



Artículo original

# Aislamiento y selección de cultivos nativos de *Bacillus* sp. productor de amilasas a partir de residuos amiláceos del mercado La Hermelinda, Trujillo, Perú

Isolation and selection of native *Bacillus* sp. cultures amylase-producers from amylaceous-waste starch from La Hermelinda Market, Trujillo, Peru.

Richard Avalos Zavaleta<sup>1</sup>, Luis Llenque-Díaz<sup>2</sup> y Rosa Segura-Vega<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Biólogo-Microbiólogo, <sup>2</sup>Departamento Académico de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú. albertoyenque65@gmail.com

## RESUMEN

La presente investigación estuvo dirigida a aislar y seleccionar cultivos nativos de *Bacillus* sp. productor de amilasas a partir de residuos amiláceos del mercado La Hermelinda, Trujillo - Perú. Se recolectaron residuos amiláceos de yuca, papa, camote, olluco y choclo, se cortaron porciones contaminadas de 25g y colocaron en agua destilada estéril, homogeneizó manualmente por 5 minutos, y calentó a 80°C durante 10 minutos. Se realizaron diluciones seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup> y sembró 0.1 mL de las dos últimas diluciones en Agar Almidón 0.1%. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas. Luego se adicionó lugol en las zonas circundantes a las colonias, y seleccionaron aquellos cultivos con halo neto de hidrólisis. Se hicieron subcultivos en Agar-Almidón, incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas, y seleccionaron los diez cultivos bacterianos que tuvieron mayor halo neto. Posteriormente, en cada biorreactor se colocó 450 mL de caldo almidón 0.1% - buffer fosfato a pH 7.0, suplementado con sales, agregó 50 mL del inóculo estandarizado e incubó a temperatura ambiente. Se determinó la producción de amilasas cada 24 h por 5 días, extrayendo 10 mL de muestra de cada biorreactor y centrifugado. Al sobrenadante (extracto enzimático), se cuantificó la cantidad de amilasas producidas en relación al tiempo de incubación y determinó las unidades enzimáticas de amilasas/mL y analizados mediante la prueba estadística de ANOVA. Finalmente, se aislaron 50 cultivos nativos con capacidad de degradar almidón de los residuos amiláceos, de los cuales 05 cultivos tuvieron con mayor capacidad hidrolítica sobre el almidón en placa, y el cultivo nativo FGM-04P que fue identificada como *Bacillus* sp. como el mayor productor de amilasas en sistema agitado con 0,1 % de almidón, pH 7,0 y 25°C.

**Palabras clave:** Aislamiento, *Bacillus*, Residuos amiláceos, Hidrólisis enzimática.

## ABSTRACT

The aim of this research was to isolate and select native cultures of *Bacillus* sp. producing amylases from waste starch market The Hermelinda, Trujillo-Peru. Collected waste starch from cassava, potatoes, sweet potatoes, olluco and corn, is cut contaminated portions of 25g and placed in sterile distilled water, you manually homogenized by 5 minutes, and heated at 80°C for 10 minutes. They were serial dilutions from 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-3</sup> and it sowed 0.1 mL of dilutions last two starch Agar 0.1%. The plates were incubated at 37° C for 24-48 hours. Then added lugol in areas surrounding the colonies, and selected those crops with net hydrolysis halo. Is made subcultures in Agar Almidon, incubated at 37 ° C for 24-48 hours, and selected the ten bacterial cultures that had greater net halo. In each bioreactor was placed 450 mL of starch 0.1%-buffer phosphate at pH 7.0, supplemented with a salts, added 50 mL of the inoculum standardized and it incubated at room temperature. Determined the production of amylases every 24 h for 5 days, extracting 10 mL sample of each bioreactor and spin. To the supernatant (extracted enzyme), the amount of amylase produced in relation to the time of incubation was quantified and determined enzyme amylases/mL units and analyzed using ANOVA statistical test. Finally, se isolated 50 native crops capable of degrading starch starch residues, of which 05 crop had more hydrolytic capability on starch in plaque, and the native culture, FGM-04P, which was identified as *Bacillus* sp. as the largest producer of amylases in hectic system with 0.1% starch, pH 7.0 and 25° C.

**Keywords:** Isolation, *Bacillus*, Starch Residues, Enzymatic Hydrolysis

## INTRODUCCIÓN

A nivel regional, existen pocos estudios sobre la producción de amilasas y amiloglucosidasas, con características diferentes a las ya comercializadas, utilizando bacterias silvestres y sustratos de origen agrícola con alto contenido de almidón. Esto se hace mediante estudios de bioprospección microbiana, que tratan de identificar las potencialidades de la flora microbiana presente en los diversos nichos ecológicos del mundo, que posibiliten la formación de industrias productoras de enzimas y las industrias derivadas de su aplicación<sup>1,2</sup>. Se conoce que las enzimas convierten a los procesos industriales en eficientes y menos costosos, por su alto grado de especificidad y adaptabilidad<sup>3</sup>, acumulan más material procesado y consumen menos cantidad de energía, por lo que su labor hidrolítica implica la ruptura de un enlace mediante la adición de los elementos del agua, por lo que los polisacáridos son degradados hasta monosacáridos, como es el caso de la hidrólisis de almidón a glucosa<sup>4,5,6</sup>.

