
EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE CONSERVACIÓN PARA *Aspergillus niger* CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA AMILOLÍTICA

I. Henao², M. Franco-Correa¹, G. Marín¹

¹ Laboratorio de Microbiología Ambiental. Departamento de Microbiología.
Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana,
Cra. 7 No. 43-82 Bogotá, Colombia.

² Laboratorio Central. Investigación de la Calidad. Dirección de Calidad.
Leona S.A., Tocancipá, Colombia.
ihenaopa@leona.com.co, franco@javeriana.edu.co

RESUMEN

Se evaluaron 6 metodologías de conservación para hongos filamentosos con actividad enzimática amilolítica, bajo parámetros de viabilidad, pureza y actividad enzimática durante cuatro meses. Se utilizó para este trabajo la cepa nativa de *Aspergillus niger* SMB14M3 como microorganismo experimental por poseer actividad enzimática amilolítica amiloglucosidasa. La máxima actividad enzimática amilolítica atribuida a la amiloglucosidasa sobre la maltosa, se presentó a las 36 horas de fermentación, con un valor de 2.805 unidades ($\text{imol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$). El rango óptimo de actividad del extracto enzimático está en valores de pH que van desde 3 hasta 5 y 60°C de temperatura. Se evaluó la viabilidad del microorganismo conservado en diferentes métodos determinándose que los mejores son la conservación en agua destilada suplementada con NaCl al 0,85% y el suelo. No se observa que la pureza del microorganismo se vea afectada al igual que la actividad enzimática en el momento del uso experimental.

Palabras clave: actividad enzimática, amiloglucosidasa, *Aspergillus niger*, hongos filamentosos, conservación microbiana.

ABSTRACT

Six experimental methods for conservation of filamentous fungi with amylolytic activity were evaluated according to the parameters: viability, purity and enzyme activity, over a period of four months. In this research, the wild-type of filamentous fungus *Aspergillus niger* SMB14M3 was used because it showed amylglucosidase amylolytic enzyme activity. The maximum amylolytic enzyme activity, attributed to amylglucosidase upon maltose, was encountered at 36 hours of fermentation, with a value of 2.805 units ($\text{imol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$). The optimal pH range for enzyme activity is from 3 to 5 and the temperature is 60° C. The viability of the fungus when preserved the by the different methods was evaluated, and it was determined that the best methods were: soil and distilled water + 0.85 % w/v NaCl. Neither the purity of the microorganism nor its enzyme activity was affected when the fungus was used in experiments.

Key words: enzymatic activity, amylglucosidase, *Aspergillus niger*, filamentous fungi, long term microorganism preservation

INTRODUCCIÓN

La preservación y el almacenamiento prolongado de microorganismos con importancia económica, los cuales tienen la capacidad de producir altos rendimientos de metabolitos deseables en fermentaciones a gran escala, es de vital importancia para un proceso de fermentación exitoso (Hesseltine y Hayes, 1973). Dentro de las condiciones necesarias para conservar correctamente las cepas microbianas en laboratorios de microbiología se encuentran pureza del cultivo, evitando contaminaciones durante el proceso de conservación; viabilidad celular del 70 - 80% durante el tiempo de conservación, y estabilidad genética de las células (García y Uruburú, 1991). Un proceso biotecnológico importante es el cervecero, en el cual se utilizan metabolitos microbianos. Para producir el etanol que contiene la cerveza se debe llevar a cabo el proceso de degradación del almidón, donde se utilizan enzimas amilolíticas que generalmente se encuentran en la malta. Si la concentración de enzimas amilolíticas presentes en la malta no es suficiente, se hace necesario suministrar enzimas amilolíticas exógenas, que por lo general son de origen microbiano. La amiloglucosidasa, una enzima amilolítica, es utilizada en el proceso cervecero para producir cervezas con bajo contenido calórico o con alto contenido de alcohol, porque su finalidad es degradar las dextrinas producidas por acción de la α -amilasa o la maltosa por la β -amilasa y finalmente producir glucosa. Esta enzima es producida comercialmente por cepas de hongos filamentosos en especial por *Aspergillus niger*. La finalidad de este trabajo fue determinar las metodologías más convenientes para la conservación de hongos filamentosos sin que afectaran la actividad amilolítica amiloglucosidasa y con esta base poder plantear la posibilidad de desarrollar investigaciones que permitan conservar a largo plazo las actividades enzimáticas dentro del proceso cervecero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo empleado

