

Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*

✉ Janny Coca, Odette Hernández, Rachel Berrio, Sonia Martínez, Ernesto Díaz, Julio C Dustet

Sección de Biotecnología Aplicada. Centro de Ingeniería de Procesos, Facultad de Ingeniería Química. Instituto Superior Politécnico "José Antonio Echeverría". Calle 127, s/n, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba. Telf.: (53-7) 260 7750; Fax: (53-7) 267 2964; E-mail: janny@quimica.ispjae.edu.cu

RESUMEN

Se investigaron 12 microorganismos productores de lipasas, para lo cual se utilizaron cepas de bacterias, hongos y levaduras desarrolladas en aceite de oliva 2% como fuente de carbono. Se apreció la actividad lipolítica y se estudiaron las características cinéticas de las lipasas extracelulares expresadas por los mejores productores, *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. Ambos microorganismos se analizaron en presencia de diferentes fuentes de carbono para precisar la más adecuada para la síntesis de la enzima. Se obtuvieron alrededor de 0,26 UI/mL de actividad en presencia de aceite de oliva y girasol al quinto y séptimo día respectivamente en cultivos de *A. niger*, y 0,21 UI/mL en aceite de oliva al cuarto día en cultivos de *A. fumigatus*. Se caracterizaron los extractos enzimáticos procedentes de ambas cepas y se encontró que los valores óptimos de pH y temperatura para la actividad de los extractos enzimáticos de *A. niger* y *A. fumigatus* fueron pH 6, 40 °C y pH 7, 80 °C, respectivamente. Ambos extractos resultaron estables en medios neutros, ligeramente ácidos y a temperaturas entre 20 y 40 °C durante 5 h de incubación. No se encontró en la literatura información sobre la lipasa producida por la cepa de *A. fumigatus*.

Palabras claves: caracterización de lipasas, lipasas, producción

Biotecnología Aplicada 2001;18:216-220

ABSTRACT

Production and characterization of lipases from *Aspergillus niger* and *A. fumigatus*. Strains from bacteria, fungi and yeast were used for a quantitative screening of lipase-producing microorganisms using 2% of olive oil as carbon source. The production and kinetic characteristics of extracellular lipases expressed by the best producers (*Aspergillus niger* and *A. fumigatus*) were studied. The more ideal carbon source for lipase synthesis was selected. Around 0.26 IU/mL of *A. niger* lipase activity was obtained in 2% olive and sunflower oil on the 5th and 7th day, respectively and 0.21 IU/mL of *A. fumigatus* lipase activity was achieved in olive oil at 4th day. The optimum pH and temperature for extract enzymatic activities were pH 6 and 40 °C for *A. niger* lipase and pH 7 and 80 °C for *A. fumigatus* lipase. Both enzymatic extracts were stable in neutral and weakly acid mediums at temperatures ranging between 20 and 40 °C for 5 h. Lipase from *A. fumigatus* strain has not been reported in the consulted literature.

Keywords: characterization of lipases, lipases, production

Introducción

Las lipasas (EC 3. 1. 1. 3) hidrolizan triglicéridos a ácidos grasos y glicerol, y bajo ciertas condiciones catalizan la reacción inversa. Algunas de estas enzimas son también capaces de catalizar reacciones de transesterificación e hidrólisis enantioselectivas [1]. Estas enzimas hidrolíticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y están presentes en los procesos metabólicos degradativos de algunas plantas y animales. Ellas son producidas por un gran número de microorganismos a partir de los cuales se obtienen usualmente para fines comerciales, un ejemplo típico lo son las lipasas producidas por los hongos *Aspergillus niger* y *A. fumigatus* [2].

