

OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE
AMILASA SINTETIZADA POR *Bacillus* sp PA4BG AISLADO DEL INTESTINO DE
POLLOS TIPO BROILER

MILTON YONEL ENRÍQUEZ FAJARDO
FRANK CARLOS HERRERA RUALES.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
2007

OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE
AMILASA SINTETIZADA POR *Bacillus* sp PA4BG AISLADO DEL INTESTINO DE
POLLOS TIPO BROILER

MILTON YONEL ENRÍQUEZ FAJARDO
FRANK CARLOS HERRERA RUALES.

Trabajo de Investigación, presentado como requisito para optar el título de
Ingeniero agroindustrial

Director

Ph.D, Pablo Fernández Izquierdo.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
2007

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”.

“Artículo 1 del acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1996, emanada del honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño”.

***“DEDICAMOS ESTE TRABAJO
A NUESTRAS FAMILIAS,
POR SU APOYO INCONDICIONAL”***

AGRADECIMIENTOS

AGRADECEMOS INFINITAMENTE A:

Al profesos, Pablo Fernández, por brindarnos su apoyo y conocimiento
Guido Villota, laboratorista de microbiología de la Universidad de Nariño
Susana Calpa, laboratorista de química de la Universidad de Nariño
Pilar, Mabel y Sandra, laboratorios especializados de la Universidad de Nariño

Nota de aceptación

DIRECTOR

JURADO

JURADO

San Juan de Pasto, mayo 25 de 2007.

RESUMEN.

SE OBTUVIERON 11 MORFOTIPOS BACTERIANOS AMIOLÍTICOS DE MUESTRAS DE CONTENIDO INTESTINAL DE POLLOS TIPO BROILER. SE SELECCIONÓ A EL MORFOTIPO PA4BG COMO EL DE MAYOR ACTIVIDAD AMIOLÍTICA Y SE IDENTIFICÓ COMO *BACILLUS* SP.

LA FASE EXPONENCIAL DE CRECIMIENTO PARA *BACILLUS* SP PA4BG INICIO DESPUÉS DE LAS 10 HORAS DE FERMENTACIÓN Y SE MANTUVO HASTA LAS 28 HORAS, LA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA FUE DETECTABLE A LAS 12 HORAS DE FERMENTACIÓN Y TUVO UN MAYOR INCREMENTO HACIA AL FINAL DE LA FASE LOGARÍTMICA DE CRECIMIENTO ALCANZANDO SU MÁXIMO VALOR A LAS 48 HORAS CON 6.95 U/ML.

EN LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS CONCENTRACIÓN Y EDAD DE INOCULO LA MAYOR ACTIVIDAD AMIOLÍTICA SE OBTUVO CON UNA CONCENTRACIÓN DEL 5% (V/V) Y UNA EDAD DE INOCULO DE 20 HORAS A LAS 48 HORAS DE FERMENTACIÓN Y SU VALOR FUE 9.23 U/ML. EN LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS PH Y TEMPERATURA LA MAYOR ACTIVIDAD AMIOLÍTICA SE OBTUVO CON UN PH DE 6.7 Y UNA TEMPERATURA DE 37°C A LAS 48 HORAS DE FERMENTACIÓN Y SU VALOR FUE 11.95 U/ML.

EL TAMIZADO DE LOS SUSTRATOS DEL CALDO EXPERIMENTAL SE LLEVÓ A CAVO A UNA TEMPERATURA DE 37 °C, PH 6.7, CONCENTRACIÓN DE INOCULO DEL 5% (V/V) Y 20 HORAS EDAD DEL INOCULO, MOSTRANDO SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA CON $P < 0.01$ PARA LOS FACTORES ALMIDÓN DE PAPA, SUERO LÁCTEO Y HARINA DE SANGRE. LOS FACTORES SIGNIFICANTES SE ANALIZARON POR MEDIO DE UN DISEÑO FACTORIAL 2^3 OBTENIENDO UN MODELO POLINÓMICO LINEAL EL CUAL PERMITIÓ DESARROLLAR LA OPTIMIZACIÓN ASCENDENTE DE LA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA, ENCONTRANDO LOS NIVELES MAS ALTOS DE ACTIVIDAD EN LOS EXPERIMENTOS 7 Y 8 CON 16.18 Y 15.83 U/ML RESPECTIVAMENTE. FINALMENTE POR MEDIO DE UN DISEÑO COMPUESTO CENTRAL BLOQUEADO CUBO ESTRELLA SE HALLARON LOS VALORES ÓPTIMOS 52.35 GR/L, 678.77 ML/L Y 6.31 GR/L PARA LOS FACTORES ALMIDÓN DE PAPA, SUERO LÁCTEO Y HARINA DE SANGRE RESPECTIVAMENTE, QUE CORRESPONDEN A LA CIMA DE LA CURVA DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA Y CON LOS CUALES SE ALCANZÓ UNA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA DE 19 U/ML A LAS 40 HORAS DE FERMENTACIÓN.

ABSTRACT

11 AMYLOLITIC BACTERIAL MORFO-TYPES OF INTESTINAL CONTENT SAMPLES FROM BROILER CHICKEN WERE OBTAINED. PA4BG MORFO-TYPE WAS CHOSEN AS THE HIGHEST AMILOLITIC ACTIVITY MORFO-TYPE AND IT WAS IDENTIFIDED AS *BACILLUS* SP.

THE GROWTH EXPONENCIAL PHASE FOR *BACILLUS* SP PA4BG BEGAN AFTER 10 HOURS AND CONTINUED TO 28 HOURS OF FERMENTATION. AMYLASE ACTIVITY WAS ONLY DETECTABLE AFTER 12 HOURS OF FERMENTATION AN ITS MAIN INCREMENT APPEARED AT THE END OF LOGARITMIC PHASE, GETTING THE HIGEST AMYLOLITIC ACTIVITY IN 11.95 U/ML AT 48 HOURS OF FERMENTATION.

WHEN CONCENTRATION AND INOCULUM AGE PARAMETERS WERE EVALUATED, THE HIGEST AMYLOLITIC ACTIVITY WAS 9.23 U/ML WHICH WAS GOT WITH 5%(V/V) AND 20 HOURS AT 48 HOURS OF FERMENTATION. WHEN PH AND TEMPERATURA PARAMETERS WERE EVALUATED , THE HIGEST AMYLOLITIC ACTIVITY WAS 11.95 U/ML WICH WAS GOT WITH PH 6.7 AND TEMPERATURE 37°C AT 48 HOURS OF FERMENTATION.

A SUBSTRATES SCREENING OF THE EXPERIMENTAL MÉDIUM WITH INOCULUM CONCENTRATION 5% (V/V), INOCULUM AGE 20 HOURS, PH 6.7 AND TEMPERATURE 37 °C WAS CARRIED OUT, THE RESULTS INDICATED ESTATISTICAL SIGNIFICANCE WITH $P < 0.01$ TO POTATO STARCH, MILKY WHEY AND BOVINE BLOOD FLOUR. THE SIGNIFICANTS FACTORS WERE ANALYSED BY A 2^3 FACTORIAL DESIGN, GETTING A POLINOMIC LINEAL MODEL WHICH ENABLED TO DEVELOP AN ASCENDANT OPTIMIZATION, THE RESULTS SHOWED THAT THE HIGEST LEVELS OF AMYLOLITIC ACTIVITY WERE 16.18 AND 15.83 U/mL. FINALLY THROUGH A CENTRAL COMPOSITE BLOQUED CUBE-START DESIGN, THE OPTIMAL LEVELS FOR CONCENTRATION OF POTATO STARCH, MILKY WHEY AND BOVINE BLOOD FLOUR WERE FOUNDED AS 52.35 GR/L, 678.77 mL/L AND 6.31GR/L RESPECTIVELY GETTING 19 U/mL AT 40 HOURS OF FERMENTATION.

CONTENIDO.

	Pág
1. INTRODUCCIÓN.	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	19
3. OBJETIVOS.	20
3.1. OBJETIVO GENERAL.	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	20
4. JUSTIFICACIÓN.	21
5. ESTADO DEL ARTE.	22
6. MARCO TEÓRICO.	26
6.1 ALMIDÓN.	26
6.1.1. Estructura química del almidón.	26
6.1.1.1. Amilosa.	26
6.1.1.2. Amilopectina.	27
6.1.1.3 Material intermediario.	28
6.1.2. Estructura del gránulo de almidón.	28
6.1.3. Hidrólisis del almidón.	28
6.1.3.1. Hidrólisis química.	30
6.1.3.2. Hidrólisis enzimática del almidón.	30
6.1.3.3. Productos de la hidrólisis enzimática del almidón.	30
6.1.3.3.1. Glucosa.	30

6.1.3.3.2. Maltosa.	31
6.1.3.3.3. Maltodextrinas.	31
6.1.3.3.4. Dextrinas	31
6.2. LAS AMILASAS.	32
6.2.1. Fuentes de enzimas amilolíticas.	32
6.2.1.1. Enzimas de origen animal.	32
6.2.1.2. Enzimas de origen vegetal	32
6.2.1.3. Enzimas de origen microbiano.	33
6.2.2.1. Amilasa extracelulares.	33
6.2.2.1.1. α -amilasas.	33
6.2.2.1.2. β -amilasas.	35
6.2.2.1.3. Glucoamilasa o amiloglucosidasa.	36
6.2.2.1.4. Enzimas desramificantes.	37
6.2.2.1.4.1. Pululanasa.	37
6.2.2.1.4.2. Isoamilasa.	37
6.2.2.1.4.3. Transferasas.	37
6.2.2.1.5. Ciclodextrín glucosiltransferasa (CGTasas).	37
6.3. CRECIMIENTO MICROBIANO Y SÍNTESIS DE AMILASA.	38
6.3.1. Tasa específica de crecimiento de microorganismo.	38
6.3.2. Cinética de producción de enzimas.	39
6.3.3. Factores importantes en la fermentación de enzimas.	41
6.3.3.1. Cultivo sumergido.	41
6.3.3.2. El pH.	42

6.3.3.3. Temperatura.	43
6.3.3.4. Iones.	44
6.3.3.5. Agentes surfactantes.	44
6.3.4. Inducción de enzimas.	44
6.3.5. Represión por fuente de carbono.	44
6.3.7. Inoculo	45
7. DISEÑO METODOLÓGICO.	46
7.1. SELECCIÓN DEL AISLAMIENTO BACTERIANO AMILOLÍTICO.	46
7.1.1. Muestreo.	46
7.1.2. Cultivo y aislamiento de microorganismos amilolíticos.	46
7.1.3. Selección del mejor aislado bacteriano amilolíticos.	46
7.1.4. Caracterización fenotípica del microorganismo seleccionado.	47
7.2. DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE SÍNTESIS DE AMILASA VS CRECIMIENTO BACTERIANO.	47
7.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN Y EDAD DE INOCULO EN LA SÍNTESIS DE AMILASA.	47
7.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS VARIABLES TEMPERATURA Y PH EN LA SÍNTESIS DE AMILASA.	48
7.5. OPTIMIZACIÓN DEL LOS SUSTRATOS DEL MEDIO EXPERIMENTAL PARA LA SÍNTESIS DE AMILASA.	49
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	52
8.1. AISLAMIENTO DE BACTERIAS AMILOLÍTICAS.	52
8.1.1. Muestreo.	52
8.1.2. Selección del mejor morfotipo bacteriano amilolítico.	52
8.1.3. Caracterización del mejor aislado bacteriano.	54

8.2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y SÍNTESIS DE AMILASA DEL <i>Bacillus</i> sp PA4BG.	54
8.3. EFECTO DE LOS FACTORES CONCENTRACIÓN Y EDAD DEL INOCULO EN LA SÍNTESIS DE AMILASA.	56
8.4. EFECTOS DE LOS PARÁMETROS TEMPERATURA Y PH EN LA ACTIVIDAD DE LA AMILASA.	59
8.5. OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA SÍNTESIS DE AMILASAS POR <i>Bacillus</i> sp PA4BG.	63
CONCLUSIONES.	75
RECOMENDACIONES.	76
BIBLIOGRAFÍA.	77
ANEXOS.	88

LISTA DE CUADROS

	Pág
Cuadro 1. Clasificación de las amilasas.	32
Cuadro 2. Propiedades de algunas α -amilasa bacterianas y fúngicas.	35
Cuadro 3. Algunas propiedades de β -amilasa.	36
Cuadro 4. Algunas propiedades de glucoamilasa.	36
Cuadro 5. Algunas propiedades de pululanasa.	37
Cuadro 6. Algunas propiedades de Ciclodextrín glucosiltransferasa.	38
Cuadro 7. Represión por catabolismo en la síntesis de amilasas.	45
Cuadro 8. Niveles para el diseño factorial 3^2 para determinar la influencia de la edad y concentración del inoculo en la actividad de las amilasas.	48
Cuadro 9. Niveles para el diseño factorial 3^2 para determinar la influencia de la temperatura y el pH en la actividad de las amilasas.	49
Cuadro 10. Sustratos del medio de cultivo experimental.	50
Cuadro 11. Niveles del diseño factorial 2^3 evaluación de las variables significantes en la actividad amilolítica.	50
Cuadro 12. Búsqueda de la zona optima de producción de amilasas.	51
Cuadro 13. Niveles del diseño central compuesto cubo estrella.	51
Cuadro 14. Morfotipos amilolíticos aislados de intestino tenue de pollos tipo broilers y aguas termales en agar MRS modificado según Betancourt (2006).	52
Cuadro 15. Pruebas bioquímicas aplicadas al aislado bacterianos PA4BG.	54
Cuadro 16. Efecto de los factores concentración y edad del inoculo en la actividad amilolítica para <i>Bacillus</i> sp PA4BG.	56
Cuadro 17. Análisis de varianza para edad y concentración del inóculo en la actividad amilolítica por <i>Bacillus</i> sp PA4BG.	57
Cuadro 18. Efecto de los factores temperatura y pH en la en la actividad amilolítica para <i>Bacillus</i> sp PA4BG.	59
Cuadro 19. Análisis de varianza para los variables pH y temperatura.	60
Cuadro 20. Resultados del diseño Plackett-Burman.	64
Cuadro 21. Análisis de varianza para los sustratos del medio experimental.	65
Cuadro 22. Resultados promediados del diseño factorial 2^3 , evaluación de las variables significantes, almidón, lactosuero y harina de sangre bovina en la actividad amilolítica para <i>Bacillus</i> sp PA4BG.	67
Cuadro 23. Análisis de varianza para las variables lactosuero, almidón de papa y harina de sangre.	68
Cuadro 24. Resultados para la pendiente ascendente en la actividad amilolítica para <i>Bacillus</i> sp PA4BG.	69
Cuadro 25. Análisis de varianza de la pendiente ascendente.	70
Cuadro 26. Niveles para el diseño central compuesto cubo-estrella con 6 puntos centrales y 2 replicas para determina la influencia de los factores almidón, Lactosuero y harina de sangre en la actividad de las amilasas.	70

Cuadro 27. Resultados promediados diseño central compuesto cubo-estrella bloqueado.	71
Cuadro 28. Análisis de varianza para diseño central compuesto cubo-principal.	72

LISTA DE FIGURAS.

	Pág
Figura 1. Moléculas de glucosa.	26
Figura 2. Estructura de la amilosa	27
Figura 3. Estructura de la amilopectina	27
Figura 4. Estructura del grano de almidón	28
Figura 5. Perfil de sacáridos en jarabe de glucosa y maltosa	29
Figura 6. Acción de las α -amilasas sobre una cadena de amilopectina	34
Figura 7. Estructura de la α -amilasa	34
Figura 8. Acción de las β -amilasas sobre una cadena de amilopectina.	35
Figura 9. Producción de amilasa por <i>Bacillus amylosolven</i> .	40
Figura 10. Efecto del pH en la producción de amilasa extracelular	43
Figura 11. Relación de crecimiento y producción de α amilasas respecto a la temperatura.	43
Figura 12. actividad amilolítica de los diferentes aislados bacterianos seleccionados. Medio de cultivo agar MRS modificado con 20 gr/L de almidón, Betancourt (2006), 37 °C, 24 horas.	53
Figura 13. Fotografía del aislado bacteriano PA4BG cultivado medio agar MRS modificado con 20 gr/L de almidón (MERCK) Betancourt, (2006). La cual se revelo con yodo sublimado dejando ver el halo producto de la hidrólisis de almidón. Tiempo de incubación 24 horas a 37 °C.	53
Figura 14. Cinética de crecimiento y actividad amilolítica por <i>Bacillus</i> sp PA4BG, donde se observa que la máxima concentración celular es alcanzada a las 34 horas y se mantiene constante hasta las 48 horas mientras la actividad de enzimas se maximiza a finales de la etapa de crecimiento microbiano.	56
Figura 15. Combinación de los factores edad y concentración del inoculo y su efecto en la actividad amilolítica, en caldo MRS modificado con 20 gr/L. tiempo de incubación 48 horas a 37°C.	57
Figura 16. Interacción de las variables concentración y edad del inoculo.	58
Figura 17. Superficie de respuesta para la actividad amilolítica en función de la edad u concentración del inoculo.	59
Figura 18. Combinación de los factores pH y temperatura y su influencia en la actividad amilolítica, en caldo MRS modificado con 20 gr/L, tiempo de incubación 48, inoculo 5% (v/v) a 20 horas.	60
Figura 19. Principales efectos del pH en la actividad de las amilasas.	61
Figura 20. Efectos principales de la temperatura en la síntesis de amilasa.	62
Figura 21. Efecto de la interacción pH y temperatura en la actividad de enzima.	63
Figura 22. Superficie de respuesta para la actividad amilolítica en función de	

pH y la temperatura.	63
Figura 23. Influencia de los sustratos del medio experimental en la actividad amilolítica. Tiempo de incubación 48, 37 °C, pH 6.7, inóculo 5% (v/v) y 20 horas.	64
Figura 24. Efectos del almidón (X_1), lactosuero (X_2) y harina de sangre (X_3) en la actividad amilolítica para <i>Bacillus</i> sp PA4BG.	66
Figura 25. Influencia de los factores almidón, lactosuero y harina de sangres en la actividad amilolítica para <i>Bacillus</i> sp PA4BG. Tiempo de incubación 48, 37 °C, pH 6.7, inóculo 5% (v/v) y 20 horas	67
Figura 26. Contornos de superficie de respuesta estimada para las variables lactosuero, almidón de papa y harina de sangre.	68
Figura 27. Gráfica de ascenso hacia la combinación óptima de sustratos en el medio de cultivo experimental. Tiempo de incubación 48, 37 °C, pH 6.7, inóculo 5% (v/v) y 20 horas de edad.	69
Figura 28. Resultados del diseño central compuesto cubo-estrella bloqueado en el medio de cultivo experimental. Tiempo de incubación 48, 37 °C, pH 6.7, inóculo 5% (v/v) y 20 horas de edad.	71
Figura 28. Diagrama de Pareto	72
Figura 29. Superficie de respuesta para la actividad amilolítica en función de factores almidón, lactosuero y harina de sangre.	74

LISTA DE ANEXOS.

	Pág
Anexo 1. Método de aislamiento de microorganismos productores de amilasas, según bergman y col (1988).	84
Anexo 3. Conservación de la cepa.	85
Anexo 4. Método Smith Y Roe micromodificado.	86
Anexo 5. Soluciones amortiguadoras (buffer).	88
Anexo 6. Acondicionamiento de los sustratos.	89
Anexo 7. Cinética de crecimiento y síntesis de amilasa <i>Bacillus</i> sp PA4BG.	91
Anexo 8. Composición química de los sustratos.	92

INTRODUCCIÓN.

Las amilasas son enzimas que hidrolizan el almidón al romper los enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 específicamente, obteniendo productos denominados hidrolizados de almidón. Las amilasas representan aproximadamente un 25 % del mercado mundial de enzimas, se utilizan en la industria textil, en la producción de jarabes con alto contenido de glucosa y maltosa, en la cervecería para el proceso de malteado, en la fabricación de piensos y detergentes, en la industria del papel, y en panadería.

Las amilasas se pueden obtener de fuentes animales, vegetales y microbianas. El empleo de algunas enzimas de origen vegetal y animal ha ido decayendo debido a que su aplicación requiere producción a gran escala y bajo costo, esto a favorecido la utilización de las enzimas de origen microbiano las cuales dados los avances recientes de la biotecnología, sus rápidas tasas de crecimiento, la posibilidad de mantener los procesos bajo condiciones controladas y sus altos rendimientos se han convertido en la principal fuente de amilasas a nivel industrial.

Gran parte de las actuales investigaciones en el campo de la producción de amilasas microbianas se enfocan en la utilización de recursos agrícolas de bajo costo como sustratos para las fermentaciones. Teniendo en cuenta esto la presente investigación se baso en el aprovechamiento de algunos recursos agroindustriales regionales como almidón de papa, suero lácteo y harina de sangre bovina para la elaboración de un medio de cultivo que optimice la síntesis de amilasa producida por la bacteria *Bacillus* sp PA4BG.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El almidón es un complejo de carbohidratos muy abundante en plantas como cereales, raíces y tubérculos, de donde se extrae por medios físicos separándolo de la fibra y la proteína (Koch y Roper, 1987), su versatilidad hace que tenga gran cantidad de aplicaciones industriales, una de ellas es la producción de carbohidratos simples como dextrinas maltosa, glucosa y otros azúcares (Ostertag, 1993), los cuales se obtienen cuando el almidón es sometido a hidrólisis ácida o enzimática (Chacon y Sarmiento, 2002).

La hidrólisis enzimática del almidón es catalizada por enzimas llamadas amilasas, de las cuales las mas importantes son: la α -amilasa, la β -amilasa, la glucoamilasa y las enzimas desramificantes como pululanasa, isoamilasas y oligo 1-6 glucosidasas (Cereda y Vilpoux, 2003), estas pueden ser encontradas en plantas, animales, y microorganismos como hongos y bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* entre otros (Torben, 2000).

La producción de amilasas bacterianas se lleva a cabo mediante la función de la maquinaria celular normal de síntesis de proteínas que es afectada por condiciones físicas y químicas del medio de crecimiento, como la temperatura, el oxígeno disuelto, pH, carbono, nitrógeno, y micro nutrientes (Teodoro y Martins, 2000).

Las amilasas mas estudiadas de acuerdo a sus aplicaciones industriales son las del genero *Bacillus*, donde la síntesis es inducida por fragmentos procedentes de la degradación del almidón, que generan mayores niveles de enzima que los azúcares simples cuando se utilizan como fuente de carbono (Özlem y col, 2004).

En nuestro medio no se han profundizado estudios relacionados con el aprovechamiento de residuos agroindustriales regionales como el almidón de papa, suero lácteo y sangre bovina en la obtención de productos de la biotecnología de microorganismos tales como las enzimas amilolíticas. Por esta razón se ha decidido llevar a cabo una investigación a fin de responder la siguiente pregunta.

¿Se puede mediante el manejo de parámetros de fermentación optimizar un medio de cultivo para la producción de amilasa sintetizada por bacterias aisladas del intestino de pollos tipo broilers cuando se utiliza subproductos agroindustriales regionales como fuentes de carbono y nitrógeno?

3. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Optimizar un medio de cultivo para la producción de amilasa sintetizada por bacterias aisladas del intestino de pollos tipo broiler.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Seleccionar un aislado bacteriano productor de amilasa.
- determinar la relación entre síntesis de amilasa vs crecimiento bacteriano.
- Evaluar el efecto de las variables edad y concentración de inóculo en la síntesis de amilasa.
- Evaluar el efecto de las variables temperatura y pH en la síntesis de amilasa.
- Optimizar las concentraciones de los sustratos del medio experimental para la síntesis de amilasa.

4. JUSTIFICACIÓN.

La papa (*solanum tuberosum*) es uno de los principales cultivos en Colombia con una área sembrada cercana a las 165.294 hectáreas y una producción de 2,9 millones de toneladas de las cuales Nariño aporta 207.433,1 toneladas convirtiéndose en el tercer productor de papa a nivel nacional con un rendimiento calculado de 16 toneladas por hectárea. Buena parte de la producción esta representada por papa de tercera calidad denominada richi, que comprende tubérculos de tamaño muy pequeño o con daños mecánicos. Este tipo de papa es destinada principalmente a alimentación animal o simplemente se abandona en el terreno en el momento de la cosecha debido a su bajo valor en el mercado lo que genera problemas fitosanitarios. La desvalorización de esta clase de papa se basa en que no cumple con las características típicas que buscan los clientes ya sean consumidores directos o industrias de procesamiento de papa frita o precocida, tales características son generalmente gran tamaño y forma regular del tubérculo, evidentemente la papa de tercera calidad no cumple estas características pero su composición es esencialmente la misma que los tubérculos de primera o segunda calidad, por lo tanto es una fuente económica de un gran volumen de almidón aprovechable en usos industriales. Muchos de sus usos se basan en su aprovechamiento como sustrato en la obtención de productos a través de fermentaciones industriales microbianas, uno de esos productos son las enzimas amilolíticas más conocidas como amilasas las cuales son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, textil y papelería debido a la propiedad de hidrolizar almidones.

