

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



OBTENCION DE AMILASA POR CINETICA DE CRECIMIENTO CON EL  
MICROORGANISMO *Bacillus subtilis* ATCC 6633 UTILIZANDO COMO  
MEDIO DE CULTIVO CASCARA DE PAPA.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR  
JONATHAN EMANUEL PORTILLO CUELLAR  
AIDA LORENA RAMIREZ MARTINEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

MAYO DE 2009

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTINEZ DE DIAZ

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. Maria Concepcion Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

MSc. Sonia Maricela Lemus Martinez

ASESORA DE AREA DE MICROBIOLOGIA

MSc. Coralia de los Angeles Gonzalez de Diaz

DOCENTE DIRECTORA

MSc. Maria Del Carmen Guillen De Medrano

## AGRADECIMIENTOS

- Dedicamos nuestro triunfo académico, en primer lugar: A Dios Todopoderoso, por su inspiración y constante orientación.
- A nuestros padres, hermanos y demás familiares, por su constante apoyo y confianza.
- A nuestro docente director Ing. María del Carmen Guillén de Medrano por su valiosa ayuda en la laboriosa tarea de estructuración y revisión del trabajo, así como a su disponibilidad en todo momento para orientarnos.
- A nuestros asesores: MSc. Sonia Maricela Lemus Martínez y MSc. Coralía Gonzales De Díaz, por su valioso apoyo y colaboración.
- A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la elaboración de esta investigación. Nuestros más sinceros agradecimientos.

Jonathan y Aida

## DEDICATORIA

- **A DIOS TODO PODEROSO**  
A Dios que me ha dado la vida y fortaleza para terminar este trabajo de investigación, por ser siempre fuente de inspiración en mi carrera profesional.
- **A MIS PADRES**  
Saúl Eugenio Portillo Castro y María Concepción Cuellar de Portillo gracias por su incondicional amor y apoyo durante toda mi vida a lo largo de mi trayectoria estudiantil y por ser fuerza decisiva para terminar mi carrera.
- **A MI HERMANA**  
Dayana Elizabeth Portillo Cuellar por sus consejos y por ser siempre un ejemplo a seguir como hermana mayor.
- **A MI DOCENTE DIRECTORA**  
Ing. María del Carmen Guillén de Medrano por brindarme su tiempo y sus conocimientos muy valiosos para que lograra terminar este trabajo de graduación con éxito.
- **A MI COMPAÑERA DE TESIS**  
Aida Lorena Ramírez Martínez por compartir el mismo objetivo y su amistad de muchos años.
- **AL PERSONAL DE EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**  
Por su paciencia y apoyo incondicional en el desarrollo de esta Investigación.
- **A MIS AMIGOS**  
Daniel, Javier, Mauricio, Hanery, Jimmy, Francisco, Verónica, Marcela, Imelda, Carla, Sandra, Jaquelin, Mercedes, Irma, Sofía, Elba, Marielos y Lidisze por su apoyo y amistad de muchos años y a todas las personas que en toda mi carrera he conocido y formaron parte de mi vida en algún momento gracias.

Jonathan Emanuel Portillo Cuéllar

## DEDICATORIA

- **AL CREADOR**  
Le dedico con mucho amor, por haberme permitido concluir mi carrera y ser hoy una profesional y no desampararme de su misericordia infinita.
- **A MIS PADRES**  
Rafael y Flor que me dieron la vida y han estado en todo momento a mí lado, gracias por darme una carrera y así regalarme un futuro prometedor, los amo.
- **A MIS HERMANOS**  
Edgardo, por se como padre para mí, por tu confianza infinita te quiero y Silvi gracias por tu apoyo.
- **A MI COMPAÑERO DE TESIS**  
Jonathan Emanuel Portillo Cuellar por formar este equipo y concluir este trabajo gracias, que Dios te bendiga.
- **A MI DOCENTE DIRECTORA**  
Ing. María del Carmen Guillén de Medrano por todo el apoyo incondicional y su fina entrega.
- **A TODOS MIS EX COMPAÑEROS**  
Con los que compartí momentos inolvidables.
- **A TODOS MIS AMIGOS**  
Los llevo en mi corazón, a las personas que quiero y están en la presencia de Dios, a todos gracias.

Aida Lorena Ramírez Martínez

## INDICE

CONTENIDO	PAGINA
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCION	xxiii
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo General	26
2.2 Objetivo Específico	26
CAPITULO III	
2.0 MARCO TEÓRICO	28
3.1 Aplicaciones Industriales	28
3.1.2 Alimentos	29
3.1.3 Detergentes	29
3.1.4 Tratamiento de Desechos	30
3.1.5 Enzimas para Diagnóstico	30
3.1.6 Enzimoimmunoanálisis	30
3.1.7 Enzimas Terapéuticas	31
3.1.8 Industria Farmacéutica	31



3.5.3 Formación de productos	44
3.5.3.1 Velocidad volumétrica de formación de productos	44
3.5.3.2 Velocidad específica de formación de productos	44
3.5.4 Rendimientos en el cultivo	45
3.5.4.1 Rendimientos de biomasa	45
3.5.4.2 Rendimiento de producto	45
3.6 El <i>Bacillus subtilis</i>	46
3.7 La Papa o Patata	47
3.8 El Almidón como Sustrato	48
CAPITULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLÓGICO	52
4.1 Tipo de Estudio	52
4.2 Recopilación Bibliográfica	52
4.3 Investigación de Campo	52
4.4 Parte Experimental	53
4.4.1 Obtención del Sustrato	
4.4.2 Preparación del Inoculó	53
4.4.3 Preparación del Biorreactor	54
4.4.4 Preparación del Medio de Cultivo	54

4.4.5 Producción	55
4.4.6 Tratamiento de Muestras	56
4.4.6.1 Determinación de biomasa por el Método Turbidimétrico	56
4.4.6.2 Determinación de azúcares por el Método de Fenol-Sulfúrico	56
4.4.6.3 Elaboración de la curva estándar de sacarosa	57
4.4.6.4 Determinación de pH	58
4.4.6.5 Cuantificación de almidón presente en el filtrado obtenido cáscara de papa	58
4.4.6.6 Ensayo para determinar la actividad de la amilasa	59
CAPITULO V	
5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	63
5.1 Resultados Obtenidos del Proceso de Producción de $\alpha$ -amilasa	64
5.2 Velocidad Volumétrica de Biomasa por Turbidimetría	64
5.3 Velocidad Específica de Biomasa por Turbidimetría	68
5.4 Calculo del Tiempo de Duplicación	70
5.5 Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato	71
5.6 Velocidad Específica de Consumo de Sustrato	73
5.7 Velocidad Volumétrica de Producción de $\alpha$ -amilasa	76
5.8 Velocidad Específica de Producción de $\alpha$ -amilasa	79

5.9 Rendimientos de biomasa	81
5.10 Rendimientos de producto	84
5.11 Velocidad Volumétrica de Formación de Azucares	87
5.12 Velocidad Especifica de Formacion de Azucares	90
5.13 Resultados del análisis de pH en muestras durante el proceso de producción de $\alpha$ -amilasa	92
CAPITULO VI	
6.0 CONCLUSIONES	95
CAPITULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	98
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	

## INDICE DE TABLAS

TABLA N°	PAGINA
1: Aplicación de Regresión Lineal a la curva Estándar de Patrones Mcfarland	64
2: Resultados del Análisis de Muestras por el Método Turbidimétrico durante el Proceso de Producción de $\alpha$ - Amilasa	66
3: Aplicación de regresión polinomial a los resultados del Análisis de Muestras por el Método Turbidimétrico durante el Proceso de Producción de $\alpha$ - Amilasa	68
4: Velocidad Específica de Crecimiento	69
5: Aplicación de la Regresión Lineal a la Curva de Estándar de Almidón	71
6: Resultados del Análisis de Muestra para la Cuantificación de Almidón en las muestras	72
7: Regresión Polinomial a los resultados del Análisis de Muestras para cuantificar el Almidón durante el proceso de producción de la $\alpha$ -Amilasa	73
8: Velocidad Específica de Consumo de sustrato	74
9: Almidón hidrolizado por la $\alpha$ -amilasa (Actividad amilolítica)	77
10: Aplicación de regresión polinomial a los resultados del Almidón Hidrolizado durante el Proceso de Producción por la $\alpha$ -Amilasa	78
11: Porcentaje de la Actividad de la $\alpha$ -Amilasa	78
12: Velocidad especifica de formación de producto	79

13: Rendimiento de biomasa sobre el almidón (X/S)	82
14: Rendimiento específico de biomasa sobre el almidón	82
15: Rendimiento de producto sobre sustrato (Yp/s)	85
16: Rendimiento específico de producto sobre sustrato	85
17: Aplicación de la regresión lineal a los resultados del análisis de fenol-sulfúrico	87
18: Concentración de azúcares obtenidos durante la producción de $\alpha$ -amilasa	
19: Aplicación de regresión polinomial a los resultados del análisis de muestras por el método fenol sulfúrico, para la cuantificación de azúcares totales durante el proceso de producción de la $\alpha$ -amilasa	90
20: Velocidad específica de formación de azúcares	90
21: Aplicación de la regresión lineal a los Resultados del Análisis de pH en Muestras durante el Proceso de Producción de $\alpha$ -Amilasa	93
22: Resultados de la curva estándar de patrones Mcfarland	103
23: Resultado del análisis de muestras por el método turbidimétrico durante el proceso de producción de proteína unicelular	103
24: Aplicación de regresión lineal a la curva estándar de patrones Mcfarland	104
25: Curva estándar de almidón	105
26: Resultados del análisis de muestras, para la cuantificación de almidón durante el proceso de producción de $\alpha$ - amilasa	105

27: Resultado de la curva patrón de azúcares por el método de fenol-sulfúrico	106
28: Resultados del promedio del análisis de azúcares totales a las muestras durante el proceso de producción de $\alpha$ -amilasa	106
29: Resultado del promedio de actividad enzimática de la $\alpha$ -amilasa	107
30: Resultados del promedio del análisis de pH en muestras Durante el proceso de producción de $\alpha$ -amilasa	108
31: Determinación de amilasa en las muestras	111

## INDICE DE ANEXOS

### ANEXO N°

- 1: Frotis de cepa *Bacillus subtilis*
- 2: Promedio de la Evaluación del Crecimiento Microbiano en el Proceso de producción de  $\alpha$ -Amilasa
- 3: Determinación de Almidón En Las Muestras
- 4: Datos Obtenidos en el Análisis de Azúcares Totales
- 5: Datos Obtenidos en la Determinación de la Actividad de la Amilasa
- 6: Datos Obtenidos en la Toma de pH
- 7: Diagrama para la Determinación de Azúcares por el Método del Fenol-Sulfúrico
- 8: Preparación del Sustrato a Partir del Almidón de las Cascaras de Papa
- 9: Diagrama Para La Determinación De Amilasas
- 10: Preparación del Inoculo
- 11: Figura del Wrist-Action Shaker modelo BT
- 12: pH-metro usado en la cinética de producción de  $\alpha$ -amilasa
- 13: Calibración del pH-metro

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	PAGINA
1: Espectrofotómetros/colorímetros	37
2: Curva de Crecimiento en un cultivo por lotes	40
3: Tubérculo de papa entero y en corte transversal	47
4: Fragmento de amilopectina de una molécula de almidón con sus enlaces $\alpha$ -1,4 y $\beta$ -1,6	50
5: Curva Estándar de Patrones Mcfarland	65
6: Curva de Turbidimetría (Muestras) Concentración vrs. Tiempo	67
7: Velocidad Especifica de Crecimiento Concentración vrs. Tiempo	69
8: Curva Estándar de Almidón	71
9: Consumo de sustrato (Almidón) Concentración vrs. Tiempo	72
10: Velocidad Específica de Consumo de sustrato Concentración de sustrato vrs Tiempo	75
11: Curva de Formación de Producto (Actividad de $\alpha$ -Amilasa) mg de Almidón Hidrolizado por la $\alpha$ -amilasa vrs. Tiempo	77
12: Calculo de la Velocidad Específica de Formación de Producto mg de Almidón Hidrolizado vrs. Tiempo	80
13: Curva de Rendimiento de Biomasa sobre Sustrato Biomasa vrs Consumo de Sustrato	81
14: Rendimiento Especifico de Biomasa sobre Sustrato (X/S) Porcentaje de $\alpha$ -Amilasa vrs. Concentración de sustrato (mg/mL)	83

15: Curva de Rendimiento de Producto sobre Sustrato Concentración de Sustrato vrs. mg almidón hidrolizado por la $\alpha$ -Amilasa (actividad)	84
16: Rendimiento específico de Producto sobre sustrato (Yp/s) Concentración de Sustrato vrs. mg almidón hidrolizado (actividad)	86
17: Curva Fenol-Sulfúrico Concentración vrs. Absorbancia	88
18: Curva de azúcares Concentración de azúcares vrs tiempo	89
19: Producción de Azúcares, Concentración de Azúcares vrs Tiempo	91
20: Curva de pH vrs. Tiempo	92
21: Fotografía de cepa <b><i>Bacillus subtilis</i></b> vista al microscopio con un aumento de 100X	102
22: Shaker usado en la cinética de producción de $\alpha$ -amilasa	113
23: pH-metro usado en la cinética de producción de $\alpha$ -amilasa	114

## INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	PAGINA
1: Producción de Glucosa y Jarabes Ricos en Fructosa a Partir del Almidón	28
2: Taxonomía del <i>Bacillus subtilis</i>	46
3: Composición de la Papa	48
4: Estándares de Sacarosa	58
5: Determinación de la Actividad de la $\alpha$ -Amilasa	60

## ABREVIATURAS

Abs: Absorbancia

ATCC: American Type Culture Collection

g: Gramos

H: Horas

Kcal: Kilocalorías

kg: Kilogramos

L: Litros

lb: Libras

mg: Miligramos

mL: Mililitros

nm: Nanómetros

°C: Grados Centígrados

p: Producto

qp: Velocidad específica de formación de productos

Qp: Velocidad volumétrica de formación de productos

qs: Velocidad específica de consumo de sustrato

Qs: Velocidad volumétrica de consumo de sustrato

rpm: Revoluciones por Minuto

s: Sustrato

t: Tiempo

Tm: Medida de masa en el Sistema Internacional de Unidades, equivale a 1000kg

TSA: Tripticasa Soya Agar

UFC: Unidades formadoras de colonias

X: Biomasa

$\mu$ : Velocidad específica de crecimiento

## RESUMEN

En el presente estudio de investigación se da a conocer la cinética de crecimiento del *Bacillus subtilis* ATCC 6633 como microorganismo productor de  $\alpha$ -amilasa utilizando como medio de cultivo *Solanum tuberosum* (cáscaras de papa), el cuál es un producto orgánico de desecho que es fácil de obtener y de bajo costo.

El experimento se realizó por triplicado a las mismas condiciones de temperatura y pH.

A cada muestra se le determinó el pH, biomasa por el método turbidimétrico, azúcares totales por el método del fenol-sulfúrico y la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa por el método del lugol.

Al realizar la cinética de crecimiento del *Bacillus subtilis* ATCC 6633, se determino el rendimiento máximo de la  $\alpha$ -amilasa el cual se lleva a cabo en un tiempo de 48 horas después de haber iniciado el proceso de fermentación, hidrolizando así 1.0531 mg/mL de almidón proveniente de cascaras de papa.

Recomendamos realizar más estudios cinéticos con diferentes microorganismos para la producción de enzimas y otras sustancias utilizando como sustratos desechos orgánicos de fácil obtención aumentando así ingresos económicos al país.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCIÓN**

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Microbiología industrial o biotecnología microbiana es la rama de la microbiología orientada a la producción de elementos de interés industrial mediante procesos en los cuales intervenga, en algún paso, un microorganismo, ésta es tan antigua como la manipulación de alimentos fermentados tales como el vino, yogurt y pan. No obstante, durante el siglo XX su aplicación se diversificó con el ánimo de generar un gran número de compuestos químicos complejos de forma más sencilla y barata, los cuales son más difíciles o costosos de obtener con una síntesis orgánica; éste hecho se debe a la enorme versatilidad metabólica de los microorganismos de producir fácilmente los compuestos deseados, así como los precursores de dichos compuestos.

Esta investigación da a conocer el comportamiento cinético de crecimiento microbiano para la producción de  $\alpha$ -amilasa utilizando como sustrato el almidón presente en cáscaras de papa, el cuál es un desecho orgánico poco utilizado. Actualmente en el país la cáscara de papa no ésta recibiendo el uso apropiado, perdiéndose así un recurso de gran utilidad, fácil obtención y bajo costo.

La cinética de crecimiento realizada al microorganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633, dio resultados favorables para la producción de  $\alpha$ -amilasa, por lo tanto este trabajo puede servir como guía para posteriores estudios ya sean en el laboratorio o en la industria.

Durante todo el proceso de cinética de crecimiento microbiano se retiró una muestra por día, la cuál se colocó en refrigeración para posteriores análisis de producción de biomasa, pH, actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa, consumo de almidón y producción de azúcares totales.

Para el análisis de los resultados obtenidos durante la cinética de producción de  $\alpha$ -amilasa, se usó el programa Equation Grapher Versión 3.2, el cual nos proporcionó los datos necesarios para calcular y predecir el comportamiento cinético del ***Bacillus subtilis*** ATCC 6633, en el medio de cultivo de cáscaras de papa, determinando así el tiempo óptimo de producción de la enzima y así poder demostrar que la cáscara de papa es un sustrato útil para la formación de la enzima  $\alpha$ -amilasa.

## **CAPITULO II**

### **OBJETIVOS**

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Obtener amilasa por cinética de crecimiento con el microorganismo ***Bacillus subtilis*** ATCC 6633 utilizando como medio de cultivo cáscara de papa.

### 2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Elaborar una curva de producción de amilasa a partir de la cinética de crecimiento del ***Bacillus subtilis*** ATCC 6633.

2.2.2 Cuantificar a través de técnicas apropiadas la amilasa bacteriana obtenida al final de la cinética de crecimiento.

2.2.3 Evaluar la velocidad de transformación del almidón en dextrinas que se encuentran en el medio de cultivo.

2.2.4 Demostrar el aprovechamiento de la cáscara de papa como sustrato en la formación de  $\alpha$  – amilasa.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEÓRICO**

### 3.0 MARCO TEÓRICO

#### 3.1 APLICACIONES INDUSTRIALES DE ENZIMAS <sup>(1)</sup>

Los especialistas conocen desde hace mucho tiempo que las enzimas son utilizadas en procesos industriales. La lista siguiente contiene algunas de las de las principales aplicaciones actuales del uso de enzimas empleadas solas o en combinación.

