

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
ESCUELA DE POSTGRADO
PROGRAMA DOCTORAL DE MICROBIOLOGÍA



**EFFECTO DE LA TEMPERATURA, pH Y CONCENTRACIÓN
DE SUSTRATO SOBRE LA VELOCIDAD DE HIDRÓLISIS
DEL ALMIDÓN DE PAPA POR *Bacillus subtilis* NATIVO
EN UN BIORREACTOR CILÍNDRICO AGITADO**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MICROBIOLOGÍA**

AUTOR : Ms.C. LUIS ALBERTO LLENQUE DÍAZ

ASESOR : Dr. PEDRO MERCADO MARTÍNEZ

TRUJILLO - PERÚ
2011

No. de Registro: _____

DEDICATORIA

A DIOS, por ser mi guía y por
brindarme la satisfacción de
culminar esta nueva capacitación.

A mis padres, Demetrio y
Juana, por regalarme la vida y
mi educación.

A mis hermanos e hijos, quienes
con su paciencia y comprensión,
contribuyen con mi formación
profesional.

AGRADECIMIENTO

A la institución CONCYTEC, por el apoyo concedido.

JURADO DICTAMINADOR

Presidente: Dr. José Mostacero León

Secretario: Dr. Marco Salazar Castillo

Vocal: Dr. Pedro Mercado Martínez

Trujillo, Abril del 2011

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
JURADO DICTAMINADOR	iv
ÍNDICE	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIAL Y MÉTODOS	14
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	35
PROPUESTA	47
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	74

RESUMEN

Se planteó el problema científico: ¿Cuál es el efecto de la temperatura, pH y concentración de sustrato sobre la velocidad de hidrólisis del almidón de papa por *Bacillus subtilis* nativo, aislado de suelos de papa de la ciudad de Huamachuco en un biorreactor cilíndrico agitado en condiciones de laboratorio?. Se procesaron muestras de suelo para aislar y seleccionar al cultivo puro de bacterias con mayor capacidad hidrolítica sobre el almidón de papa en medio acuoso; luego se establecieron 15 sistemas de ensayos combinando las variables de estudio, mediante el diseño estadístico computarizado de Box – Benhken a valores bajo, medio y alto. Se monitoreó la presencia de almidón, mediante la técnica del lugol en tubo y se registró el tiempo total necesario para la bacteria hidrolice completamente la cantidad de almidón presente en cada uno de los sistemas y se determinó la velocidad de hidrólisis del almidón por la bacteria. La bacteria seleccionada con mayor capacidad hidrolítica sobre el almidón de papa en medio acuoso fue identificado como *Bacillus subtilis*, el mismo que alcanzó una velocidad de hidrólisis experimental de 0,166 g de almidón/h con 40°C, pH 7,5 y 1,0 % de almidón, encontrándose un mayor efecto positivo de la temperatura(40°C) y el pH(7,5) sobre la velocidad de hidrólisis; así mismo, el diseño estadístico permitió predecir una optimización de la velocidad de hidrólisis a 0,181 g/h con 31,5°C, pH de 7,8 y 1,4 % de almidón.

Palabras clave. Efecto, hidrólisis de almidón, *Bacillus subtilis*, biorreactor cilíndrico agitado.

ABSTRACT

Raised the scientific problem: What is the effect of temperature, pH and concentration of substrate on the speed of potato starch hydrolysis by *Bacillus subtilis* native, isolated from soil of cultivars potato Huamachuco city in an agitated cylindrical bioreactor under laboratory conditions? Samples soil they were processed to isolate and select pure cultivation of bacteria with increased hydrolytic capacity on aqueous potato starch; then it established 15 test systems by combining variables of study through computerized statistical design of Box - Benhken values low, medium and high. Monitored the presence of starch by lugol's into tube technique and recorded the total time required for the bacteria completely hydrolyze the amount of starch present in each of the systems and determined the speed of starch hydrolysis by the bacteria. The bacteria selected hydrolytic capacity on aqueous potato starch was identified as *Bacillus subtilis*, the same that reached a speed of experimental hydrolysis of 0,166 g starch/h with 40°C, pH 7,5 and 1,0 % of starch, found a greater positive effect of the temperature (40°C), and pH 7,5 on the rate of hydrolysis; Likewise, statistical design allowed predict an optimization of the rate of hydrolysis to 0,181 g with 31 °C, pH 7,8 and 1,4% of starch.

Keywords: Effect, hydrolysis of starch, *Bacillus subtilis*, agitated cylindrical biorreactor

INTRODUCCIÓN

Según el Instituto Nacional de Estadística e Informática(INEI) en febrero – 2007, la producción nacional de papa y maíz amarillo duro crecieron en 40,2% y 20,9% respectivamente, respecto al nivel obtenido en similar mes del año anterior y La Libertad destacó como el mayor productor de papa (26,1%), seguido de Huánuco (18,8%), Junín (11,3%), Cajamarca (7,8%), Cuzco (6,6%) y Ancash (5,0%), y se prevé que el producto bruto interno agropecuario en este año 2010 ascenderá, debido a la creciente producción de maíz amarillo duro, papa, pimienta piquillo, alcachofa y espárrago; y según el informe técnico “Perú: Panorama Económico Regional – febrero 2007, que elaboró el INEI, la producción de papa y maíz amarillo duro, fue de 229 mil 922 toneladas y 90 mil 580 toneladas respectivamente, debido al incremento de las áreas cosechadas y mejores rendimientos del cultivo por hectárea (INEI, 2008).

Huamachuco es la capital de la Provincia de Sánchez Carrión, región La Libertad que se encuentra ubicada en plena cordillera de los andes, a 3 200 metros sobre el nivel del mar y 180 Km de Trujillo, con 52 500 habitantes y una superficie de 424,13 km², tiene un clima templado y temperatura que varían entre 11° y 15°C, y posee valles de clima templado (Dirección Regional de La Libertad, 2008); en la actualidad, su gente se dedica principalmente a la

agricultura, la ganadería y la crianza de animales domésticos, su producción es muy diversa gracias a que se extiende en zonas de jalca y temple como en Cochorco y Sartimbamba, junto al cálido Marañón, donde se produce ciruela, plátano, camote yuca, mango, naranja, etc; y en las zonas de alturas, se produce gran variedad de papa nativa como la Carhuanaca, Chano de perro, Llameyina, entre otras; tiene renombre nacional en la producción de papa y es principal abastecedor de los mercados de la costa norte del Perú, al igual de producir trigo, maíz, lenteja, arveja, haba, oca, mashua, y olluco (Gobierno Regional La Libertad, 2008).

El almidón es un hidrato de carbono complejo $(C_6H_{10}O_5)_n$, en forma de grano o polvo, principal molécula de reserva en la mayoría de las plantas; se acumula en los cloroplastos de las hojas y en los amiloplastos, en los cuales se forma después de la translocación de sacarosa u otro carbohidrato provenientes de las hojas; la cantidad de almidón varía en los diversos vegetales y depende de muchos factores genéticos y ambientales; como es el caso de la papa que contiene el 20.3% de almidón (Robinson, 1991).

Estructuralmente el almidón presenta dos fracciones: amilosa y amilopectina, ambos constituidos por unidades de D-glucosa unidas por enlaces α -1,4 que permiten que las cadenas de almidón se enrollen en forma de hélices, donde la amilopectina es una molécula muy ramificada, localizándose entre el carbono 6 de una glucosa de la cadena principal y el carbono 1 de la primera glucosa en la cadena que forma la rama (enlaces α -

1,6); por su parte, la amilosa es más pequeña y contiene cientos a miles de unidades de glucosa, número que depende de la variedad y las condiciones ambientales (Vanguardia 1, 2008).

En una reacción enzimática, los reactivos se denominan sustratos, es decir la sustancia sobre la que actúa la enzima, que es modificado químicamente y se convierte en uno o más productos (Montgomery y col, 1998). Como esta reacción es reversible, la enzima libre se encuentra en la misma forma química al comienzo y al final de la reacción (Murray y col, 1996).

Los enzimas son catalizadores de origen biológico muy activos que incrementan la velocidad de reacciones (Montgomery y col, 1998) en medios acuosos y en condiciones muy suaves de temperatura, presión, pH, etc, muy específicos ya que pueden modificar un único sustrato en una mezcla de sustratos muy similares e incluso pueden discernir entre dos isómeros de una mezcla racémica de un compuesto quiral, y muy selectivos al modificar un único enlace o un único grupo funcional en una molécula que tenga varias posiciones modificables (Trevan y col, 1990).

Químicamente, las enzimas, son proteínas que poseen grupos químicos ionizables (carboxilos, $-\text{COOH}$; amino, $-\text{NH}_2$; tiol, $-\text{SH}$; imidazol, etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos y poseen una conformación natural más estable que las demás conformaciones posibles; son altamente especializadas que tienen como función la catálisis o regulación de la velocidad de las

reacciones químicas que se llevan a cabo en los sistemas biológicos (Murray y col, 1996).

Las enzimas sufren cambios en la conformación estructural que suelen ir asociados con cambios en la actividad catalítica, donde el pH y la temperatura son los factores que influyen de manera más directa sobre la actividad de un enzima; según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra y como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica, éste es el pH óptimo, pero la mayoría son muy sensibles a los cambios de pH; tal es así que, desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad, al provocar la desnaturalización de la proteína (Murray y col, 1996), en los procesos industriales se utilizan las soluciones amortiguadores (buffer) más o menos complejos para mantener estable el pH.

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: así por cada 10°C de incremento, la velocidad de reacción se duplica y las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor (Montgomery y col, 1998). La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima; por encima de ésta, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la

actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse (Murray y col, 1996). En los microorganismos, existe normalmente un amplio espectro de características enzimáticas para escoger, tales como el rango de pH y resistencia a alta temperatura (Smith, 2006).

Las enzimas convierten a los procesos industriales en eficientes y menos costosos, por su alto grado de especificidad y adaptabilidad (Prescott y col, 2002), acumulan más material procesado y consumen menos cantidad de energía, su labor hidrolítica implica la ruptura de un enlace mediante la adición de los elementos del agua, por lo que los polisacáridos son degradados hasta monosacáridos, como es el caso de la hidrólisis de almidón a glucosa (Bocanegra y Gallardo, 2005).

El proceso de hidrólisis de almidón ocurre mediante varias etapas catalizados por enzimas entre las que destacan la α -amilasa, β -amilasa, glucoamilasas y otras, y al parecer solo la α -amilasa puede atacar gránulos de almidón intactos, y la β -amilasa y glucoamilasa, actúan sobre los primeros productos liberados por la α -amilasa, que hidroliza de manera aleatoria enlaces α -1,4 en las moléculas de amilosa y amilopectina; al principio creando huecos al azar en los granos de almidón y liberando productos que aun son grandes (Crueger y Crueger, 1989). En las cadenas de amilosa no ramificadas, el ataque repetido por la α -amilasa produce maltosa, un disacárido que contiene dos unidades de glucosa; y no ataca enlaces α -1,6 localizados en los puntos de ramificación de la amilopectina, por lo que la digestión de amilopectina cesa

cuando aun quedan dextrinas ramificadas con cadenas de longitud corta, muchas α -amilasas son activadas por Ca^{2+} , elemento esencial durante el proceso hidrolítico (Leveau y Bouix, 2000).

El genero *Bacillus* es un grupo de bacterias, que se caracteriza por la forma de bastón, Gram positivas, aerobios estrictos o anaerobios facultativos y en condiciones estresantes forma una endospora. La forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes; así, la mayoría de especies dan positivo a la prueba de la catalasa (Cortez, 2001) y generalmente son móviles, con flagelos peritricos; viven en suelo, agua de mar y ríos, alimentos que contaminan con su presencia (INDECOPI, 1999); son saprófitas y tienen la característica particular de producir enzimas hidrolíticas incluyendo a las amilasas (Cueva, 1993). Se aíslan de suelos fértiles y exclusivamente de cultivos de productos amiláceos, que después de una selección primaria y secundaria (Villanueva y col, 2007) se podría elegir a las bacterias productoras de amilasas activas en determinadas condiciones de ensayo, al mismo tiempo que permiten el diseño de un proceso eficiente para degradar almidón de residuos de papa.

América Latina está emergiendo como un productor clave de biocombustibles, buscando utilizar las ventajas comparativas de la región, como tierras fértiles y climas tropicales; los analistas dicen que el suelo y clima del continente son ideales para desarrollar etanol a base de soya y caña de azúcar, que son más eficientes que el maíz, dominante en Estados Unidos, el

mayor productor de biocarburantes y algunos entusiastas ya predicen que si los precios de los combustibles fósiles siguen subiendo, podría causar un desastre humanitario mundial, pero que tal y como se utilizan hoy, a pequeña escala, no son dañinos (Monbiot, 2004); entonces se propone utilizar las grandes cantidades de residuos de papa (Seoanez, 2000) que se generan en nuestra región como materia prima alternativa para la conversión del almidón de papa en jarabes azucarados utilizando catalizadores biológicos en biorreactores (Sánchez y Figueroa, 2000; Aguilar, 2003; Morata, 2005) y que posteriormente puedan ser transformados en biodiesel (Vanguardia 2, 2008).

En tal sentido, en Perú (2008) se inició una planta de biocombustibles que procesa soya, pero al 2010 estará alimentada con jatropha, una planta de secano resistente que puede ser cultivada fácilmente en los desiertos peruanos; además de las inversiones en caña de azúcar para producir etanol (Ellsworth, 2008). Entonces la problemática nacional e internacional sobre la demanda de los biocombustibles, que implica el incremento del uso de los productos vegetales para la producción de biocombustibles en altos niveles, será necesario plantear una posibilidad de disminuir el impacto negativo del consumo de cultivos vegetales para la producción de biocombustibles, utilizando residuos de los cultivos de papa y otros, para obtener jarabes de azúcares reductores que sirven de materia prima para la producción de bioalcohol, que según sus promotores, "...proporcionaría una vía de desarrollo sostenible para muchos países que pueden producir biocombustibles baratos" (Agudelo y col, 2004).

La optimización de determinados procesos o medios de producción se realiza mediante el uso de métodos estadísticos – numéricos, examinando todas las combinaciones posibles de las variables con diseños factoriales totales o fraccionados; este último, evalúa un número de variables a través de un menor número de experimentos, elimina el efecto nulo o inhibitorio e identifica las variables que muestran un efecto positivo; es decir, mide el efecto al cambiar una variable independiente mientras que las demás se mantienen constante en cierto nivel (Greasham and Inamine, 1986).

