



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50<sup>th</sup> anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



**TOGETHER**  
*for a sustainable future*

## DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

## FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

## CONTACT

Please contact [publications@unido.org](mailto:publications@unido.org) for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at [www.unido.org](http://www.unido.org)

20079

PROGRAMA REGIONAL DE BIOTECNOLOGIA PARA AMERICA  
LATINA Y EL CARIBE DP/RLA/83/003

11 p  
tablas  
graficos  
Anexos

DEGRADACION ENZIMATICA DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

INFORME FINAL

CONTRATO No. 89/85  
Universidad Católica de Valparaíso  
Valparaíso, Chile

CELULOSA  
CHILE

**DEGRADACION ENZIMATICA DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES**

**PROYECTO ONUDI DP/RLA/83/003**

**SEXTO INFORME DE AVANCE**

- Fermentación en Sustrato Sólido de Coseta Agotada de Remolacha
- Mejoramiento Genético de Cepas de *Trichoderma aureoviride*
- Implementación de Fermentador Prototipo

PREPARADO POR:  
ANDRES ILLANES F.  
GERMAN AROCA A.  
FERNANDO ACEVEDO B.  
EDUARDO AGOSIN  
INES CONTRERAS  
MERCEDES ZALDIVAR

Valparaíso , 3 de Enero de 1991

## PRESENTACION

El sexto informe de avance, segundo y final del segundo año de ejecución del proyecto, contiene los resultados correspondientes a las siguientes actividades, de acuerdo al calendario del documento Términos de Referencia:

### B. Estudio del pretratamiento ácido de coseta agotada de remolacha.

Se entrega los resultados finales de esta actividad, seleccionándose las condiciones de operación para el desarrollo de las experiencias de fermentación en sustrato sólido (FSS) con coseta agotada de remolacha (CAR) pretratada a nivel de laboratorio y, eventualmente, a nivel de prototipo.

### C. Estudio de FSS a nivel de laboratorio.

- C.1. Construcción y puesta en marcha de una unidad de minifermentadores de columna. Esta actividad fue completamente reportada en el Informe de Avance N° 5.
- C.2. Producción y normalización de inóculos. Esta actividad fue totalmente reportada en el Informe de Avance N° 5.
- C.3. Realización del estudio de la cinética de FSS a nivel de laboratorio :

En el Informe de Avance N° 5 se reportó los resultados preliminares obtenidos con cepas de Trichoderma aureoviride sobre CAR sin pretratamiento. Tales resultados contienen una sobrevaloración de la actividad enzimática producida debido a problemas metodológicos. En consecuencia tales experiencias debieron ser repetidas, reportándose en esta ocasión resultados definitivos que se encuentran plenamente validados. Se reporta en consecuencia el estudio cinético de FSS con dos cepas de T.aureoviride: T.a.s (salvaje) y T.a.7-121 (mutante derivada de la anterior). Adicionalmente se reporta la cinética de FSS de dos cepas de Trichoderma reesei : T.r.UC-4 (proporcionada por el Dr. Marcel Gutiérrez dentro del marco del Proyecto) y T.r.QM-9414 (cepa de colección empleada en todo el trabajo como cepa de referencia). Los anteriores resultados se refieren a CAR sin pretratamiento. En base a los resultados obtenidos se seleccionó la cepa T.a.7-121 para los estudios subsiguientes. Dado los bajos valores obtenidos con la cepa T.r.UC-4, se decidió en la reunión de coordinación realizada el mes de octubre pasado, continuar el trabajo con la cepa mejorada T.r.LM-1, proporcionada por el Dr. Marcel Gutiérrez en el marco del Proyecto. Se entrega también en este informe los resultados de la cinética de FSS sobre CAR pretratada químicamente en las condiciones determinadas en el punto B, para las dos cepas seleccionadas: T.a.7-121 y T.r.LM-1.

En base a lo acordado en la reunión de coordinación de octubre pasado, las actividades correspondientes al estudio cinético a nivel de laboratorio de FSS con aserrín de pino explotado se ejecutarán en los primeros cinco meses del tercer año, tal como ha quedado establecido en el documento Términos de Referencia 1991. Las experiencias se desarrollarán empleando las dos cepas seleccionadas.

Se reporta también en esta sección la determinación de las isoterms de sorción de CAR. Aunque esta actividad no se encontraba inicialmente contemplada en el plan de actividades, se consideró necesario realizarla a fin de establecer condiciones adecuadas de operación, especialmente para las pruebas en el fermentador prototipo que se ejecutarán durante el tercer año.

**D. Mejoramiento genético de Trichoderma aureoviride.**

En el Informe de Avance N° 5 se reportó la obtención de un mutante sobreproductor derivado de la cepa salvaje, denominado T.a.7-121 y su caracterización fisiológica básica. En el presente informe se proporciona una caracterización bastante completa del comportamiento de la cepa mutante en fermentación sumergida, referida especialmente a la fisiología de producción de enzimas celulolíticas. Se ha continuado trabajando en la obtención de cepas sobreproductoras, siendo de momento la cepa reportada la de mejores características. Durante el tercer año se continuará trabajando en esta dirección, procurándose la obtención de mutantes termotolerantes, capaces de crecer adecuadamente a temperaturas de 30 °C.

**E. Implementación de los sistemas auxiliares del fermentador prototipo.**

Se reporta la instalación del sistema de acondicionamiento de aire y control de temperatura del fermentador prototipo y la instalación de los correspondientes sensores. Se describe el esquema de control propuesto.

**F. Prueba de operación del fermentador prototipo.**

Se da cuenta de las pruebas de operación realizadas al fermentador prototipo, especialmente en lo relativo a patrón de mezclado y comportamiento del agitador.

**G. Modificaciones al diseño del fermentador prototipo.**

Se reporta la modificación del sistema de agitación del fermentador prototipo y el estudio de la configuración adecuada de las propiedades del sólido fermentado. Se ha logrado desarrollar una configuración de agitador que produce un patrón de mezclado aceptable y se encuentra en construcción la pieza en acero inoxidable, que deberá estar en condiciones de ser instalada en los próximos treinta días.

**H. Experiencias en el fermentador prototipo en las condiciones establecidas a nivel de minifermentadores.**

Esta actividad corresponde realizarla durante el tercer año, de acuerdo al calendario de actividades contenido en el documento Términos de Referencia 1991.

**I. Envío de un técnico chileno a la Planta Piloto de Fermentaciones del Departamento Biotecnología en UAM, Mexico.**

Se da cuenta del período de entrenamiento del investigador participante Sr. Germán Aroca, por seis semanas en la Planta Piloto de Fermentaciones de UAM, México. El entrenamiento se realizó bajo la supervisión del Dr. Mariano Gutiérrez

## ACTIVIDAD B.

### ESTUDIO DEL EFECTO DEL PRETRATAMIENTO EN LA DIGESTIBILIDAD ENZIMÁTICA IN VITRO DE LA CAR Y EL ASERRIN DE PINO

Esta actividad tiene como objetivo el estudio del efecto del pretratamiento de explosión térmica y de hidrólisis ácida en la composición y digestibilidad del aserrín de pino y la coseta agotada de remolacha respectivamente. El estudio del pretratamiento del aserrín de pino fué completamente reportado en informes anteriores. En este Sexto informe se analizará las alteraciones en el contenido de lignina, celulosa, hemicelulosa, proteína y cenizas en la Coseta Agotada de Remolacha (CAR) luego de ser sometida a distintas condiciones de pretratamiento ácido. También se reporta el efecto de estas distintas condiciones de pretratamiento en la digestibilidad in vitro del material, la cual se evaluó a través del método de hidrólisis enzimática in vitro con una mezcla de celulosa y celobiasa comerciales cuyo procedimiento experimental se reportó en el Quinto Informe de Avance.

El pretratamiento químico de la CAR a través de un proceso de hidrólisis ácida fué seleccionado por permitir una hidrólisis selectiva de la hemicelulosa sin alterar mayormente la celulosa. Inicialmente se trabajó a 25 g/l de CAR con  $H_2SO_4$  y HCl a distintas concentraciones, temperaturas y tiempos de reacción, seleccionándose como condiciones óptimas  $H_2SO_4$  al 1.34 %, 80 °C. y 1 hora (Informes N° 3 y 4). Este pretratamiento debió reestudiarse posteriormente para adecuarlo a condiciones más favorables para el proceso de FSS. Se trabajó a mayor concentración de sólidos (75 g/l) y se estudió el efecto de reducir la concentración de  $H_2SO_4$  a fin de disminuir los costos del pretratamiento. Se estudió razones de 0.5, 0.3 y 0.1 g  $H_2SO_4$ /g CAR a 80°C y tiempos de 1 y 2 horas, obteniéndose niveles de solubilización de hemicelulosa sensiblemente inferiores a los obtenidos a 25 g/l pero niveles de DIV (evaluados como % de celulosa hidrolizada en CAR a 9 horas de incubación) entre un 57 y un 82 % que resultan aceptables, los que se informaron en el Quinto informe de Avance.

Los resultados que a continuación se presentan corresponden a un estudio sobre un set de condiciones de pretratamiento en un rango que sería el más adecuado, desde un punto de vista de los costos involucrados (fundamentalmente en cuanto a la utilización de ácido sulfúrico), para la utilización de este sistema de pretratamiento como una etapa anterior a la FSS.

La tabla B.1 muestra la composición proximal de la CAR cruda (reportada en el informe anterior) y que sirve como base al análisis de los resultados. La tabla B.2 muestra las condiciones que se mantuvieron constantes en los distintos pretratamientos, el tiempo de operación fué de 2 hrs. para las distintas condiciones de razón ácido/CAR estudiadas, esta

condición de tiempo está avalada por resultados que se presentaron en el Quinto Informe de Avance.

Tabla B.1 : Composición proximal de la Coseta Agotada de Remolacha.

	%
Hidrosolubles	11,3
Lípidos	1,1
Pectinas	8,9
Hemicelulosa	47,6
Celulosa	21,5
Lignina	2,1
Proteína	7,4

Tabla B.2 : Condiciones de operación del pretratamiento

Concentración de sustrato	:	75	g/l
Temperatura	:	80	°C
Agitación	:	250	rpm
Volumen de operación	:	500	ml

## RESULTADOS

La tabla B.3 muestra el porcentaje de remoción de sólidos y la composición del material obtenido luego del pretratamiento a distintas razones ácido/CAR. Como se puede observar en dicha tabla, se comprueba el efecto de aumento en la remoción de sólidos con la disminución de la razón ácido/CAR. También es posible observar que a medida que esta razón disminuye la solubilización de la celulosa aumenta tendiendo a un valor similar al de la coseta cruda.

En la Tabla B.4 se muestra la digestibilidad enzimática in vitro del material pretratado en distintos tiempos de incubación. Estos valores ofrecen un buen criterio de selección de las condiciones de pretratamiento, ya que muestran un máximo de DEIV para la condición de pretratamiento #2. Por esta razón se selecciona esta condición para todos los estudios de FSS de CAR pretratada.

Tabla B.3 : Remoción de sólidos y composición del producto del pretratamiento.

PRETRATAMIENTO	1	2	3	4(*)
RAZON (g ác./g CAR)	0,05	0,1	0,3	0,5
% REMOCION DE SOLIDOS	61,4	54,7	41,9	48,0
COMPOSICION RESULTANTE (%)				
Hidrosolubles	5,9	6,3	3,5	10,7
Lipidos	1,2	2,2	1,5	1,2
Pectinas	7,1	7,7	6,8	9,2
Hemicelulosas	44,7	41,5	42,4	38,1
Celulosa	26,6	28,4	35,8	32,8
Lignina	3,1	3,5	4,2	5,4

(\*) : Los resultados corresponden a muestras obtenidas con un pretratamiento sin neutralización.

Tabla B.4 : Digestibilidad enzimática in vitro del material pretratado a las distintas condiciones.

	DEIV <sub>T</sub>		
	Tiempo de incubación (h)		
	2	5	24
C.A.R cruda	4,9	4,8	4,2
Pretratamiento # 1 0,05 g ác./g CAR	5,8	17,5	42,2
Pretratamiento # 2 0,10 g ác./g CAR	9,9	23,4	48,0
Pretratamiento # 3 0,30 g ác./g CAR	11,9	12,1	38,3

$$DEIV_T = \frac{m_s - m_r}{m_s} \times 100$$



ACTIVIDAD C. ESTUDIO DE FERMENTACION EN SUSTRATO SOLIDO  
A NIVEL LABORATORIO CON COSETA AGOTADA DE  
REMOLACHA CRUDA Y PRETRATADA.

RESUMEN

Se realizaron experiencias de FSS de CAR sin pretratamiento, empleando las siguientes cepas: Trichoderma reesei UC-4, Trichoderma aureoviride salvaje y Trichoderma aureoviride 7-121. Como cepa de referencia se utilizó Trichoderma reesei QM-9414. Las experiencias se realizaron en columnas de fermentación tipo Alazard-Rainbault, a temperatura controlada y con suministro de aire humidificado.

Durante todas las experiencias se observó un desarrollo homogéneo de micelio sin esporulación. Los mejores resultados en términos de enriquecimiento proteico y producción de enzimas celulolíticas se obtuvieron con T.aureoviride 7-121. Los resultados obtenidos con T.reesei UC-4 no fueron satisfactorios y no superaron los obtenidos con la cepa de referencia.

En base a los resultados obtenidos se decidió seleccionar la cepa T.aureoviride 7-121 para el desarrollo de las siguientes experiencias. La cepa T.reesei UC-4 fue descartada y reemplazada por la cepa T.reesei LM-1 proporcionada recientemente en el marco del proyecto.

Con las cepas seleccionadas se realizaron experiencias de FSS de CAR pretratada químicamente, en las condiciones establecidas en el punto B. del presente informe. Con la cepa T.aureoviride 7-121 se obtuvo un incremento considerable en la actividad celulolítica respecto de CAR sin pretratamiento, no ocurriendo igual cosa en el caso de la cepa T.reesei LM-1 en relación a su contraparte UC-4.

En base a los resultados obtenidos con la cepa T.aureoviride 7-121, deberá hacerse un análisis que permita establecer cuál de los dos sustratos se utilizará para las pruebas a nivel de fermentador prototipo que se realizarán durante el tercer año de ejecución del Proyecto.

1). METODOLOGIA.

1.1. Microorganismos:

Se utilizaron las siguientes cepas:

Trichoderma reesei QM -9414. Cepa de colección usada como patrón de referencia.

Trichoderma reesei UC -4. Cepa mutante proporcionada por la Universidad Nacional Agraria, Perú.

Trichoderma aureoviride nativa. Cepa aislada por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Trichoderma aureoviride 7 -121. Cepa mutada de la anterior.

1.2. Mantenición de cepas:

Las cepas se mantuvieron en tubos inclinados con agar papa dextrosa como medio de cultivo, inoculados con esporas e incubados durante 7 días a 28°C, y luego mantenidos a 5°C.

1.3. Preparación de inóculo para FMSS:

Las columnas de Alazard y Raimbault fueron inoculadas con micelio crecido en medio líquido, cuya composición se detalla a continuación:

Para Trichoderma reesei:

TABLA # 1

Componente	g/l
Lactosa	6,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,23
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,59
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,123
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>7</sub> · H <sub>2</sub> O	5,15
Solución Sales	10,0 ml/l

Para Trichoderma aureoviride:

TABLA # 2

Componente	g/l
Glucosa	6,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,23
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,59
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,123
Solución de Sales	10,0 ml/l

### Composición de Sales Minerales:

Componente	mg/l
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5,0
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,6
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2,5
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	3,7

Las propagaciones se realizaron en cultivo sumergido en matraces de 1l, con 250 ml de medio de cultivo, inoculadas con resuspensión de esporas ( $2 \cdot 10^7$  esporas/ml), proveniente de un tubo de agar con agua destilada estéril.

La incubación se efectuó a 30°C, con agitación orbital de 220 rpm., con una duración de 2,5 días para Trichoderma aureoviride y 3,0 días para Trichoderma reesei, tiempos correspondientes a 3/4 del crecimiento exponencial del microorganismo, determinado en experiencias iniciales de cinéticas de crecimiento de cada cepa en su respectivo medio de cultivo.

#### 1.4. Fermentación Semi-Sólida en columnas de Alazard-Raimbault:

Los fermentadores de columna fueron inoculados con el contenido total del matraz de propagación junto al medio de cultivo sólido que se indican a continuación:

Para Trichoderma reesei

TABLA # 3

Componente	g
CAR seca (9 -12 mesh)	150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	24
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,25
Solución de Sales	15 ml

Para Trichoderma aureoviride:

TABLA # 4

Componente	g
CAR seca (9 -12 mesh)	150
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	19,35
Urea	5,1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,25
Solución de Sales	15 ml

La solución de sales es la indicada anteriormente.

La coseta agotada de remolacha (CAR) fue previamente esterilizada, durante 40 min. a 120 °C, al igual que las demás sales. Luego se procedió a mezclar en forma estéril todos los componentes del medio de cultivo junto al contenido total del matraz de propagación, ajustándose de este modo la humedad inicial del sustrato en un 65 % base húmeda.

Una vez realizada la mezcla anterior, se dejó reposar por 3 hr. en refrigerador (en forma estéril), para producir una efectiva impregnación del sólido. Transcurrido este tiempo se procedió a rellenar en forma estéril cada una de las columnas de fermentación.

Estas columnas de fermentación son aireadas con un flujo de 70 ml/min. de aire estéril, por medio de un dispositivo ubicado inmediatamente debajo del tubo fermentador. Todo el sistema se encuentra en un baño termostático a 25 °C para I. aureoviride y 30 °C para I. reesei.

#### 1.5. Toma de muestras:

El contenido de una columna correspondió a la muestra a analizar.

Para la extracción de enzimas se sumergió 2 g. de muestra húmeda fermentada en 30 ml. de agua destilada, agitando 5 min. a 200 rpm. en un matraz de 250 ml. Luego se centrifugó por 10 min. a 5000 rpm.

El sobrenadante obtenido se ocupó para la determinación de actividad de papel filtro (PF), azúcares reductores, proteína soluble y medición de PH.

El sólido fue lavado con agua destilada para la determinación de contenido proteico.

Otra fracción de sólido sin lavar se utilizó para cuantificar el porcentaje de humedad.

#### 1.6. Métodos de Análisis:

La actividad enzimática se cuantificó por la capacidad degradativa de la enzima sobre papel filtro, utilizando el método del ácido dinitrosalisílico (DNS) para la determinación de azúcares reductores. Una unidad de papel filtro (UPF) se define como la cantidad de enzima que produce un micromol de azúcares reductores, expresados como glucosa, por minuto.

Para la determinación de proteína extracelular se utilizó el método de Lowry.

La determinación del contenido proteico en sólidos se determinó en base al porcentaje de nitrógeno en sólidos mediante el método de microkjeldahl.

Para la determinación del contenido de humedad, mediante gravimetría, se llevó la muestra hasta peso constante en estufa a 80 °C.

## 2). RESUTADOS.

### 2.1. Fermentación #1: (I. aureoviride nativa)

En Fig. # 1, 2, 3, 4 y 7, se presentan los perfiles de la cinética de fermentación con I. aureoviride nativa.

La inoculación se realizó con el cultivo líquido indicado en la Tabla #2, crecido durante 2,5 días.

La fermentación sólida se desarrolló a 25°C durante un lapso de 11 días (264 horas). El medio de cultivo sólido es el indicado en la Tabla #4.

La Fig. #1 muestra los cambios de humedad y ph durante la experiencia. La humedad del medio de cultivo fue aumentando durante las primeras 180 horas de cultivo y se mantuvo constante en 70% durante el resto de la fermentación. El ph experimentó un descenso directamente asociado al crecimiento micelial. El nivel de ph más bajo fue de 3,7 a las 84 horas y aumenta hasta 6,3 hacia el final de la fermentación.

La Fig. # 2 muestra la concentración de proteína excretada al medio de cultivo, alcanzando un nivel de 0,027 (g/g car seca) luego de las 204 horas de fermentación

En Fig. # 7, se presenta la proteína en sólidos, alcanzando un nivel máximo de 0,41 (g/g car seca), manteniéndose en ese valor luego de las 144 horas de cultivo.

La Fig # 3, muestra la cinética enzimática, observándose un periodo de latencia muy pequeño (aprox. 15 horas), luego del cual permanece constante (8 UPF/g seco)

En la Fig. # 4 se observa la concentración de azúcares reductores, alcanzándose un nivel de 0,04 (g/g seco)

### 2.2. Fermentación # 2: (I. aureoviride 7-121)

Los resultados de esta experiencia se presentan en Fig. 5, 6, 7, 8, 9, con I. aureoviride 7-121, en las mismas condiciones especificadas para la fermentación anterior. Esta fermentación fue llevada durante 11 días.

La Fig # 5, muestra las curvas de ph y de humedad aumentando esta última en forma suave desde las 120 horas, alcanzando un valor final de 69,6%, mientras que el ph experimentó un descenso hasta 3,6 a las 96 horas, tiempo después del cual empezó a aumentar hasta llegar a un ph de 6,3 al final de la fermentación.

La Fig. # 6 contiene la proteína extracelular por gramo de

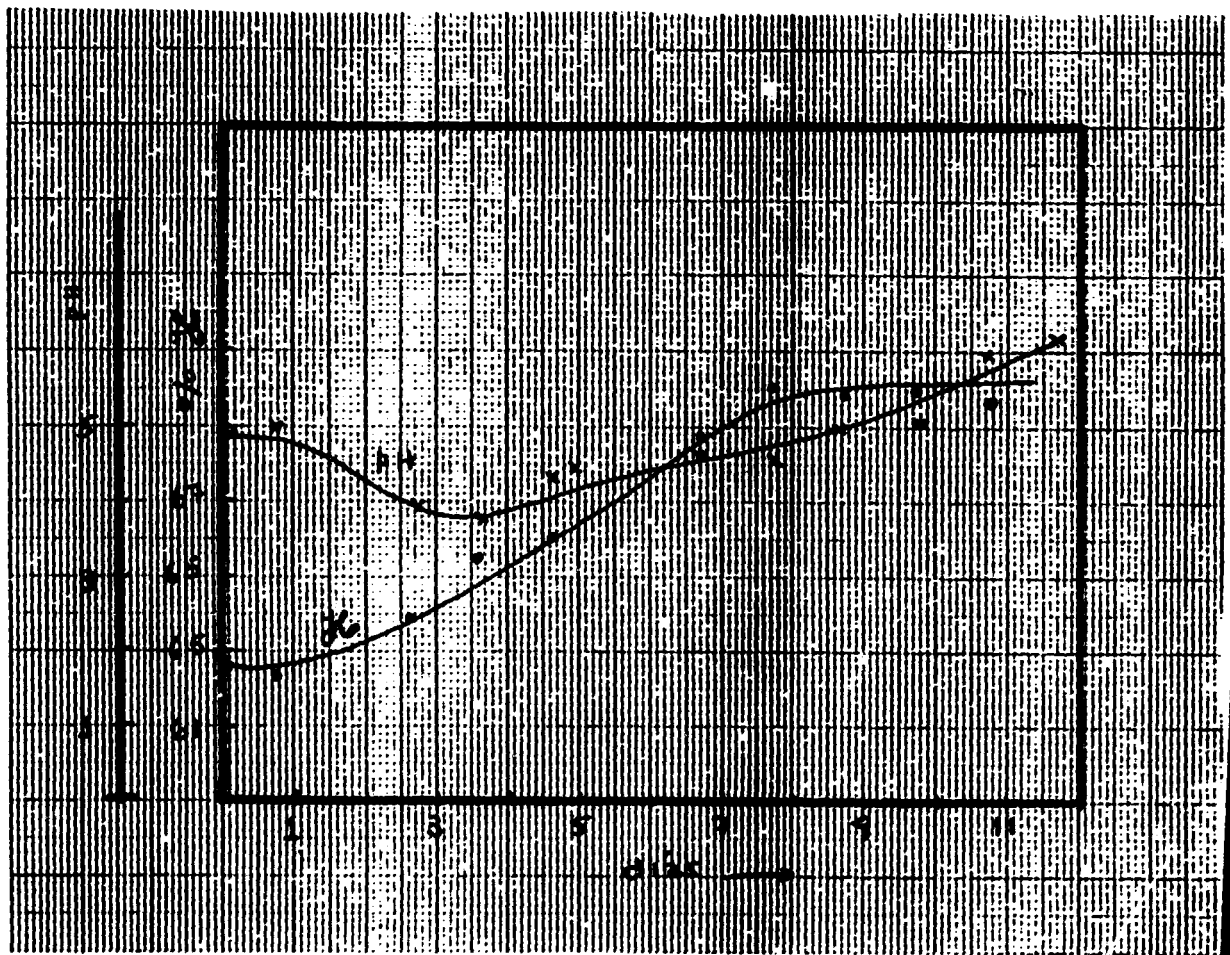


FIG #1: Fern. T. aureoviride nativa

25°C

Curvas de humedad y PH.

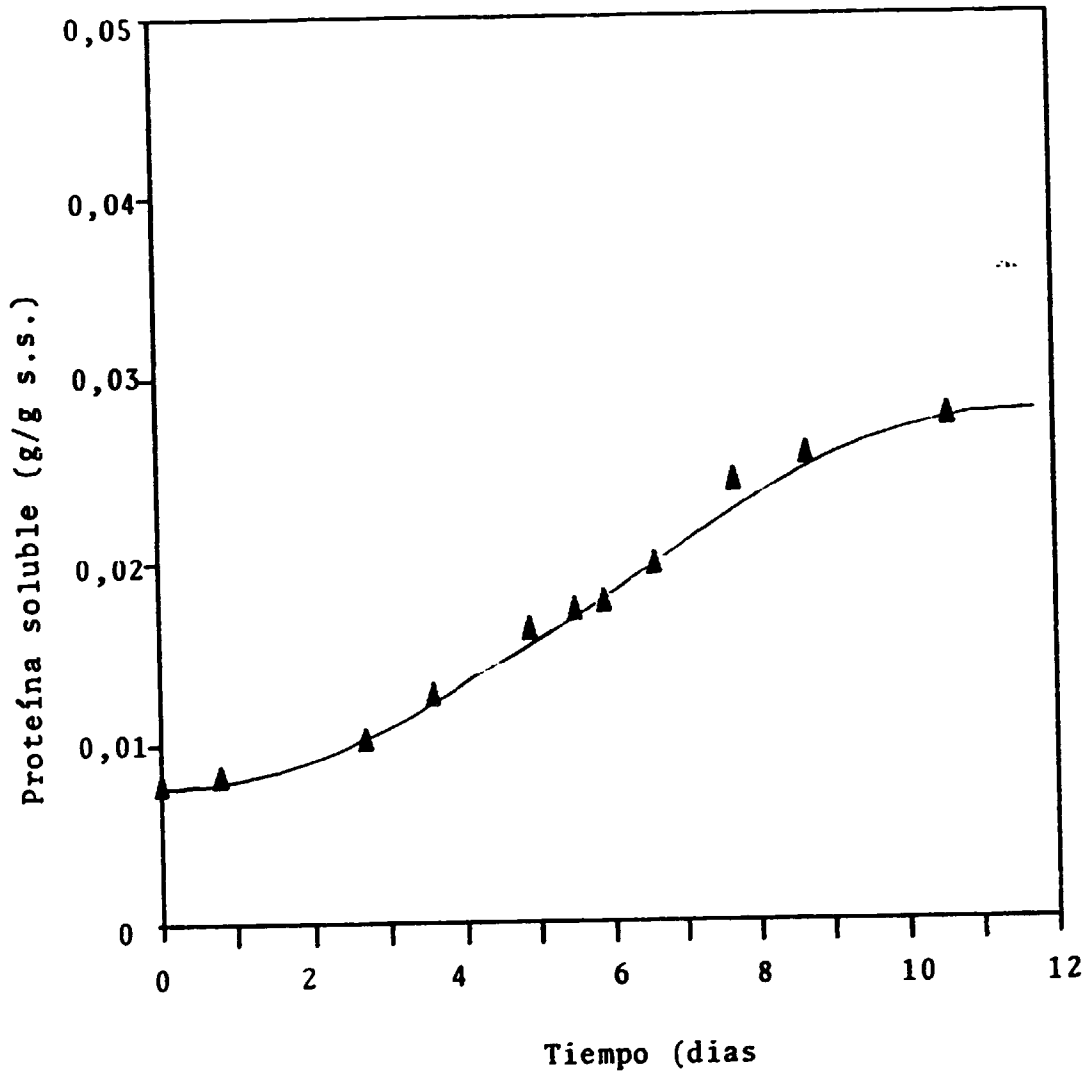


Fig. 2 : Fermentación con T. aureoviride nativa a 25 °C. Proteína excretada.

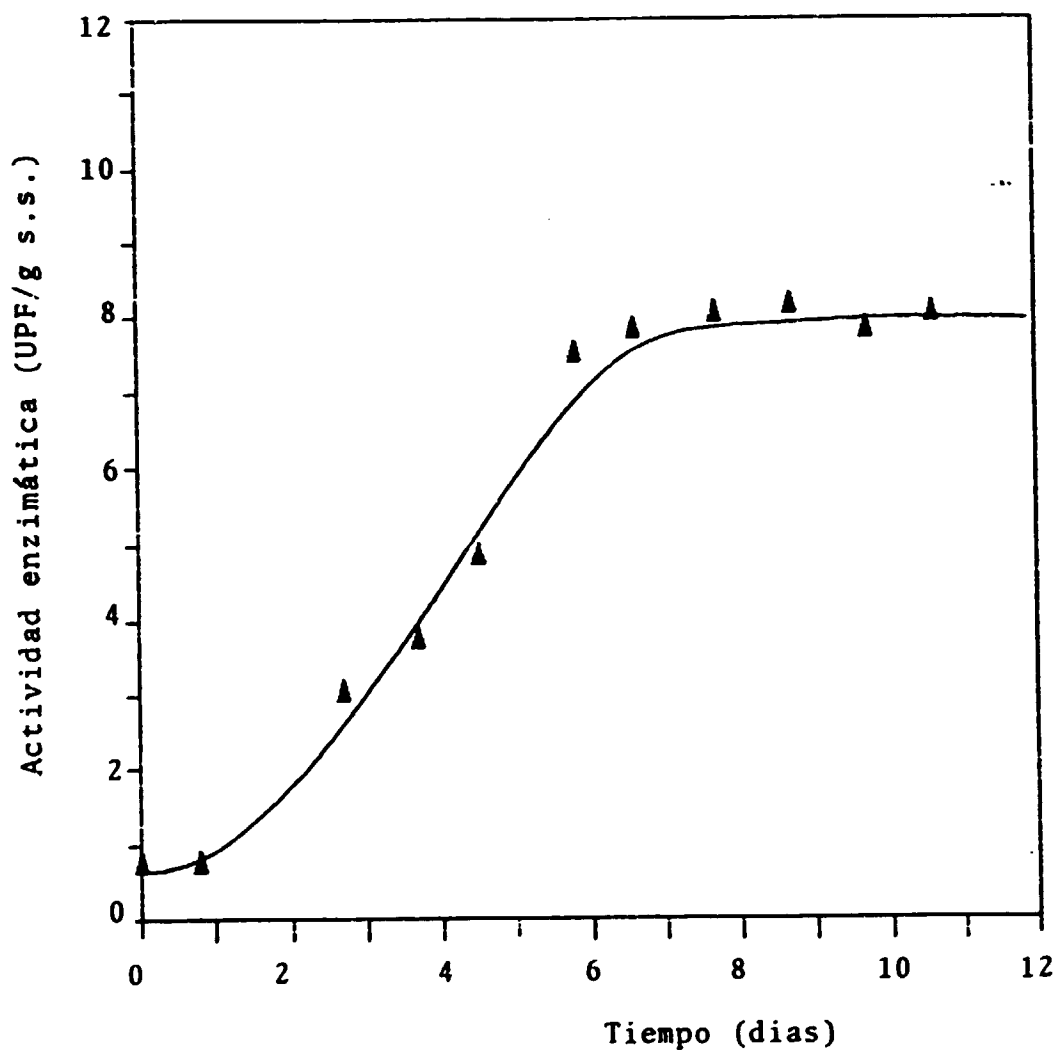


Fig. 3. Fermentación con *T.aureoviride* nativa a 25 °C. Producción de celulasas.



