



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th 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 for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org

20174

1954
-labios
-propolis

21/05/92

8º INFORME DE AVANCE

PROYECTO PNUD/ONUDI

**Degradacion enzimatica
de residuos agroindustriales**

**Preparado por: Andres Illanes
Mercedes Zaldivar**

Valparaiso, Junio 1992

A. PRESENTACION

El presente informe, octavo y segundo correspondiente al tercer año de ejecución del proyecto, contiene la información relativa al desarrollo de las actividades correspondientes a los últimos seis meses de este tercer año, de acuerdo al plan de trabajo comprometido en el documento Términos de Referencia.

Con ello se da por concluida la participación de instituciones chilenas en el proyecto, cuya tarea fue la de desarrollar la tecnología a nivel laboratorio y piloto para enriquecimiento proteico y producción de celulasas mediante fermentación en sustrato sólido de residuos celulósicos nacionales.

El trabajo desarrollado se encuentra reportado en los ocho informes de avance cuyo contenido en forma resumida es el siguiente:

Informe N° 1 : Se analizó la disponibilidad nacional de residuos lignocelulósicos, concluyendo luego de la evaluación de una gran cantidad de información disponible, que los materiales que ofrecían mejores perspectivas para ser empleados en el proyecto eran la coseta agotada de remolacha (CAR) y el aserrín de pino (AP).

Informe N° 2 : Se informó acerca del montaje de todas las técnicas analíticas a emplear en el proyecto y se entregó el diseño completo del fermentador prototipo a ser construido en el marco del proyecto.

Informes N° 3 y 4 : Se informó de los resultados obtenidos en el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos seleccionados previamente. Se realizó un completo estudio de explosión térmica con y sin SO₂ de AP y de hidrólisis ácida de CAR, seleccionándose en ambos casos las condiciones más adecuadas de proceso en términos del incremento de la degradabilidad enzimática in-vitro (DEIV) y de remoción selectiva de hemicelulosa en el caso de CAR.

Adicionalmente se estudió el efecto del pretratamiento biológico del AP, mediante la acción de ligninasas de Phanerochaete chrysosporium.

Informe N° 5 : Se informó acerca de los resultados obtenidos en el mejoramiento genético de una cepa nativa de Trichoderma aureoviride, mediante mutación y selección en base a la capacidad de sobreproducción de celulasa.

Se dió cuenta de la construcción y puesta en operación de una unidad de fermentadores de columna para la realización de las experiencias de fermentación en sustrato sólido (FSS) a nivel de laboratorio.

Se realizaron las primeras experiencias de FSS con las cepas de

T.aureoviride y la cepa de referencia T.reesei QM 9414, obteniéndose los mejores resultados con las cepas de T.aureoviride. Se dió cuenta también de la implementación de los sistemas auxiliares y sensores del fermentador prototipo encontrándose el fermentador diseñado para una capacidad máxima de 50 kilos ya construido.

Informe N° 6 : Se entregó los resultados completos de las experiencias de FSS con CAR cruda a nivel de laboratorio con las cepas de T.aureoviride, salvaje y mutante y las cepas de T.reesei, control y un mutante producido por el grupo de trabajo peruano en el marco del proyecto. Los mejores resultados se obtuvieron con las cepas de T.aureoviride, acordándose continuar el trabajo con dichas cepas, sin perjuicio de evaluar mutantes sobreproductores que se generaran más adelante. Con la cepa mutante de T.aureoviride y una cepa mutante de T.reesei, proporcionada posteriormente por el grupo peruano, se realizaron las experiencias de FSS sobre CAR pretratada en las condiciones previamente seleccionadas, obteniéndose los mejores resultados con el mutante de T.aureoviride, seleccionado para la ejecución de las experiencias de FSS a nivel piloto.

Se entregó los resultados de avance en el mejoramiento genético de T.aureoviride, con una completa caracterización fisiológica del mutante sobreproductor seleccionado.

Se dió cuenta de los avances en la implementación de los sistemas auxiliares del fermentador prototipo en lo relativo a acondicionamiento de aire y control de temperatura, describiéndose el esquema de control propuesto.

Se dió cuenta de la prueba de operación del fermentador prototipo, la que en términos generales fue satisfactoria, detectándose ciertas deficiencias en el padrón de mezclado y comportamiento del agitador.

Se realizaron modificaciones al diseño del sistema de agitación del fermentador prototipo, debido a las dificultades encontradas en la agitación del material fermentado, de compleja reología. Se diseñó un nuevo agitador que a escala menor satisfizo las exigencias del proceso y se encargó la construcción de la unidad piloto.

Se dió cuenta finalmente de la estadía del investigador chileno, ingeniero Germán Aroca, por seis semanas en la Planta Piloto de Fermentaciones de UAM, México, bajo la supervisión del Dr. Mariano Gutiérrez.

Informe N° 7 : Se dió cuenta de los resultados obtenidos a escala de laboratorio en la FSS de AP explotado en las condiciones previamente seleccionadas. Los resultados fueron considerados insatisfactorios por la baja degradabilidad in-vitro por parte de las cepas de T.aureoviride y T.reesei.

Se dió cuenta del criterio de selección de la cepa y el sustrato para las experiencias de FSS a nivel piloto.

Se dió cuenta de las actividades finales de instalación y puesta en operación de los sistemas auxiliares de monitoreo y control del fermentador prototipo.

Se dió cuenta de los resultados obtenidos en las pruebas productivas de FSS a nivel piloto, considerando una prueba preliminar y dos experiencias productivas que permitieron reproducir razonablemente los niveles finales de enriquecimiento proteico y producción de celulasas obtenidos a escala de laboratorio, aunque los perfiles cinéticos obtenidos no resultaron reproducibles. Se generó así la cantidad de material requerido para las pruebas nutricionales y toxicológicas y para la formulación del preparado enzimático con actividad celulolítica.

Se dió cuenta finalmente de los avances en el mejoramiento genético de T.aureoviride, reportándose la obtención de un mutante sobreproductor, parcialmente dereprimido en la síntesis de celulasa.

En el presente informe, conforme al plan de trabajo contenido en el documento Términos de Referencia, se da cuenta detallada de las siguientes actividades, que completan el compromiso de trabajo de las instituciones chilenas luego de los tres años de ejecución del proyecto:

Actividad D. Evaluación toxicológica del producto fermentado.

Se da cuenta de los resultados obtenidos en el estudio de toxicidad y evaluación nutricional del sólido fermentado enriquecido en proteína microbiana. El producto fermentado fue sometido a evaluación toxicológica y nutricional con ratas de laboratorio y pollos Broiler. El trabajo fue contratado al Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile, y ejecutado por el Doctor Osvaldo González.

Actividad E. Implementación del sistema de control y acondicionamiento de aire del fermentador.

En los dos informes anteriores se dio cuenta de esta actividad, quedando solamente pendiente la selección y compra del sistema de adquisición de datos para su acople al fermentador piloto. Los elementos del sistema están en este momento en trámite de importación a través de la Oficina PNUD Santiago. Debido al calendario de uso de los recursos no fue posible iniciar su compra hasta la recepción del segundo pago. Por otra parte, el monto de los recursos disponibles no permitió adquirir la unidad compacta que ofrece Cole-Parmer, por lo que se consideró como alternativa el

montaje del sistema en base a sus unidades componentes, que reduce significativamente el costo y permite mayor flexibilidad de operación. Esto desafortunadamente dilató la adquisición y, al no encontrarse disponible en plaza, debió importarse previendo disponer de él no antes de fines de junio, estando ya considerada su instalación y prueba de funcionamiento. Se entrega la información relativa a la selección del sistema.

Actividad F. Continuación del programa de mejoramiento genético de T.aureoviride.

Se da cuenta de los avances finales logrados en el programa de mejoramiento genético de Trichoderma aureoviride. Se da cuenta de la caracterización del mutante 6-14-11 cuya obtención fue reportada en el Informe de Avance N°7 y de la aislación de un nuevo mutante, de séptima generación, con mayor termotolerancia que las cepas anteriores y altos niveles de actividad celulolítica.

Actividad G.2. Experiencias productivas en fermentador prototipo y estabilización del preparado enzimático producido.

Esta actividad se encuentra completamente concluida y reportada en el Informe de Avance N°7. No obstante, por razones de los requerimientos de producto para su evaluación toxicológica y nutricional, debió operarse nuevamente la planta piloto, dándose cuenta de los resultados obtenidos (actividad G.2.1).

Se da cuenta asimismo de los resultados obtenidos en la recuperación de celulasas desde el sustrato sólido fermentado (actividad G.2.2) y del estudio de la estabilidad del preparado enzimático con actividad celulolítica producido por fermentación en sustrato sólido (actividad G.2.3)

Actividad H. Experiencias de sacarificación enzimática.

Se da cuenta de los resultados obtenidos en el estudio de sacarificación enzimática de coqueta agotada de remolacha con el preparado enzimático producido por fermentación en sustrato sólido. Se estudió el efecto de la dosificación enzimática y la temperatura en la cinética de sacarificación y se comparó los resultados obtenidos con aquellos con un preparado comercial de celulasa, bajo condiciones análogas.

Actividad I. Composición proximal y perfil aminoacídico del producto fermentado.

Se efectuó un análisis proximal al producto fermentado y un análisis de la composición aminoacídica de la proteína contenida. Ambos trabajos fueron contratados al Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, INTA, de la Universidad de Chile, y ejecutado por el Doctor Osvaldo Conzález.

Actividad J. Pasantía de investigación en Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Se da cuenta de las actividades realizadas durante la estadía de investigación del ingeniero chileno Sr. Christian Bernet en el Laboratorio de Micología y Biotecnología, a cargo del Dr. Marcel Gutiérrez, en la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú, entre el 15 de enero y el 29 de febrero de 1992.

Actividad K, L. Reuniones de coordinación.

Por razones que escapan a esta coordinación nacional, no se ha realizado reuniones de coordinación posteriores a la efectuada en Valparaíso en octubre de 1990.

Finalizada la participación de las instituciones chilenas, puede concluirse que se ejecutaron todas las actividades comprometidas, habiéndose logrado desarrollar una tecnología para el enriquecimiento proteico y producción de celulasas mediante fermentación en sustrato sólido de coseta agotada de remolacha con cepas nativas y mutantes genéticamente mejorados de Trichoderma aureoviride, producidos en el marco del proyecto. La tecnología fue desarrollada a nivel de laboratorio en columnas de lecho empacado del tipo Raimbault-Alazard y posteriormente escalada a nivel piloto en un fermentador diseñado y construido en el marco del proyecto, con una capacidad máxima de manejo de 50 kilos de material por lote.

En base a los resultados obtenidos las principales conclusiones que se derivan del trabajo realizado son:

- La coseta agotada de remolacha resultó un sustrato muy apropiado para su enriquecimiento proteico mediante la modalidad de fermentación en sustrato sólido, lográndose un elevado nivel de proteína con una disminución considerable del contenido de fibra.

- El pretratamiento de la coseta agotada de remolacha por hidrólisis ácida suave, estudiado en el marco del proyecto, resultó beneficioso en términos de degradabilidad del sustrato, obteniéndose mayores niveles de producción de celulasa que en el sustrato crudo.

- Los resultados obtenidos con aserrín de pino explotado como sustrato fueron insatisfactorios, tanto en cuanto a enriquecimiento proteico como producción de celulasas. Ello, no obstante los interesantes valores de digestibilidad enzimática in-vitro obtenidos.

- La cepa autóctona Trichoderma aureoviride y sus mutantes derivados crecieron adecuadamente en sistema sólido y produjeron niveles de celulasas comparables con los mejores reportados en

literatura y siempre por sobre los valores obtenidos con la cepa de referencia (Trichoderma reesei QM 9414) y con los mutantes proporcionados por el Dr. Marcel Gutiérrez en el marco del proyecto (T. reesei UC-4 y LM-1).

- Los mutantes seleccionados (principalmente T. aureoviride 7-121 y 6-14-11) produjeron niveles significativamente mayores de celulasas que la cepa madre, para un mismo nivel de enriquecimiento proteico. Adicionalmente se obtuvo con los mutantes un sistema enzimático menos sensible a represión catabólica por fuentes de carbono rápidamente metabolizable y mutantes con mayor termotolerancia, como el mutante 7-23-9 reportado en este informe.

- El fermentador diseñado y construido fue capaz de operar en condiciones de contención microbiológica, siendo posible controlar manualmente durante su operación humedad y temperatura mediante los sistemas de control instalados conforme a la estrategia planteada.

- Los resultados obtenidos a escala de laboratorio fueron reproducidos a escala piloto en lo referente a nivel de enriquecimiento proteico y producción de celulasas. No obstante, no fue posible lograr en las cuatro experiencias realizadas a nivel piloto un grado de reproducibilidad adecuado de los resultados, en especial en lo referente a la cinética del proceso.

- Se produjo en total, más de 80 kilos de material fermentado que fue utilizado en su mayor parte en los estudios nutricionales y toxicológicos, recuperándose parte de las celulasas producidas para estudios de estabilización y formulación del preparado enzimático.

- El producto fermentado fue sometido a evaluación toxicológica y nutricional con ratas de laboratorio y pollos Broiler. No se observó indicios de toxicidad, siendo asimilado sin dificultad el producto hasta niveles de un 20 % de la dieta total. Niveles mayores produjeron mermas en la tasa de crecimiento y peso respecto del control, lo que se atribuye al aún elevado contenido de fibra para el tipo de animal ensayado. Al nivel señalado, sin embargo, el producto puede ser empleado como aporte proteico en la formulación de alimento para animales monogástricos, como era el objetivo inicial del proyecto. El perfil aminoacídico de la proteína del producto es considerado de calidad aceptable en relación al patrón FAO y otras proteínas de origen microbiano.

- Las enzimas producidas fueron evaluadas en la sacarificación de coqueta agotada de remolacha pretratada, obteniéndose resultados que comparan favorablemente con los obtenidos en condiciones análogas con un preparado comercial de celulasa de Trichoderma reesei (ENZECO Cellulase Tv-1000)

- Se estudió distintos sistemas de estabilización y formulación del preparado enzimático producido, lográndose obtener por

precipitación con sulfato de amonio un producto estabilizado con una pérdida de actividad del orden del 15% luego de 62 días de almacenamiento. La pérdida de actividad se produce en los primeros días de almacenamiento, estabilizándose después, lo que permite anticipar un tiempo de vida media de nivel compatible con su eventual uso comercial.

Aunque no representa una actividad comprometida en el marco del proyecto, se está realizando actualmente un estudio de evaluación técnico económico para la producción en Chile de coqueta agotada de remolacha enriquecida por fermentación en sustrato sólido con cepas de Trichoderma aureoviride, considerando la recuperación de las enzimas producidas para su empleo en la industria nacional de jugos de fruta y en la industria textil. Se estima que el estudio estará concluido a fines del presente año, lo que permitirá evaluar la opción de transferencia tecnológica al sector productivo, con el cual no existe de momento contactos formales. Dicho estudio se pondrá a disposición de la Coordinación del Programa si lo estimare conveniente.

Debe señalarse que resultó difícil lograr mantener un nivel motivacional elevado en los laboratorios nacionales participantes, por lo que, luego del primer año, el trabajo fue realizado en forma muy principal por la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Católica de Valparaíso. Debe destacarse que la incorporación sustantiva a contar del segundo año del grupo de investigadoras del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, resultó un aporte de gran significación al proyecto al seleccionar, mejorar genéticamente y caracterizar el comportamiento de las cepas que en definitiva fueron empleadas en las actividades productivas del proyecto.

A nivel internacional debe destacarse un razonable nivel de coordinación con el grupo de investigación en Perú y un muy escaso nivel de coordinación con el grupo venezolano, en el que precisamente recaía la coordinación general del proyecto. Estimamos que esto representa un elemento negativo que, sin entrar a una impertinente calificación de nuestros colegas de proyecto ni soslayar las dificultades que a nivel nacional pudieron encontrar, creemos escapa de nuestra responsabilidad como país participante que, además de llevar el proyecto a término de acuerdo a los compromisos formales contraídos, mantuvo en todo momento un ánimo de coordinación y participación de sus resultados.

En el plano académico el proyecto ha servido de ámbito para la formación de investigadores jóvenes, dando la opción no frecuente de trabajo de escalamiento, diseño y construcción de equipos, de innegable valor formativo para estudiantes de ingeniería. El proyecto ha generado numerosas presentaciones a eventos científicos, dos publicaciones ya aceptadas por el comité editorial

respectivo y otra en preparación. Ha quedado un equipamiento importante que se espera poder continuar utilizando en apoyo a la línea de trabajo en fermentación en sustrato sólido.

Aspectos interesantes de considerar y que derivan del trabajo realizado son:

- La implementación de un sistema de control automático que puede ser adosado al sistema de adquisición de datos adquirido en el marco del proyecto. El análisis está ya realizado debiendo obtenerse el financiamiento correspondiente.

- La caracterización del preparado enzimático producido en relación a otras actividades hidrolíticas que permitirán una evaluación de su potencial de uso en la clarificación de jugos y en la elaboración de vinos, de gran relevancia para nuestro país.

- La necesidad de estudiar con mayor atención el sistema de recuperación de las enzimas desde el sólido fermentado. Los mejores resultados fueron obtenidos por extracción mediante suspensión acuosa; no obstante, esto diluye la enzima, lo que puede resultar muy incidente en el costo de proceso (ésto está siendo cuantificado en el estudio de evaluación técnico-económica ya señalado). De lo anterior se desprende la conveniencia de realizar un estudio más acabado de extracción por prensado, que optimice las principales variables de proceso e incluso considere distintas modalidades de operación, que no fueron abordadas en nuestros estudios.

- La aplicación de la experiencia y conocimientos adquiridos en el manejo de fermentación en sustrato sólido a la producción de otras enzimas y metabolitos microbianos. Actualmente se ha iniciado un preproyecto de producción de lactasa fungal por fermentación en sustrato sólido, que entronca con una tecnología ya desarrollada y escalada a nivel piloto para la producción de lactasa inmovilizada a partir de una lactasa fungal comercial, para la producción de permeado de suero hidrolizado, que ya ha sido favorablemente evaluado por la industria láctea nacional.

- Finalmente lo ya señalado en relación al estudio de factibilidad técnico-económica del proceso en nuestro país.

En mi calidad de coordinador nacional deseo dejar expresa constancia de mis reconocimientos al Coordinador General del Programa, Dr. Rodolfo Quintero y a la Oficina de PNUD en Santiago de Chile, por haber en todo momento facilitado de manera expedita nuestro trabajo. Ello sin duda contribuyó a mantener un alto espíritu de trabajo en los grupos que concluyeron el proyecto y a superar las dificultades derivadas de un proyecto complejo, tanto por la naturaleza misma de sus objetivos, como por la participación inicial de muchos grupos de trabajo cuyo aporte no fue en definitiva significativo.

D. EVALUACION TOXICOLOGICA DEL PRODUCTO FERMENTADO

Se realizó un acabado estudio toxicológico del producto de coseta agotada de remolacha (CAR) fermentado con la cepa Trichoderma aureoviride 7-121. El material fermentado fue producido en la unidad piloto, de acuerdo al procedimiento y con los resultados reportados en el Informe N°7. Dada la elevada cantidad de material requerido, fue necesario operar una vez más la unidad piloto, lo que se reporta en el punto G.2.1. de este informe. Para efectuar este estudio debió producirse una cantidad cercana a 80 kilogramos de material fermentado seco, muy superior al compromiso contraído en el documento Términos de Referencia.

Los resultados del estudio se encuentran contenidos en el Anexo 1, que corresponde al informe técnico elaborado por el Dr. Osvaldo González del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile.

El estudio permite concluir que el producto fermentado con T.aureoviride no presenta muestras de toxicidad en ratas de laboratorio, lo que es un aspecto positivo y esencial para el proyecto. A los niveles empleados en las dietas, 4, 8 y 16 %, el producto resultó completamente inocuo, lo que permite concluir que no existen contraindicaciones de tipo toxicológico para utilizar esta cepa en la elaboración de alimentos formulados para uso animal. Por otra parte los estudios reproductivos en ratas fueron muy positivos, no evidenciándose diferencias significativas respecto del control en ninguno de los niveles de dosificación empleados.

Los estudios nutricionales realizados en ratas son menos alentadores, dado los índices negativos de PER y NPR. El experto, no obstante, atribuye esto al alto contenido de fibra residual (20%) que aún contiene el producto y que resulta muy elevado en el alimento formulado, que requiere para este estudio una dieta con un 10% de proteína proveniente de la CAR fermentada, esto es, una dosificación por sobre el 30%.

Los estudios de crecimiento en pollos broiler permitieron demostrar que el producto dosificado en un 5% tiene un efecto benéfico, observándose una mejor respuesta en ganancia de peso y conversión de alimento que el control. A un nivel de 10% se observa una respuesta similar al control y solo a un nivel de 20% se observa un efecto negativo, con retraso en el crecimiento y menor conversión de alimento que en el control, lo que es directamente atribuible al alto contenido de fibra residual del producto.

Es interesante destacar que, no obstante que se logra una reducción significativa del contenido de celulosa y hemicelulosa (ver Actividad I), el contenido porcentual de lignina tiende a aumentar debido a su carácter completamente recalcitrante a la acción del

hongo y se incrementa el contenido de β glucanos que forman parte estructural de la pared del hongo. Sin duda este aspecto constituye el factor limitante en cuanto al uso del producto, lo que se confirma con los estudios nutricionales en pollos.

Existe en consecuencia un nivel máximo aceptable de dosificación entre 10 y 20% que es interesante de precisar, ya que el uso de este suplemento en alimentación de aves aún a nivel del 10% puede ser de interés para la industria avícola que se encuentra duplicando su capacidad productiva instalada en nuestro país.

E. IMPLEMENTACION DEL SISTEMA DE ADQUISICION DE DATOS.

En el Anexo 2 se entrega la descripción del sistema de adquisición de datos, que permite ser acoplado a los distintos sensores que se requiere para el monitoreo y control de la FSS. Se describe las características del sistema cuya adquisición está en trámite a través de la oficina PNUD Santiago y la de otras opciones que fueron descartadas por razones de costo.

El sistema de adquisición de datos deberá quedar acoplado a sensores de temperatura del lecho sólido y del baño térmico y, a través de una interfase, a sensores de temperatura de aire y de humedad relativa del aire.

F. CONTINUACION DEL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENETICO DE
T. AUREOVIRIDE

Se da cuenta de la caracterización del mutante 6-14-11, cuya aislación fue reportada en el Informe de Avance N°7. Se confirma la mayor tolerancia térmica de este mutante en relación a la cepa 7-121. Sus niveles de producción de celulasa, celobiasa y xilanasas a 33°C son entre un 50 y 100% superiores a los de las cepa 7-121. No obstante, al comparar esos resultados con los obtenidos a 28°C, se observa un menor nivel de actividad enzimática y un tiempo de latencia mayor, lo que disminuye la productividad.

Como consecuencia de ello, se decidió someter la cepa 6-14-11 a un nuevo proceso de mutación, empleando como criterio de selección la capacidad de crecer y producir celulasas a 35°C. De los clones de 7ª generación obtenidos, se seleccionó la cepa clasificada 7-23-9 que produce a 33°C niveles de celulasas significativamente superiores a las cepas 7-121 y 6-14-11. No obstante, el nivel producido es aún inferior al de la cepa parental 6-14-11 a 28°C, asemejándose al de la cepa 7-121 a esa temperatura.

Puede concluirse en consecuencia que se ha cumplido esencialmente el objetivo planteado en el documento Términos de Referencia al obtenerse un mutante apreciablemente más termotolerante y que produce niveles de celulasa a 33°C comparables a los de la cepa parental a 28°C. Se considera que se podría obtener a futuro resultados de mayor significación práctica a través de la continuaciones del programa de mejoramiento genético, dada la reiterada obtención de mutantes genéticamente estables hasta la 7ª generación.

Los detalles de la metodología y resultados obtenidos se encuentran contenidos en el Anexo 3 de este informe.

G.2. EXPERIENCIAS PRODUCTIVAS EN FERMENTADOR PROTOTIPO Y ESTABILIZACION DEL PREPARADO ENZIMATICO PRODUCIDO

G.2.1. Operación de fermentador prototipo para suministrar material para evaluación toxicológica y nutricional y recuperación de enzimas.

Debido a los requerimientos de producto para los estudios toxicológicos y nutricionales, se decidió realizar una cuarta fermentación piloto.

Metodología

Se intentó desarrollar una estrategia de asepsia más rigurosa durante el cultivo, por lo que la metodología descrita tuvo las siguientes modificaciones:

esterilizar la coseta agregándole una mayor humedad (25 % aproximadamente), agregar al medio de cultivo un agente antibacteriano como tetraciclina (al 0.012 % respecto del peso total), mantener durante la fermentación una menor humedad del aire de entrada (aproximadamente un 82 %) y por último, realizar un arrastre con vapor a presión al fermentador vacío para asegurar su esterilidad inicial.

La propagación del micelio, la preparación del fermentador y el medio de cultivo se realizaron de la misma forma que en las otras fermentaciones. La única variación fue que parte del agua en que se disolvían los nutrientes, ahora fue agregada a la coseta para su esterilización.

Resultados y Discusión

Por tratarse de una experiencia con fines productivos no se siguió la cinética completa de enriquecimiento proteico y producción de celulasas, resgistrando solo los valores finales del cultivo.

Se obtuvo una producción enzimática inferior en un tercio a la obtenida en fermentaciones anteriores, lo que se atribuye al efecto del antibiótico empleado que mostró afectar en cierta medida la actividad de celulasa. No se descarta un posible efecto adverso como consecuencia de la temperatura, que en algunos momentos alcanzó los 30°C y al mayor nivel de agitación que fue requerido para controlarla.

El nivel de enriquecimiento proteico obtenido estuvo también por debajo de valores anteriores, alcanzándose un tenor de proteína del 30.1 %, lo que puede ser consecuencia de la menor actividad enzimática producida. Al final del cultivo no se detectó una baja en la actividad de celulasa como ocurrió en otras fermentaciones a nivel piloto, lo que podría estar avalado por el hecho de que en

este caso no se detectó contaminación bacteriana con su consecuente actividad proteolítica.

En la figura 1 se presenta el perfil de pH, en que se detecta inicialmente una leve disminución y luego sube hasta llegar a valores de pH 6 a las 150 horas de cultivo.

A partir de las 40 horas el aumento fue brusco, lo que se debería al rápido crecimiento detectado en forma visual (se aprecian muchos más focos blancos de micelio que otras veces).

En general el perfil de pH durante la fermentación fue similar al obtenido en otras experiencias piloto o laboratorio.

En la figura 2 se observan los perfiles de humedad y actividad de agua del lecho sólido. La evolución de la humedad no manifiesta mayor variación y se estabiliza alrededor del valor de diseño (65 %). Esto es consecuencia de que las sucesivas pasadas de aire seco (HR menor que 50 % por 10 minutos) no provocan secado del lecho de cultivo.

El perfil de actividad de agua tiene una tendencia global poco clara. Aunque inicialmente aumenta, al final termina en valores menores que 0.95. Como se ha observado anteriormente, no se ha podido obtener una correlación aceptable entre la humedad y la actividad de agua del sólido.

En la figura 3 se presenta la evolución de temperatura del lecho sólido y los valores de los parámetros de control manipulados. Primeramente es necesario mencionar que en esta fermentación hubo dos aspectos que dificultaron la evacuación del calor generado. Uno, como ya se ha mencionado, es la detección visual de un comienzo más vigoroso de la fermentación (relacionado con el estado del inóculo). El otro aspecto es la existencia de un medio ambiente levemente más cálido que en otras oportunidades, debido al tiempo de verano. Esto tuvo como consecuencia que los elementos de control para calefaccionar (foco infra-rojo para aire de entrada y resistencia para calentar baño del humidificador) estuvieran sin uso durante todo el cultivo.

Al observar la figura 3.a se puede ver que hasta las 30 horas de cultivo la temperatura estuvo alrededor de 25 °C; sin embargo de ahí en adelante ésta comienza a subir, no lográndose bajarla mediante pulsos de agitación mecánica. Cuando el cultivo pasa los 28 °C (a las 50 horas) como estaba programado se comienza a realizar pasadas cortas de aire seco. Esto se aprecia en la figura 3.b a la hora 50, lo que se realiza conjuntamente con un enfriamiento por hielo del agua de humidificación. Este enfriamiento se refleja en la temperatura del aire de entrada (figura 3.b) que baja a valores de 18-19 °C. Esto último se realizó debido a que la temperatura de entrada del aire (22-23 °C) era muy

alta para tener un gradiente de temperatura respecto del cultivo (25 °C) que permitiera enfriamiento por aire.

Esta acción conjunta de control, además de agitación manual, logra bajar la temperatura del lecho sólido después de la hora 50, como se aprecia en la figura 3.a. Sin embargo la temperatura no tarda en volver a subir generando otra acción similar de control a la hora 60, con igual resultado.

Esta estrategia se continuó durante la fermentación, pero a pesar de esto hubo una clara tendencia al alza de temperatura. Cabe destacar que se logró mantener la mayor parte del cultivo en un rango de temperatura entre 25-30°C, que corresponde a un rango aceptable para la producción de biomasa y enzima.

Por último cabe hacer notar que el agregar aire seco al fermentador por tiempos mayores, podría haber facilitado el enfriamiento del lecho sólido, pero se habría producido un secado del mismo, como aconteció en experiencias anteriores. Se trató de que no ocurriera esto último, teniendo en cuenta que la humedad relativa del aire de entrada esta vez fue menor que la empleada en otras fermentaciones.

Puede concluirse que en la presente fermentación se logró eliminar la contaminación bacteriana como consecuencia de la asepsia más estricta llevada a cabo. La observación al microscopio permite apreciar sólo una contaminación menor por levaduras.

Los niveles de actividad enzimática y enriquecimiento proteico resultaron por debajo de lo esperado, por las razones ya señaladas. Cabe mencionar que una observación del micelio en crecimiento permite apreciar que luego de sucesivos períodos de agitación, presenta una apariencia física bastante más deteriorada, lo que indica que esta agitación perturbó el vigoroso crecimiento inicial. Sin embargo, es claro que la agitación del cultivo fue necesaria para romper focos calientes y canalizaciones de aire que se fueron creando conforme avanzaba la fermentación.

Puede concluirse que se ha logrado la reproducibilidad de ciertos comportamientos típicos en FSS piloto, como variación de pH, humedad y perfil térmico del lecho sólido, en respuesta a las variables de control manipuladas. No obstante, las medidas tomadas para lograr un mayor nivel de asepsia, aunque eficaces desde esa perspectiva, provocaron una disminución del nivel de enzima producido, lo que plantea la necesidad de una mayor experimentación para lograr un control más efectivo del proceso.

En esta última operación se produjo una cantidad cercana a los veinte kilos de material fermentado, en base seca, el cual fue sometido a la operación usual de secado y molienda. Una parte del material fue remitida a INTA para la finalización de los estudios toxicológicos y nutricionales y el material restante fue almacenado

para fines demostrativos y eventuales análisis. Se adjunta una muestra del producto, que por sus características de aroma y sabor resultó apetecible para los animales de prueba.

6.2.2. Experiencias de recuperación y estabilización de celulasas.

- Recuperación de celulasas del sustrato sólido.