Cuadro N° 1: PRODUCCIÓN DE GLUCOSA Y JARABES RICOS EN FRUCTOSA A PARTIR DEL ALMIDÓN<sup>(10)</sup>

	<i>Pasta de almidón (30-40% de sólido)</i>				
			⇓	⇐	<i>α-amilasa bacteriana</i>
	<i>Almidón hinchado y gelatinizado</i>				
⇒	⇒	⇒	⇓	⇐	<i>amiloglucosa</i>
⇑			<i>Jarabe sacarificado con ED 96</i>		
			⇓	⇐	<i>Filtración/ clarificación/ desionización</i>
⇑			<i>Jarabe de glucosa 40-50% en peso</i>	⇒evaporización⇒	<i>Jarabe de glucosa</i>
	<i>MgSO<sub>4</sub></i> ⇒		⇓ ⇓ ⇓		⇓
⇑	<i>Glucosa isomerasa</i> ⇒				
					<i>Cristalización</i>
⇑			<i>Jarabe rico en fructosa</i>		⇓
⇑	<i>Desionización evaporización</i> ⇒		⇓		<i>Dextrosa monohidratada producto</i>
<i>Corriente enriquecida en glucosa</i>			<i>Jarabe rico en fructosa: fructosa 42%, sólidos 72%</i>	⇒	⇒
⇑	⇐	⇐	⇓	⇐	<i>Separación cromatográfica</i>
			<i>Jarabe de fructosa 90-95%</i>		

Cuadro N° 1 Continuación

		↓↓↓		
		↓↓↓		
			<i>Mezclado</i>	
		↓    ⇒	⇒⇐	⇐
		↓	<i>Fructosa 55%</i>	
		<i>Jarabe de fructosa 90-95%</i>		<i>Fructosa 42%</i>

### 3.1.2 ALIMENTOS<sup>(1)</sup>

Por lo general, las enzimas se usan en la industria alimenticia como auxiliares de procesos. Se usan de esta forma en diversos sistemas que incluyen horneado, elaboración de cerveza, productos lácteos, saborizantes. De todos ellos, posiblemente el uso más importante de las enzimas es en la hidrólisis de carbohidratos y proteínas.

### 3.1.3 DETERGENTES<sup>(1)</sup>

Las enzimas utilizadas en los detergentes provienen de ***Bacillus subtilis***. Una característica importante de las enzimas usadas en detergentes, es su capacidad para mantenerse activa a temperaturas elevadas hasta de 60°C y en intervalos de pH de 6 a 9.5. Una dificultad particular en la formación de detergentes biológicos tiene que ver con la necesidad de un sistema de enzimas proteolíticas que pueda resistir condiciones extremas de alcalinidad causadas por la naturaleza propia de los detergentes.

#### 3.1.4 TRATAMIENTO DE DESECHOS <sup>(1)</sup>

Ésta es un área con gran potencial pero con relativamente poca aplicación hasta ahora. Aquí son de mayor importancia los desechos proteínicos y a base de carbohidratos, los cuales serán objetivos de degradación claves en el futuro.

#### 3.1.5 ENZIMAS PARA DIAGNÓSTICO<sup>(4)</sup>

Las enzimas en la práctica del laboratorio clínico tienen dos papeles distintos: puede medirse en los líquidos corporales como indicadores de la enfermedad o puede usarse como reactivo químico para la determinación de moléculas específicas en materiales tales como sangre, plasma, suero y orina, nuevamente para ayudar al diagnóstico de la enfermedad. En unos pocos casos, las enzimas se administran como agentes terapéuticos.

Las enzimas como reactivas de diagnósticos ofrecen las ventajas sobre los procedimientos químicos de una mayor velocidad y especificidad. Entre sus limitaciones se cuentan la estabilidad y la necesidad de un almacenamiento y manipulación adecuada, y la interferencia por iones metálicos o proteínas.

La determinación más corriente en un laboratorio clínico es la de glucosa en orina y sangre.

#### 3.1.6 ENZIMOINMUNOANÁLISIS <sup>(5)</sup>

Las técnicas de enzimoinmunoanálisis están reemplazando con rapidez al radioinmunoanálisis en química clínica, ya que ofrecen altos niveles de

sensibilidad y reproducibilidad junto con una aplicación general y la posibilidad de automatización. Además, no existe contacto con material radiactivo.

### 3.1.7 ENZIMAS TERAPÉUTICAS<sup>(5)</sup>

Las enzimas han demostrado ser valiosos agentes terapéuticos en diversas aplicaciones. Uno de los ejemplos de mayor éxito se refiere al tratamiento de ciertos neoplasmas, entre los que se encuentran la leucemia linfocítica aguda, con asparraginasa

### 3.1.8 INDUSTRIA FARMACEUTICA.

La producción de aminoácidos mediante tecnología con enzimas está adaptada convenientemente. Aunque se pueden sintetizar empleando un proceso químico, se debe señalar que en este caso se obtiene una mezcla de D y L isómeros. Puesto que solamente el L-isómero es biológicamente activo, la mezcla debe ser separada en sus dos componentes. Este proceso puede llevarse a cabo mediante el empleo de la enzima aminoacilasa. Una vez sintetizado, la mezcla del DL aminoácidos se acetila. Las penicilinas semisintéticas son los principales productos farmacéuticos obtenidos por tecnología enzimática. El método de fermentación tradicional permite producir la bencil-penisilina (penisilina g) como la fenoximetil- penisilina (penisilina b).

### 3.2 NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS<sup>(7)</sup>

Algunas enzimas se denominan según su sitio de procedencia anatómica, como la ptialina de la saliva y la pectina gástrica. Actualmente su clasificación se basa en el nombre del sustrato atacado, o en el tipo general de sustrato común relación catalizada, y se ha añadido, convencionalmente, la terminación *asa*. Por ejemplo, las que actuaron sobre la unión éster son la esterases; si la esterasa que es específica de los ésteres de colesterol, se denomina colesterolestera.

En el año de 1961, la unión internacional de bioquímica adoptó el sistema de clasificación y nomenclatura propuesto por su Comisión de Enzimas basado en la reacción química catalizada, o sea la propiedad específica de cada enzima; los diversos tipos se agrupan en clases, por catalizar procesos semejantes, bien subclases, especificadoras, con mayor exactitud, de la reacción particular considerada.

Según las recomendaciones de la Comisión de Enzimas, el nombre de cada enzima tiene dos Partes: la primera en el nombre del sustrato y la segunda indica el tipo de reacción catalizada, con la terminación *asa*. Así se necesita aclarar la naturaleza de la reacción se añade lo pertinente entre paréntesis.

No obstante las ventajas de la nomenclatura de la enzimas propuesta por la Comisión, su uso no ha alcanzado mucha emoción, pues a menudo los nombres son complejos; se hace difícil, en la práctica, excluir el uso de los

nombres consagrados por la costumbre. Por lo General se usan los nombres comunes de la enzima. Los 6 grupos de enzimas son los siguientes:

1. Óxido-reductasas
2. Transferasas
3. Hidrolasas
4. Liasas
5. Isomerasas
6. Ligasas

Las Amilasas son enzimas hidrolíticas, es decir son Hidrolasas. Estas tienen la capacidad de introducir los elementos del agua, H y OH, en el sustrato atacado, produciendo así su rompimiento. Se denominan de acuerdo con el nombre de su sustrato seguido de la en designación hidrolasa. Existen varias subclases en este grupo, de las cuales las más importantes son las *esterasas* uno, que atacan diversas uniones éster, las *fosfatasas* una enzima encargadas de la eliminación de grupos fosfatos, las *glicosidasas*, con actividad sobre compuestos glucosídico, entre estas tenemos las *amilasas*.

La  $\alpha$ -amilasa es una enzima que rompe los enlaces  $\alpha$ , 1-4 de los almidones, las dextrinas y el glucógeno, produciendo maltosa y pequeños oligosacáridos ramificados.

### 3.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO<sup>(9)</sup>

La microbiología comprende el estudio de una amplia variedad de sistemas vivientes “inferiores” que incluyen virus, bacterias, algas, hongos simples como las levaduras y los mohos, así como los hongos superiores altamente diferenciados más grandes como las “setas”.

En un medio de apoyo para el crecimiento adecuado, los microorganismos unicelulares aumentan de tamaño y, por último, se dividen en dos por un proceso de fisión binaria o gemación. De hecho, una célula microbiana no viable se define como aquella que incubada en medio de apoyo para el crecimiento por un período suficientemente largo, es incapaz de aumentar su tamaño o de multiplicarse, una célula que aparentemente no crece, aún puede ser viable, pero el medio es incapaz de apoyar el crecimiento debido a la disminución de un nutriente esencial, la presencia o producción de materiales tóxicos o un cambio en el medio físico, como la disminución de oxígeno, pH o temperatura. A menudo las células pueden vivir en este estado sin crecimiento, particularmente como esporas o quistes, por períodos largos.

Las células microbianas requieren un alto grado de adaptabilidad para responder a cambios tanto en el medio físico como en el químico. A diferencia de las formas de vidas diferenciadas, multicelulares, los organismos unicelulares responden a cambios en el medio al exhibir un conjunto diferente de actividades metabólicas. Los organismos unicelulares son capaces de existir

en una variedad de estados fisiológicos y pueden cambiar rápidamente de un estado a otro.

El crecimiento se puede considerar como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo, lo cual, para los organismos unicelulares, conduce a un aumento en el número de individuos en la población. Se puede considerar el crecimiento al nivel de individuos dentro de una población (ciclo celular) o el crecimiento de poblaciones celulares (ciclo de crecimiento). El crecimiento de las poblaciones celulares se puede subdividir en sistemas cerrados, como el cultivo intermitente, y en sistemas abiertos, como el cultivo alimentado por lotes y el cultivo continuo.

### 3.3.1 MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO<sup>(9)</sup>

Existen varios métodos para medir el crecimiento de células microbianas, entre los cuales tenemos: Peso seco celular, absorción, peso húmedo, volumen de células empacadas, número de células, masa de un componente celular, etc.

#### 3.3.1.1 PESO SECO CELULAR<sup>(9)</sup>

El método más usado para medir el crecimiento microbiano es secar volúmenes conocidos de cultivo celular lentamente hasta obtener un peso constante. Cuando se trata de células que sedimentan rápidamente, como levaduras, esto usualmente implica centrifugación ( $4,6 \times 10^3$  rpm). Luego las células concentradas se colocan en una estufa a 90°C o a 105 °C hasta obtener un

peso constante. El peso de las células secas usualmente se expresa en términos de g/L.

En las determinaciones de peso seco celular existen fuentes de error importantes debido a la absorción de humedad atmosférica por las células secas y los tubos de centrifuga o las membranas durante el enfriamiento. Esto se puede evitar al enfriar en un desecador o mediante la determinación de la cantidad de agua absorbida por las membranas o tubos y con la corrección adecuada del peso medido.

#### 3.3.1.2 ABSORCIÓN <sup>(9)</sup>

A menudo se obtiene ventaja del hecho de que en una celda espectrofotométrica, las células microbianas desvían la luz, de modo que la cantidad de ésta que llega al detector del espectrofotómetro está relacionada directamente con el número de células presentes en la muestra del cultivo de acuerdo a la Ley de Beer. Por lo general, se emplean longitudes de onda alrededor de 600 nm. Es importante entender que como la absorbancia es afectada por el tamaño y la forma de las células, la relación entre la absorbancia y el número de células cambia si el tamaño o la forma de ésta cambian durante el crecimiento del cultivo.



Fig. N° 1: Espectrofotómetros/colorímetros, a la izquierda el spectronic 20D y a la derecha el spectronic 20. Ambos utilizados para la medición de crecimiento de microorganismos.

#### 3.3.1.3 PESO HÚMEDO <sup>(9)</sup>

Este quiere decir simplemente la centrifugación o filtración del cultivo seguida por el pesado directo. Aunque es un método extremadamente rápido, es importante estandarizar correctamente el procedimiento, ya que se mide el agua tanto intracelular como extracelular, lo cual puede causar errores considerables.

#### 3.3.1.4 VOLUMEN DE CÉLULAS EMPACADAS <sup>(8)</sup>

Mediante la centrifugación de muestras del cultivo en tubos de centrifuga graduados se puede determinar rápidamente el volumen de células empacadas. Este método es muy inexacto, especialmente cuando se miden pequeños cambios en la población celular.

### 3.3.1.5 NÚMERO DE CÉLULAS <sup>(9)</sup>

El crecimiento se puede determinar también en términos de número de células por litro. El número total de células se puede medir colocando muestras de cultivo adecuadamente diluidas sobre portaobjetos de microscopios graduados como los de Herber o los hematocitómetros y contando el número de células con la ayuda de un microscopio.

Aunque este método es relativamente rápido y exacto no distingue entre células viables y no viables, también muy agotador; sin embargo, se cuenta con contadores de células automáticos.

### 3.3.1.6 MASA DE UN COMPONENTE CELULAR <sup>(8)</sup>

En los casos donde se dificulte el uso de otros métodos, la cantidad de un componente celular, la cual es una cantidad constante del peso seco total, se puede usar para estimar la concentración de células o de biomasa. Se han usado componentes como el nitrógeno, proteína, RNA, DNA y ATP celulares. Pueden surgir dificultades, ya que varía la cantidad de estos componentes en la célula, a menudo considerablemente, durante el crecimiento de las células, especialmente cuando las condiciones de éste son diferentes.

### 3.3.1.7 MEDICIONES FÍSICAS <sup>(9)</sup>

El crecimiento de las células microbianas va acompañado siempre de generación de calor.

Recientemente se demostró que hay una relación directa entre la cantidad de calor producido y la concentración de biomasa. Este método es directo, no requiere de muestreo y es instantáneo, pero es más adecuado para biorreactores a gran escala, puesto que la cantidad de calor generado en escala pequeña puede ser demasiado pequeña para ser adecuada.

Para cultivos aeróbicos es posible medir la rapidez de captación de oxígeno, ya que se ha demostrado que está directamente relacionada con la concentración de biomasa. Es obvio que este método no es adecuado para cultivos anaeróbicos.

### 3.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO DE UN CULTIVO POR LOTES<sup>(8)</sup>

El conocimiento de la cinética y producción de metabolitos es fundamental en el tratamiento cuantitativo de los procesos de fermentación. El conocimiento de la cinética de un cultivo permite la predicción del transcurso de la fermentación, la evaluación de velocidades, rendimientos y productividades y entrega información útil para establecer las estrategias de producción y optimización del proceso.

El comportamiento cinético de una población está determinado por un conjunto de factores genéticos y ambientales. Entre estos últimos destacan las condiciones de operación (composición del medio, temperatura, pH y otras) y la

modalidad de cultivo entre las que distinguimos el cultivo por lotes y el cultivo por lotes alimentados o semicontinuo.

El cultivo por lotes se define como aquel que se realiza sin intercambio de materia con los alrededores, salvo lo referente a los gases (aireación, producción de dióxido de carbono y otros) que se suministran y retiran del sistema en forma continua. En esta modalidad de cultivo se adicionan inicialmente los nutrientes y luego se inocula con una determinada cantidad de células viables, que produce una serie de eventos característicos denominada Curva de Crecimiento, la cual se representa por una gráfica del peso seco celular o biomasa ( $x$ ), (g/L) contra el tiempo de incubación en horas (h), tal como se muestra en la figura

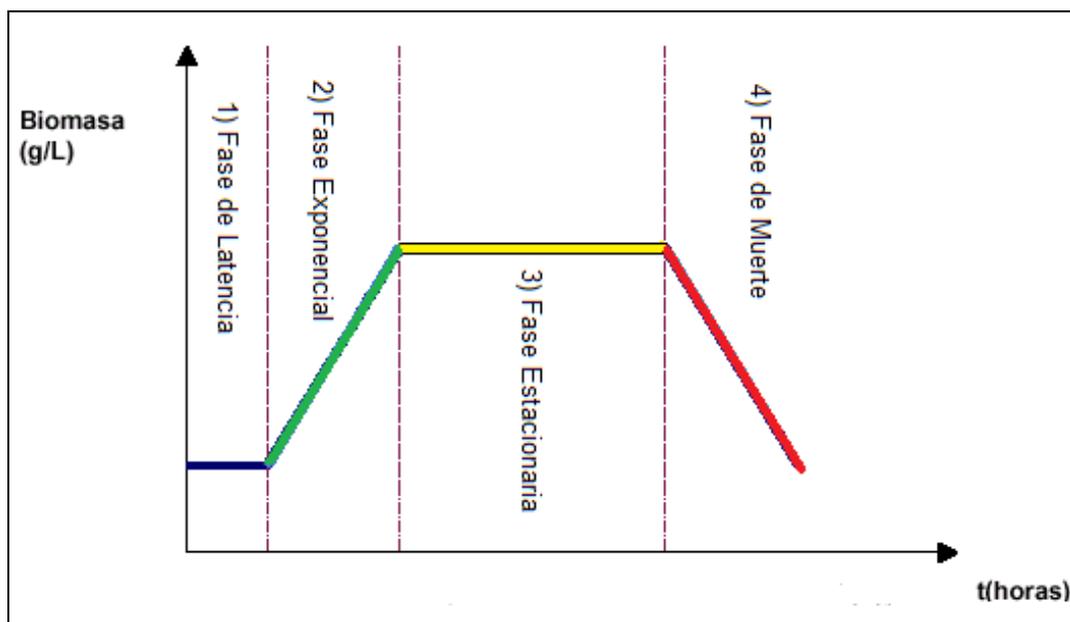


Fig. N° 2: Curva de Crecimiento en un cultivo por lotes

1) Fase de latencia: Se produce inmediatamente después de la inoculación. En ella no hay iniciación de replicación de ADN ni separación de nuevas células. Se produce el reacomodo de la composición macromolecular al nuevo ambiente en que se encuentran las células inoculadas.

2) Fase de crecimiento exponencial o logarítmico: Las células se reproducen a una velocidad que es la máxima de todas las fases de crecimiento, por no existir limitación de nutrientes.

3) Fase estacionaria: Se alcanza cuando se agota un nutriente, razón por la cual se detiene el crecimiento.

4) Fase de muerte: Esta fase se presenta en aquellos cultivos en los que se inducen enzimas autolíticas en condiciones de inanición.

### 3.5 EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO<sub>(7)</sub>

La evaluación de la cinética de crecimiento microbiano de un cultivo por lotes implica la medición del crecimiento de los microorganismos, consumo de nutrientes y formación de productos.