El interés por estas enzimas se ha acrecentado en los últimos años debido a sus diversas propiedades catalíticas. Ello ha causado que se conviertan en catalizadores valiosos en diferentes aplicaciones industriales, tales como: aditivos en la formulación de detergentes, en la industria alimenticia para la elaboración de productos dietéticos con bajo nivel de grasas y colesterol, en la industria del papel con el objetivo de eliminar la cera de la pulpa del papel, en la industria

farmacéutica en la obtención de moléculas bioactivas, así como en procesos de síntesis química para la obtención de compuestos ópticamente puros [3], modificación de grasas y otros lípidos por hidrólisis y esterificación [4].

Los problemas asociados al uso sistemático y controlado de las enzimas no se encuentran totalmente resueltos [5, 6]. Tanto la composición de la enzima como las condiciones empleadas para su procesamiento, pueden ser determinantes en las propiedades catalíticas de la misma y en los diversos resultados que se puedan obtener. El conocimiento de nuevos microorganismos productores de enzimas lipasas y de la diversidad de condiciones necesarias para la producción de las mismas son de gran utilidad si se desean emplear para cualquiera de los fines antes mencionados, y debe ser por tanto, el fundamento de todo estudio.

El presente trabajo tiene como objetivo seleccionar y caracterizar dentro de un grupo amplio de microorganismos nacionales los mejores productores de enzimas lipasas.

1. Pokorny D, Friedrich J, Cimermam A. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotech Lett* 1994;16:363-6.

2. Schmid RD, Verger R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem Int Ed* 1998;37:1608-33.

3. Hernaiz MJ, Sánchez-Montero, Sinisterra JM. Modification of purified lipase from *C. rugosa* with polyethylene glycol: A systematic study. *Enzyme Microb Technol* 1999;24:181-90.

4. Kazlauskas R. Elucidating structure mechanism relationship in lipases. Prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends Biotechnol* 1994;12:464-72.

5. Hofelmann M, Hartmann J, Zink A, Schreier P. Isolation, purification and characterization of lipase isoenzymes from a technical *Aspergillus niger* enzyme. *J of Food Sci* 1985;50:1721-4.

Materiales y Métodos

Microorganismos y desarrollo de los cultivos

Los microorganismos empleados en este estudio fueron: *A. oryzae* 6.28.1, *A. niger* J-1, *A. fumigatus* 6.17.3, *Trichoderma hartzianum* 101.8.2, *Mucor griseocyanum* 55.1.1, *Bacillus brevis* 23.9.1, *B. subtilis* 23.44.1, *B. cereus* 23.4.1, *Escherichia coli* 001, *Candida utilis* L 3.75.13, *C. lipolitica* 3.39.1 y *Saccharomyces cerevisiae* 25.7.3, proporcionadas por el cepario del Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA, La Habana, Cuba).

Los hongos y las levaduras se conservaron en cuñas de agar papa dextrosa y las bacterias en agar nutriente, todos a 4 °C. Se empleó un medio de cultivo con la composición siguiente (g/L): NaH₂PO₄ 12; KH₂PO₄ 2; MgSO₄·7 H₂O 0,3; CaCl₂ 0,25 y como fuentes de nitrógeno y carbono sulfato de amonio al 1% y aceite de oliva al 2% respectivamente. Las otras fuentes de carbono ensayadas y las concentraciones empleadas son especificadas en los experimentos. El pH inicial del medio se ajustó a 6 para hongos y levaduras y a 7 para las bacterias.

Para el cultivo de los hongos se tomaron alícuotas de las soluciones de esporas y se adicionaron a 20 mL de medio estéril contenidos en erlenmeyers de 100 mL, de modo que la concentración final en el medio fuera de 10⁶ esporas/mL. El cultivo se desarrolló a 30 °C y 100 rpm 8 días. Para las bacterias y las levaduras se incubaron precultivos de 20 mL a 30 °C y 120 rpm durante 12 h y a 30 °C y 120 rpm durante 48 h respectivamente, y posteriormente inoculados a razón 1/10 en 180 mL de medio salino contenidos en erlenmeyers de 500 mL. El crecimiento de los cultivos se realizó bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación que del precultivo por espacio de 12 y 72 h respectivamente.

