

03062



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
U.A.C.P. y P. DEL C.C.H.

1
24

"EVALUACION DE LOS PARAMETROS FISICO-QUIMICOS QUE
AFECTAN LA PRODUCCION DE CELULASAS Y XILANASAS
POR *Aureobasidium* sp."

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA**

P R E S E N T A :

IIMI. MARIA ELENA ACUÑA ARGÜELLES

México, D. F.

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

| | Página |
|---|--------|
| RESUMEN..... | 1 |
| 1. INTRODUCCION..... | 2 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 6 |
| 2.1. Celulosa y materiales lignocelulósicos..... | 8 |
| 2.2. Aplicaciones e importancia comercial de las celulasas y xilanasas..... | 11 |
| 2.3. Producción de celulasas y xilanasas microbianas.. | 12 |
| 3. MATERIALES Y METODOS..... | 17 |
| 3.1. Microorganismo..... | 17 |
| 3.2. Propagación y conservación de la cepa..... | 17 |
| 3.3. Prueba cualitativa para medir la capacidad celulolítica de las cepas..... | 18 |
| 3.4. Medios de cultivo para la producción de celulasas y xilanasas..... | 18 |
| 3.5. Preparación del inóculo..... | 19 |
| 3.6. Condiciones de cultivo para la producción de celulasas y xilanasas..... | 19 |
| 3.7. Determinación de la actividad celulolítica sobre papel filtro..... | 20 |
| 3.8. Determinación de la actividad celulolítica sobre CMC..... | 21 |

| | Página |
|---|--------|
| 3.9. Determinación de la actividad de β -glucosidasa.. | 22 |
| 3.10. Determinación de la actividad xilanolítica..... | 22 |
| 3.11. Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno..... | 23 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSION..... | 25 |
| 4.1. Efecto de la temperatura..... | 25 |
| 4.2. Efecto del pH inicial del medio de cultivo..... | 34 |
| 4.3. Experimentos a nivel fermentador de 14 litros... 41 | |
| 4.3.1. Efecto de la edad del inóculo..... | 41 |
| 4.3.2. Efecto del volumen de inóculo..... | 44 |
| 4.3.3. Influencia de surfactantes..... | 47 |
| 4.3.4. Efecto de la aereación y agitación..... | 55 |
| 4.3.5. Determinación de k_{La} | 66 |
| 4.3.6. Efecto del control de pH..... | 71 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 74 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 77 |

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto de algunos parámetros físico-químicos sobre la producción de celulasas y xilanasas por *Aureobasidium* sp. utilizando un medio con reactivos industriales y bagacillo de caña de azúcar como única fuente de carbono, sin ningún pretratamiento físico o químico.

La máxima actividad celulolítica y xilanolítica se produjo en un intervalo de temperaturas de 29° a 37°C y a un pH inicial de 4.5. En las condiciones utilizadas *Aureobasidium* sp. produce una mayor actividad de celulasas, xilanasas y β -glucosidasa que la doble mutante de *T. viride* QM9414. De hecho la cepa produce casi tres veces más de la actividad de β -glucosidasa, la cual es considerada como la enzima limitante en la sacarificación de la celulosa cristalina.

Al pasar de matraz agitado a fermentador de 14 litros, los niveles de producción se mantuvieron iguales. A este nivel el inóculo micelial de 24 horas resultó el más adecuado para la producción de celulasas y xilanasas y se pudo reducir 100 veces el volumen de inóculo sin que se afectara negativamente los niveles de producción de ambas enzimas.

Cuando se utilizaron los surfactantes Tween-80 y MAZU-DF7940 en el medio de cultivo del inóculo, se incrementó la producción de celulasas en un 45%. En el caso de las xilanasas el incremento fue menor (23%). Asimismo, cuando estos surfactantes se adicionaron además al medio de producción, la actividad de ambas enzimas fue prácticamente igual.

