 0.2. Las cajas se incubaron 24 h a 40°C. A las cajas que contenían entre 20 y 80 colonias y que presentaran halos de hidrólisis, se les realizó una réplica en placa en agar nutritivo con almidón soluble al 0.2%, se incubaron 24 h a 40°C y se les adicionó yodo ( $I_2$  al 0.3% y KI al 3%).

Las colonias que presentaron el mayor halo café se sembraron en agar Muller-Hinton, conservándose en refrigeración a 4°C.

### 2.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA ( SACAROLITICA )

Los microorganismos seleccionados, se inocularon en matraces de 250 ml con 50 ml de caldo nutritivo, sales de fosfato y almidón soluble. Se incubaron en un agitador oscilatorio a 200 rpm durante 24 h a 40°C y pH 6. Las células fueron removidas por centrifugación y al sobrenadante se le determinó la actividad sacarolítica a diferentes pH's (4-9) y temperatura (65-90). La actividad enzimática se midió por el método del ácido 3,5 dinitrosalisílico. Para tal caso se tomó el criterio de que 1 U de actividad es la cantidad de enzima que produce 1 mg de azúcar reductor en forma de glucosa en 10 minutos a una temperatura y pH determinado. En la tabla 1, se muestra la forma de preparar las muestras y testigos para cuantificar las unidades de actividad enzimática (Chandra, 1980).

### 3.- PURIFICACION DE LA ENZIMA:

El extracto libre de células, se llevó a 90% de saturación con  $(NH_4)_2SO_4$  a 4°C. El precipitado se centrifugó durante 10 minutos a 2000 rpm y se dializó durante la noche contra agua bi

T A B L A 1

Determinación de la actividad enzimática.

	Ext. Crudo (ml)	Almidón (ml)	Buffer (ml)	Agua (ml)	3,5-DNS (ml)
Muestra	0.2	0.5	0.3	--	1
Testigo*	0.2	---	---	0.8	1
Blanco*	---	---	---	1	1

1º Las muestras se incuban en baño de agua a 70°C por 10 min.

2º Agregar 1 ml de 3,5-DNS. Agitar en vortex.

3º Colocarlos en baño de agua hirviendo por 5 min.

4º Pasar a baño de hielo y agregar 2 ml de agua destilada

5º Leer a  $\lambda_{550}$  nm.

\* Se procesan a partir del paso 3.

destilada a 4°C con 2 cambios. La determinación de proteína se realizó por el método de Lowry ( Lowry, et al, 1951 ).

El dializado se utilizó para la prueba de la influencia de iones sobre la actividad enzimática.

#### 4.- INFLUENCIA DE IONES, DETERMINACION DE $K_M$ Y PESO MOLECULAR.

La actividad mostrada en el dializado se consideró como el 100%, entonces se adicionaron los iones a la mezcla de buffer (acetatos 0.2 M, pH 5) y almidón en las siguientes concentraciones.  $CaCl_2$ ,  $FeCl_3$ , NaCl y KCl a 1 mM/ml y  $ZnSO_4$ ,  $BaCl_2$ ,  $CoCl_2$  y  $MnCl_2$  a 10 mM/ml. Las condiciones de ensayo fueron: temperatura, 70°C por 10 minutos y pH 5 (tabla 1).

La  $K_M$  se determinó por el método de Lineweaver-Burk (Lehninger, 1984 ) usando almidón soluble.

La determinación del peso molecular se realizó por electroforésis en geles de poliacrilamida al 11% con dodecilsulfato de sodio por el método de Laemmli. (Smith, 1984). Los estándares de peso molecular utilizados son:  $\alpha$ -lactalbumina de leche bovina, tripsinogeno de páncreas bovino, anhidrasa carbonica, deshidrogenasa gliceraldehido-3-fosfato, albumina de huevo y albumina bovina.

#### 5.- DETERMINACION DEL VALOR AZUL Y PATRON DE HIDROLISIS DE LA AMILASA SOBRE EL ALMIDON.

El valor azul se realizó colocando iguales cantidades de almidón de papa ( Sigma ) al 5% y enzima ( 6 ml ) y se incubaron a 70°C. A intervalos de 2 min se tomó una muestra de 1 ml. A esta cantidad se le adicionó 1 ml de la solución de yodo (0.2 g/l de  $I_2$  y 0.2 g/l de KI) y el volumen se llevó a 10 ml con agua destilada. La absorbancia fué medida a 600 nm en un espectrofotómetro Coleman Junior II, modelo 6/20 (Obi y Odibo, 1984).

Para conocer los productos de la hidrólisis del almidón por la enzima de nuestra cepa, se procedió a colocar en el tubo de ensayo de actividad, el buffer y almidón soluble más la enzi

ma, una vez transcurrido el tiempo necesario, 10 min, se inyectó una muestra de 1 ml al HPLC ( Beckman ), se utilizó agua destilada como eluente, flujo = 0.6 ml/min, temperatura de la columna = 90°C, columna de spherogel carbohidrate X 7.5 de 7.5 mm de diámetro y 30 cm de largo, detector de índice de refracción - - Altex, modelo 156, integrador Varian, modelo 4270.

Se utilizó manitol como control interno.

#### 6.- PRODUCCION DE LA ENZIMA:

Para optimizar al máximo la producción de la enzima, se determinaron los diferentes parámetros físico-químicos y nutricionales que podrían afectar la síntesis de ésta.

Se partió de un medio basal (MB) el cual contenía lo siguiente (%); caldo nutritivo, 0.8; extracto de levadura, 0.3; almidón soluble, 0.2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.3, para conocer el % de inóculo, pH, temperatura y concentración de almidón.

Para la determinación del % de inóculo, del cultivo patrón se tomó una asada y se sembró en un tubo con agar Muller-Hinton, se incubó 24 h a 40°C; de éste tubo se transfirió una asada a otro que contenía 10 ml del medio MB y se incubó a 40°C durante 18 h. El paquete celular se lavó dos veces a 2000 rpm, 10 min con agua destilada estéril y se resuspendió en 5 ml de agua destilada estéril ( ó hasta alcanzar una densidad celular de  $3 \times 10^6$  células/ml ). Los % de inóculo se variaron de 1 a 10.

Los anteriores experimentos, fueron conducidos en matraces de 250 ml con 50 ml del medio MB, pH inicial 5, 40°C y 200 rpm durante 24 h, Las células se eliminaron por centrifugación y al sobrenadante, se le realizaron las pruebas de actividad por el método ya descrito.

Una vez conocido el % de inóculo, se determinó el pH inicial. El medio MB se ajustó con NaOH ó HCl 1N, según se requiriera, La fermentación se realizó bajo las mismas condiciones que la anterior. Los pH's probados fueron 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

Para conocer la influencia de la temperatura sobre la síntesis de la enzima, los matraces se colocaron a 35, 40, 50 y 60°C. Las condiciones de fermentación fueron: 7% de inóculo, pH 5 y 200 rpm durante 24 h.

Por lo que respecta a la concentración de almidón, la concentración de éste varió de 0.2 a 5% en condiciones optimizadas.

El crecimiento se monitoreó midiendo la densidad óptica en un fotocolorímetro Klett-Summerson con filtro rojo.

El efecto de las diferentes fuentes de carbono se estudió sustituyendo el almidón del MB por los carbohidratos. Se probaron (%) glucosa, 0.5; 0.15 y 1; lactosa, 0.2 y 1; maltosa, 0.2, 0.5, y 1; dextrinas, 0.2; galactosa, 0.5; melazas, 0.5 y 1. La fermentación se realizó con los parámetros optimizados y se monitoreó crecimiento, azúcares reductores y actividad enzimática.

Se probaron, también, diferentes concentraciones y tipos de harinas, las cuales fueron: harina de maíz, arroz, soya, trigo, y harina de semilla de algodón al 1, 2 y 3%. Del medio basal, solo se agregaron las sales de fosfato. Las condiciones de cultivo fueron las optimizadas.

El último sustrato probado fue el suero de leche al 1 y 3% mas las sales de fosfato, bajo las mismas condiciones de cultivo.

## 7.- INFLUENCIA DE LA ENZIMA SOBRE EL MACERADO:

Se preparó una mezcla de cebada; malta en relación 31.2: 16.5 g, y se sometieron a maceración por el método de infusión, figura 1 ( Prescott; 1962; Woodward, 1978 ).

Los granos molidos se colocaron en vasos de precipitado de 1 lt con un volumen de operación de 300 ml y se le agregaron 30.7 ml de extracto crudo, de *B cereus*, otro con  $\alpha$ -amilasa comercial y un tercero con agua destilada.



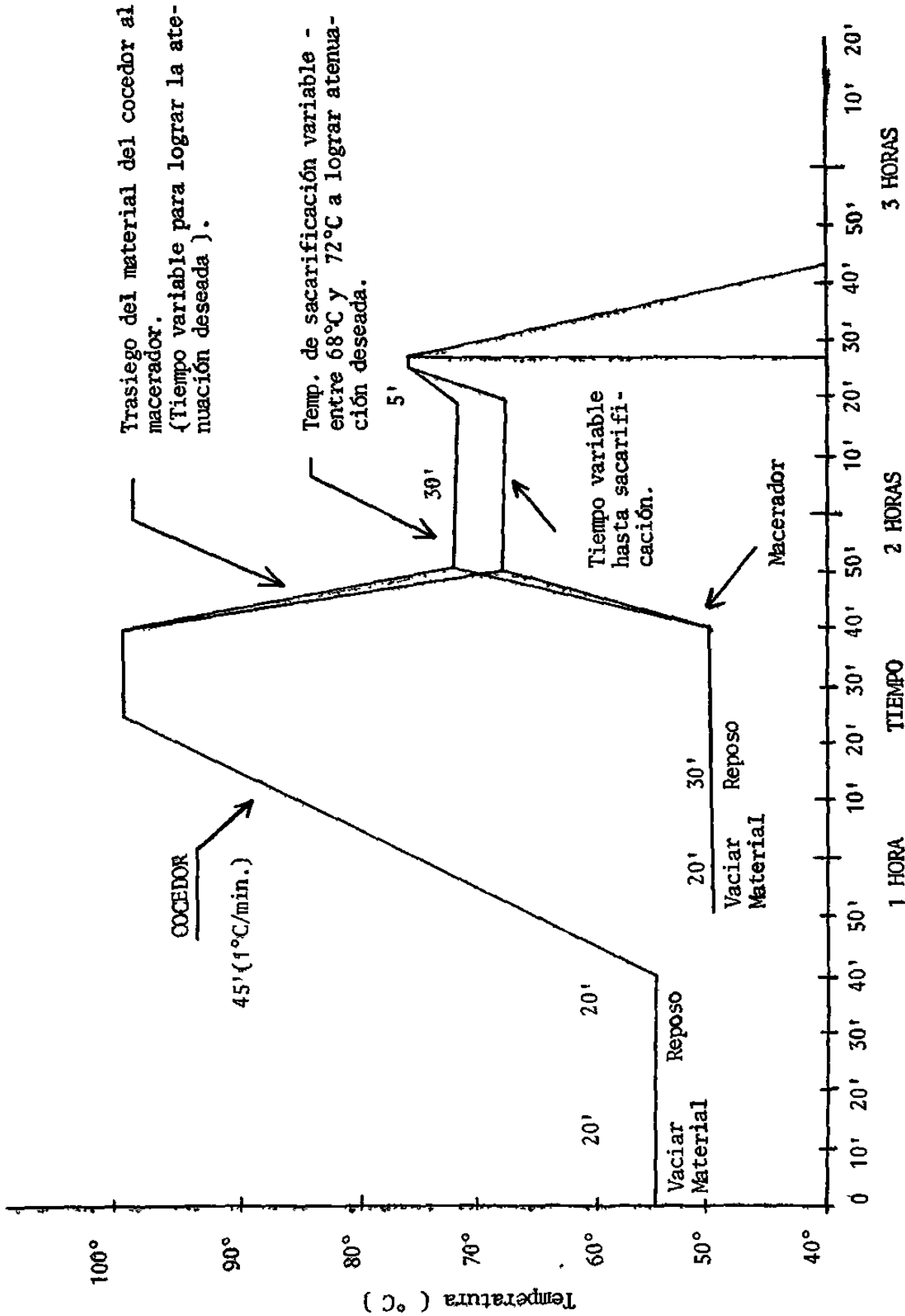


Figura 1.- Proceso de maceración realizado para probar la  $\alpha$ -amilasa de *B. cereus* FCB-UANL y la  $\alpha$ -amilasa comercial.

Al finalizar el tiempo requerido para la desaparición del color azul producido por la unión del almidón y el lugol, se midió la concentración de azúcares reductores en forma de glucosa, así como el tiempo necesario para la desaparición del color azul.

Todos los parámetros de cinéticas enzimáticas se compararon con una  $\alpha$ -amilasa comercial. Los azúcares producidos por las enzimas y el testigo se determinaron por medio de la cromatografía líquido-líquido de alta resolución en las condiciones descritas en el punto 5.

## RESULTADOS Y DISCUSION

I.- Aislamiento de la cepa y determinación del pH y temperatura de máxima actividad enzimática. Se lograron aislar 12 cepas de bacilos de diferentes sustratos, a los cuales se les determinó efecto de temperatura y pH de máxima actividad sa carolítica, y en base a ello se seleccionó la cepa C6, la cual posee su máxima actividad a 70°C y pH de 5 a 6 ( figura 2 ). Estos resultados sugieren que se trata de una  $\alpha$ -amilasa, porque la  $\beta$ -amilasa posee su máxima actividad entre 40 y 60°C ( 13, 19, 21, 41, 42 ).

De las  $\alpha$ -amilasas producidas por organismos del género *Bacillus* destacan *B. licheniformis* CUMC 305, *B. licheniformis* NCYB 6346, las cuales poseen su máxima actividad a 90°C ( 23, 27 ).

Comparándose la termoestabilidad de la  $\alpha$ -amilasa de la C6, con la *B. licheniformis* resulta ser menor la nuestra en 20°C, pero es muy similar, y en algunos casos mejor que la producida por organismos mesofílicos, tales como *B. apiarius* CBML 152 y *B. subtilis* NRRL B 3411 que producen una  $\alpha$ -amilasa que alcanza su máxima actividad a 60°C ( 13, 15 ).

El pH óptimo de la mayoría de la  $\alpha$ -amilasa es ácido 6 cercano a la neutralidad y las activas bajo condiciones alcalinas, son inestables a temperaturas superiores a 50°C (22). Nuevamente, el pH óptimo es comparable con la amilasa de *B. apiarius* CBML y *B. subtilis* NRRL B 4311. Los dos anteriores parámetros han sido comparados con la amilasa producida por organismos del género *Bacillus*, pero algunos actinomicetos del género *Thermomonospora* y *Actinomyces* producen una  $\alpha$ -amilasa que posee máxima actividad entre 60 y 65°C ( 16, 30, 48, 52 ) y solo la producida por una cepa de *Thermoactinomyces vulgaris* tiene su actividad óptima a 70°C y pH 5 ( 41 ). De los actinomicetos, solo este último se compara en termoestabilidad y pH con la cepa C6.

