

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

**CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
AGROINDUSTRIAL**



## **INFORME DE INVESTIGACIÓN**

**PRODUCCIÓN DE AMILASAS A PARTIR DE BACTERIAS DEL  
GÉNERO *Bacillus* AISLADAS DE SUELOS DEL DISTRITO DE  
HUANCAS, AMAZONAS, PERÚ 2006**

**Ms.C. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN**

**Ms.C. JULIO MARIANO CHÁVEZ MILLA**

**AUTORES**

**CHACHAPOYAS - PERÚ**

**2006**

**PRODUCCIÓN DE AMILASAS A PARTIR DE BACTERIAS DEL GÉNERO  
*Bacillus* AISLADAS DE SUELOS DEL DISTRITO DE HUANCAS,  
AMAZONAS, PERÚ 2006**

**RESUMEN**

La presente investigación estuvo dirigida a aislar *Bacillus* productores de amilasas para ello se recolectaron once muestras de suelo del distrito de Huancas, Amazonas, Perú. De las once muestras se aislaron cuarenta cepas en agar nutritivo y posteriormente sembradas en agar tripticosa soya, obteniendo treinta y tres cepas de bacilos, las cuales luego fueron sembradas por puntura en agar almidón encontrándose ocho cepas del género *Bacillus* con capacidad hidrolítica sobre el almidón, lo que se evidenció por la presencia de un halo de hidrólisis después de agregar lugol. A las ocho cepas aisladas se le determinó la actividad enzimática por el método de Street-Close modificado por Cueva y Villanueva y se cuantificó la producción de proteínas por el método de Lowry. Finalmente se encontró que la cepa del género *Bacillus* FJ4UNAT es la que tiene mayor actividad enzimática específica, registrando 0.0188 USC/mg de proteína.

Palabras clave: Amilasas, *Bacillus*, Enzimas.

## I. INTRODUCCIÓN

Las enzimas como la amilasa son catalizadores biológicos extraordinariamente eficientes responsables de miles de reacciones necesarias en los procesos químicos de la vida, la amilasa es una glucosidasa que ayuda entre otras a la digestión de los alimentos pre-cocidos (Bradley et.al., 1982).

Gran parte del interés inicial de la enzimología se desarrolló por científicos asociados con las industrias alimenticias, vinícolas o cerveceras. El resultado fue que con frecuencia, los objetivos científicos e industriales eran inesperables. Los estrechos lazos entre la enzimología e industria aún continúan y las capacidades catalíticas específicas de muchas enzimas se utilizan efectivamente para propósitos comerciales y médicos (Bradley et.al., 1982).

Los microorganismos juegan un papel fundamental en la naturaleza y en el hombre. La presencia de una flora bacteriana normal es indispensable, aunque también existen gérmenes patógenos. Análogamente tienen un papel importante en la industria y permiten desarrollar importantes progresos en la investigación industrial (Balatti, 1994).

Estos microorganismos son excelentes productores de enzimas como por ejemplo las proteasas de hongos y bacterias que se usan en la industria panificadora para controlar la rotura del gluten (proteína) de granos de trigo y centeno. Las proteasas también se emplean en detergentes (alcalasa), para ablandar la carne (bromelina y papaína), fabricación de quesos (renina) y en la industria cervecera (papaína) para eliminar pequeñas cantidades de proteína que producen turbidez en la cerveza enfriada. En medicina se utilizan proteasas (estreptodornasa, ficina y tripsina) para limpiar

heridas. Otras clases de enzimas también se utilizan en gran escala con fines industriales y terapéuticos (Bradley et.al., 1982).

Entre las especies bacterianas de interés industrial están las bacterias del ácido acético, *Gluconobacter* y *Acetobacter* que pueden convertir el etanol en ácido acético. Del género *Clostridium*, cabe destacar que el *Clostridium acetobutylicum* puede fermentar los azúcares originando acetona y butanol. Las bacterias del ácido láctico incluyen, entre otras, las especies de los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus* que producen yogurt. *Corynebacterium glutamicum*, es una importante fuente industrial de lisina. El olor característico a tierra mojada se debe a compuestos volátiles (geosmina) producidos por *Streptomyces* aunque su principal importancia radica en la producción de antibióticos como anfotericina B, kanamicina, neomicina, estreptomina, tetraciclina, etc. (Crueger, 1993).

El genero *Bacillus* también es una especie bacteriana importante en la agroindustria incluye bacilos aerobios, gram positivos que forman cadenas. Casi todos los miembros de este género son microorganismos saprófitos prevalentes en el agua aire y suelo (Doran, 1998).

