

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

TESIS

"Estudios de la Influencia de los Componentes del Medio sobre la Actividad Enzimática Específica de Amilasas Fúngicas y Bacterianas"

María de los Angeles Márquez

1975

Don.....
S.....
Fecha 25-6-76
T. N. 67862 ... B. 48292



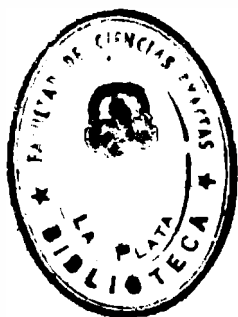
Sr. Decano

Sres. Profesores

Elevo a vuestra consideración el presente trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Farmacia y Bioquímica. El mismo se efectuó bajo la dirección del Dr. Rodolfo J. Ertola, a quien deseo expresar mi profundo agradecimiento por su permanente orientación y su valioso apoyo.

Asimismo quiero manifestar mi gratitud especialmente a los Dres. Antonio P. Balatti y Luis A. Mazza, y a todas aquellas personas que de alguna manera me brindaron su ayuda desinteresada e hicieron posible la realización de este trabajo.

PARTE GENERAL



I.- INTRODUCCION

Es bien conocida la importancia industrial de las enzimas amilolíticas microbianas, considerando la gran diversidad de sus aplicaciones.

Varios aspectos relacionados con su producción han sido objeto de estudio por parte de investigadores del país y del exterior. La casi totalidad de los trabajos realizados expresan los resultados en valores de actividad enzimática por unidad de volumen. Se llega así, a menudo, a la conclusión de que la presencia de un componente o una determinada concentración del mismo, produce aumentos en los rendimientos. Esta conclusión parece útil desde el punto de vista práctico, pero queda la duda si el componente estudiado favorece la biosíntesis de la enzima o es simplemente la concentración de microorganismo lo que aumenta, manteniéndose constante la actividad enzimática específica o sea la actividad calculada por unidad de peso de microorganismo.

Obtener aumentos de la concentración de microorganismo para incrementar la concentración de un metabolito, no es siempre posible más allá de un límite determinado, sobre todo en procesos con hongos filamentosos. Son bien conocidas las dificultades tecnológicas para aumentar la potencia de agitación en escala industrial con el fin de resolver los problemas derivados del aumento de viscosidad de los caldos de fermentación o de la inadecuada aeración del cultivo. De ello deriva la importancia tecnológica de una investigación destinada a estudiar la influencia de componentes del medio sobre la producción específica de un metabolito

de origen microbiano.

Es objeto del presente trabajo de tesis el estudio de la influencia de algunos componentes de los medios en procesos de producción de enzimas amilolíticas fúngicas y bacterianas sobre la actividad enzimática específica. Se incluyen además algunos resultados vinculados al suministro de aire en procesos de obtención de amilasas bacterianas.

Para que el trabajo tuviera mayor validez y contribuyera a analizar las conclusiones obtenidas con anterioridad sobre rendimientos enzimáticos volumétricos, se decidió elegir una cepa de Aspergillus niger muy conocida y estudiada como la N.R.R.L. 337, utilizada por varios investigadores del exterior y del país, y una cepa de Bacillus subtilis IAM H 1521, también empleada en numerosos trabajos publicados.

II.- GENERALIDADES

Las enzimas amilolíticas pueden ser de diversos orígenes: vegetal como las que se encuentran en la malta, soja, remolacha, etc.; de origen animal como las del páncreas y saliva, y finalmente de origen microbiano, que son en la actualidad muy utilizadas en la industria.

Numerosos artículos publicados tratan sobre las características generales de las enzimas amilolíticas microbianas, su naturaleza, estructura molecular, mecanismo de acción y sus diferentes fuentes de obtención (1, 2, 3, 4, 5).

Las amilasas son producidas por numerosos microorganismos. En general, las cepas más productoras dentro de los hongos se encuentran comprendidas entre los géneros

Aspergillus, Rhizopus, Penicilium, Mucor y Monilia. En 1894, Calmette aisló hongos con propiedades amilolíticas y posteriormente varias especies de Rhizopus se utilizaron comercialmente para la producción de enzimas, incluyendo las especies niveus, delemar, oryzae y javanicus. Más tarde, otros investigadores ensayaron cepas de Aspergillus niger y Aspergillus oryzae, observando que producían altos rendimientos de alfa amilasa. Actualmente se prefieren distintas cepas de éstos microorganismos para la producción industrial de la enzima.

En lo que se refiere a las bacterias, si bien existen varios microorganismos productores de amilasa, tales como Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus, Bacillus coagulans y Pseudomonas saccharophila, la mayoría de las cepas usadas en escala industrial, pertenecen a Bacillus subtilis.

Considerando que el objetivo de este trabajo de tesis se refiere fundamentalmente a la influencia de componentes de medios sobre los rendimientos enzimáticos, esta parte general incluye una revisión bibliográfica sobre los trabajos relacionados con los medios de fermentación utilizados en la producción y algunos aspectos esenciales de las condiciones operativas empleadas.

III.- MEDIOS DE FERMENTACION

El medio de cultivo destinado a la producción de enzimas amilolíticas debe contener: a) una fuente de carbono. b) una fuente de nitrógeno. c) sales minerales. d) factores de crecimiento y en algunos casos inductores y otros agregados.

El medio formulado no necesariamente debe dar

un abundante desarrollo celular, sino fundamentalmente una máxima concentración de enzima.

Por otro lado, son condiciones esenciales para la producción de la enzima: 1°) la presencia de los genes apropiados para la formación de la enzima en el microorganismo, lo que está limitado y determinado por el genotipo. 2°) la presencia de material adecuado para la formación de la enzima, es decir la presencia de precursores que puedan ser proteínas preformadas o bien determinados aminoácidos que no puede sintetizar el microorganismo. 3°) energía, necesaria para la síntesis de la molécula de proteína que se la obtiene del metabolismo de sustancias agregadas. 4°) la presencia de un inductor en el caso de enzimas inducidas como lo es la alfa amilasa fúngica, ya que su formación depende de la presencia de una determinada sustancia en el medio⁽⁶⁾. El inductor es generalmente el sustrato de la enzima o un componente estrechamente relacionado al sustrato, pero existen casos de inductores que tienen poca o ninguna relación con el sustrato. Otro es el caso de la amilasa bacteriana, que no es una enzima inducida habiéndose demostrado que la secreción de la misma puede ocurrir en ausencia absoluta de almidón u otros carbohidratos.⁽²⁹⁾

Los medios utilizados en la producción industrial de amilasas microbianas, llevan por lo general materias primas naturales. Como se ha dicho, el microorganismo requiere ciertos factores para su desarrollo, como así también factores para la producción de enzima que se encuentran en dichos productos naturales, tales como maíz, cebada, trigo, malta, extracto de soja, extracto de levadura, etc. con los cuales se obtienen considerables rendimientos.

a) Medios utilizados en la producción de amilasas fungicas

La fuente de carbono que se incorpora a los medios de fermentación ejerce una notable influencia sobre la síntesis enzimática.

Tonomura y colaboradores (6) han estudiado el efecto de distintas sustancias que pueden actuar como inductores tales como maltosa, isomaltosa, amilosa, glucosa, sacarosa, almidón, etc. en la producción de amilasa por Aspergillus Oryzae. Ellos demostraron que la isomaltosa fue la más efectiva, aumentando los rendimientos enzimáticos en un 50% con respecto a los obtenidos con almidón y maltosa. En cuanto a la glucosa, observaron que inhibe la biosíntesis, lo que coincide con trabajos de otros investigadores (7) que obtuvieron mayor rendimiento de amilasa cuando la glucosa que contenía el medio había sido casi totalmente consumida.

Utilizando una cepa de Aspergillus niger, Shu y Blackwood (8) establecieron que el rendimiento de amilasa es afectado por la naturaleza de los carbohidratos. Así, en medios con maltosa, almidón o dextrina obtuvieron rendimientos considerables, mientras que empleando glucosa como única fuente de carbono, observaban una marcada disminución.

En general los investigadores (6, 8, 9, 10) coinciden en que el almidón estimula la producción de amilasa en hongos. Tikhomirova (11) observó que incrementando la concentración de dicho carbohidrato hasta un 2%, se aumenta la concentración amiloalítica. Estos investigadores demostraron, por otro lado, que el peso seco de micelio aumenta también con el contenido de almidón del medio.

Van Lanen y Le Mense, (12) estudiando las fuentes de carbono en relación a la producción de alfa amilasa con una cepa de Aspergillus niger N.R.R.L. 337, demostraron que la sacarosa, la maltosa y el almidón dan buenos rendimientos, mientras que la xilosa y la lactosa fueron menos efectivas cuando se adicionan a un medio complejo.

La clase o calidad de la fuente de nitrógeno agregada al medio es también de gran importancia. Shu y Blackwood (8) trabajando con una cepa de Aspergillus niger, establecieron que, a pesar de lo generalmente aceptado, para la producción de enzimas amilolíticas no es necesaria la presencia de proteínas y aminoácidos en el medio, ya que el rendimiento de amilasa aumentaba cuando se usaba acetato de amonio como fuente de nitrógeno. Observaron también que el cloruro de amonio, nitrato de sodio, nitrato de amonio, urea, asparagina y glicina dan bajos niveles enzimáticos cuando son empleados como única fuente de nitrógeno, en cambio utilizando esos compuestos juntamente con pequeñas cantidades de caseína hidrolizada, se estimula la producción.

En sus experiencias de producción de amilasas con una cepa de Aspergillus Oryzae, Corman (13) utilizó fuentes de nitrógeno inorgánicas, tales como nitrato y nitrito de sodio y orgánicas como urea, ácido aspártico y asparagina, obteniendo rendimientos similares con ambos tipos de fuentes.

Musaeva (14) estudió el efecto de fuentes de nitrógeno orgánicas tales como la gelatina, caseína, extracto de maíz y peptona, agregados al medio Czapek,

en la formación de enzimas por una cepa de Aspergillus awamori. Ninguna de las fuentes nitrogenadas dió mayor actividad amilolítica que el control que contenía nitratos.

También han sido estudiadas otras fuentes de nitrógeno complejas tales como hidrolizados de proteínas, harina de soja, sorgo, malta, etc. . Le Men- se, Corman y Van Lanen (12), en un trabajo muy completo, estudiaron la influencia de harina de soja, agua de maceración de maíz y vinazas sobre la producción de alfa amilasa con Aspergillus niger N.R.R.L. 337. Los rendimientos obtenidos con medios que contienen agua de maceración de maíz y vinazas, sin agregado de carbohidratos, fueron muy bajos, pero se logró aumentar considerablemente la actividad enzimática si se reemplazaban esas fuentes nitrogenadas por harina de soja.

Erb y Wistoff (15), con la misma cepa, observaron que el agregado de urea a un medio base de harina de maíz, estimula la producción de alfa amilasa.

Con respecto a las sales que comunmente se usan en la formulación de los medios, podemos mencionar fosfatos, sulfatos, cloruros y nitratos. Estudiando el efecto de distintas sales como cloruro de potasio, sulfato de magnesio, fosfato monopotásico y sulfato ferroso sobre el desarrollo y actividad enzimática de una cepa de Aspergillus, Musaeva (16) observó que el sulfato de magnesio es sumamente importante y que sin esa sal en el medio, se inhibe completamente la síntesis de amilasa.

Por otro lado, investigadores japoneses (17) establecieron que el ión calcio y el ión magnesio incrementan la formación de amilasa por Aspergillus oryzae.

El rol del calcio en la estructura estable de alfa amilasa es mencionado por muchos investigadores. Yoshimura (18) demostró con Aspergillus oryzae su importancia en experiencias de captación de dicho ión con EDTA.

Valle y Oikawa (19, 20) han establecido que la enzima contiene 1 átomo gramo de calcio por molécula gramo de alfa amilasa que es esencial para su actividad, razón por la cual ese ión es indispensable como un componente del medio.

Le Mense, Corman y colaboradores (12) demostraron la influencia favorable del carbonato de calcio como regulador del pH utilizado al 0,5% en un medio que contenía harina de maíz y vinazas. Esto fué confirmado por otros autores que con un medio base de harina de maíz acidificado obtuvieron aumentos notables en la producción de alfa amilasa por Aspergillus niger 337. Los mismos investigadores demostraron que pequeñas cantidades de cloruro de sodio y cloruro de potasio actúan estimulando la producción de amilasa por esa cepa. (15).

Asimismo, Seliber y Golovkina (21) observaron que el agregado de cloruro de sodio del 0,5 al 1,5 % a un medio de cultivo que contenía glucosa, incrementa la producción de enzima, atribuyendo dichos resultados a un efecto de presión osmótica.

Comparando los efectos de distintas sales inorgánicas y de vitaminas, sobre la formación de amilasa por Aspergillus oryzae, Mihashi y Tatsumi (22) establecieron

que el cloruro de sodio, el ácido ascórbico y el ácido para-aminobenzoico, fueron los más efectivos para la producción de la enzima.

Se han mencionado otras sustancias en la formulación de medios con el objeto de aumentar los rendimientos enzimáticos, tales como sales del ácido fítico, fluoruros y agentes tensioactivos. Así, Takami y Wataru (23) observaron que la actividad amilolítica de varias cepas de *Aspergillus*, es incrementada en medios conteniendo trazas de ~~fluoruro~~ fluoruro de sodio, fluoruro de calcio y fluoruro de potasio. Estos mismos investigadores (24) determinaron que la actividad amilolítica es también incrementada por adición de vitaminas B₁, B₂ y B₆, en cambio la vitamina C hace decrecer la actividad. Yamada y Casey (25), trabajando con la cepa N.R.R.L. 337, de *Aspergillus niger*, observaron que el agregado de fitato de calcio o ácido fítico a un medio sintético, incrementa la producción de alfa amilasa.

Reese y Maguirre (26) estudiaron la influencia de algunos tensioactivos sobre la producción de amilasa por varias cepas de hongos, observando un efecto favorable de dichas sustancias. Por otro lado, Takahashi, Abekawa y Yamada (27) analizaron la influencia de tensioactivos noiónicos sobre la forma de crecimiento y la producción de amilasa por una cepa de *Aspergillus niger*. Con algunos tensioactivos obtuvieron mayor rendimiento enzimático y forma de crecimiento tipo filamentosa, y con otros observaron una disminución en la producción enzimática, con predominio de la forma de crecimiento tipo "pellets".

De la bibliografía comentada surgen las siguientes conclusiones con respecto a los componentes fundamentales de los medios:

- 1°) La fuente de carbono puede tener, aparte de sus funciones específicas, incluyendo la energética, un efecto inductor o represor. Como ejemplo del primer caso tenemos al almidón o la maltosa, y del segundo caso la glucosa. La fuente utilizada de preferencia es el almidón.
- 2°) Con respecto a las fuentes de nitrógeno las referencias son amplias y a menudo contradictorias. Debe tenerse en cuenta en primer lugar las diferencias debidas a las cepas. En segundo lugar es necesario distinguir entre experiencias de producción o simplemente de formación. Por otra parte, como es bien conocido, la influencia de una fuente puede depender de la presencia de otras o de las condiciones operativas empleadas. Aunque existen referencias bibliográficas sobre la posibilidad de utilizar fuentes de nitrógeno inorgánicas, se considera de mayor importancia, dada la naturaleza de los trabajos realizados y del enfoque de los mismos, la utilización de fuentes de nitrógeno orgánicas de origen natural como el agua de maceración de maíz, residuos de destilería o bien harina de soja o su extracto.
- 3°) La presencia de determinadas sales es fundamental para la producción de la enzima. Es evidente que, como ocurre con todos los medios es necesario el agregado de fósforo, azufre, potasio y magnesio. En el caso que nos ocupa es además esencial la presencia de calcio. No es necesaria la adición de otros

elementos estimulantes mencionados, como el manganeso, zinc, hierro, etc. en razón de que se encuentran en concentración suficiente en las fuentes naturales utilizadas, como ocurre en la harina de soja.

b) Medios utilizados en la producción de amilasas bacterianas

Estudiando el efecto de distintos glúcidos sobre la producción de alfa amilasa de Bacillus subtilis, Fukumoto (28) observó que la lactosa y la galactosa son los estimulantes más efectivos en la síntesis de la enzima. La glucosa y la fructosa favorecen la máxima respiración pero no son eficaces para la síntesis. Se estableció que la glucosa, en elevadas concentraciones estimula la respiración celular, pero inhibe la formación de alfa amilasa por un efecto de represión catabólica. No obstante cuando se la emplea en bajas concentraciones puede estimular su biosíntesis.

Según Coleman y colaboradores (29), la maltosa es la mejor fuente de glúcidos para Bacillus subtilis, siguiéndole luego el almidón, el glicerol y la glucosa. Por otro lado, para otra cepa de Bacillus subtilis, Windish (30) afirma que la utilización de glucosa, fructosa y sacarosa estimula el crecimiento pero reduce la producción de amilasa; a su vez observa lo inverso para glucógeno, lactosa, galactosa y xilosa.

En lo que se refiere a las fuentes nitrogenadas, Nomura y colaboradores (31) han ensayado el efecto de varias sustancias sobre la formación de amilasa, utilizando células lavadas de Bacillus subtilis. El hidrolizado de caseína juntamente con la glucosa, estimula la producción de amilasa, pero la preparación más activa de las ensayadas, fué un extracto acuoso de células.

Tsuru (32) establece que la glicina y sus péptidos inhiben la síntesis de amilasa por Bacillus

subtilis, aunque no explican los motivos. Este efecto inhibitor de la glicina puede ser suprimido por adición de alanina o metionina.

