

Trabajo completo

Selección de sustratos económicos para la producción de conidios de *Aspergillus niger* a nivel industrial

RECIBIDO: 17/04/2012

ACEPTADO: 20/08/2012

Sobrero, S.¹ • Frisón, L.² • Aringoli, EE.² •
Fernández, V.¹ • Zapata de Basílico M.de la L.²

¹Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Paraje El Pozo.

²Facultad de Ingeniería Química - Santiago del Estero 2829.

Universidad Nacional del Litoral (3000). Santa Fe - Argentina.

*Correspondencia: Silvina Sobrero - Teléfono: (0342) 4575206 (Int. 127). E-mail: ssobrero@fbc.edu.ar

RESUMEN: *Aspergillus niger* es importante en procesos biotecnológicos como en la producción de ácidos y enzimas. Ha sido considerado como seguro, (GRAS) por la FDA lo que permite su aplicación en la industria de alimentos. El objetivo del trabajo fue estudiar la velocidad de crecimiento radial de 4 aislados de *Aspergillus niger* en medios sólidos a base de maíz (MA), soja (SA) y mezcla de frutas con vegetales (V_gA), con intención de disponer de medios de cultivo económicos para propagar los conidios y reducir costos en los procesos biotecnológicos. Para ello, se sembraron suspensiones de conidios en la superficie de los medios. Se midieron los radios de las colonias durante 7 días y se modelaron con la ecuación de Baranyi y Roberts, utilizando el software DMFIT.

En la mayoría de los casos los aislados no presentaron período lag y cuando existió, no superó las 12 horas. Las mayores velocidades de crecimiento se obtuvieron en SA ($\mu_{max} =$

7.49 mm día⁻¹, promedio de 4 aislados). En 7 días se llegó a la fase estacionaria con máxima conidiación. Se compararon los resultados con los obtenidos en MEA mostrando diferencias significativas. SA se podría elegir como medio económico y de fácil preparación para la producción de conidios. **PALABRAS CLAVE:** *Aspergillus niger*, medios económicos, micología predictiva, crecimiento radial.

SUMMARY: *Selection of economic substrates for the production of conidia of Aspergillus niger at industrial level*

Aspergillus niger is important in biotechnological processes such as production of acids and enzymes. It has been regarded as safe (GRAS) by FDA, which allows its implementation in the food industry. The objective of this work was to study the radial growth rate of 4 isolates of *Aspergillus niger* on solid media based on corn (MA), soybean (SA) and mixed fruit with vegetables

(V_gA), with the intention of having economic culture media to obtain great amounts of conidia and reduce costs in biotechnological processes. For this purpose, conidia were seeded on the surface of the media. We measured the radius of the colonies for 7 days and modelled them with the equation of Baranyi and Roberts, using the DMFIT software. In most cases, the isolates showed no lag period and when it existed, it did not exceed 12 hours. The highest growth rates was obtained

in SA ($\mu_{\text{max}} = 7.49 \text{ mm day}^{-1}$, average of 4 isolates). In 7 days, the stationary phase with maximum conidiation was reached. The results were compared with those obtained in MEA showing significant differences. SA could be chosen as a cheap and easy-to-prepare medium for the production of conidia. **KEYWORDS:** *Aspergillus niger*, economic substrates, predictive mycology, radial growth.

Introducción

Aspergillus niger es un moho filamentoso ascomycete de distribución ubicua importante en procesos biotecnológicos como producción industrial de ácido cítrico, oxálico y ácido glucónico, ingredientes alimentarios, farmacéuticos y en la industria de enzimas extracelulares con un alto nivel de producción lo que posibilita su utilización a gran escala (1, 2, 3). Ha sido considerado como seguro, GRAS (Generally Recognised As Safe) (by the United States Food and Drug Administration) lo que permite su aplicación en la industria de alimentos tanto para el hombre como para animales (4, 5). Como secreta grandes cantidades y variedades de enzimas, es seleccionado para su producción en estado sólido y en cultivo sumergido (6, 7). Es utilizado para la obtención de glucoamilasa, utilizada en la producción de jarabe de maíz de alto contenido en fructosa; de pectinasa utilizada en la clarificación de vino y sidra, de α -galactosidasa que es una enzima que descompone ciertos azúcares complejos (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14).