Las bacterias del género *Bacillus* son productores de antibióticos (Gramicidina, bacitracina, polimixina), insecticidas y enzimas como proteasas y amilasas. Las amilasas son enzimas extracelulares que hidrolizan el almidón. Las amilasas tienen numerosas aplicaciones biotecnológicas, un ejemplo de ello es la producción de jarabes, que contienen oligosacáridos como maltosa y glucosa (Hewitt et.al., 1996).

Las bacterias de este género lo podemos aislar del suelo puesto que como parte de un ecosistema más, existe en el una serie de organismos que viven sobre dicho sustrato y modifican la superficie de las partículas sólidas, es un lugar donde se desarrollan colonias de microorganismos, y constituyen una fuente importante para el aislamiento de bacterias de uso industrial como *Bacillus* (Pastor, 2001).

Un gramo de tierra fértil de jardín, puede tener varios miles de millones de organismos entre bacterias y otros, de esta gran población es posible aislar microorganismos con cualidades especiales, útiles para las industrias biotecnológicas, a través de técnicas de Screening (Villanueva, 2000).

Estas técnicas de Screening posibilitan el aislamiento de un determinado tipo o pequeño número de microorganismos a partir de una población grande cualitativa y cuantitativa diferente. Para aislar microorganismos productores de determinados metabolitos, es necesario tener presente algunas consideraciones como por ejemplo cuales son los microorganismos productores del metabolito de interés, cual es su hábitat natural y cuales son sus características morfológicas y culturales. También es importante conocer sus requerimientos nutricionales, tanto para el crecimiento como para la síntesis del metabolito de interés, así como sus condiciones óptimas de incubación (Villanueva, 2000).

La amilasa es un metabolito de interés industrial y es de tres tipos alfa, beta y gama amilasa, cada una de ellas hidroliza el almidón en diferentes lugares (Villanueva, 2000). Las alfa amilasas son generalmente estables a pH 5,5-8,0 en presencia de un complemento de calcio, la actividad óptima de las alfa amilasas normalmente ocurre

entre pH 4,8 a 6,5. Por la temperatura a la que actúan las amilasas se pueden clasificar en amilasas termoestables y termolábiles; las enzimas termoestables son aquellas que actúan sin perder su actividad en un rango de 60 a 110 °C y la mayoría de ellas son de origen bacteriano, mientras que las enzimas termolábiles, son aquellas que actúan hasta 55°C sin perder su actividad, generalmente varían entre los 20 y 55°C y son de origen fúngico principalmente (Vargas, 2004).

El sustrato para la producción de amilasas por bacterias del género *Bacillus* es el almidón que en su forma nativa se encuentra formado por dos constituyentes la alfa amilasa y la amilopectina. La alfa amilosa esta constituida por cadenas largas no ramificadas de D-glucosa que se hallan unidas mediante enlaces alfa 1,4; las cadenas son polidispersas y varían en peso molecular, no es verdaderamente soluble en el agua pero forma micelas hidratadas, que le confieren un enrollamiento helicoidal. La amilopectina esta muy ramificada, la longitud media de las ramificaciones es de 24 a 30 residuos de glucosa que varían según la especie. Los enlaces glicosídicos son alfa 1,4; pero en los puntos de ramificación son enlaces 1,6. La amilopectina produce disoluciones coloidales o micelas que dan una coloración rojo violácea con el yodo y su peso molecular puede llegar hasta 100 millones (Lehninger, 1985).

La degradación enzimática del almidón por acción de la amilasa producida por microorganismos a escala industrial está siendo practicado con mayor énfasis y a reemplazado considerablemente los procesos tradicionales de catálisis ácida. Cerca del 75% de los jarabes y dextrosa sólida son ahora producidos por procesos enzimáticos, es decir una nueva tecnología se ha acentuado en el área de la degradación del almidón por efecto de las amilasas. Además las amilasas se utilizan también para modificar las

características de almidones naturales, es así que en panadería y molinera se usa para la reducción de la viscosidad de las pastas, aceleración del proceso de fermentación, incremento del volumen del pan, mejoramiento de la miga y la textura, mantenimiento de frescura y suavidad, mejoramiento de la textura de las pastas, reducción del tiempo de mezclado e incremento del volumen de masa (Walker, 1990).

Otras aplicaciones de las amilasas es en cervecería, para el proceso del malteado; en industria alimentaría con cereales en la alimentación con precocidos para infantes, alimentos instantáneos; chocolate y cocoa, también para la producción de edulcorantes, jarabe de maíz, para la manufactura de jarabes de alto contenido de maltosa, producción de jarabe de bajo índice de dextrosa; bebidas destiladas; en fundición, confiere mayor solidez; en textilería, para el proceso de engomado y desgomado; en saborizantes, como clarificantes; en alimentos vegetales, para licuefacción de purés y sopas. En la industria de papel; piensos y detergentes (Scragg, 2000).

