

Evaluación del crecimiento de *Aspergillus niger* en un medio de cultivo líquido

M. P. Marin Cortez¹, A. Robledo Olivo^{1*}, A. V. Charles Rodríguez¹, S. González Morales², N. Camposeco Montejo³.

¹Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, calzada Antonio narro 1923, Buena vista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila.

²Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, calzada Antonio narro 1923, Buena vista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila.

³Departamento de Fitomejoramiento, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, calzada Antonio narro 1923, Buena vista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila.

*armando.robledo@outlook.com

Área de participación: Ingeniería Química

Resumen

En la presente investigación se utilizó suero lácteo como alternativa e implementación de medio en una fermentación líquida, con el fin que *Aspergillus niger* metabolice los carbohidratos y nitrógeno existentes en este residuo agroindustrial. Se realizó una fermentación líquida por 240 h, posteriormente las cuantificaciones realizadas fueron biomasa, azúcares totales [Dubois y col., 1956], azúcares reductores [Miller, 1959] y proteína soluble [Bradford, 1976]. La biomasa fue aumentando conforme las horas transcurridas con un valor máximo de crecimiento con 1.99 g, los AT decrecieron pasando las horas, lo contrario a los AR y la proteína soluble que fue variable su comportamiento en la fermentación. Por lo que este medio de cultivo con este microorganismo, se permite utilizar y aplicar en industrias relacionadas.

Palabras clave: fermentación líquida, azúcares fermentables, proteína soluble, *Aspergillus niger*.

Abstract

In the present investigation, whey was used as an alternative and implementation of medium in a liquid fermentation, in order that *Aspergillus niger* metabolize the carbohydrates and nitrogen existing in this agroindustrial residue. A liquid fermentation was carried out for 240 h, subsequently the quantifications were biomass, total sugars [Dubois y col., 1956], reducing sugars [Miller, 1959] and soluble protein [Bradford, 1976]. The biomass was increasing according to the hours elapsed with a maximum value of growth with 1.99 g, the ATs decreased passing the hours, the opposite to the AR and the soluble protein that was variable in its fermentation behavior. So this culture medium with this microorganism, is allowed to use and apply in related industries.

Key words: liquid fermentation, fermentable sugars, soluble protein, *Aspergillus niger*.

Introducción

Los hongos filamentosos conforman uno de los grupos biológicos de mayor abundancia en la biosfera y tienen un importante impacto para el hombre, ya sea como patógenos de plantas y/o animales, o en aplicaciones en diferentes ámbitos: farmacéutico, industrial, alimentario, agrícola, entre otros. [Riquelme, 2013]. Las especies del género *Aspergillus* se diferencian por la estructura del conidióforo y la disposición de los conidios, tales como el color, la forma y textura de las esporas, lo que han permitido agruparlos en secciones o grupos. Su morfología y el color son características macroscópicas de las colonias a tomar en cuenta para la descripción de las diferentes especies de *Aspergillus*. Presentan distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro [Samsom y Varga, 2007]. Microscópicamente el género se caracteriza por cadenas de conidios pequeños u ovals a esféricas sostenidas en cadenas en las puntas de filídes radialmente ubicadas sobre la superficie del ápice dilatado del conidióforo, que se denominan vesículas [Araujo y col., 2019.]. *Aspergillus niger* es un microorganismo muy utilizado en biotecnología [Pel y col., 2007], dada su amplio espectro de enzimas para la degradación de

polisacáridos, proteínas y lípidos [Vries y Visser, 2001]. Celulasas, hemicelulasas, pectinasas, amilasas, inulinasas, lipasas y proteasas, por lo que tiene una larga tradición de uso seguro en la producción de enzimas y ácidos orgánicos [Pandey y col., 1999; Berka y col., 1992].

La fermentación líquida o sumergida es una técnica de crecimiento de microorganismos en un medio líquido, donde todos los nutrientes se encuentran disueltos en el medio de cultivo y el proceso se lleva a cabo bajo condiciones fisicoquímicas controladas, este es el método más usado por la industria biotecnológica. En comparación con la fermentación sólida, presenta la ventaja de mantener mayor homogeneidad, mayor facilidad de controlar los factores de la fermentación (temperatura, aireación, agitación y pH), presenta mejor distribución del oxígeno y del calor suministrado al sistema y se puede llevar a cabo la medición directa de la biomasa [Crueger y Crueger, 1989]. La fermentación líquida es muy compleja por su composición y propiedades, principalmente por las cepas de hongos inoculadas, además de otros factores como la temperatura de fermentación, el pH inicial del medio, la velocidad de agitación y el volumen del líquido envasado, tiempo de fermentación, etc [Li y Wan, 2012].