Estudios de recuperación de enzimas extracelulares en fermentación en sustrato sólido (FSS), han permitido demostrar la simplicidad del proceso. Se ha reportado extracción estática por simple percolación o elución, obteniéndose un extracto limpio sin necesidad de recurrir a la filtración del líquido percolado o eluido (1). También se ha realizado la extracción por agitación del material sólido en un solvente acuoso, produciéndose en este caso desorción de la enzima con un cierto grado de desintegración del sólido. Finalmente debe mencionarse la extracción por prensado, que tiene la ventaja de producir una dilución menor de la enzima, pero con menores rendimientos de recuperación.

Se reporta los resultados del estudio de recuperación de celulasas por extracción en diferentes solventes acuosos, realizándose posteriormente en el solvente seleccionado un estudio del efecto de la razón solvente:soluto y del tiempo de extracción.

Estudios preliminares de extracción por prensado, produjeron resultados inferiores a los obtenidos por extracción acuosa, siendo preliminarmente descartada como alternativa.

Metodología

Se trabajó con muestras de material fermentado (coseta agotada de remolacha, CAR), con T.aureoviride 7-121 en columnas de Alazard - Raimbault, de 11 días de fermentación, con humedad de sólidos de 69% y pH 6,3. Alternativamente se utilizó material proveniente de las experiencias realizadas a nivel piloto.

El primer estudio consistió en determinar el solvente acuoso más apropiado. Muestras de 2 gramos de material fermentado fueron sometidas a extracción en 30 ml de distintos medios líquidos durante 5 min. a 125 rpm. Los medios líquidos utilizados en la extracción enzimática fueron agua destilada y tampón citrato pH 4,8; considerándose también su suplementación con Tween 80 y cloruro de sodio, de modo de estudiar la efectividad del surfactante en la desorción del complejo enzimático y de solubilización por salado al emplear NaCl a un nivel de fuerza iónica 0.5 M. En estas experiencias, la razón de extracción utilizada fue de 2 gramos de material fermentado en 30 ml de medio líquido. Cada muestra fue agitada por 5 min. a 125 rpm y el extracto

se centrifugó por 10 min. a 5000 rpm. En el sobrenadante obtenido se analizó la actividad degradativa sobre papel filtro, por el método del ácido dinitrosalicílico, actividad de celobiasa por cuantificación de la velocidad inicial de hidrólisis de celobiosa a glucosa, medida por Glucostat, y proteína excretada por el método modificado de Lowry, de acuerdo a los procedimientos analíticos previamente reportados.

Una unidad de papel filtro (UPF) se definió como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de equivalente de glucosa por minuto, empleando papel Whatman No 1 como sustrato, en condiciones estandarizadas según lo reportado previamente. Una unidad de celobiasa (UC) se definió como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de glucosa por minuto, empleando celobiosa como sustrato, en condiciones estandarizadas según lo reportado previamente.

Una vez seleccionado el solvente, se estudió el efecto del tiempo de extracción y de la razón solvente: soluto. En el primer caso se analizó 5, 10, 20 y 30 min. para una razón de 2 gramos de sólido en 30 ml de solvente. Una vez seleccionado el tiempo de extracción, se estudió razones soluto:solvente de 2:5, 2:10, 2:20, 2:30, 2:40 y 2:50 (en g de sólido por ml de solvente). Las restantes condiciones se mantuvieron como en el primer estudio.

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos con distintos solventes acuosos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Actividad en papel filtro y proteína excretada por gramo seco logradas en experiencias de extracción con diferentes medios líquidos.

MEDIO LIQUIDO	UPF/g.seco	Prot Excr./g.seco
Tampón Citrato pH 4.8	11.88	0.051
Agua destilada	13.04	0.060
Tampón + 0.1 ml tween 80	11.95	0.049
Agua dest. + 0.1 ml tween 80	11.50	0.046
Sol. 0.3 M Na Cl en tampón	11.88	0.047

De los resultados obtenidos, puede observarse que la mayor cantidad de proteína extraída se logró con agua destilada produciéndose aumentos de un 9 - 11% en la actividad de papel filtro respecto de los otros medios líquidos utilizados. Aunque las diferencias observadas son poco significativas, resulta obvia la conveniencia de utilizar agua destilada como solvente. En todos los casos la actividad específica de la proteína extraída fue similar.

Los resultados del efecto del tiempo de extracción en agua destilada como solvente se presentan en la Figura 4, en donde puede observarse que se produce una significativa extracción de proteína en los primeros 10 min. y que tiempos mayores producen solo un leve aumento. En cuanto a la enzima, se observa un aumento moderado de la recuperación al aumentar el tiempo de extracción en el rango estudiado.

Los resultados del efecto de la razón solvente:soluto, para un tiempo de extracción seleccionado de 10 min., se muestran en la figura 5, tanto para la actividad de papel filtro como para la actividad de celobiasa. El máximo nivel de extracción de celulasa (actividad de papel filtro) se obtiene para la razón 20 ml: 2 g. En el caso de celobiasa y proteína total extraída, se observa un incremento fuerte de la recuperación hasta una razón 20 ml: 2 g, aumentando solo muy levemente a razones solvente:soluto mayores.

En base a los resultados obtenidos puede concluirse que las condiciones más favorables para la extracción enzimática desde los sólidos fermentados son 20 ml de agua destilada por 2 gramos de sólido por durante 10 min. Los resultados obtenidos en extracción por prensado (no mostrados) resultaron significativamente inferiores a los obtenidos por extracción acuosa. Aparentemente se produce una importante inactivación como consecuencia del incremento térmico que de momento no ha sido resuelto, debido al diseño de la prensa. El problema está actualmente siendo estudiado en mayor profundidad, por estimarse que no es conveniente descartar definitivamente una alternativa que tiene la ventaja de producir un extracto enzimático más concentrado.

El mayor nivel de extracción con agua destilada es contrario a lo que se anticipó. Se obtuvo un efecto negativo al incrementar moderadamente la fuerza iónica hasta la zona de solubilización por salado (salting-in), mediante la adición de cloruro de sodio o tampón citrato.. El fenómeno puede atribuirse a la distorsión producida por la cantidad de sal remanente adsorbida al sólido (principalmente sulfato de amonio) que pudo haber llevado la concentración salina más allá del punto de solubilización por salado (salting-out), afectando en consecuencia negativamente la extracción de proteína enzimática.

Pudo observarse que la razón celobiasa:celulasa (UC / UPF) extraída en la fermentación en sustrato sólido de CAR con T. aureoviride es de 1.64, valor superior en aproximadamente un 23% a la obtenida en fermentación sumergida con un sistema análogo (2).

Bibliografía:

- (1). THIEMAN, J. E. 1985. Produção de Enzimas por Fermentação em Substrato Semi-Sólido com Especial Referências às Celulasas. En Anais Do Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas. Vol I. Maringá, Brasil: 107 - 131.

(2). CABELLO, A. L. 1991. Producción de Celulasas de T. aureoviride II en Cultivo por Lotes Alimentado con Sustrato Sólido. Tesis para optar al título de Magister en Ciencias de la Ingeniería con mención en Ingeniería Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso.

- **Estabilización de celulasas mediante adición de agentes preservantes.**

Con el propósito de establecer la estabilidad de almacenamiento del preparado enzimático producido, se realizaron experiencias de almacenamiento con distintos agentes preservantes en diferentes dosificaciones, sugeridas por literatura. Esta información es relevante, ya que la eventual utilización de la enzima requiere una estabilidad compatible con los tiempos de almacenaje y comercialización. Se estima que el tiempo de uso de una enzima no debería ser inferior a los seis meses luego de producida. Por otro lado se requiere mantener el preparado enzimático libre de contaminación microbiana.

Metodología

Se empleó muestras de extracto enzimático producido en las condiciones descritas en la sección anterior. Estas muestras fueron formuladas con los siguientes agentes estabilizantes:

Sorbato de Potasio	0.2 % p/v
Timerosal	0.1 % v/v
Azida de Sodio	0.02 % p/v
Glicerol	50.0 % v/v
Glicerol + Timerosal	50% v/v; 0.1 % v/v

A cada una de las muestras anteriormente señaladas, además de un control (sin preservante), almacenadas en cámara fría a 10 °C, se les siguió la cinética de pérdida de actividad durante 60 días.

La actividad de papel filtro se determinó de acuerdo a lo indicado previamente.

Resultados y Discusión

En las figuras 6 a 10, se observan los efectos de cada uno de los preservantes estudiados sobre la estabilidad de la celulasa, en relación al control.

En Tabla 2, se registra el pH inicial del caldo luego de la adición de los preservantes.

Tabla 2: pH inicial de los caldos de fermentación tras la adición preservantes.

Preservante	pH
Control	5.28
Sorbato	5.96
Timerosal	5.31
Azida	5.59
Glicerol	5.25
Glicerol + Timerosal	5.3

El preparado enzimático se mantiene bastante estable durante los primeros 30 días de almacenamiento, con pérdida de actividad por debajo del 10 %. Curiosamente el único caso en que se observa una pérdida mayor, del orden del 20 %, es con glicerol + timerosal.

Para este periodo de almacenamiento no se observan diferencias significativas entre las muestras con preservante y el control.

Luego de 60 días ya es posible observar diferencias entre las muestras preservadas y los respectivos controles. Sin adición de preservantes se produjo al cabo de 60 días una disminución del 55% en la actividad de papel filtro. Con azida de sodio se produjo una disminución de solo un 34%. Le siguen en efectividad el timerosal y la mezcla glicerol-timerosal con una disminución del 40%. Los restantes preservantes ensayados produjeron una disminución superior al 45%.

Durante el tiempo señalado no se observó contaminación en las muestras preservadas con azida, glicerol y timerosal. En cambio las muestras con sorbato de potasio y los controles fueron contaminados, siendo la contaminación ostensible al cabo de 60 días.

Desafortunadamente el efecto de estabilización más significativo fue con azida de sodio, que no es un producto de grado alimentario. Aún así y aunque las diferencias con el control fueron significativas, el efecto de estabilización de estos agentes no puede considerarse satisfactorio.

- Recuperación y estabilización de celulasas mediante precipitación por salado

Con el fin de lograr un preparado estabilizado se estudió la recuperación y almacenamiento del preparado enzimático por precipitación con sulfato de amonio (salting-out), que demostró ser una buena alternativa en la recuperación de celulasas producidas

Tabla 2: pH inicial de los caldos de fermentación tras la adición preservantes.

Preservante	pH
Control	5.28
Sorbato	5.96
Timerosal	5.31
Azida	5.59
Glicerol	5.25
Glicerol + Timerosal	5.3

El preparado enzimático se mantiene bastante estable durante los primeros 30 días de almacenamiento, con pérdida de actividad por debajo del 10 %. Curiosamente el único caso en que se observa una pérdida mayor, del orden del 20 %, es con glicerol + timerosal.

Para este periodo de almacenamiento no se observan diferencias significativas entre las muestras con preservante y el control.

Luego de 60 días ya es posible observar diferencias entre las muestras preservadas y los respectivos controles. Sin adición de preservantes se produjo al cabo de 60 días una disminución del 55% en la actividad de papel filtro. Con azida de sodio se produjo una disminución de solo un 34%. Le siguen en efectividad el timerosal y la mezcla glicerol-timerosal con una disminución del 40%. Los restantes preservantes ensayados produjeron una disminución superior al 45%.

Durante el tiempo señalado no se observó contaminación en las muestras preservadas con azida, glicerol y timerosal. En cambio las muestras con sorbato de potasio y los controles fueron contaminados, siendo la contaminación ostensible al cabo de 60 días.

Desafortunadamente el efecto de estabilización más significativo fue con azida de sodio, que no es un producto de grado alimentario. Aún así y aunque las diferencias con el control fueron significativas, el efecto de estabilización de estos agentes no puede considerarse satisfactorio.

- Recuperación y estabilización de celulasas mediante precipitación por salado

Con el fin de lograr un preparado estabilizado se estudió la recuperación y almacenamiento del preparado enzimático por precipitación con sulfato de amonio (salting-out), que demostró ser una buena alternativa en la recuperación de celulasas producidas

por fermentación sumergida de cepas de T.reesei (1). La precipitación por salado tiene la ventaja adicional de permitir la concentración del preparado enzimático, ya que por lo general el precipitado resultante es altamente soluble y puede por tanto ser resuspendido en un pequeño volumen de líquido.

Metodología

La precipitación de la enzima desde el extracto se efectuó con sulfato de amonio al 67% de saturación, en tampón citrato pH 4.8. A fin de no provocar zonas de mayor fuerza iónica se agregó bajo agitación la solución saturada de sulfato de amonio al extracto enzimático. Posteriormente la mezcla resultante se mantuvo en cámara fría a 10°C, por 24 horas. Transcurrido este tiempo, la suspensión conteniendo la enzima precipitada, se centrifugó a 11.000 rpm. durante 15 min.

Luego, se midió cuidadosamente el volumen del sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 15 ml de tampón citrato pH = 4.8.

Al sobrenadante, al precipitado resuspendido y al caldo inicial, se les midió la actividad sobre papel filtro, de acuerdo al procedimiento usual.

Muestras de precipitado enzimático en sulfato de amonio al 67% de saturación fueron almacenadas en cámara fría, estudiándose la estabilidad por un período de 64 días.

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en la precipitación con sulfato de amonio se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Precipitación de celulasas del extracto enzimático con sulfato de amonio.

	UPF/ml	Vol. (ml)
Caldo inicial	0.253	50
Sobrenadante	0.018	150
Precipitado resusp.	0.653	15

Al realizar un balance de actividad, se obtiene:

$$UPF_c = UPF_s + UPF_p + UPF_d$$

donde:

- UPF_e = Actividad total inicial
 UPF_m = Actividad total en la solución sobrenadante luego de la precipitación
 UPF_p = Actividad total en el precipitado resuspendido en tampón.
 UPF_d = Actividad perdida en el proceso

Reemplazando valores se tiene:

$$\begin{aligned}
 0.253 * 50 &= 0.018 * 150 + 0.653 * 15 + UPF_d \\
 12.65 &= 2.70 + 9.80 + UPF_d \\
 12.65 &= 12.50 + UPF_d
 \end{aligned}$$

Luego: $UPF_d = 0.15$

El porcentaje de recuperación de actividad de papel filtro es:

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Recup.} &= (9.80 / 12.65) * 100 \\
 &= 77.5\%
 \end{aligned}$$

El porcentaje de actividad remanente en el líquido descartado es:

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Reman.} &= (2.7 / 12.65) * 100 \\
 &= 21.3\%
 \end{aligned}$$

Y el porcentaje de pérdida de actividad es:

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Pérd.} &= (0.15 / 12.65) * 100 \\
 &= 1.19\%
 \end{aligned}$$

La estabilidad del precipitado enzimático, mantenido en solución al 67% de saturación con sulfato de amonio se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Estabilidad de celulasa precipitada con sulfato de amonio al 67% de saturación, al macenada a 10 °C.

Tiempo (días)	UPF/ml	UPF	% Recuperación
0	0.157	3.14	100
32	0.125	2.50	80
64	0.130	2.60	83

No se observó ningún signo de contaminación microbiana en el preparado enzimático al cabo de dicho tiempo de almacenamiento.

La precipitación por salado con sulfato de amonio resultó un sistema adecuado para la recuperación de la celulasa en el extracto enzimático. Se produjo una pérdida de actividad durante la operación de precipitación de solo un 1 %. La actividad no precipitada, en cambio fue de algo más de un 20 %. Este valor es significativo, pero puede ser reducido trabajando a una concentración de sal mayor, la que no fue ensayada, tomando el valor de 67 % de saturación de experiencias previas de recuperación de celulasas de caldos fermentados con T.reesei.

La precipitación por salado produjo un efecto significativo en la estabilización del preparado enzimático. Luego de 64 días se produjo una pérdida de solo el 17 % de la actividad inicial, que se compara muy favorablemente con un 34 % para el mejor de los preservantes ensayados y un 55 % para el control sin preservantes. La pérdida de actividad se produjo en los primeros días de almacenamiento, estabilizándose luego sin posterior decaimiento. Ello permite anticipar un tiempo de vida media de almacenamiento elevado, compatible con su eventual aplicación industrial.

Bibliografía

- (1). SCHAFFELD, G., ILLANES, A., NUÑEZ, L. 1988. Recovery of cellulase from spent broth of sugar beet pulp fermentation by Trichoderma reesei. MIRCEN J. of Appl. Microbiol. Biotechnol. 4, 414-417.

Figura N° 1. Perfil de pH del cultivo,
tercera FSS celulasa.

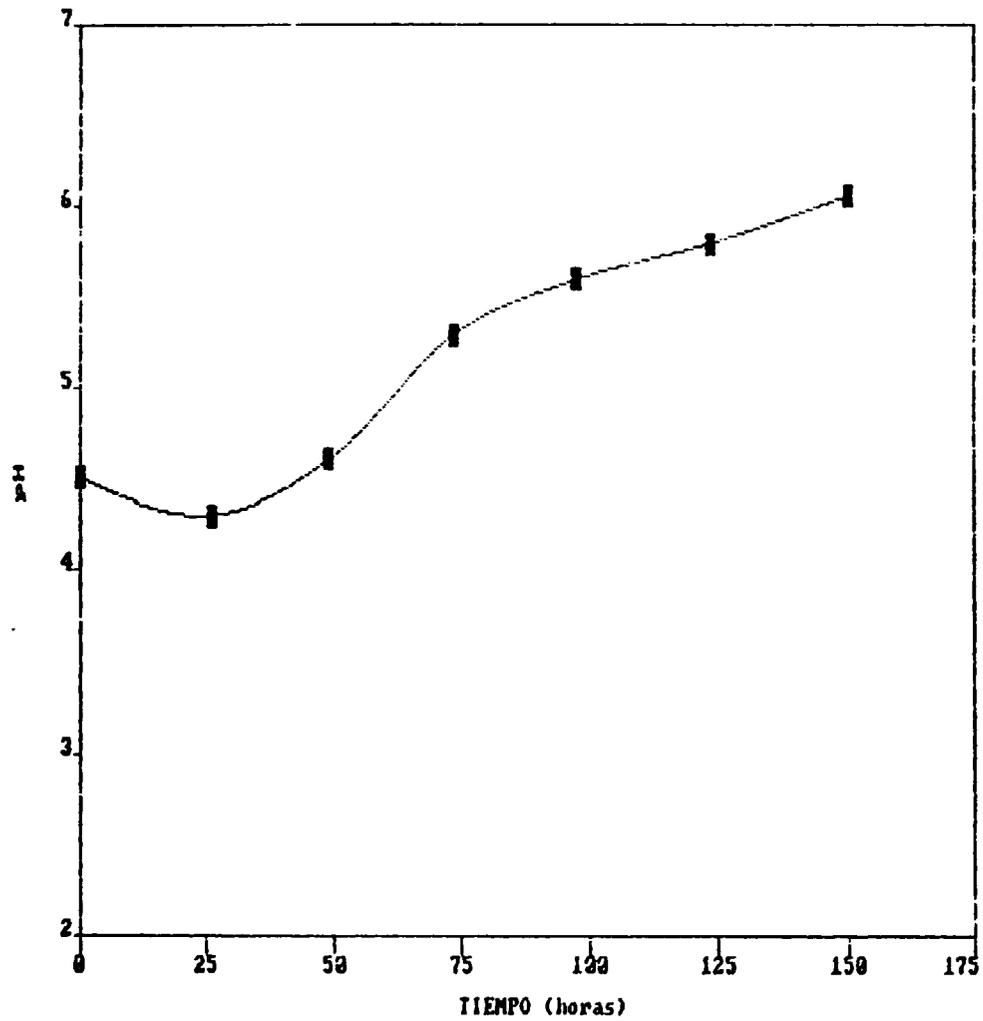


Figura N° 2 Perfiles de humedad y actividad de agua en lecho sólido, tercera FSS celulasa.

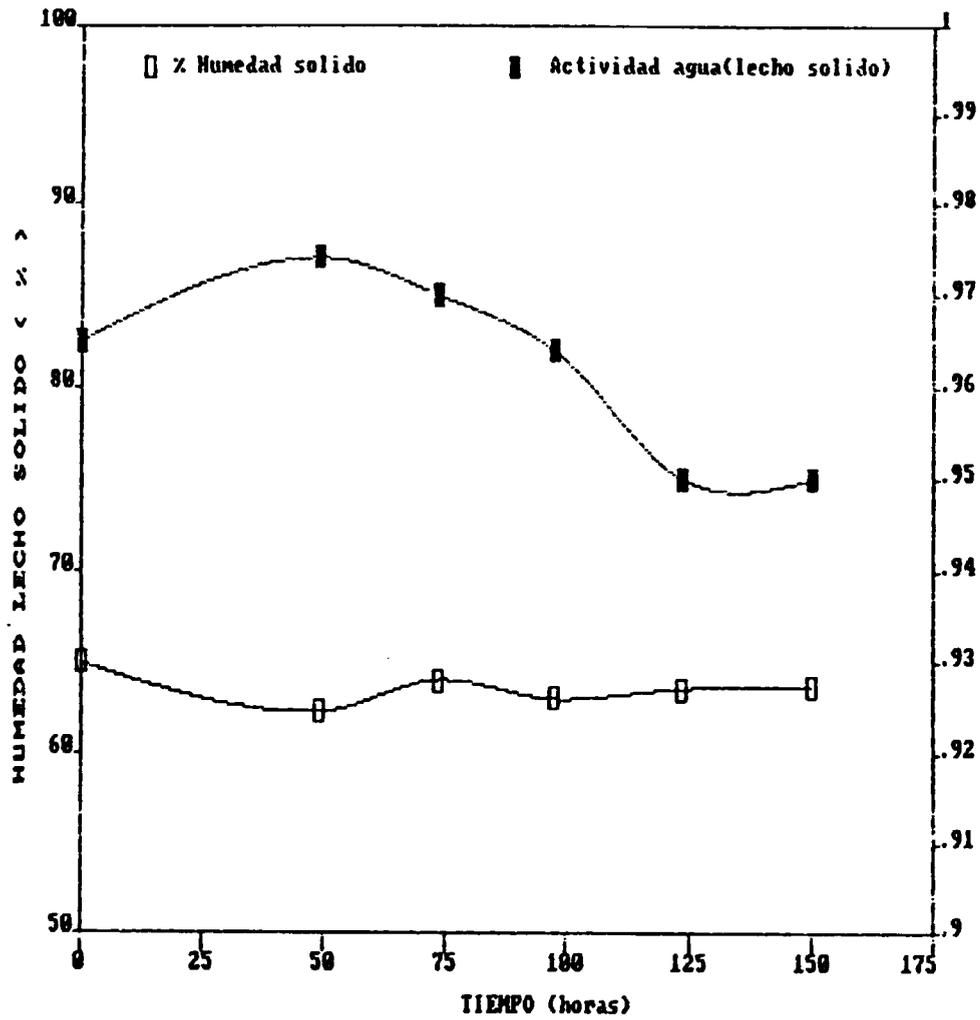


Figura N° 3a. Evolución de temperatura del lecho sólido, tercera FSS celulasa.

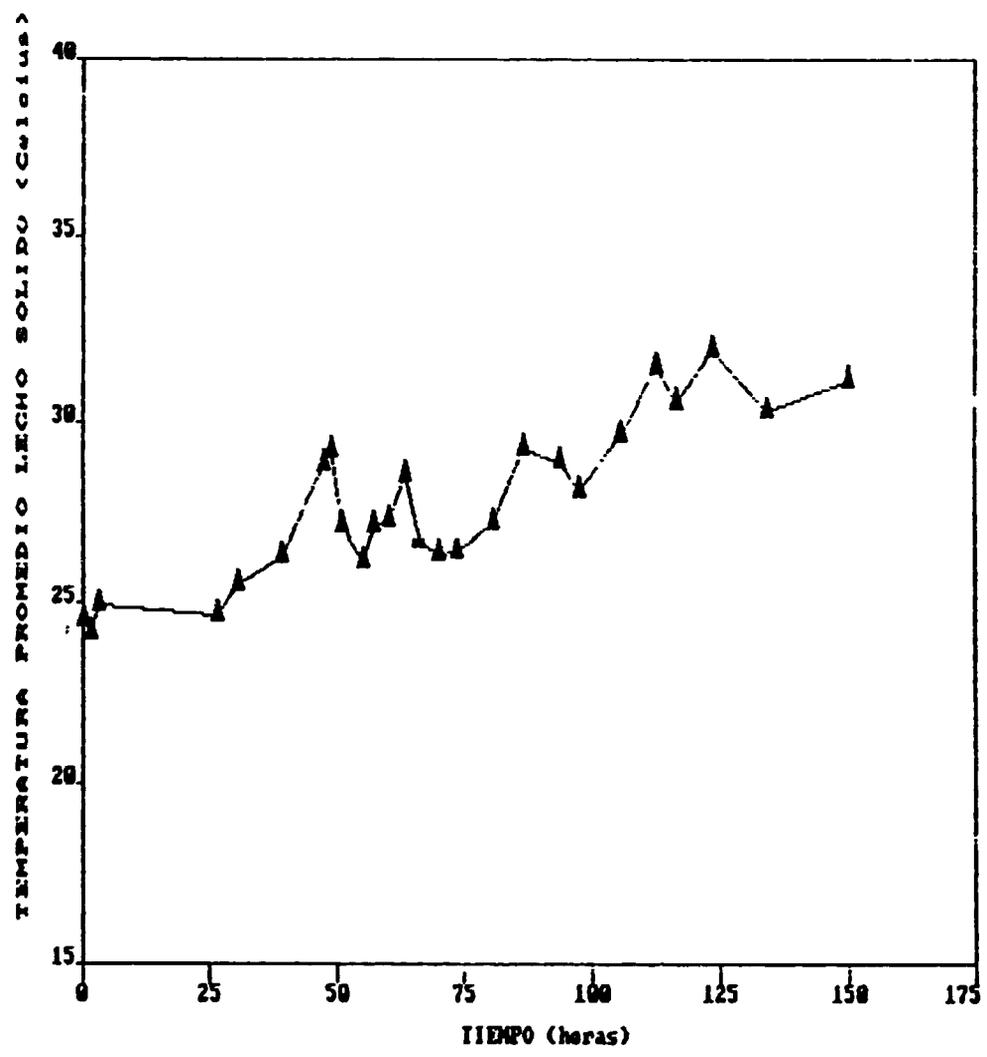
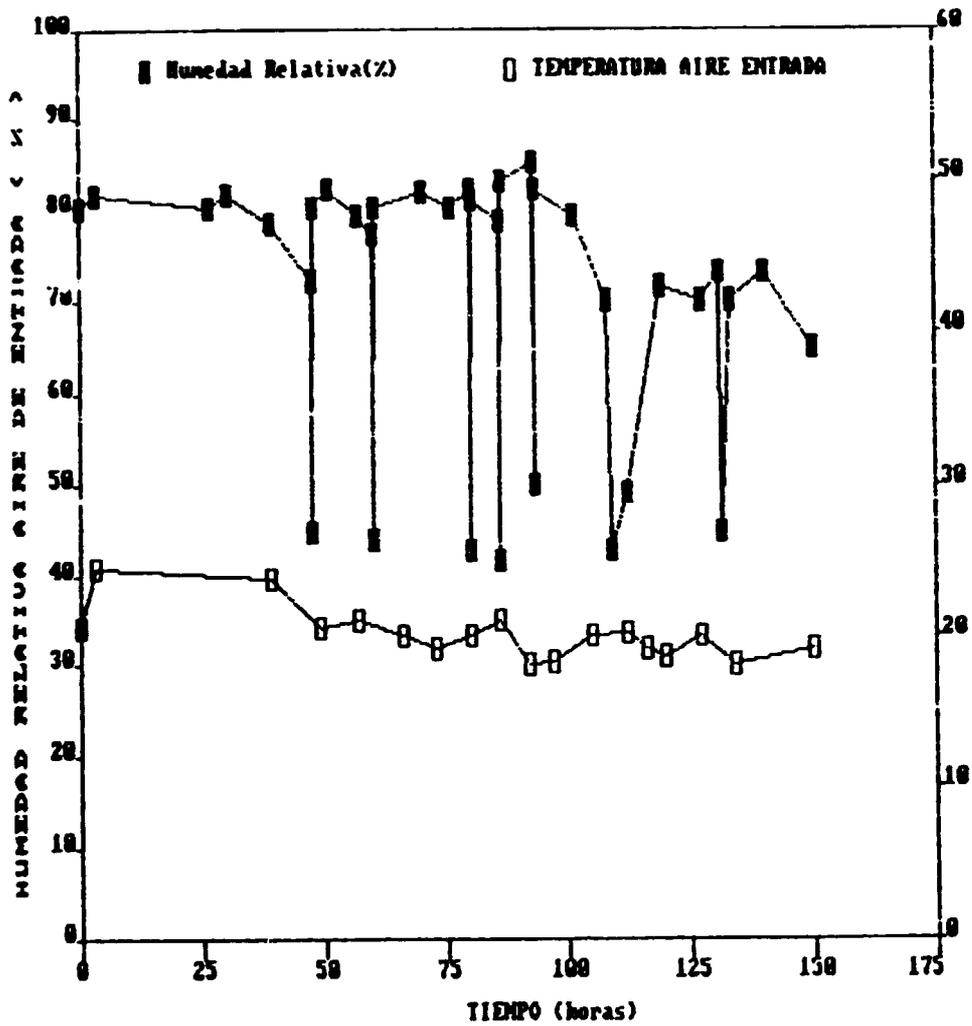


Figura N° 3b. Valores de los parámetros de control manipulados, tercera FSS celulosa.



