

# Aislamiento y evaluación de hongos filamentosos ambientales con buena producción de amilasa

Isolation and evaluation of environmental filamentous fungi with good production of amylase

Marino Olivares de la Cruz<sup>1</sup>, Julio Arellano Barragán<sup>2</sup>,  
Steban Ilich Zerpa<sup>3</sup>, Marco Salazar Castillo<sup>4</sup>

## RESUMEN

Esta investigación estuvo orientada al aislamiento y a la evaluación de cultivos de hongos filamentosos ambientales que sean buenos productores de amilasa. Para ello, los mohos fueron aislados de sus medios naturales: aire, suelo, pan enmohecido, arroz enmohecido, y se cultivaron en medios Agar Sabouraud común. Como cultivos puros, fueron adaptados a las condiciones de cultivo que propiciara la producción de una buena cantidad de amilasa, empleándose para ello Agar almidón al 1% enriquecido con sales. Se seleccionaron los cultivos de mayor producción de amilasa después de haber sido evaluados de manera cualitativa, observando los halos de degradación del almidón al crecer en placas de Agar almidón al 0,5% enriquecido con sales. Una vez obtenidos y estandarizados los inóculos, se procedió a la producción de amilasas en botellas planas de vidrio conteniendo medios sólidos, semisólidos y líquidos, a base de salvado de trigo. A los siete días de incubación a 28–30 °C, los preparados enzimáticos crudos de amilasa fueron obtenidos extrayéndolos de las botellas de vidrio a través de técnicas de homogenización, filtración simple y al vacío y por centrifugación, después de lo cual fueron conservados en congelación hasta sus subsiguientes usos. Se procedió a la evaluación cuantitativa de la producción de amilasas, determinando su actividad con el Método de Street-Close y una técnica que expresa las unidades de amilasa como UA/dL. Los cultivos de hongos filamentosos ambientales de mayor producción de amilasa fueron *Aspergillus niger* LMa, *A. niger* Sf y *A. niger* Le.

**Palabras clave:** Aislamiento y evaluación, hongos filamentosos ambientales, producción de amilasa.

- 
- <sup>1</sup> Biólogo, Maestro en Ciencias con mención en Bioquímica (UNT). Doctorando en Ciencias Biológicas (UNT). Profesor de la Universidad Privada Antenor Orrego.
  - <sup>2</sup> Biólogo Microbiólogo. Maestro en Microbiología (UNT). Doctor en Ciencias Biológicas (UNT). Profesor de la Universidad Nacional de Trujillo.
  - <sup>3</sup> Doctor en Ciencias-Área Bioquímica. (Université Catholique de Louvain-UCL, Bélgica, 1988-1993). Profesor de la Universidad Nacional de Trujillo.
  - <sup>4</sup> Biólogo Microbiólogo. Maestro en Ciencias con mención en Bioquímica (UNT). Doctor en Ciencias Biológicas (UNT). Profesor de la Universidad Nacional de Trujillo.

## ABSTRACT

This research was aimed at isolation and evaluation of cultures of environmental filamentous fungi as good producers of amylase. To do this, molds were isolated from their natural environments: air, soil, moldy bread, moldy rice, and cultured in Sabouraud Agar media common. Once isolated, as pure cultures, they were adapted to culture conditions conducive to producing a good amount of amylase, using for that starch agar 1% supplemented with salts. Crops with high production of amylase were selected after being evaluated qualitatively by observing the halos of starch degradation to grow on starch agar 0,5% plates enriched with salts. Then, once the inocula were obtained and standardized, the production of amylases was started in flat glass bottles containing solid media, semi-solid media and liquid media based on wheat bran. After seven days of incubation at 28–30 °C, enzyme preparations crude amylase were obtained by extracting the glass bottles through techniques of blending, simple and vacuum filtration and by centrifugation, after which, they were preserved frozen to its subsequent use. Quantitative evaluation of the production of amylases was done, determining their activity with the method of Street-Close and a technique that express amylase units as UA/dL. The environmental filamentous fungus cultures with the most production of amylase were *Aspergillus niger* LMa, *A. niger* Sfy *A. niger* Le.

**Key words:** Isolation and evaluation, environmental filamentous fungi, production of amylase.

## I. INTRODUCCIÓN

La producción de enzimas se refiere a los procesos agrupados en varias etapas: 1) Generación o producción celular de la enzima, 2) Recuperación o aislamiento de la enzima (incluye la separación sólido-liquido o clarificación, extracción y concentración), y 3) Purificación de la enzima. La producción de enzimas depende del origen de la enzima; pero, en general, todos los seres vivos son fuentes naturales de enzimas (Olivares, 1996; Olivares, 2011).