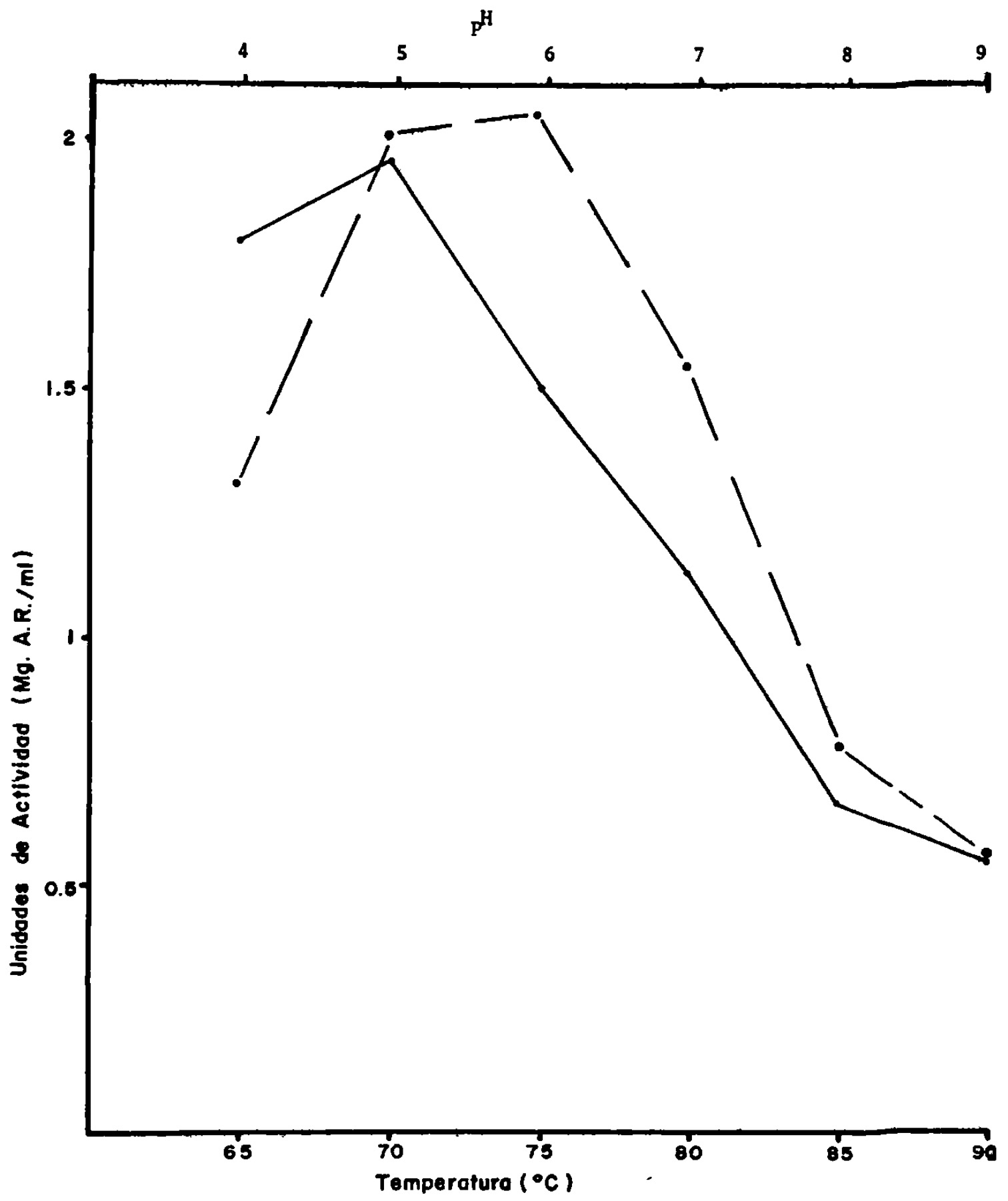


Figura 2.- Efecto de temperatura y pH sobre la actividad de la amilasa de la cepa C6 a pH 5. ● — ●, temperatura; ● - - - ●, pH.

II.- Identificación de la cepa, determinación del valor azul,  $K_M$  y efecto de sales sobre la actividad enzimática.

Una vez seleccionada la cepa C6, se procedió a identificarla, la cual resultó ser *Bacillus cereus* ( Tabla 2 ). Este resultado difiere a lo reportado por varios autores, quienes mencionan que *B. cereus* produce  $\beta$  y no  $\alpha$ -amilasa ( 13, 42, 43 ), por lo cual se procedió a determinar el tiempo requerido para eliminar el color azul producido por la unión del almidón con el yodín.

La figura 3 muestra el tiempo requerido para la desaparición del complejo azul, realizado por nuestra enzima y la  $\alpha$ -amilasa de *B. apíarius* CBML 152 ( 15 ).

Como se puede observar, los patrones de pérdida de color son similares, por lo que se presume que realmente se trata de una  $\alpha$ -amilasa, porque la  $\beta$ -amilasa no puede pasar los enlaces  $\alpha$  1-6 y el límite dextrina es muy alto, por tanto, el tiempo de desaparición del color azul es mas largo ( 13 ).

Para comprobar lo anterior, se realizaron los patrones de hidrólisis del almidón por nuestra enzima, la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* ( Sigma ) y  $\alpha$ -amilasa comercial. Los resultados por HPLC ( figura 4 ) muestran que los productos de hidrólisis son los mismos y solo cambia la concentración de cada compuesto. Así, tenemos que la figura 4 A representa nuestra enzima y los principales productos de hidrólisis son glucosa y maltosa, éstos también lo son para la  $\alpha$ -amilasa Sigma y comercial, figuras 4B y 4C.

Con lo anterior, se comprueba que realmente se trata de una  $\alpha$ -amilasa, y nuestra cepa se designó *Bacillus cereus* FCB-UANL.

A la enzima parcialmente purificada se le determinó la  $K_M$  - figura 5, y se observa que la  $K_M$  para almidón es mayor a lo reportado para la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* CUMC 305, -

TABLA 2

Identificación de la cepa C6. El patrón bioquímico se compara con *Bacillus cereus*.

MORFOLOGÍA COLONIAL	COLONIAS BRILLANTES, CREMOSAS, - AMARILLAS, CONVEXAS, BORDES RE- DONDOS.	
MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	BACILOS CORTOS, GRAM POSITIVOS - DELGADOS, ESPORAS OVALADAS, CEN- TRALES, BIPOLARES.	
<u>PATRÓN BIOQUÍMICO</u>	<u>FCB-UANL</u>	<u>PATRÓN*</u>
CRECIMIENTO EN ANAEROBIOSIS	+	+
CATALASA	+	+
MOVILIDAD	+	+
REDUCCIÓN DE NITRATOS	+	+
HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN	+	+
HIDRÓLISIS DE LA LECITINA	+	+
REACCIÓN DE ACETIL-METIL-CARBINOL	+	+
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO DE MANITOL		B
PRODUCCIÓN DE UREASA	- A +	±
UTILIZACIÓN DE CITRATO	-	±
CRECIMIENTO EN:		
PAPA ( ALMIDON )	+	+
CALDO NaCl 5%	+	+
GLUCOSA	+	+
TEMPERATURA 40°C	+	+
TEMPERATURA 50°C	-	-
p <sup>H</sup> 6	RICO	RICO

\* MANUAL BERGEY (BUCHANAN Y GIBSON, 1974)

A = DÉBIL

B = NO REPORTADA

± = VARIABLE

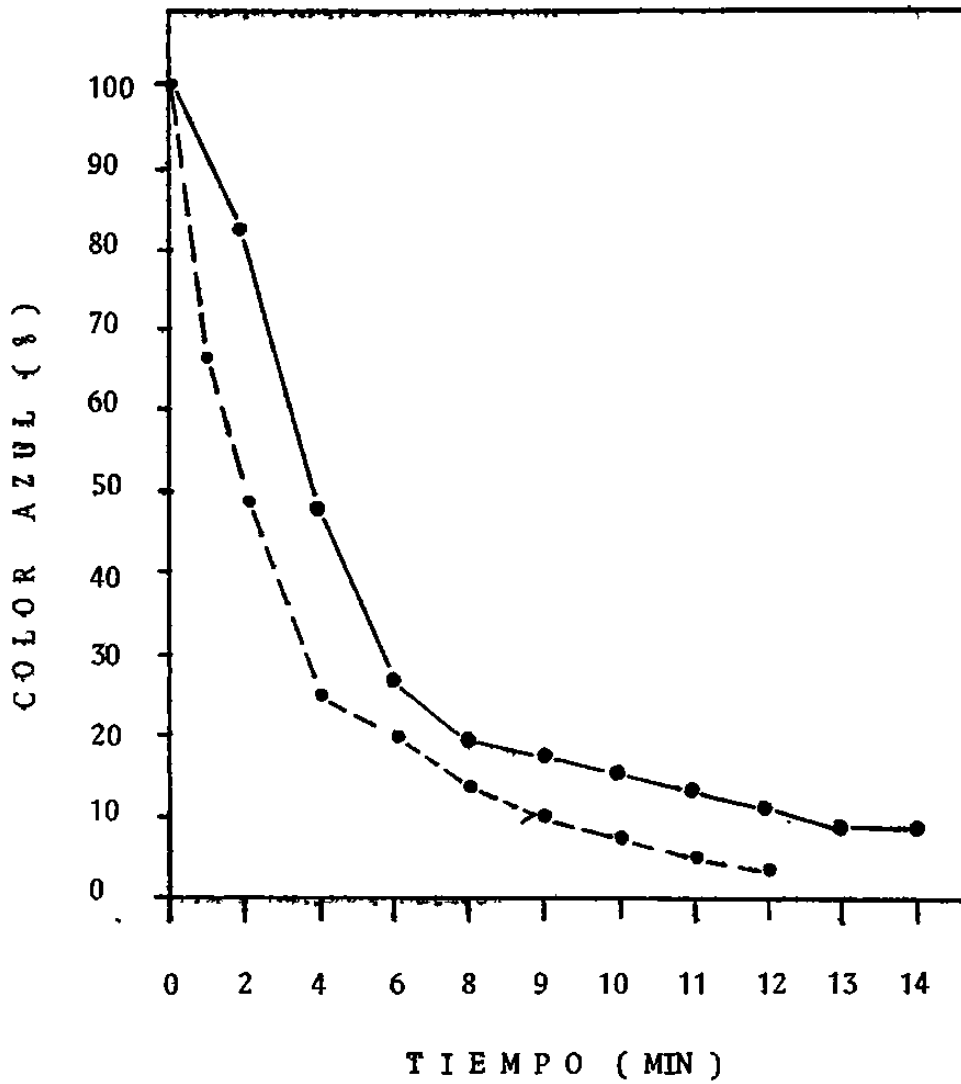


Figura 3.- Determinación del tiempo para desaparición del color azul. ● — ●, amilasa *B. cereus* FCB-UANL; - ● - - - ●,  $\alpha$ -amilasa *B. apiarius* CBML 152 (15).

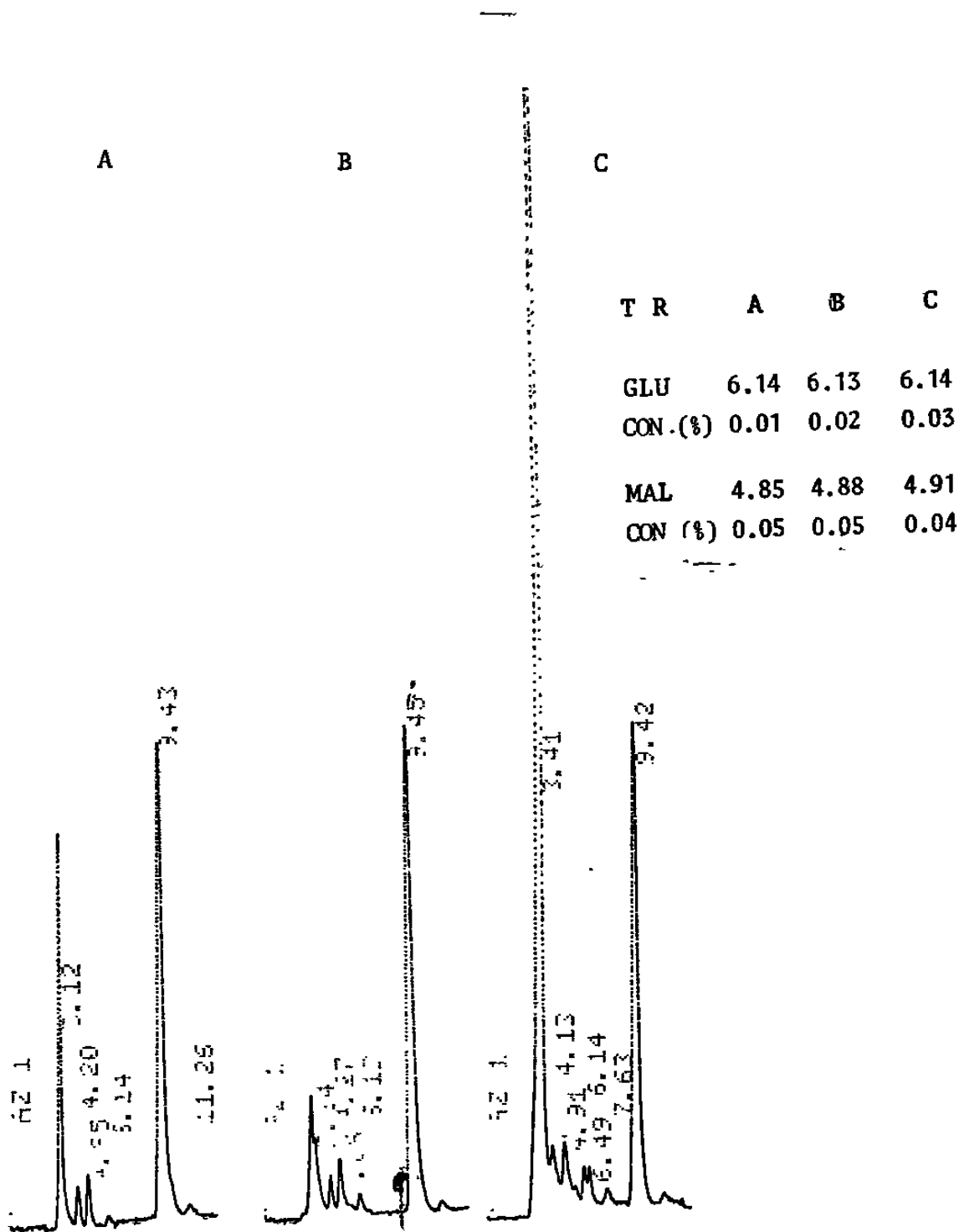


Figura 4.- Patrón de hidrólisis del almidón por enzimas amilo-  
liticas. A, amilasa de *B. cereus* FCB-UANL; B,  $\alpha$ -ami-  
lasa comercial; C,  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*.