La hidrólisis enzimática o degradación enzimática del almidón por acción de la amilasa a escala industrial, ha sido practicada por muchos años y ha reemplazado considerablemente los procesos tradicionales de hidrólisis ácida. Este proceso de hidrólisis enzimática consiste en la utilización de enzimas como catalizadores para romper las moléculas de almidón, obteniéndose productos semejantes a los de la hidrólisis ácida, donde el tipo de enzima más utilizada en este proceso son las amilasas, siendo las más conocidas la  $\alpha$ -amilasa y la  $\beta$ -amilasa; las primeras desdoblan el almidón en glucosa y maltosa, y se caracteriza por tener la facilidad de fragmentar los almidones en dextrinas reductoras, que no dan color en el yodo, y la segunda, convierte la totalidad del almidón en glucosa. Existen dos fases dentro del proceso de hidrólisis enzimática. Primero, la licuefacción y segundo, la sacarificación. La licuefacción se lleva a cabo en presencia de  $\alpha$ -amilasa o  $\beta$ -amilasa, mientras que la sacarificación, es la conversión de almidón a glucosa, en presencia de glucoamilasa<sup>1</sup>.

Al comparar los dos tipos de hidrólisis, se encuentra la gran ventaja de la hidrólisis enzimática sobre la ácida. Esto se debe primordialmente, a que las enzimas son específicas para un tipo de enlace (selectividad), por lo cual, no es usual la aparición de productos de degradación; caso contrario sucede con la hidrólisis ácida, en la cual, el poco control y la selectividad pobre ocasionan la aparición de productos de degradación, inclusive tóxicos. Otra ventaja son los rangos moderados de condiciones como temperatura y pH en las que transcurre la hidrólisis enzimática (pH=4-8; T=40-60°C); además, no se presentan sustancias extrañas añadidas como en el caso de la hidrólisis ácida para la neutralización y se mantiene el valor nutritivo ya que no se produce degradación de los componentes separados, mientras la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina<sup>7</sup>.

Las amilasas son enzimas extracelulares que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-4) con retención de la configuración del carbono anomérico, a partir de polímeros de glucosa, como el almidón y glucógeno. Tienen aplicaciones en diversos sectores: textil, papel, panificación, fermentación, producción de energéticos, preparación de ayudantes digestivos y farmacéuticos. Su principal aplicación es la producción de jarabes de glucosa, maltosa, maltotriosa, dextrina y/o fructosa<sup>8</sup>. Biotecnológicamente, son las enzimas más importantes ya que representan cerca del 30% del mercado mundial de enzimas<sup>9,10</sup>.

Para lograr incrementar la producción de enzimas extracelulares por un microorganismo existen diferentes estrategias; dentro de ellas, las más simples, consisten en aplicar diferentes sistemas de cultivo que incluso permitan emplear como soporte a materiales de desecho agroindustrial y el uso de fermentadores o biorreactores. En los últimos años ha habido un renovado interés en los procesos de producción de enzimas extracelulares mediante sistemas de fermentación, en el que se ha explorado la posibilidad de usar cepas bacterianas en estos sistemas<sup>11</sup>. La ventaja del uso de la fermentación, son una producción más barata de enzimas, que tienen mejores propiedades fisicoquímicas, menores requerimientos de energía, y que es una tecnología amigable con el medio ambiente, ya que reutiliza residuos agrícolas<sup>12</sup> y además, estos procesos dan productos altamente concentrados<sup>13</sup>.

La mayoría de las enzimas utilizadas en procesos industriales se producen por fermentación en medio líquido o fermentación sumergida ya que los costos de recuperación de las enzimas son inversamente proporcionales a la concentración en el medio de fermentación dada en g/L. En los últimos años se han desarrollado sistemas alternativos para la producción de enzimas por microorganismos, como la fermentación en sustrato sólido (SSF), citada en un gran número de

investigaciones, donde se muestra como ventaja una mayor producción enzimática que en fermentación en medio líquido<sup>14</sup>, utiliza medios de bajo costo y requiere menos energía, sin embargo resulta difícil el control de diferentes parámetros tales como pH, temperatura, aireación y transferencia de oxígeno y humedad<sup>15</sup>, es por ello que la SLF se ha convertido en el método preferido de fermentación para aplicaciones industriales dado que es menos problemática, haciéndola más repetitiva, reproducible y fácil de monitorear<sup>16</sup>.

La fermentación es una tecnología que tuvo sus orígenes como un arte ancestral. Originalmente, estos procesos fueron aquellos en los que hongos filamentosos invadían ciertos materiales sólidos que luego eran consumidos por las personas<sup>17</sup>. La fermentación ofrece una serie de ventajas económicas para la obtención de productos de alto valor agregado<sup>18</sup>, como etanol, enzimas, antibióticos, hongos comestibles, ácidos orgánicos, aminoácidos, pigmentos, metabolitos secundarios, etc.<sup>19,20,21</sup>. Por tanto, un proceso de fermentación típico se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo, son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. El microorganismo va aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Los dos fenómenos, crecimiento y formación de producto, tienen lugar durante el desarrollo del proceso simultáneamente o no según los casos, donde se establecen condiciones experimentales adecuadas (pH, temperatura, agitación, etc.) para obtener finalmente el producto deseado, con el mayor rendimiento<sup>22</sup>.

