

# Potencialidades del hongo *Aspergillus oryzae* para reducir la contaminación por fósforo en áreas de alta producción animal

by Revista Vinculando - lunes, mayo 18, 2009

[https://vinculando.org/articulos/sociedad\\_america\\_latina/potencialidades\\_hongo\\_aspergillus\\_oryzae\\_contaminacion\\_fosforo.html](https://vinculando.org/articulos/sociedad_america_latina/potencialidades_hongo_aspergillus_oryzae_contaminacion_fosforo.html)

El ácido fítico y sus sales constituyen la principal forma de almacenamiento de fósforo en semillas de cereales y leguminosas, sin embargo, autores como Aguirre (2003) plantean que en esta forma el fósforo permanece no disponible para los animales monogástricos debido a que estos no están provistos de suficiente actividad fitasa, capaz de liberar el grupo fosfato de la estructura del fitato.

## Introducción

Trabajo expuestos por Martínez y col. (2002) han señalado que el ácido fítico, es además, un compuesto con actividad antinutricional dado a su capacidad de formar complejos insolubles con minerales, proteínas y almidones, disminuyendo su disponibilidad bajo condiciones fisiológicas. Aunque en los últimos años muchos países han buscado algunas alternativas para sustituir ciertas cantidades de cereales por alimentos más fibroso y de menor costo, la asimilación del fósforo sigue siendo un problema y actualmente trabajos descritos por Acosta y col. (2006) demuestran la importancia de este estudio en la alimentación de cerdos y aves.

Una alternativa que ha tenido el hombre para aumentar la disponibilidad del fósforo vegetal, ha sido extraer de fuentes microbianas, enzimas que hidrolicen estos fitatos, ya que está comprobado la actividad de la enzima fitasa en diversos microorganismos (Frapin y Nys, 1995 y Phillippy, 1999). Esto conllevaría a una menor contaminación ambiental por la excreción del fósforo inactivo y menor costo de producción por unidad de animal, si se toma en consideración para este último que la fuente fosfórica puede constituir la tercera posición en materia de gastos en la cría de aves y cerdos.

Sin embargo, aunque las fitasas extraídas de fuentes microbianas parecen solucionar el problema, solo están al alcance de algunos países desarrollados, o incluso de países pobres que al no tener más opciones están obligados a importar estas enzimas a muy altos precios dada entre otras causas a la compleja forma de extracción enzimática.

Es por ello que constituye prioridad de la investigación en la rama animal, buscar una forma eficiente de controlar este efecto antinutricional que contribuye cada día más al deterioro de medio y que a su vez influye negativamente en economía de la producción animal. Teniendo en cuenta lo antes planteado se realizó una investigación para alcanzar los siguientes objetivos:

## Objetivo general

Obtener un crudo enzimático con alta actividad fitasa a partir de fermentaciones microbianas.

## Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad fitasa de las cepas H/6.28.1 de *Aspergillus oryzae* y LRO de *Rhodotorula sp.*
2. Desarrollar fermentaciones microbianas en un sustrato amiláceo rico en fósforo fítico.
3. Evaluar la actividad fitasa de los crudos enzimáticos, a través del contenido de fosfato orgánico.

## Materiales y Métodos

Se realizaron dos experimentos en el Instituto de Ciencia Animal (ICA) a escala de laboratorio que consistieron en fermentar harina de maíz con dos cepas microbianas diferentes y determinar la actividad hidrolítica de cada cepa en el contenido de fósforo fítico presente en la harina. En el primer experimento se utilizó la cepa H/6.28.1 de *Aspergillus oryzae* y en el segundo se usó la cepa LRO de *Rhodotorula sp*

Para el desarrollo de los experimentos se utilizaron dos métodos de fermentación en la harina de maíz; para la fermentación con *Aspergillus oryzae* se emplearon fermentaciones en estado sólido (FES) y para *Rhodotorula* fermentaciones en estado sólido sumergido. Se utilizaron erlenmeyer de 500 ml en los cuales se inocularon cepas microbianas en 30g harina de maíz .

Los muestreos se realizaron en una dinámica donde en cada uno de los tiempos deseados (horas) se separaron los erlenmeyer con los productos fermentados, se les midió el pH, crecimiento microbiano y luego se sometieron a 80<sup>0</sup> C para frenar su fermentación, una vez pasada las 48 horas restantes se les determinó su contenido en fósforo fítico, fósforo total.