Luego de generada o producida la enzima es necesario recuperarla o aislarla del organismo productor. Las operaciones de recuperación permiten obtener un preparado o extracto enzimático crudo (o “bruto”) capaz de ser sometido a purificación. Esta etapa, a diferencia de la anterior, no depende del origen de la enzima, pero si de la localización extracelular o intracelular de la enzima. Si la enzima es extracelular para su “extracción” basta con solamente separarla del medio por filtración o por centrifugación, que son las técnicas más empleadas para ello. Una vez obtenido el preparado enzimático crudo, en mucho de los casos se emplearán directamente tras la adición de un antiséptico (NaCl, glicerina, mertiolato), pero en general se procede a liberarlos de impurezas y purificarlas (Ilianes, 1994; Olivares, 1996; Olivares, 2011).

Las amilasas existen bajo la forma de  $\alpha$ -amilasa (1,4- $\alpha$ -D-glucano-glucanohidrolasa o endoamilasa, EC 3.2.1.1),  $\beta$ -amilasa (1,4- $\alpha$ -D-glucano-maltohidro-

lasa o amilasa sacarogénica, EC 3.2.1.2) y  $\gamma$ -amilasa (1,4- $\alpha$ -D-glucano glucohidrolasa o glucoamilasa, EC 3.2.1.3). Son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 del almidón (Carrera, 2002), dando origen a diversos productos a base de dextrinas, maltosa y glucosa, los cuales poseen una gran relevancia para algunas operaciones y procesos industriales. Las  $\alpha$ -amilasas dan origen a la maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa y maltohexaosa, entre otras (Campos y otros, 2008; Espitia, 2009; La Torre, 2008; Martínez, 2005; Pandey y otros, 2000; Pérez y otros, 1989; Rodríguez y otros, 2010).

Las amilasas son comúnmente halladas en animales y en plantas, sin embargo, para fines industriales, las más utilizadas son las de origen bacteriano o fúngico (Whiteburst, 2002). Pueden ser aisladas de células vegetales (Castro y otros, 2006; Cueva, 1995), de células animales (amilasa salival) y de células microbianas (Cueva, 1993; Henao y otros, 2006; Luján, 1991; Pichén, 2008; Tinoco, 2003).

La  $\alpha$ -amilasa es producida por una amplia variedad de microorganismos, incluyendo *Bacillus* y *Aspergillus* (Buendia y otros, 2003; Nahas y Waldemares, 2002). La mayoría de las amilasas comerciales provienen de fuentes bacterianas como: *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*. En los últimos años, las amilasas preferidas para uso comercial han sido de *B. licheniformis*, debido a su estabilidad térmica y su rendimiento, al menos para pH neutro y ligeramente alcalino (Rojo y otros, 2001).

La  $\alpha$ -amilasa estable en medio ácido de *A. niger* se conoce desde hace más de 30 años y ha sido caracterizada a fondo por Minoda y colaboradores (Vercauteren y otros, 1998). Se ha reportado la amilasa producida por el hongo termófilo *Thermomyces lanuginosus* por fermentación en medio sólido, usando salvado de trigo como sustrato; la  $\alpha$ -amilasa del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, cultivado en un medio líquido con almidón (Flórez y otros, 2005). También se ha reportado que *Paecilomyces sp.* produce una elevada actividad de  $\alpha$ -amilasa, que *Rhizopus delemar* la produce en pequeñas cantidades, que *A. niger* y *R. delemar* producen grandes cantidades de amiloglucosidasa, en tanto que *Paelomyces sp.* y *Neurospora sp.* producen pequeñas cantidades de  $\alpha$ -amilasa.

Producir amilasas fúngicas mediante aplicaciones biotecnológicas es particularmente importante para la industria de alimentos, para la producción de biocombustibles y también para la industria textil (Castro y otros, 2006). Las amilasas convierten el almidón en dextrinas que son utilizados en la industria alimentaria como sustrato para la producción de fructosa, jarabes con equivalentes de dextrosa (de 42 a 63) y jarabes de maltosa. Todos estos productos se usan ampliamente en diversas industrias: bebidas, confitería, fermentaciones, helados, alimentos infantiles, y otros (Bennett, 2010; Mera y otros, 2003; Ruiz, 2008).