Estas enzimas exigen para su síntesis microbiana no solo fuentes de carbono, sino también adecuadas fuentes de nitrógeno orgánico. Varios subproductos y residuos agroindustriales regionales son potencialmente aprovechables como fuentes de nitrógeno en el proceso fermentativo de producción de amilasas, no solo por los volúmenes en los que se encuentran sino por su bajo costo, dos de ellos son; el lactosuero de la industria del queso y la sangre bovina procedente del proceso de faenado, que por sus características fisicoquímicas son un buen complemento cuando se utilizan para la producción de proteínas y o enzimas microbianas.

Lo anteriormente expuesto nos lleva a pretender aprovechar el almidón de papa, el lactosuero y la sangre bovina en la producción de amilasa por medio de la bacteria *Bacillus* sp PA4BG, con lo cual se contribuiría a solucionar la problemática de desvalorización del tubérculo de papa mejorando también el estado fitosanitario del cultivo, además permitiría reducir la acción contaminante del lactosuero y diversificaría los usos actuales de la sangre bovina como materia prima agroindustrial.

5. ESTADO DEL ARTE.

La historia de las amilasas y sus aplicaciones industriales empieza a mediados del siglo XIX cuando se reconoció que la α -amilasa de la cebada aumentaba la fermentación con la generación de azúcares fermentables a partir del almidón propiedad que se aprovechó para su utilización en panadería y producción de bebidas.

En un principio las preparaciones comerciales de las enzimas se obtenían de extractos crudos de plantas y animales, con escasa contribución de los microorganismos. La primera enzima producida y comercializada industrialmente fue la α -amilasa producida por el hongo *A. Oryzae* en 1894 a la que se denominó takadiastasa y su producción se realizaba mediante cultivo en superficie semisólida, en esa misma época fue descubierta una α -amilasa de importancia industrial producida por bacterias del género *Bacillus*, aislada por los franceses Boidin y Efferont.

Desde principios del siglo XX las amilasas fueron aprovechadas para diferentes procesos industriales entre los cuales los más importantes fueron la producción de bebidas alcohólicas y pegantes. A comienzos de los años 50 se inició en Dinamarca la producción en cultivo sumergido de amilasa bacteriana para la industria textil, mientras que a partir de los años 60 en Estados Unidos y Japón se desarrolló la industria del almidón, esto se logró cuando se introdujo por primera vez una preparación enzimática con amiloglucosidasa que permitía hidrolizar completamente el almidón para obtener glucosa.

Actualmente casi toda la producción de glucosa proveniente del almidón se basa en un proceso enzimático debido a ventajas como mayor rendimiento, mayor pureza y facilidad de cristalización, convirtiéndose en producto sustituto del azúcar, lo que ha traído consigo el desarrollo de la producción industrial de enzimas amilolíticas.

Unas 20 compañías de Europa, Japón y Estados Unidos realizan la producción de enzimas, pero el mercado es dominado por 3 de ellas: Novo Nordisk (Dinamarca)

con el 50% de las ventas a nivel mundial, seguida por Gist Brocades (Neatherlands) y Rhom and Haas (Alemania). El mercado de las enzimas ha tenido gran crecimiento desde los años 70 y este ha sido paralelo con el desarrollo de un gran número de aplicaciones en la industria alimentaría.

En América latina existen empresas productoras de enzimas en México, Brasil, Argentina y Uruguay, muchas de las cuales son subsidiarias de empresas transnacionales como es el caso de Pfizer en México y Brasil y Novo en Brasil. En Colombia no hay producción de enzimas a escala industrial, siendo importadas de diversos países de Europa, también de Japón, Estados Unidos, Canadá y México. La importación de enzimas en Colombia se hace en su mayor parte a través de representantes o casas comerciales pero algunas industrias de cervecería y molinería hacen importación directa de las enzimas que requieren.

Debido a la gran importancia económica e industrial de los procesos de producción de amilasas por parte de la empresas hay casi una total falta de información a cerca de las condiciones de crecimiento y producción de los microorganismos desarrollados por las compañías productoras, sin embargo existen muchos estudios a escala laboratorio y planta piloto sobre la influencia de las condiciones de operación en los que se desarrolla la fermentación de los diversos microorganismos.

Ya que cada microorganismo es específico en sus condiciones de fermentación las investigaciones no muestran una norma general en cuanto a condiciones fisicoquímicas y biológicas necesarias para la síntesis de las enzimas, por ejemplo los rangos de pH y temperaturas pueden tener variaciones grandes, Shaista y col (2003), aislaron amilasas del microorganismo *Bacillus subtilis* utilizando como medio de fermentación cáscara de banano, la síntesis óptima de la enzima se alcanzó a una temperatura de 35 °C con un pH inicial de 7 y 50 gr de cáscara de banano mientras Vargas (2002), alcanzó con la cepa de *Bacillus megaterium* MFFB-UNMSM-39 una producción máxima de amilasa a 45 °C y pH 7.5. De igual manera las variables biológicas pueden variar significativamente, Nahas y Waldemarin (2002), evaluaron la producción de amilasa extracelular por *Aspergillus ochraceus* en un medio de cultivo estacionario donde la máxima producción de enzima fue obtenida después de 48 horas, mientras Dhanya y col (2006), encontraron la mayor cantidad de amilasa sintetizada a las 72 horas con 62.470 U/g. A pesar de esto es común en la mayoría de las cepas la utilización de una fuente de carbono compleja como el almidón para favorecer la síntesis de la enzima, en este sentido gran parte de las investigaciones realizadas han utilizado maíz como fuente de carbono, principalmente por ser un cereal de gran explotación en países como Estados Unidos donde es el principal substrato en la producción de azúcares y alcohol.

Recientemente se han desarrollado investigaciones enfocadas al aprovechamiento de fuentes amiláceas tropicales y residuos agroindustriales de países en

desarrollo para la producción de amilasas, encontrando muy buenos resultados, de los cuales se pueden destacar los siguientes:

Vargas (2003), Aisló la cepa *Bacillus megaterium* MFFB-UNMSM-39, realizó su fermentación con almidón de yuca como fuente de carbono en matraz agitado, alcanzó una producción de 16.10 U/mL con pH 7.5, 45°C y 150 rpm, mientras que en biorreactor de tanque agitado de 1 litro registra una producción de 32.84 UmL-1 a 45°C, pH 7.5, 75 rpm y 1.5 vvm, utilizando 25.41 gr de almidón. La producción de amilasa se detectó a las 16 horas hacia finales de la fase logarítmica, incrementándose rápidamente de las 24 a las 36 horas alcanzando la máxima producción a las 60 horas en la fase estacionaria de crecimiento.

Dharani (2004), evaluó la producción de amilasa con fuentes de almidón como papa, yuca amarga, amaranto, cebada, palma de sago y maíz, la producción mas alta fue encontrada utilizando almidón de amaranto con una concentración de amilasa de 382 UmL-1, seguido de almidón de maíz con 364 UmL-1 y almidón de papa con 350 UmL-1.

Bertrand y col (2005), aislaron diferentes tipos de levaduras y evaluaron su crecimiento y actividad amilolítica con almidón de papa, trigo, arroz, yuca, maíz y almidón soluble. La producción de enzima fue mayor en el medio suplementado con almidón de trigo, maíz y papa con 298.5, 200.0 y 103.5 gmL-1 h-1 respectivamente.

Hema y col (2006), reportaron la producción de amilasa en medio sólido utilizando como fuente de carbono, salvado de trigo y desechos de la manufactura de hojuelas de arroz alcanzando una producción máxima de enzima de 92 Ugr--1.

Dhanya y col (2006), evaluaron diferentes tipos de residuos agroindustriales para la producción de amilasa por el *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842, entre ellos estuvieron el salvado de trigo y pasta de maní alcanzado una máxima producción con 62 470 Ugr--1.

A nivel nacional la mayoría de investigaciones con microorganismos amilolíticos se han encaminado principalmente a la producción de alcohol y jarabes de glucosa o fructosa utilizando como sustrato almidón de yuca, actualmente universidades como la de Antioquia y la Nacional están llevando a cabo investigaciones para la obtención de jarabes glucosados con el apoyo de Colciencias (Sánchez, 2002). Sin embargo Sarmiento y col (2003), del grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial de la Universidad Javeriana reportan la producción de α -amilasa con células inmovilizada de la cepa *Thermus* sp, llevada cabo en medio PAP2 modificado por la adición de almidón de maíz en concentración de 3.024gL-1, y con lo cual se obtuvo 60.97Umin-1 a las 24 horas en un fermentador de 1litro y 60.31Umin-1 a las 14 horas en un fermentador de 10 litros.

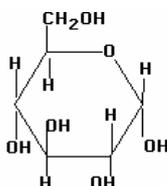
En general las recientes investigaciones sobre producción de amilasas se han centrado en estudiar nuevas y baratas fuentes de carbono, pero han dejado algunos vacíos en el estudio de fuentes alternativas de nitrógeno. En este sentido este trabajo de investigación ha logrado determinar que los subproductos agroindustriales lactosuero y sangre bobina son además de aprovechables, también complementarios cuando se utilizan como fuentes de nitrógeno orgánicas en la producción de amilasas por *Bacillus*.

6. MARCO TEÓRICO.

6.1. ALMIDÓN. El almidón constituye las reservas nutritivas de muchas plantas, esta distribuido tanto en las raíces, tallos y hojas, se encuentra más abundantemente en semillas de los cereales y en los tubérculos como la papa, yuca y otros (Linden, 1996). Es sintetizado durante el proceso de fotosíntesis ocupando la mayor parte de las células sirviendo como una clase de energía almacenada, ya que su oxidación a dióxido de carbono y agua libera energía (International Starch Institute).

6.1.1. Estructura química del almidón. Es un carbohidrato de estructura compleja formado por monosacáridos de glucosa ligados entre si por uniones glucosídicas α -1,4, y α -1,6 y esta representado por la formula general $(C_6H_{10}O_5)_n + xH_2O$, el factor n tiene por lo menos un valor igual a 4; llegándose a encontrar fórmulas con 100 a más átomos de carbono (Vilpoux, 2003).

Figura 1. Molécula de glucosa

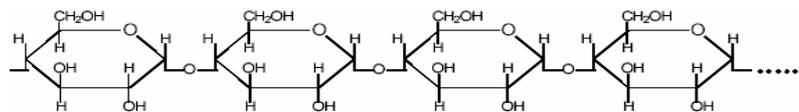


El almidón esta compuesto básicamente por dos tipos de macromoléculas: amilosa y amilopectina, debe muchas de sus funcionalidades a estas dos moléculas así como a la organización física de las mismas dentro de la estructura granular. La proporción entre amilosa y amilopectina varia mucho de acuerdo ala fuente botánica lo que confiere características especificas al a pasta de almidón (Cereda, 2001).

6.1.1.1. Amilosa. La amilosa es un polímero lineal compuesto por enlaces α -1,4 D-glucosa, aunque se presentan algunas ramificaciones. En una de las extremidades de la cadena polimérica la unidad terminal de glucosa presenta un hidroxilo primario y dos secundarios así como un grupo aldehído reductor en forma de un hemiacetal interno, siendo denominado el extremo reductor de la molécula. La extremidad opuesta o extremo no reductor presenta una unidad de glucosa que contiene un hidroxilo primario y tres secundarios, las demás unidades de glucosa del polímero presentan un grupo hidroxilo primario y dos secundarios (Wurzberg, 1986), la amilosa presenta un peso molecular de $1.5 \times 10^5 - 10^6$ y tamaño medio

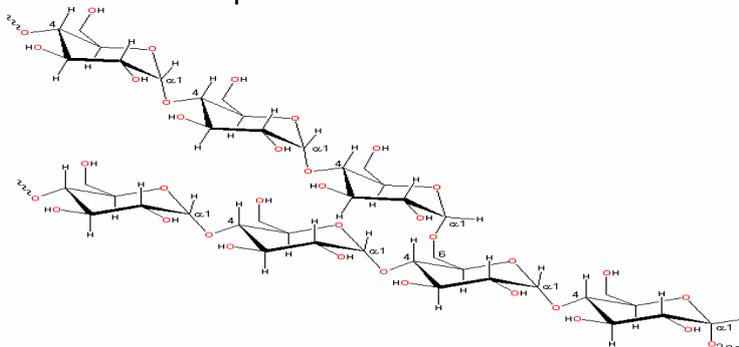
de cadena de aproximadamente 10^3 unidades de glucosa (Cereda, 2001). Aunque podemos encontrar de 200 a 2000 unidades de glucosa, los pesos moleculares de las moléculas ramificadas son de 1,5 a 3 veces mayores que aquellas de las fracciones lineales (Wurzburg, 1986). La amilosa se representa como una estructura de cadenas rectas aunque usualmente existe en forma de hélice, lo cual le permite formar complejos con ácidos grasos libres, mono y diglicéridos, alcoholes lineales y yodo con el cual forma una coloración azul (Cereda, 2001).

Figura 2. Estructura de la amilasa.



6.1.1.2. Amilopectina. La amilopectina es una molécula altamente ramificada formada por unidades de D-glucosa ligadas en α -1,4 y con 5 a 6 % de enlaces α -1,6 en los puntos de ramificación (Buléon, 1998) la gran mayoría de los almidones contienen del 20 al 30 % de amilosa y 70 al 80 % de amilopectina esta razón varía de acuerdo a la fuente botánica (Wurzburg, 1986), es compuesta de cientos de cadenas cortas de (1-4) α -D- glucanos que son ligados por enlaces α -1,6. La amilopectina presenta un grado de polimerización cercano a $10^4 - 10^5$, peso molecular del orden de $(50-500) \times 10^6$ y las longitudes de las ramificaciones son variables mas es común que presenten de 20 a 30 unidades de glucosa (Cereda 2001). En presencia de yodo la amilopectina forma coloración rojiza y es estable en soluciones acuosas. Una molécula de amilopectina consiste en una cadena principal C que carga el grupo reductor de la molécula, y numerosas cadenas ramificadas denominadas A y B. las cadenas A son aquellas que son conectadas a otras cadenas vía enlaces α -1,6 mas no cargan ramificaciones. Las cadenas B son aquellas conectadas a otras cadenas también por enlaces α -1,6 y poseen una o mas cadenas A B ligadas a través de enlaces α -1,6 (Cereda, 2001).

Figura 3. Estructura de la amilopectina

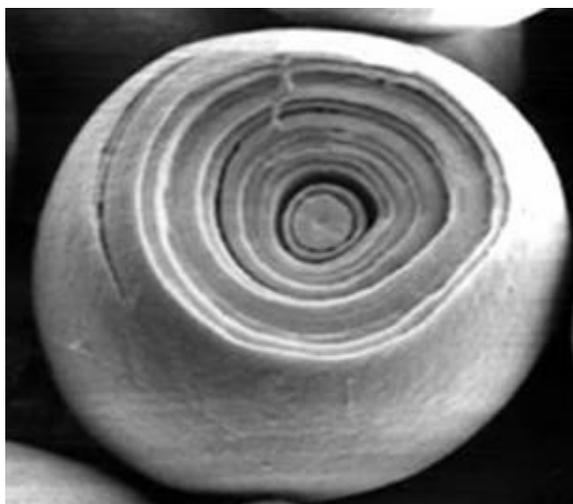


6.1.1.3. Material intermedio. Mas allá de los dos polímeros principales, algunos estudios han mostrado la existencia de un tercer componente del almidón

denominado material intermediario la cantidad y estructura de este material difiere de acuerdo al tipo y grado de maduración del granulo de almidón, el material intermediario consiste en cadenas lineales con grado de polimerización que varia de 50 a 200 moléculas levemente ramificadas y de bajo peso molecular $> 10^6$ (Wang, 1993).

6.1.2. Estructura del granulo de almidón. El almidón existe en entidades discretas, semicristalinas las cuales reciben el nombre de gránulos. El tamaño, la forma y la estructura de los gránulos difieren substancialmente entre fuentes botánicas, los diámetros varían en un rango de 1 μm a 200 μm ; las formas pueden ser elípticas, esféricas, angulares; simples o compuestos. Existe amplia diversidad en la estructura y las características del granulo de almidón nativo, incluyendo variación significativa entre gránulos de una misma especie (Cereda, 2001). La amilopectina es la responsable de la estructura del gránulo de almidón, el cual consiste de áreas cristalinas y no cristalinas, arregladas en capas concéntricas, las cadenas de amilopectina dentro de los gránulos están dispuestas radialmente con sus terminales no reductoras en dirección a la superficie (Jenkins, 1993). Las capas cristalinas están conformadas por segmentos cortos de la cadena de amilopectina que forman dobles hélices mientras que los puntos de ramificación están en las zonas amorfas (Jenkins, 1993; Ball, 1996).

Figura 4. Estructura del grano de almidón.



Fuente Microfotografía www.lsbu.ac.uk.

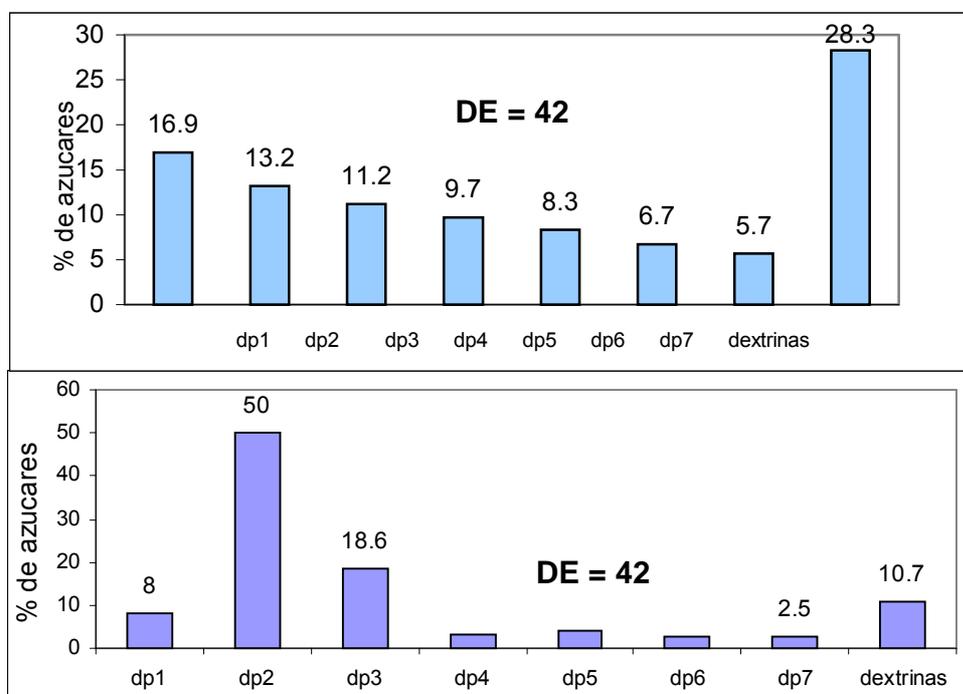
6.1.3. Hidrólisis del almidón. El almidón es sometido a un proceso de hidrólisis cuando ocurre un desdoblamiento ya sea por un exceso de agua o por la presencia de una pequeña cantidad de fermento ó ácido (Fermena, 2000), de acuerdo a lo anterior la hidrólisis de almidón tanto para fines analíticos o industriales puede ser ácida o enzimática. El almidón no tiene sabor, mas sus

productos de hidrólisis presentan un sabor dulce (Cereda, 2001). Con el objeto de cuantificar el grado de hidrólisis así como el tamaño de los productos de la hidrólisis, se define como el equivalente dextrosa (**ED**) y el grado de polimerización (**DP**). El primero de ellos se refiere al porcentaje de glúcidos reductores expresados como glucosa y calculados como porcentaje de sustancia total seca. El grado de polimerización es el número de subunidades de glucosa que contienen una cadena de oligo-o polisacárido (Linden y Lorient, 1996).

- **DE** tiene un valor de 100 cuando la proporción de moléculas de glucosa es 100 %
- **DE** tiene un valor de 52.6 cuando la proporción de moléculas de maltosa es 100%
- **DE** tiene un valor de 0 cuando el almidón no es hidrolizado

Dos productos hidrolizados preparados en diferentes condiciones pueden tener el mismo **DE** y presentar un perfil de azúcares completamente diferente, consecuentemente las propiedades de los productos hidrolizados serán diferentes (Sumerly, 2003).

Figura 5. Perfil de sacáridos en jarabe de glucosa y maltosa. DP: grado de polimerización; DP1: glucosa, DP2: maltosa, DP3: maltotriosa y DP>7: dextrinas.



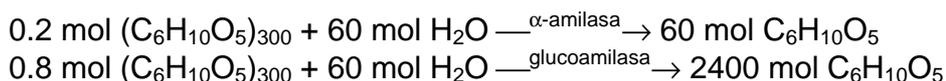
6.1.3.1. Hidrólisis química. Varios compuestos químicos inducen la hidrólisis del almidón, los químicos mas usados son los ácidos minerales. La hidrólisis se da por desdoblamiento de las moléculas amilosa y amilopectina, que se rompen transformándose en dextrinas cada vez más simples y finalmente en glucosa (Cereda, 2001), sin embargo la aplicación a usos alimentarios se ve limitada debido a la introducción de sabores indeseables en el producto final (Linden y Lorient, 1996).

6.1.3.2. Hidrólisis enzimática del almidón. las enzimas rompen los enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 específicamente (Linden y Lorient, 1996), la hidrólisis enzimática inicia con la licuefacción, este proceso es catalizado por las α -amilasas, el almidón ya licuado es constituido en su mayoría por dextrinas, que son transformados a azúcares de bajo peso molecular, el procesos de sacarificación que ocurre con la ayuda de enzimas específicas como glucoamilasas, β -amilasas, dependiendo de la clase de producto deseado. El origen y la dosificación de la enzima, la temperatura, pH y el tiempo de reacción influyen en la composición final de los productos de hidrólisis del almidón (Teague y Bruma, 1992).

6.1.3.3. Productos de la hidrólisis enzimática del almidón. La designación de hidrolizado de almidón reúne a todos los productos del fraccionamiento del almidón independiente del catalizador usado, o el grado de fraccionamiento. Incluyen un número importante de productos como glucosa, maltosa, maltotetraosa, maltodextrinas, ciclodextrinas, dextrinas etc. Los hidrolizados presentan propiedades físicas, funcionales, energéticas y organolépticas características de cada uno (Teague y Bruma, 1992).

6.1.3.3.1. Glucosa. La glucosa es designada a todas las soluciones acuosas de polímeros de D-glucosa, obtenidos por hidrólisis del almidón y con un **(DE)** entre 20 – 80. Por glucosa entendemos los productos hidrolizados con contenido de moléculas de glucosa en proporción de 5 – 95 % con la condición que ellas predominan en relación a los otros polisacáridos. La glucosa pura o dextrosa es hecha de 100% D-glucosa. La glucosa comercial es una mezcla de hidrolizados compuesta predominantemente por glucosa además de maltosa, maltotriosa, y otros sacáridos en proporción variable (Sumerly y col, 2003).

La transformación del almidón en glucosa se realiza según las siguientes series de reacciones enzimáticas:



Luego a partir de una mol de almidón y 2400 mol de H₂O se obtienen 2400 mol de glucosa, que equivale a decir que a partir de 1Kg de almidón se produce 1.11Kg

de glucosa si las reacciones se llevan a cabo en un rendimiento del 100%, pero el rendimiento de las reacción es del 97% para las cadenas lineales de amilosa y del 90% para las cadenas de amilopectina; lo que conduce a una producción de 1.1 en masa (Cheftel, J.C. y Cheftel,H 1976).

6.1.3.3.2. Maltosa. El jarabe de maltosa es una solución acuosa purificada y concentrada, contiene al menos 30% de maltosa con la condición que la maltosa predomina con relación a los otros sacáridos. La concentración máxima de maltosa que es posible producir por hidrólisis del almidón a escala industrial es aproximadamente del 90%. El principal uso del jarabe de maltosa es como sustituto de parte de la malta en la manufactura de la cerveza (Okada y Nakakuki, 1992).

Se producen dos tipos fundamentales de jarabes de maltosa. Uno de ellos contiene un contenido de 30 – 50% de maltosa y el 6 - 9% de glucosa un equivalente dextrosa (DE) de 42 – 49% y se utilizan en mermeladas y pastelería por su resistencia a la aparición del color, no ser higroscópico y no cristalizar tan fácilmente como los jarabes de glucosa. El otro contiene del 30 al 40% de maltosa, 30 – 50% de glucosa y un equivalente dextrosa (DE) de 63 - 70. El contenido de azúcares fermentables es alto y se mantiene estable durante el almacenamiento (Schenk y Hebeda, 1992).

6.1.3.3.3. Maltodextrinas. La maltodextrina es una solución acuosa purificada y concentrada, líquida o seca. Contienen una mezcla de glucosa, maltosa, maltotriosa y otros sacáridos cuyo equivalente en dextrosa (DE) es menor a 20, que es un grado de hidrólisis mas bajo que los jarabes de maltosa y glucosa. Las propiedades de las maltodextrinas de acuerdo al equivalente dextrosa siguen las mismas variaciones de aquellos reportados para jarabes de glucosa (Sumerly, 2003).