Obtención del crudo enzimático

Los cultivos de hongos se filtraron al vacío y luego se centrifugaron a 12 000 rpm durante 5 min. Los cultivos de bacterias y levaduras se centrifugaron a 12 000 rpm durante 5 min. Los sobrenadantes obtenidos que contienen los crudos enzimáticos de lipasas extracelulares colectados se congelaron a 0 °C para su posterior análisis.

Caracterización de las lipasas

La influencia de la temperatura en la actividad enzimática se estudió en un rango de 20 °C a 90 °C por medición de la velocidad de reacción a pH 7,0. El efecto de la temperatura en la estabilidad se estudió incubando el crudo enzimático de *A. niger* a pH 3,65, tal y como se obtuvo de la fermentación y el de *A. fumigatus* a pH 7,0 a varias temperaturas desde 20 °C hasta 60 °C por espacio de 5 h (tomando como 100% la actividad inicial de la enzima).

El efecto del pH en la actividad lipolítica se estudió a 37 °C y se varió el pH del medio de reacción desde 4 hasta 10 consecutivamente. La influencia del pH en la estabilidad de la enzima fue estudiada por la exposición del crudo enzimático a valores de pH de 4 y 5 (tampón acetato de sodio 0,05 M), 6 y 7 (tampón fosfato de sodio 0,05 M), 8, 9 y 10 (tampón

carbonato de sodio 0,05 M) y a 30 °C durante 5 h y se determinó la actividad residual, la cual se expresó como un porcentaje de la actividad inicial que presentó la enzima.

Determinaciones analíticas

La cinética de crecimiento para las bacterias y levaduras se realizó por medición de la densidad óptica del cultivo a 530 nm. En los hongos se determinó el peso seco a 100 °C durante 24 h y se informó como gramos de micelio por mililitro de cultivo filtrado.

La actividad enzimática se determinó por medición del incremento de la absorbancia a 348 nm producido por la liberación del p-nitrofenol como resultado de la hidrólisis de 0,4 mM del éster para-nitrofenilo de propionato (p-NPP) en tampón fosfato 25 mM pH 7,0 y 37 °C. Se define como unidad internacional la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 micromol de p-NPP por minuto bajo las condiciones descritas anteriormente [6].

Resultados y Discusión

Selección de los microorganismos productores de lipasas

La actividad lipolítica expresada por diversos microorganismos en aceite de oliva se muestra en la Figura 1. Como se puede apreciar, la producción de lipasas no se manifiesta de igual modo para estos microorganismos. Existen diferencias importantes entre los niveles de actividad lipolítica expresados por los hongos y los de las bacterias y levaduras. En los hongos se alcanzaron actividades promedios entre 5,4 y 2,8 veces superiores a las restantes.

Este resultado pudiera atribuirse a que el sustrato empleado como fuente de carbono en la fermentación para la producción de la enzima es mejor asimilado por los hongos, ya que en el caso de las bacterias y levaduras se registraron crecimientos muy escasos (no se muestran los resultados), y/o la posibilidad de que las cepas de bacterias y levaduras estén expresando actividad lipolítica intracelular fundamentalmente. Este hecho pudo ser corroborado con un estudio preliminar del que se pudo concluir que al menos en los cultivos de cepas bacterianas investigadas fue mayor la expresión de actividad lipásica intracelular respecto a la extracelular.

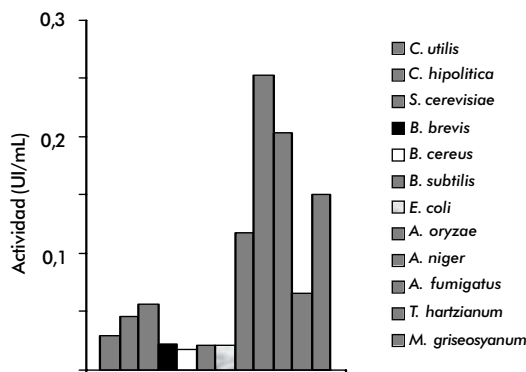


Figura 1. Actividad lipolítica expresada por diferentes especies en aceite de oliva.