El efecto de proteínas como fuente de nitrógeno agregadas al medio, depende en gran parte de su constitución en aminoácidos. Así, Fukumoto (28) establece que las fuentes nitrogenadas más adecuadas para la producción enzimática son de naturaleza compleja como los hidrolizados de caseína, extractos de soja, gelatina, extractos de levadura y otros. Esto ha sido confirmado por muchos otros investigadores.

Yohikawa y Maruo (33) extrajeron un factor activo de células de Bacillus subtilis que fué purificado. Este factor, que por su comportamiento se asemeja a alquildiaminas, estimula la formación de alfa amilasa por Bacillus subtilis. Así mismo Nomura (31) encontró que ciertas aminos como la putrescina, cadaverina y espermina estimulan la producción de la enzima.

En cuanto a los constituyentes inorgánicos, han sido mencionados varios iones que tienen efecto estimulante sobre la formación de alfa amilasa, tales como el zinc, hierro, sodio y manganeso (28, 48). El ión calcio que forma parte de la molécula de la enzima, y es importante en la estabilidad de la misma, debe estar presente en el medio.

Según Stein y Fischer (34) el ión zinc sería también parte integrante de la molécula de alfa amilasa. Este metal induce la dimerización de la molécula de la enzima. La formación del complejo zinc-proteína parece ser un caso particular de la alfa amilasa de Bacillus subtilis.

Por otro lado los fosfatos han demostrado tener un efecto estimulante en la producción de amilasa por Bacillus subtilis (35,28).

Con respecto a la influencia de otras sustancias sobre la formación de amilasa, Nomura, Maruo y Akabori (36), estudiaron el efecto de la adición de polietilenglicol al medio de cultivo de una cepa de Bacillus subtilis, observando que la velocidad de formación de la enzima es acelerada por el polietilenglicol a una concentración del 10 %.

Resumiendo la bibliografía consultada sobre composición de medios de cultivo para la producción de amilasa bacteriana, surgen conclusiones generales similares que para el caso de enzimas fúngicas.

- 1º) Fuentes de carbono adecuadas son la lactosa y el almidón.
- 2º) Las fuentes de nitrógeno preferidas son las de naturaleza orgánica y natural o sea que nuevamente nos encontramos con la conveniencia de la utilización de los residuos de destilería o de la harina de soja, de preferencia ésta última en forma de extracto.
- 3º) Con respecto a las sales, se destaca nuevamente la importancia de los elementos esenciales ya mencionados, incluyendo al calcio.

En la totalidad de los trabajos recopilados, tanto en lo que se refiere a amilasa fúngica como bacteriana, se dan únicamente valores de actividad enzimática volumétrica; por lo tanto no es posible saber, como se dijo anteriormente, si los componentes estudiados aumentan realmente la biosíntesis de la enzima o si lo que aumenta es la concentración de microorganismo.

La única referencia bibliográfica relacionada

con nuestro interés es la de Tikomirowa (11), en la cual se menciona que el peso seco de micelio aumenta con el contenido de almidón del medio, pero no se dan datos sobre la influencia del almidón en la actividad enzimática específica.

IV.- CONDICIONES DE OPERACION

Es importante establecer en cada caso las condiciones óptimas del proceso, en relación a la producción enzimática. Es así que, parámetros como aeración, agitación, pH y temperatura deben ser fijados convenientemente. A continuación se mencionan brevemente los aspectos esenciales vinculados a las condiciones de operación.

a) Amilasa fúngica

En un trabajo de investigación realizado en equipos de fermentación de 500 y 3000 litros de capacidad (37), se estudió la influencia de la aeración y agitación en la producción de amilasa fúngica utilizando una cepa de Aspergillus niger. Los resultados mostraron que aumentando la potencia de agitación, de 0,5 a 1,5 wattios por litro, se logra un aumento de la concentración de oxígeno disuelto y de la relación consumo a demanda de oxígeno. Las mayores concentraciones de actividad enzimática se obtienen empleando una potencia de agitación intermedia (0,7 w/l).

Un aspecto que se considera importante y que debe ser tenido en cuenta en la producción de enzimas fúngicas, es la forma de crecimiento que pueden adoptar los hongos. Como consecuencia de la forma de crecimiento se producen cambios físicos y fisicoquímicos en los caldos, que pueden modificar sensiblemente fenómenos de transferencia que se traducen finalmente en alteraciones del metabolismo celular, afectando los rendimientos del proceso.

La forma de crecimiento adoptada por los hongos depende, entre otros factores, de la cantidad de siembra. En general, cuando el número de esporos sembrados es inferior a 10^6 esporos por mililitro, se obtiene desarrollo en forma de conglomerados denominados comunmente "pellets". En trabajos realizados anteriormente en ésta Facultad (38), los niveles más altos de alfa amilasa se observaron en caldos con desarrollo tipo filamentososo.

En lo que se refiere a pH, Tsuchiya, Corman y Koepsell (39), han estudiado el efecto del pH sobre la estabilidad y producción de alfa amilasa con una cepa de Aspergillus niger. Ellos observaron que el rendimiento de alfa amilasa fúngica decrece cuando el pH inicial en el medio de cultivo es inferior a 4,5. Por otro lado, Roy (40) establece un rango óptimo de estabilidad de amilasa fúngica entre pH 5,5 y 8,5.

b) Amilasa bacteriana

En experiencias realizadas en nuestra Facultad, utilizando una cepa de Bacillus subtilis, se demostró la importancia de la agitación en los rendimientos de la enzima. En ensayos en fermentadores, al aumentar la velocidad de agitación de 380 a 970 rpm, se obtuvo un aumento de 2,5 veces en la actividad amilolítica (41).

Markbanen y Bailey (42), trabajando con otra cepa de Bacillus subtilis estudiaron el efecto de velocidades de agitación entre 750 y 1000 rpm, sobre el rendimiento enzimático. En éste caso, la menor velocidad estudiada (750), fué la más favorable para la producción de amilasa.

En otros estudios realizados sobre la influencia del pH y aeración en la formación de amilasa (43), se demostró que la producción de la enzima puede ocurrir sin aeración después que se alcanza la fase estacionaria de desarrollo, si se controla el pH llevándolo a los valores correspondientes a los ensayos aereados.

Zajic y Liu (44) determinaron el efecto de mezclas de aire y dióxido de carbono sobre la síntesis de amilasa. Estos investigadores observaron que el aire atmosférico conteniendo de 2,5 a 13 % de CO_2 v/v, inhibe la síntesis de alfa amilasa durante las primeras 48 horas pero supera luego al testigo (con aire solamente) observando la máxima actividad para la mezcla con 2,5 % a los 4 días. Mezclas con 17 % de CO_2 inhibe la síntesis de amilasa.

En un trabajo muy reciente sobre producción de amilasa bacteriana, Markbanen y Bailey (42), estudiaron la influencia de la temperatura en un rango de 30 a 42,5°C. Ellos demostraron que el rendimiento de amilasa aumenta con el aumento de temperatura, llegando al máximo valor de actividad enzimática a los 40°C.

PARTE EXPERIMENTAL

I.- AMILASA FUNGICA

a) Microorganismo

El microorganismo utilizado corresponde a una cepa de Aspergillus niger del N.R.R.L. identificada con el número 337. Para su conservación se la mantuvo en medio Czapek-agar (45) bajo vaselina. Se procedió de la siguiente forma: sobre medio Czapek-agar solidificado en forma vertical en tubo de ensayo, se sembraron esporos y se incubaron a 30°C. Después de una semana y estando ya desarrollado el micelio de fructificación con abundantes esporos de color negro, se adicionó a cada tubo una cantidad de vaselina líquida estéril como para formar una capa de dos centímetros de altura.

b) Inóculo

En todas las experiencias se utilizó como inóculo una suspensión de esporos en agua estéril adicionada de humectante. Esta suspensión se obtuvo como sigue: se sembraron esporos en tubos inclinados con medio Czapek-agar y se mantuvieron en estufa a 30°C durante una semana. El contenido de cada tubo se suspendió en tres a cuatro mililitros de agua destilada estéril y se transfirió a un erlenmeyer de 500 ml de capacidad que contenía 50 gramos de cebada perlada previamente adicionada de 5 ml de una solución esporulante (asparagina 1g, glicerina 30g, agua destilada 1000ml). Este erlenmeyer se incubó a 30°C durante una semana. A continuación se adicionó agua destilada estéril que

contenía tres a cuatro gotas de tween 80, para facilitar la suspensión de los esporos.

La siembra se efectuó de forma tal de alcanzar una concentración inicial en el medio del orden de 10^6 esporos por mililitro, con lo que se asegura un desarrollo del tipo filamentosos. En todos los casos, antes de realizar la siembra se determinó el número de esporos presentes en la suspensión inoculante con el propósito de transferir en cada ensayo, una suspensión con igual número de esporos.

c) Medios de Cultivo

Los medios empleados se indican en la Tabla I. Los valores indicados en dicha Tabla corresponden a la concentración inicial de cada componente. Cuando se indica un asterisco (*) significa que se hicieron agregados periódicos durante el proceso, que se detallan en cada caso en particular.

La composición del medio base fué decidida de acuerdo a las consideraciones generales ya comentadas, y con la idea de disponer de un medio que facilitara la determinación del microorganismo (sin sólidos en suspensión). Por ese motivo se ha evitado el uso de harinas o cereales que, aunque podrían aumentar los rendimientos, ocasionarían dificultades en la determinación mencionada.

El pH inicial de los medios fué ajustado a 7. La elección de éste valor se decidió en base al rango óptimo de estabilidad de la amilasa fúngica y de formación de la misma por la cepa empleada, que de acuerdo a experiencias realizadas en nuestra Facultad, está entre 7 y 8.

El extracto de soja utilizado en la composición de los medios se obtuvo por tratamiento de 1 parte de harina de soja desengrasada con 10 partes de una solución de hidróxido de sodio al 0,1 %, en autoclave a vapor fluente, durante 2 horas. Una vez enfriado a temperatura ambiente se centrifugó y el líquido límpido obtenido fué llevado a sequedad en estufa de aire a 40°C y posteriormente molido y tamizado.

Cuando se analizó la influencia de las distintas sustancias estudiadas, éstas se agregaron a los medios al comienzo del proceso o en forma periódica, según se indica en cada caso.

El agregado periódico de las fuentes de carbono y de nitrógeno o de ambas en forma conjunta, se efectuó con dos finalidades. La primera para determinar la influencia de mayores concentraciones de algunas fuentes, pero adicionadas durante el transcurso del proceso, y la segunda con el objeto de comparar los resultados de experiencias realizadas con la misma cantidad de una fuente determinada, pero agregada en un caso al comienzo del proceso y en el otro durante el transcurso del mismo.

d) Determinaciones Analíticas

Determinación de pH. La determinación de pH fué efectuada por medio de un medidor de pH marca Metrohm Harisen, modelo E 396 B.

Determinación del Número de Esporos. El recuento del número de esporos fué efectuado en una cámara de Neubauer.

Determinación de la Actividad Amilolítica. El método usado es el de Sandstedt, Kneen y Blish (46), que se basa en la acción de la enzima sobre un sustrato de almidón a 30°C, determinándose la hidrólisis producida por medida del tiempo que tarda la mezcla enzima-sustrato adicionada de solución iodo-ioduro de potasio en igualar a un color tipo. El método original utiliza un sustrato formado por almidón soluble, al cual se le incorpora una solución de beta amilasa. En el presente trabajo se ha empleado una modificación del método, ya practicado con anterioridad en investigaciones en ésta Facultad, que consiste en usar como sustrato una solución de almidón soluble solamente, sin agregado de beta amilasa. Los resultados obtenidos se llevan a Unidades S.K.B. por mililitro, multiplicándolos por un factor que surge de determinaciones comparativas realizadas con una enzima de título conocido (Mylose 100 Cía Wallerstein de U.S.A.) usando dos sustratos distintos: uno constituido por una solución de almidón soluble y el otro por una solución del mismo almidón, adicionada de un extracto de harina de trigo duro que es una fuente de beta amilasa. De la razón entre éstos dos resultados, es decir, actividad amilolítica con sustrato almidón mas beta amilasa, sobre la actividad amilolítica obtenida con almidón sin beta amilasa, surge dicho factor . En nuestro caso utilizando almidón soluble Litner's de B.D.H. el factor resultó ser igual a 8.

Las determinaciones se realizaron en el líquido sobrenadante obtenido por centrifugación de las muestras. Los valores de actividad enzimática se expresan como actividad enzimática volumétrica (A.E.V.)

en unidades S.K.B. por mililitro y como actividad enzimática específica (A.E.E.) en unidades S.K.B. por gramo de peso seco de microorganismo.

Determinación de Microorganismo. La determinación de microorganismo se efectuó en todos los casos por gravimetría, empleando el volumen total de medio contenido en un erlenmeyer, por filtración a través de papel. De ésta manera se evitan errores que son comunes cuando se trabaja con hongos filamentosos al extraer muestras de pequeño volumen. El sedimento microbiano obtenido se lavó tres veces con solución de ácido acético diluida y tres veces con agua destilada, con el fin de eliminar el carbonato de calcio y demás componentes del medio. Finalmente fué colocado en pesafiltro previamente tarado, secándolo en estufa a 90°C durante 6 horas.

Los resultados se expresan en todos los casos en gramos por litro (g./l).

e) Condiciones de Operación

Las experiencias fueron realizadas en erlenmeyers lisos de 1000 mililitros de capacidad, conteniendo 200 ml de medio. Los erlenmeyers fueron esterilizados en autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

Para el desarrollo del proceso los erlenmeyers se colocaron en agitador rotatorio a 235r.p.m. (excentricidad 2,5 cm) y a temperatura constante de 30°C.

f) Resultados y Discusión

Se realizó un conjunto de experiencias preliminares sin determinación de la concentración de microorganismo, con el objeto de verificar algunos resultados

ya mencionados en la bibliografía, como son los que se refieren a influencia del inductor y concentración de extracto de soja y las distintas relaciones fuente de carbono/ fuente de nitrógeno.

A fin de establecer el comportamiento de almidón, maltosa y lactosa como inductores, se programó un experimento con tres series de ensayos: 1) serie testigo con almidón (medio n°1), 2) serie con maltosa y 3) serie con lactosa (medios n° 1a y 1c respectivamente). Los resultados indicados en la tabla II, muestran que la maltosa es tan buen inductor como el almidón, dado que los rendimientos son similares. En cambio se obtuvieron valores de actividad enzimática menores para los medios conteniendo lactosa.

Se realizaron también experiencias preliminares con seis series de ensayos utilizando los medios cuya composición corresponde a los números 2a, 2b (testigo), 2c, 2d, 2e y 2f de la Tabla I. Como puede observarse en ésta, se mantuvo constante en el medio la concentración de la fuente de carbono y se varió la cantidad de extracto de soja desde 25 a 150 gramos por litro, siendo la relación fuente de carbono/ fuente de nitrógeno de 1/1,25 a 1/7,5. Los valores de actividad enzimática volumétrica obtenidos, aumentan a medida que aumenta la concentración de extracto de soja en los medios, llegando a un máximo de 116 Unidades/ml para los medios con 150 gramos por litro (Tabla III).

Todos los resultados concuerdan con las observaciones mencionadas en la bibliografía, que como se dijo anteriormente no incluyen determinaciones de actividad específica.

TABLA II

Influencia de distintos inductores

<u>Serie</u> <u>Horas de</u> <u>proceso</u>	<u>Testigo</u>	<u>Maltosa</u> <u>A.E.V. (U.S.K.B./ml)</u>	<u>Lactosa</u>
48	40,0	40,0	-
72	48,0	46,4	12,0
96	56,0	58,0	16,0
120	60,0	60,0	19,2
144	52,0	56,0	15,0

A.E.V.: Actividad Enzimática Volumétrica.

Los datos que figuran en esta tabla, como todos los que se consignan en este trabajo, tanto de actividad enzimática como de pH y peso seco en las distintas series de experiencias son, en todos los casos, promedios de valores de ensayos realizados por duplicado o triplicado.

TABLA III

Influencia de distintas relaciones fuente de Carbono/ fuente de Nitrógeno

<u>Serie</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
Horas de proceso	A. E. V. (U.S.K.B./ml)					
48	40,0	50,0	58,0	68,8	60,0	68,0
72	45,0	56,0	73,6	76,8	76,8	80,0
96	56,6	78,6	96,0	100,0	106,4	108,0
120	60,0	87,2	102,4	106,8	112,8	116,0
144	53,8	80,0	93,0	103,0	106,4	106,0

1) Influencia de agregados periódicos de la fuente de carbono

Las primeras experiencias se realizaron sin determinación de microorganismo y con el objeto de establecer si el agregado de una cantidad adicional de una fuente de energía incorporada al medio de cultivo durante el proceso, conduce a la obtención de caldos con mayor actividad enzimática. Con tal fin se realizaron tres series de ensayos: la primera con el medio base n° 1, Testigo y las otras dos series con los medios 3a y 3b respectivamente. A partir de las 48 horas de comenzado el proceso y cada 24 horas se efectuaron los agregados de las fuentes de carbono. A la serie 3a se le agregaron 4 gramos totales de almidón (20 g./l) en 4 veces, es decir 1 gramo suspendido en 3 ml de agua destilada estéril por vez. A la serie 3b, la misma cantidad de sacarosa, siendo cada agregado de 1 gramo disuelto en 5 ml de agua destilada estéril.