### 3.5.1 CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS.

#### 3.5.1.1 VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE GENERACIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS<sub>(8)</sub>

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{X_2 - X_1} \times \frac{d \ln X}{dt}$$

Donde:

$X_1$  = Densidad celular en gramos/litro inicial

$X_2$  = Densidad celular en gramos/litro inicial final

$t_1$  = tiempo en minutos inicial

$t_2$  = tiempo en minutos final

#### 3.5.1.2 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE GENERACIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS.

$$\mu = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt}$$

Donde:

$X$  = Densidad celular en gramos/litro

$t$  = tiempo en minutos

### 3.5.2 CONSUMO DE NUTRIENTES (UTILIZACIÓN DE SUSTRATO).

#### 3.5.2.1 VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO<sub>(8)</sub>

$$Q_s = - \frac{s_2 - s_1}{t_2 - t_1} = - \frac{ds}{dt}$$

Donde:

$s_1$  = Concentración de azúcares totales en gramos/litro o microgramos/mililitro inicial

$s_2$  = Concentración de azúcares totales en gramos/litro o microgramos/mililitro final

$t_1$  = tiempo en horas inicial

$t_2$  = tiempo en horas final

Las unidades son: gramos de sustrato consumidos / litro x hora.

### 3.5.2.2 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO<sub>(8)</sub>

$$qs = -\frac{1}{X} \times \frac{ds}{dt}$$

Donde:

qs: Velocidad específica de consumo de sustrato

s = Concentración de azúcares totales en gramos/litro o microgramos/mililitros

t = tiempo en horas

x = Densidad celular en g/L

Las unidades son:

Gramos de sustrato consumidos/gramos de biomasa x hora

### 3.5.3 FORMACIÓN DE PRODUCTOS.

#### 3.5.3.1 VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTOS<sub>(8)</sub>

$$Qp = \frac{p_2 - p_1}{t_2 - t_1} = \frac{dp}{dt}$$

Donde:

Qp: Velocidad volumétrica de formación de productos

s<sub>1</sub> = gramos de producto formado final (almidón)

s<sub>2</sub> = gramos de producto formado (almidón)

t<sub>1</sub> = tiempo en horas inicial

t<sub>2</sub> = tiempo en horas final

Las unidades son:

gramos de producto formado / Litro x hora

#### 3.5.3.2 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE FORMACIÓN DE PRODUCTOS<sub>(8)</sub>

$$qp = \frac{1}{X} \times \frac{dp}{dt}$$

Donde:

qp: Velocidad específica de formación de productos

X = Densidad celular en gramos/litro

P = gramos de producto formado

t = tiempo en horas

Las unidades son:

Gramos de producto formado / gramos de biomasa x hora

### 3.5.4 RENDIMIENTOS EN EL CULTIVO.

#### 3.5.4.1 RENDIMIENTOS DE BIOMASA ( $Y_{x/s}$ )<sub>(8)</sub>

$$Y_{x/s} = \frac{dX}{ds}$$

Las unidades son:

Gramos de biomasa / gramos de sustrato consumido

#### 3.5.4.2 RENDIMIENTO DE PRODUCTO ( $Y_{p/s}$ )<sub>(8)</sub>

$$Y_{p/s} = \frac{dp}{ds}$$

Las unidades son: gramos de producto / gramos de sustrato consumido.

### 3.6 **BACILLUS SUBTILIS**<sub>(11)</sub>

El *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva, Catalasa positiva, aerobio facultativo comúnmente encontrada en el suelo. Miembro del Género *Bacillus*, *B. subtilis* tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, permitiendo al organismo tolerar condiciones ambientalmente extremas (Anexo1)

El *B. subtilis* se ha mostrado muy manejable para la manipulación genética, y se ha hecho, por lo tanto, extensamente adoptado como un organismo modelo para estudios de laboratorio, sobre todo de esporulación, que es un ejemplo simplificado de la diferenciación celular

Cuadro N° 2: TAXONOMÍA DEL **BACILLUS SUBTILIS**<sub>(11)</sub>

<b><i>Bacillus subtilis</i></b>	
<b>Clasificación científica</b>	
Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<b><i>B. subtilis</i></b>
<b>Nombre binomial</b> <b><i>Bacillus subtilis</i></b> (Ehrenberg 1835) Cohn 1872	

### 3.7 LA PAPA O PATATA<sup>(12)</sup>

Las patatas (*Solanum tuberosum*) constituyen un alimento muy antiguo, utilizado por los pueblos de América, antes que Cristóbal Colón llegase a ella. Parece ser que los antiguos Incas ya la consumían habitualmente. De esta manera fue importada a Europa, aunque tardó bastante tiempo a adoptarse su consumo, dado que la planta era tóxica y se pensaba que el consumo de las patatas podría causar igualmente enfermedades si era consumida. Su consumo no se generalizó hasta el siglo XVII, debido a que la escasez de alimentos que imperaba durante esta época obligó a hacer uso de la misma.

La papa es a nivel mundial el 4º cultivo más sembrado, produciéndose 290 millones tm en 13.85 millones de has, contiene 2% de proteína, aminoácidos esenciales y vitamina C. Es uno de los vegetales que contiene más almidón.

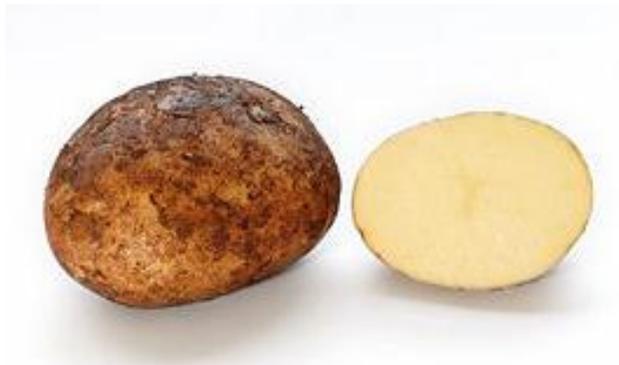


Fig. N° 3: Tubérculo de papa entero y en corte transversal

Cuadro N° 3 COMPOSICIÓN DE LA PAPA CRUDA CON PIEL<sup>(11)</sup>

Valor nutricional medio por cada 100 g	
Agua	82.00g
Valor calórico	70.00 kcal
Proteínas	2.00 g
Carbohidratos	19.00 g
Lípidos	0.10 g
Provitamina A	5.00 mg
Vitamina B1	0.11 mg
Vitamina B2	0.04 mg
Vitamina B3	1.20 mg
Vitamina B6	0.25 mg
Vitamina C	19.50 mg
Hierro	1.80 mg
Calcio	9.00 mg
Magnesio	10.00 mg
Fósforo	26.00 mg
Potasio	255.00 mg
Sodio	2.40 mg
Fibras	1.40 g

### 3.8 EL ALMIDÓN COMO SUSTRATO<sup>(12)</sup>

El almidón es un polisacárido de reserva alimenticia predominante en las plantas, se diferencia de todos los demás carbohidratos en que, en la naturaleza se presenta como complejas partículas discretas (gránulos). Los gránulos de almidón son relativamente densos, insolubles y se hidratan muy mal en agua fría. Pueden ser dispersados en agua, dando lugar a la formación de suspensiones de baja viscosidad.

Químicamente es una mezcla de dos polisacáridos muy similares, la amilosa y la amilopectina; contienen regiones cristalinas y no cristalinas en capas alternadas. Puesto que la cristalinidad es producida por el ordenamiento de las cadenas de amilopectina, los gránulos de almidón céreo tienen parecido grado de cristalinidad que los almidones normales. La disposición radial y ordenada de las moléculas de almidón en un gránulo resulta evidente al observar la cruz de polarización (cruz blanca sobre un fondo negro) en un microscopio de polarización cuando se colocan los polarizadores a  $90^\circ$  entre sí.

La amilosa es el producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1,4), que establece largas cadenas lineales de 200 a 2500 unidades y pesos moleculares hasta de un millón; es decir, la amilosa es una  $\alpha$ -D-(1,4)-glucana cuya unidad repetitiva es la  $\alpha$ -maltosa. Tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de hélice consta de seis moléculas de glucosa. El interior de la hélice contiene sólo átomos de hidrógeno, y es por tanto lipofílico, mientras que los grupos hidroxilo están situados en el exterior de la hélice. La mayoría de los almidones contienen alrededor del 25% de amilosa.

La amilopectina se diferencia de la amilosa en que contiene ramificaciones que le dan una forma molecular a la de un árbol; las ramas están unidas al tronco central (semejante a la amilosa) por enlaces  $\alpha$ -D-(1,6), localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa. Su peso molecular es muy alto ya que algunas

fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de daltones. La amilopectina constituye alrededor del 75% de los almidones más comunes. Algunos almidones están constituidos exclusivamente por amilopectina y son conocidos como *céreos*. La amilopectina de papa es la única que posee en su molécula grupos éster fosfato, unidos más frecuentemente en una posición O-6, mientras que el tercio restante lo hace en posición O-3.

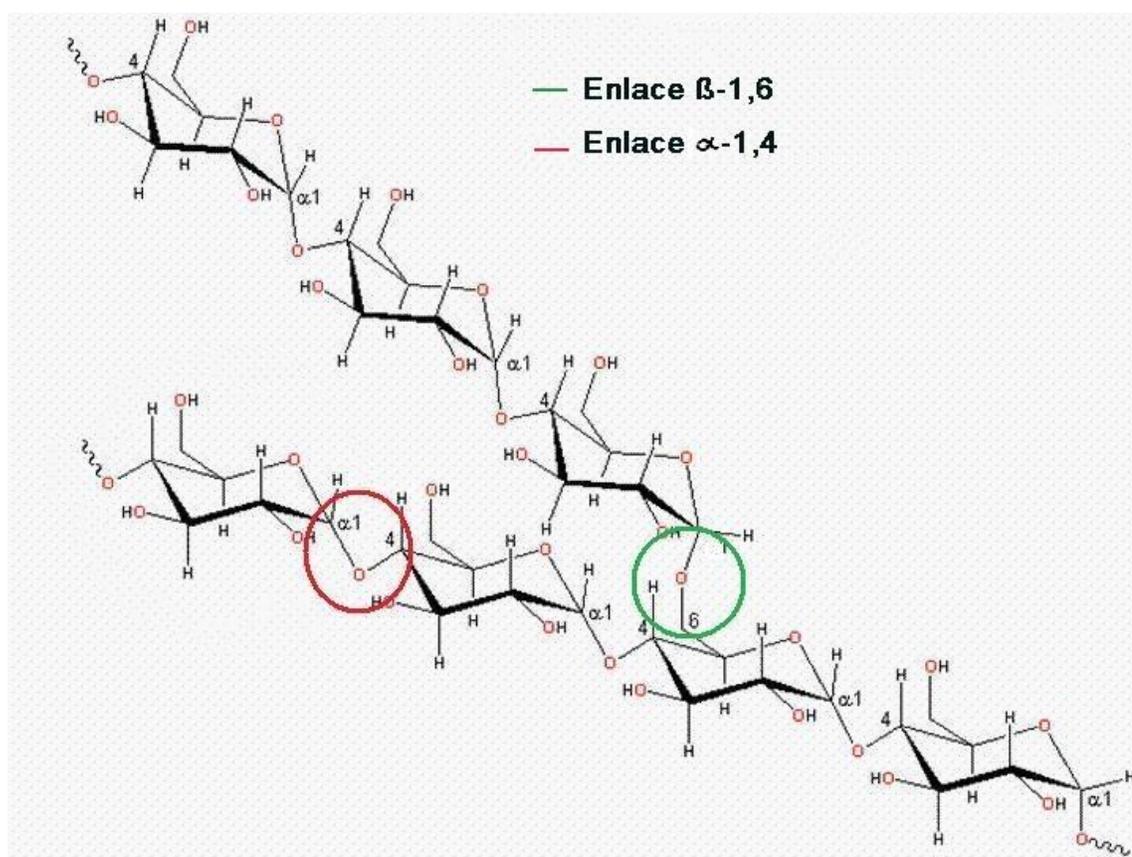


Fig. N<sup>o</sup> 4: Fragmento de amilopectina de una molécula de almidón con sus enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\beta$ -1,6

**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLÓGICO**

## 4.0 DISEÑO METODOLÓGICO.

### 4.1 TIPO DE ESTUDIO

La investigación es de carácter prospectivo y experimental.

Prospectivo porque se podrán hacer mas investigaciones acerca de las enzimas producidas por el ***Bacillus subtilis***. La investigación se realizo en tres etapas:

- Recopilación bibliográfica
- Investigación de campo
- Parte experimental

### 4.2 RECOPIACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Bibliotecas:

- Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador (UES)
- Central de la Universidad de El Salvador (UES)
- Universidad Nueva San Salvador (UNSSA)
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)

### 4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

El microorganismo a utilizar en la producción de  $\alpha$ -amilasa por medio de cinética de crecimiento microbiano pertenece al genero Bacillus, ***Bacillus subtilis*** ATCC 6633 (Anexo N° 1)

El sustrato utilizado en la investigación es la cascara de papas obtenidas del cafetín de la Universidad de El Salvador.

#### 4.4 PARTE EXPERIMENTAL

##### 4.4.1 OBTENCIÓN DEL SUSTRATO<sup>(2)</sup>

El sustrato se obtiene de la cáscara de papa triturada, diluida, filtrada y autoclavada a la cual se le añade cloruro de calcio y se le ajusta el pH a 7.0

(Anexo N° 8)

##### 4.4.2 PREPARACIÓN DEL INOCULÓ<sup>(2)</sup>

El microorganismo a utilizar será la ***Bacillus subtilis* ATCC6633** Antes de iniciar el proceso de producción, es necesario asegurar el estado puro de la cepa, para ello se realizará una tinción de Gram. Para ser vista al microscopio a una magnitud de 100X. El objetivo de esta preparación es observar la morfología de las células bacterianas de ***Bacillus subtilis* ATCC6633**, las cuales se presentan como bastones grandes de color violeta (Gram +) con esporas en los polos.

Después de asegurar el estado puro de la bacteria, se sembrarán en dos placas que contengan agar TSA y se incubarán a temperatura ambiente por un período de 24 horas.

Suspender las bacterias desarrolladas con 2.0 mL a 3.0 mL de agua destilada agregar las bacterias a 100 mL de suspensión de cascara de papa estéril,

contenidos en un matraz de 250 mL también estéril; este se incubará con agitación a temperatura ambiente durante 48 horas (Anexo N° 10)

#### 4.4.3 PREPARACIÓN DEL BIORREACTOR<sub>(2)</sub>

- Lavar con agua y jabón 16 matraces de 250 mL.
- Enjuagar los matraces con agua destilada y dejarlos escurrir.
- Envolver los matraces con papel kraft.
- Esterilizarlos por medio de calor seco en una estufa a una temperatura de  $160^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{c}$  por una hora.

#### 4.4.4 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO<sub>(2)</sub>

- Lavar las cáscaras de papa con agua destilada y escurrirlas
- En un beaker de 2500 mL colocar las cáscaras de papa y agregar agua destilada hasta cubrirlas.
- Licuar las cáscaras de papas hasta formar una suspensión, filtrar por medio de una gasa y recoger el filtrado en un matraz de 2500 mL.
- A 2000 mL de suspensión cáscaras de papa agregar cloruro de calcio
- Ajustar el pH del medio de cultivo a un valor 7.0 utilizando ácido clorhídrico 1.0N o hidróxido de sodio 1.0N
- Esterilizar en autoclave el filtrado de cáscara de papa con cloruro de calcio ya disuelto y con un pH de 7.0, La esterilización se realizará a

una temperatura de  $121^{\circ} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$  a 15 lb. De presión durante 15 minutos. (Anexo N° 8)

#### 4.4.5 PRODUCCIÓN<sub>(2)</sub>

- Tomar el pH de la suspensión de papa y ajustar si es necesario a pH 7.0 con ácido clorhídrico 1N o con hidróxido de sodio 1N.
- Tomar 100 mL de la suspensión de cáscara de papa y colocarlo en un matraz el cual servirá de referencia en los análisis posteriores, refrigerarlo.
- Incorporar la suspensión de bacterias contenidos en los tres matraces de 250 mL, preparados.
- Transferir 100 ml de suspensión de cáscara de papa a los 15 matraces restantes.
- Colocar los 15 matraces en un shaker.
- Mantener las condiciones a temperatura ambiente.
- Tomar 3 matraces a los cuales se les determinaran los parámetros de biomasa, azúcares totales y pH al inicio del proceso.
- Tomar 3 matraces diariamente durante 5 días consecutivos y almacenarlos en refrigeración a una temperatura de  $10^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

#### 4.4.6 TRATAMIENTO DE MUESTRAS

##### 4.4.6.1 DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR EL MÉTODO TURBIDIMÉTRICO<sub>(2)</sub>

- Tarar un tubo de ensayo a 10 mL.
- Tomar una alícuota de 10 mL de uno de los matraces fermentado y colocarla en el tubo de ensayo que ha sido previamente tarado a 10 mL.
- Centrifugar el tubo de ensayo que contiene la alícuota de 10 mL del medio fermentado por un período de 15 minutos.
- Colocar el sobrenadante en un vaso de precipitado de 50 mL y guardarlo para el posterior análisis de pH.
- Resuspender el paquete celular con 10 mL de agua destilada y centrifugar nuevamente durante quince minutos; repetir esta operación dos veces más.
- Adicionar al centrifugado final 5 mL de agua estéril, resuspenderlo y afora a 10 mL.
- Leer la solución aforada en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 610 nm; si la turbidez es muy alta se realizarán diluciones.

##### 4.4.6.2 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR EL MÉTODO DE FENOL-SULFÚRICO<sub>(2)</sub>

La determinación de azúcares totales se realizará en el filtrado obtenido en la determinación de biomasa por peso seco.

Tomar 5 mL del filtrado utilizando una pipeta volumétrica de 5 mL, colocarlos en un tubo de ensayo, adicionar 0,5 mL de una solución de sulfato de zinc al 10 % y 0,5 mL de hidróxido de sodio 0,5 N, utilizando para ello pipetas mohr de 1 mL. Mantener en reposo el tubo de ensayo del paso anterior durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar durante 15 minutos y utilizar el sobrenadante obtenido para la cuantificación de azúcares.

Tomar una alícuota de 0,5 mL del sobrenadante del paso anterior.

Adicionar 1,5 mL de agua destilada al tubo que contiene 0,5 mL del sobrenadante utilizando una pipeta mohr de 5 mL, luego, utilizando una pipeta mohr de 1 mL, adicionar 0.1 mL de fenol al 80 %, sumergir los tubos en baño de agua fría y adicionar lentamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado utilizando una pipeta volumétrica de 5 mL.

Agitar y mantener en reposo los tubos durante 30 minutos exactos, manteniéndolos a temperatura ambiente.

Leer las muestras tratadas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

Los valores encontrados interpolarlos en una curva estándar de sacarosa (Anexo N° 7)

#### 4.4.6.3 ELABORACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE SACAROSA<sub>(8)</sub>

- Pesar 10 mg. de sacarosa grado reactivo, en una balanza analítica.
- Colocar la sacarosa pesada en un balón volumétrico de 10 mL.