6. Guisán JM, Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernández-Lafuente R, Huguot J. A single step purification immobilization and hiperactivation of lipases via interfacial. Adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* 1998;58: 486-93.

Influencia de la fuente de carbono en la síntesis de lipasas en cultivos de hongos

Entre los hongos, los mejores productores fueron las cepas de *A. niger* y *A. fumigatus*, resultando las actividades enzimáticas 0,26 y 0,21 UI/mL respectivamente. La cinética de crecimiento y de expresión de actividad lipásica obtenida en cultivos de estos microorganismos desarrollados en varias fuentes de carbono se muestra en la Figura 2. Se observa que el microorganismo *A. niger* se desarrolla de modo similar en presencia de los sustratos lipídicos, alcanzando crecimientos entre 10 y 15 g de micelio seco por litro de cultivo. En las restantes variantes los niveles de crecimiento son inferiores.

Al apreciar la Figura 2B, es notable que la producción de lipasas alcanza valores superiores en cultivos donde fueron empleados lípidos como fuente de carbono en relación a aquellos donde se emplearon glicerol, almidón o glucosa, siendo las actividades lipolíticas alcanzadas menores de 0,05 UI/mL; como consecuencia quizás de que el glicerol constituye un producto final de la acción de las lipasas, es decir, está presente la inhibición por producto [7] y su presencia en el medio de cultivo al parecer no favorece la síntesis de la enzima. Se ha informado por algunos investigadores [8-10] que los azúcares pueden influir tanto a favor como en contra de la producción de estas enzimas,

pero en nuestro caso en particular, la presencia de azúcares no favoreció la síntesis de lipasas en cultivos de este microorganismo.

Se observa además, que la síntesis de la enzima comienza fundamentalmente a partir del segundo día de la fermentación, y los máximos de actividad se alcanzan en fases posteriores a la etapa de crecimiento óptimo del microorganismo, por lo que pudiera afirmarse que la síntesis de la enzima de interés se encuentra parcialmente asociada al crecimiento. En relación con los resultados obtenidos en los cultivos de *A. fumigatus* (Figuras 3A y B), se puede apreciar que los mayores crecimientos alcanzados oscilan entre 12 y 16 g/L de materia seca, muy parecida a la de los cultivos de *A. niger*.

La síntesis de la enzima de interés sólo se logra de manera apreciable en presencia de aceite de oliva (alrededor de 0,21 UI/mL de enzima) y niveles más bajos de actividad se producen con aceite de girasol y aceite de coco. Al parecer no basta con la presencia de sustratos lipídicos en el medio de cultivo, sino influye también el tipo de sustrato lipídico presente. De hecho, se puso de manifiesto que no todos los microorganismos aun siendo de origen filamentoso, responden de modo similar, pues la respuesta de cada microorganismo se encuentra sujeta a las particularidades fisiológicas de cada uno.

7. Crueger W, Crueger A. Biotecnología: manual de microbiología industrial. Acibia S.A, Zaragoza; 1993.

8. Pal N, Das S, Kundu AK. Influence of culture and nutritional conditions on the production of lipases by submerged culture of *Aspergillus niger*. J of Ferment Technol 1978;56:593-8.

9. Nakashima T, Fukudo H, Kyotani S, Morikawa H. Culture conditions for intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilisation within biomass support particles. J of Ferment Technol 1988;66:441-8.

10. Salleh AB, Musani R, Basri M, Ampon K, Yunus WMZ, Razak CNA. Extra and intracellular lipases from a thermophilic *R. oryzae* and factors affecting their production. Can J Microbiol 1993;39:978-81.