Para el caso de *Aspergillus oryzae* los tiempos de evaluación fueron (0, 24, 48, 72, 96, 120 horas) y para *Rhodotorula sp* (0, 4, 8, 12, 20, 28, 36, 44 horas)

Se realizó un análisis químico y bromatológico a la harina de maíz según la AOAC, 1995). La determinación del fósforo fítico constituyó un aporte de este trabajo (Ver capítulo Resultados y Discusión, Nueva metodología).

Con la finalidad de medir el crecimiento que tenían ambas cepas microbianas sobre el sustrato de harina de maíz se realizaron observaciones en cada muestreo; para el caso de *Aspergillus oryzae* se le hicieron pruebas de observación y para *Rhodotorula* se realizaron conteos totales en cámara de Neubauer (Martínez y col., 1985).

## Estimación indirecta de la actividad fitasa

La actividad fitasa relativa se determinó según los criterios expuestos por Bedford (2004).

Actividad Fitasa=  $P_f$  (inicial) –  $P_f$  (muestreo siguiente) – (.....) $P_f$  (final)

*P<sub>f</sub>* – Fósforo fítico

Los experimentos se realizaron según Diseño Completamente Aleatorizado (D.C.A) con clasificación simple y el tiempo como única causa de variación. Los resultados se procesaron en el paquete estadístico “STATGRAFIC versión 5.0”, las diferencias entre medias se determinaron por la dócima de Duncan, 1995.

## Resultados y Discusión

Los resultados del análisis bromatológico y químico realizado sobre el sustrato (Tabla 1) mostraron como datos interesantes que el maíz empleado en el experimento tenía niveles ligeramente bajos de fitato, además el fósforo total mostró concentraciones normales de acuerdo con lo reportado por Kornegay (2001), esto puede estar dado a que la mayoría de los trabajos recientes están encaminados hacia el uso de maíces genéticamente modificados con el objetivo de obtener granos con mayor contenido en fósforo disponible.

**TABLA 1** Análisis químico y bromatológico de la harina de maíz usado como sustrato en las fermentaciones.

Sustrato	% de MS M.S
Harina de maíz	89, 61

\* MS – Materia seca; Ca – Calcio; P.f – Fósforo fítico; P. t – Fósforo total; CEN – Ceniza; P.B – Proteína bruta; F.B - Fibra bruta; E.E – Extracto etéreo.

Al observar los resultados del crecimiento de la cepa sobre el sustrato se pudo apreciar que el mayor crecimiento se encontró a las 48 horas, aunque la esporulación completa no se alcanzó hasta las 120 horas (Tabla 2), lo cual demuestra realmente la naturaleza del microorganismo. Debe señalarse además que de forma general las pruebas de observaciones realizadas sobre las colonias microbianas presentaron un comportamiento similar al descrito en la literatura para este género lo que demuestra el efecto positivo del sustrato partiendo del hecho de que el inóculo se desarrolló sobre la harina de maíz por un tiempo de 120 horas (Abin y Fernández, 1996).

**TABLA 2.** Crecimiento de *Aspergillus oryzae* sobre la harina de maíz.

Sustrato	Tiempo de evaluada la fermentación (horas)
24	48
Maíz molido + <i>Aspergillus oryzae</i>	X
Control	----

X Comienza el crecimiento micelar; XX Comienza la esporulación; XXI Esporulación incompleta; XXX Esporulación completa; ---- Crecimiento nulo

*Determinación de la actividad fitasa de Aspergillus oryzae a través del contenido de fosfato orgánico.*

## Nueva metodología

Para determinar la actividad fitasa de la cepa sobre el fósforo fítico, se partió del criterio de varios autores, logrando de esta forma una nueva metodología para la determinación del fósforo fítico, para ello, se sometieron las muestras (inicial y después de fermentadas) a un proceso de extracción del ácido fítico con ácido tricloroacético (TCA) al 10% por 30 minutos (Reddy y Salunkhe, 1981), la sustancia producto se filtró y se sometió a una precipitación con cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>) para obtener un complejo Fe-fitato según lo planteado por Thompson y col. (1982) citados por Martínez y col. (2002), luego se centrifugó y se lavó con agua desionizada el precipitado para eliminar las impurezas. El complejo Fe-fitato se digirió con ácido nítrico-perclórico en proporción de (2:1). El

fósforo presente se determinó por el método de Amaral (1972) citado por Herrera y col. (1980) para el fósforo total.