Las amilasas se emplean en la elaboración de la cerveza y bebidas alcohólicas, ya que producen los azúcares fermentables necesarios para los microorganismos (Espitia, 2009). También son usadas en la panificación como suplemento a la harina de trigo con bajo contenido en  $\alpha$ -amilasa, puesto que su adición mejora la estructura de la miga y volumen del pan (Novo Nordisk S.A., 1992).

Las amilasas también son estudiadas para el mejoramiento de la digestibilidad ruminal del almidón y como aditivo en la alimentación de rumiantes (Campos y otros, 2008), como es el caso de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* que es una de las más estudiadas por sus efectos en la degradabilidad del almidón.

Actualmente, se sigue buscando microorganismos específicos que reporten mejores rendimientos para optimizar los procesos en los que se aplican las enzimas; lo cual conlleva a que se optimicen los procesos de producción de enzimas (Pandey y otros, 2000). Al respecto, en nuestra localidad son muy escasos los trabajos actuales, por lo que en la presente investiga-

ción se planteó el siguiente problema: ¿De qué fuentes se pueden aislar hongos filamentosos de buena producción de amilasa? Los hongos filamentosos ambientales crecen bien en condiciones naturales, entonces, podrán ser aislados de sus medios naturales y ser utilizados para una buena producción de enzimas como la amilasa. En consecuencia, el objetivo del trabajo fue aislar y evaluar hongos filamentosos ambientales que sean buenos productores de amilasa.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Material biológico

Hongos filamentosos ambientales, aislados en los ambientes de la Facultad de Ciencias Biológicas (CC.BB.) de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Cultivos de *Aspergillus niger*: cepa LQBa (aislado anteriormente del aire en el Laboratorio de Química Biológica), cultivo LMa (aislado del aire en el Laboratorio de Micología), cultivo Sf (aislado del suelo de jardín); cultivo Le (aislado de las hojas enmohecidas de un libro), cultivo Ae (aislado de arroz enmohecido). Cultivo de *Penicillium sp.* (Pe), aislado de pan enmohecido. Salvado de trigo (*Triticum Sativum Lam*) entero y grano de choclo (*Zea mays*), adquiridos en el mercado local.

### 2.2. Reactivación de la cepa de *Aspergillus niger* LQBa

Un cultivo puro de *A. niger*, catalogado como cepa LQBa, se repicó dentro de un tubo de ensayo conteniendo Agar Sabouraud común (Mendo, 1999) y se incubó a 28–30 °C, por 6 días.

### 2.3. Aislamiento de los cultivos de *Aspergillus niger*

El cultivo de *A. niger* LMa fue aislado exponiendo al aire una placa con Agar Sabouraud antibiótico, en el ambiente del Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNT.

Para aislar el cultivo de *A. niger* Sf, inicialmente se preparó una suspensión al 1% en agua destilada del suelo de los jardines de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNT. Luego de filtrarlo, se inoculó por superficie un volumen de 0,5 mL en una placa petri con Agar Sabouraud antibiótico.

Los cultivos de *A. niger* Le, *A. niger* Ae, y de *Penici-*

*llum sp* Pe fueron aislados inoculando en cuatro puntos concéntricos de cada placa con Agar Sabouraud anti-biótico una asada de esporas provenientes de hojas de libro, arroz y pan enmohecidos, respectivamente.

A continuación, todos los medios de cultivo fueron incubados a 28–30 °C, por 6 días. Por observación microscópica en fresco, se verificó la pureza e identificó al moho, seleccionando a *Aspergillus niger* y a *Penicillium sp*.

#### 2.4. Evaluación cualitativa de la producción de amilasas

Los cultivos de mohos seleccionados fueron sembrados por puntura (en cuatro puntos concéntricos) en una placa con Agar Almidón al 1%, enriquecido con sales (AAE) y también con AAE al 0,5% de almidón, e incubados a 28–30 °C, durante 6–14 días.

Las colonias de los mohos que produjeron más amilasa se detectaron observando el halo de degradación del almidón (circulo claro alrededor de la colonia), adicionando, inicialmente por puntos, y luego, para confirmar, a toda la placa una solución de lugol. Al final se consideraron cuatro (de los seis) cultivos para la siguiente fase, por presentar buena, regular y escasa producción de amilasa.