El estadístico de Box – Benhken es un diseño de superficie de respuesta ampliamente utilizados para estudiar el efecto de varias variables y determina las condiciones óptimas de un sistema multivariable (Rojas, 2008), permite evaluar el efecto cuadrático, la interacción entre dos variables y determina la naturaleza no lineal de la respuesta; donde cada columna representa una variable independiente y cada fila representa un ensayo experimental, los elementos, +, 0, y -, representan los niveles alto, medio y bajo, respectivamente, de cada variable (Greasham and Inamine, 1986); generalmente, los valores asignados de estos niveles son espaciados equitativamente a partir del punto central y los ensayos son ejecutados en una secuencia aleatoria por triplicado (Box and Draper, 1987).

Existen varios programas computarizados disponibles para estos análisis y donde las ecuaciones calculadas pueden ser utilizadas para generar una respuesta predictiva en cualquier combinación de factores en o cerca de la

región investigada, pueden indicar que la respuesta optima ha sido identificada o al menos podría sugerir la región donde lo optimo podría estar localizado (Arroyo, 2002) y una vez identificado estos niveles óptimo de cada variable se realiza el ensayo experimental confirmativo, resultados positivos indican que el sistema optimizado servirá para trabajar con volúmenes mayores; así tenemos que para determinar la variable con un efecto más significativo y la variable con el menor efecto, se utilizó el software Statgraphics versión 5,0 (Icanaqué 2009); en tanto que Villanueva 1995 y Robles 2000, aplicaron éste diseño seguido del análisis de regresión múltiple con la versión 6,1 para determinar el nivel óptimo de cada variable independiente.

El trabajo consistió en aislar y seleccionar cultivos de bacterias nativos a partir de suelos de cultivos de papa de la ciudad de Huamachuco con la característica principal de degradar almidón, e identificados mediante ensayos morfológicos, tintoriales y pruebas bioquímicas para luego ser evaluados en los biorreactores a diferentes condiciones de incubación; planteándose el siguiente problema científico: ¿Cuál es el efecto de la temperatura, pH y concentración de sustrato sobre la velocidad de hidrólisis del almidón de papa por *Bacillus subtilis* nativo, aislado de suelos de papa de la ciudad de Huamachuco en un biorreactor cilíndrico agitado en condiciones de laboratorio?, deduciéndose la siguiente hipótesis científica: La temperatura, el pH y la concentración de almidón tienen efecto positivo sobre la velocidad de hidrólisis del almidón de papa por *Bacillus subtilis* nativo en un biorreactor cilíndrico agitado; ocurriendo de manera óptima entre 25 °C, 30°C y 40° C, pH de 7, 0; 7, 5 y 8, 0 y de 0, 5; 1, 0 y 1, 5 % de almidón.

MARCO FILOSOFICO

El etanol o alcohol etílico es producido a partir de cualquier compuesto orgánico que contenga niveles considerables de azúcar o materiales que puedan convertirse en azúcar simple, dentro de los que destacan el azúcar de caña, los granos como el maíz, cebada, trigo y sorgo, maderas, residuos forestales e incluso desechos de papel, basura de patio, plásticos y llantas (Núñez y Ayala, 2009).

Las grandes industrias, como las productoras de etanol, surgen en estos tiempos como alternativas para la modernización del campo y dotar de nuevos y más usos a la producción de granos; sin embargo, en países como México, donde existe un arraigo cultural, laboral y alimenticio a productos como el maíz, resulta cuestionable su eficiencia, puesto que no sólo rivaliza con el consumo sino con la cultura milenaria que ha caracterizado a esa nación (Núñez y Ayala, 2009). En el Perú, ha adquirido gran importancia económica ya que se está orientando a la producción de la materia prima (caña de azúcar) a gran escala, que conlleva a progreso en varios aspectos, por ejemplo, generar nuevos puestos de trabajo calificado y no calificado con remuneración y salarios de la población, se está ampliando la comercialización de materiales y equipos, y por consiguiente se genera mayor tributo para el estado.

Por otro lado, mientras los agricultores levantan sus ruegos para pedir lluvia, y aún lo siguen haciendo (Lovelock, 2004), las grandes empresas transnacionales se aprovechan de las grandes extensiones de tierra que por

cuestiones políticas y económicas no son aprovechadas por los pobladores que por miles de años han permanecido cerca, cuidándolo de alguna manera. Un nuevo revuelo en la industria tiene que ser complacida: la producción de biocombustibles, generando preocupación en otros sectores socio-económicos; la razón es que al ser producido a base de productos orgánicos y de gran importancia para la ingesta alimenticia humana y pecuaria, principalmente, se le considera como un competidor directo para éste, es decir, rivaliza con el consumo humano y pecuario de la caña de azúcar y el maíz.

La industria de los biocombustibles ha sido criticado por su importante papel en la inflación de precios de los granos y como consecuencia de los alimentos en general, así mismo se duda de los beneficios ambientales del producto, cuestionando que éste pueda reducir el consumo y la dependencia del petróleo en el mundo, agregando que al quemarse el etanol produce más ozono que la gasolina y pone en riesgo el suministro de agua (Núñez y Ayala, 2009); es decir, hay un sector que está en desacuerdo con la producción de los biocombustibles porque dicen que afectan a los países más pobres mediante la elevación de los precios de los alimentos. Finalmente si la demanda nacional e internacional es de grandes cantidades de biocombustibles importados, esto está en directa relación con los objetivos de desarrollo sustentable, ya que se observa la destrucción acelerada de las selvas tropicales debido a la creciente producción de biocombustibles en varios países en desarrollo, por ello va ser muy difícil conseguir una producción sustentable en los países terceros.

En este sentido, la papa tiene un potencial económico para utilizarse en lugar de la caña de azúcar y el maíz en los procesos de producción de jarabes glucosados, siendo ventajoso por ser una materia prima más barata y de alta disponibilidad en la región y el país. Por otro lado, utilizando la papa para extraer almidón y usarlo posteriormente para producir jarabes glucosados, por un lado ahorraría alimentos, como el caso del maíz, que es más esencial en la nutrición directa de las personas, y por otro lado, contribuiría con la generación de un valor comercial agregado.

OBJETIVO(S)

General:

1. Determinar el efecto de la temperatura, pH y concentración de sustrato sobre la velocidad de hidrólisis del almidón de papa de *Bacillus subtilis* seleccionado de cultivos aislados de suelos de cultivares de papa de la ciudad de Huamachuco en un biorreactor cilíndrico agitado.

Específicos:

1. Aislar cultivos puros de bacterias con capacidad hidrolítica sobre el almidón en placa a partir de muestras de suelo de cultivares de papa de la ciudad de Huamachuco.
2. Seleccionar e identificar un cultivo bacteriano con una máxima capacidad hidrolítica de almidón en medio acuoso.

3. Monitorear la velocidad de hidrólisis del almidón de la bacteria seleccionada en un biorreactor cilíndrico agitado en las condiciones de ensayo, según esquema del diseño de Box-Benhken.
4. Determinar las condiciones óptimas experimentales para alcanzar la máxima velocidad de hidrólisis del almidón por la bacteria seleccionada en un biorreactor cilíndrico agitado.
5. Analizar el efecto de cada una de las variables del estudio, de manera individual y en interacción, sobre la velocidad de hidrólisis del almidón de la bacteria seleccionada en un biorreactor cilíndrico agitado.
6. Optimizar la máxima velocidad de hidrólisis de almidón que puede alcanzar la bacteria seleccionada en un biorreactor cilíndrico agitado a las condiciones óptimas de concentración de sustrato, pH y temperatura utilizando el programa de software Statgraphics Plus v. 7,0.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

- Muestras de suelos provenientes de cultivares de papa de la ciudad de Huamachuco, La Libertad – Perú.
- Almidón de papa comercial “Chuño”.

Objeto de estudio

- Hidrólisis del almidón de papa

Variables de estudio

- Variables independientes: Temperatura (°C), pH (valores) y Concentración de almidón (%)
- Variable dependiente: Velocidad de hidrólisis del almidón de papa.

Método y técnicas

Procedimiento:

A. Recolección y enriquecimiento de las muestras de suelo

En una área de cultivar de papa, se realizó un hoyo en el suelo de aproximadamente 30 cm de profundidad y se recolectó aproximadamente 250

g de tierra en bolsas de primer uso, repitiéndose lo mismo en otras tres zonas y se mezclaron haciendo un total de 1 Kg aproximadamente. Esto se repitió en cuatro áreas diferentes. Luego se transportó a la ciudad de Trujillo, Laboratorio de Fisiología y Genética Bacteriana - Universidad Nacional de Trujillo; procediéndose a retirar los residuos vegetales y colocados en bandejas plásticas a los que se les añadió almidón de papa (Chuño) en una concentración al 1 %, se incubó por 7 días a temperatura ambiente en constante humedad (Villanueva y col, 2007).

B. Aislamientos y Selección primaria de cultivos bacterianos que hidrolizan almidón (Villanueva y col, 2007).

De cada una de las cuatro muestras incubadas, se pesó 10 g de suelo y se hizo una disolución con 90 mL de solución salina fisiológica estéril, luego fue sometida a calor de 80 °C por 20 min; y se hicieron diluciones sucesivas adecuadas para finalmente sembrar las dos ultimas diluciones por el método de superficie, 0,1 mL de disolución en placas petri con Agar Almidón (AA). De cada colonia se repicó, por duplicado, en placa con AA por el método de puntura y se incubaron a 37°C por 24 h; después de este tiempo, a una de las placas se adicionó el reactivo de lugol hasta cubrir toda la superficie.

Los cultivos bacterianos con capacidad de hidrólisis del almidón fueron reconocidos por la observación de un halo de hidrólisis de almidón alrededor de la colonia. La selección primaria de un cultivo se hizo en base al mayor halo neto de hidrólisis que presentaban.

A partir de la segunda placa incubada, se repicaron los mejores cultivos en tubos con AA, rotulados como FGM-Nºcultivo A+, y se conservaron en refrigeración hasta su posterior evaluación.

C. Preparación del medio de fermentación

El medio de fermentación consistió de 500 mL de Caldo Almidón (CA) a base de almidón a la concentración a evaluar, peptona al 0,5%, cloruro de sodio 0,3%, extracto de levadura 0,3%, Solución de CaCl_2 dihidratado 1,5 % y ajustado al pH a evaluar con buffer fosfato.

D. Preparación del inóculo bacteriano

Cada cultivo se reactivó a partir del cultivo puro por subcultivo en placas con AA y se incubó a 37°C por 24 h; luego se sembró en CA (almidón 0,5%, pH 7,0). Se incubó a 37°C por 24 h hasta obtener una cantidad de 9×10^8 células/mL (Equivalente al tubo Nº 3 del nefelómetro de Mc Farland), que constituyó el inóculo para los biorreactores

E. Construcción y acondicionamiento de los biorreactores

Se construyeron y acondicionaron 04 biorreactores de material de vidrio, de 1 L de capacidad, con cuatro baffles, agitador con 4 paletas, tapa con dos orificios y se instaló un motor de agitación de aproximadamente 200 rpm (Anexo, Figura 6).

F. Selección secundaria del cultivo bacteriano con máxima capacidad hidrolítica en medio acuoso.

Se agregó, al biorreactor, el medio de fermentación con almidón 0, 5% y pH 7, 0; luego se inoculó 5 mL de suspensión bacteriana y se inició el funcionamiento de los biorreactores a temperatura ambiente. El monitoreo de la cantidad de almidón residual se realizó por el método de lugol (Villanueva y col, 2007), para lo cual se obtuvieron muestras de 0,5 mL cada 15 minutos de incubación a temperatura de 25°C y se determinó el tiempo total en que la bacteria logró hidrolizar completamente el almidón añadido.

Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado con cada uno de los cultivos aislados y seleccionados anteriormente.

G. Identificación del cultivo puro seleccionado

El cultivo seleccionado con mayor velocidad hidrolítica sobre el almidón en medio acuoso, se identificó siguiendo lo establecido por Villanueva y col, 2007(Anexo, Cuadro 2), referido a la identificación de bacterias productoras de amilasas.

H. Evaluación del efecto de las condiciones de ensayo sobre la hidrólisis de almidón por *Bacillus subtilis* seleccionado e identificado en un biorreactor cilíndrico agitado (Robles, 2000).

Cada sistema de ensayo, constituido por 3 biorreactores, fue monitoreado de acuerdo a lo establecido en el siguiente esquema:

Cuadro 1. Esquema del diseño de Box –Benhken aplicado en la investigación.

Sistema de ensayo (Nº)	Condiciones de ensayo (niveles)		
	A	B	C
1	-	0	+
2	+	-	0
3	0	+	-
4	-	0	-
5	+	0	0
6	0	-	0
7	0	+	+
8	-	0	0
9	-	-	0
10	+	0	+
11	+	+	0
12	-	+	0
13	0	-	-
14	0	-	+
15	-	-	-

Donde:

A, es la concentración de almidón de:

(-) = 0, 5 % (0) = 1, 0 % (+) = 1, 5 %;

B, es el pH a valores de:

(-) = 7, 0 (0) = 7, 5 (+) = 8, 0

C, es la Temperatura de:

(-) = 25 °C (0) = 30 °C (+) = 40°C.

Monitoreo

Muestras de 0,5 mL fueron obtenidas cada 15 min, durante el período de incubación, de cada uno de los sistemas de ensayo (Anexo, Figura 6 - 9); y colocadas en un tubo de ensayo, se añadió 0,5 mL de solución acuosa de lugol (KIO_3 0,367g/L; KI 5 g/L; NaOH 1N 2 mL) y 2 mL de agua destilada (Figura 10 - 12). Una coloración azul indicó la presencia de almidón en el sistema de ensayo, en tanto que un color amarillo indicó ausencia del mismo en cada una de las muestras evaluadas (Figura 13 - 15).

La velocidad de hidrólisis del almidón (g/h) de cada uno de los sistemas evaluados, se calculó del cociente entre la cantidad de almidón en gramos (g) añadido al sistema y el tiempo total en horas (h) que permitió hidrolizar completamente el almidón añadido.