En cuanto a la actividad fitasa indirecta se comprobó que *Aspergillus oryzae* expresa su mayor actividad a las 48 horas, donde se observó solamente 0,83 de los 1,93 g. de F. fítico/kg de alimento (Tabla 3), estos resultados coinciden con los planteados por Agudelo (2002), el cual probó en cerdos, que 500 unidades de fitasas de *Aspergillus niger* recombinante incrementaron el fósforo disponible en 0,86 g / kg de alimento. Este momento coincide además, con el comienzo de la esporulación y por tanto la fase donde los requerimientos de nutrientes aumentan considerablemente y el microorganismo debe excretar al medio la enzima necesaria para su hidrólisis.

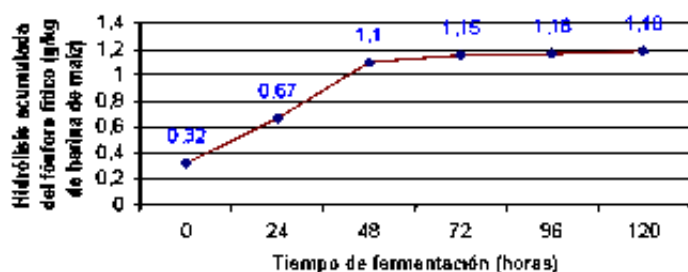
**TABLA 3.** Actividad hidrolítica de *Aspergillus oryzae* sobre el fósforo fítico (F. Fítico) y el fósforo total (F. Total), (g/kg de alimento)

Tiempo	0	24	48	72	96	120	Control	EE +-	Inicial
F.Fítico	1,61 <sup>a</sup>	1,26 <sup>b</sup>	0,83 <sup>c</sup>	0,78 <sup>c</sup>	0,77 <sup>c</sup>	0,75 <sup>c</sup>	1,65 <sup>a</sup>	0,029*	1,93
F. Total	2,63	2,44	2,59	2,52	2,49	2,51	2,55	0,057 <sup>ns</sup>	2,93

\* Medias con letras no comunes en la misma fila difieren entre sí para  $P < 0,05$  (Duncan, 1955) \*  $P < 0,05$

Otro de los resultados fue el comportamiento sobre contenido de fósforo fítico de la cepa de *Aspergillus oryzae* una vez pasada las 48 horas, en este caso se aprecia una estabilidad hidrolítica en las 72, 96 y 120 horas restantes que solo alcanzó 9.09% del fósforo hidrolizado (Tabla 3 y Figura 1) , esto puede estar dado al agotamiento del fósforo fítico a partir de las 48 horas en la que la cepa expresó su mayor actividad fitasa y por tanto una reducción considerable del fósforo orgánico en más del 50 %.

**Figura 1.** Actividad fitasa indirecta de *Aspergillus oryzae* sobre el sustrato



En la figura anterior se observa la reducción del fósforo fítico producto de su hidrólisis por *A. oryzae*. Estos datos coincidieron con un aumento del crecimiento microbiano (Tabla 2) lo que se podría relacionar con la disponibilidad de fósforo producto de la hidrólisis del fósforo fítico, teniendo en cuenta la importancia de este elemento en la nutrición de los microorganismos.

Como se puede apreciar a las 48 horas de fermentación, el fósforo fítico hidrolizado fue de 1.1 g/kg de harina de maíz, esto es un 57% del fósforo fítico inicial (1,93 g/kg de harina de maíz), resultados similares obtuvieron Vallardi y col. (2002), con fitasas comerciales obtenidas a partir de cepas de *Aspergillus ficum* y *A. niger*.

Los resultados anteriormente discutidos demuestran la actividad hidrolítica que tiene de la cepa H/6.28.1 de *A. oryzae* sobre el fósforo fítico una vez transcurrida las primeras 48 horas de fermentación. Este es un aspecto de gran interés en la alimentación de animales monogástricos ya que los cereales (maíz, sorgo, trigo, etc) llegan a constituir una fracción elevada en la dieta alimentaria, con poca disponibilidad de fósforo por encontrarse en forma de fitatos. Por lo tanto, la utilización de esta cepa podría aportar beneficios económicos y ambientales si se

incluyeran estos conocimientos y sus posibles formas de aplicación en la alimentación de monogástricos.