La cepa nativa *Aspergillus niger* SMB14M3 seleccionada para este estudio fue obtenida de la colección de microorganismos del Laboratorio de Microbiología de Aguas, la cual fue aislada con anterioridad de una industria cervecera ubicada en el altiplano Cundiboyacense. Los cultivos fueron mantenidos en agar maltosa al 2% p/v (extracto de levadura (Oxoid, Basingstoke, England) 0,5 g/l, maltosa (Merck, Darmstadt, Germany) 20,0 g/l, Cloruro de calcio (Merck, Darmstadt, Germany) 0,5 g/l, sulfato de amonio (Carlo Erba, Milan, Italia) 0,5 g/l, fosfato monobásico de potasio (Merck, Darmstadt, Germany) 0,2 g/l, fosfato dibásico de potasio (Merck, Darmstadt, Germany) 0,2 g/l), agar bacteriológico (Oxoid, Basingstoke, England) 14,0 g/l) hasta el momento del uso experimental. La confirmación de la identificación del microorganismo se realizó mediante el uso de claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1975; Hoekstra *et al.*, 1981; Watanabe, 1994).

Curva de crecimiento

Las curvas de crecimiento fueron llevadas a cabo en erlenmeyers de 250 ml de capacidad bajo agitación a 120 rpm, conteniendo 50 ml de caldo maltosa al 2% p/v. Todas las curvas de crecimiento fueron realizadas por triplicado, durante 5 días a 25°C. Adicionalmente se realizó un conteo de conidios en cámara de Neubauer (Vélez *et al.*, 1997) y la medición de biomasa por peso seco (Collins *et al.*, 1995).

Determinación cuantitativa de la actividad amilolítica

Se determinó la actividad amiloglucosidasa de la cepa nativa de *Aspergillus niger* SMB14M3, cuantificando los azúcares reductores utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Millar, 1959,

citado por Beltrán y Maldonado, 2002), durante la curva de crecimiento diariamente durante 5 días.

Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática fue determinado en un rango de 10 a 70°C en rangos de 10°C, utilizando el extracto crudo de la muestra, luego de ser centrifugado (3000 rpm por 10 min) para separar las células (Schrickx *et al.*, 1993). La maltosa se utilizó como sustrato en proporciones 1:1 y el buffer fosfato a una concentración de 1:10 v/v a pH 5.5. El pH óptimo de actividad amiloglucosidasa se evaluó entre pH 2.0 - 12.0 utilizando soluciones buffer fosfato 1:10 v/v con el extracto crudo y la solución de maltosa a una temperatura de 25°C; las muestras se incubaron durante 30 minutos (Beltrán y Maldonado, 2002).

Evaluación de los métodos de conservación

Se evaluaron 6 métodos de conservación al final del período de 4 meses de tratamiento, crioconservación en glicerol al 10%, conservación por transferencia seriada, en agua destilada, bajo una capa de aceite mineral, en suelo y en tierra diatomácea. La viabilidad se midió mediante recuento en placa en profundidad, se determinó la pureza durante el periodo de conservación y se estableció el cambio de las características morfológicas tanto a nivel macroscópico como microscópico (Kirsop, 1991; Watanabe, 1994). La actividad enzimática se evaluó comparando los valores obtenidos en la curva de crecimiento con los obtenidos en los diferentes tiempos de evaluación.

Análisis estadístico

Para la medición de las variables en estudio se tomaron al azar 10 viales de cada una de

las metodologías de conservación del último tiempo de evaluación que fue el cuarto mes. Para determinar si existía diferencia en el promedio de células viables y la producción enzimática con cada método de conservación y así mismo entre los diferentes métodos, en los tiempos evaluados, se realizó una prueba de análisis de varianza con diseño de bloques completamente aleatorizados. Previo al ANOVA se comprobó normalidad de las variables mediante prueba de Shapiro Wilk y con el objeto de determinar diferencias significativas entre la viabilidad promedio de cada método se utilizó la prueba de Bonferroni con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el programa Statlets 2.0 (Statpoint, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curva de crecimiento