I. Análisis estadístico de los datos:

Se evaluaron los diferentes valores de la velocidad de hidrolisis del almidón de papa promedio por *Bacillus subtilis* aislado y seleccionado alcanzado en cada uno de 15 ensayos realizados, mediante las técnicas estadísticas de Diagrama de pares, Respuesta de superficie y Líneas de contorno inmersos en el programa de software Statgraphics (Ayala y Pardo, 1995) Plus versión 7,0 con la finalidad de determinar los valores óptimos de concentración de sustrato, pH y temperatura para alcanzar la máxima velocidad de hidrolisis en las condiciones ensayadas.

RESULTADOS

En la Figura 1, se muestran las colonias características de las bacterias aisladas de las muestras de suelo, procedentes de la ciudad de Huamachuco, en Agar Almidón (AA), que se caracterizaban por ser de tamaño mediano, cremas y bordes irregulares.

En la Figura 2, se observan los halos de hidrólisis del almidón alrededor de las colonias de bacterias sobre las placas con AA, sembradas por puntura, que permitió reconocer y hacer la selección primaria de los cultivos bacterianos con mayor capacidad hidrolítica sobre el almidón de papa (método del yodo).

En la Tabla 1, se muestran las velocidades de hidrólisis de los cultivos sobre el almidón de papa, en las condiciones de ensayo, como criterio para hacer la selección secundaria de los mismos, destacando el cultivo FGM-03A+ con el mayor valor (0,125 g/h) en tanto que el cultivo FGM-02A+ tuvo el menor valor (0,060 g/h).

En la Tabla 2, se muestran las características macroscópicas y microscópicas del cultivo FGM-03A+ aislado y seleccionado, el mismo que fue identificado como *Bacillus subtilis* porque sus colonias fueron medianas, cremosas, brillantes y de bordes irregulares; se caracterizó por ser bacilos

Gram positivos, esporulados, catalasa positivos y fermentaban la glucosa, producían ácido a partir del manitol y móviles, en tanto que fueron negativos a las pruebas de lecitinas y hemólisis.

En la Tabla 3, se presentan los resultados obtenidos de la velocidad de hidrólisis del almidón promedio experimental, logrado por *Bacillus subtilis* en los biorreactores cilíndricos agitados, según el esquema de ensayo; observándose que cuando se trabajó con 1 % de almidón, pH de 7,5 y 40°C (ensayo N° 14) se logró una velocidad de hidrólisis promedio máxima de 0,166 g/h y una mínima de 0,055 g/h cuando se trabajó con 0,5% de almidón, pH 7,5 y a 25°C (ensayo N°4).

La Tabla 4, muestra los valores de los efectos estimados para la velocidad de hidrólisis del almidón promedio por *Bacillus subtilis* en los biorreactores cilíndricos agitados, obtenido con el programa de software Statgraphics Plus v. 7,0; se observa que el mayor efecto de la variable C (Temperatura) o combinación de variables BB (pH), se debe a que existe mayor diferencia de los valores calculados. Así tenemos que, la temperatura, C, muestra una mayor diferencia (0,0472 +/- 0,0236), seguido del pH, BB, (0,0827 +/- 0,0428), de la concentración de sustrato y temperatura, AC, (0,0433 +/- 0,0354); mientras que se muestra un menor efecto positivo, cuando interactúa la concentración de sustrato y el pH, AB, (0,0266 +/- 0,0368), y así sucesivamente.

En la Figura 3 se presenta el Diagrama de pares estandarizados para la velocidad de hidrolisis del almidón promedio por *Bacillus subtilis* en los biorreactores, según el análisis estadístico computarizado de Box-Benken Plus, donde la variable Temperatura tiene efecto positivo mayor, de manera individual, seguido por la interacción pH (BB) y concentración de sustrato y temperatura (AC), también se observa que la interacción de la Temperatura (CC) tiene un efecto positivo pero menor, las demás interacciones individuales y en pares que tienen un efecto negativo fueron anulados por el software, para el posterior análisis.

La Figura 4, representa la Respuesta de Superficie estimada con el programa de software Statgraphics Plus v. 7,0 para la velocidad de hidrólisis del almidón promedio por *Bacillus subtilis* en los biorreactores, manteniendo constante la temperatura de 31,5°C; se observa que a medida que se incrementa la concentración del almidón y el pH del sistema se incrementa la velocidad de hidrolisis del almidón por la bacteria, hasta un máximo de 0,166 g/h.

La Figura 5, permite observar las Líneas de contorno de la Respuesta de Superficie estimado con el programa de software Statgraphics Plus v. 7,0 para la velocidad de hidrolisis del almidón promedio por *Bacillus subtilis* en los biorreactores cilíndricos agitados manteniendo constante la temperatura de 31,5°C, donde se puede deducir que en la medida que dichas líneas de

tendencia se intercepten en el centro permitirá obtener los valores óptimos de concentración de almidón y pH del sistema.

La Tabla 5, muestra el Análisis de Varianza para la velocidad de hidrólisis del almidón promedio por *Bacillus subtilis* en los biorreactores cilíndricos agitados, donde se observa que existe mayor diferencia significativa entre la velocidad de hidrólisis y temperatura (valor F =3,700 y P=0,814), y entre la velocidad de hidrólisis y el pH evaluado (valor F =3,720 y P=0,897), al comparar los valores F y P respectivamente; en tanto que, existe una menor diferencia significativa entre la velocidad de hidrólisis y la combinación de las variables concentración de sustrato y temperatura, AC, (valor F =1,490 y P=0,256) .

En la Tabla 6, se muestra la respuesta de optimización, estimada con el programa de software Statgraphics Plus v. 7,0, de la velocidad de hidrólisis maximizada de *Bacillus subtilis* con un valor óptimo de 0,181 g/h a los valores óptimos de 1,4 % de almidón, pH de 7,8 y 31,5°C en los biorreactores cilíndricos agitados, manteniendo constante todas las demás condiciones del ensayo.



Figura 1. Colonias de bacterias aisladas de muestras de suelo en AA

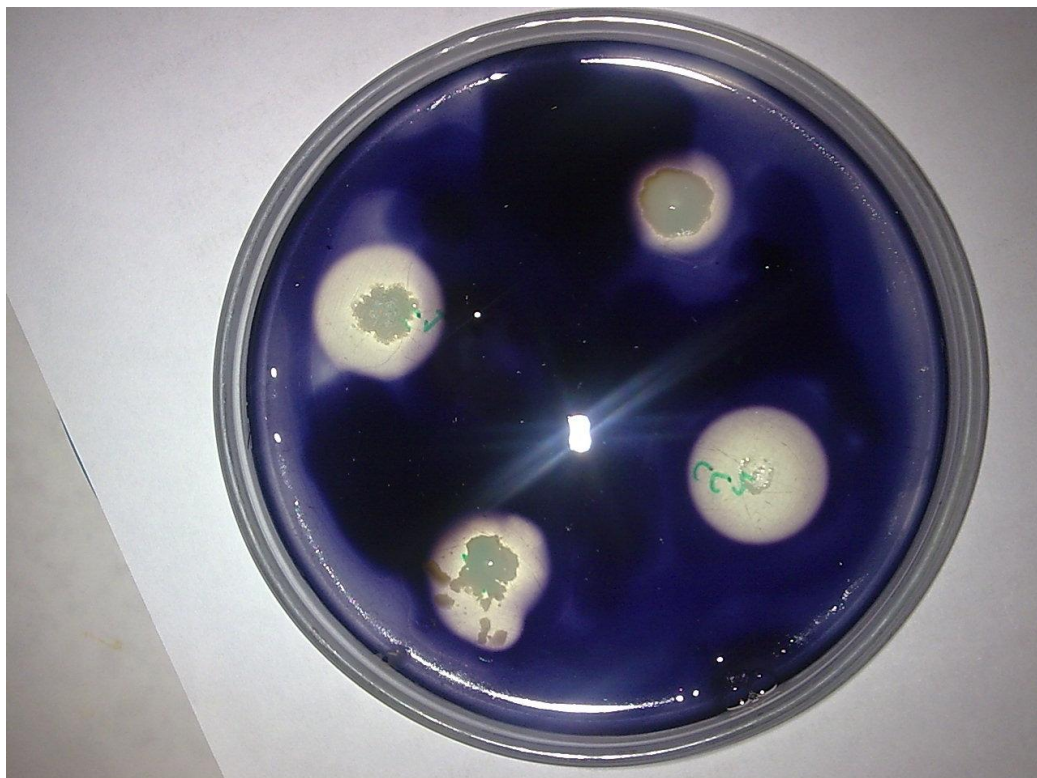


Figura 2. Selección primaria de bacterias con capacidad hidrolítica sobre el almidón en placa (método del yodo).

Tabla 1. Selección secundaria de las bacterias con capacidad hidrolítica sobre el almidón de papa en medio acuoso (0,5 % almidón, pH 7,0 y 25°C) mediante el monitoreo de la velocidad de hidrólisis de almidón.

Cultivo	Número de horas	Velocidad de hidrólisis de almidón promedio, (g/h)
FGM-01A+	5,5	0,090
FGM-02A+	8,3	0,060
FGM-03A+	4,0	0,125
FGM-04A+	5,8	0,086
FGM-05A+	5,5	0,090

Tabla 2. Características de identificación del cultivo FGM-03A+ seleccionado.

Características macroscópicas	Características microscópicas	Especie identificada
Colonias medianas, cremosas, brillantes y bordes irregulares.	Bacillos Gram + Esporas + Catalasa + Lecitinasa - Fermentación de la glucosa + Producción de ácido de manitol + Hemólisis - Movilidad + Hidrólisis de almidón +	<i>Bacillus subtilis</i>

Tabla 3: Velocidad de hidrolisis del almidón promedio por *Bacillus subtilis* seleccionado a diferentes condiciones de ensayo

Ensayo Nº	Condiciones de ensayo			Velocidad de hidrolisis promedio (g/h)
	Concentración de almidón (%)	pH (Valores)	Temperatura (°C)	
1	0, 5	7, 5	40	0, 083
2	1, 5	7, 0	30	0, 093
3	1, 0	8, 0	25	0, 083
4	0, 5	7, 5	25	0, 055
5	1, 5	7, 5	30	0, 100
6	1, 0	8, 0	30	0, 090
7	1, 0	8, 0	40	0, 100
8	0, 5	7, 5	30	0, 071
9	0, 5	7, 0	30	0, 071
10	1, 5	7, 5	40	0, 107
11	1, 5	8, 0	30	0, 083
12	0, 5	8, 0	30	0, 083
13	1, 0	7, 0	25	0, 062
14	1, 0	7, 5	40	0, 166
15	0, 5	7, 0	25	0.126

Tabla 4. Efectos estimados para la velocidad de hidrolisis del almidón promedio por *Bacillus subtilis* en los biorreactores cilíndricos agitados.

Parámetro	Valores		
C: Temperatura	0, 0472	+/-	0, 0236
AA	0, 0390	+/-	0, 0421
AB	0, 0307	+/-	0, 0314
AC	0, 0433	+/-	0, 0354
BB	0, 0827	+/-	0, 0428
CC	0, 0266	+/-	0, 0368
Promedio	0, 0467	+/-	0, 0296

Los errores estándares son basados sobre el error total con 8 d.f.

Leyenda:

- AA : Interacción dual de la variable Concentración de sustrato
- AB : Interacción dual de las variables: Concentración de sustrato y pH
- AC : Interacción dual de las variables: Concentración de sustrato y temperatura
- BB : Interacción dual de la variable pH
- CC : Interacción dual de la variable temperatura.



Figura 3. Diagrama de pares estandarizados para la velocidad de hidrólisis del almidón por *Bacillus subtilis*.

Leyenda:

AA: Interacción dual de la variable Concentración de sustrato

AB: Interacción dual de las variables: Concentración de sustrato y pH

AC: Interacción dual de las variables: Concentración de sustrato y temperatura

BB: Interacción dual de la variable pH

CC: Interacción dual de la variable temperatura.

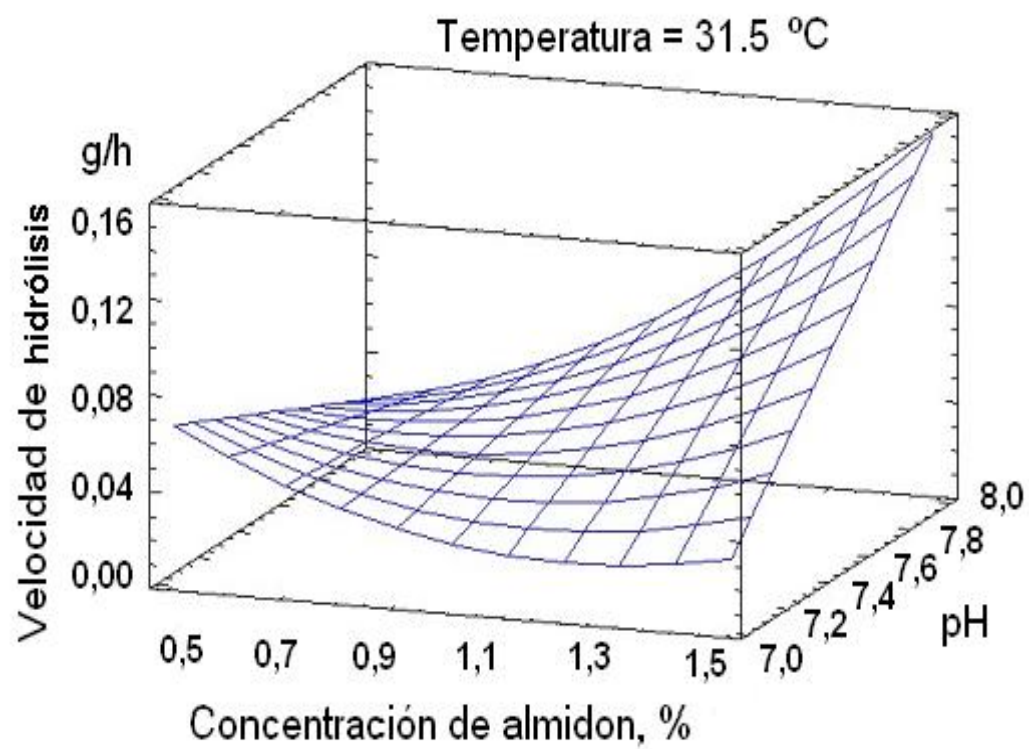


Figura 4. Respuesta de superficie estimada para la velocidad de hidrólisis del almidón por *Bacillus subtilis*.