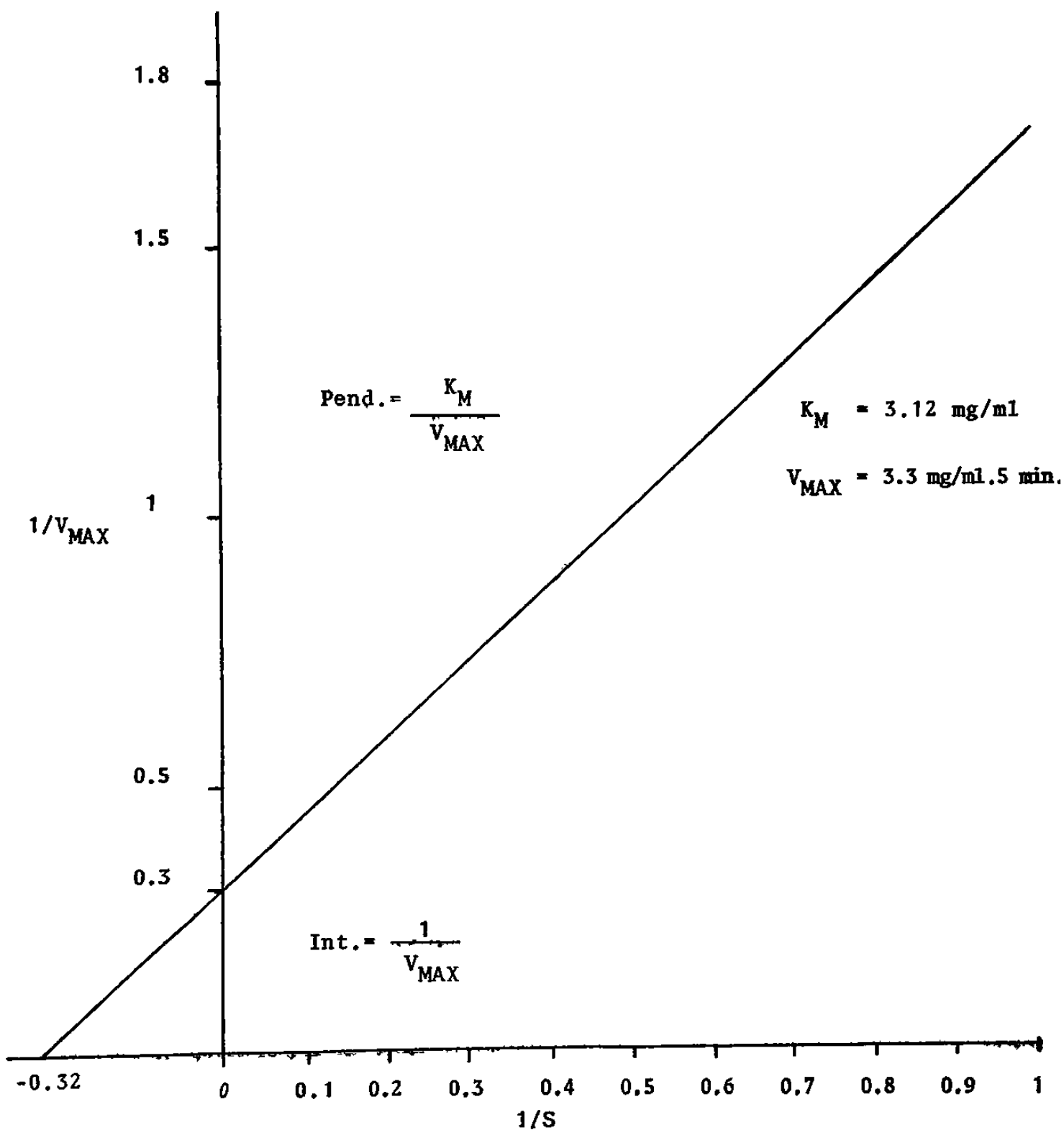


Figura 5.- Determinación de la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) por el método de Lineweaver-Burk para almidón usando  $\alpha$ -amilasa parcialmente purificada. El valor de S esta expresado en mg y V en mg de azúcar reductor/ml. 5', bajo las condiciones de ensayo.

TABLA 3

Efecto de iones sobre la actividad de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus cereus* FCB-UANL.

SAL*	ACTIVIDAD ENZIMATICA ( U / ML )	%**
Control	2.55	100
MgCl <sub>2</sub>	3.10	121
NaCl	3.05	120
CaCl <sub>2</sub>	2.90	114
KCl	2.85	111
BaCl <sub>2</sub>	2.32	91
ZnSO <sub>4</sub>	2.30	90
FeCl <sub>3</sub>	2.10	80
CoCl <sub>2</sub>	2.07	78.5
CuSO <sub>4</sub>	2.00	78
MnCl <sub>2</sub>	2.50	97

\* A la concentración mencionada en material y métodos.

\*\* Actividad con respecto al control.

la cual posee un valor de 1.274 mg/ml ( 23 ), a la producida por *Thermomonospora curvata*, 0.39 mg/ml (16) y a la de *Schwanniomyces auvius*, 0.364 mg/ml (54).

El extracto crudo se dializó y determinó el efecto de algunas sales sobre la actividad de la  $\alpha$ -amilasa. En la tabla 3, se muestran los resultados y se observa que el  $Mg^{+2}$ ,  $Na^{+}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $K^{+}$  estimulan favorablemente la actividad de la enzima. Sin embargo, el  $Ba^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Mn^{+2}$  muestran efecto inhibitorio. Los resultados anteriores se asemejan a los de Krishnan y Chandra para la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* ( 23 ), pero difiere, en gran medida, a los reportados por Obi y Odibo para la  $\beta$ -amilasa de *Thermoactinomyces sp*, donde la amilasa es altamente estimulada por  $Mn^{+2}$ ,  $Ba^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Fe^{+2}$  ( 30 ).

### III.- Purificación y peso molecular.

Los pasos de purificación, así como los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4. Cuando el dializado, 2 ml, se hizo pasar a través de la columna de 10 x 1.5 cm, empacada con sephadex G100, se recuperaron 10 fracciones de 3 ml de las cuales solo las fracciones 3 y 4 poseían actividad. El dializado y fracciones 3 y 4 se liofilizaron y se realizó su determinación de peso molecular ( figura 6 ) donde se observa que la  $\alpha$ -amilasa de *B. cereus* FCB-UANL, tiene un peso molecular de 59 Kd, el cual es el mismo para la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* ( Sigma ) y difieren al de la  $\alpha$ -amilasa comercial.

Este resultado es acorde con lo reportado por Fogarty para la mayoría de las  $\alpha$ -amilasas microbianas, el peso molecular es del orden de 50 Kd, con excepción de *B. subtilis* que forma dímeros con zinc (13), pero difiere a lo reportado por Krishnan (23) para la  $\alpha$ -amilasa producida por *B. licheniformis* CUMC 305 y por Morgan (28) para *B. licheniformis* NCIB 6646, cuyo peso es 28 y 62.65 Kd, respectivamente.

Las variaciones de peso molecular de la  $\alpha$ -amilasa dentro de

TABLA 4

Actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa producida por *Bacillus cereus* FCB-UANL.

	Actividad (U/ml)	Proteína ( ug/ml )	Act. esp. (U/mg prot)	Purif.
Extracto crudo	3.1	991.5	3.1	1
Dializado	2.4	481	4.95	1.6
Columna (Sephadex G 100 )	2.3	270.24	8.47	2.73
$\alpha$ -amilasa (Sigma) <sup>a</sup>	29.75	9073	3.28	
$\alpha$ -amilasa (Comercial) <sup>a</sup>	19.5	5900	3.31	

a = Bajo nuestras condiciones de ensayo.

la misma especie se dá también en *B. stearothermophilus*, la cepa 503-4 y la 1, 503-4 pesan 15.6 y 52.7 Kd, respectivamente (13).

#### IV.- Producción de la $\alpha$ -amilasa.

Se ha demostrado que diversas condiciones del medio de cultivo pueden afectar el crecimiento y síntesis de algunos metabolitos, entre ellos la  $\alpha$ -amilasa termoestable, toxinas y proteasas producidas por el genero *Bacillus* (10, 34, 38).

La producción de la  $\alpha$ -amilasa difiere en pH, temperatura, % de inóculo, etc., depende de la especie que se trate, y el obtener la máxima producción de una enzima es necesario conocer los parámetros físico-químicos y nutricionales que pueden influir sobre la producción de la exoenzima (10).

Efecto de Temperatura y pH sobre la producción de la  $\alpha$ -amilasa.

La fermentación se realizó a varias temperaturas durante 24 h a pH 5, y se observó que a 35°C hay buen crecimiento, pero no buena producción de la enzima. La máxima producción enzimática ocurrió a 40°C, y el crecimiento bacteriano fue más abundante que a 35°C, pero conforme se incrementó la temperatura a 50 y 60°C la densidad celular y la enzima presente en el medio disminuyó considerablemente. (figura 7).

El pH inicial fue ajustado con HCl ó NaOH 0.1 N según fue necesario. Las fermentaciones se realizaron a 40°C a diferentes pH. La figura 8 muestra el efecto del pH inicial y se observa que *B. cereus* FCB-UANL es capaz de producir la enzima en amplio rango de pH, teniendo muy poca variación de pH 4 a 8.

Los resultados encontrados varían poco a los reportados por Ghosh y Chandra (15) para un bacilo masofílico. Estos investigadores reportan que *B. apiaris* produce la enzima en un rango de 5 a 8, pero no a pH 4.

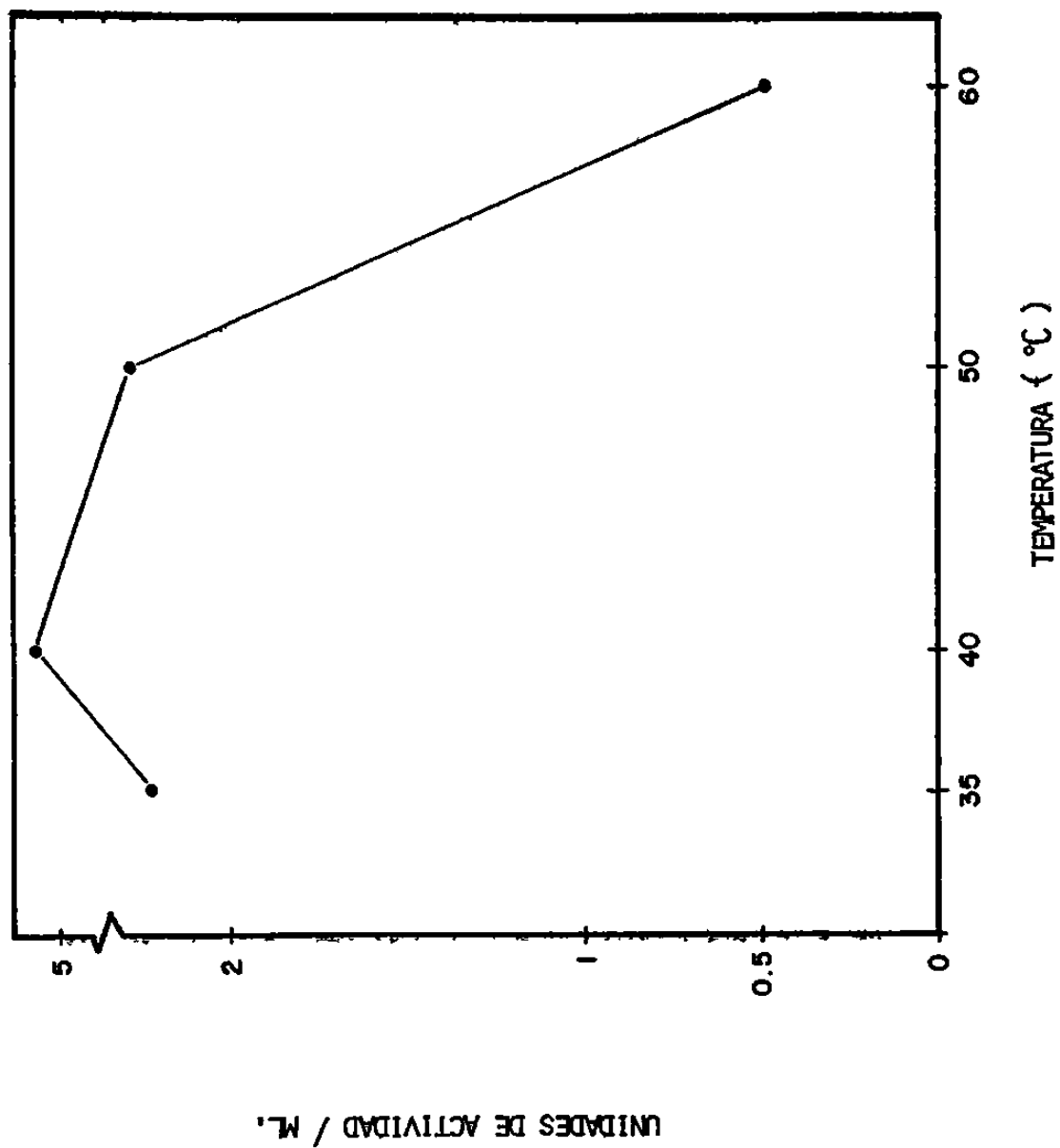


Figura 7.- Efecto de la temperatura sobre la producción de la  $\alpha$ -amilasa de *B. cereus* FCB-UANL en medio basal a las 24 h de cultivo y pH 5.

