

Evaluación de residuos de cáscaras de plátano y yuca para la producción de amilasas a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* A16

Juan Pablo Heredia Martín, Etna Milena Sánchez Castelblanco

Laboratorio de Biotecnología - Grupo de Investigación en Procesos Industriales NEURONA -
Centro de Gestión Industrial, SENA, Calle 15 # 31 - 42 Bogotá, Colombia
etnamilena@misena.edu.co

INVESTIGACIÓN

RESUMEN

Los sustratos utilizados en la producción de amilasas microbianas son uno de los principales factores que influyen en el rendimiento del proceso, ya que la actividad enzimática y los costos de producción dependen en gran medida de sus características. La mayoría de las amilasas industriales se obtienen a partir de costosos sustratos formulados con almidones comerciales. Por tal razón, es importante buscar nuevos sustratos de bajo costo que permitan la obtención de amilasas microbianas cuyas características permitan su aplicación en diferentes procesos industriales. Residuos agroindustriales con un contenido importante de almidón podrían ser usados como sustratos en la producción de estas enzimas. En este estudio se compararon las actividades enzimáticas producidas por *Bacillus amyloliquefaciens* (aislamiento A16) en medios de cultivo preparados con cáscaras de plátano hartón y yuca, con contenidos de almidón de 7.74 y 5.27 % p/p, respecto a un medio de cultivo estándar de almidón soluble. Durante la fermentación se tomaron muestras cada 12 h para obtener extractos enzimáticos y se evaluó cualitativamente la degradación de almidón y cuantificó la actividad amilolítica a pH 6.5. Luego de 84 horas de fermentación, el mayor rendimiento de amilasas se presentó en el medio con cáscaras de plátano a pH 7.0 (96.52 ± 0.36 U/mL), resultados superiores a los obtenidos en el medio estándar de almidón (74.01 U/mL) y en el medio con cáscaras de yuca (40.94 ± 0.19 U/mL), demostrándose que las cáscaras de plátano son un sustrato aprovechable y de fácil consecución que presenta buenos rendimientos para producir amilasas.

Palabras clave: actividad enzimática, actividad amilolítica, almidón, residuos agroindustriales

ABSTRACT

Evaluation of plantain and cassava peels wastes for amylases production by *Bacillus amyloliquefaciens* A16. The substrates used to produce microbial amylases are one of the principal factors affecting the process yield because the enzyme activity and production costs depend on their characteristics. Most industrial amylases produced are obtained from synthetic substrates formulated from expensive commercial starches. It is important to search for new affordable substrates to obtain microbial amylases, with specific properties that allow their application in several industrial processes. The agro-industrial wastes with starch in their composition may be used as affordable substrates for amylase production. In this study, the enzymatic activities produced from *Bacillus amyloliquefaciens* (Isolated A16) in culture media made from plantain and cassava peels, with a starch concentration of 7.74 and 5.27 % w/w, were compared to the enzyme activity obtained in a standard media made from soluble starch. During fermentation, samples were taken every 12 h to obtain enzymatic extracts in which the starch degradation was qualitatively evaluated, and the amylase activity was determined at pH 6.5. After 84 h of fermentation, the plantain peels media presented a major amylase activity (96.52 ± 0.36 U/mL) at pH 7.0, results higher to those obtained in the starch standard media (74.01 U/mL) and cassava peels media (40.94 ± 0.19 U/mL). Hence, this showed that plantain peels are a usable and accessible substrate that may provide good yields in amylase production.

Keywords: enzymatic activity, amylase activity, starch, agro-industrial wastes

How to cite (Vancouver style):

Heredia Martín JP, Sánchez Castelblanco EM. Evaluación de residuos de cáscaras de plátano y yuca para la producción de amilasas a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* A16. Biotecnol Apl. 2020;37(4):4201-5.

Introducción

El almidón es un polímero conformado por monómeros de glucosa unida por enlaces glicosídicos α -1,4 y α -1,6, que se almacena en gránulos como fuente de energía en las plantas, ya que la glucosa producida durante la fotosíntesis es transformada en amilosa y amilopectina [1]. La distribución de almidón es muy variable en las plantas y se encuentra principalmente en los rizomas y las raíces. Sin embargo, los cereales y tubérculos son la principal fuente de este polisacárido para el hombre, debido a su alto contenido que puede variar entre 55.5 y 79.5 % p/p dependiendo de la especie vegetal [2, 3].

Cultivos como trigo, arroz, yuca y papa constituyen una fuente básica de almidón en la alimentación hu-

mana, con importantes cantidades de residuos agroindustriales con un contenido considerable de almidón que podría ser usado como fuente de carbono de bajo costo para su aprovechamiento [4, 5].

