

# Evaluación de la actividad amilolítica de *Aspergillus niger* ANM-1 en fermentaciones en estado sólido y sumergido para la obtención y caracterización de aditivos enzimáticos

Lenis Matute<sup>1</sup>, Annalisse Bertsch<sup>1</sup> e Isabel Díaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579. Maracay 2101. Venezuela.

<sup>2</sup> Facultad de Ingeniería. Núcleo Cagua. Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579. Cagua, Aragua. Venezuela.

## RESUMEN

Este trabajo evaluó el efecto del tipo de fermentación sumergida (FS) o en estado sólido (FES) y la suplementación del medio con varias fuentes de carbono en la inducción de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa y la glucoamilasa. Estos resultados fueron contrastados con los obtenidos empleando afrechillo de trigo como único sustrato fermentable en el medio para la obtención de aditivos enzimáticos empleando *Aspergillus niger* ANM-1. Se observó que los factores de mayor importancia en la inducción de las actividades enzimáticas estudiadas ( $P < 0,01$ ) fueron el tipo de fermentación empleada para las glucoamilasas y la fuente de carbono suplementada para las  $\alpha$ -amilasas. Además, los procesos fermentativos en sólido y en líquido fueron llevados a escala mayor empleando para ello fermentadores por carga y se obtuvieron dos aditivos multienzimáticos, de los cuales, el obtenido por FES presentó el mayor contenido de proteínas (37,5%) y las más elevadas actividades para las  $\alpha$ -amilasas (1.432 UA/g), glucoamilasas (3.442 UI/g), fitasas (5.765 UI/mL), xilanasas (419 BXU/g) y  $\beta$ -1,4 endoglucanasas (536 UI/g).

**Palabras clave:** *Aspergillus niger*,  $\alpha$ -amilasas, glucoamilasas, aditivo.

## Evaluation of the amyolytic activity of *Aspergillus niger* ANM-1 in solid state and submerged fermentation for obtaining and characterization of enzymatic additives

## ABSTRACT

This work evaluated the effect of method of fermentation submerged (FS) and solid (FES) and supplementation of the medium with various carbon sources, on the induction of enzymatic activity of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase. These results were compared using wheat bran as sole fermentable substrate in the medium to obtain enzyme additives employing *Aspergillus niger* ANM-1. It was observed that the most important factors on the induction of enzymatic activities ( $P < 0.01$ ) was the type of fermentation used for the glucoamylases and supplemented carbon source for  $\alpha$ -amylase. In addition, the fermentation processes in solid and liquid were taken on a larger scale load fermenters and two multienzymatic additives were obtained, of which, the one obtained by FES had the highest protein content (37.5%) and higher activities for  $\alpha$ -amylase (1,432 AU/g), glucoamylases (3,442 IU/g), phytase (5,765 IU/mL), xylanases (419 BXU/g) and endo  $\beta$ -1,4-glucanases (536 IU/g).

**Key words:** *Aspergillus niger*,  $\alpha$ -amylases, glucoamylases, aditive

---

\*Autor de correspondencia: Annalisse Bertsc

E-mail: bertscha@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

Los aditivos enzimáticos obtenidos en procesos biotecnológicos empleando desechos agrícolas a agroindustriales, son incorporados directamente en el alimento de pollos y cerdos en la etapa de iniciación (Morillo et al., 2003). Estos aditivos aportan enzimas tales como las amilasas, las cuales complementan la actividad desarrollada por las enzimas endógenas del tracto intestinal de los animales, permitiendo así, el uso de materias primas alternativas de bajo precio sin desmejorar la calidad de las dietas. Contribuye además a disminuir los costos atribuibles a los ingredientes usados en la alimentación animal y a mejorar la ganancia de peso y la conversión alimenticia (Palomo, 2008; Bertsch et al., 2010). En consecuencia, varios trabajos se han llevado a cabo para estudiar el efecto del uso de diferentes fuentes de carbono (almidón, harina de papas, afrechillo de trigo, carboximetilcelulosa) y de diversos microorganismos (*Aspergillus fumigatus*, *Bacillus sp.*, *Aspergillus niger*) en la producción de amilasas (Bertolin et al., 2003; Lagunas et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Grata et al., 2008; Gupta et al., 2008; Díaz, 2010; Asad et al., 2011; Domínguez et al., 2011). Este trabajo tiene como propósito evaluar el efecto del proceso de fermentación en estado sólido (FES) y fermentación sumergida (FS) y de la suplementación del medio, en la actividad de las  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas, así como la obtención y caracterización de dos aditivos enzimáticos empleando *Aspergillus niger* ANM-1 en un medio de cultivo a base de afrechillo de trigo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo

Se utilizó *Aspergillus niger* ANM-1, aislado a partir de granos de maíz (*Zea mays* L.), perteneciente al cepario del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química y Tecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (Mujica, 2006). Dicha cepa fue conservada bajo refrigeración a 4°C y propagada en cuñas de papa dextrosa agar (PDA).