Para cada fermentación se preparó un inóculo con el fin de disminuir el tiempo de duración de la fase de adaptación. La figura 1 presenta la curva de crecimiento de la cepa nativa de *Aspergillus niger* SMB14M3. La concentración celular inicial en la curva del microorganismo fue 8.4×10^4 conidios ml^{-1} y una biomasa inicial de 0.10 g l^{-1} . Se observó una tendencia a la disminución en el recuento de conidios en el transcurso de la fermentación y por otro lado, un aumento en la biomasa. Lo anterior demuestra que el medio aporta al microorganismo las condiciones nutricionales para el desarrollo vegetativo, de forma más significativa que en el estadio reproductivo, fase del desarrollo fúngico utilizada en la conservación de los hongos esporógenos (Simione y Brown, 1991). Como consecuencia de esto, esta fase no fue utilizada para llevar a cabo los inóculos durante la puesta en prueba de los métodos de conservación.

Es así que se decidió utilizar un medio nutritivo como el YGC para inducir el estadio

reproductivo. Este medio nutritivo ha sido reportado por estimular una rápida formación de conidios debido a que los nutrientes se encuentran ampliamente disponibles para el microorganismo, lo cual conlleva a que se consuman rápido generando una tensión nutricional. Este mismo fenómeno fue observado por Meza y Monroy (2002) al elaborar una curva de crecimiento con *Aspergillus niger* en medio líquido con agitación.

Determinación cuantitativa de la actividad amilolítica

En la figura 2 se observa que la máxima actividad atribuida a la enzima amiloglucosidasa sobre la maltosa se dio a las 36 horas de fermentación con un valor de 2.805 unidades ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$). Al comparar este valor con los obtenidos por Schrickx *et al.*, (1995) de 250 unidades ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) utilizando cepas genéticamente modificadas presentan la gran diferencia que hay entre el microorganismo nativo y el mejorado. Se pudo establecer que el tiempo máximo de producción enzimática es dependiente del microorganismo y de las con-

diciones de cultivo (Moreira *et al.*, 1999; Nahas y Waldemarin, 2002; Beltrán y Maldonado, 2002) al observarse que la actividad enzimática específica disminuye considerablemente a las 168 horas de fermentación como consecuencia de que el microorganismo en ese tiempo entró en la fase estacionaria de crecimiento donde los nutrientes comienzan a ser escasos.

Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática

En las figuras 3 y 4 se aprecia el rango óptimo de actividad enzimática. Con respecto al pH el rango entre 3 y 5, y la temperatura alrededor de los 60°C. Estudios realizados por Pandey *et al.* (1995) y Moreira *et al.* (1999) son similares a los obtenidos en este trabajo, donde reportan valores óptimos de pH entre 4.5-5.0 y 4-6 y temperatura entre 40-60°C y 50-60°C respectivamente. Beltrán y Maldonado (2002) reportan que esta enzima según su estabilidad a pH y temperatura, puede ser utilizada dentro del proceso cervecero, específicamente bajo las condiciones de las primeras fases de elaboración del mosto cervecero.