Las bacterias del género *Bacillus* constituyen un grupo importante, este género incluye bacterias Gram positivas que tienen la ventaja de poseer diversos mecanismos para asegurar su sobrevivencia ante condiciones físicas desfavorables, bajo estas condiciones *Bacillus* spp inicia una serie de respuestas; si estas respuestas fallan para poder mantenerse en estado vegetativo se induce la esporulación<sup>23</sup>. La habilidad de las especies de *Bacillus* de formar endosporas altamente resistentes al calor, desecación, irradiación UV, les confiere una ventaja competitiva muy importante en un ambiente como el suelo<sup>24,25</sup>. Así mismo, *Bacillus* spp. también se debe adaptar a cambios bruscos de temperatura, para esto cuentan con genes de shock térmico inducibles que incluyen proteínas chaperonas y proteasas<sup>23</sup>. *Bacillus* tiene como hábitat natural el suelo y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, entre sus principales características se encuentra su capacidad de crecer en un intervalo amplio de temperaturas desde 15 hasta 55 °C, presentar motilidad, aerotaxis y velocidades de crecimiento altas, sobrevivir en concentraciones salinas (hasta el 7% de NaCl), y producir una amplia variedad de antibióticos y enzimas hidrolíticas extracelulares<sup>26</sup>.

Las  $\alpha$ -amilasas provenientes de hongos y bacterias son las más utilizadas en el sector industrial por sus múltiples ventajas: fácil disponibilidad, volumen de producción, estabilidad de operación, modificación y optimización del proceso. Las  $\alpha$ -amilasas bacterianas del género *Bacillus* como *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*, han encontrado una extensa aplicación en diversos procesos industriales debido a sus amplios rangos de operación de temperatura (25-90°C), resistencia a pH extremos (1.0-11.5) y altos niveles de expresión<sup>9,10</sup>. Generalmente, los niveles de expresión enzimática en los microorganismos son bajos, por lo que es necesario incrementarlos para su producción a nivel industrial. El crecimiento del microorganismo y la expresión enzimática están fuertemente influenciados por la composición del medio de cultivo, principalmente por la fuente de carbono y nitrógeno. En el caso de las amilasas de *Bacillus* sp el uso de fuentes de nitrógeno orgánicas como extracto de levadura, peptona y triptona es determinante para aumentar su producción<sup>27,28,29</sup>.

Los mercados de nuestra región generan grandes cantidades de residuos amiláceos diariamente, entre las que destacan los residuos de papa, yuca, camote, olluco y choclo, subproductos de la comercialización al menudeo y que son eliminados al ambiente, contaminándolo, y favoreciendo la propagación de enfermedades. Por otro lado, la comunidad industrial y empresarial, necesita de microorganismos productores de amilasas para obtener jarabes glucosados y ser aprovechados en la producción de bioetanol a gran escala. En tal sentido, se propone una alternativa para aprovechar estos residuos amiláceos de papa, yuca, camote, olluco y choclo, de donde se aislarán e identificarán especies nativas de bacterias amilolíticas, cuyas enzimas son fácilmente recuperables de los medios de producción. En este sentido, es necesario aislar nuevos cultivos bacterianos del género *Bacillus* con altos niveles de producción de amilasas, que puedan existir en el ambiente a partir de residuos

amiláceos, lo cual permitirá contar con una cepario bacteriano, para producir enzimas a nivel comercial y ser utilizadas en la hidrólisis y sacarificación del almidón.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico:

Muestras de residuos amiláceos de yuca, papa, camote, olluco y choclo, procedentes del mercado La Hermelinda, Trujillo - Perú.

### Recolección y transporte de la muestra

Se recolectaron 05 muestras de residuos amiláceos de 250g cada una (yuca, papa, camote, olluco y choclo) del mercado en bolsas de polietileno de primer uso debidamente rotulas. Posteriormente se transportó al Laboratorio de Fisiología Microbiana del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo.

### Tratamiento térmico de la muestra

De la superficie de los residuos amiláceos se cortaron porciones contaminadas y se colocaron en un vaso de precipitación de 500 mL de capacidad hasta completar 25 g. Posteriormente se agregó 225 mL de agua destilada estéril (ADE), se homogeneizó manualmente por 5 minutos, y se calentó a 80 °C durante 10 minutos<sup>30</sup>.

### Selección primaria

A partir de la muestra tratada térmicamente, se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  en solución salina fisiológica estéril (SSFE); y a partir de las dos últimas diluciones, se sembró 0.1 mL por superficie en placas con Agar Almidón (AA) 0.1% (g/L: almidón 1.00; Peptona, 2.50; Extracto de levadura, 0.25 y Agar, 15.0). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 a 48 horas y se observó el crecimiento de las colonias cada 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó lugol en las zonas circundantes a las colonias, y se seleccionaron aquellos cultivos bacterianos que tuvieron más de un mm de diámetro de halo neto de hidrólisis alrededor de cada colonia. Luego se sembraron por puntura en AA y se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 horas, se adiciono lugol y seleccionaron los 10 primeros cultivos bacterianos que tuvieron mayor halo neto de hidrolisis.