Los resultados se indican en la figura n° 1, donde se observan mayores valores de actividad enzimática volumétrica en series en las cuales se efectuaron agregados periódicos de sacarosa y almidón.

Otra serie de ensayos se realizó con el fin de comparar la actividad enzimática obtenida en medios que inicialmente contenían almidón y a los cuales se agregó sacarosa periódicamente, y aquellos que inicialmente contenían sacarosa y a los que se agregó almidón.

La composición de los medios utilizados se indica en la Tabla I con los n° 4a y 4b. Se realizaron tres series de ensayos: la primera serie Testigo T empleando el medio base n° 1; la segunda el medio 4a al cual se le incorporaron 30 gramos por litro de sacarosa, y la tercera

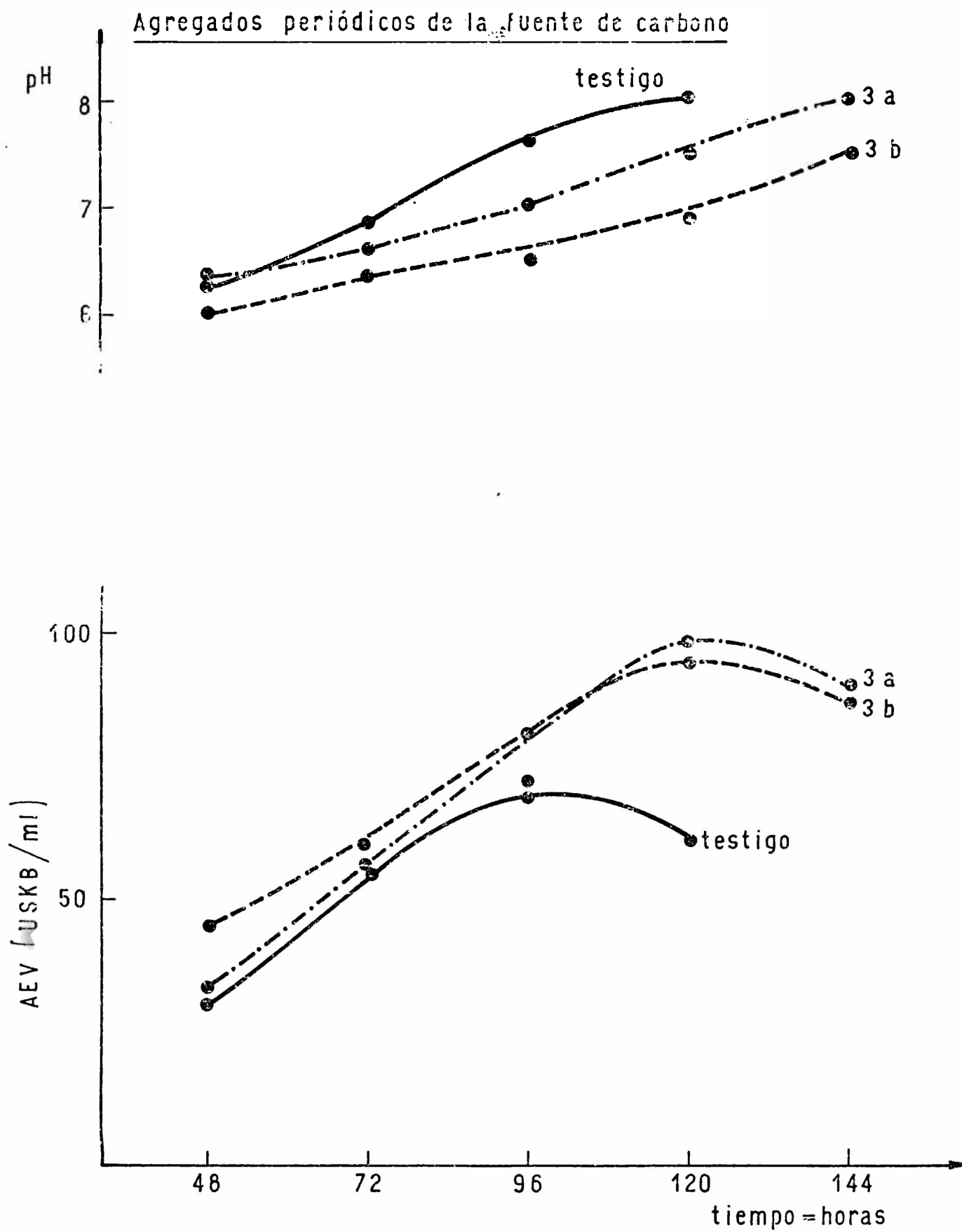


Figura n° 1

serie con el medio 4b al que se le agregaron 20 gramos por litro de almidón.

Los agregados se realizaron cada 24 horas y a partir de las 48 horas de iniciado el proceso. A la segunda serie se le hicieron 4 agregados de 1,5 gramos de sacarosa cada uno, disueltos en 5 ml de agua destilada estéril. A la tercera serie se le hicieron también 4 agregados de un gramo de almidón cada uno, suspendido en 3 ml de agua destilada estéril.

En la figura n° 2 se representan los valores obtenidos, donde se pone de manifiesto nuevamente que los agregados periódicos de ambas fuentes de carbono producen caldos con mayor actividad enzimática volumétrica.

En cuanto al pH, se puede observar que la evolución del mismo es tal, que las curvas se encuentran por debajo del pH presentado en los ensayos testigos. Esto puede ser debido a una mayor concentración de ácidos orgánicos (posiblemente glucónico) producidos por la cepa al aumentar la concentración de la fuente de carbono.

En las experiencias que se mencionan a continuación se procedió en forma similar, pero efectuando ésta vez determinación de microorganismo.

En primer lugar se realizaron dos series de ensayos para estudiar la influencia del agregado periódico de sacarosa, que denominamos T (testigo) y S (con agregado de sacarosa) empleando el medio base n° 1. A partir de las 48 horas de iniciado el proceso, se comenzaron los agregados de sacarosa a la serie S, que se repitieron cada 24 horas. En total fueron 4 agregados de 1 gramo de sacarosa por vez (20 g./l), disuelto en 5 ml de agua destilada estéril.

Los resultados obtenidos para ambas series se muestran en la Tabla IV.

Agregados periódicos de la fuente de carbono

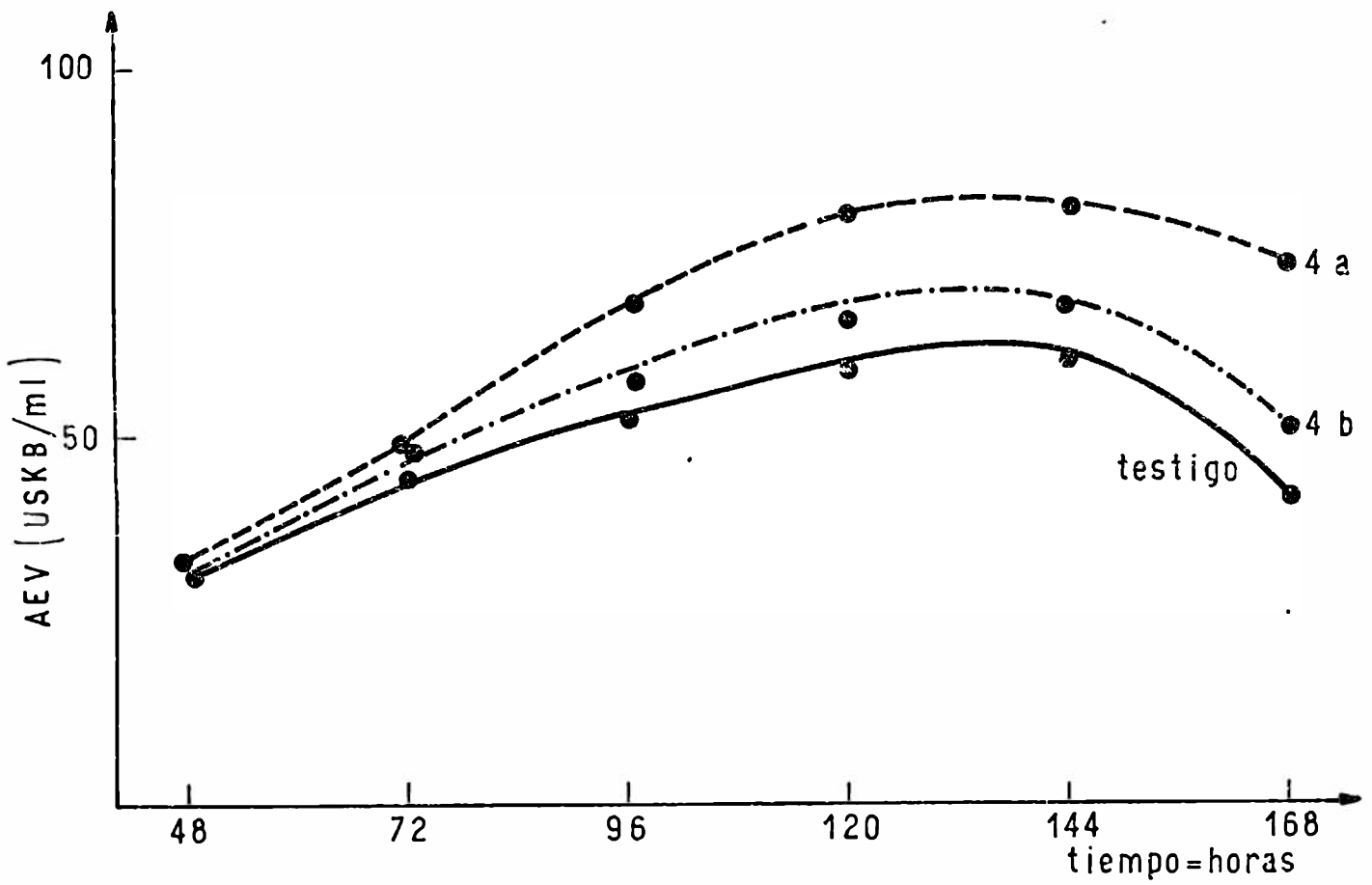
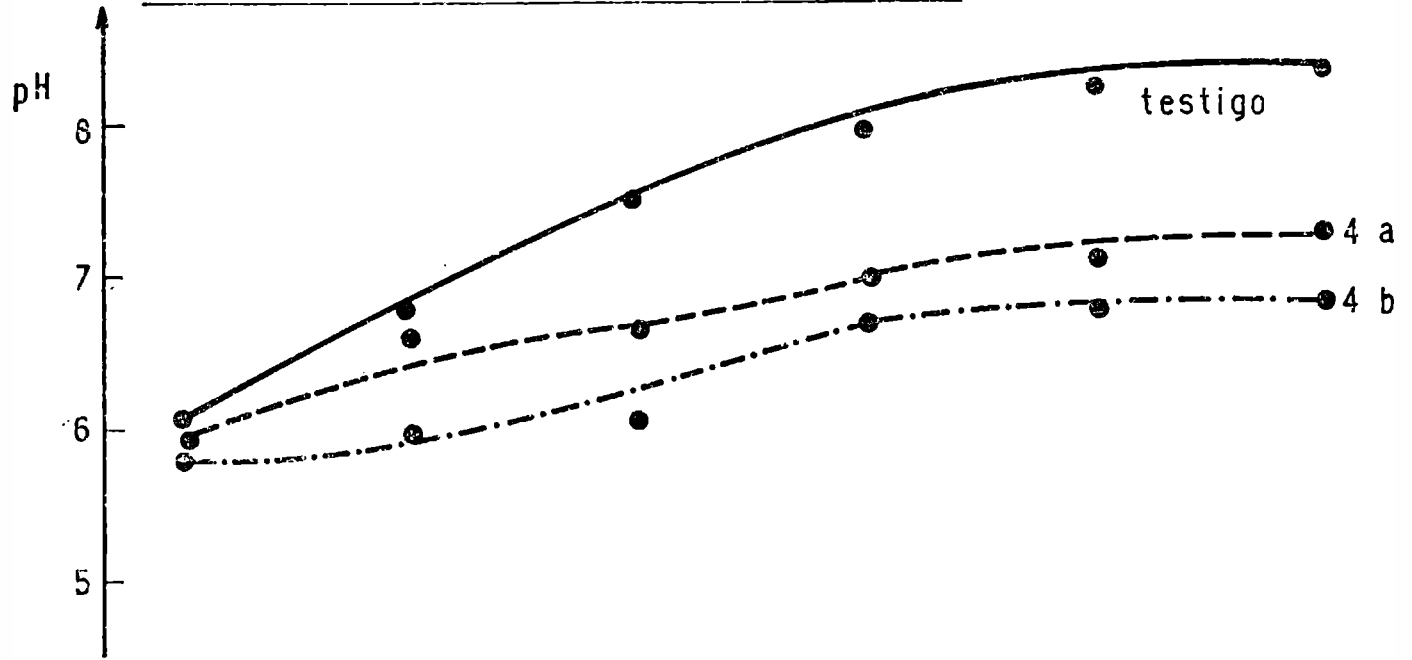


Figura nº 2

TABLA IV

Influencia de agregados periódicos de sacarosa

<u>Serie</u>	<u>T</u>				<u>S</u>			
	pH	A.E.V. (USKB/ml)	P.S. (g/l)	A.E.E. (USKB/g)	pH	A.E.V. (USKB/ml)	P.S. (g/l)	A.E.E. (USKB/g)
24	5,9	16,0	-	-	6,0	-	-	-
48	6,0	17,6	35	500	6,1	-	-	-
72	6,5	29,6	32	908	6,9	32,0	34	913
96	7,6	40,0	26	1520	7,4	48,0	35	1366
120	7,9	48,0	25	1900	7,5	53,6	37	1438
144	8,0	48,0	26	1800	7,6	56,8	38	1320

A.E.V.: Actividad Enzimática Volumétrica

p.s.: peso seco

A.E.E.: Actividad Enzimática Específica

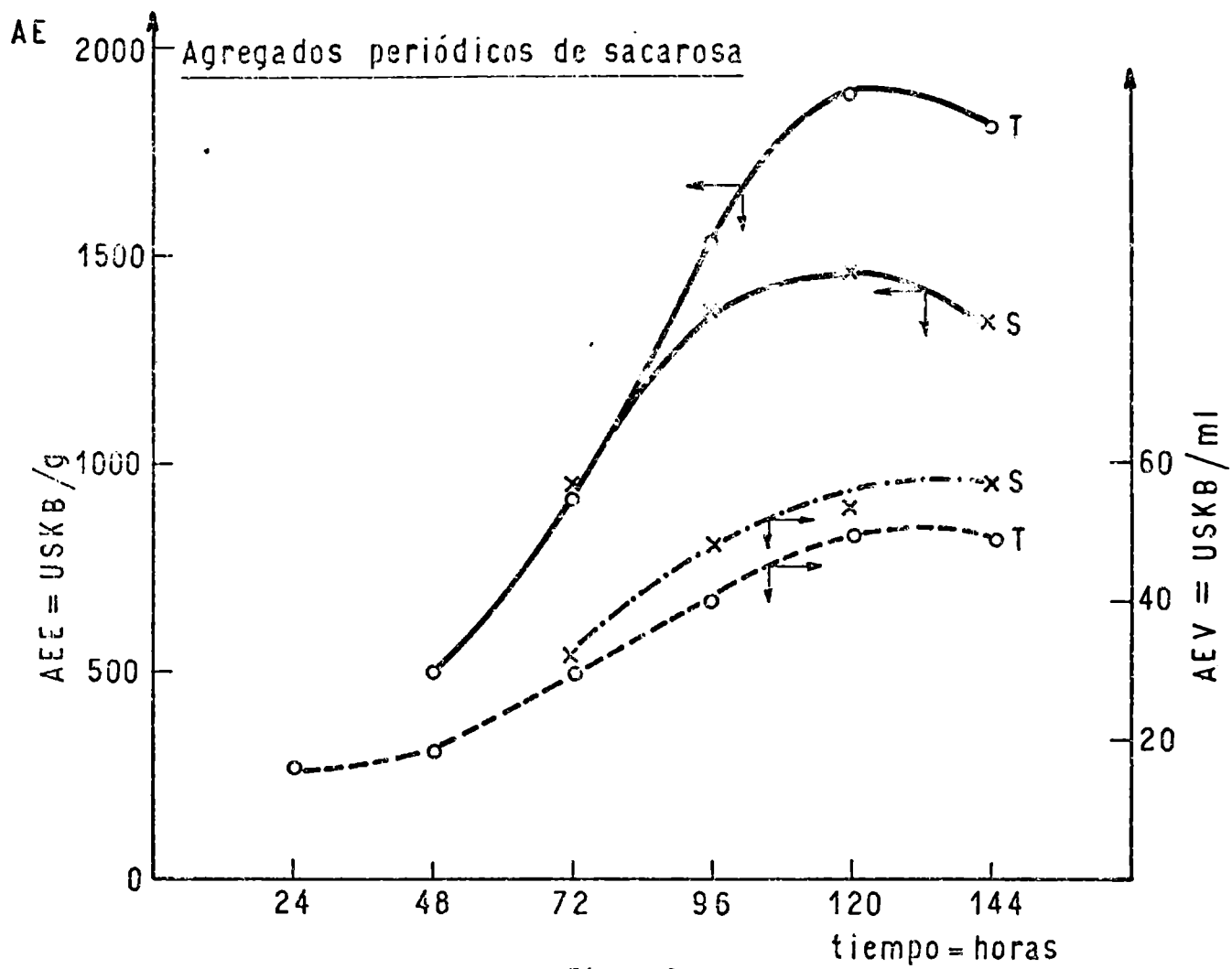


Fig. nº 3

De la observación de los resultados indicados en la Tabla IV y de su representación gráfica (figura nº 3) se deduce que la mayor actividad enzimática de la serie S se debe a una mayor concentración de microorganismo. Por el contrario la actividad enzimática específica es mayor en la serie testigo T.