6.1.3.3.4. Dextrinas. Son producto intermedio de la conversión del almidón en azúcares, son sacáridos con siete o mas unidades de glucosa en su cadena y tienen un peso molecular elevado. Su proceso de obtención consiste en someter a calor una suspensión de almidón de 35% p/v, hasta la gelatinización, luego esta es enfriada y se adiciona enzima, al final de la dextrinización el material es calentado para desactivar la enzima y luego es filtrado. Las dextrinas presentan muchas aplicaciones industriales y alimentarias, su uso más común es como adhesivo para cajas de cartón, sobres y estampas. Es usada también para dar brillo a cereales procesados y ornamentaciones cerámicas, además del uso en textiles e industria farmacéutica. En el sector alimentario las dextrinas son usadas en la preparación de comidas como agentes espesantes, y tiene aplicaciones en la industrial de la cerveza, panadería, jugos y bebidas a base de cocoa, licores destilados y confitería etc (Sumerly, 2003).

6.2. LAS AMILASAS. Las amilasas son enzimas que degradan el almidón y tienen numerosas aplicaciones biotecnológicas. Se encuentran en la saliva, los jugos pancreáticos, las células de la sangre, las semillas y granos de muchas plantas, en hongos y bacterias (Scragg, 1997). Las amilasas rompen los enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 específicamente, obteniendo productos que van desde oligosacáridos como las dextrinas hasta jarabes de maltosa y glucosa (García y col, 1993). Las amilasas pueden ser divididas en dos grandes grupos: las endoamilasas, que cortan aleatoriamente los enlaces glucosídicos en el interior de la molécula y las exoamilasas, que hidrolizan las moléculas desde el extremo no reductor de la molécula (Scragg, 1997).

Cuadro 1. Clasificación de las amilasas.

Tipo de amilasas	enzimas	Microorganismos productores
endoamilasas	α -amilasas	<i>B. Cereus</i> , <i>b.magaterium</i> , <i>B. Polymyxa</i> , <i>A. Niger</i> , <i>A. Swamori</i> , <i>A. Crysse</i> .
	otras enzimas exoactivas	<i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>aerobacter aerogenes</i> .
	pulunasas e isomerasas	<i>bacillus cereus</i> . <i>B macerans</i> , <i>b. Amiloliquefaciens</i> .
exoamilasas	Glucoamilasa β-amilasas	<i>A. Niger</i> , <i>A. Swamori</i> , <i>A. Crysse</i> <i>b. subtilis</i> , <i>b. Amyloliquefaciens</i> .

Fuente: (Sumerly, 2003).

6.2.1. Fuentes de enzimas amilolíticas. Las fuentes de enzimas se dividen en tres grupos: animales, vegetales y microbianas. En años pasados las plantas y los animales fueron las fuentes tradicionales de enzimas, pero dados a los avances recientes de la biotecnología, el futuro esta en los microorganismos (Scragg, 1997).

6.2.1.1. Enzimas de origen animal. Las enzimas de origen animal son obtenidas a partir de sus tejidos, por lo general, se preparan de animales recién sacrificados. Inmediatamente después de sacrificio, se quitan los tejidos y se congelan para evitar la degradación bioquímica y sulfuración, el principal tejido animal que se usa como fuente de amilasas es el páncreas (Scragg, 1997). Actualmente las enzimas animales tienen interés industrial son las pepsinas bovinas y porcinas (Sumerly, 2003).

6.2.1.2. Enzimas de origen vegetal. Las plantas han sido fuente tradicional de un cierto número de enzimas (Gacesa y Huble, 1990), durante muchos años se han hecho preparaciones rudimentarias de enzimas vegetales, sin embargo la

extracción de enzimas a partir de plantas es a menudo difícil y requiere equipo pesado para macerar y moler el material típicamente fibroso (Scragg, 1997). Las amilasas están ampliamente distribuidas en las plantas superiores, especialmente en la cebada malteada la cual constituye la fuente principal de enzimas vegetales en la industria cervecera, en donde se ha utilizado tradicionalmente este material crudo para extraer varias proteínas y glucohidrolasas (Gacesa y Huble, 1990); Wiseman 1993).

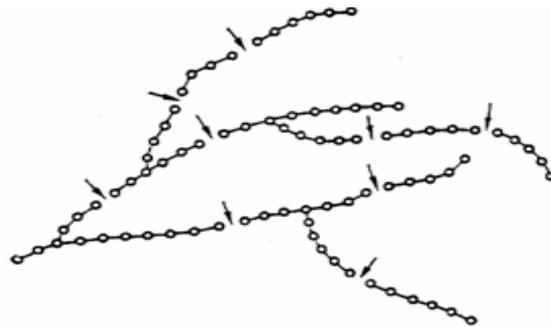
6.2.1.3 Enzimas de origen microbiano. La producción de amilasas por vía microbiana esta siendo intensamente estudiada por investigaciones científicas y tecnológicas, tanto en optimización de procesos de fermentación como en mejoramiento genético de microorganismos para aumentar la síntesis de enzimas (Scragg, 1997), las enzimas microbianas son más útiles que las de las plantas o animales por la gran variedad de actividades catalíticas de que disponen y por que usualmente pueden obtenerse en cantidades abundantes, baratas, de forma regular y de calidad uniforme, ocasional mente mediante cultivos de superficie o usualmente mediante técnicas de fermentación aeróbica de cultivos profundos. Además las enzimas microbianas son más estables que sus homólogos de las plantas o animales y su proceso de producción es más fácil y seguro que el seguido con plantas y animales (Wiseman, 1993).

6.2.2.1. Amilasa extracelulares. La mayoría de las amilasas microbianas usadas comercialmente son extracelulares, esto quiere decir que se producen en el interior de la célula y luego son excretadas o difunden en el medio de cultivo (Scragg, 1997), las enzimas extracelulares poseen varias ventajas sobre las intracelulares de las cuales podemos nombrar las siguientes. La molécula es segregada fuera de la célula y no requiere técnicas de ruptura celular además la mayor parte de las enzimas se encuentran en el sobrenadante de cultivo, de modo que los métodos de recuperación suelen ser operaciones unitarias de centrifugación, filtración y precipitación. El número de proteínas que se segregan es limitado y por eso es relativamente fácil de aislar una enzima a partir de una mezcla, contrariamente a todo ello, las enzimas intracelulares se han de separar a partir de una mezcla amplia de sustancias, que incluyen otras proteínas y material contaminante, tales como ácidos nucleicos. Se pueden obtener rendimientos del 1% (v/v) a partir de fermentadores que tienen mayor volumen. Las enzimas extracelulares suelen presentar una estructura mas compacta y son menos susceptibles a la desnaturalización (Wiseman, 1993; Byong, 2000).

6.2.2.1.1. α - amilasas. Las α - amilasas (1,4- α -Glucan-glucohidrolasas) son enzimas extracelulares que hidrolizan enlaces α -1,4 glucosídicos. Estas enzimas son endoamilasas, que cortan aleatoriamente los sustratos en el interior de la molécula. Su acción no es inhibida por enlaces α -1,6 glicosídicos, que por otra parte no son hidrolizados por ellas (Croeger, 1993).

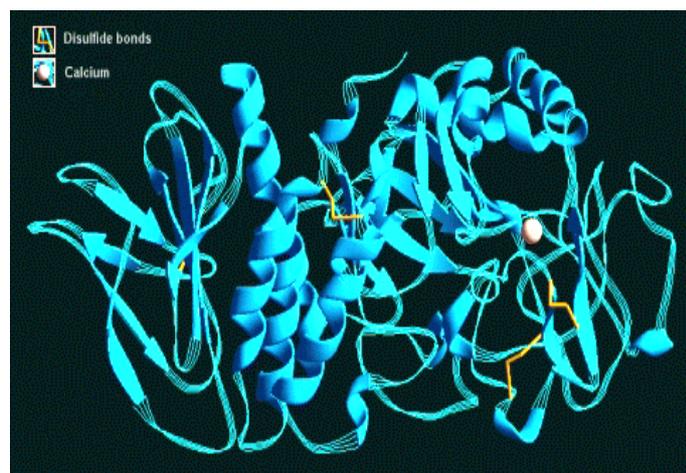
Estas enzimas transforman el almidón provocando una drástica disminución de la viscosidad y generando una distribución de productos de bajo peso molecular. (García y col, 1993), los productos de hidrólisis tienen configuración alfa en la glucosa del extremo reductor (Wiseman, 1993).

Figura 6. Acción de las α -amilasas sobre una cadena de amilopectina.



Las α -amilasas son metaloproteínas formadas por una cadena polipeptídica, su estructura primaria se ha determinado a partir de la secuencia de nucleótidos de los genes que la codifican (Tada, 1989). Se piensa que la enzima actúa por la acción combinada de los grupos carboxilo e histidina del centro activo. Las α -amilasas obtenidas de *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* tienen un ión calcio fuertemente ligado por molécula, que es necesario para la actividad de la enzima y para estabilizar la estructura tridimensional de la proteína frente al calentamiento (Wiseman, 1993).

Figura 7. Estructura de la α -amilasa.



Condiciones de pH, Ca²⁺ y temperatura, producen cambios en la actividad de la enzima así como la composición específica y el peso molecular, tienen ciertas variaciones que dependen de la fuente de donde se haya extraído dicha enzima. La estabilidad y la actividad que los iones calcio le generan a la α -amilasa es un fenómeno estudiado ampliamente (Schwimmer, 1981), estos iones pueden provenir de sales como acetato de calcio, sulfato de calcio y cloruro de calcio, siendo esta última sal la más comúnmente utilizada (Sumerly, 2003).

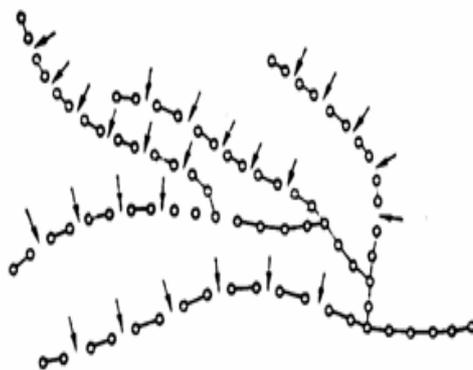
Cuadro 2. Propiedades de algunas α -amilasa bacterianas y fúngicas.

Organismo	pH optimo	° T optima	Peso molécul ar x10 ³
<i>B. acidocaldarius</i>	3.5	75	68
<i>B. myloliquefaciens</i>	5.6	65	49
<i>B.subtilis</i>	5.3 – 6.4	50	24 – 100
<i>B. sp</i>	5.0 – 6.0	70	-
<i>Thermomonospora curvata</i>	5.5 – 6.0	65	62
<i>A. oryzae</i>	5.5 – 5.9	40	51 – 52
<i>A. Níger</i>	5.0 – 6.0	60	58 – 61
<i>Mocur pusillos</i>	3.5 – 40	65 – 70	48 – 51

Fuente (Croeger, 1993).

6.2.2.1.2. β -amilasas. La enzima actúa hidrolizando el último enlace glucosídico α -1,4 del extremo no reductor de las cadenas de amilosa y amilopectina, liberando unidades de maltosa en forma secuencial hasta que la acción de la enzima se ve limitada por los enlaces α -1,6 de la amilopectina, la acción de la β -amilasa sobre la amilopectina resulta en la conversión de 50 – 60% de maltosa y forma de β -dextrinas límite (Wiseman, 1993).

Figura 8. Acción de las β -amilasas sobre una cadena de amilopectina.



En contraste a las α -amilasas el calcio no es necesario para la estabilización y activación de las β -amilasas bacterianas (Croeger, 1993) y se inhibe por los reactivos de grupos sulfhídrico (Montoya, 2004).

Cuadro 3. Algunas propiedades de β -amilasa.

Microorganismos	pH optimo	°T optima	Peso moléculas x10 ³
<i>Bacillus cereus</i>	7.0	40	62
<i>Clostridium thermosulphurogenes</i> H-12-1	5.5	75	210
<i>Bacillus sp</i> IMD 198	6.8	55	58
<i>Bacillus circulans</i>	7.0 – 7.5	60	60
<i>Bacillus sp</i> IMD 273	6.5 – 7.0	50	57
<i>Bacillus megaterium</i> G-2 ^a	7.0	60	60

Fuente (Croeger, 1993).

6.2.2.1.3. Glucoamilasa o amiloglucosidasa. Las glucoamilasa (α - 1,4- Glucan – glucohidrolasas) cataliza la hidrólisis de los enlaces α -1,4 del almidón y de los oligosacáridos, liberando moléculas de β - glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena. Los enlaces ramificados α - 1,6 también se hidrolizan, pero mucho más lentamente formándose un jarabe de glucosa con equivalente en dextrosa de 97-98 DE, un contenido de glucosa del 95 al 97% en peso y de un 30 aun 5% de oligosacáridos grandes (Sumerly, 2003).

Esta enzima es una glicoproteína que tiene un peso molecular de 60-100.000 Daltons y un pH óptimo de 4.3-4.5 (Wiseman, 1993). Las amiloglucosidasas se usan a gran escala en la industria del procesamiento de el almidón en tanques discontinuos a 55 60°C y pH de 4.5 con periodos de incubación de 42-48, horas para transformas las dextrinas formadas por las α -amilasas en glucosa. (Sumerly, 2003).

Cuadro 4. Algunas propiedades de glucoamilasa

microorganismos	pH optimo	Temperatura optima	Peso molecular
<i>Monascus sp</i> GA-I	4.5	55	52000
<i>Aspergillus niger</i>	4.5	70	63000
<i>Candida tsukubaensis</i>	2.4 – 4.8	55	56000
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	5.5	60	306000

Fuente (Croeger, 1993).

6.2.2.1.4. Enzimas desramificantes. Dentro de este grupo se puede encontrar enzimas como r-enzima, pululanasa, isoamilasa y oligo 1,6-glucosidifasa. Que hidrolizan exclusivamente los enlaces α -1,6 de la amilopectina del almidón licuado; ellas tienen diferentes características y especialidades pero en general ellas rompen los enlaces transformando el almidón en dextrinas lineales (Sumerly, 2003), sus productos son principalmente maltosa y maltotriosa (Marc y col, 2002).

6.2.2.1.4.1. Pululanasa. La pululanasa tiene este nombre porque hidroliza al polisacárido lineal pululano (Wiseman, 1993). , cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1,6 presentes en el pululan, el glicogen y la amilopectina (Furegon, 1997)

La fuente comercial de la pululanasa es la *Klebsiella pneumonia*, que la excreta durante su crecimiento, aunque una parte de enzima parece estar ligado a la célula. Como sustrato principal para inducir la síntesis de enzima se emplea almidón rico en amilopectina (Wiseman, 1993).

Cuadro 5. Algunas propiedades de pululanastas.

microorganismos	pH optimo	Temperatura optima	Peso molecular
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	6.0	65	83000
<i>Bacillus acidopullulyticus</i>	5.0	60 - 65	115000
<i>Thermus aquqticus</i>	6.4	95	83000
<i>Clostridium</i> sp.	5.0	60 - 70	-

Fuente (Croeger, 1993).

6.2.2.1.4.2. Isoamilasa. Esta enzima no hidroliza al pululano y tiene una acción limitada sobre las dextrinas limite, se pueden obtener a partir de *Flavobacterium* y *pseudomonas deramosa* que actúan sobre los enlaces α -1,6 situados en los puntos de ramificación y no dentro de cada línea, como ocurre en el pululano (Wiseman, 1993). .

6.2.2.1.4.3. Transferasas. Las transferasas son enzimas que emplean un aceptor glucosídico (la glucosa en solución) para la transferencia de unidades de glucosa provenientes de un donador (el sustrato), formando un nuevo enlace glucosídico. En este grupo se encuentran las transglucosidasas, la amilomaltasa y las Ciclodextrín glucosiltransferasa; y aunque estas enzimas no son deseables en la hidrólisis de almidón, siempre se encuentran en pequeñas cantidades en los preparados comerciales (Montoya, 2004).

6.2.2.1.5. Ciclodextrín glucosiltransferasa (CGTasas). La Ciclodextrín glucosiltransferasa forma ciclodextrinas circulares a partir del almidón, formadas

por 6,7 y 8 unidades de glucosa llamadas α , β y γ ciclodextrinas respectivamente. También pueden transferir la glucosa del almidón al residuo glucosa de la sacarosa. Las enzimas son extracelulares y pueden purificarse mediante la adsorción al almidón. La enzima proveniente de *B. macerans* se ha utilizado para producir dextrinas que contienen fructosa por glucosilación de hidrolizados de almidón de equivalentes en dextrosa superiores a 10 con sacarosa o azúcar invertido (Wiseman, 1993).

Cuadro 6. Algunas propiedades de Ciclodextrín glucosiltransferasa.

microorganismos	pH optimo	Temperatura optima	Peso molecular
<i>Bacillus macerans</i>	6.2 – 6.4	50 – 55	-
<i>Pseudomonas</i> sp MSI	5.5	50	96000
<i>Bacillus coagulans</i>	6.2	50	62000
<i>Lipomyces kenonenkoe</i>	5.0	60	345000

Fuente (Croeger, 1993).

6.3. CRECIMIENTO MICROBIANO Y SÍNTESIS DE AMILASA.

6.3.1. Tasa específica de crecimiento. En un proceso comercial la duración de la fermentación contribuye al costo del producto, por lo que una fase de letargo mínima resulta muy deseable. La fase 2 es conocida como la fase exponencial, durante la cual la división celular o velocidad de aumento de biomasa llega a ser máxima. La velocidad de producción de biomasa se aproxima a la representada por la ecuación (Wiseman, 1986; Bautista, 1997).

$$X_t = X_0 \cdot e^{\mu t} \quad (1)$$

Donde la biomasa ha incrementado desde X_0 g/L a X_t gL⁻¹ en t horas. La constante μ se conoce como velocidad específica de crecimiento de los organismos (unidades, h⁻¹) y se deriva de la expresión.

$$\mu = (dX/dt)(1/X) \quad (2)$$

Donde (dX/dt) es la velocidad de aumento de biomasa (unidades, gL⁻¹h⁻¹) en el punto en que la biomasa ha alcanzado X g. Integrando y ordenando la ecuación (2) nos da.

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu t \quad (3)$$

$$\mu = (\ln X - \ln X_0)/t \quad (4)$$

μ puede calcularse experimentalmente a partir de la ecuación 4. De esta forma si se determina los valores de X y de t , durante cierto intervalo de tiempo, y se representa X (en g L^{-1}) frente a t (en horas) en ejes de coordenadas, es posible ajustar por un análisis de regresión exponencial los puntos resultantes a una recta, cuya pendiente es el valor de μ expresado en h^{-1} (Wiseman, 1986; Bautista, 1997)

La velocidad específica de crecimiento μ generalmente esta en función de tres parámetros: la concentración de sustrato limitante S , la velocidad máxima de crecimiento $\mu_{\text{máx}}$ y la constante específica de cada sustrato K_s .

$$\mu = \mu_m S / (K_s + S) \quad (5)$$

La constante K_s es una constante cuya magnitud representa la afinidad del organismo por el sustrato limitante del crecimiento se define también como la concentración de sustrato a la que se obtiene la mitad de las velocidades específicas de crecimiento máxima ($\mu = 0.5\mu_{\text{máx}}$) (Byong, 2000; Wiseman, 1986; Croeger, 1993).

A medida que el sustrato limitante de crecimiento es consumido por el cultivo, su concentración S en el medio disminuye hasta que llega a ser el mismo orden que K_s . a partir de este punto la velocidad de crecimiento del cultivo disminuye significativamente (ecuación 5) hasta que alcanza la fase estacionaria momento en que el crecimiento cesa totalmente. Una fase de retardo correspondiente a la lisis celular sigue a la fase estacionaria (Byong, 2000).

A medida que el valor de s se acerca al de k_s algunos cultivos microbianos sintetizan y a menudo excretan compuestos conocidos como metabolitos secundarios (Wiseman, 1986).

Las velocidades máximas de crecimiento son de considerable importancia industrial. El valor de μ_m depende del microorganismo y de las condiciones de fermentación. Las velocidades específicas de crecimiento varía entre 0.090 - 0.61 h^{-1} puesto que un organismo necesita energía adicional para degradar el sustrato con cadenas largas, la velocidad específica de crecimiento para sustratos sencillos es mayor que para moléculas de cadena larga (Croeger, 1993)

6.3.2. Cinética de producción de enzimas. No ha sido desarrollado un modelo cinético general aplicable a la síntesis de enzimas aunque existen muchos trabajos relacionados con la regulación de formación de enzimas microbianas. En muchos casos se aplica con relativo éxito el modelo clásico desarrollado por Luedeking y Piret para ácido láctico y extendido para otros productos de la fermentación (García y col, 1993).

$$dp/dt = \alpha(dx/dt) + \beta X \quad (6)$$

Donde se plantea que la velocidad de síntesis de producto es proporcional al crecimiento del microorganismos (primer termino), y a la cantidad de células presentes en el medio (segundo termino).

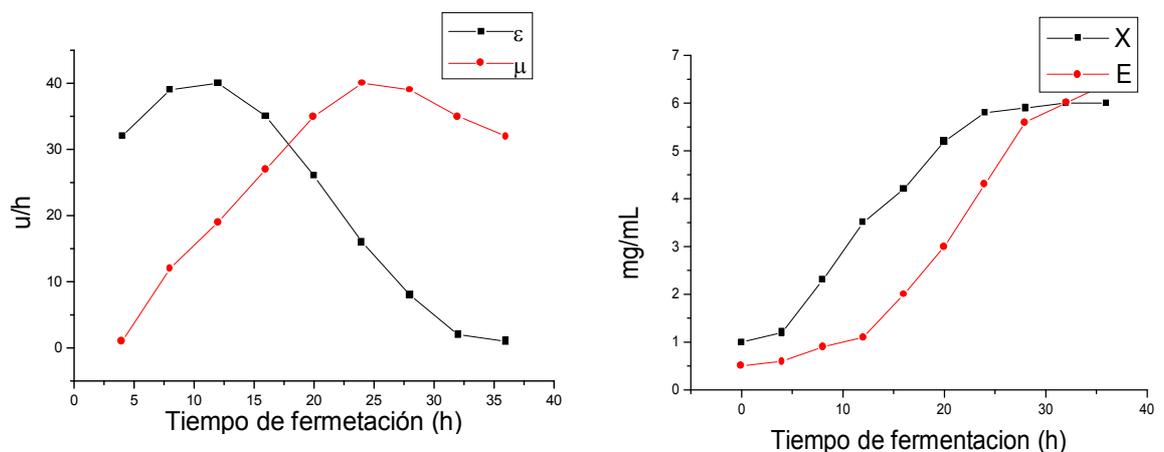
$$q_p = \alpha\mu + \beta \quad (7)$$

Donde: $q_p = (1/X)(dp/dt)$ velocidad específica de síntesis de producto.
 $\mu = (1/X)(dX/dt)$ velocidad específica de crecimiento.
 X = concentración celular.
 p = actividad enzimática ($U^{-1}mg$ de biomasa, UmL^{-1}).
 α y β son constantes del modelo.

Existen enzimas que son producidas perfectamente asociadas al crecimiento, deteniéndose la síntesis al llegar a la fase estacionaria (caso $\beta = 0$). Sin embargo lo común es encontrar la producción de enzima ubicada en la fase post-exponencial, sin ninguna relación con el crecimiento (caso $\alpha = 0$) a diferencia de lo que sucede para muchos metabolitos primarios en el caso reproducción de enzimas no puede establecerse relación estequiométrica en la fermentación (García y col, 1993).

La velocidad de formación de α -amilasa es muy baja durante el crecimiento exponencial en muchas cepas de producción, pero justo antes de que la velocidad de crecimiento decaiga y comience la formación de esporas, aumenta la producción de amilasas (Croeger, 1993).

Figura 9. Producción de amilasa por *Bacillus amylosolven*. Donde μ es la velocidad específica de crecimiento, ϵ velocidad específica de producción de enzima, X concentración de células, E concentración de enzima (Croeger, 1993).



6.3.3. Factores importantes en la fermentación de enzimas. En el diseño de la fermentación de enzimas es muy importante iniciar con la cepa mas activa disponible. Frecuentemente es conocido que las cepas productoras de enzimas pueden ser obtenidas por trabajos en campo o de colecciones de cultivos. En la ausencia de tales cultivos, un programa de screening de cultivos de la naturaleza o colecciones de cultivos puede ser llevado a cabo. Antes de finalizar la selección de la cepa algunos factores deberían revisarse tan profundamente como sea posible (Fogarty y Kelly, 1990).

Algunos factores importantes para la producción de enzimas por microorganismos

1. cepa microbiana
2. temperatura
3. pH
4. transferencia de oxígeno
5. nivel de dióxido de carbono
6. fuentes de energía, C, N₂, P, S y otros inorgánicos.
7. Factores de crecimiento
8. Etapa del ciclo de crecimiento
9. Rata de crecimiento
10. Adición de agentes surfactantes
11. Inducción
12. Represión y atenuación
13. Represión de nutrientes

Una vez una buena cepa es obtenida, los parámetros de fermentación deben ser optimizados al máximo crecimiento y producción enzimática. Factores muy importantes son la temperatura el pH y la transferencia de oxígeno. También son importante la nutrición del microorganismo especialmente con respecto a las fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y sales minerales es especial mente frecuente en la producción de enzimas extracelulares la adición de agentes surfactantes (Fogarty y Nelly, 1990).