#### 2.5. Obtención de los inóculos

Los cultivos anteriores de *A. niger* LMa, *A. niger* Sf, *A. niger* Le y *A. niger* LQBa, antes de ser cubiertos totalmente con lugol, fueron empleados para la obtención de los respectivos inóculos. Para ello, las esporas fueron suspendidas en una solución de NaCl 0,85% – Tween 80 al 0,5% estéril, y llevadas (estandarizadas) a una concentración de aproximadamente  $2 \times 10^6$  esporas/mL mediante su recuento en cámara Neubauer.

#### 2.6. Producción de amilasas

Los medios de producción sólidos se obtuvieron colocando en botellas planas de 250 mL 20 g de salvado de trigo entero, 10 mL de buffer acetato 0,1M pH 5,0 y 10 mL de almidón al 2%.

Los medios de producción líquidos se obtuvieron adicionando en botellas planas de 800 mL, 200 mL del filtrado de caldo salvado de trigo (4%)–grano de choco (10%) enriquecido con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 1%, pH 5,0.

También fue empleado un medio semisólido o semi-líquido con los mismos componentes anteriores, excepto que no fue filtrado, es decir, incluyó al salvado de trigo.

Todos los medios de producción fueron esterilizados a 121 °C por 15 minutos y luego de enfriados, fueron, respectivamente, inoculados con 3 mL de suspensión de esporas obtenidos en el paso anterior, e incubados durante 7 días a 28–30 °C.

#### 2.7. Extracción de las amilasas

Las amilasas producidas en los medios sólidos se extrajeron con 100 mL de buffer acetato 0,1M pH 5,0, agitando u homogenizando suavemente con ayuda de una bagueta de vidrio durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se filtró cuatro veces, primero a través de gasa y las siguientes al vacío, adicionando para las dos últimas filtraciones carbón activado a razón del 4% del volumen de buffer de extracción.

Las amilasas producidas en el medio semisólido fueron extraídos por filtración a través de gasa luego de adicionarle 100 mL de buffer acetato 0,1M pH 5,0. Las amilasas producidas en los medios líquidos fueron extraídas primero por filtración a través de gasa, luego por centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos y, finalmente, por filtración al vacío.

Todos los filtrados fueron los preparados enzimáticos o extractos enzimáticos crudos, y fueron conservados en congelación hasta su utilización.

#### 2.8. Evaluación cuantitativa de la producción de amilasas

Se realizó determinando la actividad amilásica sobre el almidón según el método Street-Close modificado por Cueva y otros (1983) y según la técnica empleada por Pichén (2008).

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Aislamiento de hongos filamentosos

En la Figura 1, se muestran seis cultivos puros de mohos, de los cuales cinco han sido aislados a partir de sus fuentes naturales. En las Figuras 2 y 3 se presentan observaciones microscópicas de los cultivos puros de *A. niger* y *Penicillium sp*, respectivamente.



Figura 1. Cultivos puros de hongos filamentosos.



Figura 2. Cultivo puro de *Aspergillus niger*.



Figura 3. Cultivo puro de *Penicillium sp.*

LQBa: Cultivo de *Aspergillus niger*, reactivado de cultivo stock productor de  $\beta$ -galactosidasa del Laboratorio de Química Biológica de la Facultad de CC.BB-UNT.

Lma: Cultivo de *A. niger*, aislado del aire del Laboratorio de Micología de la Facultad de CC.BB-UNT.

Sf: Cultivo de *A. niger*, aislado del filtrado de suelo del jardín de la Facultad de CC.BB-UNT.

Le: Cultivo de *A. niger*, aislado de las hojas enmohecidas de un libro del Laboratorio de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNT.

Ae: Cultivo de *A. niger*, aislado de arroz enmohecido, en el Laboratorio de Química Biológica de la Facultad de CC.BB-UNT.

Pe: Cultivo de *Penicillium sp.*, aislado de pan enmohecido, en el Laboratorio de Química Biológica de la Facultad de CC.BB-UNT.

### 3.2. Adaptación de los cultivos. Inducción de amilasas

En la Figura 4, se muestran a los cultivos que mejor se adaptaron a las condiciones de cultivo conducentes a la producción de una buena cantidad de amilasa. Estos tres cultivos fueron los que mostraron mejor comportamiento frente a la evaluación cualitativa y posterior evaluación cuantitativa de la producción de amilasa.



Figura 4. Cultivos puros de hongos filamentosos.

Cultivo de mayor producción de amilasa : *A. niger* LMa.

