

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MICROBIOLOGÍA Y**  
**PARASITOLOGÍA**



**Producción de amilasas y proteasas por *Bacillus* spp.  
aislados de suelos de la Universidad Nacional de Trujillo,  
La Libertad-Perú.**

**TESIS**  
**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**BIÓLOGO - MICROBIOLÓGO**

**AUTORA: Br. Leticia Ivon Solorzano Polo**  
**ASESORA: Dra. Eva Elizabeth Villanueva Tarazona**

**TRUJILLO – PERU**  
**2018**

## AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

Dr. ORLANDO GONZÁLES NIEVES

**Rector**

Dr. RUBÉN VERA VÉLIZ

**Vice-Rector Académico**

Dr. STEBAN ILICH ZERPA

**Secretario General**

## AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dr. FREDDY MEJÍA COICO

**Decano**

Dr. WILMER ZELADA ESTRAVER

**Profesor Secretario**

Dra. BERTHA SORIANO BERNILLA

**Directora de La Escuela Académico Profesional de**

**Microbiología y Parasitología**

## PRESENTACIÓN

SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO DICTAMINADOR:

En cumplimiento con las disposiciones establecidas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Trujillo, pongo a vuestra consideración y criterio la Tesis: “Producción de amilasas y proteasas por *Bacillus* spp. aislados de suelos de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad-Perú” con el propósito de obtener el Título Profesional de Biólogo – Microbiólogo.

Esperando que vuestro criterio sea de comprensión por errores u omisiones cometidos en la elaboración del presente trabajo, me someto a vuestro dictamen.

Trujillo, enero de 2018

---

Br. Leticia Ivon Solorzano Polo

## MIEMBROS DEL JURADO

---

Dr. MARCO SALAZAR CASTILLO

**Presidente**

---

Dra. EVA E. VILLANUEVA TARAZONA

**Secretaria**

---

Ms. C. ANÍBAL QUINTANA DÍAZ

**Vocal**

## **APROBACIÓN**

Los profesores que suscriben, miembros del jurado, declaran que el presente informe de tesis ha cumplido con los requisitos formales y fundamentales, siendo APROBADO por UNANIMIDAD.

---

Dr. MARCO SALAZAR CASTILLO

**Presidente**

---

Dra. EVA E. VILLANUEVA TARAZONA

**Secretaria**

---

Ms. C. ANÍBAL QUINTANA DÍAZ

**Vocal**

## DE LA ASESORA

La que suscribe, Dra. Eva Elizabeth Villanueva Tarazona, Asesora de la presente tesis “Producción de amilasas y proteasas por *Bacillus* spp. aislados de suelos de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad-Perú”.

### CERTIFICA:

Que la investigación ha sido desarrollada de conformidad con su correspondiente proyecto y con las orientaciones pertinentes brindadas a la tesista.

Que el presente informe ha sido redactado bajo mi asesoramiento, y acoge las sugerencias y observaciones pertinentes. Por ello, autorizó a la Br. Leticia Ivon Solorzano Polo para continuar con los procedimientos según sus fines.

Trujillo, enero de 2018

---

Dra. Eva E. Villanueva Tarazona  
**ASESORA**

## DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido cumplir con esta meta dándome reflexiones para no decaer y por haberme dado salud para lograrlo.

A mis padres, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos y paciencia en cada tropiezo, por la motivación constante que me permitió ser una persona de buenos principios y valores, pero, sobre todo, por su amor y comprensión.

A mis hermanas, por su constante apoyo y ejemplo a seguir, por haberme puesto una baya cada día más y más alta a superar.

Y para aquellas personas especiales en mi vida que aportaron en la realización de esta tesis, porque no dejaron de creer en mí y fortalecieron cada día mi progreso. Pues con “FE” todo se puede.

## AGRADECIMIENTO

A mi asesora, Dra. Eva Elizabeth Villanueva Tarazona, por su decisivo apoyo constante en este trabajo de investigación y la atención mostrada en lo referente al desarrollo de este proyecto, por aquellas palabras de aliento continuo.

A los técnicos y profesionales, que me brindaron siempre su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de nuevos conocimientos.

BIBLIOTECA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO	ii
AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS	iii
PRESENTACIÓN	iv
MIEMBROS DEL JURADO	v
APROBACIÓN	vi
DE LA ASESORA	vii
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTO	ix
ÍNDICE	x
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
II. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. MATERIALES	
1.1 Material biológico	6
1.2 Medio de cultivo	6
2. MÉTODOS	
2.1 Selección de bacterias productoras de amilasas	6
2.1.1 Reactivación y verificación de pureza de <i>Bacillus</i> spp.	6
2.1.2 Selección de bacterias productoras de amilasas	7

2.1.3	Cuantificación de la actividad enzimática de amilasas producida por <i>Bacillus</i> spp.	8
–	Preparación del inóculo	8
–	Inoculación y cultivo de <i>Bacillus</i> spp. para la producción de amilasas	8
–	Obtención de preparado enzimático (PE)	8
–	Cuantificación de las amilasas, producidas por <i>Bacillus</i> spp.	9
2.2	Cuantificación de la actividad enzimática de proteasas producida por <i>Bacillus</i> spp.	9
–	Inoculación y cultivo de <i>Bacillus</i> spp. para la producción de proteasas	9
–	Cuantificación de las proteasas, producidas por <i>Bacillus</i> spp.	10
2.3	Análisis estadístico de los datos	10
III.	RESULTADOS	11
IV.	DISCUSIÓN	16
V.	CONCLUSIONES	19
VI.	RECOMENDACIONES	20
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
ANEXOS		
Anexo 01.	Análisis bioinformático de las secuencias, por el programa Blast nucleotide de 34 cepas de <i>Bacillus</i> spp aislados de suelos de la Ciudad Universitaria de Universidad Nacional Trujillo, La Libertad-Perú.	27

Anexo 02. Cepas de <i>Bacillus</i> spp. aislados de suelos de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad – Perú, conservados en glicerol al 10 %.	28
Anexo 03. Observación microscópica a 1000 A de <i>Bacillus</i> sp. NRR2 en coloración Gram (a) y coloración Wirtz (b) a partir de colonias en agar almidón enriquecido con extracto de levadura al 0.3%.	29
Anexo 04. Evaluación semicuantitativa de la producción de proteasas por <i>Bacillus</i> AMY_2.1.3.1 y IHB B 6505 en Agar Leche (a) y de Amilasas en Agar Almidón enriquecido con Extracto de Levadura (b), incubados durante 48 horas a 30°C.	30
Anexo 05. Curva de calibración para cuantificar la actividad enzimática de amilasas por el Método Street Close modificado.	31
Anexo 06. Curva de calibración para cuantificar de la actividad enzimática de amilasas por el Método Street Close modificado.	32
Anexo 07. Curva de calibración para cuantificar la actividad enzimática de proteasas por el Método de Lowry.	33
Anexo 08. Curva de calibración para cuantificación de la actividad enzimática de proteasas por el Método de Lowry.	34