El almidón es degradado por enzimas extracelulares denominadas amilasas e isoamilasas que hidrolizan los enlaces glicosídicos α -1,4 y α -1,6 de las cadenas de amilosa y amilopectina produciendo sacáridos de menor peso molecular como oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos [6]. Los azúcares producidos en la hidrólisis del almidón son usados en la producción de jarabes de los que se obtiene etanol por procesos de fermentación [7]. Las amilasas tienen diversos orígenes y las obtenidas a partir de

1. Magallanes-Cruz P, Flores-Silva P, Bello-Perez L. Starch structure influences its digestibility: A Review. J Food Sci. 2017;82:2016-23.

2. Krisztina RV. Starch Bearing Crops as Food Source. In: Gyorgy F, editor. Cultivated plants, primarily as food sources. Oxford: Eolss Publishers Co. Ltd; 2011. p. 253-87.

3. Bertoff E. Understanding Starch Structure: Recent Progress. Agronomy.2017; 7: 1-29.

4. Moteiro de Souza P, Oliveira e Magalhães P. Application of microbial α -amylase in industry – a review. Braz J Microbiol. 2010;41:850-61.



Publicación libre de costo para el autor
No article processing charges

bacterias y hongos de los géneros *Bacillus* y *Aspergillus* son las más utilizadas en su producción industrial debido a los altos rendimientos reportados en cultivos sumergidos [8].

Para la producción de amilasas se han realizado fermentaciones en medios de cultivo con salvado, granos y harina de diferentes cereales y tubérculos con el fin de incrementar el rendimiento de enzimas bacterianas y fúngicas [5], sin embargo, existen residuos agroindustriales de otros cultivos que no se han explotado para producir amilasas. El cultivo de plátano y banana, en crecimiento en países tropicales y subtropicales, genera gran cantidad de residuos de cáscaras, tallos y hojas [9], al igual que el cultivo de yuca, ampliamente extendido en países tropicales, genera residuos que no son gestionados adecuadamente [10]. Por ejemplo, en Colombia se pierde hasta un 45 % del almidón extraído de raíces de yuca en las aguas residuales del proceso [11]. Estos residuos serían materias primas importantes en la producción de amilasas por sus contenidos de almidón, lo que los convertiría en una alternativa viable de bajo costo para la obtención de enzimas.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la producción de amilasas por *Bacillus amyloliquefaciens* (aislamiento A16) usando sustratos obtenidos a partir de residuos de cáscaras de plátano (*Musa paradisiaca* L) y yuca (*Manihot esculenta*). Este es el primer estudio en el que se reporta a una cepa nativa aislada de suelos de humedales de Bogotá para la obtención de amilasas a partir de cáscaras de plátano y yuca. Durante las fermentaciones se evidenció el consumo de almidón a través de pruebas cualitativas y se determinó la actividad enzimática por pruebas cuantitativas como un estimativo de la producción de amilasas.

Materiales y métodos

Pretratamiento de los residuos

Cáscaras de plátano (CP) y yuca (CY) con un espesor entre 3 a 5 mm, se recolectaron en los centros de acopios de residuos de restaurantes ubicados en la zona industrial de Puente Aranda en la ciudad de Bogotá. Los residuos fueron lavados con agua potable para eliminar residuos gruesos, posteriormente se realizó una extracción de grasas con 10 mL de éter etílico, seguida de una eliminación de azúcares reductores con 10 mL de etanol al 80 %. Finalmente, las cáscaras se cortaron en pedazos de aproximadamente de 1 cm², se deshidrataron en estufa (BINDER – FED 115) a 70 °C hasta peso seco constante y se conservaron a –80 °C hasta el momento de ser utilizados.

Caracterización de los residuos de plátano y yuca

Los residuos previamente deshidratados y congelados se pasaron a un horno (BINDER – FED 115) a 70 °C por una hora para eliminar el agua residual generada del proceso de descongelación, haciendo ensayos de caracterización por triplicado. La humedad se cuantificó en 2 g de residuos troceados no pretratados, determinado gravimétricamente el contenido de agua, y a partir de estos residuos deshidratados se determinó el contenido de cenizas [12].