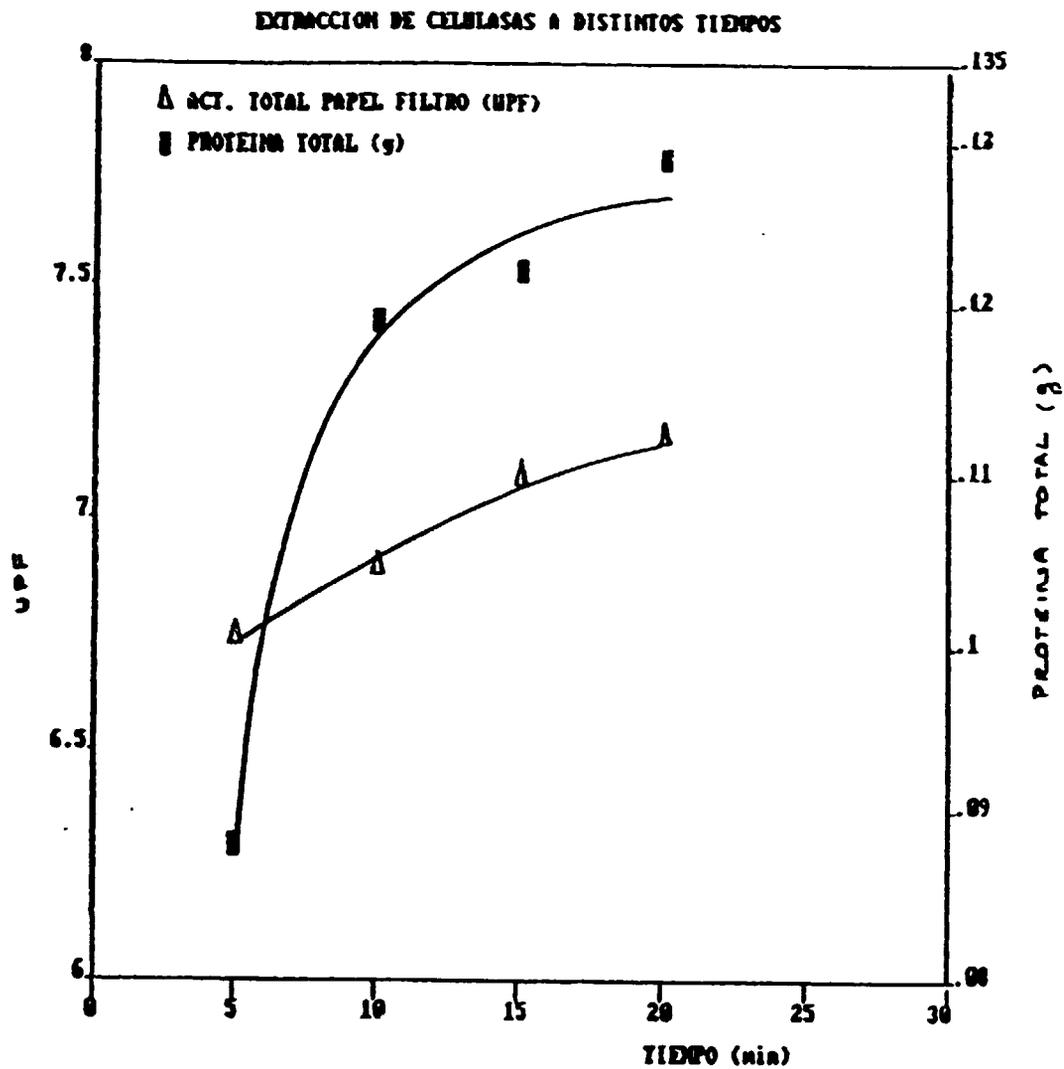


Figura 4 : Recuperación de celulasas para distintos tiempos de extracción en medio acuoso.

EXTRACCION ENZIMATICA.

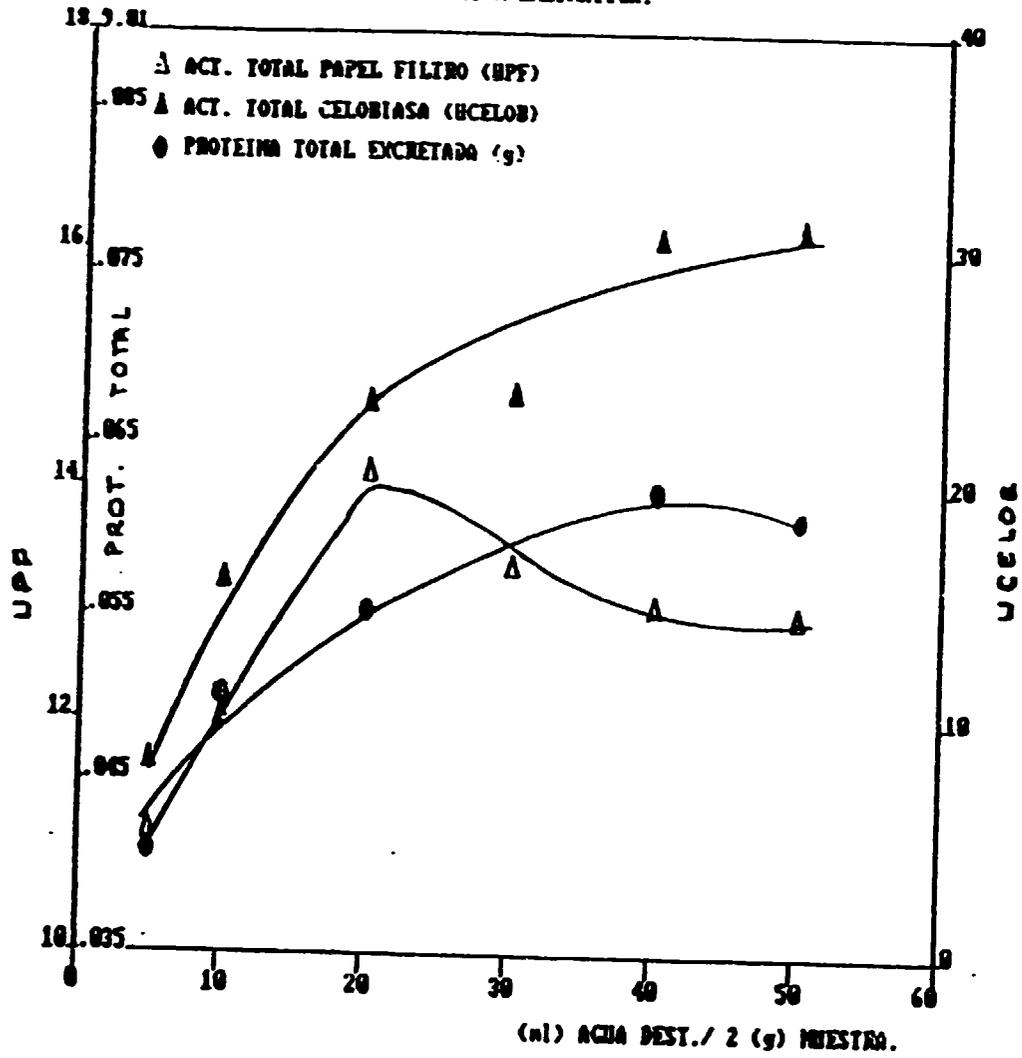


Figura 5: Recuperación de celulasas mediante extracción en medio líquido para diferentes razones sólido - líquido.

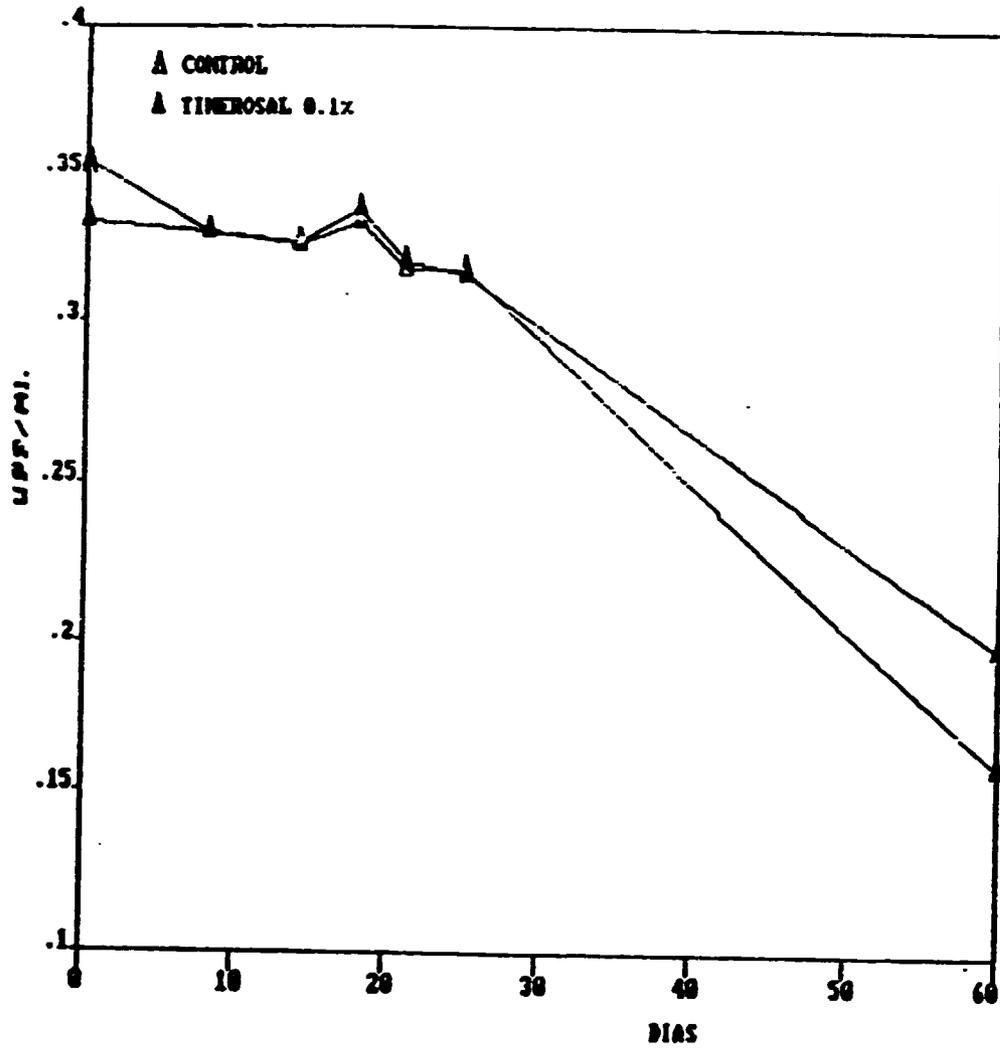


Figura 7 : Ensayos de estabilidad en caldos de fermentación con adición de Timerosal al 0,1 %.

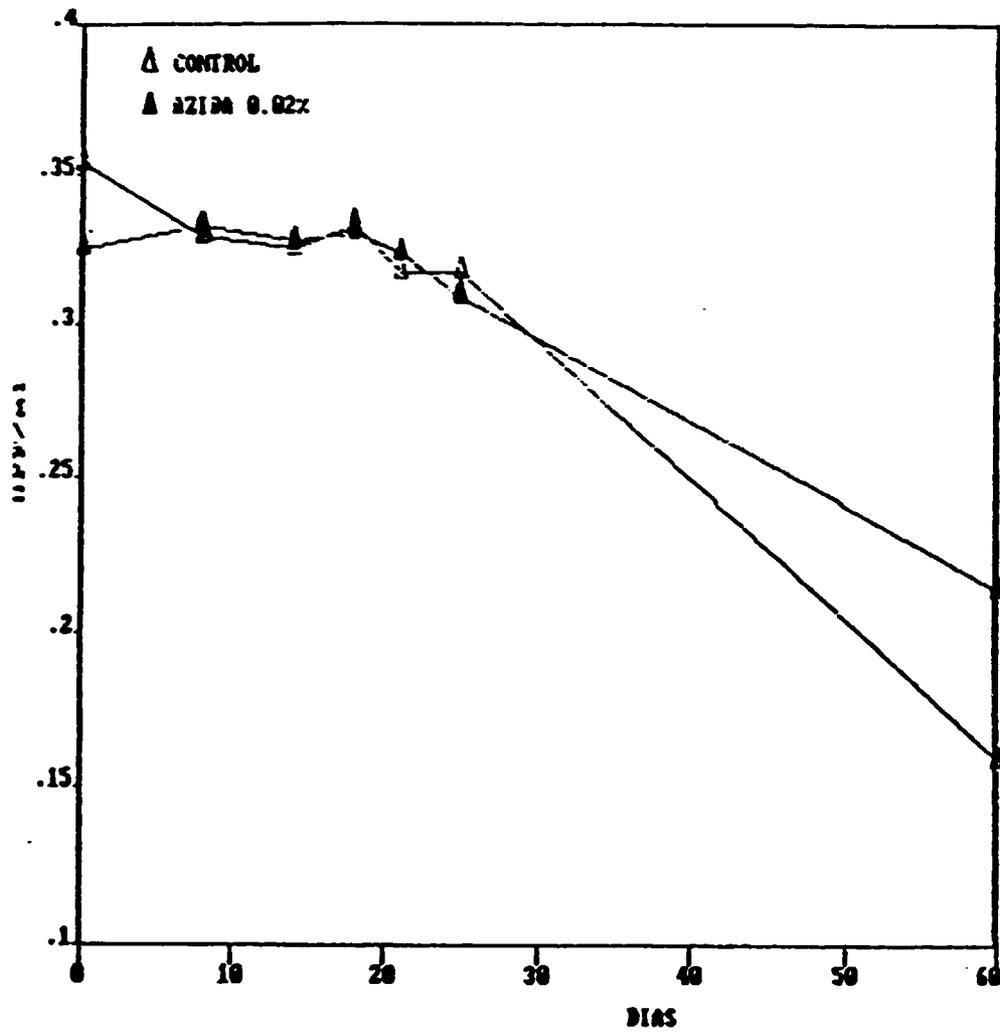


Figura 8 : Ensayos de estabilidad en caldos de fermentación con adición de Azida de Sodio al 0,02%.

EXPERIENCIAS DE ESTABILIDAD

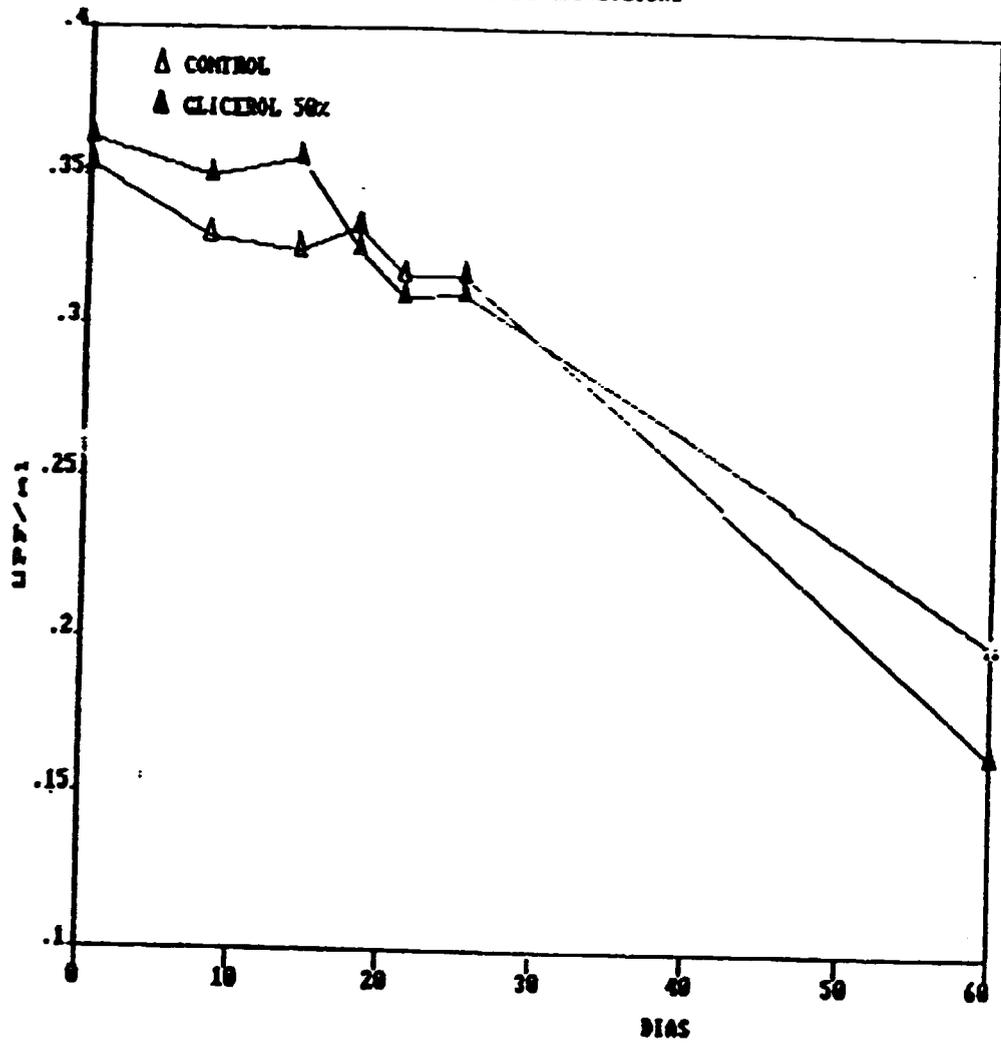


Figura 9 : Ensayos de estabilidad en caldos de fermentación, con adición de Glicerol al 50 %.

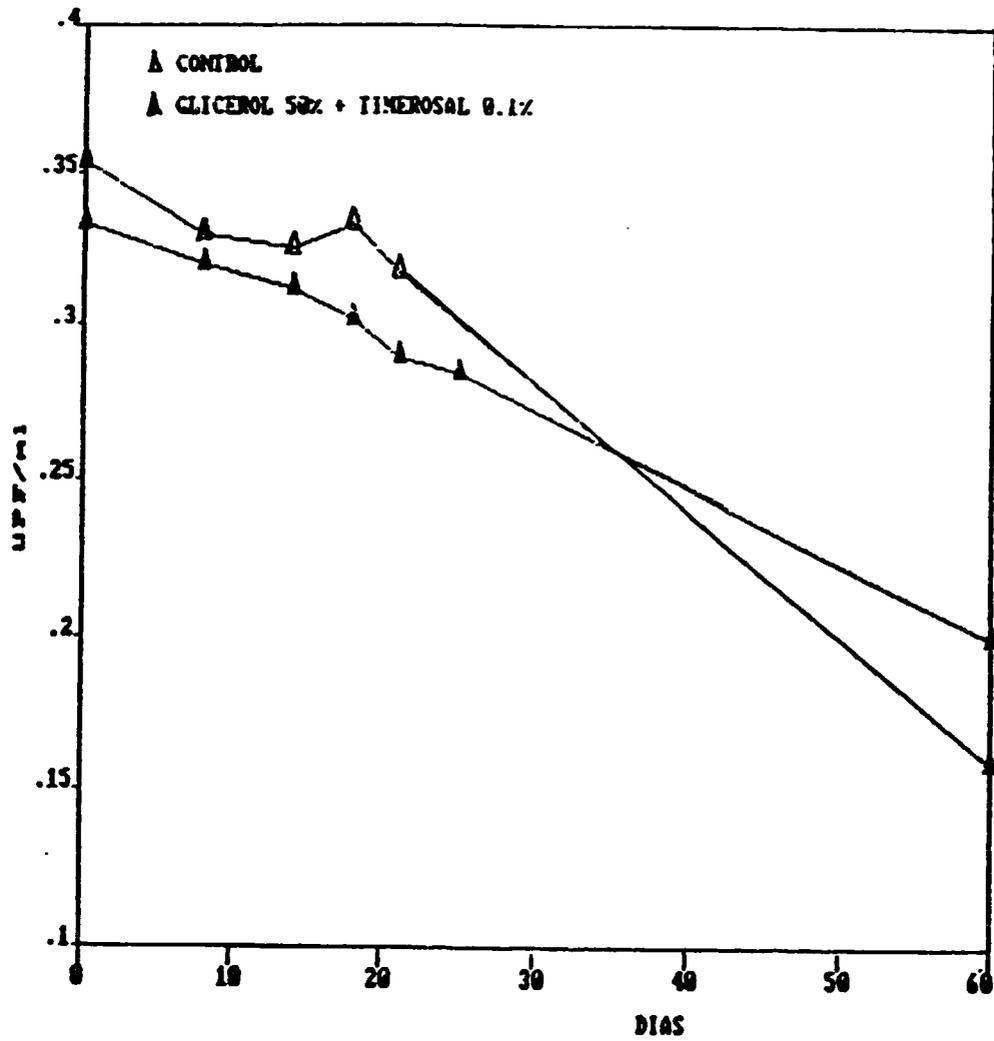


Figura 10 : Ensayos de estabilidad en caldos de fermentación, con adición de Glicerol al 50 % y Timerosal al 0,1 %.

H. SACARIFICACION ENZIMATICA.

Como una forma de evaluar la calidad del preparado enzimático producido por FSS con T.aureoviride 7-121, se estudió la sacarificación enzimática de coqueta agotada de remolacha (CAR).

El sustrato utilizado fue pretratado mediante hidrólisis ácida suave, que permite la solubilización selectiva de la hemicelulosa contenida en la CAR. Las condiciones del pretratamiento fueron las previamente establecidas (ver Informe de Avance N° 6).

Las experiencias de sacarificación se realizaron bajo las condiciones establecidas como óptimas encontradas para una celulasa comercial, trabajando sobre CAR (1).

Metodología

Las condiciones de operación utilizadas en hidrólisis ácida fueron las siguientes:

CAR	= 25 g/l ; +60 -100 mallas
H ₂ SO ₄	= 0.274 M
Temperatura	= 80 °C
Velocidad agitación	= 300 rpm
Tiempo	= 1 h

La resuspensión resultante fue neutralizada con NaOH 1 M, filtrada lavada repetidamente con agua destilada y posteriormente el sólido retenido secado en estufa a 60 °C.

Las experiencias de sacarificación se realizaron sobre CAR pretratada químicamente por hidrólisis ácida suave. No obstante a fin de evaluar la efectividad del pretratamiento en cuanto a degradabilidad del sustrato, se consideró una experiencia control con CAR cruda (sin pretratamiento).

El preparado enzimático utilizado fue obtenido a partir del extracto proveniente de FSS en CAR con T.aureoviride 7-121, conteniendo 0.734 UC/ml y 0.445 UPF/ml. Como control se empleó un preparado comercial de celulasa de T.reesei (ENZECO Cellulase Tv-1000, Enzyme Development Corporation, New Yory, EEUU), utilizado al mismo nivel de actividad de celulasa. El preparado comercial debió ser previamente precipitado con sulfato de amonio y dializado a fin de remover la gran cantidad de azúcares empleadas en su formulación.

Las experiencias de sacarificación se llevaron a cabo en un reactor de vidrio Pyrex de 4 litros, provisto de un sistema de agitación mecánica con un propulsor de cuatro aspas. El volumen de trabajo fue de 2 litros y se trabajó a 500 rpm. La concentración de

sustrato empleada fue de 10 g/l de CAR (pretratada o cruda) y el pH del sistema fue ajustado a 4.8 mediante tampón citrato 0.1 M.

Como variables se estudió la temperatura de reacción y la razón enzima:sustrato (E/S) empleada. Se trabajó a 50 y 30 °C y a razones E/S de 1:2 y 1:6 (p/p), que corresponden a 16 y 5.3 UPF/g sustrato respectivamente. El volumen de preparado enzimático requerido se calculó considerando dichas razones E/S y la concentración de sustrato.

El curso de la reacción de sacarificación se siguió mediante muestreo cada dos horas. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm. por 10 min y se analizó azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico, actividad de papel filtro y actividad de celobiasa con determinación de glucosa por el método de glucostat (Sigma). La concentración de celulosa se determinó mediante el método de Effland. Los procedimientos analíticos empleados y las definiciones de unidades de actividad son los usuales reportados previamente.

La conversión alcanzada durante la reacción se expresó en base a porcentajes de sacarificación (% S), cuantificado como:

$$\% S = 0.9 * \frac{AR}{CI} * 100$$

en donde:

AR = concentración de azúcares reductores
producidos por hidrólisis enzimática

CI = concentración inicial de celulosa

El valor de 0.9 corresponde a un factor de corrección, para expresar el porcentaje de hidrólisis en base a un valor máximo de 100% correspondiente a la hidrólisis total de celulosa a glucosa, ya que por cada enlace β 1-4 hidrolizado se adiciona una molécula de agua.

En la experiencia de sacarificación enzimática de CAR pretratada conducida a 30 °C y E/S de 1:6, se analizó el grado de adsorción de la enzima a los sólidos durante la sacarificación.

Se estudió también la cinética de inactivación térmica de la celulasa en ausencia de sustrato a 50 y 30 °C.

Resultados y Discusión

Las experiencias de sacarificación se realizaron con CAR pretratada químicamente y, a fin de analizar el efecto del pretratamiento se consideró una experiencia testigo con CAR cruda. Se realizó también una experiencia testigo con CAR pretratada sin adición de enzima, que no produjo un nivel detectable de azúcares reductores. Por consiguiente puede afirmarse que el efecto de sacarificación es debido íntegramente a la acción enzimática.

En la Figura 1, se presenta un resumen de los resultados obtenidos en las experiencias de sacarificación enzimática realizadas a distintas temperaturas y razones E/S. Los resultados corresponden a 30 horas de sacarificación, no observándose variaciones más allá de ese tiempo.

En la Figura 2, se compara los resultados anteriores, con los obtenidos en condiciones análogas con celulasa comercial de *T.reesei* (ENZECD, Cellulase Tv-1000).

En la Figura 3 se presenta los resultados correspondientes a la adsorción de la celulasa a los sólidos durante la sacarificación de CAR pretratada, a 30 °C y E/S de 1:6.

En la Figura 4 se presenta los resultados de inactivación térmica de celulasa de *T.aureoviride* a 50 y 30 °C, en ausencia de sustrato.

En experiencias a 50 °C, no se observó diferencia en el porcentaje de sacarificación final de CAR pretratada obtenido con razones E/S de 1:2 y 1:6. En ambos casos se obtuvo un 73% de sacarificación al cabo de 30 horas de reacción (ver Figura 1). Como es lógico, la velocidad inicial de sacarificación fue sensiblemente superior para la razón E/S de 1:2, decayendo en el tiempo hasta aproximarse a la velocidad de sacarificación observada a 30 °C, lo que sugiere un efecto de inactivación térmica.

Con CAR cruda a 50 °C y una razón E/S 1:6, tanto el nivel de sacarificación final (42 %) como la velocidad de sacarificación resultaron sensiblemente inferiores que con CAR pretratada (ver Figura 1). Ello muestra que el pretratamiento produce un incremento efectivo en la degradabilidad del sustrato.

En la experiencia a 30 °C con CAR pretratada y razón E/S de 1:6 se obtuvo una baja velocidad de sacarificación con un nivel final de tan solo 33%. Sin embargo, al aumentar la razón E/S a 1:2 se logró un nivel de sacarificación final por sobre el 85%, muy superior al obtenido en iguales condiciones a 50 °C, aunque la velocidad inicial de sacarificación fue lógicamente menor. Esto sugiere que a dicha temperatura la celulasa es inactivada de manera significativa, lo que no es sorprendente dado el carácter termosensible de las cepas de *T.aureoviride*.

A fin de corroborar lo anterior se analizó la estabilidad térmica del preparado enzimático de T.aureoviride, cuyos resultados mostrados en la Figura 4, confirman lo anterior. A 50 °C, se produjo una rápida inactivación durante las primeras 10 horas, estabilizándose luego en un valor cercano al 60 % del valor inicial.

Estos resultados se refieren a enzima libre de sustrato, por lo que no pueden predecir nitidamente el comportamiento durante la sacarificación, debido a la posible adsorción de la enzima a los sólidos y el efecto de protección por sustrato. De los resultados presentados en la Figura 3, puede observarse que la enzima es rápidamente adsorbida al ser contactada con el sólido, siendo posteriormente desorbida en forma gradual durante la sacarificación. Esto es afortunado pues durante el periodo inicial, donde la inactivación térmica es mayor, la enzima se encuentra parcialmente protegida debido a su mayor nivel de adsorción al sólido en ese periodo.

No obstante ello, el efecto de inactivación térmica a 50 °C es manifiesto si se le compara con el obtenido a 30 °C donde la inactivación fue mucho menor. A esa temperatura se observó una caída inicial hasta un 90% de la actividad inicial durante las primeras diez horas, estabilizándose luego. Por lo tanto la inactivación fue solo levemente superior al 10% y ocurrió en las primeras 10 horas, que corresponden al periodo en el cual la enzima está aun mayoritariamente adsorbida al sólido en la experiencia de sacarificación. La estabilidad térmica de la enzima a 30 °C justifica entonces los resultados obtenidos a 30 °C y E/S de 1:2 que aparecen en la Figura 1, donde se obtuvo el más alto nivel de sacarificación.

Por otro lado debe destacarse de los resultados mostrados en la Figura 3, que la actividad enzimática permanece practicamente inalterada durante todo el periodo de sacarificación a 30 °C. Al comparar este resultado con el obtenido en la Figura 4 a esa misma temperatura, puede comprobarse el efecto de protección de la actividad enzimática por la presencia de su sustrato sólido. La limitación al nivel de sacarificación final obtenido a 30 °C y E/S de 1:2 (ver Figura 1) estaría entonces dado, no por limitación enzimática, sino por el agotamiento de la porción de celulosa accesible al ataque de la enzima.

A 30 °C se observa una marcada diferencia tanto en la velocidad inicial como en el nivel de sacarificación en relación a la carga enzimática, lo que puede atribuirse a que se está trabajando por debajo del punto de saturación de la enzima con sustrato. Igual cosa ocurre a 50 °C en relación a la velocidad inicial de sacarificación, también mayor a E/S de 1:2. Sin embargo el nivel final de sacarificación es similar, lo que es atribuible a la prevalencia del fenómeno de inactivación térmica a esa temperatura.

Esto es concordante con resultados reportados en literatura en sistemas similares (3).

Los resultados obtenidos en las experiencias realizadas a una alta razón E/S con la celulasa de T.aureoviride, permiten concluir que no se advierte un posible efecto inhibitorio de los productos de reacción sobre la actividad enzimática. La presencia de una alta actividad relativa de celobiasa en el caso del complejo enzimático de T.aureoviride contribuye en este caso a aliviar el posible efecto inhibitorio de la celobiasa sobre la celulasa que es notable en el caso del complejo celulolítico de T.reesei (4).

En el caso de CAR pretratada, al comparar en la Figura 2 los resultados de sacarificación obtenidos con las celulasas de T.aureoviride con los de la celulasa comercial, puede advertirse que a 50°C y E/S de 1:6 se obtiene un 85% de sacarificación con la enzima comercial de T.reesei (muy similar al valor obtenidos a E/S de 1:2, cuyos resultados por claridad no aparecen en la Figura 2), contra el 73 % obtenido con las celulasas de T.aureoviride. Esto sin duda puede atribuirse al carácter termoestable de las celulasas de T.reesei, cuya temperatura óptima de reacción es en torno a 50 °C, lo que no ocurre con la celulasa de T.aureoviride. En la experiencia testigo de sacarificación de CAR cruda, en cambio, se obtiene un nivel de sacarificación cercano al 40 % con la celulasa de T.aureoviride, muy por sobre el 12 % obtenido con la celulasa comercial de T.reesei.

Lo anterior podría explicarse, dada la actividad xilanolítica reportada en caldos fermentación sumergida de CAR con este microorganismo (2). La enzima estaría actuando sobre la hemicelulosa contenida en la CAR (cruda), aportando de este modo una mayor cantidad de azúcares reductores, lo que ocurre de manera mucho menos significativa con el preparado enzimático de T.reesei, de escasa actividad xilanolítica. En este caso sería entonces necesario redefinir el % S como:

$$\% S = 0.9 \frac{AR}{HCI + CI}$$

donde: HCI = concentración inicial de hemicelulosa

obteniéndose en tal caso también un % de sacarificación cercano al 12 %, aunque con una concentración de azúcares reductores 3 veces superior.

En el caso de CAR pretratada este efecto no se advierte, dado que el % de hemicelulosa en CAR pretratada es muy pequeño.

Puede concluirse que las pruebas de sacarificación con celulasas

producidas por FSS con T.aureoviride fueron exitosas lográndose un elevado nivel de sacarificación de CAR a razones E/S de 1:2 y 30 °C. Los resultados en esas condiciones son comparables a los obtenidos con un preparado comercial de T.reesei a igual razón E/S y 50 °C, que corresponde a la temperatura óptima para dicha enzima. La sacarificación con celulasas de T.aureoviride puede aún ser optimizada en función de la temperatura de reacción, mejorando aún más los resultados reportados.