La implementación y uso de residuos agroindustriales como fuentes de carbono, ayudan a minimizar la contaminación ambiental y mejoran la rentabilidad de productos biotecnológicos. El suero de leche es una alternativa de sustrato, es el principal desecho de la industria láctea al realizar la precipitación de la caseína, el suero está generalmente compuesto de agua (93-94%) en la que hay lactosa (4.5-6%, p / v), proteínas solubles (0.6-1.1% p / v), grasa (0.06-0.5% p / v), ácidos orgánicos, grasas, vitaminas y minerales. Por lo tanto tiene potencial para su utilización en procesos. Actualmente es necesaria la producción de una variedad de productos biológicos [Kourkoutas y col., 2002; Panesar y col., 2007; Bekatorou y col., 2006]. Por lo que es viable para ser utilizado como medio de cultivo para producir azúcares reductores que pueden utilizarse para la fermentación y producir productos de valor agregado.

Metodología

Cultivo de microorganismo

Se empleó la cepa *Aspergillus niger* de la colección del DCTA, para su crecimiento se preparó agar papa dextrosa (PDA) de la marca MCD LAB®, la siembra fue por estriado y se incubó a una temperatura de 30°C durante 96 h. Las esporas fueron cosechadas añadiendo una solución de Tween 80 al 0.1% bajo agitación y se contó en una cámara Neubauer.

Obtención y tratamiento de medios de cultivo

Se recolectó suero de leche en un rancho de General Cepeda perteneciente al estado de Coahuila. El cual se filtró y esterilizó por calor húmedo a 121°C por 15 min a una presión de 6.80 kg.

Preparación de medios de cultivo y fermentación

Se enriqueció el suero de leche con medio Czapek-Dox: Extracto de levadura BD Bioxon® (7.63 g/L); fosfato de potasio J.T. Baker® (3.04 g/L); Sulfato de magnesio J.T. Baker® (1.52 g/L); cloruro de potasio Jalmek® (1.52 g/L), se midieron 50 ml y se colocó en matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se colocó una concentración de 1×10^6 esporas por mililitro de medio de cultivo. Consecutivamente los matraces se taparon con tapones de algodón y gasa, se metieron a un incubador sheker Innova®44 a 150 rpm a una temperatura de 30°C por 240 h. Para la fermentación en líquido se realizaron tres repeticiones, las cuales se tomaron cada 24 horas hasta la culminación de 240 h.

Determinación de biomasa

Para la filtración de biomasa se utilizó una bomba de vacío de diafragma BIOBASE®, conectando a un embudo de porcelana con papel filtro y se vertió la fermentación líquida, recibiendo el extracto líquido en un matraz de Kitasoto. Posteriormente el papel filtro con biomasa se puso en una estufa e incubadora BIOBASE® por 48 h, posteriormente por diferencia de pesos se realizó la cinética de biomasa.

Tratamiento del extracto líquido

Después de la filtración a vacío se colocó en tubos falcón y se centrifugaron a 400 rpm por 15 min. Posteriormente se tomó con una jeringa el sobrenadante para pasarlos por filtros CELLTREAT® PTFE con un poro de 0.22µm con un diámetro 20mm y se congelaron para hacer posteriormente las determinaciones correspondientes.

Determinación de azúcares totales

Se utilizó la metodología de Dubois y *col.*, en 1956 por lo que se tomaron 0.500 ml de extracto filtrado y se vació en un tubo de ensaye. Después se añadieron 0.500 ml de Fenol al 5%, se homogenizó y se dejó en un baño de agua con hielo por 5 minutos. Culminado el tiempo se añadió 1 ml de Ácido Sulfúrico Jalmek® concentrado vertiendo por las paredes del tubo de ensaye. Cuidadosamente se agito y se dejó en un baño de ebullición por 5 minutos. A continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente por otros 5 minutos. Luego con el equipo BIOBASE-EL10A Elisa Reader se procedió a leer a una absorbancia de 470 nm. La curva de calibración se realizó con glucosa al 0.1%.