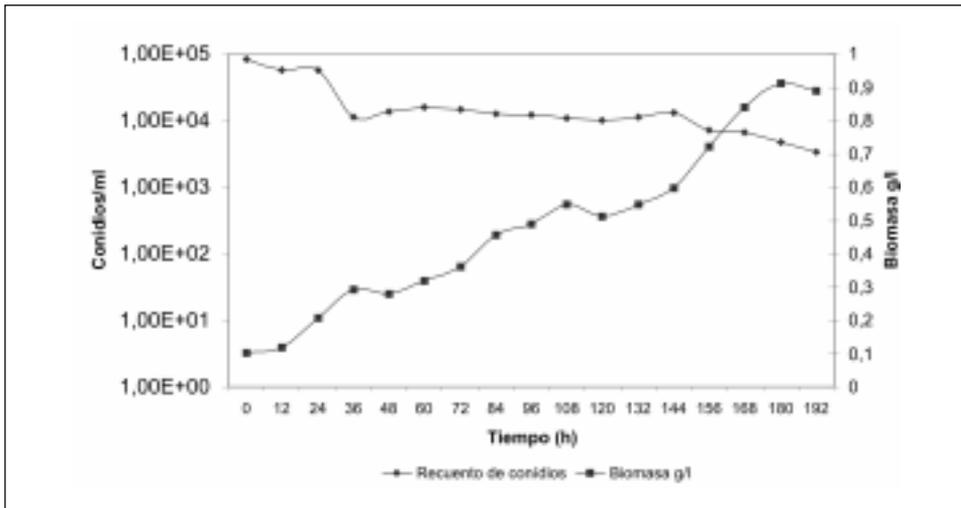


Figura 1. Curva de crecimiento de *Aspergillus niger* realizada durante 5 días a 25°C

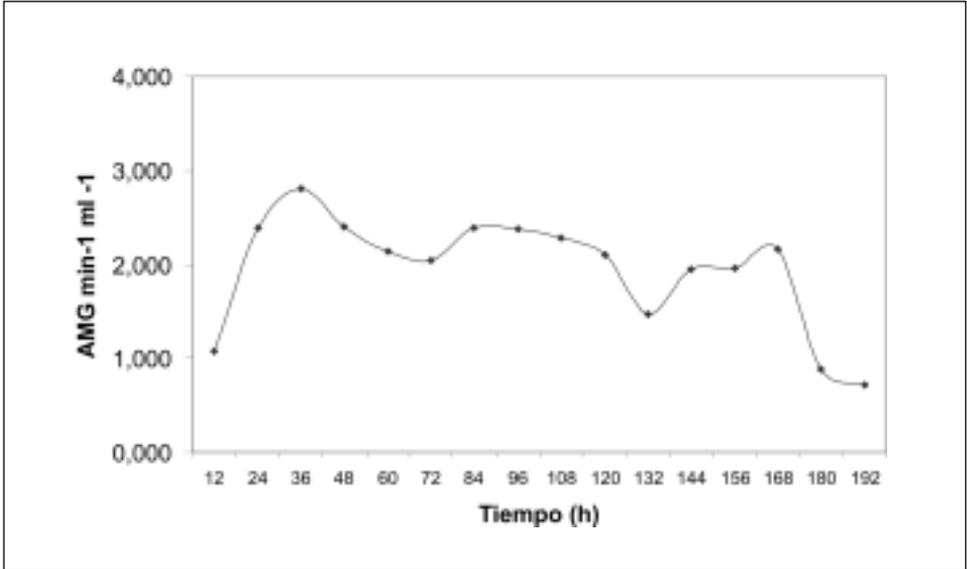


Figura 2. Actividad Amiloglucosidasa medida durante la curva de crecimiento (25°C- 5 días). Método del ácido 3,5-dinitrosalisílico.

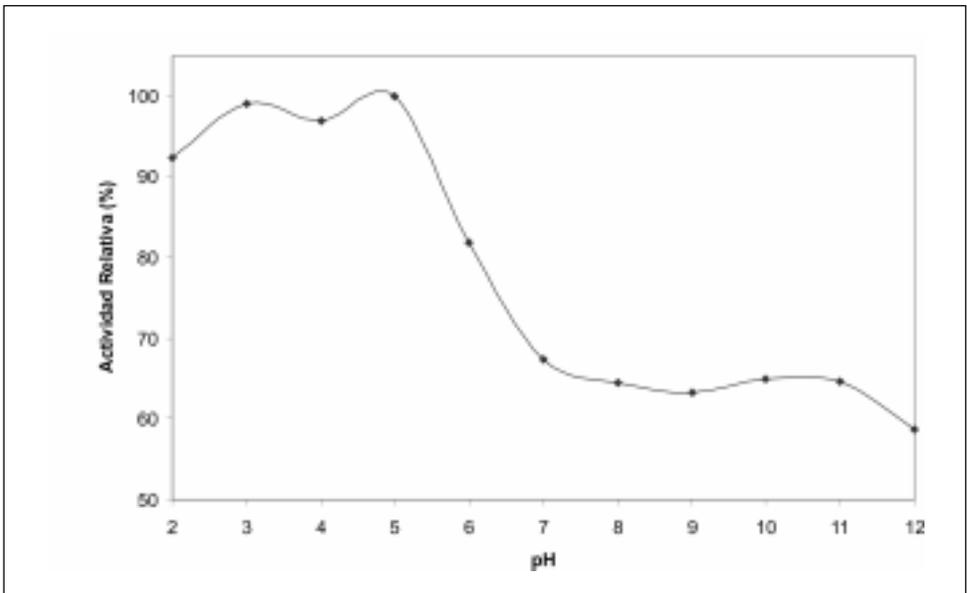


Figura 3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática amilolítica.