Bibliografía

- (1). SCHAFFELD, G.; A. ILLANES; G. MEJIAS; A. M. PINOCHET. 1987. Sequential Acid and Enzymic Hydrolysis of Sugar Beet Pulp. J. Chem. Tech. Biotechnol.: 161 - 171.
- (2). CABELLO, A. L. 1991. Producción de celulasas con T.aureoviride en cultivo por lotes alimentado intermitente con sustrato sólido. Tesis para optar al título de Magister en Ciencias de la Ingeniería con mención en Ingeniería Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso.
- (3). ALI, L. S.; N. COCHET; T. GHOSE & J. LEBEAULT. 1984. Enzymatic Hydrolysis of Sugar Beet Pulp. Biotechnology Letters 6(11): 723 -728.
- (4). ASENJO, A.; I. CONTRERAS; R. GONZALEZ Y A. RONCO. 1982. Cellulolytic Enzymes for the Hydrolysis of Leached Beet Cossette. Biotechnology Letters 4(1): 51 -56.

HIDROLISIS ENZIMÁTICA.

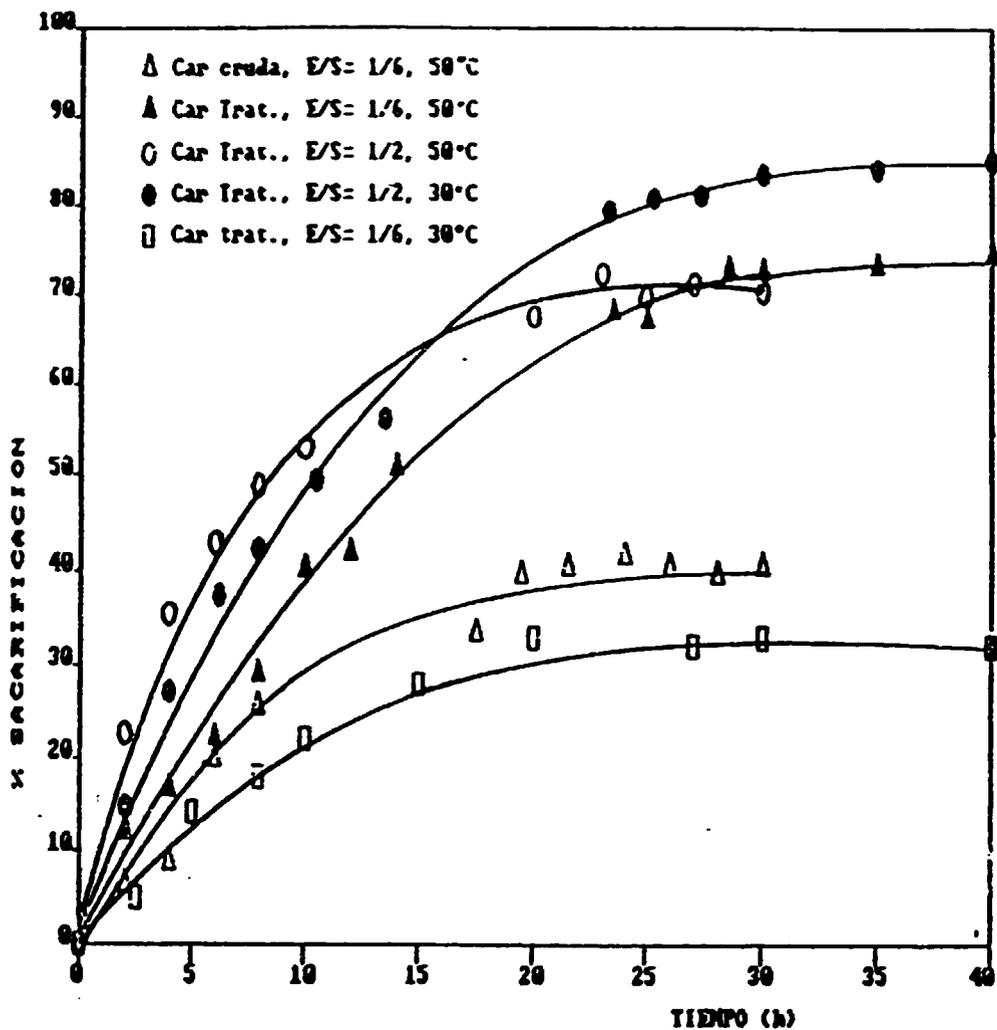


Figura #1 : Experiencias de hidrólisis enzimática realizadas con caldos de fermentación en CAR cruda y pretratada.

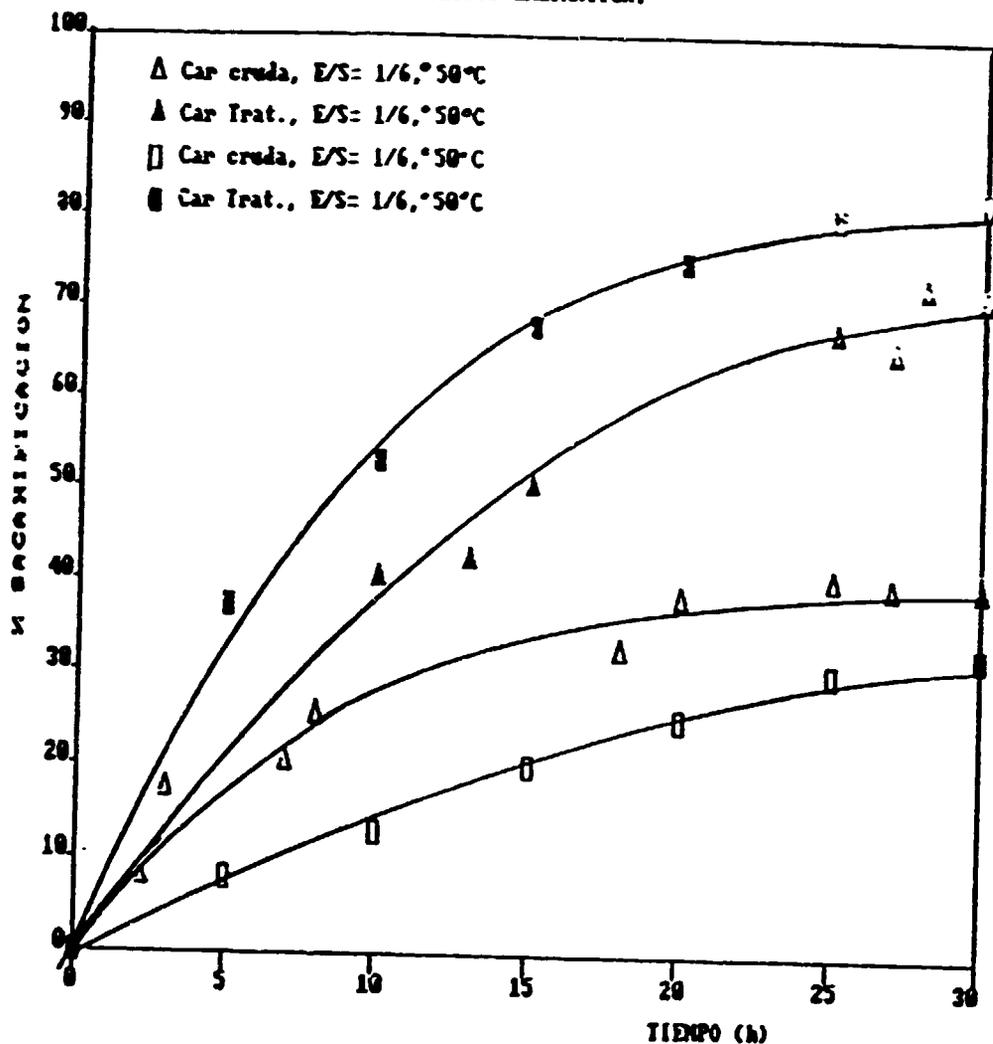


Figura #2 : Experiencias de hidrólisis enzimática con celulasas provenientes de caldos de fermentación de *T. aureoviride* 7-121 (Δ,▲) y celulasas comerciales de *T. reesei* (□,■) en CAR cruda y pretratada.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

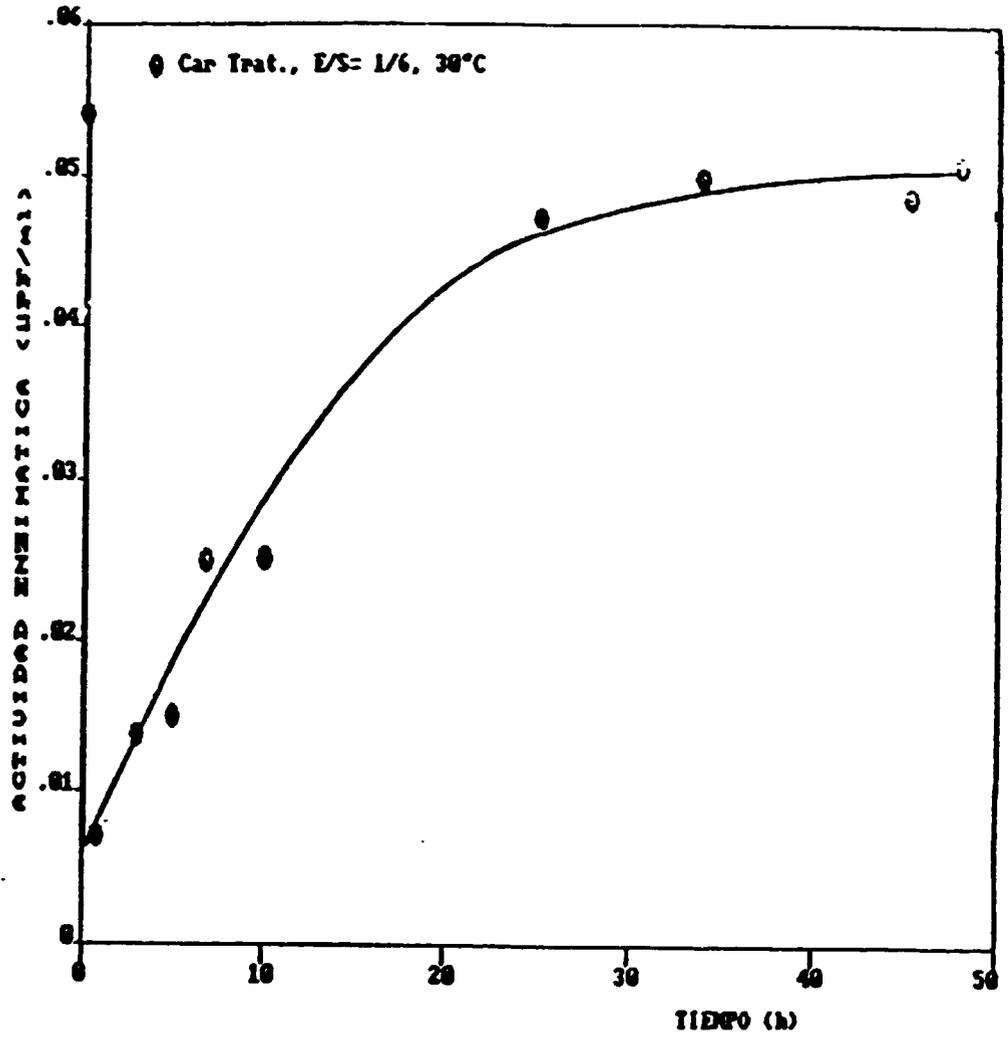


Figura #3 : Actividad de papel filtro presentada en hidrólisis enzimática de CAR pretratada para E/S=1/6 y 30°C.

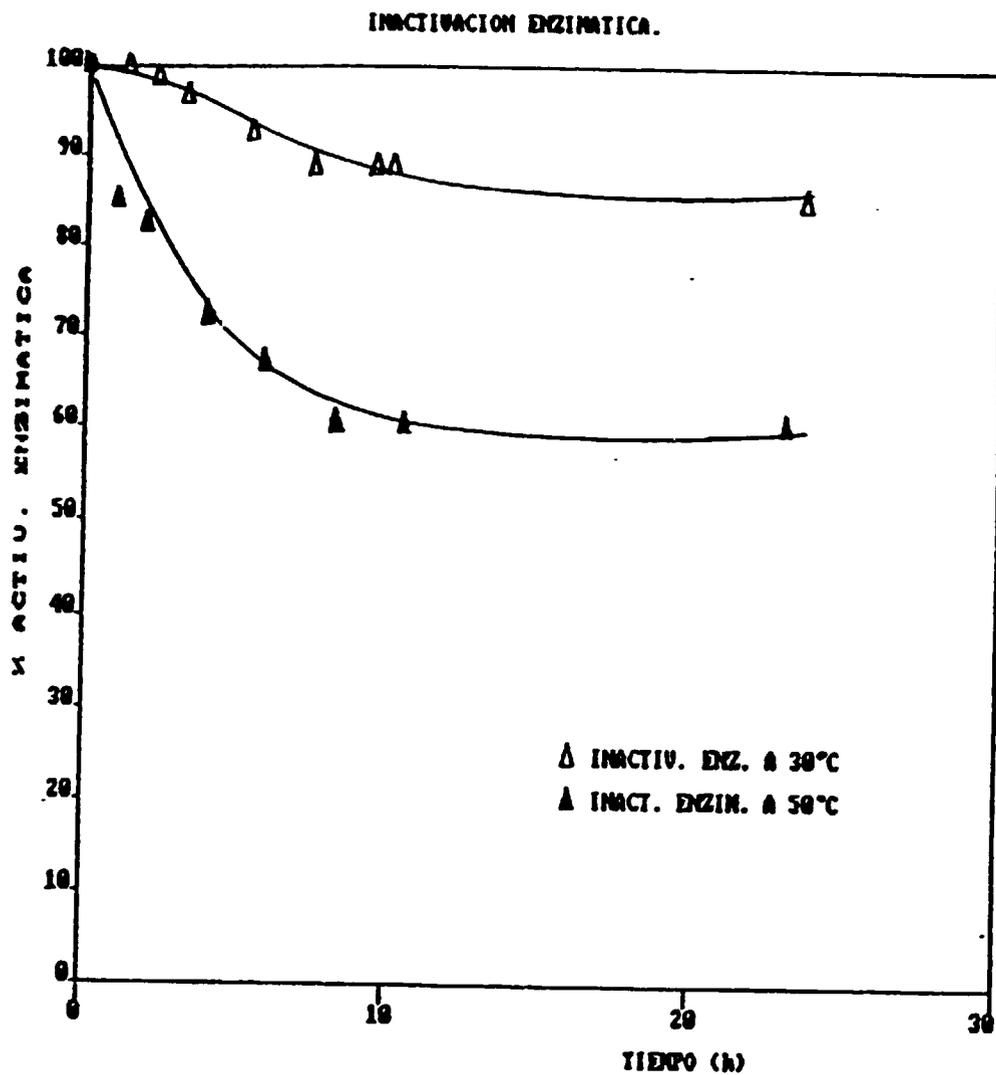


Figura #4 : Inactivación enzimática en ausencia de sustrato a 30 y 50°C.

I. COMPOSICION PROXIMAL DEL PRODUCTO FERMENTADO Y PERFIL AMINOACIDICO DE LA PROTEINA

I.1. Composición proximal del producto fermentado

Metodología

La marcha analítica para la determinación de la composición proximal de la CAR fermentada fue realizada de acuerdo a lo informado previamente (ver Informes de Avance N° 4 y 5) en base a la metodología propuesta por Effland (TAPPI 60: 143, 1977).

Resultados y Discusión

La composición proximal de la CAR fermentada, correspondiente a la última experiencia piloto aparece en la Tabla 1, junto con la composición de CAR cruda, para efectos de comparación.

Tabla 1. Composición proximal de CAR fermentada

% base seca

	CAR cruda	CAR fermentada
Hidrosolubles	11.3	43.1
Lípidos	1.1	1.4
Pectinas	8.1	1.5
Hemicelulosa	47.6	7.9
Celulosa	21.5	4.1
Lignina	3.0	11.9
Proteína (Nx6.25)	7.4	30.1

Debe destacarse el incremento en hidrosolubles y lignina y la disminución en pectinas y obviamente celulosa y hemicelulosa.

La reducción en el contenido de pectinas está indicando que I.aureoviride produce pectinasas. Esto se había advertido indirectamente a través del cambio de consistencia del medio sólido en las etapas iniciales de fermentación, donde se produce la liberación de sustancias que provocan una apariencia pegajosa, asociada a la liberación y solubilización de sustancias pécticas.

El aumento en el contenido de lignina es bastante apreciable. Esto es debido en parte al carácter recalcitrante de la lignina, que tiende por tanto a acumularse en el producto fermentado y a la presencia de β glucanos y otros polisacáridos altamente insolubles que conforman la pared del hongo y que son analizados como "lignina" de acuerdo al método de Effland. De todos modos, este elevado nivel de material recalcitrante constituye un problema para

el producto ya que incrementa su contenido de fibra, provocando las dificultades nutricionales destacadas en el punto D de este informe.

El contenido de celulosa se reduce en un 81%, lo que es considerado muy satisfactorio, si se le compara con el nivel de reducción de solo el 67% obtenido en fermentación sumergida de CAR con T.reesei (Illanes y Schaffeld, Biotechnol. Letters 5(5):305, 1983).

La reducción del contenido de hemicelulosa es apreciable, alcanzando al 84%. Esto debe ser considerado como algo propio de las cepas de T.aureoviride, donde se ha comprobado una alta actividad xilanólica (ver Informe de Avance N° 6). Sin duda este aspecto es un antecedente muy favorable para el uso de T.aureoviride en el enriquecimiento de CAR, que posee precisamente un elevado contenido de hemicelulosa. Por contraste, las cepas de T.reesei tienen una baja capacidad de degradación de hemicelulosa, como lo comprueban los resultados obtenidos en fermentación sumergida de CAR (Illanes y Schaffeld, Rev. Arg. Microbiol. 14(2):97, 1982) con una reducción de solo el 34%, lo que hace necesario en ese caso un pretratamiento ácido para la remoción de la hemicelulosa.

El contenido de proteína en el sólido aumenta cuatro veces, alcanzando en esa fermentación un tenor final del 30%. Debe señalarse que en esta fermentación se obtuvo un contenido proteico inferior al usual entre 35 y 38%. Ello puede explicarse en razón de la menor actividad enzimática producida en esa fermentación, lo que fue analizado en el punto G.2.1 de este Informe. Aún considerando este valor, el incremento del contenido proteico se compara favorablemente con el obtenido en fermentación sumergida de CAR con T.reesei, donde se obtuvo un tenor final de proteína del 28% (Illanes y Schaffeld. op.cit. 1983)

I.2. Perfil aminoácido de la proteína

El trabajo fue contratado al Dr. Osvaldo González de INTA, Universidad de Chile y ejecutado en el departamento de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción.

Resultados y Discusión

Los resultados del perfil aminoácido de la proteína del producto de CAR fermentada con T.aureoviride (CARFTA) se muestran en la Tabla 1.

Para efectos comparativos se ha indicado el perfil FAO, el perfil del producto PROCOFERM (CAR fermentada por T.reesei) y el de una proteína microbiana producida en hidrocarburo (proceso Kuwait).

Tabla 1. Perfil aminoacídico (g/100 g de proteína) de la proteína de CAR fermentada con *T.aureoviride* (CARFTA), de la proteína de CAR fermentada con *T.reesei*, proceso sumergido (PROCOFERM), de la proteína microbiana de petróleo, proceso Kuwait (KUWAIT) y del patrón FAO.

AMINOACIDO	CARFTA	PROCOFERM	KUWAIT	PATRON FAO
Isoleucina	5.90	4.42	4.54	4.00
Leucina	6.20	8.17	7.87	7.04
Lisina	4.23	4.45	5.25	4.70
Fenilalanina	4.69	4.32	4.28	6.08*
Tirosina	5.46	4.23	5.23	
Metionina	3.10	2.62	1.99	3.52**
Cistina	2.32	4.51	0.23	
Treonina	4.22	6.30	7.08	4.00
Valina	5.61	7.16	6.42	4.96
Aspártico	8.64	12.66	7.54	
Glutámico	11.90	11.26	11.54	
Serina	7.60	4.43	3.71	
Glicina	4.99	7.53	16.75	
Histidina	3.12	2.15	1.99	
Arginina	4.39	3.54	4.89	
Alanina	3.95	8.61	7.52	
Prolina	8.68	2.15	3.17	
Triptofano	N.D.	1.43	N.D.	0.96
	95	100	100	

* : Fenilalanina + Tirosina
 ** : Metionina + Cistina

El perfil aminoacídico de la proteína puede considerarse aceptable, con un buen nivel de aminoácidos sulfurados, aminoácidos aromáticos, treonina, isoleucina, leucina y valina. Solamente el nivel de lisina aparece bajo en comparación al patrón FAO e incluso levemente por debajo del producto análogo PROCOFERM y de la proteína Kuwait.

Debe destacarse que existen diferencias significativas en los niveles de algunos aminoácidos entre CARFTA y PROCOFERM, no obstante provenir ambos del mismo sustrato, lo que indica la diferencia entre la proteína celular de *T. aureoviride* y *T. reesei*. El hecho más destacable es el alto nivel de aminoácidos sulfurados en CARFTA, que está por sobre el patrón FAO. El nivel de metionina, que suele ser deficitario en proteínas forrajeras, es superior al de las otras dos proteínas de origen microbiano.

En la apreciación del Dr. González se trata de una proteína de calidad aceptable a buena, con un cómputo aminoacídico de 78, restando por conocer el contenido de triptofano que no fue determinado.

La comunicación del Dr. González sobre los resultados obtenidos por el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, aparece en el Anexo 4.

J. PASANTIA DE INVESTIGACION EN UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA, LIMA, PERU.

Como parte del programa de intercambio de experiencias durante el desarrollo del proyecto, el ingeniero chileno Sr. Christian Bernet realizó una estadia de investigación en el Laboratorio de Micología y Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina en Lima, Perú, bajo la supervisión del Doctor Marcel Gutiérrez Correa.

La estadia se realizó entre el 19 de enero y el 29 de febrero.

El ingeniero Bernet fue uno de los responsables de la implementación del fermentador prototipo en nuestro laboratorio y participó en el desarrollo de las experiencias piloto de FSS realizadas con la cepa de T.aureoviride en coseta agotada de remolacha (CAR). Por ello fue seleccionado para realizar esta estadia cuyos objetivos eran:

19. Realizar un estudio comparativo de FSS de CAR con cepas mutantes de T.aureoviride producidas por el grupo chileno y de T.reesei producidas por el grupo peruano, bajo las condiciones de inoculación y propagación desarrolladas en el laboratorio del Dr. Marcel Gutiérrez.

20. Intercambiar experiencias relativas a la implementación de los sistemas auxiliares y del sistema de control de los equipos para FSS desarrollados.

El primer objetivo fue cabalmente cumplido, habiéndose obtenido muy buenos resultados con ambas cepas, lo que puede observarse en el Informe respectivo, contenido en el Anexo 5

Pudo comprobarse una mayor capacidad productiva en la cepa de T.aureoviride, lo que ya había sido demostrado previamente en nuestro laboratorio.

El segundo objetivo fue logrado solo parcialmente, ya que solo pudo realizarse un intercambio de conocimientos y experiencias y conocer la estrategia y detalles del sistema de adquisición de datos y control adquirido por el grupo peruano, lo que fue de provecho para nuestro trabajo al regreso del ingeniero Bernet a Chile. No fue sin embargo posible, operar el sistema durante su permanencia en Perú, ya que el equipo había sido adquirido muy recientemente y estaba aún en etapa de instalación, habiéndose programado la primera experiencia de prueba para el mes de abril.

El informe del ingeniero Sr. Christian Bernet se encuentra en el Anexo 5.

ANEXO 1

**ESTUDIO DE TOXICIDAD Y VALORACION BIOLOGICA
DE UN PRODUCTO EN BASE A COSETA AGOTADA DE
REMOLACHA ENRIQUECIDA POR FERMENTACION
CON EL MICROORGANISMO Trichoderma aureoviride**

PROYECTO PNUD/ONUDI/DP/RLA 83/003

CONTRATO 91-091G

ANDRES ILLANES - Coordinador

DR. OSVALDO GONZALEZ C. M.V.,M.Sc.

**INSTITUTO DE NUTRICION Y
TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Evaluar la calidad biológica y toxicológica del producto "Coseta agotada de remolacha, enriquecida por fermentación con el hongo Trichoderma aureoviride". Para este fin se programaron 4 experimentos diferentes:

- 1. Estudio de toxicidad subcrónica en ratas.
- 2. Evaluación biológica de la proteína mediante los métodos de PER (Protein Efficiency Ratio) y NPR (Net Protein Ratio)
- 3. Estudio sobre parámetros reproductivos en ratas.
- 4. Ensayo en pollos broiler en crecimiento

Previo al desarrollo del estudio biológico, la muestra del producto recibido de la Universidad Católica de Valparaíso-Ingeniería Bioquímica- se sometió a un análisis químico proximal (A.Q.P) que incluyó determinación de humedad, extracto etéreo, fibra cruda, proteína y cenizas, según técnicas del AOAC. Para proteínas se empleo el factor N x 6.25.

El resultado del A.Q.P. fue el siguiente (g/100 g).

Humedad	7.72
Extracto etéreo	0.84
Fibra cruda	20.32
Proteína	35.31 (N x 6.25)
Cenizas	10.13

Dietas utilizadas en experiencia de toxicidad subcrónica y estudio reproductivo en ratas.

Como base se utilizó una fórmula estandar para ratas de laboratorio (Fórmula AIN- NIH7, modificada por Osvaldo González). Para formular las raciones experimentales se procedió a reemplazar parcialmente la cuatro fuentes principales de proteína (carne, soya, pescado y leche) por coseta enriquecida. El reemplazo se efectuó rebajando proporcionalmente el aporte de proteína de los cuatro ingredientes mencionados. La coseta enriquecida se agregó en las proporciones de

A = 16 g/100 g

B = 8 g/100 g

C = 4 g/100 g

D = Sin coseta. Dieta control

La suma de la proteína aportada por la coseta y los otros cuatro ingredientes, calculada en base al AQP en el caso de la coseta y tabular en el caso de la soya, carne, pescado y leche, varió entre 16,01 y 16.14 gramos por 100 gramos.

FORMULA PARA RATAS (g/100g)

	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
Harina de carne	6.5	7.1	7.7	8.0
Afrecho de soya	6.6	8.7	10.3	12.0
Harina de pescado	6.2	8.5	9.2	10.0
Leche descremada en polvo	2.3	2.7	2.8	3.0
Costra enriquecida	16.0	8.0	4.0	-
Harina de maíz	32.42	35.02	36.02	37.02
Harinilla de trigo	10	10	10	10
Trigo entero molido	10	10	10	10
Alfalfa deshidratada	4	4	4	4
Levadura de cerveza desh.	2	2	2	2
Aceite de maíz	2	2	2	2
Sal común	0.1	0.1	0.1	0.1
Fosfato tricálcico	1.25	1.25	1.25	1.25
Conchuela finamente molida	0.25	0.25	0.25	0.25
Pre mezcla mineral	0.12	0.12	0.12	0.12
Pre mezcla vitamínica	0.26	0.26	0.26	0.26

Pre-mezclas de Vitaminas y Minerales

Pre-mezcla mineral

Carbonato de Cobalto	366 mg
Sulfato de Cobre	3.662 mg
Sulfato Ferroso	110 g
Oxido de Manganeso	55 g
Oxido de Zinc	15 g
Yodo (Yodato de Calcio)	1.3 g
Excipiente (Sacarosa) csp	1.000 g

Pre-mezcla vitamínica

Vitamina A estabilizada (Palmitato o acetato)	4.700.000 U.I.
Vitamina D3	3.900.000 U.I.
d-Alfa Tocoferol Acetato	17.000 U.I.
Vitamina K (Menadiona)	2.8 g
Cloruro de Colina	476.0 g
Acido Fólico	1.9 g
Niacina	25.5 g
d-Pantotenato de Calcio	15.3 g
Riboflavina	2.9 g
Tiamina	8.5 g
Piridoxina	1.5 g
d-Biotina	119.0 mg
Vitamina B12	3.400.0 mcg
Excipiente csp	2.000.0 g

Contenido de elementos minerales en dieta control (*)

Calcio (g/1000g)	11	-	11.3
Cobre (mg/1000g)	11.1	-	20
Fierro (mg/1000g)	330	-	300
Magnesio (g/1000g)	1.5	-	1.2
Manganeso (mg/1000g)	59	-	60
Sodio (g/1000g)	2.8	-	2.1
Potasio (g/1000g)	7.5	-	7.1
Zinc (mg/1000g)	57	-	50
Cromo (mg/1000g)	0.85	-	1

(*) Datos obtenidos de experiencias previas (2 muestras)

Análisis químico proximal (*)

Humedad	=	11	-	8.5	%
Proteína	=	21.3	-	19.13	%
Ext. Etereo	=	8.3	-	13	%
E.N.N (x Dif.)	=	49.2	-	46.58	%
Fibra	=	4.3	-	5.1	%
Cenizas	=	5.9	-	7.69	%
E.B.	=	4.614	cals/gramo		

(*) Datos obtenidos de experiencias previas (2 muestras)

1. ESTUDIO DE TOXICIDAD SUBCRONICA EN RATAS

Para este estudio se utilizaron 80 machos Wistar de 24 a 27 días de edad divididos en cuatro grupos:

Grupo A, Alimentados con una dieta con 16% (peso/peso) de coseta enriquecida.

Grupo B, con 8% de coseta enriquecida en su dieta.

Grupo C, con 4% de coseta en la dieta, y

Grupo D, Control

Todos los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales adecuadas con control de temperatura (18 a 24° C); humedad (45 a 70% de H.R.) y luminosidad controlada con ciclos de 12-12 horas de luz-oscuridad.

Cuatro grupos de ocho animales, con cada una de las dietas, fueron mantenidos en jaulas individuales hasta el fin del experimento. En ellos se efectuaron los controles de peso, consumo de alimento, recolección de muestras de orina y se mantuvieron hasta los días 84 a 90 con el fin de efectuar los controles post-mortem. Las 48 ratas restantes se mantuvieron en grupos de 3 y 4 animales por jaula y se utilizaron para observación sacrificio y necropsia a las 4 y 8 semanas.

Entre los días 24 y 28; 52 y 56; y 80 y 84 se controló consumo de alimento individual.

En los días 28 y 56 se sacrificaron 6 ratas de cada grupo para efectuar necropsia y detectar posibles lesiones macroscópicas.

Durante todo el desarrollo de la experiencia se observó el comportamiento y el aspecto externo de los animales.

Entre los días 84 y 90 se tomó muestras de orina, en jaulas metabólicas, a 6 animales de cada uno de los grupos A, B y C y a 4 del grupo D. En estas muestras se efectuó un urianálisis que incluyó densidad, pH, albúmina glucosa y estudio de sedimento.

Entre el día 84 y 90 se sacrificaron, bajo anestesia barbitúrica, los 32 machos mantenidos en jaulas individuales. Previo al sacrificio se les tomó muestra de sangre con EDTA para hemograma y sangre sin anticoagulante en tubos Vacutainer para obtener suero y realizar estudio de química sanguínea. En este se incluyó determinación de nitrógeno ureico, glicemia y las enzimas fosfatasa alcalina y transaminasa glutámico-oxalacética. El estudio de hemograma y de química sanguínea se efectuó a 6 ratas de cada uno de los grupos A, B y C y a 4 del D. A todos los animales sacrificados se les efectuó necropsia en busca de posibles alteraciones macroscópicas. En estos 32 animales se disecó y controló peso a los siguientes órganos: hígado, riñón, bazo, corazón, testículos, adrenales y

tiroides. A 6 machos de cada uno de los grupos tratados y a 4 del grupo control se les tomó muestra de hígado y riñón en formalina al 10% para estudio histopatológico. Ellas fueron procesadas mediante técnicas histológicas habituales preparándose placas con tinción de hematoxilina-eosina para observación microscópica.