En otra experiencia similar a la anterior, se realizaron los ensayos con agregados periódicos de almidón, empleando también el medio base nº 1. Se efectuaron dos series de ensayos, serie T(testigo) y serie A (con agregado de almidón). Los agregados comenzaron a las 48 horas de iniciado el proceso y se repitieron cada 24 horas. Se incorporaron 20 g./l totales de almidón a la serie A, en 4 veces de 1 gramo cada una, suspendido en 3 ml de agua destilada estéril. En la Tabla V se indican los valores obtenidos y en la figura nº 4 su representación gráfica .

Como en el ensayo anterior, el valor más alto en actividad enzimática volumétrica que corresponde a la serie A, es debida a una mayor cantidad de microorganismo, observándose así mismo una actividad específica mayor en el caso de la serie testigo T.

De éstas experiencias se deduce que una mayor cantidad de hidrato de carbono incorporada al medio, favorece solamente el crecimiento del microorganismo y no la biosíntesis de la enzima.

2) Influencia de los agregados periódicos de la fuente nitrogenada

Se realizaron tres series de ensayos empleando los siguientes medios : la serie testigo T con el medio

TABLA V

Influencia de agregados periódicos de almidón

Serie	T				A			
	PH	A.E.V. (USKB/ml)	P.S. (g/l)	A.E.E. (USKB/ g)	PH	A.E.V. (USKB/ml)	P.S.	A.E.E. (USKB/l)
24	6,0	18,0	-	-	6,1	-	-	-
48	6,3	26,0	24	918	6,5	-	-	-
72	7,0	28,0	32	1000	6,7	45	37	1050
96	7,6	45,0	30	1400	7,3	53	38	1300
120	7,9	56,8	29	2000	7,4	60	42	1380
144	8,2	56,0	29	1900	7,5	60,9	41	1400

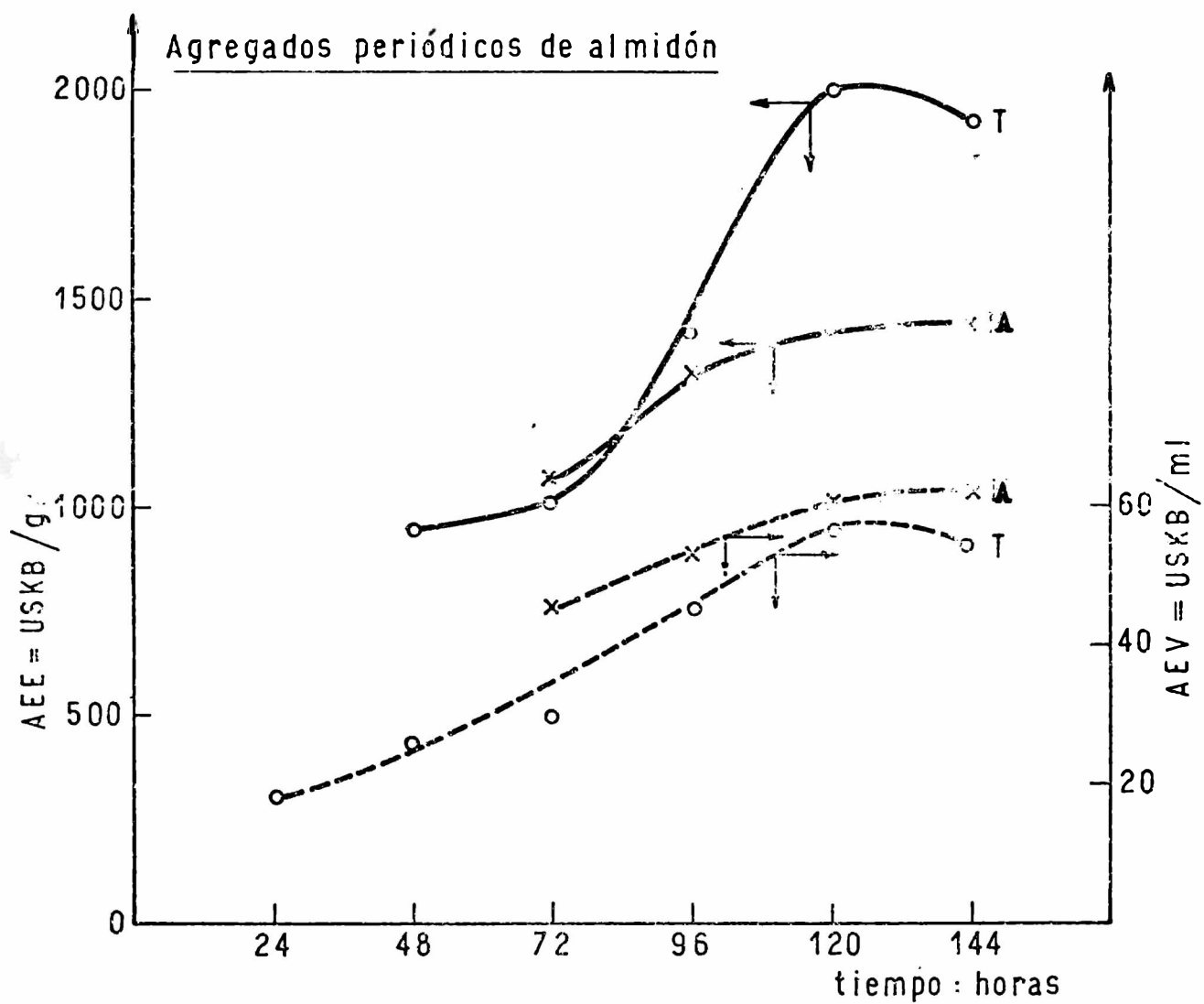


Fig. nº 4

base nº 1, y las series 1 y 2, con los medios indicados en la Tabla I como 5a y 5b respectivamente. A la serie 1 se le agregó a partir de las 48 horas de iniciado el proceso y cada 24 horas, 50 g./l de extracto de soja, de manera tal que llegara a una concentración de 100g./l, semejante al contenido inicial del medio de la serie 2. Se efectuaron 4 agregados de 2,5 gramos de extracto de soja por vez, disueltos en 10 ml de agua destilada estéril.

Los resultados obtenidos se indican en la Tabla VI. Como puede observarse, los valores de actividad enzimática específica son semejantes para las series 1 y 2, lo cual podría ser el resultado de que ambas, al final del proceso, tienen composición similar. En cuanto a la concentración de microorganismo resulta mayor en dichas series que en la indicada para la serie T, lo cual nos permite deducir que una concentración superior de extracto de soja favorece únicamente el crecimiento del microorganismo.

3) Influencia de los agregados periódicos conjuntos de las fuentes de carbono y nitrogenada

Se realizaron tres series de ensayos: T, 1 y 2. La serie testigo T, con el medio base nº 1 y las series 1 y 2, con los medios nº 6a y 6b. A los erlenmeyers de la serie 2 se le agregaron a partir de las 48 horas de iniciado el proceso y cada 24 horas, 25 g./l totales de extracto de soja y 10 g./l totales de almidón, de tal manera que la composición de éste medio de la serie 2, llegue a igualarse al correspondiente de la serie 1. Se efectuaron 2 agregados de 1 gramo de almidón por vez, suspendido en 3 ml de agua destilada estéril y 2 agregados de 2,5 gramos de extracto de soja por vez, di-

TABLA VI

Influencia de agregados periódicos de extracto de soja

<u>Serie</u>	<u>1</u>					<u>2</u>						
	<u>pH</u>	<u>A.E.V.</u> (USKB/ml)	<u>P.S.</u> (g/l)	<u>A.E.E.</u> (USKB/g)	<u>pH</u>	<u>A.E.V.</u> (USKB/ml)	<u>P.S.</u> (g/l)	<u>A.E.E.</u> (USKB/g)	<u>pH</u>	<u>A.E.V.</u> (USKB/ml)	<u>P.S.</u> (g/l)	<u>A.E.E.</u> (USKB/g)
48	6,3	30,0	33,2	900	6,0	28,3	24,5	1150	6,35	26,6	22,0	1200
72	7,3	34,8	29,0	1200	7,6	45,8	32,6	1400	7,8	43,7	32,4	1350
96	7,5	38,6	25,8	1500	7,85	54,0	31,6	1700	8,0	58,5	32,5	1800
120	7,8	53,8	24,4	2200	7,95	56,0	28,0	2000	8,2	59,8	31,5	1900
144	8,2	46,5	22,0	2100	7,9	56,0	28,0	2000	8,3	60,0	30,0	2000

sueltos en 10 ml de agua destilada estéril.

Los resultados se indican en la Tabla VII. Como se observa en dicha tabla, los valores de actividad enzimática para las series 1 y 2 son similares, mientras que la serie testigo T alcanza los mayores niveles de actividad enzimática específica.

También aquí las series 1 y 2 muestran mayor concentración de microorganismo, lo que nos lleva a pensar que los agregados conjuntos de las fuentes de carbono y de nitrógeno, favorecen únicamente el crecimiento de microorganismo, sin influir en el valor de la actividad enzimática específica.

4) Influencia de tensioactivos y otras sustancias

Considerando que algunos tensioactivos y otras sustancias pueden afectar la excreción de enzimas microbianas, se realizaron ensayos con la finalidad de observar el efecto que sobre la actividad amilolítica de la cepa ensayada tuvieran 2 tensioactivos: el polioxietileno sorbitan mono-oleato (tween 80: p.e. 1,08 é índice HLB: 15) y el sorbitan monopalmitato (span 40: p.e. 1,03 é índice HLB: 6,7) (47), 2 hidrocarburos como el decano y hexadecano, ácido oleico y sales de manganeso.

Las experiencias con los tensioactivos se realizaron en tres series de ensayos: la primera serie testigo T, con el medio base nº 1 ; la segunda serie Tw y la tercera serie Sp con los medios indicados en la Tabla I como 7a y 7b respectivamente.

Los resultados obtenidos se indican en la Tabla VIII.

TABLA VII

Influencia de agregados perióxicos conjuntos de las fuentes de carbono y nitrogenada

<u>Serie</u>	<u>I</u>				<u>2</u>			
	pH	A.E.V. (USKB/mL)	p.s. (g/l)	A.E.E. (USKB/g)	pH	A.E.V. (USKB/mL)	p.s. (g/l)	A.E.E. (USKB/g)
48	6,6	22,4	29,4	760	6,0	25,3	42,2	600
72	7,3	39,0	36,0	1080	6,5	43,4	48,2	900
96	7,5	47,0	33,5	1400	7,2	53,8	44,6	1200
120	7,8	43,0	29,7	1450	7,5	48,0	43,5	1100
					6,0	28,4	38,0	750
					6,5	41,6	52,0	800
					7,3	55,0	50,0	1100
					7,7	57,6	48,0	1200

TABLA VIII

Influencia de tensioactivos

<u>Serie</u>	<u>T</u>				<u>T_w</u>				<u>S_p</u>			
	pH	A.E.V. (USKB/ml)	ps. (g/l)	A.E.E. (USKB/g)	pH	A.E.V. (USKB/ml)	p.s. (g/l)	A.E.E. (USKB/g)	pH	A.E.V. (USKB/ml)	p.s. (g/l)	A.E.E. (USKB/g)
48	6,0	20	25,0	900	5,9	24	23,0	1000	6,0	40	34,0	1100
72	7,1	34	28,4	1200	6,6	38	27,6	1380	7,8	51	27,0	1900
96	7,4	45	29,0	1550	7,8	45	28,0	1600	8,2	56	22,6	2500
120	7,9	40	26,0	1480	8,0	53	26,0	2000	8,7	56	22,0	2600

Como puede observarse, los valores de actividad enzimática específica para las series Tw y Sp, son más altos que los correspondientes a la serie testigo T (figura nº 5) lo que muestra la influencia de los tensioactivos sobre los niveles enzimáticos.

Teniendo en cuenta que los valores más altos de actividad se logran en la serie Sp conteniendo span 40 en una concentración de 1 g./l, se ensayaron distintas concentraciones de ésta sustancia.

Se realizaron 4 series de ensayos empleando los medios indicados en la Tabla I como 7b, 7c y 7d respectivamente, donde se varió únicamente la concentración de span 40. Además, se incluyó como en todos los ensayos anteriores, una serie testigo T, con el medio nº 1.

En la figura nº 6 puede observarse que una concentración de span 40 del orden de 1 g./l, da por resultado caldos con mayor actividad enzimática específica.

Los resultados obtenidos demuestran sin lugar a dudas, la influencia del agregado de éstos agentes tensioactivos sobre la actividad específica, sobre todo en el caso del span que muestran diferencias muy significativas. Este aspecto no había sido demostrado con anterioridad. Como se mencionó en la parte general, en la bibliografía consultada se encontró una referencia sobre el agregado de dichos agentes, pero como no se mencionan datos sobre la concentración de microorganismo, no podía saberse si la actividad específica se modificaba.

La razón de la influencia de esos agentes sobre la actividad específica no es clara. Se ha mencionado,