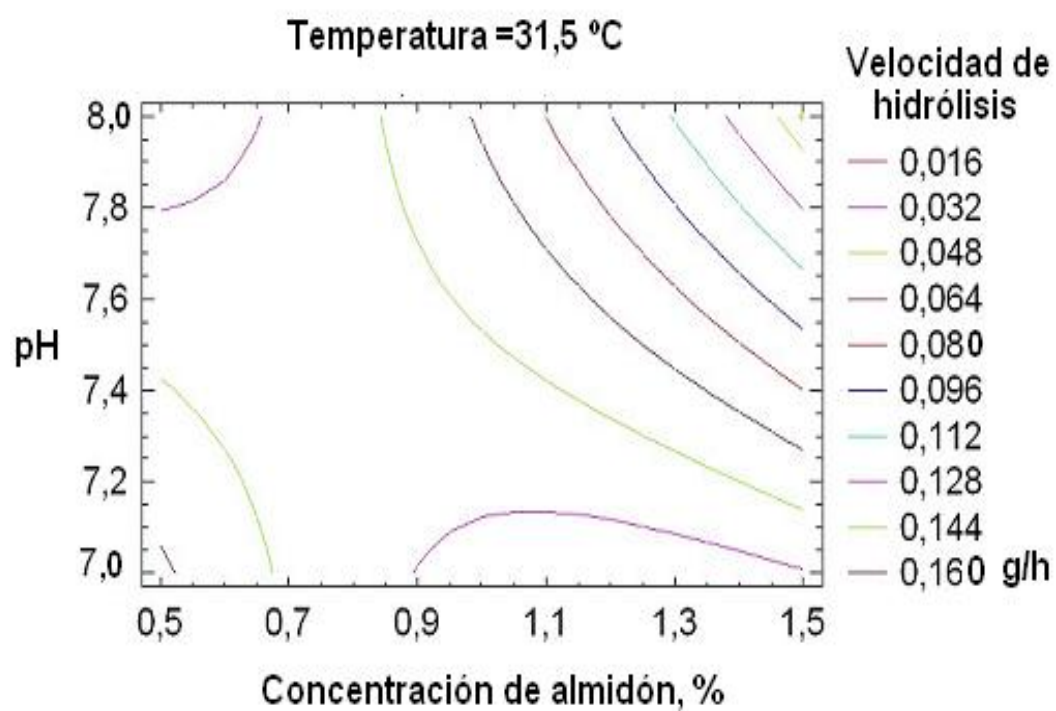


Figura 5. Líneas de contorno de la respuesta de superficie estimado para la velocidad de hidrólisis del almidón por *Bacillus subtilis*.

Tabla 5. Análisis de varianza para la velocidad de hidrólisis del almidón promedio por *Bacillus subtilis*.

	Suma de cuadrados	Df	Mean Square	F-Ratio	Valor P
C:Temperatura	0, 00349	1	0, 00349	3, 700	0, 814
BB	0, 00327	1	0, 00327	3, 720	0, 897
AC	0, 00131	1	0, 00131	1, 490	0, 256
AB	0, 00084	1	0, 00084	0, 960	0, 356
AA	0, 00075	1	0, 00075	0, 860	0, 381
CC	0,00046	1	0, 00046	0, 520	0, 489
Total error	0,00703	8	0,00087		
Total (corr.)	0,01475	14			

R-squared	=	52, 3303 %
R-squared (adjusted for d.f.)	=	16, 5781 %
Error Estándar del Estimado	=	0, 0296
Error Medio Absoluto	=	0, 0179
Estadístico Durbin-Watson	=	2, 1414 (P=0,2652)
Autocorrelación residual Lag 1	=	- 0, 1736

Tabla 6. Respuesta de la optimización, estimada con el programa de software Statgraphics Plus v. 7,0 de la velocidad de hidrolisis maximizada con un valor óptimo de 0,181 g/h de *Bacillus subtilis* seleccionado en un biorreactor cilíndrico agitado.

Parámetro	Bajo	Alto	Óptimo
Concentración de almidón (%)	0,5	1,5	1,4
pH (valor)	7,0	8,0	7,8
Temperatura (°C)	25,0	40,0	31,5

DISCUSIÓN

Se recolectaron y procesaron las muestras de suelo procedentes de las zonas de cultivo de papa de la ciudad de Huamachuco (Gobierno Regional, 2008), y se logró aislar colonias de bacterias en placas con AA (Figura 1); la selección primaria de estos cultivos se hizo en base a su capacidad hidrolítica sobre el almidón, mediante la técnica del lugol (Villanueva y col, 2007), previa a la siembra por puntura en placas de AA y que después del tiempo de incubación se determinó los halos netos de hidrólisis del almidón en placa (Figura 2).

La selección secundaria del cultivo con una máxima capacidad hidrolítica del almidón en medio acuoso, se logró mediante el ensayo en los biorreactores cilíndricos agitados a condiciones de 25°C, pH 7,0 y a una concentración de 0,5 % de almidón (Anexo, Figura 6), los cuales fueron monitoreados midiendo el tiempo en que se hidrolizaba todo el almidón presente; esto permitió seleccionar el cultivo FGM-03A+ con mayor capacidad catalítica para hidrolizar el almidón, al hidrolizar en un menor tiempo la cantidad de almidón presente en los biorreactores en las condiciones de ensayo (Tabla 1), con una velocidad de hidrólisis del almidón promedio de 0,125 g/h.

La identificación de dichos cultivos con capacidad hidrolítica sobre el almidón se realizó mediante la descripción de las características morfológicas de las colonias (Tabla 2), siendo estas colonias cremosas, medianas y de bordes irregulares; y de acuerdo a sus características tintoriales fueron bacilos Gram positivos (Anexo, figura 16), esporulados; y en base a los hallazgos de las pruebas bioquímicas fueron catalasa (Cortez, 2001) y Amilasa positivos, fermentadores de la glucosa, móviles, lecitinasas y hemólisis negativos (Mac Faddin, 1980; Villanueva y col, 2007), lo que permitió determinar que el cultivo aislado y seleccionado corresponde a la especie *Bacillus subtilis* (Anexo, Cuadro 2). Este tipo de aislamiento y selección es común a los hallazgos registrados por Hashim et. al, 2004, quienes reportaron el hallazgo de 5 cultivos bacterianos de aguas termales con una identidad compartida al género *Bacillus* y 9 bacterias con una identidad compartida con la especie *B. halodurans*; caso similar a lo registrado por Thippeswamy et al, 2006, quienes lograron aislar e identificar una cepa de *Bacillus* a partir de residuos industriales.

El almidón es el material de reserva que predomina en las plantas y comúnmente se presenta en gránulos con una típica estructura en capas y está compuesto de dos fracciones: la amilosa y amilopectina; la amilosa es soluble en agua caliente y se tiñe de azul con una solución acuosa de yodo caracterizada por una cadena helicoidal no ramificada de unas 200 – 500 unidades de D -glucosa con enlaces 1,4- α -glicosídicos (Seoanez, 2000).

Los almidones nativos tienen características muy específicas y se comportan de diferentes maneras en cuanto a sus propiedades funcionales, lo que depende de su fuente natural; por tal motivo, el estudio de fuentes convencionales y no convencionales de almidones es una alternativa a las diferentes industrias (alimentos, cosméticos, papel, textil y otras.) en su utilización; siendo los cereales, raíces, tubérculos y leguminosas, las principales fuentes de obtención de almidones en nuestro país, así como del maíz, papa, yuca y arroz; y por consiguiente, los almidones son utilizados como materia prima en diversas industrias y representan un insumo vital para la industria de alimentos como estabilizadores, ayudantes en la emulsificación, mejoradores de textura y otros, en donde sus propiedades funcionales son determinantes en la calidad del producto final (Prescott y col, 2002).

Actualmente los almidones tienen una orientación más importante desde el punto de vista económico como es la utilización de los mismos en la producción de biocombustibles (Vanguardia 1, 2008); en la investigación, todos los ensayos realizados se hicieron utilizando almidón comercial, que sirvió como agente inductor de las síntesis de amilasas en *Bacillus subtilis* al mismo tiempo como sustrato para ser degradado dentro del sistema de ensayo.

Bacillus subtilis se caracteriza por producir enzimas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que ellos mismos empleen estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones (Leveau y Bouix, 2000). El cultivo de *Bacillus subtilis* seleccionado dentro de los demás cultivos aislados con capacidad hidrolítica presentó un

potencial catabólico comprobado sobre el almidón en medio acuoso; similar propiedad se ha encontrado en otros microbios como *Pseudomonas* sp y *Aspergillus* sp que producen α -amilasas para degradan el almidón, al mismo tiempo que producen proteasas, glucoamilasas y pectinasas (Morata, 2005).

Adicionalmente, *Bacillus subtilis* se caracterizó por presentar esporas y su hábitat es el suelo, donde se tornan metabólicamente activos cuando tienen disponibles sustratos para su crecimiento pero que el agotamiento de estos promueve la formación de esporas y permanecen durante mucho tiempo en un determinado ambiente; por lo que Sánchez et. al, 2005, logró aislar cepas microbianas de diferentes nichos ecológicos, productoras de las enzimas amilolíticas; por ejemplo, de yuca (Arteaga, 1999; Sánchez y Figueroa, 2000), del procesado tanto de maíz y de papa (Bocanegra y Gallardo, 2005) y los medios empleados fueron CZAPEK, PCA y MRS modificados y las cepas obtenidas fueron debidamente purificadas, críoconservadas e identificadas bioquímicamente, donde 9 cultivos, fueron identificadas bioquímicamente y que correspondieron a los géneros *Bacillus* sp, *Clostridium* sp y *Kurthia* sp; donde dichas enzimas amilolíticas obtenidas a partir de las cepas nativas presentaron pesos moleculares que oscilan entre 30 y 150 kDa aproximadamente. También producen amilasas muchos hongos del suelo (Ramírez y Coha, 2003) y *Streptomyces* (Carrillo, 2003) y *Termomucor* (Satyanarayana y col, 2004).

Las amilasas intervienen en la hidrolisis del almidón, por ello se han utilizado las amilasas bacterianas provenientes de *B. subtilis* (Dercová y et al,

1992) y *B. lichenformis* (Rubio, y col, 2001), las cuales se caracterizan por ser estables a altas temperaturas e hidrolizar enlaces 1,4- α -glicosídicos aún en el centro de la cadena, por lo que se la conoce como endoamilasa, produciendo glucosa, maltosa y oligómeros de 3 a 7 unidades; están presentes en plantas, animales y microorganismos que permiten reducir la viscosidad de la solución de almidón y el color de su reacción con yodo durante el proceso hidrolítico (Carrillo, 2003). La disolución acuosa obtenida como producto de la acción de *Bacillus subtilis* sobre el almidón en los biorreactores cilíndricos agitados corresponde a un extracto crudo donde debe contener un grupo de enzimas relacionado con la hidrólisis del almidón, lo que correspondería evaluarlo para medir la cantidad de enzimas presentes en el extracto enzimático crudo (disolución concentrada de enzimas). La hidrólisis enzimática del almidón se utilizó para obtener varios hidrolizados con diferentes composiciones (Baks et al, 2008).

La producción de jarabes glucosados y/o fructosados se basa en la hidrólisis del almidón, y ha sido empleada industrialmente desde la década del 70; desde entonces, se han venido desarrollando procesos enzimáticos que han permitido su obtención, dando origen a nuevos productos con mayor poder edulcorante y menor costo en relación con el azúcar de caña (Montoya, 1998; Quintero, 1998). Estos procesos requiere dos etapas, la primera etapa, denominada de licuefacción, que consiste en una hidrólisis de las largas cadenas de almidón para obtener maltodextrinas (cadenas mas cortas de almidón), ésta es llevada a cabo por la enzima α -amilasa que corta los enlaces

glicosídicos α -1,4 internos en forma aleatoria del almidón. En la segunda etapa, denominada sacarificación, se hidrolizan los enlaces α -1,4 y/o α -1-6 del terminal no reductor de la cadena de dextrina, por la enzima amiloglucosidasa, liberando glucosa (Cueva, 1993; Uhlig, 1998).

Los eventos bioquímicos anteriores han ocurrido en cada uno de los biorreactores cilíndricos agitados durante el tiempo de incubación en las diferentes condiciones de evaluación, porque se observó un aumento de la turbidez del medio de cultivo que representó el incremento de la biomasa de *Bacillus subtilis* al utilizar el almidón, como fuente de carbono, y los demás ingredientes para su desarrollo, crecimiento y reproducción; al mismo tiempo que ha tenido que ocurrir la excreción de las amilasas hacia el medio de cultivo para permitir la hidrólisis del almidón, pero que parte de las moléculas resultantes de dicha hidrólisis son asimiladas por la bacteria para obtener la energía y los metabolitos primarios para su crecimiento (James y Lee, 1997; Quintero, 1998). En el mundo, actualmente se buscan α amilasas y amiloglucosidasas con características diferentes a las ya comercializadas (Agudelo y col, 2004).

La velocidad de hidrólisis del almidón por *Bacillus subtilis* se determinó midiendo el tiempo total, en horas, requerido para hidrolizar completamente el almidón (Anexo, Figura 11 - 15), en las condiciones establecidas de concentración de sustrato, pH y temperatura. Estas tres variables de estudio evaluadas, fueron sugeridas por Robles, 2000, quien analizó la producción de bioinsecticidas a diferentes valores de pH, temperatura y concentración de

proteínas. Los quince ensayos previamente establecidos por el programa de Staffgraphics Plus versión 7,0 (Cuadro 1), permitieron predecir las posibles combinaciones de estas variables que fueron ensayadas y monitoreadas permitiendo alcanzar una velocidad de hidrólisis del almidón experimental máxima de 0,166 g de almidón/h (Tabla 3).

La adición de una disolución de hidrolizado de caseína al 0,1% en un medio de constitución química definido permitió acortar la fase lag y aumentar la tasa de crecimiento y la inducción de la alfa amilasa de *Bacillus stearothermophilus* cuando se evaluó utilizando como fuente de carbono la fructosa y glucosa, sacarosa, maltosa, almidón y glicerol; se comprobó que la alfa amilasa fue producida durante la fase logarítmica de crecimiento y la cantidad producida fue inversamente proporcional a la tasa de crecimiento, lográndose una mayor cantidad de enzima con glicerol, glucosa y en menor proporción con sacarosa y fructosa (Welker y,Campbell, 1963). En tal sentido, la inclusión de la peptona en el medio de producción, se justifica para proveer los monómeros necesarios en la síntesis de la cantidad necesaria de la alfa amilasa por parte de la bacteria que tiene como inductor la presencia del almidón en el medio de fermentación.