La industria alimentaria genera una gran cantidad de residuos sólidos orgánicos e

inorgánicos, de características contaminantes que podrían servir de sustratos para el desarrollo de este moho y posterior obtención de importantes productos. En medios sólidos se puede valorar el crecimiento fúngico midiendo la velocidad de crecimiento de las hifas expresado como velocidad de crecimiento radial de la colonia (mm día^{-1}). Los resultados de estas mediciones se pueden tratar con modelos matemáticos aportados por la micología predictiva, que es una subdisciplina de la microbiología de alimentos que combina el conocimiento microbiano y matemático para desarrollar modelos matemáticos que describen la evolución de una población microbiana en determinadas condiciones ambientales (15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25).

Con intención de disponer de medios de cultivo económicos para reducir costos en los procesos biotecnológicos, se formularon medios sólidos a base de cereales, oleaginosas y frutas para evaluar cual de ellos resultaría aconsejable para la propagación de conidios por la velocidad de crecimiento obtenida en cada uno.

Materiales y Métodos

Cepas utilizadas

Se utilizaron 4 aislados de *Aspergillus niger* productores de ácido cítrico pertenecientes al cepario micológico del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química Universidad Nacional del Litoral (LMFIQ).

Los aislados conservados en crioviales con 0.2% agar-agua (p v⁻¹) en heladera se reactivaron en agar extracto de malta (MEA) y se incubaron a 25°C durante 10 días.

Medios de cultivo

Los medios elegidos para realizar el estudio fueron formulados a base granos de maíz (MA), porotos de soja (SA) y mezcla de vegetales y frutas (V_gA), y se compararon con un medio tradicional como el MEA. Su composición y su formulación se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Formulación y composición de los medios de cultivo

Medio de cultivo	Formulación	Concentración gL ⁻¹	Actividad Acuosa a 25°C**	Proteínas gL ⁻¹	Lípidos gL ⁻¹	Hidratos de carbono gL ⁻¹	Referencias bibliográficas
MEA	Malta	20					
	Agar	15	0,981	3,20	0,40	34,40	(26)
	Glucosa	20					
	Peptona	1					
MA	Granos de maíz	60	0,982	25,80	21,60	13,20	(27)
	Agar	15					
SA	Porotos de soja	60					
	Agar	15	0,983	5,40	2,28	42,60	(****)
V _g A	Jugo de vegetales	175***	0,986	1,03	Nd*	5,15	(28)
	V _g						
	CaCO ₃	3					
	Agar	15					

* Esterilizado durante 15 minutos a 121°C.

** Equipo Aqualab CX 2T Decagon Devices Inc. Pullman Washington 99163 USA.

*** mL del jugo comercial

**** Preparado de forma similar a MA

Preparación del inóculo

Se tomaron los conidios por raspado de la superficie de medio MEA y se resuspendieron en solución salina (NaCl, 8,5 gL⁻¹ en agua) con Tween 80 (0,1% v v⁻¹) hasta alcanzar una concentración de 10⁷-10⁸ conidios mL⁻¹.

Curva de crecimiento

Se inocularon 5 placas de Petri para cada medio de cultivo y para cada aislado con 2 μL de la suspensión anterior en el centro de

cada placa que contenía 15 mL de medio ya solidificado. Se incubó a 25 °C durante 7 días. El radio de la colonia se obtuvo realizando en cada uno 5 mediciones (mm) cada 24 horas durante 7 días.

La velocidad de crecimiento se obtuvo a partir de los radios (y , mm) medidos a diferentes tiempos (t , días), modelándolos con la ecuación de Baranyi y Roberts, utilizando el software DMFIT (DM: Dynamic Modelling 2.1) (29, 30).

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(e^{-v \cdot t} + e^{h_0} - e^{-v \cdot t - h_0} \right) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{\frac{m \mu_{\max} t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left(e^{-v \cdot t} + e^{h_0} - e^{-v \cdot t - h_0} \right) - 1}}}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right)$$

Donde: $y(t)$ es el radio (mm), t tiempo (d), y_0 radio de la colonia al tiempo $t = 0$ (mm), μ_{\max} radio máximo de la colonia (mm d⁻¹), m, v parámetros de curvatura para caracterizar la transición de la fase exponencial; h_0 parámetro adimensional que cuantifica el estado fisiológico inicial de las células, y_{\max} radio máximo de la colonia.