## RESUMEN

En la presente investigación se cuantificó la producción de amilasas y proteasas de 34 cultivos de *Bacillus* aislados de suelos de la Universidad Nacional de Trujillo mediante la actividad enzimática. Para ello se reactivó y verificó la pureza de los cultivos conservados en glicerol al 10%. Posteriormente se seleccionaron las bacterias productoras de amilasas en Agar Almidón y de proteasas en Agar Leche. De los cultivos seleccionados se prepararon los inóculos, que fueron sembrados en Caldo Almidón para la producción de amilasas y en Caldo Caseína, para la producción de proteasas. Después de 48 horas se extrajeron los Preparados Enzimáticos (PE) mediante centrifugación a 4°C, 5 000 rpm por 10 minuto. La actividad enzimática de las amilasas se cuantificó mediante el método de Street Close modificado y las proteasas mediante la degradación de caseína. De los 34 cultivos, 11 produjeron amilasas y 9 proteasas. Se concluye, que la actividad enzimática de las amilasas producidas por las 11 cepas de *Bacillus* seleccionadas, oscilan entre 0.4 a  $2.7 \times 10^{-2}$  Unidades Street Close/100 mL de Preparado Enzimático; y la actividad enzimática de las proteasas de las 09 cepas de *Bacillus* seleccionadas, oscilan entre, 0.03 a 0.06 Unidades de Proteína/mL de Preparado Enzimático.

## I. INTRODUCCIÓN

Las amilasas y proteasas son enzimas hidrolíticas de importancia industrial; su aplicación está dada en la producción de jarabes y en el caso de proteasas en la elaboración de productos de limpieza, procesamiento de alimentos, entre otros. Entre los microorganismos productores destacan las bacterias como el género *Bacillus*, mohos como *Aspergillus* y actinomicetos como *Streptomyces*. El género *Bacillus*, de la familia *Bacillaceae* incluye especies aerobias o anaerobias facultativas, Gram positivas y formadores de endosporas <sup>1</sup>.

*Bacillus thuringiensis*, además de esporas presenta cristales paraesporales bipiramidales durante la esporulación <sup>1</sup>. La mayoría de sus especies de *Bacillus* son mesófilas siendo su temperatura óptima de crecimiento entre 30°C y 45°C, sin embargo, algunos son termófilos con temperatura óptima de 65°C; otros son psicrófilos, capaces de crecer y esporular a 0°C <sup>2</sup>. Este es un género que incluye más de 60 especies, la morfología de sus colonias es muy variada; pueden ser de aspecto liso, mucoso o rugoso; con bordes ondulados o extendidos y algunas especies presentan aspecto de vidrio esmerilado <sup>3</sup>.

Sus células vegetativas se dividen por fisión binaria y frecuentemente forman cadenas. Tienen la capacidad de fermentar la glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar la gelatina, almidón, glucógeno y n-acetil-glucosamina <sup>4, 5</sup>. El tamaño de sus células varía entre 0,5 a 2,5 µm de diámetro x 1,2-10 µm de longitud <sup>3</sup>.

El género *Bacillus* se constituye en uno de los géneros más comunes de bacterias de vida libre presentes en el suelo por lo que es considerado su hábitat primario y gracias a su potencial de producir endosporas, facilita la posibilidad de aislarlos y mantenerlos

en cultivos en el laboratorio. Estas bacterias han demostrado tener una amplia distribución en todas las regiones geográficas del planeta, alcanzando alrededor del 24% del total de bacterias aisladas en el suelo <sup>6, 7</sup>. En relación al valor de pH, algunas de sus especies crecen a pH ácidos, otros a pH neutros y otros a pH alcalinos; los microorganismos bacilares alcalófilos viven en ambientes con valores de pH encima de 9 <sup>8</sup>.

En diversos estudios se ha detectado que especies del género *Bacillus* producen enzimas hidrolíticas de relevancia económica como amilasas, proteasas y quitinasas, lo cual ha permitido su aplicación en diversas industrias y en control biológico <sup>7</sup>. Una de las enzimas que se explotan a nivel industrial, son las amilasas. Estas enzimas son de tres tipos: alfa, beta y gamma amilasa, cada una de ellas hidroliza el almidón a nivel de diferentes enlaces, y pueden ser obtenidas a partir de fuentes animales, vegetales y microbianas. Pueden ser producidos como enzimas extracelulares o intracelulares <sup>9</sup>.

Las  $\alpha$ -amilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos (1,4), presentes en el almidón, glicógeno fosforilazas y otros polisacáridos<sup>10</sup>. Si se considera desde el punto de vista industrial, las amilasas extracelulares y de origen microbiano son las más ventajosas <sup>9</sup>.

En relación al almidón, este polímero está compuesto por: la amilosa, que presenta únicamente enlaces (1,4) y la amilopectina, que adicional a los enlaces (1,4), posee sitios de ramificación 1,6. Si bien un producto comercial está integrado por una mezcla de enzimas diferentes, los dos grupos de enzimas amilolíticas más importantes están representados por la alfa-amilasa y  $\beta$ -amilasa <sup>11, 12</sup>. La industria del almidón es una de las principales usuarias de amilasas para la hidrólisis y modificación

de esta materia prima con el fin de obtener glucosa, maltosa y oligosacáridos, que pueden ser convertidos en jarabes de fructosa y dextrosa. La glucosa obtenida, también puede ser fermentada para producir etanol, aminoácidos y ácidos orgánicos <sup>10</sup>.

Generalmente, los niveles de expresión enzimática en los microorganismos son bajos, por lo que es necesario incrementarlos para su producción a nivel industrial. El crecimiento del microorganismo y la expresión enzimática están fuertemente influenciados por la composición del medio de cultivo, principalmente por la fuente de carbono y nitrógeno. En el caso de las amilasas de *Bacillus* spp. el uso de fuentes de nitrógeno orgánicas como extracto de levadura, peptona y triptona es determinante para aumentar su producción <sup>12</sup>.

Debido a la creciente demanda de amilasas a nivel industrial, es muy importante el aislamiento, la selección y cuantificación de nuevas cepas bacterianas con capacidad de producir enzimas con actividad amilolíticas y que posean propiedades diferentes o únicas de nichos ecológicos poco explorados.

Existen estudios que señalan al género *Bacillus* con un gran potencial en la producción de proteasas y quitinasas; estas han sido aisladas de suelos alcalinos, y de residuos quitino-proteicos como caparazón de camarón. Las proteasas podrían jugar un papel dentro del proceso antagónico de los organismos, ya que se ha observado que podrían estar involucradas dentro del proceso de patogenicidad de hongos hacia insectos <sup>7</sup>. Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas, tienen un rol fisiológico e industrial <sup>13</sup>.

Las proteasas son endopeptidasas que actúan sobre las proteínas hidrolizando enlaces peptídicos; estas pueden ser: metaloproteasas que trabajan a pH óptimo de 7,0; estearasas, enzimas con alta actividad esterolítica y baja actividad proteolítica y serin-proteasas (proteasas alcalinas), que tienen residuo serina en/o cerca al sitio activo <sup>14</sup>. Entre las serinproteasas se encuentra un grupo de enzimas llamadas comúnmente proteasas alcalinas o subtilisinas que son un grupo fisiológica y comercialmente importante utilizadas primordialmente como aditivos para jabones y detergentes, el curtido de pieles, así como en diversas industrias, como la tenería y textiles, en recuperación de plata en placas de rayos X y tratamiento de aguas. Tienen un rol catalítico muy importante en la hidrólisis de proteínas <sup>14</sup>.