RESULTADOS

No se detectó alteraciones en el comportamiento ni en el aspecto externo en ningún animal durante el desarrollo del experimento. El pelaje se presentó normal en coloración, brillo y disposición. No se observó ningún tipo de secreción anormal ni deposiciones alteradas.

En las necropsias efectuadas a las 4, 8 y 12 semanas no se apreciaron lesiones macroscópicas. Los órganos internos se presentaron normales.

CUADRO N° 1

GANANCIA DE PESO EN RATAS

a) A las 4 semanas

Grupo	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
X	110.75	139.4	138.87	146.5
D.S.	29.40	26.11	41.42	33.91

Diferencia significativa ($p < 0.05$) del grupo A y D. Otros grupos diferencias no significativas (N.S.)

b) A las 8 semanas

Grupo	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
X	182	200.9	212.25	213.12
D.S.	38.86	39.71	48.94	49.24

Diferencias N.S.

c) A las 12 semanas

Grupo	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
X	221.88	236.75	239	257.25
D.S.	44.67	41.05	49.8	41.6

Diferencias N.S.

DS = Desviación Estandard

CUADRO N° 2

CONSUMO DE ALIMENTO (g/día/100 g de peso corporal)

a) A las 4 semanas

Grupo	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
X	7.63	8.58	7.94	8.74
D.S.	0.83	0.67	0.88	1.9

Diferencia significativa grupo A con B ($p < 0.05$)

b) A las 8 semanas

Grupo	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
X	10.14	10.13	10.05	10.26
D.S.	0.63	0.64	0.80	0.67

Diferencias no significativas (N.S.)

c) A las 12 semanas

Grupo	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
X	9.25	9.45	10.20	9.55
D.S.	0.79	0.63	0.87	0.83

Diferencias N.S.

CUADRO N° 3

PESO DE ORGANOS

a) Hígado (g/100 g de peso corporal)

Grupo	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
X	3.47	3.85	3.37	3.49
D.S.	0.24	0.39	0.41	0.30

Diferencia significativa A con B y C con B ($p < 0.05$ en ambos casos)

b) Riñones (mg/100 g de peso corporal)

Grupo	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
X	684.5	760.75	724.0	689.4
D.S.	42.48	180.76	92.11	56.6

Diferencias N.S.

c) Corazón (mg/100 g de peso corporal)

Grupo	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
X	296.9	305.5	301	282.87
D.S.	19.5	16.12	11.04	22.8

Diferencia significativa B con D y C con D ($p < 0.05$ en ambos casos)

CONT. Cuadro N° 3

d) Bazo (mg/100 g de peso corporal)

Grupo	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
X	205.75	220.25	212.5	209.25
D.S.	13.68	21.79	15.56	12.02

Diferencia N.S.

e) Testículos (mg/100 g de peso corporal)

Grupo	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
X	964.00	887.12	860.88	899.12
D.S.	66.29	54.71	64.27	78.16

Diferencias significativas A con B (p <0.05) A con C (p <0.01) y A con D (p <0.01).

f) Adrenales (mg/100 g de peso corporal)

Grupo	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
X	12.02	10.26	9.7	10.19
D.S.	1.87	1.11	1.28	1.57

Diferencia significativa A con B (p <0.05); A con C (p <0.02) y A con D (p <0.02).

g) Tiroides (mg/100g peso corporal)

Grupo	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
X	9.54	10.22	9.49	9.5
D.S.	1.84	2.31	1.36	1.32

Diferencias N.S.

CUADRO N° 4

RESULTADOS DE HEMOGRAMAS

ESTUDIO O. GONZALEZ
SANGRE

GRUPO	E	VCM	HTO	HIB	BCOS
A	6.85	62	43.1	14.4	5327
	8.19	56	46.3	15.9	10400
	7.99	56	44.9	15.1	8830
	7.75	60	47.2	15.4	5703
	7.35	61	46.0	15.2	10350
	7.19	62	45.3	15.5	6488
B	7.37	64	49.0	15.9	6749
	6.73	62	43.9	14.9	6694
	8.14	60	49.0	16.3	8917
	7.04	61	43.3	14.9	5110
	7.40	60	45.0	15.3	7078
	7.61	62	47.4	15.8	10366
C	7.20	63	46.0	15.3	6879
	7.55	63	50.0	16.3	11450
	7.78	62	49.1	16.7	10650
	7.64	59	45.2	15.4	9197
	8.10	60	48.9	16.6	6799
	7.95	59	46.9	16.3	8221
D	7.94	57	45.0	15.3	9096
	7.65	58	45.0	15.2	5673
	7.26	61	45.3	15.2	7110

RESUMEN DE FORMULAS DENCOCITARIAS (RANGOS POR GRUPO)

GRUPO	Neutr. Banda %	Neutr. Seg %	Linf. %	Monoc. %	Eosi %	Basof. %
A	0-4	18-38	36-66	4-12	0-1	-
B	0-3	16-29	50-68	8-11	-	-
C	1-7	15-32	34-72	8-14	0-1	0-1
D	0-3	19-40	38-64	6-12	0-1	-

CUADRO N° 5

RESULTADOS DE ANALISIS DE QUIMICA SANGUINEA

QUIMICA

GRUPO	Uremia	Glicemia	F.Alcaliba	GOT
A	0.38	0.69	380.5	74
	0.32	1.00	453.9	61
	0.27	0.19	239.7	100
	0.25	1.82	327.4	50
	0.31	2.07	363.1	46
	0.25	1.32	194.8	53
B	0.44	1.26	501.8	53
	0.46	1.11	483.5	74
	0.42	2.16	864.9	48
	0.34	1.86	494.7	46
	0.47	1.82	661.9	54
	0.48	2.07	294.8	51
C	0.31	0.26	226.4	68
	0.33	0.87	499.8	68
	0.45	2.79	26.5	m/e
	0.34	0.55	205.0	74
	0.40	1.49	336.6	41
	0.47	1.91	261.1	38
D	0.32	1.78	451.9	44
	0.31	2.26	548.8	33
	0.47	0.99	577.3	50
	0.32	0.57	696.7	48

m/e = muestra escasa

RESULTADOS DE URIANALISIS

Muestra	Densidad	pH	Albumina mg/dl	Glucosa mg/dl	Sedimento
A	1027	6	20	Neg	En todas las muestras (A,B,C y D) se encontró cantidades variables de cristales de oxalatos, eritrocitos (1 a 5 por campo) glóbulos blancos (0 a 5 por campo) y escasas bacterias (NOTA: las muestras no se toman estériles).
A	1025	6	30	Neg	
A	1022	5	100	Neg	
A	1032	5	30	Neg	
A	1030	6	30	Neg	
A	1017	6	30	Neg	
B	1037	6	--	Neg	
B	1025	7	--	Neg	
B	1027	5	30	50	
B	1022	6	30	Neg	
B	1032	6	--	Neg	
B	1026	7	30	Neg	
C	1033	6	20	Neg	
C	1020	5	30	Neg	
C	1022	6	30	Neg	
C	1020	6	30	Neg	
C	1025	7	20	Neg	
C	1032	6	30	Neg	
D	1030	6	30	Neg	
D	1028	6	30	Neg	
D	1028	6	30	Neg	
D	1022	7	30	Neg	

INFORME BIOPSIA

FECHA: 20 Mayo, 1997

ENVIADO POR: Dr. Osvaldo González

ESPECIE: Rata EDAD: 4 meses SEXO: Machos

MUESTRAS: Hígado y riñón

DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO (H y E)

GRUPO A

A-1

Hígado: No se observan lesiones histopatológicas

Riñón : Congestion leve

A-4

Hígado: Tumefacción celular leve

Riñón : Tumefacción celular leve

A-7

Hígado: Sin lesiones microscópicas

Riñón : Tumefacción celular leve

GRUPO B

B-9

Hígado: Tumefacción celular leve

Riñón : Congestión y tumefacción celular leve

B-14

Hígado: Congestión leve y tumefacción celular marcada. En una triada portal se observa una infiltración marcada de células mononucleares con predominio de linfocitos y macrófagos.

Riñón : Congestion moderada y tumefacción celular marcada. Se observan focos de nefritis intersticial subaguda.

GRUPO C

C-14

Hígado: Sólo se aprecia un foco de células inflamatorias mononucleares (linfocitos y macrófagos) en una triada portal. No se observan otras lesiones

Riñón : Tumefacción celular leve

C-19

Hígado: Tumefacción celular leve. Además se presenta un foco de necrosis con células infiltrativas del tipo macrófago. Adyacente a la lesión anterior, la triada portal presenta una gran cantidad de células macrófago-linfocitaria. No se aprecian otros focos inflamatorios o necróticos en el resto de la preparación.

Riñón : Congestion leve.

C-21

Hígado: Tumefacción celular leve

Riñón : Congestión leve

GRUPO D (CONTROLES)

D-26

Hígado: Tumefacción leve

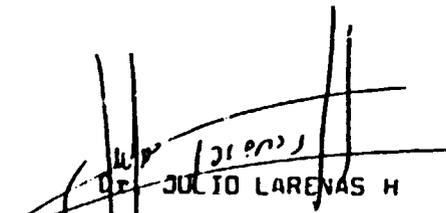
Riñón : Congestión leve

D-32

Hígado: Tumefacción leve

Riñón : Tumefacción leve

CONCLUSION: Las alteraciones observadas son inespecíficas, no representando lesiones de importancia y por lo tanto no son atribuibles a problemas tóxicos. En algunos casos se encontró lesiones focales inflamatorias de pequeño tamaño no relacionadas al tipo de alimentación.


Dr. JULIO LAREÑAS H
Patólogo Veterinario

RESUMEN DE RESULTADOS DE HISTOPATOLOGIA

Grupo	Congestión	Tumefacción	Otras alteraciones	Congestión	Tumefacción	Otras alteraciones
A (6 muestras)	3 positivas leve 3 negativas	1 marcada 3 leves 2 negativas	1 con inflamación	5 positivas 1 negativa	5 positivas 1 negativa	-----
B (6 muestras)	5 positivas 1 negativa	4 leves 2 negativas	1 con foco hemorrágico. 1 con inflamación	4 positivas 2 negativas	4 positivas 2 negativas	1 con inflamación
C (6 muestras)	6 positivas leves	5 leves 1 negativa	2 con inflamación	4 positivas 2 negativas	3 positivas 3 negativas	---
D (4 muestras)	2 positivas leves 2 negativas	3 leves 1 negativa	---	2 positivas 2 negativa	2 positivas 2 negativa	---

2. EVALUACION BIOLOGICA DE LA PROTEINA

La calidad biológica de la proteína se determinó mediante métodos de PER de Chapman, Castillo y Campbell (1959) y NPR de Pellett y Young (1980). Para esto se emplearon 3 grupos de 10 ratas de ambos sexos, cepa Wistar y de 21 a 23 días de edad. Un grupo fue el control y se alimentó con una dieta en base a caseína por la calidad biológica comprobada de esta proteína y su alta digestibilidad (98%). Otro grupo recibió la dieta con coseta enriquecida como fuente de proteína. Un tercer grupo recibió una dieta apteica. Las dietas de caseína y coseta enriquecida fueron elaborados según la fórmula siguiente: proteínas 10%; Grasa 10%, mezcla vitamínica 1%; mezcla mineral 3.5% (American Institute of Nutrition); celulosa en polvo c.s.p. completar un 5% de fibra y maicena c.s.p. completar 100. La dieta apteica solo se diferenció en que la fuente proteica (caseína o coseta enriquecida) fue reemplazada por maicena.

El estudio tuvo una duración de 4 semanas durante las cuales las ratas se mantuvieron en jaulas individuales de fondo cribado, con agua y dieta ad libitum y bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. Semanalmente se realizaron controles de peso e ingesta. La distribución de las ratas asignadas a cada grupo de estudio se hizo en forma aleatoria utilizando un sistema de bloque basado en el peso y distribuyendo las ratas al azar en cada bloque por cada dieta usada.

De acuerdo con el método del NPR, las ratas en dieta apteica se mantuvieron por 14 días.

Para el estudio de PER se aplicó la fórmula:

$$\text{PER} = \frac{\text{Ganancia de peso (g)}}{\text{g de proteína ingerida}} = (\times 28 \text{ días})$$

Para el estudio de NPR se aplicó la fórmula:

$$\text{NPR} = \frac{\text{Ganancia de Peso (g) + Pérdida de peso grupo apteico (g)}}{\text{g proteína ingerida}} (\times 14 \text{ días})$$

Los resultados se analizaron estadísticamente empleando el análisis de varianza y el test de Duncan.

El resultado del PER para la caseína fue de 3.02 ± 0.2 y para la coqueta enriquecida fue de -3.77 ± 0.3 (negativo).

El resultado del NPR para la caseína fue de 4.26 ± 0.3 y el de la coqueta enriquecida fue de -0.17 ± 0.2 (negativo).

3. ESTUDIO REPRODUCTIVO EN RATAS

Para este estudio se utilizaron 27 hembras Wistar de 40 a 45 días de edad y pesando entre 112 y 135 g. Se dividieron en tres grupos de 9 hembras recibiendo dietas con coseta enriquecida en 4, 8 y 16% respectivamente. Toda esta experiencia se realizó bajo condiciones estandar de vivero con control de temperatura y humedad y con control de luminosidad con ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

Luego de 20 días bajo estas condiciones las hembras se pusieron en compañía de machos reproductores en relación de 1 por cada 3 hembras. Se mantuvieron durante 9 días, suficientes para abarcar al menos 2 ciclos estrales en cada hembra. Luego se separaron los machos, se controló posible preñez mediante los métodos usuales de observación visual de abultamiento del abdomen y aumento de peso. A medida que se detectaban hembras preñadas se colocanban en jaulas individuales para esperar el parto y efectuar los controles correspondientes.

En esta experiencia se controlaron

índices:

$$\text{a) I. de Fertilidad} = \frac{\text{Hembras preña}}{\text{Hembras cruzadas}}$$

$$\text{b) I de Nacimientos vivos} = \frac{\text{Crías nacidas vivas}}{\text{Total de crías nacidas}} \times 100$$

$$\text{c) I de supervivencia de 4° día} = \frac{\text{Crías vivas al 4°}}{\text{Crías nacidas vivas}} \times 100$$

$$\text{d) I de lactancia} = \frac{\text{Crías vivas al destete}}{\text{Crías vivas al 4° día}} \times 100$$

CUADRO N° 7

RESULTADO DEL ESTUDIO REPRODUCTIVO

Grupo	A (16%)	B (8%)	C (4%)
Hembras paridas	8	9	8
Hembras cruzadas	9	9	9
Indice de fertilidad	89	100	89
Crías nacidas vivas	45	52	42
Total crías nacidas	47	57	43
Indice nacimientos vivos	96	100	98
Crías vivas al 4° día	44	50	42
Crías nacidas vivas	45	52	42
Indice de supervivencia al 4 días	98	96	100
Crías vivas al destete	42	50	41
Crías vivas al 4° día	44	50	42
Indice de lactancia	95	100	98

4. ENSAYO EN POLLOS BROILER EN CRECIMIENTO

Para este ensayo se utilizaron 60 pollos broiler de un día variedad Hy-line (Champion S.A.) los que se mantuvieron en piso de viruta con agua y alimentos ad-libitum con temperatura ambiental de 33 a 38 grados, iluminación de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Al día 12 se separaron 36 pollos de peso variando entre 279 y 363 gramos. Ellos se distribuyeron en forma aleatoria en 4 grupos mediante un sistema de bloque basado en el peso.

Cada grupo de 9 aves se mantuvo durante 6 semanas con dietas diferentes. Ellos fueron:

Dieta A con 20% (g/100 gramos) de coseta enriquecida.

Dieta B con 10% de coseta enriquecida

Dieta C con 5% de coseta enriquecida

Dieta D control

Como dieta control se usó una fórmula probada para broiler. Para introducir la coseta enriquecida en las otras 3 fórmulas se rebajo proporcionalmente las 2 fuentes proteicas principales (soya y pescado) de manera de hacer isoproteicas las dietas. También se rebajó el contenido de harinilla de trigo en las dietas con coseta a fin de compensar el contenido de fibra aportado por el material en estudio.

Semanalmente se controló el peso individual. Para su estudio se efectuó un análisis estadístico a los días 14, 28 y 42 se obtuvo la media (x) y desviación estándar (D.S.) para cada grupo y los grupos entre ellos se analizaron mediante el test de student para ver posibles diferencias significativas.

En los días 14, 28 y 42 se controló consumo de alimento por grupo.

Con los valores de ganancia de peso y del consumo de alimento se calculó la conversión para cada dieta.

Cuatro aves de cada grupo fueron sacrificadas y sometidas a necropsia para observar posibles lesiones macroscópicas.

Diariamente se observaba comportamiento, estado general y aspecto externo de los cuatro grupos de aves. Solo hubo mortalidad de 5 pollitos la primera semana (previo a la administración de las dietas) y 3 de ellas fueron accidentales.

FORMULA DE LAS DIETAS USADAS EN AVES (g/100g)

Dietas	A (16%)	B (8%)	C (4%)	D (Control)
Maíz	55.42	57.16	56.73	54.8
Harina de pescado	7.38	10.04	11.37	12.7
Afrecho de soya	15.5	18.7	20.30	21.9
Harinilla de maiz	-	2.4	4.9	8.9
Conchuela	1.2	1.2	1.2	1.2
Avifos (1)	0.3	0.3	0.3	0.3
Pre-mezcla vitamínica (1)	0.15	0.15	0.15	0.15
Pre-mezcla mineral (1)	0.05	0.05	0.05	0.05
Coseta enriquecida	20.00	10.00	5.00	-

(1) Preparados especiales para broilers (AVICOSAN)

RESULTADOS

CUADRO N° 8

CONTROLES DE PESO AVES

a) Al inicio del experimento

Grupo	A (20%)	B (10%)	C (5%)	D (Control)
X	316	316	320	320

b) Día 14

Grupo	A (20%)	B (10%)	C (5%)	D (Control)
X	668,89	706,67	727,78	693,89
D.S.	47,81	69,28	86,28	19,65

Grupo A con C: diferencia significativa (p <0.1).

c) Día 28

Grupos	A (20%)	B (10%)	C (5%)	D (Control)
X	1053	1318	1314,4	1311,67
D.S.	69,10	84,48	77,15	72,89

Grupos A con B; A con C y A con D: diferencia significativa (p <0.001).

d) Días 42

Grupos	A (20%)	B (10%)	C (5%)	D (Control)
X	1585	2028,9	2119,4	2083,3
D.S.	133,24	113,1	102,9	160,1

Grupos A con B; A con C y A con D: diferencias significativa (p <0.001) . Grupo 3 con C: diferencia significativa (p <0.1).

CUADRO N° 9

GANANCIA DE PESO PROMEDIO A LAS 2, 4 Y 6 SEMANAS DE TRATAMIENTO
(g/animal)

Tratamiento	A (20%)	B (10%)	C (5%)	D (Control)
2 semanas	352.9	390.7	407.8	373.9
4 semanas	384	612	586	617.8
6 semanas	532	710	805	772
Ganancia acumulado	1.268,9	1.712,7	1.798,8	1.763,7

CUADRO N° 10

CONSUMO DE ALIMENTO PROMEDIO A LAS 2, 4 Y 6 SEMANAS (g/animal)

Tratamiento	A (20%)	B (10%)	C (5%)	D (Control)
2 semanas	477	469	456	447
4 semanas	541	747	702	753
6 semanas	734	908	958	910
Acumulado	1.752	2.124	2.116	2.110

CUADRO N° 11

CONVERSION (g alimento consumido/g peso .

con
p.

Tratamiento	A (16%)	B (8%)		
2 semanas	1.35	1.20	1.12	1.
4 semanas	1.41	1.22	1.20	1.22
6 semanas	1.38	1.28	1.19	1.28
Acumulado	1.38	1.24	1.18	1.20

Durante el desarrollo del ensayo, las aves de grupo A (20% de coseta enriquecida en la dieta), presentaron deposiciones líquidas o semilíquida, plumaje sucio y aspecto de mal estado fisiológico comparado con los otros grupos (arrinconados, poco activos, plumaje erizado en algunas aves).

Dos aves del grupo A y uno del grupo C presentaron malformación de las patas con desviación leve tipo perosis.

No se produjeron muertes espontáneas en ninguno de los grupos.

Resultados de las necropsia en aves

Grupo A = Aves de bajo peso. Zona pericloacal sucia con deposiciones oscuras, color verdoso y cafésoso. Depósitos grasos escasos. Huesos resblandecidos. Contenido de ciego abundante y de color oscuro, distensión cecal. Tres aves presentaron enteritis catarral leve.

Grupo B = Aves con órganos internos normales. Solo un ave presentó distensión cecal con contenido de ciego, líquido oscuro. Todas las aves de este grupo presentaban depósitos grasos disminuídos o escasos.

Grupo C = Aves con órganos internos normales. Escasos depósitos grasos.

No se aprecian lesiones macroscópicas

Grupo D = No se apreciaron lesiones macroscópicas, órganos internos normales. Depositos grasos regulares (no abundantes).

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

En la prueba de toxicidad subcrónica se puede ver que prácticamente no hay diferencia en la respuesta de los animales frente a los niveles de 4 y 8% de coseta enriquecida incorporada al alimento. Sólo hay diferencias en general de bajo significado estadístico como por Ej. la menor ganancia de peso del grupo A (nivel 16%) a la cuarta semana (Cuadro N° 1) y unas diferencias variables en el tamaño de algunos órganos (Cuadro N° 3) pero sin que se evidencien alteraciones morfo-funcionales. En general, podemos observar que las diferencias implican al grupo A o sea el que recibió mayor cantidad de coseta incorporada a la dieta. Lo más significativo que se observa es la diferencia repetida en el tamaño de las glándulas suprarrenales cuando se compara el grupo A con cada uno de los otros grupos. Este aumento de tamaño nos puede indicar que estamos frente a un inicio de alteración general. Es sabido que las adrenales son órganos de choque frente a estados de stress, agresión o cambios que puedan alterar el funcionamiento normal. En esta situación se produce una alteración del eje hipotálamo-hipofisis, que también puede explicar lo observado en el tamaño testicular. Ultimamente se han publicado trabajos que relacionan estado nutricional con desarrollo testicular especialmente en la línea germinativa a expensas de la línea espermática. En la parte funcional, (ver estudio reproductivo) no se observó alteración alguna.

Los estudios de efectos nutricionales, como consumo de alimento y ganancia de peso demuestran inocuidad en los niveles empleados.

Los estudios de hemograma, urianálisis y química sanguínea, así como los de histopatología, no revelan anormalidad en ninguno de los grupos. Una excepción la constituye los resultados de la fosfatasa alcalina la que aparece muy elevada para todos los grupos, incluido el control. Este resultado se nos ha repetido en estudios anteriores. Las ratas Wistar, empleadas en este caso, nos han arrojado frecuentemente valores sobre lo normal que menciona la literatura (135 a 180 U. como límite superior del rango). En esta oportunidad no tenemos explicación y sólo debe revisar las técnicas y condiciones de muestreo utilizadas por nosotros.

La conclusión que podemos sacar de esta parte del estudio es que la coseta enriquecida no demostró efectos tóxicos al ser adicionada al alimento de ratas en niveles de 4 y 8% y que, aparentemente, al 16% estamos en un nivel marginal sobre el cual pudieran aparecer manifestaciones tóxicas.

El estudio sobre la valoración biológica de la proteína es distinto. Los resultados son completamente negativo ya que los niveles de proteína incorporados a la dieta de ratas en crecimiento no fueron suficientes para sustentar un

crecimiento mínimo y los animales en experimento terminaron en malas condiciones. Todo esto no significa que el producto sea tóxico ya que el concepto de toxicidad está muy relacionado con el de dosis. Las razones del resultado negativo en este caso pueden ser varias:

- a) Para aportar un 10% de proteína a la dieta- como es lo que se utiliza en los PER y NPR- hubo que preparar una fórmula que llevaba sobre el 30% de coseta enriquecida. Esto significó elevar de partida el contenido de fibra de la dieta por sobre el 5% usual de las raciones usadas para PER y NPR.
- b) El contenido real de fibra tiene que ser superior al que calculamos basándonos en el A.Q.P., pues la determinación de fibra cruda subestima el verdadero contenido de los alimentos. Además el alto contenido de cenizas puede contribuir a aumentar el efecto fibra por la presencia de elementos minerales inertes no absorbibles.
- c) EL verdadero contenido de proteína de la coseta enriquecida puede estar falseado ya que es muy probable que el producto empleado contenga un porcentaje significativo de compuestos nitrogenados no proteicos como ácidos nucleicos, algún sustrato nitrogenado usado en la fermentación (?), metabolitos microbianos, etc.

d) El valor biológico de la proteína de la coseta enriquecida puede no ser muy elevado.

En el caso del PER y NPR se pone un animal en etapa de máximo incremento en crecimiento frente a un mínimo de proteína suficiente para obtener el máximo de aprovechamiento. En este caso los factores señalados son más que suficientes para producir el efecto observado.

Los ensayos sobre reproducción en ratas no necesitan mayor comentario ya que son autoexplicativos (Cuadro N° 7). Cualquier índice sobre noventa es considerado bueno o normal para cualquiera de los parámetros estudiados.

El hecho de que las hembras hayan mantenido su fertilidad, nos sugiere que la coseta enriquecida no afecta el funcionamiento ovarico y todo el mecanismo gestacional como la implantación. Las crías recién nacidas se veían activas y con vitalidad normal y llegaron al período de destete sin alteraciones en su desarrollo lo que nos indica que a los niveles empleados tampoco se afectó la lactancia. Puede llamar la atención la baja cantidad de crías nacidas pero se trató de hembras primíparas cuyas camadas son generalmente reducidas.

La experiencia en broiler quizás sea una de las más interesantes y explicativas. Con niveles de 20% de coseta

enriquecida en la dieta se presentaron alteraciones patológicas importantes. Aumentó el consumo de alimento, disminuyó la conversión y se presentó retraso en crecimiento de las aves (Cuadro 8-9-10 y 11). Las necropsias de las aves estudiada también hace aparecer al contenido de la fibra como responsable de los efectos encontrados. Ello puede provocar un aumento del tránsito intestinal y fallas en la absorción de los nutrientes.

Todas las evidencias hacen aparecer a la fibra (además de la probable ayuda de las cenizas) como las culpables del efecto tóxico observado.

En los grupos con 5 y 10% (C y B respectivamente) se observó completa normalidad y, más aún, el grupo con 5% tuvo mejor respuesta productiva en ganancia de peso y conversión al compararlo con el grupo B (10%) y el D (Control). Aparentemente a ese nivel habría un efecto benéfico del producto estudiado, quedando establecido entre 10 y 20% el límite entre la inocuidad y la toxicidad de la coseta enriquecida.

Como conclusión final se puede decir que la evidencia experimental indica que el límite entre inocuidad y toxicidad del producto analizado esta entre el 10 y el 20 por ciento y que los efectos observados son sugestivamente atribuibles al alto contenido de fibra más un posible efecto de los elementos minerales presentes.

RECOMENDACIONES

Sería altamente conveniente efectuar algunas determinaciones para caracterizar mejor el producto. Entre ellas vale la pena mencionar:

- Aminograma
- Determinación del contenido de ácidos nucleicos y oxalatos.
- Determinación del contenido de sustancias nitrogenadas no proteicas.
- Obtención de un aislado proteico para caracterizar la proteina.
- Ensayo de PER y NPR con aislado proteico o en combinación con fuentes proteicas exentas o bajas en fibra.
- Caracterizar el contenido de elementos minerales.
- Efectuar ensayo piloto en Broiler y/o cerdos para caracterizar posible efecto benefico detectado a nivel del 5%

ANEXO 2

DESCRIPCION DEL SISTEMA DE ADQUISICION DE DATOS

Se describe a continuación el sistema de adquisición de datos seleccionado y, para efectos de comparación, se incluye la descripción de otras dos alternativas que fueron descartadas en razón de su mayor costo y menor flexibilidad

1. Configuración seleccionada

El sistema de adquisición de datos seleccionado está constituido básicamente por dos partes: el hardware y el software. Dentro del hardware se pueden distinguir los siguientes elementos:

- Panel de adquisición de datos
- Computador MITAC, procesador 80286 (ya adquirido)
- Paneles terminales
- Sensores
- Interfases

El software, por otro lado, está diseñado tanto para la adquisición de datos como para el control del sistema, además de permitir el desarrollo de programas orientados a las necesidades específicas. A continuación se especifica las capacidades del software manejado vía menú:

- Despliegue de datos numéricos en formato de tabla
- Despliegue de datos en tiempo real en el diagrama de procesos
- Control seleccionable automático o manual
- Despliegue de valores presentes, máximos, mínimos, promedios y diferencias de entradas análogas
- Despliegue de estados digitales I/O
- Graficación de datos en tiempo real y set points
- Cambio de los canales desplegados en el gráfico y visualización instantánea de todos los datos acumulados hasta el estado presente
- Control ON-OFF cuando las entradas caen fuera del rango seleccionado, tanto de set-points como a intervalos de tiempo definidos

- Pueden ser programadas salidas analógicas para funciones tipo rampa, salto y mantenimiento, ingresando para ello el punto inicial y final de cada segmento

El panel de adquisición de datos, constituyente del hardware, posee una resolución de 12 bits, 16 canales o entradas analógicas y 16 I/O digitales. Además, este panel acepta entradas analógicas desde 2 mV a 10 V a una velocidad de 1000 muestras por segundo. Los rangos de entradas seleccionables por software son: +-25 mV, 50 mV, +-250 mV, 500mV, +-5 V, 10 V; +-1 mA, 2 mA, +-10 mA, 20 mA y +-50 mA. Este sistema se caracteriza por poseer un modo autoregulable, que entrega la mejor resolución para cualquier señal dada.

Asociado al panel o tarjeta de adquisición de datos, que es insertada directamente al computador, está el panel terminal, que es donde se conectan directamente los sensores. Este panel acepta ocho entradas analógicas y configura igualmente ocho I/O digitales.

El sistema de adquisición de datos está adaptado para la lectura directa, usando como sensores termocuplas, RTD y, en general, voltajes continuos de baja impedancia.

El panel de salidas analógicas es adecuado para el control de circuitos analógicos de set-points y para la generación de funciones tipo rampa, salto y mantenimiento. Este panel está diseñado para ser usado en conjunto con el de adquisición de datos, descrito previamente.

El panel seleccionado tiene cuatro salidas analógicas de 12 bits de resolución. Posee cuatro rangos de salida: 0-5 V, 0-10 V, +- 5 V y 4-20 mA y ocho I/O digitales.

