

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Escuela Profesional de Biología - Microbiología**

**“DESPRENDIMIENTO DE TINTA DEL PAPEL DE OFICINA PARA  
SU RECICLADO POR UN EXTRACTO ENZIMÁTICO  
AMILOLÍTICO TERMOESTABLE DE *Geobacillus  
thermoparaffinovorans* (CB-13)”**

**TESIS**

Presentada por:

**Bach. Delsy Mirian Espinal Quiñonez**

Para optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO-MICROBIÓLOGO**

TACNA - PERÚ

2019

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS N° 321

En la ciudad de Tacna, en el auditorium de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; siendo las 16:00 horas del día 20 de diciembre del 2018, estando presente el jurado calificador nominado por Resolución de Facultad N° 9234 – 2018 – FACI/UNJBG, conformado por los siguientes docentes:

Dr. DALADIER MIGUEL CASTILLO COTRINA PRESIDENTE

Msc. SOLEDAD AMPARO BORNÁS ACOSTA SECRETARIA


Dr. CESAR AUGUSTO CEVALLOS COLUMBUS MIEMBRO


Acto seguido, se dio lectura a la Resolución correspondiente y del mismo modo se dio lectura al Artículo 22 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

A continuación, el Presidente del Jurado instó a la Bachiller: DELSY MIRIAN ESPINAL QUIÑONEZ, a exponer la tesis titula: "DESPRENDIMIENTO DE TINTA DEL PAPEL DE OFICINA PARA SU RECICLADO POR UN EXTRACTO ENZIMÁTICO AMILOLÍTICO TERMOESTABLE DE *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13)"

Siendo las 17:00 horas, la tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador. Terminado este proceso, se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo a reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado: Aprobado por unanimidad, con el calificativo de 15 (Bueno), de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

Siendo las 17:20 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.

  
Dr. DALADIER MIGUEL CASTILLO COTRINA  
PRESIDENTE

  
Msc. SOLEDAD AMPARO BORNÁS ACOSTA  
SECRETARIA

  
Dr. CESAR AUGUSTO CEVALLOS COLUMBUS  
MIEMBRO



## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo principalmente a Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida.*

*A mis padres, que con su apoyo y consejos me han enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar. A mis hermanos por su apoyo incondicional.*

*A mis profesores por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mis padres por haberme apoyado a culminar mi carrera profesional. Asimismo expresar mi más sincero agradecimiento al M. Sc. Roberto Castellanos Cabrera, por su importante aporte y sus consejos durante el proceso de investigación.

Al proyecto Fondecyt Convenio 099-2015 "Tratamiento Biotecnológico con enzimas termoestables bacterianas para el destintado de papel periódico y de oficina en su proceso de reciclado", realizado en nuestra institución y liderado por M. Sc. Roberto Castellanos Cabrera.

Al Laboratorio de Biotecnología Enzimática y los biólogos que lo integran, Ariadna Zúñiga Llanos, Julissa Naquiche Calero, Israel Salazar Quispe, Mirella Yllanes Huanacuni, Héber Ramírez Arua quienes siempre estuvieron dispuestos a colaborar y aportar con sus conocimientos.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	2
1.2 Hipótesis.....	3
1.3 Justificación.....	3
1.4 Objetivos .....	5
1.4.1 Objetivo general.....	5
1.4.2 Objetivos específicos .....	5
1.5 Marco teórico.....	6
1.5.1 Amilasas .....	6
1.5.2 Amilasas bacterianas.....	9
1.5.3 Almidón como sustrato .....	13
1.5.4 Enzimas termoestables.....	17
1.5.5 Tratamiento del papel a reciclar.....	18

1.5.6	Aditivos en la fabricación del papel.....	21
1.5.7	Aplicaciones de las amilasas en el destintado.....	22
II.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1	Materiales.....	24
2.2	Método .....	26
2.2.1	Ubicación y delimitación del área de estudio.....	26
2.2.2	Diseño de investigación.....	27
2.2.3	Obtención de <i>Geobacillus thermoparaffinovorans</i> (CB13) ..	28
2.2.4	Determinación del tiempo de producción del extracto enzimático amilolítico termoestable de <i>Geobacillus thermoparaffinovorans</i> (CB-13) .....	29
2.2.5	Caracterización del extracto enzimático amilolítico termoestable de <i>Geobacillus thermoparaffinovorans</i> (CB13) .....	34
2.2.6	Determinación de los parámetros de desprendimiento de tinta con extracto amilolítico termoestable .....	35

III. RESULTADOS .....	41
IV. DISCUSIÓN.....	61
V. CONCLUSIONES.....	67
VI. RECOMENDACIONES .....	68
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69
VIII. ANEXO .....	79

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de amilasas .....	8
<b>Tabla 2.</b> Propiedades y origen de $\alpha$ y $\beta$ amilasas.....	9
<b>Tabla 3.</b> Características bioquímicas de <i>Bacillus sp</i> termófilo.....	13
<b>Tabla 4.</b> Enzimas empleadas en la hidrolisis de almidón. ....	17
<b>Tabla 5.</b> Termoestabilidad de la $\alpha$ -amilasa producida por bacterias termófilas.....	18
<b>Tabla 6.</b> Procedimiento para medir la actividad de amilasas.....	33
<b>Tabla 7.</b> Procedimiento para medir los azúcares reductores.....	40
<b>Tabla 8.</b> Análisis de varianza de la actividad enzimática (U/ml) por tiempos en horas.....	42
<b>Tabla 9.</b> Prueba de Tukey actividad enzimática frente a diferentes tiempos .....	43
<b>Tabla 10.</b> Análisis de varianza para concentración de proteínas totales por tiempos .....	45

<b>Tabla 11.</b> Prueba de Tukey concentración de proteínas totales frente a diferentes tiempos.....	46
<b>Tabla 12.</b> Análisis de varianza para la actividad enzimática por temperatura.....	48
<b>Tabla 13.</b> Prueba de Tukey para actividad enzimática por temperatura..	49
<b>Tabla 14.</b> Análisis de varianza para actividad enzimática a diferentes pH. .....	50
<b>Tabla 15.</b> Prueba de Tukey para actividad a diferentes pH.....	51
<b>Tabla 16</b> Absorbancias de longitud de onda y diluciones de tinta diferentes .....	55
<b>Tabla 17.</b> Condiciones para el desprendimiento de tinta.....	56
<b>Tabla 18.</b> Análisis de varianza para tinta residual .....	56
<b>Tabla 19.</b> Prueba de Tukey para la comparación de dosis de enzima frente al desprendimiento de tinta.....	57
<b>Tabla 20.</b> Prueba de Tukey para la comparación del tiempo frente al desprendimiento de tinta.....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Hidrolisis del almidón con la amilasa. ....	6
<b>Figura 2.</b> Estructura del almidón .....	14
<b>Figura 3.</b> Estructura de la amilosa.....	15
<b>Figura 4.</b> Ramificación $\alpha$ 1-6 amilopectina. ....	16
<b>Figura 5.</b> Actividad enzimática a diferentes tiempos de producción.....	44
<b>Figura 6.</b> Determinación de proteínas totales por tiempos de la cepa <i>Geobacillus thermoparaffinovorans</i> (CB-13). ....	47
<b>Figura 7.</b> Curva del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. ....	50
<b>Figura 8.</b> Curva del efecto del pH sobre la actividad enzimatica.....	52
<b>Figura 9.</b> Curva de actividad enzimática sobre diferentes concentraciones de sustrato. ....	53
<b>Figura 10.</b> Curva de actividad enzimática por dosis de enzima .....	54
<b>Figura 11.</b> Concentración de tinta residual por dosis de enzima.....	58

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>ANEXO 1.</b> Fotografía de la formación del halo alrededor de la colonia de <i>Geobacillus thermoparaffinovorans</i> (CB-13). .....	79
<b>ANEXO 2.</b> Fotografía de la producción de la enzima a partir de <i>Geobacillus thermoparaffinovorans</i> (CB-13) en medio líquido. ....	79
<b>ANEXO 3.</b> Esquema del proceso de producción .....	80
<b>ANEXO 4.</b> Curva de calibración de la concentración de azúcares reductores.....	81
<b>ANEXO 5.</b> Curva de calibración de la concentración de proteínas.....	82
<b>ANEXO 6.</b> Curva de calibración de la tinta. ....	83
<b>ANEXO 7.</b> Esquema del desprendimiento de tinta. ....	84
<b>ANEXO 8.</b> Fotografía de lectura de las absorbancias de tinta residual ...	85
<b>ANEXO 9.</b> Curva de calibración de la concentración de azúcares reductores para el desprendimiento de tinta .....	85
<b>ANEXO 10.</b> Datos del tiempo de mayor producción enzimática.....	86

<b>ANEXO 11.</b> Datos del tiempo de mayor concentración de proteínas .....	87
<b>ANEXO 12.</b> Datos del efecto de la temperatura en la actividad enzimática .....	87
<b>ANEXO 13.</b> Datos del efecto del pH en la actividad enzimática. ....	88
<b>ANEXO 14.</b> Datos del sustrato papel sobre la actividad enzimática.....	88
<b>ANEXO 15.</b> Datos dosis del extracto enzimático sobre la actividad enzimática.....	89
<b>ANEXO 16.</b> Barrido espectral de tinta a absorbancias de 260 a 400 cada 20 nm.....	90
<b>ANEXO 17.</b> Datos del desprendimiento enzimático.....	91
<b>ANEXO 18.</b> Datos de la concentración de azúcares reductores del desprendimiento de tinta.....	92
<b>ANEXO 19.</b> Fotografía de la pulpa para destintar.....	92
<b>ANEXO 20.</b> Fotografía de la pulpa tratada con el extracto crudo enzimático amilolítico.....	93

**ANEXO 21.** Fotografía de la medición de curvas de calibración con lector de placa ..... 94

**ANEXO 22.** Fotografía del espectrofotómetro para medir las absorbancias de actividad enzimática..... 94

## RESUMEN

En este trabajo se evaluó las características del extracto enzimático amilolítico termoestable de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) aislada de los géiseres de Calientes-Candarave, con la finalidad de obtener una enzima que tenga potencial industrial.

Se logró el desprendimiento de tinta del papel de oficina bajo las condiciones óptimas de la enzima, temperatura 70 °C, pH 6,0 en una concentración de papel al 1 %, considerando como variable respuesta tinta residual y azúcares reductores, obteniendo resultados óptimos en el desprendimiento en tiempo de 40 minutos y con una dosis del 20 % con 0,301 de tinta residual en mg/mL del extracto crudo enzimático, los cuales pueden servir como base para mejorar tratamiento del papel de reciclaje.

## **ABSTRACT**

In this work, the characteristics of the thermostable amyolytic enzyme extract of *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) isolated from the geysers of Calientes-Candarave were evaluated in order to obtain an enzyme with industrial potential.

The release of ink from the office paper was achieved under the optimal conditions of the enzyme, temperature 70 ° C, pH 6.0 at a concentration of 1% paper, considering residual ink and reducing sugars as variable response, obtaining optimal results in the detachment in time of 40 minutes and with a dose of 20% with 0.301 residual ink in mg / mL of the crude enzymatic extract, which can serve as a basis for improving the treatment of recycling paper.

## I. INTRODUCCIÓN

La fabricación de papel es una industria importante y en continuo crecimiento, por lo que se genera grandes cantidades de papel de desecho, siendo de gran importancia el reciclaje del papel, debido al interés social, económico y ambiental.

El sistema convencional para el reciclaje de papel de desecho impreso utiliza productos químicos métodos incluyen hidróxido de sodio, silicato de sodio, peróxido de hidrógeno, agentes quelantes, agentes blanqueadores y surfactantes. Métodos que generan contaminantes tóxicos (Bobu y Ciolacu, 2008). Por lo que en el presente trabajo de investigación se aplicó la enzima amilolítica termoestable de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) como alternativa en el desprendimiento de tinta del papel de oficina para su reciclado.

## 1.1 Planteamiento del problema

Actualmente en el proceso de fabricación del papel se ha tomado importancia al reciclaje de sus componentes, sin embargo el principal problema de este proceso convencional, es el uso de metodologías químicas en su totalidad, generando así problemas medioambientales con efluentes tóxicos; para lo cual se necesitan tecnologías que puedan moderar estos impactos negativos.

Presentándose como una de estas alternativas el uso de enzimas como parte en el pretratamiento, para la remoción de tintas en el papel y siendo las amilasas una de las implicadas en este proceso se plantea la siguiente pregunta:

¿El extracto enzimático amilolítico termoestable de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) es capaz de desprender la tinta del papel de oficina para su reciclado?

## **1.2 Hipótesis**

De acuerdo al problema planteado, se presentó a continuación la siguiente hipótesis:

El extracto enzimático amilolítico termoestable de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) es capaz de desprender tinta del papel de oficina en su reciclado.

## **1.3 Justificación**

Debido a las innumerables aplicaciones del papel su demanda aumentó de manera progresiva, pero su producción trae consigo un gran impacto ambiental, generando el papel desperdicio, lo que hace necesario la búsqueda de técnicas e innovaciones que reduzcan de manera significativa estos problemas para el ambiente (Ramírez, 2013).

El papel desperdicio constituye el residuo aprovechable de mayor volumen y peso contenido en los residuos sólidos urbanos. Su aprovechamiento como materia prima para la fabricación de papel presenta numerosas ventajas ambientales, económicas y sociales (Zhao, 2004).

Actualmente el destintado de papel desperdicio de oficina, se lleva a través de una combinación de procesos físicos y químicos tales como dispersantes y coagulantes, y en menor grado acción física, lo cual contribuye a mayor contaminación del medio ambiente (Ramírez, 2013).

Cuando estos papeles son tratados químicamente, las partículas de tóner suelen tener una separación muy pobre de las fibras ya que son rígidas, planas y de gran tamaños, esto dificulta su eliminación en el proceso (Carré et al., 2000).

Los tratamientos enzimáticos pueden ser utilizados en el destintado de papel reciclado del tipo oficina ya que este tipo de papel se encuentra limitado para su aprovechamiento por el alto contenido de tintas de tóner (Viesturs et al., 1999).

La aplicación de estos métodos enzimáticos permitiría reducir el consumo de químicos para el proceso de destintado y contribuir al desarrollo de una tecnología más amigable con el ambiente.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Desprender la tinta del papel de oficina con el extracto enzimático amilolítico termoestable de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13).