Las proteasas producidas por hongos tienen un pH óptimo dentro del rango ácido (pH 2-6) mientras que la mayoría de las proteasas de origen bacteriano tienen un pH óptimo alcalino (pH 8-11) <sup>15</sup>. Desde 1967 se conoce que las cepas de *Bacillus* que crecen a pH por encima de 10, sintetizan proteasas que presentan actividad hasta un valor de pH de 12 con puntos isoelectrónicos extremadamente básicos; son activas a temperaturas relativamente altas <sup>16</sup>.

Las proteasas obtenidas a partir de bacterias del género *Bacillus* representan las de mayor importancia en la biotecnología mundial, destacando por su gran diversidad de uso la subtilisina y la serino-proteasa. Esta proteasa se produce fundamentalmente a escala industrial y es utilizada en las formulaciones de productos de limpieza y en la manufactura de hidrolizados proteicos a partir de diferentes fuentes proteicas <sup>17</sup>.

Sernaqué (2016) aisló a partir de suelos agrícolas y no agrícolas de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de Trujillo, 90 cultivos que fueron identificados molecularmente como del género *Bacillus*, de los cuales seleccionó semicuantitativamente 34 cepas productoras de proteasas utilizando Agar Leche al 5%. Debido a que especies del género *Bacillus*, se reportan como productoras de amilasas y proteasas, entre otras enzimas de importancia industrial, en la presente investigación, de las 34 cepas, se seleccionaron las productoras de amilasas y proteasas en medio sólido y se cuantificaron sus actividades enzimáticas correspondientes.

## OBJETIVOS

1. Cuantificar la producción de amilasas, mediante la actividad enzimática, de *Bacillus* spp. seleccionados a partir de 34 cultivos aislados de suelos de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Trujillo, La Libertad-Perú.
2. Cuantificar la producción de proteasas, mediante la actividad enzimática, de *Bacillus* spp. seleccionados a partir de 34 cultivos aislados de suelos de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Trujillo, La Libertad-Perú.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. MATERIAL

#### 1.1 Material biológico

34 cepas de *Bacillus* spp aislados de suelos agrícolas y no agrícolas de la Ciudad Universidad de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad – Perú, 2016, proporcionado por el Laboratorio de Microbiología Industrial, de la Universidad Nacional de Trujillo (Anexo 01).

#### 1.2 Medio de cultivo <sup>18</sup>

Agar Almidón (AA)

Agar Almidón Extracto de Levadura al 0.3% (AAEL)

Agar Nutritivo Extracto de Levadura al 0.3% (ANEL)

Agar Leche al 5 % (AL)

Caldo Almidón Extracto de Levadura al 0.3% (CAEL)

Caldo Caseína (CC)

### 2. MÉTODOS

#### 2.1 Selección de bacterias productoras de amilasas

##### 2.1.1 Reactivación y verificación de pureza de *Bacillus* spp.

Las 34 cepas de *Bacillus* spp conservadas en glicerol al 10 %, <sup>19</sup> (Anexo 02) fueron reactivadas en CNEEL al 0.3% e incubadas a 30°C durante 24

horas. La pureza y sus características macro y micro morfológicas propias del género se verificaron mediante siembra en placas conteniendo ANEL y la incubación se realizó a 30°C durante 48 horas.

Cumplido el tiempo de incubación se observó la uniformidad de la morfología de las colonias. La pureza se verificó mediante coloración de Gram y la presencia de espora mediante la coloración de Wirtz <sup>20</sup>(Anexo 03). Confirmando la pureza de cada cepa se sembró en frascos conteniendo AA; después de la incubación se conservaron en refrigeración hasta el momento de la selección.

### **2.1.2 Selección de bacterias productoras de amilasas <sup>21</sup>**

Cada cepa se sembró, por puntura, en tres placas conteniendo AAEL y se incubaron por 48 horas a 30°C, observando el crecimiento a partir de las 20 horas.

Transcurridas las 48 horas, se adicionó solución yodada en toda la superficie de la placa y se dejó en reposo durante 2 minutos, luego se midió el diámetro del halo de hidrólisis de almidón y el diámetro de la colonia <sup>22</sup>. En las colonias que presentaron formas irregulares, se realizaron varias mediciones con la finalidad de sacar el promedio correspondiente (Anexo 04.b).

Se seleccionaron las colonias que presentaron los mayores halos de hidrólisis de almidón y se sembraron en frascos conteniendo AA; luego de

la incubación a 30°C se conservaron a 10°C hasta cuantificar la actividad enzimática de las cepas de *Bacillus* seleccionadas.

### 2.1.3 Cuantificación de la actividad enzimática de amilasas producida por *Bacillus* spp.

- **Preparación del inóculo.** Cada cultivo puro de *Bacillus* spp. seleccionado en la etapa anterior, se sembró en un matraz conteniendo 30 mL de CA-EL<sup>19</sup> y se incubó durante 8 a 12 horas a 0.5 vvm de aireación (Anexo 05). Luego, se centrifugó en microviales a 4000 rpm a 4°C durante 10 minutos; se eliminó el sobrenadante y el “pellet” se resuspendió con solución salina fisiológica estéril (SSFE). La suspensión microbiana se estandarizó a 0.26 de absorbancia a 660 nm.
- **Inoculación y cultivo de *Bacillus* spp. para la producción de amilasas.** Del inóculo estandarizado, se adicionó 2 mL a cada uno de tres matraces conteniendo 20 mL de CA-EL, se mezcló e incubó en aireación constante (0.5vvm) a 30°C durante 24 a 48 horas. El almidón residual se evaluó adicionando en una lámina portaobjetos una gota del CAEL y solución yodada; esta evaluación se realizó cada 8 horas.
- **Obtención de preparado enzimático (PE).** Cuando todo el almidón se hidrolizó se colocó los medios de cultivo a 4°C hasta el momento de ser evaluados. Con el preparado enzimático anteriormente conservados se centrifugó, entre 0 y 4°C, a 5 000 rpm durante 10 minutos; el sobrenadante se recolectó en microviales estériles

debidamente rotulados. Se conservaron en refrigeración a 4°C hasta cuantificar su actividad enzimática (Anexo 06.a).

- **Cuantificación de las amilasas, producidas por *Bacillus* spp.** La actividad enzimática se midió mediante el método de Street Close modificado<sup>23</sup>. Una unidad de enzima equivale a una unidad de Street Close (USC), que es la cantidad de enzima que hidrolizó 20 mg de almidón en 15 minutos a 37°C y a pH 7.1 (Anexo 07 y 08).

## 2.2 Cuantificación de la actividad enzimática de proteasas producida por

*Bacillus* spp.

Se realizó una verificación para la determinación semicuantitativa utilizando AL al 5% (Anexo 04.a). La proteólisis se evidenció por halos claros transparentes alrededor de las colonias y se seleccionaron las colonias que presentaron los mayores halos de hidrólisis de proteasas<sup>22</sup> y se sembraron en frascos conteniendo AL; luego de la incubación a 30°C se conservaron a 10°C hasta cuantificar la actividad enzimática de las cepas de *Bacillus* seleccionadas. El inóculo preparado en el punto 2.1.3 se utilizó en esta etapa experimental (Anexo 06.b).