El análisis de las variables, permitió definir que éstas actúan de manera independiente, en pares o en interacción múltiple con un efecto que puede ser positivo o negativo; es decir que permite el incremento o disminución de la velocidad de hidrólisis del almidón por *Bacillus subtilis* en los biorreactores cilíndricos agitados (Rodríguez-Sanoja et al, 2005), como se demuestra en la

Figura 3, donde se observa que la temperatura tiene un mayor efecto positivo (C) de manera independiente sobre la velocidad de hidrolisis, seguido del pH (BB), y luego por una interacción de la concentración de sustrato y temperatura (AC), y concentración de sustrato y pH (AB), etc (Tabla 4).

Por otro lado, el enfoque estadístico de respuesta de superficie estimada en la Figura 4, indica que la velocidad de hidrolisis del almidón fue máxima (0,166 g/h) cuando el pH se incrementa hasta 7, 8 cuando se mantiene constante la temperatura a 31, 5°C; en tanto que se observa una disminución de la misma cuando se incrementa la concentración de almidón hasta 1, 5 %. Todo esto, se corrobora con las líneas de contorno de la respuesta de la superficie estimada (Figura 5), donde se establece un efecto interactivo positivo (acercamiento) entre la variable pH y velocidad de hidrolisis y no así entre la variable concentración de sustrato y velocidad de hidrolisis (distanciamiento entre ellos) en las mismas condiciones de temperatura (31,5°C).

El análisis de varianza mostró la adecuación del sistema de trabajo y número de ensayos de verificación que confirmaron su validez (Tabla 5), donde se demuestra en primer lugar, que existe diferencia significativa entre la velocidad de hidrolisis del almidón con la temperatura(C) cuando actúa de manera independiente, y en segundo lugar cuando hay interacción del pH(BB) y así sucesivamente, pero que no hay diferencia significativa entre la velocidad de hidrolisis y la interacción con la concentración de sustrato (AA). De igual modo, después del procesamiento de los demás resultados con el mismo diseño estadístico permitió predecir una velocidad de hidrolisis óptima de 0,181

g/h ajustando el sistema de ensayo a las condiciones óptimas de 1,4 % de almidón (sustrato), pH de 7,8 y 31,5°C en los biorreactores (Tabla 6).

Será necesario, entonces hacer un trabajo posterior de escalamiento con las condiciones optimas logradas en este trabajo con el microbio aislado con un mayor volumen de trabajo, como el realizado por Saran et al, 2007, quienes incrementaron la producción de proteasas extracelulares de *Bacillus* sp cuando trabajaron en un biorreactor de 30 L utilizando las condiciones optimizadas por el diseño estadístico de respuesta de superficie.

El incremento de la concentración de sustrato en el sistema de ensayo permitió disponer de mayor número de moléculas de almidón en la disolución para interactuar con la amilasa excretada por *Bacillus subtilis*, porque las amilasas resultan ser más estables a concentraciones altas de sustrato (Trevan y col,1990), pero que si esta sobrepasa la cantidad de saturación (cantidad equimolecular de sustrato y enzima), quedará como exceso y no constituirá un incremento de la velocidad de hidrolisis, sino mas bien tendrá un efecto negativo de inhibición de la catálisis, al no permitir una buena interacción entre el sustrato y la molécula enzimática.

Por otro lado, la concentración de iones H^+ e OH^- (pH del sistema) influyen en la carga neta de las moléculas que interactúan: sustrato y enzima, pudiendo desestabilizar dicha unión almidón – amilasa, que tendría como consecuencia una disminución de la velocidad de hidrolisis y que en la medida que dichas concentraciones no modifiquen la carga neta del almidón y de la

amilasa la interacción se llevará a cabo de manera positiva (McKee y McKee, 2003).

El efecto positivo de la temperatura al incrementar la velocidad de hidrólisis del almidón por *Bacillus subtilis* ésta determinado por la cantidad de calor dentro del sistema (Temperatura) que permitió la interacción entre las moléculas del almidón y la amilasa (Anexo, figura 9) , promoviendo un acercamiento mutuo, un acoplamiento rápido e inicio de la catálisis (Voet y Voet, 2006); estas interacciones serán más adecuadas y rápidas (de recambio) en la medida que no se altera la estructura funcional de las enzimas presentes. Por su naturaleza proteica, cualquier incremento de temperatura que desestabilice dicha interacción o altere la estructura tridimensional de la molécula enzimática hace que se pierda la acción catalítica y por lo tanto disminuya o anule dicho proceso catalítico.

La temperatura óptima para la producción de amilasa por *Thermomonospora curvata* después de tres días de incubación en un sistema agitado con 1% de almidón fue de 65° C, y exhibió un óptimo de pH bastante amplio en el rango de pH 5,5 a 6,5 y cuando se purificó fue rápidamente inactivada en valores de pH por debajo de 7, 0 a 65° C. A pH 7, 0 y 8, 0; la enzima era estable, pero no mostró la activación de calor observada con los preparativos crudos (Glymph and Stutzenberger, 1977); mientras que la alfa amilasa de *Geobacillus thermoleovorans* exhibió una temperatura óptima de 100°C y un pH de 7, 0 cuando se había sacarificado almidón de manera eficiente (Satyanarayana et al, 2004); en tanto que se logró una máxima

producción de amilasa por una cepa de *Bacillus* que se trabajó con una temperatura óptima de 60°C y pH de 6, 5 cuando la maltosa fue usada como fuente de carbono (Thippeswamy et al, 2006).

De igual forma, la actividad de la alfa amilasa de *B. subtilis* aumentó 14 veces cuando se trabajó a 42°C, pH 7,0 con 100 mL de medio nutritivo que contenía almidón al 0,1% y una proporción de C: N de 1: 2, con una velocidad de rotación de 220 rpm durante 4-6 días de trabajo (Avdiuk et al, 2008). Así mismo, al evaluar el efecto de la temperatura sobre la biodegradación aeróbica de un lote de papa con un cultivo mixto de bacterias del género *Bacillus*, se encontró que el proceso ocurrió más rápido cuando la temperatura oscilaba desde 30 a 45 °C, en un biorreactor agitado de 5 litros (Krzywonos et al, 2008).

El bioetanol es elaborado a través de la fermentación de productos con alto contenido de carbohidratos como la papa, hemicelulosa como la madera blanda, inclusive celulosa o residuos de papel, melazas azucareras, maíz, almidón de trigo, almidón de papa, almidón de yuca y por hidrólisis y fermentación de residuos celulósicos (Kafarov y col, 2007). El surgimiento de plantas de alcohol carburante de primera generación a partir de almidón, en la región Caribe, implica la transformación de la materia prima por procesos de hidrólisis mediante la acción de un complejo de amilasas capaces de degradarlo en azúcares (Durango y col, 2008).

La implementación de los sistemas enzimáticos en las empresas conlleva a generar altos costos de producción; por lo tanto, la investigación

tuvo como principio, desarrollar e implementar aplicaciones microbiológicas y biotecnológicas para degradar almidón mediante la fermentación en un medio acuoso, y para buscar soluciones técnicas a la problemática planteada del proceso de hidrólisis del almidón (Durango y col, 2008), conviniendo en dar a conocer una alternativa de uso para estos fines de los residuos de papa que como producto natural permitirán amenguar el destino de la papa como alimento importante de bajo costo y las condiciones cinéticas para su hidrolisis completa.

La generación de biocombustibles a partir de plantas que son empleadas en otras actividades humanas tiene el riesgo de generar un desequilibrio de diversas índoles, como el ocurrido a finales de 2006, en México, cuando el precio del maíz se incrementó y repercutió en todos los productos de su cadena (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2009); del mismo modo, según el primer informe publicado por Rasmussen et al, 2010, se ha logrado degradar residuos lignocelulósicos de maíz húmedo para la producción de biocombustible sostenible obteniéndose un rendimiento máximo de 3,3 g de etanol/100 g utilizando un proceso puramente biológico. Se propone utilizar los residuos agroindustriales de la papa, previo tratamiento, y que mediante un proceso biológico con *Bacillus subtilis*, se obtenga jarabes ricos en azúcares reductores para ser utilizados posteriormente en la fermentación hasta etanol.

PROPUESTA

Como resultado de esta investigación propongo degradar almidón de papa, para producir jarabes glucosados: en tal sentido, utilizo el cultivo de *Bacillus subtilis* seleccionado en un biorreactor de 14,28 L de capacidad a las condiciones de trabajo de 1, 4 % de almidón; pH 7,8 y a 31, 5 °C.

DESCRIPCIÓN DE MATERIAS PRIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES GLUCOSADOS

La Caña de Azúcar.- Se cultiva en regiones de clima sub - tropical donde el agua es abundante pero distribuida bajo riego controlado. Su principal ambiente geográfico es la Costa Central y Norte del Perú en los valles de La Libertad; Lambayeque; y Lima, las cooperativas agroindustriales tienen extensas áreas de cultivo de caña que, luego, lo procesan en sus fábricas, conocidas como ingenios para la elaboración de azúcar y otros derivados. En menor escala, se cultiva en la provincia de Ambo y San Martín.

La papa.- En los pisos medios o Región Quechua se cultiva la papa, que es la base de la economía andina y, también, elemento básico de la alimentación de la población de esta región. Hay una gran variedad de papas que difieren en el color, la forma y el tamaño de los tubérculos. De la papa se elabora el

Chuño y la papa seca. Su cultivo está difundido desde el nivel del mar hasta los 4,000 m.s.n.m.

El Maíz.- Es otro de los legados del Perú a la humanidad, como la papa. Se le cultiva en todo el Perú, desde el nivel del mar hasta los 3,500 m.s.n.m. El maíz de tipo duro se cultiva en la Costa y en la Selva, con el que se preparan los alimentos para las aves. El maíz de tipo blando se cultiva en la Región Andina y se destina a la alimentación de la población, en forma de choclo, cancha mote, jora, humitas, tamales harina, etc. En el valle de Urubamba se produce el maíz Cuzco, considerado como mejor maíz del mundo.

PRODUCCIÓN AGRÍCOLA A NIVEL REGIONAL

El valor de la producción agropecuaria en La Libertad en el 2009 fue de 2 mil 146 millones de soles, siendo la caña de azúcar el producto con mayor siembra. Así mismo, según información del Ministerio de Agricultura, los productos con mayor cantidad de hectáreas sembradas en la región son: la caña de azúcar, el arroz cáscara, la papa, el maíz amarillo duro, la cebada grano, el algodón rama y la cebolla.

La papa (*Solanum tuberosum*), es un tubérculo que se cultiva en nuestra región en zonas que van desde los 2000 y 3000 m sobre el nivel del mar (m.s.n.m). En el año 2009, se han producido aproximadamente 320,604 toneladas, con más de 20 000 hectáreas sembradas en la Sierra Liberteña principalmente en las provincias de Sánchez Carrión, Santiago de Chuco, Julcán y Otuzco; que se transporta al mercado local, regional y nacional.

Provincias de la Región de La Libertad					
	Sánchez Carrión	Santiago de Chuco	Julcán	Bolívar	Patáz
	Papa	Papa	Papa	Papa	Papa
	Cebada	Maíz	Trigo	Cebada	Cebada
	Trigo	Trigo			
	Lenteja	Cebada			
Cultivos	Frejol				
	Chocho				
	Ciruela, Plátano				
	Camote, yuca				
	Mango, naranja				

INEI: Censo de Población y Vivienda del Perú 2009

RECURSO LOCAL:

El 75 % de la materia seca de la papa está compuesto por almidón, que es parcialmente semicristalino e insoluble en agua a temperatura ambiente, siendo la amilosa uno de los mayores componentes (24 %).

MATERIA PRIMA

Utilizo el almidón de papa comercial procedente de los mercados Mayorista y La Hermelinda de la ciudad de Trujillo.

METODOLOGÍA

1. ADQUISICION DE LA MATERIA PRIMA

A partir de los locales de venta, al por mayor y menor, compro el almidón de papa comercial llamado comúnmente “Chuño”.

2. DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN DE ALMIDON SOLUBLE

Determino la concentración de almidón soluble en la disolución, mediante el método de lugol en comparación con la curva patrón de almidón realizado con el espectrofotómetro a 660 nm.

3. PREPARACION Y ESTANDARIZACION DEL MEDIO DE PRODUCCION

Preparo el medio de producción (Caldo almidón de papa) con la siguiente composición química: Peptona 1,0 %; almidón 1,4 %; Ca Cl_2 0,5 %; fosfato disódico y fosfato monosódico para ajustar a un valor de pH de 7,8.

4. CONSTRUCCION DEL BIORREACTOR

Construyo un biorreactor cilíndrico tipo tanque agitado, utilizando el software de diseño computarizado (Barrena y Barrena, 2001), de material de acero quirúrgico, con las siguientes características técnicas:

Volumen total (m ³)	=	0,01428
Altura del biorreactor (m)	=	0,546
Diámetro del biorreactor (m)	=	0,182
Volumen de trabajo (m ³)	=	0,010
Altura del líquido (m)	=	0,384
Nº de turbinas	=	3, tipo Rushton de disco con 6 paletas planas
Diámetro de la turbina (m)	=	0,061
Diámetro del disco de la turbina (m)	=	0,041
Ancho de cada paleta (m)	=	0,018
Altura de cada paleta (m)	=	0,015
Distancia fondo de tanque a turbina (m)	=	0,0782
Nº de baffles	=	4, simétricos
Ancho del baffle (m)	=	0,0182
Separación baffle a tanque (m)	=	0,004
rpm del motor	=	200,00

Eficiencia del motor (%)	=	75,00
Tiempo de mezcla (s)	=	2, 30
Nº de Reynolds	=	635,67
Nº de Potencia	=	3,80

5. ACONDICIONAMIENTO, INOCULACION DEL BIORREACTOR Y ARRANQUE

Al biorreactor, agrego 7,50 L de medio de producción y pre-incubo en baño maría de 31,5 °C por 15 min, e inoculo 0,75 L de una suspensión de ***Bacillus subtilis***, sembrado en caldo almidón e incubado a 37 °C por 48 horas, a una concentración equivalente al tubo Nº 1 del nefelómetro de Mc Farland (3×10^8 células/mL). Inicio la agitación por conexión del sistema eléctrico de las paletas.

