

Obtención de extractos amilolíticos de hongos filamentosos mediante fermentación en estado sólido (FES) de residuos de ñame morado (Dioscorea alata)

Angélica Galviz-Quezada ^a, Víctor Manuel Osorio-Echeverri ^b

^a Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín

^b Grupo de Investigación en Biociencias. Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia

Resumen. Las amilasas, son uno de los grupos más importantes de enzimas utilizadas en numerosos procesos biotecnológicos como la conversión de almidón para obtener jarabes de azúcar, producción de ciclodextrinas para la industria farmacéutica, producción de papel y detergente, entre otros. Para producir estas enzimas se prefiere el uso de microorganismos debido a su corto período de crecimiento, mayor productividad y termoestabilidad. Se han reportado hongos productores de amilasas, incluidos *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Candida* y *Penicillium*, que utilizan como sustrato desechos de la industria agrícola mediante fermentación en estado sólido (FES). En esta investigación se evaluó la producción de extractos amilolíticos por *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium* sp. Se realizó un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial 3x2, cuyos factores fueron hongo (*A. niger*, *A. fumigatus* y *Fusarium* sp.) y porcentaje de harina de ñame morado (10 y 20% p/p - g sustrato/g soporte). La variable respuesta fue la actividad específica que se denota como la unidad de actividad enzimática (U) dividida por la cantidad de proteína total. Los análisis realizados mostraron que la actividad enzimática específica más alta se obtuvo con los extractos obtenidos de la fermentación de ñame al 20% p/p para *A. fumigatus*. El valor promedio de la actividad específica para este tratamiento fue 0.241 U/mg equivalente de BSA.

Palabras clave: fermentación en estado sólido, amilasas fúngicas, ñame morado

Introducción.

Uno de los grupos más importantes de enzimas industriales son las amilasas; estas cubren el 30% de la producción mundial de enzimas. Las amilasas se usan en numerosos procesos biotecnológicos como la conversión de almidón para obtener jarabes de azúcar, producción de ciclodextrinas para la industria farmacéutica, producción de papel y detergente, tratamiento de aguas residuales y para el pretratamiento de alimentos para animales, incluso tienen aplicaciones en biocombustibles, textiles, medicina y química analítica (Nwamaka and Ndubuisi, 2011; Sivaramakrishnan et al., 2006). El almidón se degrada a azúcares simples, como glucosa, maltosa u oligosacáridos, maltooligosacáridos o dextrinas por enzimas como las endoamilasas (α -amilasa), exo-amilasas (β -amilasa), enzimas de desramificación y glicosiltransferasas (Nwamaka and Ndubuisi, 2011). Para producir estas enzimas se prefiere el uso de microorganismos debido a su corto período de crecimiento, mayor productividad y termoestabilidad. La producción de amilasas por microorganismos depende de las condiciones de crecimiento como el sustrato, el requerimiento de iones metálicos, el pH y la temperatura (Nwamaka and Ndubuisi, 2011). Todas esas condiciones están determinadas principalmente por los recursos microbianos y las fuentes de carbono. Por esta razón, los microorganismos nativos con la capacidad de producir enzimas como los hongos filamentosos y fuentes de carbono económicas fácilmente disponibles, como los desechos agroindustriales, han sido una alternativa para mejorar y aumentar la producción de enzimas a nivel industrial (Okorie, 2010; Zambare, 2010). Se han reportado hongos productores de amilasa como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Penicillium*, entre otros (Nwamaka and Ndubuisi, 2011), utilizando residuos de la industria agrícola, por ejemplo, salvado de trigo, salvado de maíz, harina de soja y bagazo de caña de azúcar (Rodrigues et al., 2016). Entre los hongos filamentosos, *Aspergillus* es el género más utilizado para la producción de este tipo de enzimas (Rodrigues et al., 2016). La FES se ha utilizado ampliamente para obtener enzimas debido a que este método de fermentación permite la valorización de los desechos agrícolas para la producción de productos valiosos como las enzimas; este tipo de fermentación se caracteriza por el crecimiento del microorganismo en ausencia de agua libre (Rodrigues et al., 2016) sobre una matriz como salvado de trigo, cáscara

de arroz, cáscara de plátano, salvado de maíz, harina de soya, bagazo de caña de azúcar, entre otros, que le proporciona nutrientes y un soporte a los microorganismos (Ooijkaas et al., 2000; Rodrigues et al., 2016). Sin embargo, hay otras matrices ricas en almidón, como el ñame blanco y el ñame morado, que pueden implementarse como sustrato en la producción de amilasas.

Objetivo.

Evaluar la producción de extractos amilolíticos de tres hongos filamentosos mediante fermentación en estado sólido utilizando residuos de ñame morado como sustrato.

Materiales y métodos.

Se realizó un diseño previo unifactorial para evaluar el porcentaje de harina de ñame p/p (50, 30, 20 y 10%) como sustrato para el crecimiento y la producción de extractos enzimáticos de *Penicillium* sp. El segundo diseño se realizó utilizando un diseño factorial completo 3x2 cuyos factores fueron el hongo (*A. niger*, *A. fumigatus* y *Fusarium* sp.) y el porcentaje de harina de ñame (10 y 20% p/p - g sustrato-ñame /g soporte). La variable de respuesta evaluada para los dos experimentos fue la actividad específica que se denota como la unidad de actividad enzimática (U) dividida por la cantidad de proteína total.