Para cuantificar el almidón, 1 g de cada residuo pretratado y macerado más 15 mL de agua destilada y 5 mL de ácido sulfúrico 0.2 M, se llevó a reflujo por 8 h para hidrolizar el almidón. El proceso se detuvo con la ausencia de una coloración azul-violeta al adicionar reactivo de Lugol a una alícuota de la mezcla. Enseguida la mezcla se neutralizó con solución de hidróxido de sodio al 40 % p/v y se llevó a volumen final de 250 mL. Como patrón se hidrolizó 1 g de almidón soluble (Merck) bajo las condiciones descritas previamente. Una porción de cada mezcla se tituló por retroceso con reactivo de Fehling previamente estandarizado con solución de glucosa 0.5 % p/v y se determinó la cantidad de azúcares reductores presentes en los hidrolizados de los residuos y de almidón. Por comparación de los títulos obtenidos se determinó el contenido de almidón en las cáscaras de plátano hartón y yuca [13].

Preparación de medios de cultivo

Medios de cultivo con cáscaras de plátano hartón (CP)

Se descongelaron 3.23 gramos de residuos de CP previamente tratados y deshidratados, se adicionaron en frascos Schott - DURAN® y esterilizaron a 121 °C, 15 psi por 20 min, luego se les adicionó una solución de nutrientes estéril – SNE (extracto de levadura 0.25% p/v; peptona 0.25 % p/v; sulfato de amonio 0.05 % p/v; cloruro de calcio 0.05 % p/v; hidrógeno fosfato de potasio 0.01 % p/v y dihidrógeno fosfato de potasio 0.01 % p/v), llevándose a un volumen final de 100 mL y una concentración de almidón de 0.25 % p/v.

Medios de cultivo con cáscaras de yuca (CY)

Se descongelaron y deshidrataron 4.23 g de residuos de CY pretratados, y se adicionaron en frascos Schott - DURAN®, luego se esterilizaron a 121 °C, 15 psi por 20 min y se les adicionó SNE hasta un volumen final de 100 mL y una concentración de almidón de 0.25 % p/v.

Medios control

Se prepararon 100 mL de caldo almidón al 0.25 % p/v a partir de SNE y almidón soluble (Merck) [14]. Este medio fue usado para la elaboración de controles positivos y negativos para la producción de amilasas.

El pH de todos los medios fue ajustado a 7.0 adicionando una solución de hidróxido de sodio 0.1 M esterilizada por filtración.

Producción de amilasas

Un criovial preservado en congelación con la cepa *B. amyloliquefaciens* (A16), previamente aislada de suelos de humedales de Bogotá [15], se reactivó en 100 mL de caldo nutritivo a 37 °C durante 24 horas. Se tomaron 10 mL de este cultivo con 6×10^8 células/mL y se inocularon en 100 mL de los medios preparados con CP, CY y almidón soluble (Merck). Un control negativo se realizó con caldo almidón sin inocular. Los medios CP, CY y controles se incubaron a 37 °C y 120 rpm por 84 horas en agitación en una incubadora New Brunswick-Innova40. Todos los cultivos se realizaron por duplicado.

5. Abd-Elhalem BT, El-Sawy M, Gamal RF, Abou-Taleb KA. Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. *Ann Agr Sci*. 2015;60:193-202.

6. Robyt J. Enzymes in the hydrolysis and synthesis of starch. In: Whistler R, Bemiller J, Paschall E, editors. *Starch: Chemistry and Technology*. London: Academic Press; 1984. p. 87-123.

7. Moreno M, Montoya O, Gutiérrez P. Purificación y caracterización de una α -amilasa producida por la cepa nativa *Bacillus* sp. BM1. *Dyna*. 2010;162:31-8.

8. Enhasy H. Bioprocess development for the production of alpha amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in batch and fed-batch cultures. *Res J Mic*. 2007;2:560-8.

9. Unakal C, Kallur R, Kaliwal B. Production of α -amylase using banana waste by *Bacillus subtilis* under solid state fermentation. *Eur J Exp Biol*. 2012;2:1044-52.

10. Olukanni D, Olatunji T. Cassava Waste management and biogas generation potential in selected local government areas in Ogun State, Nigeria. *Recycling*. 2018;3:1-12.

11. Wheatley C, Chuzel G, Zakhia N. CASSAVA: Uses as a Raw Material. In: Caballero B, editors. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. London: Academic Press; 2003. p. 969-74.

12. Food and Agriculture Organization. FAO [Internet]. Análisis proximal de calcio y fósforo en harinas de pescado; 1994 [Cited 2020 mar 5]. Available from: <http://www.fao.org/3/ab482s/AB482502.htm>

13. Gerena Baron F. Obtención de jarabes azucarados a partir de la hidrólisis química de residuos de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis* L var. Valencia) y papa (*Solanum tuberosum*) variedad diacol capiro (r-12) para ser empleados como edulcorantes en la industria de alimentos [dissertation]. Duitama: Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD. 2013. [Cited 2020 Feb 26]. Available from: <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/1528>

14. Pedroza A, Matiz A. Aislamiento y selección de microorganismos productores de amilasas y celulasas. In: Pedroza A, Matiz A, Quevedo B, Aguirre A, editors. *Manual de introducción a la biotecnología*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2007. p. 118.

