

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.- COLECCIÓN DE LA MUESTRA.-

De la localidad de Huaral, Distrito de Huando del Departamento de Lima, se colectó 120 muestras representativas de suelos de naranjales de aproximadamente 1,500 g. de suelo de la capa subyacente, entre los 5 y 20 cm. de profundidad, las muestras se guardaron en bolsas de polietileno previamente rotuladas y llevadas al laboratorio para su procesamiento.

#### 3.2.- AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE AMILASA.-

Para el aislamiento y selección de microorganismos productores de amilasa, se empleó los métodos microbiológicos según Seeley y Vandemark (1973); que involucran propagación en medio de aislamiento (MA) según Kwan, (1993) y sembrado por puntura en agar almidón modificado (AAM) según Achi, (1992), posteriormente fueron incubadas a temperatura de 37°C. Para encontrar las cepas con capacidad hidrolítica sobre el almidón, se empleó una solución de yodo de Gram. La presencia de la enzima amilasa se determinó por difusión radial en medio sólido, según Neto, y col. (1987); y Ceska, (1971).

#### 3.3. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.-

La identificación de las bacterias seleccionadas productoras de amilasa, se realizó tomando en cuenta los caracteres biológicos, características culturales y morfológicas, además se realizó la diferenciación bioquímica respectiva de acuerdo a lo establecido en el Manual de Berge's of Determinative Bacteriology (1974) y Mac Faddin (1984), que incluye; reacción de coloración Gram, motilidad, reducción de nitrito, O-F glucosa, indol, licuefacción de la gelatina, citrato de Simmons, Voges-Proskauer, ureasa, fenilalanina desaminasa, glucosa, manitol,

arabinosa, xilosa, cloruro de sodio, hidrólisis de almidón. Cabe destacar, que previa a la identificación bioquímica, se le asignó a cada sepa, un código interno con las siguientes siglas "MFFB-UNMSM-#" que se mantiene en el presente estudio.

### **3.4.- EVALUACIÓN DE *BACILLUS* PRODUCTORES DE AMILASA.-**

En la evaluación de las cepas de *Bacillus* productores de amilasa, se empleó agar almidón modificado a pH, 5, 7 y 8; sembrando el cultivo puro por puntura y luego las placas fueron incubadas a temperaturas de 37°C, 45°C y 55°C por un periodo de 72 horas. Para determinar las cepas con mayor capacidad hidrolítica sobre el almidón, se empleó una solución de yodo de Gram; demostrándose la presencia de la enzima amilasa por una zona clara, que define el diámetro de halo producido en el agar.

### **3.5.- INÓCULO.-**

La preparación de los inóculos (número de células viables) de los *Bacillus* seleccionados con mayor diámetro de halo, se llevaron a cabo de un cultivo de 24 horas crecido sobre agar tripticosa soya; para luego estandarizarlas a una concentración celular de  $10^8$  ufc/ml, en un espectrofotómetro SPECTRONIC 20, a una longitud 630 nm. con una absorbancia de 0.96. Para determinar el inóculo óptimo, primero se realizaron ensayos iniciales transfiriendo volúmenes de; 1%; 3%; 6%; 9%; 12% y 15% (v/v) a matraces de 250 ml. poniendo 100 mL de caldo almidón modificado, luego los matraces fueron incubados a 45°C por un periodo de 48 horas, con agitación constante de 150 rpm. El porcentaje de inóculo óptimo se determinó relacionando la mayor producción de amilasa encontrada en los ensayos.

### **3.6.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.-**

La evaluación de la actividad enzimática en los experimentos se realizó por el método propuesto por Smith y Roe (1949), donde una unidad de actividad fue definida como el total de enzima presente en el sobrenadante que es capaz de

hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos a 37°C. Esta evaluación en una primera fase se llevó a cabo en matraz agitado con caldo almidón modificado según Achi (1992) a pH 7.5, temperatura de 45°C y agitación constante de 150 rpm por un periodo de 48 horas. Y en la segunda fase se realizó en biorreactor de tanque agitado con caldo almidón de yuca a pH 7.5, temperatura de 45°C, agitación constante de 75 rpm y volumen de aire 1.5 vvm por un periodo de 60 horas.

### **3.7.- OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS VELOCIDAD DE AGITACIÓN Y VOLUMEN DE AIRE EN LA FERMENTACIÓN**

El establecimiento de los parámetros velocidad de agitación y volumen de aire, para la fermentación de *Bacillus megaterium* MFFB-UNMSM-39 se efectuó por ensayos repetitivos mediante un diseño factorial a dos niveles ( $N = 2^k$ ) en caldo almidón modificado (medio control) a una temperatura óptima de crecimiento de 45°C y pH 7.5.

### **3.8.- OPTIMIZACIÓN DEL SUSTRATO EXPERIMENTAL.-**

La optimización del caldo almidón de yuca (medio experimental) se realizó en tres etapas (screening; optimización ascendente; y optimización final), empleando almidón de yuca como la principal fuente de carbono; extracto de levadura y sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno; y sales (citrato de sodio, cloruro de calcio, fosfato de potasio, sulfato de hierro). El screening se realizó siguiendo un diseño estadístico según Plackett y Burman (1946), el cual nos permitió evaluar los factores del caldo almidón de yuca. La optimización ascendente se efectuó empleando el método de pendiente ascendente, según Carpenter y Sweeny (1965); mientras que la etapa de optimización final, se realizó por el diseño rotatable hexagonal según Box y Wilson (1951).

### **3.9.- CINÉTICA.-**

La evaluación de la cinética de crecimiento de las bacterias y la producción de amilasa se llevó a cabo por medio de cultivos batch discontinuos, en matraces agitados y empleando un biorreactor de vidrio construido en el Instituto de

Microbiología “SIMON PEREZ ALVA” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM; utilizando para este cometido dos tipos de sustratos; a) caldo almidón modificado (medio control), y, b) caldo almidón de yuca (medio experimental) formulado con ocho factores y a dos niveles (ver cuadro N° 12), bajo la influencia de los parámetros fermentativos (temperatura, pH, agitación y volumen de aire). Para evaluar la biomasa se recurrió al método de recuento en placa según Seeley y Vandemark; (1973). La actividad enzimática de amilasa por el método Smith y Roe (1949); y, la proteína por el método de Lowry.

### **3.10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-**

Para efectos de análisis y comparación de las pruebas experimentales, el desarrollo de la presente investigación se diseñó en tres etapas: a) Screening; b) Optimización ascendente; y c) Optimización final. Para la etapa del screening, se empleó un diseño según Plackett y Burman (1946) evaluándose ocho factores con dos niveles que corresponden a la formulación del caldo almidón de yuca (ver cuadro N° 12); el análisis de varianza, nos permitió evaluar la significancia de los efectos determinantes sobre el crecimiento de las células, que influyen en la producción de la enzima amilasa, bajo los parámetros controlados de la fermentación. Para la etapa de optimización ascendente, se empleó el método de pendiente ascendente, según Carpenter y Sweeny (1965); por medio del cual se determinó la máxima pendiente de ascenso de los factores significativos y las respuestas respectivas. La etapa de optimización final, se realizó empleando el diseño rotatable hexagonal según Box y Wilson (1951), que nos permitió encontrar el modelo matemático de segundo orden, para determinar los valores óptimos de los factores más significativos.