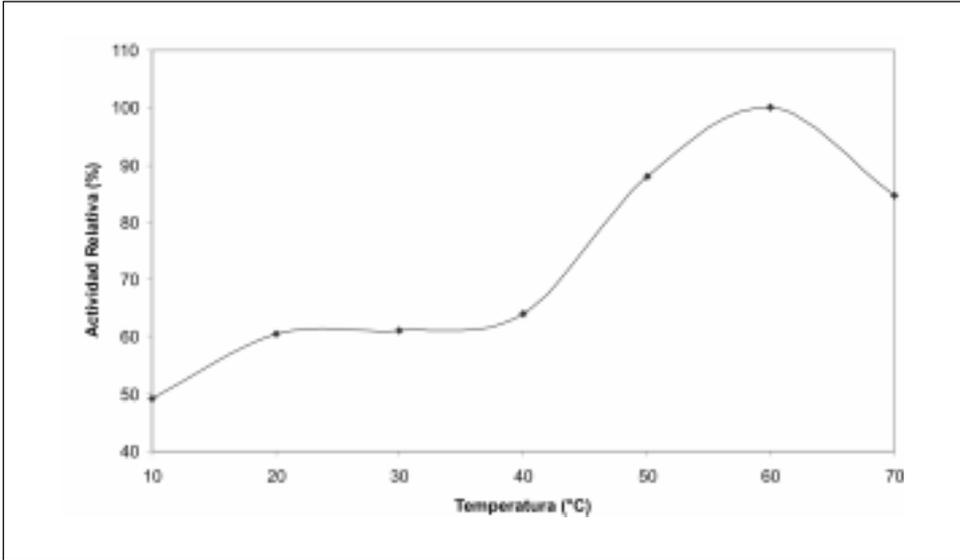


Figura 4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática amilolítica

Evaluación de los métodos de conservación

Como se observa en la figura 5, los métodos que aparentemente se encontraron por encima del umbral de aceptación de las técnicas, después de 4 meses de conservación, son todos los ensayados, excepto el de conservación bajo una capa de aceite mineral. Con esta evaluación se determinó que esta técnica no puede ser analizada experimentalmente bajo el mismo parámetro con que fueron evaluadas las anteriores, debido a que las técnicas instrumentales para llevar a cabo una correcta recuperación del microorganismo no ofrecen la confiabilidad necesaria. Lo anterior fue reportado debido a que a las 12 horas de conservación se determinó la pérdida de viabilidad, consecuencia que no se esperaba, debido a que el fundamento de la técnica es disminuir la tasa metabólica generada por la disminución de la transferencia de oxígeno. Esta pérdida de viabilidad posiblemente se atribuye a la naturaleza hidrófoba que tiene

tanto el aceite mineral como los conidios y que pudo haber conducido, a que en el momento de retirar la capa de aceite mineral, se hubiesen liberado conidios, generando una pérdida de propágulos.

Por otro lado, se debe tener en cuenta que la técnica de conservación bajo una capa de aceite mineral no detiene el metabolismo, por lo cual pueden generar alteraciones morfológicas y fisiológicas como pérdida de la capacidad esporulativa, atenuación o pérdida de virulencia entre otros (Borba y Rodríguez, 2000).