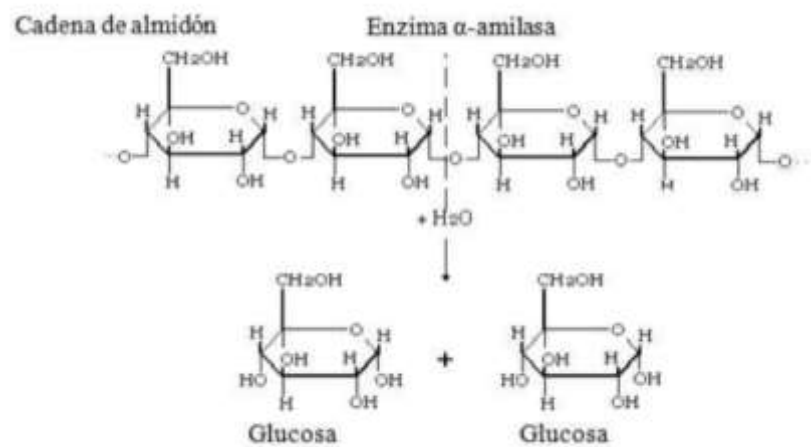
### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Evaluar el tiempo de producción de la enzima en el extracto enzimático amilolítico termoestable de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13).
- Caracterizar el extracto enzimático amilolítico termoestable de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13)
- Determinar los parámetros del desprendimiento de tinta por el extracto amilolítico termoestable de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13).

## 1.5 Marco Teórico

### 1.5.1 Amilasas

Las amilasas son enzimas que hidrolizan las moléculas de almidón para dar productos que incluyen las dextrinas y progresivamente más pequeños polímeros compuestos por unidades de glucosa (Windish y Mhatre, 1965).



**Figura 1.** Hidrólisis del almidón con la amilasa (Windish y Mhatre, 1965).

Estas enzimas son de gran importancia hoy en día en la biotecnología con aplicaciones en las industrias de comida, fermentación, textil y papelera (Gupta et al., 2003).

Las amilasas derivan de varias fuentes, incluyendo plantas, animales y microorganismos, estas enzimas microbianas en general cumplen con las demandas industriales. Hoy un gran número de amilasas microbianas son una variable comercialmente y han sustituido casi por completo hidrólisis química del almidón en la industria de procesamiento de almidón (Pandey et al., 2000).

Las amilasas son clasificadas bajo el número EC (IUBMB nomenclatura enzimática), esta clasificación se basa en las propiedades catalíticas de las enzimas (Tabla 1), tales como las especificidades de sustrato y producto. Estas enzimas se dividen en tres clases de EC: Transferasas (EC 2), Hidrolasas (EC3) e Isomerasas (EC 5), la mayoría de las enzimas corresponden a la clase EC 3 (Schaechter, 2009).

**Tabla 1.**

## Clasificación de amilasas

Nombre de la enzima	EC número	GH familia	GH 13 subfamilia	Mecanismo
$\alpha$ - Amilasa	3.2.1.1	13	1,(2),5,7,(19),27,28,32	Retención
$\beta$ -Amilasa	3.2.1.2	14		Inversión
Glucoamilasa	3.2.1.3	15		Inversión
Oligo-1,6- glucosidasa	3.2.1.10	13	31	Retención
$\alpha$ -Glucosidasa	3.2.1.20	13	21,29	Retención
Amilo-1,6- glucosidasa	3.2.1.33	13	25	Retención
Pullanasa	3.2.1.41	13	12,13,14	Retención
Ciclomaltodextrinasa	3.2.1.54	13	(20)	Retención
Glucan-1,4- $\alpha$ maltotetrahidrolasa	3.2.1.60	13	NC	Retención
Isoamilasa	3.2.1.68	13	11	Retención
Glucan-1,4- $\alpha$ - maltohexahidrolasa	3.2.1.98	13	(19).	Retención
Glucan-1,4- $\alpha$ - maltotrihidrolasa	3.2.1.116	NC	NC	Retención
Glucan-1,4- $\alpha$ - maltohidrolasa	3.2.1.133	13	(20).	Retención
Neopululanasa	3.2.1.135	13	(20).	Retención
4- $\alpha$ -D- Glucanotrialosa tetrahidrolasa	3.2.1.141	13	10	Retención
Enzimas ramificadoras	2.4.1.18	13	9	Retención
Ciclomaltodextrin glucanotransferasa	2.4.1.19	13	2	Retención
4- $\alpha$ - Glucanotransferasa	2.4.1.25	77		Retención
4- $\alpha$ -glucan 1- $\alpha$ -D- glucosilmutasa	5.4.99.15	13	26	Retención

Fuente: Schaechter, (2009): EC- Clasificación de la enzima; GH Familia de amilasas clasificados según el número de glicósidos de la hidrolasa; NC no clasificado.

### 1.5.2 Amilasas bacterianas

La  $\alpha$ -amilasa puede ser producida por diferentes especies de microorganismos, pero para aplicaciones comerciales la  $\alpha$ -amilasa se deriva principalmente de género *Bacillus* producidas a partir de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus amyloliquefaciens* son conocidos por ser buenos productores de la enzima amilasa y estos se han usado ampliamente para la producción comercial para diversas aplicaciones industriales tales como en alimentos, la fermentación, los textiles y de papel (Konsula y Kyriakides, 2007; Prakash y Jaiswal, 2009).

**Tabla 2.**

Propiedades y origen de  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas

Especies	No. de formas	pH óptimo	Temperatura (°C) óptima
<b>Bacterial <math>\alpha</math>-amylase</b>			
<i>Alicyclobacillus acidoaldarius</i>	1	3	75
<i>Alteromonas haloplanctis</i>	1	-	-
<i>Bacillus sp.</i>	3	5,5	90
<i>Bacillus sp.</i>	1	11,0-12,0	60
<i>Bacillus sp.</i>	2	9	70
<i>B. flavothermus</i>	1	5,5-6,0	60
<i>B. licheniformis</i>	1	6,0-6,5	90

<b>Especies</b>	<b>No. de formas</b>	<b>pH óptimo</b>	<b>Temperatura (°C) óptima</b>
<i>B. lichiniiformis</i> "	1	6,0-8,0	50
<i>B. lentus</i>	1	6,1	70
<i>B. megaterium</i>	1	-	-
<i>B. subtilis</i>	1	5,6	80
<i>B. subtilis</i>	1	5,4-6,4	50
<i>B. subtilis</i> "	1	6,5	50
<i>Bifidobacterium adolescentes</i>	1	5,5	50
<i>Chlorofexus aurantiacus</i>	1	7,5	71
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1	5,6	45
<i>C. perfringenes</i>	1	6,5	30
<i>Cytophaga sp.</i>	1	4,5-6,5	50-60
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	1	5,5	60-65
<i>L. brevis</i>	1	6,5	55
<i>L. plantarum</i>	3	5,5	65
<i>Micrococcus luteus</i>	1	6	30
<i>M. varians</i>	3	7	45
<i>Myxococcus coralloides</i>	1	8	45
<i>Pyrococcus furiosus</i>	1	-	100
<i>P. woesei</i>	1	-	130"
<i>Streptococcus bovis</i>	1	5,0-6,0	50
<i>Thermococcus profundus</i>	1	5,5-6,0	80
<i>Thermos sp.</i>	1	5,5-6,5	70
<i>T. filiformis</i>	1	5,5-6,0	95

<b>Especies</b>	<b>No. de formas</b>	<b>pH óptimo</b>	<b>Temperatura (°C) óptima</b>
<b>Fungal and yeast <math>\alpha</math> amylase</b>			
<i>Aspergillus sp.</i>	1	5,5	40
<i>A. flavus</i>	1	6	55
<i>A. flavus</i>	1	7	30
<i>A. fumigatus</i>	1	5,5	40
<i>A. oryzae</i>	1	5,25	44
<i>A. oryzae</i>	1	0,4-0,5	50
<i>Cryptococcus sp.</i>	1	-	-
<i>Filobastidium capsugenum</i>	1	5,6	45
<i>Lipomyces kononenkoeae</i>	1	4,5-5,0	70
<i>Nocardia asteroides</i>	2	6,9	50
<i>Rhizopus sp.</i>	2	4,0-5,6	60-65
<i>Scytalidium sp.</i>	1	6,5	50
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	1	4,8-6,0	62,5
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1	4,6-5,2	60
<i>Thermotoga marítima</i> "	1	7	85-90
<b><math>\beta</math>- amylase</b>			
<i>Bacillus circulans</i>	1	7	50
<i>B. polymyxa</i>	1	5,5	45
<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	1	6	70
<i>Hendersonula toruloidea</i>	1	6	60
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1	5	60

Fuente: Pandey et al., 2000

El género *Bacillus* fue descrito por primera vez por en 1872 a partir de un aislado obtenido de materia orgánica del suelo. Estas bacterias se caracterizan por tener una forma alargada, que simula un bastón, y suelen ser móviles con flagelos peritricos. Más del 90 % de las especies de este género son catalasa positivo, formadoras de endosporas durante la fase estacionaria, móviles y gram positivo en cultivos frescos (Donohue y Bernlohr, 1978).

Manoj (2013) estudió las características de crecimiento de un *Bacillus sp* termófilo, el aislado se caracterizó por la técnica de tinción de gram con lo que descubrió que la cepa era gram positiva y la observación microscópica reveló una bacteria con forma de barra dispuesta en cadena. Varias pruebas bioquímicas como la formación de endosporas, motilidad, anaeróbica; realizó pruebas de catalasa y oxidasa. La observación morfológica, microscópica y la prueba bioquímica indicaron que la bacteria era *Bacillus sp* (Tabla 3).

**Tabla 3**Características bioquímicas de bacteria termofila *Bacillus* sp.

Características	observación
Forma de varilla en cultivos jóvenes	+
Filamentos	-
Varillas o filamentos curvados	-
Cocos en tétradas o paquetes	-
Endosporas producidas	+
Móvil	+
Gram positivo al menos en cultivos jóvenes	+
Aerobios estrictos	ND
Anaerobios facultativos o microaerófilos	ND
Anaerobios estrictos	-
Producto de fermentación de carbohidratos	ND
Sulfato activamente reducido a sulfuro	-
Catalasa	+
Oxidasa	ND
Acidez marcada de glucosa	+
Nitrato reducido a nitrito	ND
Requiere 3-12% de NaCl para crecimiento	ND
Capacidad de crecer a > 700 C	+

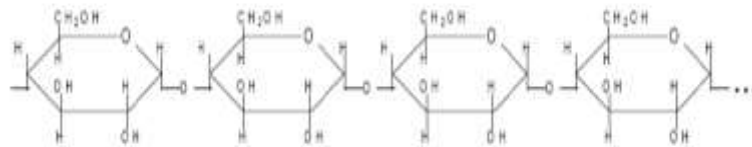
+ indica positivo y – indica prueba negativa ; ND no determinado

Fuente: Kumar, 2013

### 1.5.3 Almidón como sustrato

El almidón es un polisacárido que se encuentra distribuido en los órganos de vegetales, como carbohidrato de reserva. Se obtiene principalmente a partir de maíz, trigo, arroz, palmera de sago y en los tubérculos como papas, camote, yuca, etc (Belitz y Grosch 1988).

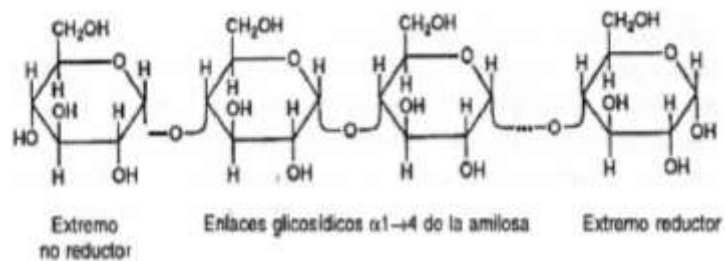
Respecto a su composición química, el almidón es un polímero de glucosa anhidra, constituido por unidades D-glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) unidas por enlaces alfa- glucosídicos formando dos tipos de polímeros: la  $\alpha$ -amilosa y la amilopectina según la figura 2 (Carrascal, 2005).



**Figura 2.** Estructura del almidón (Belitz y Grosch, 1988)

La amilosa es un polímero lineal formado de unidades D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha$  (1-4)(figura 3). Debido a su carácter prácticamente lineal y a la presencia de los enlaces  $\alpha$  (1-4) es susceptible de complejar moléculas hidrófobas (yodo, ácidos grasos, cadenas hidrocarbonadas); tiene una capacidad de fijación de yodo del orden de 20 mg por 100 mg de amilosa (Cluskey et al., 1980), esta propiedad se debe a la conformación en hélice de esta macromolécula, en la cual todos los grupos hidrófilos están orientados hacia el exterior y los grupos hidrófobos están hacia el interior. Esta

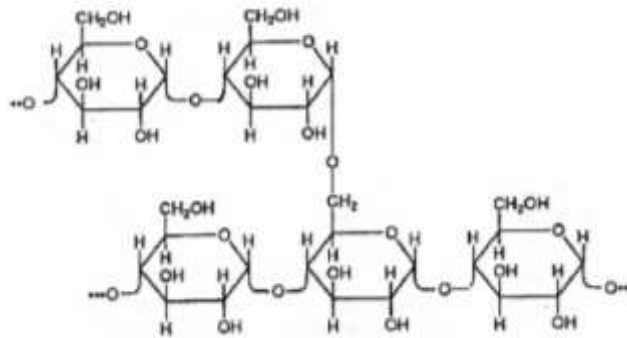
capacidad de fijación del yodo es la base para la cuantificación analítica del almidón (Fuwa, 1954).



**Figura 3.** Estructura de la amilosa (Belitz y Grosch, 1988)

La amilopectina es el polímero mayoritario del almidón, ya que supone el 70 y 80 % en peso. Se trata de una macromolécula ramificada en la que las unidades de glucosa anhidra (D-glucosa) están principalmente unidas por enlaces  $\alpha$  (1-4) cuando forman parte de cadenas lineales y por enlaces  $\alpha$  (1-6) cuando actúan como unión entre dos cadenas para formar ramificaciones (figura 4).

El grado de polimerización es aproximadamente de  $10^6$  unidades de glucosa (Belitz y Grosch, 1988).



**Figura 4.** Ramificación  $\alpha$ 1-6 amilopectina (Robin, 1981)

### 1.5.3.1 Degradación del almidón

Las responsables en la degradación del almidón son amilasas como catalizadores. Las enzimas se pueden encontrar en la saliva, los jugos pancreáticos, las células de la sangre, las semillas y granos de muchas plantas, en hongos y bacterias. (Carrascal, 2005).