### Medio de cultivo y condiciones del proceso fermentativo

Se emplearon 50 g/L de sustrato en un medio compuesto por afrechillo de trigo como sustrato base. Adicionalmente se utilizaron cinco fuentes de C suplementarias a distintos niveles de sustitución (5, 10 y 15%) para la prueba, las cuales se seleccionaron basadas en su disponibilidad y en la capacidad señalada como fuentes inductoras de amilasas. Estas fuentes de

C fueron residuos de pasta de trigo húmeda, residuos de papas (*Solanum tuberosum* L.), almidón soluble (Sigma S 9765), carboximetilcelulosa (CMC, Sigma C 4146) y celulosa microcristalina (Macherey-Nagel 81529), los cuales eran reactivos analíticos. Los residuos de pasta y papas fueron proporcionados por industrias locales. En el proceso de FES, se ajustó la humedad del proceso a 85% usando una solución salina a pH 4,27 compuesta por:  $\text{CaCO}_3$ , 0,5 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g/L y extracto de levadura, 2 g/L. En el proceso de FS, se utilizó una concentración de 50 g de sustrato/L de solución salina.

El proceso fermentativo se realizó en matraces de 500 mL, esterilizados a 121°C durante 15 min. El sustrato fue inoculado a temperatura ambiente, con esporas de *A. niger* ANM-1 e introducido en una cámara de fermentación a 37°C durante siete días para la FES. La FS se realizó durante un lapso de 64 h, a 37°C y con 300 rpm de agitación.

### Obtención del extracto enzimático

Los sustratos fermentados fueron recolectados y centrifugados a 12 000 rpm durante 20 min en centrifuga refrigerada marca Beckman, (modelo GS15R) a 4°C, obteniéndose el sobrenadante o extracto enzimático correspondiente.

### Actividad de la enzima $\alpha$ -amilasa

Se determinó la actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa utilizando el método reportado por Bird y Hopkins (1954), basado en la utilización de una solución con 0,5 mL de una solución buffer de cloruro-acetato 0,15 M a pH 5 y 0,5 mL de una disolución con almidón al 0,1%, a la cual se adicionó 10  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático, incubándose durante 8 min a 37°C. La reacción fue detenida con 4,5 mL de una solución I<sub>2</sub>/IK. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 580 nm, reportando la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en unidades amilolíticas (UA/mL), las cuales se definen como la capacidad de hidrolizar 0,1 mg de almidón.

### Actividad de la enzima glucoamilasa

Se determinó la actividad de la enzima glucoamilasa empleando el método espectrofotométrico señalado por Olmos (1987). Se tomaron 0,5 mL de extracto enzimático y le adicionaron 2 mL de una solución buffer cloruro de sodio 0,15 M a pH 5, 2,5 mL de una solución con 1% de almidón y se incubó durante 15 min a 60°C. La reacción fue detenida con 1 mL de ácido 3,5-dinitro-salicílico. Luego de enfriar, se incorporaron 8 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 575

nm. La actividad glucoamilásica se obtuvo en unidades internacionales (UI/mL), las cuales se definen como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por cada mL de extracto enzimático.

### Obtención del aditivo enzimático

Se efectuaron los procesos de FES en un fermentador de bandejas y de FS en un fermentador Microferm (New Brunswick Scientific, EUA), con 7 L de capacidad, a 37°C, agitación de 300 rpm y aireación de 2 vvm, empleando el sustrato resultante del estudio de comparación de medias señalado anteriormente, por presentar la mayor actividad de las enzimas en estudio. Asimismo, se monitorizaron las variaciones ocurridas en el pH (Hanna 8417 Instruments®, México), la concentración de azúcares y la actividad de las enzimas amilolíticas, en los sustratos fermentados (Miller, 1959; Covenin, 1979; Olmos, 1987). Estas mediciones se llevaron a cabo cada 4 h en el proceso de FS y a diario en la FES.

El sustrato fermentado fue deshidratado en un secador de bandejas Proctor Schwartz (Philadelphia, EUA) a 50°C, hasta que alcanzó peso constante. Por último, el material deshidratado fue molido para obtener los aditivos enzimáticos (uno por FS y otro en FES), los cuales fueron analizados en conjunto con el afrechillo de trigo para conocer su composición proximal, en cuanto a: humedad, proteína bruta, cenizas, grasa bruta y fibra bruta (Covenin, 1983) y las actividades de las enzimas  $\alpha$ -amilasas, glucoamilasas,  $\beta$ -1,4 endoglucanasas (Olmos, 1987), fitasas (Bitar y Reinhold, 1972) y xilanasas (Bailey *et al.*, 1991) en los aditivos obtenidos.

### Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño anidado en el que se evaluó el efecto sobre la actividad de  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas del método fermentativo empleado (FS o FES) y de cinco fuentes de C suplementadas (residuos de pasta alimenticia húmeda, residuos de papas, almidón, CMC y celulosa) a distintos niveles de sustitución (5, 10 y 15%), en un medio con afrechillo de trigo como sustrato base. Los resultados fueron analizados empleando análisis de varianza y se compararon las medias de los tratamientos usando la prueba de comparación de

medias de mínimas diferencias significativas de Fisher (Siegel y Castellan, 1998), a un nivel de confianza del 95%. Con base en estos resultados, se contrastaron las medias de los tratamientos con suplementación con respecto al uso del afrechillo de trigo como único sustrato en el cultivo, usando la prueba de comparación de medias antes señalada, bajo un diseño al azar.