Las variables a ser sensadas y registradas en la FSS se listan a continuación:

Variable	Nº de sensores	Necesidad de interfase
Temperatura lecho sólido	5	No
Temperatura baño térmico	1	No
Temperatura aire entrada fermentador	1	Si
Humedad relativa de aire	1	Si

De acuerdo a lo anterior, se hace necesaria la construcción de interfases para la adecuación de las señales en cuestión. Esto será ejecutado en conjunto con la Escuela de Ingeniería Eléctrica de la Universidad Católica de Valparaíso.

2. Otras Configuraciones

Existen otras dos alternativas de sistemas de adquisición de datos, cuyas características se detallan a continuación.

La parte del hardware está constituida por:

- Unidad central remota de adquisición de datos.
- Computador MITAC, procesador 80286
- Interfase RS-232-C, conexión a puerto serial.
- Sensores
- Interfaces condicionadoras de señal.

La unidad central remota de adquisición de datos (MAC-14) cotizada posee 48 canales de entradas analógicas, las cuales están programadas por separado, permitiendo la lectura de las distintas clases de señales simultáneamente.

La unidad, en principio, lee entradas de voltage; luego, para permitir la lectura de sensores tales como termocuplas, RTD, y transmisores existe la opción (incluida en la lista de items) de un paquete condicionador de señal.

Este sistema de adquisición de datos configura 11 entradas binarias, lo que permite el monitoreo del estado de válvulas ON/OFF o switches, además permite la medición de flujo y rpm mediante el conteo de pulsos. Por otro lado, la unidad configura 10 salidas tipo TTL que permiten el control de alarmas externas u operaciones de proceso. En este sentido es posible acoplar relés opcionales (no incluidos en la lista) que otorgan una mayor capacidad de control.

La unidad central remota lee voltajes en el rango de 0 - 10 Volts y corriente en los rangos 4 - 20 mA o 0 - 50 mA

Además posee una resolución de 16 bits y las entradas de señales deben ser de baja impedancia (10000 Mohms).

Por otro lado, la parte del software, está constituida por los siguientes paquetes:

- Software guiado por menú
- Software para condicionamiento de señal. (x)
- Software de manejo de impresora. (x)
- Software para banda de registro. (x)
- Software para gráficas de tiempo real

(x): Estos ítems son instalados en fábrica.

Todos estos programas constituyen un solo paquete que permite:

- Desplegar datos en forma numérica, gráficos de barra u otros formatos.
- Desplegar 1, 4, 8 o 16 gráficos a la vez.
- Fácil manejo debido a menús de ayuda implementados para guiar al usuario por el sistema en la puesta en marcha.
- Proveer referencias de temperatura y linealización para termocuplas y rangos de escala para otros sensores.
- Otorga voltajes compensados para mediciones con RTD.
- Capacidad de impresión simultánea con el despliegue en pantalla.

La interfase RS-232-C permite conectar la unidad de adquisición de datos al puerto serial del computador haciendo factible ubicar la unidad hasta 1000 pies del computador.

Por otro lado, la unidad remota lee señales provenientes de sensores de baja impedancia, lo cual hace necesario construir interfaces, en caso que se requiera, para compatibilizar, al igual que el sistema descrito anteriormente.

La tercera alternativa está constituida por la unidad base del sistema de adquisición de datos y control HP 3421-A comercializada por la Hewlett-Packard. Esta unidad lee hasta 30 canales de entradas, permitiendo la lectura de señales en VCC, VCA, Ohms en 2 y 4 hilos, frecuencia y temperatura. También lee y escribe información digital y almacena sobre 30 lecturas analógicas. La unidad HP 3421-A posee las siguientes características incorporadas:

- Convertidor analogo/digital integrador de digitos
- Contador incorporado
- Compensación para termocupla.
- Linearización para termocupla tipo T incorporado
- Buffer de almacenamiento de 30 lecturas
- Display de 30 canales con indicadores de poder y errores
- Calibración electrónica.
- Batería recargable
- Set de comando de alto nivel

Los rangos de las señales que lee la unidad son 300 mV, 3 V, 30 V, 300 V y un modo de autocalibración que ajusta la señal del sensor a la más apropiada. La velocidad de muestreo es de 2 a 35 lecturas/segundo.

Las opciones incluidas en los items de la cotización son:

- Módulo multiplexor de 8 canales con actuador de 2 canales.
- Modulo multiplexor de 9 canales con actuador de 1 canal.

Estas dos tarjetas son instaladas en la unidad base, configurando el sistema de adquisición de datos para la lectura a través de 17 canales analógicos con capacidades de control dadas por 3 salidas analógicas programables.

El sistema en su totalidad no incluye un paquete de programas que permita el manejo del sistema via computador. Para ello es necesario desarrollar un software adecuado por el usuario.

El sistema de adquisición de datos seleccionado y descrito en el punto 1, satisface plenamente los requerimientos del proceso de FSS, dejando incluso una cierta potencialidad para aumentar el número de sensores o variables a sensor. En razón de ello se ha solicitado a la Oficina PNUD Santiago la adquisición de este sistema (ver cotización adjunta de W. Reichmann para equipo Cole-Parmer).

W. Reichmann y Cia. Ltda.
SANTIAGO - CHILE

MIGUEL CLARO 987 - CASILLA 16553 - FOMOS: 2049713 - 2045714 - 2049715 - 2049716 - FAX 0056(2) 2351600

Señor(es)

Programa de las Naciones Unidas
para el Desarrollo
Oficina del Representante Residente
P. de Valdivia 0193 P/7
SANTIAGO

Fax 032/932333
REF.: Proyecto ONUDI - UNESCO DP-RLA-003
Actividad DP - 03.32.1
Contrato 91-091-G

FACTURA PROFORMA
Nº 89/92

NUESTRO SIGNO:GB/AM/RB FECHA: 12.5.92

FABRICANTE: Cole Parmer Internat Co. 7425 North Oak Park Ave. Chicago Illinois 60648 USA

PLAZO DE ENTREGA EN FABRICA: 2-3 meses aprox. después de recibido su pedido.

PAIS DE ORIGEN: U.S.A. PUERTO DE EMBARCUE: Chicago

VIA DE TRANSPORTE: Flete aéreo consolidado CLASIFICACION Código NAB: 8473.30

FACTURA PROFORMA VALIDA POR: 45 días. COMISION: incluida en el precio

SEGURO: cubierto por fábrica contra todo riesgo, incluso 60 días de Aduana.

FORMA DE PAGO A FAVOR DE: Cole parmer Internat. Co.
mediante: Acreditivo irrevocable, a la vista, CONFIRMADO Y LIBRE DE GASTOS.
 Cheque anticipado Cobranza días.

Por intermedio de Un Banco en U.S.A.

Precios, gastos y plazo de entrega quedan sujetos a confirmación del fabricante.

Nº DE CATALOGO	DESCRIPCION	US\$ PUESTO Fábrica
-08302-10	1 Tarjeta de adquisición de datos, de 16 entradas análogas, con 12 bit de resolución.	US\$ 990.=
-08303-00	1 Tablero para terminales de 8 canales.	270.=
-08303-30	1 Tablero para terminales de 8 canales.	249.=
-08303-70	2 Soportes plásticos, para terminales. c/u 30.=	60.=
	Valor puesto fábrica	US\$1.469.=
	Gastos hasta FCA aprox.	281.=
	Valor FCA aprox.	US\$1.750.=
	Flete aéreo consolidado aprox.	110.=
	Seguro aprox.	40.=
	Valor CIP aprox.	US\$1.900.=
		=====

De Uds. muy atte.

W. REICHMANN Y CIA. LTDA.
W. Reichmann

Señor(es)
Programa de las Naciones Unidas
para el Desarrollo
Oficina del Representante Residente
P. de Valdivia 0193 P. 7
SANTIAGO

Fax. 032/932333
REF.: Proyecto ONUDI - UNESCO DP -RLA-003
Actividad DP -03.32.1
Contrato 91-091-G

FACTURA PROFORMA

Nº 87/92

NUESTRO SIGNO: GB/AM/RB

FECHA: 11.5.92

FABRICANTE: Cole Parmer Internat. Co., 7425 North Oak Park Ave. Chicago/Illinois
60648 U.S.A.

PLAZO DE ENTREGA EN FABRICA: 2-3 meses aprox. después de recibido su pedido.

PAIS DE ORIGEN: U.S.A

PUERTO DE EMBARQUE: Chicago

VIA DE TRANSPORTE: Flete aéreo consolidado CLASIFICACION Código NAB: 8471-10

FACTURA PROFORMA VALIDA POR: 45 días. COMISION: incluida en el precio

SEGURO: cubierto por fábrica contra todo riesgo, incluso 60 días de Aduana.

FORMA DE PAGO A FAVOR DE: Cole Parmer Internat. Co.

mediante: Acreditivo irrevocable, a la vista, CONFIRMADO Y LIBRE DE GASTOS.
 Cheque anticipado Cobranza días.

Por Intermedio de Un Banco en U.S.A.

precios, gastos y plazo de entrega quedan sujetos a confirmación del fabricante.

Nº DE CATALOGO	DESCRIPCION	US\$ PUESTO Fábrica
-08338-17	1 Sistema de adquisición de datos, de 48 canales. Conexión: 220V, 50 Hz. 8473.30	US\$ 3.925.=
-08338-50	1 Software guiado menú, requiere 200 K RAM	315.=
-08338-51	1 Opción para condicionamiento de señal	385.=
-08338-52	1 Opción de manejo de impresora	255.=
-08338-55	1 Software para banda de registro	230.=
-08338-70	1 Interfase RS 232 C	385.=
-08338-80	1 Software gráficas de tiempo real	385.=
08302-00	1 Tarjeta de adquisición de datos, de 16 entradas analo- gas, con bit de resolución.	1.590.=
08303-00	1 Tablero para terminales de 8 canales. Valor puesto Fábrica Gastos hasta FCA aprox. Valor FCA	270.= US\$ 7.740.= 260.= US\$ 8.000.=

W. Reichmann y Cia. Ltda.

- 2 -

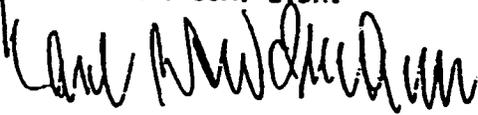
100

Flete aéreo aprox.
Seguro aprox.
Valor CIP aprox.

US\$ 8.000.=
210.=
140.=
US\$ 8.350.=

De uds. muy atte.

W. REICHMANN Y CIA. LTDA.



ANEXO 3

INFORME DE AVANCE

PROYECTO : DEGRADACION ENZIMATICA DE RESIDUOS
AGROINDUSTRIALES

CENTRO PARTICIPANTE : LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y
FARMACEUTICAS

INFORME PREPARADO POR : MERCEDES ZALDIVAR

PERIODO QUE SE INFORMA : ENERO A MAYO 1992

En el último informe de avance (1991) reportamos el aislamiento de una mutante de Trichoderma aureoviride 6-14-11. Esta cepa produce, en cultivos sumergidos con celulosa microcristalina como única fuente de carbono, muy buenos niveles de todas las enzimas del complejo celulasas. La mutante 6-14-11 además presenta la característica de ser parcialmente resistente a la represión catabólica ejercida por glucosa. Se demostró que, en presencia del represor I. aureoviride produce niveles enzimáticos que alcanzan un 50% a un 60% de los producidos en condiciones desreprimidas.

Resultados preliminares informados en el informe anterior, indicaban que esta mutante es capaz de crecer a 35°C, temperatura a la cual la cepa parental 7-121 ni la cepa silvestre son capaces de hacerlo. Estos resultados hacían presumir que la cepa 6-14-11, además de ser hiperproductora de celulasas y parcialmente resistente a represión catabólica, es termotolerante.

En el presente informe se reporta la producción de celulasas y xilanasas al cultivar el hongo a 33°C. Se describe además una nueva mutante, de séptima generación, aislada por su capacidad de crecer y producir enzimas a 33°C.

Materiales y Métodos

Microorganismo.- Se utilizó Trichoderma aureoviride cepa silvestre y las mutantes 7-121 y 6-14-11. El aislamiento y las propiedades de estas mutantes fueron descritas en informes de avance anteriores.

Inducción y selección de mutantes termotolerantes.- Se sometió una suspensión de 5×10^7 esporas de T. aureoviride 6-14-11 a la acción de un mutágeno químico, nitrosoguanidina, durante 40 minutos con agitación a 35°C. Las esporas sobrevivientes se sembraron en placas de agar papa dextrosa con la adición de 0.1% Triton X-100 y 0.4% sorbosa. Las placas se incubaron a 35°C durante 3 a 4 días hasta la aparición de estructuras fructificantes. Todos los clones capaces de crecer a 35°C fueron replicados en quintuplicado al medio de selección con 10 g/l de celulosa amorfa. Las placas se incubaron a 35°C durante 3 a 4 días y luego a 50°C durante 18 horas con el objeto de acelerar la acción de las celulasas. Se seleccionaron aquellas colonias que presentaban mayor crecimiento que la cepa parental, medido en función al diámetro de la colonia, y que además presentaron halos de hidrólisis de mayor diámetro que la cepa parental.

Producción de celulasas en medio líquido.- Los métodos utilizados para la producción de celulasas en matraces agitados y la determinación de actividades enzimáticas fueron descritos en informes de avance anteriores. La única condición de cultivo que se modificó en esta etapa, fue la temperatura de incubación de los matraces, que para los datos presentados en este informe corresponde a 33°C.

Resultados

Determinación de la termorolerancia de T. aureoviride 6-14-11.-

Uno de los objetivos a cumplir durante esta etapa era la obtención de una mutante termotolerante, capaz de crecer y producir celulasas y hemicelulasas a temperaturas superiores a 30°C. La necesidad de una cepa termotolerante surge del proceso de fermentación sólida en que la distribución de calor en el reactor no es enteramente uniforme por lo que se producen zonas en que la temperatura es superior a la que es capaz de tolerar la mutante 7-121.

En el informe de avance anterior se reportaron resultados preliminares que indicaban que la mutante 6-14-11, aun cuando no fue aislada por su capacidad de crecer a temperaturas mas altas, era capaz de crecer en medio de cultivo sólido al incubar las placas a 35°C. Mas aún, las colonias se mantenían viables luego de incubar las placas durante 18 horas a 50°C. Las cepa silvestre y 7-121 eran incapaces de crecer a temperaturas superiores a 33°C.

Inducción y selección de mutantes termotolerantes.- Con el objeto de cuantificar la producción de celulasas y hemicelulasas por la mutante 6-14-11 a 33°C, se cultivo este hongo en medio líquido de Mandels con 7.5 g/l de celulosa microcristalina como fuente de carbono y 0.94 g/l de urea como fuente de nitrógeno. Los matraces se incubaron con agitación orbital a 33°C durante 15 días. Periódicamente se tomaron muestras, se centrifugaron, y en los sobrenadantes se determinaron las actividades enzimáticas y proteína soluble.

Los resultados se muestran en las figuras 1, 2 y 3. Se observa que la producción de endoglucanasa, FPA, celobiasa, xilanasas y proteína soluble por la cepa 6-14-11 en estas condiciones es 50 a 100% superior a aquella de la cepa 7-121. Cabe señalar que la producción de todas las enzimas por ambas cepas se ve retrasada a 33°C respecto a lo observado a la temperatura habitual de

incubación de 28°C, lo que hace necesario prolongar el cultivo hasta los 15 días. Las enzimas alcanzan niveles detectables entre el cuarto y sexto día de incubación mientras que a 28°C se observa producción enzimática ya los dos días de cultivo.

Aun cuando I. aureoviride 6-14-11 es mas termotolerante que su cepa parental 7-121, los niveles enzimáticos producidos a 33°C son inferiores a los producidos a 28°C. Se decidió entonces utilizar la mutante 6-14-11 como cepa parental para una nueva mutagénesis con nitrosoguanidina, utilizando como criterio de selección de mutantes la habilidad de crecer y de producir celulasas a 35°C.

Se seleccionaron siete clones capaces de crecer a 35°C y de producir halos de hidrólisis de la celulosa de mayor diámetro que aquellos de la cepa parental. Todos estos clones se cultivaron a 33°C en medio líquido con en objeto de cuantificar su producción de celulasas. Sólo una de estas mutantes, denominada 7-23-9 produjo niveles enzimáticos significativamente superiores a los producidos por 6-14-11 en las mismas condiciones.

La figura 4 muestra los resultados de endoglucanasa y de FPA por ambas cepas. Se puede observar que la endoglucanasa se comienza a producir a los cuatro días de cultivo y que alcanza a los 10 días 48 U/ml, es decir un 40% superior a la cepa parental. Se obtuvo un resultado semejante en la FPA en que a los 10 días el nivel enzimático es de 0.78 U/ml, un 50% superior a la parental 7-121.

En la figura 5 se muestran los resultados de celobiasa y xilanasa. Se observa que a los 10 días de cultivo los niveles de celobiasa son muy superiores a los de 7-121, lográndose un aumento de 100%. Con respecto ala xilanasa, se logró sólo un pequeño aumento de 22%.

La figura 6 muestra los resultados de producción de proteína soluble. Se observa que se logró un incremento de 40% a los 10 días de cultivo.

La tabla resume los resultados de la producción enzimática a 33°C por las cepas 7-121, 6-14-11 y 7-23-9, y se las compara con las enzimas producidas por 6-14-11 a 28°C. Se observa que la nueva mutante produce a 33°C niveles enzimáticos significativamente superiores a aquellos producidos por 7-121 y por 6-14-11. Al comparar estos niveles con un control de 6-14-11 a 28°C se aprecia que, aún cuando la nueva mutante 7-23-9 es parcialmente termotolerante, la producción de celulasas llega a sólo un 50% de los niveles alcanzados por la cepa parental a 28°C.

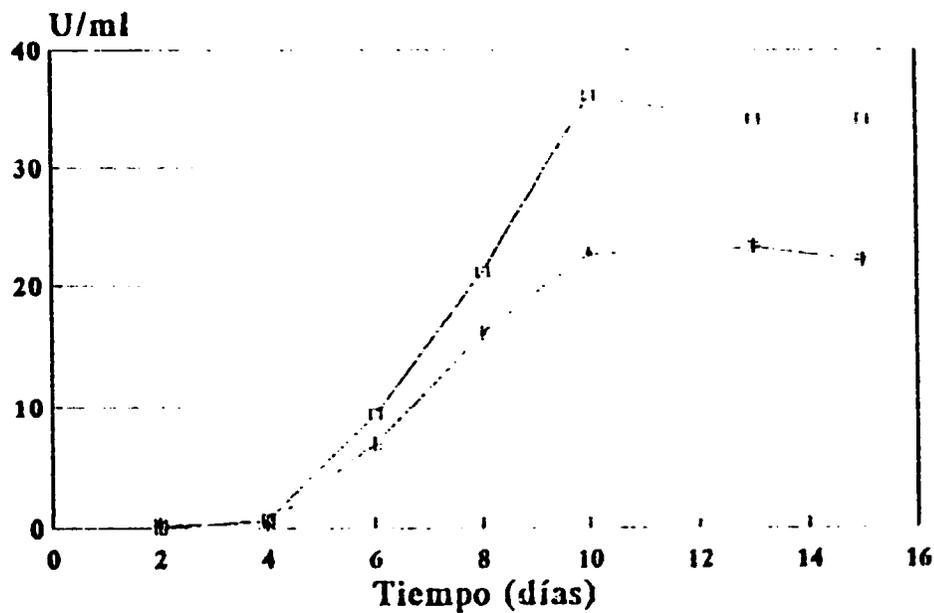
Los resultados mostrados permiten concluir que es posible obtener mutantes termotolerantes, capaces de crecer y producir enzimas celulolíticas a 33°C. Cabe destacar que, aunque no se logró alcanzar un nivel óptimo de enzimas a temperaturas superiores, I. aureoviride es un hongo que se puede someter a mutagénesis química y lograr mutantes estables. Es posible predecir que la nueva mutante podrá ser sometida nuevamente a tratamiento con mutágeno para la obtención de mutantes con mayor termotolerancia.

Leyendas de las Figuras

- Figura 1.- Cinética de producción de endoglucanasa y FPA por Trichoderma aureoviride 7-121 y 6-14-11 a 33°C.
- Figura 2.- Cinética de producción de celobiasa y xilanas por Trichoderma aureoviride 7-121 y 6-14-11 a 33°C.
- Figura 3.- Cinética de producción de proteína soluble por Trichoderma aureoviride 7-121 y 6-14-11 a 33°C.
- Figura 4.- Cinética de producción de endoglucanasa y FPA por Trichoderma aureoviride 6-14-11 y 7-23-9 a 33°C.
- Figura 5.- Cinética de producción de celobiasa y xilanas por Trichoderma aureoviride 6-14-11 y 7-23-9 a 33°C.
- Figura 6.- Cinética de producción de proteína soluble por Trichoderma aureoviride 6-14-11 y 7-23-9 a 33°C.

FIGURA 1

ENDOGLUCANASA



FPA

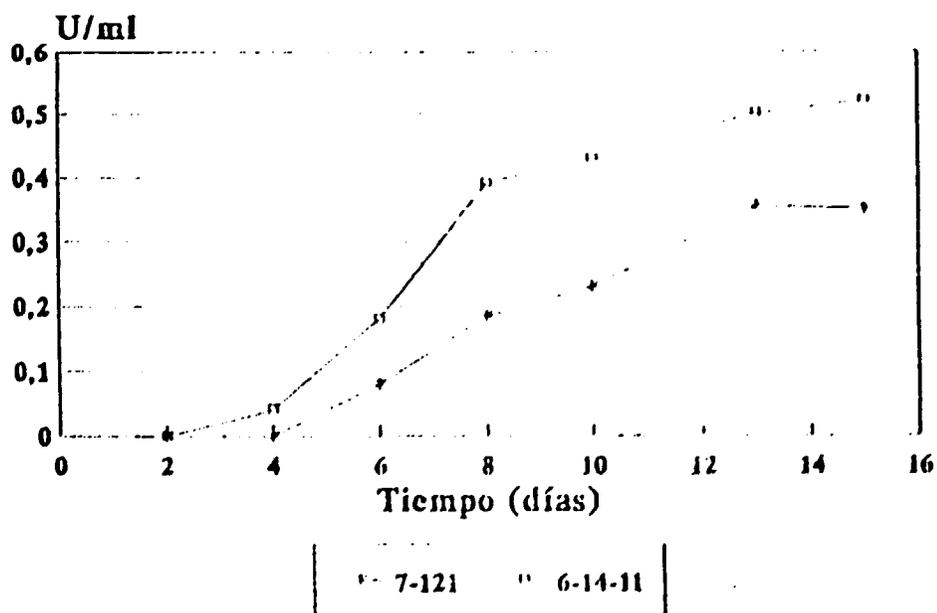
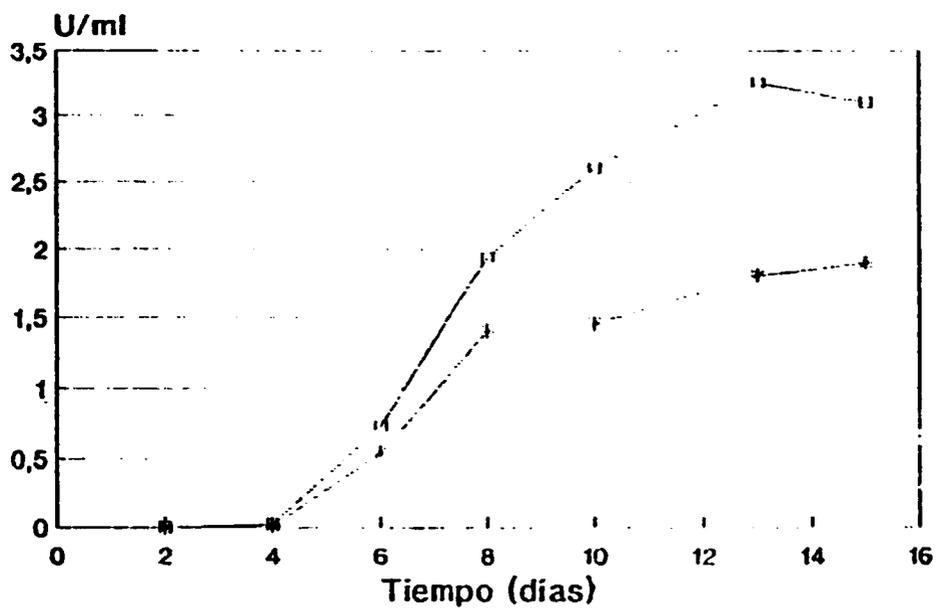


FIGURA 2
CELOBIASA



XILANASA

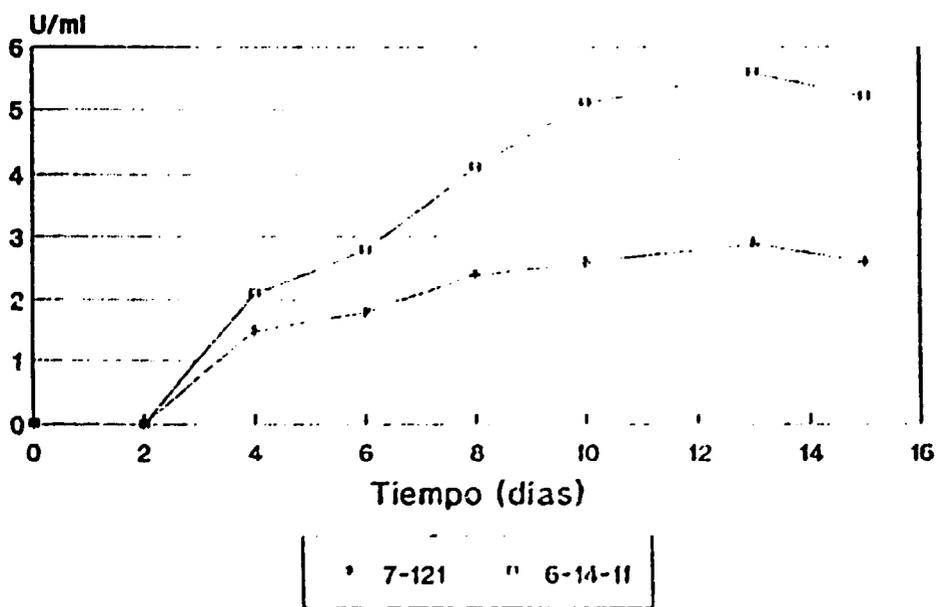


FIGURA 3
PROTEINA SOLUBLE

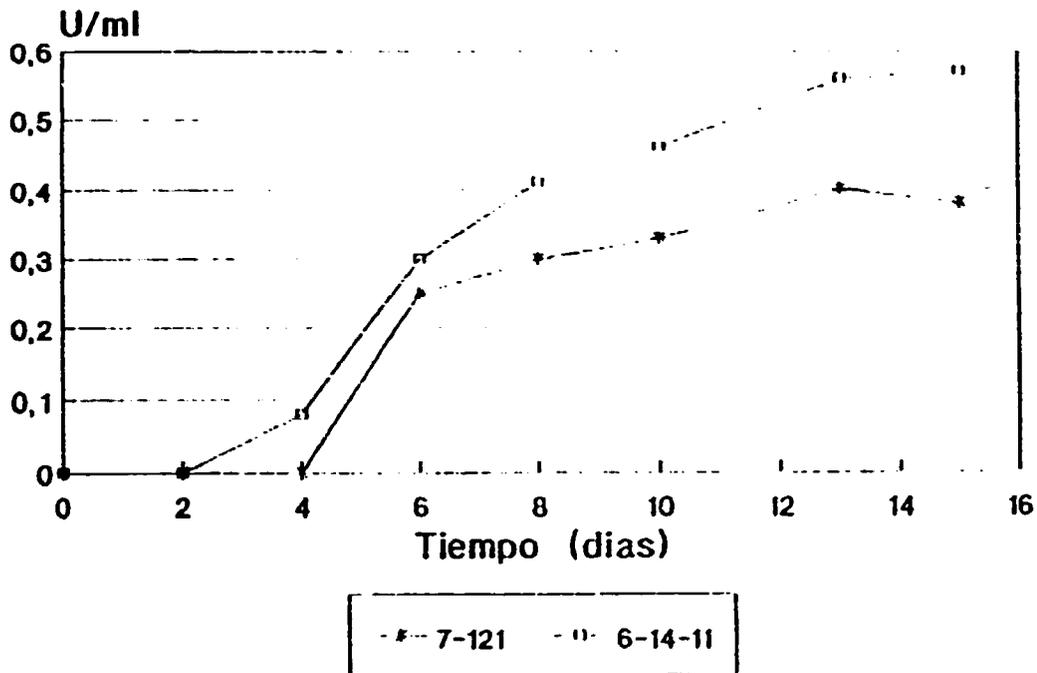
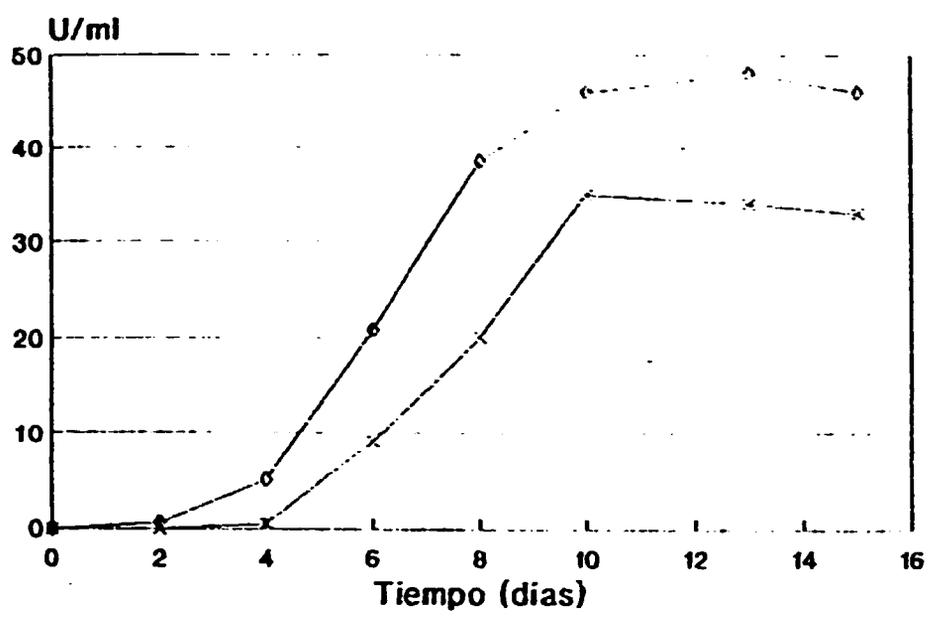
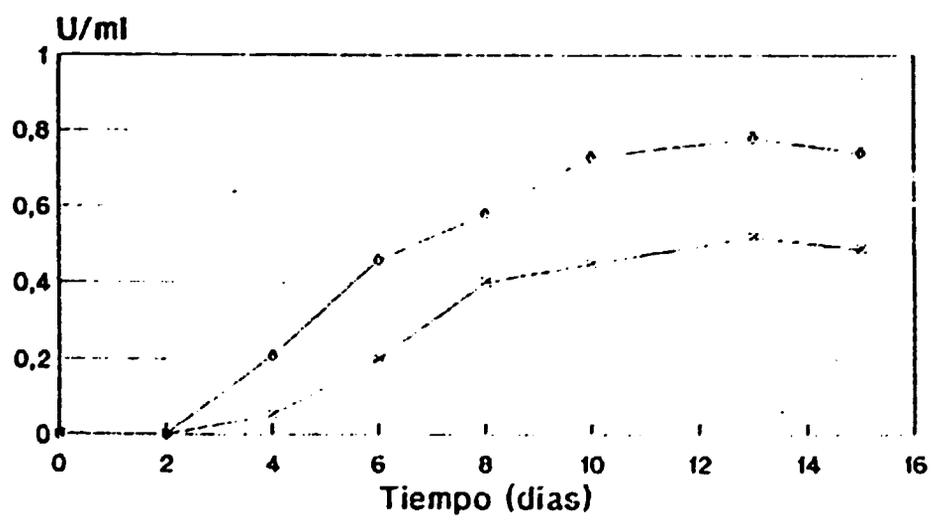