Durante la hidrólisis enzimática del almidón se usan diferentes enzimas que rompen los enlaces  $\alpha$  (1-4) y  $\alpha$  (1-6) presentes en el almidón para liberar cadenas más cortas como dextrinas, maltosa y glucosa. Las enzimas actúan específicamente en un

tipo de enlace o algunos casos en ambos enlaces  
(Tabla 4) (Mercier, 1982)

**Tabla 4**  
Enzimas empleadas en la hidrolisis de almidón.

Enzima	Tipo de enlace	Tipo de ataque	Productos Terminales	
			Amilosa	Amilopectina
$\alpha$ -amilasa E.C.3.2.1.1	$\alpha(1-4)$	Endo	Glucosa Maltosa	Dextrinas
$\beta$ -amilasa E.C.3.2.1.2	$\alpha(1-4)$	Exo	Glucosa Maltosa	Maltosa Dextrinas
Pululanasa E.C.3.2.1.4.1	$\alpha(1-6)$	Endo	Ninguno	Dextrinas
Isoamilasa E.C.3.2.1.60	$\alpha(1-6)$	Endo	Ninguno	Dextrinas
Amiloglucosidasa E.C.3.2.1.3	$\alpha(1-4)$ $\alpha(1-6)$	Exo	Glucosa	Glucosa

Fuente: Mercier, 1982.

#### 1.5.4 Enzimas termoestables

La termoestabilidad es una característica deseada de la mayoría de las enzimas industriales. Estas enzimas termoestables aisladas de organismos termófilos tienen un número de aplicaciones comerciales a causa de su estabilidad, como la licuefacción enzimática y sacarificación del almidón las cuales se llevan a cabo a altas temperaturas.

Las enzimas amilolíticas termoestables se han investigado actualmente para mejorar los procesos industriales de la degradación del almidón (Gomes et al., 2003; Stamford et al., 2001).

**Tabla 5**

Termoestabilidad de la  $\alpha$ -amilasa producida por bacterias termófilas.

Aislado termófilo	Termoestabilidad de la $\alpha$ amilasa a 60 °C			
	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas
<i>A. ruiensis</i>	43,33	39,33	36,33	32,33
<i>G. kaustophilus</i>	42,11	37,13	34,32	32,11
<i>G. vulcani</i>	45,54	44,32	40,00	38,54
<i>G. thermoparaffinovorans</i>	42,24	39,12	36,04	33,14
<i>G. steaerothermophilus</i>	44,00	41,00	38,00	35,20
<i>G. thermoleovorans</i>	49,76	46,43	43,16	39,36
<i>G. thermolituanicus</i>	42,56	39,36	36,42	33,56
<i>Paenibacillus Gh 134</i>	40,21	37,11	34,31	32,20

Fuente: Gursahani, 2010.

### 1.5.5 Tratamiento del papel a reciclar

- a) Tratamiento químico:** Las sustancias químicas se emplean para aumentar la hidrofobicidad, controlar la selectividad, disminuir los porcentajes de pérdida de

fibra, aumentar la eficiencia de destintado y afectar la velocidad (cinética) de procesos de separación (García, 2001). Las principales sustancias químicas utilizadas en el destintado son el hidróxido de sodio (NaOH), se emplea en el proceso de destintado para ajustar el pH, también produce el hinchamiento de la fibra y modifica los compuestos ligantes de las tintas, lo cual ayuda a la liberación de la tinta de la superficie de las fibras, facilitando la penetración de las demás sustancias químicas, el peróxido de hidrógeno el que se utiliza como agente de blanqueo, agentes quelantes, silicato de sodio y surfactantes (Ferguson, 1992; Rosencrance, 2007). Estas sustancias químicas en conjunto en agitación mecánica, para descomponer las fibras de celulosa seca en la materia prima y humedecer las fibras de celulosa separadas de las tintas (Smith, 2002). La tinta papel impreso tratado químicamente suelen tener una separación muy pobre de las partículas de tóner de la fibra ya que son rígidas, planas y de gran tamaño, esto dificulta su eliminación en el proceso (Beneventi y Carré, 2000).

**b) Tratamiento enzimático:** La biotecnología tiende a cambiar el proceso industrial convencional existente, por aplicaciones enzimáticas. Las enzimas tienen un gran potencial para resolver muchos de los problemas asociados con el uso de fibra reciclada, especialmente en relación con el destintado, la capacidad de drenaje, cornificación, refinación, y sustancias pegajosas. El destintado enzimático es el proceso que se efectúa utilizando enzimas, las cuales pueden atacar el papel o en algunos casos las partículas de tinta dependiendo de su función (Pala et al, 2004). Estas enzimas incluyen las celulasas, hemicelulasas, pectinasas, amilasas, lipasas, esterases, y lacasas. Las lipasas y esterases pueden degradar tintas a base de aceite vegetal, las pectinasas , hemicelulasas , celulasas y enzimas ligninolíticas alteran la superficie de la fibra en las proximidades de las partículas de tinta , liberando de este modo la tinta para la eliminación por lavado o flotación (Bajpai y Bajpai, 1998 ). Básicamente, el destintado se puede dividir en dos grandes etapas: 1) El pulpeo o desintegración y 2) el

destintado y/o lavado (Beneventi y Carré, 2000). En el destintado como un pretratamiento enzimático se hace bajo la influencia de tres enzimas: celulasa, lipasa y una mezcla de celulasa y xilanasas, sobre las propiedades del papel periódico viejo (ONP), este pretratamiento se hace antes de la convencional técnica del destintado (Spiridon y Machado, 2005).

#### **1.5.6 Aditivos en la fabricación del papel**

Uno de los aditivos en la fabricación del papel es el almidón, este puede ser aplicado en húmedo/seco, el encolado interno para resistencia a la penetración de líquidos, como aditivo de resistencia por vía seca (aumenta la resistencia, reduce el polvo superficie) también mejora la retención de la fibra de la pasta (Turrado *et al.*, 2008).

El encolado superficial mejora las propiedades de impresión, manteniendo la tinta en la superficie y evitando que se extienda por la superficie del papel (Casey, 1981). Esta operación dificulta el mojado y, por tanto, la desintegración de esta clase de papeles. El material más común utilizado en las operaciones de encolado superficial es el almidón el cual se

adiciona también con emulsiones de cera y resinas especiales (Smook, 1990).

### **1.5.7 Aplicaciones de las amilasas en el destintado**

En la industria del papel se realiza preparaciones de almidones para recubrimientos, el almidón es un buen agente de encolado para el acabado de papel, mejora la calidad y estabilidad, además de ser un buen recubrimiento para el papel, mejora la rigidez y la resistencia en el papel (Bruinenberg et al., 1996). Es así que el papel a reciclar, en el proceso de destintado, el almidón estucado puede ser hidrolizado por enzimas amilolíticas (Magnin et al., 2002). El uso de  $\alpha$ -amilasas en la pulpa y papel, es para la modificación de almidón del papel dotado de recubrimiento, es decir, para la producción de baja viscosidad, almidón de alto peso molecular (Gupta et al., 2003).

Las amilasas mejoran el drenaje en procesos de reciclaje de la industria papelera. Asimismo, estas enzimas mejoran la eliminación de tintas en papel, el tratamiento previo del papel con amilasas provoca un debilitamiento de la estructura superficial del papel, y por tanto una disminución de

la resistencia del papel a la penetración de fluidos, este tratamiento enzimático facilita la desintegración del papel, obteniéndose una pasta en mejores condiciones para su tratamiento (López et al., 2000).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Material biológico

La cepa bacteriana *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) fue aislada de los géiseres de Calientes - Candarave que se encuentran a 4300 msnm y proporcionada por el Laboratorio de Investigación de Biotecnología Enzimática de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

#### 2.1.2 Reactivos

- Agar agar
- Almidón soluble
- Extracto de levadura
- Peptona
- Sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ )
- Cloruro de sodio ( $NaCl$ )
- Cloruro de calcio ( $CaCl_2$ )
- Ácido acético ( $CH_3COOH$ )
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico ( $C_7H_4N_2O_7$ )
- Acetato de sodio ( $C_2H_3NaO_2$ )

- Fosfato sódico di básico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )
- Caldo Luria Bertani (LB)
- Tartrato de sodio y potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .)
- Fenol ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ )
- Metabisulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )
- Sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ )
- Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ )
- Ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ )
- Fosfato monosódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
- Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- Cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ )
- Reactivo de Bradford

### 2.1.3 Equipos

- Esterilizador de aire seco GEMMY Modelo YCO-010
- Incubadora GEMMY Modelo IN – 010
- Espectrofotometro GREETMED, Modelo NV-203
- Autoclave GEMMY
- Microcentrifuga EPPENDORF- 5418

- Cocina eléctrica SURGE
- Balanza de precisión DAKOTA
- Micropipeta 5-50 µl DRAGON LAB
- Micropipeta 0,5-10 µl DRAGON LAB
- Micropipeta 100 µl BOECO Germany
- Micropipeta 100-1000 µl BOECO Germany
- Lector de microplacas Epoch 2
- Incubadora en agitación orbital Shaker mrc

## **2.2 Método**

### **2.2.1 Ubicación y delimitación del área de estudio**

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación de Biotecnología Enzimática de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, en el cual se encuentra la cepa bacteriana *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) aislada de los géiseres de Calientes-Candarave.

### **2.2.2 Diseño de investigación**

El tipo de investigación fue básica – experimental donde todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los diseños y análisis aplicados según el propósito se detallada a continuación:

Para la producción de enzima se utilizó un diseño completamente aleatorio (D. C. A.) con tres repeticiones, donde tuvo 5 tratamientos: 0, 12, 24, 36, 48 horas, y las variables respuestas fueron la concentración de proteínas y actividad enzimática.

Para la caracterización enzimática se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones, para el caso del efecto del pH tuvo 4 tratamiento: 5, 6, 7 y 8 y la variable respuesta fue las unidades de actividad enzimática (U/mL), en cuanto al efecto de la temperatura también tuvo 4 tratamientos: 50, 60 y 70, 80 °C, siendo la variable respuesta las unidades de actividad enzimática (U/mL).

Para la determinación de parámetros de desprendimiento se utilizó el análisis de varianza multifactorial donde:

- Número de factores: 2 (tiempo en minutos y dosis de enzima en %).
- Número de variable respuesta: 1 (tinta residual en mg/mL).

Se realizó 3 repeticiones por cada ensayo y para comparar efectos principales e interacción comparativa entre media se usará Tukey.

Los diseños fueron analizados con el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.

### **2.2.3 Obtención de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB13)**

*Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) fue donada por el Laboratorio de Biotecnología Enzimática de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. La cepa se obtuvo a partir de muestras de los géiseres de Calientes-Candarave que se encuentra a 4300 msnm, 70 12'15" de longitud oeste, 17 15'30" latitud Sur. La

identificación molecular y el análisis de las secuencias se hizo en MacroGen Inc de Corea del Sur.

*Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) fue replicada en un tubo de ensayo con tapa rosca con agar nutritivo, para la posterior utilización.

#### **2.2.4 Determinación del tiempo de producción del extracto enzimático amilolítico termoestable de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13)**

##### **2.2.4.1 Producción del extracto enzimático amilolítico termoestable**

###### **a) Actividad cualitativa**

Para esto se procedió a reactivar la cepa bacteriana de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) en caldo Luria Bertani (LB) (Peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L) incubándolas a 60 °C por 24 horas.

Luego se procedió a la siembra por puntura en placas Petri con medio compuesto por almidón 1 %, peptona 0,5 %, extracto de levadura 0,2 %, cloruro de sodio 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L.

cloruro de sodio 0,05 %, sulfato de magnesio 0,05 %, cloruro de calcio 0,015 %, agar 2% (Souza et al., 2000). Incubados a 60 °C por 24 horas. Después de comprobar el crecimiento bacteriano se reveló las zonas de hidrolisis por amilasas agregando lugol 30 % hasta cubrir la totalidad de la placa se dejó a temperatura ambiente por unos 5 minutos y finalmente se retiró el lugol (anexo 1).

## **b) Caracterización cuantitativa de la actividad**

- **Inóculo**

Se sembró una asada del cultivo bacteriano *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) en 3 mL de caldo nutritivo y se incubó a 60 °C ± 5, hasta obtener una D.O. de 0,3 en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

- **Producción del extracto enzimático**

Se inoculó 5 % (v/v) de caldo LB con crecimiento bacteriano en matraces con de 250 mL con 50 mL de medio de producción para amilasas (almidón 10 g/L; peptona 5 g/L; extracto de levadura 5 g/L; NaCl 1 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/L; MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/L; CaCl<sub>2</sub> 0,5g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2 g/L) (Manoj, 2013).

Se incubó en un agitador orbital (shaker mrc) a 150 rpm a 60 °C por 60 horas y se midió la concentración de proteínas (mg/mL) y actividad enzimática (U/mL). Se determinó a partir de alícuotas de 1,5 mL recogidos cada 12 horas (Annamalai et al., 2011).

Para la obtención del extracto crudo enzimático, se procedió a centrifugar a 10 000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue utilizado para la cuantificación de la actividad

enzimática y concentración de proteínas (anexo 2 y 3).

- **Determinación de la actividad amilolítica**

Se midió la actividad amilolítica por el método de ácido 3,5 dinitrosalisílico, para esto se realizó la curva estándar de solución de glucosa (mg/mL).

Se mezcló bien todos los tubos y se leyó las absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm contra el blanco de reactivo. Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron contra la concentración de glucosa, además resultó conveniente realizar una regresión lineal  $y = a + bx$

Donde  $y$  = absorbancia,  $x$  = concentración de glucosa (anexo 4).

La medición de la actividad enzimática de amilasas se realizó de la siguiente manera:

**Tabla 6.**

Procedimiento para medir la actividad de amilasas

<b>Reactivos</b>	<b>BR</b>	<b>BS</b>	<b>BE</b>	<b>ES</b>
Buffer fosfato de sodio pH 7 a 50 mM ( $\mu$ l)	150	50	100	0
Dilución de enzima ( $\mu$ l)	0	0	50	50
Sustrato almidón 1 % ( $\mu$ l)	0	100	0	100
<b>Incubar los tubos ependorf a 60 °C por 30 minutos</b>				
Reactivo DNS ( $\mu$ l)	250	250	250	250
<b>Colocar los tubos en baño de agua hirviendo durante 5 minutos e inmediatamente enfriarlos en baño de agua</b>				
Agua destilada ( $\mu$ l)	500	500	500	500

\* BR: Blanco del reactivo  
BS: Blanco del sustrato  
BE: Blanco de la enzima  
ES: Enzima sustrato

Fuente: Gutierrez y Villena, 2010.

Se agitó bien los tubos y se leyó las absorbancias a 540 nm contra el blanco de reactivo (BR).

- **Cuantificación de proteínas totales**

Se realizó por el método descrito por Bradford (1976), para lo cual se realizó una curva estándar de BSA (Albúmina Suero Bovina) (anexo 5). Para medir se tomó 50  $\mu$ l de muestra y se añadió 500  $\mu$ l del reactivo de Bradford dejándolo actuar por un minuto,

para el blanco del reactivo se usó la misma proporción reemplazando la muestra con agua destilada. Se midió a 595 nm.