15. Buitrago S, Sánchez E, Guerrero H. Aislamiento de microorganismos amilolíticos, celulolíticos y lignolíticos a partir del suelo de humedales de Bogotá. *Revista SENNOVA*. 2014;1:148-55.

Obtención de extractos enzimáticos

Durante las fermentaciones se tomaron muestras de 5 mL cada 12 h de los medios CP, CY y caldo almidón centrifugándose a 4600 rpm por 20 min a 7 °C en una centrífuga Hettich – Rotanta 460R. Los sobrenadantes o extractos enzimáticos se almacenaron a –20 °C por un máximo de 12 h para posteriormente evaluar la presencia de almidón y la actividad enzimática.

Durante las 84 horas de cultivo se determinó la hidrólisis del almidón adicionando una gota de reactivo de Lugol a 2 mL del extracto enzimático. El almidón residual se evidenció por la presencia de una coloración azul-violeta en el extracto luego de adicionar el reactivo.

Cuantificación de la actividad enzimática amilolítica

Se mezcló 1 mL de cada extracto enzimático con 1 mL de almidón soluble 1% p/v en buffer fosfato pH 6.5 y se prepararon blancos enzimáticos para cada tiempo de ensayo mezclando 1 mL de agua destilada y 1 mL de almidón soluble 1% p/v en buffer fosfato pH 6.5. Las mezclas se llevaron a 60 °C por una hora en un baño de agua (Barnstead Lab-Line). Las reacciones enzimáticas se detuvieron en baño de hielo por 15 min y se centrifugaron a 4600 rpm por 20 min a 7 °C, recuperando el sobrenadante. En 1 mL de cada sobrenadante se determinó la concentración de glucosa por la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico o DNS [16], leyéndose la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV – 1800. Por medio de una curva de calibración con patrones de glucosa de 0.08 a 0.43 mg/mL se calculó la concentración de azúcares. La cantidad de glucosa determinada en los blancos enzimáticos y en los extractos obtenidos a la hora 0 fueron sustraídas de la concentración de glucosa presente en los extractos enzimáticos producidos durante las 84 horas de la fermentación. La cuantificación de la actividad amilolítica (U/mL) se determinó como la cantidad de enzima que produce un μmol de glucosa por minuto por mililitro [5, 17].

Análisis estadísticos

Para determinar las diferencias significativas entre las actividades enzimáticas producidas en los tres medios de cultivo, se realizó una prueba de hipótesis con la distribución t de Student comparando las medias experimentales de las actividades enzimáticas producidas en los medios caldo almidón – CY, caldo almidón – CP y CY – CP, con un nivel de significación $\alpha = 0.05$. Todos los cultivos se hicieron por duplicado, representándose la desviación estándar.

Resultados y discusión

Caracterización de los residuos de cáscaras de plátano hartón y yuca

Los porcentajes de almidón, humedad y cenizas en base seca de los residuos CP y CY se muestran en la tabla. Los residuos mostraron un contenido de almidón de 7.74 % p/p y 5.27 % p/p (Tabla). Con base en estos resultados se definió la cantidad de residuos necesaria para preparar medios de cultivo a una concentración final de almidón de 0.25 % p/v, lo que permitió la realización de las fermentaciones sumergidas

Tabla. Porcentajes obtenidos en la caracterización de cáscaras de plátano (CP) y cáscaras de yuca (CY) en base seca

Residuos	Almidón (% p/p)	Humedad (% p/p)	Cenizas (% p/p)
CP	7.740	88.150	1.863
CY	5.267	78.630	1.380

sin que se presentaran problemas de agitación. Esto debido a que al utilizar mayores concentraciones a 0.25 % p/v de almidón aumentaba la viscosidad del medio, dificultándose así la disponibilidad de nutrientes en el medio.

El contenido de almidón de las cáscaras de plátano evaluadas en este estudio fue de 7.74 % p/p, mientras que en otros estudios se han reportado concentraciones de almidón en base seca entre 11.0 y 48.0 % p/p [18, 19]. De hecho, Agama *et al.* [18] concluyen que la composición química y el contenido de almidón de las cáscaras de plátano dependen del estado de maduración del fruto del que provengan.