Se detallaron las características macroscópicas del género *Bacillus* (tamaño, color, borde, textura) y microscópicas (coloración Gram y de esporas)<sup>31,32</sup>. Además se realizó la diferenciación bioquímica respectiva de acuerdo a lo establecido en el Manual de Berge's of Determinative Bacteriology y Mac Faddin, que incluye; catalasa, motilidad, reducción de nitrito, Ox-Fer, glucosa, indol, licuefacción de la gelatina, citrato de Simmons Voges-Proskauer, ureasa, desaminasa, glucosa, manitol, arabinosa,<sup>33,34</sup>. Los cultivos seleccionados fueron subcultivados en AA 0.1% e incubados a 37 °C durante 24 a 48 horas, y rotulados en orden correlativo<sup>1,30</sup>.

### Determinación de la producción de amilasas en sistema agitado.

#### Reactivación del cultivo y preparación del inóculo

Cada cultivo bacteriano seleccionado se reactivó por estría en placas conteniendo AA 0.1% e incubados a 37 °C por 18 h. A partir del cultivo reactivado se preparó una suspensión bacteriana equivalente al tubo N° 3 del nefelómetro de MacFarland ( $9.0 \times 10^8$  UFC/mL), utilizando SSFE.

#### Construcción de biorreactores

Se construyeron 05 biorreactores con frascos de vidrio de 1000 mL de capacidad; con 04 "baffles", se acondicionó un motor de 6V y un agitador tipo Roushton a cada uno. Los frascos y agitadores fueron esterilizados haciendo uso de lejía al 2.5 % por 30 minutos y luego irradiados con luz ultravioleta de una lámpara de 300 Watt, a una distancia de 40 cm por 60 minutos.

#### Producción de amilasas en biorreactor

Se colocó 450 mL de una solución de caldo almidón 0.1 % - buffer fosfato a pH 7.0 suplementado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ , luego se agregó 50mL de inóculo estandarizado ( $9.0 \times 10^8$  UFC/mL) a cada uno de los biorreactores y se puso en funcionamiento con una agitación aproximada de 150 rpm e incubado a temperatura ambiente (23-25 °C)<sup>35</sup>.

Luego a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h se extrajo 10 mL de muestra de cada biorreactor, se centrifugo a 3500 rpm por 15 minutos. En el sobrenadante (extracto enzimático) se cuantifico la cantidad de amilasas producidas en relación al tiempo de incubación.

#### Medición de la Actividad Enzimática

La evaluación de la actividad enzimática se realizó mediante el método de Street- Close modificado por Cueva. En un tubo de ensayo (Problema) se colocó 2.5 mL de solución de almidón al 0.04%-buffer fosfato a pH 7 y 0.5 mL de ADE, se mezcló y se pre incubó a 37 °C por 5 min, luego se agregó 1 ml de extracto de enzimático que se mezcló e incubo a 37 °C por 60 min. Luego se agregó 2.5 mL de HCl 0.1N seguidamente se agregó 0.5 mL de solución yodada. Se trabajó con un tubo testigo al que se le agrego el extracto enzimático después de haberle agregado HCl, se incubo en las mismas condiciones. Las lecturas de las absorbancias se realizaron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm<sup>36</sup>. La cantidad de almidón hidrolizado se calculara a partir de la diferencia entre el almidón inicial incubado y el almidón residual, después de la actividad enzimática. Una unidad de actividad amilolítica (UA) fue definida como el total de enzima presente en el sobrenadante que es capaz de hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos a pH 7 a temperatura ambiente<sup>1</sup>.

#### **Elaboración de la curva de calibración del almidón**

Se trabajó con una concentración de almidón al 0.04%. Se colocó 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL en tubos de ensayo posteriormente se aforo a 3 mL con agua destilada; luego se agregó a cada tubo 2.5 mL de HCl al 0.1N y 0.5 mL de solución yodada. Las lecturas de las absorbancias se realizaron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm.

#### **Análisis estadístico de los resultados**

La cantidad de amilasas producidas promedio por cada uno de los cultivos de *Bacillus* sp. fueron analizadas mediante la prueba estadística del Análisis de Varianza (ANOVA) con una significancia del 0.05 % para establecer si existe o no diferencia significativa<sup>37,38</sup>.

## **RESULTADOS**

En la Fig. 1 se observan los halos de hidrólisis del almidón alrededor de las colonias de bacterias sobre las placas con Agar Almidón, sembradas por puntura, que permitió reconocer y hacer la selección primaria de los cultivos bacterianos con mayor capacidad hidrolítica sobre el almidón por el método del yodo

En la Tabla 1 se registran las características microscópicas y macroscópicas de los cultivos bacterianos aislados y seleccionados a partir de muestras de residuos amiláceos, procedentes del mercado La Hermelinda, Trujillo – Perú.