### **2.2.5 Caracterización del extracto enzimático amilolítico termoestable de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB13)**

La caracterización del extracto enzimático amilolítico se basa en la reducción de la concentración de almidón por la hidrólisis enzimática (Rath, 2003). Como variables respuestas de la caracterización del extracto a se evaluó la actividad enzimática en (U/mL). Donde (U) se define como a la cantidad de enzima necesario para la transformación de 1 micromol del sustrato por minuto (Macarulla, 1992).

#### **2.2.5.1. Efecto del pH sobre la actividad enzimática**

El pH óptimo fue determinado mediante la medición de la actividad enzimática a diferentes pH usando los siguientes tampones (50 mM): acetato de sodio (pH 5,0), fosfato de sodio (pH 6,0- 7,0- 8,0) y 1 % (p/v) de almidón soluble como sustrato a 60 °C.

### **2.2.5.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática**

La temperatura óptima se determinó mediante la medición de la actividad enzimática a un rango de temperaturas de (50 a 80 °C) en tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0) y almidón soluble al 1 % p/v como sustrato.

### **2.2.6 Determinación de los parámetros de desprendimiento de tinta con extracto amilolítico termoestable**

#### **A. Efecto del sustrato sobre la actividad enzimática**

En el ensayo se empleó como sustrato papel de oficina a diferentes concentraciones de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 y 1,4 %, con 15 % en concentración de enzima en crudo.

Como condiciones experimentales se estableció el pH y temperatura óptima de la enzima con un tiempo de acción de 30 minutos. Como variable respuesta se midió

la actividad enzimática mediante la lectura por absorbancia a 540 nm.

## **B. Dosis óptima**

Se determinó sobre papel de oficina como sustrato a concentración óptimo (p/v) calculado en el ensayo anterior, evaluando como variable de interés la concentración de enzima de 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 % de enzima en crudo. El ensayo se realizó en condiciones de pH y temperatura óptima de la enzima con un tiempo de acción de 30 minutos. Como variable respuesta se midió la actividad enzimática mediante la lectura por absorbancia a 540nm.

## **C. Espectro de absorción de la tinta**

Se basa en la absorción de radiación electromagnética que presentan las moléculas, que al ser analizadas con un espectrofotómetro del cual se obtiene un barrido espectral.

Para determinar el espectro de absorción de tinta se preparó diluciones a partir de tinta EPSON 664 con concentraciones de 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 y 0,10 % las

cuales se midieron las absorbancias de 260 a 400 nm en intervalos de 20 nm de longitudes de onda, esto mismo se repitió de manera más fina en la región donde se haya observado una mayor absorbancia, esta vez tomando valores cada 10 nm, con esto se estableció el máximo de absorción de la tinta. A partir de la concentración de máxima absorción se realizó una recta de calibrado.

Posterior al espectro de absorción de la tinta se realizó una curva de calibración para la tinta (anexo 6).

Para la determinación de tinta residual se procedió a leer a la longitud de onda determinada en el ensayo anterior.

#### **D. Desprendimiento enzimático**

El destintado implica la eliminación de tinta de impresión, el cual se compone principalmente de dos pasos: el desprendimiento de partículas de tinta de la superficie de la fibra, seguido de la eliminación de tinta separada de la suspensión de pasta por lavado o flotación (Singh et al., 2012).

Por lo tanto en esta parte de la investigación se desarrolló el desprendimiento de tinta de la fibra de la siguiente manera:

- **Desintegración (pulpeo)**

El proceso de desintegración se realizó en una licuadora, previamente al proceso de desintegración, se puso en contacto el (papel de oficina reciclado) con agua para facilitar el proceso. El material, se desintegró durante un tiempo de 5 minutos, tiempo en el cual se obtuvo una suspensión homogénea.

- **Tratamiento enzimático**

Las mejores condiciones para la acción de la enzima se optimizaron en ensayos anteriores tales como pH, temperatura y sustrato óptimo para la actividad, las cuales se usaron para este ensayo, del mismo modo para averiguar el tiempo de tratamiento eficaz las muestras de pulpa se trataron durante diferentes periodos de tiempo que oscilaron de 20 a 200 minutos (anexo 7), con tomas de muestra de cada 20 minutos.

Se trabajó también con 3 diferentes dosis de enzima en crudo 10, 15 y 20 %. Cada tratamiento con sus respectivos controles.

Posterior al tratamiento enzimático se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos, del sobrenadante se leyó las absorbancias a una longitud de onda de 300 nm (anexo 8)

- **Cálculo de concentración azúcares reductores**

Para determinar la concentración de azúcares reductores se usó el método descrito por Miller (1959), ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Se calculó la concentración de azúcares reductores del sobrenadante en cada ensayo del tratamiento enzimático (muestra) cada 20 minutos según la tabla 7.

**Tabla 7**

Procedimiento para medir los azúcares reductores

<b>Muestra/Reactivos</b>	<b>BR</b>	<b>RM</b>	<b>RM</b>	<b>RM</b>
Agua destilada (µl)	90	0	0	0
Muestra (µl)	0	90	90	90
<b>Incubar los tubos ependorf a 60 °C por 30 minutos</b>				
Reactivo DNS (µl)	150	150	150	150
<b>Colocar los tubos en baño de agua hirviendo durante 5 minutos e inmediatamente enfriarlos en baño de agua</b>				
Agua destilada (µl)	300	300	300	300

Fuente: Gutierrez y Villena, 2010

\* BR: Blanco del reactivo

RM: Reacción de la muestra

Las reacciones se midieron a 540 nm contra el blanco de reactivo (BR). Asimismo se realizó la curva patrón para obtener las concentraciones (anexo 9).

### III. RESULTADOS

#### 3.1 Determinación de actividad enzimática cualitativa

La actividad cualitativa de la cepa bacteriana *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) se determinó mediante la tinción de lugol al 30 %, se evidenció actividad por halos de hidrolisis de almidón formados (anexo 1).

#### 3.2 Caracterización cuantitativa de la actividad enzimática

##### 3.2.1 Tiempo de mayor producción enzimática de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13)

Se determinó la actividad enzimática de amilasa a diferentes tiempos de la enzima amilasa por la cepa *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13), los tiempos evaluados fueron 0, 12, 24, 36, 48 y 60 horas, a 60 °C y pH 7. Los ensayos se realizaron por triplicado (anexo 10).

**Tabla 8.**

Análisis de varianza de la actividad enzimática (U/mL)

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón- F</b>	<b>Valor- P</b>
Entre grupos	0,507455	5	0,101491	140,00	0,0000
Intra grupos	0,00869933	12	0,00072494		
Total (Corr.)	0,516154	17			

Fuente: Statgraphics Centurión XVI.

En la tabla 8 se observa la razón F, que es igual a 140,00 este valor es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la prueba F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de actividad enzimática (U/mL) entre un nivel de tiempo (horas) y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza. Es decir que el tiempo de producción afecta considerablemente la actividad enzimática.

**Tabla 9**

Prueba de Tukey para actividad enzimática a diferentes tiempos.

<b>Tiempo (horas)</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
0	3	0,0276667	X
12	3	0,0703333	XX
60	3	0,122	XX
24	3	0,157667	X
48	3	0,348667	X
36	3	0,504667	X

Fuente: Statgraphics centurión XVI.

La tabla 9 muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles, puesto que no comparten una misma columna de X, por ende la actividad de la enzima a diferentes tiempos son significativamente diferentes con un intervalo de confianza simultánea de Tukey del 95 %, logrando una mayor actividad enzimática del extracto a las 36 horas de producción.

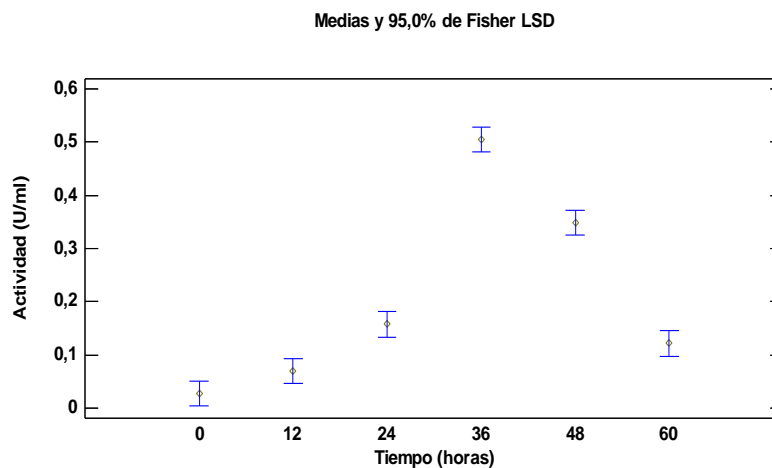


Figura 5. Actividad enzimática a diferentes tiempos de producción

Fuente: Statgraphics centurión XVI.

En la figura 5 claramente se observa que la actividad enzimática generada por la cepa bacteriana *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) a las 36 horas de producción presenta 0,505 U/mL, mayor actividad enzimática a diferencia de los otros tiempos.

### 1. Proteínas totales

Se evaluó concentraciones de proteínas en diversos tiempos de producción, es decir, 0, 12, 24, 36, 48 y 60 horas, cada ensayo por triplicado (anexo 11).

**Tabla 10**

Análisis de varianza para concentración de proteínas totales a diferentes tiempos

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón- F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	0,0278243	5	0,00556486	57,67	0,0000
Intra grupos	0,001158	12	0,0000965		
Total (Corr.)	0,0289823	17			

Fuente: Statgraphics centurión XVI.

La tabla 10 descompone la varianza de proteínas totales en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos. La razón F, que en este caso es igual a 57,6669, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor P de la prueba F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de proteínas totales entre un nivel de tiempo (horas) y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza. Es decir que el tiempo de producción afecta considerablemente la concentración de proteínas totales.

**Tabla 11**

Prueba de Tukey concentración de proteínas totales a diferentes tiempos

<b>Tiempo (horas)</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
0	3	0,0946667	X
12	3	0,1153333	XX
24	3	0,128	X
60	3	0,168	X
36	3	0,194667	XX
48	3	0,197	X

Fuente: Statgraphics centurión XVI.

En la tabla 11 se observa 4 grupos homogéneos, según la alineación de las X's en columnas, los cuales difieren entre sí. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. Por lo que la mayor concentración de proteínas totales se dió a las 48 horas con un intervalo de confianza simultánea de Tukey del 95 %.

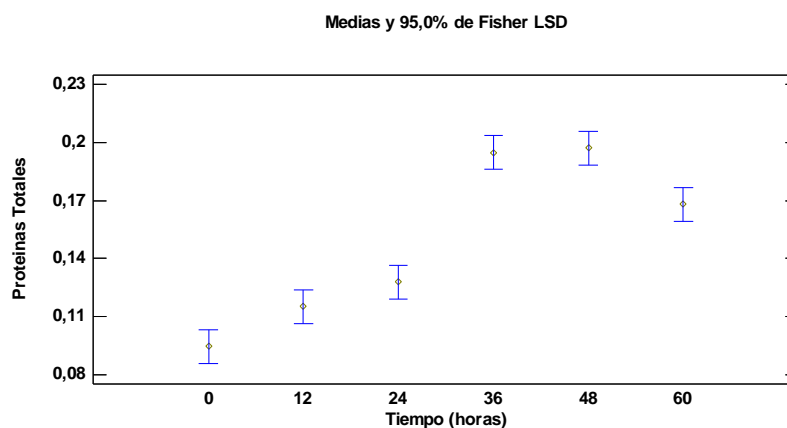


Figura 6. Determinación de proteínas totales por tiempos de la cepa *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13).

Fuente: Statgraphics centurión XVI.

En la figura 6 la concentración de proteínas totales generada por la cepa bacteriana *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) donde la mayor concentración de proteínas fue de 0,197 mg/mL en un tiempo de 48 horas de producción.

### 3.3 Caracterización del extracto enzimático amilolítico termoestable de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13).

Con el propósito de conocer la respuesta de la enzima a factores como temperatura y pH, se realizaron ensayos de actividad enzimática para su posterior aplicación.

## 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se determinó en U/mL, evaluando las reacciones a temperaturas desde 50 a 80 °C. Los resultados se muestran en (anexo 12).

**Tabla 12.**

Análisis de varianza para la actividad enzimática por temperatura

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0285857	3	0,00952856	346,49	0,0000
Intra grupos	0,00022	8	0,0000275		
Total (Corr.)	0,0288057	11			

Fuente: Statgraphics centurión XVI.

La tabla 12 ANOVA descompone la varianza de actividad enzimática en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro de grupos. La razón F, que en este caso es igual a 346,493, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor P de la prueba F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de actividad enzimática entre un nivel de temperatura y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza. Es decir que las

diferentes temperaturas afectan a la actividad enzimática (U/mL).

**Tabla 13**

Prueba de Tukey para actividad enzimática por temperatura

<b>Temperatura</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
50	3	0,143667	X
80	3	0,160667	X
60	3	0,239	X
70	3	0,257333	X

Fuente: Statgraphics centurión XVI.

En la tabla 13 muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles, puesto que no comparten una misma columna de X, por ende la actividad de la enzima a diferentes temperaturas son significativamente diferentes con un intervalo de confianza simultánea de Tukey del 95 %. Logrando una mayor actividad enzimática del extracto a 70 °C con 0,25 U/mL.

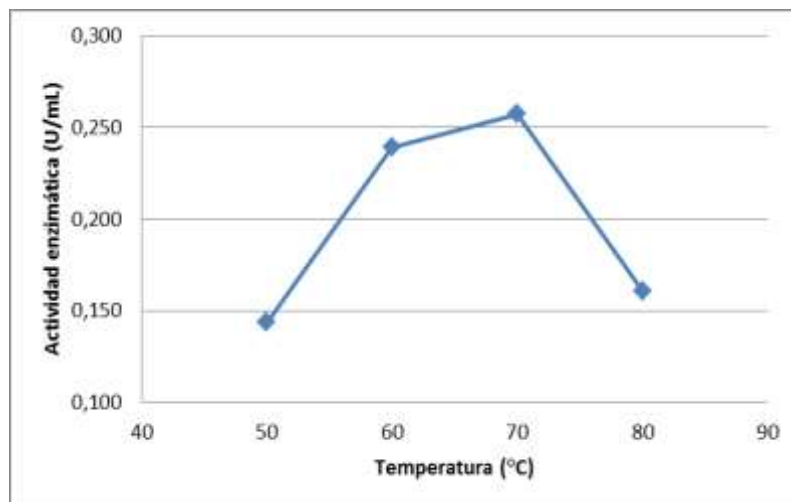


Figura 7. Curva del efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

Fuente: Elaboración propia.

### 3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

Se determinó el efecto del pH sobre la actividad enzimática en U/ml, evaluando valores de pH desde 5 a 8 se realizaron ensayos de reacción por triplicado en (anexo 13).