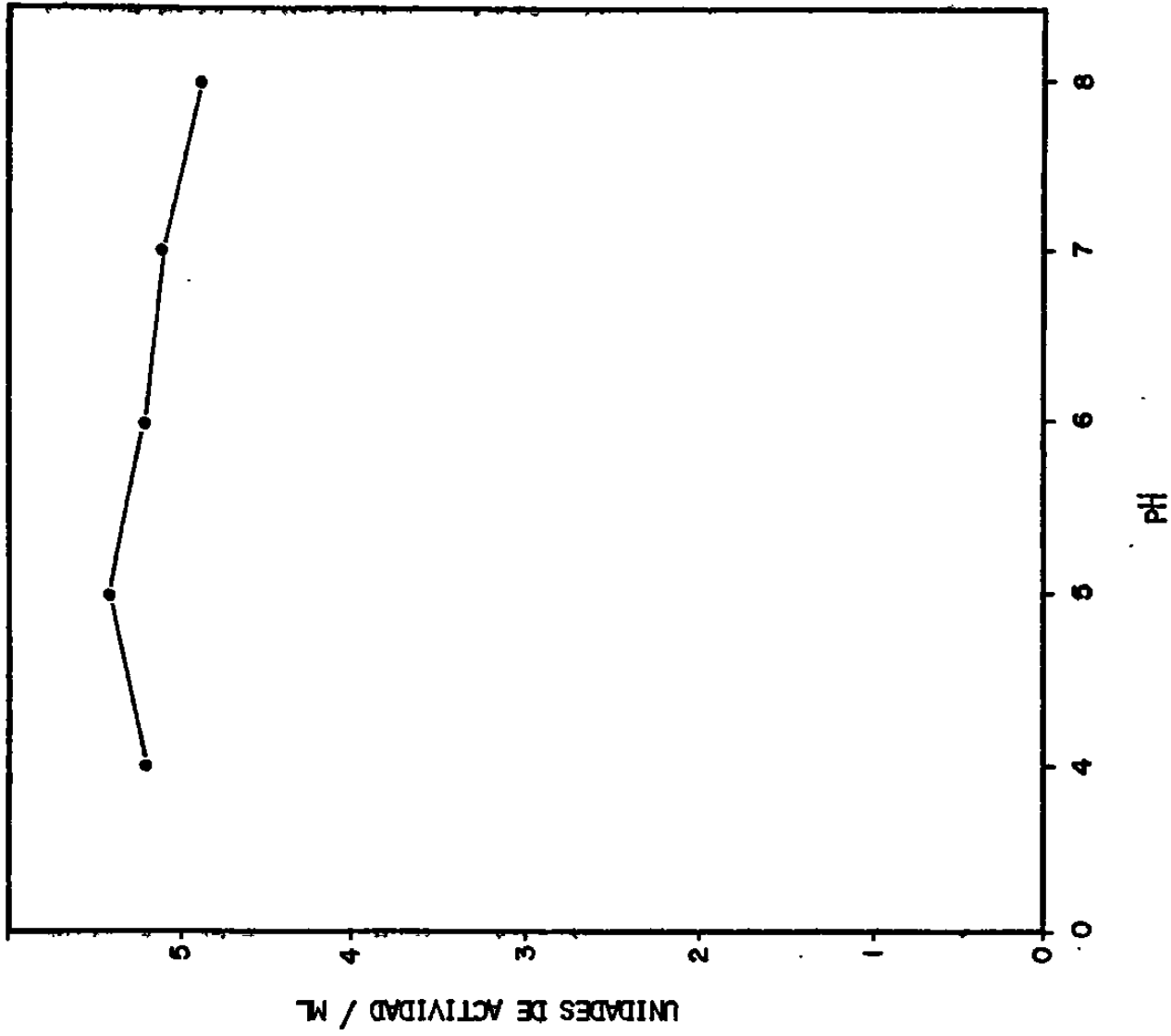


Figura 8'.- Efecto del pH sobre la producción de  $\alpha$ -amilasa de *S. cerevisiae* FCB-UANL en medio basal a 40°C.

Por lo que respecta a la temperatura, *B. apiarius* demostró sintetizar la enzima en un rango de 40 a 65°C; mientras que para *B. licheniformis* 584, la amilasa apareció en el cultivo a 50°C y pH cercano a la neutralidad (37), similar a *B. licheniformis* CUMC 305 con pH 6.5 y 48°C (10).

Tiempo de aparición de la enzima y efecto del % de inóculo.

Los primeros reportes referentes al período de tiempo que tarda la  $\alpha$ -amilasa en ser secretada al medio, indican que ésta aparece al final de la fase exponencial ó en la fase estacionaria (34, 38), ya que ésta se relacionaba directamente con la esporulación, pero se observó que la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa es independiente de ésta (11).

En la figura 9 se observa que la síntesis de la enzima en un medio con almidón soluble, se inicia a partir de las 4 h de cultivo y continua a lo largo de la fase logarítmica. Este evento concuerda con Dancer (11), quien al trabajar con una cepa de *B. subtilis*, ésta sintetizó la  $\alpha$ -amilasa a partir de las 3 h, también *B. apiarius* produjo la enzima a partir de las 5 h y prosiguió continuamente en la fase logarítmica (15).

En microorganismos termófilos, Srivastava (46) reportó que *B. stearoothermophilus* produce la amilasa durante la fase exponencial, así mismo Rothstein (36) encontró que una cepa de *B. licheniformis* inicia la síntesis a partir de las 3 h, pero Saito (37) reporta que en *B. licheniformis* 584 la enzima aparece en el medio después de 24 h, no así la producida por la cepa CUMC 305 la cual secreta la enzima a las 9.5 h de cultivo (10). Sin embargo, la máxima acumulación es durante la fase estacionaria.

Por lo que respecta al % de inóculo, se encontró que con 7% se obtiene la mayor producción de la  $\alpha$ -amilasa, y que la cantidad de enzima no se incrementa cuando se aumenta el % de inóculo (figura 10). Estos resultados difieren a lo encontrado por Kvesitadse y Feniksova (24) con *Aspergillus* -



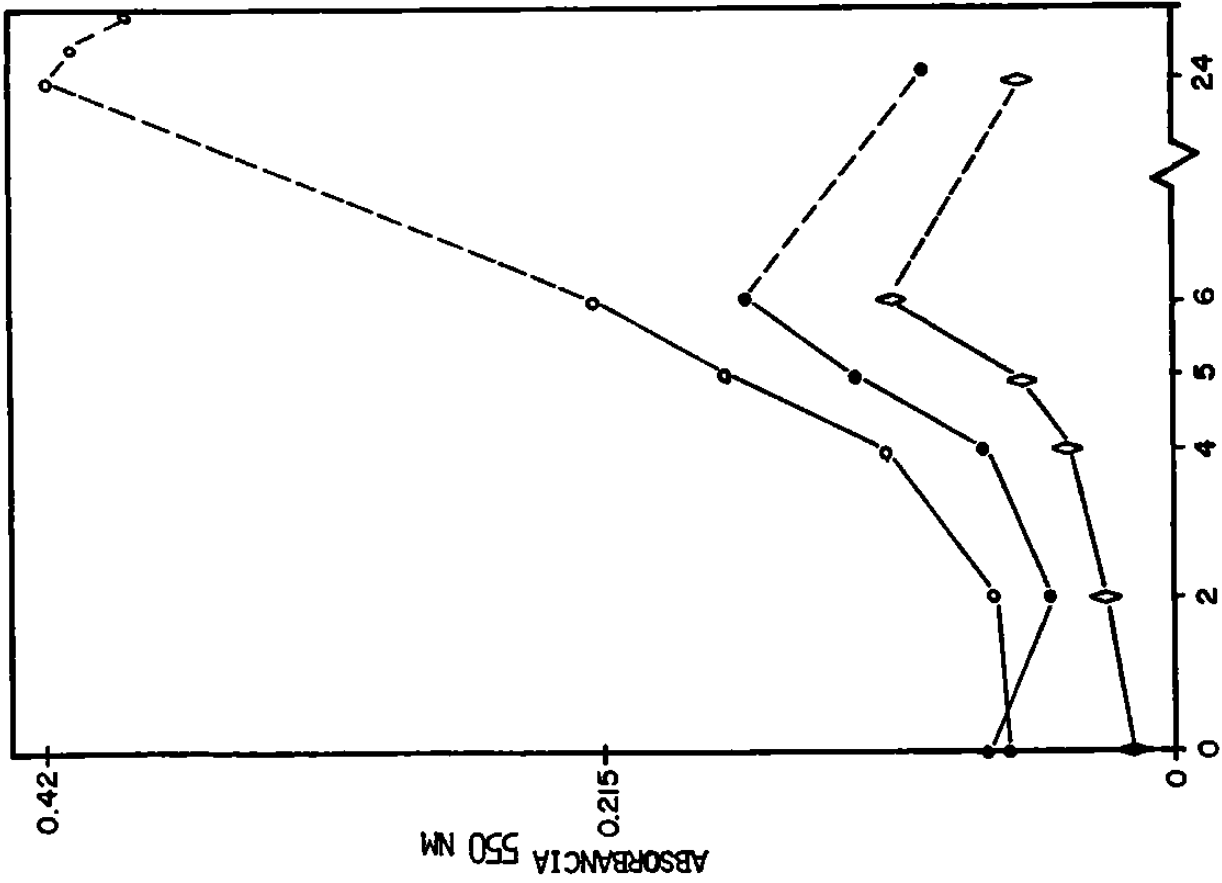


Figura 9.- Tiempo de aparición de  $\alpha$ -amilasa de *B. cereus* - - FCB-UANL en medio basal. Simbología: O, actividad enzimática; A1, azúcares reductores; A2, testigo.

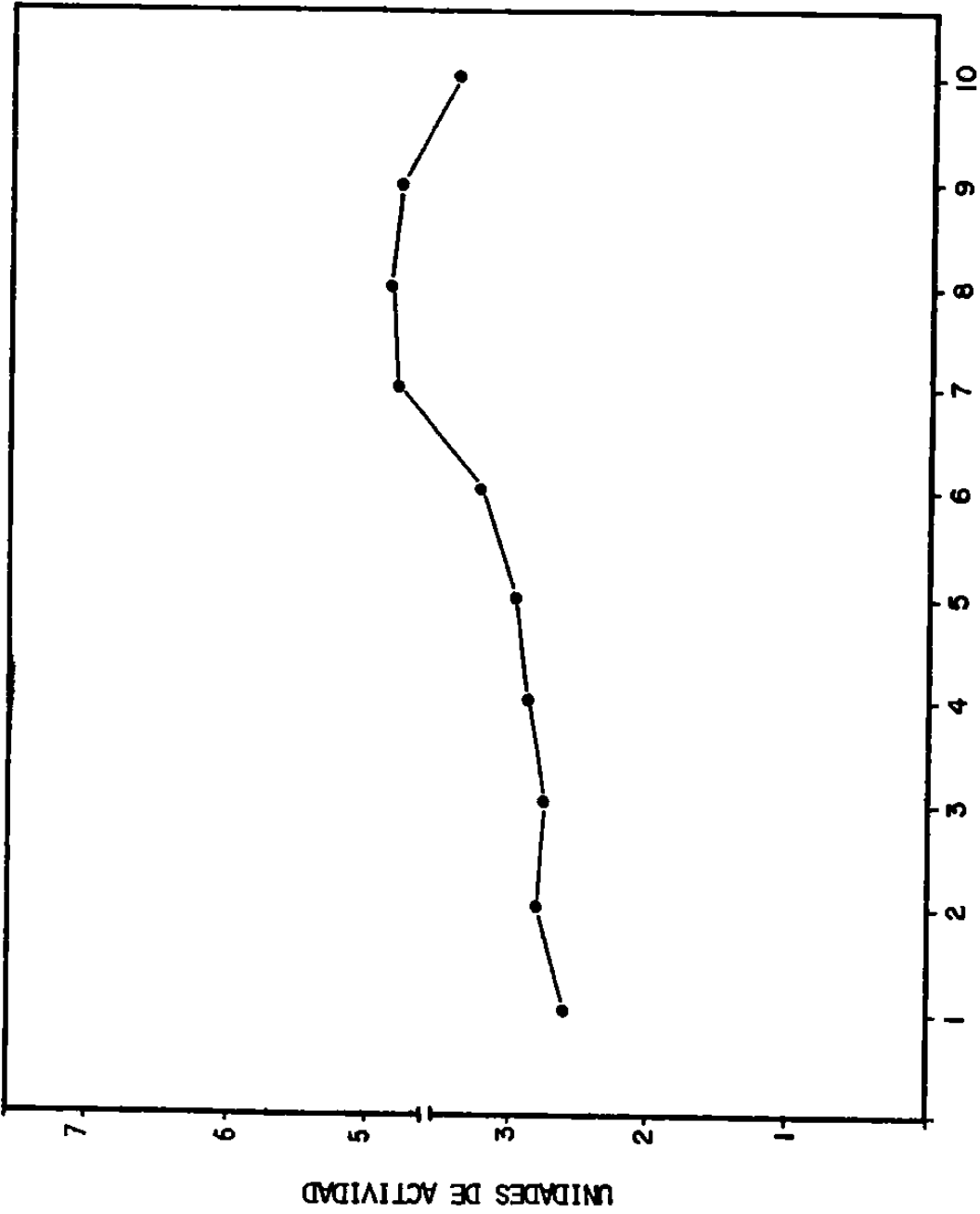


Figura 10.- Efecto del % de inóculo sobre la producción de la  $\alpha$ -amilasa de *B. cereus* FCB-UANL, % DE INOCULO

*oryzae* 3-9-15, quienes al probar diferentes porcentajes de inóculo, 0.6 a 12%, no encontraron diferencia en la producción de la  $\alpha$ -amilasa durante 72 h de cultivo.

#### Efecto de la Fuente de Carbono.

Otro parámetro que hace variar la síntesis enzimática es el tipo y concentración de la fuente de carbono. Lo anterior es interesante si se pregunta si la síntesis de  $\alpha$ -amilasa es inducida por almidón u oligosacáridos de bajo peso molecular. Aparentemente es debido al almidón ya que, la producción comercial de  $\alpha$ -amilasa a partir de *B. subtilis* es acompañada de altas concentraciones de almidón (8-12%). Estas observaciones son evidencia que la síntesis de la enzima es inducible (37, 53) y que la  $\alpha$ -amilasa es acumulada mayormente con almidón y maltooligosacáridos a diferencia a cuando está presente la glucosa (7).

La figura 11 muestra el efecto de la concentración del almidón sobre la producción de la  $\alpha$ -amilasa y se observa que 0.2% es la concentración de óptima producción. Resultados similares fueron encontrados con *B. stearothermophilus* (46), *B. apiarius* (15) y *B. licheniformis* CUMC 305 (10), pero difieren a lo reportado para *B. licheniformis* 584 (37), *A. oryzae* (24) y *T. curvata* (16, 48).

Por lo que respecta al crecimiento, no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de almidón, pero éstas son muy evidentes en la producción de la enzima, esto último solo es compatible con lo encontrado por Srivastava y Baruah para *B. stearothermophilus* (46). Lo anterior demuestra que mucho dependerá del tipo de microorganismo que se trate para determinar el % de almidón óptimo para la producción de la enzima.