- Adicionar al balón de 100 mL, 30 mL de agua destilada y agitar hasta su completa disolución.
- Aforar con agua destilada la solución de sacarosa en el balón volumétrico de 100 mL, obteniéndose una concentración final de 100 µg/ml.
- Preparar a partir de la solución que posee una concentración de 100 µg/ml de sacarosa, las soluciones que se detallan en el siguiente cuadro:

Cuadro N°4 ESTANDARES DE SACAROSA<sub>(8)</sub>

Tubo	Solución de sacarosa (mL)	Agua destilada (mL)	Fenol 80% (mL)	Ácido sulfúrico concentrado (mL)
1	0,0	2,0	0,1	5,0
2	0,1	1,9	0,1	5,0
3	0,2	1,8	0,1	5,0
4	0,4	1,6	0,1	5,0
5	0,6	1,4	0,1	5,0
6	0,8	1,2	0,1	5,0
7	1,0	1,0	0,1	5,0

#### 4.4.6.4 DETERMINACIÓN DE pH

Utilizar el sobrenadante obtenido en la determinación de biomasa por el método turbidimétrico y establecer el valor de pH utilizando un potenciómetro

(Anexo N° 12)

#### 4.4.6.5 CUANTIFICACIÓN DE ALMIDÓN PRESENTE EN EL FILTRADO

##### OBTENIDO DE CÁSCARA DE PAPA<sub>(2)</sub>

- Pesar exactamente 10 mg de almidón de papa.

- En un balón volumétrico de 10 mL. diluirlos y aforar hasta formar una solución de almidón 1,0 mg/mL.
- De la solución preparada en el literal anterior tomar 1,0 ml y transferirlo a otro balón volumétrico de 10 mL., hacer esto dos veces más de tal forma que se obtengan 4 diferentes concentraciones de: 1,0, 0,1, 0,01 y 0,001.
- A cada balón agregar 2 ó 3 gotas de lugol y agitar.
- Tomar 10 mL. de la suspensión de cáscara de papa y agregarle 2 ó 3 gotas de lugol.
- Usar agua destilada como blanco.
- Leer todas las soluciones en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 mn.
- Graficar los datos obtenidos y determinar por interpolación la concentración de almidón presente en la suspensión de cáscara de papa.

#### 4.4.6.6 ENSAYO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE LA AMILASA<sub>(8)</sub>

Para determinar la actividad amilolítica tomar una alícuota de 1.0 mL del sobrenadante centrifugado y colocarlo en tubos de ensayo de 10 mL, adicionar 1.0 mL de buffer acetato 0.05M de pH 6.0 preincubar durante 10 minutos a 37 °C la cual es la temperatura de la actividad. El final de este tiempo se desarrolla un color que va de azul hasta amarillo paja según la cantidad de

almidón que se ha hidrolizado, para la cuantificación de los azúcares reductores totales liberados durante la reacción enzimática.

Preparar para cada muestra una serie de tres tubos de la siguiente manera.

Cuadro N° 5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA  $\alpha$ -AMILASA<sub>(8)</sub>

Tubo N°	Almidón al 1% en buffer de acetato 0.1 N pH 4.6	Buffer acetato 0.1 N de pH 4.6	Solución de CaCl <sub>2</sub> 0.5 M	Filtrado
1	5.0 mL	3.9 mL	1.0 mL	0.1 mL
2	5.0 mL	3.9 mL	1.0 mL	0.1 mL
3	0.0 mL	9.0 mL	1.0 mL	0.0 mL

NOTA: El filtrado que se coloca en el tubo número dos debe inactivarse la enzima antes de añadirse los 0.1 mL de sustrato, el cual se consigue calentando a 105 °C durante 15 minutos. Para el cual se considera una cantidad mayor del filtrado ya que parte del agua se evapora con el calentamiento de modo que se tenga una medición exacta.

Los tubos así preparados se incuban a temperatura ambiente durante cinco minutos. Después de incubar, agregar a cada tubo dos mL de HCl 1.0 N se mezcla y se toma un mL para pasarlo a un matraz volumétrico de 50 mL que contiene 0.5 mL de HCl 1.0 N y 40 mL de agua destilada. Después se agrega 0.1 ml de lugol (0.3 % de I<sub>2</sub> y 8.0% de KI) se afora a 50 mL y se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Los mg de hidrolizados se determinan mediante la siguiente formula:

$$\text{mg de Almidón Hidrolizados} = \text{mg de almidón originales} \times \frac{T_b - T_a}{T_a}$$

Donde:

$\lambda$  de Tubo 1: Longitud de onda de la enzima activa

$\lambda$  de Tubo 2: Longitud de onda de la enzima inactiva

(Anexo N° 9)

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS**

## 5.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el análisis de los resultados obtenidos durante la cinética de producción de  $\alpha$ -amilasa, se usó del programa Equation Grapher Versión 3.2 1996-1998 (MFSort International).

Este es un software que consiste en dos programas: Un analizador de la regresión y un graficador de ecuaciones.

El analizador de la regresión es un programa que analiza y grafica la mejor curva para datos experimentales. El programa maneja los modelos de regresiones mas comúnmente usados tales como lineal, logarítmica y exponencial. También proporciona modelos polinómicos y regresiones múltiples.

El programa graficador de la ecuación traza y analiza las curvas obtenidas en el programa. Encuentra la regresión mas conveniente, encuentra automáticamente tangentes, raíces, máximos/mínimos, las intersecciones, etc. También puede calcular y obtener áreas de la integración. Para el análisis de los resultados obtenidos experimentalmente, el programa es útil ya que grafica rectas tangentes con sus pendientes, es decir las derivadas donde estas representan velocidades o rendimientos en diferentes tiempos de la cinética de producción de la  $\alpha$ -amilasa.

## 5.1 RESULTADOS OBTENIDOS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE $\alpha$ -AMILASA

Todas las muestras fueron analizadas a las mismas condiciones experimentales de fermentación por triplicado y se tomaron los promedios para los resultados.

(Anexos 2,3,4,5 y 6)

## 5.2 VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE BIOMASA POR TURBIDIMETRÍA

TABLA N° 1: Aplicación de Regresión Lineal a la Curva Estándar de Patrones Mcfarland.

<b>Escala Mcfarland</b>	<b>BaCl<sub>2</sub> al 1%(mL)</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>Absorbancia</b>	<b>UFC/mL (x10<sup>8</sup>)</b>
1	0.1	9.9	0.3796	3
2	0.2	9.8	0.5782	6
3	0.3	9.7	0.7768	9
4	0.4	9.6	0.9754	12
5	0.5	9.5	1.1740	15
6	0.6	9.4	1.3726	18
7	0.7	9.3	1.5712	21
8	0.8	9.2	1.7698	24
9	0.9	9.1	1.9684	27
10	1.0	9.0	2.1670	30

$$\text{Ecuación linealizada } Y = 0.181 + 0.0662X$$

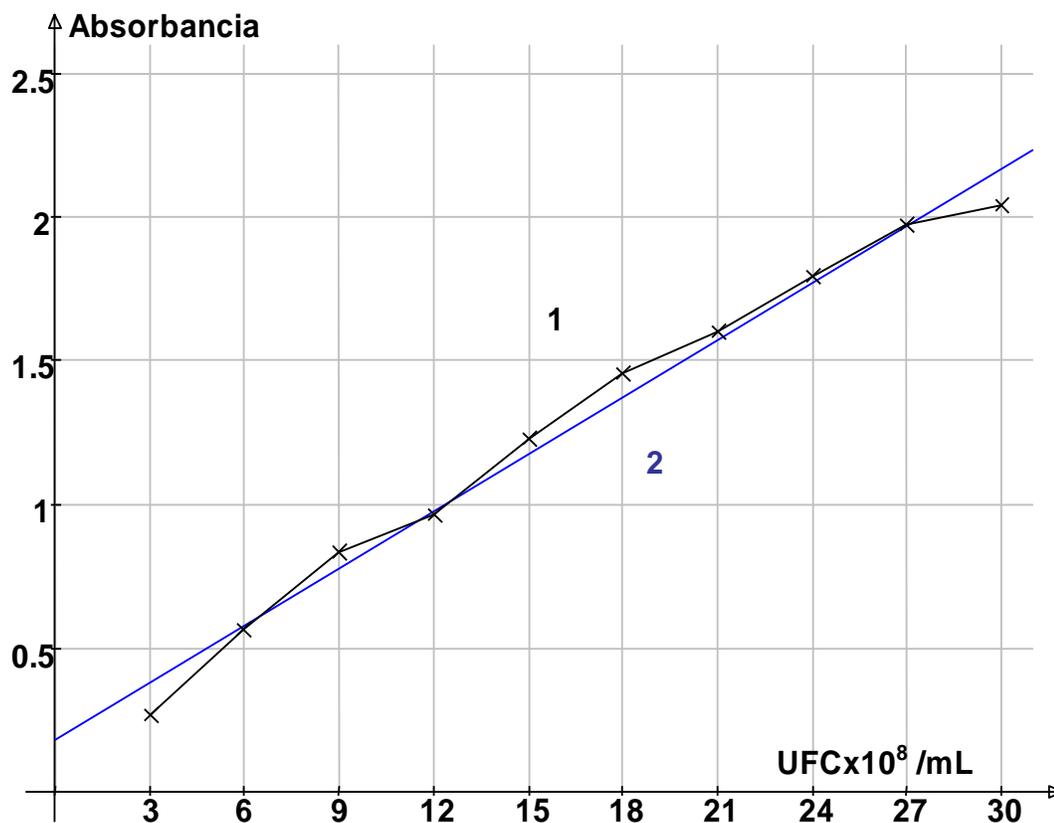


Fig. N°: 5 Curva Estándar de Patrones Mcfarland

- La **Curva N° 1** se obtiene graficando los resultados obtenidos experimentalmente de los patrones Mcfarland.
- La **Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de regresión lineal a los resultados obtenidos experimentalmente de los patrones Macfarland.

Ecuación:  $Y = 0.181 + 0.0662X$  es el resultado de la aplicación del método de regresión lineal a los estándares de patrones Mcfarland obtenidos experimentalmente.

TABLA N° 2: Resultados del análisis de muestras por el método turbidimétrico durante el proceso de producción de  $\alpha$  - amilasa.

N° de Muestra	Tiempo (horas)	Absorbancia	*UFCx10 <sup>8</sup>	LnX
1	0	0.5310	5.287	1.6653
2	24	0.7227	8.187	2.1025
3	48	0.8440	10.015	2.3041
4	72	0.9517	11.646	2.4550
5	96	0.9577	11.737	2.4627
6	120	0.9610	11.782	2.4666

Los valores de concentración fueron determinados en la ecuación de la regresión lineal de la Curva Estándar de patrones Mcfarland.

Ejemplo para un tiempo de 48 horas

$$Y = 0.181 + 0.0662X; Y = \text{Abs}$$

$$X = \frac{Y - 0.181}{0.0662}$$

$$X = \frac{0.8440 - 0.181}{0.0662}$$

$$X = 10.015$$

$$\text{Ln } X = \text{Ln } (10.015)$$

$$\text{Ln } X = 2.3041$$

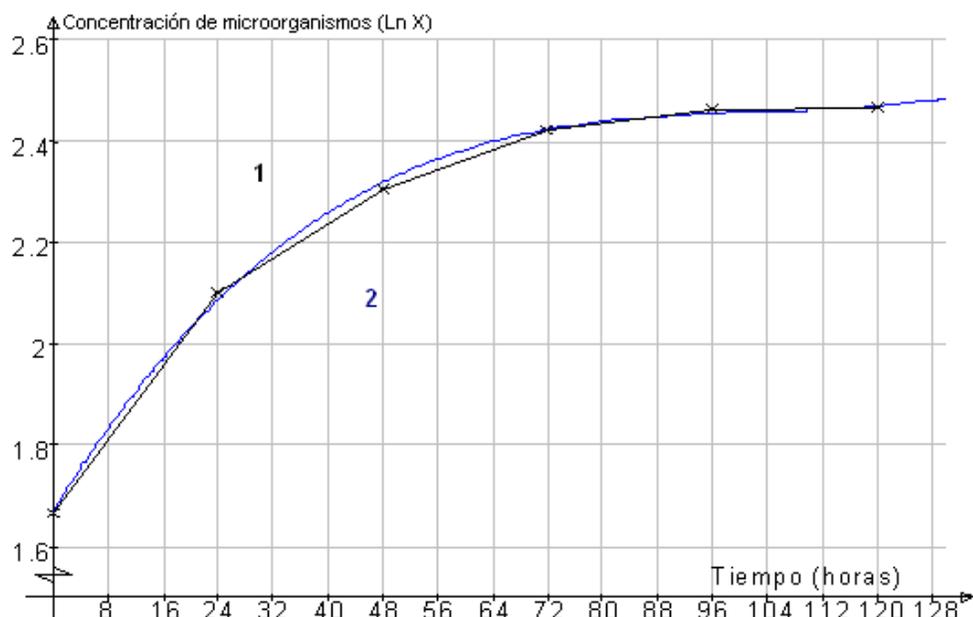


Fig. N°: 6 Curva de Turbidimetría en muestras.  
Concentración de Microorganismos (Ln X) vrs. Tiempo.

- **La Curva N° 1** se obtiene calculando la concentración (UFCx10<sup>8</sup>/mL) de las muestras en la ecuación lineal de la curva estándar de patrones Mcfarland.
- **La Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados de las muestras obtenidas en la ecuación lineal de patrones Mcfarlan.

En la figura N° 6 se observa el crecimiento del *Bacillus subtilis* con relación al tiempo, a partir de las 0 horas hasta las 120 horas en donde se puede observa la fase de crecimiento y la fase estacionaria.

### 5.3 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE BIOMASA POR TURBIDIMETRÍA

TABLA N° 3: Aplicación de Regresión Polinomial a los Resultados del Análisis de Muestras por el Método turbidimétrico, Durante e Proceso de Producción de  $\alpha$  - Amilasa

Tiempo (horas)	Valor de Ln X
0	1.6700
24	1.7997
48	2.2260
72	3.0050
96	4.1920
120	5.8440

$$\text{Ecuación: } Y = 1.67 + 0.022x - 0.000209x^2 + 6.74E-7x^3$$

Con los datos obtenidos en la tabla N° 3 se grafican para luego trazar rectas tangentes a diferentes tiempos las cuales representan la velocidad específica de crecimiento microbiano.

TABLA N° 4: VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO

Tangente	Tiempo (horas)	Valor de la Pendiente de las Rectas Tangentes $\mu(\text{h}^{-1})$
<b>A</b>	24	<b>0.0112</b>
<b>B</b>	48	<b>0.0247</b>
<b>C</b>	72	<b>0.0408</b>
<b>D</b>	96	<b>0.0588</b>
<b>E</b>	120	<b>0.0793</b>

$$\mu = \frac{dLn x}{dt} = \text{pendiente}$$

$\mu$ : Velocidad de crecimiento microbiano en un tiempo específico ( $\text{UFC} \times 10^8/\text{mL}$ )

$\frac{dLn x}{dt}$ : Derivada de biomasa con respecto al tiempo (pendiente de la tangente)

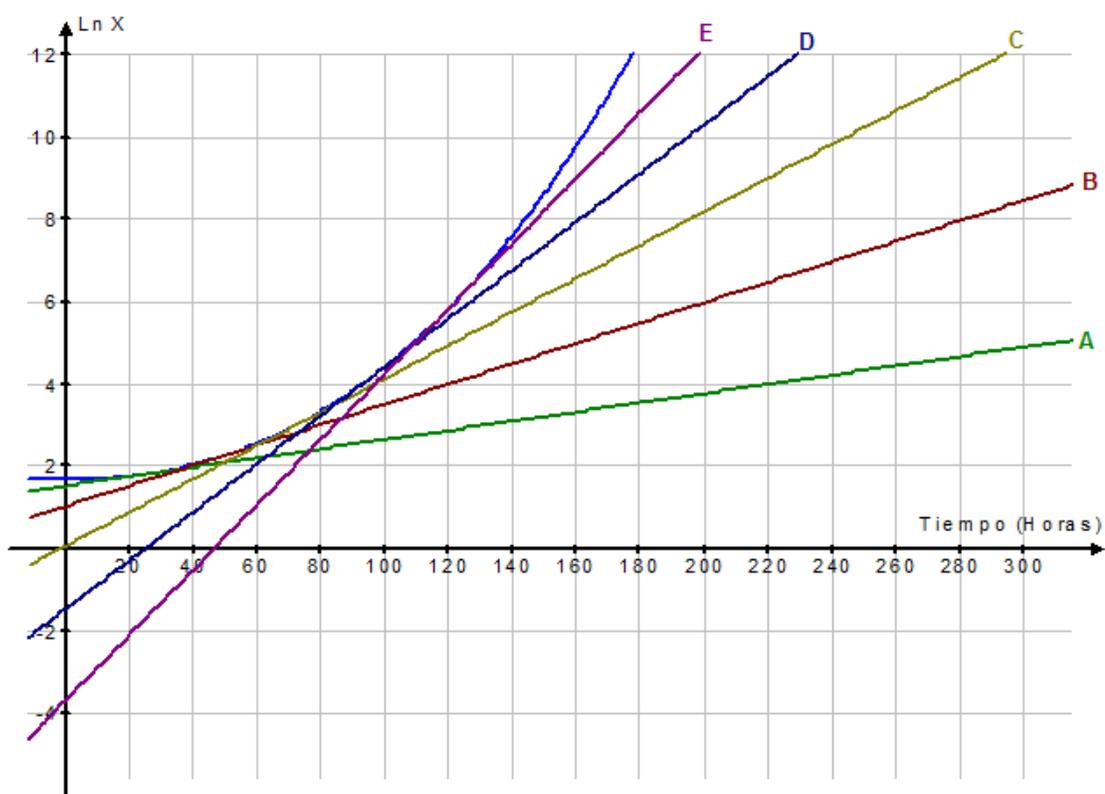


Fig. N° 7: Velocidad Especifica de Crecimiento Concentración vrs. Tiempo

$\mu$  = La velocidad específica de crecimiento puede calcularse en la curva del gráfico de la figura 6, trazando rectas tangentes en diferentes tiempos, el valor de la pendiente de cada recta tangente representa esta velocidad de crecimiento microbiano ( $\text{UFC} \times 10^8/\text{mL}$ ) en un tiempo específico.

En la figura N° 7 puede observarse el crecimiento ordenado de un cultivo por lotes del *Bacillus subtilis* formando una curva en el cual se puede determinar las fases de crecimiento: Latencia y exponencial. La máxima velocidad de crecimiento se alcanza a las 48 horas, en este tiempo inicia la fase exponencial.

#### 5.4 CALCULO DEL TIEMPO DE DUPLICACIÓN

$$\text{Formula: } Td = \frac{\text{Ln}2}{\mu}$$

Donde:

Td: Es el tiempo entre dos duplicaciones sucesivas de una población microbiana.