Las mejores condiciones de aereación y agitación para la producción enzimática en fermentador fueron las combinaciones: 200 rpm/0.4 vvm y 140 rpm/1 vvm. En estas dos combinaciones se obtiene el mismo valor de k_{La} , que corresponde a 12.4 h⁻¹.

Por otro lado se demostró que el control de pH durante la fermentación no mejora la producción de celulasas y xilanasas por el contrario, se encontró una disminución de su producción.

1. INTRODUCCION

Las enzimas son macromoléculas fundamentales en todos los procesos biológicos. Debido a sus propiedades de acelerar las reacciones químicas, especificidad por el sustrato y llevar a cabo sus funciones en condiciones suaves de pH, temperatura y presión. Estos catalizadores biológicos, también tienen importancia práctica en la industria química y alimentaria, así como en análisis clínicos y en terapéutica. En su mayoría las enzimas de uso industrial son de origen microbiano y algunas de origen animal o vegetal. Entre las enzimas de mayor uso industrial tenemos a las amilasas, proteasas, lipasas, isomerasas, pectinasas y celulasas.

Las celulasas son enzimas que hidrolizan los enlaces $\beta(1-4)$ de la celulosa produciendo azúcares solubles. Estas enzimas tienen un enorme potencial de ser utilizadas en la sacarificación de la celulosa contenida en los desechos celulósicos urbanos y agroindustriales, los cuales son muy abundantes. Las xilanasas están relacionadas con las celulasas debido a que en la naturaleza los xilanos que son un tipo de hemicelulosa se encuentran asociados a los polímeros de celulosa, por lo que, también son importantes en la sacarificación de materiales lignocelulósicos de desecho.

El término celulasa se refiere no a una sola enzima sino más bien a sistema enzimático complejo constituido de al menos tres tipos de enzimas: endo $\beta(1-4)$ glucanasa, exo $\beta(1-4)$

glucanasa y β -glucosidasa. Estas enzimas son inducibles, es decir requieren de la presencia de celulosa en el medio de cultivo para biosintetizarse. Las xilanasas también son un sistema enzimático inducible de al menos tres tipos de enzimas: endo β (1-4) xilanasas, exo β (1-4) xilanasas y β -xilosidasa.

La celulosa pura y contenida en los materiales de origen vegetal es muy difícil de degradar por su insolubilidad, alto grado de cristalinidad y por la presencia de lignina. Aún para la degradación de la celulosa pura, es necesaria la participación de todo el complejo celulolítico y además en algunos casos se requiere de pretratamientos físicos y/o químicos para hacer la celulosa más accesible al ataque enzimático.

Desde el punto de vista práctico las mejores fuentes de celulasas y xilanasas son los hongos, ya que producen los sistemas enzimáticos extracelulares y completos.

Las celulasas son producidas comercialmente en algunos países de Europa, Japón y Estados Unidos, sin embargo en México no se producen a pesar de que existe una considerable importación de estas enzimas. Por otro lado en nuestro país existen abundantes desechos agroindustriales como el bagacillo de caña, paja de trigo y rastrojo de maíz, que se pueden utilizar como materia prima barata y renovable tanto para la producción de celulasas y xilanasas, como para su aplicación en la producción de azúcares solubles.

El bagacillo de caña se genera en grandes volúmenes como un subproducto de la industria azucarera y actualmente es subutilizado. Por su alto contenido en celulosa 46% y hemicelulosa 30% (90% de ella en forma de xilanos (1)), resulta ser un buen sustrato para la producción de celulasas y xilanasas.