Si la fermentación es conducida como un cultivo tipo batch, la etapa del ciclo de crecimiento a la cual el contenido de enzima es el mas alto debe ser determinada. En muchos casos la enzima desaparece rápidamente después de alcanzar su actividad pico. Aun cuando la actividad enzimática no desaparece de las células su estabilidad en un extracto crudo puede variar ampliamente, dependiendo sobretodo de el tiempo de recolección. Tal observación es presumiblemente debida a la producción de proteasas en las etapas finales (Fogarty y Kell, 1990).

6.3.3.1. Cultivo sumergido. La casi totalidad de las enzimas producidas en el mundo occidental, proviene de procesos de fermentación en cultivo sumergido, entiendo por estos aquellos en los que nutrientes y los microorganismo se encuentran en fase acuosa, su gran ventaja sobre el cultivo semisólido estriba en

la homogeneidad que es posible establecer en el cultivo, de tal forma que no existen gradientes de temperatura, pH o concentraciones de nutrientes en el sistema (García y col, 1993).

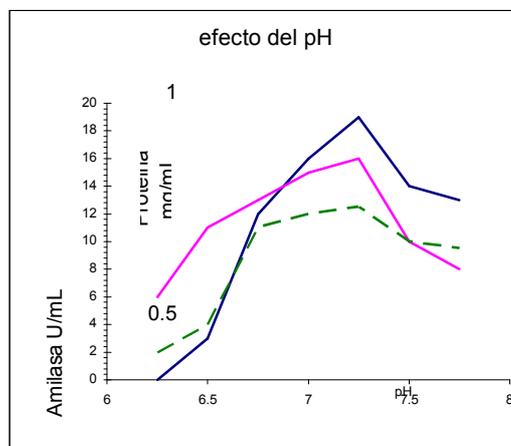
6.3.3.2. El pH. Puesto que la estructura y la actividad de las enzimas es dependiente del pH, se esperaría que los mecanismos de transporte celular, las reacciones y la velocidad de crecimiento dependieran también del pH, el crecimiento microbiano suele ser máximo en el rango de pH 6,5 – 7,5 (Byong, 2000).

En términos de pH, es necesario distinguir entre cuatro valores, que no necesariamente coinciden:

- El pH máximo de crecimiento del microorganismo productor.
- El pH máxima producción de enzima.
- El pH máximo de estabilidad de la enzima.
- El pH máxima actividad de la enzima.

La regulación de un valor determinado es con frecuencia requerida, no solo para mantener la fermentación en las condiciones de máxima producción si no también para evitar cambios que pueda afectar la actividad enzimática. Existen casos, en que el pH de producción de enzima y crecimiento de microorganismos, sobre todo para enzimas intracelulares, no coinciden con el pH de máxima actividad de la enzima (García y col, 1993). Para la regulación de pH, así como para los ajustes al inicio y al final del proceso, el ácido y la base se deben seleccionarse, después de asegurarse que no tengan efectos negativos sobre la enzima. El hidróxido de sodio y el ácido ortofosfórico son los más empleados (García y col, 1993).

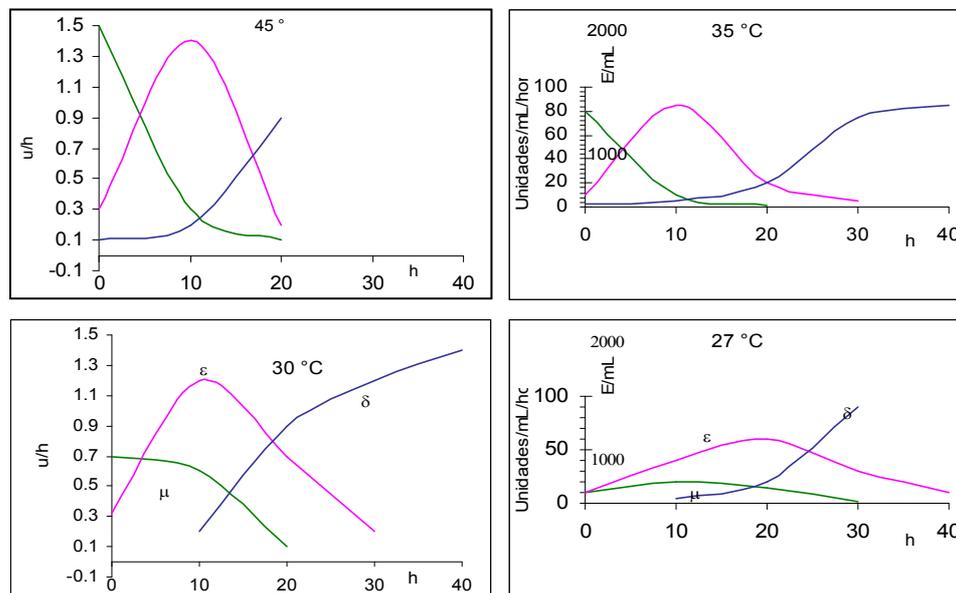
Figura 10. Efecto del pH en la producción de amilasa extracelular. ___ amilasa, - - peso seco, -.-proteína (Crueger, 1993).



6.3.3.3. Temperatura. Las fermentaciones son llevadas a cabo en rangos mesófilos (temperatura óptima 20-45°C). o termófilos (>45°C). Debe escogerse la temperatura apropiada para conseguir el máximo crecimiento y la formación óptima de enzima (Croeger, 1993). Como en la casi totalidad de los procesos de fermentación industrial, la temperatura es regulada a lo largo de la fermentación. Generalmente la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo coincide con la producción de enzimas, sin embargo la temperatura de máximo crecimiento no puede ser siempre la adecuada para estabilidad de una cierta enzima haciendo necesario una optimización con el objeto de encontrar la temperatura del proceso adecuada para maximizar la producción y preservación de la enzima durante la fermentación (García y col, 1993). Es frecuente entonces encontrar temperaturas de máxima producción de enzimas inferiores a las del máximo crecimiento del microorganismo, es este el caso de la producción de α -amilasas (Mamo y Gessesse, 1999; García y col, 1993).

El efecto de la temperatura sobre la producción de amilasa y la velocidad de crecimiento se muestra en la siguiente figura.

Figura 11. Relación de crecimiento y producción de α amilasas respecto a la temperatura.



Fuente Crueger, 1993.

A 45°C se alcanza la velocidad máxima de formación específica de la enzima a 18 horas en la cepa de control; sin embargo, la cantidad máxima de enzima

producida se obtiene a temperaturas considerablemente mas baja (27-30°C) (Croeger, 1993).

6.3.3.4. Iones. Es conveniente añadir en el caso de algunas enzimas, se requiere de ciertos iones en el medio de fermentación para una eficiente producción. En algunos casos estos iones juegan un papel importante en la actividad (metaloproteinas) y en otros en la estabilidad, por ejemplo, la síntesis de α -amilasas, requieren la presencia de Ca^{2+} Mg^{2+} . Una vez tomados en cuenta los factores, la definición de elementos restantes del medio de cultivo se basa en requerimientos mínimos para el crecimiento del microorganismo (García y col, 1993).

6.3.3.5. Agentes surfactantes. Se ha encontrado que la adición de agentes surfactantes, específicamente el Tween 80 y el triton, aumentan la producción de gran numero de enzimas extracelulares y aunque el mecanismo de acción es desconocido, se supone que estos agentes modifican la permeabilidad celular (García y col, 1993).

6.3.4. Inducción de enzimas. Los genes estructurales que codifican muchas enzimas son normalmente inactivos en la ausencia del sustrato, por lo que la producción de enzimas es generalmente represada. De todas formas cuando un sustrato es adicionado el gen estructural es activado y la enzima es producida. Tal proceso es denominado "inducción" o "de represión" y la enzima es considerada como "inducible" (Fogarty y Nelly, 1990)

Substratos análogos que no son atacados por la enzima son frecuentemente excelentes inductores en la síntesis de enzimas. Aunque la mayoría de los inductores son sustratos o sustratos análogos, intermediarios y productos algunas veces funcionan como inductores. Esto es común especialmente en enzimas extracelulares que hidrolizan polímeros extensos. Donde una baja concentración de enzima es producida aun bajo condiciones de represión, este nivel basal actúa lentamente sobre unas pocas moléculas del polímero, liberando inductores de bajo peso molecular los cuales entran a la célula e inducen la enzima, en este sentido siendo almidón una macromolécula que no puede ser tomada por la célula y por tanto no puede actuar como inductor de la síntesis de la amilasa. Se asume que una pequeña cantidad de enzima se produce constitutivamente y se excreta al medio, donde su acción sobre el almidón conduce a la producción de inductores de bajo peso molecular (Fogarty y Nelly, 1990; Croeger, 1993).

6.3.5. Represión por fuente de carbono. La represión por fuente de carbono también es conocida como represión del catabólicos de carbono, es otro mecanismo conservativo el cual protege contra el desgaste de la maquinaria de síntesis de proteínas de una célula Opera cuando mas de un sustrato de carbono esta presente en el ambiente. Las células producen enzimas para catabolizar la fuente de carbono mas rápidamente asimilable; la síntesis de enzima cuando se

esta utilizando otro sustrato es represada hasta que el primer sustrato es agotado. Las enzimas involucradas son usualmente inducibles. La represión por fuentes de carbono es un fenómeno usualmente causado por la glucosa pero en diferentes organismos otras fuentes de carbono rápidamente metabolisables pueden causar represión (Fogarty y Kell, 1990).

La represión catabólica en la producción de la mayor parte de enzimas extracelulares es significativa. La glucosa favorece más el crecimiento en comparación con otros sustratos, pero es menos favorable en términos de producción de amilasas. En fermentación discontinua con carbohidratos como factor limitante, el crecimiento es inversamente proporcional a la producción de amilasas. Cuando se utiliza nitrógeno como factor limitante con exceso de glucosa, solamente se producen trazas de amilasas (Croeger, 1993).

La represión por fuente de carbono es muy importante en la práctica comercial puesto que muchas enzimas de importancia industrial actual o potencial están sujetas a este tipo de regulación (Fogarty y Kelly, 1990).

Cuadro 7. Represión por catabolismo en la síntesis de amilasas

ENZIMA	MICROORGANISMO	REPRESIÓN FUENTE DE CARBONO
α -amilasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	Glucosa, fructosa y xilosa
β -amilasa	<i>Bacillus megaterium</i>	Glucosa maltosa
β -1,3 glucanasa	<i>Streptomyces sp</i>	Glucosa y glicerol
β -glucosidasa	<i>Trichoderma reesei</i>	Glucosa

Fuente Fogarty y Kell (1990).

La represión por fuente de carbono puede ser evitada por el uso de una fuente de carbono no represora (si la fuente de carbono no represora esta disponible y el costo es competitivo), o limitando la tasa de crecimiento por alimentación controlada de la fuente de carbón represora (Fogarty y Kell, 1990).

6.3.7. Inoculo. Si un fermentador se inicia con poco inoculo, el crecimiento se retrasa y la velocidad de formación de producto puede ser insatisfactoria, con cantidades mayores la "carga" de material indeseable proveniente de la fermentación previa puede disminuir el funcionamiento del cultivo, como regla general se usa hasta 10% de inoculo (Scragg, 1997; Croeger, 1993).

7. DISEÑO METODOLÓGICO.

7.1. SELECCIÓN DEL AISLAMIENTO BACTERIANO AMILOLÍTICO.

7.1.1. **Muestreo.** Las muestras se recolectaron desde el intestino de pollos tipo broilers de 4 semanas de edad. Se colectaron 3 muestras según la técnica descrita por Betancourt (2006); en la cual después del sacrificio de los pollos, se hace una corte vertical a bajo del esternon para extraer el intestino, luego se vertió 10 mL de contenido del intestino en frascos estériles de 50 mL, se rotularon las muestras adecuadamente y se trasladaron al laboratorio para sus análisis posteriores.

7.1.2. **Cultivo y aislamiento de microorganismos amilolíticos.** Para el aislamiento de microorganismos amilolíticos se empleo el método microbiológico de Bergman y col (1988) anexo 1, luego se propagaron las muestras en un medio compuesto por 20 gr/L de almidón (MERCK), peptona 10gr/L (OXOID), extracto de carne 10gr/L (OXOID), extracto de levadura 5 gr/L (OXOID), sulfato de magnesio heptahidratado 0.2 gr/L (MERCK), Sulfato de manganeso monohidratado 0.05 gr/L (MERCK), acetato de sodio anhidro 5 gr/L (MERCK), fosfato dipotasico 2 gr/L (MERCK) y agar 15 gr/L (OXOID). Las muestras se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Se identificó con un código las colonias bacterianas en cada una de las cajas petri agrupándolas de acuerdo a sus características morfológicas según el manual de Bergey's (1994).

Cada una de los aislados bacterianos se sembró por punción en cajas petri y tubos inclinados con agar MRS (OXOID) y se rotularon adecuadamente. Los tubos se llevaron a refrigeración mientras las cajas se incubaron a 37 °C por 24 horas, posteriormente se guardaron bajo refrigeración.

7.1.3. **Selección del mejor aislado bacteriano amilolíticos.** Para la selección del mejor aislado bacteriano se empleo un medio de cultivo compuesto por: almidón 20 gr/L (MERCK), peptona 10gr/L (OXOID), extracto e carne 10gr/L (OXOID), extracto de levadura 5 gr/L (OXOID), sulfato de magnesio heptahidratado 0.2 gr/L (MERCK), Sulfato de manganeso monohidratado 0.05 gr/L (MERCK), acetato de sodio anhidro 5 gr/L (MERCK), fosfato dipotasico 2 gr/L (MERCK) y agar 15 gr/L (OXOID). El pH del medio de cultivo fue ajustado a 6,2 con NaOH 0,5N. Luego se sembró por punción 5 cajas petri para cada uno de los aislados bacterianos y se incubaron durante 24 horas a temperaturas de 37°C.

Para determinar los aislados bacterianos con mayor capacidad amilolítica se aplicó la técnica propuesta por Montoya (2004), en la cual se reveló los halos de almidón hidrolizado producidos por cada uno de los aislados a través de la sublimación de yodo sobre el medio de cultivo. Posteriormente se midió el diámetro de los halos y se realizó la selección del microorganismo por medio de la prueba estadística de Tukey. Luego de seleccionado, el microorganismo se conservó en tubos inclinados, perlas de porcelana y glicerol, anexo 3.

7.1.4. Caracterización fenotípica del microorganismo seleccionado. La caracterización de la bacteria seleccionada, se realizó con base en las siguientes pruebas: tinción de Gram, motilidad, indol, fermentación de lactosa y catalasa, además se determinaron sus características morfológicas y se compararon de acuerdo a las descritas en el Manual Bergey's.

7.2. DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE SÍNTESIS DE AMILASA VS CRECIMIENTO BACTERIANO. Los caldos utilizados como medio de cultivo estuvieron compuestos por: almidón 20 gr/L (MERCK), peptona 10gr/L (OXOID), extracto de carne 10gr/L (OXOID), extracto de levadura 5 gr/L (OXOID), sulfato de magnesio heptahidratado 0.2 gr/L (MERCK), Sulfato de manganeso monohidratado 0.05 gr/L (MERCK), acetato de sodio anhidro 5 gr/L (MERCK), fosfato dipotásico 2 gr/L (MERCK). El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 6,2 con NaOH 0,5N.

Se preparó un inóculo en erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de caldo, el cual fue inoculado con la bacteria desde una caja petri con una asa de argolla, luego se incubó a 37°C por 24 horas, este inóculo fue estandarizado con cámara de Neubauer a una concentración celular de 5.44×10^7 .

La fermentación se llevó a cabo durante 48 horas a 37°C en cultivos batch discontinuos, en 24 frascos de 50 mL cada uno con 9 mL de caldo a los cuales se les adicionó 1 mL del inóculo. Para la evaluación del crecimiento y actividad enzimática se realizaron mediciones cada 2 horas y 4 horas respectivamente, el crecimiento celular se determinó a través de espectrofotometría a una longitud de onda de 400 nm y por recuento en cámara de Neubauer. Mientras que la actividad amilolítica se determinó a través del método Smith y Roe micromodificado (1949), anexo 4, para lo cual fue necesario centrifugar los 2 mL de muestra a 5000 rpm durante 5 minutos.

7.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN Y EDAD DE INOCULO EN LA SÍNTESIS DE AMILASA. Los caldos utilizados como medio de cultivo estuvieron compuestos por: almidón 20 gr/L (MERCK), peptona 10 gr/L (OXOID), extracto de carne 10gr/L (OXOID), extracto de levadura 5 gr/L (OXOID), sulfato de magnesio heptahidratado 0.2 gr/L (MERCK), Sulfato de

manganeso monohidratado 0.05 gr/L (MERCK), acetato de sodio anhidro 5 gr/L (MERCK) y fosfato dipotasico 2 gr/L (MERCK). El pH fue ajustado a 6,2 con NaOH 0,5N.

Se preparó un inoculo en erlenmeyer de de 125 mL con 100 mL de caldo el cual fue inoculado con la bacteria desde una caja petri con una asa de argolla y se incubó a 37°C por 24 horas, luego el preinoculo fue estandarizado con cámara de Neubauer a una concentración celular de 5.44×10^7 .

Para determinar la influencia de as variables en el proceso de síntesis de amilasa se realizó un diseño factorial 3^2 con tres puntos centrales y dos replicas, se consideraron como variables independientes la edad del inoculo y concentración del inoculo. Los valores máximos y mínimos de estas variables se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 8. Niveles para el diseño factoria 3^2 para determinar la influencia de la edad y concentración del inoculo en la actividad de las amilasas.

Factor	Nivel		
	Mínimo	Medio	Máximo
Edad del inoculo (horas)	12	16	20
Concentración del inoculo (%)	5	10	15

Las fermentaciones se realizaron en frascos de 50 mL con 10 mL de caldo durante 48 horas a 37°C. Se tomó como variable de respuesta la actividad amilolítico que se cuantifico a través del método Smith y Roe micromodificado (1949), anexo 4.

7.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS VARIABLES TEMPERATURA Y PH EN LA SÍNTESIS DE AMILASA. Los caldos utilizados como medio de cultivo estuvieron compuestos por: almidón 20 gr/L (MERCK), peptona 10gr/L (OXOID), extracto de carne 10gr/L (OXOID), extracto de levadura 5 gr/L (OXOID), sulfato de magnesio heptahidratado 0.2 gr/L (MERCK), Sulfato de manganeso monohidratado 0.05 gr/L (MERCK), acetato de sodio anhidro 5 gr/L (MERCK) y fosfato dipotasico 2 gr/L (MERCK).

Se preparó un preinoculo en erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de caldo el cual fue inoculado con la bacteria desde una caja petri con una asa de argolla y se incubó a 37°C por 24 horas, luego el preinoculo fue estandarizado con cámara de Neubauer a una concentración celular de 5.44×10^7 .

Se preparó un inoculo en erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de caldo el cual fue inoculado con 10 mL del preinoculo y se incubó a 37°C por 20 horas. Las

fermentaciones se realizaron en frascos de 50 mL con 9.5 mL de medio y 0.5 mL de inoculo durante 48 horas a 37°C. Los pH se ajustaron a 5.7, 6.2 y 6.7 por medio de soluciones amortiguadoras buffer fosfato, anexo 5.

Para determinar la influencia de las variables en el proceso de síntesis de amilasa se realizó un diseño factorial 3^2 con tres puntos centrales y dos replicas, se consideraron como variables independientes el pH y temperatura. Los valores máximos y mínimos de las variables se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 9. Niveles para el diseño factoria 3^2 para determina la influencia de la temperatura y el pH en la actividad de las amilasas.

Factor	Nivel		
	Mínimo	medio	Máximo
pH	5.7	6.2	6.7
Temperatura (°C)	32	37	42

Se tomó como variable de respuesta la actividad amilolítica que se cuantifico a través del método Smith y Roe micromodificado (1949), anexo 4.

7.4. OPTIMIZACIÓN DEL LOS SUSTRATOS DEL MEDIO EXPERIMENTAL PARA LA SÍNTESIS DE AMILASA. El medio experimental fue constituido por: sales minerales, Citrato de amonio (MERCK), Acetato sodio (MERCK), Sulfato de Mg (MERCK), Sulfato de Mn (MERCK), Fosfato di-potasico (MERCK), urea, almidón de papa, harina de sangre bovina y lactosuero. El pH del medio experimental se ajustó a 6.7 con una solución amortiguadora buffer fosfato, anex 5.

Los medios de cultivo utilizados en la obtención del preinoculo e inoculo estuvieron compuestos por: almidón 20 gr/L (MERCK), peptona 10 gr/L (OXOID), extracto de carne 10gr/L (OXOID), extracto de levadura 5 gr/L (OXOID), sulfato de magnesio heptahidratado 0.2 gr/L (MERCK), Sulfato de manganeso monohidratado 0.05 gr/L (MERCK), acetato de sodio anhidro 5 gr/L (MERCK) y fosfato dipotasico 2 gr/L (MERCK). El pH de estos medios de cultivo fue ajustado a 6,2 con NaOH 0,5N.

Se preparó un preinoculo en erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de caldo el cual fue inoculado con la bacteria desde una caja petri con una asa de argolla y se incubó a 37°C por 24 horas, luego el preinoculo fue estandarizado con cámara de Neubauer a una concentración celular de 5.44×10^7 .

Se preparó un inoculo en erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de caldo el cual fue inoculado col 10 mL del preinoculo y se incubó a 37°C por 20 horas.

Las fermentaciones se realizaron en frascos de 50 mL con 9.5 mL de medio experimental y 0.5 mL de inoculo durante 48 horas a 37°C. El pH se ajustaron a 6.7 con una solución amortiguadora buffer fosfato, anexo 5.

La optimización del medio experimental se llevó a cabo en 4 fases. En la primera parte se evaluó e identificó los factores significativos por medio de un diseño exploratorio de Plackett-Burman, este permitió evaluar 9 variables en 12 corridas con un punto central y 2 replicas bajo los parámetros de fermentación ya encontrados (edad inoculo, concentración inoculo, pH y temperatura). Los valores máximos y mínimos de este experimento se muestran en la cuadro 10. Se tomó como variable de respuesta la actividad amilolítica que se cuantifico a través del método Smith y Roe micromodificado (1949), anexo 4.

Cuadro 10. Sustratos del medio de cultivo experimental.

Factores		Mínimo	Máximo	Unidades
X ₁	Almidón de papa.	2	16	g/L
X ₂	Lactosuero.	25	75	mL
X ₃	Urea (MERCK).	0.5	2.5	g/L
X ₄	Citrato de amonio (MERCK).	1	3	g/L
X ₅	Acetato sodio (MERCK).	3	7	g/L
X ₆	Sulfato de Mg (MERCK).	0.1	0.3	g/L
X ₇	Sulfato de Mn (MERCK).	0.25	0.75	g/L
X ₈	Harina de sangre bovina.	2	8	g/L
X ₉	Fosfato di-potasico (MERCK).	1.6	3.6	g/L

En la segunda fase se determinó la mejor combinación de las variables significantes; para lo cual se utilizo un diseño factorial 2³ con 3 puntos centrales y dos replicas, para la obtención de un modelo polinomial lineal. Las fermentaciones se llevaron a cavo con un pH de 6.7, una temperatura de 37° C, concentración de inoculo de 5% y una edad de inoculo de 20 horas en recipientes estériles de 50 mL con 10 mL de medio caldo experimental durante 48 horas. Se tomó como variable de respuesta la actividad amilolítica que se cuantifico a través de método Smith y Roe micromodificado (1949), anexo 4.

Cuadro 11. Niveles del diseño factorial 2³ evaluación de las variables significantes en la actividad amilolítica.

Factor	Nivel	
	Mínimo	Medio
X _{n1}	-1	1
X _{n2}	-1	1
X _{n3}	-1	1

En la tercera fase se hizo un acercamiento a la zona óptima por medio de aproximación a la máxima pendiente utilizando la ecuación de regresión lineal obtenida en el diseño factorial 2^3 . Las fermentaciones se llevaron a cabo con dos replicas, con los parámetros de pH, temperatura, edad y concentración del inóculo ya establecidos. En recipientes estériles de 50 mL con 10 mL de medio caldo experimental durante 48 horas. Se tomó como variable de respuesta la actividad amilolítica, que se cuantificó a través del método Smith y Roe micromodificado (1949), anexo 4.

Cuadro 12. Búsqueda de la zona óptima de producción de amilasas.

Experimento	x1	x2	X3
1	[x1]1	[x2]1	[x3]1
2	[x1]2	[x2]2	[x3]2
3	[x1]3	[x2]3	[x3]3
4	[x1]4	[x2]4	[x3]4
5	[x1]5	[x2]5	[x3]5
6	[x1]6	[x2]6	[x3]6
7	[x1]7	[x2]7	[x3]7
n	[x1]n	[x2]n	[x3]n

En la cuarta fase se encontró el óptimo local, determinando las concentraciones de las variables significantes para optimizar la actividad amilolítica, se utilizó un diseño compuesto central cubo-estrella con 6 puntos centrales. Las fermentaciones se llevaron a cabo con dos replicas, bajo los parámetros de pH, temperatura, concentración y edad del inóculo ya establecidos, en recipientes estériles de 50 mL con 10 mL de medio caldo experimental por 48 horas. La variable de respuesta fue actividad amilolítica cuantificada por método Smith y Roe micromodificado (1949), anexo 3.