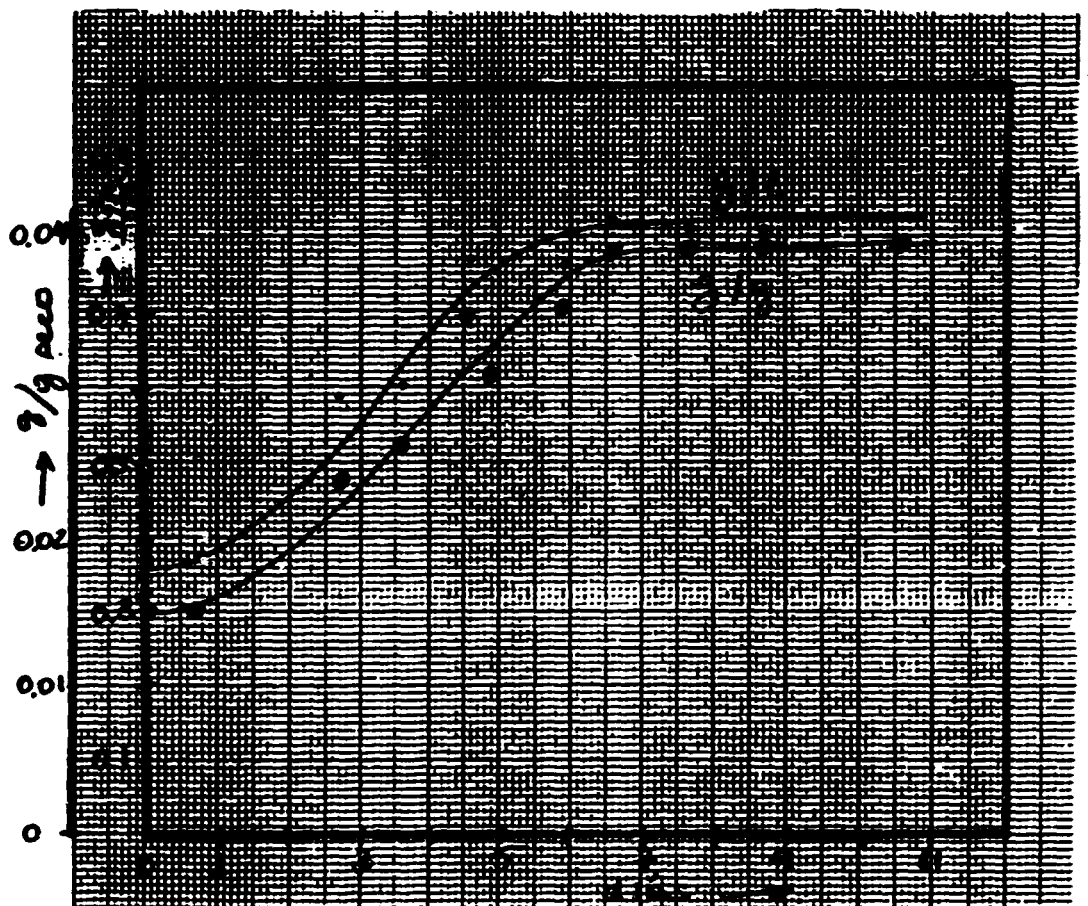


FIG. # 4 :

Ferm. T. aureoviride nativa  
25 °C.

Concentraci3n de aireos reactivos.

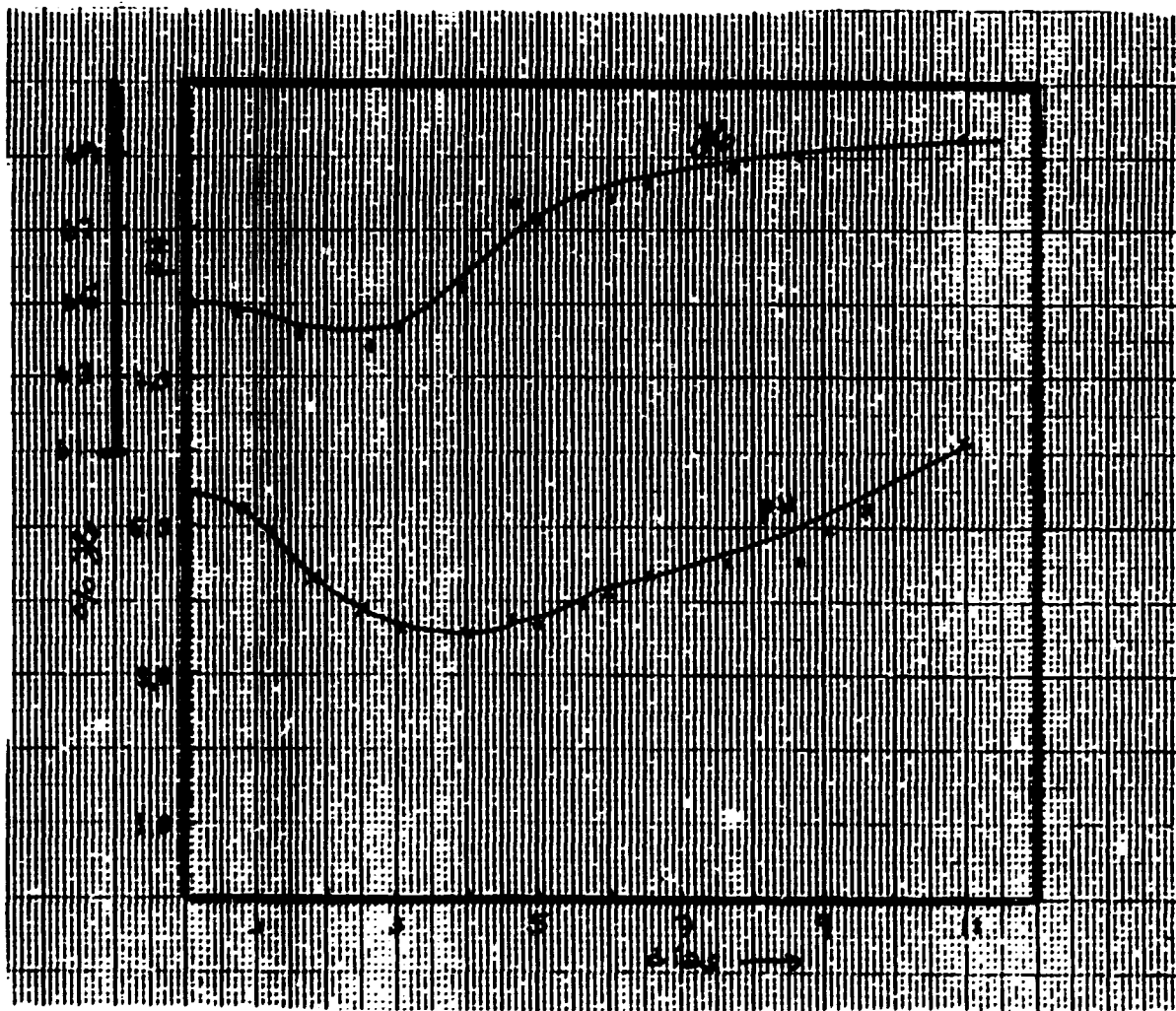


Fig #5 : Ferm. T. aureoviride 7-121  
 25 °C  
 Curvas de humedad y PH.

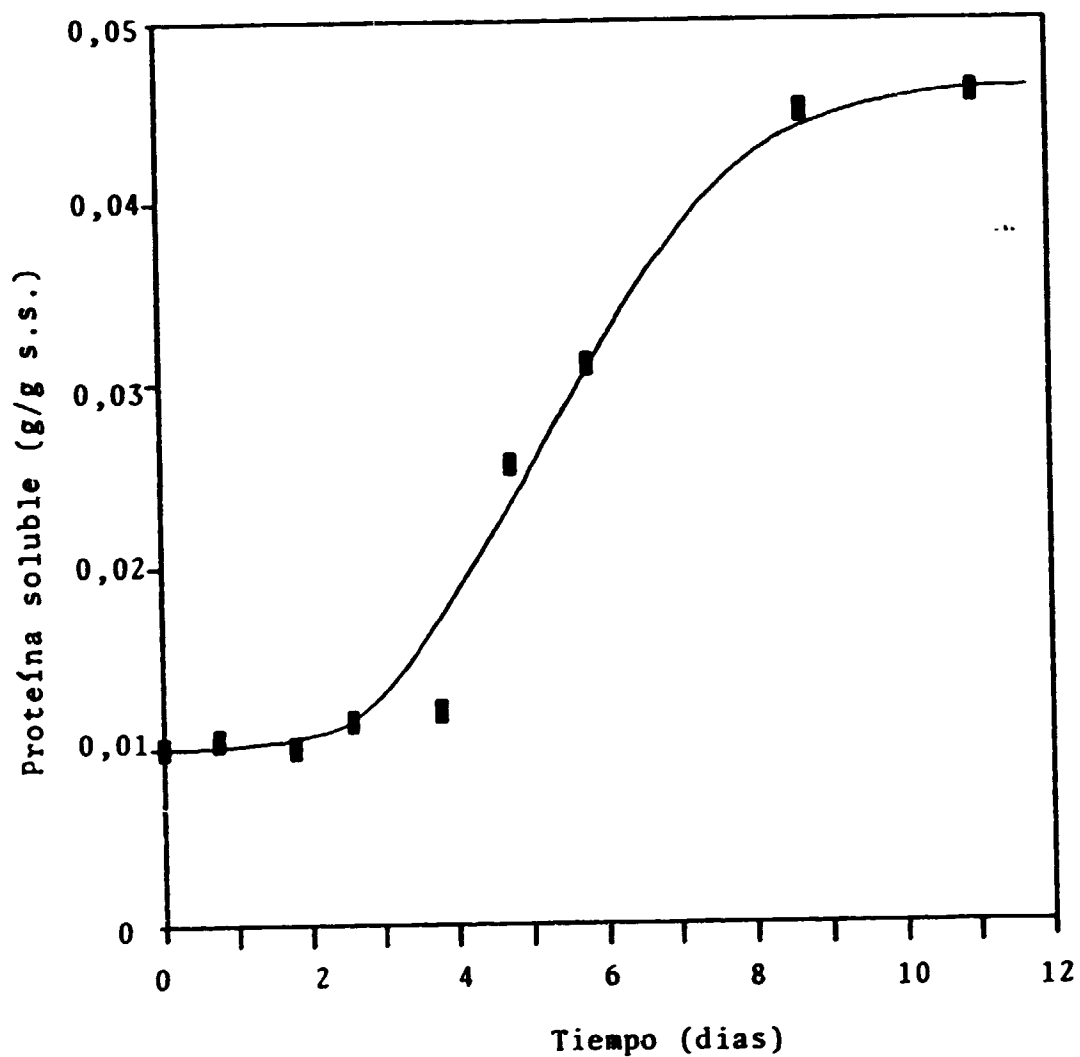


Figura 6 : Fermentación con T. aureoviride 7-121 a 25 °C. Proteína excretada.

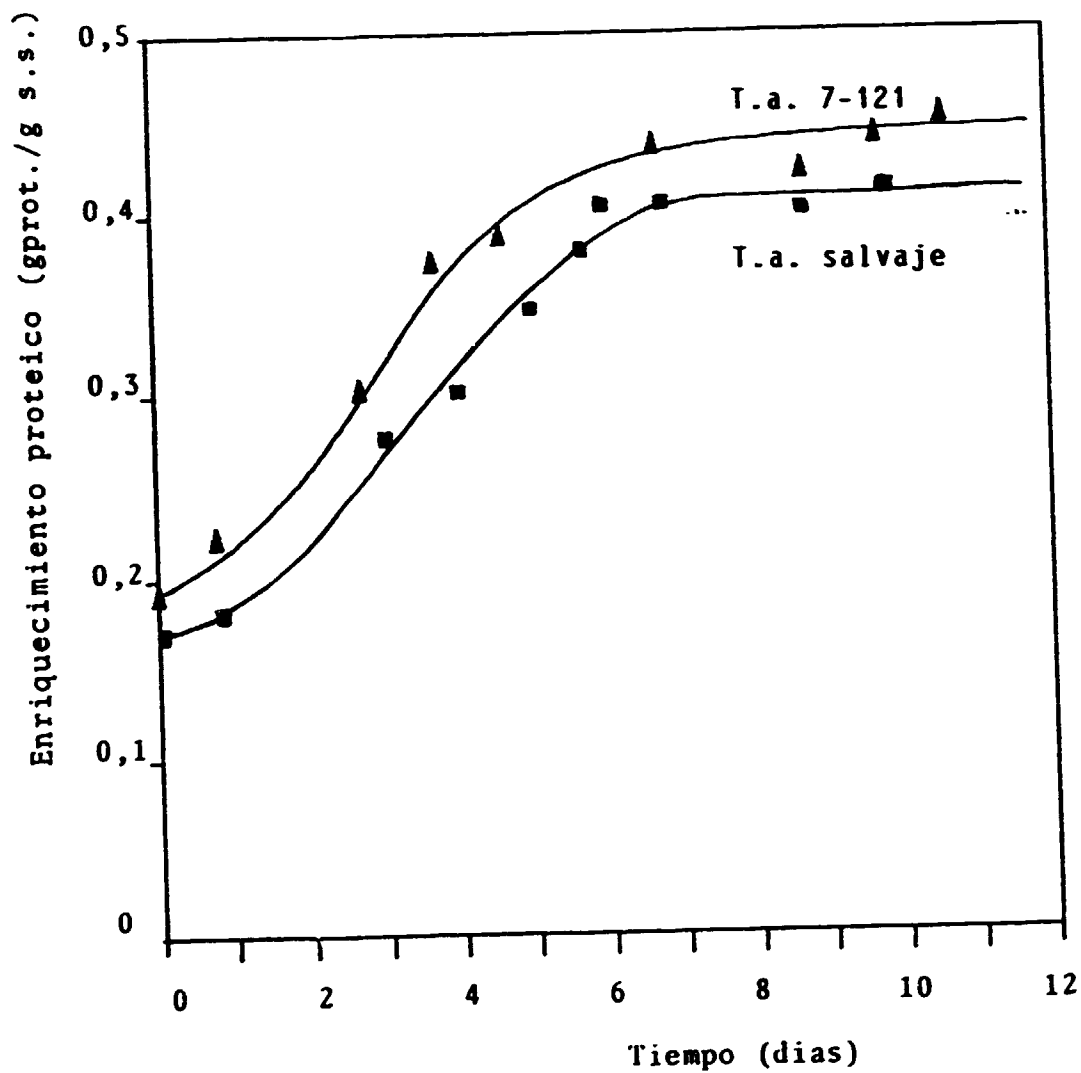


Fig. 7. Fermentación con *T.aureoviride* salvaje y *T. aureoviride* 7-121, a 25 °C.

Enriquecimiento proteico en sólido.

▲ *T. aureoviride*

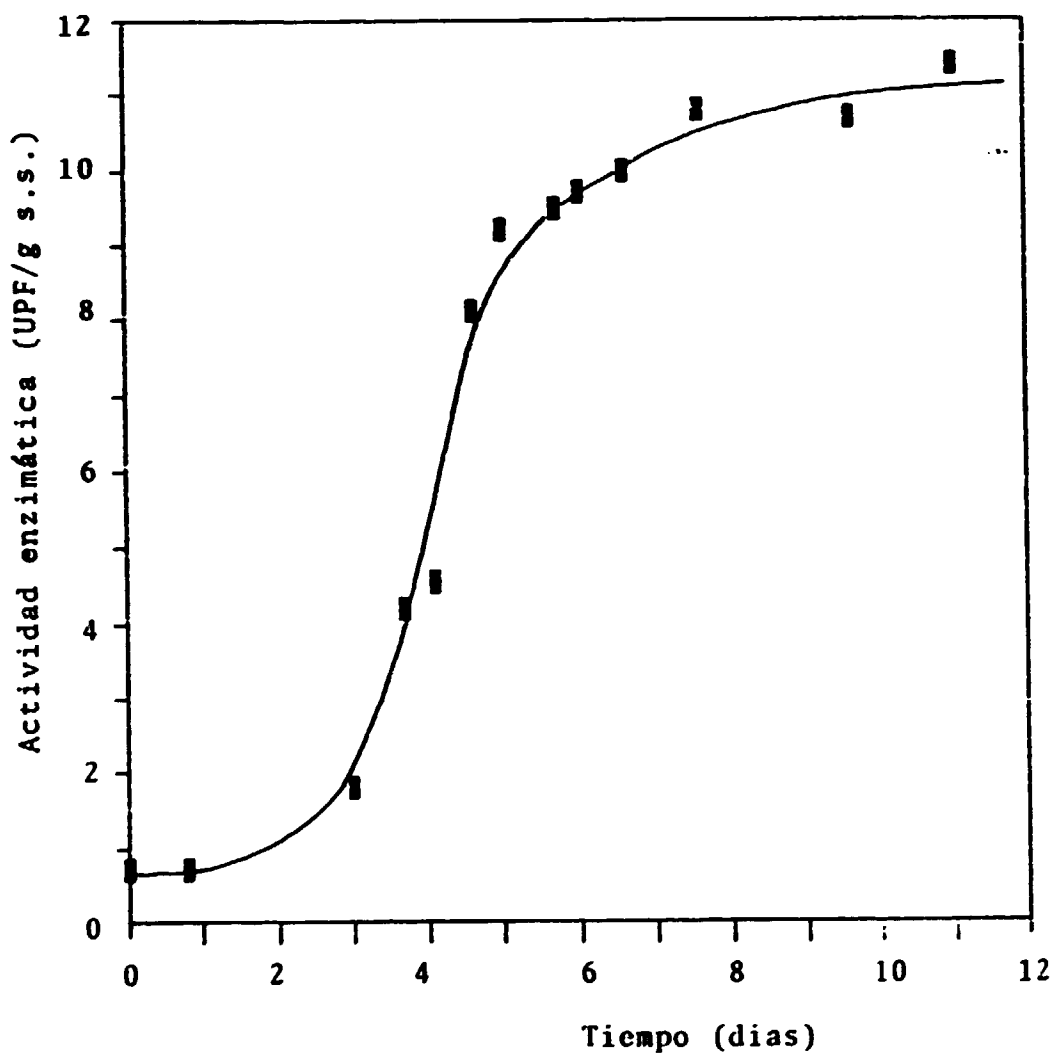


Fig. 8. Fermentación con *T. aureoviride* 7-121 a 25 °C. Producción de celulasas.

*T. aureoviride* 7-121

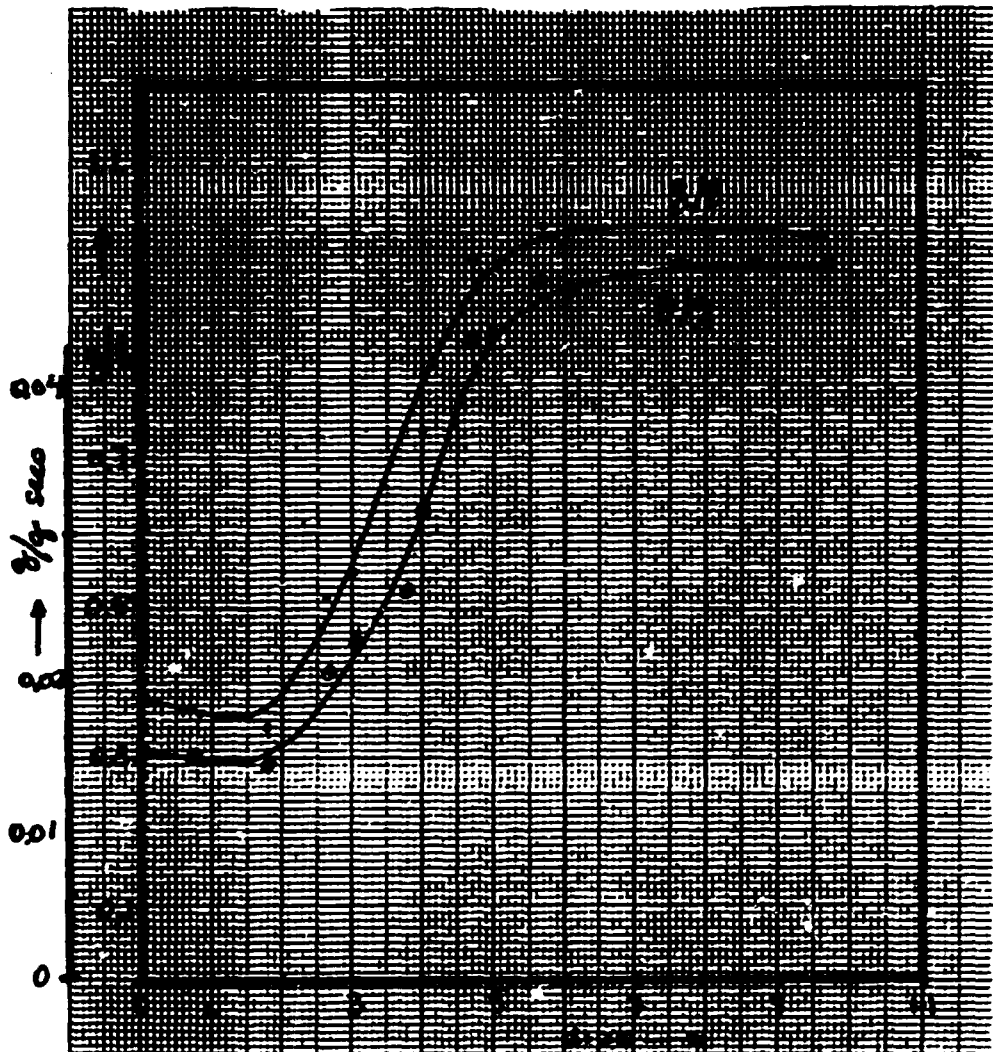


FIG # 9: *Ferm. T. aureoviride* 7-121  
 26°C  
 Concentración azúcares reductores.-

de sustrato seco llegando a nivel de 0,05 g/g a las 192 horas de cultivo.

En Fig. # 7, se presentan los resultados de proteína en sólidos, lográndose un nivel de 0,43 g/g seco a las 144 horas.

En la Fig. # 8 se observa que el nivel de actividad de PF logrado alcanza a los 11 UFF/g seco a las 192 horas de cultivo. Se observa un período de latencia de 48 horas.

En Fig. # 9, se observa el nivel de azúcares reductores que hacia el final de la fermentación alcanzaron 0,048 g/gseco.

### 2.3. Fermentación # 3: (I. aureoviride 7-121)

Se realizaron 2 experiencias complementarias a 25°C con el mutante I. aureoviride, para analizar el efecto que tendría sobre la fermentación las siguientes modificaciones:

Ferm 3.a): Un inóculo propagado en fuente de carbono soluble (glucosa) y fuente de carbono insoluble (CAR), este último como sustrato inductor de celulasas.

Ferm. 3 b): El medio de cultivo sólido contiene sólo sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno.

#### Ferm.3 a):

El medio de cultivo de propagación es el mismo indicado en Tabla # 2, salvo que como fuente de carbono fueron considerados 1,2 g/l de glucosa y 6,0 g/l de CAR con 1,7 días de propagación. El medio de cultivo sólido es el indicado en Tabla #4.

#### Ferm.3 b):

El medio de cultivo de propagación es el indicado en Tabla # 2, sin embargo, el medio de cultivo sólido fue cambiado según lo detallado en Tabla # 3.

En Tabla # 5 se encuentran registrados los datos obtenidos en estas experiencias.

### 2.4. Fermentación # 4: (I. reesei UC-4)

Esta fermentación se realizó con propagación en lactosa como única fuente de carbono, crecido por 3 días. El medio de cultivo se encuentra detallado en Tabla # 1.

El medio de cultivo sólido se detalla en Tabla # 3.

La fermentación sólida se desarrolló a 30°C durante 312 horas de cultivo.

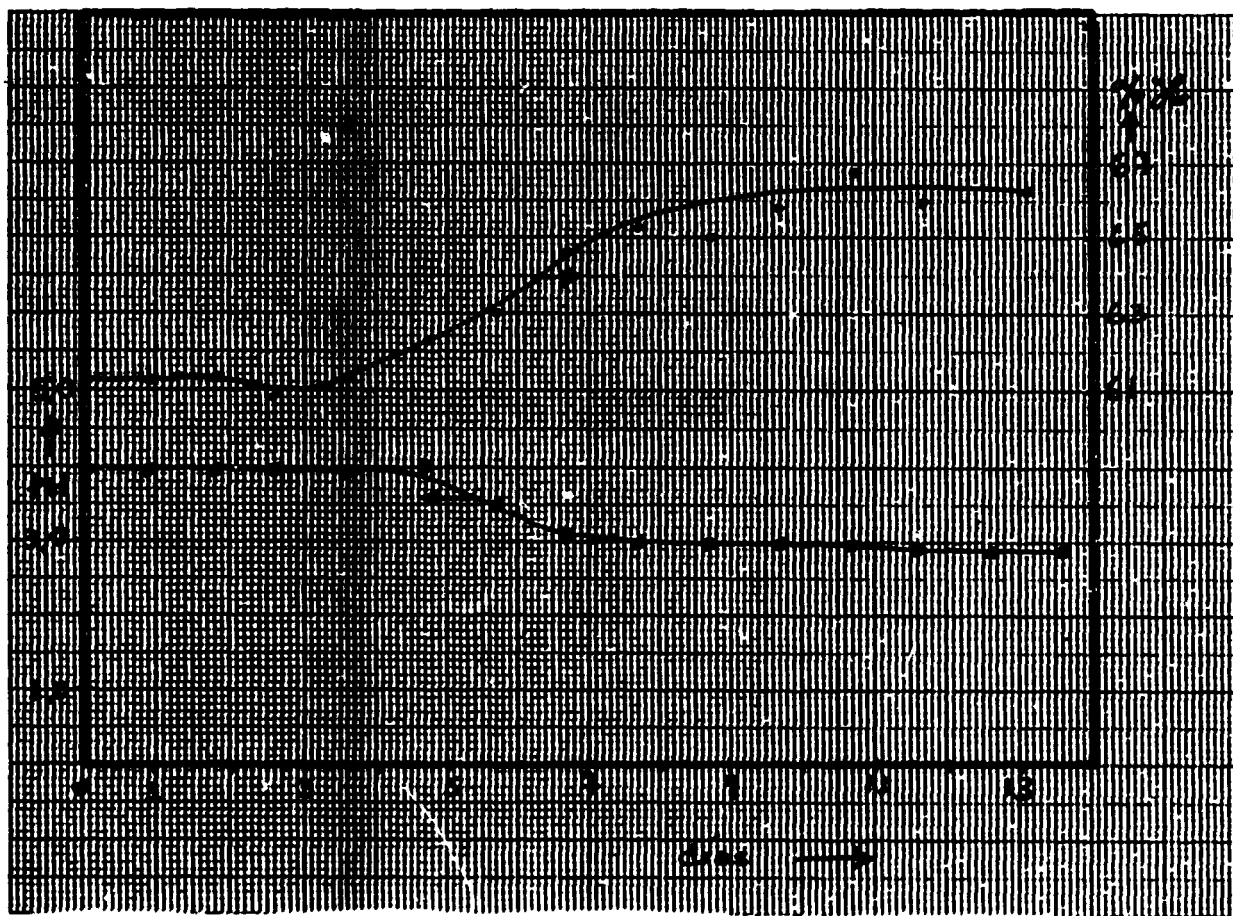
Los resultados se presentan en Fig. # 10, 11, 12, 13 y 14.

**TABLA # 5.**

**Fermentación I. aureoviride 7-121.**

	<b>Ferm. 2.a</b>	<b>Ferm. 3b.</b>
<b>Humedad final(%)</b>	70	66
<b>PH final</b>	6,5	3,0
<b>Tiempo total ferm.(días)</b>	12	8
<b>Fase Lag.(días)</b>	3	2,5
<b>Tiempo producción máx.(días)</b>	9	4
<b>UPF/g seco</b>	7,4	2,5
<b>Proteína en sólidos (g/g)</b>	0,45	0,17
<b>Proteína extracelular (g/g)</b>	0,06	0,03
<b>Azúcares reductores (g/g)</b>	0,034	0,022





FLG # 10: Ferm. T. reesei UC-4  
 30°C  
 curvas de pH y humedad.

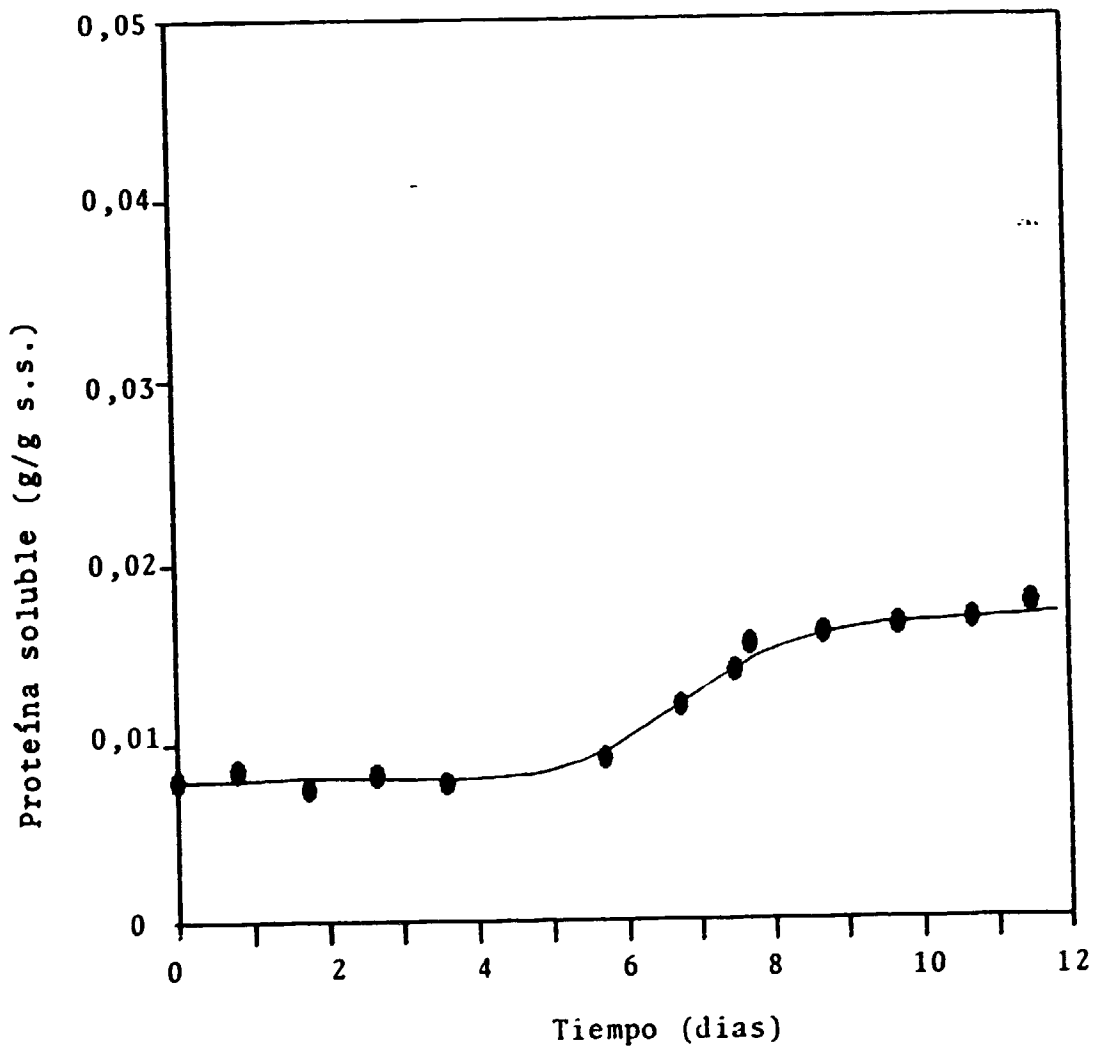


Fig. 11 : Fermentación con T. reesei UC-4 a 30 °C  
Proteína excretada.

