

## V. DISCUSIÓN

De 120 microorganismos aislados de suelos de naranjales, se identificaron 46 cepas con capacidad de hidrólisis sobre el almidón, que representan el 38.33% de las cepas evaluadas. La presencia de la enzima amilasa en la etapa de selección de los microorganismos, se determinó por difusión radial en medio sólido, encontrándose diámetros mayores (mm.) en las cepas *Bacillus megaterium* MFFB-UNMSM-39; *Faenibacillus spp* MFFB-UNMSM-08; *Faenibacillus spp* MFFB-UNMSM-47; *Bacillus coagulans* MFFB-UNMSM-05; *Bacillus circulans* MFFB-UNMSM-10; *Faenibacillus spp* MFFB-UNMSM-78, de 33, 28, 26, 24, 23 y 21 mm. respectivamente (Tablas N° 6 y 10). Estos resultados son semejantes con los trabajos de Kwan y col. (1993) que reporta a *Bacillus circulans* aislado de suelos de Hong Kong; Rani y col. (1994) que identifica a *Bacillus megaterium* de suelos de la India; Goyal y col. (1995) que determina a *Bacillus sp*, Ferreira y col. (1998) que identifica a *Bacillus subtilis*. Cabe destacar que los autores mencionados han aislado cepas silvestres al igual que en el presente trabajo.

La optimización de los parámetros aereación y velocidad de agitación (Cuadros N° 03 al 11 y Gráfico N° 4) para *Bacillus megaterium* MFFB-UNMSM-39 en biorreactor de tanque agitado, con caldo almidón modificado según Achi, (1992), se efectuaron mediante un diseño factorial a dos niveles ( $N = 2^2$ ). Encontrándose una alta producción de amilasa cuando el consumo de aire y la velocidad de agitación se incrementan en el rango establecido, deduciéndose de estos resultados una velocidad de agitación óptima 75 rpm con un volumen de aire en una relación de 1.5 vvm, bajo las condiciones de estudio. Estos resultados tienen similitud en cuanto a metodología de trabajo con los estudios realizado por Pastor y Col. (2001), en el que determinaron un volumen de aire promedio de 1 vvm y una velocidad de agitación de 750 rpm. para la producción de una proteasa a partir de *Bacillus subtilis* NRL 3411 y amaranto como sustrato; en éste estudio

también determinaron la relación vvm y rpm; estableciendo, que cuando aumentan el volumen de aire de 053 a 056 vvm y la velocidad de agitación de 350 a 750 rpm se incrementa la producción de la proteasa. Cabe destacar que Pastor y Col. (2001), han trabajado en condiciones diferentes utilizando un microorganismo y sustrato diferente.

La producción de amilasa de *Bacillus megaterium* MFFB-UNMSM-39 en biorreactor de tanque agitado con 0.5 L. con caldo almidón modificado según Achi, (1992), a temperatura de 45°C; pH 7.5; agitación constante de 75 rpm.; 1.5 vvm, inóculo 3% (v/v), (Cuadro N° 11; y, Gráficos N° 5 y 6) fue de 25.38 U/mL, incrementándose la actividad en 9.28 U/mL. (57.63 %) por efecto de la inyección de aire y la distribución del mismo por la agitación, frente a la fermentación llevada en matraz agitado que arrojó una producción de amilasa de 16.10 U/mL. Este resultado tiene concordancia con lo establecido por Scragg, (1996); y Crueger (1993) que manifiestan que la transferencia de oxígeno hacia las células y el mezclado del mismo aumenta la biomasa. La cinética de crecimiento fue gradual con una  $\mu_m = 0.41 \text{ h}^{-1}$  y un  $t_g = 1.67 \text{ h}$ . En cuanto a  $\mu_m$ , al parecer tiene concordancia con lo establecido por Crueger (1993) que establece que el valor de  $\mu_m$  depende del microorganismo y las condiciones de fermentación y las  $\mu_m$  varían entre 0.090 y 0.61  $\text{h}^{-1}$ , también se evidencia que el microorganismo tiene una fase de latencia de 12 horas, estos datos concordarían con los enunciados de Crueger (1993); Scragg (1996) que manifiestan que en la fase de latencia los microorganismos se encuentran en una etapa de adaptación a su nuevo ambiente y que los microorganismos debe inducir nuevos sistemas de transportes para su metabolismo, así mismo, necesitan energía adicional para degradar sustratos de cadena larga y como en el presente estudio se ha utilizado almidón de yuca como la principal fuente de carbono y éste sustrato es una molécula de cadena larga se justificaría el tiempo en la fase de latencia. La producción de amilasa empieza levemente a las 20 horas, hacia finales de la fase logarítmica para luego incrementarse y alcanzar la máxima producción en la fase estacionaria; del análisis

se concluye, que la enzima amilasa producida por el *Bacillus megaterium* MFFB-UNMSM-39 es una enzima inductiva según Lehninger (1985).