Cultivo de regular producción de amilasa: *A. niger* Sf.

Cultivo de menor producción de amilasa : *A. niger* Le.

### 3.3. Evaluación cualitativa de la producción de amilasas

En la Figura 5, se observa una mínima producción de amilasa por el cultivo de *A. niger* LQBa. Un mínimo halo y las rayas o manchas oscuras de color azul violeta demuestran la presencia de almidón. En la Figura 6, se observa una buena producción de amilasa por el cultivo de *A. niger* LMa. Las rayas o manchas amarillas demuestran la ausencia de almidón en el halo, el cual es visiblemente mayor respecto a *A. niger* LQBa.



Figura 5. Halo de degradación del almidón en cultivo de 18 días de *A. niger* LQBa.

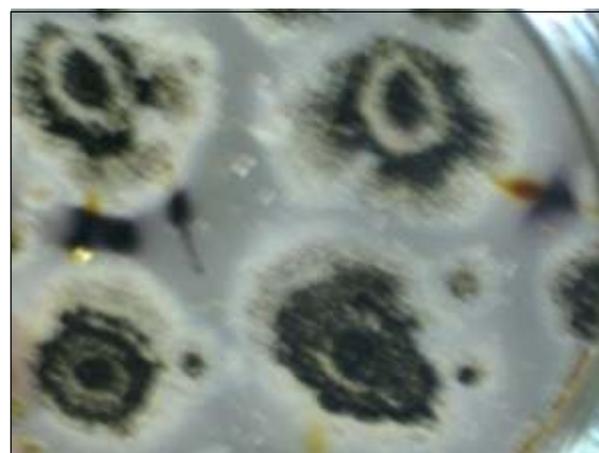


Figura 6. Halo de degradación del almidón en cultivo de 6 días de *A. niger* Lma.

En las Figuras 7 y 8, se observan, respectivamente, con respecto a *A. niger* LMa, una regular y una menor producción de amilasa por los cultivos de *A. niger* Sf y *A. niger* Le. Se observan de 3 a 2 manchas azulinas que delimitan el halo de degradación del almidón, lo cual indica que tales cultivos producen buena cantidad de amilasa, respecto a *A. niger* LQBa.



Figura 7. Halo de degradación del almidón en cultivo de 8 días de *A. niger* Sf.



Figura 8. Halo de degradación del almidón en cultivo de 10 días de *A. niger* Le.

En las Figuras 9 y 10, se observa una mínima producción de amilasa por los cultivos de *A. niger* Ae y *Penicillium* sp. Pe. Los mínimos halos y el color azul violeta de casi todo el medio de cultivo demuestran la presencia de almidón.



Figura 9. Halo de degradación del almidón en cultivo de 18 días de *A. niger* Ae.



Figura 10. Halo de degradación del almidón en cultivo de 18 días de *Penicillium* sp Pe.

### 3.4. Evaluación cuantitativa de la producción de amilasas

En los Cuadros 1 y 2, se muestra que el cultivo de *A. niger* LMa es el de mayor producción de amilasa, tanto en medio sólido como en medio líquido; sin embargo, también se observa a simple vista que no existiría mayor diferencia significativa entre los cultivos *A. niger* LMa y *A. niger* Sf y entre los cultivos *A. niger* Sf y *A. niger* Le. Así mismo, se observa también que el medio de producción sólido ha influenciado en la mayor producción de enzima amilasa.

En los cuadros 3 y 4, datos obtenidos según la técnica reportada por Pichén (2008), se muestra también que el cultivo de *A. niger* LMa es el de mayor producción de amilasa, tanto en medio sólido como en medio

líquido; sin embargo, en este caso se observa que a simple vista existiría diferencia significativa entre los tres cultivos creciendo en medio sólido, y entre *A. niger* LMa y los demás cultivos creciendo en medio líquido. De la misma forma, se observa que el medio de producción sólido ha influenciado en la mayor producción de enzima amilasa.

En el Cuadro 5, se presenta en su conjunto a los Cuadros 1, 2, 3 y 4. Además, se incluye el cultivo de *A. niger* Sf creciendo en medio semisólido, el cual muestra valores intermedios entre el cultivo sólido y el cultivo líquido.