Cuadro 13. Diseño compuesto central cubo-estrella.

Factor	Nivel				
	Distancia axial	[x]n Mínimo	[x]n Medio	[x]n Máximo	Distancia axial
Xn1	-1.80907	-1	0	1	1.80907
Xn2	-1.80907	-1	0	1	1.80907
Xn3	-1.80907	-1	0	1	1.80907

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1. AISLAMIENTO DE BACTERIAS AMILOLÍTICAS.

8.1.1. Muestreo. En el cuadro 14 se presentan los resultados obtenidos al realizar el aislamiento de morfotipos bacterianos amilolíticos desde el intestino tenue de pollos tipo broilers en medio agar MRS modificado con 20gr/L de almidón soluble (MERCK) según Betancourt, (2006).

Cuadro 14. Morfotipos amilolíticos aislados de intestino tenue de pollos tipo broilers en agar MRS modificado según Betancourt, (2006).

Fuente	Morfotipos bacterianos	Gram positivos	Gram negativos
Pollo A	PA3GR	⊗	
	PA3BT		⊗
	PA3CP	⊗	
	PA4GR		⊗
	PA4BG	⊗	
	PA6GR		⊗
	PA6PR	⊗	
Pollo B	PB4PL	⊗	
	PB3GL		⊗
Pollo C	PC3LC	⊗	
	PC4GT	⊗	
TOTAL	11	7	4

El proceso de aislamiento arrojó como resultado 11 morfotipos bacterianos amilolíticos de los cuales 7 se determinaron como pertenecientes al grupo de los Gram positivos y 4 al grupo de los Gram negativos.

8.1.2. Selección del mejor morfotipo bacteriano amilolítico. Después del proceso de aislamiento y purificación se aplicó una prueba de hidrólisis de almidón cuyos resultados se evaluaron a través de un análisis de varianza aplicando la prueba F. El análisis se determinó con un nivel de confianza de 95% evidenciando que hay diferencias significativas en la actividad amilolítica ($p = 0.0000$).

A través de la prueba Tukey se establecieron 3 grupos de aislados bacterianos con medias similares. En el grupo con menor actividad amilolítica se incluyen los aislados bacterianos PA3CP, PC3LC, PA6PR, PA4GR, PC4GT, PA6GR, PB4PL,

PB3GL y PA3BT. El aislado bacteriano PA4BG formo un grupo homogéneo mostrando diferencia significativa, con un promedio de halo de 10 mm.

Figura 12. actividad amilolítica de los diferentes aislados bacterianos seleccionados. Medio de cultivo agar MRS modificado con 20 gr/L de almidón, Betancourt (2006), 37 °C, 24 horas.

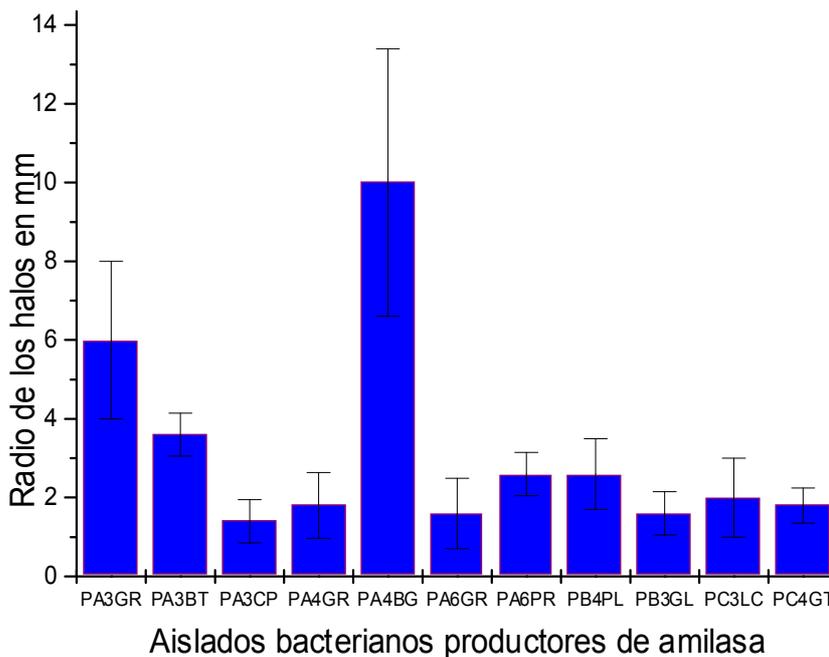


Figura N° 13. Fotografía del aislado bacteriano PA 4BG cultivado en medio agar MRS modificado con 20 gr/L de almidón (MERCK) Betancourt, (2006). La cual se revelo con yodo sublimado dejando ver el halo producto de la hidrólisis de almidón. Tiempo de incubación 24 horas a 37 °C.



8.1.3. Caracterización del mejor aislado bacteriano. El aislado bacteriano **PA4BG** cultivado en agar MRS modificado con 20 gr/L de almidón Betancourt (2006), formó colonias planas de color blanco con bordes ramificados, en medios de cultivo líquidos crece con bastante rapidez formando una película rugosa suave en la parte superior del medio evidenciando la necesidad de oxígeno para su crecimiento.

Bajo la observación en microscopio (1000 X) se observaron bacilos Gram positivos, de bordes redondeados que se encuentran libres o formando cadenas. En tinción bacteriana con verde malaquita en cultivos superiores a 50 horas se puede observar la presencia de endosporas en posición central de forma elíptica que no deforma la célula.

Cuadro 15. Pruebas bioquímicas aplicadas al aislado bacteriano PA4BG.

Pruebas bioquímicas	Resultado
Indol	+
Lactosa	+
Catalasa	+
Motilidad	+
Hidrólisis de almidón	+
Oxidasa	-
Azul de anilina	-
Glucosa	+

De acuerdo a las descripciones enunciadas en el Manual Bergey's, las características morfológicas y los resultados de las pruebas bioquímicas cuadro 15, presentados por el aislado PA4BG, el aislado es afín con *Bacillus* sp.

Casi todos los microorganismos del género *Bacillus* sintetizan amilasas, por esto este género tiene un gran potencial industrial, las cepas del género *Bacillus* que son usadas extensivamente para la producción de amilasas son *Bacillus. amyloliquefaciens*, *Bacillus. licheniformis*, *Bacillus. stearothermophilus*, *Bacillus. stearothermophilus*, *Bacillus. acidopullulyticus*, *Bacillus. macerans*, *Bacillus. coagulans*, *Bacillus. subtilis*, *Bacillus. Acidocaldarius*, *Bacillus. cereus*, *Bacillus. megaterium* y *Bacillus. circulans*.

Además de ser el género más explotado industrialmente es también el más estudiado debido a las características de las enzimas que sintetizan, entre las cuales vale la pena destacar el amplio rango de temperaturas y pHs en los cuales son eficientes o las altas concentraciones de sustrato a las que pueden trabajar (Vargas, 2002; Hema Anto y col, 2006; Shah Ali y col, 2006; Wiseman, 1993; Furegon, 1997; Croeger, 1993; Scragg, 1997).

8.2. RELACIÓN ENTRE CRECIMIENTO Y SÍNTESIS DE AMILASA DEL *Bacillus* sp PA4BG. Los resultados evidenciaron la existencia de una fase de latencia cercana a las 4 horas explicable por el hecho de existir una fuente de carbono compleja lo que exige energía adicional para la degradación del sustrato, a partir de este momento se inicia una fase de aceleración positiva comprendida entre las 4 y 10 horas, durante este periodo no se detectó ninguna variación en la actividad amilolítica en el medio de cultivo permaneciendo constante en 0.00763 U/mL, según Croeger, (1993), el almidón por ser una macromolécula, no puede ser aprovechada por las células y por lo tanto no puede actuar como inductor en la síntesis de amilasas al inicio de la fermentación

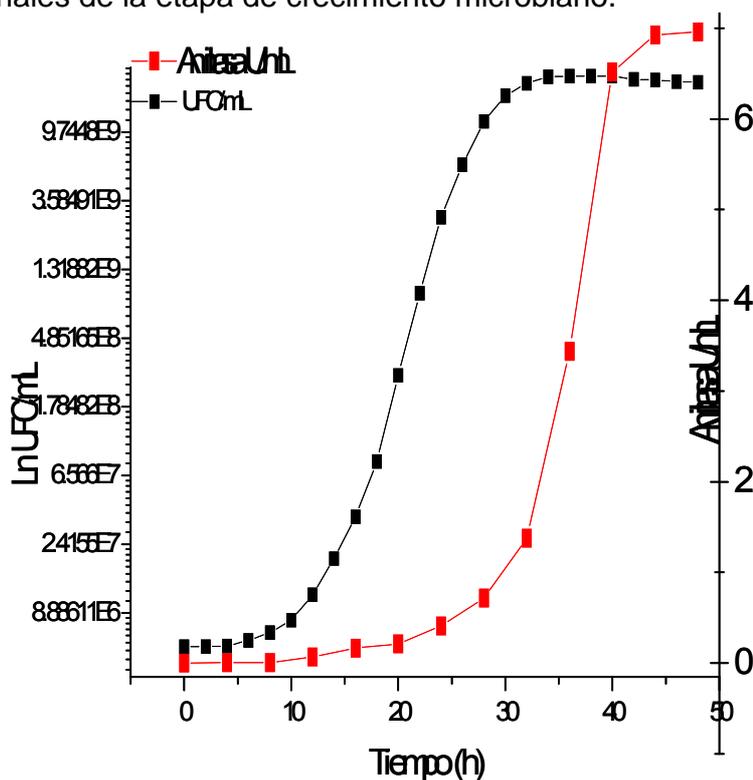
La pequeña cantidad de enzima existente en el medio durante este periodo fue proveniente del inóculo además de una cantidad excretada constitutivamente por el microorganismo según lo enuncia Scragg (1997). Esto coincide con los resultados obtenidos por Vargas (2003), quien reporta el fin de la fase de aceleración positiva hacia las 12 horas de fermentación, sin evidencia de actividad amilolítica para *Bacillus megaterium* MFFB-UNMSM-39, en caldo almidón de yuca. Dhanya y col (2006), tampoco reportaron la producción de amilasa durante las primeras 8 horas de fermentación para *Bacillus amyloliquefaciens* utilizando medio de cultivo sólido con diferentes residuos agroindustriales, otros investigadores como Özlem y col, (2005); Souza y Meire, (2000); quienes trabajaron con bacterias del genero *Bacillus* reportaron resultados similares. Por el contrario Dharani (2004), encontró una fase corta de latencia menor a 4 horas y una actividad amilolítica de 45 U/mL para ese tiempo utilizando *Bacillus licheniformis* SPT 27 con medio caldo almidón de amaranto.

En la figura 14 se puede observar que la fase exponencial para *Bacillus* sp PA4BG inició después de las 10 horas de fermentación y se mantuvo hasta las 28 horas, la producción de amilasa se detectó después de las 12 horas con un valor de 0.07031 U/mL, a partir de la hora 28 se inició una fase de aceleración negativa en el crecimiento del microorganismo que se mantuvo hasta la hora 34 a partir de ahí el crecimiento se detuvo, la actividad de la enzima aumentó a una velocidad baja entre las horas 12 y 28, luego la actividad de la enzima se incrementó considerablemente hasta la hora 40, a partir de la cual la aceleración en la actividad amilolítica se reduce llegando a su máximo valor a las 48 horas con 6,95 U/mL. Los patrones de crecimiento y actividad amilolítica no son iguales de hecho la mayor actividad de la enzima se detecta al final de la fase logarítmica.

Según Croeger (1993), en muchas cepas bacterianas productoras de amilasas la velocidad de formación de enzima es muy baja durante el crecimiento exponencial pero justo antes que la velocidad de crecimiento decaiga y comience la formación de esporas la formación de enzima se incrementa drásticamente. Nuestros resultados son similares a los mostrados por Rosso y col (2002), quienes reportaron la hora 24 como el final de la fase exponencial de crecimiento y la producción de enzima entre las 10 y 48 horas de fermentación utilizando el aislado bacteriano *Bacillus circulans* DF 9R en medio almidón de yuca. Vargas (2003), reporta gran producción de amilasa entre las 20 y 24 horas finalizando la fase exponencial del crecimiento y se incrementa hasta las 36 horas de la fermentación. Por el contrario Shah y col (2006), encontraron que la producción de enzima se inicia al tiempo con la fase exponencial y decrece después de las 24

horas mientras el crecimiento del microorganismo se mantiene hasta las 72 horas para *Bacillus* sp AS-1.

Figuras 14. patrones de crecimiento y actividad amilolítica por *Bacillus* sp PA4BG, donde la máxima concentración celular es alcanzada a las 34 horas y se mantiene constante hasta las 48 horas mientras la actividad de enzimas se maximiza a finales de la etapa de crecimiento microbiano.



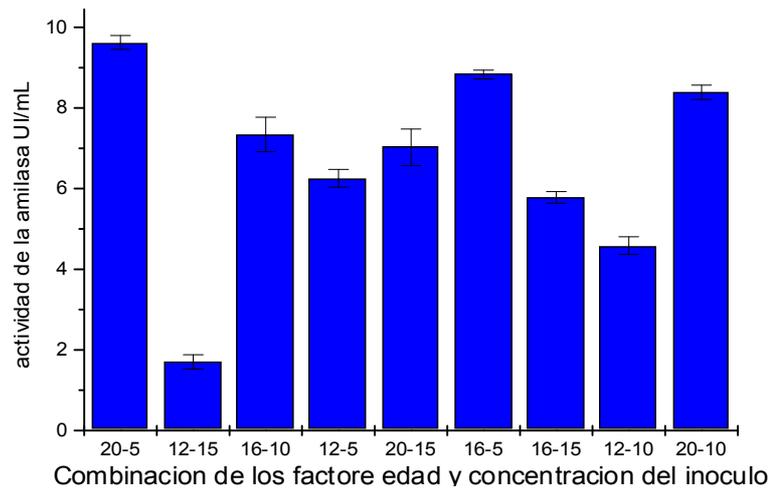
8.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN Y EDAD DEL INOCULO EN LA SÍNTESIS DE AMILASA.

Cuadro 16. Efecto de los factores concentración y edad del inoculo en la actividad amilolítica para *Bacillus* sp PA4BG.

Factores	Concentración del inóculo (C)			
	Niveles	5%	10%	15%
Edad del inoculo (E)	12	6.25 ± 0.21	4.58 ± 0.21	1.70 ± 0.17
	16	8.82 ± 0.10	7.34 ± 0.42	5.77 ± 0.14
	20	9.62 ± 0.17	8.38 ± 0.17	7.02 ± 0.45

En la cuadro 16, se presentan las medias y la desviación estándar de los resultados obtenidos por el diseño factorial 3².

Figura 15. Efecto de la edad y concentración del inoculo en la actividad amilolítica, 48 horas a 37°C.



Cuadro 17. Análisis de varianza para edad y concentración del inóculo en la actividad amilolítica por *Bacillus* sp PA4BG.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrados medios	F	P
A:Edad	780,421	1	780,421	198,9	0
B:Concentración	419,787	1	419,787	107,0	0
AA	417,089	1	417,089	10,6	0,003
AB	284,637	1	284,637	7,2	0,012
BB	14,724	1	14,724	3,7	0,064
Blocks	160,026	2	0,800132	2,0	0,151
Total error	980,682	25	0,392273		
Total (corr.)	141,772	32			

El análisis de varianza de la cuadro 17, muestra cuatro efectos con $P < 0.05$ indicando una significancia con un nivel de confianza del 95%, el modelo matemático fue simplificado al remover la interacción BB con $P = 0,0641$. A continuación se presenta la ecuación de segundo orden estimada con una correlación ajustada de $R^2 = 90,9\%$.

$$\text{Actividad amilolítica} = - 7,98 - 0,69 \cdot C + 1,99 \cdot E + 0,024 \cdot E \cdot C - 0,053 \cdot E^2$$

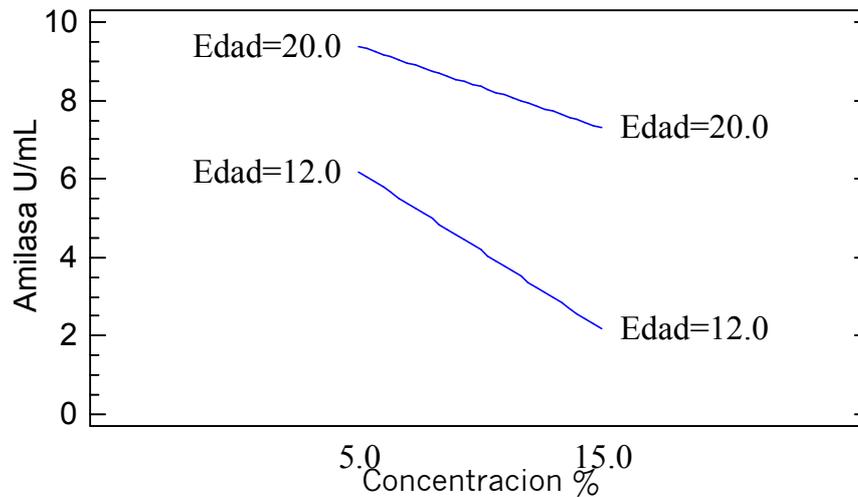
(Ecuación 1)

En la ecuación 1, se observa que el coeficiente de mayor valor corresponde a la edad (E) y que el rendimiento alcanza su máximo cuando está en el nivel más alto,

ya que el signo que le antecede es positivo. Teniendo en cuenta esto, se fijó el tratamiento de la muestra en este valor. El segundo mayor coeficiente es el que acompaña a la variable concentración (C) y el rendimiento alcanza un máximo cuando está en el nivel mas bajo, ya que el signo que la antecede es negativo. La influencia de la edad del inoculo en la eficiencia del cultivo puede ser explicable con base a la existencia de una mayor concentración de células para 20 horas que para 12 o 16 horas debido a que a las 20 horas de cultivo el microorganismo se encuentra en la fase exponencial de crecimiento lo cual significa que en un alto porcentaje las células presentes en el medio son viables, además se puede mencionar que algunas sustancias toxicas se acumulan en el medio de crecimiento a medida que el microorganismo utiliza sustratos para sus actividades metabólicas, tales sustancias inhiben el crecimiento celular, afectando el rendimiento del cultivo, por tal motivo, una mayor concentración del inoculo afectaría la actividad de la enzima, ya que a cantidades mayores la carga de material indeseable proveniente de la fermentación previa puede disminuir el funcionamiento del cultivo (Scragg, 1997).

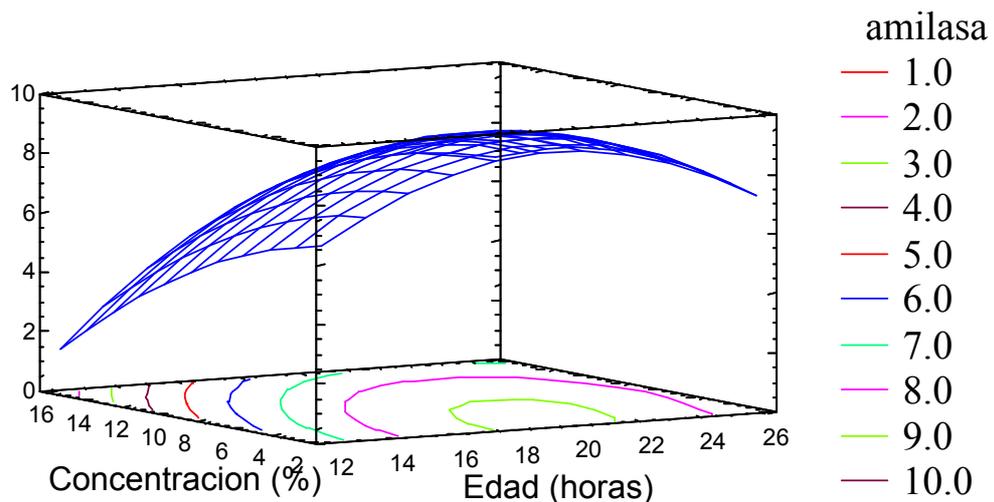
Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Hema y col (2006) quien trabajo con *Bacillus cereus* MTCC-1305 usando como medio de fermentación los desperdicios de agroindustria del arroz y salvado de trigo, mostrando que a mayores tamaños de inóculos la actividad amilolítica disminuye gradualmente. Además de los efectos principales cabe destacar la existencia de una interacción entre la variables concentración y edad de inoculo la cual afecta positivamente la actividad amilolítica ya que el signo que la antecede es positivo, en la figura 16 se puede observar para esta interacción como la actividad amilolítica se ve favorecida a medida que la concentración del inoculo disminuye y la edad de inoculo aumenta.

Figura 16. Interacción de las variables concentración y edad del inoculo.



En la figura 17, se observa que la mayor actividad amilolítica fue 9.62 U/mL la cual se obtuvo con una concentración del 5% (v/v) y una edad de inóculo de 20 horas a las 48 horas de fermentación, la actividad amilolítica se reduce significativa mente cuando el inóculo tiene 12 horas de edad y concentración de un 15% alcanzando solo 1.7 U/mL. Estos resultados muestran concordancia con los resultados obtenidos por He Guo-qing y col, (2002), quienes obtuvieron los mejores resultados para actividad amilolítica, con 16 horas de edad y 3.82% (v/v) de concentración de inóculo utilizando el aislado bacteriano *Bacillus subtilis* ZJF-1A5.

Figura N° 17. Superficie de respuesta para la actividad amilolítica en función de la edad u concentración del inóculo.



8.4. EFECTOS DE LOS FACTORES TEMPERATURA Y PH EN LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA. En el cuadro 18, se presentan las medias y la desviación estándar de los resultados obtenidos por el diseño factorial 3², Los cuales se evaluaron a través de un análisis de varianza.

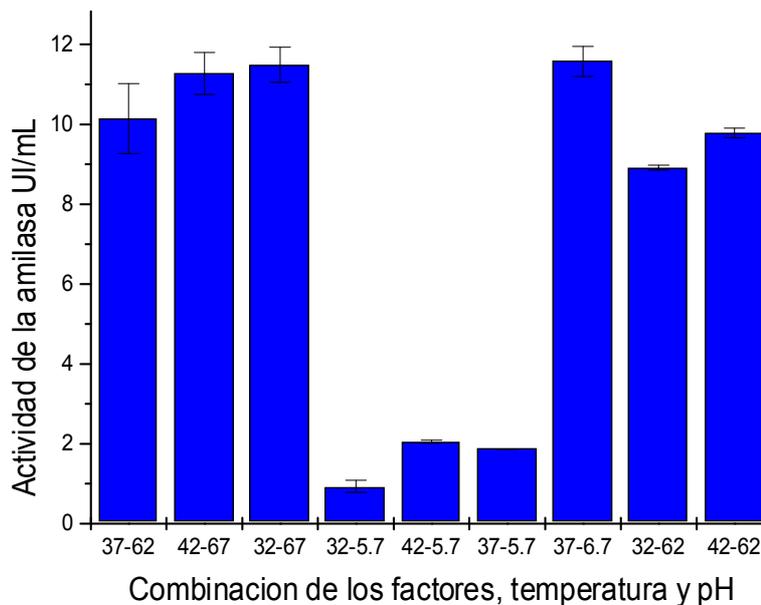
Cuadro 18. Efecto de los factores temperatura y pH en la en la actividad amilolítica para *Bacillus* sp PA4BG.

Factores	Temperatura en °C			
	Niveles	32	37	42
pH	5.7	0.93 ± 0.15	1.86 ± 0.004	2.05 ± 0.03
	6.2	8.91 ± 0.06	10.14 ± 0.87	9.78 ± 0.12
	6.7	11.49 ± 0.43	11.57 ± 0.37	11.27 ± 0.52

Con los resultados obtenidos del diseño factorial 3² se obtuvo una ecuación polinomial que representa la relación entre la variable dependiente actividad amilolítica y las variables independientes pH, temperatura y sus interacciones. A continuación se presenta la ecuación obtenida.

$$\text{Actividad amilolítica} = -392,89 + 1,33T + 114,09\text{pH} - 0,049*T^2 + 0,345T*\text{pH} - 9,51765*\text{pH}^2. \text{ (Ecuación 2)}$$

Figura 18. Efecto de los factores pH y temperatura en la actividad amilolítica, en caldo MRS modificado con 20 gr/L, tiempo de incubación 48, inóculo 5% (v/v) a 20 horas.



Cuadro 19. Análisis de varianza para los variables pH y temperatura.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrados medios	F	P
A:Temperatura	121,055	1	121,055	16,04	0.000
B:pH	351,441	1	351,441	465,63	0.000
AA	115,035	1	115,035	15,24	0,000
AB	892,851	1	892,851	11,83	0,002
BB	430,282	1	430,282	57,01	0,000
Blocks	0,0928468	2	0,0464234	0.06	0,940
Total error	188,693	25	0,754772		
Total (corr.)	462,918	32			

$R^2 = 95,9238 \%$

R^2 (ajustado por d.f.) = 95,169%

El análisis de varianza muestra cinco efectos con $P < 0.05$ indicando una significancia a un nivel de confianza del 95%, por lo cual no es necesario remover ningún factor de la ecuación 2.