Una vez obtenidos los aditivos, se evaluaron las actividades enzimáticas entre ambos empleando un diseño completamente aleatorizado. Los resultados fueron analizados empleando análisis de varianza y se contrastaron las medias de los tratamientos empleando la prueba de medias de Tukey (Montgomery, 2005). La información recopilada fue procesada con los programas informáticos Statgraphic (2011) y Minitab 15® (2008).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de diferentes fuentes suplementarias de C sobre la actividad enzimática

El análisis estadístico aplicado a los datos recolectados indica que la actividad de la  $\alpha$ -amilasa fue influida ( $P < 0,01$ ) por la fuente de C suplementada (Cuadro 1). Esto señala que la actividad amilolítica no fue afectada por el tipo de fermentación o los niveles de suplementación de los sustratos en el medio.

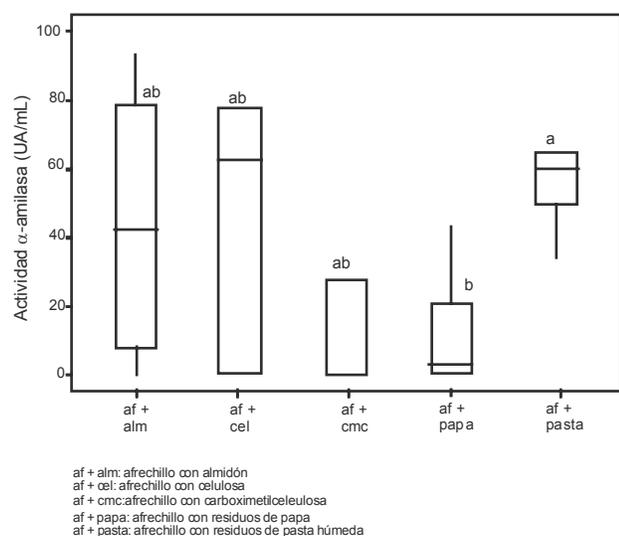
Asimismo, los resultados de la prueba de comparación de medias de Fisher de la actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa fue 28,93% superior en la FS, con respecto a la FES. No obstante, esta diferencia en las medias no fue estadísticamente significativa.

En la Figura 1 se puede observar que la prueba de comparación de medias de Fisher demostró la existencia de dos grupos homogéneos en los ensayos realizados en FS, donde el tratamiento suplementado con residuos de pasta húmeda presentó la más elevada actividad de la  $\alpha$ -amilasa y se diferenció ( $P < 0,05$ ) del tratamiento suplementado con residuos de papas.

En ambos procesos fermentativos (FS y FES) los datos recolectados permitieron evidenciar el efecto de las fuentes ricas en almidón como inductoras en la generación de enzimas amilolíticas (Kunamneni *et*

**Cuadro 1.** Análisis de varianza para la actividad de la  $\alpha$ -amilasa.

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	P
Tipo de fermentación	2.171,13	1	2 171,13	0,98	0,352
Fuente de carbono suplementada	17 786,11	8	2 223,26	3,88	0,007
Nivel de suplementación	11 475,23	20	573,76		
Total	31 432,50	29			



**Figura 1.** Actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa de acuerdo a los tratamientos estudiados. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) según la prueba de comparación de medias de Fisher.

*al.*, 2005; Chimata *et al.*, 2010). En este sentido, los resultados concuerdan con lo reportado por Bertsch *et al.* (2010) y Domínguez *et al.* (2011), donde el uso de los residuos de pasta como sustrato fermentable por *Aspergillus niger* ANM-1 ha permitido obtener como producto final aditivos enzimáticos donde predomina la actividad de las  $\alpha$ -amilasas. Así mismo, los resultados muestran que el CMC estimuló la actividad  $\alpha$ -amilásica, coincidiendo con lo reportado por Gupta *et al.* (2008), quienes señalan que cuando el CMC y la celulosa son usados como suplemento de C a bajas concentraciones, funciona como una buena fuente para la producción de  $\alpha$ -amilasa.

En cuanto a la actividad de la glucoamilasa, las pruebas estadísticas señalan que ésta enzima fue influida ( $P < 0,01$ ) por el tipo de fermentación empleada, mientras que la fuente de C suplementada no ejerció influencia sobre la actividad de esta enzima (Cuadro 2).