Nuestro grupo ha estado trabajando en los últimos años en la producción de celulasas y xilanasas usando un hongo levaduriforme seleccionado en nuestro laboratorio e identificado como *Aureobasidium sp.*, que no es patógeno y el cual es capaz de producir celulasas y xilanasas extracelulares cuando crece en celulosa microcristalina (2) y desechos agroindustriales sin pretamamientos físicos y/o químicos (3). La máxima actividad producida por esta cepa en celulosa cristalina es alcanzada a tiempos más cortos que los requeridos por otros microorganismos (2). No hemos encontrado ningún otro reporte de género *Aureobasidium* como productor de un sistema celulolítico completo capaz de degradar papel filtro y celulosa cristalina. Además es un hongo que produce un micelio muy fino sin formar "pellet" en cultivo sumergido, por lo que su uso a nivel industrial no tendría los problemas de transferencia de oxígeno que tienen los hongos filamentosos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Los requerimientos nutricionales de este hongo han sido estudiados en matraces agitados y se ha establecido un medio de cultivo simple y económico a base de sales grado industrial y agua de la llave, en el que *Aureobasidium sp.* produce una elevada actividad de las enzimas celulolíticas (4).

Considerando lo antes expuesto el objetivo de este trabajo está centrado en el estudio de la variación de algunos parámetros físico-químicos sobre la producción de celulasas y xilanasas por *Aureobasidium sp.*, a nivel de fermentadores de 14 litros y utilizando un medio con reactivos industriales y bagacillo de caña de azúcar sin ningún pretratamiento, como única -- fuente de carbono.

2. ANTECEDENTES

Las celulasas y xilanasas son grupos de enzimas muy importantes, ya que constituyen una herramienta de la naturaleza para la recirculación del carbono, por su participación en la degradación biológica de los constituyentes de las plantas (5) y también debido al gran potencial que tienen de ser utilizadas en la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos con fines industriales. Las celulasas actúan sobre los enlaces $\beta(1-4)$ de la celulosa degradándola hasta azúcares solubles. Las xilanasas están comprendidas dentro de las hemicelulasas y son las más estudiadas debido a que su sustrato los xilanos, constituyen una gran proporción de la hemicelulosa de las plantas (1). Las xilanasas están muy relacionadas con las celulasas debido a que su sustrato, los xilanos, se encuentran asociados en la naturaleza con la celulosa, estas enzimas hidrolizan los enlaces $\beta(1-4)$ de los xilanos.

La aplicación de ambos sistemas enzimáticos en la hidrólisis de materiales lignocelulósicos permitiría un mayor aprovechamiento de éstos.

Se ha reconocido la intervención concertada y sinérgica de tres tipos básicos de actividades para degradar a la celulosa cristalina (6): endoglucanasas (1,4 β glucan 4 glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.4); exoglucanasas o celobiohidrolasas (1,4 β glucan 4 celobiohidrolasa E.C. 3.2.1.91) y β -glucosidasa (β -glucósido glucohidrolasa E.C. 3.2.1.21). En comparación

con las amilasas los mecanismos de acción de las celulasas se conocen poco, se saben que actúan sinérgicamente para llevar a cabo la sacarificación de la celulosa.

Varios mecanismos han sido propuestos como un intento de dilucidar la interacción entre los componentes del sistema celolítico y el sustrato. El mecanismo que es actualmente aceptado propone que las endoglucanasas inician un ataque sobre las regiones amorfas presentes en forma natural en la celulosa, seguida inmediatamente por la acción de la celobiohidrolasa, la cual libera celobiosa de las cadenas terminales no reductoras de la celulosa. Posteriormente las dos enzimas actúan de manera sinérgica solubilizando a la celulosa a pequeños oligosacáridos y celobiosa, los cuales son hidrolizados por la β -glucosidasa hasta glucosa (7).

Las xilanasas al igual que las celulasas son un grupo de enzimas, las cuales pueden ser clasificadas por su modo de acción en: a) endoxilanasas ($\beta(1-4)$ xilano xilano hidrolasa E.C. 3.2.1.8) actúan de manera aleatoria y pueden ser a su vez de dos tipos: 1) Las que son capaces de hidrolizar enlaces $\beta(1-3)$ de los arabinoxilanos liberando arabinosa, y 2) Las que atacan otros sitios sin liberar arabinosa. b) exoxilanasas ($\beta(1-4)$ xilano hidrolasas) estas enzimas actúan sobre el lado terminal no reductor de la cadena de xilanos, liberando xilosa. c) Las β -xilosidasas (β -D xilósido xilohidrolasa E.C. 3.2.1.37) actúan sobre xilooligosacáridos cortos produciendo xilosa (8).