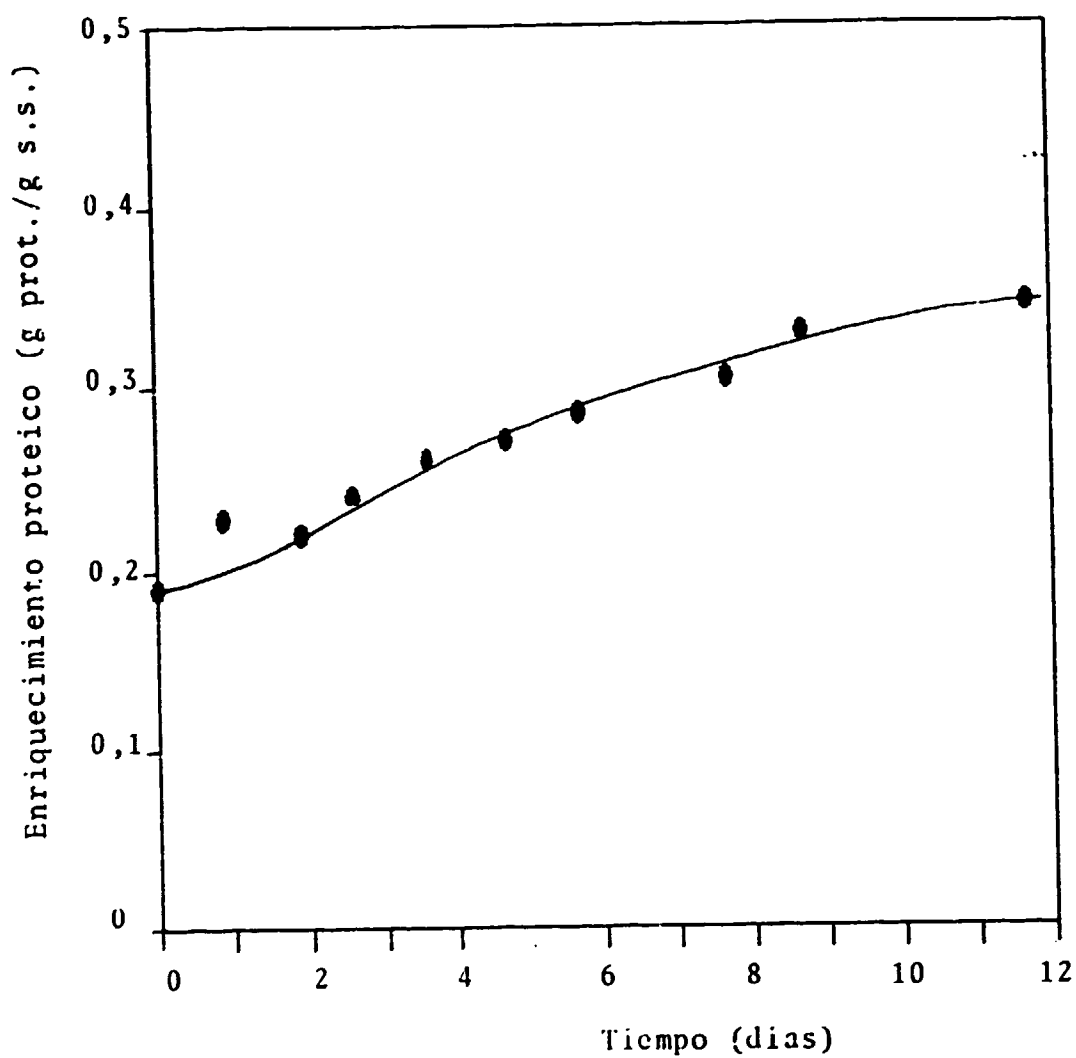


Fig. 12. Fermentación con *T. reesei* UC-4 a 30 °C.  
Enriquecimiento proteico en sólido.

*T. reesei* UC-4

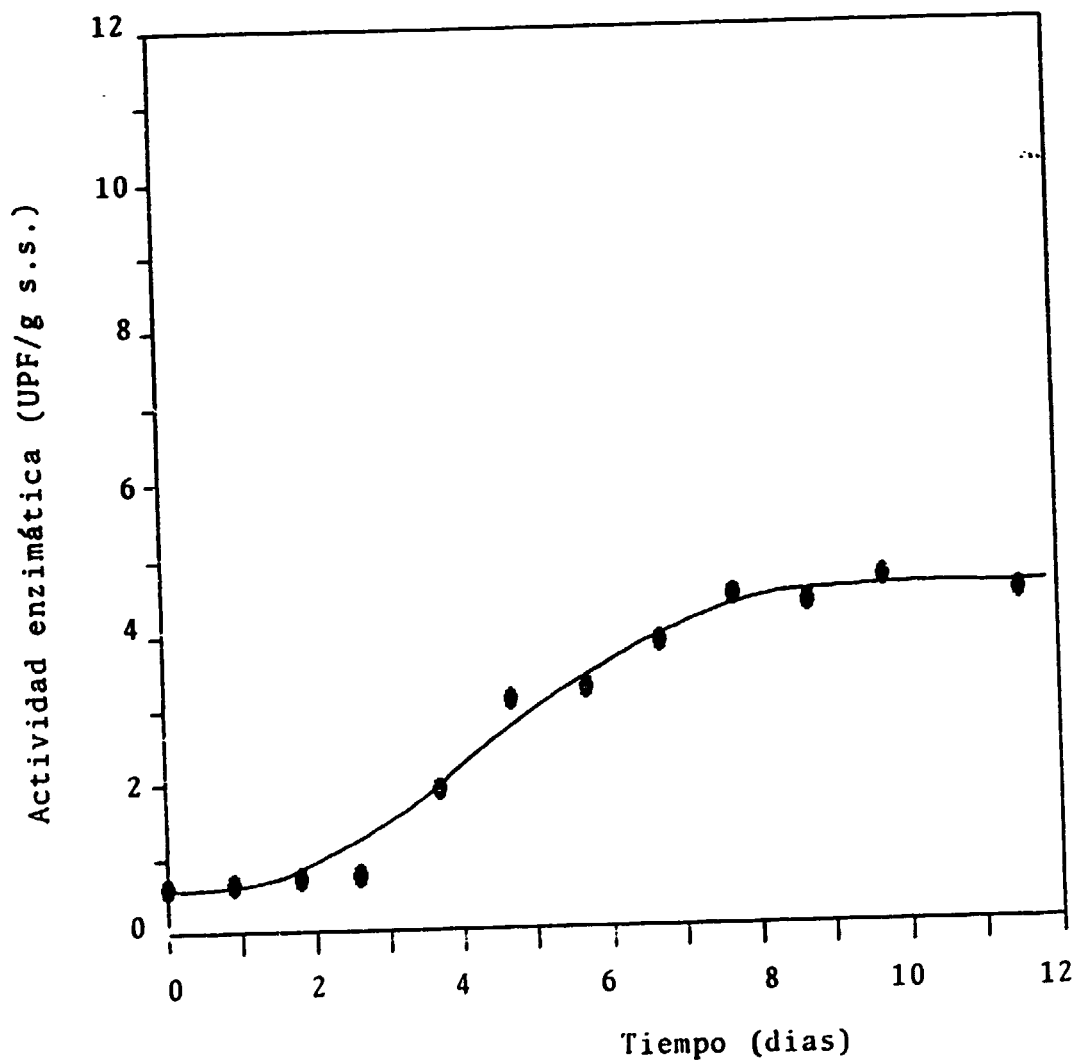


Fig. 13. Fermentación con *T. reesei* UC-4 a 30 °C.  
Producción de celulasas.

*T. reesei* UC-4

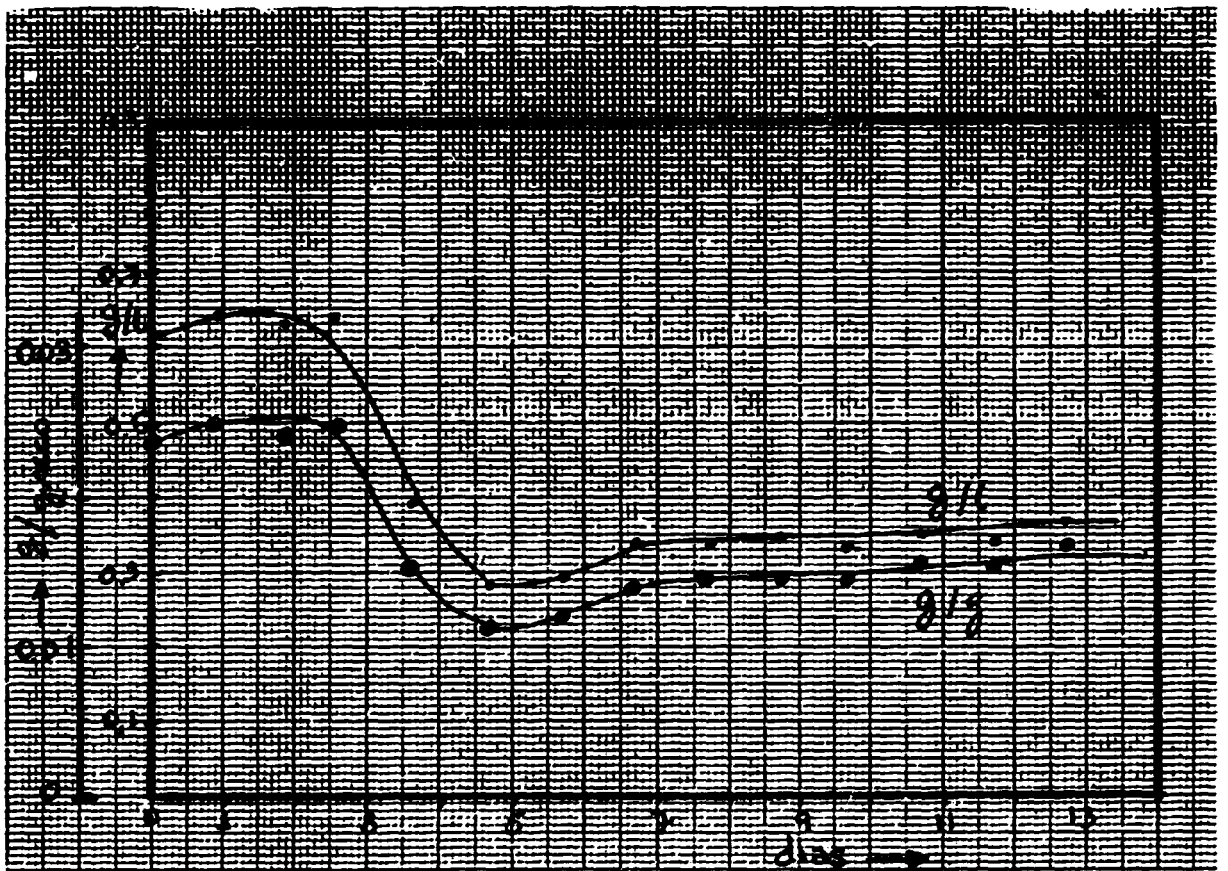


FIG # 14: Ferm. T. reesei UC-4  
 30°C  
 Concentración azúcares reductores..

La Fig. # 10, detalla los cambios de humedad experimentados durante la fermentación, variaciones de 61 a 66 % de humedad, manteniéndose constante en este último valor desde las 228 horas de fermentación. También en esta figura se presentan los cambios de ph, el que experimentó un descenso hasta un ph de 2,9 hacia el 5° día de cultivo, manteniéndose constante en este valor luego de las 168 horas.

En Fig. # 11, se observan los niveles de proteína extracelular con un máximo de 0.017 g/g seco.

En Fig. # 12, se presentan los niveles de proteína en sólidos, lográndose una concentración máxima de 0,35 g/g.

La Fig. # 13, muestra la actividad de celuiasas expresada como UPF/g seco, que alcanza un valor de 4,6 a los 9,7 días de fermentación, observándose una fase lag de 3 días en la producción de la enzima.

Fig. # 14, muestra los, niveles de azúcares reductores obtenidos durante la fermentación, llegando a una concentración final de 0,016 g/g. Se observa un mayor consumo de azúcares a los 4,5 días alcanzando un nivel de 0,012 g/g.

## 2.5. Fermentación # 5: ( T. reesei QM-9414)

Esta experiencia se realizó en idénticas condiciones a la fermentación # 4. El tiempo de fermentación fue de 14 días.

Los resultados son presentados en Fig. # 15, 16, 17, 18 y 19.

En Fig. # 15, se observan los cambios de humedad y ph producidos durante la fermentación. La humedad final alcanzó un 67%, en tanto que el ph se mantuvo en un valor de 3,0 luego del 7° día.

La Fig. # 16, se presenta la proteína excretada al medio de cultivo, lográndose 0,032 g/g hacia el final de la fermentación.

En Fig. # 17, la proteína en sólidos alcanzó un nivel de 0,34 g/g, lo que corresponde a un 5,44% de nitrógeno.

La Fig. # 18, presenta la actividad enzimática degradativa sobre papel fitro, lográndose 6,5 UPF/g a las 288 horas.

En Fig. # 19, se observa la concentración de azúcares reductores. El mayor consumo se produce al 5° día, estabilizándose en un valor de 0,015 g/g hacia el final de la fermentación.

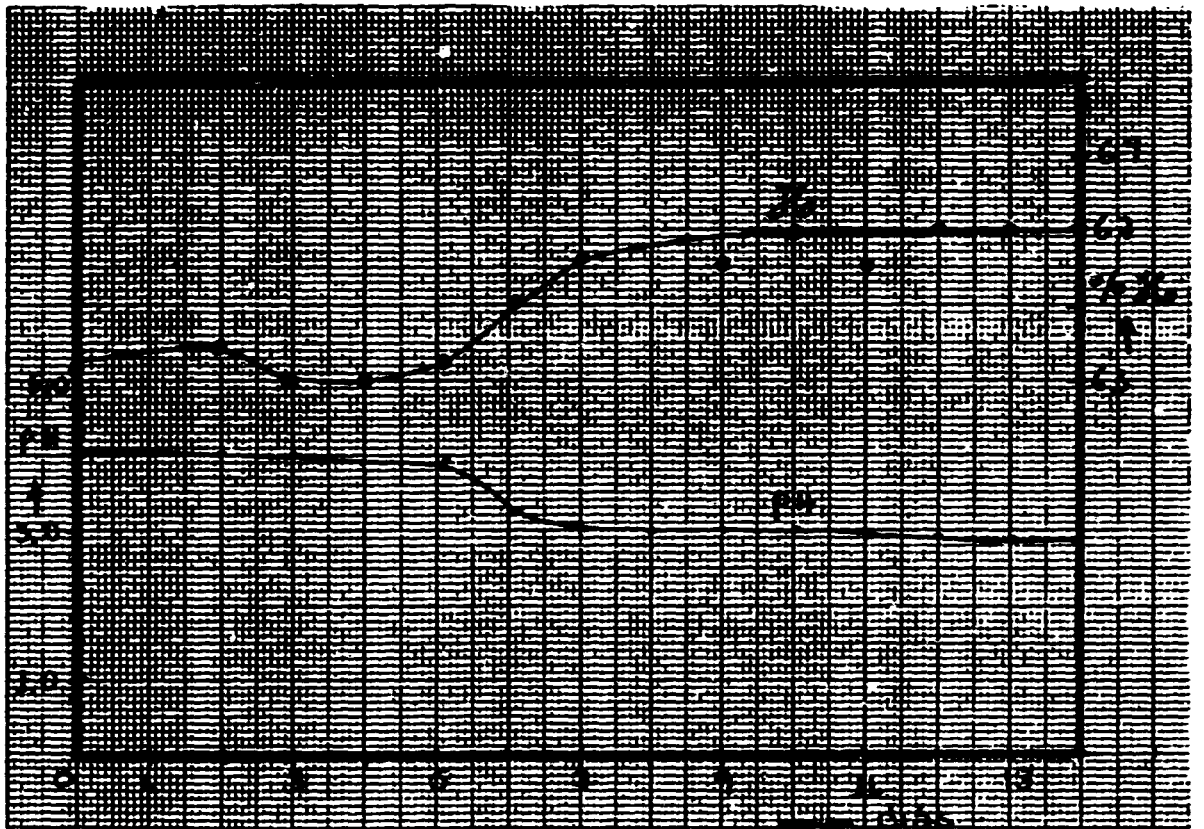


FIG #15 : Ferm. T. reesei QM-9414  
 30°C  
 Curvas de pH y humedad.

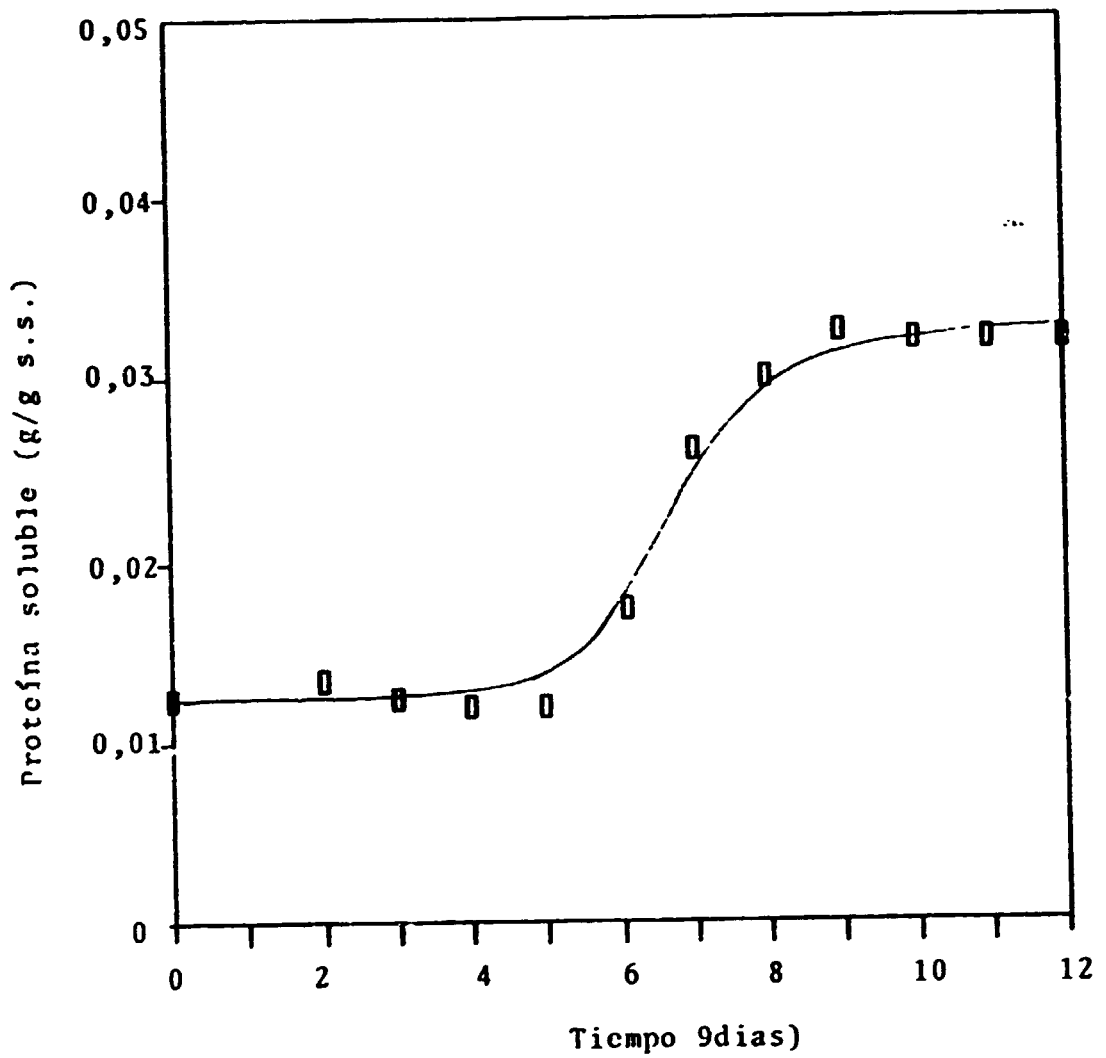


Fig. 16 : Fermentación con T.reesei QM-9414 a 30 °C  
Proteína excretada.



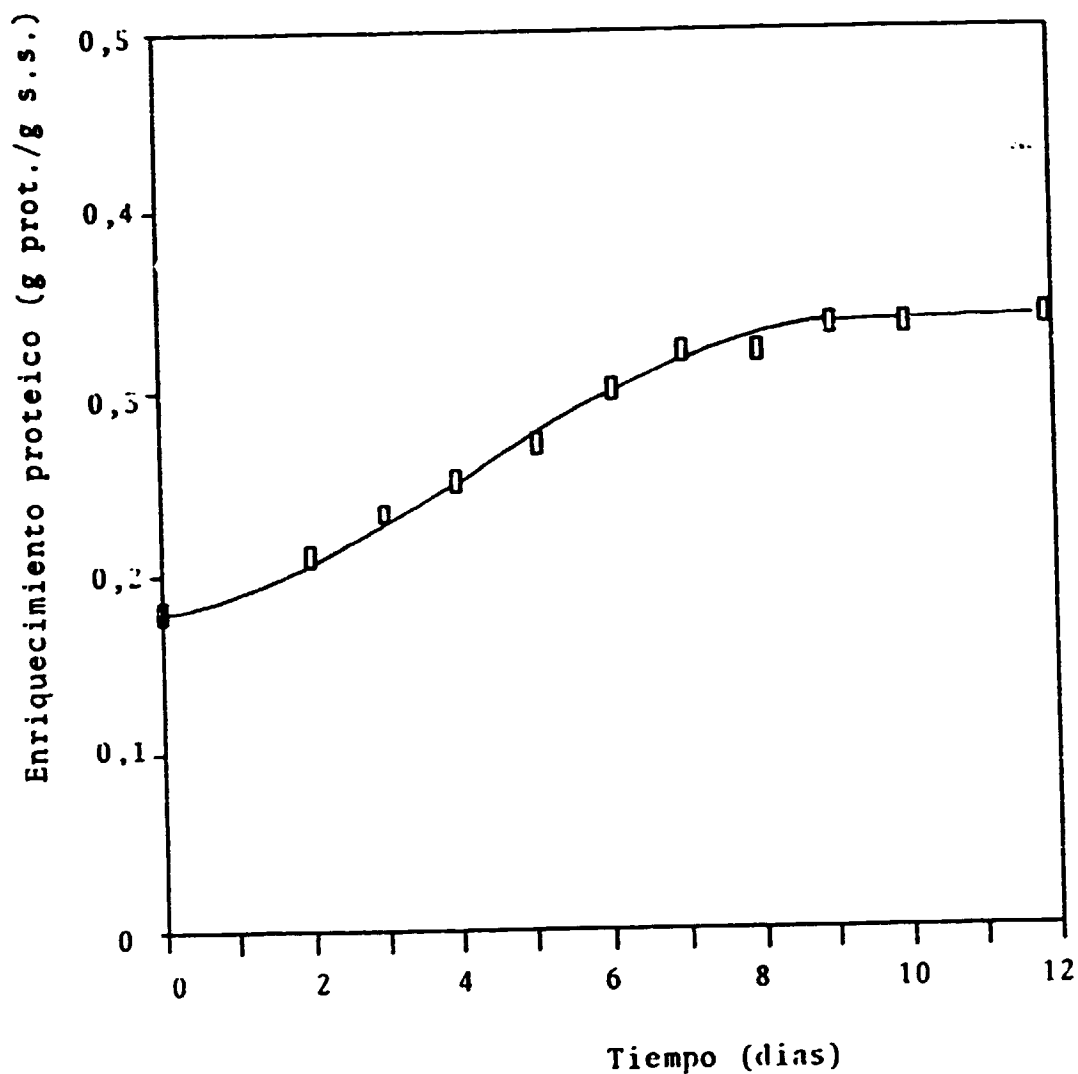


Fig. 17. Fermentación con *T. reesei* QM-9414 a 30 °C.  
Enriquecimiento proteico en sólido.

*T. reesei* QM-9414

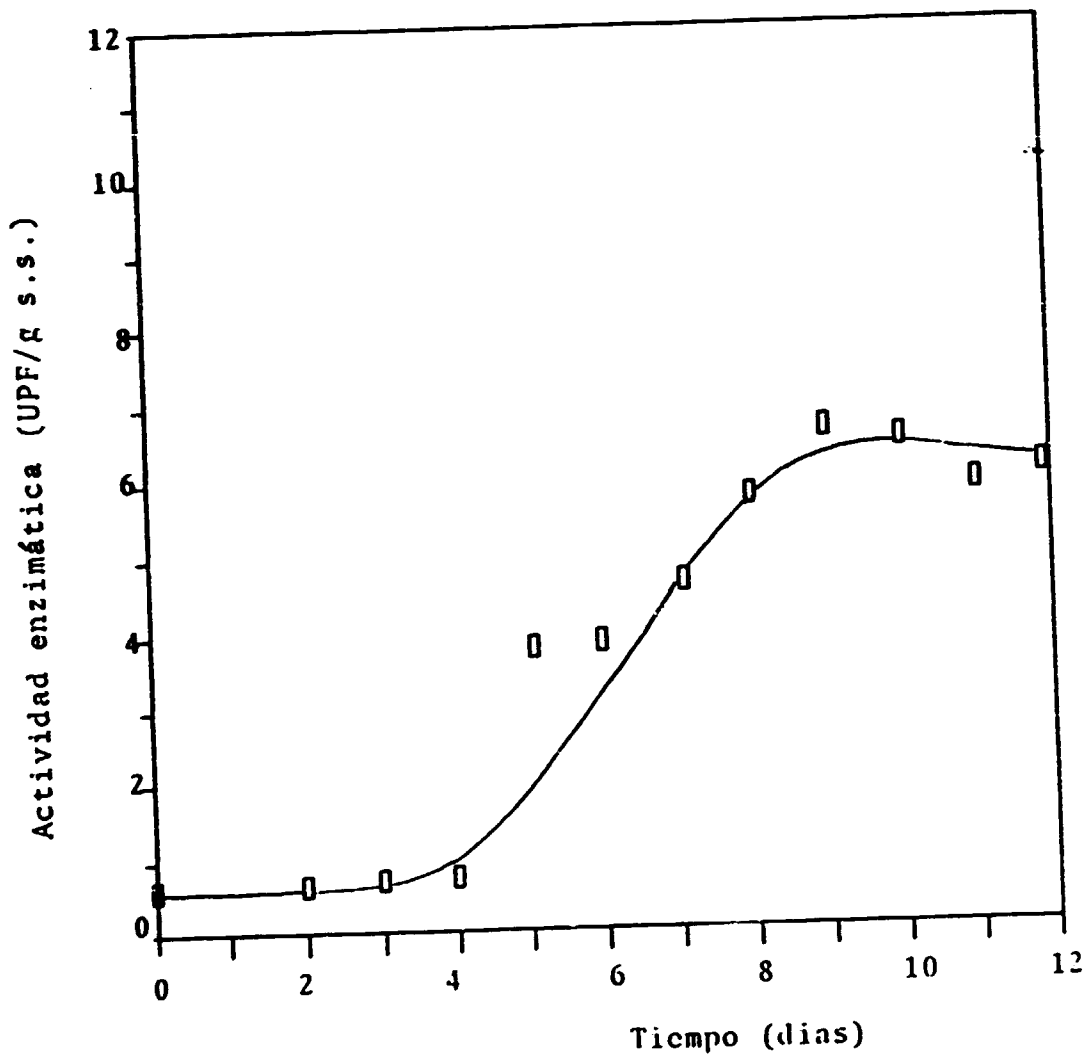


Fig. 18. Fermentación con *T. reesei* QM-9414 a 30 °C. Producción de celulasas.

*T. reesei* QM-9414

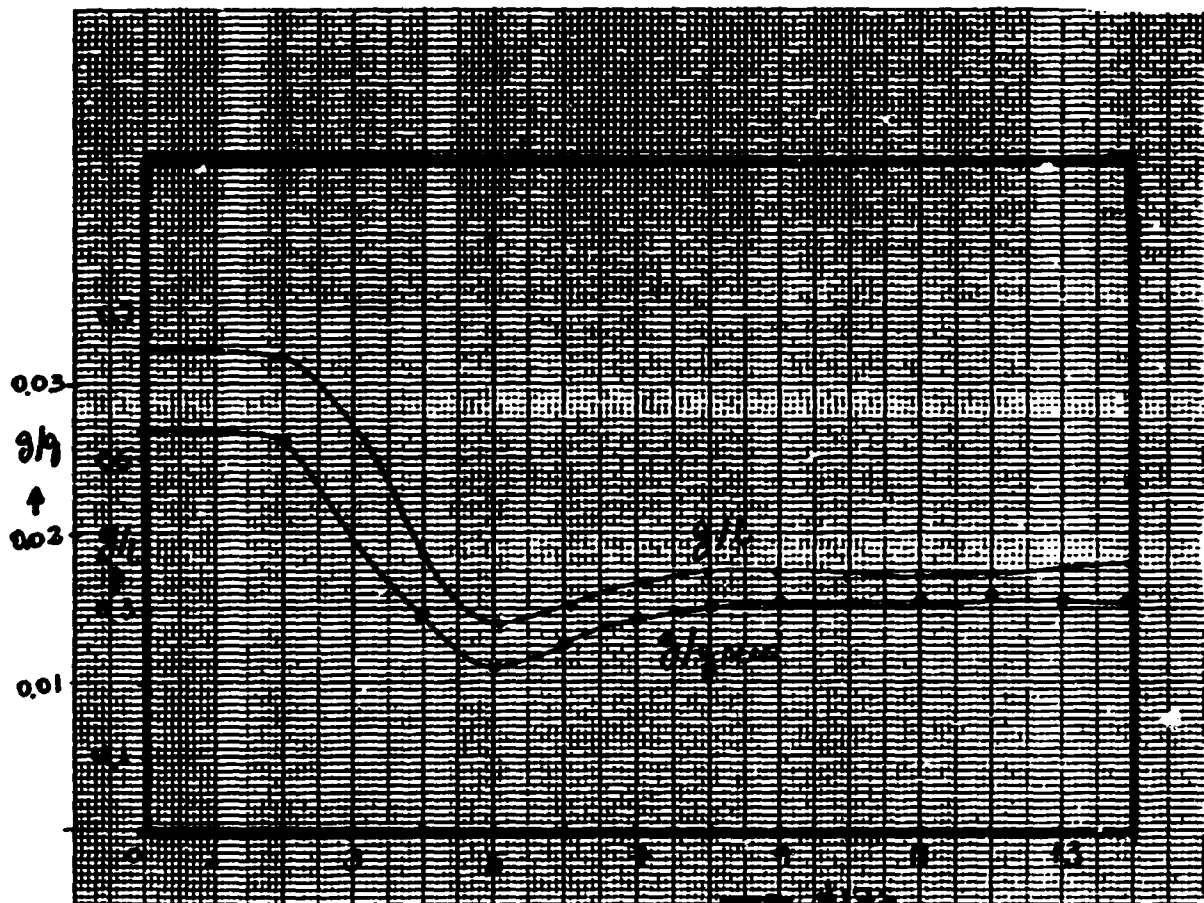


FIG # 19 :

Ferm. T. mesii QM-9434

30°C

Concentración azúcares reductores .-

## 2.6. Fermentación #6: (*I. aureoviride* 7-121)

Esta experiencia se desarrolló en idénticas condiciones a la Fermentación #2, difiriendo sólo en el tipo de sustrato utilizado. La coqueta agotada de remolacha fue hidrolizada mediante tratamiento ácido (0,1 g.ác. sulfúrico/g. CAR seca), bajo las siguientes condiciones:

Conc. Sustrato	: 75 (g/l)
Temperatura	: 80 °C
Tiempo	: 2 (h)
Agitación	: 250 rpm

El sustrato debidamente neutralizado, fue utilizado en la Fermentación #6, obteniéndose los siguientes resultados:

En Fig. #20, se observan los cambios de humedad y ph producidos durante la fermentación. a los 15 días de cultivo la humedad del sustrato alcanzó un 73%, en tanto que el nivel de ph más bajo alcanzado fue de aproximadamente 3,5 a los 6 días de fermentación, y un valor de 6,7 hacia el final de la experiencia.