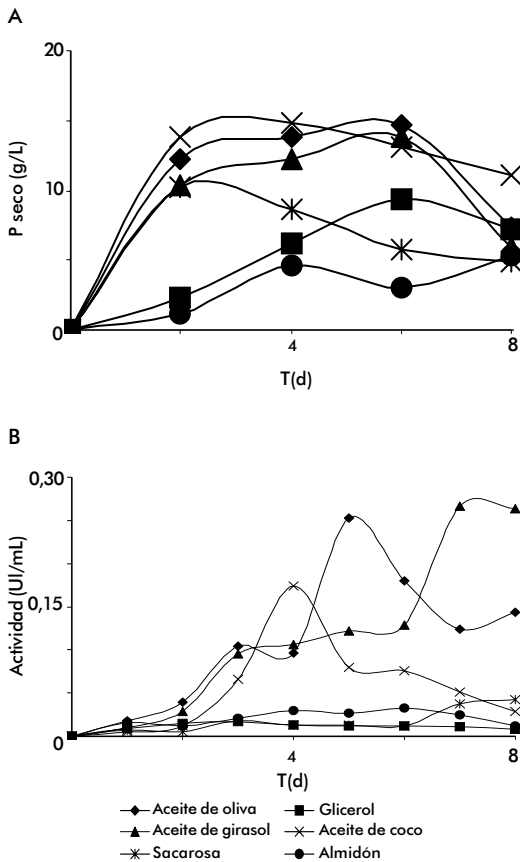


Figura 2. Caracterización de un cultivo de *A. niger* desarrollado en diferentes medios: A) crecimiento microbiano y B) expresión de actividad lipolítica.

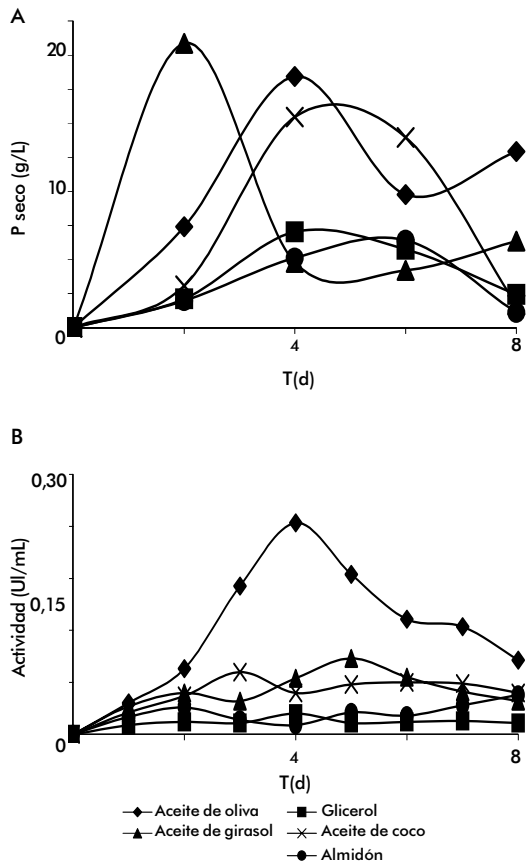


Figura 3. Caracterización de un cultivo de *A. fumigatus* desarrollado en diferentes medios: A) crecimiento microbiano y B) expresión de actividad lipolítica.

Caracterización de los extractos solubles de lipasas de *A. niger* y *A. fumigatus*

Para caracterizar los extractos solubles de las lipasas producidas por los dos hongos en estudio, se determinó la influencia de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática y se definió el perfil que describe dicho comportamiento. Para analizar la influencia de la temperatura, el pH se mantuvo constante en 7 y para analizar el pH, la temperatura se mantuvo constante en 37 °C (Figuras 4 y 5).