En años anteriores se había hipotetizado que la síntesis de la amilasa es inhibida por la presencia de glucosa (8, 34, 37, 38), sin embargo, se procedió a comprobar tal aseveración ya que otros investigadores reportaron que la glucosa

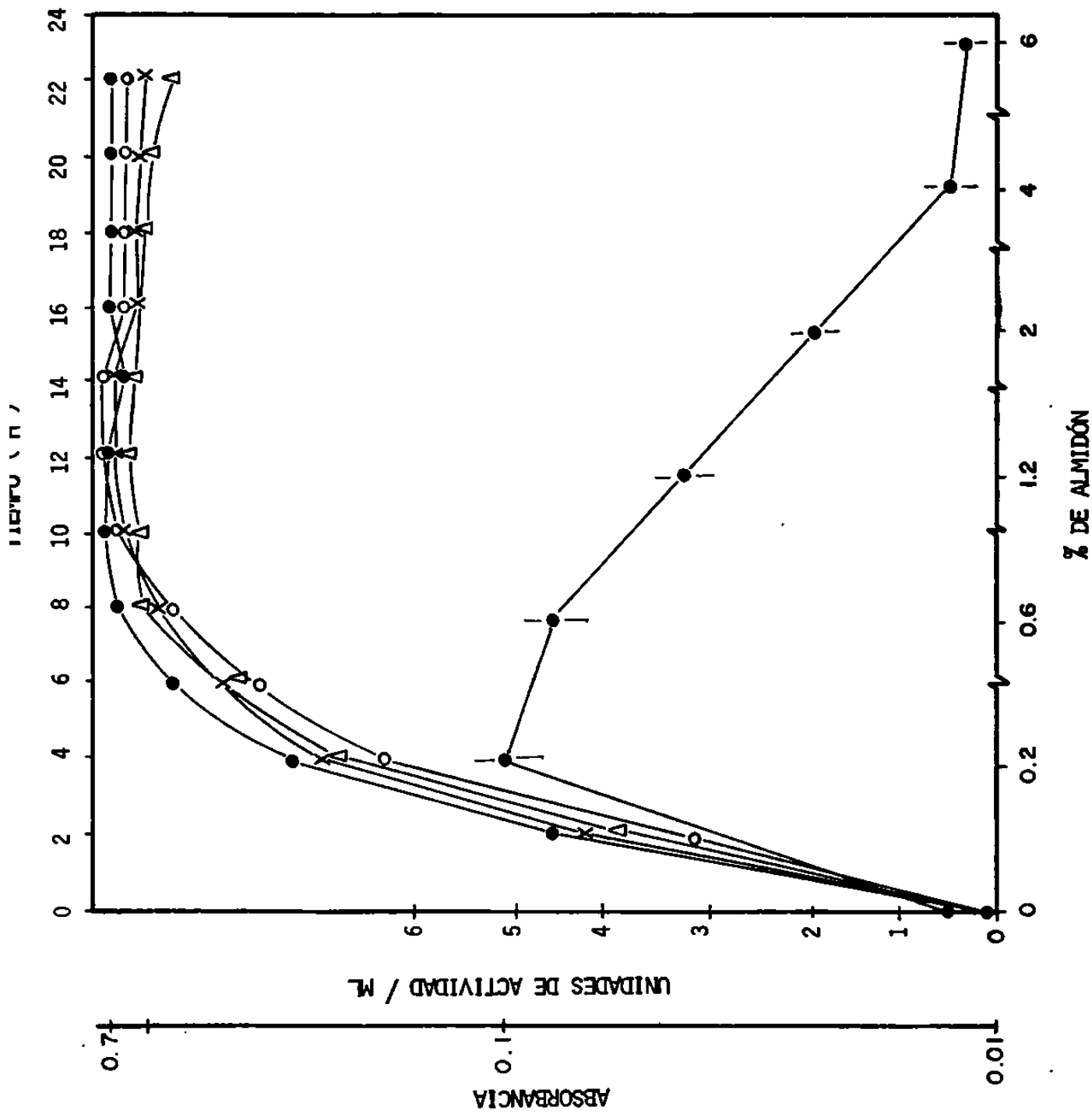


Figura 11.- Efecto de la concentración de almidón sobre la producción de  $\alpha$ -amilasa y crecimiento de *B. cereus* FCB-UANL.  $\bullet$ , actividad: 0, 2%; X, 6%;  $\Delta$ , 1.2%;  $\circ$ , 2%.

no solo no inhibía la producción, sino que la incrementaba con respecto al almidón (10).

Los resultados para diferentes carbohidratos se presentan en las figuras 12-17. Se monitoreó el crecimiento (absorbancia), azúcares reductores (mg/ml) y actividad (U/ml) durante 24 h de cultivo. Así, en la figura 12 se observa que la síntesis enzimática se inició a las 5 h, lo anterior se comprueba por el incremento de los azúcares reductores en el medio, los cuales aumentan hasta 2.3 a las 12 h y luego se reducen a 0.8 a las 24 h; en cambio la enzima se acumula linealmente a partir de la 8 h, alcanzándose la máxima producción a las 24 h. Por tanto si la enzima se sintetiza cuando existen azúcares en el medio, producidos por la misma enzima cuando ataca al almidón, decidimos probar el efecto de la glucosa. Cuando se añadieron 0.05% de glucosa al medio que contenía almidón al 0.2% (figura 13) observándose que no existe represión catabólica por glucosa, al menos a esta concentración, y el comportamiento del microorganismo fue casi igual a cuando la glucosa esta ausente.

Cuando se probó el efecto de las dextrinas, se observó que la biomasa y enzima fueron muy similares a lo encontrado para almidón (figura 14). Esto resalta la hipótesis de Welker y Campbell a cerca de que algunos maltooligosacáridos podrían inducir más fácilmente la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa (52). Lo encontrado para *B. cereus* FCB-UANL concuerda con lo reportado para *B. stearoothermophilus* (46) y *B. licheniformis* CUMC 305 (10). Para las 3 cepas, la producción de la enzima fue casi la misma para almidón soluble, en cambio la producción sobre lactosa al 0.2% es menor, pero para nuestra cepa la máxima síntesis se alcanzó a las 16 h (figura 15). Estos resultados son acordes, en parte, a los encontrados con *B. licheniformis* 584 (37), *B. licheniformis* CUMC 305 (10) y *B. stearoothermophilus* (46), en todas las cepas, la cantidad de  $\alpha$ -amilasa es menor en comparación con almidón, e incluso en *B. stearoothermophilus* no se detectó actividad sacarolítica cuando la lactosa está presente de 0.1 a 0.4%, tampoco con maltosa, sacarosa y galactosa (46).

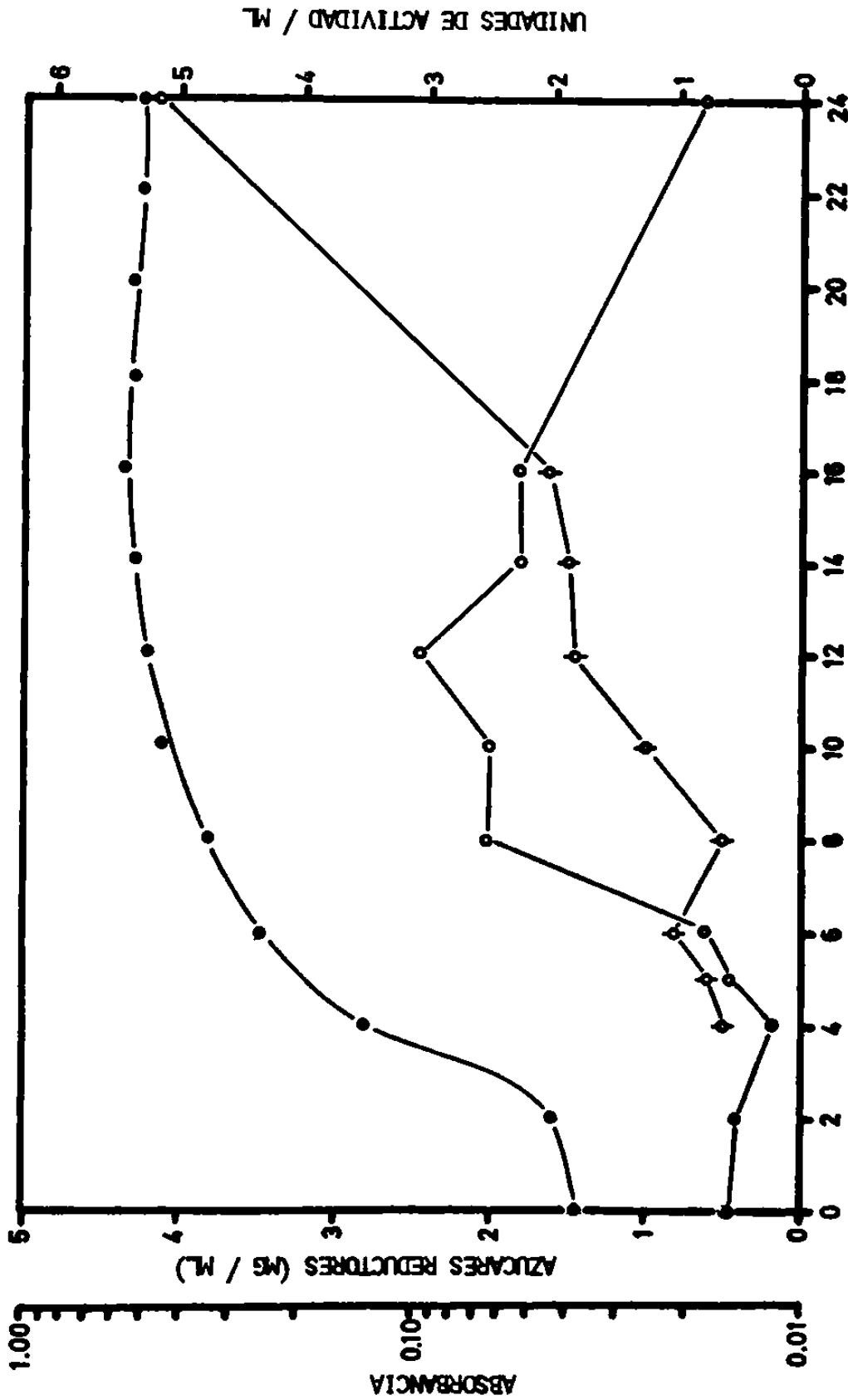


Figura 12.- Cinética de la producción de  $\alpha$ -amilasa de *C. cereus* FCB-UANL a partir de almidón al 0.2%. Simbología: ●, crecimiento; ○, azúcares reductores; ◇, actividad.

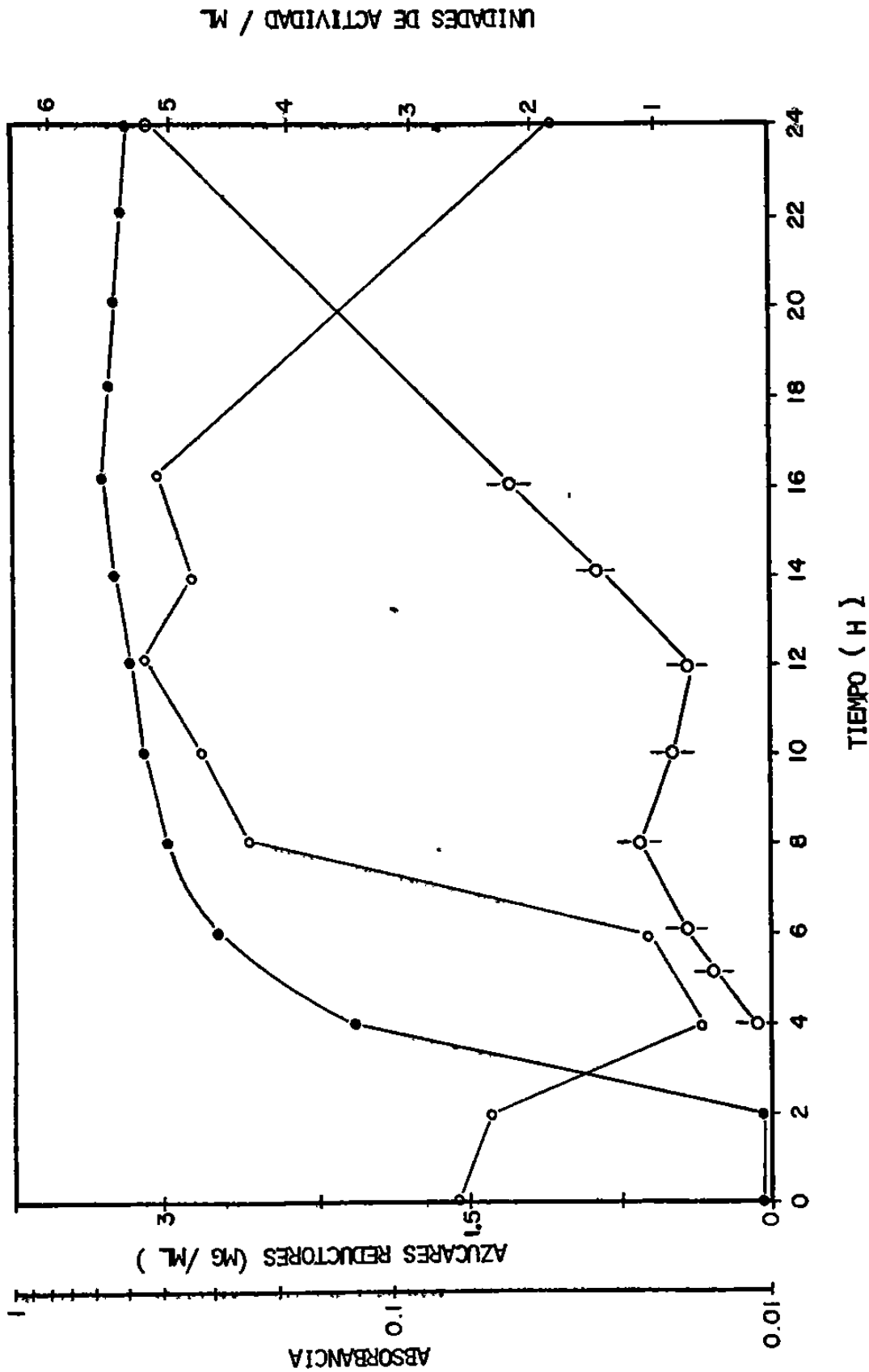


Figura 13.- Cinética de producción de  $\alpha$ -amilasa de *B. cereus* FCB-UANL a partir de almidón al 0.2% + glucosa al 0.05%. Simbología: ●, crecimiento; ○, azúcares reductores; ○, actividad.