La Fig.#21, muestra la concentración de proteína extracelular en el medio de cultivo alcanzando un nivel máximo de 0,11 g. proteína/g. CAR seca.

La Fig. #22 presenta la proteína en sólidos, la que alcanza un nivel de 0,42 g.prot./g. CAR seca., valor similar al obtenido en fermentación #2.

En Fig. #23, se muestra el nivel de actividad papel filtro, lográndose un nivel de 29,2 UPF/g. seco, a las 288 horas de cultivo. Se observa un periodo de latencia de 72 horas.

En Fig.#24, se observa el nivel de azúcares reductores que hacia el final de la fermentación llegó a un nivel de 0,008 g./g.seco.

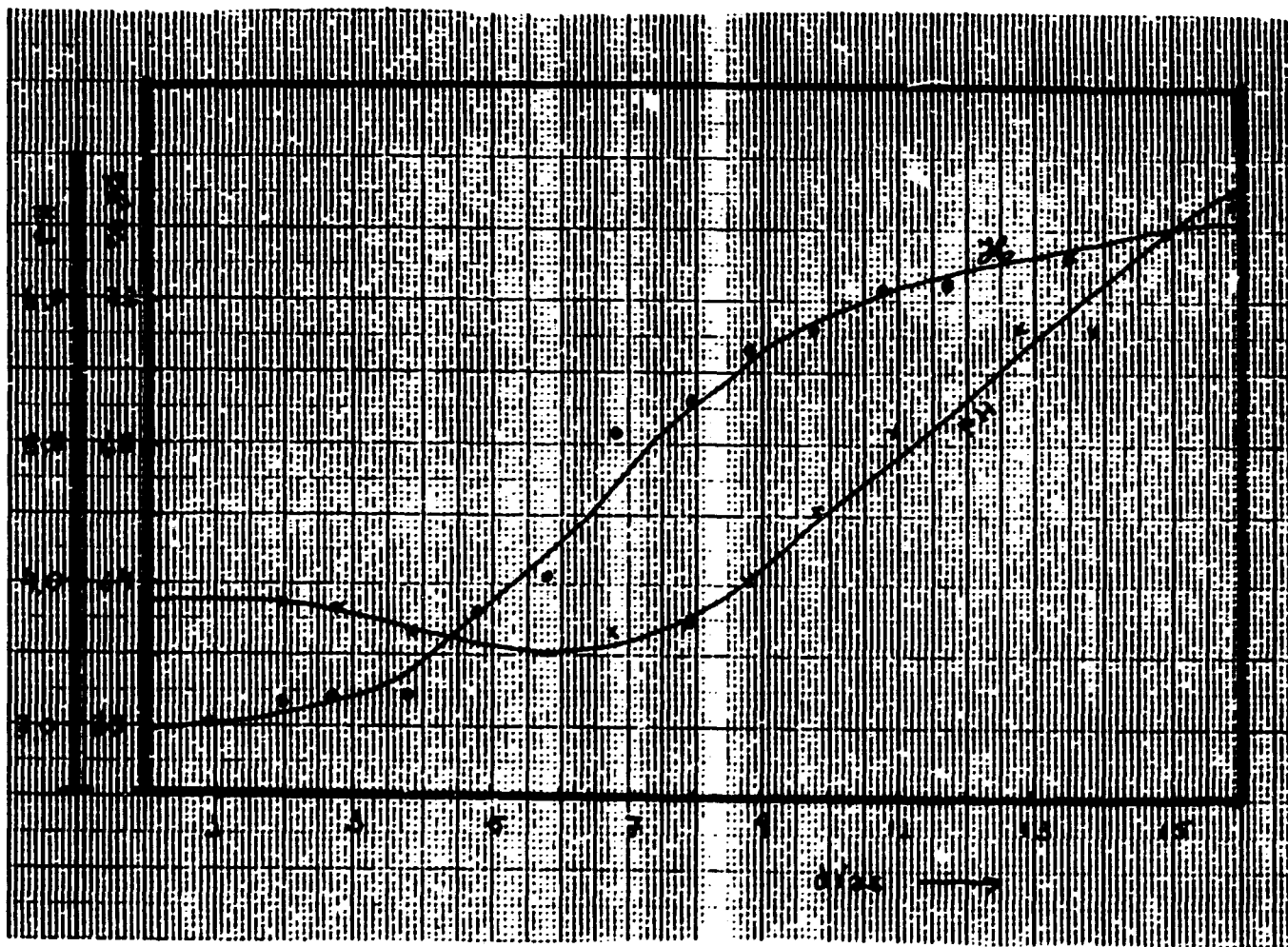


FIG. #20: Ferm. T. aureoviride 7-121  
 CMA pretratada, 25°C  
 Curvas humedad y PH.

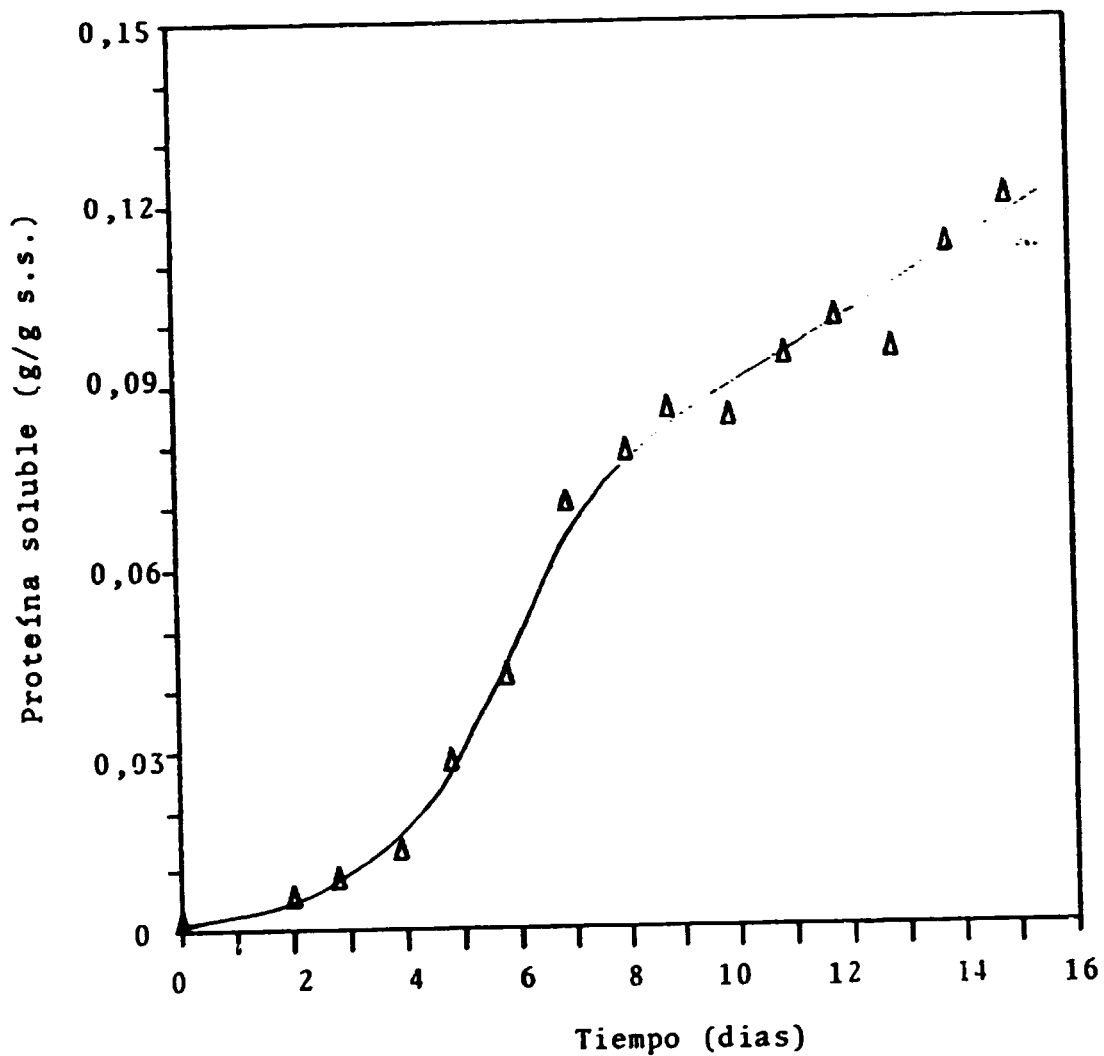


Fig. 21 : Fermentación con T. aureoviride 7-121 con CAR pretratada a 25 °C . Proteína excretada.

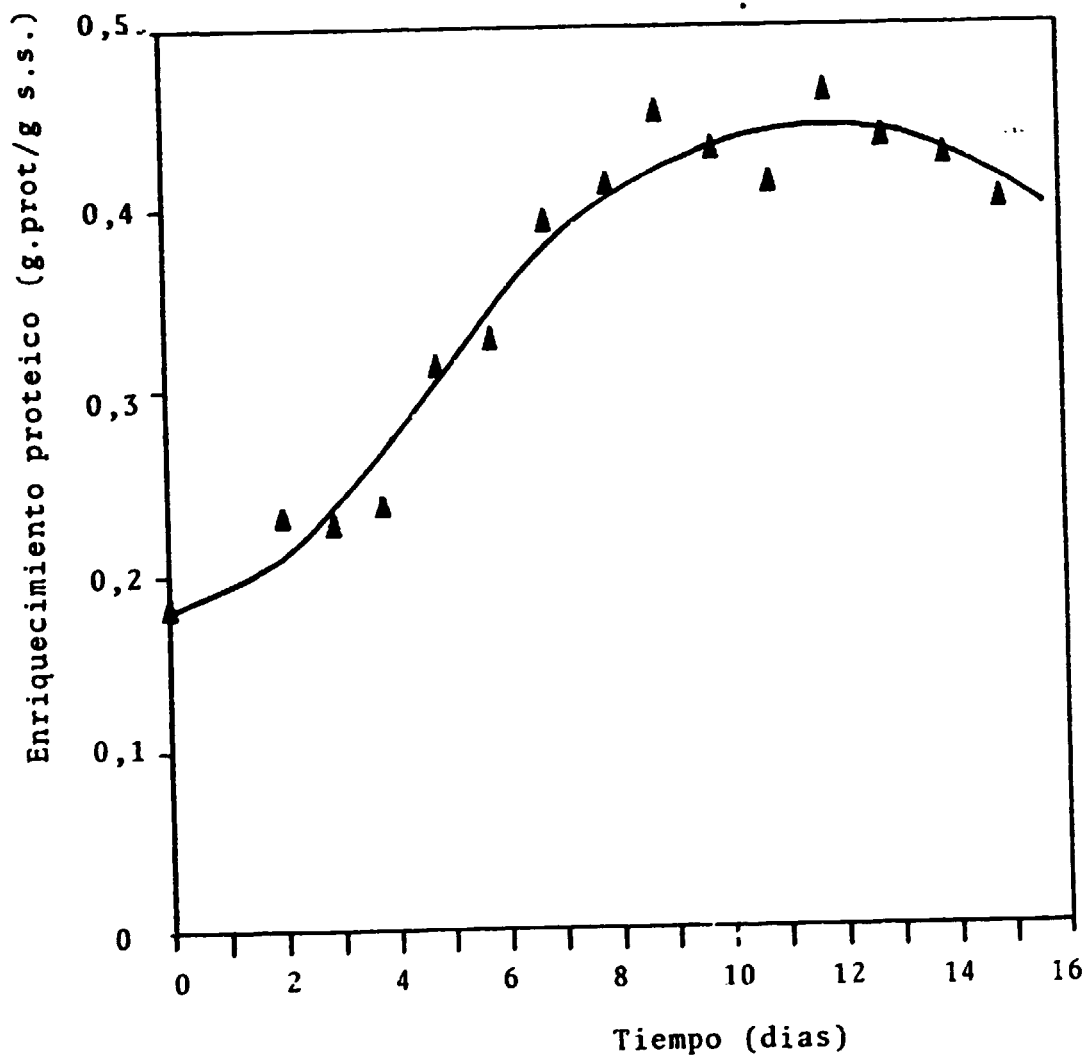


Fig. 22. Fermentación de CAR pretratada con T.aureoviride 7-121 a 25 °C.  
Enriquecimiento proteico en sólido.

T. aureoviride 7-121

C.A.R. pretratada

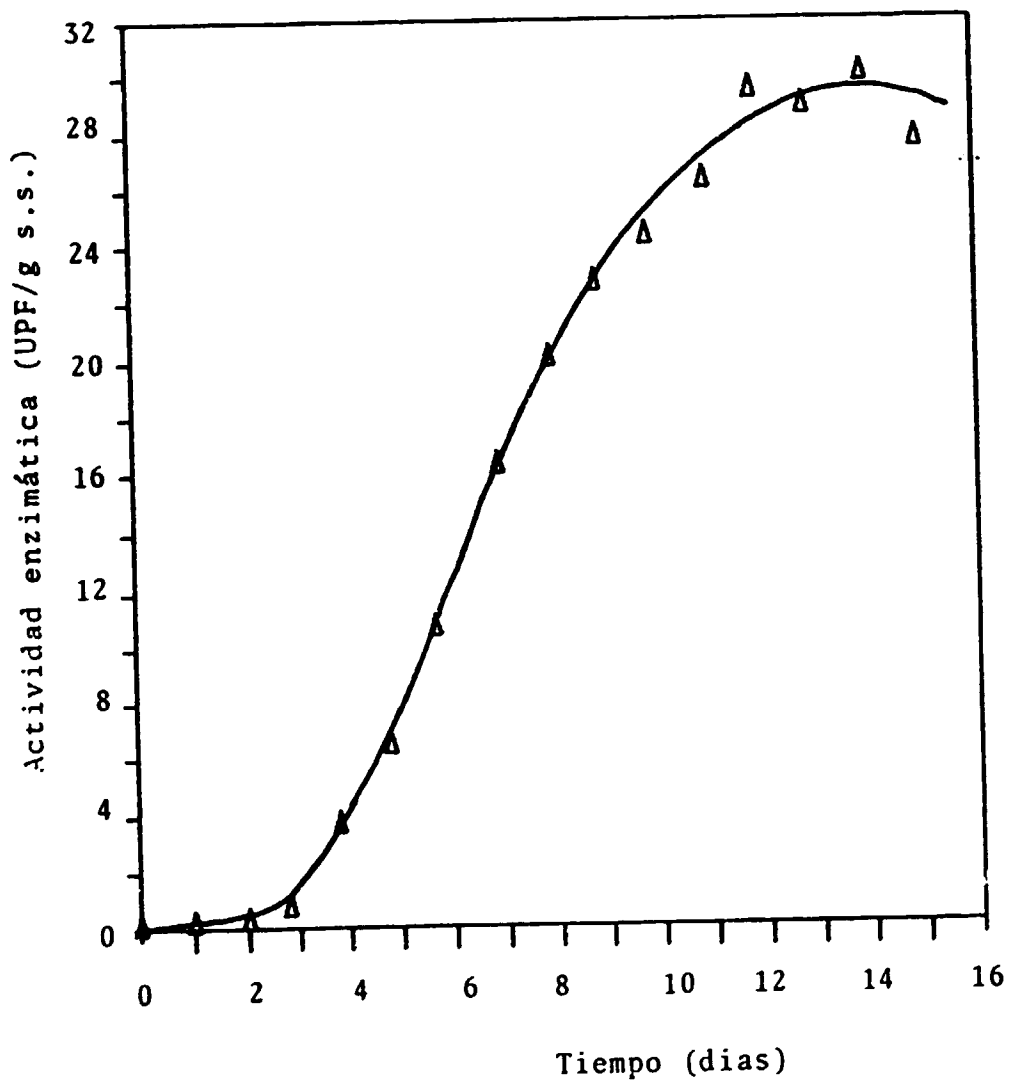


Fig. 23. Fermentación de CAR pretratada con *T. aureoviride* 7-121 a 25 °C. Producción de celulasas.

*T. aureoviride* 7-121

C.A.R. pretratada



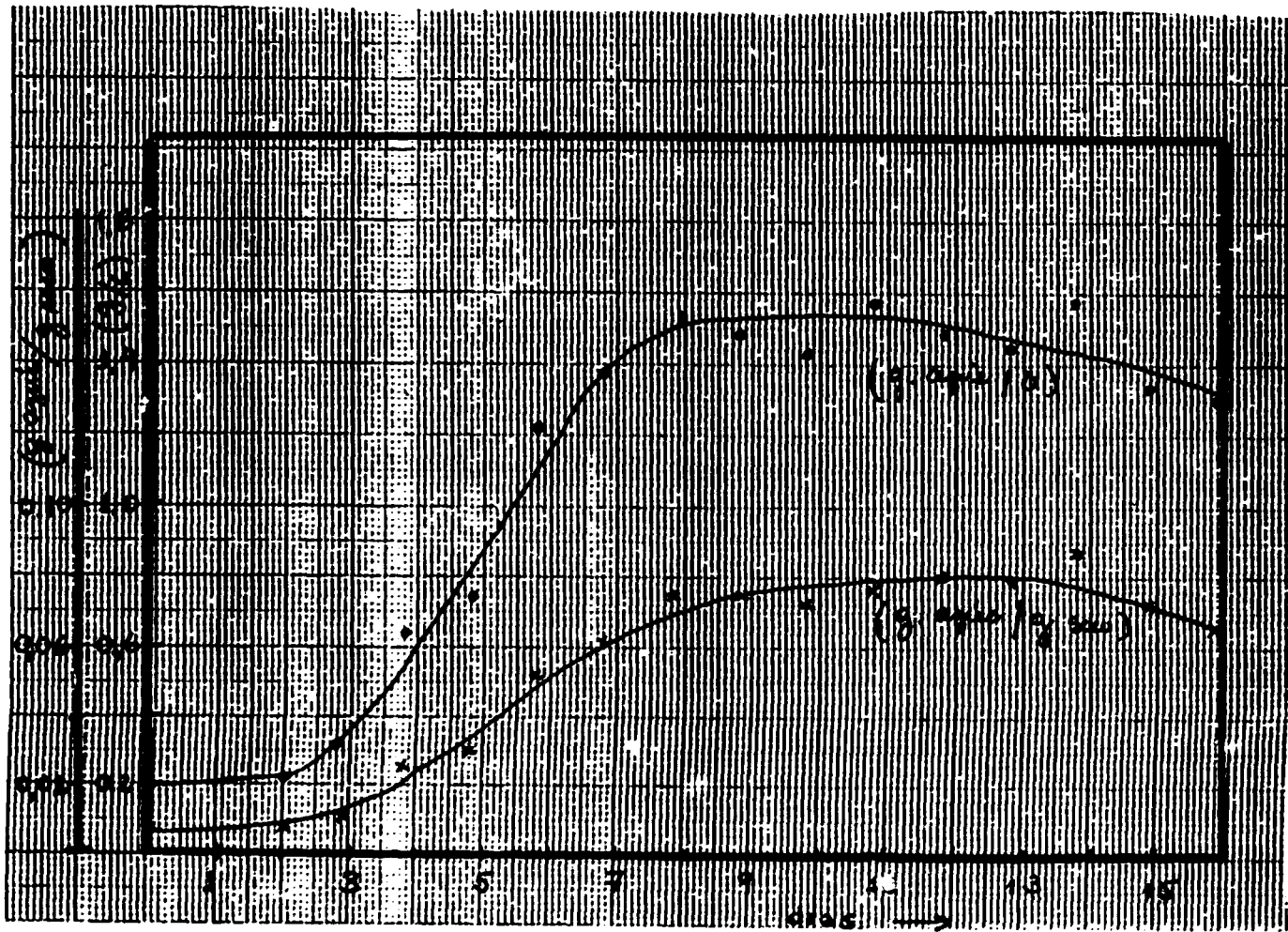


Fig #24:

Ferm. T. aureoviride 7-121

Con. pecheteada, 25°C

Concentração de açúcares reduçtoes.

### 3). COMENTARIOS.

#### a). Temperatura:

Se realizó experiencia de fermentación semi-sólida con I. reesei QM-9414 a 25°C, cuyos resultados no se presentan en este informe, con los mismos medios de propagación y de sólidos utilizados para la fermentación # 5, observándose que a esta temperatura se producía una fase de latencia de 7 días, durante el cual sólo se observó algunos focos de crecimiento. A 30°C se observó sin embargo un crecimiento homogéneo y sin esporulación.

En relación a la cepa I. aureoviride, se determinó en experiencias anteriores, una temperatura óptima de crecimiento y producción de enzimas de 25°C.

#### b). Medio de propagación:

Es sabido que el empleo de inóculo de micelio reduce en forma apreciable los tiempos de fermentación en comparación con experiencias que utilizan resuspensión de esporas como inóculo, eliminándose así los largos períodos de latencia.

De este modo, en experiencias con micelio como inóculo, se observó que I. reesei UC-4 creció muy débilmente en medio de propagación con glucosa como única fuente de carbono. En glucosa más extracto de levadura, lo hacía con crecimiento muy escaso y focalizado, desarrollándose microcolonias independientes que no se extendían por todo el sustrato.

Para I. reesei QM-9414, también existieron dificultades para el crecimiento en glucosa como fuente de carbono. Adicionándole extracto de levadura al medio de propagación anterior se obtuvo un crecimiento más visible de micelio y esporas.

En la presente investigación, para las cepas de I. reesei, como para las I. aureoviride, se utilizó propagación en lactosa y glucosa respectivamente (sin extracto de levadura), observándose que el microorganismo se desarrolló en forma uniforme y sin esporulación durante todo el tiempo de fermentación.

#### c). Humedad:

La humedad inicial (61 - 65%) se encuentra cercana al límite de la capacidad de absorción del sustrato, observándose sin embargo un aumento gradual de la capacidad de absorción de agua del sustrato fermentado, alcanzando alrededor de un 70% de humedad relativa para todas las experiencias realizadas.

d). pH:

Se utilizó el método de control autógeno de pH que consiste en utilizar dos fuentes de nitrógeno, sulfato de amonio y urea. Es esperable una disminución del pH en una primera etapa, producto del consumo del sulfato de amonio y luego un aumento gradual del mismo a medida que la urea es consumida.

Este método de control de pH fue efectivo para las cepas I. aureoviride, sin embargo para I. reesei QM-9414 se observó, en experiencia no reportada, que de un pH inicial de 4,2 comenzó inmediatamente a aumentar en forma gradual hasta 6,5 al 6° día de fermentación, lo cual indicaría que el microorganismo metabolizó en primer lugar la fuente de nitrógeno orgánica. En relación a la humedad de esta misma experiencia, el sistema coseta - hongo se mantuvo entre un 61 y 63% durante toda la fermentación. Actividad de papel filtro prácticamente no se observó (0,6 UPF/g).

Por los resultados arrojados de esta experiencia con I. reesei, es que se optó por el medio de cultivo con sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno (Tabla #3).

Los pH más bajos registrados en Ferm. # 4 y 5 son de 2,9 a 3,0, valores límites con los cuales se comienzan a producir efectos inhibitorios sobre la enzima.

e). Proteína extracelular:

Puede observarse en todas las fermentaciones una buena correlación con la actividad degradativa de papel filtro.

f). Proteína en sólidos:

La proteína ligada al sólido es un indicador del crecimiento micelial. El valor real de proteína existente se vería afectado durante la etapa de lavado del sólido, en donde algo de células sería desorbido, sin embargo, se observó un efecto de mayor trascendencia: el porcentaje de proteína inicial en sólidos se encuentra sobredimensionado. En experiencias realizadas en este trabajo, se observó que a pesar de que la coseta inicialmente humedecida con el medio de cultivo, aproximadamente 2,0 gramos, era lavada con 100 ml. de agua destilada, las sales de sulfato de amonio no son arrastradas durante el lavado, con lo cual interfieren en la determinación del porcentaje de nitrógeno en sólidos, presentándose los siguientes resultados:

Para CAR más sales se obtuvo un 18,6% de proteína.

Para CAR más sales e inóculo, un 18,8% de proteína.

Para CAR sola, un 9,0% de proteína.

Es esta la razón de los altos niveles de proteína inicial (0,17 - 0,20 g/g seco). Este efecto se vería disminuido a medida que avanza la fermentación debido al consumo de la fuente de nitrógeno.

Posteriormente, se realizaron experiencias en el transcurso de la Fermentación #6, de contenido protéico en muestras con previa extracción en condiciones de agitación de 200 rpm. durante 15 min., en donde sobrenadante y sólidos le fue determinado el contenido de proteína. Se observó 0,13 g.prot.en sólidos/g. seco para el punto inicial de fermentación, en relación a 0,20 g/g obtenidos en muestra lavada con agua destilada. La diferencia del contenido protéico se encontró en el análisis del sobrenadante.

A medida que la fermentación transcurrió, se corroboró que el contenido preotéico en cada una de las muestras sólidas, ya sea tratada mediante una fuerte extracción o un simple lavado, fue cada vez más similar a medida que la fermentación avanzó, llegándose a valores prácticamente iguales hacia el final del cultivo.

El contenido protéico para I. reesei fue de 34% y para I. aureoviride de aproximadamente de un 43%, hacia el final de la fermentación, permaneciendo inalterado este último valor al utilizar coseta agotada tratada químicamente.

La velocidad específica de crecimiento evaluada a través de la velocidad específica de incremento de proteína en sólidos, es sensiblemente superior en cepas I. aureoviride que en I. reesei.

g). Actividad enzimática:

La actividad enzimática evaluada mediante la capacidad degradativa sobre papel filtro, indica valores para I. aureoviride 7-121 de 11 UPF/g. seco, y un valor de 8 UPF/g para I. a. salvaje, en relación a 6,5 UPF/g de la cepa de referencia. Resultados muy inferiores fueron los obtenidos para I. reesei UC-4 (4.6 UPF/g.). Resultados óptimos (29,2 UPF/g. ) con I. aureoviride 7-121 fueron obtenidos en fermentación con CAR tratada químicamente, resultado esperado debido a que el sustrato así tratado resulta ser más fácilmente metabolizable para el microorganismo.

Cabe hacer notar que se hicieron estudios preliminares de procedimientos de extracción de la enzima, obteniéndose un aumento de alrededor de un 10% en la actividad de papel filtro si la enzima era extraída con agua destilada a que si lo fuese con tampón, tal procedimiento fue tomado como norma de extracción.

h). Azúcares Reductores:

Es esperable que el nivel de azúcares reductores disminuya en una primera etapa debido al crecimiento inicial del hongo, atribuible al consumo de azúcares de rápido metabolismo. Este resultado es observado en las experiencias con I. reesei. Con I. aureoviride se presentó tendencia a un aumento de tales azúcares, resultado poco esperado, puesto que una mayor actividad celular requeriría de un mayor consumo de azúcares como se presentaría en una fermentación del tipo sumergida. Este resultado pareciera indicar que la síntesis de celulasas en estas cepas no sería demasiado sensible a la represión por azúcares rápidamente metabolizables.

En experiencias de fermentaciones del tipo sumergida se ha observado que I. aureoviride nativa, consume hemicelulosa que contiene la CAR, con lo cual se estarían acumulando azúcares reductores no metabolizables por el microorganismo en el medio de cultivo.

## CONCLUSIONES

Una síntesis de los resultados obtenidos en la FSS de CAR cruda con distintas cepas celulolíticas, se encuentra en la Tabla y Figuras de Resumen anexas.

Se concluye que las cepas de T.aureoviride presentaron mejores condiciones que las de T.reesei para su cultivo por FSS. Tanto el nivel de enriquecimiento proteico como el de producción de celulasas es significativamente superior en esas cepas.

La correlación obtenida entre enriquecimiento proteico en sólidos, que es una medida de crecimiento celular, y producción de enzimas celulolíticas es razonable por cuanto el medio de cultivo considera limitación por carbono y dispone de celulosa como principal fuente de ese elemento.

Existe una buena correlación entre el nivel de actividad celulolítica y de proteína soluble en el caldo fermentado. Ello permite sostener que una parte significativa de la proteína excretada por estos microorganismos corresponde justamente a enzimas celulolíticas.

Las cepas fueron cultivadas a sus respectivas temperaturas óptimas por lo que no puede atribuirse a ello las diferencias observadas.

La cepa de T.reesei UC-4 observó un comportamiento similar a la cepa de referencia en relación al enriquecimiento proteico en sólido. Su actividad celulolítica fue, no obstante, incluso menor a la de T.reesei QM-9414. Esta cepa ha sido descartada para estudios posteriores y reemplazada por un mutante del mismo linaje, supuestamente mejorado (T.reesei LM-1).

Las cepas de T.aureoviride fueron significativamente superiores a la cepa de referencia, tanto en términos de enriquecimiento proteico como de producción de celulasas. En relación a este último aspecto las diferencias fueron más considerables.

Lo anterior, unido a la simplicidad de la preparación de inóculos, su relativa insensibilidad a represión catabólica y su interesante perfil de actividades celulolíticas, justifica la elección de estas cepas para estudios posteriores. Adicionalmente se trata de cepas nativas y mutantes derivados, lo que le otorga un mérito adicional.

La cepa mutante 7-121 es superior a la cepa nativa, tanto desde la perspectiva de enriquecimiento proteico como de producción de celulasas. En el primer aspecto las diferencias no son demasiado marcadas, pero la capacidad de producción de celulasas es del orden de un 40 % superior en la cepa mutante, lo que puede considerarse significativo. Si a eso se une la alta estabilidad genética del mutante, que no ha observado pérdida de marcas en más de un año, se concluye la conveniencia de escoger la cepa

I.aureoviride 7-121 para los estudios subsiguientes.

Una vez concluido el trabajo con CAR cruda, se realizaron experiencias con CAR pretratada con ácido sulfúrico diluido. Los resultados obtenidos con I.aureoviride 7-121 son ampliamente satisfactorios. Respecto de la misma cepa en CAR cruda, se obtuvo un 165 % de incremento en la producción de celulasas, con un nivel de enriquecimiento proteico similar. El valor de 29.2 UPF/g sólido seco es bueno si se le compara con resultados publicados en la literatura. El sustrato, depurado en el pretratamiento de parte importante de su contenido de hemicelulosa, resulta un superior inductor de la actividad celulolítica. No obstante, debe considerarse que en el caso de CAR pretratada existe una pérdida de sólidos por solubilización del orden del 42 al 45 % durante el pretratamiento. Esta pérdida de material sólido debe ser considerada en un análisis comparativo entre FSS de CAR cruda y CAR pretratada. Resulta, sin embargo, interesante considerar el uso del material hidrolizado, rico en azúcares especialmente pentosas. Este hidrolizado presenta múltiples usos potenciales que, aunque no contemplados de estudiar en el marco del proyecto, podrían resultar en una interesante línea de proyección. Resultados preliminares obtenidos fuera del marco del proyecto, indican que más del 50 % del contenido de azúcares reductores del hidrolizado son fermentables por cepas de la especie Candida.

Un análisis posterior de costos y viabilidad operacional determinará qué tipo de sustrato se empleará en la prueba a realizar en el fermentador prototipo.

Resultados en procesamiento, obtenidos con CAR pretratada y la cepa I.reesei LM-1, no son significativamente diferentes a los obtenidos con la cepa UC-4 en CAR cruda.