Diferentes estudios reportan cantidades variables de almidón tanto en yuca como en sus cáscaras. Mientras las cantidades de almidón en el tubérculo fresco pueden variar entre 20 y 30 % p/p, en las cáscaras puede encontrarse entre 47 al 61 % p/p en base seca [20-23]. Un estudio que analizó el contenido de almidón en yuca y su relación con las temporadas de lluvia, identificó que existe una relación entre las concentraciones de almidón y los factores ambientales en el momento de siembra y el cultivo [24].

Un menor contenido de almidón en los residuos de CP y CY analizados en el presente estudio puede atribuirse a los bajos espesores de las cáscaras recolectadas y a la prolongación del tiempo entre la generación de los residuos, su recolección y el análisis, ya que el almidón pudo haber sido degradado por acción de microorganismos presentes en los residuos. Se prepararon los medios de cultivo con las cáscaras caracterizadas independientemente de su bajo contenido de almidón en relación con el informado en otros estudios [18-23], puesto que el objetivo del estudio fue evaluar la producción de amilasas a partir de residuos agroindustriales para su aprovechamiento.

Determinación cualitativa del almidón residual

La hidrólisis de almidón se estableció como indicador de la producción de amilasas por *B. amyloliquefaciens* A16 en los medios de cultivo. Luego de adicionar Lugol en las muestras se presentó una coloración azul-violeta durante las primeras 48 h de fermentación, siendo más intensa en la hora 0 del ensayo, evidenciándose almidón residual en los medios CP, CY y caldo almidón. La coloración se hizo más leve a medida que transcurría el tiempo hasta ser imperceptible a partir de las 60 horas de cultivo indicando la hidrólisis completa de almidón por la acción de las amilasas producidas. Todos los sobrenadantes del medio control, preparado con almidón soluble y en el que no se inoculó el microorganismo, mostraron la misma coloración azul-violeta durante el ensayo, es decir, las cantidades de almidón fueron invariables en el tiempo por la ausencia de la producción de enzimas en el medio.

16. Olanbiwoninu A, Fasiku S. Production of bacterial amylases and cellulases using sweet potato (*Ipomoea batatas*. (L.) Lam.) peels. *Afr J Biochem Res.* 2015;9:104-9.

17. Bryjak J. Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilization on acrylic carriers. *Biochem Eng J.* 2003;16:347-55.

18. Agama-Acevedo E, Sañudo-Barajas J, Vélez De La Rocha R, González-Aguilar L, Bello-Peréz G. Potential of plantain peels flour (*Musa paradisiaca* L.) as a source of dietary fiber and antioxidant compound. *CyTA - J Food.* 2016;14:117-23.

19. Hernández-Carmona F, Morales-Matos Y, Lambis-Miranda H, Pasqualino J. Starch extraction potential from plantain peel wastes. *J Environ Chem Eng.* 2017;5:4980-5.

20. Anunputtikul W, Rodtong S. Laboratory scale experiments for biogas production from cassava tubers. *Jsee journal.* 2004;3:238-43.

21. Olufunke E, Oguogua A, Blaschek H, Ezeji T. Protein enrichment of cassava peel by submerged fermentation with *Trichoderma viride* (ATCC 36316). *Afr J Biotech.* 2010;9:187-94.

22. Bayitse R, Hou X, Bjerre A, Saalia F. Optimisation of enzymatic hydrolysis of cassava peel to produce fermentable sugars. *AMB Express.* 2015;5:1-7.

23. Souto L, Caliani M, Soares Junior M, Fiorda F, Garcia M. Utilization of residue from cassava starch processing for production of fermentable sugar by enzymatic hydrolysis. *Food Sci Technol.* 2016;37:19-24.

24. Moreno P, Gourdji S. Research program on climate change, agriculture and food safety. Retrieved from Cassava starch content and its relationship with rainfall: Analysis of a starch content database in Colombia. InfoNote. Córdoba: Research Program on Climate Change, Agriculture and Food Security. 2015, Febrero. [Cited 2020 mar 1]. Available from https://www.researchgate.net/publication/276958217_Cassava_starch_content_and_its_relationship_with_rainfall_Analysis_of_a_starch_content_database_in_Colombia

Cuantificación de la actividad enzimática amilolítica

Durante el proceso de fermentación se evaluó la actividad amilolítica de las enzimas producidas en los sustratos CP, CY y almidón, registrándose la mayor actividad luego de 84 h en los tres sustratos evaluados. Sin embargo, los extractos de amilasas producidos en el medio CP presentaron una mayor actividad al final del ensayo (96.52 ± 0.35 U/mL) a 60 °C y pH 6.5 (Figura) que los extractos obtenidos en CY (40.94 ± 0.19 U/mL) y caldo almidón 0.25 % p/v (74.10 U/mL) (Figura). Según los resultados de comparación de medias de la prueba de hipótesis con la distribución t de Student, existen diferencias significativas entre las actividades enzimáticas producidas en los medios caldo almidón 1 % p/v y CY ($p = 0.001$) y entre los medios CY y CP con almidón 0.25 % p/v ($p = 0.011$), sin embargo, no existen diferencias significativas entre las actividades producidas en los medios CP y caldo almidón ($p = 0.785$).