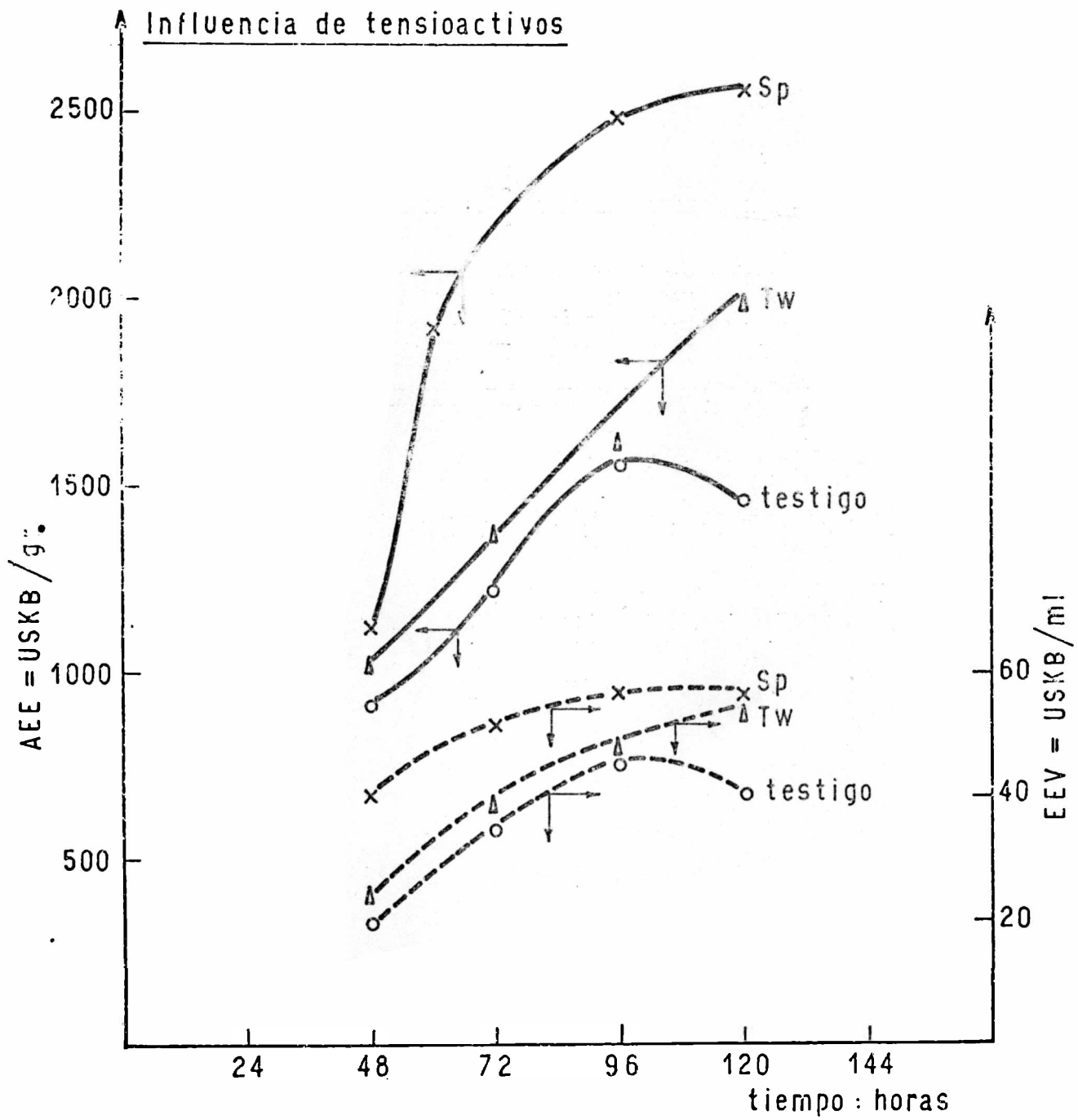


Fig. nº 5

Influencia de distintas concentraciones de span 40

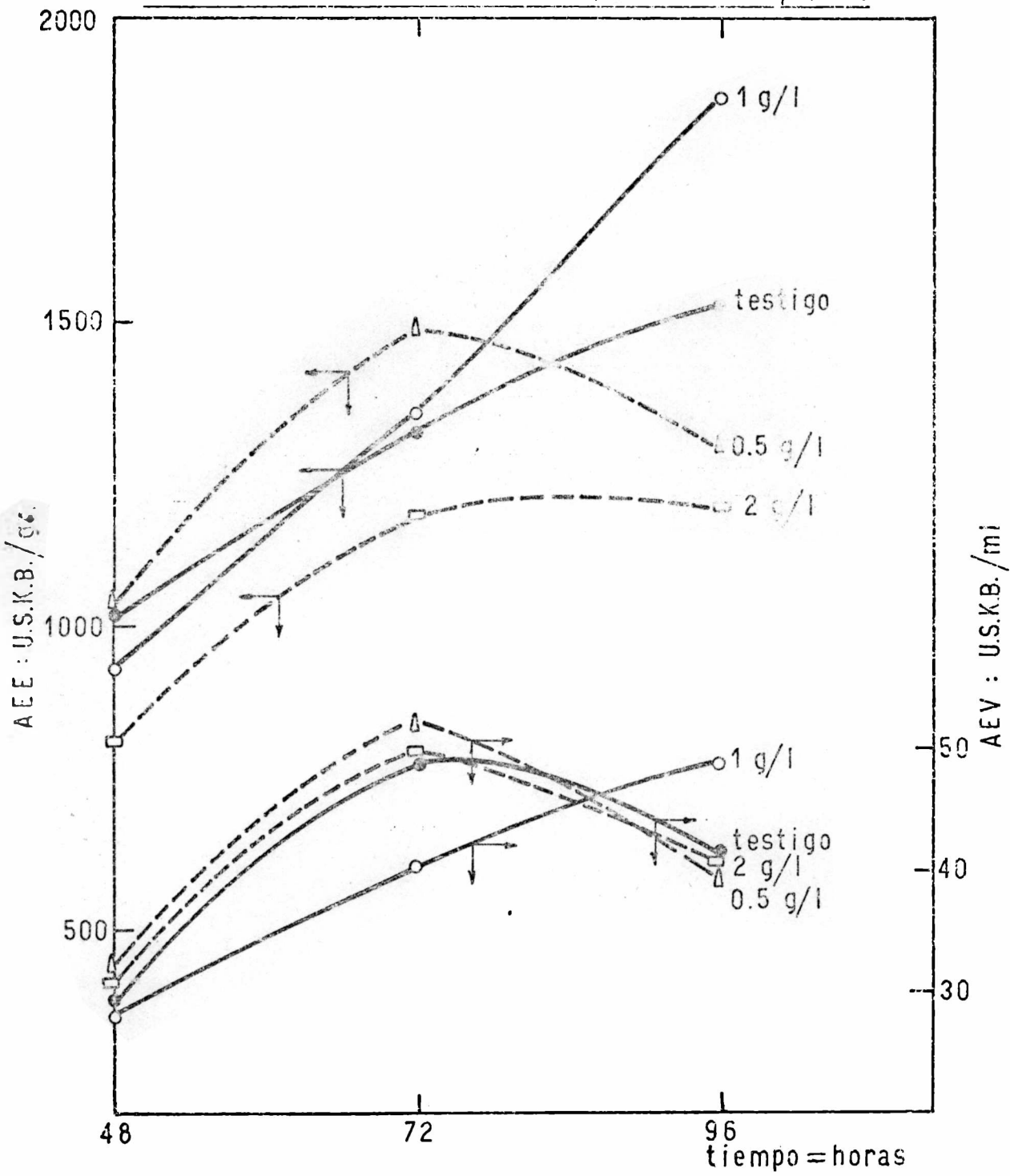


Fig. Nº 6

como posible, la alteración de la permeabilidad celular, que podría aumentar la cantidad de enzima excretada al exterior.

Los resultados obtenidos en experiencias donde se agregaron otras sustancias, se indican en la figura n° 7. Dichas experiencias se efectuaron previamente con caracter preliminar, sin efectuar determinaciones de microorganismo.

La composición de los medios corresponde en la Tabla I a los n° 8a, 8b, 8c, 8d y 8e. Paralelamente se realizó un ensayo testigo T con el medio base n° 1.

Puede observarse que solo la serie que contenía hexadecano muestra una actividad amilolítica superior a la serie testigo T, mientras que los valores más bajos corresponden a las series con sales de manganeso.

Por ese motivo, se realizó otra experiencia con agregado de hexadecano (medio 8a) en la que se determinó actividad específica, comparando siempre con una serie testigo T (medio n° 1).

Los resultados obtenidos se indican en la Tabla IX y su representación gráfica en la figura n° 8. Se observa una diferencia en actividad enzimática específica que es algo superior en la serie que contiene hexadecano, pero que no se considera significativa.

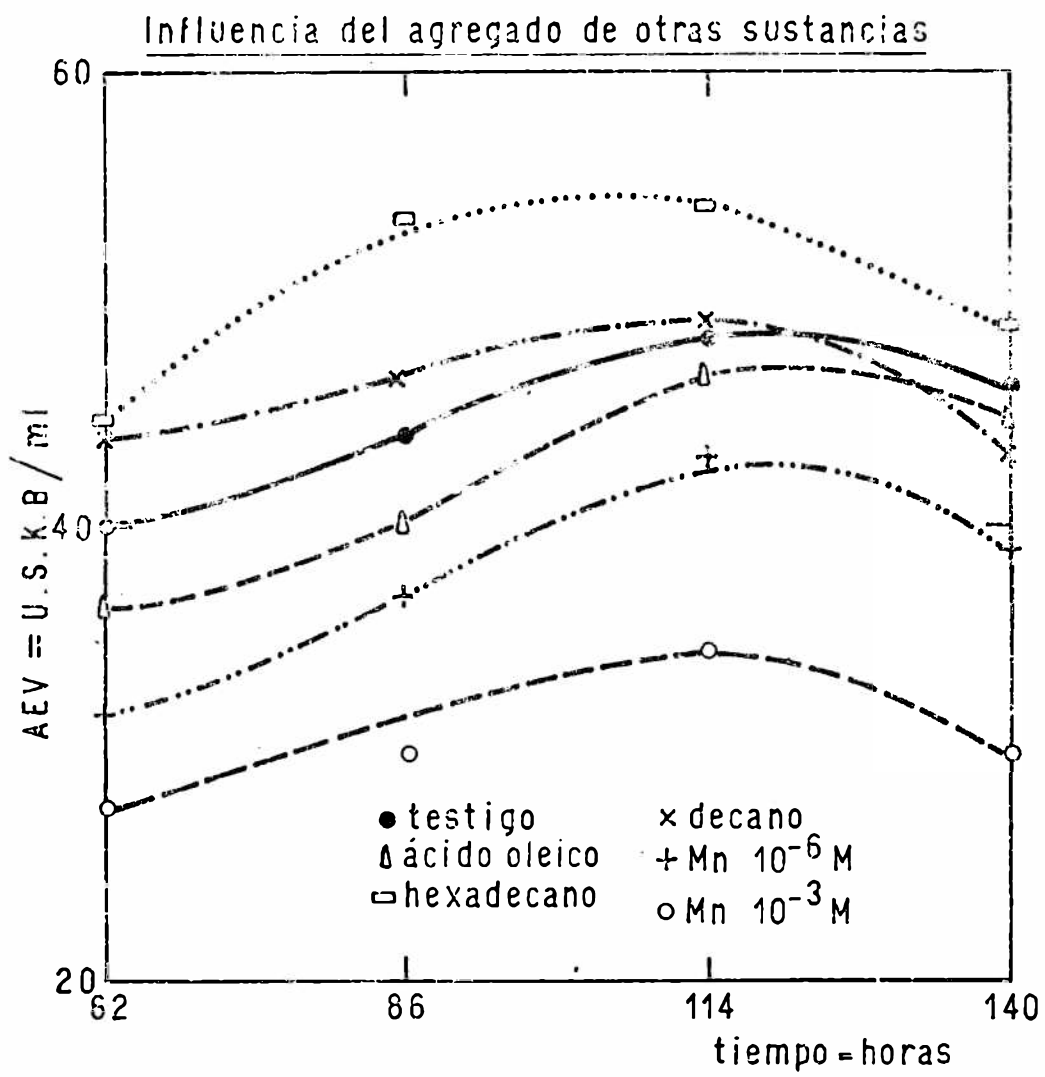


Fig. No 7

TABLA IX

Influencia de Hexadecano

<u>Serie</u>	<u>T</u>					<u>Hx</u>				
	Horas de Proceso	pH	A.E.V. (USKB/ml)	p.s. (g/l)	A.E.E. (USKB/g)	pH	A.E.V. (USKB/ml)	p.s.	A.E.E. (USKB/g)	
40	5,9	17,0	27,0	600	5,8	20,0	24,0	800		
64	6,9	34,0	37,0	990	7,0	40,0	35,0	1100		
88	7,5	45,0	38,5	1180	7,5	48,0	36,4	1300		
112	7,8	45,6	38,2	1200	7,8	48,0	37,6	1300		
136	8,0	45,6	34,2	1300	8,1	53,6	36,9	1450		

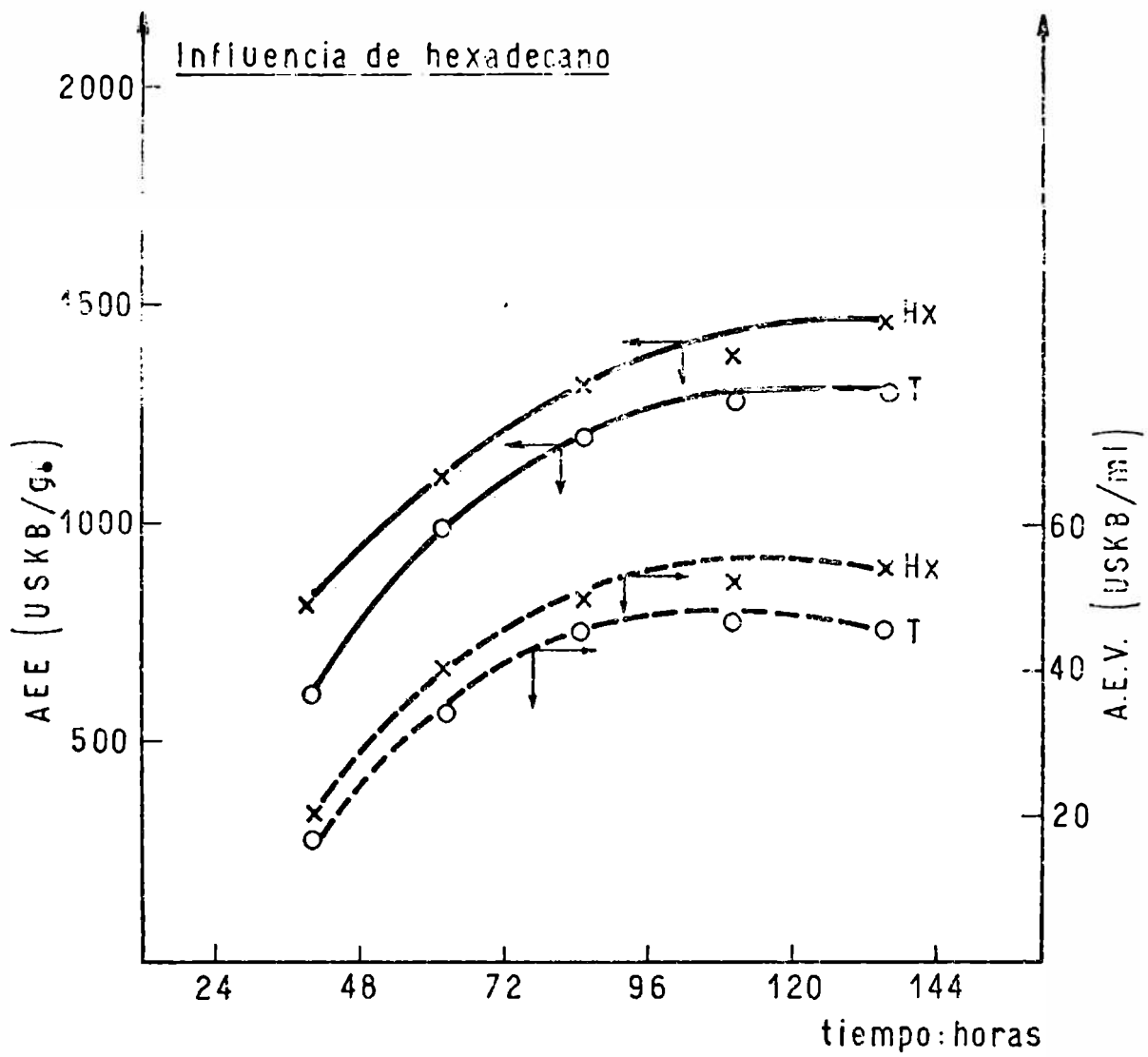


Fig. Nº 8

II.- AMILASA BACTERIANA

a) Microorganismo

Se empleó una cepa de Bacillus subtilis denominada IAM H 1521, proveniente de la Division of Type Culture Collection, The Institute of Appl. Microbiology, the Univ. of Tokyo, Japan, que fué conservada bajo vaselina, previo desarrollo en medio de Nomura, cuya composición es la siguiente: almidón soluble 8 g.%; citrato de sodio 0,04 M; fosfato amónico dibásico 0,15 M; cloruro de potasio 0,02 M; sulfato de magnesio heptahidratado 0,002 M; cloruro de calcio 0,001 M; alcohol etílico 1,0 % v/v; extracto de soja : cada litro de medio contiene el extracto obtenido por ebullición de 50 gramos de harina de soja con 250 ml de solución de hidróxido de sodio 0,1 g.% durante 1 hora. El medio completo se lleva a pH: 7,2.

b) Inóculo

Se utilizaron dos tipos de inóculos, una denominado vegetativo y el otro formado por una suspensión de esporos.

El primero se obtiene sembrando el microorganismo en medio de Nomura distribuido en tubos inclinados e incubándolos a 30 °C durante 30 horas. Transcurrido éste tiempo, el desarrollo obtenido de cada tubo se suspende en tres mililitros de agua destilada estéril y se transfiere a erlenmeyers de 300 ml de capacidad con 50 ml de medio compuesto por 4 gramos de fosfato dibásico de potasio por cada 100 ml de extracto de soja. Los erlenmeyers se colocan en agitador rotatorio donde

se mantienen 17 horas a 30°C, obteniéndose así el inóculo listo para sembrar. En todos los casos se utilizó 5 % de éste inóculo con respecto al volumen a sembrar.

En cuanto al inóculo formado por esporos, se procede de la siguiente manera: se siembra el microorganismo en tubo inclinado con medio A (Difco Bacto Penassay seed agar) (49). Se incuba a 37°C durante 24 horas y el desarrollo obtenido se suspende en 5 ml de solución fisiológica estéril (cloruro de sodio 9 g./l). Esta suspensión se transfiere a botellas con 300 ml de medio AM (Bacto Penassay seed agar + 0,30 g./l de sulfato de manganeso). Se incuba a 37°C durante 6 días y se adicionan 40 ml de solución fisiológica estéril y perlas de vidrio con el objeto de suspender la mayor cantidad posible de material. La suspensión obtenida se coloca en agitador durante 30 minutos para deshacer grumos y luego se calienta a 70 °C durante 30 minutos (shock térmico). Se guarda en tubos estériles en heladera hasta el momento de ser usado, siendo estable durante varios meses. El porcentaje utilizado de éste inóculo fué del 2,5%.

La realización de experiencias utilizando inóculos vegetativos, que corresponden a las realizadas con caracter preliminar, mostró en muchos casos diferencias notables entre los ensayos testigos. Fué así que se descartaron varios de ellos en razón a la alta disparidad observada. Los ensayos realizados con esporos dieron resultados mucho más reproducibles. Los valores máximos de actividad enzimática obtenidos en distintas experiencias en erlenmeyers de series testigos (igual composición), se reproducen casi exactamente, con la

única diferencia de un corrimiento en el tiempo que se explica por el período de retardo distinto, debido sin duda a diferencias en la concentración de esporos del inóculo.

c) Medios de Cultivo

La composición de los medios figura en la Tabla X.

El medio base al cual se agregaron las sustancias ensayadas, se eligió de manera de obtener un medio sin sólidos en suspensión, para facilitar la determinación de microorganismo.

El extracto de soja utilizado se obtiene de la misma forma que se indica en la parte experimental de amilasa fúngica.

d) Determinaciones Analíticas

Determinación de pH. Idem amilasa fúngica.

Determinación de Actividad amilolítica. Idem amilasa fúngica.

Determinación de Microorganismo. El crecimiento celular fué seguido mediante determinaciones de densidad óptica (D.O.) de los caldos de cultivo, en un espectrofotómetro Bausch & Lomb "Spectronic 20" a 600 nm.

La concentración de microorganismo fué determinada también por gravimetría, sobre 10 ml de la muestra centrifugada. El material fué lavado 3 veces con agua destilada y finalmente secado en estufa a 90°C durante seis horas.

e) Condiciones de Operación

Las experiencias se efectuaron fundamentalmente en frascos erlenmeyers lisos de 1 litro de capacidad

TABLA X

Composición de medios para amilasa bacteriana

Componentes	Medio Nº											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Maltosa	10,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	10,0	-	25,0	50,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Almidón	-	-	10,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato trisódico	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Cloruro de potasio	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Cloruro de calcio	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Fosfato dipotásico	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Fosfato diemónico	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Polietilenglicol	-	-	-	-	-	-	-	-	25,0	50,0	100,0	100,0
Extracto de soja	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	25,0	70,0	100,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Agua destilada	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

conteniendo 200 ml de medio, que se esterilizaron en autoclave a 120°C (1 atm.) durante 20 minutos. Luego de ser inoculados se colocaron en agitador rotatorio a 235 r.p.m. (excentricidad 2,5 cm) y a temperatura de 30°C.