El mecanismo de acción de las xilanasas hasta la fecha ha sido poco aclarado, debido a que éstas han sido menos estudiadas que las celulasas.

2.1. Celulosa y materiales lignocelulósicos.

La celulosa es un polímero de glucosa unido por enlaces $\beta(1-4)$. Su forma más pura en la naturaleza solo se presenta en las fibras de algodón (98%). En general la encontramos asociada a la hemicelulosa y lignina constituyendo los llamados materiales lignocelulósicos. Posee una estructura cristalina altamente ordenada y muy compacta, lo que la hace ser un sustrato difícil de degradar. La celulosa podría utilizarse mediante la hidrólisis para convertir a los azúcares solubles en proteína unicelular o por fermentación obtener compuestos orgánicos simples tales como etanol, acetona y butanol, o bien podría ser utilizada como sustrato para la producción de enzimas industriales por microorganismos.

Los materiales lignocelulósicos son generados periódicamente por medio de la fotosíntesis y se ha estimado que se producen cerca de 2×10^{12} ton/año a nivel mundial, los cuales están constituidos del 35-60% de celulosa, 10-30% de hemicelulosa y 4-18% de lignina (9). La hemicelulosa es un polímero complejo constituido por diferentes azúcares, siendo los más comunes: xilosa, glucosa, galactosa, manosa, arabinosa, ác. glucorónico y 4,0-metil-glucorónico. Los xilanos constituyen los más abun-

dantes de las hemicelulosas, por ejemplo, en angiospermas constituyen el 20-30% del peso seco (10). La hidrólisis de la hemicelulosa representa una fuente de azúcares que pueden ser utilizados para producir otros productos. La lignina es una macromolécula constituida de residuos fenil propil, cuya estructura química completa aún no es clara. Su hidrólisis representa una fuente de materia prima para la producción de compuestos fenólicos.

Entre los materiales lignocelulósicos encontramos una gran variedad de subproductos de desecho provenientes de la agricultura y agroindustrias como son: pajas de cereales (trigo, arroz, avena, etc.); rastrojos de maíz, sorgo; cascarilla de arroz y algodón, así como bagazo y bagacillo de caña de azúcar, entre otros. Estos subproductos en general son quemados para obtener energía, o usados parcialmente en la alimentación de rumiantes, o bien abandonados en el campo como abono orgánico. Sin embargo la cantidad de residuos generados es mucho mayor que la que se utiliza, por lo que constituyen una fuente de recursos renovables actualmente subutilizados y que en algunos casos son fuente de contaminación. Por estas características así como por su alto contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina, los materiales lignocelulósicos en los últimos años han recibido mucha atención, porque representan una fuente de materias primas renovables y baratas que pueden ser utilizadas y transformadas en productos útiles para el hombre o para animales por vía química o biológica.

Los procesos de depolimerización de materiales celulósicos están basados en catálisis con ácidos o enzimas. La hidrólisis química se lleva a cabo en presencia de ácidos fuertes, - este proceso es rápido y completo, pero sufre de reacciones colaterales que destruyen a la glucosa, formando subproductos tales como derivados de furfural los cuales inhiben la posterior fermentación de la glucosa formada. Por otro lado, el uso de ácidos fuertes causa problemas de corrosión y contaminación ambiental, además se requiere de la neutralización de los azúcares, lo que dificulta su aplicación a gran escala. La hidrólisis enzimática tiene muchas ventajas sobre la hidrólisis química, ya que su catalizador no es corrosivo, la reacción se lleva a cabo en condiciones suaves de temperatura, pH y presión, y - las enzimas son potencialmente reutilizables. Sin embargo por las características antes mencionadas de la celulosa, la hidrólisis enzimática se dificulta por lo que se han utilizado pretratamientos físicos y/o químicos a fin de aumentar la velocidad de la hidrólisis y los rendimientos en azúcares solubles. - La hidrólisis enzimática ha sido llevada a cabo a nivel laboratorio y planta piloto, sin embargo a la fecha no existe un proceso enzimático a gran escala para la hidrólisis de celulosa, - debido a lo antes expuesto, así como al alto costo de las enzimas, el cual representa cerca del 60% del costo total del proceso (11).