FIGURA 4
ENDOGLUCANASA



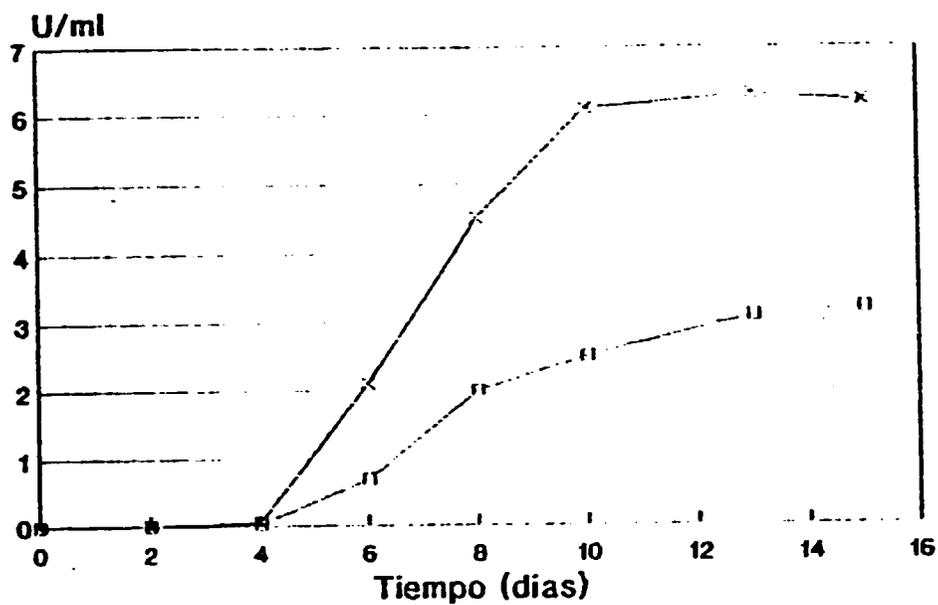
FPA



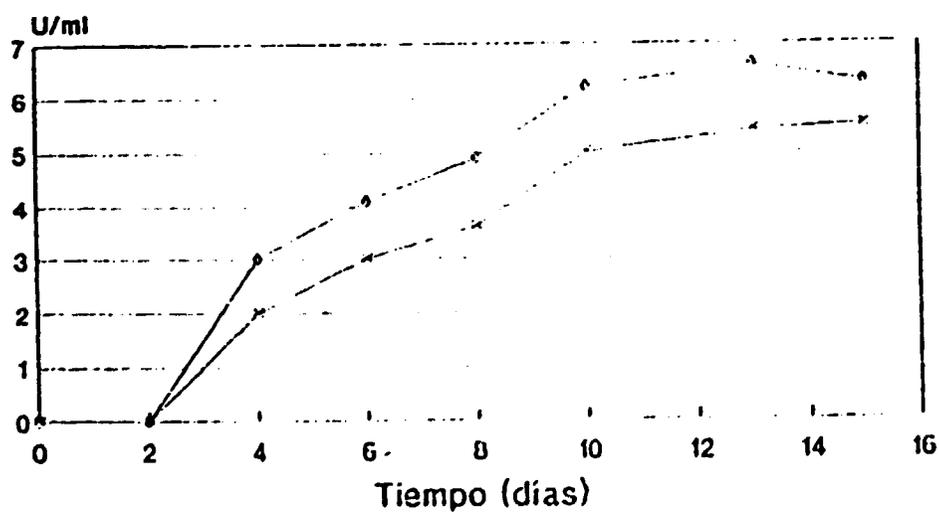
—●— 6-14-11 -x- 7-23-9

FIGURA 5

CELOBIASA

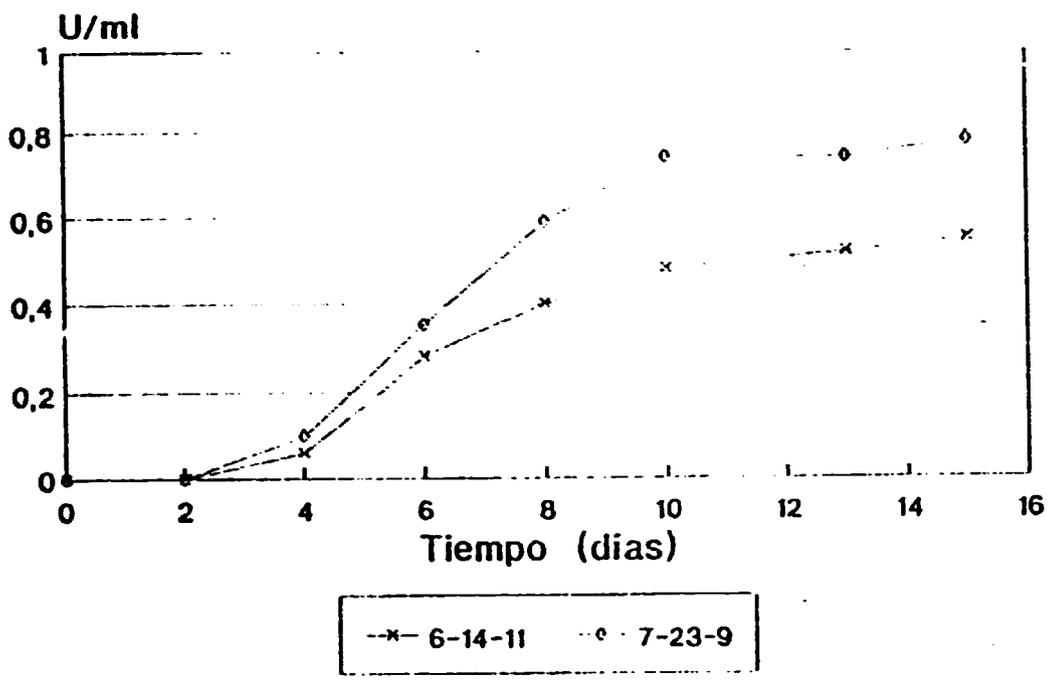


XILANASA



x	6-14-11	o	7-23-9
---	---------	---	--------

FIGURA 6
PROTEINA SOLUBLE



Efecto de la temperatura de cultivo sobre la producción de celulasas y xilanasas por *I. aureoviride*, cepa silvestre y mutantes.

CEPA	EG U/ml	FPA U/ml	β -glu u/ml	Xilanasas U/ml	Proteína mg/ml
*6-14-11	61.1	1.21	11.4	13.2	1.61
silvestre	6.2	0.12	0.9	1.4	0.21
7-121	22.7	0.36	1.8	2.6	0.40
6-14-11	35.0	0.50	3.25	5.6	0.56
7-23-9	46.6	0.78	6.3	6.6	0.74

Actividades enzimáticas determinadas en filtrados crudos a los 12 días de cultivo a 33°C en medio de Mandels modificado con 7.5 g/l de Sigmacell.

* : actividades enzimáticas producidas por la cepa 6-14-11 a 28°C.

EG : Endoglucanasa

FPA : actividad sobre papel filtro

β -glu: β -glucosidasa o celobiasa

ANEXO 4

Santiago, 12 de Junio de 1992.-

Profesor.
Andrés Illanes
Vive Rector. Universidad
Católica de Valparaíso
FAX Nr. 56(32) 212746
56(32) 233393

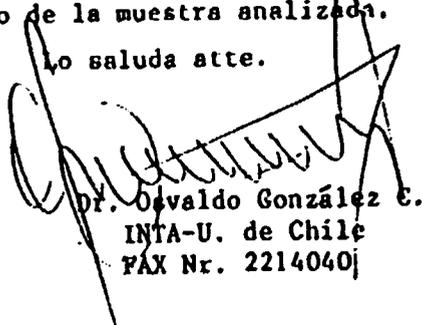
Estimado Prof. Illanes:

Adjunto le estoy enviando los resultados del análisis de aminoácidos efectuados en la Universidad de Concepción por el Dr. Dietrich von Baer.

A continuación le hago un resumen comparativo con el patrón FAO con un breve comentario.

De los resultados enviados por von Baer se puede deducir que es necesario caracterizar en detalle el contenido nitrogenado de la muestra analizada.

Lo saluda atte.



Dr. Osvaldo González E.
INTA-U. de Chile
FAX Nr. 2214040

Análisis comparativo de la Coseta Enriquecida con el patrón FAO

AMINOACIDO	Patrón FAO		Coseta Enriquecida
	mg de aa /1 g de N	g de aa /100 g Prot.	g/ 100 g de Prot.
ISOLEUCINA	250	4.00	5.9
LEUCINA	440	7.04	6.2
LISINA	340	5.44	4.23
PENILALANINA	380	6.08	4.69
+ TIROSINA			5.46
METIONINA	220	3.52	3.10
+ CISTINA			2.32
TREONINA	250	4.00	4.22
TRIPTOPANO	60	0.96	N.D.
VALINA	310	4.96	5.61

N.D. + No se determinó.

De acuerdo con la composición aminoacídica de la proteína (sin tomar en cuenta la falta de datos sobre triptofano) se ve una proteína que pudiera ser de calidad aceptable o buena. Su computo aminoacídico estaría alrededor de 78.



Concepción, 3 de Junio de 1992

Señora
 Marcela Aguayo R.
 INTA Universidad de Chile
 FAX: 02-2214030

Estimado Prof. Aguayo:

Con respecto al análisis de aminoácidos solicitado por Ud., cuyos resultados adjunto, me cabe señalar que éste no había sido informado, debido a que se repitió y los dos veces se obtuvo un porcentaje de recuperación muy bajo (~ 26 - 30 %), en circunstancias de que los porcentajes de recuperación deben estar según lo establecido por AOAC entre 85 - 105 % y luego se normalizan a 95 %. La primera vez pensamos que podría haber habido un problema en la hidrólisis, pero se repitió, dando un

Análisis de la Composición de Aminoácidos en Harina de Levadura cultivada en Coseta de remolacha - MUESTRA INTA

Aminoácidos	muestra 1 g/100g Prot.	muestra 1 g/100g Prot.	Promedio g/100g Prot.
ASPARTICO	8,51	8,77	8,64
GLUTAMICO	12,02	11,78	11,90
SERINA	8,04	7,15	7,60
GLICINA	5,23	4,76	4,99
HISTIDINA	3,34	2,90	3,12
ARGININA	4,20	4,59	4,39
TREONINA	4,13	4,30	4,22
ALANINA	3,96	3,94	3,95
PROLINA	8,53	6,82	6,68
TIROSINA	5,24	5,68	5,46
VALINA	5,72	5,50	5,61
METIONINA	3,05	3,15	3,10
CISTINA	2,39	2,26	2,32
ISOLEUCINA	5,94	5,87	5,90
LEUCINA	6,1	6,21	6,20
FENILALANINA	4,74	4,64	4,69
LISINA	3,75	4,70	4,23
	95	95	95

Observación: Los aminoácidos azufrados totales, (Metionina, Cistina) no se determinaron con oxidación per fórmica, sino sólo con hidrólisis ácido.

resultado análogo. Dicho problema no surgió con otras muestras de nosotros que se analizaron en conjunto con la de ustedes, por lo que aparentemente sería un problema inherente a esa muestra. Le agradecería.

126

1) Verificar el % de proteína indicado por Uds., lo cual incide en el cálculo hecho por nosotros.

2) Discutir con Don Enrique y verificar en bibliografía, que eventual problema podría presentarse en la hidrólisis de ese tipo de muestras, dado que en otras no se ha presentado.

Le saludó muy atentamente



Dr. Dietrich von Boer
Director
Depto. Análisis Instrumental

ANEXO 5

UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA DE INGENIERIA BIOQUIMICA

INFORME SOBRE ESTADIA EN EL LABORATORIO DE
MICOLOGIA Y BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL AGRARIA LA MOLINA.

Preparado por: Christian Bernet Y.

Valparaiso, 14 de Abril de 1992.

RESUMEN

En el presente trabajo se llevaron a cabo dos fermentaciones en sustrato sólido usando los hongos filamentosos Trichoderma aureoviride cepa 7-121 y Trichoderma reesei cepa LM-28 y coseta agotada de remolacha como fuente única de carbono suplementada con sales. La fermentación se realizó en columnas de Rimbault usando las técnicas del Laboratorio de Micología y Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. Se compararon las cinéticas de producción del complejo enzimático celulolítico, encontrándose que T. reesei produjo un máximo de 11,2 UPF/g de sólido seco a los 8 días de cultivo y T. aureoviride un máximo de 17,2 UPF/g sólido seco a los 9 días. Se determinó además la evolución de la concentración de azúcares reductores, proteína soluble, humedad del lecho sólido y pH.

Por otro lado, hubo un intercambio de experiencia en lo relativo al sistema de control por computador de la fermentación en sustrato sólido piloto implementado en el laboratorio peruano.

I.- Métodos

1.1.- Formación de esporas.

Las esporas fueron generadas en placas Petri con papa dextrosa agar como medio de cultivo, inoculadas con esporas provenientes de un cultivo hecho en tubo de agar inclinado. Las placas inoculadas fueron incubadas por 7 días a 30 °C en estufa.

1.2.- Inóculo.

Se preparó 100 ml de medio de cultivo líquido y se inoculó con 2×10^7 esporas resuspendidas previamente con una solución de Tween-80 al 0.1 %. Los matrices fueron incubados a 30 °C aproximadamente con agitación magnética durante 60 horas. La composición del medio de cultivo usado está dado en las Tablas N°1 y N°2.

1.3.- Fermentación sólida.

La fermentación sólida se llevó a cabo en columnas de Raimbault; estas fueron cargadas con 12 g de coseta seca (aprox.) acondicionada con la solución de sales y el inóculo. La coseta y las sales fueron esterilizadas aparte en autoclave por 25 minutos a 15 psi de presión. La temperatura de cultivo se mantuvo

Tabla N° 1.- Composición del medio de cultivo líquido para producción de micelio.

Compuesto	Concentración (g/l)	
Peptona	2.0	
Glicerol	1.0	
Coseta agotada de remolacha (-15 mesh)	4.0	
Sulfato de amonio	1.4	
Fosfato diácido de potasio	2.0	
Urea	0.3	
Cloruro de calcio	0.3	
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.3	
Tween-80	1.0	ml/l
Solución de sales	1.0	ml/l

Tabla Nº 2.- Composición de la solución de sales.

Compuesto	Concentración (g/l)
Sulfato ferroso	5.0
Sulfato de manganeso monohidratado	1.96
Cloruro de zinc	1.66
Cloruro de cobalto	2.0

alrededor de 28 °C y el flujo de aire alimentado fue de 12 ml/min. columna aproximadamente.

El medio de cultivo sólido fue ajustado a una tasa de C:N de 10:1 mediante la dosificación del sulfato de amonio y urea, manteniendo su razón de 3.79:1 respectivamente, que es la usada en la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Católica de Valparaiso. La composición del medio de cultivo sólido se detalla en la Tabla N° 3.

1.4.- Muestreo y métodos analíticos.

Se usaron 6 columnas para el seguimiento de la evolución del cultivo de cada cepa. Cada columna representó el estado del cultivo en un tiempo determinado al cual la columna era removida y su contenido sometido a análisis.

1.4.1.- Extracción enzimática.

El complejo enzimático celulolítico fue extraído mediante la adición de 20 ml de agua destilada a 2 g de material fermentado y la mezcla sometida a agitación en shaker durante 20 minutos a 250 rpm; posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante fue usado para la determinación de actividad enzimática, concentración de azúcares reductores

Tabla N° 3.- Medio de cultivo sólido.

Compuesto	Concentración (g/100 g CAR seca *)
Sulfato de amonio	5.8
Urea	1.53
Fosfato diácido de potasio	0.372
Cloruro de calcio	0.056
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.056
Solución de sales	0.2 ml

* Tamaño de partícula: -9 +12 mesh.

concentración de proteína y pH.

1.4.2.- Actividad enzimática.

Se determinó la actividad enzimática combinada mediante el ensayo del papel filtro, expresándose en UPF/g masa seca.

1.4.3.- Proteína soluble.

La concentración de proteína soluble fue determinada mediante el método de Folin.

1.4.4.- Azúcares reductores.

La concentración de azúcares reductores se determinó con el método del ácido dinitrosalísílico.

1.4.5.- Contenido de humedad.

La humedad del sólido se determinó por secado en estufa a 100 °C hasta peso constante.