**Tabla 14**

Análisis de varianza para actividad enzimática a diferentes pH.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,0208757	3	0,00695856	95,43	0,0000
Intra grupos	0,000583333	8	0,0000729167		
Total (Corr.)	0,021459	11			

Fuente: Statgraphics Centurión XVI.

La tabla 14 ANOVA descompone la varianza de actividad enzimática amilolítica en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos. La razón F, que en este caso es igual a 95,4316, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor P de la prueba F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de actividad enzimática amilolítica entre un nivel de pH y otro, con un nivel del 95,0 % de confianza. Es decir que los diferentes pH afectan a la actividad enzimática (U/mL).

**Tabla 15.**

Prueba de Tukey para actividad a diferentes pH

<b>pH</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
8	3	0,127667	X
5	3	0,160333	X
7	3	0,199	X
6	3	0,239	X

Fuente: Statgraphics centurión XVI.

La tabla 15 muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles, puesto que no comparten una misma columna de X, por ende la actividad de la enzima a diferentes pH son significativamente

diferentes con un intervalo de confianza simultánea de Tukey del 95 %. Logrando una mayor actividad enzimática del extracto a pH 6,0 con 0,23 U/mL.

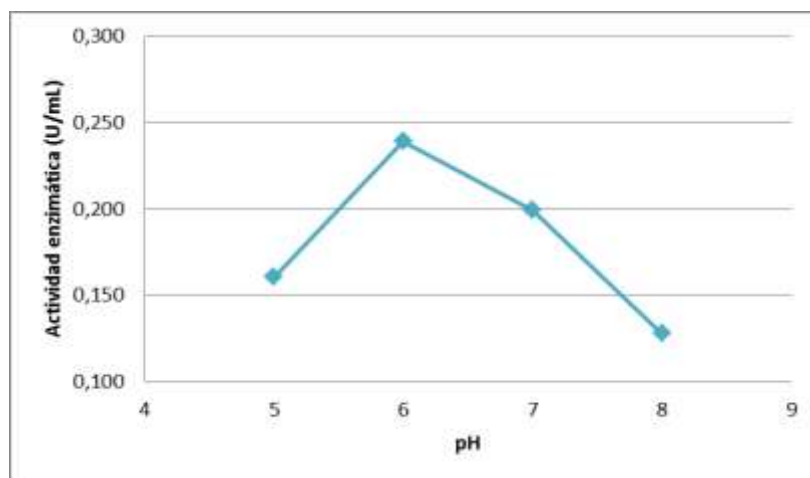


Figura 8. Curva del efecto del pH sobre la actividad enzimática.

Fuente:Elaboracion propia

### 3.4 Determinación de los parámetros de desprendimiento de tinta por el extracto amilolítico termoestable de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13).

#### A. Efecto del sustrato sobre la actividad enzimática

Se determinó el efecto del sustrato sobre la actividad enzimática con pulpa de papel en blanco, las concentraciones de sustrato en rangos de 0,4 a 1,6 %, con una concentración de enzima al 15 % obtenida del ensayo

anterior, las reacciones se realizaron por triplicado. Los resultados se observan en (Anexo 14).

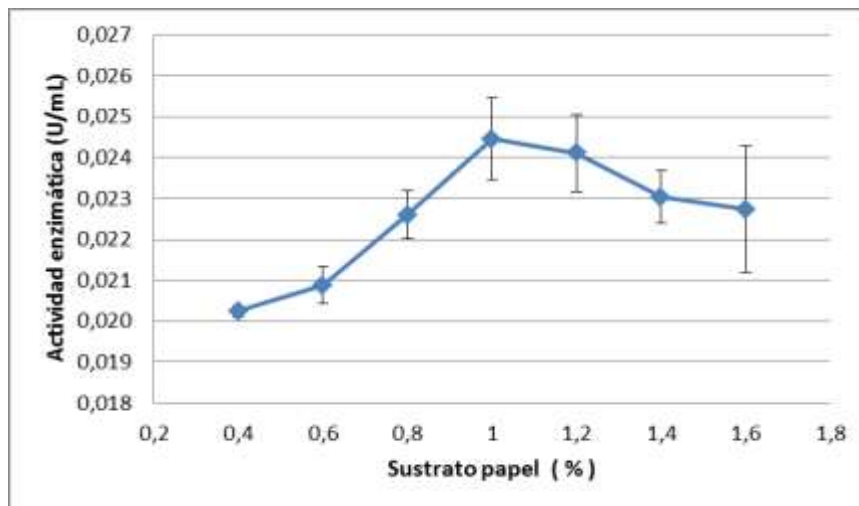


Figura 9. Curva de actividad enzimática sobre diferentes concentraciones de sustrato.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 9 se observa que a una concentración de papel de 1 % como sustrato se obtiene una mayor actividad enzimática.

## **B. Determinación de dosis óptima para el tratamiento enzimático**

Para la determinación de dosis óptima de extracto enzimático se realizó concentraciones de extracto en rangos de 1 a 25 % con un sustrato de pulpa de papel del 1 %, como

variable respuesta la actividad enzimática en (U/mL), los ensayos se realizaron por triplicado, (anexo 15).

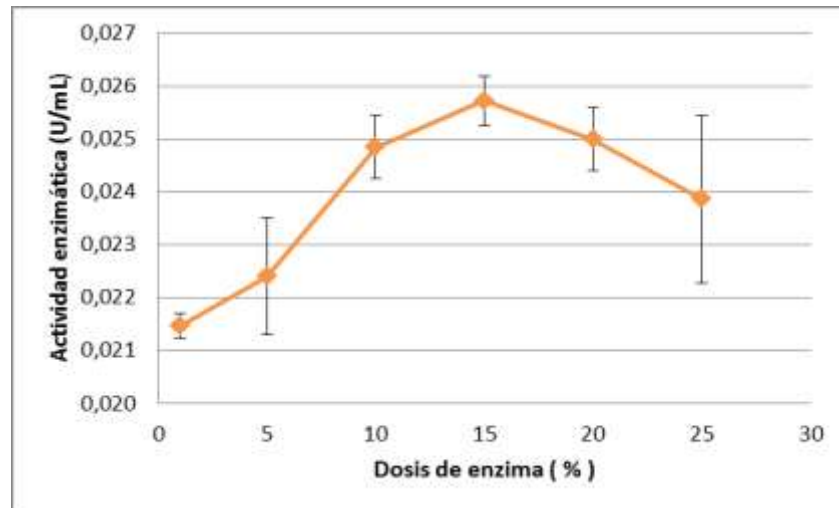


Figura 10. Curva de actividad enzimática por dosis de enzima

Fuente: Elaboración propia.

En la figura se muestra una mayor actividad enzimática con una concentración de sustrato papel al 1 % y dosis 15 %, seguido de las dosis 20 y 10 %.

### C. Espectro de absorción

Se determinó el espectro de absorción de tinta con intervalos de longitud de onda de cada 10 nm (anexo 16) las absorbancias de muestran en la tabla 16.

**Tabla 16**

Absorbancias de longitud de onda y diluciones de tinta diferentes

Longitud de onda (nm)	Concentraciones de tinta en (mg/mL)				
	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10
260	3,645	3,737	3,825	3,884	3,962
270	3,420	3,519	3,610	3,698	3,752
280	3,294	3,397	3,478	3,584	3,654
290	2,234	2,277	2,375	2,496	2,587
300	0,949	1,014	1,099	1,211	1,282
310	0,657	0,733	0,823	0,939	1,012
320	0,554	0,642	0,735	0,856	0,932
330	0,475	0,570	0,661	0,782	0,860
340	0,416	0,510	0,599	0,719	0,795
350	0,379	0,469	0,555	0,673	0,745
360	0,345	0,432	0,515	0,628	0,697
370	0,286	0,377	0,456	0,566	0,632
380	0,229	0,332	0,411	0,525	0,593
390	0,216	0,334	0,419	0,544	0,618
400	0,217	0,349	0,442	0,579	0,662

Fuente: Software Gen 5

En la tabla 16 se observa una máxima absorción de las diferentes concentraciones de tinta de impresión Epson 664, acercándose a la unidad a una longitud de onda de 300 nm.

#### **D. Desprendimiento de tinta**

Las condiciones de desprendimiento fueron establecidas basándose en las condiciones óptimas de

acción de la amilasa, los cuales se describen en la siguiente tabla 16 (anexo 17).

**Tabla 17**

Condiciones para el desprendimiento de tinta

**Proceso de pulpeo (sustrato papel)**

Concentración de la pulpa	
Tiempo de pulpeo	1 (%)
<b>Proceso de hidrolisis enzimática</b>	5 min
Temperatura	
pH	70 °C
Concentración de la pulpa	6,0
Tiempo de hidrolisis	1 %
	Cada 20 min.

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 18.**

Análisis de varianza para tinta residual

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Dosis	0,221808	2	0,110904	504,67	0,0000
B:Tiempo	0,0446699	10	0,00446699	20,33	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,0155584	20	0,000777921	3,54	0,0001
RESIDUOS	0,014504	66	0,000219758		
TOTAL (CORREGIDO)	0,29654	98			

Fuente: Statgraphics centurión XVI.

La tabla 18 descompone la variabilidad de tinta residual en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados, la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre tinta residual con un 95,0 % de nivel de confianza.

**Tabla 19**

Prueba de Tukey para la comparación de dosis de enzima frente al desprendimiento de tinta

<b>Dosis</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
E1	33	0,188273	X
E2	33	0,223212	X
E3	33	0,301485	X

Fuente: Statgraphics centurión XVI.

Esta tabla 19 se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Puesto que no comparten la misma columna de X, por lo que las dosis de extracto enzimático con respecto al desprendimiento de tinta

muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza, siendo la dosis de enzima a 20 % la que obtuvo mayor desprendimiento.

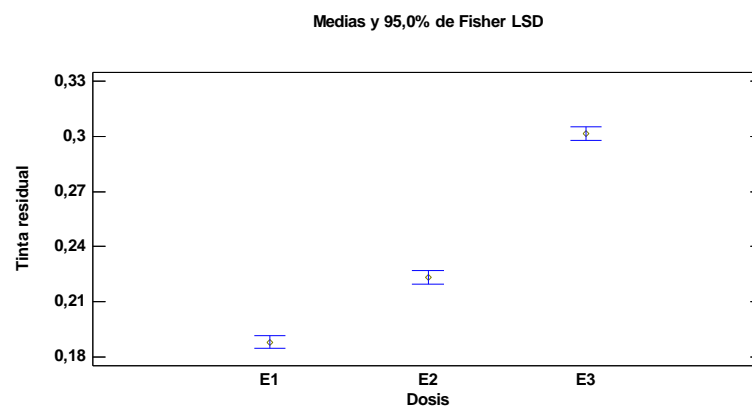


Figura 11. Concentración de tinta residual por dosis de enzima

Fuente: Statgraphics centurión XVI.

**Tabla 20.**

Prueba de Tukey para la comparación del tiempo frente al desprendimiento de tinta

Tiempo (min)	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	9	0,205556	A
80	9	0,218778	A
180	9	0,221444	AB
200	9	0,222	AB
160	9	0,224778	AB
140	9	0,227778	ABC
120	9	0,244222	BCD
100	9	0,249	CDE
20	9	0,260333	DE
60	9	0,268556	E
40	9	0,271778	E

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 20 se aplicó un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se identificaron 5 grupos homogéneos según la alineación de las letras en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartieron una misma columna de letras. Logrando tiempos de 40 y 60 minutos el mayor desprendimiento con un intervalo de confianza simultánea de Tukey del 95 %.

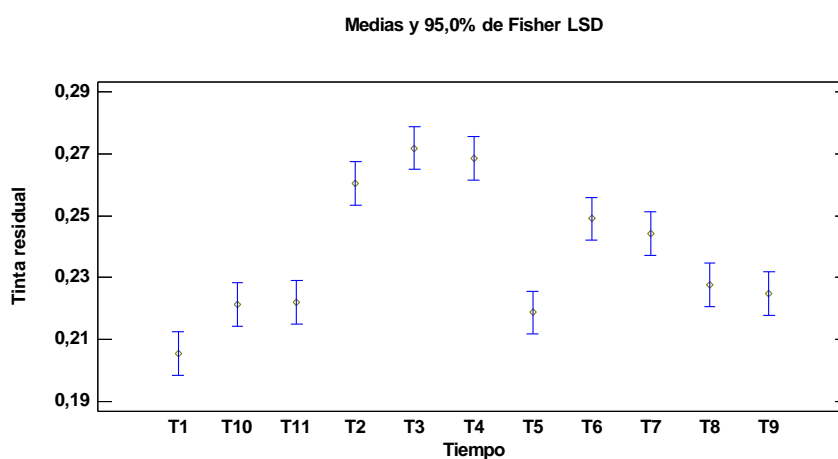


Figura 12. Concentraciones de tinta residual a diferentes tiempos

Fuente: Statgraphics Centurión XVI.

#### 4. Concentración de azúcares reductores

Se midió la concentración de azúcares reductores del sobrenadante del tratamiento enzimático en todos los tiempos de evaluación para el desprendimiento (anexo 18).

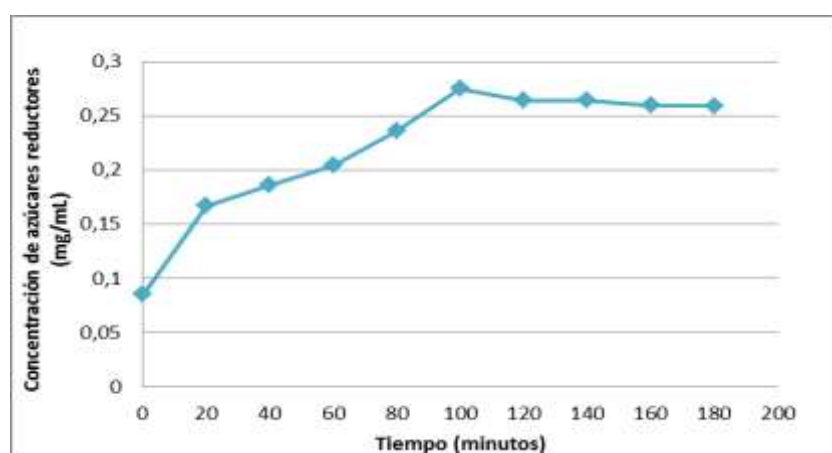


Figura 13. Concentración de azúcares reductores frente a diferentes tiempos.

Fuente: Elaboración propia

En la figura 13 se observa las concentraciones de azúcares reductores del sobrenadante de reacción del tratamiento enzimático frente a diferentes tiempos, elevándose las concentraciones hasta los 100 minutos.

## IV. DISCUSIÓN

### Producción de amilasas

Para obtener una mayor producción de amilasa depende principalmente del medio de nutriente, pH, temperatura y el tiempo de incubación (Figen et al., 2006).

