

Evaluación de la actividad fitasa de un crudo enzimático a partir de fermentaciones microbianas sobre un sustrato amiláceo

Albelo Hernández, Enrique (1), Gutiérrez Borroto, Odilia (2), Bocuort Salabarría, Ramón (2), Albert Rodríguez, Anayansi (1) y Vera Cruz, Marisol (1).

(1) Facultad Agropecuaria de Montaña del Escambray, FAME. Cuba enrique@fame.suss.co.cu

(2) Instituto de Ciencia Animal, ICA. Cuba

REDVET: 2008, Vol. IX, Nº 11

Recibido 18.04.08 - Ref. prov. K012 - Revisado 18.08.08 - Ref. def. 111108_REDVET - Aceptado 18.10.08 -
Publicado 01.11.08

Este artículo de investigación está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111108.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111108/111108.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®
- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Resumen

Se realizó un trabajo en el Instituto de Ciencia Animal (ICA) con el objetivo de obtener un crudo enzimático con actividad fitasa a partir de fermentaciones microbianas, para ello se realizaron dos experimentos, uno, utilizando una cepa de *Aspergillus oryzae* y el otro usando una cepa de *Rhodotorula* spp., se tomaron muestras de harina de maíz previamente esterilizadas y se inoculó sobre esta la cepa del hongo o levadura según correspondiera, luego se mantuvo en condiciones favorables de crecimiento (humedad y temperatura). Los muestreos se realizaron en diferentes tiempos de fermentación para cada cepa y en cada uno de ellos se determinó el contenido en fósforo fítico, fósforo total y crecimiento microbiano, los dos primeros se compararon con el de la muestra inicial y el tratamiento control. Se demostró que la cepa de *A. oryzae* tiene buena actividad hidrolítica sobre el fósforo fítico, existiendo la mayor actividad a las 48 horas con una hidrólisis de 0.47 g/kg, momento que coincidió con la fase de mayor desarrollo de las colonias. En el caso de *Rhodotorula* spp. los resultados demostraron bajo desarrollo microbiano y baja actividad fitasa con solo 0.17 g (gramos) de fósforo fítico hidrolizado por kg de harina. A pesar de que ambas cepas microbianas expresaron actividad fitasa, fue la cepa de *A. oryzae* la que mostró mayor actividad hidrolítica en el fósforo fítico, estos principios llevados a la práctica se traducen en menor

Digestión de Evaluación de la actividad fitasa de un crudo enzimático a partir de fermentaciones microbianas sobre un sustrato amiláceo

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111108/111108.pdf>

contaminación ambiental así como mejor desempeño productivo y económico en la nutrición de animales monogástricos.

Palabras claves: fósforo fítico | *Aspergillus oryzae* | *Rhodotorula* | fitasa | maíz.

Abstract

Abstract: This work was carried out at the Institute of Animal Sciences of Cuba (ICA) with the objective of obtaining an enzymatic mixture showing phytase activity from microbial fermentation. Thus, two experiments were carried out, the first using a culture of *Aspergillus oryzae* and the other using a culture of *Rhodotorula* spp. Samples of corn flour, that had been previously sterilized, were taken. Then, the fungus or the yeast were inoculated to these samples, which were kept in favourable growth conditions (humidity and temperature). Samplings were done at different fermentation times for each culture to determine the phytic phosphorus and total phosphorus contents as well as microbial growth. The results were compared to the sample and a control. It was found that the *A. oryzae* culture has a good hydrolytic activity on phytic phosphorus, with the highest level of activity taking place 48 hours after inoculation with an hydrolysis of 0,47 g/kg, which coincided with the maximum growth of the colonies. In the case of *Rhodotorula* spp. the results showed a low microbial growth and a low phytase activity with only 0,17 g of phytic phosphorus hydrolyzed per kilogram of flour. In spite of the fact that both microbial cultures showed a certain amount of phytase activity, the *A. oryzae* culture showed a higher amount of hydrolytic activity on phytic phosphorus, which means that it results in less environmental pollution as well as a better productivity in monogastric animals feeding.

Key words: phytic phosphorus | *Aspergillus oryzae* | *Rhodotorula* | phytase | corn

Introducción

El ácido fítico y sus sales constituyen la principal forma de almacenamiento de fósforo en semillas de cereales y leguminosas, sin embargo, 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. Según Martínez y col. (2002) 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.

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 comprobada la actividad de la enzima fitasa en diversos microorganismos.

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

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

Objetivos específicos

2. Evaluar la actividad fitasa relativa de las cepas H/6.28.1 de *Aspergillus oryzae* y LRO de *Rhodotorula* spp. sobre un sustrato rico en fósforo fítico.
3. Evaluar la actividad fitasa relativa de los crudos enzimáticos, a través del contenido de fósforo fítico.

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 Experimento 1 se utilizó la cepa H/6.28.1 de *Aspergillus oryzae* y en el Experimento 2 se usó la cepa LRO (Levadura *Rhodotorula* Opaca) de *Rhodotorula* spp., ambos experimentos se llevaron a cabo por Fermentación en Estado Sólido (FES) y Fermentaciones Sólido Sumergida respectivamente. Se utilizaron erlenmeyer de 500 ml en los cuales se inocularon cepas microbianas en 30 gramos de harina de maíz.

Los muestreos se realizaron en una dinámica donde en cada uno de los tiempos deseados (horas), se les midió el pH, crecimiento microbiano y luego se sometieron a 80⁰ 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* spp. (0, 4, 8, 12, 20, 28, 36, 44 horas). El fósforo total se determinó por el método de Amaral (1972), citado por Herrera y col. (1980) y el fósforo fítico según Albelo (2007).

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.