Análisis estadístico

Se realizó la validación interna del modelo, para lo cual se calcularon el coeficiente de correlación (r^2), el factor Sesgo (Bias) y el factor de Precisión (FP) (31, 32, 33 y 34). Para comparar la velocidad máxima de

crecimiento de los mohos en los distintos medios se utilizó el Test de Kruskal ± Wallis (35).

Resultados y discusión

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos al construir las curvas de crecimiento de los mohos en los medios elegidos con el programa Dmfit. Para estimar los parámetros de la ecuación de Baranyi se utilizaron mediciones de radio (mm) para cada muestra. Se muestran la velocidad de crecimiento específica (μ_{\max}), el diámetro inicial de la colonia (y_0) y el diámetro final (y_{end}), el periodo lag, el r^2 y los factores Bias y FP.

Tabla 2. Parámetros de crecimiento y validación

Medio de cultivo	Moho	N° de datos	μ (mm día ⁻¹)	Lag (días)	y_0 (mm)	y_{end} (mm)	r^2	Validación interna	
								Bias	FP
Agar Maíz	A1	100	5,30	0,00	6,15	31,65	0,9744	0,9789	1,0882
	A2	100	5,19	0,00	5,80	31,66	0,9854	0,9818	1,0755
	A3	100	5,32	0,00	4,85	30,31	0,9714	0,9587	1,1190
	A4	100	4,15	0,00	4,73	19,39	0,9769	0,9940	1,0606
Agar Soja	A1	100	7,46	0,12	3,94	46,20	0,9990	0,9995	1,0171
	A2	100	7,96	0,34	4,72	39,60	0,9967	0,9993	1,0325
	A3	100	7,28	0,10	4,51	40,47	0,9995	0,9991	1,0258
	A4	75	7,53	0,00	4,76	39,91	0,9707	0,9245	1,1758
Agar V_8	A1	100	6,45	0,00	3,86	38,98	0,9833	0,9591	1,1035
	A2	100	5,78	0,00	3,54	39,48	0,9872	0,9966	1,0419
	A3	100	6,30	0,00	3,58	45,33	0,9941	0,9841	1,0454
	A4	100	8,42	0,51	3,19	38,85	0,9975	0,9996	1,0269
MEA	A1	150	3,51	0,00	5,05	28,57	0,9822	0,9811	1,0820
	A2	125	4,86	0,00	5,87	27,41	0,9327	0,9431	1,2024
	A3	90	12,73	0,33	3,27	37,28	0,9915	0,9978	1,0555
	A4	162	5,84	0,00	5,79	35,15	0,9402	0,9878	1,1053

En MA ningún aislado muestra fase lag. En SA el aislado 5 es el único que no presentó fase lag; los demás aislados tienen fases de latencia que varían entre 2,4 a 8 horas. En V_8A el comportamiento es diferente ya que el aislado 5 es el único que necesita adaptarse al medio (fase lag de 12 hs). En el medio de referencia (MEA) sólo muestra fase lag el aislado A3.

Los promedios de y_{end} para todos los mohos en V_8A y SA son 40,7 mm y 41,5 mm, respectivamente. En MEA el valor promedio es de 32 mm superior al alcanzado en MA, que es 28,25 mm.

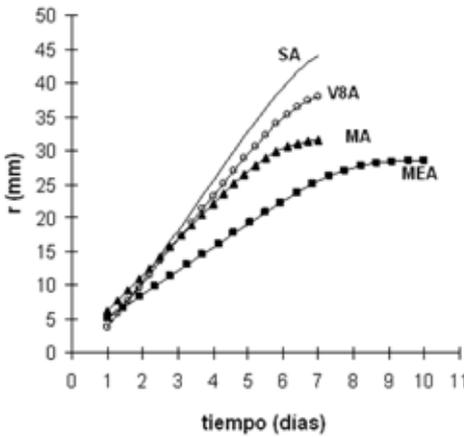
Como se muestra en la Tabla 2 los valores de BIAS son < 1 y $\geq 0,5$, lo que permiten considerar como aceptable al modelo propuesto. FP menores a 1,10 indican des-

viaciones menores al 10% entre los valores predichos y los observados. Solo A4 en SA y A2 en MEA superan dicho valor.