Cuadro 1  
UNIDADES DE AMILASA STREET-CLOSE  
PRODUCIDOS POR LOS CULTIVOS  
AISLADOS DE *Aspergillus niger*,  
CRECIENDO EN MEDIO SÓLIDO

Cultivo	Unidades Street-Close Promedio (USC/100mL)
<i>A. niger</i> LMa	50,40
<i>A. niger</i> Sf	47,35
<i>A. niger</i> Le	40,35

Cuadro 2  
UNIDADES DE AMILASA STREET-CLOSE  
PRODUCIDOS POR LOS CULTIVOS  
AISLADOS DE *Aspergillus niger*,  
CRECIENDO EN MEDIO LIQUIDO

Cultivo	Unidades Street-Close Promedio (USC/100mL)
<i>A. niger</i> LQBa	3,25
<i>A. niger</i> LMa	8,45
<i>A. niger</i> Sf	7,60
<i>A. niger</i> Le	6,25

Cuadro 3  
UNIDADES DE AMILASA UA/DL  
PRODUCIDOS POR LOS CULTIVOS  
AISLADOS DE *Aspergillus niger*,  
CRECIENDO EN MEDIO SOLIDO

Cultivo	Unidades de Amilasa Promedio (UA/dL)
<i>A. niger</i> LMa	963
<i>A. niger</i> Sf	819
<i>A. niger</i> Le	584

Cuadro 4  
UNIDADES DE AMILASA UA/DL  
PRODUCIDOS POR LOS CULTIVOS  
AISLADOS DE *Aspergillus niger*,  
CRECIENDO EN MEDIO LÍQUIDO

Cultivo	Unidades de amilasa promedio (UA/dL)
<i>A. niger</i> LQBa	103
<i>A. niger</i> LMa	168
<i>A. niger</i> Sf	138
<i>A. niger</i> Le	113

Cuadro 5  
UNIDADES DE AMILASA STREET-CLOSE Y  
UA/DL PRODUCIDOS POR LOS CULTIVOS  
AISLADOS DE *Aspergillus niger*, CRECIENDO  
EN MEDIO SÓLIDO, EN MEDIO SEMISÓLIDO  
Y EN MEDIO LÍQUIDO

Cultivo	USC/100 mL	UA/dL
<i>A. niger</i> LQBa (medio líquido)	3,25	103
<i>A. niger</i> LMa (medio sólido)	50,40	963
<i>A. niger</i> LMa (medio líquido)	8,45	168
<i>A. niger</i> Sf (medio sólido)	47,35	819
<i>A. niger</i> Sf (medio semisólido)	15,75	213
<i>A. niger</i> Sf (medio líquido)	7,60	138
<i>A. niger</i> Le (medio sólido)	40,35	584
<i>A. niger</i> Le (medio líquido)	6,25	113

#### IV. DISCUSIÓN

Los valores de actividad amilásica de los diferentes cultivos de hongos filamentosos presentadas en los Cuadros 1, 2 3 4 y 5, indican que los cultivos de *Aspergillus niger* LMa, *A. niger* Sf y *A. niger* Le son buenos productores de amilasa. Esto confirma lo que se conoce de manera general, en cuanto a que los microorganismos ambientales, entre ellos los hongos filamentosos, son organismos potencialmente buenos productores de enzimas (Buendía y otros, 2003; Henao y otros, 2006; Olivares, 1998; Pérez y otros, 1989; Sarmiento y otros, 2003).

En el presente trabajo, queda confirmado que *A. niger* se constituye, de manera especial, como excelente productor de amilasa. Esto se debería a que, básicamente, los mohos por crecer en casi cualquier medio no sean exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales; lo que significaría que fácilmente pue-

den ser cultivados y optimizados para una adecuada y buena producción de amilasa (Mera y otros, 2003; Valenzuela y otros, 2001). Esto es de mucha importancia, cuando se somete a los microorganismos a las condiciones de producción mayor escala, dado a que por ser de tipo ambiental no contribuyen a incrementar en demasía los costos de producción (Carrera, 2002; Illanes, 1984; Martínez, 2005; Olivares, 1996; Ruiz, 2008). Así mismo, por ser de tipo ambiental, no significan mayores peligros para la salud durante su manipulación (Flórez y otros, 2005; Martínez, 2005).