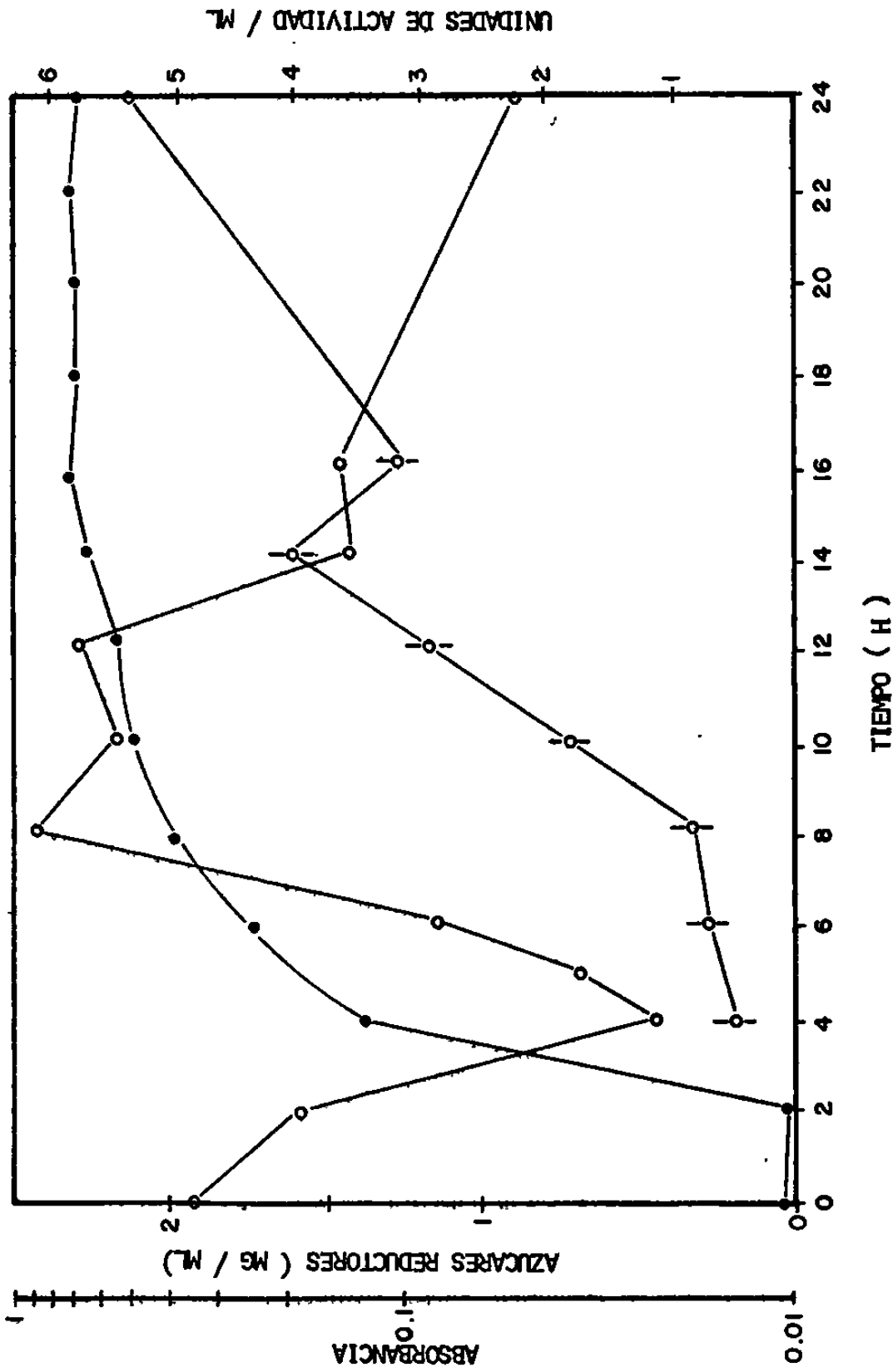


Figura 14.- Cinética de producción de  $\alpha$ -amilasa de *B. cereus* FCB-UANL a partir de dextrinas al 0.2%. Simbología:  $\bullet$ , crecimiento;  $\circ$ , azúcares reductores;  $\square$ , actividad.



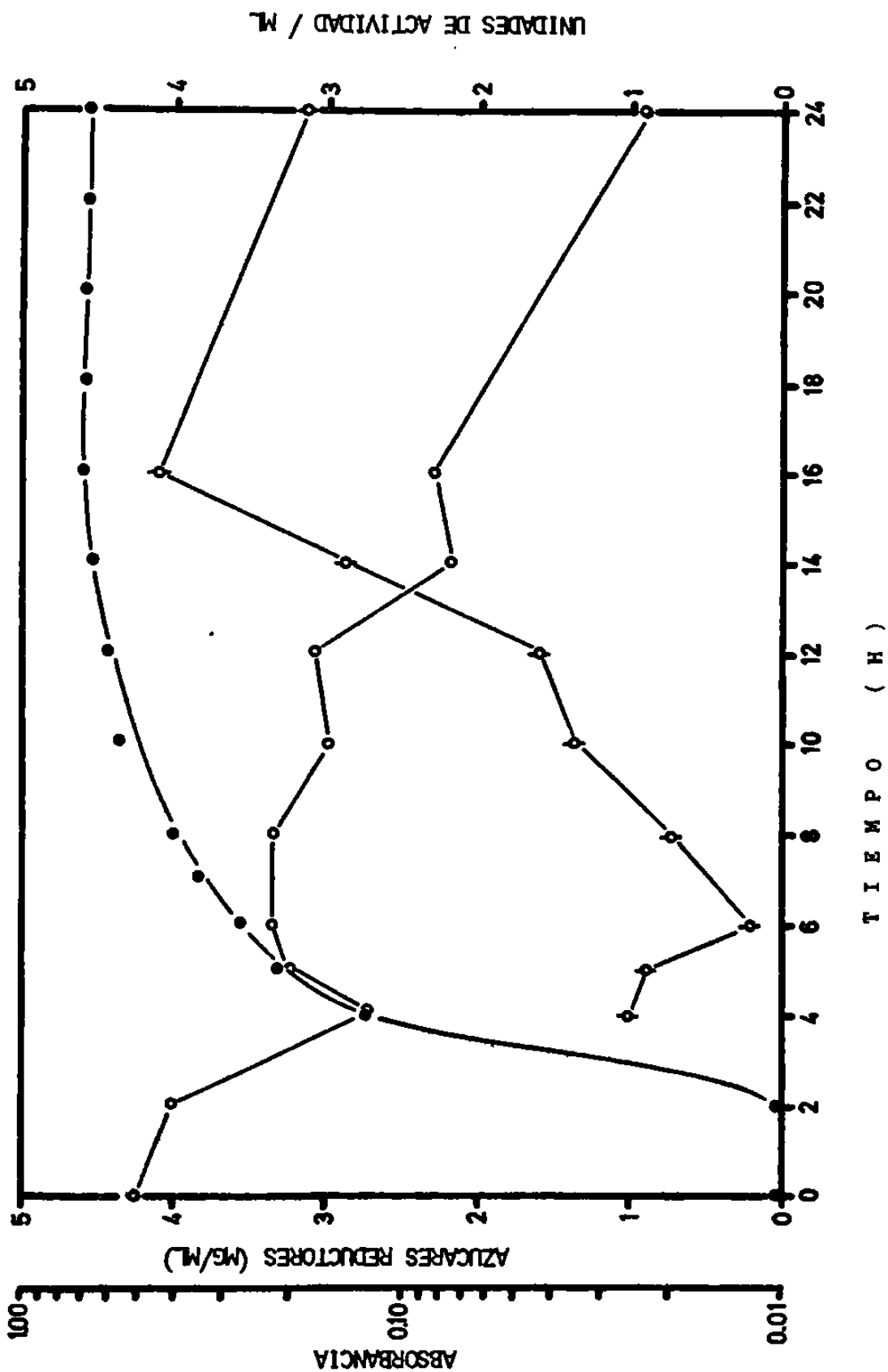


Figura 15.- Cinética de producción de  $\alpha$ -amilasa de *B. cereus* FCB-UANL a partir de lactosa al 0.2%. Simbología: ●, crecimiento; ○, azúcares reductores; □, actividad.

Cosa contraria sucedió con *B. cereus* FCB-UANL, la cual alcanza su máxima producción cuando está creciendo sobre maltosa al 0.1% (figura 16).

La maltosa ha demostrado ser mejor inductor que el almidón solo en esta cepa, porque en otras, ha inhibido total ó parcialmente la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa ( 10, 37, 46 ).

La figura 17 muestra la producción de la  $\alpha$ -amilasa cuando *B. cereus* FCB-UANL crece sobre glucosa al 0.15% como única fuente de carbono. Nuevamente, la síntesis de la enzima se inició a las 5 h, pero la máxima acumulación se alcanzó a las 24 h.

El efecto inhibitorio de la glucosa sobre la síntesis de la amilasa se observa en algunas cepas de *B. subtilis* (8), fuertemente inhibitorio en *B. stearothermophilus* (46) y *B. licheniformis* 584 (37), pero no en *B. licheniformis* CUMC 305 (10).

En base a esto, se utilizaron otras fuentes de carbono mas baratas, como melazas y suero de leche.

En la tabla 5, se observa que la melaza al 0.5% produce 4.8 U, solo 0.4 U menos a cuando se usa almidón, pero cuando la melaza se incrementa a 1%, la síntesis disminuye a 2.6 U.

También se probó el suero de leche, alcanzando hasta 4.2 U cuando ésta se utilizó al 1 y 3%, cuando se le adicionaron sales de fosfato, pero cuando se usó solo al 1% en agua la producción fué menor.

Los anteriores experimentos fueron efectuados en matraces de 250 ml y el pH sin controlar, por lo tanto decidimos conocer el comportamiento de nuestro microorganismo en un medio a pH controlado. En la figura 18 se muestra el resulta-

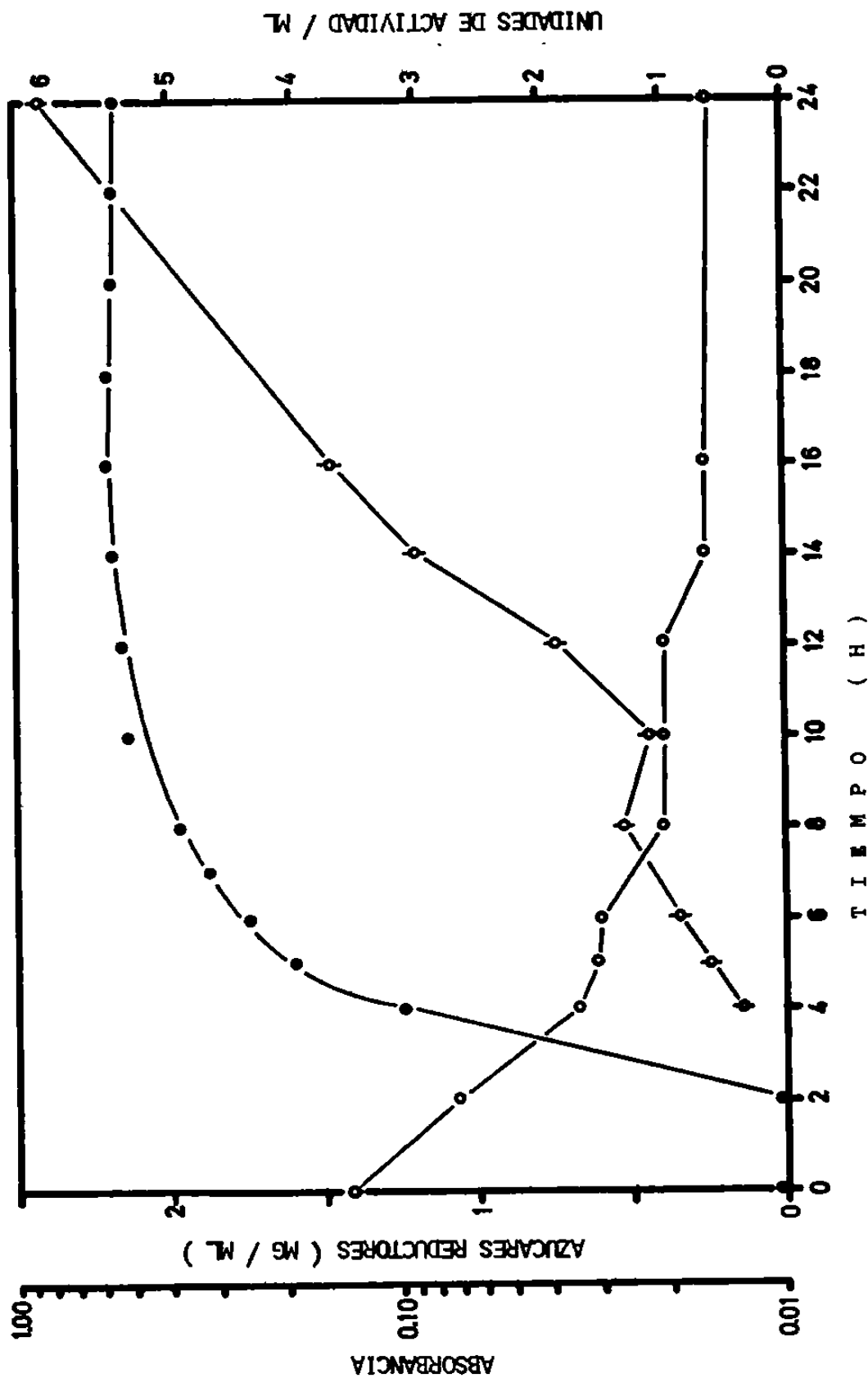


Figura 16.- Cinética de producción de  $\alpha$ -amilasa de *B. cereus* FCB-UANL a partir de maltosa al 0.1%. Simbología:  $\bullet$ , crecimiento,  $\circ$ , azúcares reductores;  $\square$ , actividad.

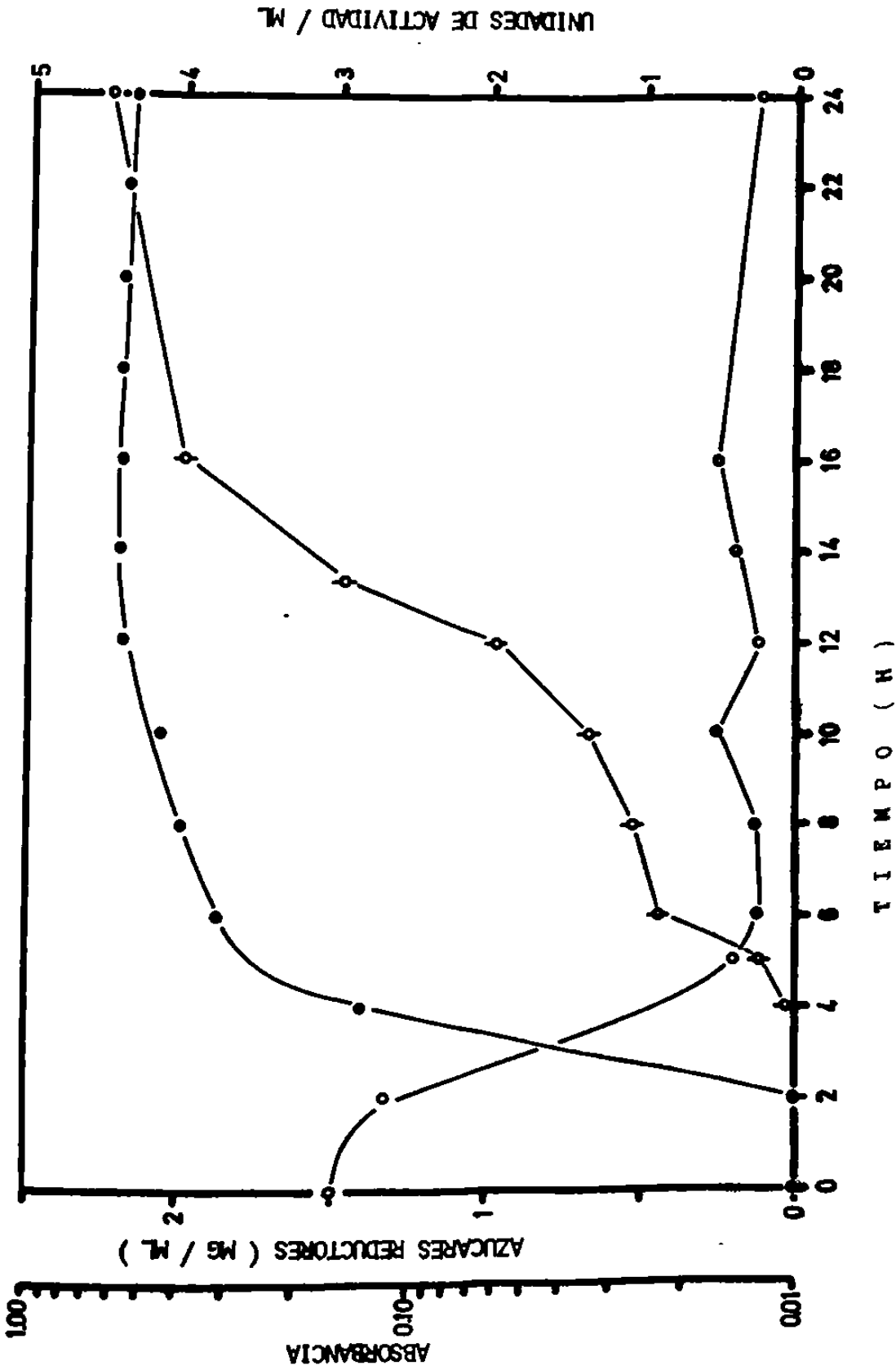


Figura 17.- Cinética de producción de  $\alpha$ -amilasa de *B. cereus* FCB-UANL a partir de glucosa al 0.15%. Simbología:  $\bullet$ , crecimiento;  $\circ$ , azúcares reductores;  $\diamond$ , actividad.