En general, la prueba de comparación de medias de Fisher demostró que la actividad de la enzima glucoamilasa fue 98% superior en la FES con respecto a la FS (Figura 2), lo que demuestra una diferencia entre los métodos fermentativos en la actividad de ésta enzima ( $P < 0,01$ ). Según Ghosh *et al.* (1990), Bertolin *et al.* (2003) y Pacheco *et al.* (2004), la menor actividad glucoamilásica en el proceso de FS puede deberse a que al elevarse la concentración de azúcares en el medio provoca la represión catabólica de la actividad glucoamilásica, aunque que este comportamiento no se observó en la FES. Al respecto, Fávila-Torres *et al.* (1998), y Nandakumar *et al.* (1999) afirman que en los

procesos de FES, las altas concentraciones de azúcares no afectan el rápido crecimiento del hongo, por lo que no se observa el efecto represor de los azúcares. Estos resultados coinciden con lo señalado por Papagianni *et al.* (2001), con respecto a que la FES le resulta "natural" al hongo y con frecuencia ofrece mejores resultados si se le compara con la FS. Asimismo, estas diferencias muestran las características intrínsecas entre los métodos de fermentación y la necesidad de su estudio para posibilitar la escogencia del sustrato según la actividad enzimática de interés.

En general, el estudio de las actividades enzimáticas ( $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas) evaluadas reveló que los factores que las afectan son distintos y no permiten la escogencia de un único método de fermentación o sustrato complementario al afrechillo que permita el escalamiento del proceso para la obtención de aditivos enzimáticos con alta actividad en  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas. Por ello se procedió a comparar las medias de las actividades de los medios suplementados con las obtenidas empleando afrechillo de trigo como único sustrato fermentable. En esta condición, las pruebas de comparación de medias de Fisher indicaron que al ser utilizado éste, como única fuente de C en el proceso de FES, aunque no difiere significativamente de las actividades que presentaron los sustratos suplementados, alcanzaron las más elevadas actividades de  $\alpha$ -amilasas (61,4 UA/mL) y glucoamilasas (252,8 UI/mL). En tanto que al emplear la FS se reportó una importante actividad de las  $\alpha$ -amilasas (48,81 UA/mL), cuando se fermentó afrechillo de trigo sin suplementación.

Estos resultados coinciden con lo señalado por Fadel (2000) e Ikram-ul-Haq *et al.* (2006), quienes afirman que el afrechillo de trigo presenta en su composición las proporciones adecuadas de las fracciones necesarias para inducir la síntesis de diversas enzimas, por lo que éste es usado comúnmente como medio para la producción de celulasas, amilasas y xilanasas. En este sentido, Ellaiah *et al.* (2002) y Anto *et al.* (2006) señalan que cuando se emplea un sustrato sin suplementación alguna en procesos de FES, el afrechillo de trigo suele superar los valores de actividades enzimáticas determinados para otros subproductos o residuos agroindustriales.

En general, el análisis del comportamiento obtenido para ambas actividades enzimáticas demostró que el afrechillo de trigo es un sustrato adecuado para la producción de este tipo de enzimas, lo cual pudiera reflejarse en menores costos del medio de cultivo al no requerir la utilización de inductores, aspecto de gran importancia ya que se ha señalado que el sustrato puede llegar a representar, hasta el 60% de la inversión total en los procesos de fermentación microbiana (OEA, 2006; Prescott *et al.*, 2003).

**Cuadro 2.** Análisis de varianza para la actividad de la glucoamilasa.

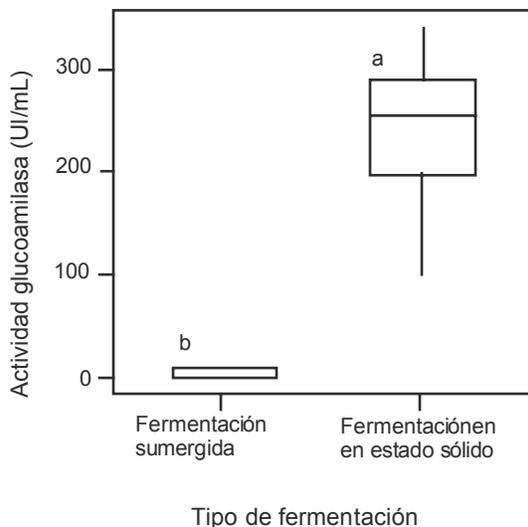
Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados medios	F	P
Tipo de fermentación	410 639,58	1	410 639,58	92,14	0,000
Fuente de carbono suplementada	35 655,50	8	4 456,94	2,07	0,089
Nivel de suplementación	42 990,33	20	2 149,52		
Total	489 285,41	29			

### Obtención de los aditivos enzimáticos

El escalamiento de los procesos estudiados en matraces a fermentadores por carga se efectuó empleando afrechillo de trigo como único sustrato. La FS se realizó durante 30 h, presentando el pH más elevado al inicio del proceso (4,82), disminuyendo hasta un valor de 3,76. Las variaciones en el pH podrían atribuirse a la acumulación de ácidos orgánicos en el cultivo como consecuencia de la actividad del hongo al degradar el sustrato (Sae-Lee, 2007). En lo que respecta al contenido de azúcares en el medio se determinó que la máxima concentración se obtuvo a las 26 h del proceso con 3.038,49  $\mu\text{g}/100\text{mL}$  de muestra (Figura 3A).

Por otra parte, en la FES se registró un valor promedio de pH de 5,8, alcanzando un valor de 6,15. La concentración de azúcares al día cero fue 13,5  $\mu\text{g}$  azúcar/100 mL, registrándose el contenido de azúcar más alto (57,28% de incremento) al tercer día de incubación, con 31,6  $\mu\text{g}$  azúcar/100 mL (Figura 3B).