Actualmente en nuestro medio no se han realizado estudios de producción de amilasa, utilizando bacterias silvestres por ello el presente trabajo estuvo orientado a producir amilasa a partir de bacterias del género *Bacillus* aisladas de suelos del distrito de Huancas; teniendo como objetivos aislar, identificar y seleccionar bacterias del género *Bacillus*.

## II. MATERIAL Y METODO

**2.1 Muestra:** Se colectaron en total 11 muestras de suelo del distrito de Huancas.

**2.2 Selección de la muestra:** Las muestras de suelo se seleccionaron teniendo en cuenta la textura, desde los 0,30m hasta los 2m de profundidad.

### 2.3 Colección de la muestra

Se colectaron aproximadamente 1000 g de suelo en bolsas de polietileno previamente rotuladas y llevadas al Laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, para su tratamiento.

### 2.4 Tratamiento de las Muestras

A las muestras se les midió el pH, se registraron datos de textura y color. Posteriormente se les realizó una coloración Gram y se sembraron en agar nutritivo, incubándose a 37°C por 24h.

### 2.5 Selección de cepas y aislamiento de microorganismos productores de amilasa:

Se aislaron en agar nutritivo 40 cepas morfológicamente diferentes, las que se sembraron en Agar Tripticasa Soya, luego a las colonias aisladas de Agar Tripticasa Soya se procedió a sembrar por puntura en agar almidón. Los cultivos se incubaron a 37°C por 24h.

Para evaluar la capacidad hidrolítica de las cepas sobre el almidón, se empleó una solución de yodo (Collins, 1995).



## **2.6 Identificación de los microorganismos:**

La identificación de bacterias del género *Bacillus* productoras de amilasas se realizaron tomando en cuenta las características culturales y morfológicas, además se realizó la diferenciación bioquímica respectiva de acuerdo a lo establecido en el manual de Berges of Determinative Bacteriology.

## **2.7 Evaluación de *Bacillus* productores de amilasa:**

La evaluación de las cepas de *Bacillus* productoras de amilasa, se realizó empleando agar almidón modificado a pH 7,1 sembrado el cultivo por puntura y luego las placas fueron incubadas a temperaturas 37°C, por un periodo de 48 horas.

Para determinar las cepas con mayor capacidad hidrolítica sobre el almidón, se empleo la solución de yodo de Gram, demostrándose la presencia de la enzima amilasa por una zona clara que define el diámetro de halo producido en el agar.

## **2.8 Obtención de biomasa de *Bacillus***

A partir del cultivo puro de *Bacillus* de las cepas aisladas fue sembrado en un cultivo liquido en 5 repeticiones con volúmenes de 20 mL de medio, cada uno fueron incubados a temperatura de 30°C . en agitación constante por 36 h Luego se procedió a centrifugar a 4,500 rpm durante 30 minutos a 4°C . Del sobrenadante obtenido constituye el preparado enzimático que fue guardado para su posterior tratamiento (Anexo 1)

### **2.9 Determinación de proteínas:**

Se realizo por el método de Lowry et.al. (1951). Utilizando caseína en una concentración de caseína 0,1% en NaOH 0.1 N como estándar para elaboración de la curva patrón.

### **2.10 Determinación de la actividad enzimática:**

En la determinación de la actividad amilásica, se utilizó como sustrato almidón bufferado a pH 7,1 0,02 M conteniendo cloruro de sodio en una concentración de 0,15M según el método Street Close modificado por Cueva y Villanueva (Villanueva et. al., 2001).

### **2.11 Determinación de la actividad enzimática:**

En la determinación de la actividad amilásica, se utilizo como sustrato almidón bufferado a pH 7,1 0,02 M conteniendo cloruro de sodio en una concentración de 0,15M según el método Street Close modificado por Cueva y Villanueva.

Una unidad Street Close, (USC) modificado se define como la cantidad de amilasa que hidroliza a 20 mg de almidón soluble en 15 minutos a 37° C y a pH 7,1

### **2.12 Determinación de la actividad específica (AE):**

Para la realizar el cálculo de la actividad específica se utilizo la siguiente ecuación:

$$AE = \frac{\text{USC /mL de preparado enzimático}}{\text{mg de proteínas de preparado enzimático}}$$

### **2.13 Cuantificación de la actividad enzimática específica:**

Para la determinación de la actividad enzimática se empleo el método de Street-Close modificado por Cueva y Villanueva y para la determinación de proteínas el método de Lowry (Villanueva et.al., 2001).