Determinación de azúcares reductores

Para esta cuantificación se utilizó la técnica de Miller en 1959, se preparó la solución DNS: Acido 3,5 dinitro salicílico SIGMA® (10.0 g/L), Hidróxido de Sodio Jalmek® (10.0 g/L), Tartrato de Sodio y Potasio Jalmek® (200.0 g/L), Fenol Jalmek® (2.0 g/L) y el Sulfito de Sodio Jalmek®(0.5 g/L). Posteriormente con una micropipeta se tomó 1 ml de extracto líquido filtrado colocándolo en un tubo de ensaye. Después se le añadió 1 ml del reactivo preparado (DNS), sometiéndolo en un baño María de ebullición durante unos 5 min, posteriormente la reacción se detuvo en un baño de hielo por otros 5 min, al terminar ese tiempo se le adiciono 5 ml de agua destilada, luego se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente, luego con el equipo BIOBASE-EL10A Elisa Reader se procedió a leer a 546 nm de longitud de onda. La curva de calibración se realizó con sacarosa al 0.1%.

Determinación de proteína soluble

Se utilizó la metodología de Bradford 1976, por lo que se preparó reactivo bradford: colorante Azul de Comassie G-250 Aldrich® 0.100g/L, etanol al 95 % Jalmek® 50ml/L y ácido fosfórico al 85 % Jalmek® 100ml/L. para el ensayo se agregó 0.100 ml de extracto filtrado, luego se adiciono 5 ml de reactivo de Bradford y se homogenizo, se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente y se leyó absorbancia a 595 nm. La curva patrón se utilizó Albúmina de huevo a 1000 ppm.

Resultado y discusión

Crecimiento de *Aspergillus niger* en suero de leche

De acuerdo a lo observado en la Figura 1 se aprecia cómo va incrementando uniformemente la biomasa de *Aspergillus niger* de manera exponencial respecto al tiempo de fermentación en suero de leche, asimilando posibles fuentes de carbono y nitrógeno, como la lactosa y la proteína, la cinética empieza con cero horas en donde se indica nula cantidad de gramos de biomasa, como va transcurriendo el tiempo se observa una tendencia positiva y en aumento de biomasa, viéndose un mayor crecimiento a las 216 horas con 1.99 g.

Por el contrario Bazán y *col.*, 2017 menciona que en paja de trigo en fermentación inoculando una cepa obtuvo un valor alto de biomasa con 0.97 g, sin embargo Pérez y *col.*, 2017 obtuvo crecimiento fúngico a los 288 h de inoculado el medio caldo peptona, alcanzándose valores máximos de biomasa seca de 1.38 y 0.40 g para *Trametes maxima* y *Pleurotus ostreatus*, respectivamente. Por lo tanto cada microorganismo en su desarrollo en cada medio de cultivo, tiene su velocidad de crecimiento asimismo incrementando la biomasa fúngica.

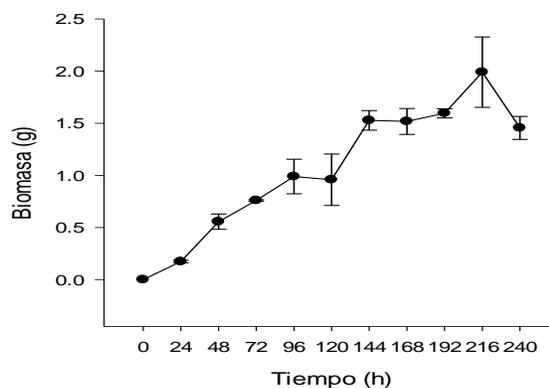


Figura 1. Curva de crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación líquida en función del peso seco de la biomasa.

Cinética de carbohidratos en la fermentación líquida.

Se muestra como *Aspergillus niger* va hidrolizando los disacáridos a través del tiempo, ya que necesita monosacáridos disponibles, como se observa en la figura 2, se inicia con un contenido de 3.09 mg/ml de AT, a partir de esta cantidad de se empieza la degradación de carbohidratos, a las 120 h con 2.54 mg/ml se aprecia un mayor porcentaje con respecto al tiempo transcurrido de fer AT con 82%, con respecto al contenido iniciado y a las 240 h con 0.14 mg/ml de AT, es el porcentaje mínimo con 5% de AT presentado en la fermentación.

El microorganismo *Aspergillus niger*, va consumiendo los monosacáridos disponibles presentes en el sustrato, ya que principalmente se alimenta de glucosa, como se observa en la figura 2, se inicia con un contenido de 2.40 mg/ml de AR empezando su consumo de monosacáridos, también en ocasiones se aprecia el aumento porque se acumula los monosacáridos aun no consumidos por el microorganismo, a las 168 h con 1.15 mg/ml es el mayor porcentaje de AR con 48% con respecto al valor iniciado, el porcentaje mínimo es de 4% a las 120 h con 0.09 mg/ml de AR.