En cuanto a la actividad amilolítica, los datos



**Figura 2.** Actividad de la enzima glucoamilasa de acuerdo al tipo de fermentación. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) según la prueba de comparación de medias de Fisher.

presentados en la Figura 4 muestran como a las 30 h del proceso fermentativo en sumergido (FS), se obtuvo la más elevada actividad enzimática para la  $\alpha$ -amilasas (20,48 UA/mL) y las glucoamilasas (110,88 UI/mL). Mientras que para la FES (Figura 5), 85,4 UA/mL fue la mayor actividad registrada para la  $\alpha$ -amilasa durante el cuarto día de la fermentación y para la glucoamilasa fue de 342,9 UI/mL, al séptimo día del proceso. Adicionalmente, se observó que las mayores actividades enzimáticas determinadas en las fermentaciones ocurrieron cuando disminuyó el contenido de azúcares en el sustrato, a causa del consumo de los mismos por parte del hongo (Ghosh *et al.*, 1990; Pacheco *et al.*, 2004). De igual forma, se constató que la actividad enzimática fue, en promedio 71,84% superior en la FES con respecto a la FS. Esto coincide con lo reportado por Nandakumar *et al.* (1999), quienes determinaron las mayores actividades en  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas en el proceso en sólido, señalando que esto podría deberse al bajo nivel de agua del sustrato y a la ausencia de un mecanismo que genere agitación, lo cual reduce considerablemente el proceso de difusión en el medio, limitando la represión catabólica atribuible a las elevadas concentraciones de azúcares.

### Caracterización de los aditivos enzimáticos

Los productos obtenidos en ambos procesos fermentativos dieron como resultado dos aditivos deshidratados cuyos rendimientos fueron de 2,7% y 65% para FS y FES, respectivamente. El análisis de la composición proximal efectuado a estos aditivos mostró que son diferentes en su composición (Figura 6), ya que provienen de metodologías de fermentación donde el crecimiento hifal, los fenómenos de aireación, de consumo de nutrientes y excreción de enzimas son distintos lo cual influye en las características del producto final (Reyes, 2006).

Se observa (Figura 6), que el contenido de proteína cruda en los aditivos enzimáticos supera en 97,1% (FES) y 53,3% (FS) a la proporción de esta fracción en el afrechillo de trigo. Este incremento es atribuible al crecimiento del hongo en el medio de cultivo, ya que la estructura celular de este moho presenta un alto contenido de proteínas (Oshoma y Ikenebormeh,

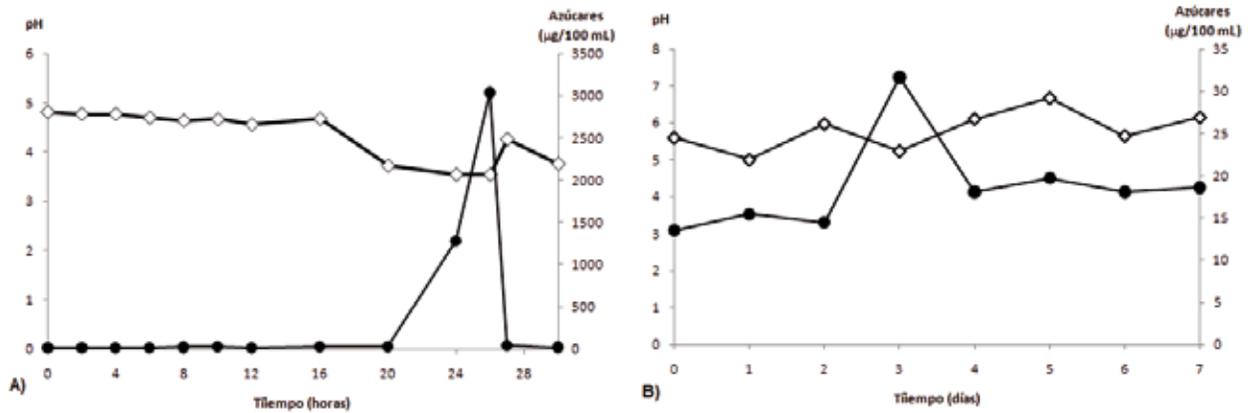


Figura 3. Variación del pH (◇) y de la concentración de azúcares (●) durante la FS (A) y la FES (B).

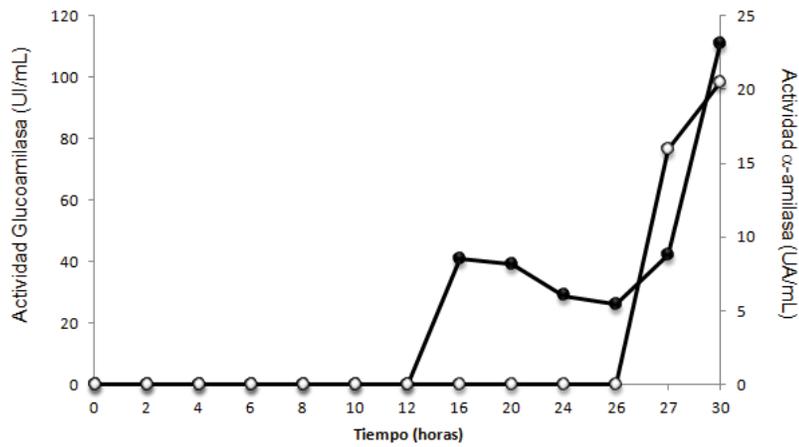


Figura 4. Cinética para la actividad α-amilasa (○) y glucoamilasa (●) en FS.