El análisis estadístico demostró que con el método de conservación en suelo se obtuvo viabilidad mayor que las demás (por encima del 80%) ($p=0.0548$), indicando que se presentaron más valores individuales en el porcentaje de viabilidad cercanos o por debajo del 80% al comparar los valores con las técnicas de crioconservación en glicerol, conservación en agua destilada

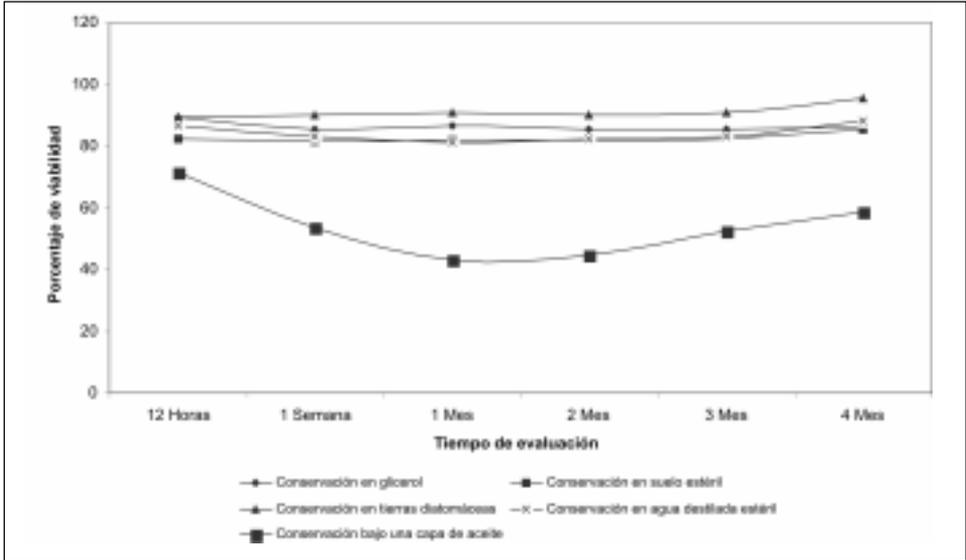


Figura 5. Porcentaje de recuperación celular de la cepa nativa de *Aspergillus niger* SMB14M3 conservado en los diferentes métodos

estéril y tierra diatomácea. Este fenómeno, reportado por Vásquez (2000), se pudo haber producido porque los conidios del hongo, posiblemente tienen afinidad con los agregados del suelo que no fueron desnaturalizados por el proceso de esterilización.

La técnica de crioconservación, durante el tiempo de evaluación fue aceptable ($p=0.0464$), el único inconveniente que afronta, es la temperatura de almacenamiento. En un estudio realizado por Meza y Monroy (2002), al comparar los porcentajes de viabilidad obtenidos al conservar por 6 meses, microorganismos como bacterias, levaduras y hongos filamentosos en glicerol al 10% v/v determinaron que los mayores porcentajes de viabilidad se dan al conservar los microorganismos a una temperatura de -70°C . Esto se debe a que a una temperatura de -20°C se encuentran mezclas eutécticas, que pueden ocasionar daños celulares (Kirsop y Snell, 1984; Greña, 1994).

La técnica de conservación en agua destilada estéril modificada con NaCl al 0,85% p/v ($p=0.0377$), permitió una mayor estabilidad en la técnica. Vásquez (2000) observó una disminución en la viabilidad de los microorganismos que evaluó por seis meses, fenómeno que según Kirsop & Snell (1991) lo reportan como consecuencia en la desestabilización de los procesos osmóticos, los cuales influyen en el daño citoplasmático, pudiendo afectar a algunas células con la consecuente disminución del recuento de UFC ml^{-1} . Este fenómeno fue disminuido para este trabajo con la adición de NaCl cuya concentración, mantiene el balance osmótico.

La conservación en tierra diatomácea estéril, obtuvo el valor probabilístico más bajo ($p=0.0007$) lo que indica que tuvo menos valores individuales de porcentaje de viabilidad cercanos o por debajo del 80% al ser comparado con las otras metodologías de conservación. El resultado se debió al

soporte que ofrece la tierra diatomácea, el cual es seguro pues se considera un material G.R.A.S. (generalmente reconocido como seguro) y no cabe la posibilidad de que contenga sustancias que a pesar de realizar el proceso de esterilización, sigan siendo reactivas y generen detrimento del microorganismo conservado, como sí se presenta en la conservación en suelo.

Con respecto a la pureza, ésta no se vio afectada ni el tiempo de conservación ni por ninguna de las técnicas.