Kumar *et al.*, (2014) quienes trabajaron con bacterias termófilas productoras de amilasa obtuvieron una actividad máxima de amilasa (0,574 U / mL) para *B. barbaricus* durante 24 horas, por otro lado Gusakov *et al.*, (2011) En un estudio sobre  $\alpha$ -amilasa alcalófila de la cepa GM8901 de *Bacillus*, por el método DNS se encontró que la actividad era un máximo de 0,75 U/mL, después de la incubación de 24 horas, no obstante Hasan et al., (2017) obtuvo de *Bacillus sp* 3,50 U/mL en 48 horas. Sin embargo la máxima producción de amilasas de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13), fue a las 36 horas con una actividad de 0,505 U/mL, con una máxima concentración de proteínas a las 36 horas, este resultado es mayor a lo que Oyeleke et al., (2010) reportó de la producción de amilasa por *Bacillus megaterium* el cual fue entre 0,31 – 0,46 U/mL de actividad enzimática amilolítica a pH alcalino, pero el resultado obtenido tiene concordancia con los estudios que reportaron Kumar et al., (2014) el cual publicó una amilasa con actividad de

0,574 U / mL en 24 horas, con una diferencia mínima en la actividad enzimática pero con tiempos de producción diferentes, ya que la cepa CB-13 tiene un tiempo de producción mayor a las 36 horas, inferior al resultado de Unal, (2015) quien trabajó con especies de *Aspergillus* logrando obtener al sétimo día de producción 0,75 U/mL de actividad enzimática por *Aspergillus terreus*.

### **Efecto del pH y temperatura frente a la actividad enzimática**

El efecto del pH en la actividad enzimática se determinó en un intervalo de pH de 5 a 8 en extracto crudo de amilasa (figura 8), el pH óptimo de la amilasa fue de 6.0 este pH es inferior en comparación con la amilasas en extracto crudo de *Bacillus sp.* BCC021-50 donde presenta una mayor actividad a un pH 7,5 Ahmed, et al (2017). Sin embargo este resultado tiene concordancia con los estudios de Shaw et al., (1995) quien trabajó con *Thermus sp.* y menciona que su pH óptimo está entre 5,5-6,5 con similitud al que reporta Egas *et al.*, (1998) que obtuvo un pH 5,5-6,0 para *Thermus filiformis*. Por otro lado Al-Qodah, (2006), menciona que el pH óptimo de la  $\alpha$ -amilasa de *Geobacillus stearothermophilus* fue de 7,0 (Garrett y Grisham, 1999). Los cambios en el pH alteran la ionización de la cadena lateral de aminoácidos en el lado activo de la enzima y, por lo tanto, la enzima estará en la mejor conformación al pH óptimo. Para

Pandey *et al* (2000) la mayoría de las enzimas que degradan almidón tienen un pH óptimo en intervalos de ácido a neutro.

Otros estudios han informado que parte de la amilasa bacteriana tiene un pH óptimo en el rango 5,0-10,5 Sivaramakrishnan *et al* (2006).

El efecto de la temperatura en la actividad enzimática se determinó en un intervalo de temperaturas de 50 a 80 en extracto de amilasa en bruto (figura 7). La actividad de la amilasa alcanzó una temperatura óptima de 70 °C este resultado es inferior a *Thermus filiformis* de 95 °C (Egas *et al.*, 1998). Pero superior a lo reportado por Fatoni y Zufahair, (2012) quien trabajo con *Thermus sp* aislada de un manantial caliente obtuvo una actividad optima a 60 °C. Sin embargo, la temperatura óptima de la amilasa producida en este trabajo concuerda en comparación con la amilasa en crudo de producción de amilasa de *Bacillus sp* termófilo BCC 021-50 de 70 °C aislado de un entorno marino Ahmed, *et al* (2017). La amilasa producida mostró su actividad óptima a 70 ° C, esta alta temperatura de la amilasa proporciona algunas ventajas en el industrial proceso como reducir el riesgo de contaminación microbiana, reducir el costo de enfriamiento, y una mejor solubilidad y menor la viscosidad del sustrato a alta temperatura (Burhan *et al.*, 2003).

Montor, (2013), menciona que la enzima a 90 °C aún no se ha desnaturalizado y presenta el 31 % de la actividad. Varios estudios han informado amilasa bacteriana activo a temperaturas medias a altas, en el rango de 50- 100 °C (Sivaramakrishnan et al., 2006).

### **Desprendimiento de la tinta por tratamiento enzimático**

La consistencia usada para el desprendimiento de tinta enzimático fue al 1 %, Pala et al., (2004) y Pelach et al., (2003) reportan que la consistencia en procesos de la industria de papel oscila entre el 2 y el 6 % puesto que a una mayor consistencia ayuda al desprendimiento de la tinta debido a las fuerzas de fricción entre las fibras en un destintado convencional. Sin embargo, Lee et al., (2007) menciona que en el destintado enzimático estas altas concentraciones complicaría el proceso de pulpeo y disminuiría el área de acción enzimática, lo que se ajusta al resultado obtenido 1 % para una mayor homogenización de la enzima.

En el desprendimiento de la tinta se realizó con las condiciones óptimas de la amilasa pH 6,0 temperatura 70 °C y con 1 % de pulpa, estas condiciones se asemejan a las de López (2000) quien realizó el tratamiento enzimático con con papel viejo de oficina (MOW) con un pH de 6,5 temperatura de 65 °C y con una consistencia de pulpa a 0,85 %, también menciona que el tratamiento previo con amilasas provoca un

debilitamiento de la estructura superficial del papel, y por tanto una disminución de la resistencia del papel a la penetración de fluidos.

Lee et al., (2011) quienes realizaron también un destintado enzimático de MOW con celulasas y xilanasas, menciona obtuvo como parámetros para el destintado enzimático consistencia 2 %, temperatura 50 °C pH 5,5 tiempo de hidrolisis 60 min. Hoyos y López (2006) publicó una investigación, en la cual se realizaron pruebas de laboratorio para el destintado enzimático de papel impreso logró que para la  $\alpha$ -amilasa fue 65 °C y el pH fue de 6,85.

Sulbarán et al (2014), trabajó con una mezcla 50:50 de dos enzimas comerciales celulasa (novozyme 342) y  $\alpha$ -amylasas (novozyme 51055), con lo obtuvo mejores resultados a una dosis de 0,1 % con tiempo de 180 minutos a pesar de esto resalta que en la industria este tiempo es muy prolongado se debería optimizar a tiempos más cortos. Sin embargo las variables estudiadas en el presente trabajo como tiempo y dosis para el desprendimiento de tinta se obtuvo una dosis de 20 % de extracto enzimático y con un tiempo óptimo de 40 minutos, tiempo inferior al que reporta Sulbaran et al (2014) lo que hace que la amilasa de la cepa CB-13 sea prometedora de futuras aplicaciones industriales.

Alzate (2013), menciona que el tratamiento previo del papel de archivo MOW (mixed office waste) con amilasas provoca un debilitamiento de la estructura superficial del papel, y por tanto, una disminución de la resistencia del papel a la penetración de fluidos.

## V. CONCLUSIONES

1. La mayor producción de amilasa de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) se da a las 36 horas con una actividad enzimática de 0,505 U/mL.
2. El extracto enzimático producido por la cepa bacteriana *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) posee una actividad máxima a pH 6,0 con una temperatura óptima de reacción de 70 °C.
3. El desprendimiento máximo de tinta se dió a una dosis de extracto crudo de enzima al 20 % en 40 minutos con 0,301 mg/mL de tinta residual.

## VI. RECOMENDACIONES

- Optimizar la producción de la amilasa termoestable de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13).
- Purificar la enzima amilasa termoestable de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) para obtener mayor acción enzimática.
- Realizar una evaluación combinada con otras enzimas que actúen sobre la tinta como las lacasas, esterasas o lipasas sobre diferentes papeles de desperdicio para así disminuir sustancias químicas en el proceso de destintado.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, A., Khushk, I., Saltar, A., Aqeel, M., Ali, H., y Changrui, L. (2017). Amylase Production from Thermophilic *Bacillus* sp. BCC 021-50 Isolated from a Marine Environment, *Fermentation* 2017, 3, 25; doi:10.3390/fermentation3020025.
- Al-Qodah, Z. (2006). Production and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Biotechnologu J.* 1: 850-857.
- Alzate, H., Dovale, A., Chala, V., Muñoz, O., Casas, A., Quintana, G., (2013). Study of the enzymatic/neutral deinking process of waste photocopy paper, *Technical Article* Vol. 74 pp. 61-65.
- Annamalai, N.; Thavasi, R.; Vijayalakshmi, S. & Balasubramanian, T. (2011). Extraction, Purification and Characterization of Thermostable, Alkaline Tolerant  $\alpha$ - Amylase from *Bacillus cereus*. *Indian J Microbiol*, 51(4): 424-429.
- Bajpai, P., y Bajpai, P. (1998). Enzymatic deinking: A review. *Tappi J*, 111-117.

- Beneventi, D. and Carré. B.(2000) The Mechanisms of Flotation Deinking and the Role of Fillers, Progress in Paper Recycling. Vol. 9 pp.77-85.
- Belitz, H.D. y Grosch W. (1988) *Química de los alimentos*. Acribia, Zaragoza 257-264.
- Bobu, E. and Ciolacu F. (2008) "Deinkability of mixed prints: alkaline vs neutral deinking" Progress in Paper Recycling. Vol. 18 pp. 23-31
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A.,Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. Process Biochemistry, 38, 1397-1403
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254.
- Bruinenberg, P. M., Hulst, A. C., Faber, A., & Voogd, R. H. (1996). A process for surface sizing or coating of paper. In: European Patent Application.
- Casey, J. P. (1981). Pulp and Paper Chemistry and Chemical Technology. . New York: Wiley Interscience Publication.

- Carrascal, F. (2005) *obtención de dextrinas de alta solubilidad y mínima retrodegradación a partir de almidón industrial de yuca*. Universidad industrial de Santander.
- Carré, B. Magnin, L. Galland, G. Vernac, Y. (2000). Deinking difficulties related to ink formulation, printing process, and type of paper, *TAPPI JOURNAL*, 83(6); pg 60.
- Cluskey, J:E.; knutson, C:A. y Inglett, G.E. (1980). "fractionation and characterization of dent corn and amylo maize starch granules" *Starch/Staerke* 32(4), 105-109.
- Donohue, T. & Bernlohr, R. (1978). Effect of cultural conditions on the concentrations of metabolic intermediates during growth and sporulation of *Bacillus licheniformis*. *J Bacteriol*, 135:363–372.
- Egas, M.C.V., da Costa, M.S., Cowan, D.A. and Pires, E.M.V. (1998). Extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermus filiformis* Ork A2: purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, 2(1): 23-32.
- Fatoni, A., y Zufahair, (2012) Thermophilic amylase from *Thermus* sp. isolation and its potential application for bioethanol production, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 34 (5), 525-531.
- Ferguson, L. D. (1992). Deinking chemistry: part 1. *Tappi Journal*. 75: 75-83.

- Figen Ertan, Bilal Balkan, Seda Balkan and Tulin Aktac. (2006) Solid State Fermentation for the Production of  $\alpha$ - Amylase from *PenicilliumChrysogenum* Using Mixed Agricultural By-Products as Substrate, Section Cellular and Molecular Biology, pp. 657- 661. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2478/s11756-006- 0137-2>.
- Fuwa, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *Journal of Biochemistry* 41, 583-603
- García, J. A. (2001). Fundamentos del destintado por flotación. *Ingeniería Química*,. 33: 265-272
- Garrett, R.H. and Grisham, C.M. (1999). *Biochemistry*. Saunder's College Publishing, Philadelphia, US
- Gomes, I., Gomes, J., y Steiner, W. (2003). Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. *Bioresource Technology*, 207-214.
- Gupta, R., Paresh Gigras, R., Mohapatra, H., Goswami, V., y Chauhan, B. (2003). "Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*.

- Gursahani Y. H. (2010). Studies on microbial thermophiles of hot water springs of Maharashtra State (Ph.D. Thesis,) University, Aurangabad.
- Gusakov, AV, Kondratyeva, EG y Sinitsyn, AP (2011) Comparación de dos métodos para analizar azúcares reductores en la determinación de las actividades de la carbohidrasa. Revista Internacional de química analítica.
- Gutierrez, M., Villena, G. (2010) Microbiología Industrial. Guía de prácticas. Laboratorio de micología y biotecnología UNALM.
- Hasan, M.,Wal, L., Hosna, A., Hakim, A., Kalam, A., (2017) Optimización de algunas condiciones de fermentación para la producción de amilasas extracelulares mediante el uso de aislamientos de *Chryseobacterium* y *Bacillus* a partir de desechos orgánicos de cocina. Revista de ingeniería genética y biotecnología vol. 15, Número 1 páginas 59-68.
- Hoyos, J. J. y G. J. López. (2006) Destintado enzimático de papel impreso por el método offset. Medellín, 82 p. Tesis (Ingeniero Químico). Universidad Pontificia Bolivariana. Escuela de Ingenierías. Facultad de Ingeniería Química.

- Konsoula, Z., y Liakopoulou Kyriakides, M. (2007). Co-production of alpha-amylase and beta-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresour Technol.*, 150-157.
- Kumar, S., Raut, S., Satpathy, S., Ranian, P., Bandvopadhyay, B., (2014) Caracterización de nuevas bacterias termófilas productoras de amilasa de Taptapani Hot Spring, Odisha, India. Jundishapur J Microbiol . 2014 Dic; 7 (12): e11800.
- Lee, C.K., Darah, I., Ibrahim, C.O., (2007). Enzymatic deinking of laser printed office waste papers: Some governing parameters on deinking efficiency. *Bioresource Technology* 98, 1684–1689. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.052>.
- Lee C.K., Ibrahim, D., Che Omar, I., (2011) enzymatic and chemical deinking. *Bioresources* 6(4)
- Lopez, D., Colom, J., Vidal , T., y Torres, A. (2000). Aplicación previa de amilasas a la desintegración del papel reciclado. Iberoamerican congress on pulp andpaper research.
- Macarulla, J., Marino, A., Macarulla., A.(1992) *Bioquímica Cuantitativa*, Barcelona España, Reverte.
- Magnin, L., Delpech, P., y Lantto, R. (2002). Pontencial of enzymatic deinking. *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, 323-332

- Manoj Kumar, N. (2013). Thermostable alpha-amylase enzyme production from *Bacillus laterosporus*: Statistical optimization, purification and characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 38-44.
- Mercier, C. (1985) Les enzymes amylolytiques. En hydrolases et dépolymérasés. Editores: Mouranche, A. y Costes, C. Gauthier Villars 109-142
- Miller G. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–429
- Montor, J. (2013). Caracterización de amidasas producidas por bacterias de suelos cultivados con caña de azúcar. Tesis para grado de Ingeniero en Biotecnología. Universidad de Papaloapan-México. 87h.
- Oyeleke, S., Auta, S., Egwim, E. (2010). Production and characterization of amylase produced by *Bacillus megaterium* isolated from a local yam peel dumpsite in Minna, Niger State. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* Vol. 2(7), pp. 88-92
- Pala, H., Mota, M., y Gama, F. (2004). Enzymatic versus chemical deinking of non-impact ink printed paper. *Journal of Biotechnology*, 79-89.