### III. RESULTADOS

Se obtuvieron los siguientes resultados en la producción de amilasas a partir de bacterias del género *Bacillus* aislados de suelos del distrito de Huancas:

- ❖ La tabla 01 muestra las características físicas, químicas y de cultivo de once muestras de suelo del Distrito de Huancas.
- ❖ En la tabla 02 se presentan las características morfológicas y tintoriales de cuarenta colonias aisladas en agar nutritivo según coloración Gram.
- ❖ En la tabla 03 se demuestra la hidrólisis del almidón en agar almidón producida por cepas de *Bacillus sp.* aisladas en agar tripticasa soya.
- ❖ La tabla 04 muestra las características bioquímicas de ocho cepas de *Bacillus sp.* productores de hidrólisis del almidón.
- ❖ En la tabla 05 se observa la concentración de proteínas totales, actividad enzimática y actividad específica de *Bacillus sp.*

**TABLA N° 01. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS Y DE CULTIVO DE ONCE MUESTRAS DE SUELO DEL DISTRITO DE HUANCAS**

<b>N° Muestra</b>	<b>Profundidad (m)</b>	<b>pH</b>	<b>Color</b>	<b>Agar nutritivo</b>	<b>Colonias aisladas</b>
1	0,30	7,48	Negro marrón	Crecimiento	1,2,3,4,5,6,21,22,23
2	1,00	7,70	Crema marrón	Crecimiento	7,8,24,25,26,27
3	1,00	5,83	Marrón rojizo	No crecimiento	-
4	0,80	6,63	Marrón grisáceo	Crecimiento	28
5	2,00	4,52	Rojo ladrillo	No crecimiento	-
6	0,30	6,78	Negro oscuro	Crecimiento	9,10,29,30,31
7	0,20	6,43	Negro	Crecimiento	32
8	0,70	6,48	Crema	No crecimiento	-
9	0,30	6,36	Marrón oscuro	Crecimiento	11,12,33,34
10	0,30	6,97	Marrón claro	Crecimiento	13,14,15,16,35,36,37
11	0,30	6,38	Marrón	Cocimiento	17,18,19,20,38,39,40

**TABLA N° 02 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y TINTORIALES DE CUARENTA COLONIAS AISLADAS EN AGAR NUTRITIVO SEGÚN COLORACIÓN GRAM**

<b>Colonias aisladas</b>	<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y TINTORIALES</b>
1	Bacilos largos. Gram positivos
2	Bacilos largos. Gram positivos
3	Bacilos cortos y gruesos. Gram positivos
4	Bacilos largos. Bacilos cortos. Gram positivos.
5	Bacilos largos. Gram positivos
6	Bacilos largos. Bacilos cortos. Gram positivos.
<b>7</b>	<b>Cocos. Diplococos. Gram negativos.</b>
8	Bacilos largos. Gram positivos
9	Bacilos largos. Gram positivos
10	Bacilos cortos y gruesos. Gram positivos
11	Bacilos cortos y delgados. Gram positivos
<b>12</b>	<b>Cocos. Gram positivos</b>
13	Bacilos cortos y gruesos. Bacilos largos. Gram positivos
14	Bacilos cortos y gruesos. Gram positivos
<b>15</b>	<b>Cocos. Gram positivos</b>
16	Bacilos cortos. Bacilos largos. Cocos. Gram positivos
17	Bacilos cortos. Gram positivos
<b>18</b>	<b>Cocos. Gram positivos</b>
19	Bacilos cortos. Bacilos largos. Gram positivos
20	Bacilos medianos. Gram positivos
21	Bacilos cortos. Bacilos largos. Gram positivos
22	Bacilos largos. Gram positivos
23	Bacilos largos. Gram positivos
<b>24</b>	<b>Cocos. Gram positivos y Gram negativos</b>
25	Bacilos cortos. Gram positivos y Gram negativos
26	Bacilos largos. Gram positivos
27	Bacilos cortos. Gram positivos
<b>28</b>	<b>Estafilococos. Gram positivos</b>
<b>29</b>	<b>Cocos. Bacilos largos. Gram positivos</b>
30	Bacilos cortos. Gram positivos
31	Bacilos cortos. Bacilos largos Gram positivos
32	Bacilos cortos y gruesos. Bacilos largos y delgados. Gram positivos
33	Bacilos cortos. Gram positivos y Gram negativos
34	Bacilos largos. Gram positivos
35	Bacilos cortos. Gram positivos
36	Bacilos cortos. Bacilos largos. Gram positivos
37	Bacilos cortos y delgados muy pequeños. Gram positivos.
38	Bacilos cortos. Bacilos largos. Gram positivos
39	Bacilos cortos. Gram positivos
40	Bacilos cortos. Gram positivos

**TABLA N° 03. HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN EN AGAR ALMIDÓN PRODUCIDAS POR CEPAS DE *Bacillus sp.* AISLADAS EN AGAR TRIPTICASA SOYA.**