TABLA RESUMEN

FERMENTACION EN SUSTRATO SOLIDO

	CAR SIN PRETRATAMIENTO				CAR CON PRETR.
	<u>T.a. nativa</u>	<u>T.a. 7-121</u>	<u>T.reesei</u> QM 9414	<u>T.reesei</u> UC-4	<u>T.a. 7-121</u>
(UPF /g. seco)	8.0	11.0	6.5	4.6	29.2
(g. prot. sólida/g. seco)	0.41	0.43	0.34	0.35	0.42
(g. prot. soluble/g. seco)	0.027	0.050	0.032	0.017	0.11
(g. az. reduct./g. seco)	0.040	0.048	0.015	0.012	0.08
Tiempo máximo producción (días)	9	9	10	10	12



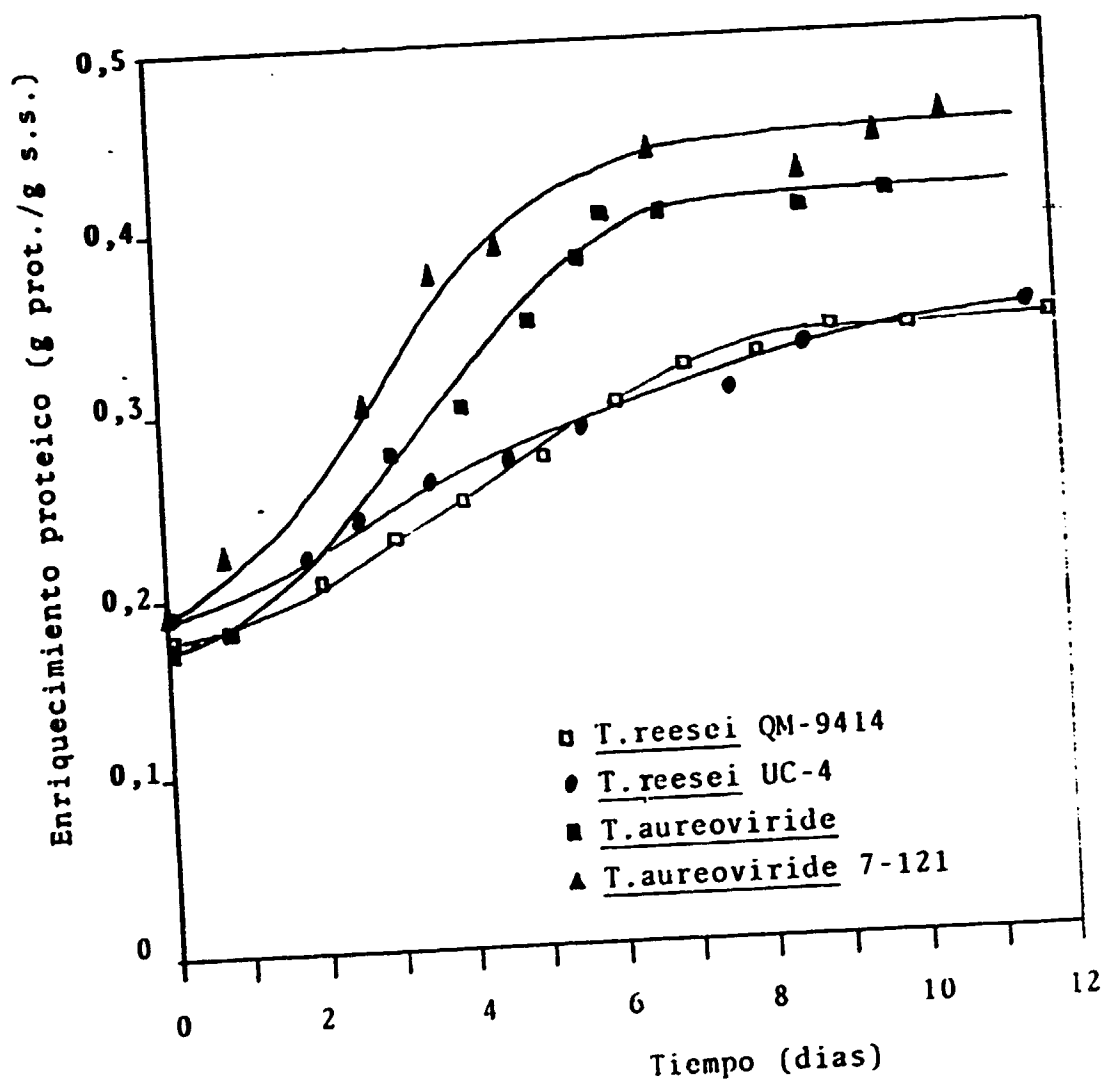


Fig. Resumen : Resultados con CAR cruda.  
Enriquecimiento proteico en sólido.

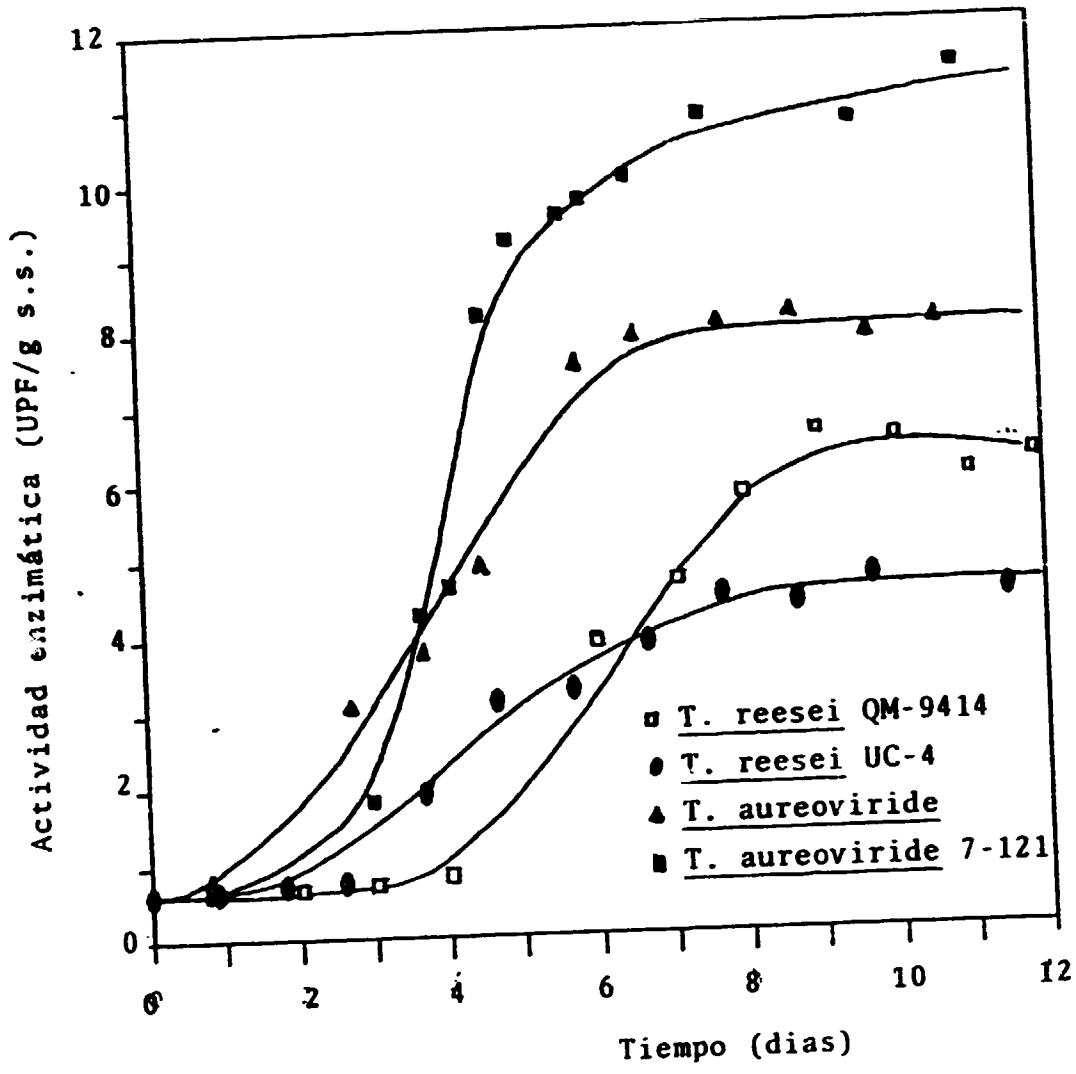


Fig. Resumen: Resultados con CAR cruda. Producción de celulasas.

ACTIVIDAD C. DETERMINACION DE ISOTERMAS DE SORCION  
DE COSETA AGOTADA DE REMOLACHA

1. OBJETIVOS

- Determinación de las curvas de sorción de agua de la coqueta agotada de remolacha pura.
- Determinación de las curvas de sorción de agua de la coqueta agotada de remolacha como sustrato ( suplementada en distintos estados de degradación ).
- Verificación de crecimiento microbiano a las distintas humedades relativas consideradas en la determinación de las curvas de sorción.
- Correlacionar las curvas de sorción obtenidas con modelos matemáticos existentes.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Determinación de curvas de sorción

La determinación de las curvas de sorción se realizó incubando muestras de coseta a una temperatura de 28°C, en un sistema estático en que la humedad relativa del aire puede ser regulada con soluciones saturadas de sales.

En la tabla 1. se indican las soluciones de sales y las humedades relativas correspondientes usadas en la determinación de las isotermas(1,2,3).

Las condiciones de la experiencia fueron las siguientes:

Tiempo de incubación : 9 días  
temperatura de incubación : 28°C

#### 2.1.1 Curvas de sorción coseta pura

Las curvas de sorción de la coseta pura se obtuvieron con el siguiente procedimiento :

Durante 24 horas, se mantuvo 20 g. de coseta en 100 ml. de una solución de metabisulfito de sodio al 1%, con el fin de evitar crecimiento microbiano en la etapa de incubación.

Al cabo de ese tiempo la muestra se filtró para retirar el líquido remanente destinándose parte de la muestra húmeda para la obtención de la curva de desorción según punto 2.4.2, y el resto en la determinación de la curva de adsorción según punto 2.4.1.

#### 2.1.2 Curvas de sorción coseta fermentada

Con respecto a las curvas de sorción de la coseta en distintos estados degradativos se procedió como sigue :

Se tomó una muestra de coseta fermentada ( 11 g. aprox.), y se inactivó el crecimiento microbiano agregando 0.1 g. de metabisulfito de sodio en forma sólida para provocar los mínimos cambios posibles en la humedad inicial de la muestra.

Parte de la muestra húmeda se utilizó en la determinación de la curva de desorción y el resto para obtener la curva de adsorción según puntos 2.4.2 y 2.4.1 respectivamente.

Se obtuvieron las isotermas de sorción en tres estados de fermentación para los siguientes microorganismos :

- Tricoderma aureoviride 7-121

- Tricoderma reesei UC-1

## 2.2 Verificación de crecimiento microbiano

Se realizó una experiencia para verificar a partir de que actividad de agua se produce crecimiento microbiano, para ello se inoculó coseta con la cepa T. reesei QM - 9114 y se incubaron muestra en estufa de cultivo a las distintas humedades relativas consideradas, según las siguientes condiciones :

Tiempo de incubación : 9 días  
Temperatura de incubación : 20°C

Luego de cumplido el tiempo de incubación, se comprobó crecimiento microbiano mediante determinación de proteína según punto 2.4.3.

### 2.3 Modelación matemática de curvas de sorción

Las curvas de sorción obtenidas se modelaron matemáticamente probando cuatro ecuaciones informadas en literatura (4), estas fueron las siguientes :

- Ecuación de Henderson ( 1952 ):

$$1 - a_w = \exp [ -(\alpha X^\beta) ]$$

- Ecuación de Kuhn ( 1972 ):

$$X = \frac{\beta}{\ln a_w} + \alpha$$

- Ecuación de Iglesias y Chirife ( 1978 ):

$$\ln [ X + ( X^2 + X_{0.5} )^{2-\beta} ] = \beta a_w + \alpha$$

- Ecuación de Iglesias y Chirife ( 1981 ):

$$X = \beta \left[ \frac{a_w}{1 - a_w} \right] + \alpha$$

donde

$a_w$  : expresa la actividad de agua :  $a_w = H.R / 100$

H.R : % de humedad relativa

X : contenido de humedad expresado como % en base seca

$X_{0.5}$  : contenido de humedad en base seca para una actividad de agua  $a_w = 0.5$

$\alpha$  ,  $\beta$  : parámetros que describen las isotermas

Para determinar los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  se procedió a linealizar las ecuaciones anteriores.

## 2.4 Métodos

### 2.4.1. Determinación de las curvas de adsorción (5,6)

- Colocar las muestras de coseta de aproximadamente 1 g. en capachos de aluminio previamente secados.
- Secar las muestras hasta obtener peso constante en estufa a aproximadamente 50°C.
- Colocar las muestras dentro de desecadoras, que contienen las soluciones sobresaturadas de sales y cerrarlas herméticamente con vaselina
- Poner las desecadoras en ambiente constante de 28°C ( estufa de cultivo ).
- Pesar las muestras después de 9 días de incubación.
- Se determina el % de humedad de la siguiente manera:

$$\% \text{Humedad} = \frac{(m_r - m_s)}{m_r} * 100$$

donde

$m_r$  : peso de la muestra después de alcanzado el equilibrio con la sal

$m_s$  : peso de la muestra secada en la estufa.

#### 2.4.2 Determinación de las curvas de desorción(5,6)

- Colocar las muestras húmedas de aproximadamente 1 g. en capachos de aluminio previamente secados.
- Colocar las muestras dentro de las desecadoras que contienen las soluciones sobresaturadas de las sales, y cerrarlas herméticamente con vaselina.
- Poner las desecadoras en ambiente constante de 20°C ( estufa de cultivo ).
- Pesar las muestras después de 9 días de incubación.
- Determinar el % de humedad de las muestras en equilibrio con la solución salina como se indica a continuación :

$$\% \text{humedad} = \frac{m_f - m_i (1 - H)}{m_i (1 - H)} * 100$$

donde

$m_f$  : peso de la muestra final ( después del periodo de incubación ).

$m_i$  : peso de la muestra inicial ( húmeda )

H : fracción de humedad de la muestra inicial.

$m_i (1 - H)$  : peso de la muestra inicial ( seca ).



### 2.4.3 Preparación de las soluciones salinas

Disolver en agua destilada una cantidad adecuada de sal hasta sobresaturación a una temperatura mayor a la utilizada en la incubación de las muestras para determinar curvas de sorción, según su solubilidad y revolviendo constantemente.

Tabla 1. Humedad relativa de soluciones de sales saturadas

SALES	% HUMEDAD RELATIVA (28 °C)
LiCl	11.20
KC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	22.30
MgCl <sub>2</sub>	32.56
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	43.70
NaBr	56.80
CoCl <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O	63.04
NaNO <sub>3</sub>	73.58
KCl	83.88
BaCl <sub>2</sub>	89.48
KNO <sub>3</sub>	92.82
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	97.12

### 2.4.3 Determinación de proteína(7)

Se utilizó el método de Microkjeldahl para material biológico.

#### Reactivos:

- Solución de ac. sulfúrico: 250 ml. de ácido sulfúrico concentrado ( 98% ) más 0 ml. de solución saturada de sulfato de cobre.
- Indicador A : Solución azul de metileno al 1%
- Indicador B : Solución saturada de rojo de metileno en alcohol etílico al 95%.

- Indicador C : 1,5 ml. de indicador A y 12,5 ml. de indicador B.
- Solución D : 25 ml. de solución saturada de ácido bórico 7,5% (p/v) y 0,1 ml. de indicador C.

La solución D es inestable, luego se prepara la necesaria para cada análisis.

Procedimiento :

-Digestión: Se pesa 0,1 g. de muestra seca y se pone en un recipiente de microkjeldahl de 100 ml. de capacidad. Luego se adicionan 2 ml. de solución de ácido sulfúrico, 1 g. de sulfato de potasio y se pone durante 4 horas a fuego lento. La solución queda verde cristalino.

-Destilación: Se efectúa en el aparato microkjeldahl. La solución recibidora contenida en un matraz erlenmeyer de 50 ml. de capacidad se ubica bajo el serpentín refrigerante, de modo que la punta final del tubo refrigerante quede suergida en la solución.

A la muestra digerida se adicionan 10 ml. de agua destilada, se agita la mezcla y se vierte en el aparato de destilación. Luego se adicionan 15 a 20 ml. de hidróxido de sodio al 40% (p/v) y se comienza la destilación hasta que el volumen de solución recibidora sea de 50 ml.

-Titulación: La solución recibidora se titula con ácido clorhídrico cuya normalidad debe estar en el rango 0,01 -0,03N.

-Blanco: Para un set de análisis, en los que se usan las mismas soluciones indicadoras, se hace un blanco donde se sigue el mismo procedimiento, pero sin la muestra.

-Porcentaje de nitrógeno en sólidos: El cálculo del % de nitrógeno en sólidos se hace en base a la siguiente ecuación :

$$\% N = \frac{14,008 (V-Vb) * N * 100}{\text{mg. de muestra}}$$

donde

- N : normalidad del ácido, moles/l
- V : volumen de ácido gastado durante la titulación, ml.
- Vb : volumen de ácido usado durante la titulación del blanco, ml

### 3. Resultados

La figura 1 muestra la isoterma de sorción de agua obtenida para la coseta cruda, y de las figuras 2 a la 8 se presentan las curvas de sorción de agua de la coseta en distintos estados de degradación para las cepas T.aureoviride 7-121 y T.reesei UC-4.

En la figura 8 se presenta la verificación del crecimiento microbiano a las distintas humedades relativas consideradas, para la coseta inoculada con la cepa T.reesei QM-9114.

Y de las tablas 2 a la 8 se indican los resultados obtenidos respecto de las modelaciones matemáticas efectuadas.

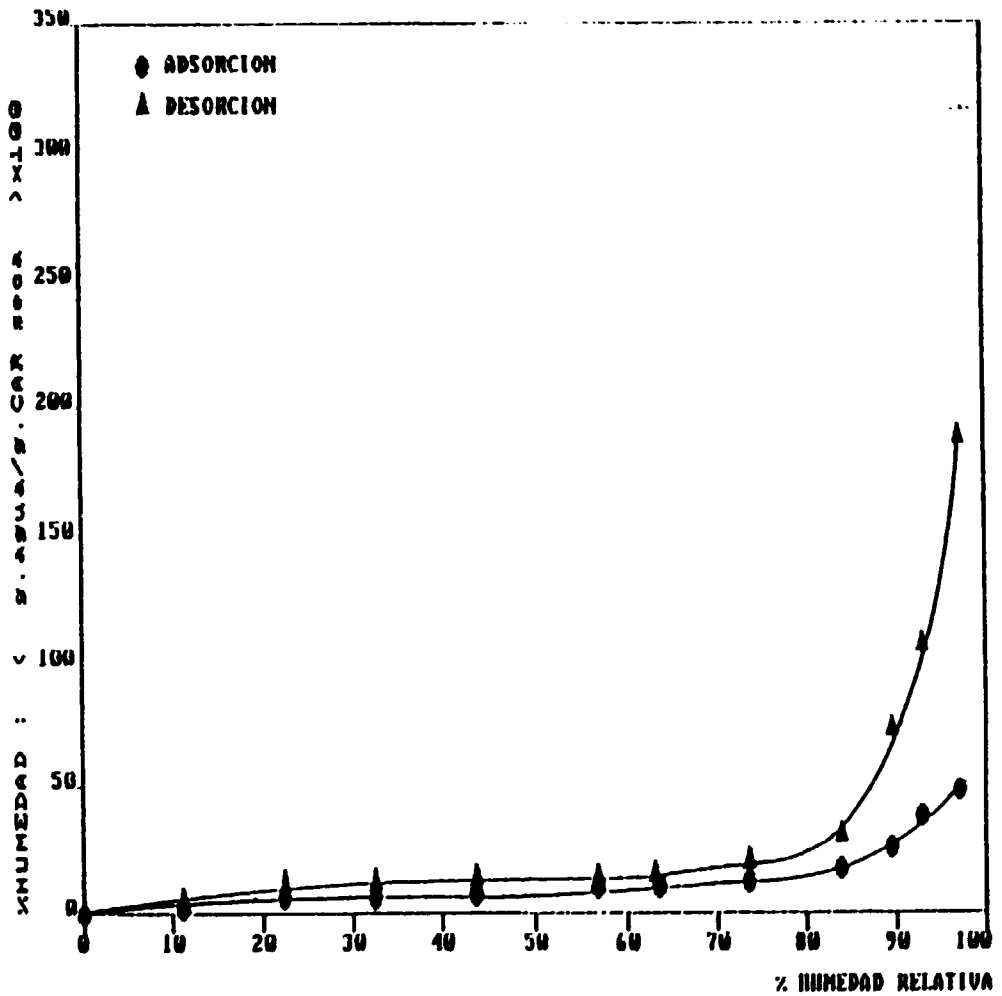


Figura 1. Isotherma de sorción de cosota cruda.  
 Temperatura: 28°C  
 Tiempo de incubación : 9 días  
 Humedad inicial muestra : 77%

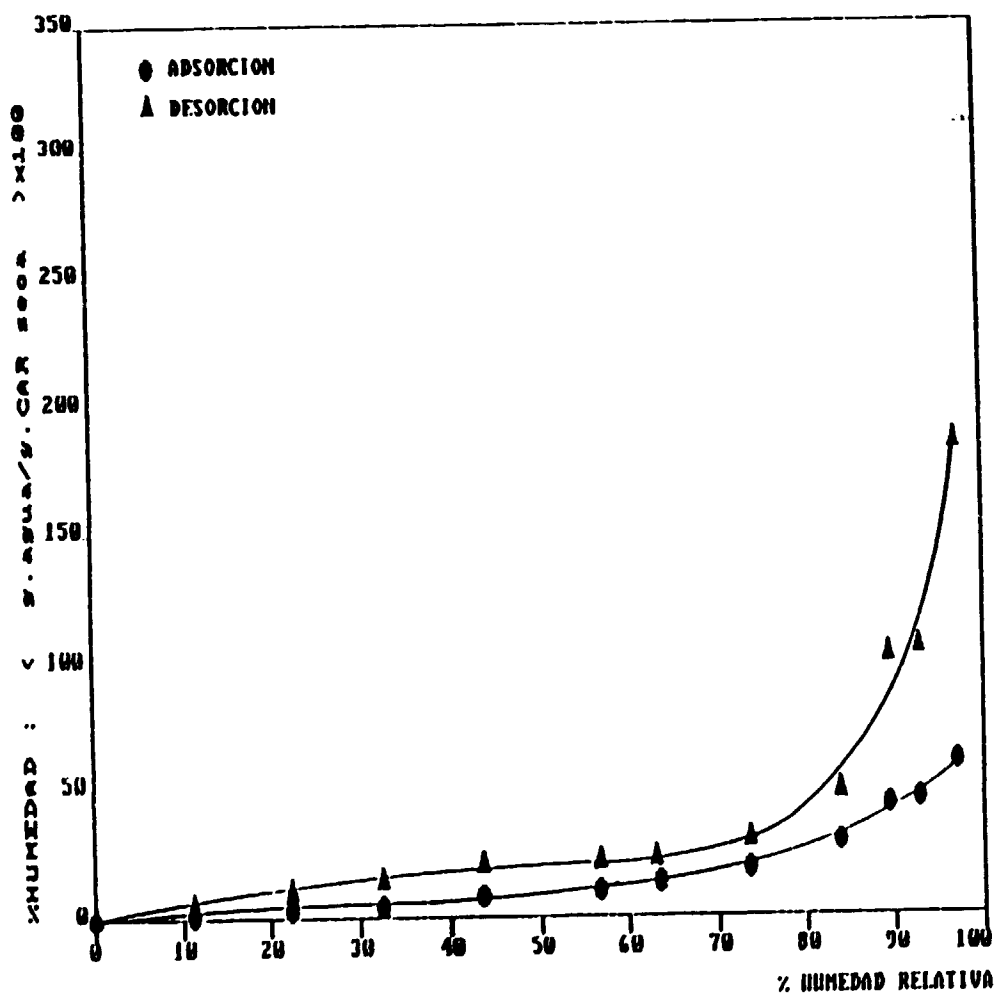


Figura 2. Isotherma sorción coqueta fermentada  
 Cepa: L. guineoytride 7-121.  
 Tiempo fermentación: 0  
 Temperatura: 20°C  
 Tiempo de incubación : 9 días  
 Humedad inicial muestra : 62%

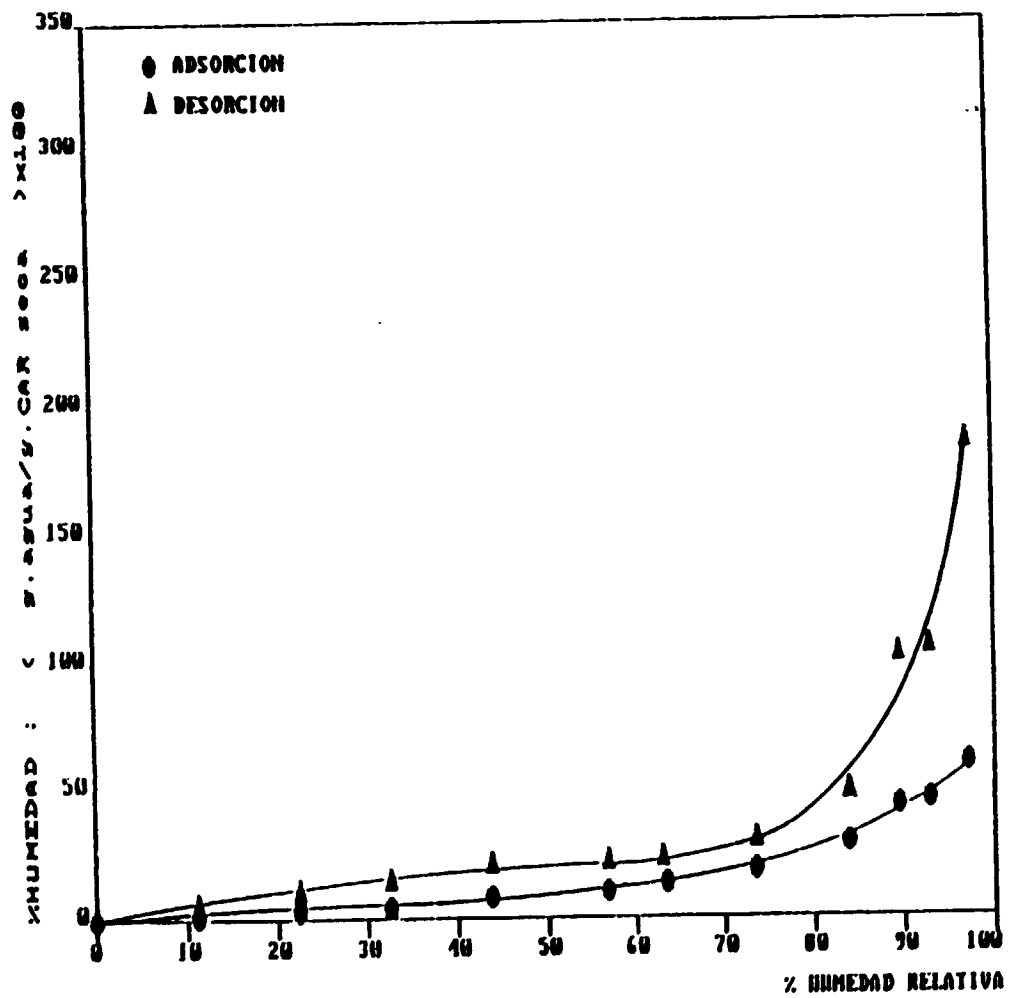


Figura 2. Isoterma sorción coeseta fermentada  
 Cepa: Laurocytride 7-121  
 Tiempo fermentación: 0  
 Temperatura: 28°C  
 Tiempo de incubación : 9 días  
 Humedad inicial muestra : 62%

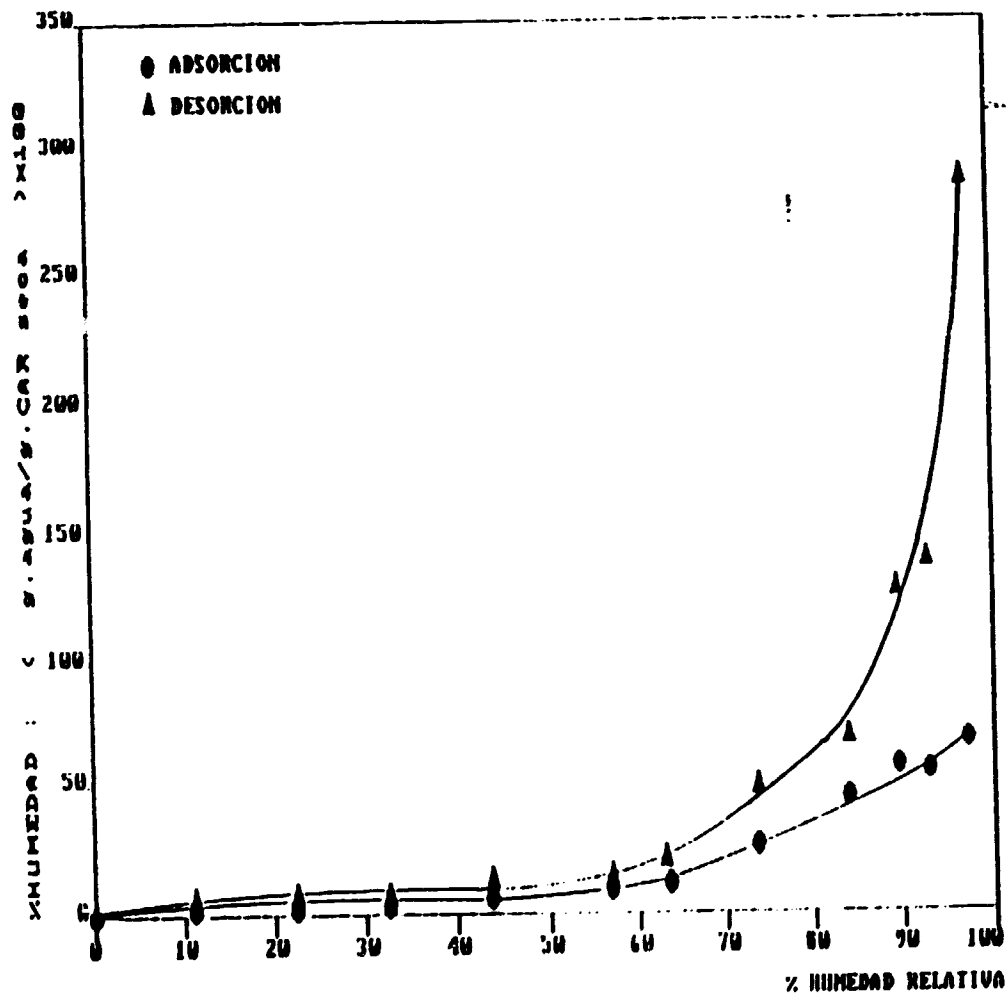


Figura 3. Isotherma sorción coqueta fermentada  
 Cepa: T. aureoviride 7-121.  
 Tiempo fermentación: 6 días  
 Temperatura: 20°C  
 Tiempo de incubación: 9 días  
 Humedad Inicial muestra: 60%