En cuanto a la fermentación sólido sumergido de la harina de maíz por la cepa LRO de *Rhodotorula sp*, los resultados obtenidos demuestran que existe un crecimiento muy pobre de los microorganismos sobre el sustrato en cuestión. En la literatura, autores como Cuenca y Rodríguez (2002) plantean que este género pertenecen a las levaduras poco fermentadoras y de crecimiento lento por lo que si se toma en consideración la variación de pH a lo largo del experimento (Tabla 4) se puede decir que el comportamiento de dicha cepa en el experimento corrobora los planteamientos anteriores.

#### *Determinación de la actividad fitasa de LRO a través del contenido de fosfato orgánico*

En la siguiente tabla se muestran los resultados correspondientes al efecto que mostró tener la cepa (*LRO*) sobre el contenido de fósforo fítico presente en la harina de maíz.

**TABLA 4.** Actividad hidrolítica de la cepa LRO de *Rhodotorula sp* sobre el contenido de Fósforo Fítico (F. Fítico) (g/kg de alimento) y el pH

Tiempo (horas)	0	4	8	12	20	28	36	44	Control	F.Fítico inicial
F.Fítico	1,76 <sup>ab</sup>	1,74 <sup>abc</sup>	1,71 <sup>bcd</sup>	1,70 <sup>bcd</sup>	1,68 <sup>bcd</sup>	1,67 <sup>cd</sup>	1,64 <sup>d</sup>	1,67 <sup>de</sup>	1,84 <sup>a</sup>	1,93
EE+ -										
0,019 *										
pH	4,35	4,46	4,85	4,85	4,81	4,52	5,24	5,37	4,44	

Medias con letras no comunes en la misma fila difieren entre sí para  $P < 0,05$  (Duncan, 1955), \*  $P < 0,05$

Obsérvese como la cepa (*LRO*), aunque mostró cambios estadísticos sobre los valores de fósforo fítico, no provocó cambios desde el punto de vista biológico al comparar en cada tiempo el contenido de fósforo fítico con respecto al inicial. En este caso el valor más bajo de fósforo fítico se aprecia a la hora 36, sin embargo representa solo un 15 % en la eficiencia de la actividad hidrolítica.

Otro aspecto importante lo constituye el comportamiento del pH en la fermentación, el cual se mantuvo por debajo de 6. Los valores de pH observados pudieran estar relacionados con el escaso crecimiento de *Rhodotorula sp* durante la fermentación, corroborando lo planteado por Carrillo (2003) y Rodríguez (2004) de que esta cepa se desarrolla en condiciones de pH alcalinos, por lo que los bajos valores de pH en la fermentación pudieron influir negativamente en la actividad fitasa del microorganismo en cuestión.

Al parecer la causa del aumento de la actividad hidrolítica en los momentos iniciales de la fermentación (Tabla 4) se debió a una elevada concentración de fósforo fítico parcialmente degradado en la esterilización previa de las muestras y por tal motivo los microorganismos en cuestión estaban obligados a degradar los fitatos para obtener los niveles adecuados de fósforo inorgánico. Obsérvese además, que este valor alcanzado en la hora 0 de fermentación no representa niveles altos de degradación, aunque claro que comparados con los tiempos restantes se puede apreciar cierta hidrólisis. Lo cierto es que de forma general no existió una hidrólisis de la cual podamos decir que existieron diferencias significativas ya sea desde el punto de vista biológico o estadístico.

## Conclusiones

1. Se encontró alta actividad fitasa de la cepa de *Aspergillus oryzae* en la harina de maíz usada como medio de fermentación.

2. *Aspergillus oryzae* redujo el contenido de fósforo fítico en todos los tiempos, siendo las 48 horas el momento de mayor actividad fitasa.
3. El sustrato harina de maíz permitió el crecimiento normal de *Aspergillus oryzae*.
4. La actividad fitasa de la cepa de *Rhodotorula sp* fue baja en la harina de maíz usada como sustrato.
5. Se logró una nueva metodología para la determinación del fósforo fítico bajo nuestras condiciones.