$\mu$ : Es la velocidad específica de crecimiento durante la fase exponencial la cual se alcanza a las 48 horas en la curva del cálculo de la velocidad específica de crecimiento de la figura N° 6.

$$\mu_{48} = 0.0247 \text{ h}^{-1}$$

$$\text{Ln}2 = 0.6931$$

$$Td = \frac{\text{Ln}2}{0.0247 \text{ h}^{-1}}$$

$$Td = \frac{0.6931}{0.0247 \text{ h}^{-1}}$$

$$Td = 0.6931 \times \frac{h}{0.0247}$$

$$Td = 28.0626 \text{ horas}$$

## 5.5 VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO

TABLA N° 5: Aplicación de la regresión lineal a la curva de estándar de almidón.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia
0.001	0.2363
0.010	0.2395
0.100	0.2709
1.000	0.5850

Ecuación:  $Y = 0.236 + 0.349X$

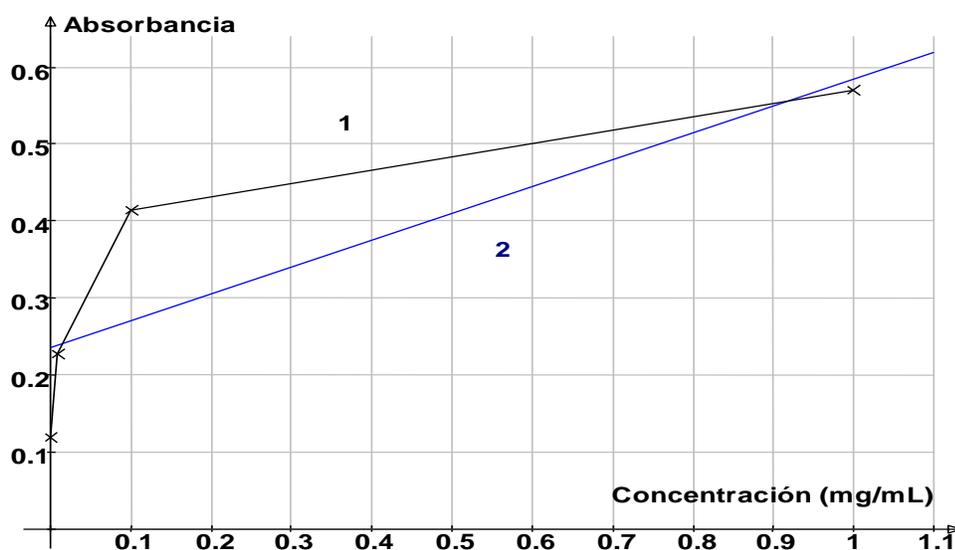


Fig. N° 8: Curva Estándar de Almidón

- La **Curva N° 1** se obtiene graficando los resultados de los estándares de almidón obtenidos experimentalmente.
- La **Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de regresión lineal a los resultados de los estándares de almidón obtenidos experimentalmente.

Ecuación:  $Y = 0.236 + 0.349X$  es el resultado de la aplicación del método de regresión lineal a los estándares de almidón obtenidos experimentalmente.

TABLA N° 6: Resultados del análisis de muestra para la cuantificación de almidón en las muestras.

Muestra	Tiempo (horas)	Absorbancia $\lambda=450$ nm	Concentración (mg/mL)
1	0	0.560	0.9284
2	24	0.525	0.8281
3	48	0.487	0.7192
4	72	0.410	0.4986
5	96	0.365	0.3696
6	120	0.299	0.1805

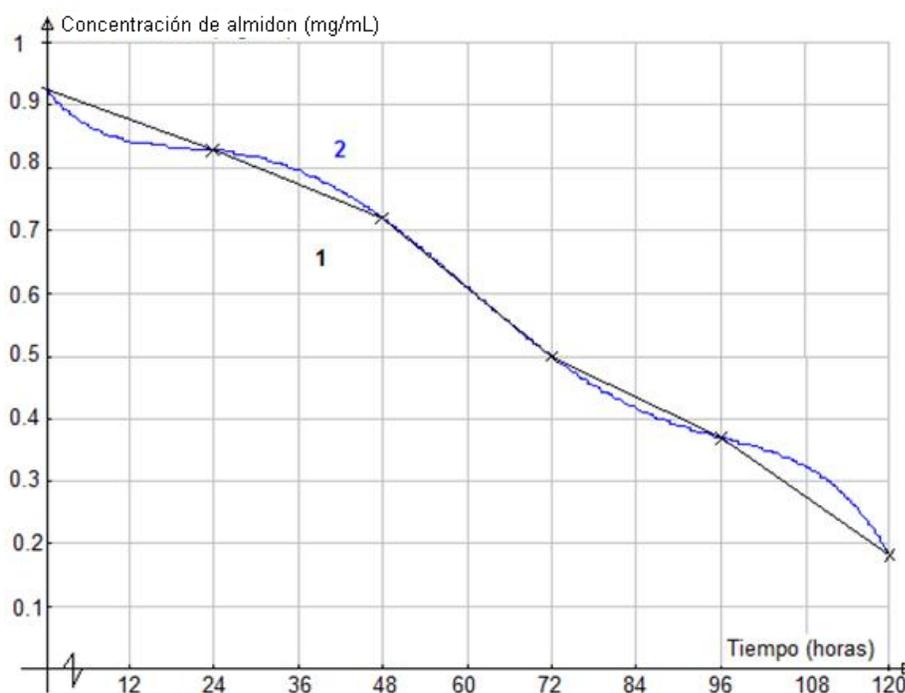


Fig. N° 9: Consumo de sustrato (Almidón) Concentración vrs. Tiempo

- La **Curva N° 1** se obtiene graficando los resultados obtenidos experimentalmente.

- La **Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

Los valores de concentración fueron determinados en la ecuación de regresión lineal de la Curva Estándar de Almidón:

$$Y = 0.928 - 0.0141x + 0.000804x^2 - 2.07E-5x^3 + 2.05E-7x^4 - 6.92E-10x^5$$

En la figura N° 9 se observa el decrecimiento de la cantidad de almidón hidrolizado por la amilasa en dextrinas teniendo una concentración inicial del almidón a las 0 horas de 0.9284 mg/mL degradándose así hasta las 120 horas a una concentración de 0.1805 mg/mL.

TABLA N° 7: Resultados de regresión polinomial a los resultados del análisis de muestras para cuantificar el almidón durante el proceso de producción de la  $\alpha$ -amilasa.

N° de Muestra	Tiempo (horas)	Concentración de Almidón
1	0	0.9280
2	24	0.8290
3	48	0.7363
4	72	0.5247
5	96	0.4384
6	120	0.3336

Ecuación:  $Y = 0.928 - 0.0141x + 0.000804x^2 - 2.07E-5x^3 + 2.05E-7x^4 - 6.92E-10x^5$

## 5.6 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO

qs: Es la velocidad específica de consumo de sustrato puede calcularse en la curva del gráfico de la figura N°9 trazando rectas tangentes en diferentes

tiempos, el valor de la pendiente de cada recta tangente multiplicada por el valor inverso de X en este tiempo, representa esta velocidad (mg de sustrato consumido/mg de biomasa que se forman en un litro de medio de cultivo).

$$qs = -\frac{1}{x} \times -\frac{ds}{dt}$$

Donde:

qs: velocidad específica de consumo de sustrato(g/L.h)

$\frac{ds}{dt}$ : velocidad volumétrica de consumo de sustrato (pendiente de la tangente)

x : Biomasa (gr de biomasa / L )

Ejemplo para t = 24 horas

$$qs = -(0.5556) \times -(-0.0011)$$

$$qs = -0.00061116 \frac{\text{mg de Almidón}}{\text{mg de biomasa} \times \text{L}}$$

TABLA N° 8: Velocidad específica de consumo de sustrato

Tiempo (Horas)	Tangente	Pendientes de las rectas tangentes	1/X (mg/mL)	qs de almidón/(mg de biomasa x L)
24	<b>A</b>	<b>-0.0011</b>	0.5556	-0.00061116
48	<b>B</b>	<b>-0.0077</b>	0.4492	-0.00345912
72	<b>C</b>	<b>-0.0072</b>	0.3328	-0.02396007
96	<b>D</b>	<b>-0.0004</b>	0.2385	-9.542E-05
120	<b>E</b>	<b>-0.0159</b>	0.1711	-0.00272074

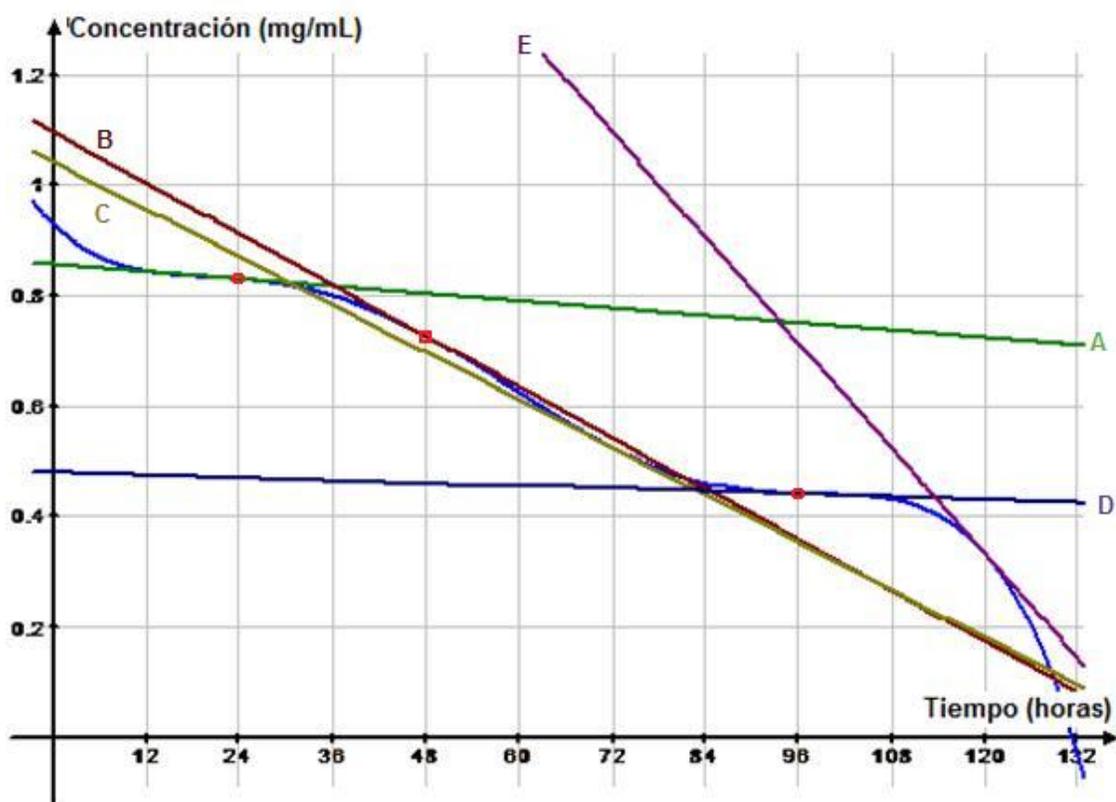


Fig. N° 10: Velocidad Específica de Consumo de sustrato Concentración de sustrato vrs Tiempo

En la figura N° 10 se puede determinar el comportamiento que experimenta el consumo de sustrato durante el proceso de producción de  $\alpha$ -amilasa. La máxima velocidad de consumo de sustrato se mantiene constante durante las primeras 24 horas y obtiene un máximo de consumo de sustrato a las 48 horas después de haber iniciado el proceso y se mantiene aproximadamente constante hasta las 84 horas. A las 96 horas hay un consumo constante de sustrato debido a que el crecimiento microbiano entra en la fase estacionaria, en la fase de muerte se observa un consumo más rápido de sustrato que en la fase estacionaria tal como se observa a las 120 horas.

### 5.7 VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE PRODUCCIÓN DE $\alpha$ -AMILASA<sub>(3)</sub>

Para la cuantificación de la actividad enzimática de la amilasa se utiliza el Método de lugol, que se basa en el rompimiento de las moléculas de almidón debido a la hidrólisis de los enlaces 1,4- $\alpha$ -glucosidos, produciendo dextrinas de peso molecular relativamente bajos, licuando por lo tanto el almidón y destruyendo su capacidad de dar coloración con el yodo.

Con este método se cuantifica la actividad amilolítica en forma indirecta, ya que se determinan los miligramos de almidón hidrolizados, los cuales son calculados por medio de la siguiente ecuación.

$$\text{mg de Almidón Hidrolizados} = \text{mg de almidón originales} \times \frac{T_b - T_a}{T_a}$$

$$\text{mg de Almidón Hidrolizado} = \text{mg de Almidón originales} \times \frac{\lambda \text{ de Tubo 2} - \lambda \text{ de Tubo 1}}{\lambda \text{ de Tubo 2}}$$

Donde:

$\lambda$  de Tubo 1: Longitud de onda de la enzima activa

$\lambda$  de Tubo 2: Longitud de onda de la enzima inactiva

Ejemplo para t = 24 horas

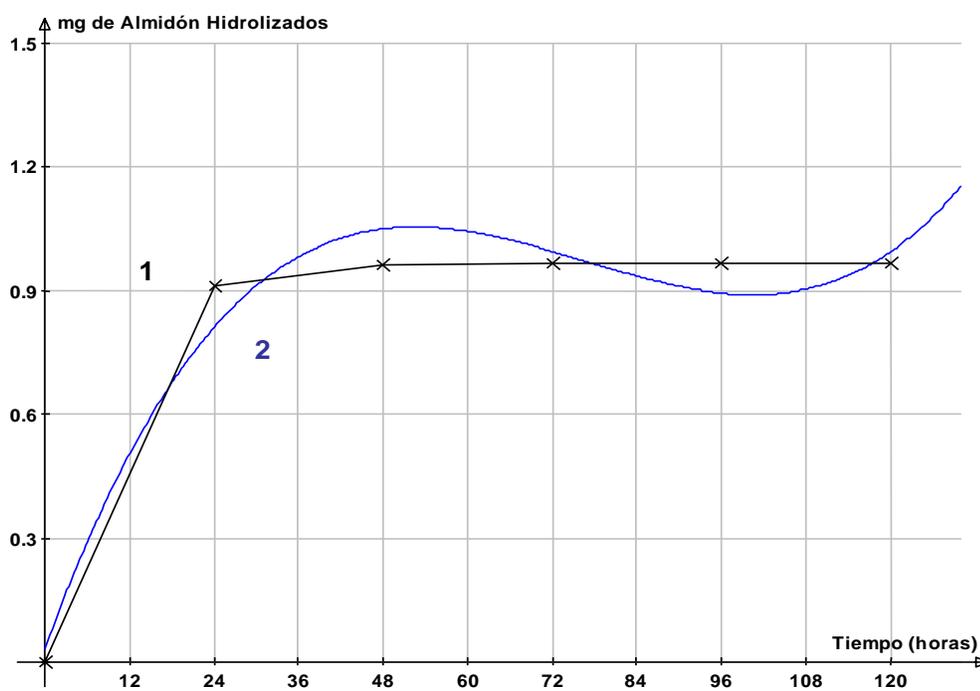
$$\text{mg de Almidón Hidrolizados} = 0.98 \text{ mg} \times \frac{(0.043 \text{ nm}) - (0.003 \text{ nm})}{0.043 \text{ nm}}$$

$$\text{mg de Almidón Hidrolizados} = 0.98 \text{ mg} \times \frac{0.04 \text{ nm}}{0.043 \text{ nm}}$$

$$\text{mg de Almidón Hidrolizados} = 0.9116 \text{ mg}$$

TABLA N° 9: Almidón hidrolizado por la  $\alpha$ -amilasa (actividad amilolítica)

N° de Muestra	Tiempo (horas)	Absorbancia Tubo 1 $\lambda=450$ nm	Absorbancia Tubo 2 $\lambda=450$ nm	*mg de Almidón Hidrolizado
1	0	0.05	0.05	0
2	24	0.003	0.043	0.9116
3	48	0.008	0.478	0.9636
4	72	0.017	1.269	0.9669
5	96	0.022	1.599	0.9665
6	120	0.024	2.051	0.9685

Fig. N° 11: Curva de Formación de Producto (Actividad de  $\alpha$ -Amilasa) mg de Almidón Hidrolizado por la  $\alpha$ -amilasa vrs. Tiempo

- La **Curva N° 1** se obtiene graficando los resultados obtenidos experimentalmente.

- La **Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

En la figura N° 11 se observa que la mayor actividad de la amilasa se da después de las primeras 48 horas en donde se mantiene casi constante a las 72 horas después de haber iniciado el proceso de producción de la amilasa.

TABLA N° 10: Aplicación de regresión polinomial a los resultados del almidón hidrolizado durante el proceso de producción por la  $\alpha$ -amilasa

Tiempo (horas)	mg de Almidón Hidrolizados
0	0
24	0.8122
48	1.0531
72	1.0016
96	0.9048
120	1.0098

$$\text{Ecuación: } Y = 0.0316 + 0.0472X - 0.000683X^2 + 2.98E-6X^3$$

La tabla N° 10 contiene los datos experimentales sometidos a una regresión polinomial los cuales están graficados en la figura N° 10

TABLA N° 11: Porcentaje de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa

Tiempo (horas)	mg de Almidón Hidrolizados	Porcentaje de actividad (%)
0	0	0
24	0.8122	77.1247
48	1.0531	100
72	1.0016	95.1097
96	0.9048	85.9178
120	1.0098	95.8883

En la tabla N° 11 Contiene los porcentajes de almidón hidrolizado tomando en cuenta como el 100% de la actividad amilolítica de la enzima la mayor cantidad de almidón que se hidrolizó durante todo el proceso, el cual se da a las 48 horas hidrolizando 1.0531 mg de almidón.