La actividad fitasa relativa se determinó por la siguiente expresión matemática:

$$\text{Actividad Fitasa} = P_f (\text{inicial}) - P_f (\text{muestreo siguiente}) - (\dots) P_f (\text{final})$$

Pf – Fósforo fítico

Análisis estadístico:

Los experimentos se realizaron según Diseño Bloque al Azar con Clasificación Simple y 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

En el desarrollo de la cepa de *Aspergillus oryzae* 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. Este comportamiento resultó ser similar al descrito en la literatura para este género lo que demuestra el efecto positivo del sustrato partiendo de que el inóculo se desarrolló sobre la harina de maíz por un tiempo de 120 horas (Abin y Fernández, 1996).

Al observar los resultados de la actividad fitasa indirecta (relativa) se comprobó que *Aspergillus oryzae* expresa su mayor actividad a las 48 horas, donde se observó una hidrólisis de 1.1 gramos de fósforo fítico/kg (Figura 1), 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.

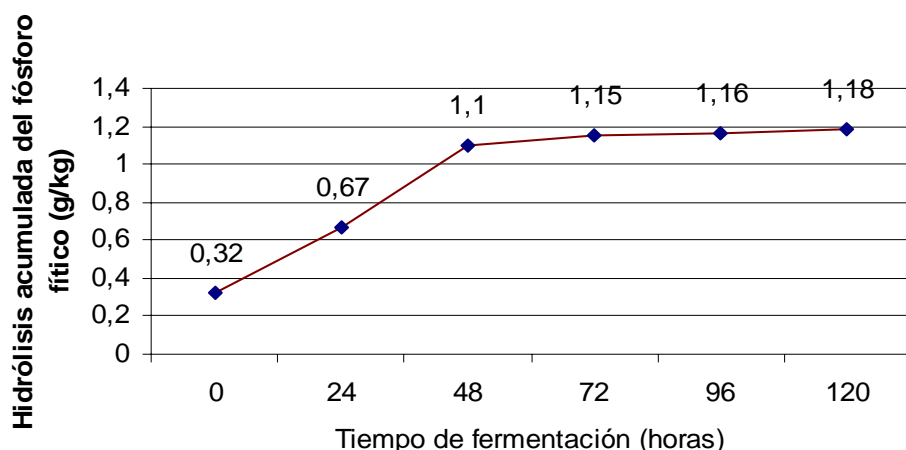


Figura 1. Actividad fitasa de *Aspergillus oryzae* sobre el sustrato

En la figura anterior se presenta el comportamiento hidrolítico sobre contenido de fósforo fítico de la cepa de *Aspergillus oryzae* una vez pasada las 48 horas, en este caso se aprecia una estabilidad enzimática en las 72, 96 y 120 horas restantes, alcanzando solamente 9.09% del fósforo hidrolizado total, la causa del planteamiento anterior puede estar dada 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 cuanto a la fermentación sólido sumergido de la harina de maíz por la cepa LRO de *Rhodotorula* spp. (Tabla 1), obsérvese como la cepa, 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 % del fósforo fítico inicial.

Tabla 1. Actividad fitasa relativa de la cepa LRO de *Rhodotorula* spp. sobre el contenido de fósforo Fítico (F. fit) (g/kg de alimento) y el pH

t	0	4	8	12	20	28	36	44	Cont	Ff inicial
Ff	1,76 ^{ab}	1,74 ^{abc}	1,71 ^{bcd}	1,70 ^{bcd}	1,68 ^{bcd}	1,67 ^{cd}	1,64 ^d	1,67 ^{de}	1,84 ^a	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), * $P < 0,05$

Leyenda:

t ----- Tiempo (horas)

Ff ---- Fósforo fítico

Cont ---- Control

Otro aspecto importante lo constituye el comportamiento del pH en la fermentación, el cual se mantuvo por debajo de 6 (Tabla 1). Los valores de pH observados pudieran estar relacionados con el escaso crecimiento de *Rhodotorula* spp. durante la fermentación, corroborando lo planteado por 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.

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* spp. fue baja en la harina de maíz usada como sustrato.

5. Recomendaciones

6. Encontrar una forma adecuada para la extracción, almacenamiento y utilización del crudo enzimático obtenido a partir de *Aspergillus oryzae*.
7. Continuar el estudio de *Rhodotorula* spp. como productora de fitasa exógena.

Agradecimientos

A la Facultad Agropecuaria de Montaña del Escambray, a mis profesores, mis familiares y a todos los que hagan posible la divulgación de estos resultados.

Bibliografía

- Abin, V.L. y Fernández, Q. G. Crecimiento microbiano. En: Elementos de Microbiología General. La Habana. 1996. Editorial Pueblo y Educación. pp: 239-262
- Agudelo, J.T. Producción animal y contaminación por fosfato. Alternativa de solución desde la porcicultura. 2002. Rev Col Cienc Pec. 15 (3): 373-379.
- Zoraya, R.. Uso del boniato (*Ipomoea batata lam*) en la tecnología de fermentación en estado sólido de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). 2004. La Habana. Tesis (en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias).
- Albelo, E. H. Evaluación de la actividad fitasa de un crudo enzimático obtenido a partir de fermentaciones microbianas sobre un sustrato amiláceo. La Habana. 2007. Tesis (en opción al grado de Master en Producción Animal para la Zona Tropical).
- Herrera, R.S.; Gonzales , S.B.; Hardy , C.; Pedroso, D.M.; Garcia, M.; Serna, A.; Rios, C.; Garcia, R.; Irigoyen, E. y Cuesta, A . Determinación de fosforo .En analisis quimico del pasto .Metodologia para las tablas de composición. 1980. Ed .EDICA. p.28.
- Beatriz, M.; Maria I. 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>. ISSN 0004-0622. [Consultado 11 Marzo 2006], p.219-231