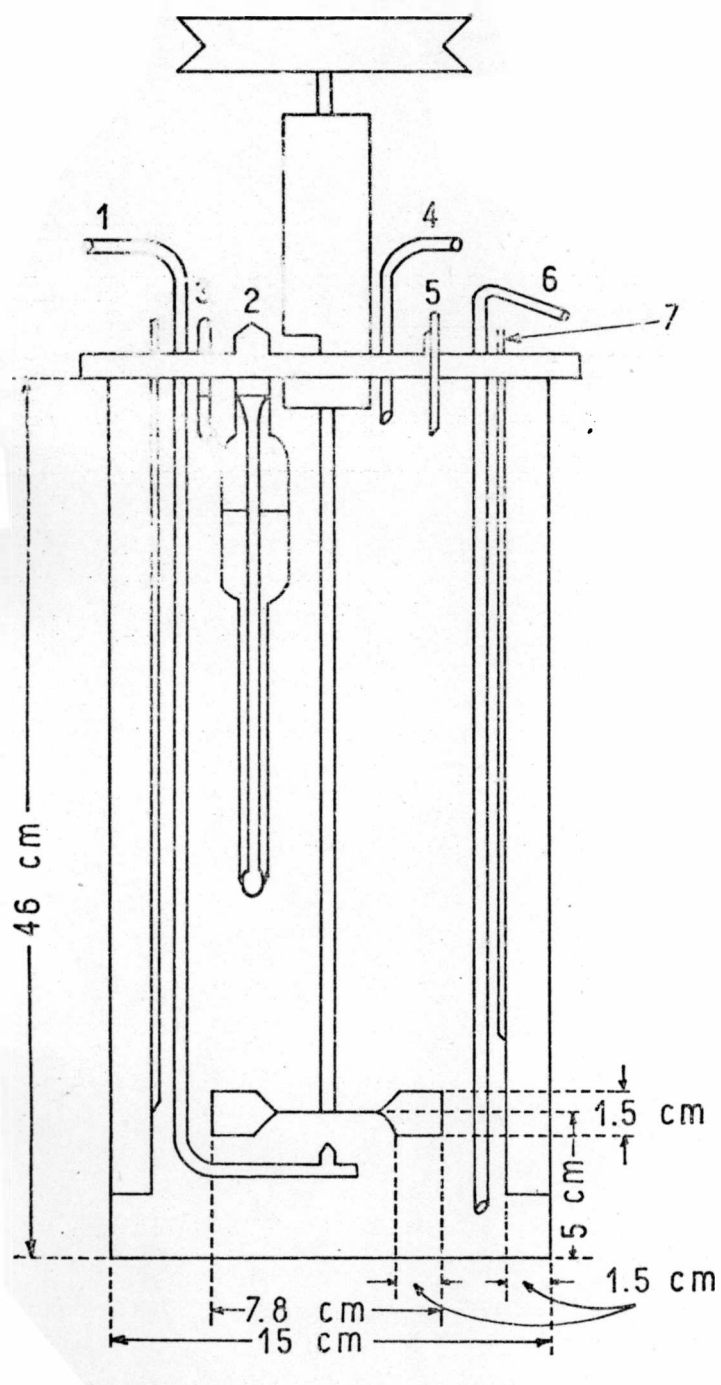
Los ensayos realizados con variaciones del suministro de aire se efectuaron en una unidad New Brunswick que consta de 3 fermentadores de 7 litros de capacidad con 3,5 litros de medio. Las experiencias se realizaron a 30°C y a 500 r.p.m. El caudal de aire fué en todos los casos de 0,5 v/v.min. Para el control de pH se emplearon electrodos Radiometers modelo G K 4032 C sumergidos en el cultivo. Las características del fermentador se indican en la figura n° 9.

f) Resultados y Discusión

Se efectuaron experiencias preliminares sin determinación de la concentración de microorganismo, con el objeto de considerar la influencia de distintas fuentes de carbono y del suministro de aire, sobre la actividad amilolítica. Los carbohidratos ensayados fueron: maltosa, lactosa y almidón en concentraciones de 10 gramos por litro. La maltosa y la lactosa tienen la ventaja de producir medios totalmente límpidos, lo que posibilita la determinación de la D.O.

Se realizaron tres series de experiencias utilizando los medios n° 1, 2 y 3 respectivamente, cuya composición se detalla en la Tabla X.

Los resultados obtenidos se indican en la Tabla XI, donde se observa que el medio que contiene lactosa



- 1 entrada de aire
- 2 electrodo para medida de pH
- 3 compensador de presión
- 4 salida de aire
- 5 entrada de antiespumante
- 6 toma de muestra
- 7 capilar para la entrada de álcali.



Fig. No 9

TABLA XI

Influencia de distintas fuentes de carbono

<u>Serie</u>	<u>Maltosa</u>		<u>Lactosa</u>		<u>Almidón</u>	
	pH	A.E.V. (USKB/ml)	pH	A.E.V. (USKB/ml)	pH	A.E.V. (USKB/ml)
24	7,3	-	7,5	21,6	7,6	-
48	8,1	67,2	8,2	128,0	8,3	58,7
72	8,7	68,8	8,8	116,0	8,7	64,8
96	9,0	54,4	8,9	96,0	9,0	54,4

como fuente de carbono, es el que muestra los mayores rendimientos enzimáticos. Además es un medio completamente límpido que permite determinar la concentración de microorganismo por turbidimetría, razones por las cuales se decidió usar ésta fuente de carbono en las experiencias posteriores.

Los ensayos preliminares sobre la influencia del suministro de aire se efectuaron en 4 erlenmeyers con medios de igual composición (medion° 2, Tabla X) con tapón de algodón. En una serie de 2 erlenmeyers, a las 30 horas de proceso (que corresponde al final de la etapa logarítmica de crecimiento) se cambió el tapón de algodón por tapones de goma estériles. Los otros 2 erlenmeyers testigos se mantuvieron con su tapón de algodón. El proceso fué conducido hasta las 80 horas y los resultados obtenidos se indican en la figura n° 10.

Se observa que en los erlenmeyers cuyos tapones fueron reemplazados por los correspondientes de goma, la actividad enzimática no aumentó, sino que comienza a descender levemente, mientras que en los erlenmeyers testigos, la actividad aumentó sensiblemente hasta las 55 horas.

En cuanto al pH, puede observarse que los valores comienzan a disminuir a partir del momento en que se limita la aeración, mientras que en la otra serie el pH evoluciona hacia valores más alcalinos.

1) Influencia de la concentración de la fuente de carbono

Se ensayaron distintas concentraciones de lactosa con el fin de determinar su efecto sobre la actividad

Influencia de la aeración (Exp. Preliminares)

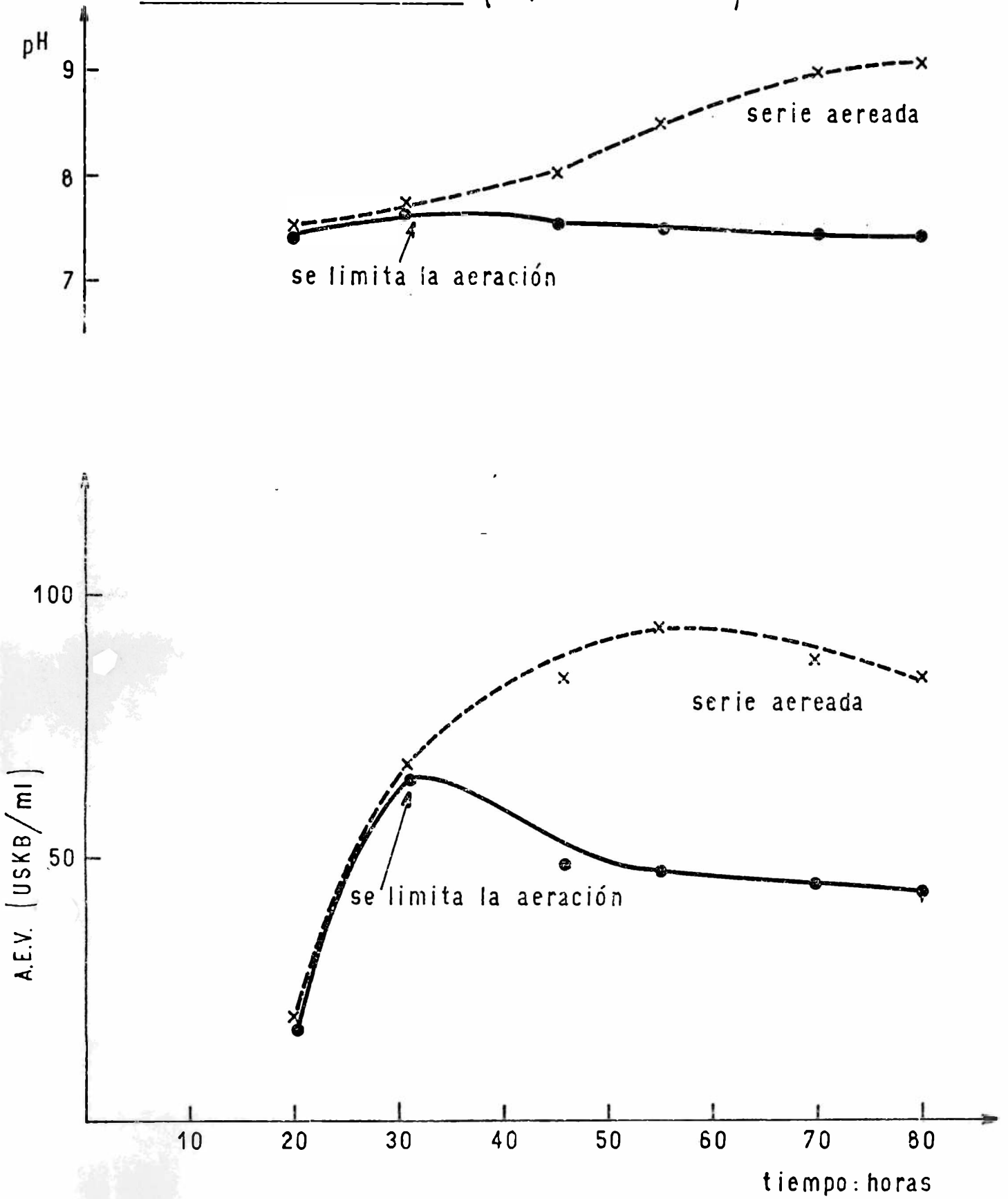


Fig. Nº 10

enzimática volumétrica y específica. En ésta experiencia se emplearon tres series de ensayos cuyos erlenmeyers llevaban los medios n° 2, 4 y 5, siendo la concentración del carbohidrato ensayado, 10, 25 y 50 gramos por litro respectivamente.

Los resultados se muestran en la Tabla XII, donde puede observarse que el medio que contiene mayor concentración de lactosa (50 g./l) da los valores más altos de actividad enzimática volumétrica, siguiéndole en orden decreciente los medios con 25 y 10 g./l ; no sucede lo mismo cuando los resultados se expresan en valores de actividad enzimática específica. En éste caso existe una pequeña diferencia en favor del medio que contiene menor concentración de lactosa (testigo).

2) Influencia de la concentración de la fuente nitrogenada

Se realizaron cuatro series de ensayos en los cuales se varió la concentración de la fuente de nitrógeno o sea de extracto de soja, empleando concentraciones de 25, 50, 70 y 100 gramos por litro. La composición de los medios se indica en la Tabla X con los n° 6, 2, 7 y 8 respectivamente.

Los resultados se indican en la Tabla XIII, donde puede observarse que a medida que aumenta la concentración de extracto de soja en los medios, va aumentando la actividad enzimática volumétrica, como así también la masa microbiana. En cuanto a la actividad enzimática específica se observa que es mayor en la serie que contiene 50 g./l de la fuente nitrogenada (testigo), siguiéndole en orden decreciente las series con 70, 100 y 25 g./l (figura n° 11).

TABLA XII

Influencia de la Concentración de la Fuente de Carbono

Serie Horas de Proceso	T (10g./l)			I (25g./l)			2 (50g./l)			
	pH	A.E.V. (USKB/ml)	p.s. (g/l)	pH	A.E.V. (USKB/ml)	p.s. (g/l)	pH	A.E.V. (USKB/ml)	p.s. (g/l)	A.E.E. (USKB/g)
24	7,5	16,0	6,6	7,3	10,5	6,1	7,0	12,0	8,2	1500
48	8,3	50,0	8,0	8,0	55,7	11,5	7,6	58,8	14,0	4220
72	8,8	85,2	5,9	8,4	120,0	8,6	8,0	150,0	11,4	13200
96	9,0	65,0	4,3	8,9	115,0	7,9	8,5	155,0	10,7	14500

TABLA XIII

Influencia de la concentración de la fuente nitrogenada

Serie	1 (25g/l)		2 (50g/l) T		3 (70g/l)		4 (100g/l)	
	PH	A.E.V. p.s. (USKB/ml) (g/l)	PH	A.E.V. p.s. (USKB/ml) (g/l)	PH	A.E.V. p.s. (USKB/ml) (g/l)	PH	A.E.V. p.s. (USKB/ml) (g/l)
17	7,1	- 3,5	6,6	- 3,9	6,4	- 4,9	6,0	- 5,9
24	7,5	- 5,1	7,4	- 6,6	7,3	- 7,0	7,0	- 7,3
40	7,6	14,0 5,8	8,0	27 8,0	7,8	28 10,0	7,5	16 11,4
48	7,8	18,4 6,2	8,2	52 8,5	8,1	71 15,5	7,8	34 15,3
64	8,7	30,0 3,5	8,6	76 5,8	8,7	110 8,8	8,3	130 13,7
72	8,8	35,2 -	8,8	87 -	8,9	120 -	8,7	136 -
89	9,2	28,0 2,6	9,2	73 4,6	9,2	96 7,5	9,1	120 10,8
				15200		12850		11100
				2825		1950		2200
				2480		12420		9900
				8550		5500		

Influencia de la concentración de extracto de soja

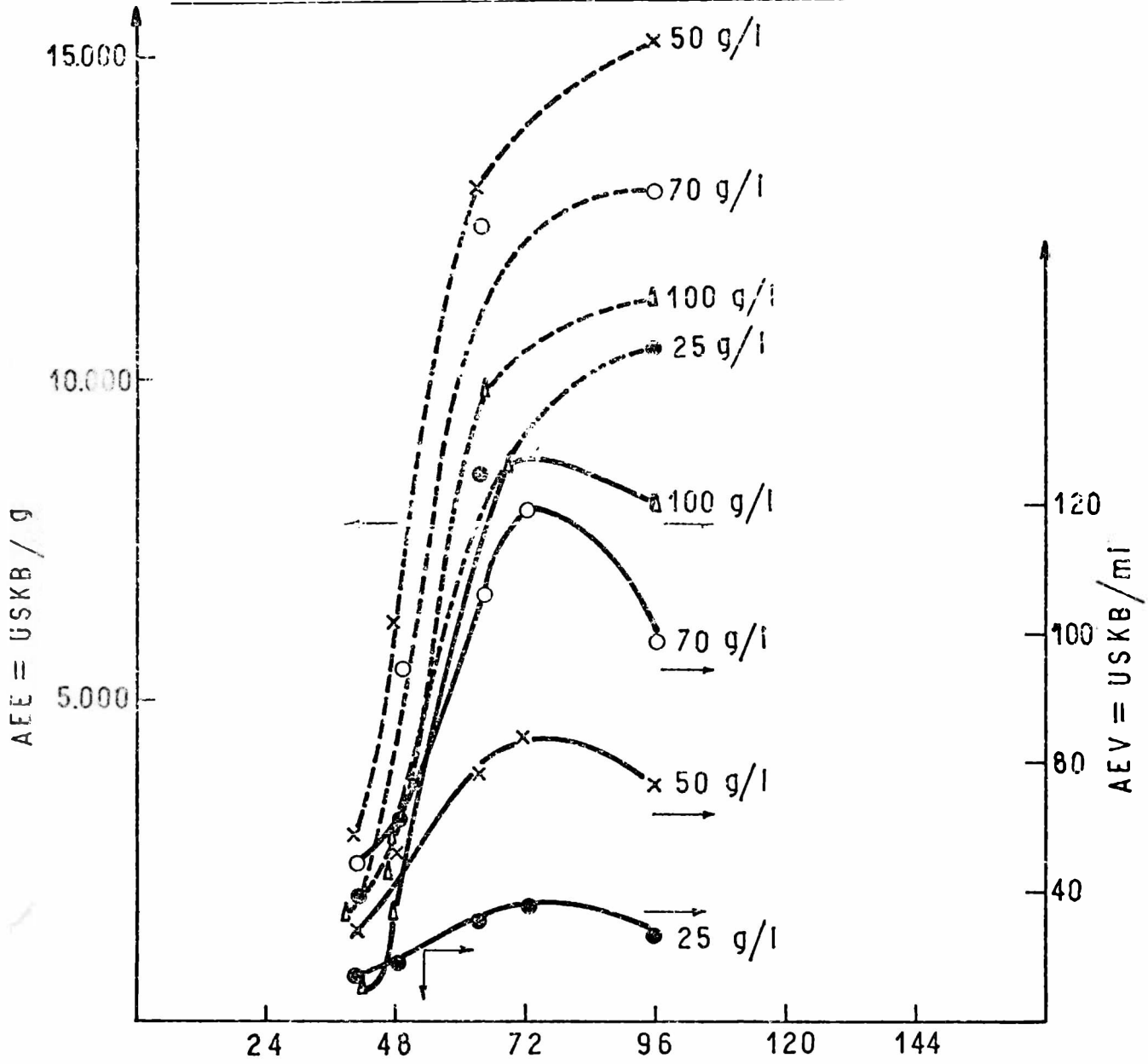


Fig. Nº 11

El descenso de pH de los medios con mayor concentración de extracto de soja, puede deberse a que los aminoácidos del extracto serían atacados con consumo de su grupo amino.