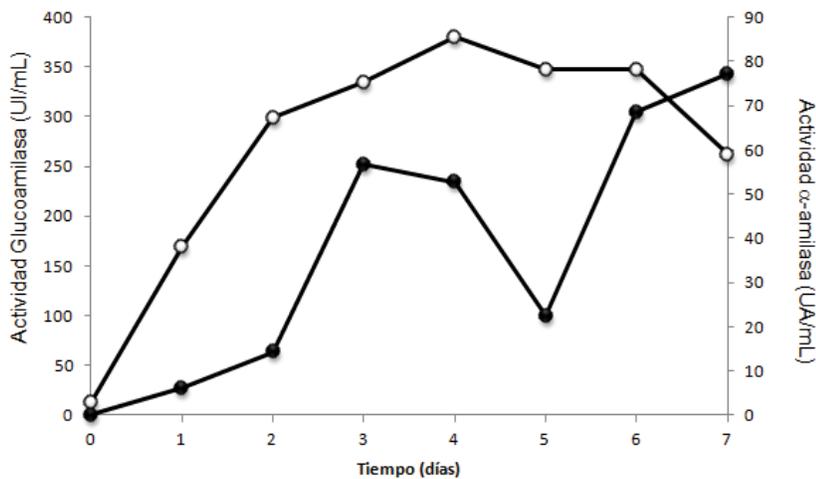
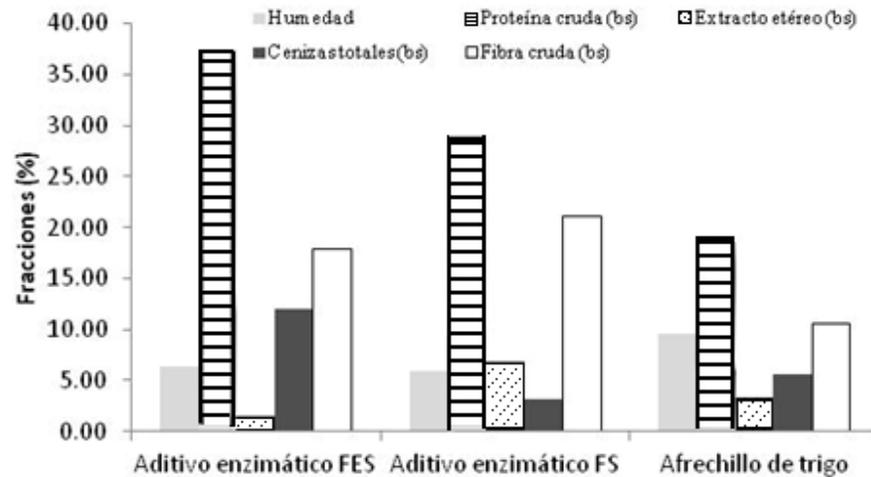


Figura 5. Cinética para la actividad α-amilasa (○) y glucoamilasa (●) en FES.



**Figura 6.** Composición proximal de los aditivos enzimáticos.

2005; Pontón, 2008). Asimismo, es importante resaltar que el contenido proteico en el aditivo obtenido por FES es superior en 26,2% al compararlo con el otro producto fermentado. De igual forma, se observa que el contenido en fibra cruda en los aditivos supera en 41% (FES) y 50% (FS) el señalado para el afrechillo de trigo. Este resultado coincide con lo señalado en otros trabajos, en donde determinaron un mayor contenido de fibra en el sustrato fermentado con respecto a la materia prima empleada en la fermentación (Oseni y Ekperigin, 2007). La razón de este incremento puede deberse a que en la composición de la pared celular microbiana existen polisacáridos análogos a la celulosa, tal como la quitina o los beta glucanos, lo que podría haber influido en los valores de las fracciones de fibra reportadas en este trabajo, tomando en cuenta el aporte de la biomasa fúngica en el producto (Park y Kim, 2010; Calvo y Castro, 1995; Peter, 2002).