La optimización del sustrato experimental en el screening empleando almidón de yuca suplementado con sales (Cuadro N° 12), a través de 12 ensayos (Cuadro N° 13) llevado a cabo en biorreactor de tanque agitado de 1 L. de capacidad, a una temperatura de 45°C, pH 7.5, agitación constante de 75 rpm. y volumen de aire 1.5 vvm, inóculo 3% (v/v). Bajo estas condiciones, se encontraron diferentes respuestas en actividad de amilasa. Del cálculo de los efectos (Cuadro N° 14) podemos ver como varían las respuesta en función de los niveles de los factores; es así, que cuando aumenta la cantidad de almidón de yuca de 10 a 30 g; Extracto de levadura de 2 a 6 g.; Citrato de sodio de 0.2 a 1.5; Cloruro de calcio de 0.5 a 3; se incrementa la producción de amilasa en 5.913; 7.967; 5.00; y 5.913 U/mL respectivamente. Esto nos indica que el nivel óptimo de aplicación de los factores probablemente no han sido alcanzados todavía y por lo tanto nos sugiere realizar ensayos posteriores.

Del análisis de varianza (Cuadro N° 15), se tiene significancia estadística para los factores almidón de yuca; extracto de levadura; citrato de sodio; y, cloruro de calcio, con un  $\alpha = 0.05$  y con 1 y 3 GL. Esto nos señala que el microorganismo tiene preferencias alimenticias por los cuatro factores y que la producción de amilasa va depender en gran medida de éstos factores. En el mismo cuadro, no se encontró significancia estadística para el factor sulfato de amonio que es una fuente de nitrógeno de carácter inorgánico; así como para sulfato de magnesio; fosfato de potasio; y sulfato de hierro; sugiriéndonos que el microorganismo no los aprovecha para su metabolismo y que dichos factores tienen efectos independientes sobre la producción de amilasa. Estos resultados tendrían alguna concordancia con el trabajo de Achi, (1992), que comparó extracto de levadura y sulfato de amonio en la producción de amilasa con *Bacillus alvei*, encontrando alta producción de amilasa con extracto de levadura mientras que con sulfato de amonio la producción de amilasa fue baja; del mismo modo, Kwan (1993) evaluó el

efecto de los iones  $Ba^{+2}$ ;  $Ca^{+2}$ ;  $Cu^{+}$ ;  $Mg^{2+}$ ;  $Ni^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ ;  $Fe^{2+}$ ; sobre la producción de  $\alpha$ -amilasa con *Bacillus circulans*, encontrando inhibición en el crecimiento y producción de  $\alpha$ -amilasa por efecto del  $Cu^{+}$ ;  $Fe^{2+}$ ;  $Z^{+2}$ ; y,  $Ni^{+2}$ ; mientras que los iones  $Ca^{+2}$  y  $Ba^{+2}$ ; estimulan el crecimiento y la producción de  $\alpha$ -amilasa.

Del análisis de residuales de los coeficientes significativos del modelo matemático (cuadros N° 16 y N° 17) que influyen en la producción de amilasa, y el análisis de varianza respectiva, no se encuentra significancia estadística para el residual por medio de la prueba de F con un  $\alpha = 0.05$  y con 7 y 3 GL, lo cual explica que el modelo matemático representa adecuadamente el proceso investigado.

La máxima producción de amilasa para *Bacillus megaterium* MFFB-UNMSM-39 en esta etapa fue de 27.40 U/mL, utilizando almidón de yuca como sustrato, éste resultado es superior al reportado por Rani, y col. (1994); Okolo y col. (1993); Mai, y Col. (1992); Grupta y Col. (1995); pero inferior a los sostenidos por Goyal y Col. (1995); y, Achi y Col. (1992). Este resultado tiene concordancia con los estudios de Rani, y col. (1994) que reportaron la producción de  $\beta$ -amilasa de *Bacillus megaterium*, empleando almidón de yuca gelatinizado, encontrando una actividad de 14 U/mL. Con los otros autores que citamos para efecto de comparación, el presente trabajo tendría sólo concordancia con el uso del sustrato, es decir, almidón de yuca más no con el tipo de microorganismo ya cada autor ha empleado un microorganismo en particular. Es así, que Okolo y col. (1993), han realizado estudios sobre el rendimiento de la actividad de amilasa empleando como sustrato almidón de yuca no gelatinizado, encontrando una actividad enzimática de amilasa de 15.7 U/mL producida por *Thermoactinomyces thalophilus* F13. Asimismo, Mai, y Col. (1992). Encontraron actividad de amilasa en 19, 15 y 13 U/mL a partir de *B. steaerothermophilus* UQM 2104; *B.licheniformis* UQM 378 T2; y, *B. licheniformis* UQM 378 T5; respectivamente, utilizando almidón de yuca como sustrato principal. Del mismo modo, Grupta y Col. (1995), reportaron el rendimiento de amilasa producida por un mutante de *Malbranchea*