Comparando los resultados de AR con los obtenidos con cepas etanolicas en residuos de mango con 1.39 mg/ml, mora con 1.80 mg/ml y la mezcla de limón-lulo con 2.08 mg/ml [Malagón y col., 2017], son menores a los obtenidos en el suero de leche ya que contiene un mayor contenido al inicio de la fermentación, con lo que favorece la producción de AR. También cabe comparar el valor de cáscara de naranja empleando *Aspergillus niger* a las 30 h se obtuvo un rendimiento 3.36 mg/ml de AR [Ahmed y col., 2016], por lo que dependiendo el tipo de residuo utilizado ya que es variable el porcentaje de contenido polisacárido o disacárido, para la conversión de glucosa.

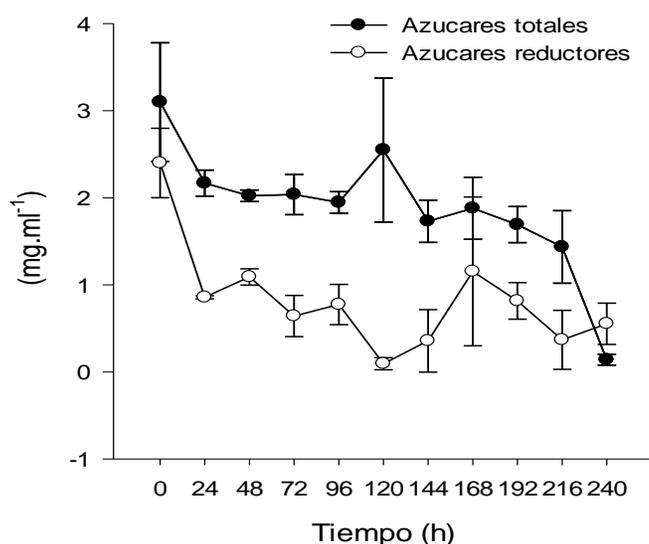


Figura 2. Descomposición de azúcares totales y consumo de azúcares reductores a través del tiempo de fermentación.

Degradación de proteínas solubles a través la fermentación

La figura 3 muestra la acción de degradación de proteínas solubles por *Aspergillus niger* va hidrolizando los proteínas a aminoácidos para la obtención de nitrógeno disponible, se inicia con un contenido de 0.18 mg/ml de proteína, a partir de esta cantidad se empieza la degradación de proteínas, a las 72 h con 0.08 mg/ml y a las 240 h con 0.09 mg/ml de proteína, se aprecian los porcentajes máximos obtenidos en la fermentación con 44% con respecto al valor iniciado, el valor mínimo presentado en la fermentación fue a las 120 h con 0.03 mg/ml de proteína con un 17%.

Por otra parte Riveros y col., 2017 menciona que en fermentación con una levadura utilizando residuos de cascara de naranja y cascara de papa obtuvo 2.12 y 4.25 mg/ml de proteína respectivamente, asimismo Espinal

y *col.*, 2019 en fermentación con la bacteria *Geobacillus theroparaffinivorans* a las 48 h reporta un contenido de 0.197 mg/ml de proteína. Entonces en una fermentación la proteína difiere del origen del residuo, el contenido porcentual de proteína del medio de cultivo y la asimilación de nitrógeno del microorganismo.

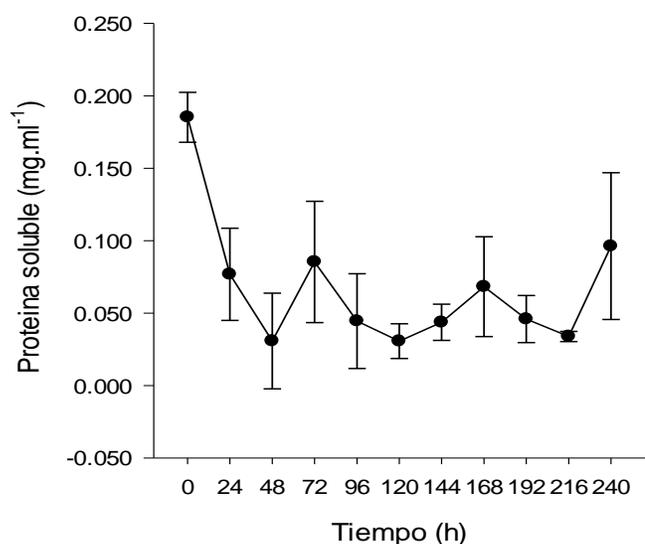


Figura 3. Descomposición de proteínas a través de la fermentación.