2.2. Aplicaciones e importancia comercial de las celulasas y xilanasas.

Las celulasas producidas a escala comercial provienen -- principalmente de *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* y *Penicillium funiculosum* (12). Las xilanasas no se producen a -- esta escala, pero generalmente están presentes en la preparacio-- nes crudas de celulasas.

Las celulasas no se producen en México a pesar de que -- existe una considerable importación de ellas; si bien no se tie-- nen estadísticas exactas sabemos que en 1985 cuando menos se im-- portaron 12 657 kg y 25 559 kg en el primer trimestre de 1988 (13). Estas enzimas son utilizadas en la industria farmacéutica, textil y en el procesamiento de algunos alimentos. Su aplica-- ción consiste en eliminar la turbiedad causada por celulosa, me-- jorando los procesos de extracción y filtración de jugos de fru-- tas; en el pretratamiento de materia prima para la industria cer-- vecera y como aditivos digestivos. En la literatura se reportan otros usos como son: alimentación animal, mejorando la produc-- ción de leche en ganado vacuno (14); extracción de diosgenina -- (15) y obtención de protoplastos de hongos (16).

Las xilanasas por sí mismas no tienen un mercado definido en la industria, pero se ha reportado su utilización en la pro-- ducción de xilosa, la cual puede ser transformada a xilitol (17) y en el pretratamiento de materiales lignocelulósicos se favore-- ce la acción de las celulasas y se incrementan los rendimientos

en azúcares (18).

El potencial de las celulasas está en la sacarificación - de los grandes volúmenes de materiales lignocelulósicos que existen en el mundo, éstas han sido evaluadas inclusive a nivel de - planta piloto, sin embargo no ha sido posible el desarrollo de - un proceso a gran escala, debido al alto costo de las enzimas (11), lo que indica la necesidad de realizar todavía aún más in- vestigación y desarrollo a varios niveles con el fin de alcanzar dicho objetivo.

2.3. Producción de celulasas y xilanasas microbianas.

Las celulasas y xilanasas son producidas por un gran núme- ro de microorganismos entre los que se incluyen hongos, actinomi cetos, bacterias y algunas levaduras, aunque éstas últimas solo producen xilanasas (Tabla 1).

Los hongos son los de mayor interés práctico debido a que producen todo el sistema celulolítico extracelularmente y entre ellos se encuentran algunos que se utilizan para producir celula sas en forma industrial.

La producción de celulasas y xilanasas se lleva a cabo en cultivo sumergido por lote (19), o alimentado (36), así como en cultivo sólido (37). Como fuentes de carbono se han utilizado - sustratos purificados como celulosa microcristalina, carboxime-- til celulosa (CMC) y solka flock para celulasas, y xilanos puri-

TABLA I

MICROORGANISMOS REPORTADOS COMO PRODUCTORES DE CELULASAS Y
XILANASAS

| Microorganismo | celulasas (PF, CMC) | xilanasas | Referencia |
|------------------------------------|------------------------|-----------|------------|
| HONGOS | | | |
| <i>Trichoderma viride</i> | + + | + | 19 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | + + | + | 20 |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> | + + | + | 21 |
| <i>Thielavia terrestris</i> | N.D. | + | 22 |
| <i>Humicola lanuginosa</i> | N.D. | + | 23 |
| <i>Myceliophthora thermophila</i> | + + | + | 24 |
| ACTINOMICETOS | | | |
| <i>Micromonospora menalosporea</i> | - + | + | 25 |
| <i>Streptomyces flavo-griseus</i> | + + | + | 26 |
| <i>Termomonospora fusca</i> | + + | N.D. | 27 |
| BACTERIAS | | | |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> | N.D. | + | 28 |
| <i>Cellulomonas uda</i> | + + | + | 29 |
| <i>Ruminococcus albus</i> | - + | N.D. | 30 |
| <i>Bacteroides succinogenes</i> | - + | + | 31 |
| LEVADURAS | | | |
| <i>Trichosporum beigeli</i> | - - | + | 32 |
| <i>Cryptococcus albidus</i> | - - | + | 33 |
| HONGOS LEVADURIFORMES | | | |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | - - | + | 34 |
| <i>Aureobasidium sp.</i> | + + | + | 35 |