6. PROCESO PRINCIPAL: HIDRÓLISIS DE ALMIDON (Vargas, 2002)

FUNDAMENTO:

Las bacterias *Bacillus subtilis* hidrolizan el almidón (macromolécula) mediante una hidrólisis extracelular preliminar, liberando una variedad de enzimas extracelulares al medio de cultivo acuoso. Donde la alfa-amilasa (Alfa 1,4-D- Glucan Glucano-hidrolasa) hidroliza los enlaces glucosídicos alfa-1,4 del almidón que poseen 3 o más unidades de D-glucosa en unión alfa-1,4. El ataque se hace en forma no selectiva (tipo

endoenzima) sobre varios puntos de la cadena simultáneamente, aunque los primeros productos de la hidrólisis son siempre oligosacáridos de 5-7 unidades de glucosa, o un número múltiplo. La amiloglucosidasa (Alfa-1,4- D-Glucan glucohidrolasa) es una exohidrolasa también conocida como glucoamilasa, que hidroliza los enlaces glucosídicos alfa-1,4 y alfa-1,6 de la amilosa y la amilopectina separando unidades de glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena.

RECUPERACION DEL PRODUCTO

Después de 3 horas, comienzo a circular la solución a través de una membrana o cartucho de ultrafiltración utilizando una bomba peristáltica regulada para dispensar un flujo de 5 mL/min. La membrana de polisulfona con fibras internas con un diámetro de 0,5 mm tiene un diámetro interior de 1,9 cm, superficie de membrana de 0,7 m y una longitud de 36,5 cm. Separo moléculas con un peso molecular menor a 5,000 (permeado) y con el uso de esta membrana separo la glucosa de manera continua que se produce.

El sistema de conversión continua a glucosa es efectivo, siendo el factor más limitante la capacidad de filtración de la membrana utilizada, debido a que el flujo de filtrado (solución glucosada) disminuye después de seis a ocho horas de iniciado el proceso de sacarificación.

ANÁLISIS DEL PRODUCTO FINAL

Para el análisis y caracterización del producto utilizo la Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), por ser ésta una técnica que permite determinación directa y rápida de azúcares, incluyendo oligosacáridos, con una mínima preparación de muestra y brindando una precisión igual a la de otras técnicas cromatográficas (cromatografías de: gas, papel, capa delgada, partición líquida, intercambio iónico y permeación con gel).

El jarabe resultante del almidón de papa, rinde una cantidad de glucosa equivalente a 40°Brix.

ESTRUCTURA DE COSTOS (Montoya y col, 2005)

Los costos de producción de jarabes glucosados a partir de una materia prima en particular es el siguiente:

Insumos	U\$S / TM
Materia prima	
<i>Gastos de Explotación</i>	
<i>Energía :</i> Gas	14,90
Electricidad	4,55
Costo Energía	19,45
<i>Químicos:</i> Enzimas	7,95
Otros productos químicos y antibióticos	3,53

Químicos: Limpieza bateas/torre de enfriamiento	0,88
Agua	1,06
Desnaturalizante	7,30
Costo Químico	20,74
<i>Otros</i>	
Amortización de Activos Fijos	29,62
Mantenimeintos y Reparaciones	5,98
Costo Laboral Operativo	2,35
Management	2,88
Gastos de Administración	4,79
Licencias, Fees & Seguros	0,68
Gastos Varios	2,31
Intereses Pagados	8,29
Tasas y Contribuciones	1,71
Costos Otros	58,61
Costo Total del Proceso	151,70

El producto final de este proceso, jarabe glucosado, tiene un costo internacional de \$ 375,06 / TM.

Asumiendo que el proceso de elaboración del jarabe de glucosa tiene el mismo costo con cualquier materia prima, entonces, se compara los costos de las diferentes materia prima que sirven para la transformación.

Materia prima	Costo, \$/ TM
Caña de azúcar	147,00
Maíz Amiláceo	111,71
Papa	75,00

Otro criterio a comparar sería el costo de producción de papa en una hectárea al año en relación al del maíz, por ejemplo. Así tenemos que se logra cosechar dos ciclos de cultivos de maíz por año; en tanto que, se podría lograr realizar hasta tres ciclos anuales de cosecha de papa (aproximadamente 4 meses por ciclo). Desde este punto de vista, el costo de producción por kg de papa será menor al del maíz si tomamos en cuenta su rendimiento por hectárea anual con ese número máximos de ciclos de cosecha. A pesar de que el rendimiento de almidón de papa es inferior al del maíz, la producción superior por hectárea del cultivo de papa se traduce en un incremento del rendimiento teórico de almidón por hectárea, que se traduce en un menor costo marginal por unidad de almidón a extraer.

FACTILIDAD DE LA PROPUESTA

La Cámara de Comercio y Producción de La Libertad (CCPLL), publicó el siguiente cuadro referido a la producción agrícola de la región LA LIBERTAD por producto, expresada en TM:

Productos	2005	2006	2007	2008	2009
Caña de azúcar	2 885 083	3 294 937	3 760 266	4 345 684	4 807 464
Arroz	235 717	258 635	285 693	306 995	338 603
Papa	343 611	291889	335 097	311 642	320 604
Maíz amarillo duro	153 751	174 815	232 599	252 567	199 946
Espárrago	100 974	117 144	147 586	154 721	166 861
Maíz amiláceo	22 021	19 333	19 085	20 137	85 345
Trigo	45 014	46 800	45 435	51 593	60 415
Cebada	47 744	44 979	39 023	42 388	50 654
Uva	44 957	44 290	45 178	40 689	43 846
Cebolla de cabeza	15 041	29 003	29 687	40 505	34 103
Los Demás	135 091	105 662	109 004	82 975	83 991

Fuente: MINAG Elaboración: Oficina de Información Empresarial - CCPLL

Así mismo, el Gobierno Regional, destaca que la provincia de Sánchez Carrión tiene una mayor producción de papa, que asciende a 121 693 (39%) toneladas, seguida de Santiago de Chuco con 81 650 (21%), Otuzco con 45 099 (14%), Julcán 38,570 (12%), Patáz 19 008 (7%), Bolívar con 14 563 (5%), entre otras (Dirección Zonal AgroRural La Libertad, 2010).

Por otro lado, el martes, 09 de marzo de 2010, el presidente de la Coordinadora Regional de Productores de Papa de La Libertad (Corpapa), Danilo Angulo Bejarano informó, que la papa es uno de los principales productos alimenticios que se encuentra en las mesas de todas las familias, desde las más humildes hasta las más ricas, ya sea en la sierra, costa y selva. Con preocupación reveló que el precio de la papa en chacra es de 20 céntimos el kilo. Con este precio los productores de La Libertad no cubren ni los costos de producción por hectárea. Refirió, además que la producción anual de papa en La Libertad alcanza 300 mil toneladas y que el producto muchas veces se queda sin salir a los mercados por falta de buenas vías de comunicación y por la falta de industrialización. Este es otro gran problema que debe solucionarse si el producto se industrializa, acotó, tras anunciar que el presidente nacional de Corpapa, Javier García Pando, estará en Trujillo para exponer a las autoridades proyectos relacionados a la industrialización del tubérculo (Dirección Zonal AgroRural La Libertad, 2010).

Si la producción anual del 2009, fue de 320 604 TM y la población total de La Libertad es de 1 617 050 habitantes (2009), que tiene una tasa de consumo de papa de 80 Kg/habitante, lo que representa un consumo total de 129 364 000 kg, equivalente a 129 364 TM (40,35%) de papa destinada al consumo humano directo, quedando un excedente de 191 240 TM/año (59,65 %), que se puede utilizar para la producción de jarabe glucosados.

IMPACTO SOCIAL

Varios cultivos agrícolas se han visto afectados por la producción de biocombustibles en este lado del continente y nuestro país ha sido incluido como proveedor principal de la materia prima (caña de azúcar), por lo que se urge encontrar reemplazos de otras materias primas. Al igual que en otros países se están iniciándose la investigación de diversas fuentes de materias primas portadoras de azúcares disponibles como la melazas, remolacha, suero de leche, yuca (Mera y Carrera, 2002), camote (Chávez, 2002) y diversos cereales como trigo, cebada, centeno, sorgo dulce, arroz, maíz y material celulósico como madera, residuos de pulpa de papel y residuos agrícolas (Patrouilleau, 2008). En este sentido una buena opción es la utilización de la papa para darle un valor agregado y lograr su explotación comercial en nuestra región y en el país. Utilizar almidón de papa para convertirlo en jarabes glucosados y posterior uso en la producción de bioetanol es novedoso, aunque la opción lógica es la caña de azúcar se deben considerar los beneficios sociales que puede tener el empleo de otros cultivos alternativos como la papa e inclusive buscar el aprovechamiento de los residuos.

La papa, por su bajo costo de comercialización, puede constituir una alternativa para el agricultor ya que se encuentra muy subutilizado. Entonces se pretende buscar alternativas de uso mediante la industrialización produciendo jarabes de dextrina y glucosa a partir del almidón de papa, ya que presenta hasta un rendimiento del 20 % de almidón (peso seco) y el jarabe glucosado producido con almidón de papa rinde el 15 % sobre el peso seco inicial de la pasta de almidón.

CONCLUSIONES

De los cinco (05) cultivos aislados con mayor capacidad hidrolítica sobre el almidón en placa, se seleccionó el cultivo nativo FGM-03A+ que fue identificada como *Bacillus subtilis* con una máxima velocidad de hidrólisis del almidón en medio acuoso a condiciones de 0,5 % de almidón, pH 7,0 y 25°C.

Las condiciones óptimas que permitieron a *Bacillus subtilis* FGM-03A+ alcanzar una velocidad de hidrolisis experimental de 0,166 g de almidón por hora en los biorreactores cilíndricos agitados fueron: Concentración de almidón de 1,0%, pH de 7, 5 y Temperatura de 40, 0 °C.

La temperatura y el pH tuvieron un mayor efecto positivo cuando se trabajó a los valores de ensayo (40°C y pH 7,5) sobre la velocidad de hidrolisis del almidón por *Bacillus subtilis* FGM-03A+ en un biorreactor cilíndrico agitado.

La máxima velocidad de hidrolisis del almidón por *Bacillus subtilis* en el biorreactor, en las condiciones óptimas de concentración de almidón al 1,4 %, pH de 7, 8 y 31,5 °C, será de 0,181 g de almidón / h.

RECOMENDACIONES

Evaluar las condiciones óptimas determinadas (concentración de almidón, pH y temperatura) para el cultivo de *Bacillus subtilis* seleccionado, en un biorreactor con mayor volumen de trabajo.

Comparar estos resultados, utilizando otros cultivos puros de *Bacillus* aislados de otras fuentes naturales

Utilizar residuos agroindustriales que contienen almidón para obtener jarabes de glucosa utilizando el cultivo de *Bacillus subtilis* aislado y evaluado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUDELO B, SÁNCHEZ C y C FIGUEROA. Producción de jarabe glucosado mediante sacarificación enzimática empleo de un reactor con membrana. Perú: Universidad Nacional de Trujillo, Ingeniería Química. Ingeniería Química; 2004; 415:196-199.
- AGUILAR G y J SALMONES. Fundamentos de catálisis. España: Edit. Acribia, S.A; 2003.
- ARROYO A. Producción de enzimas pectinasas por Actinomycetos en cultivo sumergido utilizando pectina y cascara de naranja. Tesis para optar el grado de Magister en Biotecnología. Perú: Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002.
- ARTEAGA M. Producción de glucosa a partir de *Manihot sculenta* con enzimas coinmovilizadas en cáscara de *Oriza sativa*. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias, mención Microbiología Industrial y Biotecnología. Perú: Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Trujillo; 1999.
- AVDIIUK K and L VARBANETS. [On line] Optimization of cultivation conditions of the alpha-amylase producer *B. subtilis* 147. Mikrobiol Z. 2008; 70(1):10-6. [Acceso 21/02/2010]

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18416149?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=48

AYALA J y R PARDO. Optimización por diseños experimentales. Perú: Edit. A & B S. A; 1995.

BAKS T, BRUINS M, MATSER A, JANSSEN A and R BOOM. [On line] Effect of gelatinization and hydrolysis conditions on the selectivity of starch hydrolysis with alpha-amylase from *B. licheniformis*. J Agric Food Chem. 2008; 56(2):488-95. [Acceso 21/02/2010]

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18095648?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=55

BARRENA M y A BARRENA. Diseño computarizado de un biorreactor tipo tanque agitado. Revista Antenor Orrego. 2001; 10(16): 57-69

BOCANEGRA A y R GALLARDO. *Bacillus* sp, hidrólisis de almidón, obtención de ciclodextrinas de *Solanum tuberosum*, de la región de Pamplona, En CLON. Colombia: Universidad de Pamplona. 2005; 3 (1): 57– 68.

BOX G and N DRAPER. Empirical mode building and response surfaces. New York: John Wiley & Sons; 1987.

BRAVO V, JURADO E, MARTÍNEZ J, REYES A and A GARCÍA. [On line] Enzymatic hydrolysis of soluble starch with an alpha-amylase from *B. licheniformis*. Biotechnol Prog. 2006; 22(3):718-22. [Acceso 21/02/2010]

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16739954?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=111

CÁMARA DE COMERCIO Y PRODUCCIÓN DE LA LIBERTAD. [En línea] La Libertad en el contexto nacional 2010 [Acceso 06/10/10]
<http://www.scribd.com/doc/35451714/Desarrollo-de-la-region-La-Libertad>

CARRILLO L. Actividad microbiana. [En línea] En Microbiología Agrícola; 2003. [Acceso 03/12/2009]
www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap3.pdf

CHAVEZ D. Elaboración de jarabe de glucosa partiendo del almidón de camote (*Ipomoea batata* L). Trabajo de graduación para optar el título de Ingeniero en Agroindustrias. Honduras; 2002

CORTEZ J. [En línea] Prueba de la catalasa. 2001. [Acceso 03/12/2009]
<http://www.joseacortes.com/microbiologia/pruebasbioq/catalasa.htm>

CRUEGER W y A CRUEGER. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. España: Edit. Acribia, S.A; 1989.

CUEVA F. Algunas características estructurales y catalíticas de las amilasas de *B. licheniformis* MIT-12, producidas a pH 7 y 8; Tesis para optar el grado de Maestro en Microbiología, Perú: Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Trujillo; 1993.