Trabajo a futuro

Este trabajo presentado es un preliminar para la selección de un microorganismo, productor de enzimas degradadoras de proteínas provenientes del suero láctico.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos del presente estudio, se puede concluir que el hongo *Aspergillus niger* con las condiciones aplicadas tiene la capacidad de utilizar el suero de leche para su crecimiento. El microorganismo es capaz de sintetizar los carbohidratos y proteínas para su asimilación de nutrientes. Se puede emplear el suero de leche como medio de cultivo, para darle un valor agregado al residuo de la industria láctea, lo que permite el uso y aplicación en bioprocesos en industrias relacionadas.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el otorgamiento de la beca y a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), por su apoyo y patrocinio para la realización del presente trabajo científico.

Referencias

1. Araujo J., Yegres F., Barreto G., Antequera A., Depool B., Rojas Y. 2016. Fungal hydrocarbonoclastic biocatalysts of the genere *Aspergillus* for water descontamination with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAHs). *Revista Cubana de Química*. 28:2:703-735.
2. Bazán E., Álvarez C., Totosaus S. 2017. Efecto del pretratamiento de la paja de trigo sobre el rendimiento de biomasa y la producción de un extracto con actividad celulolítica empleando *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Universitaria*. 27:5: 26-33.
3. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein

4. utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
5. Bekatorou C., Sarianos P., Koutinas A. 2006. Producción de levaduras de grado alimenticio Tecnología de los alimentos. *Biotechnol.* 44:3:407 - 415.
6. Berka R., Dunn-Coleman N., Ward M. 1992. Industrial Enzymes from *Aspergillus* species. *Biotechnology*. 23:155-202.
7. Castellanos A., Vargas T., Golda M. 2017. Cellular protein in yeast biomass produced from residues of both orange and potato shells for use in animal feeding. *REVISTA CITECSA*. 8:13:24-49.
8. Crueger W., Crueger A. 1989. *Biotecnología: manual de microbiología industrial*: Acríbia S.A. Zaragoza-España.
9. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem*. 28: 3: 350–356.
10. Espinal D., Zuñiga A., Castillo D., Castellanos R. 2019. Producción de amilasas de *Geobacillus thermoparaaffinivorans* (CB-13) aisladas de los Géiseres de Candarave, Tacna. *Ciencia & Desarrollo*.24: 38-44.
11. Ishtiaq A., Muhammad A., Zain A., Muhammad T., Azin N. 2016. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 9:2: 148-154.
12. Kourkoutas Y., Dimitropoulou S., Kanellaki M., Marchant R., Nigam P., Banat I., Koutinas A. 2002. Fermentación alcohólica a alta temperatura de suero de leche con *Kluyveromyces marxianus* IMB3 levadura inmovilizada en material celulósico deslignificado. *Bioresour. Technol.* 82:2: 177 – 181.
13. Li Y., Yang S., Wan D. 2012. Advances and existed problems in studies on liquid fermentation of medicinal fungi, *Chinese Traditional and Herbal Drugs*. 43:1:2066 – 2070.
14. Miller G., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. 1959. *Anal. Chem*. 31:426-428.
16. Pandey A., Selvakumar P., Soccol C., Nigam P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Cur. Science*. 77:149-162
17. Panesar P., Kennedy F., Gandhi D., Bunko K. 2007. Bioutilización de suero para la producción de ácido láctico *Food Chem.* , 105: 1: 1 – 14.
19. Pel H., de Winde J., Archer D., Dyer P., Hofmann G., Schaap P. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol*. 25:221–31.
20. Riquelme M. Tip growth in filamentous fungi: A road trip to the apex. 2013. *Annu Rev Microbiol*. 67:587–609.
21. Rodríguez S., Crescencia M., Soria J., Aguilera I., Serrat M. 2017. Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos. *74: 577*.
22. Samson R., Varga J. 2007. *Aspergillus systematics in the genomic era*, CBS Fungal Utrecht: Biodiversity Centre, ISBN: 978-90-70351-69-4
23. Vries R., Visser J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides, *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 65:497-522.