Representando los máximos valores de actividad enzimática obtenidos en cada una de las series estudiadas, en función de la concentración de extracto de soja, puede observarse una relación directa entre concentración de la fuente nitrogenada y los niveles enzimáticos (figura nº 12).

3) Influencia de polietilenglicol

Los ensayos se realizaron con cuatro series de erlenmeyers que contenían los siguientes medios: la serie T (testigo), cuya composición corresponde al nº 2 de la Tabla X, y las series 1, 2 y 3 con los medios indicados con los nº 9, 10 y 11 de dicha Tabla.

El polietilenglicol usado procede de Productos Químicos Purest, tiene un P.M. de 400 y se utilizó en concentraciones de 2,5, 5 y 10 gramos por ciento.

Los resultados obtenidos, que figuran en la Tabla XIV, demuestran que los ensayos realizados con la menor concentración (2,5%) producen rendimientos similares al testigo T, estando las demás series por debajo del mismo en actividad enzimática tanto volumétrica como específica (figura nº 13). Por otra parte, tampoco se observan aumentos en la velocidad de formación de la enzima, como se menciona en la bibliografía.

4) Influencia del suministro de aire

Considerando los antecedentes bibliográficos mencionados con respecto a la influencia de la aeración,

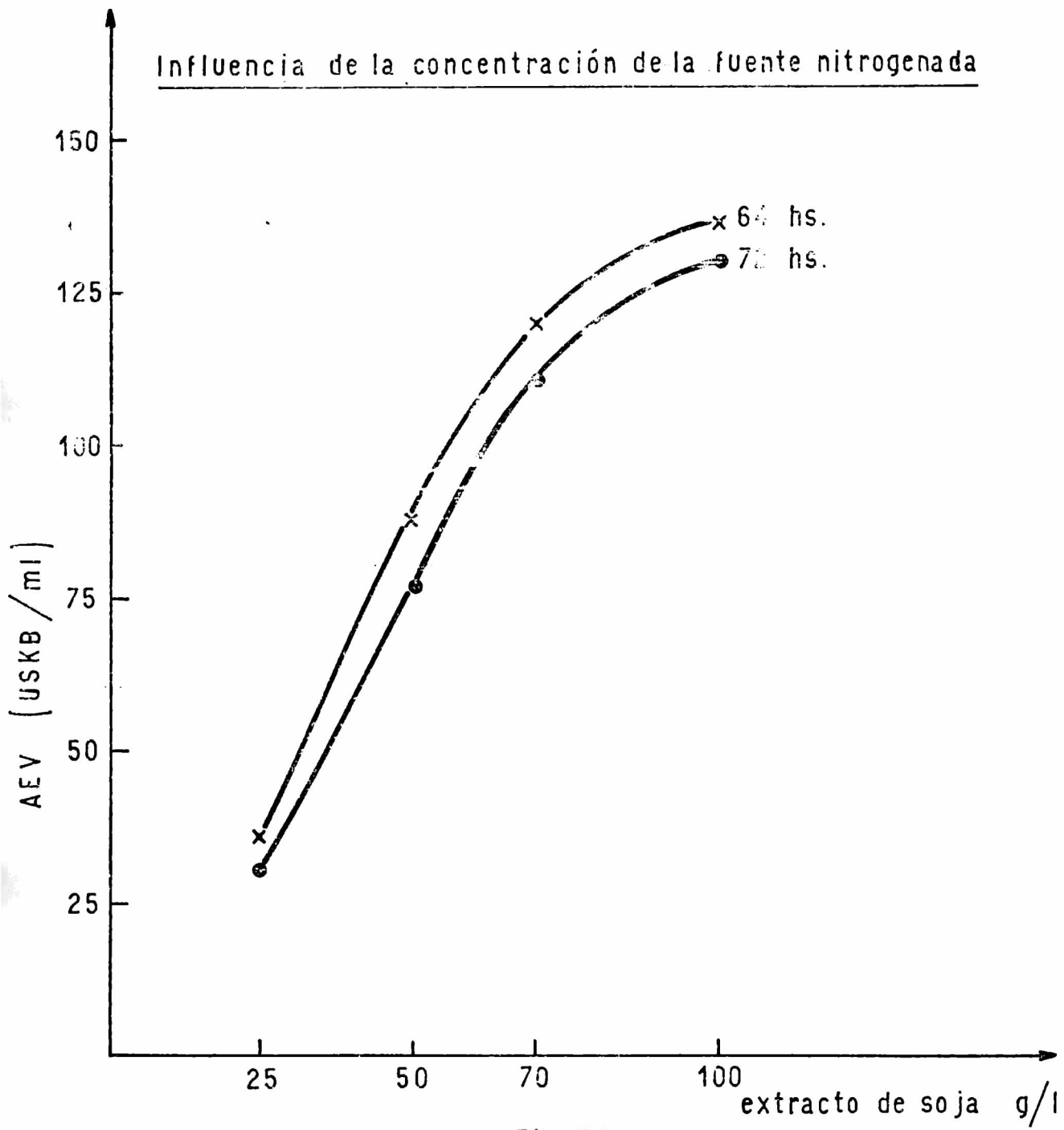


Fig. Nº 12

TABLA XIV

Influencia de polietilenglicol

Serie	T				1 (2,5%)				2 (5%)				3 (10%)			
	pH	A.E.V (USKB/ml)	p.s. (g/l)	A.E.E. (USKB/g)	pH	A.E.V (USKB/ml)	p.s. (g/l)	A.E.E. (USKB/g)	pH	A.E.V (USKB/ml)	p.s. (g/l)	A.E.E. (USKB/g)	pH	A.E.V (USKB/ml)	p.s. (g/l)	A.E.E. (USKB/g)
16	7,0	-	-	-	7,1	-	-	-	7,2	-	-	-	7,3	-	-	-
40	7,3	-	4,5	-	7,3	-	4,8	-	7,3	-	4,6	-	7,2	-	5,5	-
64	7,6	17	7,8	2260	7,6	13	6,6	2300	7,7	14	6,3	2210	7,7	14	6,0	2400
86	8,2	66	8,6	7600	8,0	56	9,1	6200	8,1	36	8,5	4330	8,0	22	8,3	2700
112	8,9	91	5,6	16100	8,8	76	5,8	13200	8,7	80	6,2	12300	8,4	60	7,7	7580
136	9,1	80	5,4	14100	9,1	71	5,3	13300	9,1	65	6,0	10800	8,8	76	7,6	10000

Influencia de polietilenglicol

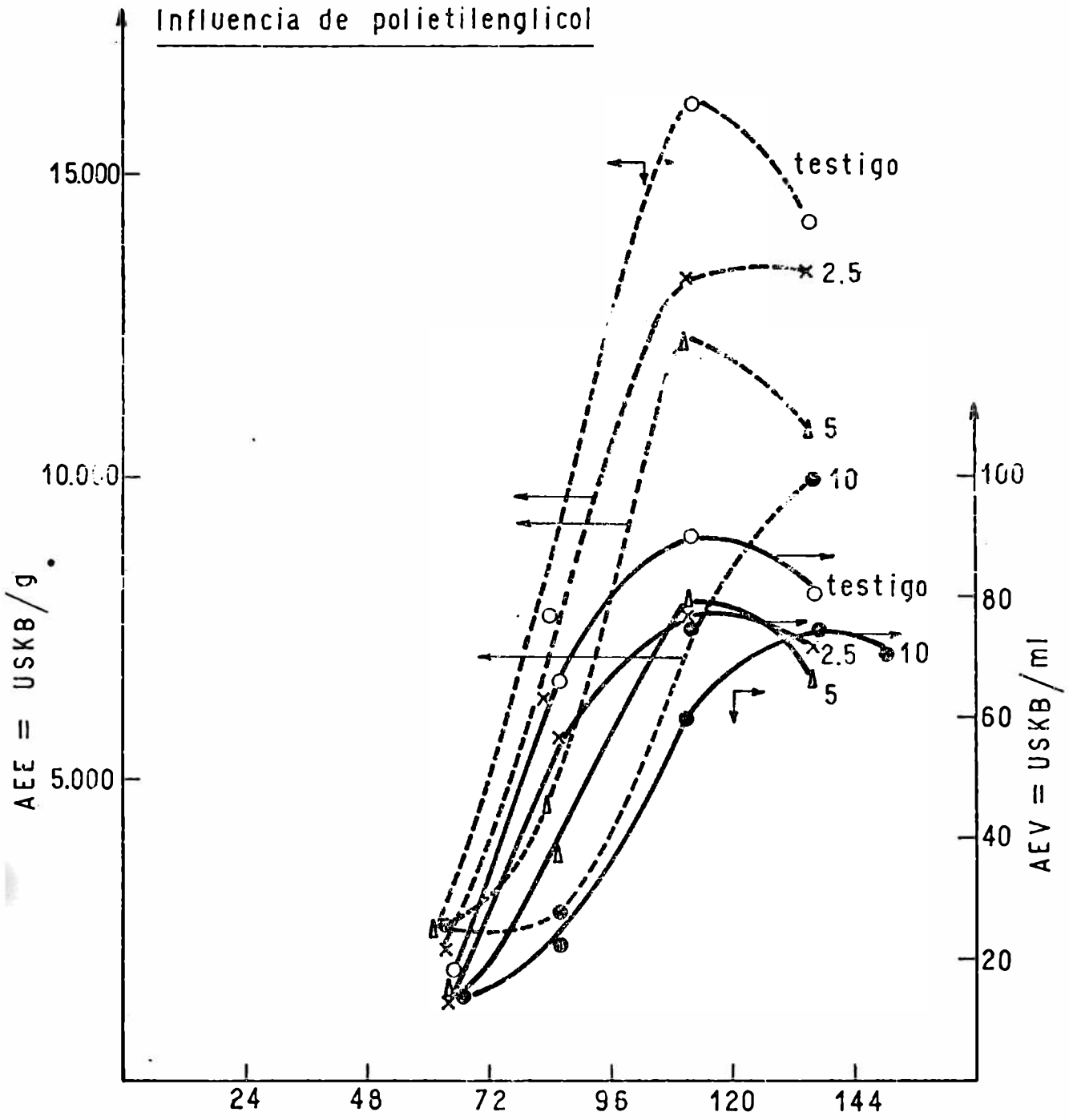


Fig. N° 13

que muestran la posibilidad de cortar el suministro de aire después de alcanzada la máxima concentración microbiana y obtener rendimientos enzimáticos similares a experiencias aereadas, siempre que se efectúe una regulación del pH, se resolvió encarar éste aspecto, dada la posible importancia tecnológica de las conclusiones de esas experiencias.

Debido a las dificultades que surgen para realizar el control de pH en erlenmeyers, se decidió utilizar tanques agitados. Las primeras experiencias se realizaron a fin de determinar la curva de crecimiento para las condiciones de operación indicadas. Estos ensayos mostraron que para el medio y las condiciones de operación fijadas resultó muy difícil controlar la espuma formada, a pesar del agregado de antiespumante (silicona). Como consecuencia de la aparición de éste problema, se efectuaron nuevas experiencias donde se utilizó el mismo medio anterior (nº 2, Tabla X) pero con la mitad de extracto de soja. En tales circunstancias se observó que durante el proceso la espuma formada es mucho menor y por otra parte, se comprobó que los niveles enzimáticos alcanzados para éstas últimas condiciones son del mismo orden que las correspondientes con el doble de concentración de extracto de soja (figura nº 14).

En ensayos preliminares, para la determinación de pH se usaron electrodos no esterilizables por vapor dentro de los fermentadores. Los métodos químicos empleados para la esterilización de dichos electrodos, no resultaron efectivos por lo cual surgieron problemas de contaminación. Este inconveniente quedó resuelto al utilizar electrodos Radiometers especiales que pueden

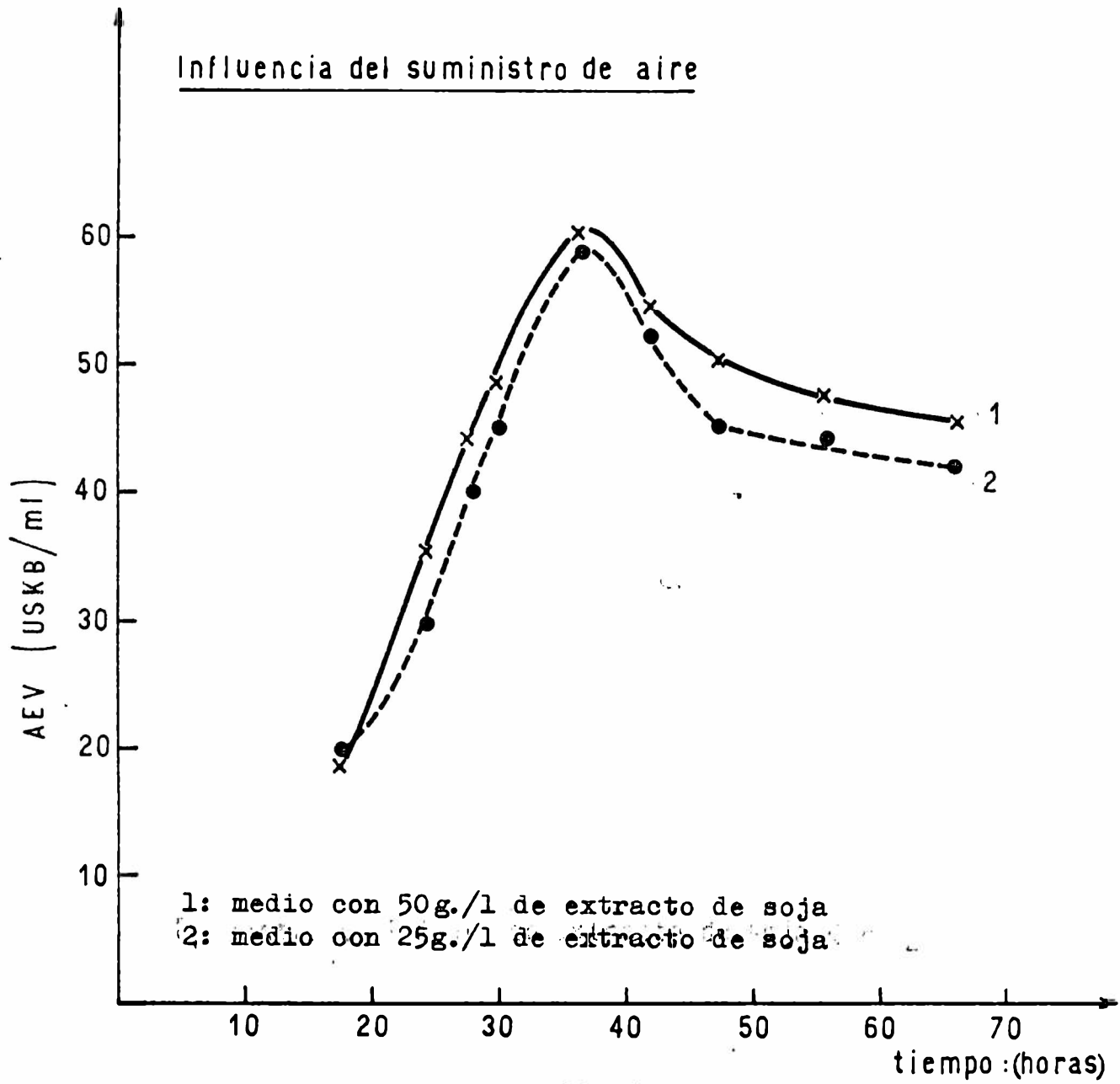


Figura N° 14

ser sometidos a esterilización con vapor dentro del fermentador.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en erlenmeyers relacionados con el suministro de aire, se programó la realización de experiencias utilizando tres fermentadores. En éstas experiencias uno de los fermentadores se empleó como testigo, es decir que se aireó durante todo el proceso (F_2). Paralelamente en los otros dos fermentadores (F_1 y F_3) se procedió a cortar el aire en la parte final de la fase de crecimiento logarítmica. A partir de éste momento en el fermentador F_1 se controló el pH que se llevó a los valores que presentaba el fermentador testigo F_2 , mediante el agregado de hidróxido de sodio 1 N. La medida y control de pH en los fermentadores F_1 y F_2 se hizo con electrodos dentro de los mismos. Por otra parte en el fermentador F_3 se dejó evolucionar el pH libremente.

En lo que se refiere a la actividad enzimática, los rendimientos son mayores en el fermentador F_2 , mientras que en el F_1 , en las primeras horas de la etapa de anaerobiosis se observa un aumento mínimo de la actividad enzimática para luego mantener un valor más o menos constante. En el fermentador F_3 , la concentración enzimática disminuye gradualmente desde el momento en que se procedió a cortar el aire (figura n° 15).