- **Inoculación y cultivo de *Bacillus* spp. para la producción de proteasas.**

Las 34 cepas de *Bacillus* spp. utilizadas en esta investigación, fueron en trabajos previos evaluados y se confirmaron la presencia de actividad proteolítica, se sembró 2 mL a cada uno de tres matraces conteniendo 20 mL de CC<sup>18</sup>, se mezcló e incubó en aireación constante (0.5 vvm) a 30°C

durante 48 horas. Cumpliendo el tiempo de incubación se procedió a centrifugar a 4°C, a 5 000 rpm durante 10 minutos, los sobrenadantes se recolectaron en microviales estériles y se rotularon adecuadamente. Se conservaron en refrigeración a 4° C hasta evaluar la actividad enzimática.

- **Cuantificación de las proteasas, producidas por *Bacillus* spp.** De las cepas seleccionadas se evaluó cuantitativamente la producción de proteasas empleando el método de Lowry <sup>24</sup> a partir de un preparado enzimático de los cultivos puros replicados (Anexo 09 y 10).

Una unidad de proteasa es la cantidad de enzima que hidrolizó 20 mg de caseína en 15 minutos a 37°C y a pH 7.1.

### 2.3 Análisis estadístico de los datos

Los datos de actividad enzimática para amilasas y proteasas fueron presentados en tablas tanto para la selección como para la cuantificación, y los resultados de producción de amilasas y proteasas serán sometidos a análisis estadístico t “student” para hallar la diferencia significativa, con un nivel de significancia de 0.05%.

### III. RESULTADOS

En la Tabla 01 se observa el análisis semicuantitativo; los halos de hidrólisis de almidón de 34 cepas de *Bacillus* spp. aislados de suelos de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad-Perú. Los valores de los halos de hidrólisis de almidón oscilan entre 0.6 y 25 mm. De los cuales 11 cepas mostraron mayores halos de hidrólisis de almidón evidenciado en AAEL al 0.3%; estos valores oscilan entre 13.3 y 25 mm.

En la Tabla 02 se observa el análisis semicuantitativo; los halos de hidrólisis de caseína de 34 cepas de *Bacillus* spp. aislados de suelos de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad-Perú. Los valores de los halos de hidrólisis de proteasas oscilan entre 0.9 y 19 mm. De los cuales 09 cepas mostraron mayores halos de hidrólisis de proteasas evidenciado en AL al 5%; estos valores oscilan entre 15 y 19 mm.

En la Tabla 03 se muestra la actividad enzimática de las amilasas producidas por 11 cepas de *Bacillus* spp aislados de suelos de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad-Perú. Los valores oscilan de 0.4 a 2.7 USC/ 100 mL de PE ( $\times 10^{-2}$ ), se trabajó con el método Street Close modificado.

En la Tabla 04 se muestra la actividad enzimática de las proteasas producidas por 09 cepas de *Bacillus* spp aislados de suelos de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad-Perú. Los valores oscilan de 0.03 a 0.06 UP/ mL de PE, se empleó el método de Lowry.

Tabla 01. Halo de hidrólisis de almidón de 34 cepas de *Bacillus* spp. aislados de suelos de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad-Perú.

N°	Nombre	Diámetro del Halo de Hidrólisis (mm)
1	<i>Bacillus flexus</i> AMY_2.1.3.1 *	16.7
2	<i>Bacillus</i> sp. BAB-5926	12.0
3	<i>Bacillus subtilis</i> FD	11.4
4	<i>Bacillus megaterium</i> IHB B 7046	11.7
5	<i>Bradyrhizobiaceae bacterium</i> S28	06.3
6	<i>Bacillus megaterium</i> IHB B 7046 *	13.3
7	<i>Bacillus subtilis</i> AER314-2	13.0
8	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LM6	13.0
9	<i>Bacillus thuringiensis</i> RBM04 *	25.0
10	<i>Bacillus megaterium</i> L2S3	12.3
11	<i>Bacillus subtilis</i> BAB-2936*	14.6
12	<i>Bacillus megaterium</i> SD15	05.7
13	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> IHB B 6505 *	14.3
14	<i>Bacillus thuringiensis</i> B20	11.3
15	<i>Bacillus</i> sp. 6077	10.0
16	<i>Bacillus licheniformis</i> CRRI-HN-2 *	13.3
17	<i>Bacillus megaterium</i> Y12 *	13.7
18	<i>Bacillus</i> sp. S20414	10.6
19	<i>Bacillus megaterium</i> KUDC1720	00.7
20	<i>Bacillus cereus</i> SAD - 05 *	17.4
21	<i>Bacillus</i> sp. NNR2 *	16.0
22	<i>Bacillus</i> sp. Z3	06.7
23	<i>Bacillus aerius</i> YM-16	10.3
24	<i>Bacillus</i> sp. BAB-4186	07.0
25	<i>Bacillus</i> sp. TT19	06.7
26	<i>Bacillus</i> sp. OM-2 *	18.0
27	<i>Bacillus megaterium</i> IHB 16671 *	13.3
28	<i>Bacillus megaterium</i> SD15	01.0
29	<i>Lysinibacillus</i> sp. SS1.22	08.7
30	<i>Bacillus megaterium</i> S111	00.3
31	<i>Bacillus</i> sp. strain BAB - 6011	06.3
32	<i>Bacillus</i> sp. 2008723472	13.0
33	<i>Bacillus</i> sp. B29(2012b)	01.0
34	<i>Bacillus</i> sp. 2008723338	00.6

\*: Cepas productoras de amilasas seleccionadas en Agar Almidón enriquecido con Extracto de Levadura al 0.3%.

Tabla 02. Halo de hidrólisis de caseína de 34 cepas de *Bacillus* spp. aislados de suelos de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad-Perú.

Nº	Nombre	Diámetro del Neto de Hidrólisis (mm)
1	<i>Bacillus flexus</i> AMY_2.1.3.1	11.3
2	<i>Bacillus</i> sp. BAB-5926	12.0
3	<i>Bacillus subtilis</i> FD	10.0
4	<i>Bacillus megaterium</i> IHB B 7046	09.7
5	<i>Bradyrhizobiaceae bacterium</i> S28	06.3
6	<i>Bacillus megaterium</i> IHB B 7046 *	19.0
7	<i>Bacillus subtilis</i> AER314-2	13.3
8	<i>Bradyrhizobium</i> sp. LM6	12.4
9	<i>Bacillus thuringiensis</i> RBM04 *	17.1
10	<i>Bacillus megaterium</i> L2S3	12.0
11	<i>Bacillus subtilis</i> BAB-2936	10.7
12	<i>Bacillus megaterium</i> SD15	11.0
13	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> IHB B 6505	00.9
14	<i>Bacillus thuringiensis</i> B20	10.3
15	<i>Bacillus</i> sp. 6077	13.0
16	<i>Bacillus licheniformis</i> CRRI-HN-2	14.4
17	<i>Bacillus megaterium</i> Y12	13.3
18	<i>Bacillus</i> sp. S20414 *	16.4
19	<i>Bacillus megaterium</i> KUDC1720 *	15.0
20	<i>Bacillus cereus</i> SAD – 05 *	17.7
21	<i>Bacillus</i> sp. NNR2 *	15.6
22	<i>Bacillus</i> sp. Z3	14.4
23	<i>Bacillus aerius</i> YM-16	13.4
24	<i>Bacillus</i> sp. BAB-4186	14.3
25	<i>Bacillus</i> sp. TT19 *	15.0
26	<i>Bacillus</i> sp. OM-2	14.3
27	<i>Bacillus megaterium</i> IHB 16671	12.7
28	<i>Bacillus megaterium</i> SD15	01.0
29	<i>Lysinibacillus</i> sp. SS1.22 *	15.7
30	<i>Bacillus megaterium</i> S111	07.0
31	<i>Bacillus</i> sp. BAB – 6011 *	15.0
32	<i>Bacillus</i> sp. 2008723472	01.4
33	<i>Bacillus</i> sp. B29(2012b)	03.3
34	<i>Bacillus</i> sp. 2008723338	01.7