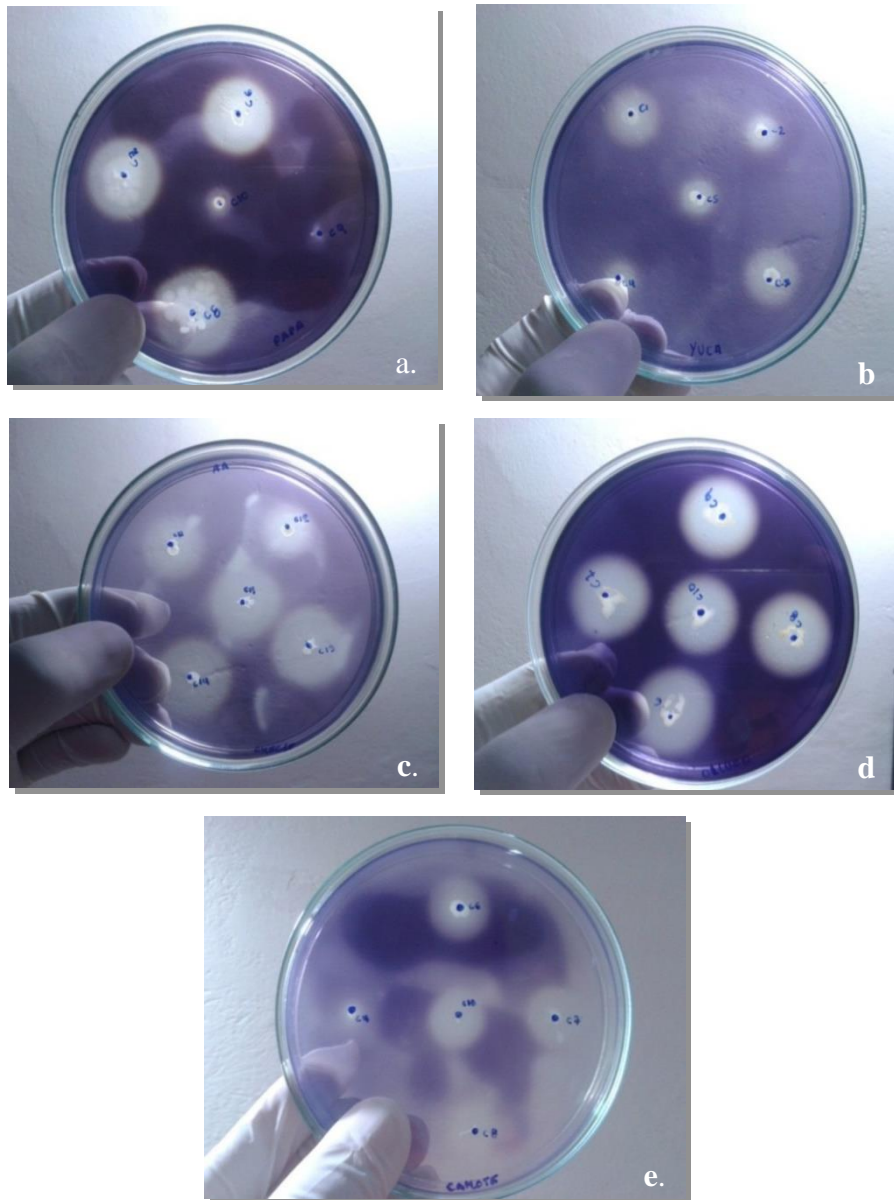
La Fig. 2 muestra la producción de amilasas (UA/mL) por *Bacillus* sp (FGM-04P, FGM-02Y, FGM-09C, FGM-05O y FGM-04B) a pH 7 a temperatura ambiente en relación al tiempo de incubación, destacando el cultivo FGM-04P como mejor productor de amilasas.

En la Tabla 2 se reporta el análisis de varianza de los valores promedios de UA/mL de las bacterias evaluadas en el biorreactor, destacando que no existen diferencias significas entre dichos valores de producción de amilasas, es decir que la producción es la misma por cada una de las bacterias evaluadas.

En la Tabla 3, se presentan las lecturas de las pruebas bioquímicas de identificación del cultivo FGM-04P seleccionado y en la Tabla 4, se reportan los resultados de las pruebas bioquímicas de identificación del cultivo FGM-04P seleccionado a partir de muestras de papa procedentes del mercado La Hermelinda, Trujillo – Perú, que evidencian al género *Bacillus*.

## **DISCUSIÓN**

Se recolectaron y procesaron diferentes muestras de residuos amiláceos contaminados del mercado La Hermelinda de la ciudad de Trujillo, y se logró aislar colonias de bacterias en placas con Agar Almidon y siguiendo el procedimiento estandarizado de una selección primaria de estos cultivos se seleccionó a las bacterias aisladas en razón a su capacidad hidrolítica del almidón en placa, mediante la técnica del lugol, previa a la siembra por puntura en placas y que después del tiempo de incubación se determinó los halos netos de hidrólisis del almidón en placa como se puede observar en la Fig. 1. Este procedimiento es utilizado por los investigadores para aislar y seleccionar bacterias con determinadas cualidades importantes desde el punto de vista industrial, como son en las industrias de edulcorantes, textiles, alimentarios y otros. <sup>1,7,13</sup>