En la figura n° 16 podemos observar también que la curva de crecimiento del microorganismo es semejante en los tres fermentadores, hasta el final de la etapa logarítmica de crecimiento, que coincide con el corte de aire. Desde éste momento se observa que la etapa de lisis

Influencia del suministro de aire

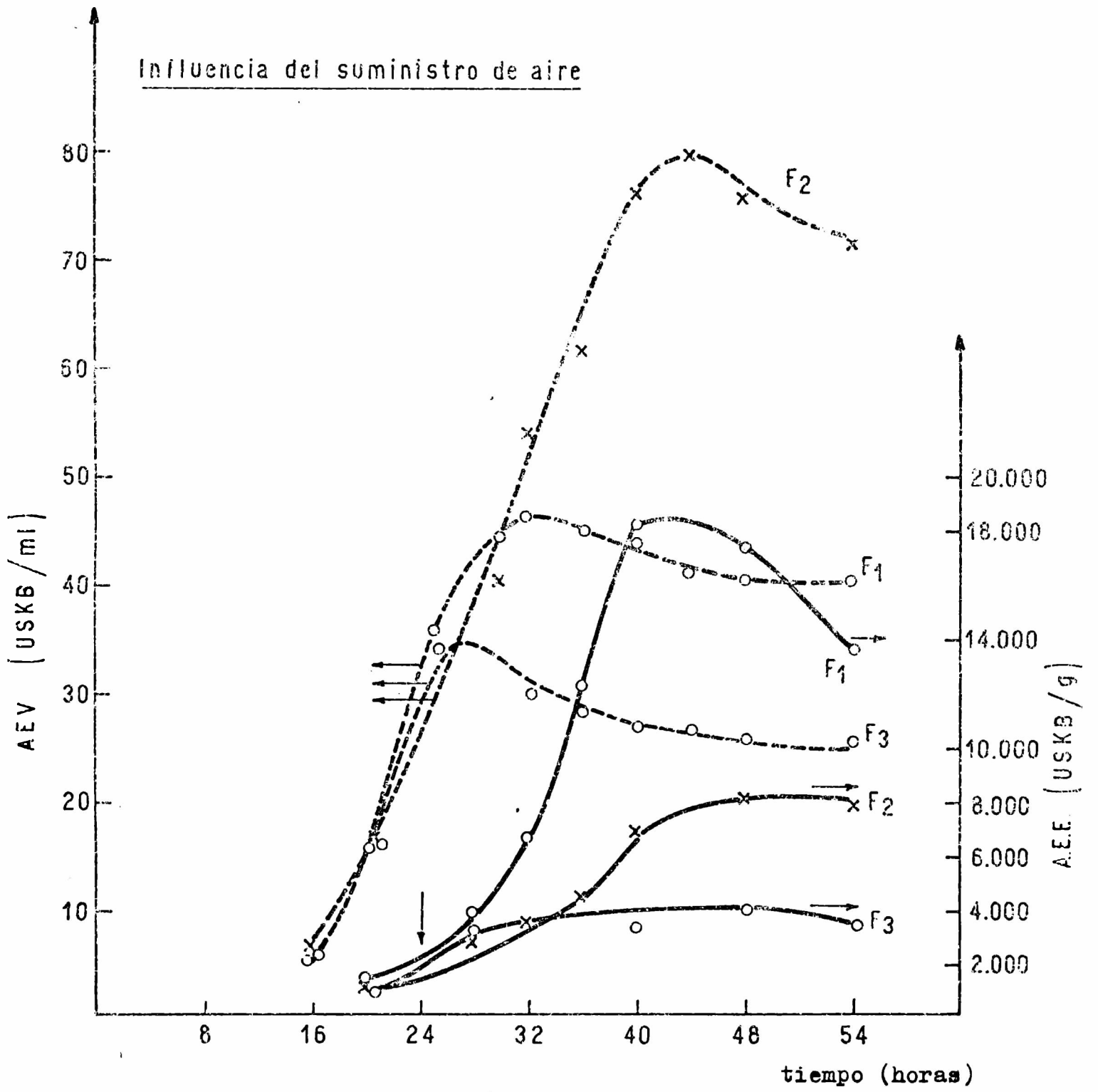


Fig. N° 15

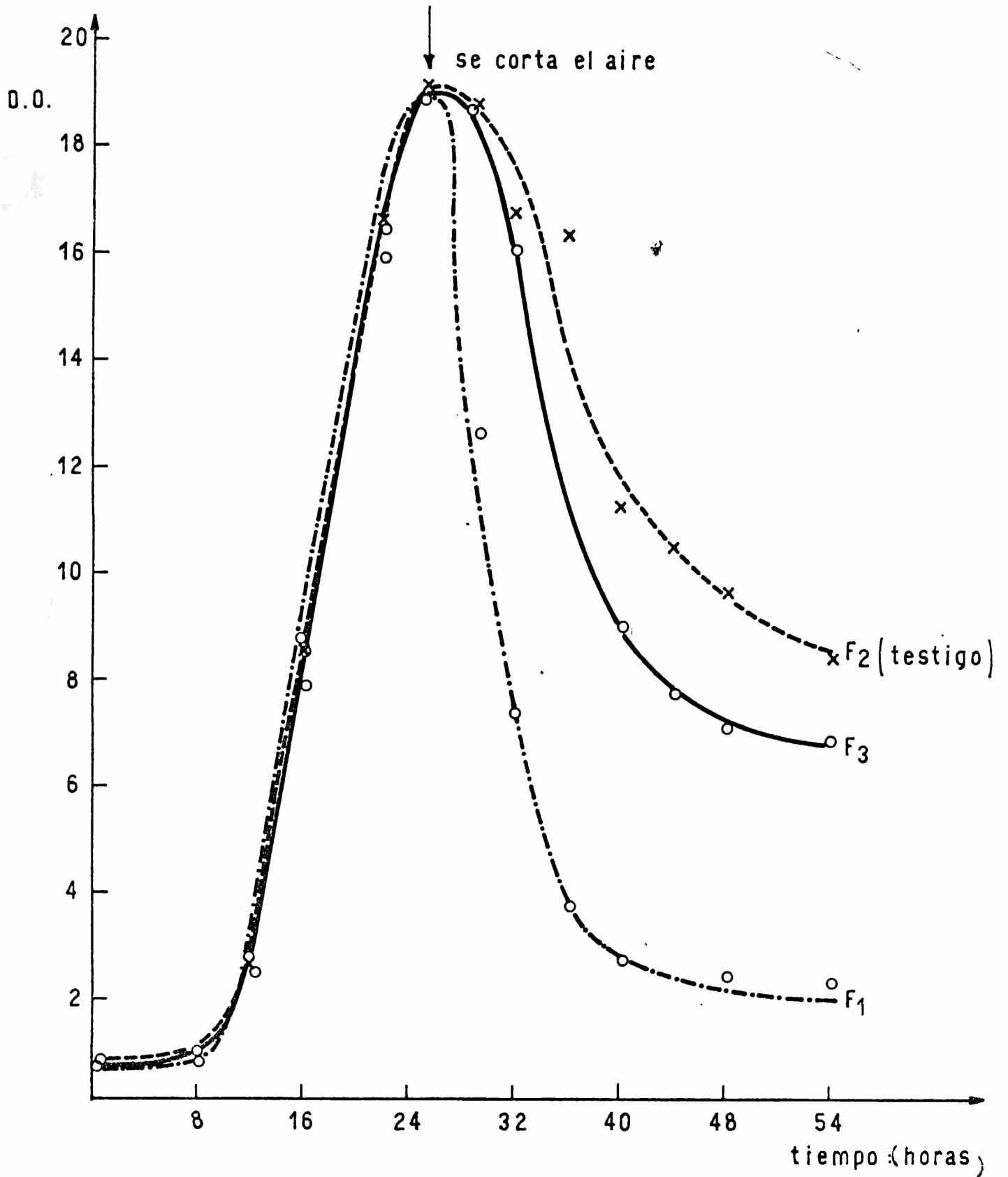
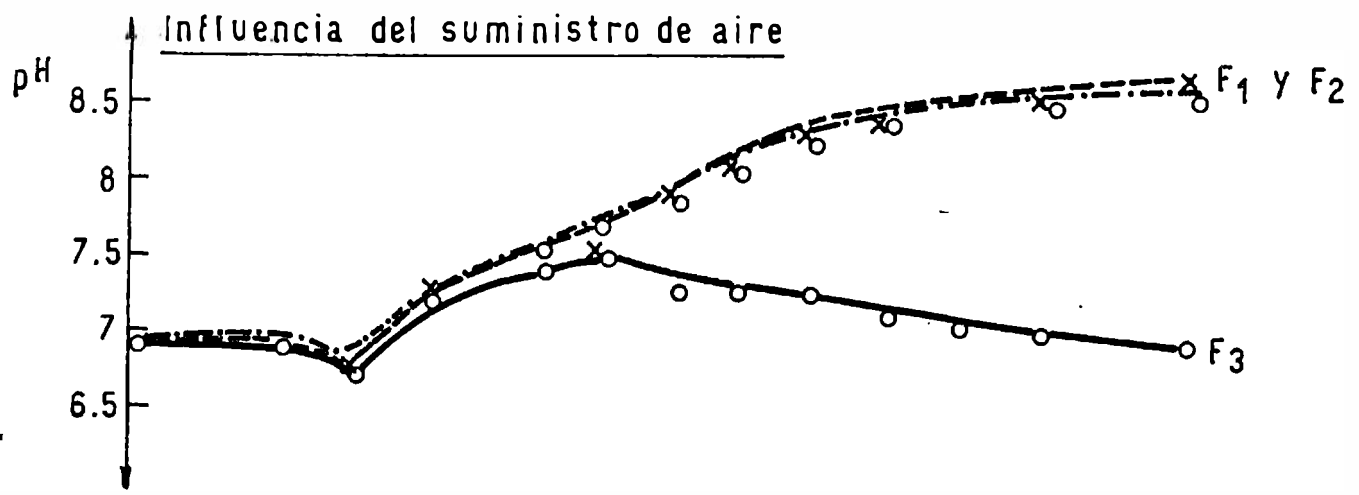


Fig. No 16

celular tiene mayor pendiente en el fermentador F_1 , es decir que la anaerobiosis y el pH acelerarían éste proceso.

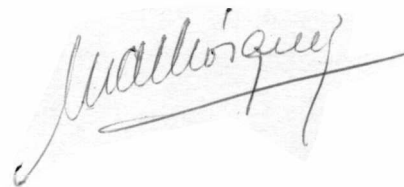
Se comprueba pues, para la producción enzimática, un efecto favorable del control de pH en aquellas experiencias donde se cortó el suministro de aire. Sin embargo los niveles enzimáticos resultan marcadamente inferiores a los obtenidos en las experiencias con aeración durante todo el proceso. La diferencia en la actividad enzimática específica, que resulta superior en el fermentador F_1 es el resultado de la lisis más pronunciada que se observa en ese fermentador y por lo tanto no se le puede asignar a esa diferencia un valor significativo (figura nº 15).

Los resultados de éstos ensayos coinciden en lo que se refiere a evolución de pH, con un trabajo anterior ya mencionado, pero no concuerdan en actividad amilolítica pues en ese caso se mencionan niveles semejantes de actividad enzimática en ensayos en los cuales se cortó el aire y controló pH, comparados con ensayos aereados durante todo el proceso. Considerando que en ese trabajo se utilizó la misma cepa, ésta diferencia debe atribuirse únicamente a la distinta composición del medio.

CONCLUSIONES FINALES

Del análisis de los resultados obtenidos surge:

- 1.- Los componentes de los medios estudiados en la obtención de amilasas fúngicas y bacterianas, con la única excepción de los agentes tensioactivos en el caso de amilasa fúngica, no producen aumentos de la actividad enzimática específica, la que se mantiene constante o disminuye.
- 2.- Los agregados periódicos de las fuentes de carbono o nitrógeno en las condiciones ensayadas, no producen tampoco incrementos en la actividad enzimática específica.
- 3.- Se demuestra que el agregado de agentes tensioactivos (sobre todo de span 40) en los medios empleados en la obtención de amilasa fúngica, produce aumentos significativos en la actividad enzimática específica, lo que confirma la importancia tecnológica de tales agregados.
- 4.- Se comprueba que la influencia del corte del suministro de aire, en la obtención de amilasa bacteriana al final de la etapa logarítmica de crecimiento, varía de acuerdo al medio empleado, ya que no se reproducen los resultados mencionados en la bibliografía de experiencias realizadas con la misma cepa con otro medio.

A handwritten signature in cursive script, likely reading 'Muller', is written in the bottom right corner of the page.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Progress in Industrial Microbiology.
Vol. 6, 95 (1967)
- 2.- Bulletin de L'Institut Pasteur.
Tomo 69 n° 2,153 (1971)
- 3.- Dixon, Malcolm y Weeb E.
Enzymes (1960)
- 4.- Advances in Applied Microbiology.
Vol. 7, 273 (1965)
- 5.- Rainbow C. y Rose A.
Biochemistry of Industrial Microorganisms 4,68(1963)
- 6.- Tonomura K, Nacamura N, Suzuki H y Tanabe O.
Jour. Ferm. Tech. Japan 36, 41 (1958)
- 7.- Nacamura Y y Sugawara S.
Chem. Abstr. Vol. 52, 17378b (1958)
- 8.- Shu P. y Blackwood A.
Canad. J. Botany 29, 113 (1951)
- 9.- Feniksova P.
Chem. Abstr. Vol. 52, 12907e (1957)
- 10.- Tikhomirova A.S.
Mikrobiologiya 27, 244 (1958)
- 11.- Tikhomirova V.
Mikrobiologiya 26, 241 (1957)
- 12.- Le Mense E, Corman J, Van Lanen J y Langlykke A.
Journ. of Bacteriol. 54, 149 (1947)
- 13.- Corman J.
Progress Ind. Microb. 6, 96 (1967)
- 14.- Misaeva M.
Chem. Abstr. Vol. 68, 11713q (1968)

- 15.- Erb. N, Wisthoff R. y Jacobs W.
Journ. of Bacteriol. 55, 813 (1948)
- 16.- Musaeva M.
Chem. Abstr. Vol. 68, 10547b (1968)
- 17.- Sakamoto S. y Shuzui
Chem. Abstr. Vol. 51, 18102b (1957)
- 18.- Yoshimura S, Tanaka A, Hashitani Y. y Sukurai K.
Progress Ind. Microb. 6, 96 (1967)
- 19.- Vallee B., Stein E., Summerwell W. y Fisher E.
Jour. Biol. Chem. 234, 2091 (1959)
- 20.- Oikawa A.
J. Biochem. 46, 463 (1959)
- 21.- Seliber G. y Golovkina N.
Mikrobiologiya 26, 292 (1957)
- 22.- Mihashi Y. y Tatsumi M.
Progress Ind. Microb. 6, 96 (1967)
- 23.- Takami, Wataru
Chem. Abstr. Vol. 73, 54625 (1970)
- 24.- Takami, Wataru
Chem. Abstr. Vol. 73, 127950 (1970)
- 25.- Dumn, Fuld, Yamada, Mas Urioste y Casey.
Appl. Microb. Vol. 7 n° 4 (1959)
- 26.- Reese E. y Maguirre A.
Appl. Microb. Vol. 17, 242 (1968)
- 27.- Takahashi J., Abekawa G. y Yamada K.
Chem. Abstr. Vol. 59, 7898a (1963)
- 28.- Fukumoto J.
Bull. de L'Inst. Pasteur 69, 163 (1971)
- 29.- Coleman G. y Grant.
Nature, 211 (1966)

- 30.- Windish W. y Mhatre N.
 Advanc. in Appl. Microb. Vol. 7 (1965)
- 31.- Nomura M. y Hosada J.
 Journ. Biochem. 45, 9 (1958)
- 32.- Tsuru D.
 Agr. Biol. Chem. 26 (1962)
- 33.- Yoshikawa H. y Maruo B.
 Biochem. Biophys. Acta 45 (1960)
- 34.- Stein E y Fisher E.
 J. Biol. Chem. 232 (1958)
- 35.- Wallerstein L.
 Advanc. Appl. Microb. Vol. 7 (1965)
- 36.- Nomura, Maruo y Akabori.
 Chem. Abstr. Vol. 50, 12168b (1956)
- 37.- Mazza L., Balatti A. y Morisi G.
 Anales de la Soc. Cient. Arg. (1972)
- 38.- Mazza L., Ertola R. y Balatti A.
 ION XXVII (1967)
- 39.- Tsuchiya H., Corman J. y Koepsell
 Cereal. Chem. Vol. XXVII, 323 (1950)
- 40.- Roy D. K.
 Progress Ind. Microb. Vol. 6 (1967)
- 41.- Mazza L., Fernandez R, Donato J., Panzica E. y Ertola R.
 ION. XXVI, 181 (1966)
- 42.- Markbanen P. y Bailey M.
 Jour. Appl. Chem. Biotechnol. 24,93 (1974)
- 43.- Mazza L. y Ertola R.
 Appl. Microb. Vol. 19 n°3 (1970)
- 44.- Zajic J. y Liu F.
 Develop. in Ind. Microb. Vol. 11, 33 (1969)
- 45.- Barzizza C. y Manso Soto A.
 Microbiología, 2, 563,7^a Ed. (1956)

- 46.- Sandstedt R., Kneen E. y Blish M.
J. Cereal Chem. 16, 712 (1939)
- 47.- Griffin W. C.
Emulsions Encycl. of Chem. Tech. Vol.8,117 (1968)
- 48.- Coleman G. y Elliot W.
Bull. de L'Inst. Pasteur 2, 167 (1971)
- 49.- A.O.A.C.
11° Edición 262 (1970)