A la hora 0 del análisis se evidenciaron actividades enzimáticas (2.08 ± 0.71 y 2.38 ± 0.71 U/mL) en los medios CP y CY que fueron sustraídas de las actividades registradas para los extractos producidos a partir de las 12 horas (Figura). La detección de estas actividades amilolíticas a la hora 0 se debió a la presencia de azúcares reductores en los extractos enzimáticos de los medios CP y CY, que no fueron generados durante la reacción enzimática mediante la acción de amilasas presentes al inicio del cultivo y provenían de trazas de azúcares que no lograron eliminarse durante el pretratamiento de los residuos.

No se evidenció el mismo comportamiento entre la producción de amilasas en el caldo almidón 0.25% p/v (control positivo) comparada con las generadas en los medios CP y CY. Mientras que durante las últimas 60 horas de fermentación en el caldo almidón al 0.25 % p/v se produjo tan solo un 19 % de las amilasas totales del ensayo (Figura), lo que sugirió la finalización de la fermentación a las 24 h. En este mismo período de tiempo (60 horas), en los medios CP y CY se produjo el 51.94 y el 41.34 % del total de enzimas (Figura). Esto justificó la prolongación de los tiempos de fermentación en los medios CP y CY para evaluar la producción total de amilasas hasta la hora 84. No se evidenciaron actividades amilolíticas en los extractos enzimáticos obtenidos en el medio caldo almidón sin inocular (control negativo), comprobándose que las amilasas producidas se generaron exclusivamente en los medios inoculados con la cepa *B. amyloliquefaciens* (A16). Tampoco se detectó producción de azúcares en el control negativo, realizado en caldo almidón sin inóculo, con lo cual se comprobó que la glucosa generada en las reacciones enzimáticas era producida por las amilasas presentes en los extractos obtenidos durante la fermentación.

El hecho de que durante las primeras 12 horas de ensayo la actividad enzimática producida en el control fue mayor respecto a la generada en los medios CP y CY (Figura), se pudo deber a la mayor disponibilidad del sustrato, ya que al adicionar almidón soluble en fermentaciones sumergidas se mejora considerablemente la producción de amilasas [25]. Sin embargo, rendimientos más bajos evidenciados en las actividades de las amilasas producidas en el control positivo

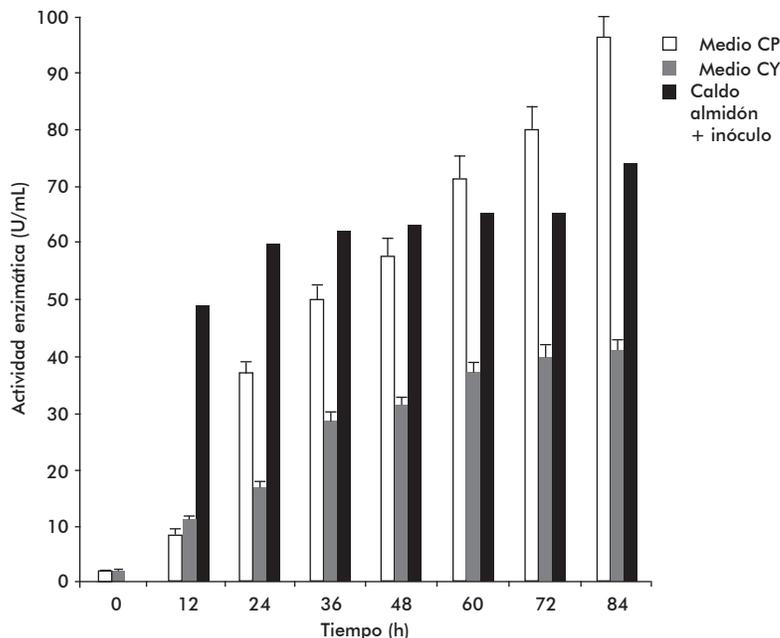


Figura. Actividad amilolítica de los extractos enzimáticos producidos en los medios con cáscara de plátano (CP), cáscara de yuca (CY) y medios control a pH 7.0. Todos los cultivos se realizaron por duplicado (+ DS). El caldo almidón sin inóculo no presentó crecimiento en ninguno de los tiempos evaluados. Como test estadístico se utilizó la prueba de hipótesis con la distribución t de Student con un valor de significancia (p) de 0.05 para todos los ensayos tanto en CP, CY y medios control. El valor de p para caldo almidón al 1 % p/v y para CY fue de 0.001, entre los medios CY y CP con almidón al 0.25 % p/v fue de 0.011 y entre los medios CP y caldo almidón fue de 0.785.