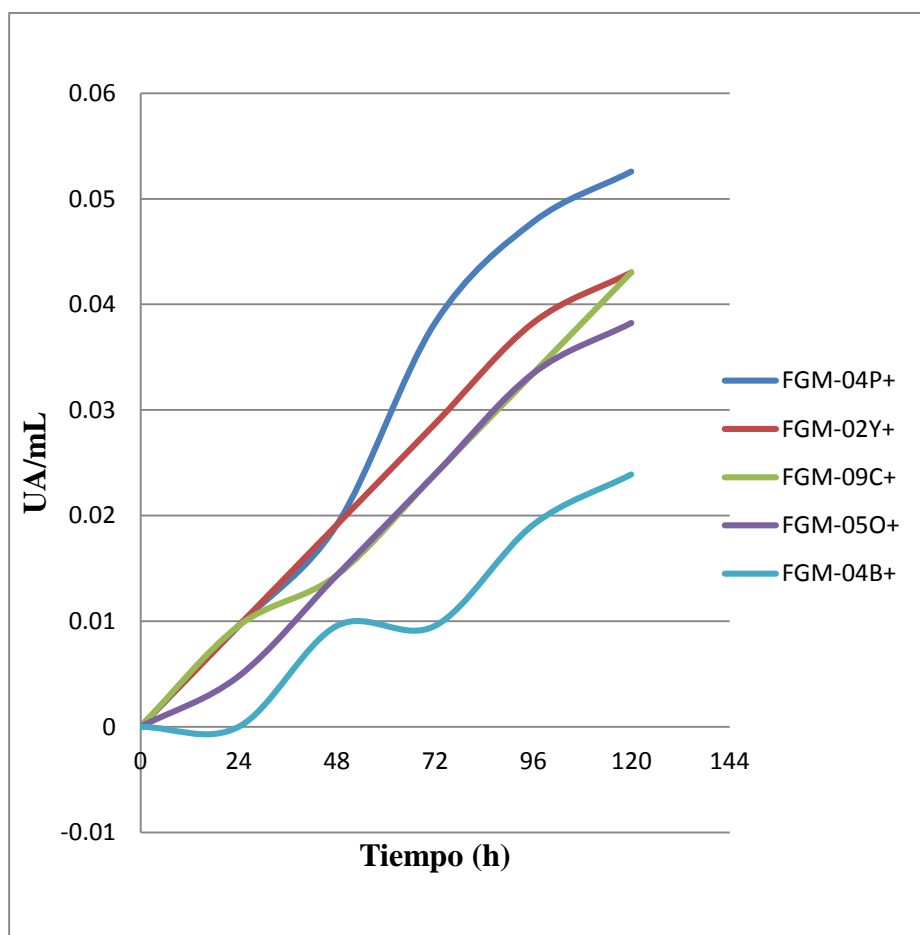


**Fig. 1.** Observación de los halos de hidrólisis de almidón en placa producidos por las bacterias aisladas durante la selección primaria por el método del yodo.

**Tabla 1.** Características microscópicas y macroscópicas de los cultivos bacterianos aislados y seleccionados de muestras de residuos amiláceos, procedentes del mercado La Hermelinda, Trujillo – Perú.

Cultivo	Características macroscópicas		Características microscópicas	
	Reacción Gram	Forma		
FGM-04P	Colonias grandes, cremosas, brillantes, bordes irregulares	+	Bacilos medianos, espora central, extremos ovalados	
FGM-02Y	Colonias medianas, cremosas, brillantes, bordes irregulares	+	Bacilos pequeños, espora central, extremos ovalados	
FGM-09C	Colonias medianas, cremosas, brillantes, bordes irregulares	+	Bacilos pequeños, espora central, extremos ovalados	
FGM-05O	Colonias grandes, cremosas, brillantes, bordes irregulares	+	Bacilos pequeños, espora central, extremos ovalados	
FGM-04B	Colonias pequeñas, cremosas, brillantes, bordes irregulares	+	Bacilos pequeños, espora central, extremos ovalados	

Leyenda: P: Papa; Y: Yuca; C: Camote; O: Olluco; B: Choco



**Fig. 2.** Producción de amilasas (UA/mL) por *Bacillus* sp. (FGM-04P, FGM-02Y, FGM-09C, FGM-05O y FGM-04B) a pH 7 a temperatura ambiente en relación al tiempo de incubación.



**Tabla 2.** Análisis de varianza de los valores promedio de UA/mL producidas por los cultivos FGM-04P, FGM-02Y, FGM-09C, FGM-05O y FGM-04B

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
FGM-04P	6	0.1673	0.0279	0.000460776
FGM-02Y	6	0.13862	0.0231	0.000277989
FGM-09C	6	0.12428	0.0207	0.000252856
FGM-05O	6	0.11472	0.0191	0.000237623
FGM-04B	6	0.06214	0.0104	9.52017E-05

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.000994667	4	0.000248667	0.9388	0.4578	2.7587
Dentro de los grupos	0.006622228	25	0.000264889			
Total	0.007616895	29				

