

OBTENCIÓN DE AMILASAS FÚNGICAS A PARTIR DE *Aspergillus* sp. AISLADO DE SEMILLAS DE LENTEJAS

C. Castro¹, C. Navas², O. Caro³, Y. Piñeros^{4*}

^{1, 2, 3} Estudiantes Ingeniería de Alimentos, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia

⁴ Docente Ingeniería de Alimentos, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia

Dirección electrónica: yinethpineros@gmail.com

1. RESUMEN

La importancia de producir amilasas fúngicas mediante aplicaciones biotecnológicas está dirigida esencialmente al área de alimentos y a la producción de biocombustibles. El objetivo del trabajo fue aislar microorganismos productores de amilasas para producir este tipo de enzimas. Las cepas productoras de enzimas hidrolíticas del almidón se detectaron a los 18 días mediante revelador de Lugol ($I_2KI=0.026\%I_2+0.26\%KI$). Las cepas fueron aisladas y cultivadas sobre salvado de trigo para la producción de amilasas (*Aspergillus* sp.). La actividad amilásica se determinó utilizando almidón como sustrato a 37°C durante 10 minutos y se cuantificó mediante azúcares reductores. El equivalente de dextrosa (DE) fue de 6,5, lo cual muestra su capacidad enzimática.

2. INTRODUCCIÓN

El fin primordial que persigue la biotecnología y los métodos de selección utilizados dentro de la misma, consiste en desarrollar procedimientos prácticos que permitan el aislamiento y la selección de microorganismos de interés industrial (Doran, 1998). Las amilasas son enzimas que catalizan las reacciones hidrolíticas del almidón, dando origen a diversos productos que poseen una gran relevancia para algunas operaciones y procesos industriales. Las amilasas son comúnmente halladas en animales y en plantas; sin embargo, para fines industriales, las más utilizadas son aquellas de origen bacteriano o fúngico. Las amilasas poseen una gran importancia en la producción de alimentos y de biocombustibles (Whiteburst, 2002; Fennema, 2000).

Las α -amilasas presentan una gran utilidad tanto para la industria textil como para la de alimentos pues rompen la molécula del almidón en fracciones más cortas (dextrinas). Actúan directamente sobre los enlaces α -1,4 de la molécula, dando origen a moléculas como la maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa y maltohexaosa, entre otras (Fennema, 2000).

Se han utilizado amilasas para la obtención de jarabes fructosados. La producción de dichas enzimas se ha hecho a partir de *Bacillus* sp. Aún se siguen buscando microorganismos específicos que reporten mejores rendimientos para optimizar los procesos industriales (Doran, 1998; Fennema, 2000).

3. METODOLOGÍA

3.1. Aislamiento de microorganismos productores de amilasas

Se aislaron microorganismos, a partir de 5 g de lentejas sobre medio YPD (1.5% extracto levadura, 2.0% peptona, 2.0% dextrosa, 2.0% agar-agar, 5% NaCl), e incubación a 28°C durante 7 días. Posteriormente se seleccionaron los microorganismos productores de amilasas, mediante cultivo en agar almidón (al 1%) a 28°C durante 7 días. Las cepas productoras de enzimas hidrolíticas del almidón se detectaron a los 18 días mediante revelador de Lugol ($I_2KI = 0.026\% I_2 + 0.26\% KI$). Las esporas de las cepas detectadas se suspendieron en Tween 80 al 0.01% y se llevaron a cultivo sobre salvado de trigo estéril (121°C durante 15 minutos, autoclave Selecta CD 4043720) en fermentación en fase sólida a 28°C durante 7 días.

3.2. Extracción del complejo enzimático

Las enzimas extracelulares luego de la fermentación en fase sólida se extrajeron con solución 1% de NaCl, en una relación 50 mL/100 g de salvado, mediante agitación durante 30 minutos y posterior filtración.

3.3. Medición actividad enzimática

La actividad amilásica se determinó utilizando almidón soluble (Merck) como sustrato. Se utilizó una solución de almidón tamponada (0.05% almidón, NaCl 0.15M, CH_3COONa 0.1M, pH 5). La reacción enzimática consistió en incubar 10 μ L de extracto enzimático junto con 0.5 mL de solución de sustrato, incubando a 37°C durante 10 minutos. La reacción se cuantificó midiendo el grado de hidrólisis del almidón mediante el método del ácido 5-dinitrosalicílico (DNS) expresándose como equivalente de dextrosa (DE). Se cuantificó mediante espectrofotometría a 575 nm (Unicam Helios B NC 9432 UVB 1000E) utilizando una curva patrón de la solución de glucosa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