En las Figuras 1, 2, 3 y 4 se pueden observar las curvas de crecimiento de cada aislado en los diferentes medios.

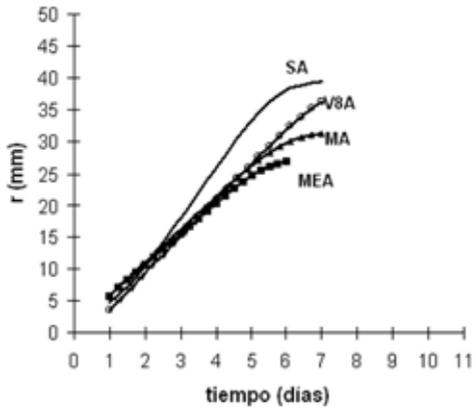
Para comparar las velocidades de crecimiento en los distintos medios y de los distintos aislados se utilizó el test de Kruskal-Wallis que compara las medianas de los valores ya que los datos no tenían distribución normal.

Figura 1. Curvas de crecimiento radial del Aislado 1 de *A. niger* en los distintos medios de cultivo



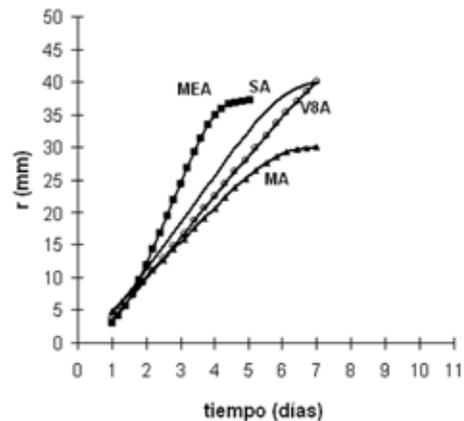
SA Agar Soya | MA Agar Maíz | MEA Agar Extracto de Malta | V₈A Agar V₈

Figura 2: Curvas de crecimiento radial del Aislado 2 de *A. niger* en los distintos medios de cultivo



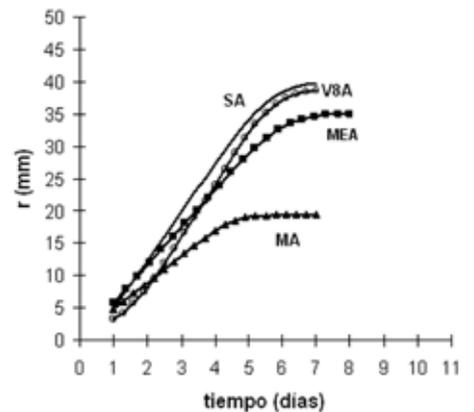
Idem, figura 1

Figura 3. Curvas de crecimiento radial del Aislado 3 de *A. niger* en los distintos medios de cultivo



Idem, figura 1

Figura 4. Curvas de crecimiento radial del Aislado 4 de *A. niger* en los distintos medios de cultivo



Idem, figura 1

Si comparamos las medianas de las velocidades de todos los aislados en cada medio estudiado, observamos que el único medio en el cual las velocidades de crecimiento de los aislados no tienen diferencias significativas es SA ($p = 0,074$). En medio MEA, que es el medio usado de rutina para la identificación de mohos y que en este trabajo se emplea como medio de referencia, las velocidades de crecimiento de los aislados analizados son significativamente diferentes ($p = 0,004$). Se distinguen 3 grupos: aislado 1, aislado 2 y 5 y aislado 3.

En MA se observó que había diferencias significativas en las medias de las velocidades ($p = 0,043$) de los diferentes aislados distinguiéndose 2 grupos: aislado 1, 2 y 4 separados del aislado 5. En V_8A se observó que había diferencias significativas en las medias de las velocidades ($p = 0,004$) de los diferentes aislados distinguiéndose 2 grupos: aislado 1, 2 y 4 separados del aislado 5. Si comparamos las medianas de las velocidades de cada aislado en todos los medios se observa que el aislado 1, 3 y 5 tienen comportamiento diferentes en todos los medios estudiados ($p = 0,0011$; $p = 0,0007$ y $p = 0,003$ respectivamente). Para el aislado 2 también existen diferencias significativas en los distintos medios ($p = 0,01$) pero se distinguen 2 grupos: medio MEA, MA y V_8A se comportan de forma similar separándose de SA.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, a través de CAI + D 2009-2012 PI 15-92 como tam-