(caldo almidón al 1% p/v) a partir de la hora 12, podrían deberse a la presencia de glucosa en el medio por una rápida degradación del almidón. Un aumento súbito en la producción de azúcares reductores durante el proceso afecta el funcionamiento de las amilasas disminuyendo la degradación del sustrato [25]. Los resultados evidencian que los medios preparados con residuos de CP limitan la disponibilidad de almidón y ralentizan su hidrólisis pero regulan la producción de glucosa en el medio, con una producción gradual de azúcares que no afectaría sustancialmente la producción de enzimas ni su actividad.

Aunque los resultados de la determinación cualitativa del almidón durante las fermentaciones muestran que la hidrólisis total del polímero se realizó entre las horas 48 a 60, la producción de amilasas continuó hasta las 84 h. Lo anterior sugiere que las concentraciones de almidón en los medios CP y CY se encontraron por encima de 0.1 % p/v hasta el final de las fermentaciones, puesto que hay evidencias de que a concentraciones menores de 0.1 % p/v de almidón no hay cambios apreciables en las actividades enzimáticas [26]. En consecuencia, la sensibilidad del método de lugol usado para la detección cualitativa de almidón no permitió identificar su presencia a concentraciones cercanas al 0.1 % p/v, lo que posiblemente sucedió durante las 60 y 84 h del cultivo. Por lo que probablemente *B. amyloliquefaciens* A16 tenga la capacidad de continuar sintetizando amilasas en ausencia o en concentraciones no detectables de almidón.

Las actividades amilolíticas producidas en los extractos enzimáticos de los medios CP y CY son comparables con otros estudios en los que se utilizaron

25. El-Fallal A, Abou M, El-Sayed A, Omar N. Starch and microbial α -amylases: From concepts to biotechnological applications. In: Chang-Fa C, editors. Carbohydrates - Comprehensive studies on glycobiology and glycotecnology. IntechOpen; 2012. p. 459-88.

26. Smerilli M, Neureiter M, Wurz S, Haas C, Frühauf S, Fuchs W. Direct fermentation of potato starch and potato residues to lactic acid by *Geobacillus stearothermophilus* under non-sterile conditions. J Chem Technol BIOT. 2015;90:648-57.

residuos orgánicos con contenidos similares de almidón para la producción de amilasas con una cepa de *B. subtilis* [9, 27]. Las actividades amilolíticas producidas en los medios CP y CY por *B. amyloliquefaciens* (A16) luego de 84 horas de fermentación fueron entre 5 a 13 veces superiores a las reportadas por Unakal *et al.* [9], en donde la mayor actividad enzimática registrada fue a la hora 24 (7.26 U/mL) de fermentación en un medio preparado con cáscaras de banano a pH 7.0 e inoculado con una cepa de *B. subtilis*, incubada a 35 °C. Las actividades de amilasas en las primeras 12 h de análisis producidas en los medios CP y CY (8.91 ± 0.33 y 11.25 ± 0.03 U/mL) son superiores a las reportadas por Jadhav *et al.* [27], quienes al evaluar una cepa de *B. subtilis* en un caldo preparado con un extracto al 50 % de cáscaras de banano en 24 h de ensayo a 37 °C obtuvieron 0.65 U/mL al aumentar la fuente de nitrógeno con peptona. Las actividades enzimáticas de amilasas obtenidas por diferentes especies del género *Bacillus* a partir de residuos de cáscaras de yuca realizada por Ayantade *et al.* [28], así como las actividades de amilasas producidas en caldo almidón al 1% p/v durante 4 a 6 días a 37 °C por *B. cereus* (51.7 U/mL), *B. pumilus* (44.6 U/mL) a pH 6.5 y por *B. subtilis* (56.1 U/mL) a pH 7.0 en el mismo estudio, son comparables a las obtenidas por *B. amyloliquefaciens* (A16) en los medios CP y caldo almidón luego de 48 h de cultivo (57.69 ± 0.22 y 63.22 U/mL). Esto evidenció que *B. amyloliquefaciens* (A16) produce amilasas con mayores actividades en menores tiempos de fermentación, tanto en medios estándar preparados con almidón soluble como en medios a partir de residuos agroindustriales en los que se obtienen amilasas con mayor actividad enzimática, tal como se evidencia en el medio realizado con CP.