ficados de diversas fuentes (lardo, avena, etc.) para xilanasas. También se han utilizado para la producción de ambas enzimas materiales lignocelulósicos de desecho como pajas de trigo, cascarilla de arroz, aserrín, bagazo y bagacillo de caña, entre otros. En la producción de celulasas también se han utilizado algunas fuentes de carbono solubles como lactosa y celobiosa, sin embargo éstas solo inducen alguna de las actividades celulolíticas - (38).

Muchos de los microorganismos que producen celulasas también producen xilanasas por lo que estas enzimas en general han sido evaluadas simultáneamente encontrándose que los requerimientos nutricionales y condiciones de cultivo son similares.

La regulación de la síntesis de celulasas en hongos es inducible y sensible a represión catabólica (39,40), aunque se conocen algunos microorganismos que producen las enzimas constitutivamente (41). La producción de xilanasas parece estar regulada por los mismos mecanismos, aunque éstas han sido menos estudiadas que las celulasas (42).

La producción de celulasas ha sido extensivamente estudiada en varios microorganismos, principalmente en *Trichoderma reesei* (*T. viride*) el cual es conocido como uno de los más potentes organismos degradadores de celulosa, pero produce bajos niveles de actividad de β -glucosidasa (43). Se han obtenido mutantes hiperproductoras de celulasas a través de seleccionarl^{as} como insensibles a represión catabólica, síntesis constitutiva de

la enzima (44) y por una producción incrementada de glucosidasa (45). Sin embargo la mayoría de los microorganismos incluyendo a las mutantes hiperproductoras de *T. viride* a la fecha resultan fuentes inadecuadas de celulasas en términos de rendimientos y balance de los componentes del sistema celulolítico para sacarificar celulosa altamente cristalina, por lo que las actividades aún resultan bajas para hacer técnica y económicamente posible la hidrólisis de celulosa a gran escala (46).

Se han planteado diversas alternativas a fin de hacer factible la hidrólisis de materiales lignocelulósicos a gran escala entre las que se incluyen: continuar con la búsqueda de nuevos microorganismos productores de celulasas; mejoramiento genético de las cepas; desarrollo de procesos económicos de producción de enzimas; empleo de cultivos mixtos a fin de obtener sistemas enzimáticos más eficientes y el uso de la Ingeniería Genética para obtener nuevas cepas productoras de celulasas capaces de producir las enzimas a tiempos más cortos de fermentación o con mayor rendimiento.

Existen numerosos grupos de investigación en el mundo trabajando sobre las diversas alternativas para hacer posible en un futuro la hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos. En México tenemos una gran variedad de sustratos disponibles en grandes volúmenes como son bagacillo de caña de azúcar, paja de cereales, etc., lo que hace importante la búsqueda de nuevos microorganismos adaptados a las condiciones climatológicas de las regiones donde se producen estos sustratos. En nues-

tro grupo se aislaron un gran número de microorganismos provenientes de zonas agrícolas, henequeneras y de cañaveral, y de éstos se seleccionó un microorganismo identificado como *Aureobasidium* sp. que es un hongo levaduriforme que produce un sistema celulolítico completo y xilanasas extracelulares cuando es crecido en celulosa microcristalina y materiales lignocelulósicos de desecho (2,3). Este microorganismo a la fecha aún no ha sido reportado por otros grupos como un hongo celulolítico verdadero.