Los valores de actividad amilásica de los cultivos de hongos filamentosos (Cuadros 3 y 5), permiten afirmar y establecer que *A. niger* LMa se constituye como un cultivo de buena producción de amilasa, dado a que produjo la mayor cantidad de amilasa, tanto en medio sólido (963 UA/dL y 50,4 USC/100 mL) como en medio líquido (8,45 USC/100mL y 168 UA/dL). Al respecto, es importante enfatizar que en la presente investigación, trabajando en condiciones similares, se obtuvieron mayor cantidad de unidades de actividad catalítica de amilasa: 953 UA/dL, frente a las 614,94 UA/dL obtenidas por Pichén (2008) al trabajar con *Paecilomyces lilacinus* creciendo en salvado de trigo.

Al comparar los valores de actividad amilásica de los preparados enzimáticos obtenidos en medios sólidos, medios semisólidos y medios líquidos, se observa que el medio sólido a base de salvado de trigo reúne las mejores condiciones para una mayor producción de amilasa por *A. niger*. Esto corrobora los resultados obtenidos por Pichén (2008) y, en lo que se refiere tan solo a la utilización de salvado de trigo, por Olivares (1998). Ello se debería a que el salvado de trigo, aparte de ser un excelente soporte o sustrato, ofrece diversos aminoácidos que son bien empleados por los microorganismos para su crecimiento y desarrollo.

El hecho de que el cultivo de *A. niger* LMa haya resultado como el de mayor producción de amilasa, reafirma y corrobora lo mencionado por Henao (2006), Buendía (2003), Ruiz (2008) y Valenzuela (2001), respecto a que *A. niger* es un buen ejemplo de mohos que son capaces de crecer en ambientes o entornos en los que faltan nutrientes esenciales, necesitando casi siempre sustratos ricos en carbono: monosacáridos como la glucosa y los polisacáridos como la amilosa. Además, se debe considerar que *A. niger* se puede encontrar cada vez más por las paredes húme-

das, como un componente importante de los mohos (Bennett, 2010).

En relación a lo manifestado en el anterior párrafo, el hecho de haber empleado al aire, al suelo, al pan y al arroz como fuentes naturales para el aislamiento de mohos, especialmente *A. niger*, obedece a que según Bennett (2010), las especies de *Aspergillus* son contaminantes comunes de los alimentos con almidón (pan y patatas), y pueden crecer en el interior o en muchas plantas. Precisamente, Buendía (2003) y Valenzuela (2001) sostienen que *A. niger* fácilmente crece y desarrolla en hojas caídas de los árboles, así como en cáscaras de vegetales.

## V. CONCLUSIONES

El aire, suelo y material celulósico se constituyen como una buena fuente de hongos filamentosos productores de amilasa.

Los hongos filamentosos ambientales se constituyen como una buena fuente de células productoras de amilasa.

*Aspergillus niger* se constituye como un buen productor de amilasa.