## 5.8 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE PRODUCCIÓN DE $\alpha$ -AMILASA

TABLA N° 12: Velocidad especifica de formación de producto

Tiempo (Horas)	Tangente	Pendientes de las rectas tangentes	1/X (mg/mL)	qp( mg de Almidón Hidrolizado) / (mg de biomasa x L)
24	A	0.0196	0.5556	0.0109
48	B	0.0022	0.4492	0.0010
72	C	-0.0048	0.3328	-0.0016
96	D	-0.0015	0.2385	-0.0004
120	E	0.0120	0.1711	0.0021

$$qp = \frac{1}{x} \times \frac{dp}{dt}$$

Donde:

qp: Velocidad especifica de formación de producto

$\frac{1}{x}$ : Inverso de la biomasa

$\frac{dp}{dt}$ : derivada del producto con respecto al tiempo (pendiente de la tangente)

Ejemplo para t = 24 horas

$$qp = 0.5556 \times 0.0196$$

$$qp = 0.0109 \frac{\text{mg de Almidón Hidrolizado}}{\text{mg de biomasa} \times \text{L}}$$

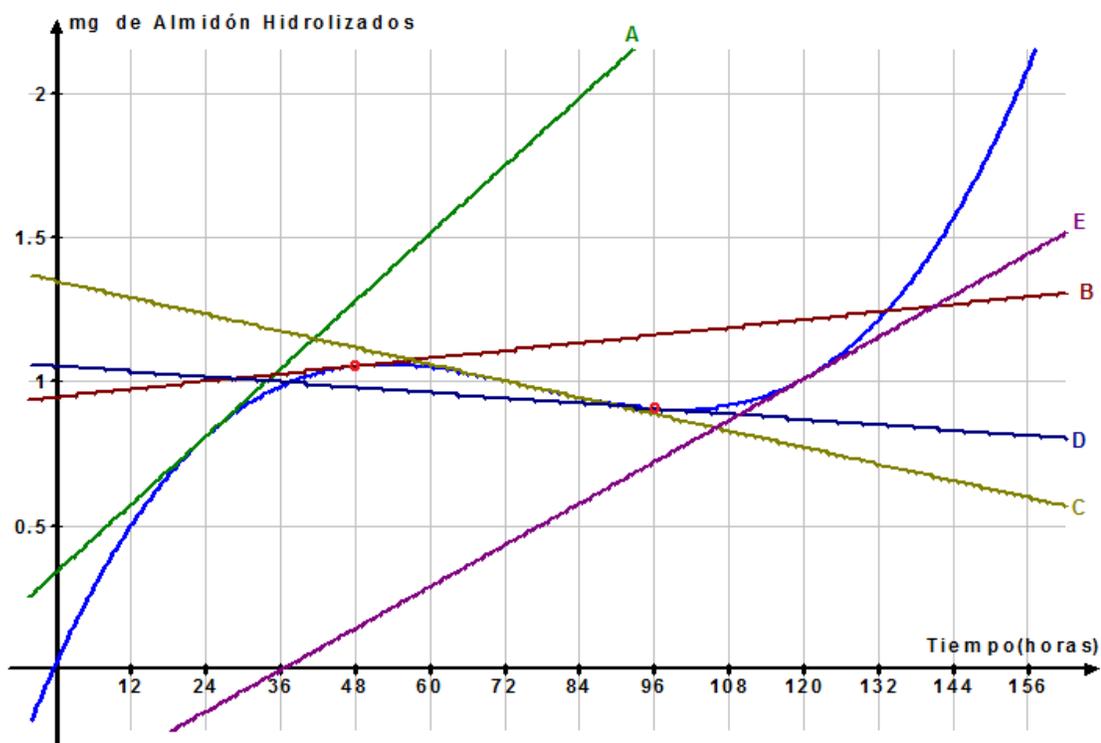


Fig. N° 12: Cálculo de la Velocidad Específica de Formación de Producto mg de Almidón Hidrolizado vs. Tiempo

qp: La velocidad específica de formación de producto puede calcularse en la figura de la N° 12, trazando rectas tangentes en diferentes tiempos, el valor de la pendiente de cada recta tangente multiplicada por el inverso del valor de la biomasa en ese tiempo, representa esta velocidad (mg de amilasa/mg de biomasa).

En la figura N° 12 puede determinarse el comportamiento que ocurre durante el proceso de formación de  $\alpha$ -amilasa. La tendencia del gráfico en la producción de  $\alpha$ -amilasa está relacionada con el crecimiento del *Bacillus subtilis*. La máxima velocidad específica de formación de  $\alpha$ -amilasa se produce durante la

fase exponencial, fase la cual ocurre durante las primeras 48 horas después de iniciado el proceso de producción. En la fase estacionara que se da a las 96 horas es mínima la formación de enzima. Al final de la fase estacionaria se observa un aumento de producción de  $\alpha$ -amilasa debido a que se a consumido los primeros azucres formados a partir del almidón inicial luego se forman nuevos azucres del almidón restante aun no hidrolizado.

## 5.9 RENDIMIENTOS DE BIOMASA

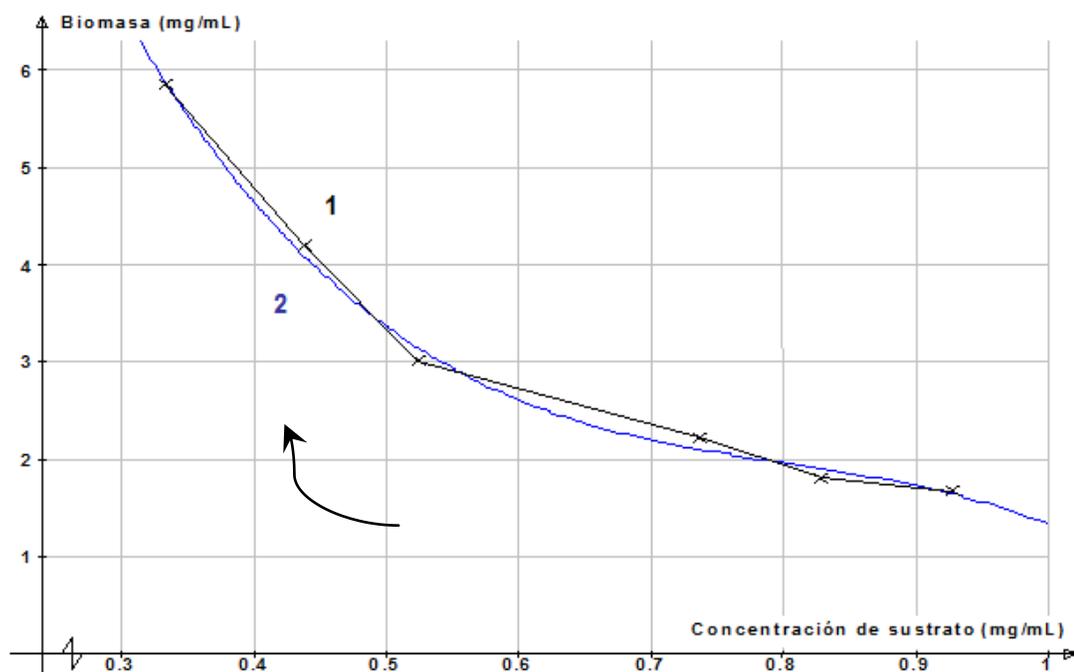


Fig. N°13: Curva de Rendimiento de Biomasa sobre Sustrato  
Biomasa vrs. Consumo de Sustrato

TABLA N° 13: Rendimiento de biomasa sobre el almidón (X/S)

Valor de Ln X (biomasa mg/mL)	Concentración de Almidón (sustrato mg/ mL)
1.6700	0.9280
1.7997	0.829
2.226	0.7363
3.005	0.5247
4.192	0.4384
5.844	0.3336

- La **Curva N° 1** se obtiene mediante la aplicación de regresión polinomial a los resultados de biomasa formados y consumo de sustrato (mg/mL).
- La **Curva N° 2** corresponde a la tendencia idealizada de la relación de biomasa formada y consumo de sustrato (mg/mL).

En la figura N° 13 puede observarse que a medida aumenta la cantidad de biomasa disminuye la cantidad de sustrato, lo cual nos indica que el microorganismo esta hidrolizando el almidón que se encuentra en el medio de cultivo como sustrato por medio de la  $\alpha$ -amilasa transformándolo así en azúcares menos complejos con el cual el *Bacillus subtilis* se alimenta para seguir reproduciéndose.

TABLA N° 14: Rendimiento específico de biomasa sobre el almidón (X/S)

Tiempo (horas)	Tangente	Valor de Pendientes de las Rectas Tangentes	$Y_{X/S}$ (mg biomasa / mg sustrato consumido)
30	<b>A</b>	<b>-23.7560</b>	-23.76
50	<b>B</b>	<b>-9.9000</b>	-9.90
80	<b>C</b>	<b>-2.0760</b>	-2.08
100	<b>D</b>	<b>-5.5000</b>	-5.50



Fig. N°14: Rendimiento Especifico de Biomasa sobre Sustrato ( $X/S$ )  
Biomasa vrs. Concentración de sustrato (mg/mL)

$Y_{X/S}$ : El rendimiento específico de formación de biomasa sobre consumo de sustrato puede calcularse en la figura de la curva del grafico N° 13, trazando rectas tangentes en diferentes tiempos, el valor de la pendiente de cada tangente representa este rendimiento (mg de biomasa formada por mg de sustrato consumido) en un tiempo específico.

El rendimiento específico de biomasa sobre sustrato  $y_{x/s}$  se calcula en la figura N° 14 puede observarse el comportamiento que existe entre la cantidad de biomasa que se esta formando en relación con la cantidad de sustrato que se consume. El grafico muestra como la cantidad de sustrato disminuye a medida

que la cantidad de biomasa aumenta. Los rendimientos poseen valores negativos debido a que es mayor la cantidad de sustrato que se esta consumiendo en relación a la cantidad de biomasa que se esta formando, a las 80 horas este valor disminuye pero aumenta nuevamente a las 100 horas.

### 5.10 RENDIMIENTO DE PRODUCTO

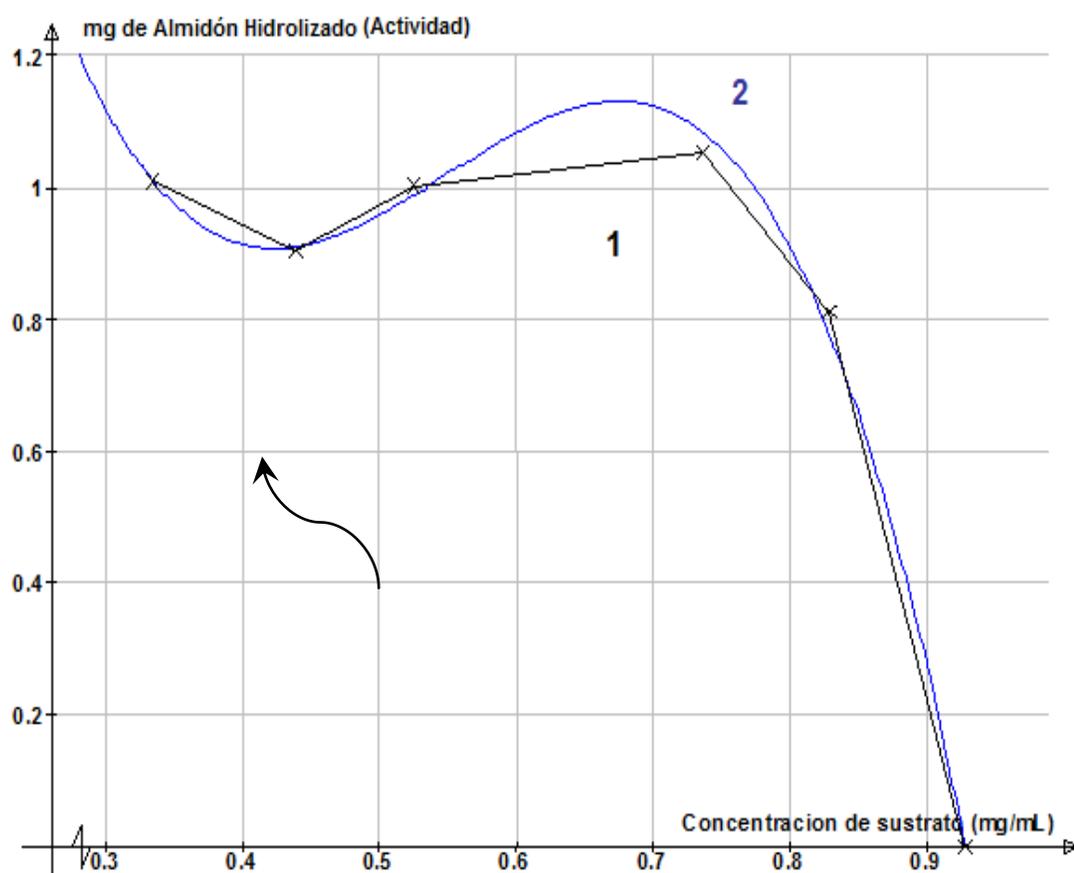


Fig N° 15: Curva de Rendimiento de Producto sobre Sustrato Concentración de Sustrato vrs. mg almidón hidrolizado por la  $\alpha$ -Amilasa (actividad)

- La **Curva N° 1** se obtiene mediante la aplicación de regresión polinomial a los resultados de mg de almidón hidrolizados y consumo de sustrato (mg/mL).
- La **Curva N°2** corresponde a la tendencia idealizada de la relación del producto ( $\alpha$ -amilasa) y consumo de sustrato.

TABLA N° 15: Rendimiento de producto sobre sustrato ( $Y_p/s$ )

mg de Almidón Hidrolizados	Concentración de Almidón
0	0.928
0.8122	0.829
1.0531	0.7363
1.0016	0.5247
0.9048	0.4384
1.0098	0.3336

En la figura N° 15 puede observarse que a medida disminuye la concentración del sustrato aumenta la cantidad de almidón hidrolizado, lo cual nos indica que la  $\alpha$ -amilasa se encuentra en forma activa en el medio de cultivo.

TABLA N° 16: Rendimiento específico de producto sobre sustrato ( $Y_p/s$ )

Tiempo(horas)	Tangente	Pendientes de las rectas tangentes	$Y_{p/s}$ (mg de $\alpha$ -amilasa/mg de sustrato)
10	<b>A</b>	<b>-15.4110</b>	-15.4110
30	<b>B</b>	<b>-3.8190</b>	-3.8190
50	<b>C</b>	<b>1.1249</b>	1.1249
80	<b>D</b>	<b>-0.5790</b>	-0.5790

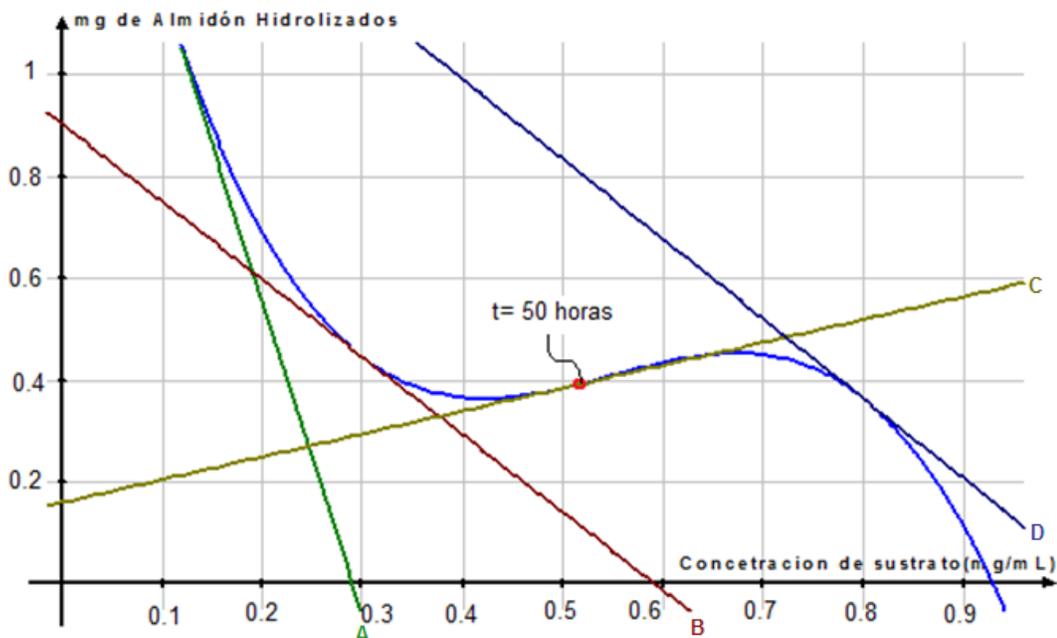


Fig N° 16: Rendimiento específico de Producto sobre sustrato ( $Y_{p/s}$ )  
Concentración de Sustrato vs. mg almidón hidrolizado (actividad)

$Y_{p/s}$ : El rendimiento específico de formación de producto sobre consumo de sustrato puede calcularse en la figura de la curva del gráfico N°15, trazando rectas tangentes en diferentes tiempos, el valor de la pendiente de cada recta tangente representa este rendimiento (mg de amilasa formada por mg de sustrato consumido) en un tiempo específico.

En la figura N° 16 puede observarse el comportamiento que existe entre la cantidad de  $\alpha$ -amilasa formada con relación a la cantidad de sustrato que se consume. La tendencia del gráfico permite establecer que al disminuir el sustrato aumenta la cantidad de amilasa producida. El máximo rendimiento específico se produce durante la fase exponencial. Los rendimientos poseen

valores negativos hasta antes de las 50 horas, ya que es la mayor cantidad de sustrato que se está consumiendo en relación con la cantidad de amilasa formada. Esta relación cambia cuando el proceso de producción alcanza las 50 horas, ya que en este tiempo es mayor la cantidad de enzima que se ha producido en relación con la cantidad de sustrato que se consume, de ahí que a este tiempo el valor del rendimiento sea positivo.

### 5.11 VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE FORMACIÓN DE AZUCARES

TABLA N° 17: Aplicación de la regresión lineal a los resultados del análisis de fenol-sulfúrico.