\*: Cepas productoras de proteasas seleccionadas en Agar Leche al 5 %.

Tabla 03. Actividad enzimática de las amilasas producidas por 11 cepas de *Bacillus* spp aislados de suelos de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad-Perú.

N°	Nombre	USC*/100 mL de PE (x 10 <sup>-2</sup> )
1	<i>Bacillus flexus</i> AMY_2.1.3.1	2.4
6	<i>Bacillus megaterium</i> IHB B 7046	2.0
9	<i>Bacillus thuringiensis</i> RBM04	0.4
11	<i>Bacillus subtilis</i> BAB-2936	2.7
13	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> IHB B 6505	0.4
16	<i>Bacillus licheniformis</i> CRRI-HN-2	0.7
17	<i>Bacillus megaterium</i> Y12	0.7
20	<i>Bacillus cereus</i> SAD - 05	0.4
21	<i>Bacillus</i> sp. NNR2	0.4
26	<i>Bacillus</i> sp. OM-2	1.8
27	<i>Bacillus megaterium</i> IHB 16671	0.6

La actividad enzimática fue evaluada por el método de Street-Close (USC) modificado.

Tabla 04. Actividad enzimática de las proteasas producidas por 09 cepas de *Bacillus* spp aislados de suelos de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad-Perú.

Nº	Nombre	UP/mL de PE
6	<i>Bacillus megaterium</i> strain IHB B 7046	0.06
9	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain RBM04	0.04
18	<i>Bacillus</i> sp. S20414	0.03
19	<i>Bacillus megaterium</i> strain KUDC1720	0.05
20	<i>Bacillus cereus</i> SAD - 05	0.03
21	<i>Bacillus</i> sp. NNR2	0.05
25	<i>Bacillus</i> sp. strain TT19	0.03
29	<i>Lysinibacillus</i> sp. SS1.22	0.04
31	<i>Bacillus</i> sp. strain BAB - 6011	0.05

La actividad enzimática fue evaluada por el método de Lowry.

#### IV. DISCUSIÓN

La degradación enzimática del almidón por acción de la amilasa a escala industrial, ha sido practicada por muchos años y ha reemplazado considerablemente los procesos tradicionales de catálisis ácida<sup>25</sup>. La producción de amilasas en el género *Bacillus* está relacionada con la complejidad, naturaleza y concentración de la fuente de nitrógeno, regulándola de manera positiva o negativa. Las fuentes de nitrógeno complejas más estudiadas para la producción de -amilasas en especies de *Bacillus* son extracto de levadura y peptona<sup>26</sup>, que han sido utilizadas en esta investigación.

De las 34 cepas, 11 cepas se seleccionaron y se cuantificaron tomando en cuenta el análisis semicuantitativo al cual se sometió y la evaluación del almidón residual dentro de las 24 horas. Por otra parte, en un proceso para la producción de enzimas por fermentación es necesario tener en cuenta el fenómeno de inducción y represión catabólica. Muchas enzimas son producidas en cantidades, solo en presencia de inductores específicos<sup>27</sup>.

La beta-amilasa y alfa-amilasa resultan ser las más utilizadas en la industria del papel y de la alimentación; ambas se encuentran en vegetales y las alfa-amilasas en microorganismos donde su acción es similar. Dichas enzimas hidrolizan los enlaces alfa 1-4 glucosídicos de la molécula de amilosa y amilopectina, produciéndose dextrinas, maltosa y glucosa, como productos<sup>28</sup>. Para la producción de la actividad amilolítica se definió la unidad de enzima equivalente a una unidad de Street Close; los valores oscilan entre 0.4 a  $2.7 \times 10^{-2}$  Unidades Street Close/ 100 mL de Preparado Enzimático.

Las proteasas representan la clase de enzimas que ocupan una posición esencial con respecto a sus funciones fisiológicas, las mayoritarias son la proteasa alcalina denominada subtilisina (AprE) y la proteasa neutra (NprE), así como sus aplicaciones comerciales <sup>29, 32</sup>. Estos microorganismos productores de celulosas y proteasas juegan un significativo rol en la descomposición de materia orgánica y mineralización de nutrientes. Las proteasas tienen un papel importante dentro del proceso antagónico de los organismos, ya que se ha observado que podría estar involucradas dentro del proceso de patogenicidad hacia los insectos. La importancia de estas características implica que estos microorganismos sean potenciales para el uso como biofertilizantes para el rendimiento del cultivo <sup>30</sup>.

De las 34 cepas, todos mostraron actividad enzimática de proteasas; esta selección se basó en un análisis semicuantitativo, y se cuantificó 9 cultivos en base a los mayores diámetros del halo de proteólisis; para la producción de la actividad proteolítica se utilizó el método de Lowry, los valores oscilan entre 0.03 a 0.06 Unidades de Proteína/ mL de Preparado Enzimático.

La importancia de esta cepa es que las proteasas alcalinas junto con otras enzimas que son secretadas al medio son producidas cuando el microorganismo se encuentra en la fase exponencial del crecimiento y empiezan a disminuir después de llegar a un máximo, lo cual sucede poco después de que el microorganismo llega a su fase de crecimiento estable, después de la cual este comenzara a esporular por tanto de esta forma se induce a que el microorganismo se mantenga en la fase de producción de exoenzimas <sup>31</sup>.

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son fácilmente aisladas desde suelo y restos de materia orgánica, especialmente en la rizósfera donde se encuentra un gran número de vitaminas, aminoácidos y carbohidratos <sup>30</sup>.

BIBLIOTECA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## V. CONCLUSIONES

1. Se cuantificó la producción de amilasas de 11 cepas de *Bacillus* seleccionadas a partir de 34 cultivos aislados de suelos de la Universidad Nacional Trujillo, cuyos valores de su actividad enzimática oscilan entre 0.4 a  $2.7 \times 10^{-2}$  Unidades Street Close/ 100 mL de Preparado Enzimático.
2. Se cuantificó la producción de proteasas de 09 cepas de *Bacillus* seleccionadas a partir de 34 cultivos aislados de suelos de la Universidad Nacional Trujillo, cuyos valores de su actividad enzimática oscilan entre 0.03 a 0.06 Unidades de Proteína/ mL de Preparado Enzimático.