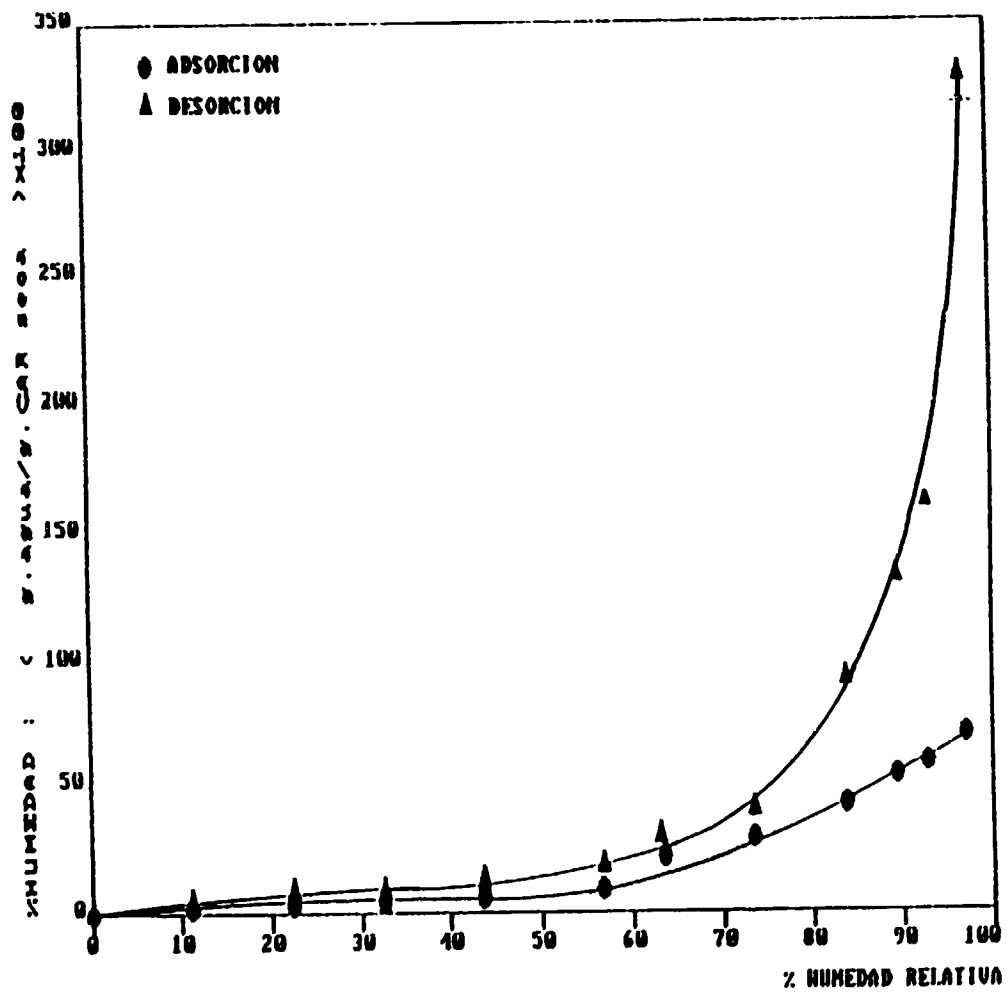


Figura 4. Isotherma sorción coqueta fermentada  
 Cepa: *S. aureoviride* 7-121  
 Tiempo fermentación: 11 días  
 Temperatura: 28°C  
 Tiempo de incubación : 9 días  
 Humedad inicial muestra : 70%



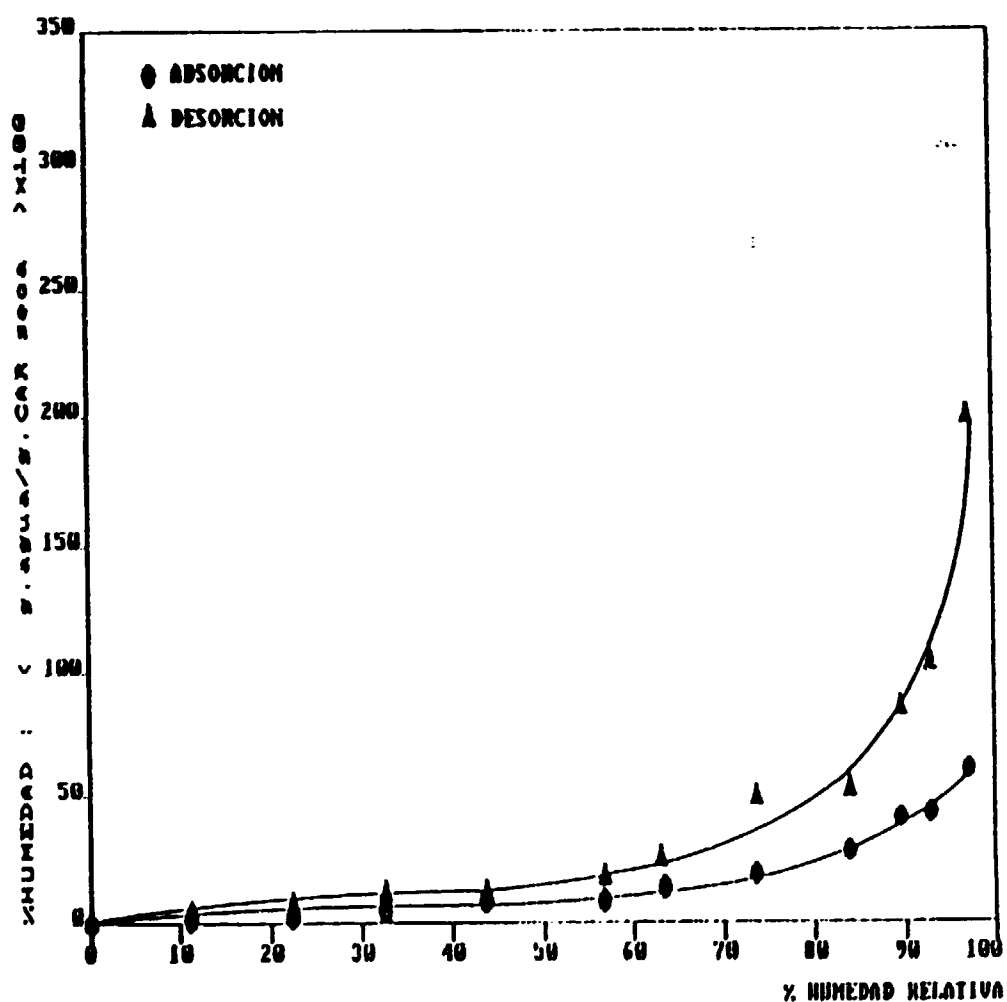


Figura 5. Isotherma sorción coqueta fermentada  
 Cepa T. reesei UCD-1.  
 Tiempo fermentación: 0  
 Temperatura: 20°C  
 Tiempo de incubación : 9 días  
 Humedad inicial muestra : 61%

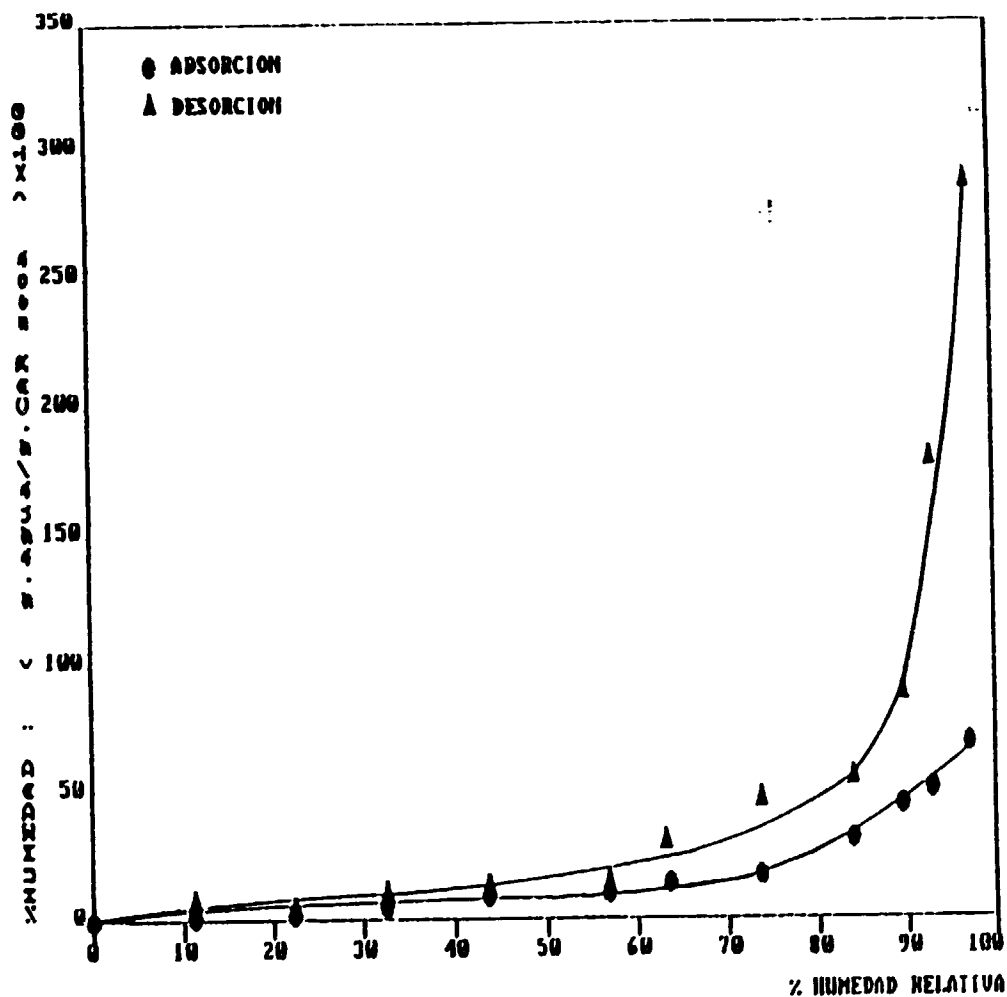


Figura 6. Isotherma sorción coqueta fermentada  
 Copa: T. rogersii H&A.  
 Tiempo fermentación: 10 días  
 Temperatura: 20°C  
 Tiempo de incubación : 9 días  
 Humedad inicial muestra : 66%

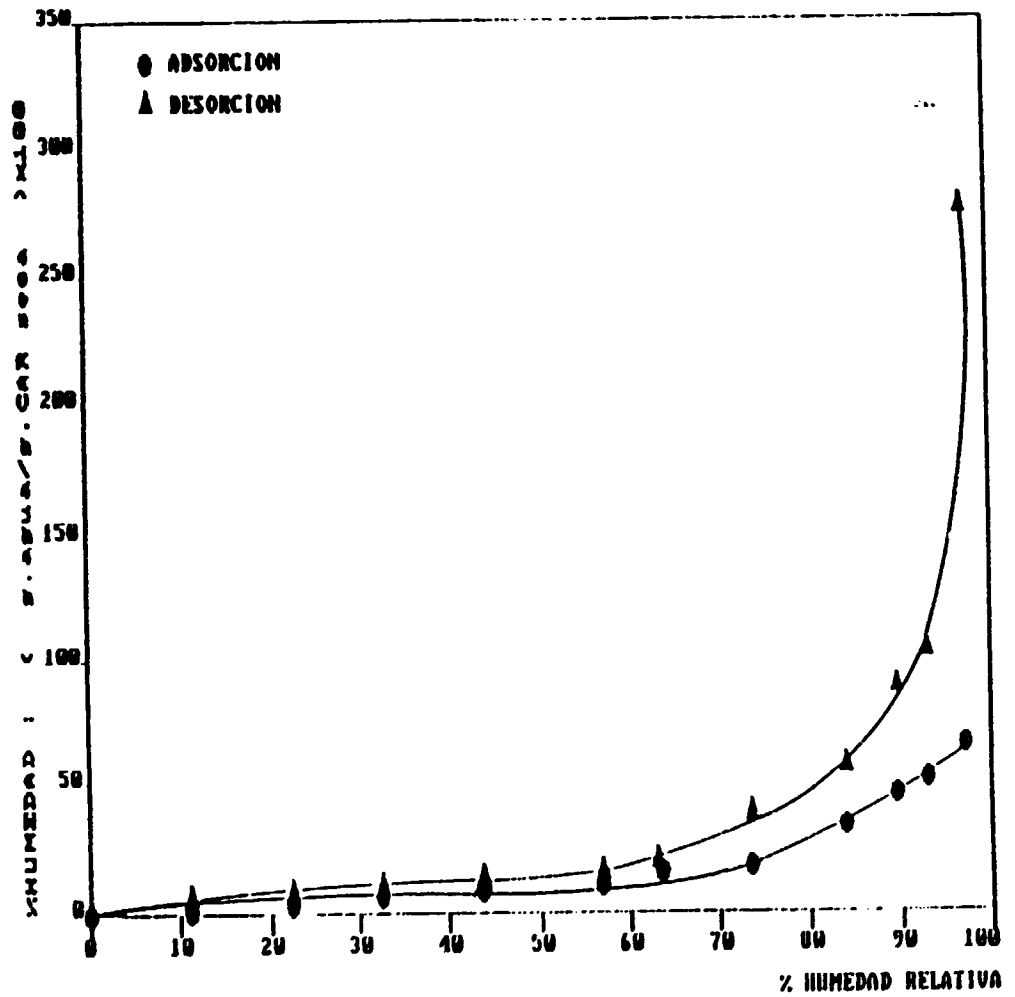


Figura 7. Isotherma sorción coqueta fermentada  
 Cepa: T. reesei UC-4.  
 Tiempo fermentación: 14 días  
 Temperatura: 28°C  
 Tiempo de incubación: 9 días  
 Humedad Inicial muestra: 60%

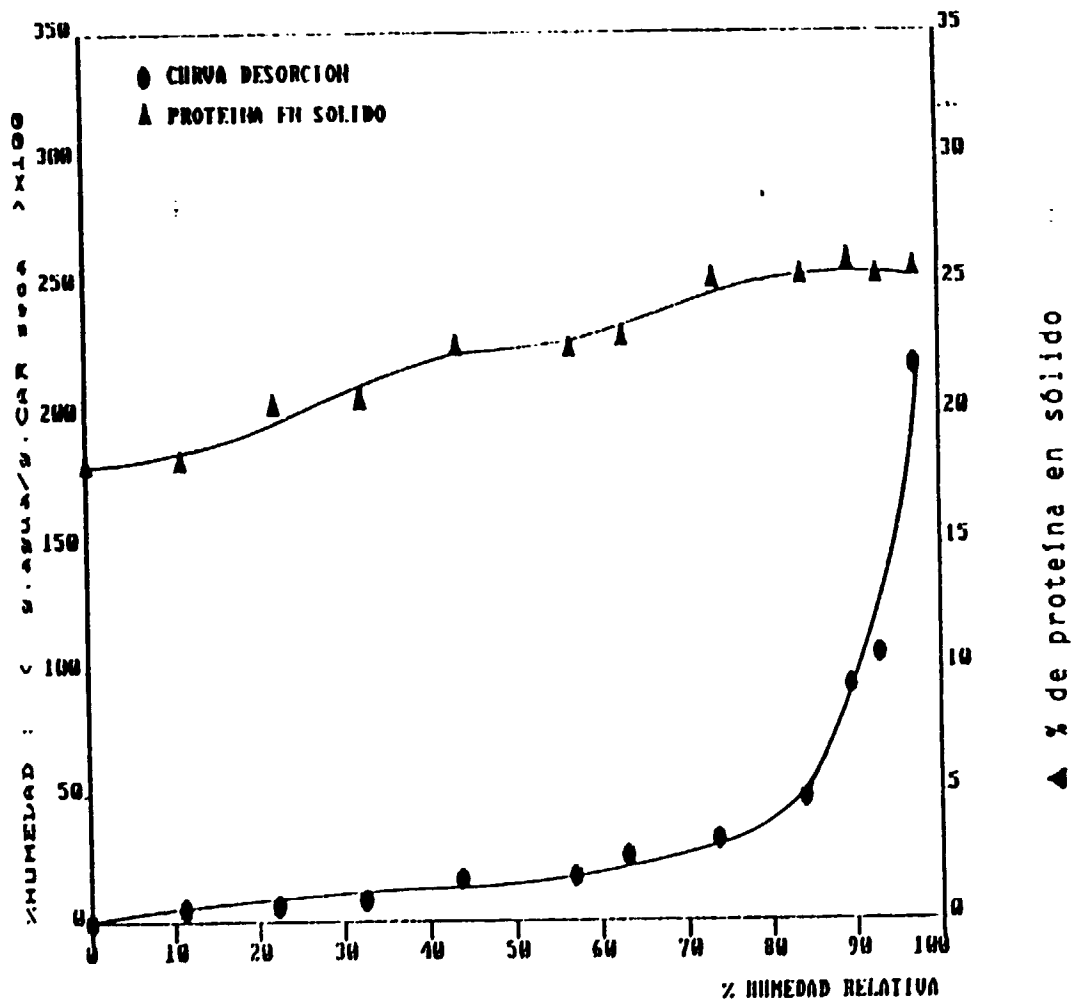


Figura B. Crecimiento microbiano a distintas humedades relativas.  
 Cepa: L. reesei UC-d.  
 Tiempo fermentación: 14 días  
 Temperatura: 28°C  
 Tiempo de incubación : 9 días

**Tabla 2. Modelación matemática. Coseta agotada de remolacha cruda.**

Isoterma	Ecuación matemática			
	Henderson (1952)	Luhn (1972)	Iglesias - Chirife (1978)	(1981)
<b>Adsorción</b>				
$\alpha$	0,987	-1,079	2,469	7,791
$\beta$	0,084	7,322	1,652	1,081
$r$	0,950	0,960	0,931	0,958
<b>Desorción</b>				
$\alpha$	0,921	-3,047	3,021	8,546
$\beta$	0,057	6,090	1,907	3,050
$r$	0,952	0,992	0,922	0,992

**Tabla 3. Modelación matemática. *T. aureoviride* 7-121.**  
 Tiempo de fermentación : 0

Isoterma	Ecuación matemática			
	Henderson (1952)	Kuhn (1972)	Iglesias - (1978)	Chirife (1981)
Adsorción				
$\alpha$	0,832	-1,769	3,957	1,771
$\beta$	0,111	9,759	1,050	10,534
r	0,998	0,885	0,984	0,884
Desorción				
$\alpha$	0,898	-5,399	4,554	5,411
$\beta$	0,044	14,577	1,414	16,909
r	0,968	0,963	0,968	0,962

**Tabla 4. Modelación matemática. [aureoxyride 7-121].  
Tiempo de fermentación 16 días.**

Isoterma	Ecuación matemática			
	Henderson (1952)	Euhn (1972)	Iglesias - Chirife (1978)	(1981)
<b>Adsorción</b>				
$\alpha$	0,772	-2,049	4,144	2,057
$\beta$	0,121	12,182	0,829	13,042
$r$	0,976	0,016	0,980	0,817
<b>Desorción</b>				
$\alpha$	0,701	-0,546	3,592	0,568
$\beta$	0,086	9,601	1,601	13,280
$r$	0,947	0,981	0,960	0,981

**Tabla 5. Modelación matemática. L. aureopylride 7-121.**  
 Tiempo de fermentación : 11 días.

Isoterma	Ecuación matemática			
	Henderson (1952)	Kuhn (1972)	Iglesias - Chirife (1978)	Chirife (1981)
<b>Adsorción</b>				
$\alpha$	0,819	-2,073	3,957	2,074
$\beta$	0,095	13,535	1,050	14,450
r	0,971	0,832	0,984	0,830
<b>Desorción</b>				
$\alpha$	0,714	-9,770	4,554	9,803
$\beta$	0,074	10,705	1,414	14,993
r	0,965	0,985	0,968	0,984



**Tabla 6. Modelación matemática. J. reesei UC-1.  
Tiempo de fermentación : 0**

Isoterma	Ecuación matemática			
	Henderson (1952)	Kuhn (1972)	Iglesias - Chirife (1978)	Chirife (1981)
<b>Adsorción</b>				
$\alpha$	0,825	-1,789	3,786	1,791
$\beta$	0,118	8,937	0,941	9,720
$r$	0.998	0.900	0.993	0.898
<b>Desorción</b>				
$\alpha$	0,915	-5,762	3,958	5,775
$\beta$	0,047	12,440	1,506	14,926
$r$	0,960	0,900	0,974	0,979

Tabla 7. Modelación matemática. L. reesei UC-4.  
Tiempo de fermentación : 10 días.

Isoterma	Ecuación matemática			
	Henderson (1952)	Kuhn (1972)	Iglesias - Chirife (1978)	Chirife (1981)
<b>Adsorción</b>				
$\alpha$	0,813	-2,039	3,758	2,042
$\beta$	0,111	9,890	1,002	10,782
r	0,995	0,903	0,970	0,901
<b>Desorción</b>				
$\alpha$	0,713	-8,706	4,409	9,729
$\beta$	0,085	7,323	1,296	11,064
r	0,965	0,977	0,961	0,977

**Tabla B. Modelación matemática. *T. aureoviride* HCC-1.**  
**Tiempo de fermentación : 14 días.**

Isotherma	Ecuación matemática			
	Henderson (1952)	Kuhn (1972)	Iglesias - Chirife (1978)	(1981)
<b>Adsorción</b>				
$\alpha$	0,829	-4,196	1,135	1,931
$\beta$	0,104	3,238	3,694	11,369
$r$	0,996	0,981	0,992	0,884
<b>Desorción</b>				
$\alpha$	0,786	-7,935	4,010	7,958
$\beta$	0,067	4,218	1,551	7,617
$r$	0,951	0,997	0,953	0,997

#### 4. COMENTARIOS

##### - Isotermas de sorción:

A partir de las curvas de isotermas obtenidas para la coseta cruda y en distintos estados degradativos apreciamos que la capacidad de sorción de agua de la coseta fermentada aumenta respecto de la coseta cruda.

También se observa durante el seguimiento de una fermentación, por ejemplo L.aureoviridis 7-1210 (figuras 3,4,5), que para las muestras tomadas en distintos estados fermentativos (tiempo 0, 6 y 11 días) los porcentajes de humedad alcanzados son mayores para un mismo tiempo de incubación.

Lo anterior indica que existe un claro efecto sobre la capacidad de sorción de agua de la coseta debido al crecimiento microbiano. Se observa, que para una misma humedad, la actividad de agua disminuye a medida que transcurre el tiempo de fermentación, esto tendría su explicación en que el agua se redistribuye a medida que va pasando el tiempo incorporándose en el tejido celular, disminuyendo con ello la disponibilidad de agua, además esta disminución en el agua libre puede verse aumentada a consecuencia del aumento de la concentración de solutos en el medio dado la necesidad que tienen estos de solvatare.

##### - Verificación del crecimiento microbiano:

En cuanto a la verificación del crecimiento microbiano (figura 8), no obstante las imperfecciones de esta experiencia, constatamos que a partir de una actividad de agua de aproximadamente 0,6 el crecimiento microbiano comienza a ser apreciable, teniéndose un comportamiento similar a lo informado en literatura. En tanto que el crecimiento observado entre actividades de agua de 0 a 0,6, este puede deberse más bien al contenido de humedad inicial de la muestra utilizada.

- Modelación matemática:

En relación a las modelaciones matemáticas efectuadas (tablas 2 a la 8), observamos que en general las isotermas de sorción obtenidas son modeladas más satisfactoriamente por las ecuaciones de Henderson (1952) y de Iglesias y Chirife (1978) de acuerdo a las regresiones (r) obtenidas.

5. REFERENCIAS

- (1) Wink, W. and G. Sears. 1950. Instrumentation Studies LVII. Equilibrium relative humidities above saturated salt solutions at various temperatures. TAPPI. 33(9):96A-99A
- (2) Rockland, L. 1960. Saturated salt solutions for static control for relative humidity between 5° and 40°C. In Analytical Chemistry 32(10):1375-1376
- (3) Catálogo. Hygrodyamics Inc. Water activity measurement and methodology. 11pp
- (4) Iglesias, H. and J. Chirife. 1982. Mathematical description of isotherms. In: Handbook of Food Isotherms Water Sorption Parameters for Food Components. Academic Press. N.Y. London. pp 262-264
- (5) Karel, M. 1975. Water activity and food preservation. In: Marcus Karel, Owey R. Fennema and Daryl B. Lund (editors). Physical Principles of Food Preservation. pp 237-261. New York: Marcel Deckka Inc.
- (6) Labuza, T.P. 1968. Sorption phenomena in foods. Food Technology. 22:263-272
- (7) Rojas, R. y G. Schaffeld. 1978. Trabajo de Investigación: Determinación de parámetros de fermentación en medios de cultivo con sustrato insoluble mediante la aplicación de balances de materia. 207 pp. Escuela de Ingeniería Bioquímica UCV.

ACTIVIDAD D. MEJORAMIENTO GENETICO DE T.aureoviride

INFORME DE AVANCE

PROYECTO : DEGRADACION ENZIMATICA DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.

CENTRO PARTICIPANTE : LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA. FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS. UNIVERSIDAD DE CHILE.

INFORME PREPARADO POR : INES CONTRERAS Y MERCEDES ZALDIVAR.

PERIODO QUE SE INFORMA : ENERO - SEPTIEMBRE, 1990.

En el informe de avance de Enero 1990 reportamos el aislamiento de la mutante 7-121 de Trichoderma aureoviride que produce elevados niveles de celulasas y  $\beta$ -glucosidasa en cultivos sumergidos. La producción de endoglucanasa y actividad sobre papel filtro por esta cepa es comparable a la de T. reesei QM 9414, mientras que la actividad celobiasa ( $\beta$ -glucosidasa) es notablemente superior en la mutante 7-121. Se determinó el efecto de algunos parámetros de fermentación como pH, fuente de Nitrógeno y adición de salvado de trigo sobre la producción de enzimas celulolíticas en matraces agitados, cuyos resultados se incluyeron en el informe anterior.

En el período Enero-Septiembre 1990 se continuó el estudio del efecto de diferentes condiciones de cultivo sobre la producción de celulasas por la mutante, en matraces agitados y en un fermentador de laboratorio.

## MATERIALES Y METODOS.

Producción de celulasas en matraces agitados. Se cultivó la mutante en medio líquido de Mandels ( 1 ) en las condiciones descritas en el 5° Informe de Avance, excepto que diariamente se controló el pH mediante la adición de NaOH de modo que no descendiera más allá de 3,5.

Fuentes de Carbono. Los sustratos celulósicos utilizados fueron los siguientes: Sigmacell (type 50, Sigma), Solka Floc SW 40, carboximetilcelulosa (baja viscosidad, Sigma) y paja de trigo molida y tamizada. Estos compuestos se agregaron al medio de cultivo a una concentración de 7,5 g/L excepto la paja de trigo en que se utilizó 18,0 g/L. Se ensayó además diferentes proporciones de una combinación de Sigmacell y paja de trigo.

Fuentes de Nitrógeno. La fuente de Nitrógeno se agregó al medio a una concentración equivalente a 0,44 g de Nitrógeno por litro. Las concentraciones de los compuestos nitrogenados utilizadas fueron en g/L: urea, 0,94 ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,07;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1,26;  $\text{NaNO}_3$ , 2,67 y licor de maíz, 12,57. En los experimentos en que se ensayó fuentes de Nitrógeno combinadas, cada una de estas se utilizó a una concentración de 0,44 g de Nitrógeno por litro.

Producción de celulasas en un fermentador. Se cultivó T. aureoviride 7-121 en un fermentador New Brunswick de dos litros de capacidad con un volumen de trabajo de 1,5 litros. El aire se introdujo a una velocidad de 0,1 a 0,2 VVM. El oxígeno disuelto se mantuvo sobre 20% de saturación variando la velocidad de agitación entre 200 y 300 rpm. La espuma se controló mediante la adición diaria de Antifoam A (Sigma) estéril. El pH se mantuvo en el nivel o dentro del rango deseado mediante la adición automática de NaOH 0,5 N y HCl 0,5 N a través de un controlador de pH New Brunswick. El medio de cultivo consistió en 1,35 L de medio de sales de Mandels con 7,5 g/L de Sigmacell como fuente de carbono. Este se inoculó con 150 mL de un cultivo miceliar preparado en matraces agitados. En todos los experimentos se suplementó el

(1) Mandels, M. and R.E. Andreotti (1978). Process Biochem. 13:6-13.



medio de cultivo del inóculo y del fermentador con 1 g/L de glucosa estéril.

Determinación de actividades enzimáticas, proteína soluble y proteína miceliar. La producción de endoglucanasa actividad sobre papel filtro (FPA) celobiasa ( $\beta$ -glucosidasa), xilanasa y proteína soluble se cuantificó de acuerdo a los métodos descritos en el 5° Informe. El crecimiento del hongo se estimó en función de proteína miceliar según el método descrito en dicho informe.

## RESULTADOS.

### 1. Producción de celulasas por la mutante 7-121 en matraces.

En el Informe de Avance anterior, reportamos que el pH del cultivo era un parámetro que influía notablemente en la producción de celulasas por la mutante 7-121. Se determinó que valores de pH por debajo de 3,5 producían una disminución de todas las actividades celulolíticas, especialmente de  $\beta$ -glucosidasa. Por este motivo, en el estudio sobre el efecto de diferentes fuentes de Carbono y de Nitrógeno sobre la producción de celulasas por la cepa 7-121, el pH se controló periódicamente de modo que no bajara de 3,5.

Efecto de la Fuente de Carbono. Se investigó el efecto de la fuente de Carbono sobre la producción de enzimas en matraces agitados que contenían el medio de sales descrito por Mandels y Andreotti adicionado de diferentes sustratos celulósicos. Como se aprecia en la Tabla 1, los mejores rendimientos de celulasas y  $\beta$ -glucosidasa se obtuvieron al utilizar Sigma-cell como fuente de carbono. En el medio con Solka Floc la actividad sobre papel filtro fue similar pero las actividades endoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa fueron inferiores a las producidas en Sigmacell. Los cultivos que contenían carboximetilcelulosa mostraron poco crecimiento y la producción de enzimas fue baja. Cuando se usó paja de trigo como fuente de carbono se alcanzaron actividades de alrededor de un 50% de aquellas obtenidas en Sigmacell, pero la actividad xilanasa fue nueve veces superior. Sin embargo hubo producción de esta enzima, aunque baja, en los cultivos que contenían sustratos celulósicos "puros". Cuando se utilizó lactosa como fuente de carbono, el crecimiento fue muy pobre y no se detectó ninguna de las actividades celulolíticas.

Al comparar las actividades específicas de las enzimas en los diferentes medios, se observa que los valores más altos de celulasa y  $\beta$ -glucosidasa se obtuvieron en Sigmacell y los mejores valores de xilanasa en paja de

trigo.

Efecto de la fuente de Nitrógeno. Se realizaron cultivos con Sigmacell como fuente de carbono, conteniendo diferentes fuentes de nitrógeno tanto orgánicas como inorgánicas. Como se muestra en la Tabla 2, la mayor producción de celulasas se obtuvo en el medio que contenía urea como fuente de Nitrógeno. Sin embargo, los cultivos que contenían licor de maíz mostraron mejores actividades específicas de celulasas y  $\beta$ -glucosidasa. Tanto en urea como en licor de maíz se obtuvo actividad xilanolítica apreciable. Los rendimientos de todas las enzimas fueron bajos en los medios que contenían fuentes de nitrógeno inorgánicas.

Cabe mencionar que en los cultivos con licor de maíz y urea, el pH nunca bajó de 4,5. Después de caer a este valor después de 48 a 72 hr, empezó a subir progresivamente hasta llegar a valores cercanos a 6.

Producción de celulasas en fuentes de Nitrógeno combinadas. Se investigó el efecto del uso conjunto de fuentes de nitrógeno orgánica e inorgánica sobre la producción de celulasas por T. aureoviride 7-121. Como fuente de nitrógeno orgánica se eligió urea debido a que como se observa en la Tabla 2, se obtuvo los mejores rendimientos de todas las actividades celulolíticas en especial de  $\beta$ -glucosidasa la que alcanzó un valor de 11,1 U/mL. Aún cuando en licor de maíz también se obtuvo altos niveles enzimáticos, se prefirió el uso de urea debido a que el licor de maíz tiene una composición química variable y su intenso color oscuro dificulta en parte la determinación colorimétrica de actividades celulolíticas y proteínas.

Los resultados se observan en la Tabla 3. Al cultivar la mutante 7-121 en una combinación de urea y nitrato de sodio, se alcanzaron los más altos niveles de todas las actividades enzimáticas y de proteína extracelular: endoglucanasa 58,9 U/mL; FPA 1,17 U/mL; celobiasa 8,63 U/mL; xilanasas 15,60 U/mL y proteína soluble 1,37 mg/mL.