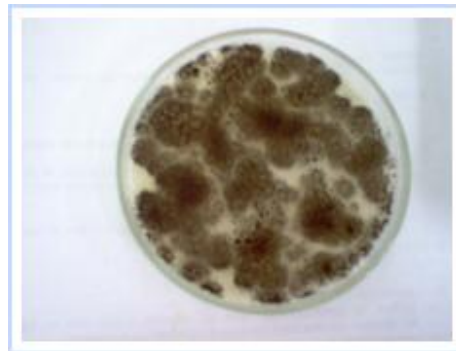
Se lograron aislar dos microorganismos productores de amilasas. El microorganismo No. 1 demostró superior crecimiento sobre el almidón. En la Figura 1 se puede observar la reacción acomplejante del lugol con el almidón dando coloración oscura (formación de complejo con el polisacárido). El microorganismo 1 presentó una mayor capacidad de hidrolizar almidón debido a la ausencia de reacción, hecho que se confirmó con su superior crecimiento sobre salvado de trigo. El microorganismo 1 fue estudiado y analizado en el laboratorio de microbiología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano y fue clasificado como *Aspergillus* sp.

En la Tabla 1 se presentan los resultados de la actividad amilolítica del complejo enzimático derivado del cultivo del microorganismo 1 (*Aspergillus* sp.). La curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores corresponde a un ajuste lineal de la forma $\text{Absorbancia (575 nm)} = 0.0072 (\text{concentración de glucosa mg/mL}) - 0.2319$, con un factor de correlación de 0.9945.

Figura 1. Aislamiento de microorganismos productores de amilasas a) y b) microorganismo 1, no hubo reacción de almidón con el lugol, c) y d) microorganismo 2, se puede observar almidón presente por la reacción con lugol.



a)



b)



c)



d)

Tabla 1. Resultados actividad amilasa del complejo enzimático derivado del cultivo de *Aspergillus* sp. sobre salvado de trigo.

Ensayo	Volumen complejo enzimático (μL)	Concentración glucosa (g/mL suspensión de almidón)	Equivalente de dextrosa (DE)
Blanco	0	0	0
1	10	3,262E-5	6.50
2	10	3,26E-5	6.53

Las amilasas presentes en el complejo enzimático obtenido del cultivo de *Aspergillus* sp. sobre salvado de trigo, fueron activas en el desdoblamiento de la molécula de almidón a pH 5.0 y temperatura de 37°C demostrando su carácter débilmente ácido y su proveniencia mesófila. Esto contrasta con pruebas anteriores en las cuales se ha establecido el pH óptimo de las α y β -amilasas en un valor de 7.0 y 5.0 respectivamente (Fennema, 2000). El equivalente de dextrosa como medida cuantitativa de la hidrólisis del polisacárido fue de 6.5, evidenciando la capacidad enzimática amilolítica del complejo enzimático obtenido. En este trabajo se confirmó la capacidad de hongos del género *Aspergillus* sp. para la producción de amilasas (Buendía *et al*, 2003).

5. CONCLUSIONES

Se realizaron técnicas apropiadas para el aislamiento de microorganismos productores de amilasas presentes en semillas de lentejas. Aunque se logró aislar dos microorganismos, el número 1, identificado como *Aspergillus* sp. demostró mayor capacidad hidrolítica del almidón, confirmado de forma cualitativa mediante la ausencia de reacción ante la adición de revelador lugol. La actividad amilolítica del complejo enzimático fue cuantificada como

equivalente de dextrosa, el cual presentó un valor de 6,5 g de glucosa/100 g de almidón, evidenciando la capacidad de hidrólisis de las enzimas obtenidas mediante cultivo de *Aspergillus* sp. sobre salvado de trigo. Es importante resaltar que este trabajo se limitó a la medición de la actividad a 37°C y un pH de 5. Por lo tanto es necesario realizar más estudios acerca de la influencia del pH y la temperatura sobre la actividad amilasa e igualmente sobre las condiciones de cultivo del microorganismo aislado.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Buendía, G.; Mendoza, G.; Bárcena, R.; Ortega, M.; Solís, J.; Lara, A.. 2003. Efecto de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* en la digestibilidad *in vitro* de maíz y sorgo, y en la productividad de borregos. *Agrociencia*, 37 (4): 317-322.

Doran, P. 1998. Principios de la Ingeniería de los Bioprocesos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 468p.

Fennema, O. 2000. Química de los Alimentos. Editorial. Acribia S.A. Zaragoza, España. 1258p.

Whiteburst, R. 2002, Enzymes in Food Technology. Editorial Sheffield Academic Press. Nueva York, USA. 225p.