Se puede notar que SA y V_8A son los medios en los cuales todos los aislados crecen más rápidamente con una buena producción de conidios, $\mu_{\text{promedio}} = 7.49$ mm día⁻¹ para SA y $\mu_{\text{promedio}} = 6.73$ mm día⁻¹ para V_8A ; alcanzando los valores más altos de yend 41.54 mm y 40.7 mm. Wang y col. (7) reportaron que el mayor contenido de proteínas de la harina de soja contribuía a una mayor producción de xilanasa. En este estudio se encuentra que dicho nutriente no se puede considerar excluyente ya que tanto en SA (rico en proteínas), como V_8A (pobre en proteínas) todos los aislados ensayados crecieron favorablemente. Estos sustratos serían una buena opción para su aplicación en procesos industriales como producción de enzimas y ácidos orgánicos. Los procesos fermentativos utilizando medios sólidos presentan ventajas frente a los medios líquidos como: simplicidad, alta productividad y productos concentrados (8, 9, 10, 11, 13, 14).

Conclusión

SA se puede elegir como medio económico y de fácil preparación para la producción de conidios de *A. niger* que podrían ser utilizados en procesos biotecnológicos. Con la ayuda de la micología predictiva podríamos estimar el momento óptimo para realizar la cosecha de conidios.

bién a la Dra. María de la Luz Zapata de Basílico, Directora del proyecto: *Control de mohos pigmentados en plantas de alimentos*.

Referencias bibliográficas

1. Magnuson, J., Lasure L., 2004. "Organic acid production by filamentous fungi". In: Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine. Tkacz, J. and Lange, L., eds. (New York).
2. Wösten, H.A.B., Scholtmeijer, K. and de Vries, R.P., 2007. "Hyperproduction of enzymes by fungi". In Food Mycology. A Multifaceted Approach to Fungy and Food. Ed. By Jan Dijksterhuis & Samson R.A. CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, (USA). Chap. 10.
3. Meijer, M., Huobaken, J.A.M.P., Dalhuijsen, S., Samson, R.A. and de Vries, R.P., 2011. Growth and hydrolase profiles can be used as characterization to distinguish *Aspergillus niger* and other black *Aspergilli*. *Studies in Mycology*. 69, 19 - 30.
4. Samson, R.A. and Pitt, J.I., 2000. "Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification". Samson R.A., Pitt J.I., editores. Harwood Academic Publishers, (Australia)
5. FDA/CFSAN, 2008. "Inventory of GRAS Notices: Summary of all GRAS Notices". *US FDA/CFSAN*. <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-gras.html>
6. Viniestra, G., Favela, T., Aguilar, C., Romero, S., Díaz, G., Augur, C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng.* 13,157 -167.
7. Wang, X.J., Bai, J.G., Liang, Y.X., 2006. Optimization of multienzyme production by two mixed strains in solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 533 - 540.
8. Abe, J., Bergman, F.W., Obata, K., Hikuri, S., 1988. Production of raw starch digesting amylase by *Aspergillus*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 27, 447- 450.
9. Trejo-Hernandez, M.R., Oriol, E., Lopez-Canales, A., Roussos, S., Viniestra, G., Raimbault, M., 1991. Production of pectinase by *Aspergillus niger* by solid state fermentation on support. *Micol. Neotrop. Apl.* 4, 49 - 62.
10. Lonsane, B.K., Ramesh, M.V., 1992. Production of bacterial thermostable enzymes by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production. *Adv. Appl. Microbiol.* 15, 1 - 48
11. Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Kazantzidou, A., Antonopoulos, D.F., Papageorgiou, I., Tjamos, E.C., 2004. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth raisin and wine-producing vineyards in Greece: population composition, ochratoxin A production and chemical control. *J. Phytopath.* 152, 250 - 255.
12. Metidieri, S., Souza, A., Schrank, A., Henning, M., 2006. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresour Technol.* 97,1217-1224.
13. Perrone, G., Mulé, G., Susca, A., Battilani, P., Pietro, A., Logrieco, A., 2006. Ochratoxin A production and AFLP analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Appl. Environm. Microbiol.* 72, 680 - 685.
14. Cheng Liu, Zhong-Tao Sun; Jin-Hua Du; Jian Wang, 2008. Response surface optimization of fermentation conditions for producing xylanase by *Aspergillus niger*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 703 - 711.
15. Cuppers, H.G.A.M., Oomes, S., Brul, S., 1997. A model for the combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage molds. *Appl. Environm. Microbiol.* 63, 3764 - 3769.
16. Valik, L., Baranyi, J., Gorner, F., 1999. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 141 - 46.
17. Patriarca, A., Vaamonde, G., Fernández Pinto, V., Comerio, R., 2001. Influence of water activity and temperature on the growth of *Wal-*