Efecto del uso combinado de Sigmacell y Paja de Trigo. Como se discutió más arriba, los mejores rendimientos enzimáticos se obtuvieron al cultivar T. aureoviride 7-121 en Sigmacell como fuente de carbono con la excepción de xilanasa cuya producción fue superior en los cultivos con paja de trigo. Con el objeto de investigar el efecto de ambas fuentes de carbono en forma conjunta se cultivó la mutante 7-121 en matraces agitados en diferentes proporciones de Sigmacell y paja de trigo. Como fuente de Nitrógeno se utilizó 0,94 g/L de urea y 2,67 g/L de  $\text{NaNO}_3$  que dió los mejores rendimientos enzimáticos como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Se observa que los mejores niveles enzimáticos se obtienen al cultivar la mutante en Sigmacell como única fuente de carbono. Al combinar Sigmacell con paja de trigo la producción de enzimas celulolíticas disminuye notablemente. Esta disminución es mayor a medida que aumenta la proporción de paja de trigo con respecto a la de Sigmacell. Contrario a lo esperado, la inclusión de paja de trigo en el medio, no resultó en un aumento de la actividad xilanasas. Por consiguiente el medio de cultivo más adecuado para la producción de celulasas en matraces agitados es el medio de sales de Mandels en el que la fuente de nitrógeno se sustituye por 0,94 g/L de urea y 2,67 g/L de  $\text{NaNO}_3$  y la fuente de carbono es 7,5 g/L de Sigmacell.

## 2. Producción de celulasas por T. aureoviride 7-121 en un fermentador de laboratorio.

En forma paralela al estudio en matraces en el presente período se inició el estudio de la producción de celulasas por la mutante 7-121 en un fermentador de laboratorio. Con el objeto de estudiar el efecto del pH sobre la producción de celulasas, se cultivó el hongo en un fermentador de 2 litros en medio de Mandels con 7 g/L de celulosa. Cada 24 horas se tomó una muestra y se le ensayó actividades celulolíticas y proteínas.

En primer lugar se permitió que el pH fluctuara libremente durante la fermentación. En la Figura 1 se observa que el perfil de pH obtenido es semejante a aquel observado en matraces, en el que el pH baja a alrededor

de 3,5 y a medida que avanza la fermentación, aumenta levemente hasta alcanzar un valor de 4,1. Luego se realizaron una serie de fermentaciones en las que el pH se fijó en valores de 4,5, 5,0 y 5,5, manteniéndose estos valores mediante la adición automática de NaOH o HCl.

Las actividades de FPA, endoglucanasa, celobiasa y xilanasas obtenidas en filtrados crudos de estas fermentaciones se muestran en las figuras 2, 3, 4 y 5 respectivamente.

Se observa que al mantener el pH fijo en 4,5 se logran los mejores niveles de endoglucanasa FPA y xilanasas. La actividad celobiasa sin embargo alcanza su valor más alto en la fermentación a pH 5,0. Cabe destacar que los valores máximos de actividades enzimáticas se alcanzan ya al tercer o cuarto día de fermentación.

Se realizó luego una fermentación en que sólo se fijó el pH mínimo en un valor 4,5 y luego se le permitió subir libremente. El objetivo de este experimento fue intentar conciliar la diferencia de comportamiento de las actividades enzimáticas frente al pH. Los resultados se muestran en las figuras 2 a 5. Se puede observar que en esta fermentación se logran los rendimientos de todas las enzimas más altos que aquellos obtenidos en las fermentaciones a pH fijo. Las actividades enzimáticas alcanzadas al cuarto día de fermentación fueron de: FPA, 1,0 U/mL; endoglucanasa, 43,0 U/mL; celobiasa, 6,3 U/mL y xilanasas, 14,0 U/mL. La producción de proteína soluble también logra su valor más alto en esta fermentación, 1,1 mg/mL, (Fig. 6).

Estos resultados indican que para lograr altos rendimientos enzimáticos, sería necesaria una caída de pH hasta 4,5 en los primeros tiempos de fermentación y luego permitir que el pH suba nuevamente.

A la fecha de este informe se encuentra en curso una fermentación que combina los resultados obtenidos en matraces con aquellos obtenidos en el fermentador. Es decir, se estudiará la producción de celulasas y xilanasas

sas por T. aureoviride 7-121 en medio líquido con Sigmacell como fuente de Carbono y la combinación urea y nitrato de sodio como fuente de Nitrógeno. Se controlará el pH mínimo de fermentación de modo que no descienda más allá de 4,5 y luego se permitirá que suba libremente. A continuación se iniciará el estudio del efecto de la concentración de celulosa sobre la producción de celulasas. En estos experimentos se aumentará la concentración de celulosa manteniendo el pH en las condiciones descritas y escalando los componentes del medio de cultivo proporcionalmente. De esta forma se espera lograr un aumento aún mayor en la producción de celulasas y xilanasa por T. aureoviride 7-121.

TABLA 1. Producción de celulasas extracelulares por T. aureoviride 7-121 en matraces agitados en diferentes fuentes de carbono.

Fuente de Carbono	Proteína (mg ml <sup>-1</sup> )	Endoglucanasa (IU ml <sup>-1</sup> )	FPA (IU ml <sup>-1</sup> )	Celobiasa (IU ml <sup>-1</sup> )	Xilanasas (IU ml <sup>-1</sup> )
Sigmacell	2,03	52,0 (50,5)	0,69 (0,67)	4,33 (4,20)	1,20 (1,16)
Solka Floc	1,35	35,7 (26,4)	0,63 (0,47)	2,65 (1,96)	1,90 (1,41)
Carboximetilcelulasa	0,27	3,3 (12,2)	0,07 (0,26)	0,40 (1,48)	1,48 (5,48)
Paja de trigo	1,14	14,8 (13,0)	0,38 (0,33)	2,08 (1,82)	10,90 (9,56)

Actividades enzimáticas determinadas en filtrados, crudos a los 8 días de cultivo en medio líquido de Mandels con 1,4 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0,3 g/L de urea como fuente de Nitrógeno. Las fuentes de Carbono se utilizaron a una concentración de 7,5 g/L con la excepción de la paja de trigo en que se usó 18,0 g/L (equivalente a 7,5 g/L de celulosa). Las figuras en paréntesis corresponden a las actividades específicas expresadas como UI/mg de proteína.

TABLA 2. Producción de celulasas extracelulares por T. aureoviride 7-121 en matraces agitados en diferentes fuentes de Nitrógeno.

Fuente de Nitrógeno	Proteína (mg ml <sup>-1</sup> )	Endoglucanasa (IU ml <sup>-1</sup> )	FPA (IU ml <sup>-1</sup> )	Celobiasa (IU ml <sup>-1</sup> )	Xilanasa (IU ml <sup>-1</sup> )
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + Urea	1,03	52,0 (50,5)	0,69 (0,67)	4,33 (4,20)	1,20 (1,16)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,39	31,2 (22,4)	0,81 (0,58)	1,36 (0,98)	1,50 (1,08)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,89	18,4 (20,7)	0,41 (0,46)	0,69 (0,77)	0,43 (0,48)
Na NO <sub>3</sub>	0,30	5,1 (16,7)	0,09 (0,30)	0,09 (0,30)	0,23 (0,76)
Licor de Maíz	1,08	58,0 (53,7)	1,15 (1,06)	6,86 (6,35)	4,58 (4,24)
Urea	2,06	54,0 (26,2)	0,66 (0,32)	11,10 (5,39)	6,04 (2,93)

Actividades enzimáticas determinadas en filtrados crudos a los 8 días de cultivo en medio líquido de Mandels con 7,5 g/L de Sigmacell como fuente de Carbono. Las fuentes de Nitrógeno se utilizaron a una concentración final de 0,44 g de Nitrógeno/L. Las figuras entre paréntesis corresponden a las actividades específicas expresadas como IU/mg de proteína.



TABLA 3. Producción de celulasas por T. aureoviride 7-121 en matraces agitados en diferentes combinaciones de fuentes de Nitrógeno.

Fuentes de Nitrógeno	Proteína mg/mL	Endoglucanasa U/mL	FPA U/mL	Celobiasa U/mL	Xilanasa U/mL
Urea + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,64	39,9 (62,3)	0,63 (0,98)	1,70 (2,65)	3,67 (5,73)
Urea + $\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,29	53,8 (41,7)	1,02 (0,79)	8,70 (6,74)	20,25 (15,70)
Urea + $\text{NaNO}_3$	1,37	58,9 (43,0)	1,17 (0,85)	8,63 (6,30)	15,60 (11,38)

Actividades enzimáticas determinadas en filtrados crudos a los 10 días de cultivo en medio líquido de Mandels con 7,5 g/L de Sigmacell como fuente de Carbono. Cada compuesto nitrogenado se utilizó a una concentración equivalente a 0,44 g de Nitrógeno por litro. Las cifras entre parentesis representan las actividades específicas expresadas como UI/mg de proteína.

TABLA 4. Producción de celulasas por T. aureoviride 7-121 en matraces agitados con Signacell y paja de trigo como fuentes de carbono.

Fuentes de Carbono	Proteína mg/mL	Endoglucanasa U/mL	FPA U/mL	Celobiasa U/mL	Xilanasa U/mL
Signacell (SC)	1,37	58,9 (43,0)	1,17 (0,85)	8,63 (6,30)	15,60 (11,38)
Paja de Trigo (PT)	0,71	14,0 (19,7)	0,52 (0,73)	2,13 (3,00)	12,54 (17,66)
SC/PT 3:1	0,96	39,3 (40,9)	1,10 (1,15)	2,00 (2,08)	6,43 (6,69)
SC/PT 1:1	0,79	26,8 (33,9)	0,90 (1,14)	2,10 (2,66)	12,54 (15,87)
SC/PT 1:3	0,72	24,0 (33,3)	0,43 (0,60)	1,68 (2,33)	14,90 (20,69)

Actividades enzimáticas determinadas en filtrados crudos a los 8 días de cultivo en 0,94 g/L urea y  $\text{NaNO}_3$  como fuentes de Nitrógeno. Las cifras entre paréntesis representan las actividades específicas expresadas como UI/mg de proteína.

### LEYENDAS DE LAS FIGURAS

- Figura 1. Perfil de pH producido al cultivar T. aureoviride 7-121 en un fermentador de 2 litros en medio líquido de Mandels con 7,5 g/L de celulosa microcristalina.
- Figura 2. Efecto del control de pH sobre la producción de FPA por T. aureoviride 7-121 en el fermentador.
- Figura 3. Efecto del control de pH sobre la producción de endoglucanasa por T. aureoviride 7-121 en el fermentador.
- Figura 4. Efecto del control de pH sobre la producción de celobiasa por T. aureoviride 7-121 en el fermentador.
- Figura 5. Efecto del control de pH sobre la producción de xilanasa por T. aureoviride 7-121 en el fermentador.
- Figura 6. Efecto del control de pH sobre la producción de proteína soluble por T. aureoviride 7-121 en el fermentador.

FIGURA 1

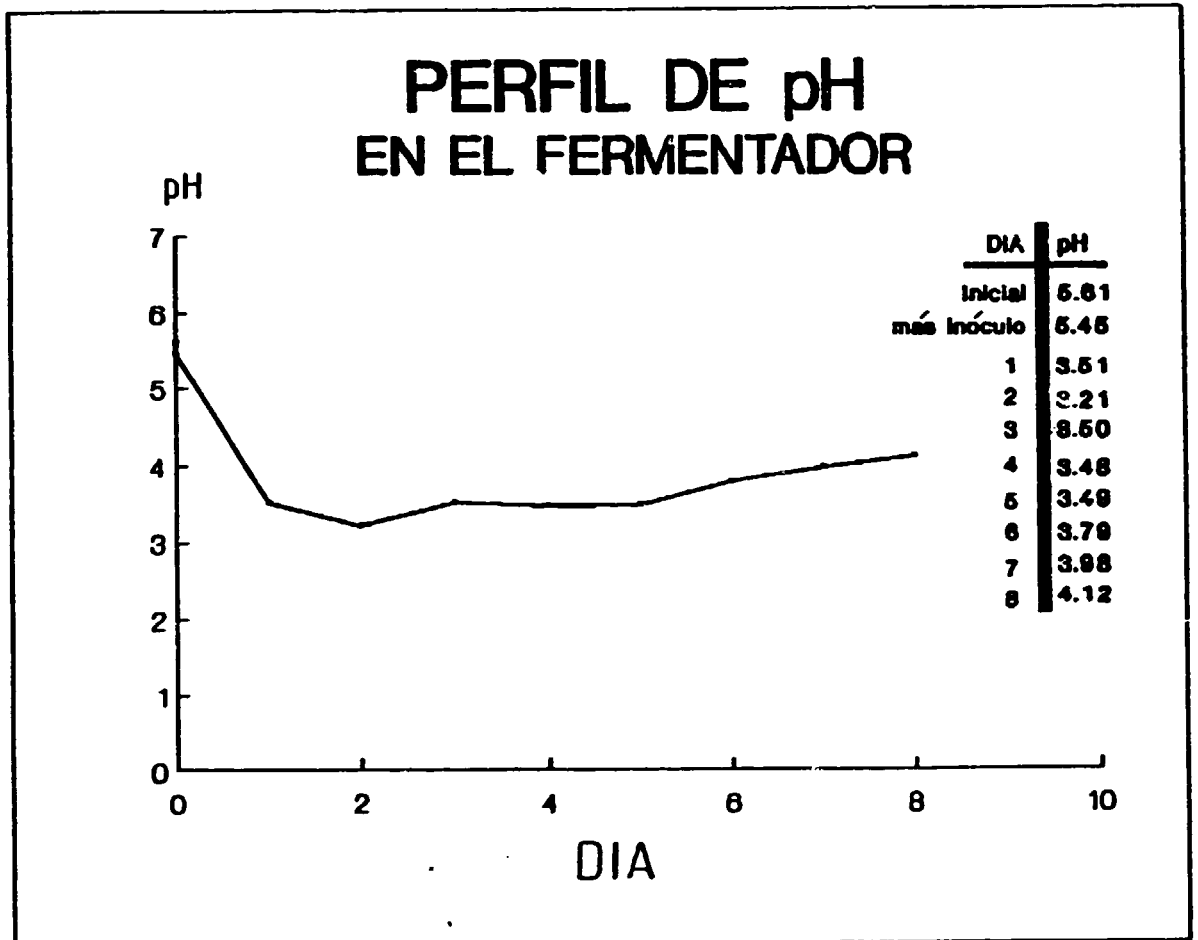


FIGURA 2

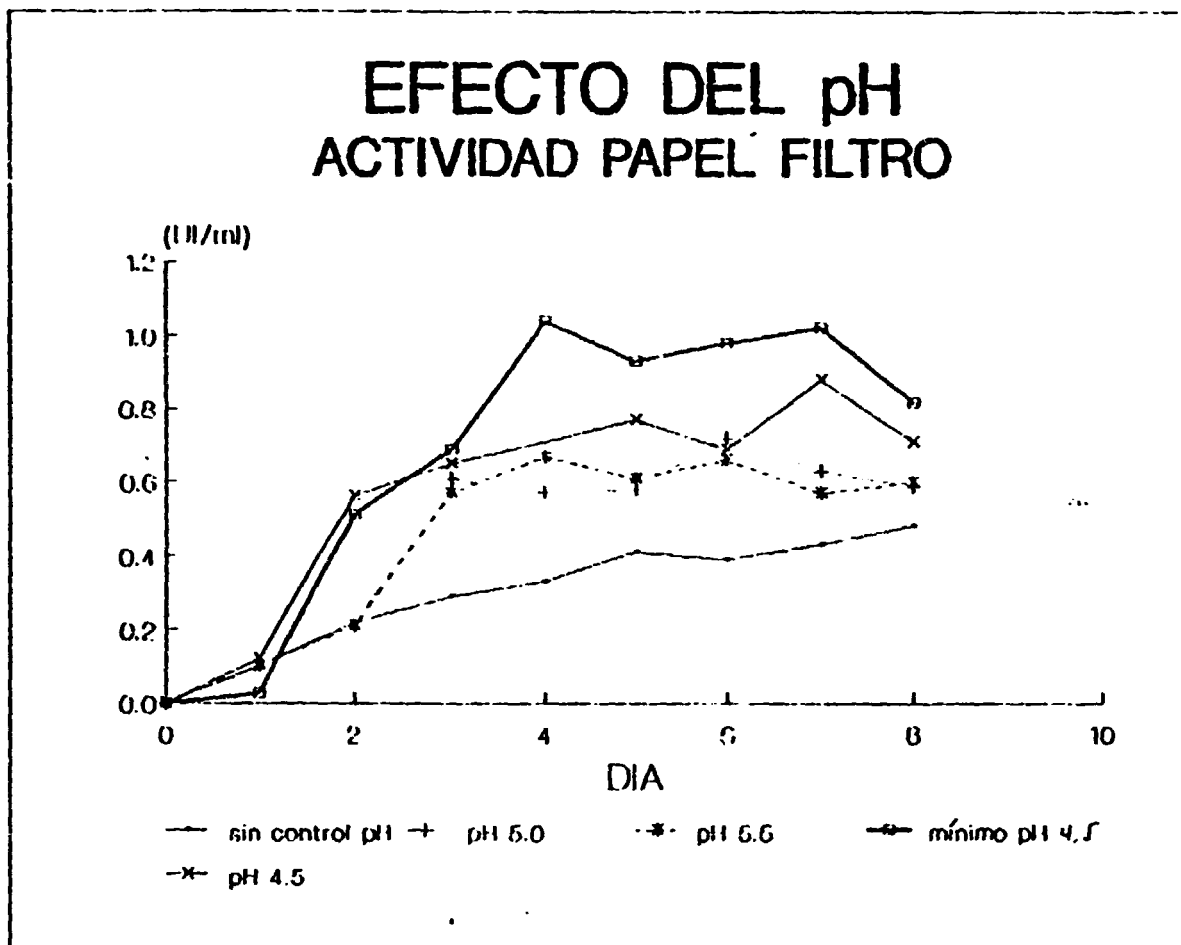


FIGURA 3

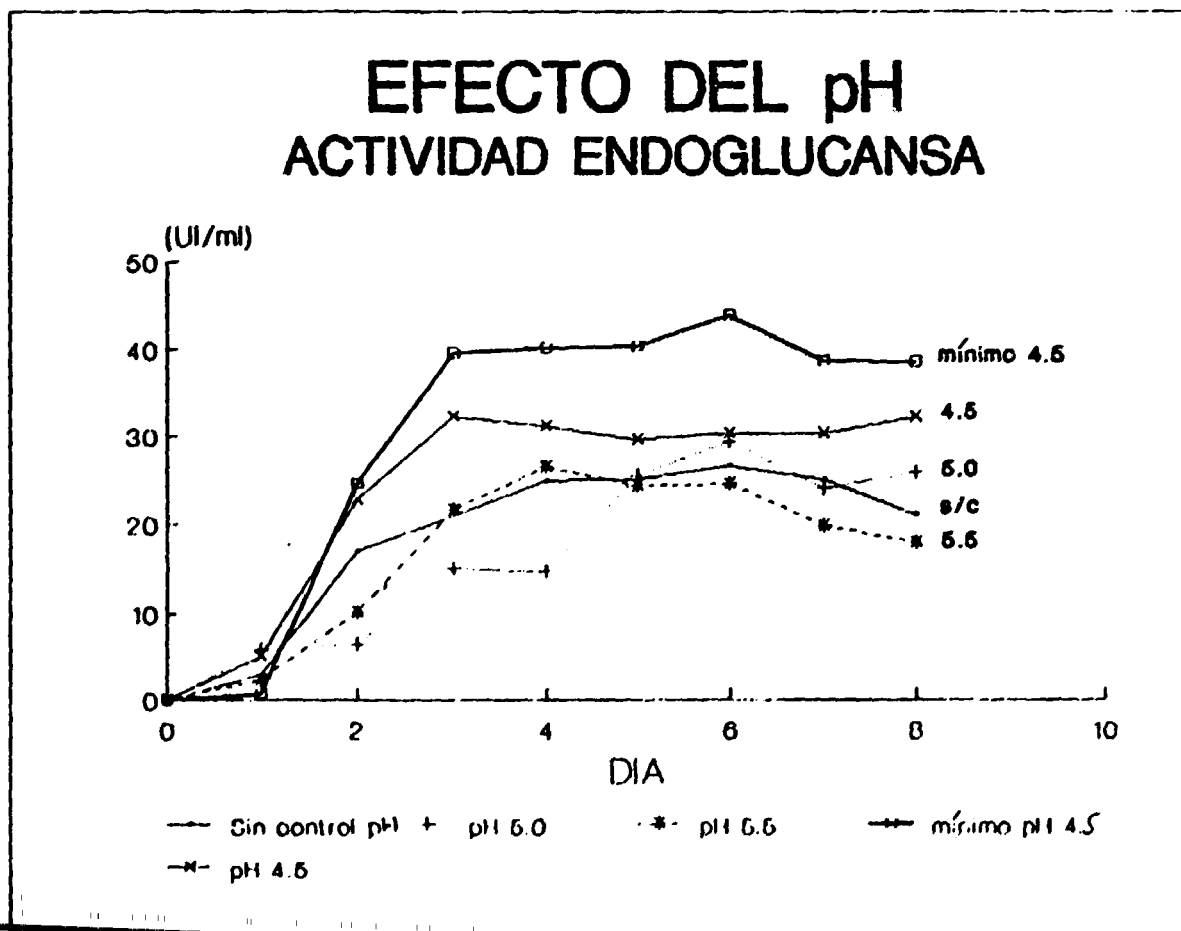


FIGURA 4

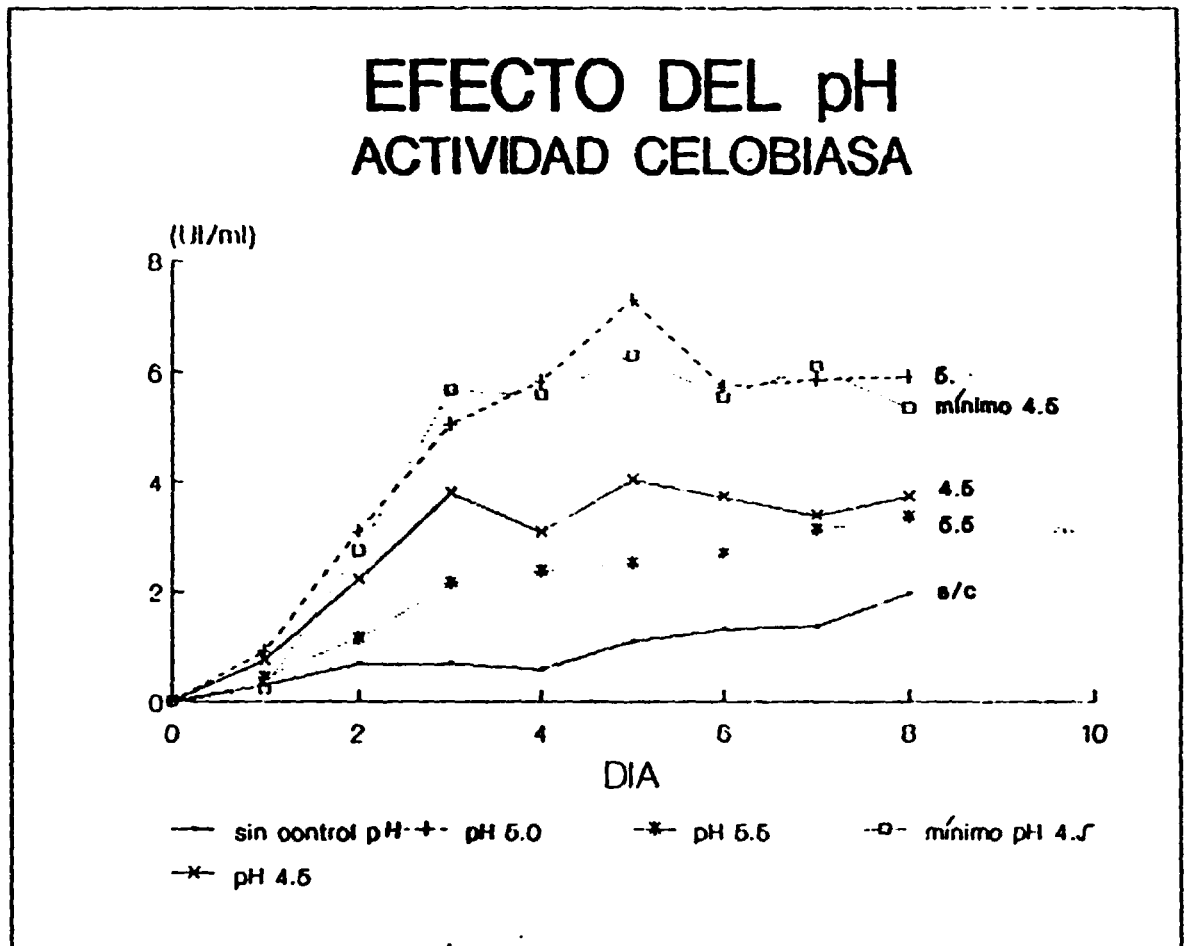


FIGURA 5

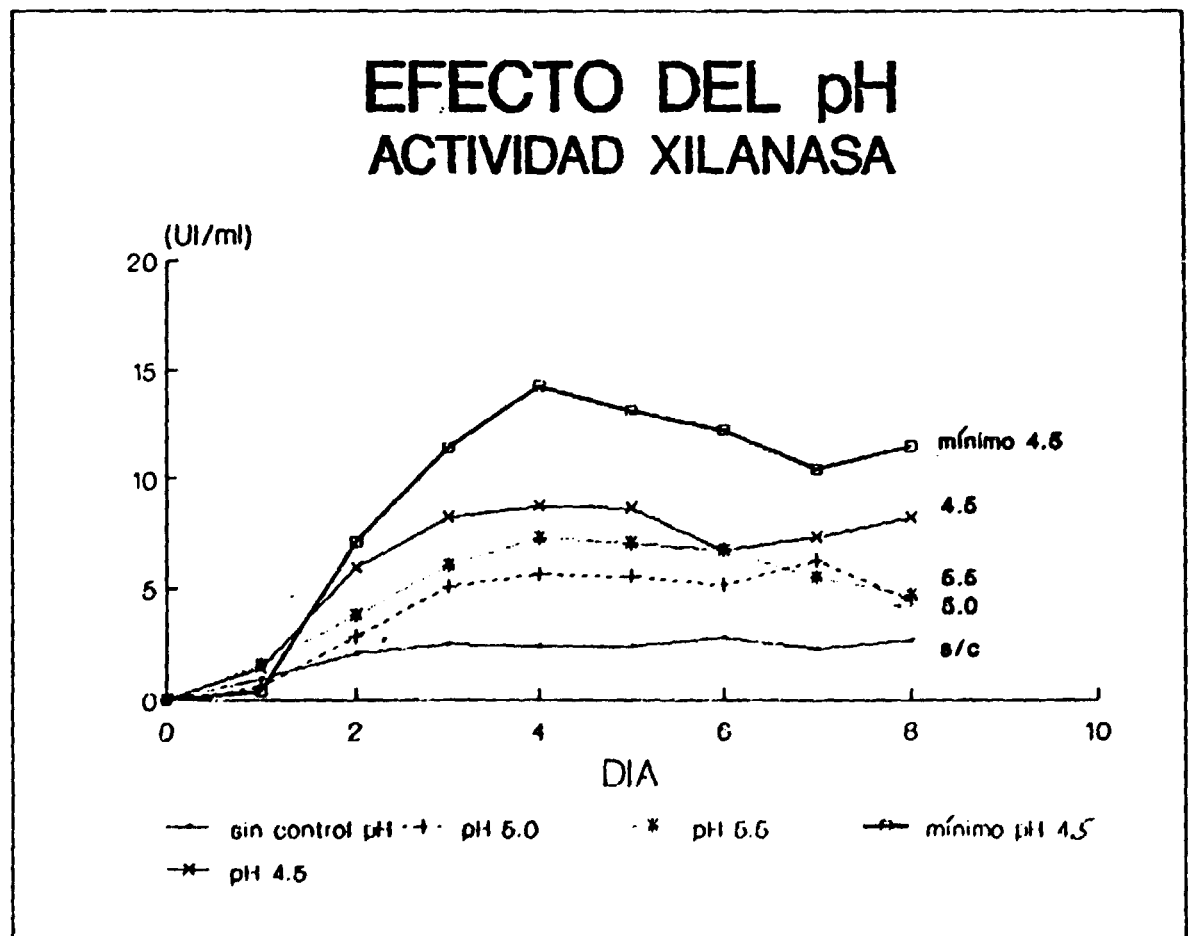
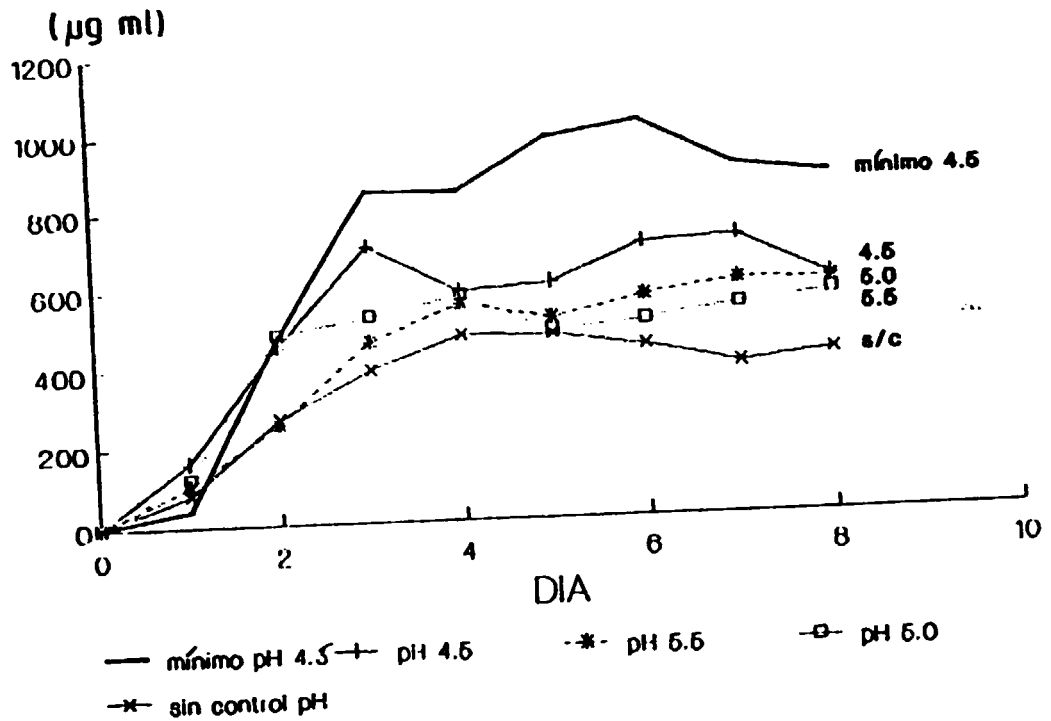


FIGURA 6

# EFEECTO DEL pH PROTEINAS SOLUBLES



Parte de los resultados de este trabajo forman parte de tres tesis de pregrado efectuadas en nuestro laboratorio. Estas son:

1. "Efecto de algunos parámetros de fermentación sobre la producción de celulasas por Trichoderma aureoviride".

Tesis de grado para optar al título de Ingeniero en Alimentos.

José Antonio González. (1989).

2. "Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de celulasas por una cepa mutante de Trichoderma aureoviride".

Tesis de grado para optar al título de Ingeniero en Alimentos.

Alfredo Iñiguez. (en curso).

3. "Mejoramiento genético del hongo celulolítico Trichoderma aureoviride: optimización de la producción de celulasas".

Tesis de grado para optar al título de Bioquímico.

Iván Niechi. (en curso).

Además ha sido enviado para su publicación el manuscrito "Isolation and properties of a mutant of Trichoderma aureoviride with enhanced cellulase and  $\beta$ -glucosidase production" de los autores Mercedes Zaldívar e Inés Contreras.