Como se muestra en la figura 6, la evaluación de los métodos bajo el parámetro de la actividad enzimática, demostró que la transferencia seriada y comparada con las metodologías que se consideran apropiadas para la conservación no tiene diferencia estadísticamente significativa ($p=0.9971$). Estos resultados se originaron posiblemente debido a que el microorganismo antes de haber sido utilizado para el uso experimental y desde que fue aislado, se conservó por

transferencias seriadas en medios de cultivos nutritivos. Si el microorganismo poseía una actividad superior a la reportada por el trabajo actual, posiblemente se pudo haber perdido por no desarrollar una metodología de conservación que garantizara la estabilidad genética desde el aislamiento.

Se debe tener en cuenta que *Aspergillus niger* por su naturaleza es estable genéticamente (Raper y Fennell 1965), pero no garantiza que por transferencia seriada se generen mutaciones aleatorias. El microorganismo a través de los pases sucesivos se adaptó a las nuevas condiciones de cultivo, las cuales no propiciaron la actividad enzimática requerida y en el momento de la reactivación del microorganismo bajo condiciones similares al aislamiento primario, no se desarrolló la misma actividad, siendo ésta la explicación para haber observado la misma actividad enzimática en todos los métodos, incluido el de transferencia seriada.

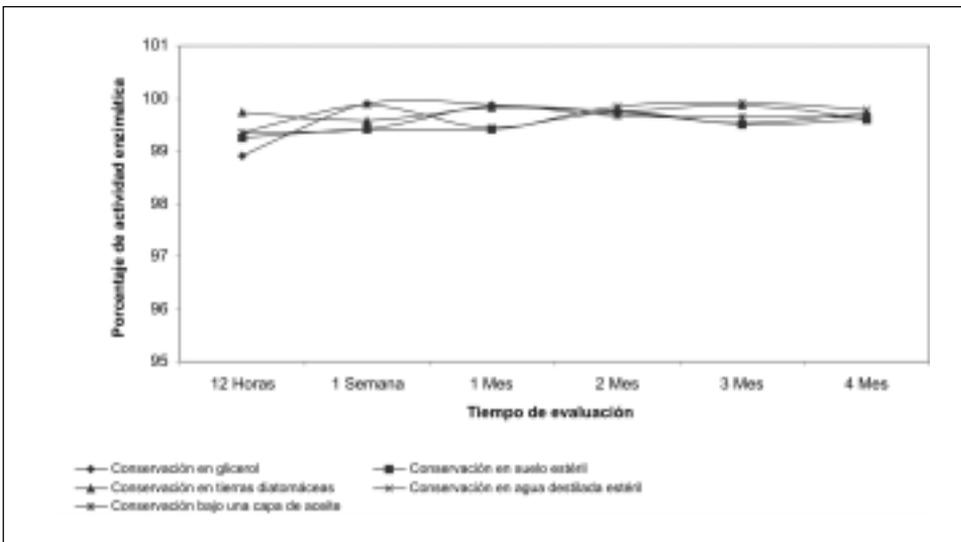


Figura 6. Porcentaje de actividad enzimática de la cepa nativa de *Aspergillus niger* SMB14M3 conservado en los diferentes métodos

CONCLUSIONES

Los métodos de conservación recomendados para este hongo y que no permitiera una fluctuación en la actividad enzimática evaluada, así como unos rangos de viabilidad altos fueron suelo y solución salina. Adicionalmente en la recuperación del hongo no se presentaron cambios morfológicos de ningún tipo. Se termina reafirmando que el uso del aceite mineral no es recomendable para la conservación de hongos.

El estudio experimental realizado permitió determinar que es muy importante escoger los medios de cultivo adecuados para cada hongo en el momento en que se desee producir los propágulos, debido a que no todos los hongos generan una rápida esporulación. Un ejemplo claro que se detectó en el proceso experimental fue que la maltosa al 2% p/v, no permitió un desarrollo óptimo del hongo *Aspergillus niger* al no permitir un estímulo en la actividad conidiogénica.

En relación con la actividad enzimática amilolítica (amiloglucosidasa), se presenta a las 36 horas de fermentación con un valor de 2.805 unidades ($\text{imol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$) y el rango de pH se encuentra entre 3 y 5, así como la temperatura fluctúa alrededor de los 60°C.