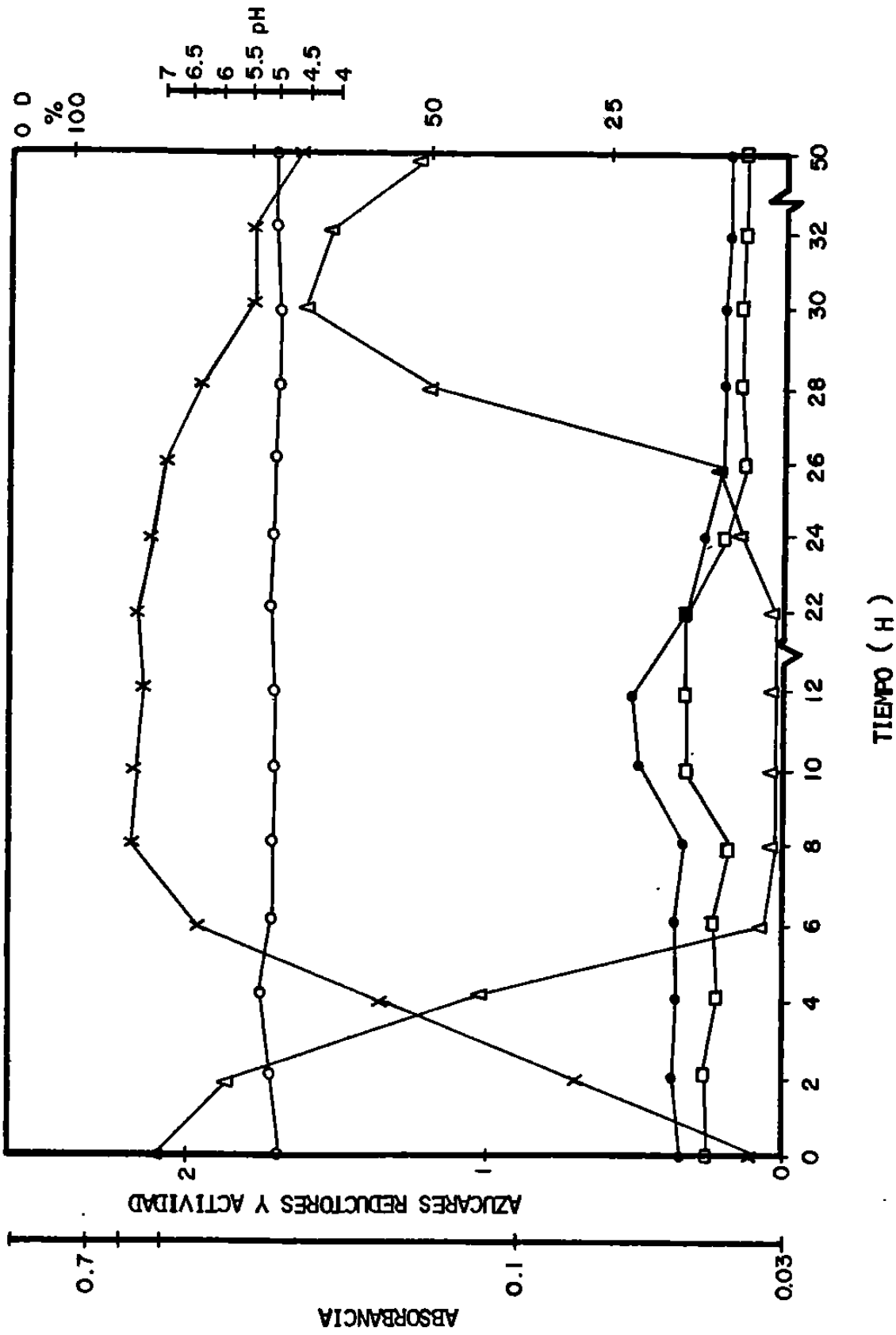


Figura 18.- Cinética de producción de  $\alpha$ -amilasa de *B. cereus* FCB-UANL a pH constante en un fermentador de 1 l con 800 ml de operación, en medio basal a 40°C, 500 rpm y 1 vvm. Simbología: X, crecimiento; 0, pH;  $\Delta$ , oxígeno disuelto;  $\bullet$ , azúcares reductores;  $\square$ , actividad.

T A B L A 5  
 Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la -  
 producción de la  $\alpha$ -amilasa producida por *Bacillus*  
*ceresii* ECR 7411

Fuente de Carbono	%	Azúcares Reduc- tores (mg/ml)		Actividad Sa- carolítica (U/ml)
		Inicial	Final	
Glucosa	0.15	1.5	0.28	4.8
	0.5 <sup>a</sup>	4.9	1.3	2.2
	1 <sup>a</sup>	10	5.95	1.8
Maltosa	0.1	1.48	0.3	6.2
	0.5 <sup>a</sup>	6.5	2.35	3.5
	1 <sup>a</sup>	11	7.15	0.17
Lactosa	0.2	2.2	0.8	4
	1 <sup>a</sup>	9.8	8.75	0.5
Galactosa	1 <sup>a</sup>	9.7	6.8	1.5
Dextrinas	0.2	1.9	0.9	5.2
Almidón	0.2	0.5	0.8	5.2
Glucosa + Almidón	0.15+0.2	1.8	1	5.2
	0.5 +0.2	4.8	2.1	2.5
Melaza	0.5	6.75	2.8	4.8
	1	9	1.2	2.6
Suero de leche	1	2.4	0.29	4.2
	3	5.1	0.67	4.2
Suero	1 <sup>b</sup>	2.4	0.4	2.3

a = medio con sales de fosfato sin caldo nutritivo.

b = solo con agua

do de la fermentación a pH inicial de 5. Observamos que la producción de  $\alpha$ -amilasa a pH constante es inhibida, aún y cuando el crecimiento es abundante.

La figura 19, muestra la demanda de oxígeno para *B. cereus* FCB-UANL creciendo en un medio basal a pH 5 y 40°C, obteniéndose  $3.7 \text{ gO}_2 \cdot \text{H}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ , lo cual lo hace dependiente del  $\text{O}_2$ , al igual que todos los miembros del género *Bacillus* ( Pirt, 1962 ).

Efecto de diferentes harinas sobre la producción de la  $\alpha$ -amilasa.

Las materias primas representan de 60 a 80% del precio de costo de la producción de enzimas por fermentación. La disponibilidad de una fuente de carbono y nitrógeno son factores decisivos en la óptima producción de enzimas. Una mejor fuente de carbono y nitrógeno son las harinas vegetales (22), por lo tanto estudiamos el posible efecto de algunas harinas sobre la producción de amilasa de *B. cereus* FCB-UANL.

La tabla 6, muestra que la harina de soya al 1%, fué la que estimuló en mayor cantidad la producción de la enzima. Estos resultados difieren a lo encontrado por Rene Scriban, quien reporta la preferencia del almidón de maíz sobre el de soya (37).

Influencia de la  $\alpha$ -amilasa de *B. cereus* FCB-UANL, sobre el macerado.

Como se había mencionado anteriormente, suponemos que los tratamientos que fueron suplementados con extracto crudo de *B. cereus* FCB-UANL y  $\alpha$ -amilasa comercial, resultarán con un marcado incremento en la concentración de dextrinas, glucosa y maltosa, con respecto al testigo que solo tenía agua

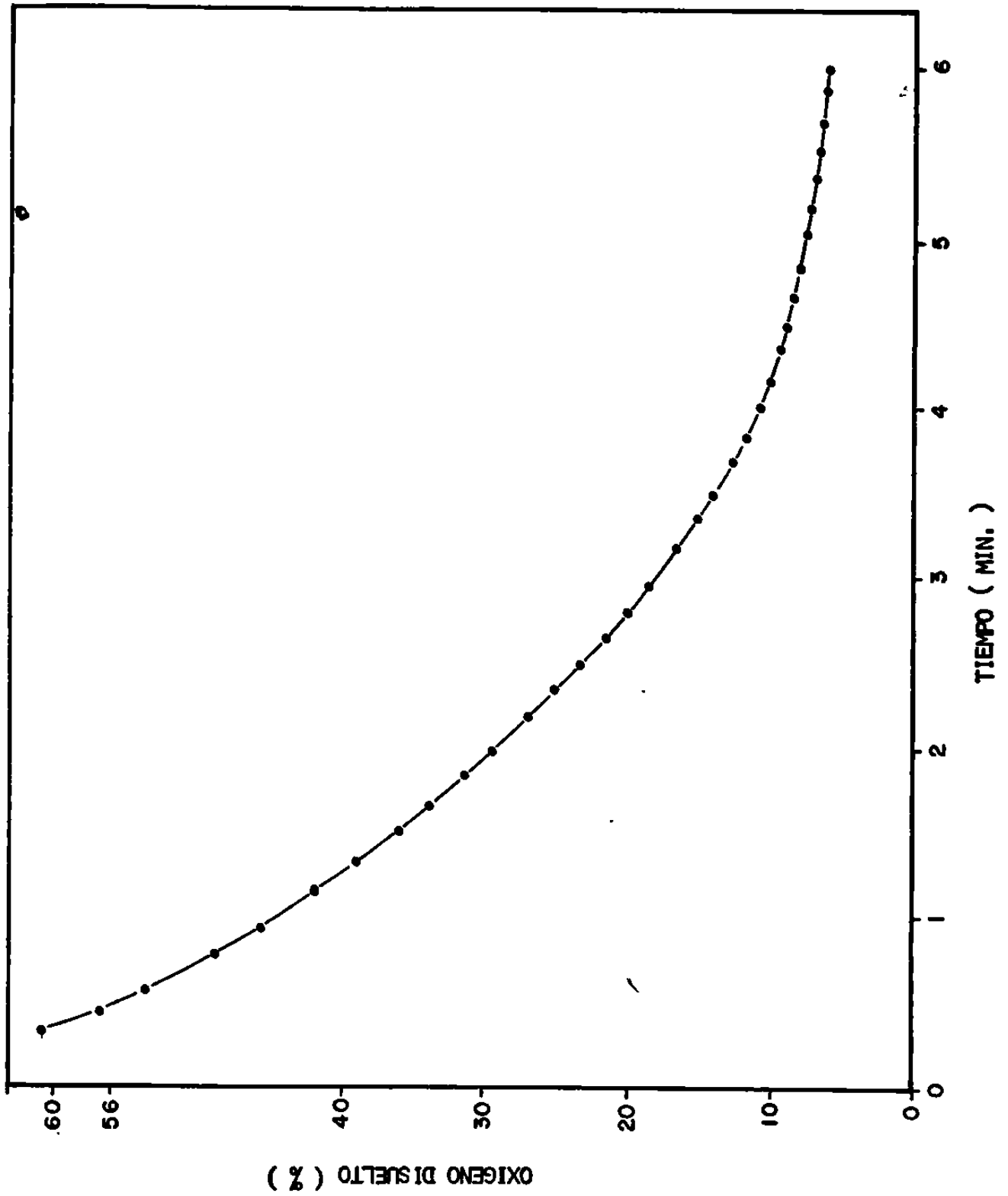


Figura 19. Demanda de oxígeno (Na) de *S. cerevisiae* FCB-UANL, creciendo en medio basal a 40°C y pH 5.  
La determinación se realizó a 100 ml de cultivo.



T A B L A 6

Efecto de diferentes harinas sobre la producción de  $\alpha$ -amilasa a partir de Bacillus cereus FCB-UANL.

Harina	%	Unidades / ml
Arroz	1	1.3
	2	0.8
	3	0.7
Maíz	1	2
	2	1.1
	3	1.6
Trigo	1	0.3
	2	0.35
	3	0.35
Soya	1	4.7
	2	1.8
	3	2.4
Semilla de algodón	1	1.3
	2	0.2
	3	0.3

La figura 20 A muestra el perfil de azúcares en el tratamiento con nuestra enzima, B la  $\alpha$ -amilasa comercial y C el testigo.

Como se puede observar, el perfil de A y B son muy similares en cuanto a su tipo y concentración de los azúcares. El pico con 3.39 para A, 3.44 para B y 3.44 para C muestran las fracciones desde maltotriosas hasta dextrinas en los picos de 4.52 (A), 4.54 (B) y 4.17 y 4.62 (C). Pero los azúcares de mayor importancia en la producción de la cerveza normal, lo son glucosa y maltosa porque la levadura no puede fermentar las dextrinas, por lo tanto estas pasan hasta el producto terminado. Así, tenemos que la  $\alpha$ -amilasa producida por *B. cereus* FCB-UANL produjo 2.95% de maltosa y 0.25% de glucosa, mientras que el testigo produjo niveles muy bajos de ambos carbohidratos, 1.85 y 0.12% respectivamente.