*sulfurea*, en 18 U/mL. utilizando como sustrato almidón de papa suplementado con sales. Pero, Goyal y Col. (1995), reportaron el rendimiento de actividad de amilasa en 140 U/mL. producido por *Bacillus sp* MK 716, empleando almidón soluble; y Achi y Col. (1992), reportan una actividad muy superior al encontrado en el presente estudio, 868 U/mL. producidos por *Bacillus alvei* utilizando como sustrato almidón de yuca; como se puede apreciar en los estudios de Goyal y Col. (1995); y, Achi y Col. (1992), la actividad de amilasa es alta a la obtenida en el presente estudio, esto se debería a que los autores mencionados probablemente hayan trabajado con cepas mutadas. Sin embargo cabe señalar que las comparaciones no serían apropiadas y sólo servirían de marco referencial, porque la fermentación realizada en el presente estudio fue realizada en biorreactor de tanque agitado y las investigaciones de los autores citados fueron conducidas en matraz agitado.

La segunda etapa que comprende la optimización ascendente, (Cuadro 18, 19 y 20) se llevó a cabo por el método de pendiente ascendente según Carpenter y Sweeny (1965); determinándose la máxima pendiente de ascenso de los factores significativos, tomando como base el incremento de cloruro de calcio en 0.3 g/L. y, en base a ésta pendiente de cinco experimentos, se encontró que las respuestas de producción de amilasa en cada experimento se incrementa, obteniéndose una máxima producción de actividad enzimática de 32.84 y 32.50 U/mL. en los experimentos 4 y 5. De los resultados se infiere, que la región óptima ha sido ubicada, pero existe un efecto de curvatura en los experimentos 4 y 5 y, por lo tanto, fue necesario aplicar en estos puntos un diseño experimental de segundo orden. El incremento de la producción de amilasa en esta etapa, se debería a que la enzima amilasa es calcio dependiente y que coadyuva en su expresión y estabilidad respectivamente, Estos resultados concuerdan con Fischer y Stein (1960) quienes manifiestan que las amilasas son calcio metalo enzimas. Del mismo estos resultados son similares o se acercan a los estudios de Arai y Col. (1969) que manifiestan que la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis* requiere por lo

menos 0.16 g/L. de calcio por mol de enzima. Fujita, y Col. (1960), encontraron que la  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus orizae* necesita 0.4 g/L de calcio por mol de enzima. Hewitt y Solomons (1996), reportan que los cultivos de *Bacillus amyloliquefaciens* requiere de 0.4 g/L. de calcio. Sin embargo, De Souza y Col. (2000), sostienen que la adición de calcio 0.4 g/L. peptona 1%; extracto de levadura 0.5% a un medio mineral acorta el periodo de latencia mejorando el crecimiento de las células y la síntesis de  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus sp.* De otro lado Okolo y col (1996) emplea 3.0 g/L. de  $\text{CaCl}_2$  para la producción de amilasa empleando *Thermoactinomyces thalophilus* F13. Como se puede apreciar los niveles de calcio empleado por los investigadores mencionados varían el uno al otro. En referencia al presente trabajo nuestros resultados son superiores en cuanto a requerimientos de calcio con los estudios de Arai y Col. (1969); Fujita y Col. (1960); Hewitt y Solomons (1996); y De Souza y col (2000) que emplearon 0.16 g/L.; 0.4g/L.; 0.4 g/L.; 0.4 g/L. Mientras que con el estudio de Okolo y Col. (1996) se tiene bastante similitud, ya que emplea 3.0 g/L de calcio.