CEPA	HALO TOTAL DE HIDRÓLISIS (mm)	DIAMETRO DE LA COLONIA (mm)	HALO NETO DE HIDRÓLISIS (mm)
1	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
2	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
3	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
<b>4</b>	<b>16</b>	<b>7</b>	<b>11</b>
5	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
6	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
7	-	-	-
8	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
9	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
10	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
11	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
12	-	-	-
<b>13</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>1</b>
<b>14</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>3</b>
15	-	-	-
16	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
17	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
18	-	-	-
19	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
20	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
21	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
22	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
23	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
24	-	-	-
<b>25</b>	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
26	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
27	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
28	-	-	-
29	-	-	-
<b>30</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>1</b>
<b>31</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>3</b>
<b>32</b>	<b>20</b>	<b>7</b>	<b>13</b>
<b>33</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>1</b>
34	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
35	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
36	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
37	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
<b>38</b>	<b>19</b>	<b>15</b>	<b>4</b>
39	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis
40	No hidrólisis	No hidrólisis	No hidrólisis

**TABLA N° 04 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE OCHO CEPAS DE *Bacillus sp.*  
PRODUCTORES DE HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN**

<b>CEPA</b>	<b>AGAR CITRATO</b>	<b>AGAR GELATINA</b>	<b>AGAR MOVILIDAD</b>
<b>FJ4UNAT</b>	+	+	+
<b>FJ13UNAT</b>	+	+	+
<b>FJ14UNAT</b>	+	+	+
<b>FJ30UNAT</b>	+	+	+
<b>FJ31UNAT</b>	+	+	+
<b>FJ32UNAT</b>	+	+	+
<b>FJ33UNAT</b>	+	+	+
<b>FJ38UNAT</b>	+	+	+



**TABLA N° 05. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA  
Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE *Bacillus sp.***

<b>Muestra</b>	<b>Proteínas (mg/mL)</b>	<b>Actividad enzimática USC/mL</b>	<b>Actividad específica USC/mg de prot</b>
<b>FJ04UNAT</b>	0,610	0,0115	0,0188
<b>FJ13UNAT</b>	0,813	0,0069	0,0084
<b>FJ14UNAT</b>	0,766	0,0059	0,0077
<b>FJ30UNAT</b>	0,648	0,0072	0,0111
<b>FJ31UNAT</b>	0,781	0,0074	0,0092
<b>FJ32UNAT</b>	0,600	0,0097	0,0161
<b>FJ33UNAT</b>	0,812	0,0070	0,0086
<b>FJ38UNAT</b>	0,852	0,0066	0,0077
<b>X</b>	0,732	0,008	0,011
<b>S</b>	0,102	0,002	0,004
<b>C.V. %</b>	14,010	22,313	37,614

**Leyenda :**

X : Promedio

S : Desviación estandar

C.V. : Coeficiente de variación

USC: Unidades Street Close

#### IV. DISCUSIÓN

Una de las fuentes más empleadas para aislar bacterias productoras de amilasas es el suelo, puesto que allí la población microbiana es grande, diversa y compleja, pudiéndose aislar mediante técnicas de screening (Villanueva, 2000).

De las once muestras de suelo investigadas, del Distrito de Huancas, se aislaron cuarenta cepas de microorganismos (Tabla N° 01), de los cuales treinta y tres fueron bacilos (Tabla N° 02) y de ellos se identificaron ocho cepas con capacidad de hidrólisis sobre el almidón (Tabla N° 03), las cuales fueron sometidas a pruebas bioquímicas para identificar a las del género *Bacillus* (Tabla N° 04).

Los cultivos que fueron seleccionados en medios sólidos mediante selección primaria, pasaron a una segunda etapa de selección en medio líquido, caldo almidón, para su determinación enzimática. Este último medio de cultivo tuvo una composición semejante al medio en el que fue seleccionado el microorganismo.

Para estudiar una enzima es necesario disponer de un método para determinar su actividad catalítica. Los métodos están diseñados para medir la velocidad de formación de producto o la velocidad de desaparición de sustrato. A menudo se mide la cantidad de producto formado en un periodo de tiempo mediante un tiempo determinado. (Bradley et.al., 1982).

La forma en que se determina o la cantidad de producto formado depende de sus propiedades químicas y físicas. Si el producto es coloreado o puede sufrir una reacción para producir el color, entonces puede medirse la absorbancia de la luz a una longitud

de onda adecuada (método colorimétrico) la cual se relaciona con la concentración de producto presente en el momento de tomar la muestra (Bradley et. al., 1982).