**Tabla 3.** Resultados de las pruebas bioquímica para la identificación de *Bacillus* sp. por medio de MicroScan.





**Tabla 4.** Pruebas bioquímicas de identificación del cultivo FGM-04P seleccionado a partir de muestras de papa.

Prueba Bioquímica		Especie
Glucosa	+	<i>Bacillus</i> sp.
Rafinosa	-	
Sucrosa	+	
Inositol	-	
Ramnosa	-	
Adonitol	-	
Sorbitol	-	
Arabinosa	-	
Melobiosa	-	
Urea	-	
Ácido sulfhídrico	-	
Indol	-	
Lisina	-	
Arginina	-	
Ornitina	-	
Triptofano desaminasa	-	
Esculina	+	
Voges Proskauer (VP)	+	
Citrato	-	
Malonato	-	
ONPG	-	
Tartrato	-	
Acetato	-	
Nitrito	+	
Movilidad	+	
Hidrólisis de almidón	+	

Se aislaron 50 cultivos bacterianos de las diferentes muestras, resultando el cultivo FGM-04P el que presentó el mayor halo de hidrólisis de 29 mm mientras que los cultivos FGM-09C y FGM-04B presentaron el menor halo de hidrólisis de 25 mm. Al respecto, existen microorganismos que producen más enzimas hidrolíticas que otras, esto puede deberse a diversos factores físicos y químicos que influyen en el fenotipo de un microorganismo en un determinado hábitat. Este fenotipo está controlado

por diversos mecanismos que pueden ser: en el ámbito genético por inducción y represión; a nivel enzimático por activación o inhibición; a nivel catalítico por las propiedades bioquímicas de las enzimas; así como por el tipo y concentración de sustratos y productos en el medio. Otros factores como la concentración de oxígeno es especialmente importante. Por ejemplo, los organismos aeróbicos presentes en el suelo consumen rápidamente el oxígeno disuelto, de tal forma que las capas más internas del suelo son prácticamente anaeróbicas. Además, muchos ambientes acuáticos a cierta profundidad, el rumen e intestino de animales, y los biodigestores para el tratamiento de aguas, entre otros representan nichos en los cuales prevalecen condiciones anaerobias<sup>4,20</sup>.

La identificación de los cultivos con capacidad hidrolítica sobre el almidón se realizó mediante la descripción de las características morfológicas de las colonias, siendo estas colonias cremosas, grandes, medianas, pequeñas y de bordes irregulares; y de acuerdo a sus características tintoriales fueron bacilos Gram positivos (Tabla 1), esporulados; y en base a las pruebas bioquímicas que realizó, permitió determinar que el cultivo aislado y seleccionado corresponde a *Bacillus* sp. En base a su capacidad para crecer en presencia o ausencia de oxígeno, los microorganismos del género *Bacillus* están clasificados como aerobios o anaerobios facultativos, Gram positivos, formadores de endosporas, pertenecientes a la familia Bacillaceae, de acuerdo a los autores del manual de Bergey<sup>33</sup>. Las esporas pueden ser clasificadas de acuerdo a su localización en el bacilo: centrales, subterminales o terminales; las formas esporuladas pueden permanecer latentes durante tiempo prolongado, hasta que las condiciones ambientales sean favorables para que puedan germinar de nuevo y reiniciar su actividad metabólica<sup>26,29</sup>. Las especies del género *Bacillus* son un grupo importante con aplicación en biotecnología, ya que tienen interés como fuente de producción de enzimas extracelulares.

La medición de la producción de amilasas en medio líquido por las bacterias seleccionadas reportó valores diferentes pero que estadísticamente se estableció que no hay diferencia significativa entre la producción de los cinco cultivos, pero teniendo en cuenta las características de crecimiento y producción en medio líquido se determinó que el mayor productor de amilasas (UA/mL) corresponde al cultivo *Bacillus* sp FGM-04P. En este sentido, *Bacillus* sp FGM-04P presentó la mayor producción de amilasas a pH 7 a la temperatura de ensayo de 23-25 °C (Figura 2), con 0.052 UA/mL hasta las 120 h de incubación. Otro estudio con *Bacillus licheniformis* FGM-A15 reportó una mayor producción de amilasas a pH 7 a 55°C siendo de 0.1876 UA/mL hasta las 72h de incubación<sup>15</sup>.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vargas S. Selección y Evaluación de bacterias del Género *Bacillus* productoras de amilasa en cultivo sumergido. Perú; 2002.
2. Sánchez CP, Mejía CE, Figueroa C, Esquivia M, Agudelo LM, Zapata N. y Gómez Estudio de cepas nativas amilolíticas. Revista Ciencias Agropecuarias. 2005; 12(2): 21-28.
3. Prescott L, Harley J, D Klein. Microbiología. 5ta ed. Argentina: Edit. Interamericana S.A. 2002.
4. Llenque L. Efecto de la Temperatura, pH y Concentración de sustrato sobre la Velocidad de Hidrólisis del Almidón de papa por *Bacillus subtilis* nativo en un Biorreactor Cilindrico Agitado. Universidad Nacional de Trujillo. 2011.
5. Hernández Medina M, Torruco Uco J, Betancur Ancona D. Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. Ciénc. Tecnol. Aliment 2008; 28(3): 718-726.
6. Gómez A, Silvia F, Sarmiento G, Leonardo F, Delgado C, Diana C. Caracterización de microorganismos celulolíticos y amilolíticos de residuos sólidos orgánicos dispuestos en la planta Ecosangil del municipio de San Gil, Santander. Matices Tecnológicos 2013; 6(5): 29-36.
7. Guadix A, Guadix E, Paez MP, González P. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. Ars Pharmaceutica 2009; 41(1): 79-89.
8. Vandenberghe L, Soccol CR, Pandey A, Lebeault J. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. Bioresour Technol 2000; 74 (2): 175-178.
9. Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. Biotechnol. Appl. Biochem 2000; 31(Pt 2): 135-152.
10. Quintero M, Montoya OI y Gutiérrez PA. Purification and characterization of a  $\alpha$ -amylase produced by *Bacillus* sp. BBM1. Dyna 2010; 77: 31-38.
11. Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. New developments in solid-state fermentation. I- Bioprocesses and products. Process Biochemistry 2000; 35(10): 1153-1169.
12. Pandey A. Solid-state fermentation. Biochem Eng J 2003; 13(2-3): 81-84.