DERCOVÁ K, AUGUSTÍN J and D. KRAJCOVÁ. [On line] Cell growth and alpha-amylase production characteristics of *B. subtilis*. Folia

Microbiol (Praha). 1992; 37(1):17-23. [Acceso 21/02/2010]
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1505858?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_SingleItemSupl.Pubmed_Discovery_RA&linkpos=4&log\\$=relatedarticles&logdbfrom=pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1505858?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_SingleItemSupl.Pubmed_Discovery_RA&linkpos=4&log$=relatedarticles&logdbfrom=pubmed)

DIRECCIÓN REGIONAL DE LA LIBERTAD. [En línea] Ubicación Geográfica del Distrito de Huamachuco, Provincia de Sánchez Carrión 2008. [Acceso 20/08/2008]
<http://www.munihuamachuco.gob.pe/paginas/huamachuco/geografia.php>

DIRECCIÓN ZONAL AGRORURAL LA LIBERTAD. [En línea] Papa peruana, tesoro de los incas, legado del Perú al mundo. 2010 [Acceso 06/10/10]
<http://agrorurallalibertad.over-blog.es/article-2183177.html>

DURANGO E, BATISTA A, CEPEDA I y H TOBÓN. [En línea] Producción de enzima amilasa microbiana mediante fermentación en sustrato líquido. Córdoba: Universidad Pontificia Bolivariana Centro de Investigaciones Montería; 2008; 14-18. [Acceso 03/12/2009]
<http://www.google.com.pe/#hl=es&q=degradaci%C3%B3n+del+almidón+por+bacillus&start=10&sa=N&fp=12d6cf8c716ca222>

ELLSWORTH B. Biocombustibles florecen pese a todo. En Opinión del Diario de La Industria, Trujillo – Perú, del 05 de Agosto del 2008.

GLYMPH J and J STUTZENBERGER. Production, Purification, and Characterization of α -Amylase from *Thermomonospora curvata*.

Applied and Environmental Microbiology, American Society for Microbiology 1977; 34(4):391-397

GOBIERNO REGIONAL DE LA LIBERTAD. [En línea] Huamachuco-Perú. 2008. [Acceso 19/05/2008]
<http://www.regionlalibertad.gob.pe/publicaciones/RegionenCifras2005.pdf>

GREASHAM R and E INAMINE. Nutricional improvement of processes. In The Culture. EE.UU: John Wiley & Sons; 1986: 41-44

HASHIM S, DELGADO O, HATTI-KAUL R, MULAA F and B MATTIASSON. [On line] Starch hydrolysing *B. halodurans* isolates from a Kenyan soda lake. Biotechnol Lett. 2004; 26(10):823-8. [Acceso 21/02/2010]
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15269555?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=168

ICANAQUÉ J. Efecto de la concentración de sacarosa, nivel de agitación y el pH en la producción de exopolímeros por *Arthrobacter* sp. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias, mención en Biotecnología y Fermentaciones Industriales. Perú: Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Trujillo; 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE DEFENSA DE LA COMPETENCIA Y DE PROTECCIÓN INTELECTUAL (INDECOPI). Norma Técnica Peruana NTP-ISO 2859-1. Procedimientos de muestreo para inspección por atributos. Parte I: Planes de muestreo clasificados

por nivel de calidad aceptable para inspección lote por lote. Lima; 1999.

INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACIÓN PARA LA AGRICULTURA. [En línea] Universidad de Guadalajara estudia producción de biodiesel a través de ricino y jatropha. Argentina; 2009 [Acceso 28/11/2009]

<http://www.iica.int/Esp/regiones/sur/argentina/Lists/Noticias/DispForm.aspx?ID=1653>

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA E INFORMÁTICA (INEI). [En línea] Noticias www.pressperu.com 2008. [Acceso 17/05/2008] <http://www.gastronomiaperu.com/noticias/detalles.php?d=1824>

JAMES J and B LEE. Glucoamylases: Microbial Sources, Industrial Applications and Molecular Biology - A Review. J of Food Biochem.1997; 21(6):1-52.

KAFAROV V, OJEDA K y E SÁNCHEZ. Diseño de producción conjunta biodiesel – bioetanol. Colombia: Universidad Industrial de Santander, Revista Energía y Computación. 2007; 15 (1): 9 – 14.

KRZYWONOS M, CIBIS E, MIŚKIEWICZ T and C KENT. [On line] Effect of temperature on the efficiency of the thermo- and mesophilic aerobic batch biodegradation of high-strength distillery wastewater (potato stillage). Bioresour Technol. 2008; 99(16):7816-24. [Acceso 21/02/2010] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

LEVEAU J y M BOUIX. Microbiología industrial: Los microorganismos de interés industrial. Argentina: Editorial Interamericana, S.A; 2000.

- LOVELOCK J. Gaia, una nueva visión de la vida sobre la tierra. Filosofía ecológica. Escuela de Ecología Social. Argentina; 2004.
- MAC FADDIN J. Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias. Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A; 1980.
- MERA I y CARRERA J. Obtención de glucosa a partir de almidón de yuca (*Manihot esculenta*), Trabajo de graduación para optar el título de Ingeniero en Agroindustrias. Honduras; 2002
- MCKEE T y J MCKEE. Bioquímica: La base molecular de la vida. 3^{era} ed. España: Edit. Mc Graw – Hill Interamericana, S.A.V, 2003.
- MONBIOT G. [On line] Fuel for Nought. Traducido por Pedro Prieto, Martes, 23 de Noviembre de 2004. [Acceso: 19/05/2008]
<http://www.crisisenergetica.org/staticpages/index.php?page=20041127134747915>
- MONTGOMERY R, CONWAY T y A SPECTOR. Bioquímica 6^{ta} ed. España: Edit. Harcourt Brace S. A; 1998.
- MONTOYA D. Tecnología de enzimas. En: Primer Congreso Internacional de Microbiología Industrial. Santa Fe de Bogotá: Universidad Pontificia Bolivariana; 1998.
- MONTOYA I, QUINTERO J, SANCHEZ O, y C CARDONA Evaluación económica del proceso de obtención de alcohol carburante a partir de caña de azúcar y maíz. Colombia: Universidad Eafit, 2005: 41(139): 76 – 87.
- MORATA V. Producción de enzimas de interés industrial (amilasas y pectinasas) activas a bajas temperaturas (15-20°C). Estrategias

- para optimizar su producción y aplicación industrial. Argentina: Universidad Nacional de Cuyo-UNCU Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-CONICET Mendoza; 2005.
- MURRAY R, MAYES P, GRANNER D y V RODWELL. Bioquímica de Harper. 14^{ava} ed. México: Edit. El Manual Moderno S.A de C.V; 1997.
- NÚÑEZ L y D AYALA. Impacto de la producción de bioetanol en el mercado del maíz. Un análisis desde la dinámica de sistemas. México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Economía y Sociedad; 2009 XIV (23): 105-124. [Acceso: 12/11/10]
<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=51011904006>
- PATROUILLEAU R. Integración de la producción agrícola, pecuaria y bioenergética: Análisis preliminar para el desarrollo de distintos conglomerados productivos, informe de avance. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 2008: 26, 28.
- PRESCOTT L, HARLEY J y D KLEIN. Microbiología 5^{ta} ed. Argentina: Edit. Interamericana S.A; 2002.
- QUINTERO R. Aplicaciones de la Biotecnología en la industria alimentaría. En: Congreso Internacional El laboratorio de Salud Integral: Una perspectiva. Medellín: Universidad de Antioquia; 1998.
- RAMÍREZ P y J COHA. [En línea] Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. Rev. Perú Biol. 2003, 10 (1): 67-77 [Acceso: 03/12/2009]

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332003000100008&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1727-9933.

RASMUSSEN M, SHRESTHA P, KHANAL S, POMETTO A and J HANS. [Online] Sequential saccharification of corn fiber and ethanol production by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. United States Bioresour Technol. 2010; 101(10): 3526-3533. [Acceso 21/02/2010] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096573?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=12

ROBINSON D. Bioquímica y valor nutritivo de los Alimentos. España: Editorial Acribia, S.A; 1991.

ROBLES H. Efecto del pH, temperatura y concentración de proteína en la producción de bioinsecticida producida por un cultivo de *B. thuringiensis* en un medio industrial. Trabajo de habilitación para promoción docente. Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2000.

RODRÍGUEZ-SANOJA R, RUIZ B, GUYOT P, and S SANCHEZ. Starch-binding domain affects catalysis in two *Lactobacillus* α -amylases. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(1): 297–302.

ROJAS, D. [En línea] Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. Trabajo de grado para obtener el título de Microbiólogo Industrial Pontificia Bogotá, D. C: Universidad Javeriana 2008 [Acceso 06/11/2010] www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis212.pdf

- RUBIO R, MENDOZA G y M CROSBY. Uso de amilasa termoestable de *B. licheniformis* en la digestibilidad in vitro del almidón de sorgo y maíz. *Agrociencia*, México. 2001; 35 (4): 423 – 427.
- SÁNCHEZ C y C FIGUEROA. Producción de maltodextrinas a partir de almidón de yuca, utilizando la enzima alfa amilasa. Perú: Universidad Nacional de Trujillo, Ingeniería Química. 2000; 416: 217-219.
- SÁNCHEZ H. [En línea] Estudio de Cepas Nativas Amilolíticas. *Vitae*. 2005; 12(2): 21-28. [Acceso: 20/08/2008]
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042005000200003&lng=pt&nrm=iso&tlng=es
- SARAN S, ISAR J and R SAXENA. [On line] Statistical optimization of conditions for protease production from *Bacillus sp.* and its scale-up in a bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol*. 2007; 141(2-3):229-39. [Acceso 21/02/2010]
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025554?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=62
- SATYANARAYANA T, NOORWEZ S, KUMAR S, RAO J, EZHILVANNAN M, and P KAUR [On line] Development of an ideal starch saccharification process using amylolytic enzymes from thermophiles. *Biochem Soc Trans*. 2004; 32 (Pt 2):276-8. [Acceso 21/02/2010]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15046588?itool=EntrezSystem>

2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=183

SEOANEZ M. Residuos: problemática, descripción, manejo, aprovechamiento y destrucción. Manual para políticos, técnicos, enseñantes y estudiosos de la Ingeniería del Medio Ambiente. Madrid España: Ediciones Mundi-Prensa; 2000.

SMITH E. Biotecnología. 4^{ta} ed. España: Editorial Acribia, S.A; 2006.

THIPPESWAMY S, GIRIGOWDA K and V MULIMANI. [On line] Isolation and identification of alpha-amylase producing *Bacillus* sp from dhal industry waste. Indian J Biochem Biophys. 2006; 43(5):295-8. [Acceso 21/02/2010]

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17133736?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=95

TREVAN M, BOFFEY S. GOULDING K, y P STANBURY. Biotecnología: Principios Biológicos. España: Editorial Acribia, S.A; 1990.

UHLIG H. Industrial enzymes and their applications, EE.UU: John Wiley & Sons. 1998; 33:45-64.

VANGUARDIA 1. [En línea] El maíz, herencia mesoamericana, 2008. [Acceso: 20/08/2008]

http://www.vanguardia.com.mx/diario/noticia/gourmet/vidayarte/el_maiz,_herencia_mesoamericana/39046

- VANGUARDIA 2. [En línea] Crisis energética, 2008. [Acceso: 17/05/2008]
<http://www.crisisenergetica.org/staticpages/index.php?page=20041127134747915>
- VARGAS S. Selección y evaluación de bacterias del genero *Bacillus* productoras de amilasa en cultivo sumergido. Tesis para optar el grado de Magister en Biotecnología Perú: Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002.
- VILLANUEVA C. Optimización del inóculo, azúcar y tiempo en el rendimiento de etanol durante la producción de vino de miel de abeja (hidromiel). Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias, mención en Microbiología Industrial y Biotecnología. Perú: Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Trujillo; 1995.
- VILLANUEVA E, ROBLES H y M OTINIANO. Aislamiento y selección primaria de bacterias productoras de amilasas. En: Guía de Prácticas de Microbiología Industrial. Perú. Universidad Nacional de Trujillo; 2007.
- VOET D y J VOET. Bioquímica. 3^{ra} ed. Argentina: Edit. Médica Panamericana, S.A; 2006.
- WELKER N and LL CAMPBELL. [On line] Effect of carbon sources on formation of alpha-amylase by *B. stearothermophilus*. J Bacteriol. 1963; 86: 681-6. [Acceso 21/02/2010]
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14066461?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=646.

ANEXOS



Figura 6. Prototipo del biorreactor cilíndrico agitado utilizado en la investigación.



Figura 7. Sistema de biorreactores utilizados en la investigación, trabajando a temperatura ambiente (25°C).



Figura 8. Biorreactor incubado en estufa a temperatura de 30°C.



Figura 9. Incubación del biorreactor utilizado en la investigación en baño maría a temperatura de 40°C.



Figura 10. Evaluación preliminar de la hidrólisis del almidón en cada uno de los sistemas de ensayo por la técnica del yodo en placa.

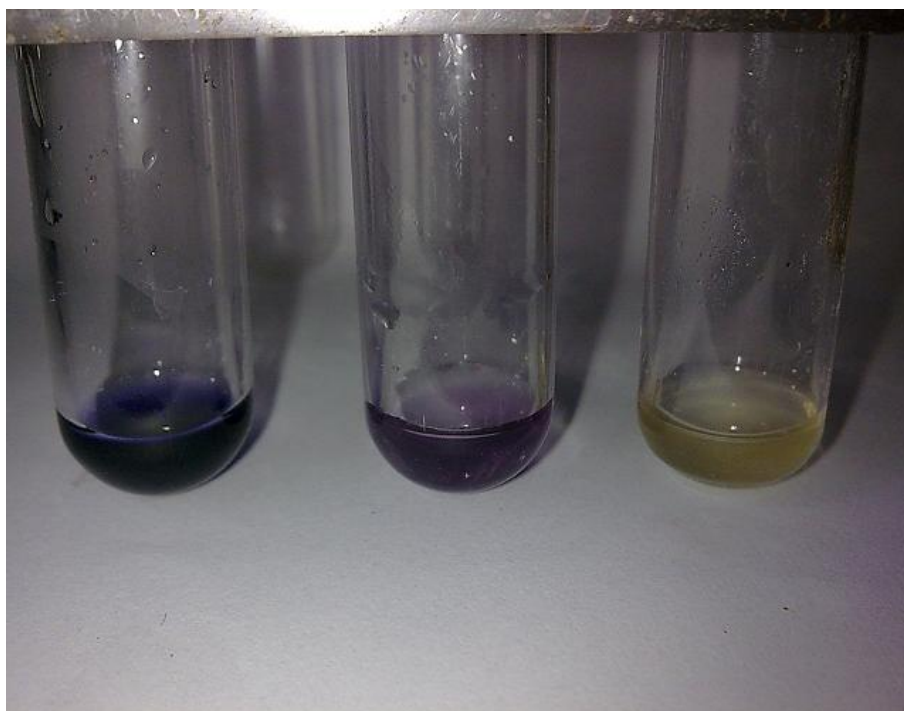


Figura 11. Estandarización de la técnica de medición de almidón en los sistemas de ensayo, por la técnica del yodo en tubo.