BIBLIOTECA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar estudios posteriores a los cultivos ya caracterizados, verificados y cuantificados que dichas cepas tengan efectos benéficos para poder obtener consorcios microbianos para ser utilizados en cultivos agrícolas con la finalidad de mejorar la producción y rentabilidad.
2. Realizar pruebas de producción de quitinasas y otras enzimas a las cepas estudiadas, para tener un análisis completo de producción de enzimas.

BIBLIOTECA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Don J. Brenner, Noel R. Krieg, George M. Garrity, James T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Staley. 2005; 3.
2. Michael T. Madigan, John Martinko, Jack Parker. Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall, 10 Edición. 2004. p. 404.
3. Tejera B, Rojas M, y Heydrich M. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. CENIC Ciencias Biológicas. 2011; 42 (3): 131 – 138.
4. Schlegel H. Microbiología General. Nueva edición. Ediciones Omega, S.A.1997. Barcelona. España.
5. Sauka D, Benintende G. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Revista Argentina de Microbiología. 2008; 40:124-140.
6. Realpe M, Hernandez C, Agudelo C. Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. Biomédica. 2000; 22 (2): 106-109.
7. Órbera T, Pérez I, Ferrer D, Cortés N, Gonzáles Z. Aislamiento de cepas del género *Bacillus* sp. Con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. Revista Cubana de Química.2005;17(1): 189-195
8. Rodas B, Quero M, Magaña H, Reyes A. Selección de cepas nativas con actividad quitino-proteolítica de *Bacillus* sp. Aisladas de suelos tropicales. Revista Colombiana Biotecnología. 2009; 11(1): 107-113.

9. Shelby N. Freer. Purification and Characterization of the Extracellular - Amylase from *Streptococcus bovis* JB1. *Applied and Environmental Microbiology*.1993; 59(5): 1398-1402.
10. Quintero M, Montoya O, y Gutiérrez P. Purificación y Caracterización de una - amilasa producida por la cepa native *Bacillus* sp. BBM1. *Dyna*.2010; 1(162): 31-38.
11. Verma A, Singh H, Anwar M, Ansari M, y Agrawai S. Production of alkaline protease from a haloalkaliphilic soil thermoactinomycete and its application in feather fibril disintegration. *African Journal of Microbiology Research*. 2014; 8(27): 2565-2573.
12. Montor J, Olvera C, Reyes D, Sachman B, Ramírez L, y Del Moral S. Caracterización bioquímica de AmiJ33, una amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de suelos cultivados con caña de azúcar en la región del Papaloapan. *Nova Scientia*. 2014; 6(2): 39-59.
13. Mala B. Rao, Aparna M. Tanksale, Mohini S. Ghatge, Vasanti V.Deshpande. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases *Microbiology and Molecular Biology. Reviews*. 1998; 597–635.
14. Pérez M, Milián G, Alfonso G, González R, Piad R, Ascunce G. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. Productoras de enzimas proteolíticas para la producción de hidrolizados de proteínas. *Revista Avanzada Científica*. 1998;1(3).

15. Muhammad N., Javed I, Shahjahan B, Qurat-ul-ain Syed Studies On Commercially Important Alkaline Protease From *Bacillus Lichniformis* N-2 Isolated From Decaying Organic Soil. Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem. 2007; 32 (4): 171–177.
16. Sáez A. Proteasas alcalinas de una cepa nativa de *Bacillus* sp. Alcalofílico. Ingeniería y Ciencia. 2006; 2(3):29-38.
17. Muhammad N., Javed I., Shahjahan B., Qurat-ul-ain Syed Studies On Commercially Important Alkaline Protease From *Bacillus Lichniformis* N-2 Isolated From Decaying Organic Soil. Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem. 2007; 32 (4): 171–177.
18. Manual de Medios de cultivo MERCK. Frankfurter Strasse 250 D-6100 Darmstadt 1. Alemania.1982. Págs: 94-95
19. Sánchez M. 2016. Biotecnología. Manual de Fundamentos y Técnicas para la Preservación de Bacterias, Hongos y Levaduras. Edit. Colombia. Bogotá. Colombia.
20. Prescott, L.Harley, J.y D. Klein. 2004. Microbiología. 5ª edición. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. Madrid. España.
21. Ertola, R., Yantorno y C. Mignome. 2005. Selección, mantenimiento y mejoramiento de microorganismos de interés industrial. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la OEA.
22. MacFaddin J. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Ed. Panamericana. Argentina. 2003.3: 385-396.

23. Cueva F, Villanueva E, Ponce H, Canchachi W, Ilich E. Termoestabilidad de Alfa Amilasa en Extractos crudos de cuatro cultivos de *Bacillus* sp. En: Cong Iberoamer CC Químicas 1983. P.21.
24. Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)
25. Vargas S. Selección y Evaluación de bacterias del género *Bacillus* productoras de amilasa en cultivo sumergido. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1994.
26. Akcan y Nurullah. High level production of extracelular alfa- amylase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 in submerged fermentation. Romanian Biotechnological Letters. 2011. 16:6833- 6840.
27. Pérez M, Milián G, Alfonso G, González R, Piad R, Ascunce G. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. Productoras de enzimas proteolíticas para la producción de hidrolizados de proteínas. Revista Avanzada Científica. 1998;1(3).
28. Rodríguez M y Quintana A. Efecto del tiempo en la digestión enzimática in vitro de almidones de *Ollucus tuberosus* y *Tropaeolum tuberosum*. Universidad Nacional de Trujillo.
29. Mala B. Rao, Aparna M. Tanksale, Mohini S. Ghatge, and Vasanti V. Deshpande. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 62, No. 3. p. 597–635. 1998
30. Lima, L., Marco, J.L., and Felix, J.R. (1998). “Enzimas hidrolíticas involucradas no controle biologic por miciparasitismo,” in Controle Biologic, eds I. S. Melo and J.L. Azevedo , 263–304.

31. Bobbie RJ, White DC. Characterization of benthic microbial community structure by high resolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Appl Environ Microbiol* 39: 1212–1222.
32. Jan J, F Valle, F Bolivar, E Merino 2000. Characterization of the 5' subtilisin (*aprE*) regulatory region from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 183:9–14.