N° de Estándar	mL de solución de Sacarosa	mL de Agua Destilada	mL de Fenol al 80%	mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Valor de la Absorbancia	Concentración (mg/mL)
1	0.0	2.0	1.0	5.0	0.014400	0
2	0.1	1.9	1.0	5.0	0.677500	0.00530
3	0.2	1.8	1.0	5.0	0.149900	0.01060
4	0.4	1.6	1.0	5.0	0.314200	0.02120
5	0.5	1.5	1.0	5.0	0.396350	0.02660
6	0.6	1.4	1.0	5.0	0.478500	0.03180
7	0.8	1.2	1.0	5.0	0.642800	0.04240
8	1.0	1.0	1.0	5.0	0.807100	0.05300
9	1.5	0.5	1.0	5.0	1.155075	0.07545
10	2.5	0.0	1.0	5.0	1.628600	0.10600

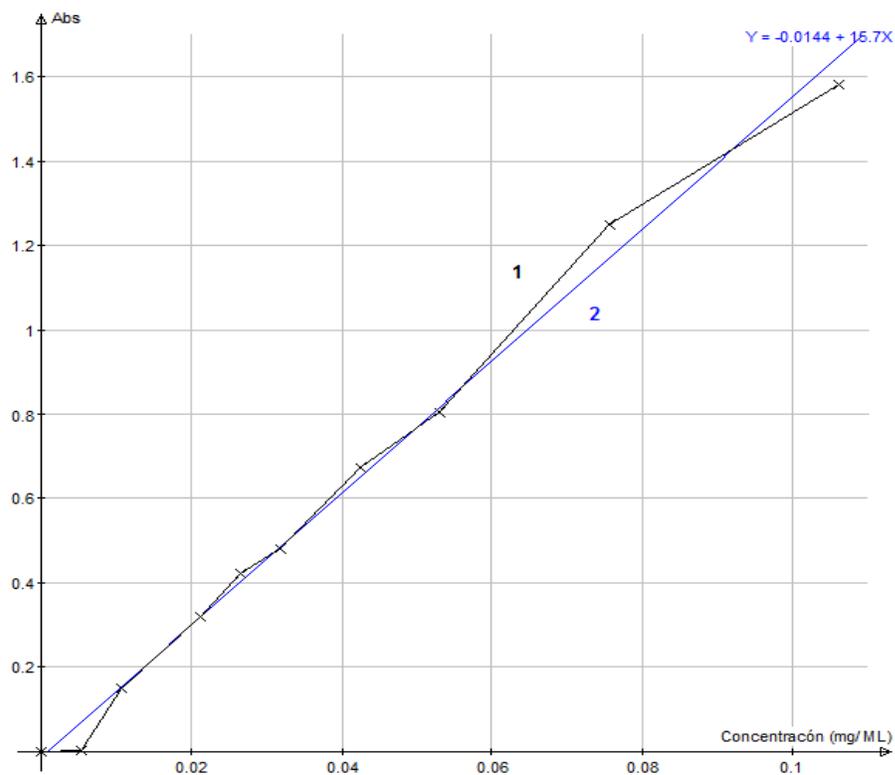


Fig. N° 17: Curva Fenol-Sulfúrico Concentración vrs. Absorbancia

- La **Curva N° 1** se obtiene graficando los resultados de los estándares de sacarosa obtenidos experimentalmente.
- La **Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de regresión lineal a los resultados de los estándares de sacarosa obtenidos experimentalmente.

Ecuación:  $Y = -0.0144 + 15.7X$  es el resultado de la aplicación del método de regresión lineal a los estándares de sacarosa obtenidos experimentalmente

TABLA N° 18: Concentración de azúcares obtenidos durante la producción de  $\alpha$ -amilasa

Azúcares		
Tiempo	Abs	[mg/mL]
0	0.14500	0.01028
24	0.25167	0.01717
48	0.48767	0.03239
72	0.79667	0.05233
96	0.97500	0.06383
120	1.23433	0.08056

$$Y = -0.0144 + 15.7X$$

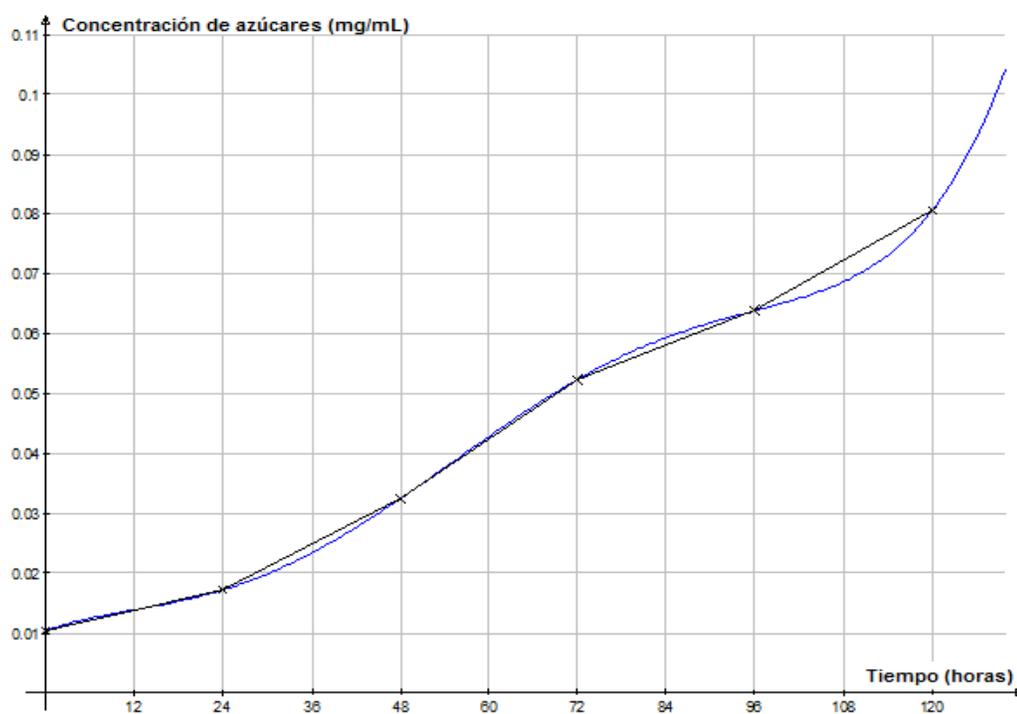


Fig. N° 18: Curva de azúcares Concentración de azúcares vrs tiempo

- La **Curva N° 1** se obtiene graficando los resultados de sacarosa en las muestras obtenidos experimentalmente.

- La **Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de regresión lineal a los resultados de sacarosa en las muestras obtenidos experimentalmente.

En la figura N° 18 se puede observar que a medida pasa el tiempo aumenta la concentración de azúcares debido a que la  $\alpha$ -amilasa esta hidrolizando el almidón en azúcares menos complejos.

TABLA N° 19: Aplicación de regresión polinomial a los resultados del análisis de muestras por el método fenol sulfúrico, para la cuantificación de azúcares totales durante el proceso de producción de la  $\alpha$ -amilasa

Azúcares		
Tiempo	Abs	[mg/mL]
0	0.14500	0.01030
24	0.25167	0.01717
48	0.48767	0.32520
72	0.79667	0.05323
96	0.97500	0.06698
120	1.23433	0.08864

$$Y = 0.0103 + 0.000466x - 2.36E-5x^2 + 8.97E-7x^3 - 1.03E-8x^4 + 3.81E-11x^5$$

## 5.12 VELOCIDAD ESPECIFICA DE FORMACIÓN DE AZÚCARES ( $qp_2$ ).

TABLA N° 20: Velocidad específica de formación de azúcares

Tiempo	Tangente	Pendientes de las rectas tangentes	1/X (mg/mL)	$qp_2$ (mg de Azúcar Producidos)/(mg de Biomasa x L)
24	<b>A</b>	<b>0.00037</b>	0.5556	0.00020557
48	<b>B</b>	<b>0.00085</b>	0.4492	0.00038182
72	<b>C</b>	<b>0.00076</b>	0.3328	0.00025293
96	<b>D</b>	<b>0.00046</b>	0.2385	0.00010971
120	<b>E</b>	<b>0.0019</b>	0.1711	0.00032509

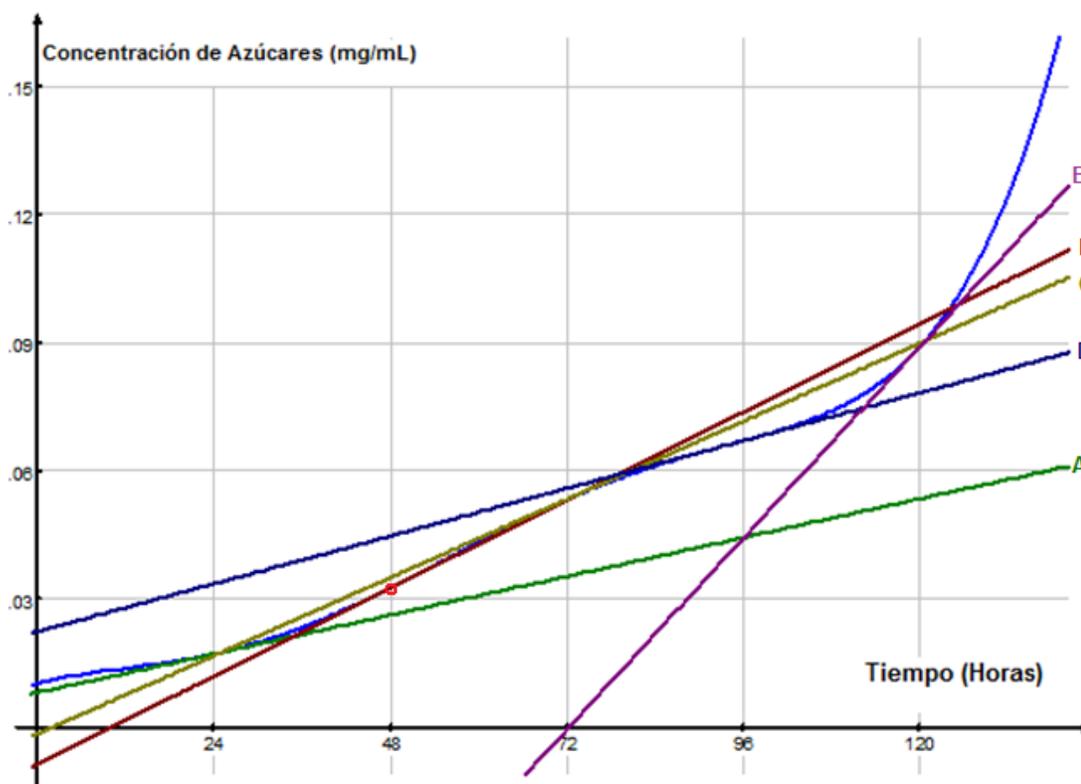


Fig. N° 19: Producción de Azúcares, Concentración de Azúcares vrs Tiempo

qp<sub>2</sub>: La velocidad específica de formación de producto puede calcularse en la figura N° 19, trazando rectas tangentes en diferentes tiempos, el valor de la pendiente de cada recta tangente multiplicada por el inverso del valor de la biomasa en ese tiempo, representa esta velocidad (mg de amilasa/mg de biomasa).

En la figura N° 19 puede determinarse el comportamiento que ocurre durante el proceso de formación de  $\alpha$ -amilasa. La tendencia del grafico en la producción de Azucares esta relacionada con la  $\alpha$ -Amilasa. La máxima velocidad especifica de formación de azucares se produce durante la fase exponencial, fase la cual ocurre durante las primeras 48 horas después de iniciado el proceso de producción. En la fase estacionara hay una disminución en la producción de azucares. En la fase de muerte la velocidad continua disminuyendo debido a que la capacidad de reproducción de las células microbianas es menor en relación a la cantidad de células que están muriendo.

### 5.13 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE PH EN MUESTRAS DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE $\alpha$ -AMILASA

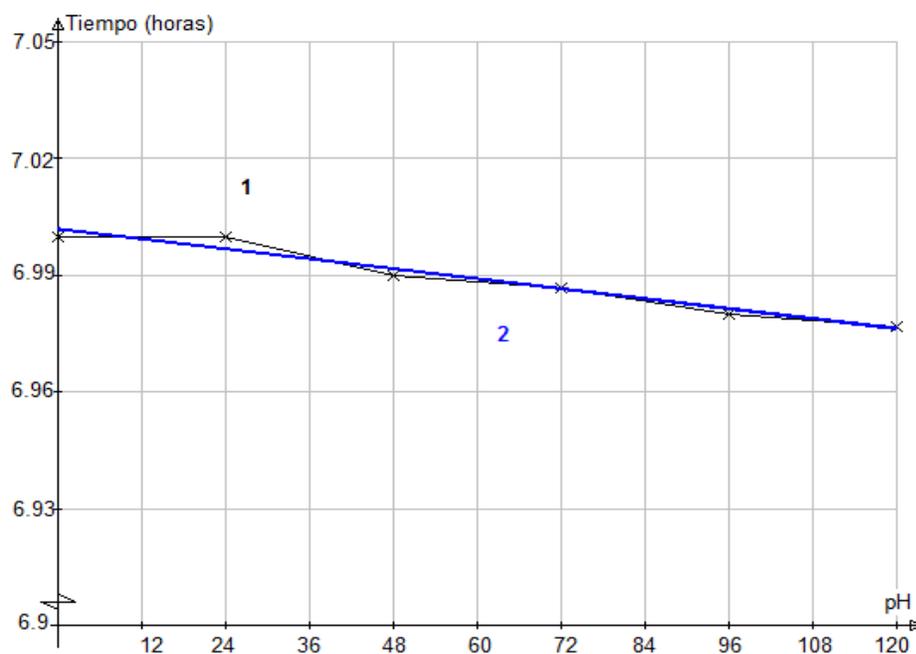


Fig. N° 20: Curva de pH vrs. Tiempo

- La **Curva N° 1** se obtiene graficando los resultados obtenidos experimentalmente.
- La **Curva N° 2** se obtiene aplicando el método de regresión lineal a los resultados obtenidos experimentalmente.

En la figura 20 puede observarse que a medida pasa el tiempo el pH casi se mantiene constante solo disminuye en muy poca cantidad.

TABLA N° 21: Aplicación de la regresión lineal a los resultados del análisis de pH en muestras durante el proceso de producción de  $\alpha$ -amilasa.

N° de Muestra	Tiempo (horas)	pH
1	0	7
2	24	6.9949
3	48	6.9897
4	72	6.9884
5	96	6.9794
6	120	6.9743

$$\text{Ecuación: } Y = 7 - 0.000214X$$

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0 CONCLUSIONES

1. En los diferentes métodos empleados al obtener los datos para la curva de producción de la cinética de crecimiento nos dan las velocidades óptimas de consumo de sustrato y la máxima producción de amilasa.
1. Es necesario que durante todo el proceso de fermentación en la producción de  $\alpha$ -amilasa el pH se mantenga dentro del rango óptimo de acción el cual es 5.0-7.0 con el fin de favorecer la actividad amilolítica de  $\alpha$ -amilasa bacteriana.
2. El método de fenol-sulfúrico, para la cuantificación de azúcares totales, permite evaluar la transformación de almidón en azúcares, obteniendo así la máxima velocidad específica de formación de azúcares que se produce durante la fase exponencial, fase que ocurre durante las primeras 48 horas después de iniciado el proceso de producción.
3. La utilización de cáscara de papa, demostró un amplio uso como sustrato. Convirtiéndolo así en un deshecho orgánico utilizable que es fácil de obtener, con un valor económico sumamente bajo, contribuyendo así con el medio ambiente, aprovechando este recurso el cual tiene poco uso industrial.

4. El ***Bacillus subtilis*** es un microorganismo útil para la producción de amilasa que posee la capacidad de formar esporas, resistir tanto altas como bajas temperaturas de fácil identificación y aislamiento.

**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7.0 RECOMENDACIONES

1. Que la enzima pueda ser producida a niveles industriales, siguiendo los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiana en el presente trabajo.
2. Realizar diferentes estudios con diferentes desechos vegetales que contengan almidón tales como cáscara de yuca, agua de cocimiento de maíz, residuos de trigo y otros.
3. Colocar un antioxidante a las cáscaras de papa al momento de ser obtenida, ya que la cáscara de papa se oxida con mucha facilidad y esto interfiere al momento de realizar los análisis, el sustrato se vuelve oscuro.
4. Realizar nuevos estudios utilizando cinética de crecimiento con diferentes microorganismos.
5. Dar a conocer este proyecto a la industria por medio de las autoridades de la Universidad de El Salvador (UES) de forma que pueda ser implementado en un momento dado en nuestro país.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Brown, C y otros. 1989 Introducción a la biotecnología, 1<sup>ra</sup> edición, Editorial Acrivia, S. A. Zaragoza España.
2. Cabello, VA. 1989. Microbiología Industrial.1<sup>ra</sup> edición: Manual de laboratorio de Microbiología Industrial. Editorial Acribia, S.A.
3. Castellanos, V y Chicas, J, 2003 “Producción de Proteína Unicelular, utilizando Agua de Cocimiento de Maíz como medio de cultivo y estudio cinético del crecimiento de ***Candida utilis***” El Salvador: Facultad de Química y Farmacia, Universidad Nacional de El Salvador (UES).
4. Chacón B, y Díaz, V. 2002 “Elaboración de un preparado a base de enzimas inmovilizadas por atrapamiento en gel de agar, para el tratamiento de desechos orgánicos presentes en aguas residuales” El Salvador: Facultad de Química y Farmacia, Universidad Nacional de El Salvador (UES).
5. Huitron, C. Biotecnología de Enzimas 1<sup>ra</sup> edición Instituto de Investigaciones Biomédicas, México D.F. 1981.
6. Jagnow, G y otros.1991 Biotecnología, producción con experimento modelo. Editorial Acribia S.A., Zaragoza España. Trad. MO López
7. Laguna, J. 1995 Bioquímica 4<sup>ta</sup> edición México D.F. Ciencia y Cultura Latino Americana S.A. de C.V. p. 33 – 35
8. Scragg, A 1996. Biotecnología para ingenieros sistemas biológicos en procesos tecnológicos. 1<sup>ra</sup>.edición Editorial Limusa México. Trad. L Huerta
9. Wulf, G y otros Biotecnología manual de microbiología industrial. 1<sup>ra</sup> edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España 1989.