*Aspergillus niger* produce mayor cantidad de amilasa al crecer en medios de cultivo sólidos a base de lavado de trigo.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bennett J. 2010. An Overview of the Genus *Aspergillus*. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-53-0.
- Buendía G, Mendoza G, Bárcena R, Ortega M, Solís J, Lara A. 2003. Efecto de la amilasa de *Aspergillus niger* en la digestibilidad *in vitro* de maíz y sorgo. *Agrociencia*. 37(4): 317-322.
- Campos-Montiel R, Pimentel-González D, Hernández-Fuentes A, Alfaro-Rodríguez R, Viniegra-González G. 2008. Influencia de cultivos fúngicos en ensayos ruminales *in vitro* de diferentes sustratos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 7(3): 215-221.
- Carrera J. 2002. Módulos de Biotecnología. Enzimas Industriales, Biorreactores, Variables de Control, Guías de laboratorio y Biotecnología Agrícola y Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca. Popayán, Colombia.
- Castro C; Navas C, Caro O, Piñeros Y. 2006. Obtención de amilasas fúngicas a partir de *Aspergillus sp.* aislado de semillas de lentejas. Universidad de Bogotá. Colombia.
- Cueva F. 1993. Algunas características estructurales y catalíticas de las amilasas de *Bacillus licheniformis* MIT-12 a pH 7 y 8. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Trujillo.
- Cueva F. 1995. pH para extracción y pH y temperatura óptimos de actividad de amilasa de *Carica papaya*. PI 3194-95. Universidad Nacional de Trujillo.
- Cueva F, Polo E, Villanueva E. 1983. Actividad amilásica en semillas de papa y maíz. Congreso Iberoamericano de Ciencias Químicas. Lima, Perú.
- Espitia L. 2009. Determinación de la concentración de  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas comerciales en la producción de etanol a partir de almidón de cebada empleando *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de Grado para optar el Título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Flórez M, López C, Valencia A. 2005. Actividad de  $\alpha$ -amilasas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* cultivado en medio líquido *Revista Colombiana de entomología*. 35: 1153-1169.
- Henao I, Franco-Correa M, Marín G. 2006. Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. *Universitas Scientiarum*. 11(2): 51-60.
- Illanes A. 1994. Biotecnología de Enzimas. Edic. Univ. de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso Chile.
- La Torre L. 2008. Análisis estructural y modificación funcional de la glucoamilasa de *Saccharomyces cerevisiae* var. *Diastaticus*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Valencia, España.
- Luján V. 1991. Influencia del pH sobre la producción y la actividad de las amilasas de *Bacillus licheniformis* MIT-12. Tesis de Br. en Ciencias Biológicas. UNT.
- Martínez J. 2005. Utilización de  $\alpha$ -amilasas en la formulación de detergentes industriales. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Andalucía, España.
- Mendo M. 1990. Medios de cultivo en Microbiología. Manual de Laboratorio. 3ª ed. Edit. Tricelm, S.A. Lima-Perú.
- Mera I, Hoyos J, Carrera J, Forero C, Velasco R. 2003. Caracterización enzimática de  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa en la hidrólisis de almidón de yuca (*Manihot esculenta*). Universidad del Cauca. Popayán, Colombia.
- Nahas E, Waldemares M. 2002. Control of amylase production and growth characteristics of *Aspergillus ochraceus*. *Rev Latinoam Microbiol*. 44: 5-10.
- Novo Nordisk S.A. 1992. Enzyme Process Division. Julio-92. Denmark.
- Olivares M. 1996. Ensayo: Procedimientos experimentales para la producción, aislamiento y purificación de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* MIT-12. Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú.
- Olivares M. 1998. Uso del alcohol etílico comercial a diferentes valores de pH en la purificación de -Galactosidasa de *Aspergillus niger*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Trujillo.

- Olivares M, Ilich S, Novoa J. 2011. Producción y aislamiento de  $\alpha$ -Galactosidasa de *Kluyveromyces sp.* Rev Pueblo Continente. 22(2): 405-411.
- Pandey A, Soccol C, Mitchell D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-Bioprocesses and products. Process Biochem. 35:1153-1169.
- Pérez M, Del Castillo F, Martínez P, Murillo F, Ruiz R, Balsalobre J. 1989. Un procedimiento para la obtención de  $\alpha$ -amilasas termoestables, por cultivo de microorganismos superproductores a altas temperaturas. Compañía Española de Petróleos, S.A. –CEPSA. Madrid, España.
- Pichén L. 2008. Efecto de la variación del pH en un medio de cultivo a base de salvado de trigo para la producción de amilasa por *Paecilomyces lilacinus*. Tesis de Título de Biólogo-Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo.
- Rodríguez-Sanoja R, Morlon-Guyot J, Guyot JP. 2010. Nueva estructura de fijación al almidón en las  $\alpha$ -amilasas del género *Lactobacillus*. Nutrition, Alimentation, Sociétés. IRD-Montpellier. Montpellier, Francia.
- Rojo R, Mendoza G, Crosby M. 2001. Uso de la amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* en la digestibilidad in vitro del almidón de sorgo y maíz. Agrociencia. 4: 317-322.
- Ruiz P. 2008. Obtención de azúcares fermentables por degradación fúngica de pulpa de banano (*Cavendish valery*). Tesis de Título de Ingeniero Químico. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador.
- Sarmiento V, Vargas D, Pedroza A, Matiz A, Poutou R. 2003. Producción de  $\alpha$ -amilasa con células libres e inmovilizadas de *Thermus sp.*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. MVZ. 8(2): 310-317.
- Tinoco J. 2003. Producción, purificación y caracterización bioquímica de las amilasas extracelular e intracelular de *Streptococcus bovis*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. España.
- Valenzuela E, Leiva S, Godoy R. 2001. Variación estacional y potencial enzimático de microhongos asociados con la descomposición de hojarasca de *Nothofagus pumilio*. Rev. Chil. Hist. Nat.. 74(4).
- Vercauteren R, Dendooven E, Heylen A. 1998.  $\alpha$ -amilasa purificada de origen fúngico estable en ácido. La Sas Van Gent. Holanda.
- Whiteburst R. 2002. Enzymes in Food Technology. Edit. Sheffield Academic Press. Nueva York, USA.