BIBLIOTECA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

# ANEXOS

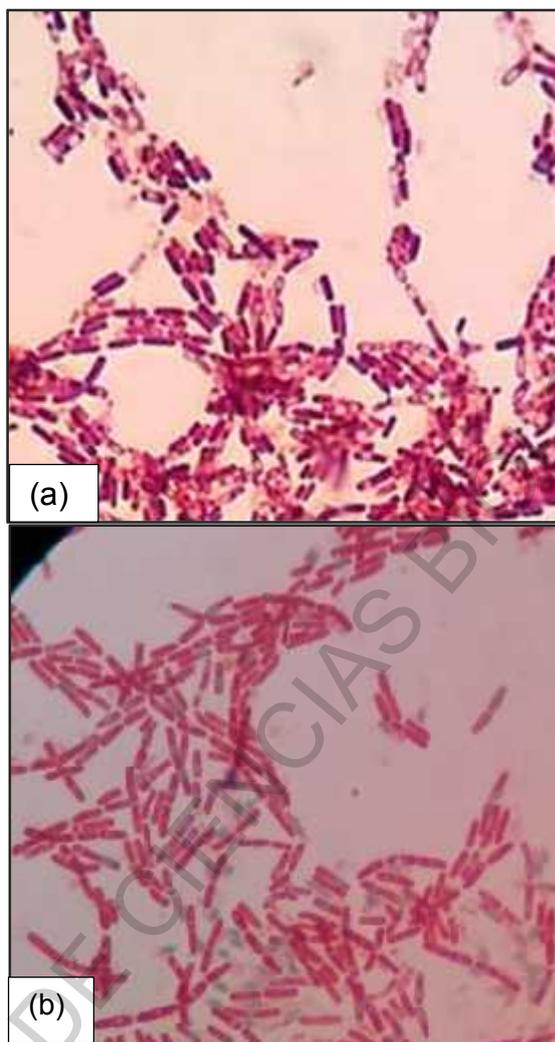
BIBLIOTECA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Anexo 01.** Análisis bioinformático de las secuencias, por el programa Blast nucleotídico de 34 cepas de *Bacillus* spp aislados de suelos de la Ciudad Universitaria de Universidad Nacional Trujillo, La Libertad-Perú.

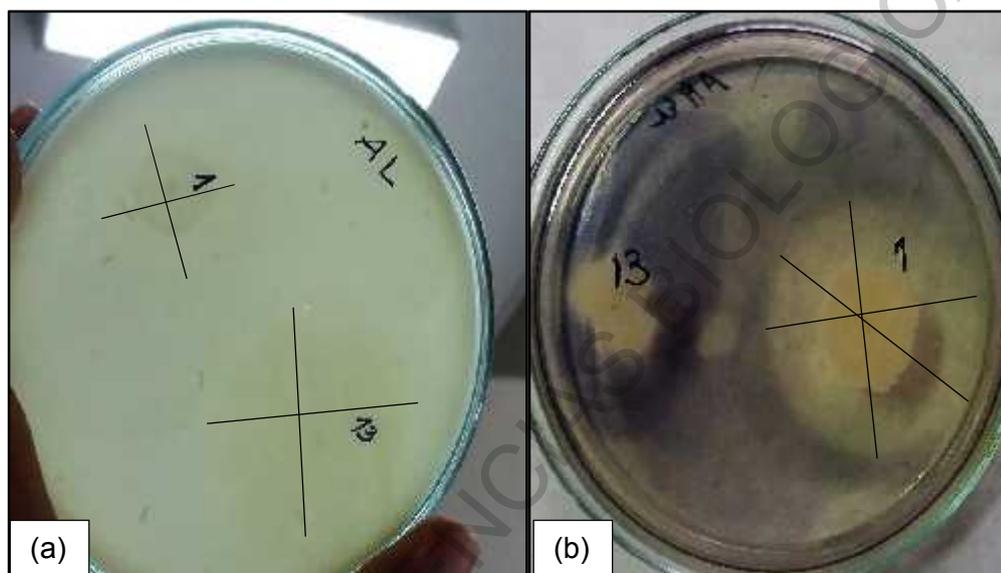
Nº	Código	Nombre	Identidad (%)	Query Cover (%)	Genbank
1	T 4AV	<i>Bacillus flexus</i> strain AMY_2.1.3.1	98	99	KT719914.1
2	T 25V	<i>Bacillus</i> sp. strain BAB-5926	99	100	KX548946.1
3	T 7AV	<i>Bacillus subtilis</i> strain FD	99	100	KY000519.1
4	T 17AL	<i>Bacillus megaterium</i> strain IHB B 7046	93	100	KJ721207.1
5	T 25AL	<i>Bradyrhizobiaceae bacterium</i> S28	84	45	EU177515.1
6	T 1AV	<i>Bacillus megaterium</i> strain IHB B 7046	99	100	KJ721207.1
7	T 22V	<i>Bacillus subtilis</i> strain AER314-2	97	99	KR967391.1
8	T 28L	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Strain LMG	81	75	KC236689.1
9	T 31AV	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain RBM04	97	100	KX529821.1
10	T 6AV	<i>Bacillus megaterium</i> strain L2S3	99	100	EU221414.1
11	T 27L	<i>Bacillus subtilis</i> strain BAB-2936	98	89	KX890471.1
12	T 20AV	<i>Bacillus megaterium</i> strain SD15	91	92	KP795827.1
13	T 13AV	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain IHB B 6505	99	100	KF475851.1
14	T 1V	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain B20	97	99	KT254134.1
15	T 3L	<i>Bacillus</i> sp. 6077	88	98	KX774628.1
16	T 29AV	<i>Bacillus licheniformis</i> strain CRR1-HN-2	99	100	JQ695929.1
17	T 7L	<i>Bacillus megaterium</i> strain Y12	93	45	KX592602.1
18	T 10AV	<i>Bacillus</i> sp. S20414	96	95	KF956586.1
19	T 26AV	<i>Bacillus megaterium</i> strain KUCC1720	96	100	KC414700.1
20	T 2V	<i>Bacillus cereus</i> SAD - 05	100	100	LC150332.1
21	T 9L	<i>Bacillus</i> sp. NNR2	92	95	KT895857.1
22	T 12V	<i>Bacillus</i> sp. Z3	83	93	EU236735.1
23	T 18AV	<i>Bacillus aerius</i> strain YM-16	99	100	KX834837.1
24	T 12AV	<i>Bacillus</i> sp. BAB-4186	97	100	KJ794158.1
25	T 9AL	<i>Bacillus</i> sp. strain TT19	87	74	JN975236.1
26	T 15L	<i>Bacillus</i> sp. OM-2	96	99	KFS43101.1
27	T 11AV	<i>Bacillus megaterium</i> strain IHB 16671	99	100	KU605234.1
28	T 3AV	<i>Bacillus megaterium</i> strain SD15	99	100	KF853121.1
29	T 5AV	<i>Lysinibacillus</i> sp. SSI.22	99	100	KC160856.1
30	T 14AL	<i>Bacillus megaterium</i> strain SIII	96	99	GU998814.1
31	T 24AV	<i>Bacillus</i> sp. strain BAB - 6011	95	99	KX897176.1
32	T 28AV	<i>Bacillus</i> sp. 2008723472	99	100	KT254138.1
33	T 8AV	<i>Bacillus</i> sp. B29(2012b)	100	100	KX986611.1
34	T 19AV	<i>Bacillus</i> sp. strain 2008723338	96	100	LN890196.1