13. Suryanarayan S. Current industrial practice in solid-state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience. *Biochem Eng J* 2003; 13 (2-3): 189-195.
14. Viniegra G, Favela E, Aguilar C, Romero S, Díaz G, Augur C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng J* 2003; 13(2-3): 157-167.
15. Rodríguez Couto C, Ángeles Sanróman M. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *J Food Eng* 2006; 76(3): 291-302.
16. Suárez Arango C, Nieto IJ. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutracéuticos. *Rev Iberoam Micol.* 2013; 30(1): 1-8.
17. Ruíz H A, Rodríguez RM, Rodríguez R, Contreras JC y Aguilar CN. Diseño de Biorreactores para fermentación en medio sólido. *Amidiq* 2007; 6(1): 33-40.
18. Castilho LR, Alves TL, Medronho RA. Production and extraction of pectinases obtained by solid-state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol* 2000; 71: 45-50.
19. Pandey A, Nigam P, Vogel M. Simultaneous saccharification and protein enrichment fermentation of sugar beet pulp. *Biotechnology letters* 1988; 10(1): 67-72.
20. Pandey A, Soccol CR. Bioconversion of Biomass: A Case Study of Ligno-cellulosics Bioconversions in Solid State Fermentation. *Brazilian Arch Biol. Technol* 1998; 41: 379-390.
21. Hölker U, Hofer M, Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 64(2): 175-186.
22. Cuellas AV. Biorreactores. Ingeniería de alimentos. 2007.
23. Petersohn A, Brigulla M, Haas S, Hoheisel J, Lker U, Hecker M. Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol* 2001; 183(19): 5617–5631.
24. Stephens C. Bacterial sporulation: A question of commitment? *Curr. Biol* 1998; 8(2): 45-48.
25. Liu X, Zhao H, Chen S. Colonization of Maize and Rice Plants by Strain *Bacillus megaterium* C4. *Curr. Microbiol* 2006; 52 (3):186-190.
26. Nakamura L.K., Roberts M.S., Cohan F.M. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. Nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *Int. J. Syst Bacteriol* 1999; 49: 1211-1215.
27. Vijayabaskar P, Jayalakshmi D, Shankar T. Amylase production by moderately halophilic *Bacillus cereus* in solid-state fermentation. *Afr. J. Microbiol. Res* 2012; 23: 4918-4926.
28. Premila J, Dhandayuthapani K. Optimization of  $\alpha$ -amylase production of *Bacillus stearothermophilus* KDP from Sago Industry Waste. *Int. Journal Applied BioResearch* 2013; 16: 17-21.
29. Zar M, Sikander A, Shahid A. The influence of carbon and nitrogen supplementation on alpha amylase productivity of *Bacillus amyloliquefaciens* IIB-14 using fuzzy-logic and two-factorial designs. *Afr. J. Microbiol. Res* 2013; 7(2):120-129.
30. Rodas B, Bautista M, Magaña H, Reyes A. Selección de cepas nativas con actividad Quitino-Proteolítica de *Bacillus* sp. aisladas de suelos tropicales. *Rev Colomb Biotecnol* 2009; 11 (1): 97-103.
31. Badía M, Hernandez B, Murrel J, Mahillon J, Pérez M. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz. *Rev. Bras. de Agroecología* 2011; 6(1): 90-99.
32. López L, Hernández M, Colín C, Ortega S, Cerón G, Franco R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *INR* 2014; 3(1): 10-18.
33. Bergeys D. Manual of the Determinative Bacteriology 1989-2000. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia 2000; 2:540-589.
34. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires: Panamericana; 2004.
35. Mitchell D, Pandey A, Sangsurasak P, Krieger N. Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 1999; 35(1-2): 167-178.
36. Cueva F, Villanueva E, Ponce H, Canchachi W, Ilich E. Termoestabilidad de Alfa Amilasa en Extractos crudos de cuatro cultivos de *Bacillus* sp. *Cong Iberoamer CC Químicas* 1983.
37. Massart DL, Vandeginste BM, Buydens LM, de Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier, Amsterdam; 1997.
38. Blanco F. Métodos Apropriados de Análisis Estadístico Subsiguientes al análisis de Varianza (ANDEVA). *Revista Agronomía Costarricense* 2001; 25(1): 53-60.

<p><b>Presentado en:</b> setiembre, 2015  <b>Aprobado en:</b> octubre 2015  <b>Correspondencia:</b> llenque@unitru.edu.pe</p>
---