Por último, se constató que los aditivos obtenidos son productos de tipo multienzimático, registrándose actividad para  $\beta$ -1,4 endoglucanasas, xilanasas y fitasas, además de las  $\alpha$ -amilasas y las glucoamilasas (Cuadro 3). En este sentido, se observó que las propiedades enzimáticas de los productos fueron significativamente

superiores ( $P < 0,05$ ) en cuanto a la actividad de las  $\alpha$ -amilasas (61%), xilanasas (68%) y fitasas (80%) en el aditivo obtenido por FES respecto al otro aditivo evaluado. Esto puede deberse a que la represión catabólica se minimiza en los procesos de FES, lo cual favorece las más elevadas actividades enzimáticas cuando se compara con la FS (Nandakumar *et al.*, 1999). Asimismo, se ha indicado que al ser la FES un método parecido al hábitat natural de los microorganismos, puede proveer mayor eficiencia en la producción de algunas enzimas y metabolitos (Jacob y Prema, 2006). Con respecto a la actividad de la  $\beta$ -1,4 endoglucanasas, aunque son similares estadísticamente, la actividad enzimática en el producto elaborado en el proceso en sólido supera en 30% a la del producto obtenido por FS, lo que sugiere que el aditivo obtenido por FES presenta mayores ventajas en cuanto a la calidad del producto.

## CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este trabajo, el tipo de fermentación (FS y FES) a emplear en los procesos biotecnológicos, en conjunto con la fuente de C suplementada, resultaron ser los principales factores de

**Cuadro 3.** Actividad enzimática de los aditivos.

Actividad enzimática	Aditivo enzimático FES	Dif.†	Aditivo enzimático FS
$\alpha$ -Amilasas (UA/g)	1 431,90±20,65	*	572,36±45,93
Glucoamilasas (UI/g)	3 442±199,44	ns	1 421,60±150,8 <sup>s</sup>
$\beta$ -1,4 endoglucanasas (UI/g)	535,62±36,78	ns	376,79±47,08 <sup>s</sup>
Xilanasas (BXU/g)‡	419,81±48,82	**	135,90±3,02
Fitasas (UI/mL)	5 764,80±16,97	**	1 195,00±18,03

† Asterisco simple y doble indican diferencia significativa a  $P < 0,05$  y  $P < 0,01$ , respectivamente. ns = no significativo.

‡ BXU = Unidades de xilanasas correspondientes a 1 nmol de xilosa de xilano en 1 seg

importancia sobre la inducción de la actividad de las  $\alpha$ -amilasas y las glucoamilasas, durante el cultivo de *Aspergillus niger* ANM-1 en medio a base de afrechillo de trigo. Finalmente, se determinó que la fermentación en estado sólido ofrece mayores ventajas en la obtención de productos destinados a la alimentación animal, al presentar el aditivo obtenido por este medio las mayores actividades enzimáticas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico al CDCH/UCV mediante el proyecto PG-01-7557-2009/1 y a la TSU Hazel Román por su colaboración técnica.

## REFERENCIAS

- Anto, H.; U.B. Trivedi; K.C. Patel. 2006. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. *Bioresour. Technol.* 97: 1161-1166.
- Asad, W.; M. Asif; S. Ajaz. 2011. Extracellular enzyme production by indigenous thermophilic bacteria: partial purification and characterization of  $\alpha$ -amylase by *Bacillus sp.* WA21. *Pak. J. Bot.* 43: 1045-1052.
- Bailey, M.; P. Biely; K. Poutanen. 1991. Interlaboratory testing methods for assay of xylanase activity. *J. Biotech.* 23: 257-270.
- Bertolin, T.; W. Schmidell; A. Maiorano; J. Casara; J. Costa. 2003. Influence of carbon, nitrogen and phosphorus sources on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. *J. Biosci.* 58: 708-712.
- Bertsch, A.; G. Domínguez; V. de Basilio; C. Mazzani; O. Luzón; H. Testi. 2010. Caracterización de aditivos enzimáticos obtenidos por monocultivo (*Aspergillus niger*) y cocultivo (*Aspergillus niger* - *Saccharomyces cerevisiae*) y su efecto sobre el comportamiento productivo de pollos de engorde. *Rev. Fac. Cienc. Vet. UCV.* 51: 27-35.
- Bird, R.; R. Hopkins. 1954. The action of some  $\alpha$ -amylases on amylose. *Biochem. J.* 56: 86-99.
- Bitar, K.; H. Reinhold. 1972. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosa of rat, chicken, calf and man. *Biochem. Biophys. Acta* 268: 442-452.
- Calvo, M.; M. Castro. 1995. Fibra cruda y quitina en el crustáceo langosilla (*Pleuroncodes planipes*, Stimpson): similitudes y diferencias. *Cienc. Mar.* 21: 179-186.
- Chimata, M.; P. Sasidhar; C. Suresh. 2010. Production of extracellular amylase from agricultural residues by a newly isolated *Aspergillus* species in solid state fermentation. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 5162-5169.
- Covenin (Comisión Venezolana de Normas Industriales). 1979. Norma 1315. Alimentos: Determinación del pH (Acidez iónica). Ministerio de Fomento. Fondonorma. Caracas. Venezuela. 7 p.
- Covenin (Comisión Venezolana de Normas Industriales). 1983. Norma 1881. Alimento completo para aves. Ministerio de Fomento. Fondonorma. Caracas. Venezuela. 10 p.
- Díaz, K. 2010. Evaluación nutricional de un aditivo enzimático obtenido por fermentación microbiana de afrechillo de trigo para la alimentación de cerdos. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 24 p.
- Domínguez, G.; A. Bertsch; C. Mazzani; O. Luzón; V. de Basilio. 2011. Obtención de un aditivo microbiano producto de la fermentación de los desechos del pastificio por *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* y su evaluación nutricional en pollos de engorde. *Rev. Cien. Fac. Cien. Vet. LUZ.* 21: 72-79.
- Ellaiah, P.; K. Adinarayana; Y. Bhavani; P. Padmaja; B. Srinivasula, B. 2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochem.* 38: 615-620.
- Fadel, M. 2000. Production physiology of cellulases and  $\beta$ -glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions. *J. Biol. Sci.* 1: 401-411.
- Fávela-Torres, E.; J. Córdova-López; M. García-Rivero; M. Gutiérrez-Rojas. 1998. Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochem.* 33: 103-107.
- Ghosh, A.; B. Chatterjee; A. Das. 1990. Induction and catabolite repression of high-affinity glucoamylase in *Aspergillus terreus* strain 4. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1307-1311.
- Grata, K.; M. Nabrdalik; A. Latala. 2008. Effect of different carbon sources on amylolytic activity of *Bacillus sp.* isolated from natural environment. *Proc. ECOpole.* 2: 321-324.
- Gupta, A.; V. Gupta; D. Modi; L. Yadaba. 2008. Production and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol.* 7: 551-556.