En la Tabla N° 05 se observa que la cepa FJ4UNAT presenta mayor actividad específica con 0,0188 USC/mg de proteína y las que mostraron menor actividad específica fueron las cepas FJ14UNAT y la FJ38UNAT registrándose 0,0077 USC/mg de proteína.

La selección de cultivos productores de enzima en preparados enzimáticos libres de células, generalmente se evalúa sólo la actividad enzimática; sin embargo es necesario evaluar simultáneamente la actividad específica, que involucra una determinación de proteínas totales presentes en el preparado enzimático (Villanueva, 2000).

La actividad específica esta en función a la cuantificación de proteínas y la actividad enzimática, puesto que a mayor concentración de proteínas menor actividad específica, por lo tanto las cepas que tienen mayor actividad enzimática no siempre tendrán mayor actividad específica, estos valores pueden fluctuar también en relación a factores externos como pH, temperatura y concentración de sustrato.

En la tabla antes mencionada se presenta también el promedio de la concentración de proteínas, la actividad enzimática y la actividad específica, las que fueron 0,732 mg/mL, 0,008 USC/mL y 0,011 USC/mg de proteína., respectivamente.

La concentración de proteínas obtenidas en esta investigación es mayor que las obtenidas por Vargas (2004), quien obtuvo una concentración de 0,092 mg/mL en la selección y evaluación de bacterias del género *Bacillus* productoras de amilasa en cultivo sumergido, probablemente por que en este estudio se empleo cultivos de *Bacillus* parcialmente purificados.

También observamos en la tabla N° 05 que el coeficiente de variación para las proteínas es menor que 20 esto nos indica que las muestras obtenidas son homogéneas, con respecto al coeficiente de variación de la actividad enzimática podemos indicar que también se puede considerar con muestras homogéneas por que el valor es cercano a 20, sin embargo en la actividad específica se demuestra que el coeficiente de variación es mayor registrándose 37,61.

## V. CONCLUSIONES

- ❖ De cuarenta cepas bacterianas aisladas del distrito de Huancas se aislaron ocho cepas del género *Bacillus* con capacidad de hidrólisis sobre el almidón.
- ❖ La cepa del género *Bacillus* FJ4UNAT presenta el mayor número de unidades Street-Close en miligramos por mililitro de preparado enzimático, siendo este 0.0115 USC/mL.
- ❖ La cepa del género *Bacillus* FJ4UNAT es la que tiene mayor actividad específica, registrando 0.0188 USC/mg de proteína.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