Al revisar los coeficientes que acompañan a las variables en la ecuación 2 se observa que el coeficiente de mayor valor corresponde al pH y que la actividad alcanza su máximo cuando está en el nivel más alto, ya que el signo que le antecede es positivo. Teniendo en cuenta esto, se fijó el tratamiento de la muestra en este valor.

El control del pH a través de una solución buffer incrementó la actividad amilolítica en un 22%. En figura 19 se observa para la variable pH que la producción de amilasa aumenta desde 0.1 U/mL hasta 11.94 U/mL para un pH de 5.7 y 6.7 respectivamente además la actividad amilolítica tiende a estabilizarse al llegar a pH cercano a 6.7 esto indica que el pH óptimo de producción de amilasa es ligeramente ácido muy cerca de un pH neutral. Los resultados obtenidos son comparables con los mostrados por Hema y col (2006), quienes analizaron el comportamiento de *Bacillus cereus* MTCC 1305 en la producción de amilasa en un rango de pH entre 5 y 9 obteniendo mejores resultados con pH cercanos a la neutralidad.

Con respecto a la temperatura el coeficiente que acompaña a la variable es mucho menor que la variable pH indicando que su influencia en la actividad de la enzima es menor. En la figura 20, se observa que la actividad amilolítica aumenta cuando la temperatura se acerca a los 37°C, disminuye levemente a una temperatura de 32°C y se reduce considerablemente a una temperatura de 42°C. Estos resultados son comparables a los reportados por Dhanya y col (2006), quienes evaluaron el efecto de la temperatura en la producción de amilasa por *Bacillus amyloliquefaciens* en un medio compuesto por residuos agroindustriales encontrando que en un rango de 30 a 45 °C la producción de amilasa es mayor para 37 °C.

Figura 19. Principal efecto del pH en la actividad amilolítica.

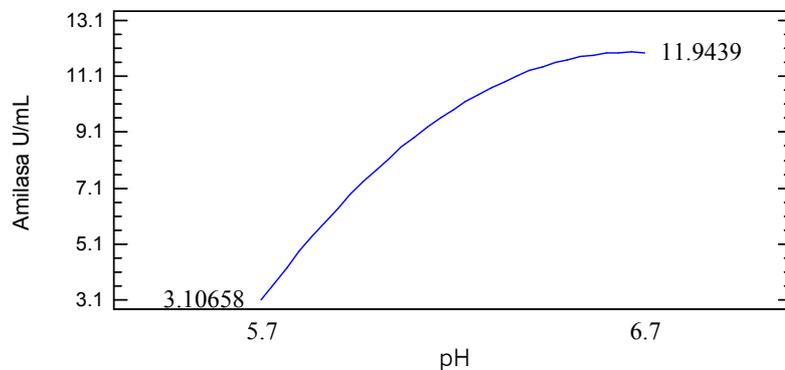
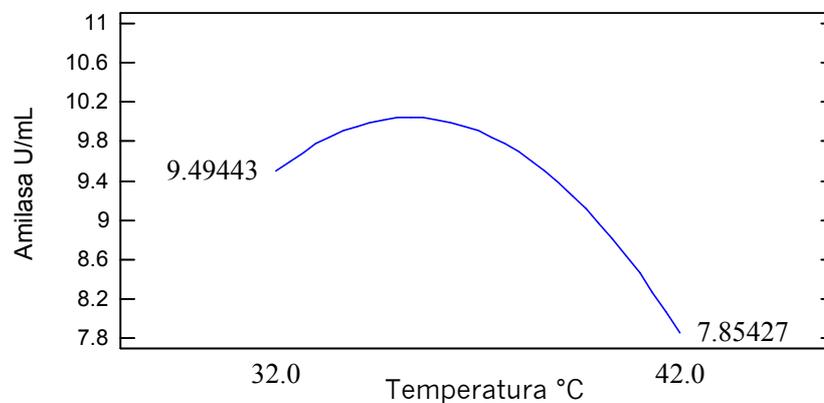


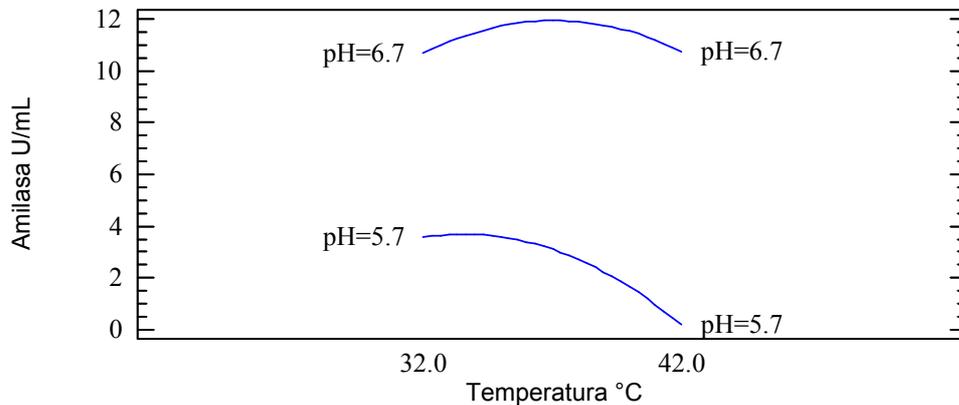
Figura 20. Efecto principal de la temperatura en la actividad amilolítica



En la figura 21, se observa que para los niveles de las variables establecidos en el experimento, la actividad amilolítica se favorece cuando la variable pH aumenta a el nivel más alto, mientras la temperatura se acerca a el nivel medio. Para ese caso los niveles corresponden a 6.7 y 37 °C respectivamente. De igual manera se puede establecer que la temperatura es menos influyente en la actividad amilolítica cuando el pH del medio tiende a neutralizarse, según Dhanya y col (2006), el pH de la fermentación juega un papel muy importante en la secreción de enzimas ya que influye en a la inducción de cambios morfológicos de bacterias además la actividad amilolítica pueden inhibirse por la acción de los protones a valores bajos de pH, esto confirma la baja actividad detectada a un pH de 5.7. Es bien sabido que el pH es una variable que interviene de gran manera en las reacciones químicas involucradas en el desarrollo de las bacterias Swetha y col (2006), la velocidad de estas reacciones es influenciada por la temperatura de manera que al aumentar la temperatura aumenta también la velocidad de las reacciones afectando de manera positiva crecimiento del microorganismo, según García y col, (1993) es frecuente encontrar temperaturas de máxima producción de enzimas inferiores a las del máximo crecimiento del microorganismo, este es el caso de la producción de amilasas por algunos *Bacillus*, por lo tanto es necesario encontrar una temperatura de proceso adecuada para maximizar la producción al tiempo que se pueda preservar la enzima en el medio ya que una temperatura alta aunque estimule el crecimiento y secreción de enzima afecta también la

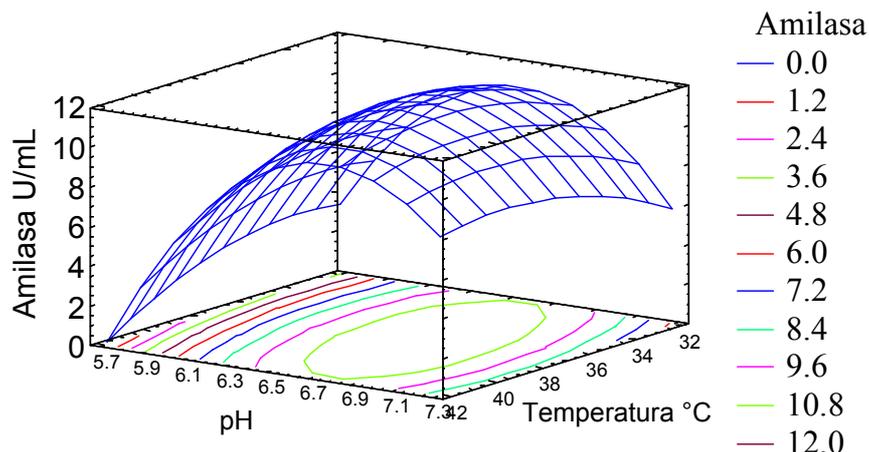
estabilidad de la misma durante el proceso fermentativo disminuyendo por lo tanto su actividad.

Figura 21. Efecto de la interacción pH y temperatura en la actividad de enzima.



De la figura 22 se puede determinar que la mayor cantidad de amilasa se obtiene con un pH de 6.7 y una temperatura de 37°C con 11.95 U/mL. La actividad amilolítica se reduce significativa mente a un pH de 5.7 y temperatura de 42 °C con una producción de amilasa de 0.19 U/mL. Estos resultados muestran concordancia con los resultados obtenidos por Rosso y col (2002), quienes evaluaron la producción de amilasa utilizando *Bacillus circulans* DF 9R encontrado un pH 7.3 y una temperatura de 37°C.

Figura 22. Superficie de respuesta para la actividad amilolítica en función de pH y la temperatura.

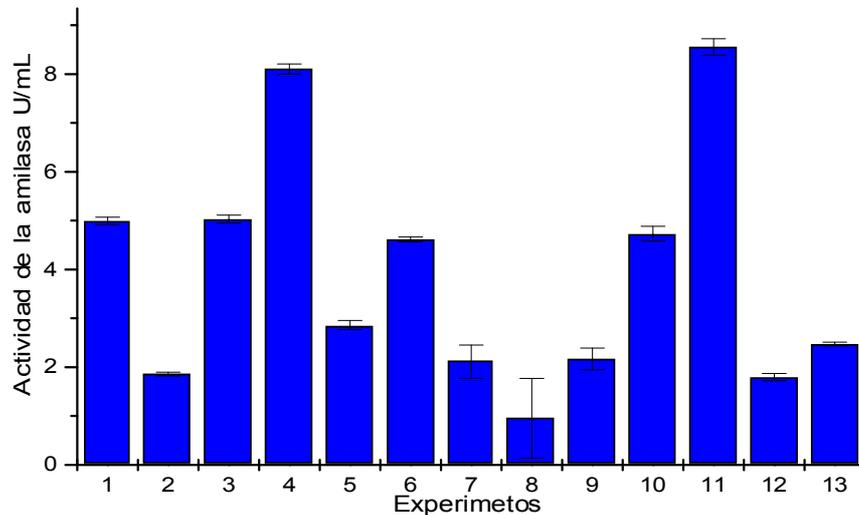


8.5. OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA SÍNTESIS DE AMILASAS POR *Bacillus* sp PA4BG. En la primera fase se aplicó un diseño de tamizado de Plackett-Burman para definir los factores más influyentes que afectan la actividad amilolítica, en el cuadro 20 se presentan los resultados obtenidos.

Cuadro 20. Resultados del diseño Plackett-Burman.

PLANTILLA										
experimento	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	Amilasa U/mL (X/ds)
1	16	750	2,5	1	7	0,3	0,25	8	1,6	4.99 ± 0.07
2	2	250	2,5	3	7	0,1	0,75	8	1,6	1.85 ± 0.03
3	16	250	2,5	3	3	0,3	0,25	2	1,6	5.03 ± 0.07
4	9	500	1,5	2	5	0,2	0,5	5	2,6	8.09 ± 0.10
5	16	750	0,5	3	3	0,1	0,25	8	3,6	2.86 ± 0.09
6	2	750	2,5	1	7	0,1	0,25	2	3,6	4.61 ± 0.04
7	2	250	0,5	3	7	0,3	0,25	8	3,6	2.11 ± 0.33
8	2	750	0,5	1	3	0,3	0,75	8	1,6	0.95 ± 0.81
9	16	250	2,5	1	3	0,1	0,75	8	3,6	2.17 ± 0.22
10	16	250	0,5	1	7	0,3	0,75	2	3,6	4.73 ± 0.15
11	2	250	0,5	1	3	0,1	0,25	2	1,6	8.55 ± 0.16
12	16	750	0,5	3	7	0,1	0,75	2	1,6	1.79 ± 0.07
13	2	750	2,5	3	3	0,3	0,75	2	3,6	2.47 ± 0.03

Figura N° 23. Influencia de los sustratos del medio experimental en la actividad amilolítica. Tiempo de incubación 48, 37 °C, pH 6.7, inóculo 5% (v/v) y 20 horas.



Con los datos de la cuadro 20 se obtuvo una ecuación polinomial que representa la relación entre la variable dependiente amilolítica y las variables independientes X₁ harina papa, X₂ lactosuero, X₃ urea, X₄ citrato de amonio, X₅ acetato sodio, X₆ sulfato de Mg, X₇ sulfato de Mn, X₈ harina de sangre bovina y X₉ fosfato dipotásico. La ecuación fue.

$$\text{Actividad amilolítica} = -1.38 + 0.191X_1 + 0.0052X_2 + 0.038X_3 - 0.025X_4 - 0.0402X_5 - 1.46X_6 - 0.686X_7 + 0.478X_8 - 0.248X_9. \quad (\text{Ecuación 3})$$

Cuadro 21 Análisis de varianza para los sustratos del medio experimental.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrados medios	F	P
A:X ₁	59.7325	1	59.7325	178.28	0.000
B:X ₂	56.9911	1	56.9911	170.1	0.000
C:X ₃	0.008102	1	0.008102	0.02	0.877
D:X ₄	0.029279	1	0.029279	0.09	0.769
E:X ₅	0.648723	1	0.648723	1.94	0.175
F:X ₆	1.43915	1	1.43915	4.3	0.047
G:X ₇	0.500893	1	0.500893	1.49	0.230
H:X ₈	68.7225	1	68.7225	205.11	0,000
I:X ₉	1.36363	1	1.36363	4.07	0.053
Blocks	0.02156	2	0.01078	0.03	0.968
Total error	9.04645	27	0.335054		
Total (corr.)	198.504	38			

$R^2 = 95.4427\%$

$R^2 = (\text{ajustado por d.f.}) = 94.0283\%$.

El análisis de varianza muestra 3 efectos con $P < 0.01$, así los efectos más significativos los ejercen los factores X₁, X₂, y X₈

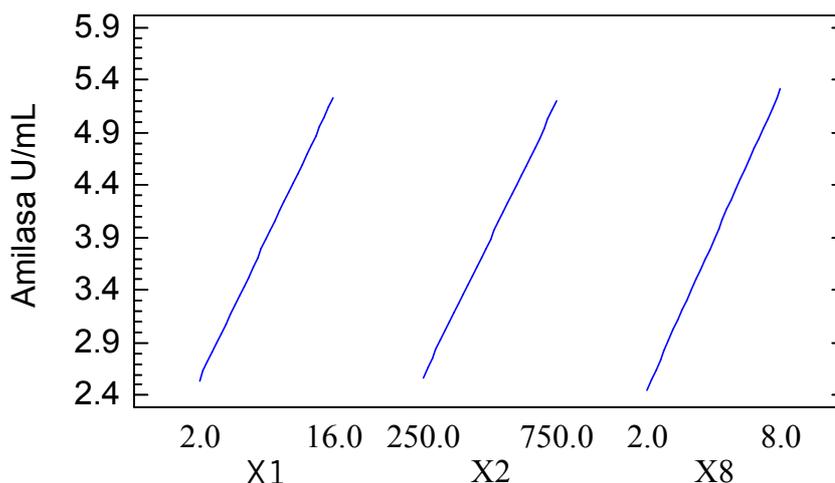
El suero afecto positivamente la producción de enzimas seguramente debido al contenido de Ca²⁺ cercano a 70mg/100g (anexo N° 4), este elemento es básico para el crecimiento de microorganismos amilolíticos, Según Shah y col (2006) la producción de α -amilasa es Ca²⁺ dependiente debido a su efecto estabilizante y activante, en sus estudios con *Bacillus* sp AS-1 encontró que el CaCl₂ en concentración de 0.02% incrementa la producción de α -amilasa mientras que la ausencia de los iones Ca²⁺ en el medio dio como resultado niveles insignificantes de la enzima.

Las variables acetato sodio, sulfato de Mn²⁺ y sulfato de Mg²⁺ no mostraron significancia en la producción de amilasa, este resultado tiene concordancia con los estudios realizados por Sumitra Ramachandran y col (2004), quienes reportaron que la actividad de α -amilasa no fue afectada por la presencia de iones metálicos como Mg²⁺ y K²⁺, usando como medio de fermentación residuos agroindustriales de la extracción de aceites para *Aspergillus oryzae*. De igual forma Sarikaya y Gürgün (2000), evaluaron el efecto de los mismos iones metálicos en algunos aislados bacterianos de *Bacillus* encontrado que no tienen efecto en la producción de amilasas.

Los factores urea y citrato de amonio no mostraron significancia en la producción de amilasas estos resultados tienen concordancia a los reportados por Mamo y Gessesse (1999), quienes compararon fuentes orgánicas de nitrógeno como extracto de levadura y peptona con fuentes inorgánicas como urea, NO_3^+ y NH_4^+ en la producción de amilasa, encontrando que *Bacillus* sp. WN11 tiene preferencia por fuentes de nitrógeno orgánicas complejas en la síntesis de amilasas, de igual manera Dharani (2004), reportó un mayor rendimiento en la producción de amilasas por *Bacillus licheniformis* SPT 27 cuando utilizó fuentes de nitrógeno orgánicas como peptona extracto de carne, extracto de levadura y caseína que cuando se utilizan fuentes de nitrógeno como oxalatos sulfatos y cloruros de amonio o nitritos y nitratos de potasio, lo cual también explicaría el efecto de la harina de sangre, el cual es de origen orgánico con un contenido de proteínas cercano al 86 % representando una gran fuente de compuestos nitrogenados aprovechables en los procesos de biosíntesis de proteínas.

De la figura 24, podemos observar que al variar la concentración de almidón de papa de 2 a 16 gr/L, la actividad amilolítica se incrementa de 2.54 a 5.22 U/mL. También la actividad amilolítica aumenta de 2.57 a 5.19 U/mL cuando el volumen de lactosuero en el medio experimental varía de 250 a 750 mL/L y cambia de 2.44 a 5.31 U/mL cuando la concentración de harina de sangre varía de 2 a 8 gr/L. Estos resultados indican que el nivel óptimo de estos factores no se ha alcanzado aún y se necesita ajustar la relación de las variables con un nuevo diseño experimental.

Figura 24. Efectos del almidón (X_1), lactosuero (X_2) y harina de sangre (X_3) en la actividad amilolítica para *Bacillus* sp PA4BG.

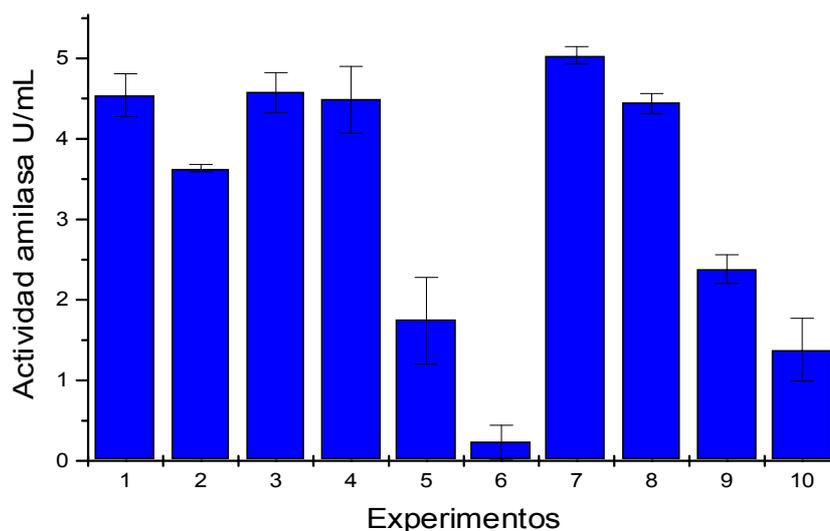


Para la optimización de las concentraciones de los sustratos seleccionados se utilizó el método aplicado por Kuehl (2000), para lo cual fue necesario realizar un diseño factorial 2^k . El polinomio obtenido en este experimento se usó para determinar la dirección hacia la máxima pendiente, con el fin de conseguir información adicional de los factores.

Cuadro 22 Resultados promediados del diseño factorial 2^3 , evaluación de las variables significantes, almidón, lactosuero y harina de sangre bovina en la actividad amilolítica para *Bacillus* sp PA4BG.

PLANTILLA				
Exp	Almidón	Lactosuer	Harina de sangre	Amilasa U/mL
1	5.5	300.0	2.55	4.54 ± 0.26
2	5.5	300.0	2.55	4.09 ± 0.52
3	10.0	100.0	5.0	4.57 ± 0.24
4	10.0	500.0	0.1	4.48 ± 0.41
5	1.0	100.0	5.0	1.74 ± 0.53
6	1.0	100.0	0.1	0.22 ± 0.21
7	10.0	500.0	5.0	5.03 ± 0.10
8	10.0	100.0	0.1	4.43 ± 0.12
9	1.0	500.0	0.1	2.38 ± 0.17
10	1.0	500.0	5.0	1.38 ± 0.39

Figura 25. Influencia de los factores almidón, lactosuero y harina de sangres en la actividad amilolítica para *Bacillus* sp PA4BG. Tiempo de incubación 48, 37 °C, pH 6.7, inoculo 5% (v/v) y 20 horas.



Cuadro 23. Análisis de varianza para las variables lactosuero, almidón de papa y harina de sangre.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrados medios	F	P
A:Almidón	65,185	1	65,185	152,59	0.000
B:Lactosuero	270,078	1	270,078	6,32	0.020
C:H sangre	186,874	1	186,874	4,37	0,048
AB	0,309401	1	0,309401	0,72	0,404
AC	0,112203	1	0,112203	0,26	0,613
BC	111,327	1	111,327	2,61	0,121
Blocks	260,129	2	130,064	3,04	0,069
Total error	897,121	25	0,427201		
Total (corr.)	828,619	29			

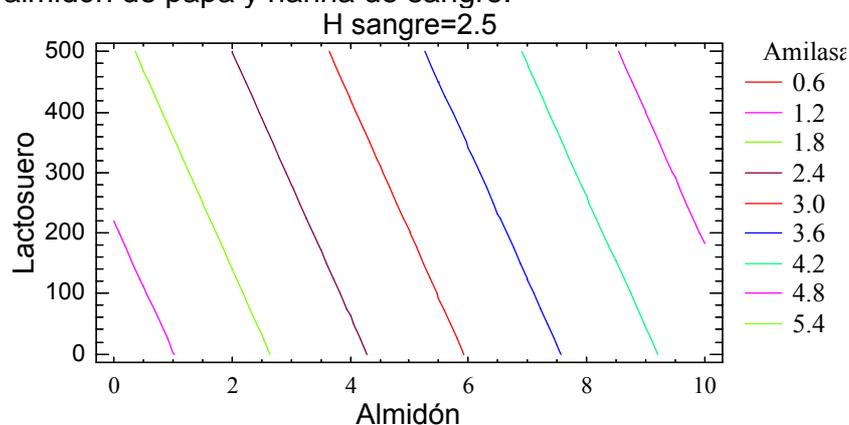
$R^2 = 85,858\%$.

El análisis de varianza muestra tres efectos con $P < 0.05$, el modelo matemático de la ecuación 4 fue simplificado al remover la interacción AB, AC y BC con $P = 0.4044$, 0.6137 y $0,1214$ respectivamente. A continuación se presenta la ecuación de primer orden estimado.

Actividad amilolítica = $0,5514 + 0,1116*HS + 0,001677*LS + 0,366231*A$
(Ecuación 4).

Los coeficientes positivos de la ecuación indican que a mayor cantidad de almidón, lactosuero y harina de sangre se incrementa la actividad amilolítica. En la figura 26 se muestra la gráfica para la ecuación de respuesta polinomial estimada, los valores de contorno ascienden conforme aumentan los niveles influyentes, las curvas indican que existe una concentración de los factores para maximizar la producción de amilasa, la cual aún no ha sido determinada.

Figura 26. Contornos de superficie de respuesta estimada para las variables lactosuero, almidón de papa y harina de sangre.