LITERATURA CITADA

- BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. 1975. Illustrated genera of imperfect fungi. Third edition. Burgess Publishing Company, Minneapolis, USA. 90 págs.
- BELTRÁN, Z.; MALDONADO K. 2002. *Caracterización microbiológica de cebada malteada y arroz y determinación de actividad enzimática amilolítica microbiana en el proceso de elaboración del mosto cervecero*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá D.C., Colombia. 111 págs.
- BORBA, C.M.; RODRÍGUEZ, K.F. 2000. Viability and sporulating capability of Coelomycetes preserved under a range of different storage regimes. *Rev Iberoam Micol* 17: 142-145.
- COLLINS, C.; LYNE, P. & GRANGE, J. 1995. *Microbiological methods*. Ed. Butterworth-Heinemann. Great Britain, 472 págs.
- GARCÍA, M.D.; URUBURU, F. 1991. La conservación de cepas microbianas. Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universitat de València. 46100 Burjassot (Valencia). [en línea] <http://www.uv.es/cect/docs/cons.doc> [consulta 15 de febrero 2003].
- GHERNA, R.L. 1994. Culture preservation. In: *Manual of methods for general bacteriology*. American Society Microbiology, 278-290.
- HESSELTINE, C.W., & HAYES, W.C. 1973. Sources and management of microorganisms for development of a fermentation industry. *Prog Ind Microbiol* 24: 3-46.
- HOEKSTRA, E.S.; VAN OORSCHOT, C.A.N. & SAMSON, R.A. 1981. *Introduction to food-borne fungi*. Centraalbureau Voor Schimmel Cultures, Baarn, Holand, 62-63.
- KIRSOP, B.E. 1991. *Maintenance of microorganisms*. Second Edition. Academic Press Inc. London. UK, 321-340.
- KIRSOP, B.E. & SNELL, J.J.S. 1984. *Maintenance of Microorganisms. A Manual of Laboratory Methods*. Academic Press Inc., Orlando, USA, 5-56, 83-130.

- MEZA, R.A.; MONROY, A.F. 2002. *Evaluación de la estabilidad del método de criopreservación en glicerol para el establecimiento de un banco de cepas*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá D.C., Colombia, 43 págs.
- MOREIRA, F.; ARRIAS, F.; FAZZANO, S.R.; LENARTOVICZ, V.; MÁRQUEZ DE SOUZA, C.G. & PERALTA, R. 1999. Production of amylases by *Aspergillus tamarii*. *Rev Microbiol* 30: 157-162.
- NAHAS, E. & WALDEMARIN, M. 2002. Control of amylase production and growth characteristics of *Aspergillus ochraceus*. *Rev Latinoam Microbiol* 44: 5-10.
- PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.Y.; SINGH, D. & MOHAN, R. 2000. Advanced in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem* 31: 135-152.
- RAPER, K.B. & FENNELL, D.I. 1965. The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland, 686 págs.
- SCHRICKX, J.M.; KRAVE, A.S.; VERDOES, J.C.; VAN DE HONDEL, C.A.; M.J.J., STOUTHAMER, A.H. & VAN VERSEVELD, H.W. 1993. Growth and product formation in chemostat and recycling cultures of *Aspergillus niger* N402 and glucoamylase overproducing transformant, provided whit multiple copies of the *glaA* gene. *J Gen Microbiol* 139: 2801-2810.
- SIMIONE, F.P. & BROWN, B.S. 1991. ATCC Preservation methods. In: *Freezing and freezing-drying*. Second edition. American Type Culture Collection, 1-35.
- STATPOINT. 2003. Statistical Analysis System (Statlets). Programa informático [en línea] <http://www.statlets.com> [consulta 30 de agosto 2003].
- VÁSQUEZ, P.A. 2000. *Evaluación de diferentes métodos de conservación para cepas fúngicas de interés agrícola*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá D.C., Colombia.
- VÉLEZ, P.; POSADA, F.; MARÍN, P.; GONZÁLEZ, M.; OSORIO, E. & BUSTILLO, A. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. CENICAFE.
- WATANABE, T. 1994. Pictorial atlas of soil and seed fungi. Lewis Publishers, Boca Raton, USA. 168 págs.
- Recibido: 22.01.2006
Aprobado: 31.08.2006