En la tercera etapa, que comprende la optimización final, la producción de actividad de amilasa (Cuadro N° 23) producida por *Bacillus megaterum* MFFB-UNMSM-39, de acuerdo al sustrato formulado (Cuadro N° 22) con los factores más significativos (Cuadro N° 21), empleando un diseño rotatable hexagonal, es de 33.22 U/mL. en el experimento 2, que se incrementa en un 1.0% en relación ha la producción más alta de la etapa de optimización ascendente (32.84 U/mL). Se ha encontrado una desviación estándar de 0.136 para la producción de amilasa en el centro de diseño (Cuadro N° 26), lo cual influye positivamente para el análisis de varianza asociada a cada coeficiente del modelo matemático (Cuadro N° 27), obteniéndose significancia estadística con un  $\alpha = 0.05$  con 2 GL a través de un Test de Student, para los términos independiente; lineales; cuadráticos; e interacción. Con esto demostramos que los coeficientes del modelo matemático se ajustan al proceso investigado, y que los datos de las respuestas proporcionan evidencia suficiente, de que el almidón de yuca asociado al cloruro de calcio son

variables útiles para predecir la producción de amilasa. Del mismo modo el modelo matemático derivado del diseño rotatable hexagonal, se ha evaluado estadísticamente para ver el grado de ajuste a los datos experimentales, (Cuadro N° 29) no existiendo diferencia significativa con un  $\alpha = 0.05$  y 1 y 2 GL. De lo que podemos inferir, que el modelo representa adecuadamente a los datos experimentales. Al estimar el modelo de segundo orden (cuadro N° 30) por el criterio de la matriz Hessiana, se obtiene un valor máximo y mínimo (+71.85 y -5.83), lo que nos indica que el modelo matemático tiene un máximo en el rango investigado y que la forma de la superficie respuesta se asemeja a una elipse cóncava hacia abajo. Del mismo modo en base al modelo matemático, al estimar las soluciones óptimas, se ha encontrado los valores de los factores almidón de yuca ( $X_1$ ) y cloruro de calcio ( $X_2$ ) que maximiza la respuesta (producción de amilasa en U/mL), en 25.41 g. y 2.87 g. respectivamente; estos valores son los óptimos y corresponden a la cima de la superficie respuesta descrita por el modelo matemático estimado, que como se puede ver, difieren muy poco de los obtenidos en el experimento 2 del diseño rotatable hexagonal, 25 g/L. de almidón de yuca y 2.83 g/L. de cloruro de calcio.

La evaluación de la cinética de crecimiento (células) con caldo almidón de yuca en biorreactor de tanque agitado; en la etapa del Screening se observa una fase de latencia de 12 horas para luego entrar a la fase logarítmica hasta las 28 horas en que comienza la fase estacionaria hasta las 60 horas. En la etapa de optimización ascendente y optimización final, se acorta el periodo de latencia a 8 horas manteniéndose en fase logarítmica hasta las 20 horas para luego entrar en fase estacionaria hasta las 60 horas.

La enzima amilasa en biorreactor de tanque agitado con caldo almidón de yuca en la fase del Screening parece levemente de las 20 a las 28 horas hacia finales de la fase logarítmica, incrementándose rápidamente hasta las 40 horas aquí empieza a desacelerar la producción de amilasa observándose un crecimiento lento hasta alcanzar la máxima producción a las 60 horas en la fase

estacionaria, (Cuadro S-1, y gráficos S-1 y S-2; Experimento 1); en la etapa de optimización ascendente, la enzima aparece de las 20 a las 24 horas que corresponde a finales de la fase logarítmica, incrementándose velozmente hasta las 36 horas a partir de éste punto la enzima aumenta lentamente alcanzando su máxima producción a las 60 horas en la fase estacionaria, (Cuadro OA-4, y gráficos OA-7 y 8; Experimento 4); en la etapa de optimización final, la enzima se detecta levemente de las 16 a 24 horas y luego se incrementa hasta las 36 horas para alcanzar la máxima producción a las 60 horas en la fase estacionaria, (Cuadro OF-2, y gráficos OF-3 y 4; Experimento 2).

La síntesis de la  $\alpha$ -amilasa ha sido reportado por varios grupos de investigadores, concordando nuestros resultados con las investigaciones de Priest (1977) y Kosenkrants (1985), que reportan que la expresión de la  $\alpha$ -amilasa se expresa fundamentalmente después de la fase logarítmica. Coleman y Elliot (1962), Fukomoto y Col. (1957) y Nomura y Col. (1958); demostraron que la síntesis de  $\alpha$ -amilasa de *B. subtilis* se expresaba en la fase post-logarítmica del crecimiento bacteriano. Walker y Campbell (1967), encontraron que la producción de  $\alpha$ -amilasa de *B. amiloliquefaciens* no se producía hasta que el cultivo ingresara a la fase estacionaria. Por estas circunstancias, concluimos, que la enzima amilasa producida por el *Bacillus megaterium* MFFB-UNMSM-39 es una enzima inductiva según Lehninger (1985).