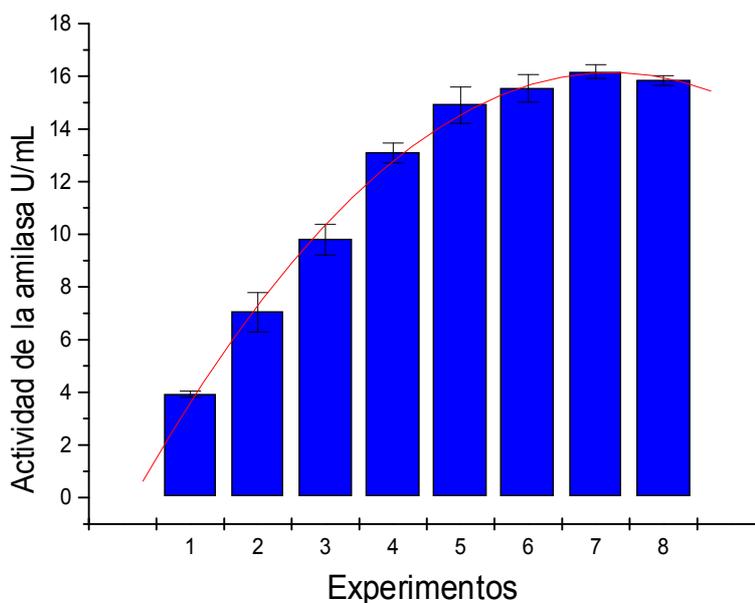


Con base en la ecuación lineal estimada 4, por medio de aproximación a la máxima pendiente se encontró la zona de respuesta óptima con 8 tratamientos y 2 replicas, la trayectoria se traslada con un factor de 6 gr/L para almidón, lo que corresponde a un incremento proporcional de 54.2 mL /L para el lactosuero y 0.51 gr/L para la harina de sangre. En la cuadro 14 se muestran los resultados obtenidos

Cuadro 24. Resultados para la pendiente ascendente en la actividad amilolítica para *Bacillus* sp PA4BG.

Exp	Almidón. gr/L	Lactosuero. mL/L	Harina. sangre gr/L	Amilasas U/mL (X/ds)
1	5.50	300.00	2.55	3.930 ± 0.115
2	11.50	354.20	3.06	7.040 ± 0.750
3	17.50	408.50	3.62	9.790 ± 0.584
4	23.50	462.80	4.19	13.08 ± 0.377
5	29.50	517.40	4.75	14.90 ± 0.694
6	35.50	571.40	5.32	15.54 ± 0.523
7	41.50	625.60	5.88	16.18 ± 0.259
8	47.50	679.90	6.45	15.83 ± 0.183

Figura 27 grafica de ascenso hacia la zona de respuesta óptima en el medio de cultivo experimental. Tiempo de incubación 48, 37 °C, pH 6.7, inóculo 5% (v/v) y 20 horas de edad.



Cuadro 25, Análisis de varianza de la pendiente ascendente.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrados medios	F	P
Modelo	148.191	5	74.0957	484.54	0.000
Error	0.764592	2	0.152918		
Total	148.956	7			

$R^2 = 99.48\%$

El análisis de varianza muestra que hay una relación significativa estadísticamente entre la actividad amilolítica y los experimentos a un nivel de confianza del 99%

De la figura 27 se observa que la actividad amilolítica se incrementa en cada experimento hasta encontrar un punto de disminución que permite hallar los niveles más altos de actividad amilolítica. Lo que nos indica que la que la región de respuesta máxima esta en la proximidad, de estas condiciones de concentraciones de almidón, lactosuero y harina de sangre. Según la prueba de Tukey se determino que los experimento 6, 7 y 8 forman un grupo de medias homogéneas que no muestran diferencias significantes estadísticamente, por lo tanto se eligió el experimento 7 como punto central para el diseño central compuesto cubo-estrella, debido a que en este experimento se obtuvo la mayor actividad amilolítica y las concentraciones de los experimentos 6 y 8 como los mínimos y máximos respectivamente.

Los resultados obtenidos en esta fase del trabajo están por debajo de los mostrados por Vargas (2003), quien obtuvo actividades enzimáticos de 32.84 y 32.5 U/mL en los puntos más altos del desarrollo de la pendiente ascendente utilizando como microorganismo *Bacillus megaterium* MFFB-UNMSM-39 y almidón de yuca como fuente de carbono. Cabe resaltar que los datos fueron mayores seguramente debido al desarrollo de las fermentaciones en reactor agitado con 75 rpm y 1.5 vvm.

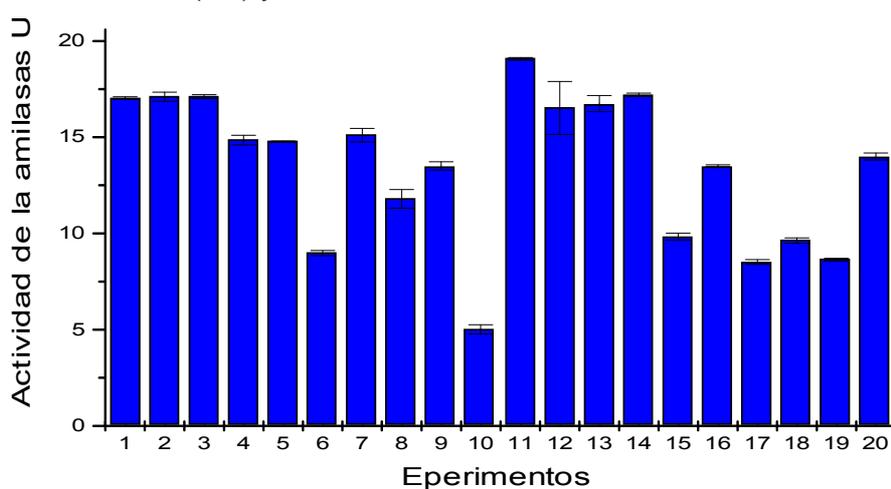
Cuadro 26, Niveles para el diseño central compuesto cubo-estrella con 6 puntos centrales y 2 replicas para determina la influencia de los factores almidón, Lactosuero y harina de sangre en la actividad amilolítica.

Factor	Nivel				Distancia axial
	Distancia axial	Mínimo	Medio	Máximo	
Almidón	30.64	35.5	41.5	47.5	52.35
Lactosuero	527.50	571.4	625.65	679.9	723.79
Harina de sangre	4.86	5.32	5.88	6.45	6.90

Cuadro 27, Resultados promediados diseño central compuesto cubo-estrella bloqueado

Exp	Almidón	Lactosuero	H sangre	Amilasa U/mL
1	41.5	625.65	5.885	17.03 ± 0.06
2	41.5	625.65	5.885	17.10 ± 0.23
3	41.5	625.65	5.885	17.10 ± 0.11
4	35.5	571.4	5.32	14.84 ± 0.24
5	47.5	571.4	5.32	14.77 ± 0.02
6	35.5	679.9	5.32	8.98 ± 0.13
7	47.5	679.9	5.32	15.10 ± 0.34
8	35.5	571.4	6.45	11.79 ± 0.48
9	47.5	571.4	6.45	13.50 ± 0.21
10	35.5	679.9	6.45	5.01 ± 0.23
11	47.5	679.9	6.45	19.07 ± 0.07
12	41.5	625.65	5.885	16.52 ± 1.37
13	41.5	625.65	5.885	16.74 ± 0.41
14	41.5	625.65	5.885	17.20 ± 0.08
15	30.6456	625.65	5.885	9.84 ± 0.17
16	52.3544	625.65	5.885	13.51 ± 0.05
17	41.5	527.508	5.885	8.52 ± 0.12
18	41.5	723.792	5.885	9.63 ± 0.13
19	41.5	625.65	4.86288	8.63 ± 0.07
20	41.5	625.65	6.90712	14.00 ± 0.18

Figura 28. Resultados la actividad amilasa en el diseño central compuesto cubo-estrella en el medio de cultivo experimental. Tiempo de incubación 48, 37 °C, pH 6.7, inóculo 5% (v/v) y 20 horas de edad.



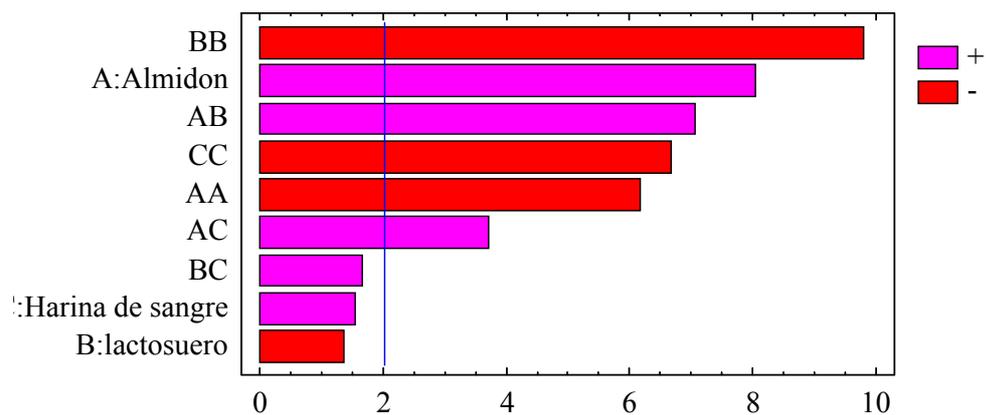
Cuadro 28, Análisis de varianza del diseño central compuesto cubo-estrella.

Fuente	Suma de cuadrados	DF	Cuadrados medios	F	P
A:Almidón	167.19	1	167.19	64.43	0.000
B:Lactosuero	4.6312	1	4.6312	1.78	0.188
C:H sangre	5.98924	1	5.98924	2.31	0.135
AA	97.8937	1	97.8937	37.72	0.000
AB	128.807	1	128.807	49.64	0.000
AC	35.4294	1	35.4294	13.65	0.000
BB	247.628	1	247.628	95.43	0.000
BC	7.02002	1	7.02002	2.71	0.107
CC	114.635	1	114.635	44.18	0.000
Blocks	25.7952	5	5.15903	1.99	0.098
Total error	116.773	45	2.59496		
Total (corr.)	849.607	59			

El análisis de varianza muestra seis efectos con $P < 0.05$, el modelo matemático fue simplificado al remover los factores Harina de sangre, lactosuero y la interacción BC. A continuación se presenta la ecuación de segundo orden estimada y una correlación ajustada de $R^2 = 82.3883 \%$.

$$\text{Actividad amilolítica} = -231.17 - 3.13*A - 0.037*A^2 + 0.0071*A*B + 0.35*A*C - 0.00072*B^2 - 4.56*C^2. \text{ (Ecuación 6)}$$

Figura N°29 diagrama de pareto.



En el diagrama de Pareto se puede observar que las interacciones entre la fuente de carbono y las fuentes de nitrógeno fueron significativas, más no la interacción entre ambas fuentes de nitrógeno. Esto se debe seguramente a que adecuadas relaciones carbono/nitrógeno son necesarias para el correcto desarrollo del microorganismo y síntesis de enzimas.

De las interacciones almidón-lactosuero y almidón-harina sangre la más significativa es almidón-harina de sangre. Seguramente esto se debe al alto contenido de proteínas y aminoácidos que presenta la sangre bovina.

Dávila (2007), reportó una deficiencia en isoleucina y metionina para la sangre de bovinos, lo cual explica la significancia de la interacción almidón-lactosuero ya que el lactosuero a pesar de no tener un alto contenido de aminoácidos complementa la deficiencia de leucina y metionina de la sangre bovina.

En la ecuación 6 y el diagrama de Pareto, podemos observar que el coeficiente que acompaña efecto cuadrado del factor harina de sangre, ejerce una disminución significativa en la actividad amilolítica, esto se debe seguramente al alto contenido de hierro y otros iones divalentes como Zn^{2+} , y Al^{2+} presentes en la sangre bovina, que pudieron causar inhibiciones enzimáticas afectando el crecimiento del microorganismo y por lo tanto la síntesis de amilasa, esto puede ser comparado con los estudios realizados por Asgher y col (2007), quienes encontraron inhibición del crecimiento y producción de amilasa por efecto de los iones divalentes Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} para *Bacillus subtilis* JS-2004. Otros investigadores como (Krishnan y Chandra 1983; Srivastava y Baruah, 1986; Ghosh y Sengupta, 1987; Jei-Fu y col, 1995; Sarikaya y Gürgün, 2000; Swetha y col, 2006), quienes trabajaron con bacterias del género *Bacillus* reportaron resultados similares.

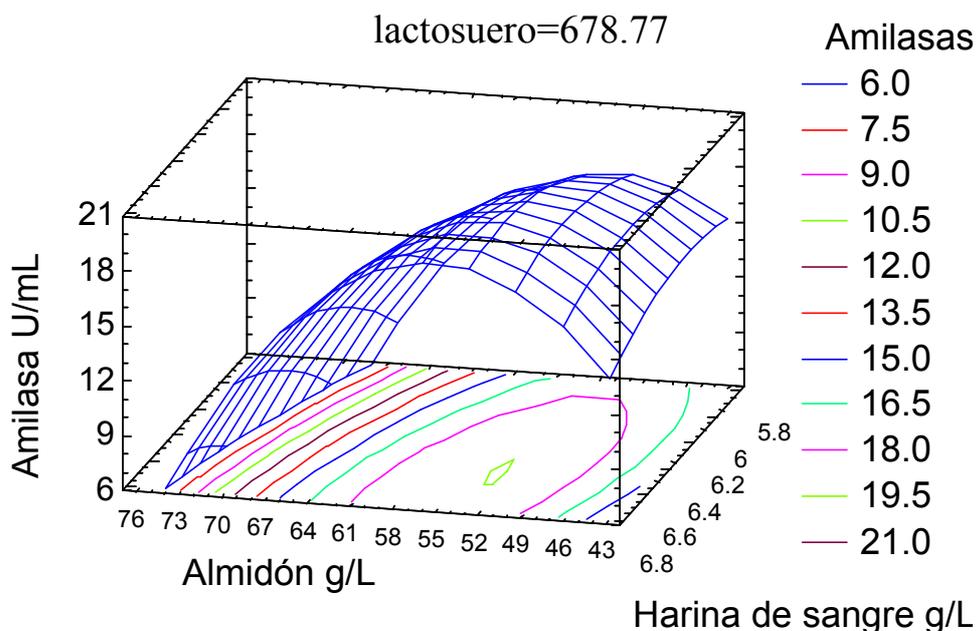
El efecto cuadrático del almidón mostró que el exceso de almidón produjo una disminución significativa en la actividad de la enzima esto puede ser explicado con base al potencial osmótico del medio, según Elita y col (2003), quienes evaluaron la influencia de diferentes sustratos en la síntesis de enzimas por *Aspergillus awamori*, un incremento en el potencial osmótico puede afectar negativamente el crecimiento del microorganismo y la producción de enzima.

En el modelo polinómico los términos cuadráticos nos indican una curvatura de la zona de respuesta, es decir que a concentraciones superiores o inferiores de la región óptima se produce una disminución de la variable de respuesta, según Crueger (1993), cuando se utiliza fuentes de nitrógeno como factor limitante con exceso de glucosa solo se producen trazas de amilasas, además Aiyer (2006), asegura que bajos niveles de fuentes de nitrógeno son inadecuados para la formación de enzimas de igual manera el exceso de fuentes de nitrógeno en el medio de fermentación causan inhibición enzimática.

El valor máximo de producción de amilasa se alcanzó a las 40 horas de fermentación, la disminución en el tiempo de fermentación puede ser explicada con base a la existencia de una fase de latencia corta, esto debido a la lactosa presente en el medio experimental que contribuye al rápido desarrollo del microorganismo en las primeras horas. La lactosa es un azúcar que favorece el crecimiento de muchas bacterias del genero *Bacillus* sin embargo también es capaz de ejercer efecto inhibitorio en la síntesis de enzima (Srivastava y Baruah, 1986; Mamo y Gessesse, 1999; Oliveira y Leal, 2003; Özlem y col, 2005). De acuerdo a lo anterior la lactosa se cree fue agotada en las primeras horas de la fermentación y por lo tanto no causó efecto inhibitorio en las etapas críticas de la síntesis de amilasas que son hacia finales de la fase de crecimiento exponencial y en la fase estacionaria.

La figura 30 muestra la grafica de superficie de respuesta para los factores harina de sangre y almidón, la figura tiene una forma de curva convexa que describe un punto máximo de producción de amilasa. Al estimar las concentraciones optimas en base al modelo matemático, se encontró que los valores de almidón, suero y harina de sangre que maximizan la producción de amilasa son 52.35 gr/L, 678.77 mL/L y 6.31 gr/L respectivamente, con los cuales se alcanza una producción de amilasa de 19 U/mL, estos valores son óptimos y corresponden a la cima de la curva de la superficie de respuesta.

Figura 30. Superficie de respuesta para la actividad amilolítica en función de factores almidón, lactosuero y harina de sangre.



8. CONCLUSIONES.

Aunque las amilasas son enzimas constitutivas los patrones de velocidad de crecimiento del microorganismo y de actividad de la enzima no fueron iguales de hecho la mayor producción de enzima se detectó al final de la fase logarítmica de crecimiento.

La combinación de los parámetros concentración y edad de inóculo óptimos para la producción de amilasas por *Bacillus* sp PA4BG fueron determinados en 5% y 20 horas los cuales representan el volumen mas pequeño de los evaluados y una edad que se encuentra en la fase exponencial de crecimiento con un alto porcentaje las células viables presentes.

Se encontró que la combinación óptima de parámetros correspondientes a temperatura y pH para la producción de amilasas por *Bacillus* sp PA4BG son 37°C y 6.7 respectivamente, coincidiendo con las condiciones típicas del hábitat de donde fue aislado el microorganismo.

El control del pH del proceso fermentativo a través de una solución buffer incremento la actividad amilolítica en un 22%.

Al evaluar el caldo experimental se encontró a un valor de $p < 0.01$, que los efectos más significativos sobre la actividad amilolítica, lo ejercieron los factores almidón de papa, suero lácteo y harina de sangre.

Bacillus sp PA4BG tuvo preferencia por las fuentes de nitrógeno orgánicas complejas, harina de sangre y lactosuero que por las fuentes de nitrógeno urea y citrato de amonio.

Se encontró que los valores de almidón, lactosuero y harina de sangre que maximizan la actividad amilolítica son 52.35 gr/L, 678.77 mL/L y 6.31 gr/L respectivamente, con los cuales se alcanza una actividad amilolítica de 19 U/mL, y corresponden a la cima de la superficie de respuesta descrita por el modelo matemático estimado.

9. RECOMENDACIONES.

Es conveniente realizar un estudio que involucre los parámetros aireación y agitación en la optimización de la actividad amilolítica ya que la cepa *Bacillus* sp PA4BG demostró ser aerobia estricta.

Conviene realizar estudios enfocados al aislamiento y purificación de la enzima de manera que sea posible caracterizar la enzima y determinar los parámetros físico-químicos en que afectan la actividad amilolítica.

Sería importante caracterizar los productos resultantes del proceso de hidrólisis de almidón con esta enzima para determinar las aplicaciones industriales de la misma.

Se recomienda el estudio de la cepa *Bacillus* sp PA4BG en el proceso de producción de biomasa de forma que se diversifiquen los productos aprovechables del proceso fermentativo.

Es importante estudiar diferentes productos amiláceos regionales como fuentes de carbono económicas para el proceso fermentativo con *Bacillus* sp PA4BG.

Aunque la máxima producción de enzimas se presentó a los 37°C la disminución en la actividad amilolítica a 32°C fue leve por lo tanto se recomienda para un futuro escalamiento del proceso evaluar el gasto energético vs productividad a 32°C

10. BIBLIOGRAFIA.

ASGHER, M. Javaid Asad. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* JS-2004 strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*. Vol 79, 2007. p 950–955.

BALL, GUAN, JAMES, MYERS, KEELING, MOUILLE y BULEON A. From glycogen to amylopectin: a model explaining the biogenesis of the plant starch granule. *Journal Plant Physiology* Vol 86, 1996. p.349-352.

BAUTISTA SANTA CRUZ Luis Fernando. Purificación de α -amilasas de *Aspergillus Oryzae* por absorción. Madrid. 1997. Tesis, universidad complutense.

BERGMAN ABE, J. F.W., OBATA, K. AND HIKURI, S. Production of raw starch digesting amylase by *Aspergillus* K-27. *journal of Microbiology and Biotechnology* Vol 27, 1988. p 447-450.

TATSINKOU FOSSI Bertrand, TAVEA Frédéric, DJOUENKEU Robert. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *Journal of Biotechnology* Vol 4 N° 1, 2005. p.14-18.

BETANCOURT Andrés. Estimación de biomasa producida a partir de harina de yuca por bacterias amilolíticas aisladas del intestino tenue de pollos tipo broilers. Colombia 2006. Tesis, Universidad de Nariño.

BULÉON, COLONNA, PLANCHOT, y BALL. Starch granules: structure and biosynthesis. *Journal of Biological Macromolecules* Vol 23 N° 2, 1998. p. 85-112.

BYONG, H. Lee. Fundamentos de biotecnología de alimentos. Zaragoza, España. Ed ACRIBIA. S.A. 2000.

CEREDA MARNEY Pascoli. Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas Propriedades gerais do amido. Vol 1: São Paulo, 2001 p 325–355.

CEREDA Pascoli y VILPOUX François. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. capitulo 15 Hydrolysis of starch. Volume 3: São Paulo, 2003. p 389-464

CHANDRAN, George Szakacs, SOCCOL Carlos Ricardo and ASHOK Pandey, Alpha Amylase from a Fungal Culture Grown on Oil Cakes and Its Properties journal of Biology and Technology. Vol.47, N°2, 20 04. p. 309-317.

CHEFTEL, JC Y CHEFTEL,H. Introducción a la bioquímica y tecnología de alimentos. Vol 1, Ed ACRIBIA. S.A. Zaragoza España. 1976.

CROEGER Wolf. Manual de microbiología industrial. Ed ACRIBIA, S.A Zaragoza España 1993.

DÁVILA ROBOT Eduard. Advances in animal blood processing: development of a biopreservation system and insights on the functional properties of plasma. Doctoral thesis, Universitat Girona. Italia 2007.

DHANYA Gangadharan, SWETHA Sivaramkrishnan, KESAVAN Madhavan Nampoothiri y ASHOK Pandey, 2006. Solid Culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for Alpha Amylase Production. Journal of Food Technology and Biotechnology Vol 44 N°2, p. 269 –274.

DHARANI Aiyer, 2004. Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27 Journal of Biotechnology Vol. 3 N° 10, p. 519-522.

ELITA BERTOLIN Telma, SCHMIDELL Willibaldo, MAIORANO Alfredo E., CASARA Janice, and A COSTA Jorge. 2003. Influence of Carbon, Nitrogen and Phosphorous Sources on Glucoamylase Production by *Aspergillus awamori* in Solid State fermentation. Journal of Biotechnology Vol. 3 N° 1, p 708 -712.

FERMEMA, O., Química de los Alimentos. 2da. Ed. Editorial ACRIBTA S.A, Zaragoza, España 2000.

FOGARTY, William M. Kelly, Catherine T. Microbial enzymes and biotechnology. Ed, Elsevier applied biotechnology series. Elsevier, Inglaterra. 1990.

FUREGON, A. Peruffo, A,1997. Curioni. Immobilization of rice limit dextrinase on g-alumina beads and its possible use in starch processing. Journal Process Biochemistry. Vol 32, No 2, p 113-120.

GACESA Peter y HUBBLE John. Tecnología de las enzimas. Editorial, ACRIBIA, S.A. Zaragoza España 1990.

GARCIA GARIBAY. QUINTERO RAMIRES. LOPEZ MUNYVIA. Biotecnología alimentaría. Ed LIMUSA, NORIEGA EDITORES. S.A México, DF. 1993

GHOSH ANIL K AND SUBHABRATA SENGUPTA, 1987. Multisubstrate specific amylose from mushroom *Termitomyces Clypeatus*. Journal Biosci. Vol. 11, Numbers 1–4, Pág 275-285.

HE Gou-qing, TANG Xing-jun, MUKHTAR A. M. Ali and CHEN Qi-he, 2002. optimization of cultural conditions for thermostable β -1,3-1,4-glucanase production by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5. Journal of Zhejiang University SCIENCE. Vol 4 N° 6. p 719-726.

HEMA Anto, UJJVAL Trivedi y KAMLESH Patel, 2006. Alpha Amylase Production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 Using Solid-State Fermentation Journal of Food Technology and Biotechnology Vol. 44 N°2. p. 241–245.

HOWLING, D. Glucose syrup: production properties and applications en: SCHENK F.W; HEBERDA, R. R .VCH publishers starch hydrolysis products New York 1992

JEI-FU Shaw, FU-PANG Lin, SU-CHIU Chen, and HSING-Chen, 1995. Purification and properties of an extracellular α -amylase from *Thermus* sp. Journal microbiology , Vol 36. p 195-200.

JENKINS, CAMERON, Y DONALD, 1993. Universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. Journal Plant Physiology Vol. 45, N°12, p. 417-420.

KOCH, H., ROPER, H. AND HOPCKE, R. New industrial uses of starch. In plant polymeric carbohydrates, eds. F. Meuser, D.J. mannera, and W. Seibel, Royal Society of Chemistry 1993. p 157-179.

KOCH, H., ROPER. H. New Industrial From Starch. ed, F. Meuser, D.J. Manner, 1987. p 121-131.

KRISHNAN Y A. K. CHANDRA, 1983. Purification and Characterization of α -Amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305. Journal microbiology. Vol 46, No. 2, p 430-437.

KUEHL Robert. Diseño de experimentos, segunda edicion. Ed Thomson learning. Mexico, 2001.

LINDEN, G., LORIENT D. Bioquímica agroindustrial: Revalorización Alimentaría de la Producción Agrícola. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España 1996.

MAMO G.; GESSESSE A, 1999. Effect of cultivation conditions on growth and α -amylase production by a thermophilic *Bacillus* sp WN11. Jpurnal of Microbiology, vol 29, N°1, p 61 -65.