- lemia sebi*: application of a predictive model. Int. J. Food Microbiol. **68**, 61- 67.
- 18.** Rosso, L., Robinson, T.P., 2001. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. Int. J. Food Microbiol. **63**, 265 -273.
- 19.** Sautour, M., Rouget, A., Dantigny, P, Divies, C., Bensoussan, M., 2001. Prediction of conidial germination of *Penicillium chrysogenum* as influenced by temperature, water activity and pH. Lett. Appl. Microbiol. **32**, 131 - 134.
- 20.** Sautour, M., Dantigny, P, Guilhem, M. And Bensoussan, M., 2003. Influence of inoculum preparation on the growth of *Penicillium chrysogenum*. J. Appl. Microbiol. **95**, 1034 -1038.
- 21.** Dantigny, P, Soares Mansur, C ; Sautour,M ; Tchobanov,I. ; and Bensoussan, M., 2002. Relationship between spore germination kinetics and lag time during growth of *Mucor racemosus*. Lett. Appl. Microbiol. **35**, 395 - 398.
- 22.** Dantigny, P, Guilmart, A., Bensoussan, M., 2005. Basis of predictive mycology. Int. J. Food Microbiol. **100**, 187-196.
- 23.** Parra, R., Magan, N., 2004. Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds. J. Appl. Microbiol. **97**, 429 - 438.
- 24.** Carrillo - Inungaray, M. L.; Ramirez-Zapata M. R.; Martínez-Castilleja, J. C., 2006. Efecto de solutos sobre el crecimiento de hongos deteriorativos de alimentos. Ciencia y Tecnología Alimentaria. **5**, 2: 142 -146.
- 25.** Davidson, F., 2007. Mathematical modelling of mycelia: a question of scale. Fungal Biology Reviews. **21**, 30 - 41.
- 26.** Pitt, J. C. & Hocking, A.D., 2009. "*Penicillium* and related genera". In Fungi and food spoilage. Third ed., Blackie Academic & Professional. (London), 281 - 284.
- 27.** Samson, R and Hoekstra, E., 1995. "Introduction to food-Borne Fungi". Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn Delft. (Netherlands). 308 p.
- 28.** Simmons, E., 2007. "An Identification Manual". CBS. Fungal Biodiversity Centre, Utrcht, (Netherlands). Chap. 1, pp 2.
- 29.** Baranyi, J., Roberts, T.,1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J. Food Microbiol. **23**, 277 - 294.
- 30.** DMFit Version 2.1 www.ifr.ac.uk/safety/dmfit.
- 31.** Ross, T.,1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. J. Appl. Bacteriol. **81**, 501 - 508.
- 32.** Giffel, M.C. and Zwietering, M.H.,1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. **46**, 135 - 149.
- 33.** Samapundo, S.; Devlieghere, F.; De Meulenaer, B. Geeraerd,A.H.; Van Impe, J.F., Debevere, J.M., 2005. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. Int. Food Microbiol. **105**, 35 - 52.
- 34.** Samapundo, S.; Devlieghere, F.,Geeraerd, A. H.; De Meulenaer B.,;an Impe, J.F., Debevere, J., 2007. Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn. Food Microbiol. **24**, 517 - 529.
- 35.** Membré, J. and Kubaczka, M., 2000. Predictive Modelling Approach Applied to spoilage Fungi: Growth of *Penicillium brevicompactum* on solid media. Lett. Appl. Microbiol. **31**, 247 - 250.