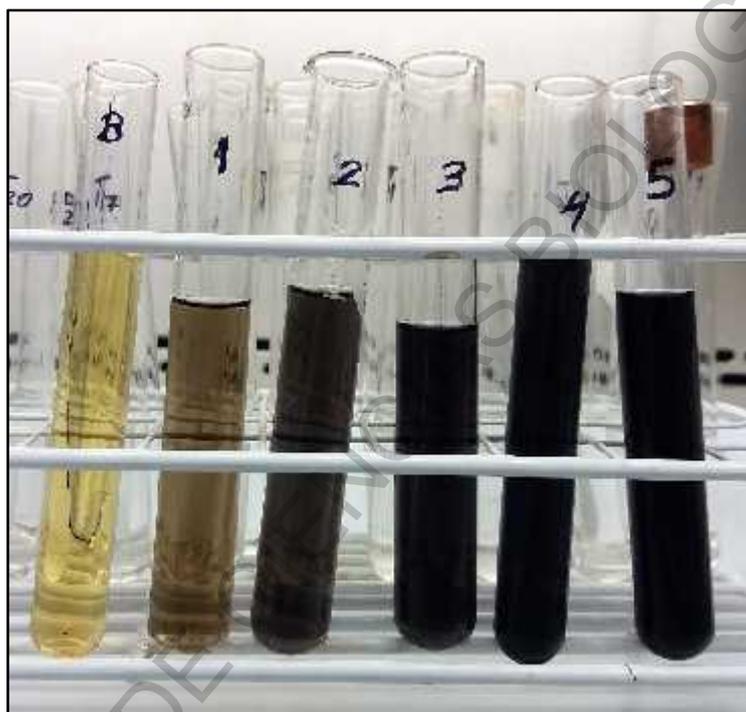
**Anexo 02.** Cepas de *Bacillus* spp. aislados de suelos de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad – Perú, conservados en glicerol al 10 %.



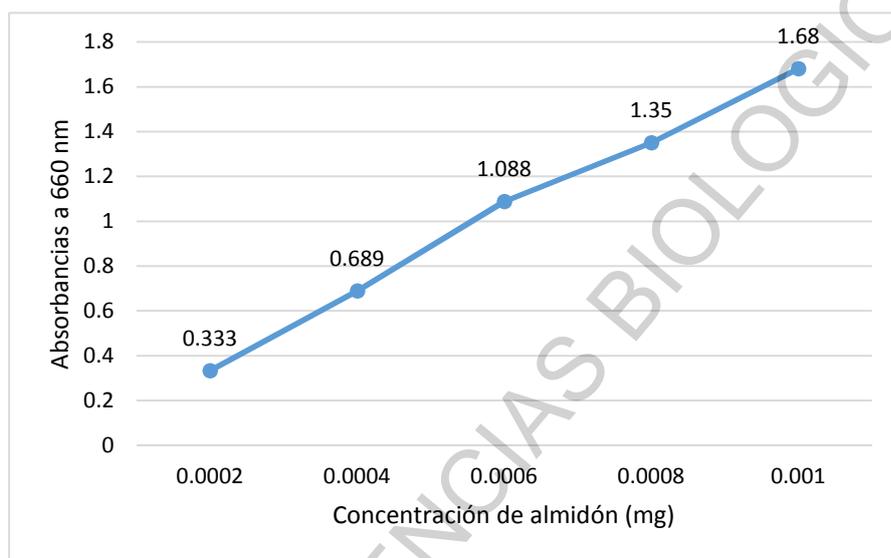
**Anexo 03.** Observación microscópica a 1000 A de *Bacillus* sp. NRR2 en coloración Gram (a) y coloración Wirtz (b) a partir de colonias en agar almidón enriquecido con extracto de levadura al 0.3%.



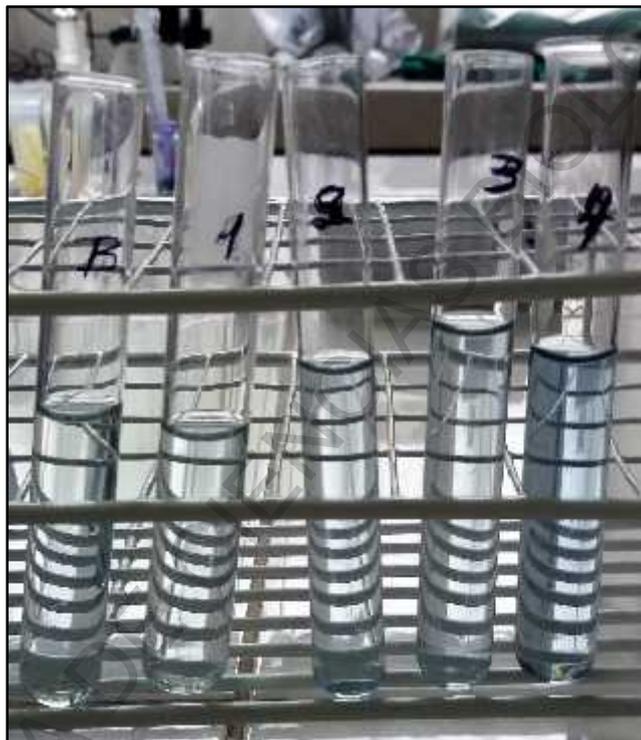
**Anexo 04.** Evaluación semicuantitativa de la producción de proteasas por *Bacillus* AMY\_2.1.3.1 y IHB B 6505 en Agar Leche (a) y de amilasas en Agar Almidón enriquecido con Extracto de Levadura (b), incubados durante 48 horas a 30°C.



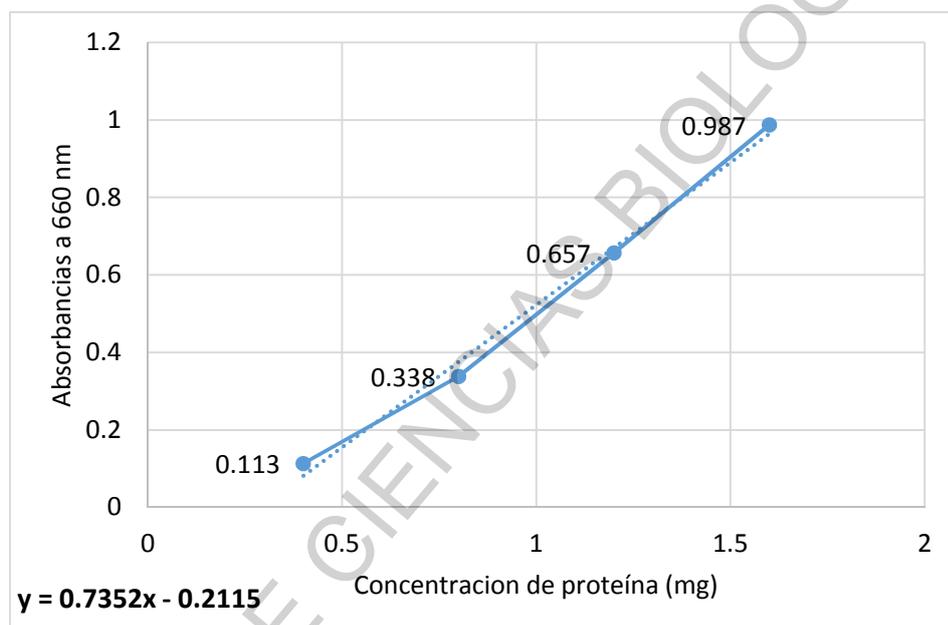
**Anexo 05.** Curva de calibración para cuantificar la actividad enzimática de amilasas por el Método Street Close modificado.



**Anexo 06.** Curva de calibración para cuantificar la actividad enzimática de amilasas por el Método Street Close modificado.



**Anexo 07.** Curva de calibración para cuantificar la actividad enzimática de proteasas por el Método de Lowry.



**Anexo 08.** Curva de calibración para cuantificación de la actividad enzimática de proteasas por el Método de Lowry.