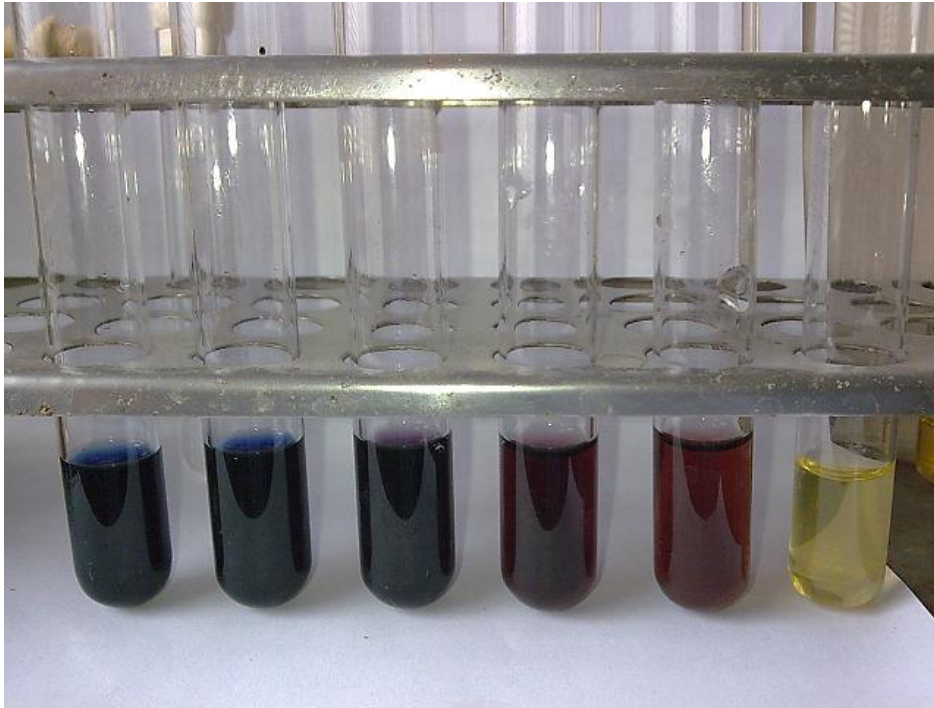


Figura 12. Monitoreo de la hidrólisis del almidón en cada uno de los sistemas de ensayo por la técnica del yodo, a diferentes tiempos de incubación.

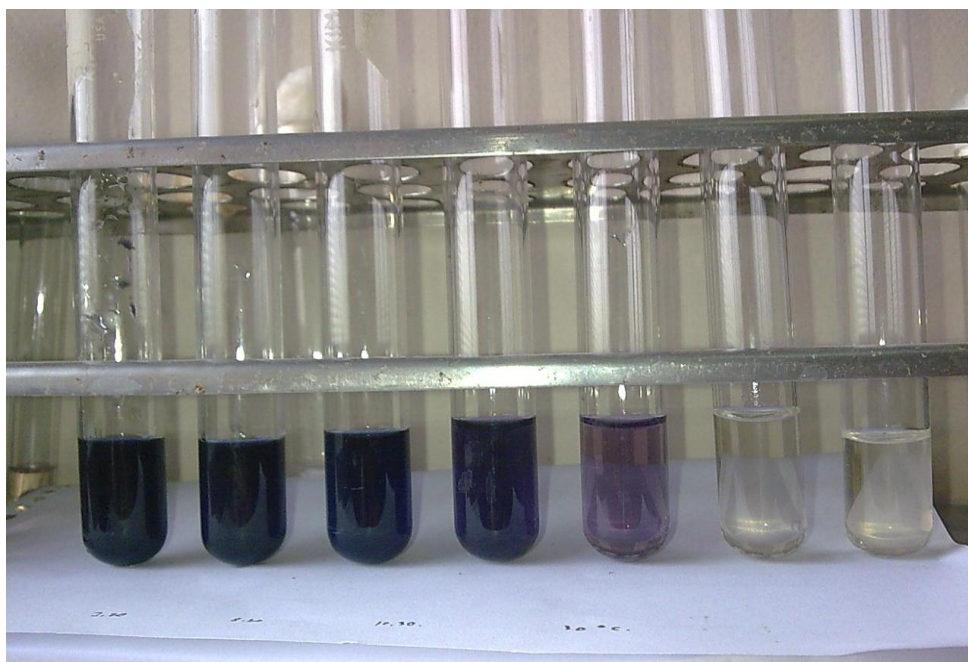


Figura 13. Evaluación de la hidrólisis del almidón en cada uno de los sistemas de ensayo por la técnica del yodo, a diferentes tiempos de incubación.

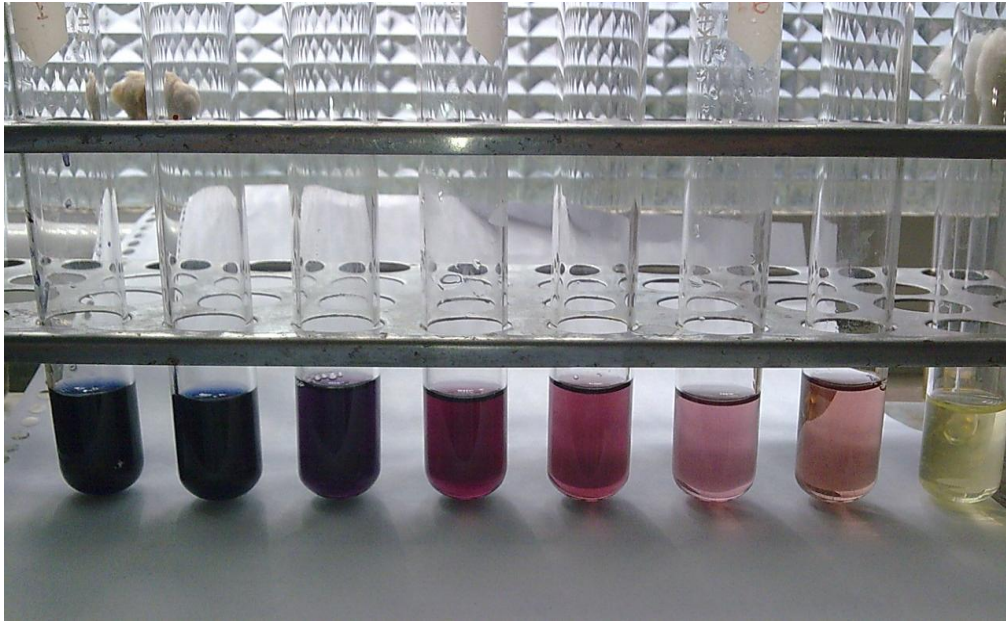


Figura 14. Evaluación de la hidrólisis del almidón en cada uno de los sistemas de ensayo por la técnica del yodo, a diferentes tiempos de incubación.

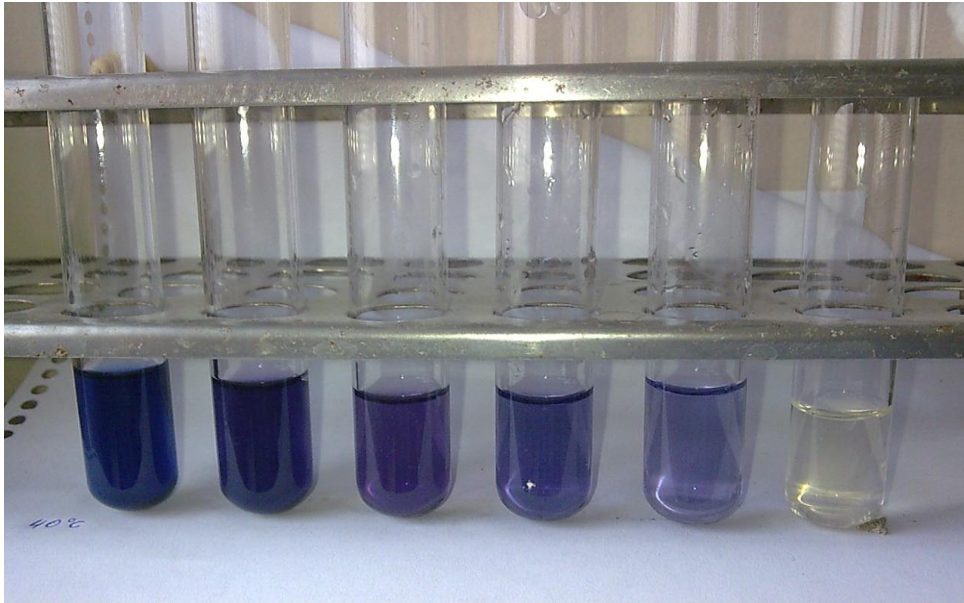


Figura 15. Evaluación de la hidrólisis del almidón en cada uno de los sistemas de ensayo por la técnica del yodo, a diferentes tiempos de incubación.

Cuadro 2. Características diferenciales de las especies de ***Bacillus*** del grupo I

Reacción	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i> var <i>Mycoides</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>
– Gram	+	+	+	+	+
– Catalasa	+	+	+	+	+
– Movilidad	+/-	+/-	-	+/-	+/-
– Reducción de nitratos	+	+	+/-	+/-	+
– Lecitinasa	+	+	+	-	+
– Fermentación de glucosa	+	+	+	+	+
– Acetoína	+	-	+/-	+/-	+/-
– Producción de ácido de manitol	-	-	-	+	+
– Hemólisis	+	+	+/-	+/-	+
– Hidrólisis de almidón	+/-	-	+/-	+/-	+/-

Fuente: VILLANUEVA E, ROBLES H y M OTINIANO. Aislamiento y selección primaria de bacterias productoras de amilasas. En: Guía de Prácticas de Microbiología Industrial. Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2007.

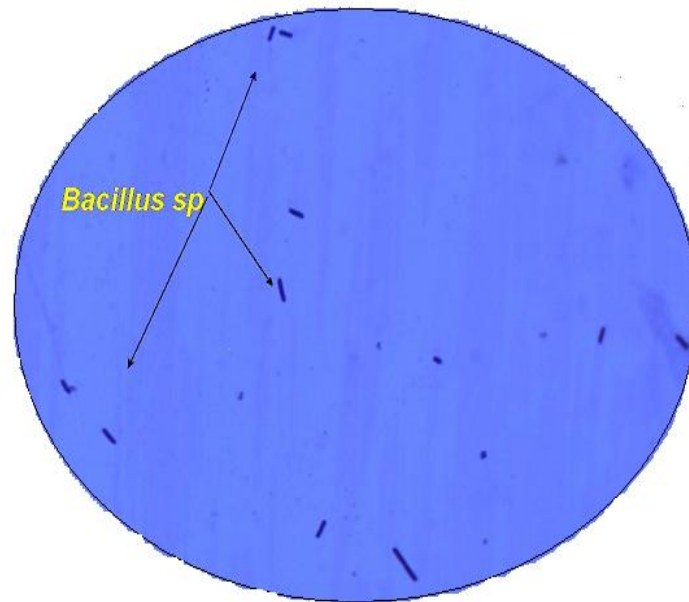


Figura 16. Microfotografía de ***Bacillus subtilis*** en lámina coloreada mediante la técnica de Gram.

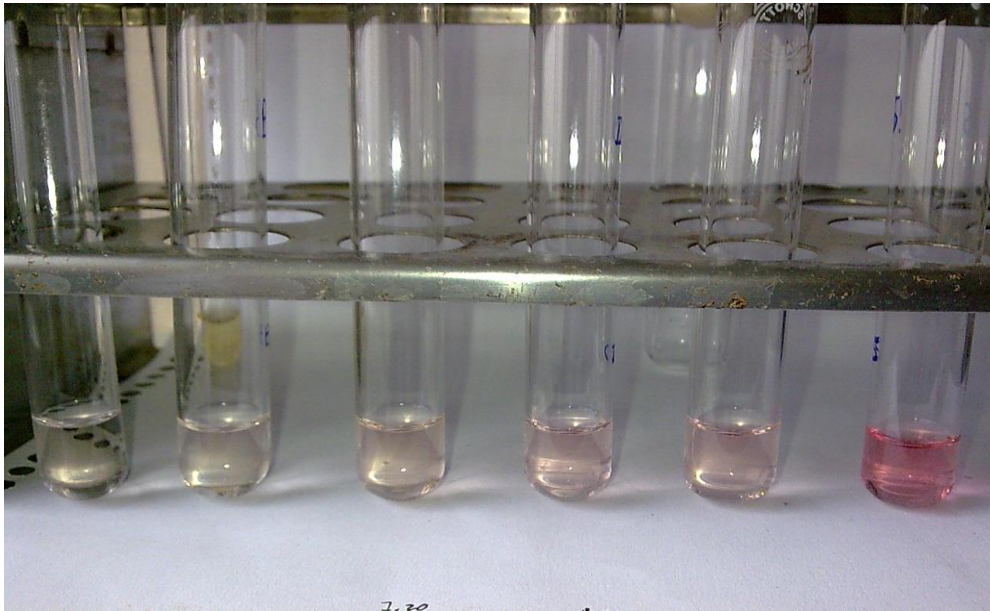


Figura 17. Monitoreo de la formación de glucosa, producto de la hidrolisis del almidón por *Bacillus subtilis*, en cada uno de los sistemas de ensayo, por la técnica de glucosa enzimática



Figura 18. Eliminación de *Bacillus subtilis* presente en las suspensiones finales de los biorreactores monitoreados, por autoclavado, lavado y desinfección de los materiales de vidrio y otros.