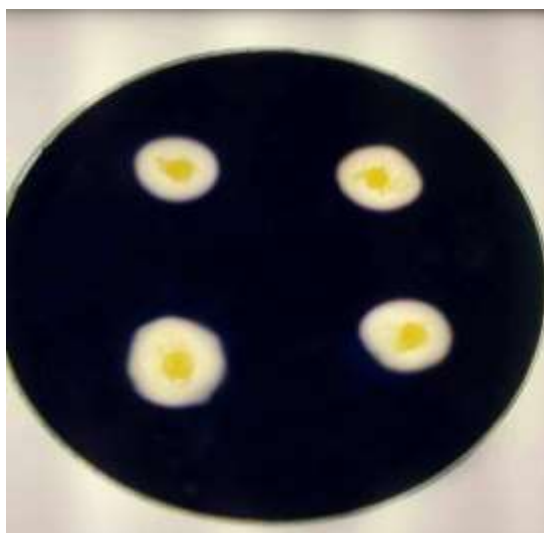
- Pandey, A.; Nigam, P.; Soccol, C.R.; Soccol, V.T.; Singh, D. y Mohan, R. (2000). "Advances in microbial amylases". *Biotechnology and Applied Biochemistry* 42(2). 135-152
- Pelach, M., Pastor, F., Puig, J., Vilaseca, F., Mutjé, P., (2003). Enzymic deinking of old newspapers with cellulase. *Process Biochemistry* 38, 1063–1067. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00237-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00237-6)
- Prakash, O., y Jaiswal, N. (2009). An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*.
- Ramírez, E.,(2013). Destintado de papel de impresión láser aplicando secuencias con ultrasonido de acción intensiva y procesamiento magnético mecánico, orientado hacia la obtención de celulosa de alta pureza. Mexico.
- Rath, C. (2003). Thermophiles: A novel group of microorganisms for 21 st centur, 2003, OUAT, Bhubanewswar,751003.
- Rosencranse, S. (2007). Non-sulfite neutral deinking for recycled fibre. *Pulp and Paper Canada*, 108: 15-18.
- Robin, J.P. (1981). Study of  $\beta$ -limit dextrans from various native starches. Interpretation in term of amylopectin structure. *Sciences des aliments*.
- Spiridon, J. y A. Machado (2005). Enzymatic deinking of old newspaper (ONP). *Progress in Paper Recycling*, 14: 14-18.

- Schaechter, M., (2009). Encyclopedia of microbiology. 3<sup>o</sup> ed., London: Academic.
- Smith, R. (2002). A guide to sealing paper recycling plants. environmental technology.
- Smook, G. (1990). Tratamientos Superficiales. Manual Para Técnicos de Pulpa y Papel. Atlanta: TAPPI PRESS.
- Stamford, T., Stamford, N., Coelho, L., y Araujo, J. (2001). Production and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Nocardopsis* sp. endophyte of yam bean. *Bioresour Technol*, 137-141.
- Singh, A., Yadav, RD., Kaur, A., Mahajan, R., (2012). An ecofriendly cost effective enzymatic methodology for deinking of school waste paper. Kurukshetra, India. *Bioresour Technol*.
- Souza, C. y Leal, M. (2000). Culture condition for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. Brazil. *Microbiol.*, 2000, 31: 298-302.
- Sulbarán, B., Turrado, J., Delgado, E., Rojas, O., y Venditti, R. (2014). Destintado en medio neutro de papel reciclado aplicando mezclas de enzimas celulasa y  $\alpha$ -amilasas. *European Scientific Journal*.

- Shaw, J. Lin, F. Chen, S. and Chen, H., (1995). Purification and properties of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermus* sp. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 36, 195-200
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R. and Pandey, A. (2006).  $\alpha$ -Amylases from microbial sources—an overview on recent developments. *Food Technol Biotechnol*, 44(2), 173-184.
- Turrado, J., Saucedo, A., Perez, R., Iñiguez, C., Lpoez, D., Villar., Mutje, P (2008). *Tecnología en la fabricación del papel*.
- Unal, A. (2015) production of  $\alpha$ -amilase from some thermophilic aspergillus species and optimization of its culture medium and enzyme activity. *Academic journals Vol. 14 (47) 31709-3183*
- Viesturs, U. "Biological deinking technology for the recycling of office waste papers" *Bioresource Technology*. (1999) Vol. 67 pp. 255-265.
- Windish, W., y Mhatre, N. (1965). *Microbial amylases*. New York: *Advances in applied microbiology*, vol. 7 Academic Press.
- Zhao, Y. Deng and J. Zhu. "Role of surfactants in flotation deinking" *Progress in Paper Recycling* (2004) Vol. 14 pp. 41-45.

## VIII. ANEXOS

**ANEXO 1.** Fotografía de la formación del halo alrededor de la colonia de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13).



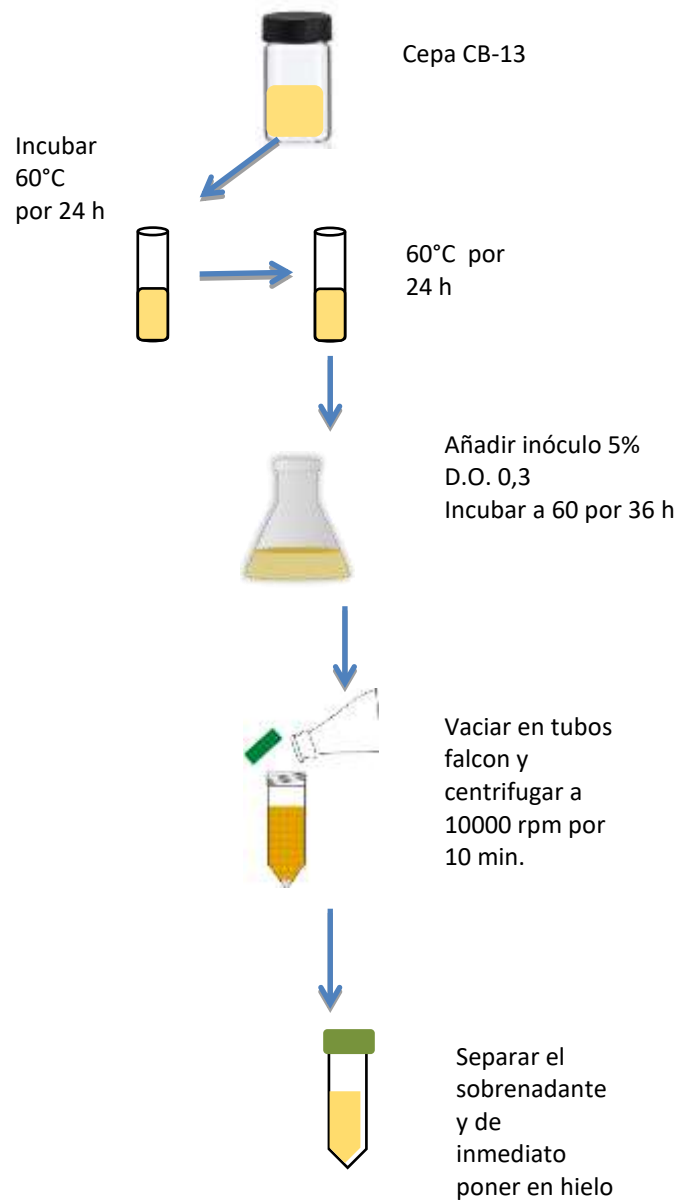
Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 2.** Fotografía de la producción de la enzima a partir de *Geobacillus thermoparaffinovorans* (CB-13) en medio líquido.



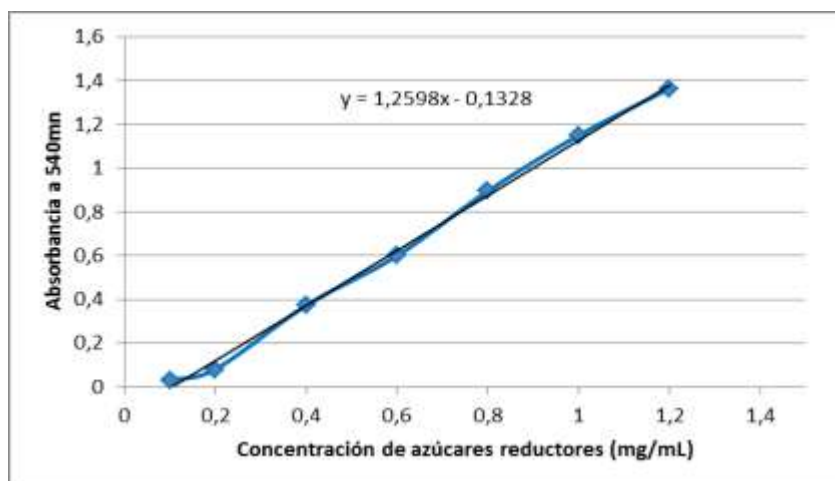
Fuente: Elaboración propia.

### ANEXO 3. Esquema del proceso de producción



Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 4.** Curva de calibración de la concentración de azúcares reductores.

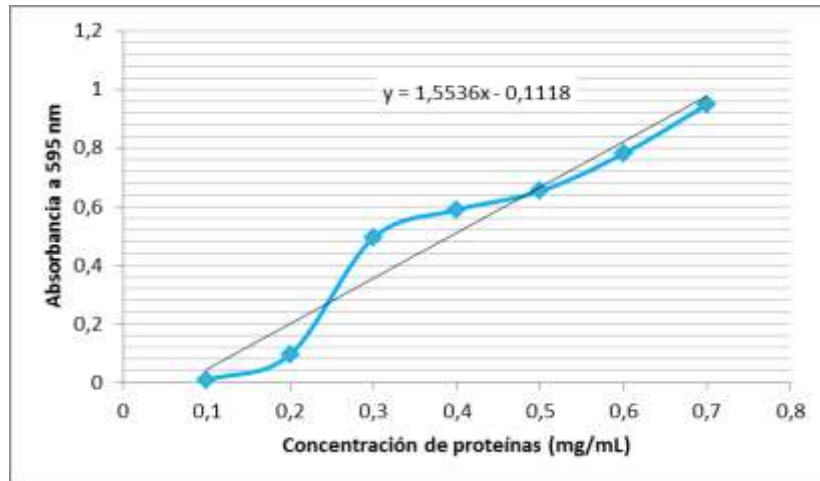


Fuente: Elaboración propia

Concentración (mg/mL)	I	II	Promedio
0,1	0,028	0,033	0,031
0,2	0,085	0,075	0,080
0,4	0,351	0,392	0,372
0,6	0,575	0,623	0,599
0,8	0,906	0,883	0,895
1	1,193	1,105	1,149
1,2	1,342	1,384	1,363

Fuente: Elaboración propia

**ANEXO 5.** Curva de calibración de la concentración de proteínas.

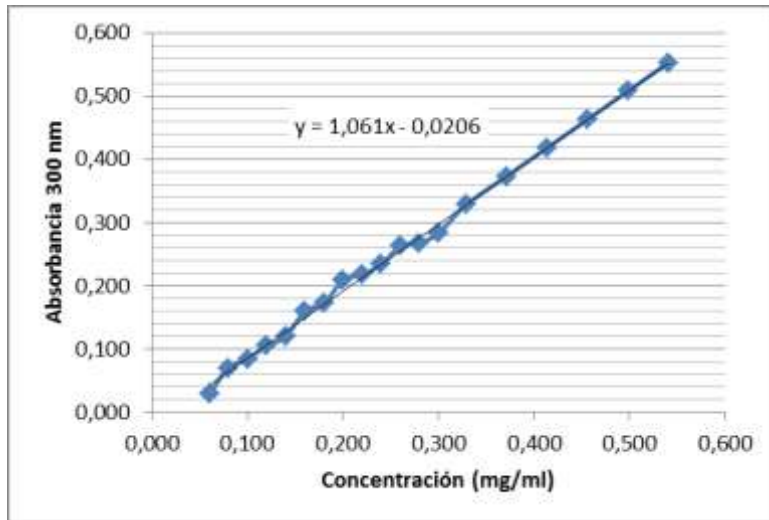


Fuente: Elaboración propia.

Concentración (mg/mL)	Repeticion I	Repeticion II	Promedio
0,1	0,0125	0,0035	0,0080
0,2	0,0865	0,1045	0,0955
0,3	0,4695	0,5175	0,4935
0,4	0,6155	0,5625	0,5890
0,5	0,6415	0,6635	0,6525
0,6	0,7555	0,8065	0,7810
0,7	0,9385	0,9575	0,9480

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 6.** Curva de calibración de la tinta.