En la Figura 4 se puede observar que la enzima muestra su mayor actividad en un rango entre 40 y 60 °C. A partir de esta temperatura se aprecia un descenso brusco en la actividad, motivado probablemente por la inactivación térmica de la enzima. El óptimo de temperatura obtenido en la Figura 4A fue similar al publicado para la lipasa excretada por *Humicola lanuginosa* [11], *Pseudomonas species* [12], *Rhizopus rhizopodiformis* [13] y *Bacillus spp.* [14] y apreciablemente superior al divulgado para la lipasa de *A. oryzae* [15] y *Pythium ultimum* [16]. Por otra parte, a pH 6 se obtuvo el máximo de actividad de la enzima, resultado muy parecido al informado para la lipasa de *A. niger* por Crueger en 1993 [7].

De forma diferente se comporta la lipasa de *A. fumigatus*, la cual alcanza su máxima actividad lipolítica a 80 °C y pH 7,0 (Figura 5). Este resultado es importante porque demuestra que esta enzima posee propiedades catalíticas muy interesantes a altas temperaturas. En la literatura no se halló anunciada la producción de lipasas por el hongo *A. fumigatus*. No obstante, se encontró que el óptimo de pH de esta

lipasa es muy similar al generalizado para la lipasa de *R. rhizopodiformis* [13]. Los resultados derivados de los estudios de estabilidad se han representado en las Figuras 6 y 7.

La lipasa de *A. niger* resultó muy inestable a partir de 50 °C perdiendo entre 20 y 40% de la actividad respecto a la inicial en 0,5 h aproximadamente. Estos

11. Ibrahim CO, Hayashi M. Purification and some properties of thermostable lipase from *Humicola lanuginosa*. *Journal Agriculture Biological* 1987;51:37-45.

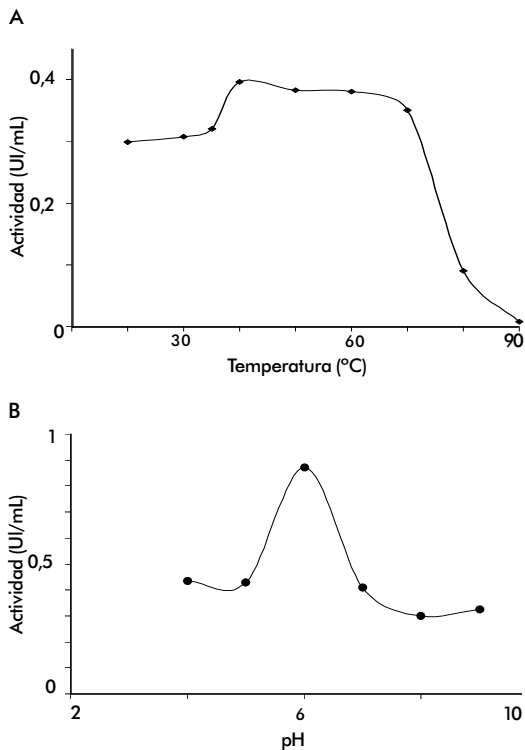


Figura 4. Estudio de la influencia de la temperatura (A) y el pH (B) en la actividad de la lipasa producida por *A. niger*.

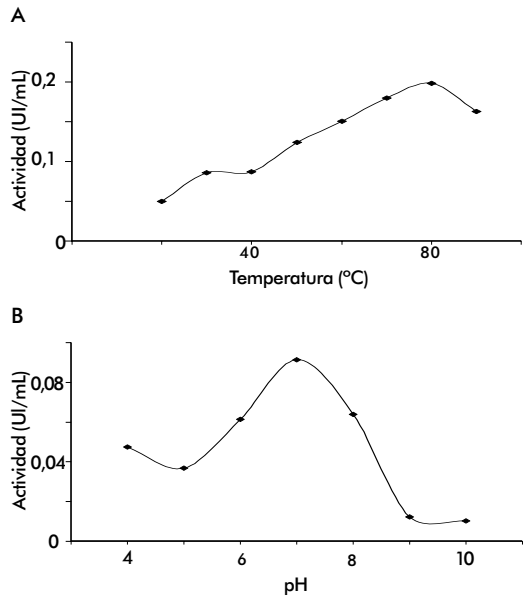


Figura 5. Estudio de la influencia de la temperatura (A) y el pH (B) en la actividad de la lipasa producida por *A. fumigatus*.