II. RESULTADOS

FIGURA Nº 1

Perfil de Actividad Enzimática Combinada Durante Cultivo de *T.reesei*

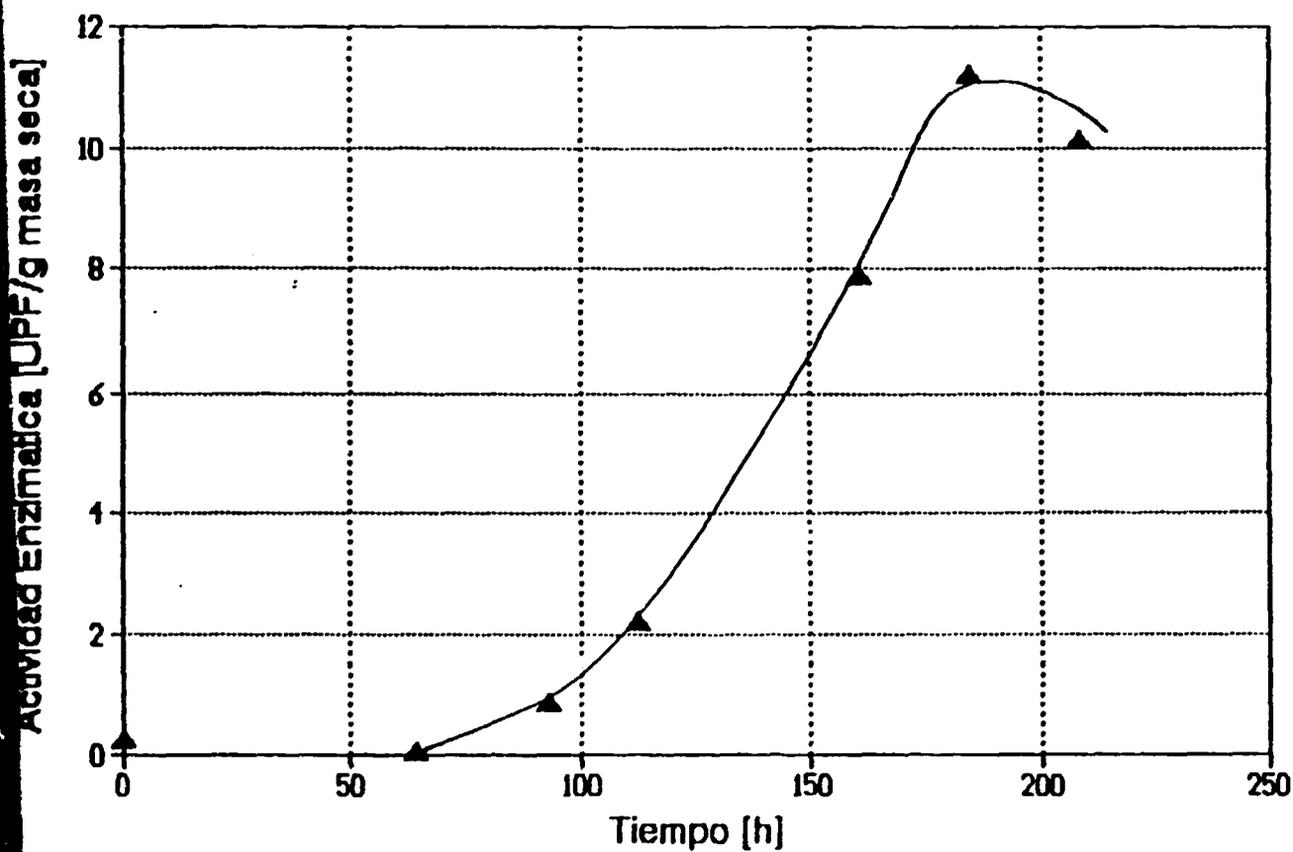


FIGURA Nº 2

Perfil de Concentracion de Proteinas Solubles Durante Cultivo de T.reesei

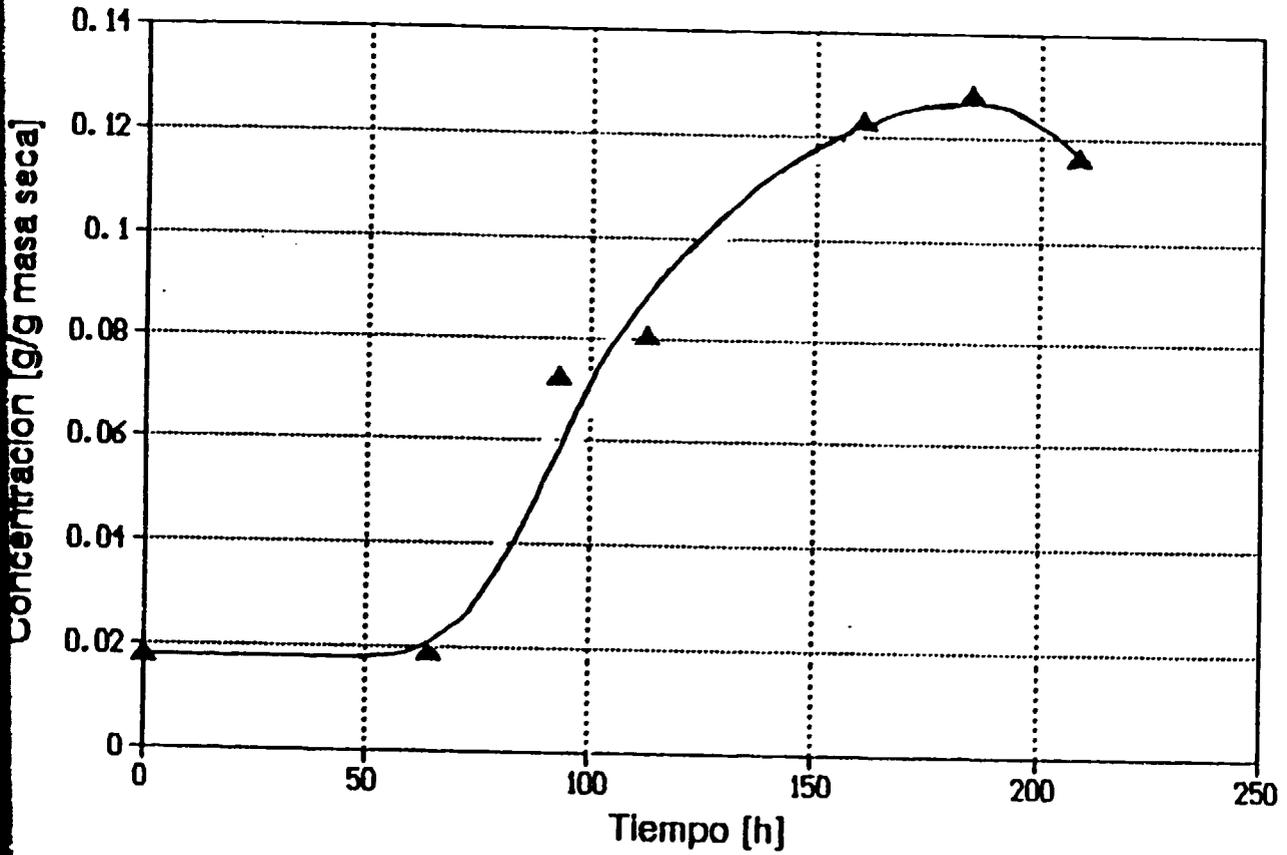


FIGURA Nº 3

Perfil de Concentracion de Azucares Reductores Durante Cultivo de *T.reesei*

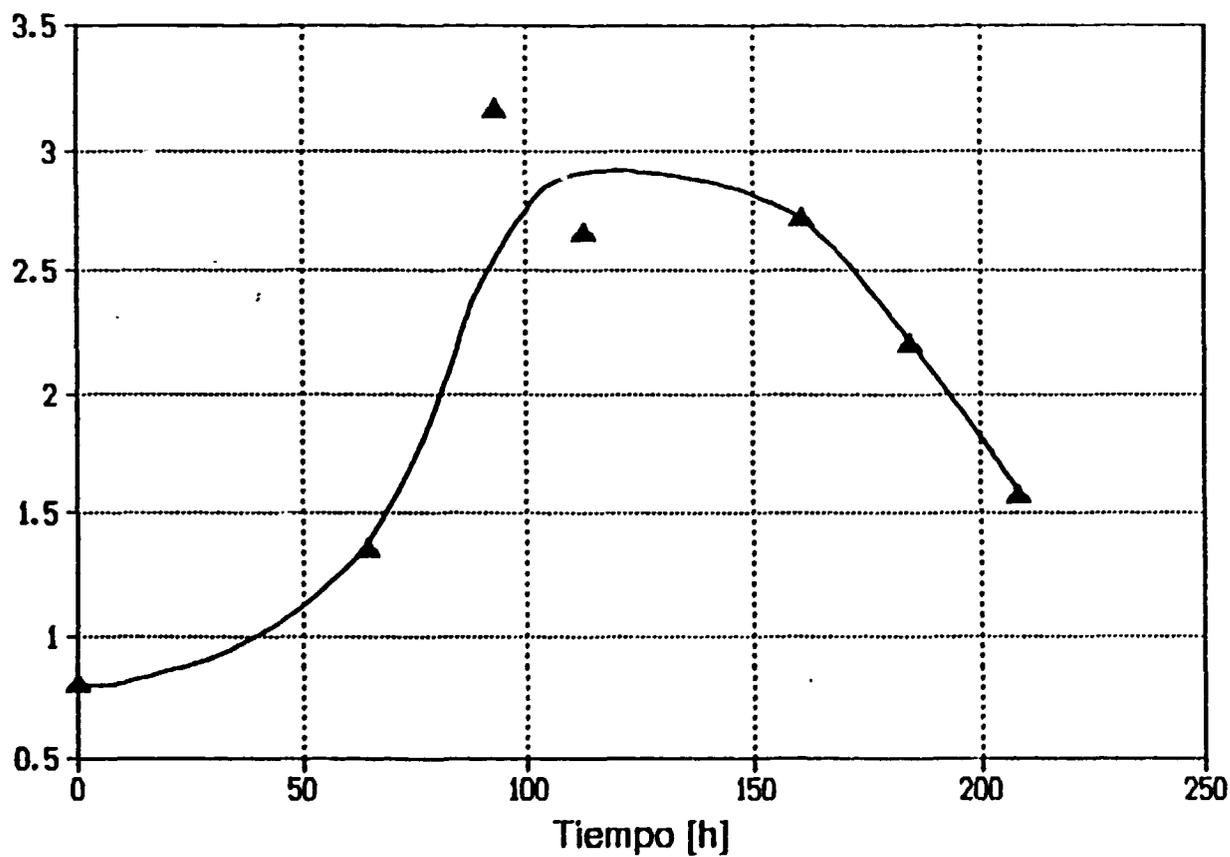


FIGURA Nº 4

Perfil de pH durante Cultivo T.Reesei

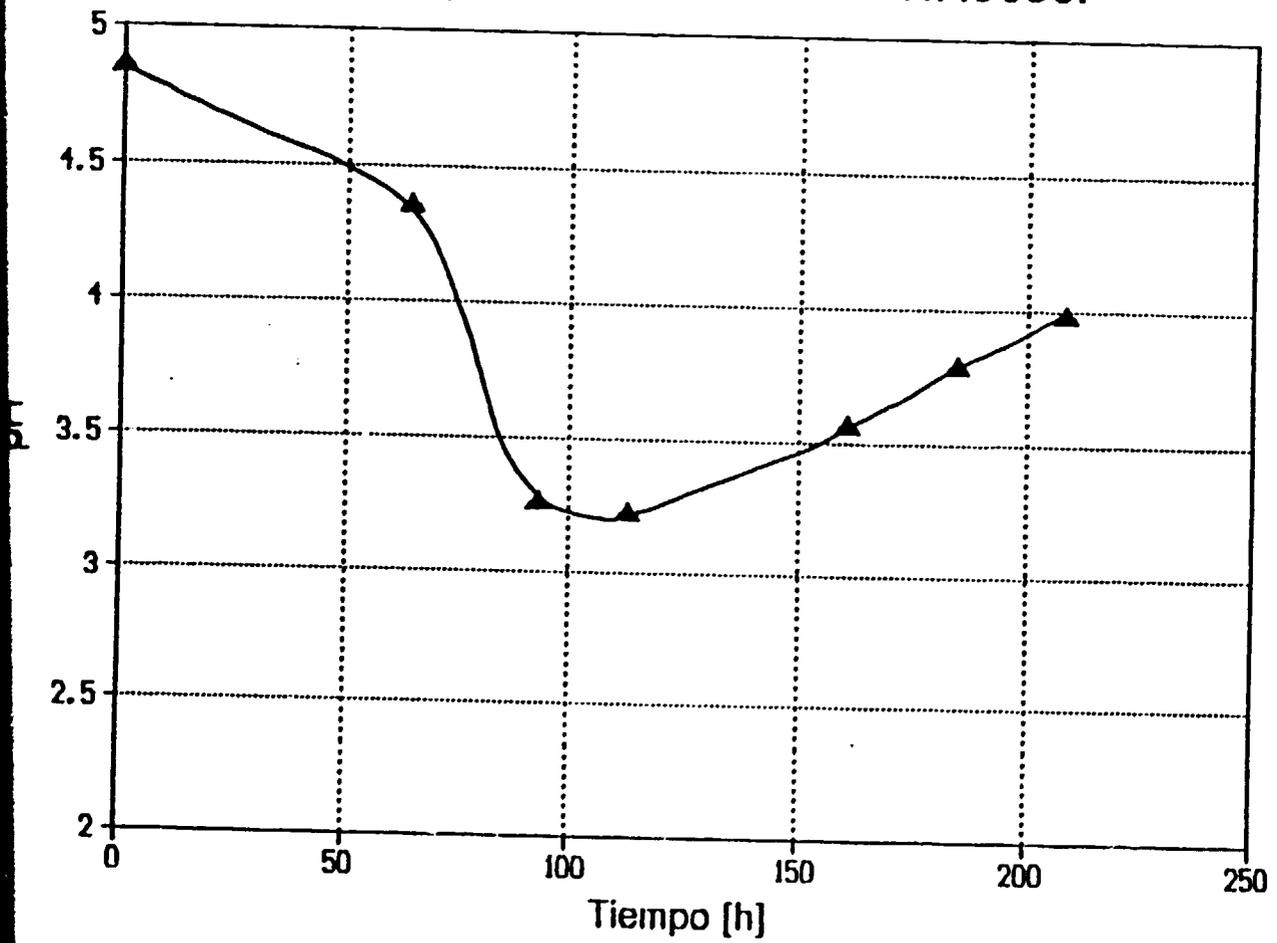


FIGURA Nº 5

Evolucion del Contenido de Humedad del Lecho Solido durante cultivo T. Reesei

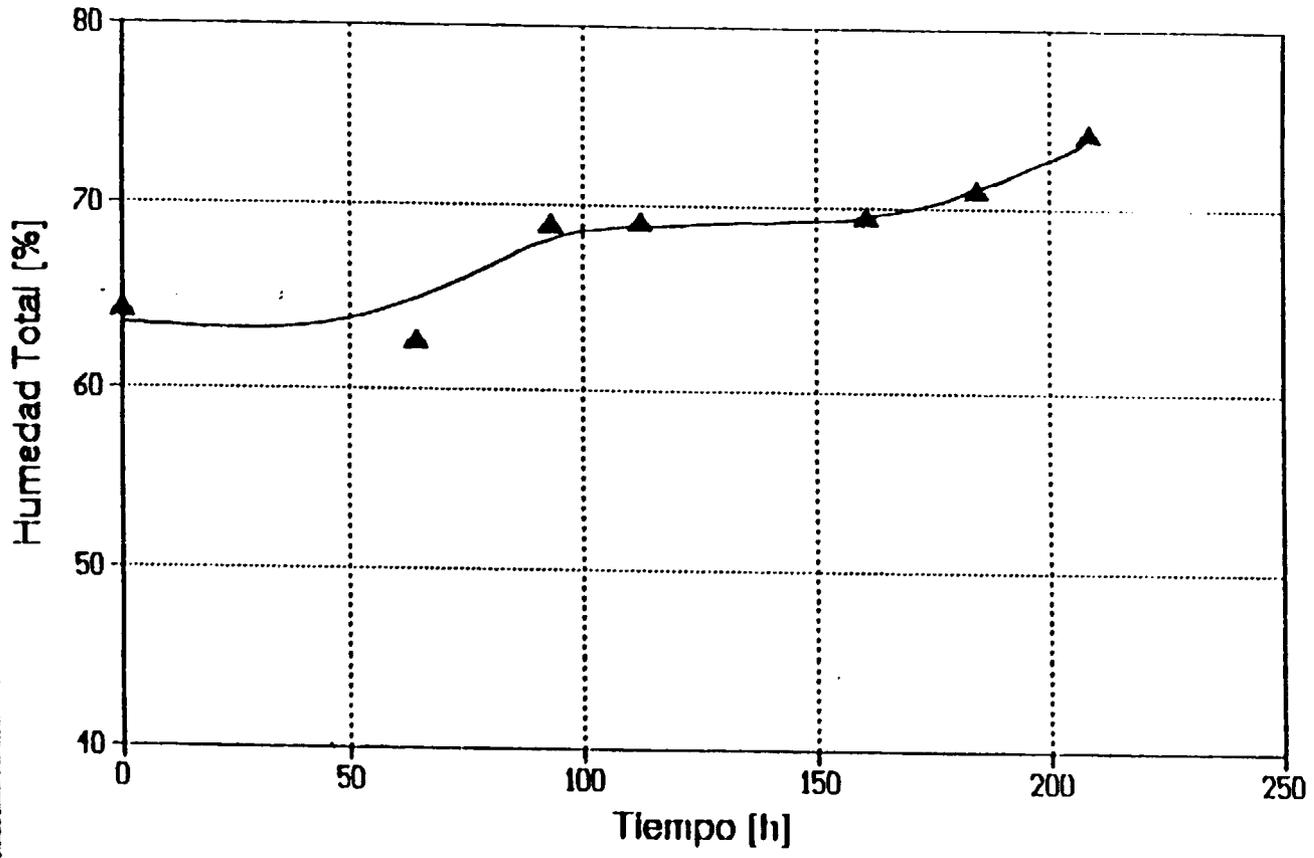


FIGURA Nº 6

Actividad Enzimatica Combinada Durante Cultivo de T.aureoviride

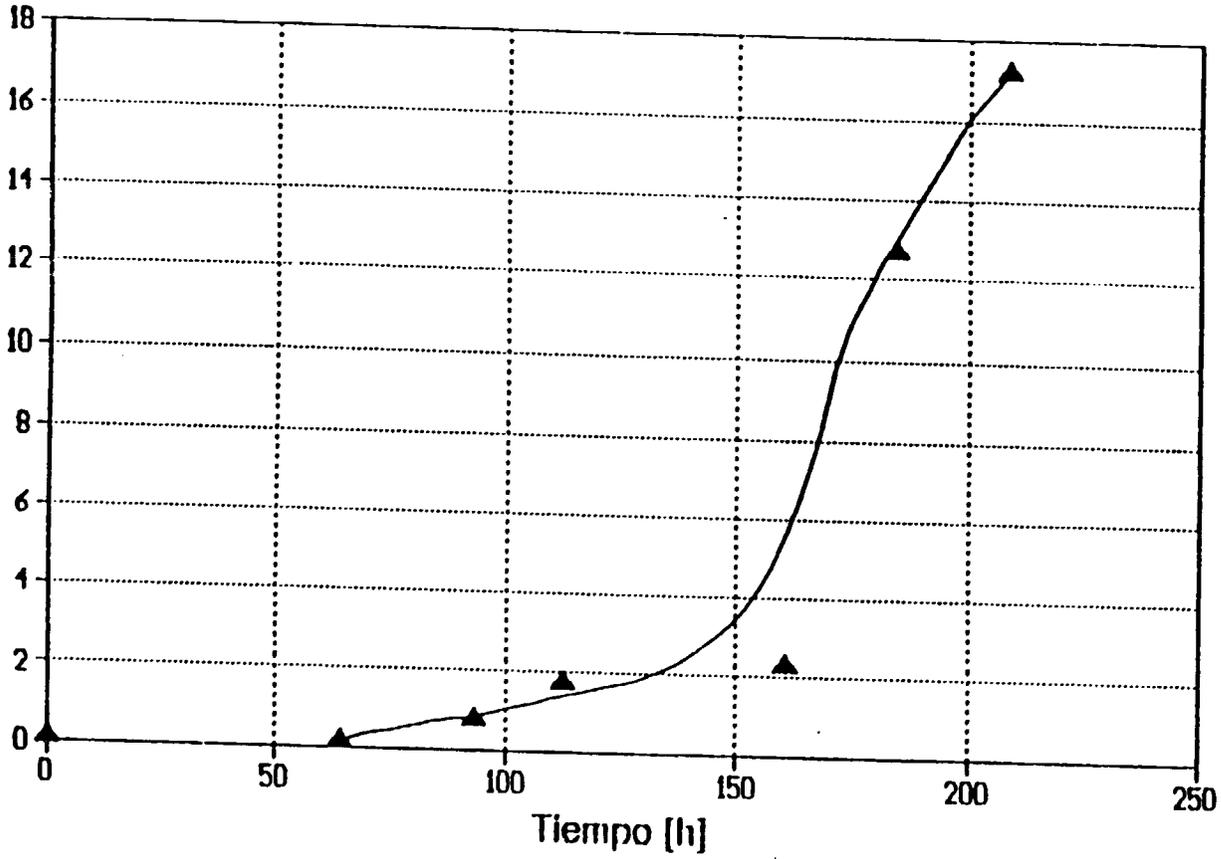


FIGURA Nº 7

Perfil Concentracion Proteinas Solubles Durante Cultivo de T.aureoviride

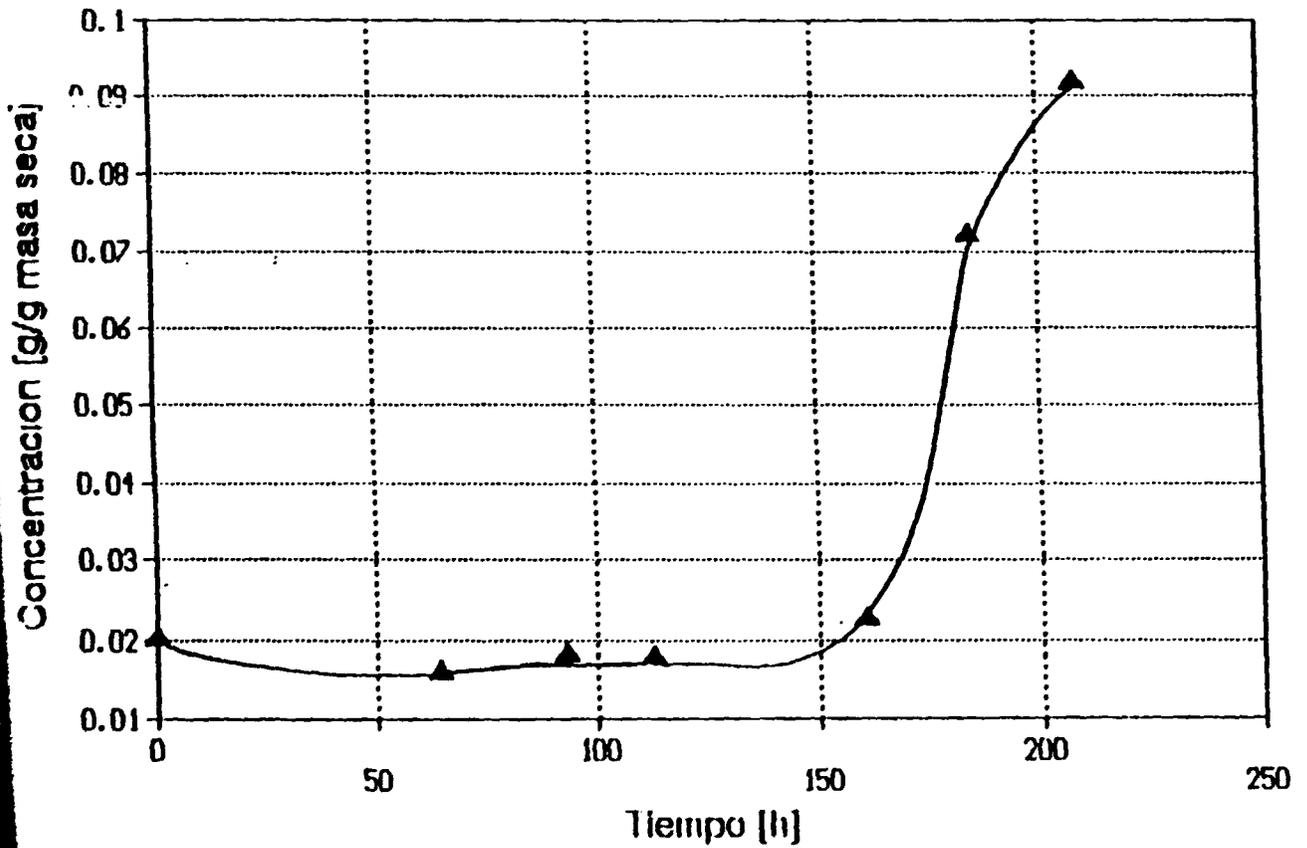


FIGURA N° 8

Concentracion de Azucares Reductores Durante Cultivo de T.aureoviride

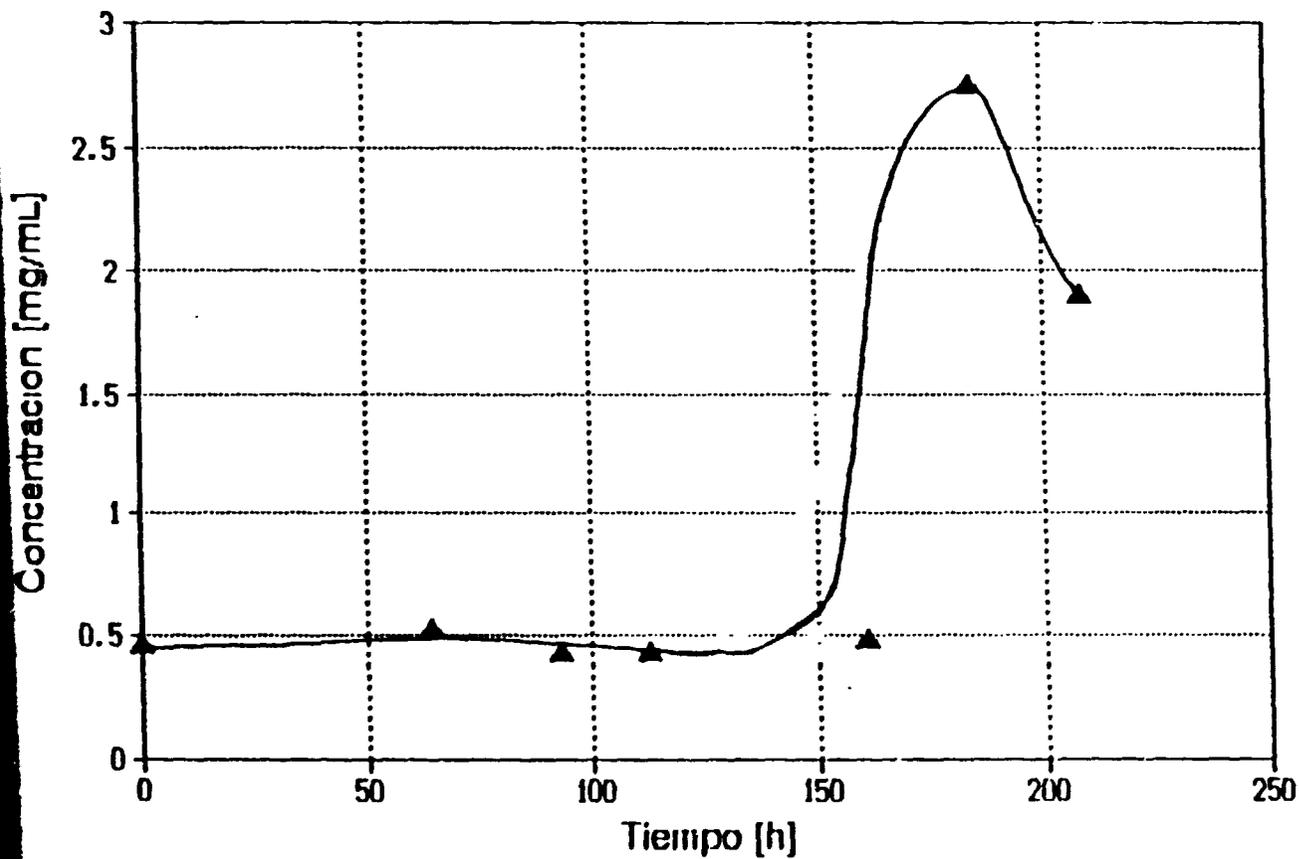


FIGURA N° 9

Perfil de pH durante el Cultivo de *T.aureoviride*

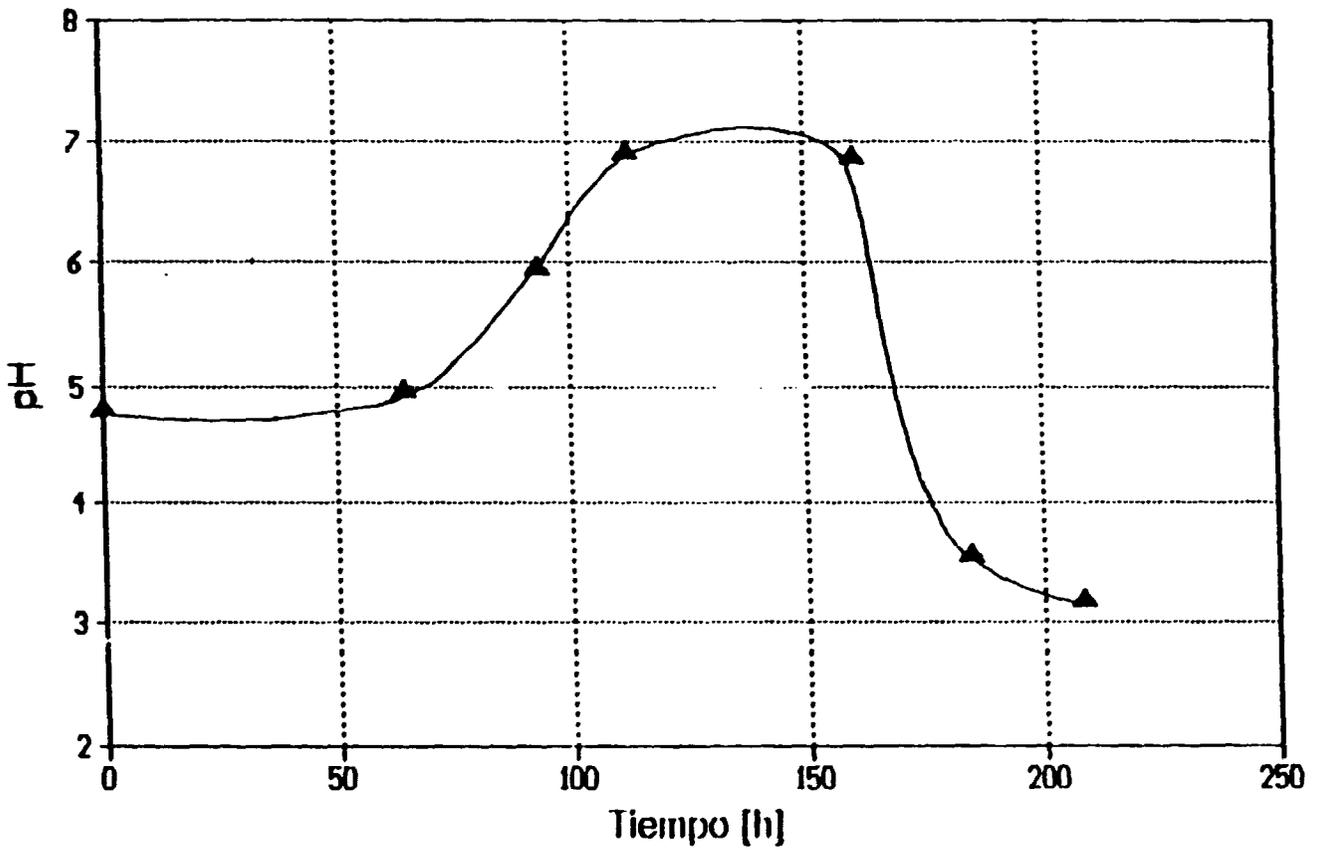
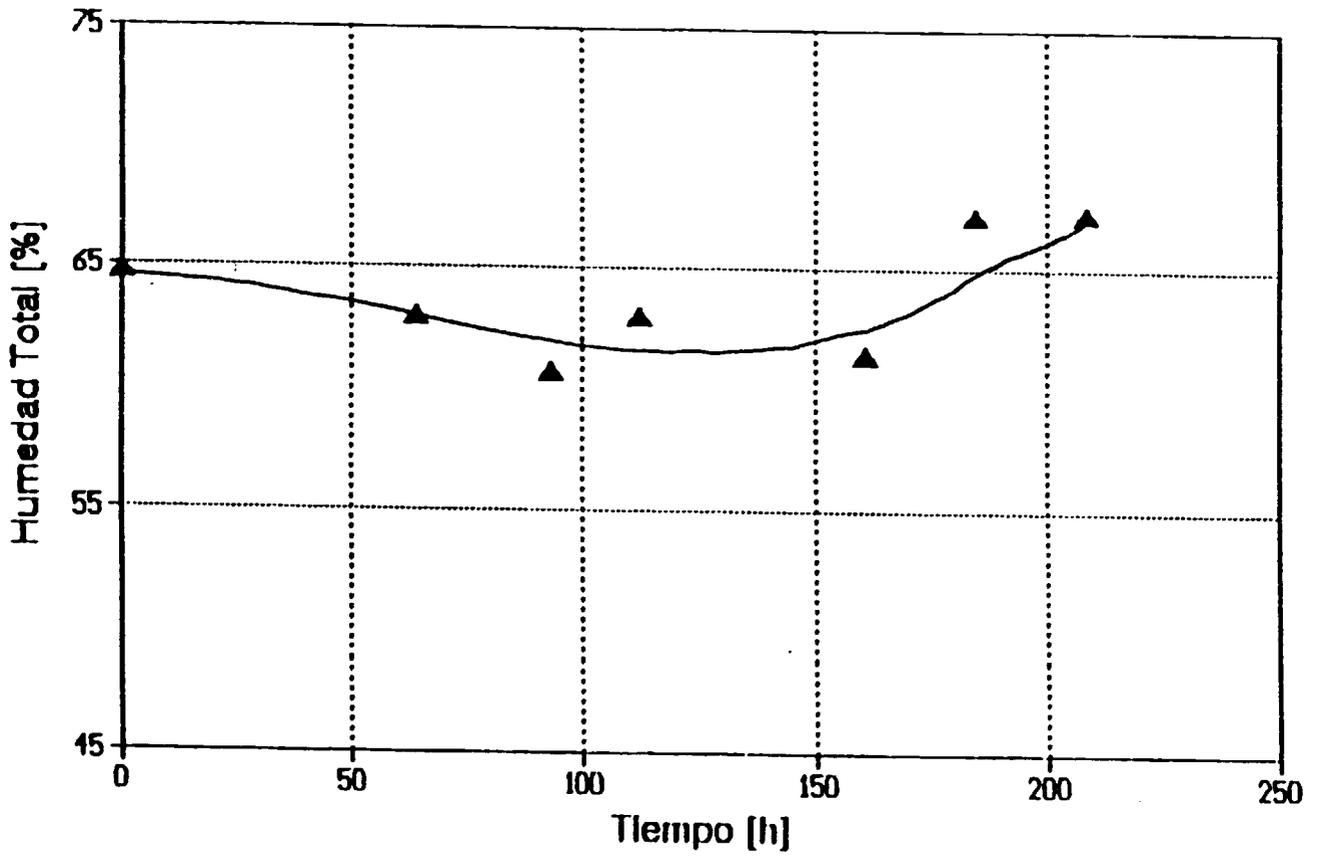


FIGURA Nº 10

Evolucion del Contenido de Humedad del Solido durante cultivo T.aureoviride



III. DISCUSIONES.

Para la propagación de Trichoderma reesei LM-28 y Trichoderma aureoviride 7-121 se usó el medio de cultivo líquido (mostrado en la Tabla N°1) empleado comúnmente en el Laboratorio de Micología y Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina. La adición de coseta agotada de remolacha a niveles de 4 g/l tiene como objeto la inducción del sistema celulolítico y de esta forma favorecer la disminución del lag de crecimiento en el cultivo sólido. Sin embargo, los resultados indican que en ambas cepas la inducción fue pobre, dado que la actividad enzimática inicial fue del orden de 0.1 UPF/g de materia seca.

Para mantener la temperatura del cultivo dentro de rangos adecuados, las columnas de Raimbault fueron sumergidas en un baño de agua sin calefacción, debido a que la temperatura ambiental llegaba a un máximo de 30 °C y se mantenía en el durante gran parte del día. La temperatura del agua del baño fluctuaba entre 25 - 28 °C y la del aire a la salida de la columna fue medida con un termómetro de mercurio, fluctuando la lectura entre los 30 - 32 °C.

De los gráficos presentados se observa que en ambas cepas el tiempo transcurrido antes que se detectara una evolución de la actividad celulolítica fue de tres días aproximadamente, que es lo esperado. En este sentido, la temperatura no influyó inhibitoriamente, a pesar de lo alta que esta era. Este fue uno de los parámetros más críticos de la experiencia en relación al cultivo de Trichoderma aureoviride 7-121, puesto que su temperatura

óptima de cultivo ha probado ser en estudios previos de 25 °C.

En la Figura N°1 y N°6 se muestra el perfil de actividad enzimática para ambos cultivos. Se observa que en el caso de Trichoderma aureoviride la producción durante las primeras 150 horas de cultivo fue lenta comparada con la de Trichoderma reesei, que comenzó a evolucionar más rápido. Posterior a las 150 horas la velocidad de producción de actividad por T. aureoviride fue bastante alta, llegando a alcanzarse valores de 17,2 UPF/g masa seca al final del cultivo, mientras que la pendiente de T. reesei en esta zona fue menor y a las 170 horas de cultivo comenzó a desacelerar la producción llegando a un máximo 11,2 UPF/g s.s. a las 180 horas, después de lo cual comenzó a disminuir la actividad, posiblemente debido a hidrólisis proteica. Es interesante hacer notar que el perfil de actividad enzimática presentada por T. reesei es similar al obtenido con T. aureoviride 7-121 cultivado con la metodología del laboratorio chileno, excepto que en este último caso el lag es de 2 días, pues también se obtiene al rededor de 11 UPF/g s.s. a los 8 días de cultivo.

La figura N°2 y N°7 muestra el perfil de concentración de proteínas solubles durante el cultivo de T. reesei LM-28 y T. aureoviride 7-121, respectivamente. En el primer caso se observa que la concentración máxima de proteína es de 0,13 g de proteína/g de masa seca a las 180 horas de cultivo y posteriormente comienza a declinar debido a hidrólisis proteica. En el segundo caso, se observa que la concentración de proteínas se mantiene en niveles de 0,02 g/g masa seca durante casi 150 horas de cultivo y posteriormente hay un rápido aumento hasta llegar a los 0,092 g/g m.s. al final del cultivo. Dado que entre las 70 y las 150 horas la

actividad enzimática comenzó a aumentar manteniéndose constante la cantidad de proteína soluble, al parecer esto correspondería a un aumento p^ásivo, es decir, la proteína-enzima ya existente en el medio s^ólido (proveniente del in^óculo) comenzó de alguna forma a desinhibirse; luego, a partir de las 150 horas aproximadamente se comienza a producir enzima realmente.

El comportamiento del pH durante el cultivo de Trichoderma reesei LM-28 puede observarse en el gr^áfico N^o 4. Durante las primeras 100 horas se observa una disminuci^ón del pH hasta llegar a un m^ínimo de 3,2. Este decaimiento es el resultado de la acidificaci^ón del medio producto de la incorporaci^ón del sulfato de amonio. A medida que el cultivo evoluciona despu^és de las 100 horas, se observa un suave aumento del pH desde 3,2 hasta 4,0; en esta zona, la velocidad de hidr^ólisis de la urea es mayor que la velocidad de incorporaci^ón del sulfato de amonio. Por otro lado, en la figura N^o 9 se observa el perfil de pH presentado por el cultivo de Trichoderma aureoviride 7-121 llevado a cabo en id^enticas condiciones que T. reesei; aqu^í la forma de la curva es la opuesta a la de la figura N^o 4. Durante las primeras 130 horas, el pH del cultivo aument^ó de los 4,8 iniciales hasta llegar a un pH de aproximadamente 7,0. Aparentemente, en este caso la velocidad de hidr^ólisis de la urea predomin^ó por sobre la incorporaci^ón del sulfato de amonio y que posteriormente (desde las 150 horas) fue la velocidad de incorporaci^ón del sulfato de amonio la que prevaleci^ó. Este comportamiento, contrario al observado en el laboratorio de la Escuela de Ingenier^ía Bi^óquímica, puede ser debido a diferencias en las condiciones ambientales, como la tasa C:N y

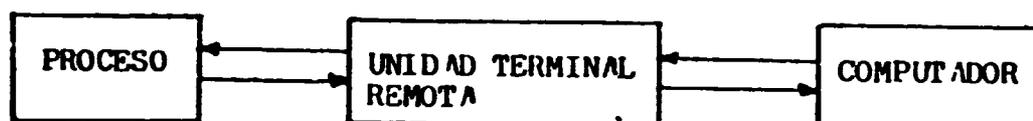
la temperatura, que fueron de 10:1 y alrededor de 30 °C respectivamente, mientras que en el laboratorio chileno la tasa C:N es de 5,3:1 y la temperatura controlada en 25 °C.

La figura N° 5 muestra la evolución del contenido de humedad del sólido durante el cultivo de T. reesei LM-28. Se observa que durante la fase lag (primeras 70 horas de cultivo) la masa sólida experimentó un leve descenso de la humedad, luego, durante el crecimiento microbiano un aumento hasta llegar a 74%. La figura N° 10 representa la evolución del contenido de humedad del lecho sólido durante el cultivo de T. aureoviride 7-121. En este caso, durante las primeras 90 horas, el sólido bajó su humedad desde 65% hasta 60%, después de lo cual comenzó a aumentar hasta llegar a 67% al final del cultivo.

La figura N° 3 muestra el perfil de la concentración de azúcares reductores durante el cultivo de T. reesei LM-28. Se observa un máximo de 3,2 g/l de extracto obtenido a las 90 horas de cultivo, después de lo cual comienza una disminución hasta llegar a 1,6 g/l al final del cultivo. En la figura N° 8 se observa el caso para el cultivo de T. aureoviride 7-121; durante la mayor parte del cultivo los niveles de azúcares reductores se mantienen en 0,5 g/l hasta las 160 horas aproximadamente, después de lo cual se presenta un rápido aumento hasta llegar a 2,7 g/l a las 180 horas y luego una rápida disminución hasta llegar a 1,9 g/l a las 208 horas. El aumento en este caso es observado también cuando el cultivo es hecho usando la metodología del laboratorio chileno, con la diferencia que llega a 1,0 g/l a los seis días de cultivo y se mantiene en este nivel hasta el final

del cultivo. Es posible que la disminución posterior a las 180 horas de cultivo se deba al consumo de los azúcares reductores metabolizables, aquellos que previamente formaban parte de oligosacáridos cuantificados en la parte ascendente de la curva. Lo mismo es posible decir del comportamiento del perfil de azúcares reductores en el caso de T. reesei LM-28.

Con respecto al control de la fermentación en sustrato sólido piloto mediante computador, se muestra el siguiente esquema:



La unidad terminal remota (HP-48060) es la encargada de adquirir los valores de las variables que determinan el estado global del proceso. Estos valores son enviados al computador en un formato apropiado quien los almacena y procesa según un programa adecuado, generándose señales que van hacia la unidad terminal remota, quien dependiendo de las señales activa los elementos finales de control. Es decir, esta unidad actúa tanto como un adquisidor de datos, así como un controlador, pues posee salidas analógicas programables. Dentro de las principales variables sensadas del proceso están las siguientes:

- Temperatura del aire de entrada y salida del fermentador
- Humedad relativa del aire de entrada y salida del fermentador
- Flujo de aire alimentado al fermentador

- Temperatura del lecho sólido
- pH del lecho sólido.

La estrategia de control planteada consideraría la manipulación del flujo de aire, la humedad relativa y la temperatura del aire a la entrada del fermentador. El algoritmo computacional que relaciona las variables de entrada con la manipulación de los elementos finales de control está en desarrollo y se espera que para comienzos de Abril se realice la primera prueba controlada.

IV. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta experiencia se concluye que la adición de coseta agotada de remolacha en el medio líquido de propagación, a las condiciones ambientales en que se llevó a cabo el cultivo, no ejerce acción como inductor de la síntesis de celulasas. Por otro lado, al comparar las producciones enzimáticas de las cepas estudiadas se concluye que en el caso de Trichoderma aureoviride 7-121 esta es alrededor de un 55% mayor que la de Trichoderma reesei LM-28.

Dado que la temperatura de cultivo estuvo alrededor de 30 - 32 °C es posible concluir que el rango de termotolerancia para la cepa Trichoderma aureoviride 7-121 es de hasta 7 °C por sobre el óptimo determinado en experiencias previas en el laboratorio chileno.