En el año 1990 se presentaron al XIII Congreso Chileno de Microbiología los siguientes trabajos:

1. "Producción de celulasas por Trichoderma aureoviride 7-121 en diferentes fuentes de Carbono y Nitrógeno". (Cellulase production by T. aureoviride on different carbon and nitrogen sources).

M. Zaldívar, J. Steiner, I. Contreras.

2. "Efecto del pH y concentración de sustrato sobre la producción de celulasas Trichoderma aureoviride". (Effect of pH and substrate concentration on cellulase production by Trichoderma aureoviride).

M. Zaldívar, J.A. González, J.M. Romero, I. Contreras.



## ACTIVIDAD E.

### IMPLEMENTACION DE SISTEMAS AUXILIARES DEL FERMENTADOR PROTOTIPO

Se procedió a implementar los sistemas auxiliares del fermentador y los respectivos sensores (temperatura, humedad del aire, actividad del agua).

En el Quinto Informe de Avance se describió el fermentador prototipo el cual permite una operación tanto dinámica como estática. Este consiste en un cuerpo cilíndrico de 1 metro de diámetro y 65 centímetros de altura. En parte inferior de este cilindro se aloja una bandeja de malla que soporta el material, cuya altura máxima es de 50 centímetros.

El fermentador cuenta con un sistema de agitación compuesto de un motoreductor de 1 Hp y 31,5 rpm de salida, un sistema de reducción que permite trabajar con velocidades de rotación de hasta 1 rpm, un sistema de transmisión y un mezclador. Estos dos últimos elementos están siendo sometidos a modificaciones según se detalla en el punto G de este informe.

La aireación opera por el fondo del equipo, forzándose el aire a través del lecho de sólido. El aire se obtiene de una línea de servicio del Laboratorio de Procesos de la Escuela de Ingeniería Bioquímica, donde se ha instalado este sistema de fermentación. Esta línea de aire es alimentada por un compresor INGERSOLL-RAND de 3 Hp, autolubricado, el cual puede proveer en forma continua 300 lpm de aire.

El diseño de este fermentador se realizó hasta un nivel de ingeniería de detalle y posteriormente la construcción fue encomendada al Departamento de Ingeniería Mecánica de la Universidad Católica de Valparaíso. La construcción se hizo íntegramente en acero inoxidable AISI 304 de 2 mm de espesor.

En todo sistema de fermentación de sustratos sólidos se distinguen dos partes claramente diferenciadas: compartimiento de fermentación, detallado en informes anteriores, y el sistema de acondicionamiento de aire.

La importancia del sistema de acondicionamiento de aire radica en que en prácticamente todos los procesos de fermentación en sustratos sólidos, la acumulación de calor metabólico constituye un problema bastante grave. Esta problemática varía mucho dependiendo del sustrato base con que se va a trabajar. Se ha demostrado que el mecanismo que controla la transferencia de calor en estos procesos es principalmente de carácter convectivo, por lo que es preciso recurrir a este tipo de métodos para controlar o eliminar el calor metabólico y así evitar gradientes importantes de temperatura en el lecho de fermentación.

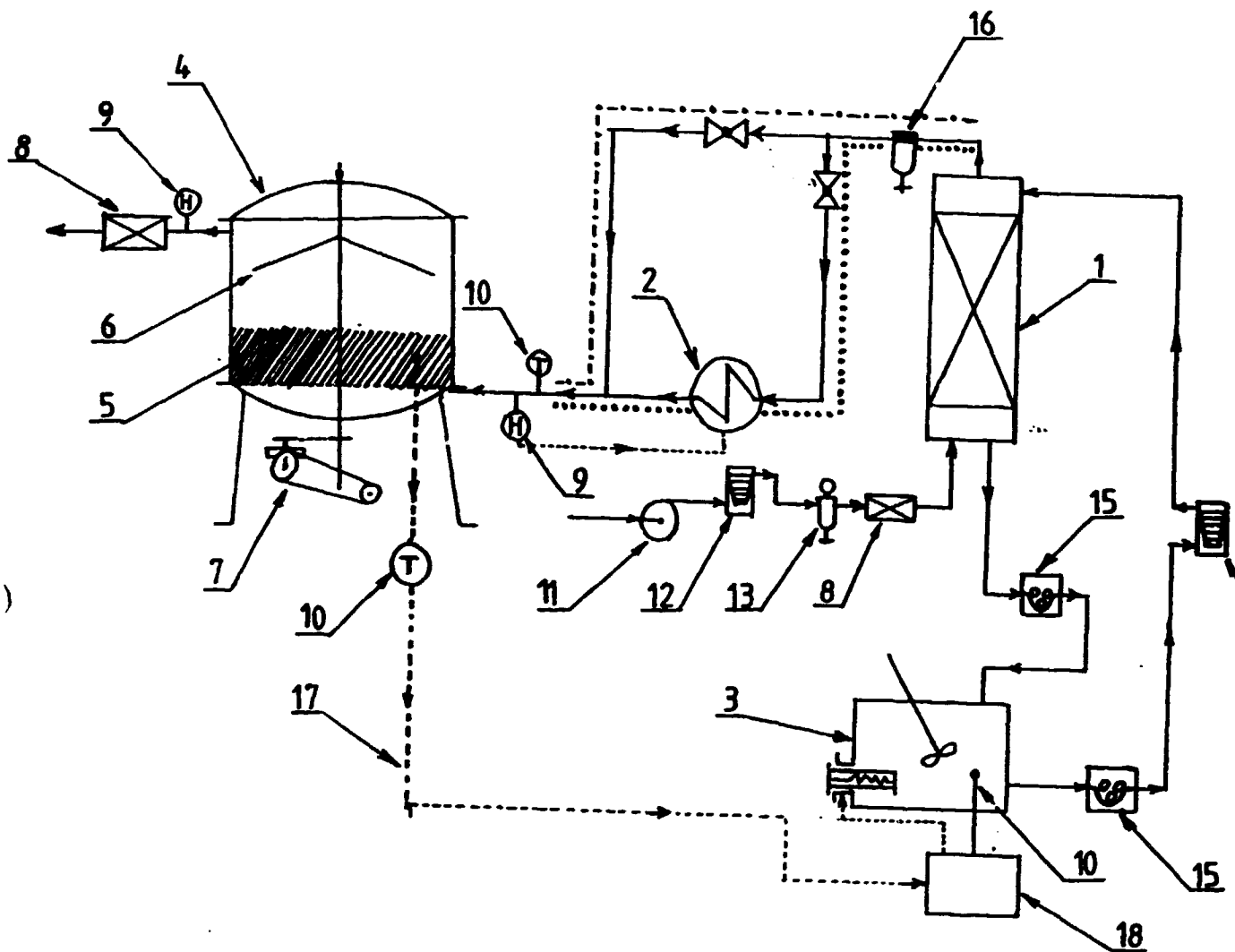
El sistema que se plantea como acondicionador de aire permitiría el control de la Temperatura y de la Humedad relativa del aire a la entrada del fermentador. Este consiste básicamente de una columna de humidificación y un calentador de aire dispuestos como se muestra en la figura E.1. La figura E.2 muestra un diagrama isométrico del sistema. El agua que se recircula a la columna de humidificación proviene de un baño termostático que mantiene una condición de temperatura para saturar el aire a una temperatura tal que al ser calentado se le otorgue una Humedad relativa adecuada para la condición de Humedad del sustrato (actividad de agua), o a una temperatura de bulbo húmedo adecuada para llevar al sistema a la temperatura óptima de fermentación, cuando por liberación de calor metabólico haya aumentado la temperatura en el lecho de fermentación.

La columna de humidificación tiene 0.15 cm de diámetro y 1 m de altura y fué calculada para saturar 120 lpm de aire. El baño termostático tiene un volumen útil de 65 litros, el elemento calefactor es una resistencia eléctrica de 1200 Watts la cual es accionada por un controlador proporcional. El calentador de aire consiste en una cámara donde está ubicada una fuente de energía radiante la cual es accionada en forma manual a través de un reostato. Se dispone además de un sensor de Humedad relativa el cual ha sido ubicado en la entrada de aire al compartimiento de fermentación. Este sensor es de marca NOVASINA y tiene una precisión de 0.1 % en la medición. Los sensores de temperatura en el lecho de fermentación son termocuplas del tipo K.

Hoy en día se encuentra en evaluación el sistema planteado realizándose pruebas de control manual de las distintas condiciones, para posteriormente poder diseñar un algoritmo de control automático de las distintas variables involucradas. Para esto se tiene considerada la adquisición de un computador y una interfase las que serán adquiridas con los fondos que restan de este año y con fondos destinados al tercer año de ejecución.

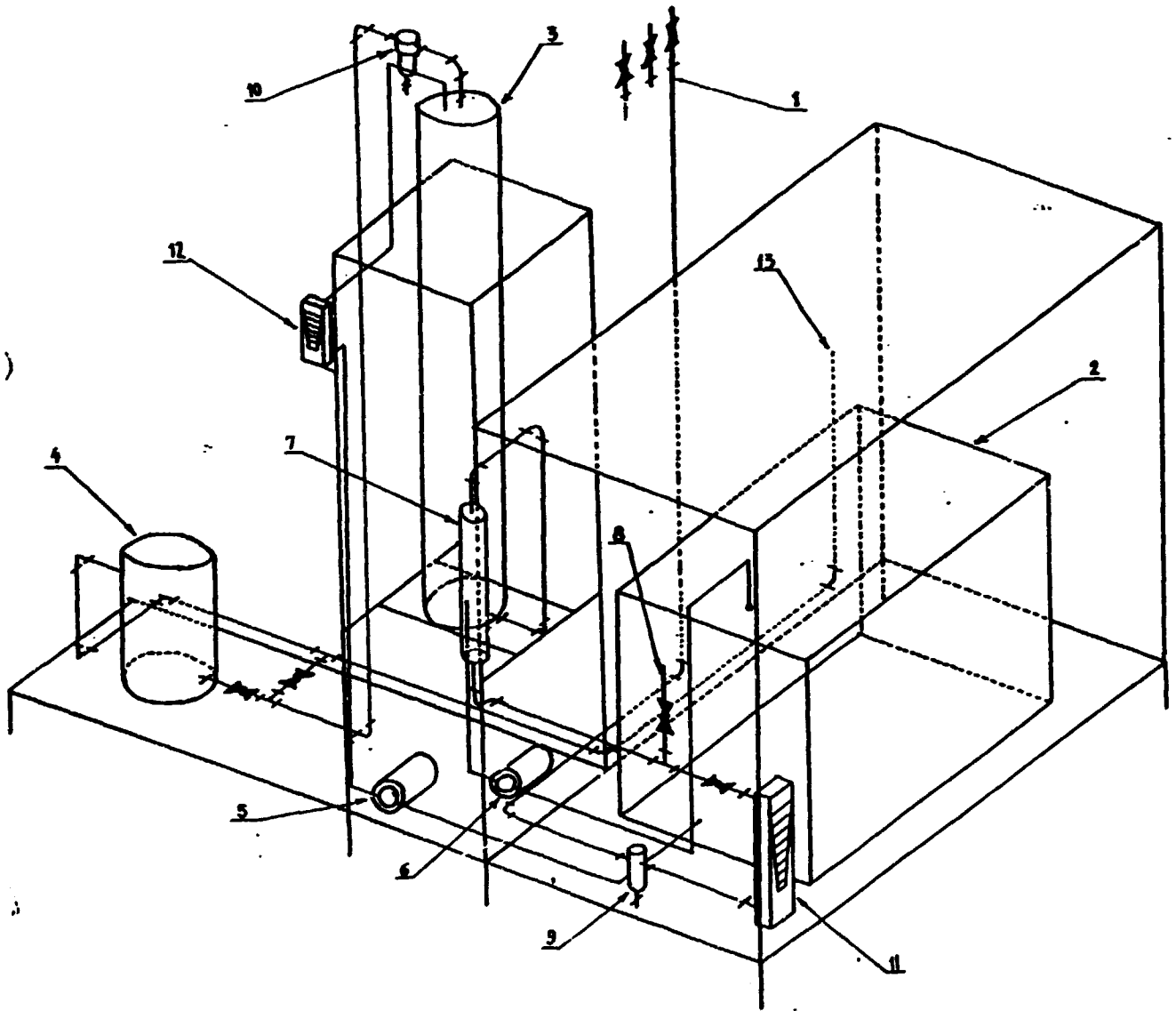
En el marco de este proyecto también se diseñaron y construyeron dos fermentadores de sustratos sólidos de nivel laboratorio, para la actividad referida a la producción de ligninasa, esto fué informado en el Quinto Informe de Avance. A continuación se entregan detalles del diseño de dichos equipos.

FIGURA N<sup>o</sup> E-1



- |     |  |      |   |
|-----|--|------|---|
| 1.- | Columna de humidificación                      | 10.- | Sensor de temperatura.                            |
| 2.- | Intercambiador de calor                        | 11.- | Compresor de aire.                                |
| 3.- | Baño térmico.                                  | 12.- | Rotámetro de aire.                                |
| 4.- | Reactor piloto                                 | 13.- | Regulador de presión                              |
| 5.- | Lecho sólido                                   | 14.- | Rotámetro de agua.                                |
| 6.- | Aspersores.                                    | 15.- | Bomba peristáltica.                               |
| 7.- | Sistema de poleas reguladoras<br>de velocidad. | 16.- | Filtro coalescedor.                               |
| 8.- | Filtro de aire.                                | 17.- | Señal de ajuste del set-<br>point de temperatura. |
| 9.- | Sensor de humedad relativa.                    | 18.- | Controlador de temperatura.                       |

Figura E-2





## DISEÑO Y CONSTRUCCION DE FERMENTADORES SOLIDOS

### a) Fermentador sólido estático.

Este es un fermentador de vidrio de un volumen de 2,5 l, el cual está aislado térmicamente con una camisa de lana de vidrio, de 1 cm de espesor. La temperatura dentro del fermentador se mide a través de termocuplas situadas en distintos puntos del lecho de sustrato. La entrada de aire húmedo es por el fondo del fermentador.

### b) Fermentador tipo tambor rotatorio.

Este es un fermentador cilíndrico de acero inoxidable de un volumen de 15 l, el cual rota gracias a la fuerza motriz proporcionada a través de una polea de transmisión desde un motor, la agitación es de 1 rpm. Posee una tapa a la cual se le ha implementado una manga de polietileno que permite tomar muestras en forma estéril. La temperatura se mide por medio de termocuplas situadas en distintos puntos del fermentador. El flujo de aire se distribuye en el interior del fermentador, a través de un eje central que posee diversos tubos cuyos extremos poseen una membrana porosa. De esta forma se logra que el aire se distribuya mejor en el interior del fermentador.

Para ambos fermentadores, la temperatura y la humedad relativa del aire, se logra por medio de un sistema de acondicionamiento de aire, el cual consiste en:

- a) Columna de Adsorción de Humedad
- b) Cámara de Calentamiento
- c) Columna de Humidificación

### Columna de adsorción de humedad.

Esta es una columna rellena con sílica gel, la cual hace disminuir la humedad relativa del aire inicial hasta un 40% y humedad absoluta a 0.005 g H<sub>2</sub>O/g aire seco. Se diseñaron dos columnas para ser utilizadas en forma alternativa mientras una de ellas se esté regenerando. Las dimensiones de cada una de estas columnas es:

**Columna 1:**

Largo: 0.61 m  
Diámetro: 0.05 m  
Masa sílica: 838.2 g  
Tiempo saturación: 9 horas

**Columna 2:**

Largo: 0.61 m  
Diámetro: 0.064 m  
Masa sílica: 1376.3 g  
Tiempo saturación: 15 h

**Cámara de Calentamiento.**

Esta es una cámara de acrílico que posee dos ampollas que permiten calentar el aire, que proviene de la columna de adsorción a temperatura ambiente, hasta 57°C que es la temperatura de entrada a la columna de humidificación.

La cámara tiene la forma de un cilindro de 20 cm de diámetro y 40 cm de largo. En cada uno de sus extremos posee tapas en las cuales están ubicadas las ampollas. Una de las ampollas está conectada a un Variac y permite calentar el aire a unos 2°C bajo la temperatura deseada, la otra ampolla está conectada a un sistema de control que actúa para llevar la temperatura al valor deseado (57°C). En el centro del cilindro están ubicadas en forma horizontal pequeños aletas que permiten agitar (y por lo tanto homogenizar la temperatura) el aire que pasa a través de la cámara.

**Columna de Humidificación.**

Esta columna está empacada con anillos Raschig y opera en contracorriente, tiene un espesor de agua por el tope y la entrada de aire por el fondo. El diseño se basó en el principio de humidificación-enfriamiento de gas, en el cual el líquido entra a la columna a la temperatura de saturación adiabática del gas entrante. En un sistema de este tipo, la temperatura del líquido total cae y se mantiene a la temperatura de saturación adiabática. El gas se enfría y humidifica, siguiendo la trayectoria de la curva de saturación adiabática sobre la carta psicrométrica, curva que pasa a través de las condiciones de gas entrante.

La temperatura de entrada del aire es 57°C y es enfriado hasta 25°C (temperatura de entrada al fermentador). La temperatura de

saturación adiabática es 24°C, por lo tanto el agua entra a la columna a esta temperatura. La humedad relativa del aire de salida es 90% y la humedad absoluta es 0.018 g agua/g aire seco.

La altura de la columna se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$H_{tg} = \frac{Z}{N_{tg}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde:

$N_{tg}$  : Número de unidades de transferencia de la fase gaseosa.

$H_{tg}$  : Altura correspondiente de una unidad de transferencia.

$Z$  : Altura total de la columna.

Además se tiene que:

$$N_{tg} = \frac{dY}{Y_{as} - Y} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde:

$Y_1$  : Humedad absoluta del aire de entrada.

$Y_2$  : Humedad absoluta del aire de salida.

$Y$  : Humedad absoluta del aire a lo largo de la columna.

$Y_{as}$ : Humedad absoluta de saturación adiabática del aire de entrada, que es constante.

$$H_{tg} = \frac{\psi S_{cg}^{0.5} (D/12)^{1.24} (Z/10)^{1/3}}{L^{0.6}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$S_{cg} = \frac{\mu_g}{\rho_g \Gamma_g} \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde:

$\psi$  : Constante que depende del porcentaje de inundación de la columna, 120.

$D$  : Diámetro de la columna.

$Z$  : Altura total de la columna.

$L$  : Velocidad másica por unidad de área del agua.



$S_{cg}$  : Número de Schmidt para el aire.

$\mu_g$  : Viscosidad del aire, 0.0195 (N s/m<sup>2</sup>)

$\rho_g$  : Densidad del aire, 1.095 10<sup>3</sup> (kg/m<sup>3</sup>)

$D_g$  : Difusividad del aire, 3.106 15<sup>5</sup> (m<sup>2</sup>/s)

El flujo de aire que entra a la columna es de 7000 ml/min, medido por medio de un rotómetro. Se consideró una velocidad del aire a través de la columna de 0.2 m/s, por lo tanto el diámetro de la columna resultó ser 2.7 cm. El flujo de agua que es alimentada a la columna se estipuló igual a 1.5 ml/min. Reemplazando los valores correspondientes en la ecuación 3 y 4, se obtiene:

$$N_{tq} = 0.26325 Z^{1/3} \quad (\text{Ecuación 5})$$

El valor de  $N_{tq}$  se obtuvo mediante integración numérica de la ecuación 2, resultando igual a 2.29. Reemplazando el valor de  $N_{tq}$  y la ecuación 5, en la ecuación 1 y despejando Z, se obtiene:

$$Z = 14.2 \text{ cm}$$

La columna está rellena con anillos Raschig de 0.4 cm de diámetro.

El control de la humedad relativa del aire que entra al fermentador se realizó a través de la medición de la temperatura de bulbo seco y húmedo del aire que sale del fermentador.

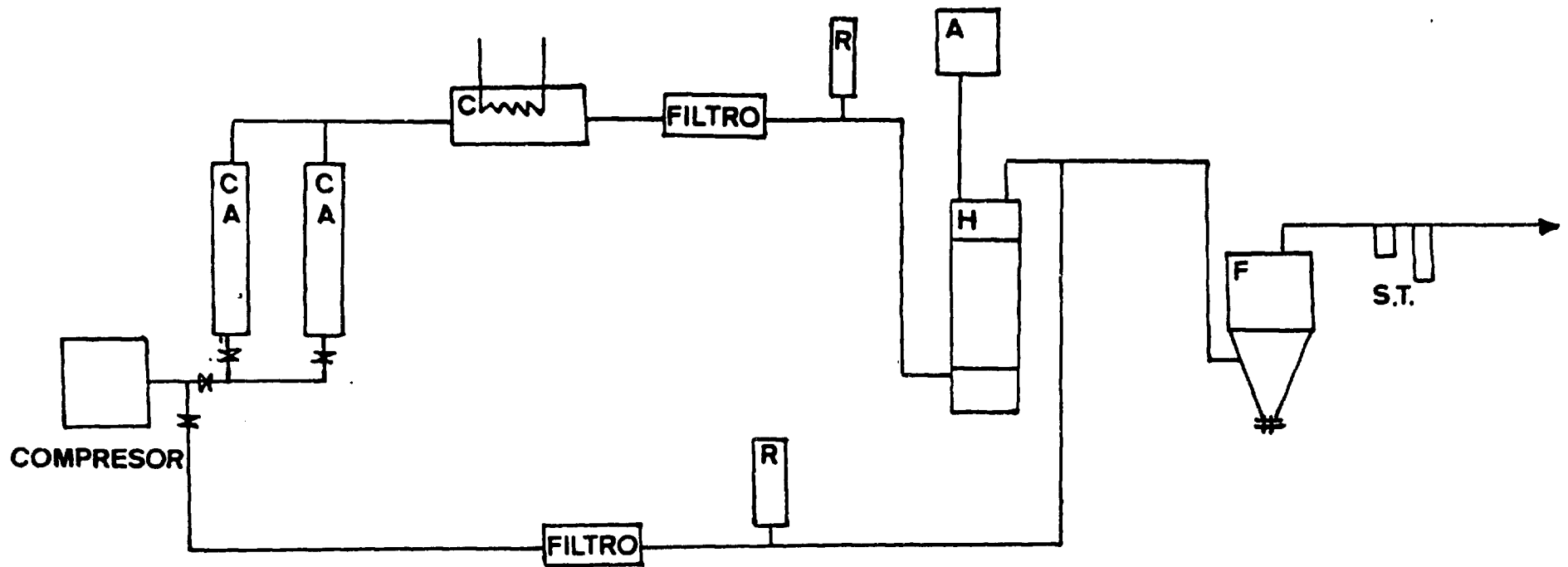
Todo el sistema desde la cámara de calentamiento (columna de humidificación, mangueras, etc.) ha sido aislado.

El agua que entra a la columna de humidificación proviene de un recipiente, aislado térmicamente por una camisa de lana de vidrio, que se mantiene a 24°C por medio de un termostato y es alimentada a la columna a través de una bomba peristáltica.

El aire que es alimentado a todo el sistema proviene de un compresor de marca Schultz de 1/2 Hp.

El sistema de acondicionamiento de aire se muestra en la siguiente figura:

# SISTEMA DE ACONDICIONAMIENTO DE AIRE



- CA : Columna de Adorción
- C : Cámara de calentamiento de aire
- R : Rotámetro
- A : Recipiente agua humidificación
- H : Humidificador
- F : Fermentador
- ST : Sistema medición temperatura bulbo seco y húmedo

## ACTIVIDAD F.

### PRUEBA DE OPERACION DEL FERMENTADOR PROTOTIPO

Se analizó el comportamiento del sistema de agitación con CAR con una humedad de 65 % y de una granulometría de 7-12 mesh, observándose deficiencias en el nivel de mezclado debido a las características reológicas del material húmedo, el cual adquiere un alto grado de compresibilidad por lo cual en vez de fluir se acumula sobre o contra las aspas del agitador, provocando un arrastre de la masa hasta un momento en que el roce generado por el movimiento de la masa es mayor que el roce de las poleas de transmisión, con lo cual éstas pierden tracción.

En cuanto al sistema de acondicionamiento de aire, se presentaron problemas en la operación de la columna de humidificación cuando se intentó saturar aire a una alta presión de operación, debido a que la bomba de recirculación de agua no tiene la suficiente presión de descarga.

## ACTIVIDAD G

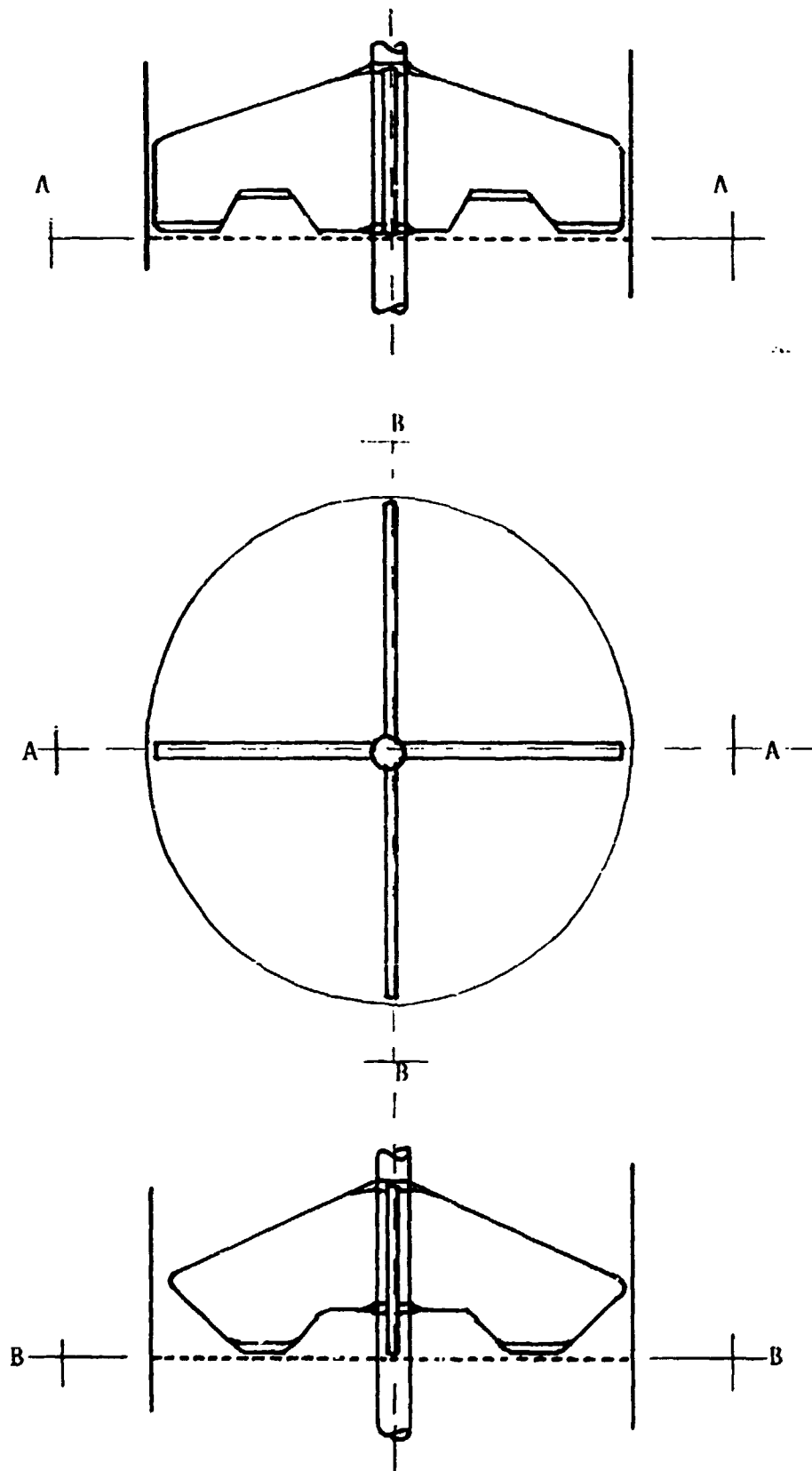
### MODIFICACIONES AL DISEÑO

Se implementarán las modificaciones al diseño y operación del fermentador prototipo conforme a la información obtenida en el punto anterior. Se plantea una modificación en el diseño del mezclador, la cual se muestra en la figura G.1. Esta nueva configuración ya ha sido probada con una pieza provisoria fabricada con latón, habiendo dado buenos resultados en cuanto al patrón de mezclado, por lo que en estos momentos se está cotizando la modificación definitiva que incluirá además un cambio en todo el sistema de transmisión, el cual se cambiará por un sistema de transmisión con cadenas.

Un estudio reciente de las isoterms de sorción de CAR, reportadas en el punto C de este informe, nos permiten anticipar que el sistema de agitación presentará menos problemas que los observados inicialmente (Actividad F), ya que sería posible trabajar a niveles de humedad menor y actividad de agua satisfactorios para el desarrollo del hongo.

En cuanto al sistema de acondicionamiento de aire se han planteado en principio las siguientes modificaciones: Cambiar la bomba de recirculación (centrífuga), por una de desplazamiento positivo que permita tener la seguridad de la mantención de un flujo constante dentro del rango de presiones de operación considerado. Instalar un by-pass a la columna de humidificación de tal forma de poder alimentar a la cámara de fermentación aire caliente seco y por lo tanto dar mayor versatilidad al sistema para estudiar la adecuada estrategia de control.

Figura G.1 : Propuesta de modificación al mezclador.



## ACTIVIDAD I

### ESTADIA DE INVESTIGACION

La estadia de investigación se realizó en la Planta Piloto de Fermentaciones del Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Mexico D.F., bajo la dirección del Prof. Mariano Gutierrez Rojas, entre el 27 de Abril y el 1° de Junio de 1990, posteriormente se realizó en el mismo lugar una estadia corta entre el 24 de Julio y el 3 de Agosto. El Depto. de Biotecnología cuenta con 16 laboratorios y 4 plantas piloto, la planta piloto de fermentaciones dependiente del Area de Microbiología, cuenta con equipamiento y servicios adecuados para el desarrollo de cualquier proceso de fermentación en sustrato sólido. Entre otros equipos se destacan cuatro fermentadores de sustratos sólidos de distintas configuraciones y con capacidad para procesar entre 10 y 25 Kg de material seco, microfermentador para cultivos sumergidos (5 a 14 l), equipo computarizado de captura de señales analógico-digitales, equipo digital de control automático, una prensa hidráulica para la recuperación de productos.

El trabajo desarrollado consistió en la evaluación de un nuevo sistema de acondicionamiento del aire para los requerimientos de una fermentación en sustratos sólidos. Dicho sistema consiste en una cámara que contiene agua caliente en la cual el aire puede ser calentado haciendolo pasar a través de un serpentín, humidificado por burbujeo dentro de la cámara, o precalentado y humidificado. Un diagrama de este sistema se muestra en la figura 1.1. El sistema se evaluó utilizando una columna de 1,4 m de altura y 20 cm de diametro interno, empacada con bagazo de caña pretratado y enriquecido en sales, sobre el cual se inoculó Aspergillus niger y se midieron los gradientes de temperatura generados durante la fermentación, a la vez que se probaban distintas condiciones de Humedad y temperatura en el aire de entrada. A través de estas experiencias se logró establecer que la temperatura de bulbo húmedo del aire a la entrada de la columna era la variable mas adecuada para poder mantener un buen control de la temperatura a todo lo largo de la columna.

En forma paralela se conocieron los distintos procedimientos experimentales desarrollados o implementados en dicho laboratorio para medir las cinéticas de crecimiento microbiano y generación de productos durante la fermentación.

Sin lugar a dudas la experiencia adquirida en esta estadia conllevará a un mayor desarrollo de las actividades del proyecto involucradas en la producción de enzimas por fermentación en sustratos sólidos. El laboratorio seleccionado para la estadia puede considerarse sin duda como el mejor equipado y con el grupo humano mejor capacitado en América Latina para el desarrollo de la FSS.

Figura I.1 : Sistema experimental de acondicionamiento de aire para fermentación en sustratos sólidos.