- Ikram-ul-Haq; K. Shahzadi; U. Hameed; M. Javed; M. Qadeer. 2006. Consortia of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* and Bio-synthesis of glucoamylase. *J. Appl. Sci. Res.* 2: 553-558.
- Jacob, N.; P. Prema. 2006. Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 263-267.
- Kunamneni, A.; K. Permaul; S. Singh. 2005. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *J. Biosci. Bioeng.* 100: 168-171.
- Lagunas, I.; B. García; E. Castaño; C. Regalado; E. Ávila. 2006. Producción de enzimas hemicelulíticas por fermentación sólida y su aplicación en alimento balanceado para pollo de engorda. *Vet. Méx.* 37: 1-13.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.* 31: 426-429.
- Minitab. 2008. Meet Minitab 15. Versión 1.1. Minitab Inc. State College, USA.
- Montgomery, D. 2005. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. Ciudad de México, México. 589 p.
- Morillo, A.; D. Villalba; J. Sánchez; M. Cortés. 2003. Suplementación enzimática en dietas para lechones. *Rev. Porcinocul.* 23: 78-88.
- Mujica, M. 2006. Bioconversión de los residuos del procesamiento de pasta alimenticia en etanol por *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de Grado. Fac. Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 88p.
- Nandakumar, M.P.; M.S. Thakur; K.S.M.S. Raghavarao; N.P. Ghildyal. 1999. Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 380-384.
- OEA (Organización de los Estados Americanos). 2006. Microbiología Industrial. Serie de Biología. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, USA. 103 pp.
- Oliveira, A., Oliveira, L., Andrade, J. y Freitas, A. 2007. Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates. *Braz. J. Microbiol.* 38: 208-216.
- Olmos, A. 1987. Reportes de biotecnología. *Biotechn.* 5: 36-39.
- Oseni, O.; M. Ekperigin. 2007. Studies on biochemical changes in maize wastes fermented with *Aspergillus niger*. *Biokemistri.* 19: 75-79.
- Oshoma, C.; M. Ikenebormeh. 2005. Production of *Aspergillus niger* biomass from rice bran. *Pak. J. Nutrition.* 4: 32-36.
- Pacheco, R.; J. Carvalho; A. Converti; P. Perego; L. Tavares; S. Sato. 2004. Production of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase from different starches by a new *Trichoderma* sp. isolate. *Ann. Microbiol.* 54: 169-180.
- Palomo, A. 2008. Tendencias en alimentación porcina. I Congreso Asociación Nacional de Veterinarios de Porcinos. Zaragoza, España. 19p.
- Papagianni, M.; S. Nokes; K. Filer. 2001. Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: Effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. *Food Tech. Biotechn.* 39: 319-326.
- Park, B.; M. Kim. 2010. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 5152-5164.
- Peter, M.G. 2002. Chitin and chitosan in fungi. In: Steinbüchel, A. (Ed.) *Biopolymers: Polysaccharides II*. Vol. 6. Wiley-VCH. Weinheim, Alemania. pp.123-151.
- Pontón, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev. Iberoam. Micol.* 25: 78-82.
- Prescott, L.; J. Harley; D. Killein. 2003. Microbiología. 4ta ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 1005p
- Reyes, I. 2006. Difusión y crecimiento microbiano en un medio sólido. Trabajo de Maestría en Ciencias. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México. México. 114p.
- Sae-Lee, N. 2007. The production of fungal mannanase, cellulose and xylanase using palm kernel meal as a substrate. *Walailak J. Sci. Tech.* 4: 67-82.
- Siegel, S.; J. Castellan. 1998. Estadística no Paramétrica Aplicada a las Ciencias de la Conducta. Editorial Trillas. Ciudad de México, México. 437p.
- Statgraphics. 2011. Statgraphics Analytical Software for PC's. Centurion XVI. StatPoint Technologies. Warrenton, EUA.