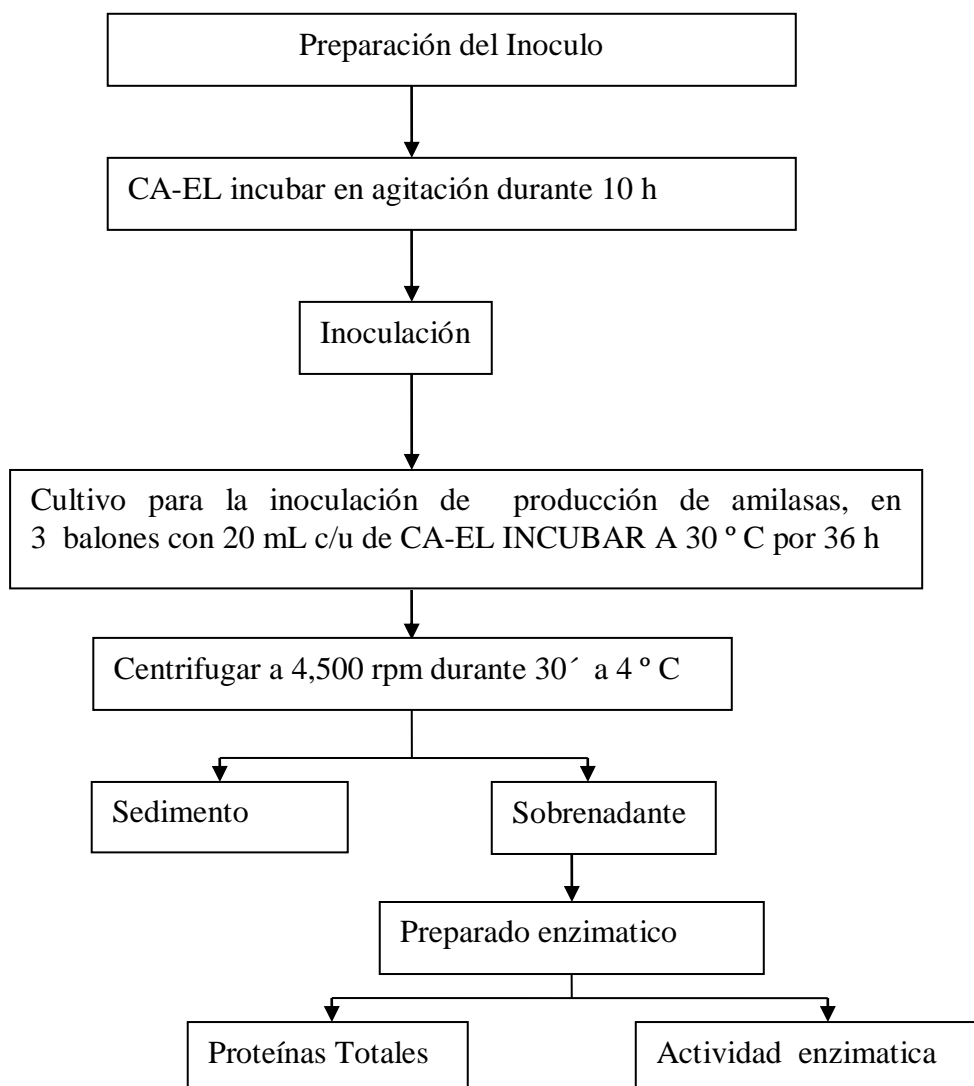
- BALATTI, A. 1994. Producción de enzimas. Primer Simposium Interamericano sobre biotecnología de enzimas, México.
- BRADLEY F. Y T. PETER. 1982. Bioquímica. Editorial REVERTÉ S.A. Barcelona, España.
- COLLINS, C. 1995. Métodos Microbiológicos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- CALZADA, B. 1991. Métodos estadísticos para la investigación. Editorial Jurídica S.A. Lima, Perú.
- CRUEGER, W. 1995. Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- DORAN, P. 1998. Principios de ingeniería de los procesos. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España.
- HEWITT, C.; J. SOLOMONS, 1996. The production of amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*, in complex totally defined synthetic culture médium. J. Ind. Microbiol. 17:96-99. Canadá
- LEHNINGER, A. 1985. Bioquímica. Segunda edición, ediciones OMEGA S.A. Barcelona, España.
- LOWRY, O.; G. ROSEBRALL; A. FARR Y R. RANDALL. 1951. Proteins measurement with the folin phenol reagent. Journal Biology Chemistry 193:265-275.
- PASTOR, M. 2001. Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal médium at different aeration rate. J. Microbiology 32 Jan/Marz. Sao Paulo, Brasil.

- SCRAGG, A. 2000. Biotecnología para ingenieros, sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Editorial Limusa S. A. Balderas, México.
- VARGAS, S. 2004. Selección y evaluación de bacterias del genero *Bacillus* productoras de amilasa en cultivo sumergido. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- VILLANUEVA, E. 2000. Caracterización de la amilasa de *Bacillus licheniformis* MIT-07 y su acción sobre almidones de *Inga feullei*, *Solanum tuberosum* e *Ipomoea batatas*. Trabajo de Habilitación para Promoción Docente. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- VILLANUEVA E. Y F. CUEVA. 2001. II Congreso Peruano de Biotecnología y Bioingeniería. Chiclayo. Perú.
- WALKER, G. 1990. Hidrólisis of starch by microbial amylase. *Biochemical Journal* 76: 260. Canadá.

## **ANEXOS**



## OBTENCION DE BIOMASA





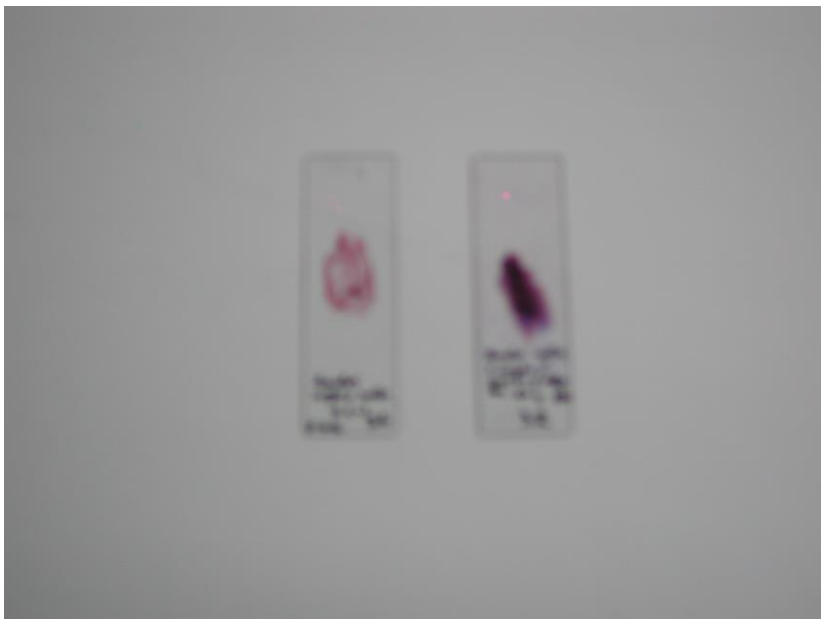
**Figura 1:** Cultivo de las muestras a 37°C en agar nutritivo.