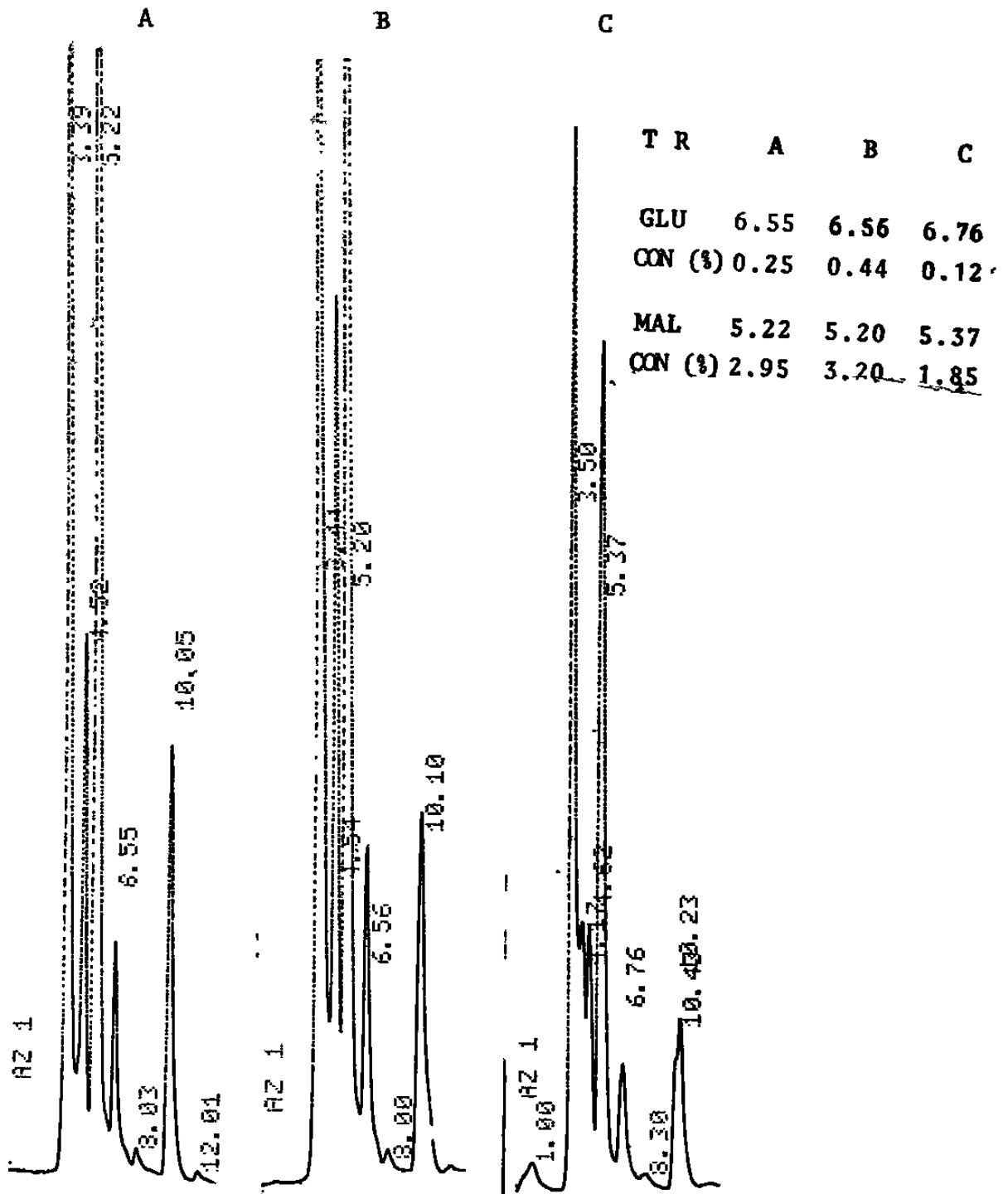


Figura 20.- Comparación del efecto de la  $\alpha$ -amilasa de *B. cereus* FCB-UANL y una  $\alpha$ -amilasa comercial sobre la maceración malta:cebada. A,  $\alpha$ -amilasa *B. cereus*; B,  $\alpha$ -amilasa comercial; C, testigo sin amilasa.

## C O N C L U S I O N E S

- 1.- Se aisló una cepa de *Bacillus cereus* que produce  $\alpha$  y no  $\beta$ -amilasa por lo que se designó *Bacillus cereus*FCB-UANL.
- 2.- La  $\alpha$ -amilasa posee máxima actividad a 70°C y pH 5-6.
- 3.- Las condiciones de cultivo de óptima producción son: 40°C, pH 5, 7% de inóculo, almidón al 0.2%.
- 4.- La mejor fuente de carbono para la producción enzimática es maltosa 0.1%.
- 5.- La síntesis de la  $\alpha$ -amilasa no se ve reprimida por glucosa al 0.15%.
- 6.- De las harinas probadas, la mejor es la harina de soya al 1%.
- 7.- La  $\alpha$ -amilasa producida por *Bacillus cereus* FCB-UANL tiene mejor actividad específica y comportamiento muy similar, en la maceración malta: cebada, a la  $\alpha$ -amilasa comercial.

LITERATURA CITADA

- 1.- Amory, A.; F. Kunst; E. Aubat; A. Klies & G. Rapoport. 1987. Characterization of the sac Q genes from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 169:324-333.
- 2.- Bernfeld, P. 1955. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ : *Methods Enzimol.* 1:149-154.
- 3.- Blain, J. A. 1975. Industrial enzyme production. Chapter 10. In "Filamentous fungi". Vol 1. Edited by J. E. Smith & D.R. Berry. William Clowes & Sons. London.
- 4.- Borgia, P. T. & L. L. Campbell. 1978.  $\alpha$ -Amylase from five strains of *Bacillus amyloliquefaciens*: Evidence for identical primary structures. *J. Bacteriol.* 134:389-393.
- 5.- Buchanan, R. E. & N. E. Gibson. 1974. *Bergey's manual of determinate bacteriology*. 7<sup>th</sup> Edition. Williams & Wilkins, Co. Baltimore. pp. 529-551.
- 6.- Canales, G. A. 1983. Beer: Art and science. *MBAA Technical Quarterly.* 20:53-67.
- 7.- Casida, L. E. 1968. *Industrial microbiology* of John Wiley & Sons, Inc. New York. pp. 391-401.
- 8.- Coleman, G. & W. H. Elliot. 1962. Studies on  $\alpha$ -amylase formation by *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* 83:256-263.
- 9.- Corman, J. & H. M. Tsuchiva. 1951. Utilization of fungal amylases for alcohol production. *Cereal Chemistry.* 28:280-288.
- 10.- Chandra, A. K.; S. Medda & A. K. Bhadra. 1980. Production of extracellular thermostable  $\alpha$ -amylase by *Bacillus licheniformis*. *J. Ferment.* 58:1-10.
- 11.- Dancer, B. N. & J. Mandelstam. 1975. Criteria for categorizing early biochemical events occurring during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 121:411-415.

- 12.- Dougherty, J. J. 1980. Wort production. Chapter V. In "Art and Practice of Brewing". Edited by Master Brewers Association of the Americas. Impression, Inc. Madison, Wisconsin.
- 13.- Fogarty, M. 1983. Amylases, Chapter I. In "Microbial enzymes and biotechnology". Edited by W. M. Fogarty. Applied Science publishers. New York.
- 14.- Gandhi, A. P. & L. Kjaergard. 1975. Effect of carbon dioxide on the formation of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus subtilis* growing in continuous and batch cultures. *Biotech and Bioeng.* XVII: 1109-1118.
- 15.- Ghosh, S. B. & A. K. Chandra. 1980. Production of thermostable  $\alpha$ -amylase by *Bacillus apianus* CBML 152. *Adv. of Technol.* 3:313-321.
- 16.- Glymph, J. L. & F. J. Stutzenberger. 1977. Production, purification and characterization of amylase from *Thermomospira curvata*. *Appl. Env. Microbiol.* 34:391-394.
- 17.- Gould, A. R.; B. K. May & W. H. Elliot. 1975. Release of extracellular enzymes from *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Bacteriol.* 122:34-40.
- 18.- Hennen, D. J. & J. A. Hoch. 1980. The *Bacillus subtilis* chromosome. *Bacter. Rev.* 44:57-82
- 19.- Hensly, D. E.; K. L. Smiley; J. A. Boundy & A. A. Lagoda. 1980. Beta-amylase production by *Bacillus polymyxa* on a corn steep-starch-salts medium. *APPL. Env. Microbiol.* 39:678-680.
- 20.- Hitotsunayagi, K.; K. Yamane. & B. Maruo. 1979. Stepwise introduction of regulatory genes stimulating production of  $\alpha$ -amylase extrahyper producing strain. *Agric. Biol. Chem.* 43: 2343-2349.
- 21.- Hyun, H. H. & J. G. Zeikus. 1985. General biochemical characterization of thermostable extracellular  $\beta$ -amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*. *Appl. Env. Microbiol.* 49:1162-

- 1167.
- 22.- Krishnan, T. & A. K. Chandra. 1982. Effect of oildseed cakes of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus licheniformis* CUMC 305. Appl. Env. Microbiol. 44:270-274.
  - 23.- Krishnan, T. & A. K. Chandra. 1983. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC 305. Appl. Env. Microbiol. 46:430-437.
  - 24.- Kvesitadse, G. I. & R. V. Feniksova. 1969. Effect of cultivation condition of  $\alpha$ -amylase biosynthesis by *Aspergillus oryzae* 3-9-15. Appl. Biochemistry and Microbiology. 5:141-146.
  - 25.- Lehninger, A. 1984. Bioquímica. 8<sup>a</sup> Reimpresión. Editorial. Omega, S. A. Barcelona. pp. 200- 210.
  - 26.- Lowry, O. H.; N. J. Rosenbrough; A. L. Farr & R. J. Randal. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
  - 27.- Martin, C. 1980. Growth of enzymology. British Food Journal. 82:133-136.
  - 28.- Morgan, F. J. & F. G. Priest. 1981. Characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 63\_46. J. Appl. Bacteriol. 50:107-114.
  - 29.- Narziss, L. 1976. The influence mashing procedure on the activity an effect on enzymes.- A survey. MBAA Technical Quarterly. 13:11-21.     o
  - 30.- Obi, S. K. & J. C. Odibo. 1984. Partial purification and characterization of a thermostable actinomycete  $\beta$ -amylase. Appl. Env. Microbiol. 47:571-575.
  - 31.- Owades, J. L. & G. Bierman. 1977. A study of the admixture - of amyloglucosidase-treated beer with the other beer. MBAA - Technical Quarterly. 15:38-42.
  - 32.- Pfisterer, E. 1974. Enzymes in fermentation. MBAA Technical -

Quarterly. 11:9-16.

- 33.- Prescott, S. y C. Gordon. 1962. *Microbiología Industrial*. 3<sup>a</sup>-- Edición. Editorial Aguilar. Madrid. pp. 160-163.
- 34.- Priest, F. G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in genus -- *Bacillus*. *Bacter. Rev.* 14:711-753.
- 35.- Rose, A. H. 1961. *Industrial Microbiology*. Butterworths. Lon \_ don.
- 36.- Rothstein, D. M.; P. E. Devlin & R. L. Cate. 1986. Expression of  $\alpha$ -amylase in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 168:839-842.
- 37.- Saito, N. & K. Yamamoto. 1975. Regulatory factors affecting - production in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 121:848-856.
- 38.- Schaeffer, P. 1969. Sporulation and the production of antibio\_ tics, exoenzymes and exotoxins. *Bacter. rev.* 33:48-71.
- 39.- Scriban, R. 1985. *Biotecnología*. Editorial El Manual Moderno, \_ S. A. México, D. F. pp. 282-297.
- 40.- Sekeguchi, J.; N. Takada & H. Okada. 1975. Genes affecting the productivity of  $\alpha$ -amylase in *Bacillus subtilis* Marburg. *J. Bac\_ teriol.* 121:688-694.
- 41.- Shimisu, M.; M. Kano; M. Tamura & M. Suekane. 1978. Purifica\_ tion and some propierties of a novel  $\alpha$ -amylase produced by a strain of *Thermoactinomyces vulgaris*. *Agric. Biol. Chem.* 42: - 1681-1688.
- 42.- Shinke, R.; K. Aoki; H. Nishira & S. Yuki. 1980.  $\beta$ -Amylase pro\_ duction by a rifampin-resistant, sporogenous mutant of *Bacillus cereus* and its revertant. *Adv. Of Technol.* 3:307-312.
- 43.- ~~Shinke~~ Shinke, R.; K. Aoki; H. Nishira & T. Kiyohara. 1980. Fractiona\_ tion of microbiologically active factors for  $\beta$ -amylase produc\_ tion. *Sci. Rept. Fac. Kobe. Univ.* 14:177-181.



- 44.- Skimer, J. K. 1975. A wider array of large-and small-scale, uses is opening up of multidisciplinary research now under way on biological catalysts. Chem & Eng. News. 53:22-41.
- 45.- Smith, B. J. 1984. SDS polyacrylamide gel electroforesis of proteins. Chapter VI. In "Methods in Molecular Biology". Vol 1 Edited by John M. Walker. Humana Press. Clifton, New Jersey.
- 46.- Srivastava, R. A. & J. N. Baruah. 1986. Culture condition for production of thermostable amylase by *Bacillus stearothermophilus*. Appl. Env. Microbiol. 52:179-184.
- 47.- Stewart, G. G. 1985. Tradition meets inovation in brewing. Bio technology. 3:791-798.
- 48.- Stutzenberger, F. & R. Caenel. 1977. Amylase production by --- *Thermomonospora curvata*. Appl. Env. Microbiol. 34:234-236.
- 49.- Taylor, M. J. & T. Richardson. 1979. Aplications of microbial-enzymes in food systems in biotechnology. Adv. Appl. Microbiol. 25:7-35.
- 50.- Townshend, A. 1981. Uses on enzymes in analitical chemistry. J. Assoc. Publ. Analysis. 19:51-58.
- 51.- Underkofler, L. A. 1976. Microbial enzymes. Chapter 7. In "Industrial Microbiology". Edited by B. Miller & Warren L. Mc Graw Hill. New York.
- 52.- Upton, M. E. & W. M. Fogarty. Production and purification of -thermostable amylase and protease of *Thermomonospora viridis*. Appl. Env. Microbiol. 33:59-64.
- 53.- Welker, N. E. & L. L. Campbell. 1963. Induction of  $\alpha$ -amylase - of *Bacillus stearothermophilus* by maltodextrins. J. Bacteriol. 86:687-691.
- 54.- Wilson, J. J. & W. M. Ingledew. 1982. Isolation and characteri zation of *Schwanniomyces alluvius* amylolitic enzymes. Appl. Env. Microbiol. 44:301-307.

- 55.- Woodward, J. D. 1978. Enzymes in practical brewing. The Brewers Digest. May. pp. 38-44.
- 56.- Yamaguchi, K.; Y. Nagata & B. Maruo. 1974. Genetic control of the rate of  $\alpha$ -amylase synthesis in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 119:410-425.
- 57.- Yamaguchi, K.; Y. Nagata & B. Maruo. 1974. Isolation of mutants -- defective in  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. Genetic analysis. J. Bacteriol. 119:416-424.
- 58.- Yoneda, Y.; K. Yamane; K. Yamaguchi; Y. Nagata & B. Maruo. 1974. Transformation of *Bacillus subtilis* in  $\alpha$ -amylase productivity by deoxyribonucleic acid from *B. subtilis* var *amylosacchariticus*. J. Bacteriol. 120:1144-1150.