Al contrastar las actividades enzimáticas de la cepa A16 con las producidas por aislamientos fúngicos en los que se usaron sustratos elaborados a partir de estos residuos, se evidenció que se obtienen mayores actividades de amilasas por *B. amyloliquefaciens* (A16) durante los primeros 3 días de fermentación (80.11 ± 0.3 y 40.25 ± 0.16 U/mL) en los medios CP y CY analizados. Incluso superiores a las informadas por Adeniran *et al.* [29] al evaluar la producción de amilasas en medios de cultivo sumergidos y sólidos con cáscaras de plátano y yuca a 29 °C por 6 días, en donde las mayores actividades amilolíticas para *A. niger* y *A. flavus* fueron de 33.2 ± 0.30 y 30.0 ± 0.20 U/mL respectivamente. Los aislamientos fúngicos *A. niger* y *A. flavus* obtenidos por Ayantade *et al.* [28] a partir de residuos de cáscaras de yuca y cultivados en caldo almidón al 1% durante 4 a 6 días a 37 °C a pH 6.0, produjeron actividades (53.5 U/mL y 65.4 U/mL) comparables con las producidas por *B. amyloliquefaciens* (A16) durante los primeros 3 días de fermentación en los medios CP y caldo almidón (80.11 ± 0.3 y 40.25 ± 0.16 U/mL).

Así se demostró que, el aislamiento *B. amyloli-*

quefaciens (A16) produce similares actividades amilolíticas en menores tiempos de ensayo comparadas con las producidas por aislamientos fúngicos, tanto en medios control a partir de almidón soluble como en medios con residuos agroindustriales donde se demuestra haber mayor producción de enzimas luego de 84 h de fermentación.

El presente estudio estuvo dirigido a evaluar la producción de amilasas por *B. amyloliquefaciens* A16 a partir de residuos agroindustriales de CP y CY para aprovechar su contenido de almidón. Los resultados obtenidos indican que el microorganismo utilizado es capaz de producir amilasas de 97 ± 0.36 y 41 ± 0.05 U/mL a partir de medios con CP y CY después de 84 horas de fermentación a pH 7.0. Además, se muestran mayores actividades de amilasas en el medio CP a partir de la hora 60 (71.53 ± 0.2 U/mL) respecto al medio estándar - caldo almidón (65.38 U/mL). Esto evidenció que no existen diferencias significativas entre la producción de amilasas en estos dos medios. Por tales razones, se pueden utilizar residuos de CP como sustrato para producir amilasas que requieran ser aplicadas en procesos que empleen pH 7.0, siendo este una fuente de almidón de fácil acceso y bajo costo para la consecución de este objetivo. Se deben realizar estudios posteriores para la reformulación de los medios a partir de CP y CY con el ajuste de variables como pH, contenido de nitrógeno o sales con el fin de aumentar la actividad de las amilasas.

Conclusiones

Los residuos de cáscaras de plátano y yuca son sustratos viables para realizar fermentaciones sumergidas para la producción de amilasas a partir de la cepa nativa *B. amyloliquefaciens* A16, siendo estos residuos fuentes accesibles de almidón en las que no es necesario un tratamiento adicional para su aprovechamiento. Además, en medios de cultivo preparados con CP se obtienen actividades enzimáticas superiores a las producidas en el medio estándar a partir de almidón soluble a las mismas concentraciones de sustrato (0.25 % p/v), lo que contribuiría en la reducción de los costos del proceso y la disminución de los tiempos de producción.

Agradecimientos

A SENNOVA y especialmente al Centro de Gestión Industrial CGI – SENA en donde se llevó a cabo este estudio: aprendices, técnicos de laboratorio e instructores.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran la ausencia de conflictos de interés.

27. Jadhav S, Kataria A, Bhise K, Chougule S. Amylase production from potato and banana peel waste. *Int J Mic Appl S.* 2013;2:410-14.

28. Ayantade V, Ademola O. Characterization of amylase from some *Aspergillus* and *Bacillus* species associated with Cassava waste peels. *Adv Microb.* 2017;7:280-92.

29. Adeniran H, Abiose S, Ogunsua A. Production of fungal β -amylase and amyloglucosidase on some Nigerian agricultural residues. *Food Bioprocess Tech.* 2010;3:693-98.

Recibido en junio, 2020.

Aprobado en Septiembre, 2020.