10. Benítez, J. Reacciones químicas. Biotecnología. Aplicaciones industriales textiles. Glucoamilasa. Glucosa isomerasa (en línea) Buenos Aires, Argentina, StarMedia Consultado el 27 de jul. 2007. Disponible en: [http://html.rincondelvago.com/enzimas\\_9.html](http://html.rincondelvago.com/enzimas_9.html)
11. Wales, J. ***Bacillus subtilis*** (en línea) EEUU, Wikipedia la enciclopedia de contenido libre. Consultado el 27 de jul. 2007. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Bacillus\\_subtilis#cite\\_ref-0](http://es.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis#cite_ref-0)
12. Wales, J. ***Solanum tuberosum*** (en línea) EEUU, Wikipedia la enciclopedia de contenido libre. Consultado el 27 de jul. 2007. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Patata>
13. Wales, J. Almidón (en línea) EEUU, Wikipedia la enciclopedia de contenido libre. Consultado el 27 de jul. 2007. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Almid%C3%B3n>
14. Wales, J. Enzima (en línea) EEUU, Wikipedia la enciclopedia de contenido libre. Consultado el 16 de abr. 2009. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Digesti%C3%B3n\\_qu%C3%ADmica](http://es.wikipedia.org/wiki/Digesti%C3%B3n_qu%C3%ADmica)
15. Wales, J. Microbiología Industrial (en línea) EEUU, Wikipedia la enciclopedia de contenido libre. Consultado el 17 de abr. 2009 Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Microbiolog%C3%ADa\\_industrial](http://es.wikipedia.org/wiki/Microbiolog%C3%ADa_industrial)
16. Delgado, M. y otros, Metrología Química I: Calibración de un pHmetro y Control de Calidad (en línea) Nicaragua, UNAN-León, Editorial Universitaria en Línea. Consultado 15 de nov. 2007. Disponible en: <http://www.unanleon.edu.ni/old/descargas/vip/revista/Articulo%202.pdf>

## **ANEXOS**

ANEXO N° 1

FROTIS DE CEPA **BACILLUS SUBTILIS**

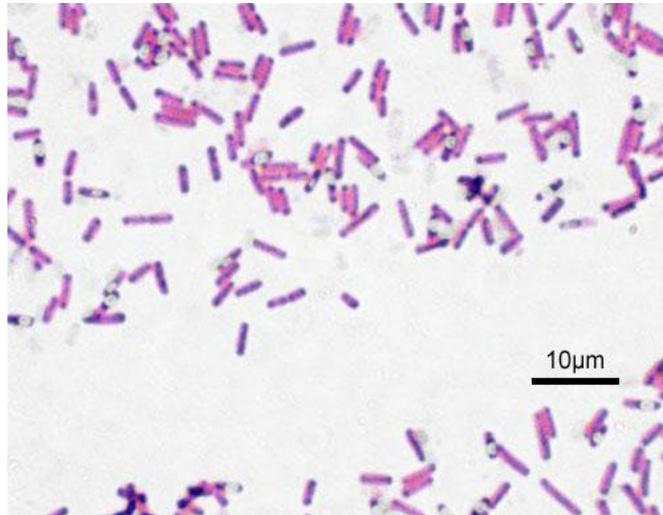


Fig. N° 21: Fotografía de cepa **Bacillus subtilis** vista al microscopio con un aumento de 100X

## ANEXO N° 2

PROMEDIO DE LA EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO EN EL  
PROCESO DE PRODUCCIÓN DE  $\alpha$ -AMILASA

TABLA N° 22: Resultados de la curva estándar de patrones Mcfarland

Escala Mcfarland	BaCl al 1%(mL)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Absorbancia	UFC/mL (x108)
1	0.1	9.9	0.2710	3
2	0.2	9.8	0.5635	6
3	0.3	9.7	0.8315	9
4	0.4	9.6	0.9621	12
5	0.5	9.5	1.2310	15
6	0.6	9.4	1.4570	18
7	0.7	9.3	1.6020	21
8	0.8	9.2	1.7950	24
9	0.9	9.1	1.9710	27
10	1.0	9.0	2.0430	30

TABLA N° 23: Resultado del análisis de muestras por el método turbidimétrico durante el proceso de producción de proteína unicelular

N° de Muestra	Tiempo (horas)	Absorbancia
1	0	0.5310
2	24	0.7227
3	48	0.8440
4	72	0.9517
5	96	0.9577
6	120	0.9610

TABLA N° 24: Aplicación de regresión lineal a la curva estándar de patrones mcfarland.

Escala Mcfarland	BaCl al 1%(mL)	H2SO4	Absorbancia	UFC/mL (x108)
1	0.1	9.9	0.3796	3
2	0.2	9.8	0.5782	6
3	0.3	9.7	0.7768	9
4	0.4	9.6	0.9754	12
5	0.5	9.5	1.1740	15
6	0.6	9.4	1.3726	18
7	0.7	9.3	1.5712	21
8	0.8	9.2	1.7698	24
9	0.9	9.1	1.9684	27
10	1.0	9.0	2.1670	30

Ecuación linealizada  $Y = 0.181 + 0.0662X$

ANEXO N° 3  
DETERMINACION DE ALMIDÓN EN LAS MUESTRAS

TABLA N° 25: Curva estándar de almidón

Concentración (mg/ml)	Absorbancia
0.001	0.118
0.010	0.270
0.100	0.415
1.000	0.570

TABLA N° 26: Resultados del análisis de muestras, para la cuantificación de almidón durante el proceso de producción de  $\alpha$  - amilasa.

N° de Muestra	Tiempo (horas)	Absorbancia del almidón en las muestras
1	0	0.560
2	24	0.525
3	48	0.487
4	72	0.410
5	96	0.365
6	120	0.299

## ANEXO N° 4

### DATOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE AZUCARES TOTALES

TABLA N° 27: Resultado de la curva patrón de azucares por el método de fenol-sulfúrico

N° de Estándar	mL de solución de Sacarosa	mL de Agua Destilada	mL de Fenol al 80%	mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Valor de la Absorbancia $\lambda=490$ nm	Concentración (mg/mL)
1	0.0	2.0	1.0	5.0	0	0
2	0.1	1.9	1.0	5.0	0.0025	0.0053
3	0.2	1.8	1.0	5.0	0.5510	0.0106
4	0.4	1.6	1.0	5.0	0.3209	0.0212
5	0.5	1.5	1.0	5.0	0.4218	0.0266
6	0.6	1.4	1.0	5.0	0.4822	0.0318
7	0.8	1.2	1.0	5.0	0.6729	0.0424
8	1.0	1.0	1.0	5.0	0.8038	0.0530
9	1.5	0.5	1.0	5.0	1.2504	0.0754
10	2.5	0.0	1.0	5.0	1.5817	0.1060

TABLA N° 28: Resultados del promedio del análisis de azucares totales a las muestras durante el proceso de producción de  $\alpha$ -amilasa.

Azucares	
Tiempo	Abs $\lambda=490$ nm
0	0.14500
24	0.25167
48	0.48767
72	0.79667
96	0.97500
120	1.23433

## ANEXO N° 5

### DATOS OBTENIDOS EN LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA $\alpha$ -AMILASA

TABLA N° 29: Resultado del promedio de actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa.

N° de Muestra	Tiempo (horas)	Absorbancia Tubo A $\lambda=450$ nm	Absorbancia Tubo B $\lambda=450$ nm
1	0	0.05	0.05
2	24	0.003	0.043
3	48	0.008	0.478
4	72	0.017	1.269
5	96	0.022	1.599
6	120	0.024	2.051

## ANEXO N° 6

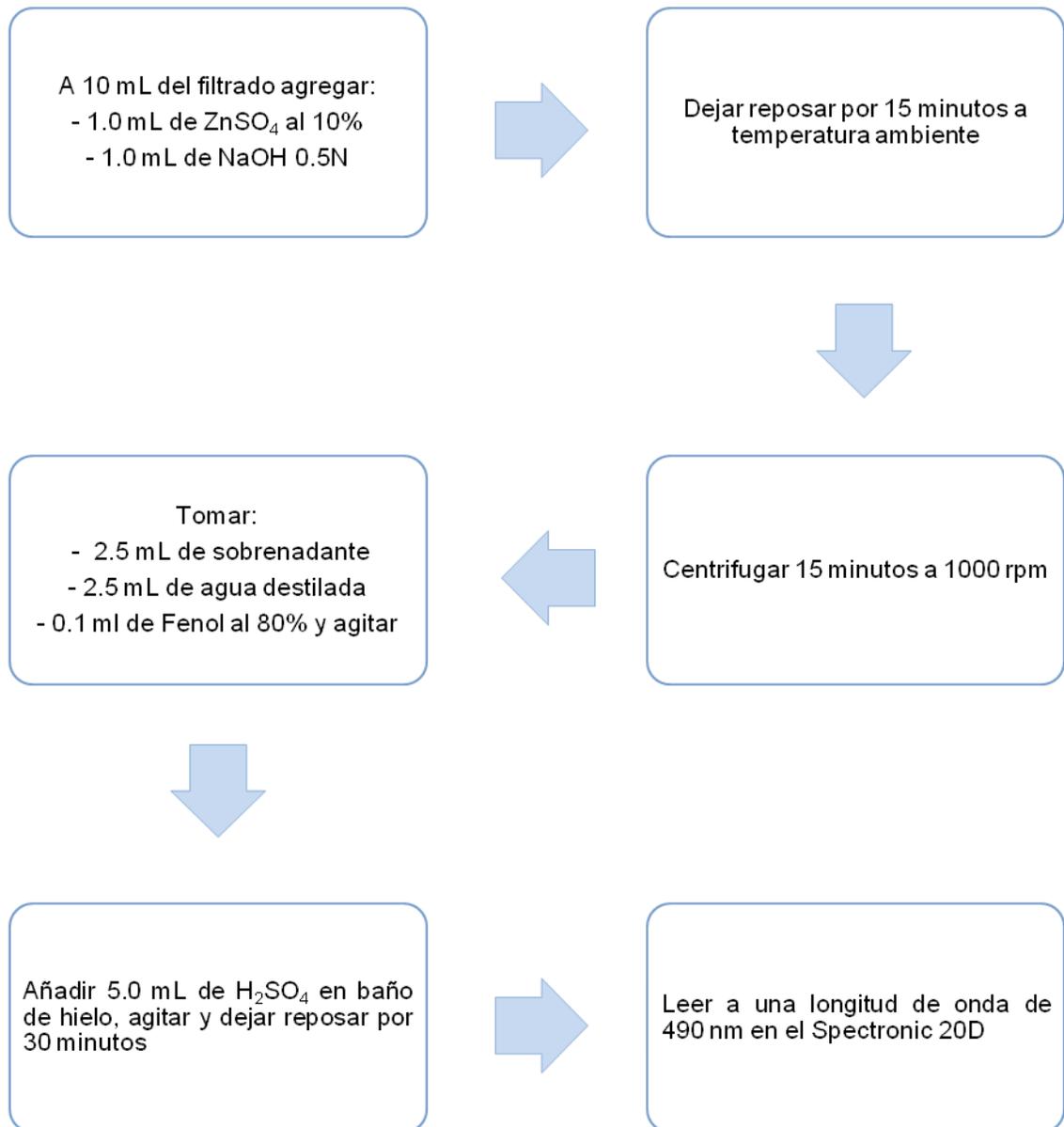
### DATOS OBTENIDOS EN LA TOMA DE pH

TABLA N° 30: Resultados del promedio del análisis de pH en muestras durante el proceso de producción de  $\alpha$ -amilasa.

Tiempo (horas)	pH
0	7.0
24	7.0
48	6.990
72	6.9867
96	6.9800
120	6.9767

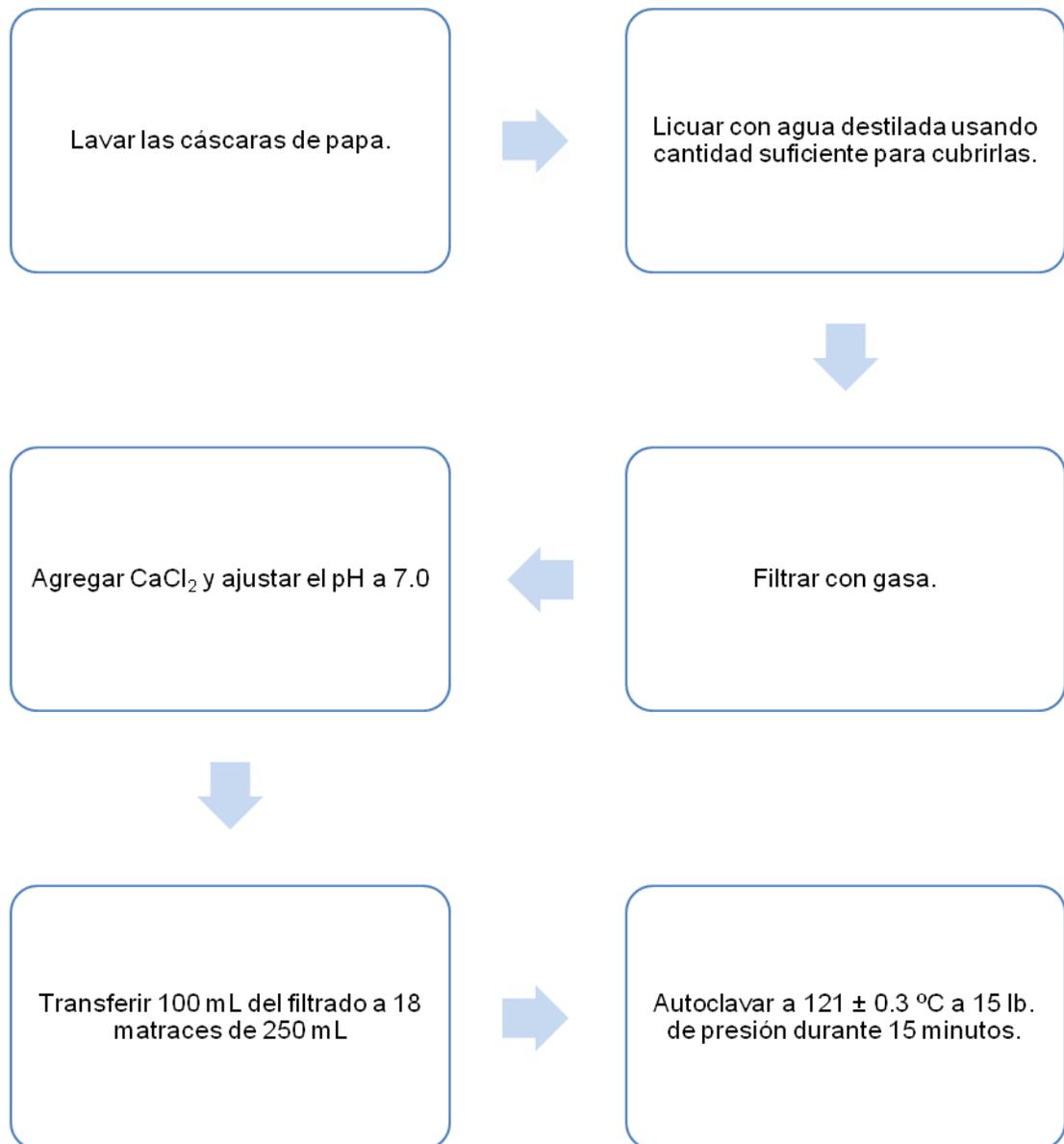
## ANEXO N° 7

### DIAGRAMA PARA LA DETERMINACION DE AZÚCARES POR EL MÉTODO DEL FENOL-SUFURICO



## ANEXO N° 8

### PREPARACIÓN DEL SUSTRATO A PARTIR DEL ALMIDÓN DE LAS CASCARAS DE PAPA



## ANEXO N° 9

### DIAGRAMA PARA LA DETERMINACION DE AMILASAS

TABLA N° 31: Determinación de amilasa en las muestras

N° tubo	Almidón al 1% en buffer de acetato 0.1N y pH 4.6	Buffer acetato 0.1N pH 4.6	Solución de CaCl <sub>2</sub> 0.5M	Filtrado	Volumen total de solución
1	5.0 mL	3.9 mL	1.0 mL	0.1 mL	10 mL
2	5.0 mL	3.9 mL	1.0 mL	0.1 mL	10 mL
3	5.0 mL	9.0 mL	1.0 mL	0.0 mL	10 mL



 Tubo 1	 Tubo 2	 Tubo 3	<p>A cada tubo con 10 mL de solución agregar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 mL de HCl 1.0 N</li> <li>- Llevar a 28 °C (temperatura ambiente) por 5 minutos</li> </ul>
---	---	---	--



 Matraz 1	 Matraz 2	 Matraz 3	<p>En cada matraz volumétrico de 50mL según el número del tubo agregar:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1.0 mL de la mezcla</li> <li>- 0.5 mL HCl 1.0N</li> <li>- 0.1 mL de lugol</li> <li>- Aforar con agua destilada</li> <li>- Leer a una longitud de onda de 450 nm</li> </ul>
---	---	---	---

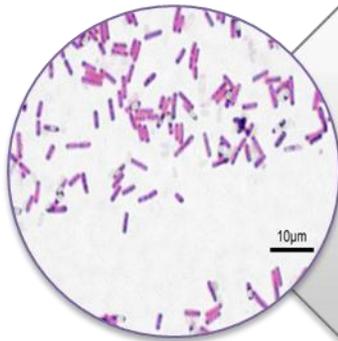
Formula para determinar los mg de almidón hidrolizados:

$$\text{mg de Almidón Hidrolizado} = \text{mg de Almidón originales} \times \frac{\lambda \text{ de Tubo 2} - \lambda \text{ de Tubo 1}}{\lambda \text{ de Tubo 2}}$$

Nota: El filtrado que se coloca en el tubo 2 debe inactivarse antes de añadirse esto se logra calentando el filtrado a ebullición durante 10 minutos.

## ANEXO N° 10

### PREPARACIÓN DEL INOCULO



#### Estado del Microorganismo

Realizar tinción de Gram. Ver al microscopio a una magnitud de 100X luego observar la morfología de las células bacterianas del *Bacillus subtilis*, las cuales se presentan en forma de bastones grandes de color violeta Gram (+) con esporas en los polos.



#### Siembra del *Bacillus subtilis*

Sembrar en 2 placas que contengan agar TSA por medio de estrias, se dejan incubar a temperatura ambiente por un periodo de 24 horas.



#### Adaptación de la bacteria al Medio de Cultivo

Agregar de 2 a 3 mL de agua destilada estéril a cada placa y suspender las bacterias por medio de perlas de ebullición estériles, agregar la suspensión de bacterias de las dos placas a un matraz de 250 mL que contienen 100 mL del filtrado de cascara de papa, dejar incubar con agitación a temperatura ambiente durante 48 horas.

## ANEXO N° 11

### SHAKER USADO EN LA CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE $\alpha$ - AMILASA



Fig. N° 22: Wrist-Action Shaker modelo BT, utilizado en biotecnología y farmacéutica para mantener líquidos en constante agitación hasta 24 matraces de 250 a 2000 mL

ANEXO N° 12

pH-METRO USADO EN LA CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE  $\alpha$ -AMILASA



Fig. N° 23: Metrohm 632 pH meter modelo de mesa, utilizado para la medición de pH por medio de un electrodo.

## ANEXO N° 13

### CALIBRACIÓN DE pH-METRO<sub>(16)</sub>

Observar si los electrodos presentan puente salino, previo a su uso, si es necesario abastecer de solución salina el puente y observar las precauciones indicadas por el fabricante.

Encender el aparato y dejarlo estabilizar lo suficiente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Seleccionar dos soluciones reguladoras, patrón de referencia certificada para calibración, cuya diferencia en pH no exceda de cuatro unidades, llenar el recipiente con una de las soluciones reguladoras para calibración, teniendo en cuenta la temperatura a la cual el material de prueba será medido. Colocar el control de temperatura a la de la solución y ajustar el control de calibración hasta hacer que los valores observados sean idénticos a los tabulados. Lavar los electrodos y los recipientes con varias porciones de la segunda solución reguladora, seleccionada para la calibración. Llenar los recipientes a la misma temperatura a la que el material será medido. El pH de la segunda solución reguladora debe estar dentro de 0.07 unidades de pH del valor tabulado. Si se observa una mayor desviación revisar los electrodos y si están gastados, reemplazarlos. Ajustar el control de calibración para hacer que el valor de pH observado sea igual al valor tabulado. Repetir la calibración hasta que las 2 soluciones reguladoras den valores observados de pH dentro de 0.05 unidades de los valores tabulados, sin más ajuste de los controles.