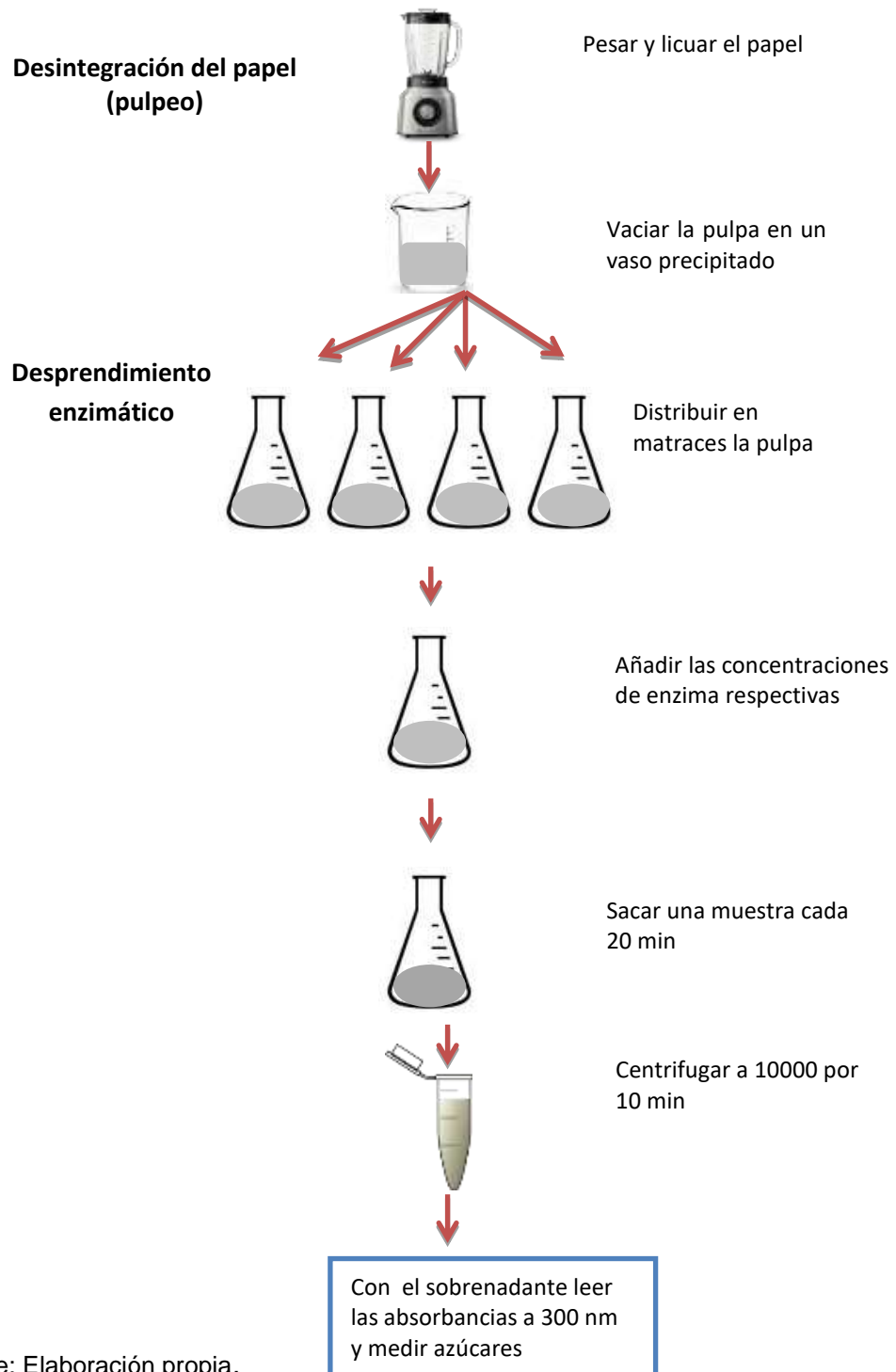


Fuente: Elaboración propia.

<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>Absorbancia (nm)</b>
0,060	0,029
0,080	0,070
0,100	0,084
0,120	0,105
0,140	0,120
0,160	0,160
0,180	0,172
0,200	0,209
0,220	0,218
0,240	0,234
0,260	0,263
0,280	0,268
0,300	0,283
0,3286	0,328
0,3710	0,373
0,4134	0,418
0,4558	0,463

Fuente: Elaboración propia.

## ANEXO 7. Esquema del desprendimiento de tinta.



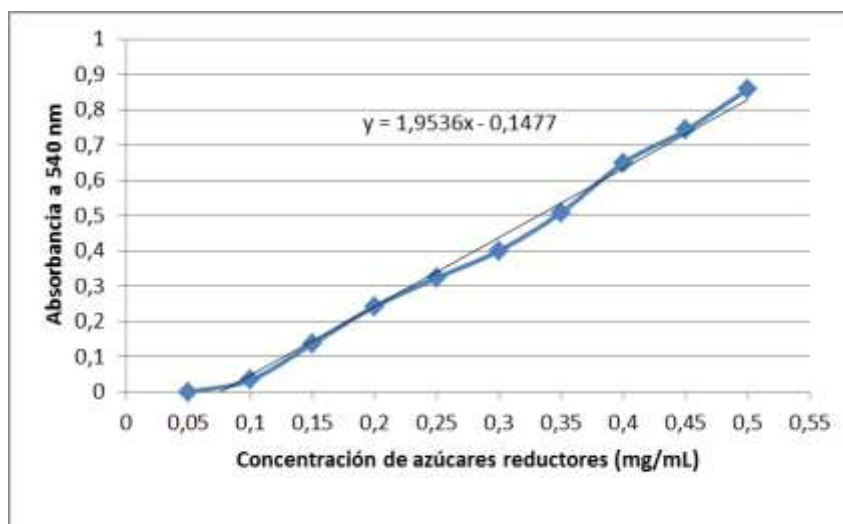
Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 8.** Fotografía de lectura de las absorbancias de tinta residual



Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 9.** Curva de calibración de la concentración de azúcares reductores para el desprendimiento de tinta



Fuente: Elaboración propia.

<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>Promedio</b>
0,05	0	0	0,000
0,1	0,027	0,041	0,034
0,15	0,135	0,139	0,137
0,2	0,246	0,238	0,242
0,25	0,338	0,309	0,324
0,3	0,406	0,395	0,401
0,35	0,489	0,528	0,509
0,4	0,622	0,677	0,650
0,45	0,737	0,747	0,742
0,5	0,855	0,861	0,858

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 10.** Datos del tiempo de mayor producción enzimática.

<b>Tiempo (horas)</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Actividad en U/ml</b>	<b>Promedio U/ml</b>
<b>0</b>	I	0,028	0,027
	II	0,026	
	III	0,029	
<b>12</b>	I	0,065	0,070
	II	0,074	
	III	0,072	
<b>24</b>	I	0,154	0,158
	II	0,161	
	III	0,158	
<b>36</b>	I	0,511	0,505
	II	0,565	
	III	0,438	
<b>48</b>	I	0,351	0,349
	II	0,333	
	III	0,362	
<b>60</b>	I	0,122	0,122
	II	0,128	
	III	0,116	

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 11.** Datos del tiempo de mayor concentración de proteínas

Tiempo (horas)	Repeticiones	Concentración de proteínas (mg/ml)		Promedio
		I	II	
0	I	0,094		0,095
	II	0,083		
	III	0,107		
12	I	0,113		0,115
	II	0,117		
	III	0,116		
24	I	0,121		0,128
	II	0,129		
	III	0,134		
36	I	0,193		0,195
	II	0,203		
	III	0,188		
48	I	0,192		0,197
	II	0,217		
	III	0,182		
60	I	0,170		0,168
	II	0,166		
	III	0,168		

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 12.** Datos del efecto de la temperatura en la actividad enzimática

Temperatura (°C)	Actividad enzimática (U/ml)			Promedio	D.S.
	I	II	III		
	50	0,138	0,142		
60	0,233	0,245	0,239	0,239	0,006
70	0,258	0,262	0,252	0,257	0,005
80	0,159	0,160	0,163	0,161	0,002

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 13.** Datos del efecto del pH en la actividad enzimática.

pH	Actividad enzimática (U/ml)			Promedio	D.S.
	I	II	III		
	5	0,153	0,169		
6	0,233	0,245	0,239	0,239	0,006
7	0,194	0,211	0,192	0,199	0,011
8	0,137	0,127	0,119	0,128	0,009

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 14.** Datos del sustrato papel sobre la actividad enzimática

Sustrato pulpa %	Actividad enzimática (U/ml)			Promedio	D.S
	I	II	III		
0,4	0,020	0,020	0,020	0,020	0,0001
0,6	0,021	0,021	0,020	0,021	0,0004
0,8	0,022	0,023	0,023	0,023	0,0006
1	0,023	0,025	0,025	0,024	0,0010
1,2	0,025	0,023	0,024	0,024	0,0010
1,4	0,022	0,023	0,023	0,023	0,0006
1,6	0,024	0,022	0,022	0,023	0,0016

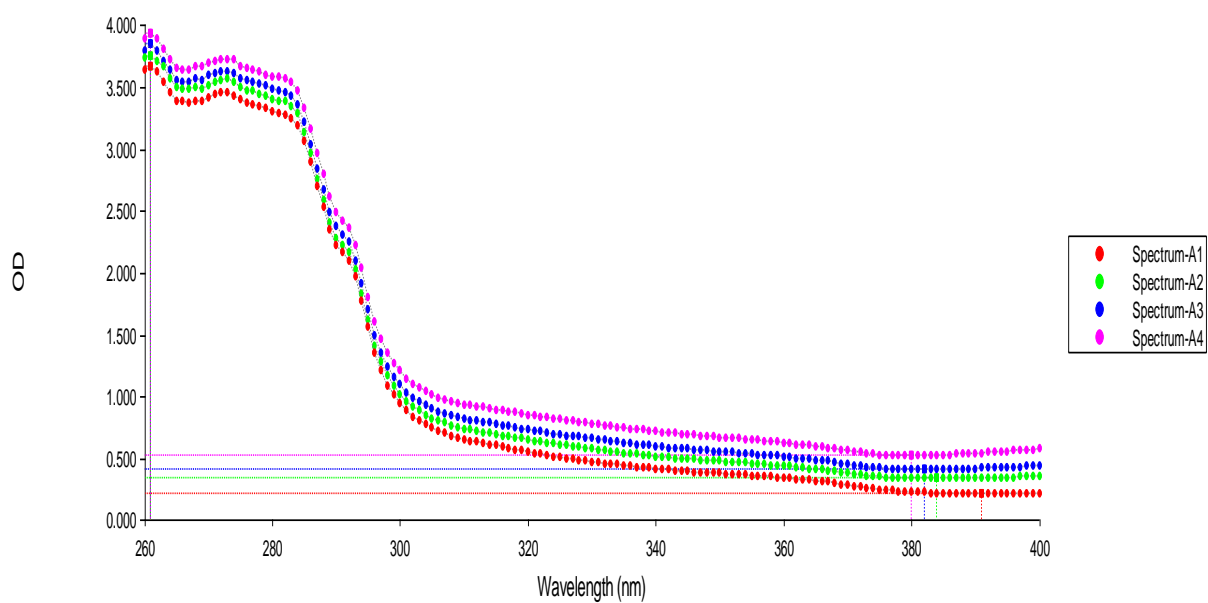
Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 15.** Datos de dosis del extracto enzimático sobre la actividad enzimática

Dosis de extracto %	Actividad enzimática (U/ml)			Promedio	D.S
	I	II	III		
1	0,021	0,021	0,022	0,021	0,0002
5	0,021	0,023	0,022	0,022	0,0011
10	0,026	0,024	0,024	0,025	0,0006
15	0,026	0,025	0,026	0,026	0,0005
20	0,026	0,025	0,024	0,025	0,0006
25	0,023	0,026	0,023	0,024	0,0016

Fuente: Elaboración propia

**ANEXO 16.** Barrido espectral de la tinta a absorbancias de 260 a 400 cada 20 nm.



Fuente: Software Gen 5

**ANEXO 17.** Datos del desprendimiento enzimático.

Tiempo (Minutos)	Dosis del extracto enzimático 10%			Dosis del extracto enzimático 15%			Dosis del extracto enzimático 20%		
	<b>0</b>	0,1216	0,1244	0,1225	0,2149	0,2187	0,2300	0,2724	0,2686
<b>20</b>	0,1942	0,2205	0,2187	0,1951	0,2997	0,2545	0,3195	0,3205	0,3176
<b>40</b>	0,2177	0,2234	0,2177	0,2319	0,2394	0,2319	0,3732	0,3572	0,3544
<b>60</b>	0,2488	0,2432	0,2714	0,2667	0,2281	0,2205	0,3073	0,3101	0,3214
<b>80</b>	0,1772	0,1649	0,1678	0,2111	0,2074	0,1989	0,2837	0,2771	0,2809
<b>100</b>	0,1913	0,1951	0,2064	0,2281	0,2337	0,2356	0,3110	0,3242	0,3157
<b>120</b>	0,2149	0,1923	0,1791	0,2224	0,2253	0,2413	0,3129	0,3176	0,2931
<b>140</b>	0,1781	0,1810	0,1810	0,2205	0,2139	0,2111	0,2959	0,2441	0,3242
<b>160</b>	0,1791	0,1697	0,1791	0,2121	0,2111	0,2130	0,2837	0,2893	0,2856
<b>180</b>	0,1687	0,1715	0,1753	0,2205	0,1828	0,2205	0,2893	0,2893	0,2743
<b>200</b>	0,1697	0,1725	0,1734	0,2055	0,2036	0,2130	0,2799	0,2922	0,2865

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 18.** Datos de la concentración de azúcares reductores del desprendimiento de tinta

Tiempo	mg/mL	mg/mL	mg/mL	Promedio
0	0,0145	0,0205	0,0205	0,0185
20	0,181	0,179	0,176	0,1787
40	0,217	0,216	0,213	0,2153
60	0,236	0,257	0,261	0,2513
80	0,309	0,316	0,314	0,3130
100	0,404	0,385	0,38	0,3897
120	0,401	0,345	0,359	0,3683
140	0,424	0,314	0,367	0,3683
160	0,316	0,373	0,388	0,3590
180	0,379	0,324	0,372	0,3583

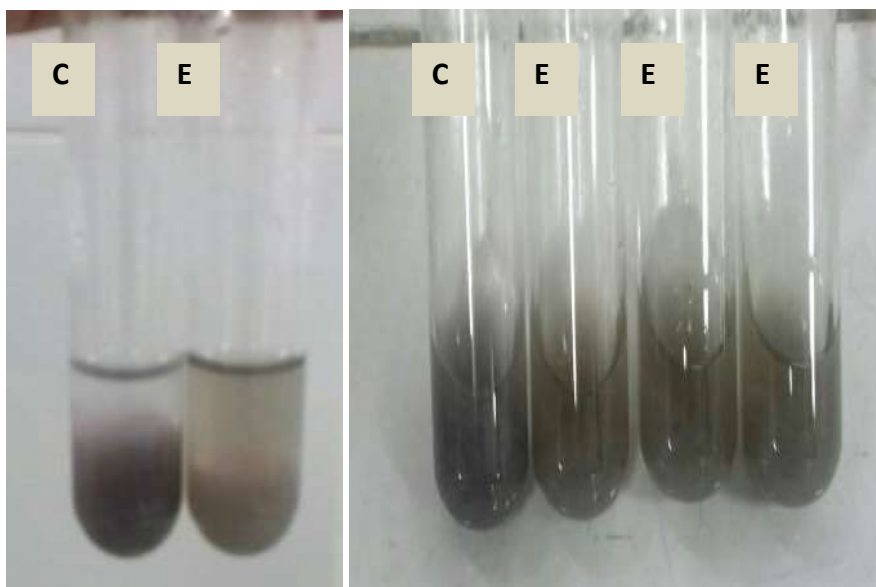
Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 19.** Fotografía de la pulpa para destintar



Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 20.** Fotografía de la pulpa tratada con el extracto crudo enzimático amilolítico.



Fuente: Elaboración propia.

En el lado izquierdo (C) se observa una pulpa control sin tratamiento enzimático y al lado derecho (E) la pulpa tratada con enzima amilolítica.

**ANEXO 21.** Fotografía de la medición de curvas de calibración con lector de placa



Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 22.** Fotografía del espectrofotómetro para medir las absorbancias de actividad enzimática



Fuente: Elaboración propia.



Dr. Roberto Castellanos Cabrera  
ASESOR



Bach. Delsy Mirian Espinal Quiñonez  
TESISTA