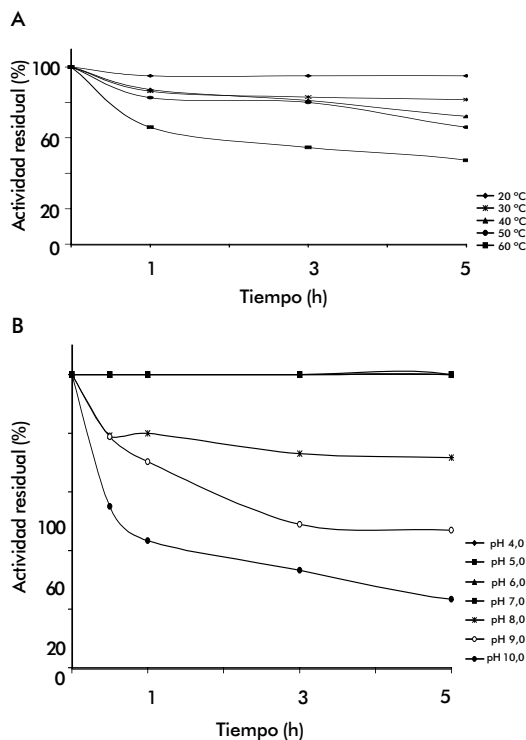


Figura 6. Perfil de estabilidad de la lipasa de *A. niger* (A) en función de la temperatura sin adición de buffer, pH 3.65 y (B) en función del pH a 30 °C, con adición de buffer.

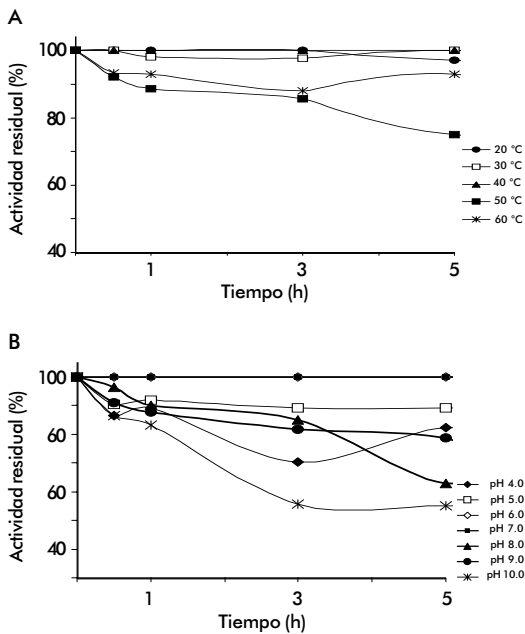


Figura 7. Curvas de estabilidad de la lipasa de *A. fumigatus* (A) en función de la temperatura, sin adición de buffer, pH 7.0 y (B) en función del pH, a 30 °C con adición de buffer.

perfiles son muy similares a los publicados para otras lipasas fúngicas [16, 17]. Por otra parte se observó que la enzima se desnaturizó rápidamente a pH alcalinos perdiendo entre 20 y 60% de actividad inicial a la hora de haber sido incubada. A pH 4, 5, 6 y 7 la enzima conservó su actividad durante las 5 h de incubación y no se observaron diferencias.