## Recomendaciones

1. Evaluar en trabajos posteriores la actividad de otras enzimas presente en el crudo y además su comportamiento sobre otros cereales.
2. Estandarizar las condiciones de fermentación.
3. Encontrar una forma adecuada para la extracción, almacenamiento y utilización del crudo enzimático.

## Bibliografía

- Abin, V.L. y Fernández, Q. G.1996. Crecimiento microbiano. En: Elementos de Microbiología General. La Habana. Editorial Pueblo y Educación. pp: 239-262
- Acosta, H .A; Villada, H. S. y Prieto, P. A. Envejecimiento de Almidones Termoplásticos Agrios de Yuca y Nativos de Papa por Microscopía de Fuerza Atómica. *Inf. tecnol.* [online]. 2006, vol.17, no.3 [citado 09 Mayo 2007], p.71-78. Disponible en la World Wide Web: . ISSN 0718-0764.
- Agudelo, J.T. 2002. Producción animal y contaminación por fosfato. Alternativa de solución desde la porcicultura. *Rev Col Cienc Pec.* 15 (3): 373-379.
- Aguirre, L. A. 2003. Factores antinutricionales en alimentos para animales monogástricos, *Rev. Cub. Cinc. Vet.*, 28(1): 8-14.
- AOAC.1995. In official of AOAC<sup>Th</sup>. Ed .Vol.1. assoc. official. Analysis Chemists, Arlintong.V.A.
- Bedford, M. R. 2004. Enzymes and enzyme cocktails for enhancing nutrient retention. Multi-State Animal Nutrition Conference Proceedings.
- Carrillo, L. (2003). Lenaduras. En: L. Carrillo. Los hongos de los alimentos y forrajes. Salta: Univ. Nacional de Salta. 126p.
- Cuenca, M. y Rodríguez, J.L. 2002. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad?. *Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España.* *Rev. Iberoam. Micol.* 19: 133-138.
- Duncan, B. 1955. Multiples ranges and multiple F test. *Biometrics* 11:1.
- Frapin D, Nys Y. 1995. Relative efficiency of microbial and vegetal phytases and additionnal effetc on phosphorus availability. *Proceed. 10<sup>th</sup> European Symposium on Poultry Nutrition, Antalya, Turkey, 15-19 October, 352-354.*
- Herrera, R.S.; Gonzales , S.B.; Hardy , C.; Pedroso, D.M.; Garcia, M.; Serna, A.; Rios, C.; Garcia, R.; Irigoyen, E. y Cuesta, A .1980. Determinación de fosforo .En analisis quimico del pasto .Metodologia para las tablas de composición .Ed .EDICA. p.28.
- Kornegay, E. T. 2001. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. En: M. R. Bedford y G. G. Partridge (ed.).*Enzymes in Farm Animal Nutrition.* New York.p:237-271.
- Martínez J., Romeo Z., Rojas T. y Guerra G. 1985. Manual Práctico de Microbiología. Ed. Por Editorial Pueblo y Educación:94
- Martínez, DB; Ibanez GM<sup>a</sup> V y Rincon LF. Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *ALAN.* [en línea]. septiembre. 2002, vol.52, no.3. Disponible en la World Wide Web: <[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222002000300001&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222002000300001&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0004-0622. [Consultado 11 Marzo 2006], p.219-231
- Phillippy BQ. 1999. Susceptibility of wheat and *Aspergillus niger* phytases to inactivation by

gastrointestinal enzymes. J. Agric. Food Chem., 47, 1385-1388.

- Reddy , N.R. y Salunkhe D.K. 1981 . Interactions Between phytate, protein , and minerals in whey fractions of Black gram. J Food Sci :46: 564-570.
- Rodríguez, Z. A. 2004. Uso del boniato (*Ipomoea batata lam*) en la tecnología de fermentación en estado sólido de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). La Habana. Tesis (en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias).
- Vallardi, G.M.; Morales, LR. y Ávila, G.E.2002. Efecto de la adición de fitasa como fuente de fósforo inorgánico en dietas para gallinas de postura. Téc Pecu Méx. 40(2): 181-186.

## **Notas:**

1: Facultad Agropecuaria de Montaña del Escambray, FAME, Sancti Spiritus

2 y 3: Instituto de Ciencia Animal, ICA, La Habana

e-mail: [enrique@fame.suss.co.cu](mailto:enrique@fame.suss.co.cu)