**Figura 2:** Selección de bacterias del género *Bacillus* en agar tripticasa Soya.



**Figura 3:** Aislamiento de cepas del género *Bacillus* en agar triticasa soya.



**Figura 4:** Coloración Gram para identificar bacilos gram negativos



**Figura 5:** Aislamiento de cepas del género *Bacillus* en agar almidón.



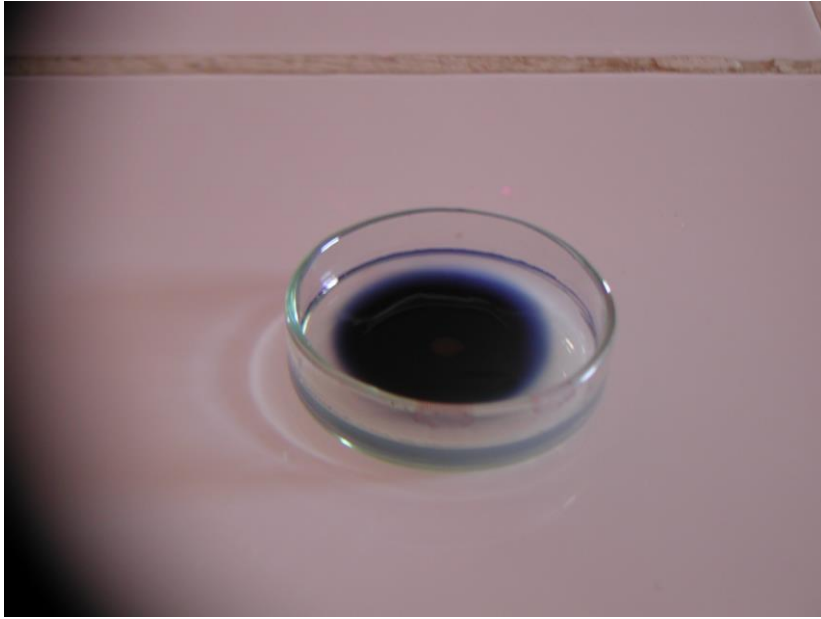
**Figura 6:** Identificación bioquímica de cepas del género *Bacillus*.



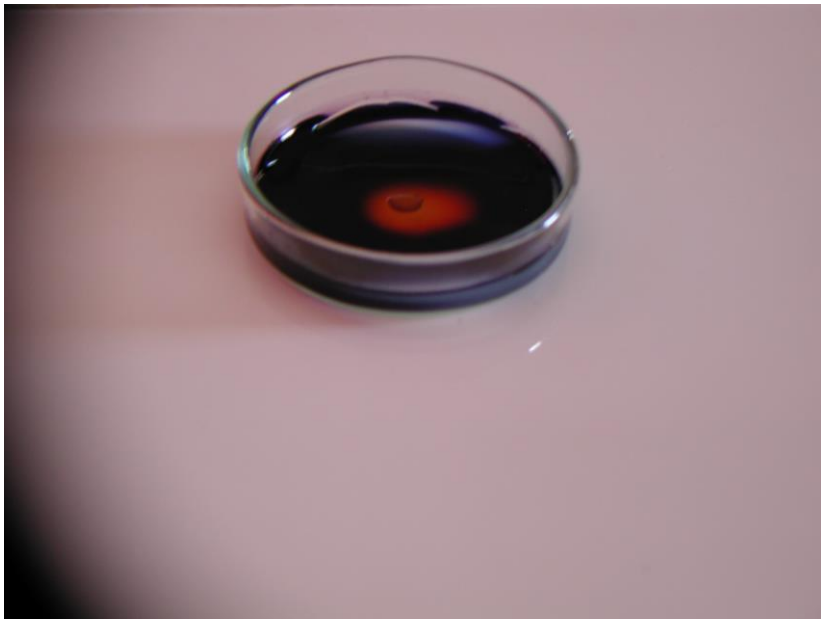
**Figura 7:** Siembra por puntura de una cepa del género *Bacillus* en agar almidón.



**Figura 8:** Evaluación de *Bacillus* productores de amilasa



**Figura 9:** Cepa de *Bacillus* no productor de amilasas en agar almidón



**Figura 10:** Cepa de *Bacillus* productor de amilasas en agar almidón



**Figura 11.** Incubación para la realización de la Actividad enzimática