El perfil de estabilidad térmica de la lipasa de *A. fumigatus* (Figura 7A) muestra que la enzima fue muy estable a 30 y 40 °C; lo cual desde el orden práctico reviste gran importancia, pues a temperaturas ambientales se podría procesar un crudo enzimático en las siguientes etapas de purificación, de modo que facilitaría las operaciones siguientes. Por encima de estas temperaturas la enzima perdió alrededor de 20% de la actividad inicial después de haber sido incubada 1 h. Estos perfiles son típicos en la mayoría de las lipasas de origen fúngico [16, 17]. Con relación a la estabilidad de la enzima frente a diferentes valores de pH, se

observó que fue muy estable a pH 6 y 7, incluso a pH 5 donde la enzima solo perdió 10% de la actividad inicial, en los restantes pH fue muy inestable. Tanto el perfil de estabilidad frente al pH de la lipasa de *A. niger* como el de *A. fumigatus* fueron de comportamiento muy similar a los divulgados para otras lipasas de origen fúngico [17-20].

Conclusiones

De las diferentes cepas estudiadas, los hongos resultaron los mejores productores de lipasas, destacándose en particular las cepas de *A. niger* y *A. fumigatus*. Ambos microorganismos se estudiaron en presencia de diferentes fuentes de carbono; sin embargo, la síntesis de lipasas se favoreció solamente en presencia de aceite de oliva, de coco y de girasol en los cultivos de *A. niger* y exclusivamente en aceite de oliva en los cultivos de *A. fumigatus*. Se comprobó que tanto la glucosa como el almidón no favorecen la síntesis de la enzima de interés en las cepas de hongos estudiadas, al igual que el glicerol, el cual constituye un inhibidor de la producción de lipasas en los cultivos de estos microorganismos.

Los crudos enzimáticos de lipasas provenientes de *A. niger* y *A. fumigatus* difieren en algunas de sus propiedades y, además, exhibieron características cinéticas comparables a las informadas para otras lipasas provenientes de microorganismos de origen filamentosos. La lipasa de *A. fumigatus* no se encontró publicada en la literatura. El comportamiento de esta enzima resultó novedoso tanto por la actividad mostrada a altas temperaturas como por su estabilidad a temperaturas moderadas. El hecho de que estos microorganismos sean generalmente reconocidos como seguros (GRAS, del inglés, *generally recognized as safe*) tanto para la industria alimenticia como para la de bebidas y licores y farmacéutica, hacen necesario cada vez más, la optimización de procesos fermentativos que garanticen la producción de enzimas lipasas a escalas superiores.

Recomendaciones

Realizar investigaciones cuyos objetivos sean incrementar la estabilidad de la lipasa de *A. fumigatus* en las condiciones de temperatura y pH en que alcanza su máxima actividad lipolítica por lo interesante que pudiera resultar su utilización como catalizador industrial.

12. Razak CNA, Pillai SP, Yunus WMZ, Ampon K, Basri M, Salleh AB. Production, purification and characterisation of lipase from a *Pseudomonas* species. *Malays Appl Biol* 1994;22:115-24.

13. Salleh AB, Razak CNA, Samad MYA, Ampon K, Yunus WMZ, Basri M. Partial purification and characterisation of lipases from thermophilic *Rhizopus rhizopodiformis*. *Sains Malays* 1996;25:131-41.

14. Nawani N, Dosanji NS, Kaur Jagdeep. A novel thermostable lipase from thermophilic *Bacillus* Sp.: characterisation and esterification studies. *Biotech Lett* 1998; 20:997-1000.

15. Seitz EW. *J Am Oil Chem Soc* 1974; 51:12-6.

16. Mozaffar Z, Weete JD. *Lipids* 1993;28: 377-92.

17. Phillips A, Pretorius GHJ. *Biotech Lett* 1991;13:833-8.

18. Sztager H, Lonsdorf H, Erdman H, Menge V, Schmid R. *Bioch Biophys Acta* 1992;1124:253-61.

19. Rúa ML, Díaz-Maurino T, Fernández VM, Otero C, Ballesteros A. *Bioch Biophys Acta* 1993;1156:181-9.

20. Rapp P. *Enzyme Microb Technol* 1995; 17:832-8.

21. Coca J, Fernández-Lorente G, Fernández-Lafuente R, Palomo JM, Mateo C, Bastida A, et al. *J Molecular Cat B: Enzymatic* 2001;11:649-56.