MARC J.E.C MAAREL, BART VEEN, JOOST C.M. UITDEHAAG, HANS LEEMHUIS, I. DIJKHUIZEN, 2002. Properties and applications of starch-

converting enzymes of the α -amylase family. Journal of Biotechnology, Vol 94 N° 3 p 137-155.

MONTGOMERY DOUGLAS. Control estadístico de calidad, 3^{ra} edición. Editorial Limusa Wiley. México, 2004.

MONTOYA CAMPUSANO Olga Inés. Manual de microbiología, Universidad Nacional de Colombia. Medellín 2004.

MONTOYA R. María Isabel. Hidrólisis Enzimática de Almidón para la obtención de Jarabes de Glucosa y Maltosa. Revista de Ingeniería Química Punto Crítico No.2 noviembre 2004.

NAHAS E, WALDEMARIN M, 2002. Control de la producción de amilasa y características de crecimiento por *Aspergillus ochraceus*. Revista Latinoamérica. Microbiología Vol. 44 N° 1, p. 5-10.

OLIVEIRA SANTOS Eliana y MEIRE LELIS Leal Martins, 2003. Effect of the Medium Composition on Formation of Amylase by *Bacillus sp.* journal Biology yTechnology. Vol. 46, N°1, p. 129-134.

OKADAN M., NAKAKUKI T, 1992. Oligosaccharides: production, properties and applications. SCHENK F.W; HEBERDA, R. E. starch hydrolysis New York VCH publishers, p, 335-366.

OSTERTAG Carlos, F. Producción Mercados mundiales de almidón. Centro Internacional de Agricultura Trópica CIAT. Colombia 1993. p. 1-26.

ÖZLEM Kiran, UGUR Çömlekçioğlu y BURHAN Arıkan, 2005. Effects of Carbon Sources and Various Chemicals on the Production of a Novel Amylase from a Thermophilic *Bacillus sp.* K-12. journal of Biology Vol 29. p. 99-103.

PEPPLER, H.J Y REED, G “enzymes in food and feed processing” en: Bautista Santa Cruz Luis Fernando. Purificación de α -amilasa de *aspergillus oryzae* por adsorción, tesis doctoral. Madrid 1997.

ROSSO Adriana M, FERRAROTTI Susana A, KRYMKIEWICZ Norberto and B NUDEL Clara, 2002. Optimisation of batch culture conditions for cyclodextrin glucanotransferase production from *Bacillus circulans* DF 9R. Journal of Microbial Cell Factories.V.1, n.3, 2002. p 1-9.

SÁNCHEZ LÓPEZ Alberto. Obtención de jarabes de glucosa por hidrólisis enzimática del almidón extraído de tres variedades de yuca (amarga, armenia y chile). Cultivadas en la provincia Guanenta (Santander). Tesis Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química. Bucaramanga 2002.

- SARIKAYA ELIF Y VELITTIN GÜRGÜN, 2000. Increase of the α -amylase yield by Some *Bacillus* Strains. *Journal biology*. Vol 24, p 299–308.
- SARMIENTO VC, VARGAS DH, PEDROZA AM, MATIZ A, Y POUTOU RA., 2003. Producción de α -amilasa con células libres e inmovilizadas de *thermus* sp. *Revista de Biotecnología*. Vol 8 N°2. p. 310 -317.
- SCRAGG ALAN. *Biotecnología para ingenieros: sistemas biólogos en proceso tecnológico*. Ed LIMUSA, NORIEGA EDITORES. Balderas, México DF. 1997.
- SHAH ALI UI Qader, Saeeda Bano, Afsheen Aman, Noman Syed and Abid Azhar, 2006. Enhanced production and extracellular activity of commercially important amylolytic enzyme by a newly isolated strain of *Bacillus*. Sp. As-1. *Journal of Biochemistry* Vol 31 N°3. p 135 -140.
- SHAISTA KOKAB, M. ASGHAR, K. REHMAN, M.J. ASAD Y O. ADEDYO, 2003. Bio- rocessing of Banana Peel for α -Amylase Production by *Bacillus subtilis*. *Journal of Agricultura & Biology* Vol. 5, No. 1. p 36–39.
- SHINSAKU HAYASHIDA, YUJI TERAMOTO, Y TAKEHIRO INOUE, 1988. Production and Characteristics of Raw-Potato-Starch-Digesting α -Amylase from *Bacillus subtilis* 65. *journal Microbiology*. Vol. 54, No. 6, p. 1516-1522
- SOUZA TEODORO Carlos Eduardo y MEIRE LELIS Leal Martins, 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *bacillus* sp. *Journal Microbiology* Vol.31 N°4. p 298-302.
- SRIVASTAVA R. A. K. Y BARUAH N., 1986. Culture Conditions for Production of Thermostable Amylase by *Bacillus stearothermophilus*. *Journal microbiology*, Vol. 52, No. 1, p 179-184.
- SUMITRA RAMACHANDRAN, ANIL K. PATEL, KESAVAN MADHAVAN NAMPOOTHIRI, SANDHYA SURMERLY, R. Produccion de hidrolisados a partir de yuca por procesos enzimaticos. Botucatu: Centro de Raizes Andino Tropicales-Universidad Estatal Paulista, 2003.
- SWETHA Sivaramakrishnan, DHANYA Gangadharan, NAMPOOTHIRI esavan Madhavan, SOCCOL Carlos Ricardo y PANDEY Ashok, 2006. α -Amylases from Microbial Sources – An Overview on Recent Developments. *Journal Food Technology and Biotechnology*. Vol 44 N°2, p 173 –184.
- TADA, S LIMURA. “cloning and nucleotide sequence of the genomic taka amylase A gene of *aspergillus oryzae*” en: Bautista Santa cruz luis fernando. Purificación de α -amilasa de *aspergillus oryzae* por adsorción, tesis doctoral. Madrid 1997.

TAPAN KR. DUTTA, MALABENDU JANA, PRITI R. PAHARI, TANMAY BHATTACHARYA, 2006. The Effect of Temperature, pH, and Salt on Amylase *Heliodiaptomus viduus*(Gurney) (Crustacea: Copepoda: Calanoida) Journal biology. Vol 30. p 187-195.

TEAGUE W.M.;BRUMA P.J. 1992. Commercial enzymes for starch hydrolysis products. En Rodolphe Sumerly, Hugo Alvares, Marney Pascoli Cereda Y Olivier f. Vilpoux. Hydrolysis of starch, Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo 2003.

TEODORO, Carlos Eduardo y MEIRE LEAL Martins, 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.* Journal biology. Vol.31, N 4, p. 298-302.

TORBEN Peter, FINN Lok, MIRGORODSKAYA Ekaterina, ROEPSTORF Peter, y SVENSSON Birte, 2000. Characterization, and Nucleotide Sequence of a High-Isoelectric-Point α -Glucosidase. Journal Plant Physiology Vol. 123, p 275-286.

VARGAS APAZA, Silver Luis. Selección y evaluación de bacterias del género *Bacillus* productoras de amilasa en cultivo sumergido. Biotecnología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Escuela de Post-Grado, Lima, 2002.

VILPOUX, F. Vol 3. Technology, use and potentialities of latin american starchy tubers fundação cargill - são paulo 2003.

WANG, Y-J., WHITE, P., POLLAK, L. AND JANE, J, 1993. Characterization of starch structures of 17 maize endosperm mutant genotypes with Oh 43 inbred line background. Journal Cereal Chemistry Vol. 70, N°2, p. 171-179.

WISEMAN Alan. Manual de las enzimas. Ed, ACRIBIA, S.A. Zaragoza España 1993.

WISEMAN Alan. Principios de biotecnología. Ed, ACRIBIA, S.A. Zaragoza España 1987.

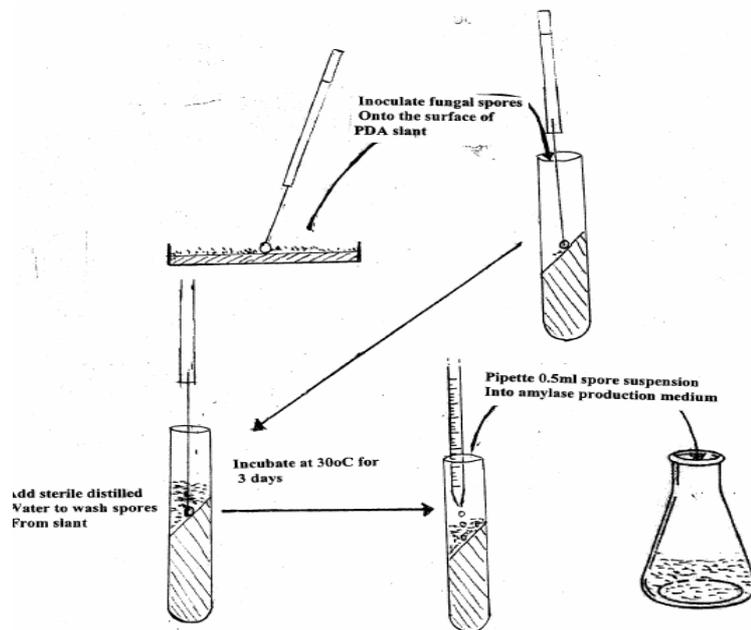
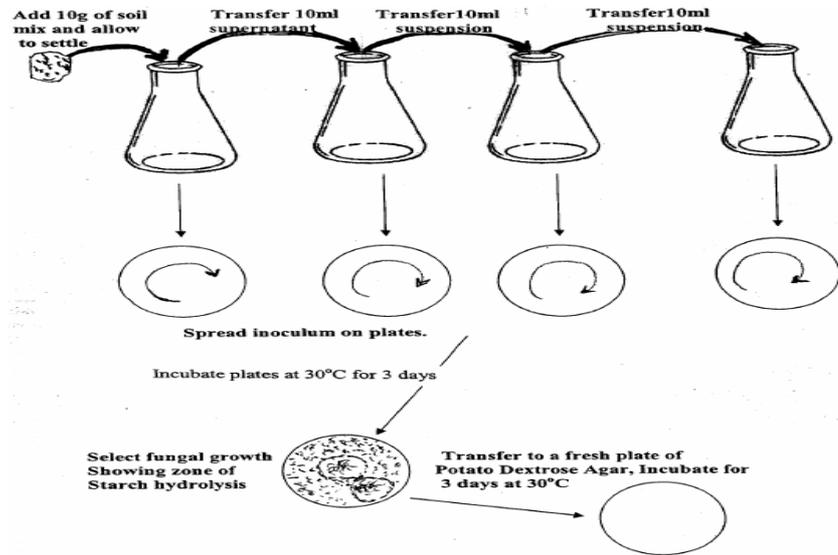
WURZBURG, 1986. Modified starches: properties and uses. En Cereda Marney Pascoli. culturas de tuberosas amiláceas latino americanas Vol 1: Propriedades gerais do amido Fundação Cargill - São Paulo 2001.

YOUNG CHUL CHUNG, TETSUO KOBAYASHI, HARUHIKO KANAI, TERUHIKO AKIBA, Y TOSHIKI KUDO, 1995. Purification and Properties of Extracellular Amylase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus profundus* DT5432. Journal of Microbiology, Vol. 61, No. p 1502–1506.

ZOMBEL, H., starch: sources, productions, and properties. En Cereda Marney Pascoli. culturas de tuberosas amiláceas latino americanas Vol 1: Propriedades gerais do amido Fundação Cargill - São Paulo 2001.

Anexos

Anexo 1.
MÉTODO DE AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE
AMILASAS, SEGÚN Bergman y col (1988).



Anexo 3. CONSERVACIÓN DE LA CEPA.

El microorganismo fue sembrado en diferentes medios de conservación tanto sólidos como líquidos de la siguiente manera.

Se repico la cepa PA4BG desde tubo inclinado a una caja petri con agar MRS modificado almidón 20 gr/L según Betancourt (2006) y se incubo a 37 °C por 24 horas. Posteriormente se sembró desde la caja petri una asada de la cepa en 100 mL de caldo MRS modificado con perlas de porcelana sumergidas y se incubo a 37 °C por 24 horas, luego se procedió a llevar la bacteria incubada a diferentes medios de conservación.

7.1.4.1. Conservación en tubos tapa rosca inclinados.

Se prepararon 5 tubos inclinados con 10 mL de agar MRS modificado los cuales fueron inoculados con una asada del caldo MRS modificado, se sello su tapa con parafina fundida, se rotularon adecuadamente y se llevaron a refrigeración.

7.1.4.2. Conservación en glicerol

Se prepararon 3 recipientes de vidrio de 10 mL con 400 µL de glicerol estéril a cada uno de los cuales se les adiciono 1600 µL de caldo MRS modificado preparado anteriormente, se selló su tapa con parafina fundida, se rotularon adecuadamente y se llevaron a congelación.

7.1.4.3. Conservación en perlas de porcelana.

Se prepararon 3 tubos tapa rosca estériles se les agrego una capa de silica gel al fondo del tubo, se cubrió la capa con algodón estéril sobre el cual se deposito con pinza estéril una capa de las perlas provenientes del caldo MRS modificado, posteriormente se selló su tapa con parafina fundida, se rotularon adecuadamente y se conservaron a temperatura ambiente.

Anexo 4.
MÉTODO SMITH Y ROE MICROMODIFICADO.

Obtención de amilasas

La obtención de extracto enzimáticos crudo se realizó a través de una centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos de muestras de 5 mL de cultivo.

1 Reactivos

- Solución buffer fosfato de cloruro de sodio.

Una solución buffer de sodio fosfato de 0.06 M, pH 7.2, la cual es 0.05 M en cloruro de sodio, es preparada de la siguiente manera 2.922g de cloruro de sodio, 6.135g de fosfato de hidrogeno di-sódico anhidro y 2.286g de fosfato de di-hidrogeno de potasio anhidro son disueltos en agua destilada, el volumen es llevado a un litro.

- Solución substrato

Una suspensión de almidón soluble 0.3 % en reactivo buffer fosfato de cloruro de sodio es hecha en el momento de utilizarse. 300 mg de almidón soluble lintner (Merk) son pesadas exactamente y suspendidas en 10ml de solución buffer fosfato de cloruro de sodio en un frasco volumétrico de 100ml, cual es agitado asta que todo el almidón forma una suspensión homogénea. La suspensión es llevada al volumen con reactivo buffer fosfato de cloruro de sodio y mezclado, el frasco es puesto en un baño maría por 3 minutos la mezcla de almidón es trasferida en erlenmeyer de 125ml para facilitar la mezcla y pipetear, este frasco es puesto en el baño maría y dejado enfriar asta 90 °C, la suspensión de almidón es mantenida a temperatura constante durante el pipeteado.

Las soluciones de almidón preparadas de esta manera se mantendrán en refrigerador por un período de 2 semanas con no más de 10% de pérdida en la susceptibilidad del substrato para hidrólisis por amilasa. Cuando se usa substrato refrigerado se debe mezclar vigorosamente y verter cuidadosamente más de lo que será usado dentro de un tubo de ensayo. Poner el tubo en baño maría por 3 minutos dejar enfriar es substrato asta 90°C y mantenerlo a temperatura constante.

- 1 N Ácido clorhídrico.

- Solución de yodo.

18g de yoduro de potasio y 1.8g de yodato de potasio son disueltos en agua destilada y diluir a un litro.

2 Procedimiento

2 mL de solución del sustrato son pipeteados dentro de cada uno de dos tubos de 15x125mm. Colocar los tubos de ensayo rotulados en un baño de agua a 37° C a temperatura constante. 0,1mL de la muestra es adicionada a un tubo. El segundo tubo es mantenido como control, ambos tubos son incubados por media hora. En el final del periodo de incubación, el contenido de cada tubo es vertidos dentro de balones volumétricos de 200 mL rotulados que contienen de 100 mL de agua destilada y 3 mL de 1 N HCl. Los tubos son lavados cuatro veces con agua destilada y el agua de lavado es adicionada a los balones. 0,1mL de la muestra de análisis es adicionado al balón de control y 1 mL de reactivo de yodo es adicionado a cada balón. Los balones son llevados al aforo es mezclado completamente después de 15 minutos la soluciones coloreadas son comparadas en un colorímetro 620nm, el agua destilada es usada para calibrar el instrumento a cero de absorbancia. El balón de control da el valor del color de la reacción yodo-almidón sin la acción de la amilasa y el balón de digestión da el valor restante después de la acción de la amilasa.

3 Cálculos

$((D \text{ de control}) - (D \text{ digestión})) / (D \text{ de control}) * 6 = \text{miligramos de almidón hidrolizado.}$

D = densidad óptica

Una unidad de actividad enzimática de amilasa es definida como la cantidad de enzima que es capaz de hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos a 37°C, a una etapa en la cual ningún color es dado con yodo

Para las muestras los cálculos son los siguientes

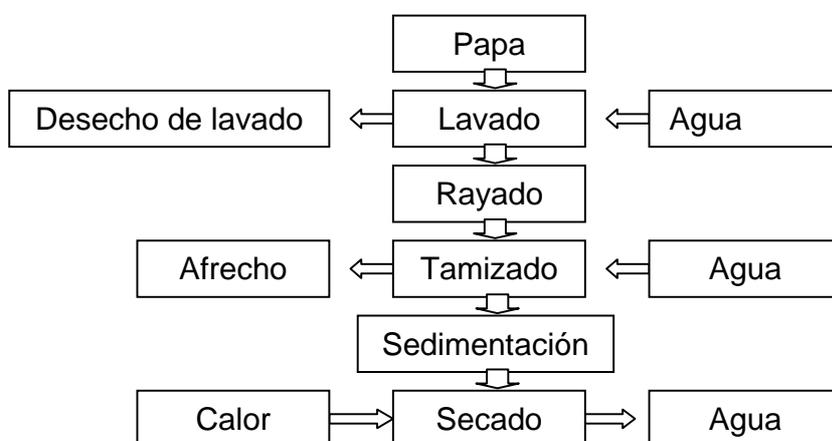
$((D \text{ de control}) - (D \text{ digestión})) / (D \text{ de control}) * 6 / 10 * 100 / 0.1 = \text{unidades de amilasa por cada 100 mL.} <<<$

Si el tubo de experimento da una densidad óptica entre 0.1 – 0.02 (80 a 95% de transmitancia), diluir la muestra en relación 1:1 con solución salina; para densidades ópticas con valores de 0.02 (por encima del 95% de transmitancia), diluir en relación 1:4 con solución salina y repetir el ensayo.

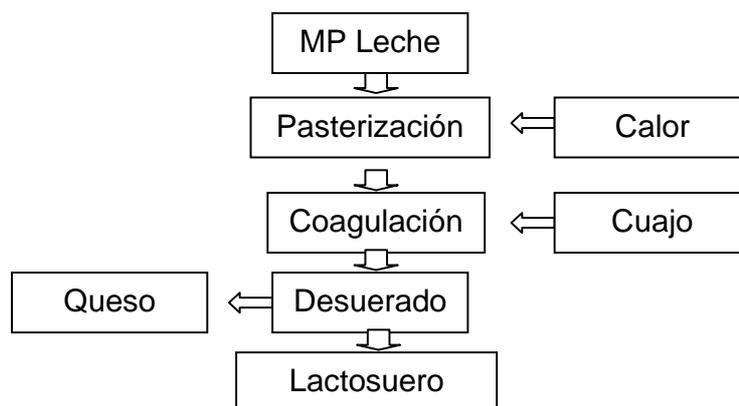
Anexo 6 ACONDICIONAMIENTO DE LOS SUSTRATOS.

Se utilizó almidón de papa como principal fuente de carbono y residuo agroindustriales como el lactosuero y harina sangre.

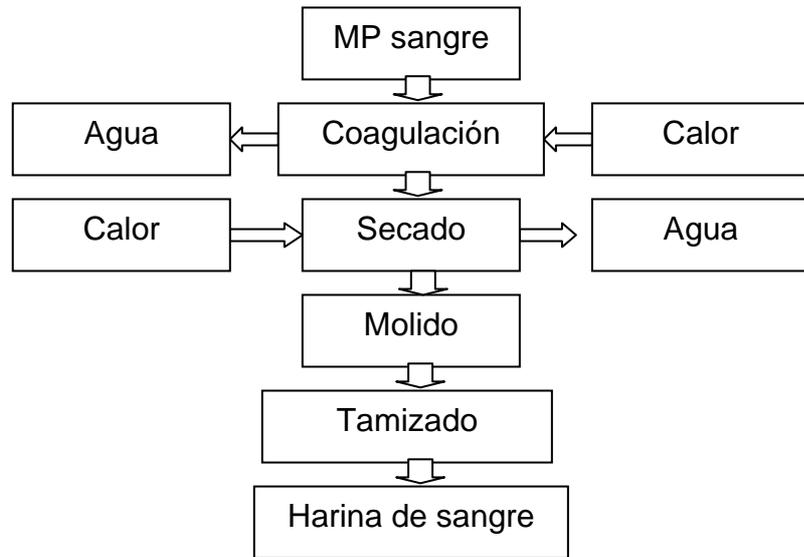
- Figura diagrama de flujo proceso de obtención almidón de papa



- Figura diagrama de flujo proceso de obtención de lactosuero.



- Figura diagrama de flujo proceso para obtención de harina de sangre.



Anexo 7
CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE AMILASA *Bacillus* sp
PA4BG

Horas	NUFC	Abs 400 nm	Amilasa UI/ml
0	5440000	0,095	0
2	5440000	0,095	
4	5488960	0,112	0,007633588
6	5950033	0,131	
8	6664037	0,135	0,007633588
10	7996844	0,278	
12	11595424	0,586	0,0703125
14	19596266	0,878	
16	36057129	1,035	0,16687737
18	80767970	1,256	
20	2,83E+08	1,653	0,210663199
22	9,33E+08	2,153	
24	2,82E+09	2,534	0,409090909
26	6,06E+09	2,743	
28	1,14E+10	2,912	0,720306513
30	1,65E+10	2,922	
32	1,98E+10	2,926	1,379310345
34	2,18E+10	2,875	
36	2,2E+10	2,943	3,436507937
38	2,2E+10	2,884	
40	2,2E+10	2,834	6,516046213
42	2,1E+10	2,744	
44	2,07E+10	2,781	6,925449871
46	2,03E+10	2,715	
48	2,01E+10	2,725	6,958762887

Anexo 8.
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS SUSTRATOS.

Constituyentes de la sangre, plasma y celular por porcentaje

Constituyentes	Sangre	Plasma	Celular
Agua	80	90.8	60.8
Sales	0.9	0.8	1.1
Grasa	0.2	0.1	0.4
Proteína	17	7.9	35.1
- albúmina	2.8	4.2	-
- globulina	2.2	3.3	-
- hemoglobina	10	-	30
- otros	1.4	0.8	2.6

Aminoácidos esenciales contenidos en 100 gr de proteína en sangre y plasma de bovinos

Aminoácidos	Sangre	Plasma
Ile	0.4-0.9	1.0-3.4
Leu	12.4-13.6	9.2-10.1
lys	9.2-9.7	6.5-9.2
Met (+cys)	1.3-1.8	0.6-1.3
Phe (+tyr)	7.0-8.0	5.1-5.7
thre	4.7-5.2	2.6-7.1
trp	1.4	0.6-1.0
val	8.0-9.1	6.8-7.4

Metales	Sangre en total (g/cm ³)	En el plasma (g/cm ³)
Hierro	$4-6 \times 10^{-4}$	$6-18 \times 10^{-7}$
Calcio	$4.48-4.92 \times 10^{-5}$	$4.25-5.25 \times 10^{-5}$
Aluminio	$1-40 \times 10^{-8}$	$1-88 \times 10^{-8}$
Magnesio	$3.2-5.5 \times 10^{-5}$	$1.8-3.6 \times 10^{-5}$
Manganeso	$0-2.5 \times 10^{-7}$	$0-1.9 \times 10^{-7}$
Potasio	$1.6-2.4 \times 10^{-3}$	$1.4-2.2 \times 10^{-4}$
Sodio	-	$3.1-3.4 \times 10^{-3}$
Zinc	-	$5-13 \times 10^{-6}$

Composición detallada de 100 g de porción comestible del suero lácteo*					
Sales minerales		Vitaminas		aminoácidos	
Sodio	45 mg	Vitamina A	3 ?g	Arginina	25 mg
Potasio	130 mg	Vitamina B1	35 ?g	Histidina	20 mg
Magnesio	8 mg	Vitamina B2	150 ?g	Isoleucina	60 mg

Calcio	70 mg	Nicotinamida	190 ?g	Leucina	95 mg
Manganeso	1 ?g	Ácido pantotenico	400 ?g	Lisina	80 mg
Hierro	100 ?g	Vitamina B6	40 ?g	Metionina	16 mg
Cobre	2 ?g	Biotina	1 ?g	Fenilalanina	35 mg
Cinc	140 ?g	Ácido Fólico	1 ?g	Treonina	70 mg
Fósforo	45 mg	Vitamina B12	200 ng	Triptófano	17 mg
Cloro	80 mg	Vitamina C	1 mg	Tirosina	30 mg
Flúor	10 ?g	Otros		Valina	60 mg
Yodo	8 ?g	Ácido láctico	130 mg		
Selenio	7 ?g	Ácido cítrico	160 mg		