Se utilizó harina de ñame morado obtenida a partir de residuos provenientes de extracciones por solvente para la obtención de colorantes. Se utilizó perlita como soporte inorgánico. La fermentación se realizó en frascos de compota adicionando 4g de la mezcla (sustrato/soporte) y 3 mL de solución de inóculo a una concentración de 1×10^6 esporas por mL hasta alcanzar una humedad del 60%. Las unidades experimentales se incubaron a 30 °C durante 8 días (Irfan, Nadeem, & Syed, 2012) y posteriormente se añadieron 15ml de solución tampón fosfato 0,1 M (pH 7.0) a los frascos de cultivo y se mezclaron a temperatura ambiente (27 °C). Se tomó el lixiviado de la muestra, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos (Irfan et al., 2012; Kalaiarasi & Parvatham, 2013) y con el sobrenadante se realizó una reacción

enzimática con el fin de evaluar la actividad específica de los extractos y se determinó la concentración de azúcares reductores por el método del DNS, la concentración de proteína total por el método de Lowry y la actividad expresada como U/mg de equivalentes de BSA.

Resultados y discusión.

En el diseño unifactorial los valores de actividad específica estuvieron entre 0.11 y 0.24 U/mg⁻¹. Se observó una inhibición en el crecimiento de *Penicillium* sp. a una concentración de sustrato de 40 y 50%. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Se observó una disminución de la actividad cuando la concentración de harina de ñame fue del 50%. Estos resultados sugieren que altas concentraciones de sustrato podrían inhibir el crecimiento de hongos debido a la disminución de la porosidad en el soporte. Para un crecimiento óptimo de hongos en materiales sólidos, es necesario asegurar una buena transferencia de oxígeno; debido a que el sustrato era harina, la adición de la solución de inóculo pudo compactar el soporte, reduciendo la porosidad del soporte y, por lo tanto, dicha transferencia. Se consideraron tratamientos con 10 y 20% de harina de ñame morado para los posteriores experimentos.

En el diseño factorial general se observó un efecto de interacción significativo entre el hongo y la harina de ñame ($p < 0.05$) sobre la actividad, sin embargo, el efecto más significativo lo tuvo el hongo. El análisis estadístico mostró efectos significativos entre los factores ($p < 0.05$). Se obtuvieron valores de actividad específica más bajos usando 10% de harina de ñame morado. Estos resultados difieren con los observados en el diseño unifactorial donde se obtuvo el valor AE más alto con 10% de harina de ñame morado. Esto podría deberse a que en el diseño unifactorial no se utilizaron tratamientos control, y los resultados no discriminan entre azúcares reductores y proteínas totales presentes en el sustrato, además del uso de hongos diferentes en los dos diseños.

Según nuestros resultados, *A. fumigatus* produce enzimas con mayor actividad específica pero a una menor cantidad que los hongos *A. niger* y *Fusarium sp.* evaluados en este trabajo y la concentración de harina de ñame morado debe ser del 20% para esta fermentación. Bajo estos parámetros la actividad específica, proteínas totales y azúcares reductores fueron de 0.241 mg mL⁻¹, 0.175 mg mL⁻¹ y 1.126 U mg⁻¹ respectivamente. En contraste, Castañeda-Casasola et al., (2018) informaron resultados diferentes. En ese trabajo, los autores observaron una mayor producción de enzimas hidrolíticas por *A. fumigatus* en FES en comparación con *A. niger* incluso observaron que *A. niger* tuvo una mejor producción de enzimas hidrolasas en la fermentación líquida (Castañeda-Casasola et al., 2018). El género *Aspergillus* es considerado como uno de los mayores productores de enzimas amilolíticas utilizadas en la industria, entre las especificadas como *Aspergillus oryzae* y las enzimas amilasas de *Aspergillus niger* son de gran interés porque son viables a un pH bajo (menos de 3) además que las amilasas fúngicas se consideran compuestos seguros para el medio ambiente GRAS (Souza et al., 2010).

Conclusiones.

Altos porcentajes de harina de ñame dificultan el crecimiento del hongo ya que disminuyen la porosidad del soporte, lo que dificulta la transferencia de oxígeno y la capacidad de hidrolizar el almidón como fuente de carbono.

Los tres hongos evaluados son capaces de producir extractos con capacidad amilolítica utilizando residuos de ñame morado como sustrato.

A. fumigatus tiene una mayor capacidad de producción de enzimas de tipo amilasas con mayor actividad específica utilizando 20% p/p de harina de ñame en comparación con *A. niger* y *Fusarium sp.*

Referencias.

Berfeld P. (1995). Amylases a and b. *Methods Enzimology*. 1, 149-158.

- Egas, M., Milton, C., Cowan, D. (1998). Extracellular amylase from *Thermus filiformis*. Ork a2: purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, 2, 23-32.
- Irfan, M., Nadeem, M., & Syed, Q. (2012). Media optimization for amylase production in solid state fermentation of wheat bran by fungal strains. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 10(3), 55–64.
- Kalaiarasi, K., & Parvatham, R. (2013). Optimization of process parameters for α - amylase production under solid-state fermentation by *Bacillus cereus* MTCC 10202. *African Journal of Microbiology Research*, 7(45), 5166–5177.
- Khan, J. A., & Yadav, S. K. (2011). Production of alpha amylases by *Aspergillus niger* using cheaper substrates employing solid state fermentation. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 1(3), 100–108.
- Padmini, N. D., Bhattacharya, S., Das, A., & Rajan, S. S. (2012). Solid - State Fermentation and characterization of α -Amylase from a rhizospheric isolate of *Aspergillus flavus* associated with *Mangifera indica*. *Annals Og Biological Research*, 3(8), 4082–4090.
- Saxena, R., & Singh, R. (2011). Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1334–1342.
- Varalakshmi, K. N., Kumudini, B. S., Nandini, B. N., Solomon, J., Suhas, R., Mahesh, B., & Kavitha, P. (2009). Production and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore. *Polish Journal of Microbiology*, 58(1), 29–36.