Se han estudiado sus requerimientos nutricionales para la producción de celulasas y xilanasas, y se ha desarrollado un medio de cultivo simple y económico compuesto de pocas sales grado industrial, agua de la llave y bagacillo de caña de azúcar sin ningún pretratamiento como única fuente de carbono (4), sin embargo sus condiciones de cultivo como son pH, temperatura, inóculo, aereación y agitación aún no han sido estudiadas.

Considerando lo antes expuesto el objetivo de este trabajo consiste en evaluar los parámetros físico-químicos que afectan la producción de celulasas y xilanasas por *Aureobasidium* sp. a nivel de fermentadores de 14 litros, utilizando el medio con reactivos industriales y bagacillo de caña.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Microorganismo.

El microorganismo que se usó durante el desarrollo de este trabajo es un hongo levaduriforme perteneciente al género *Aureobasidium* el cual fue aislado y seleccionado a partir de - - muestras de suelo de cañaveral por su capacidad de producir celulas extracelulares a partir de celulosa microcristalina (2) y desechos agroindustriales como única fuente de carbono. Este - hongo es de consistencia cremosa y de color naranja.

La mutante *Trichoderma viride* QM9414 se obtuvo de A.T.C.C. E.U.A.

3.2. Propagación y conservación de la cepa.

La propagación de las cepas se realizó a partir de una so la colonia y se sembró en medio sólido de agar papa dextrosa -- (PDA) más 0.25% de agar, incubándose a 29°C durante 72 horas. - Después de este tiempo las placas se dejaron a temperatura am- - biente por 48 horas para una mejor esporulación del hongo. Los microorganismos se conservaron por resiembras periódicas a par- - tir de una sola colonia en tubos de ensaye inclinados conteniendo PDA más 0.25% de agar y por liofilización usando leche descre mada como soporte. Los liofilizados se guardaron a temperatura ambiente.

3.3. Prueba cualitativa para medir la capacidad celulóli- tica de las cepas.

Se hizo periódicamente para corroborar la capacidad celulóli-
tica de las cepas en base a la velocidad de disgregación del
papel filtro. El microorganismo se inoculó en tubos de ensaye -
conteniendo una tira de papel filtro de 1x20 cm unida a un tapón
de gasa y 10 ml de una solución de sales minerales (medio A). -
Después de la inoculación los tubos fueron incubados a 37°C con
agitación a 180 rpm y revisados cada 6 horas. *Aureobasidium sp.*
es capaz de disgregar completamente el papel filtro en menos de
20 hrs.

El medio A contiene (% , p/v): 0.09% de urea; 0.20% fosfa-
to de potasio monobásico; 0.03% cloruro de calcio; 0.03% sulfato
de magnesio; 0.2% tween 80; 0.1 ml de cada solución de elementos
traza y pH 4.6. La solución de elementos traza contiene: sulfa-
to ferroso 500 mg; sulfato de manganeso 160 mg; cloruro de zinc
170 mg y cloruro de cobalto 200 mg, cada uno de ellos disuelto -
por separado en 100 ml de agua destilada.

3.4. Medios de cultivo para la producción de celulasas y xilanasas.

El medio de cultivo utilizado para la producción de estas
enzimas tanto a nivel matraz como en fermentadores contiene: 2%
de bagacillo de caña de azúcar sin ningún pretratamiento, 0.14%

de sulfato de amonio, 0.03% de urea y 0.2% de fosfato de potasio monobásico (todos grado industrial) y agua de la llave (3). El pH es ajustado a 4.4 con HCl. Los matraces conteniendo el medio de cultivo se esterilizaron a 15 psi durante 20 min y los fermentadores a 20 psi durante 25 minutos.

3.5. Preparación del inóculo.

El inóculo utilizado para los experimentos a nivel matraz consiste de un ml de una suspensión de esporas en agua destilada con una densidad óptica total de 5 (540 nm) por cada 100 ml de medio de cultivo. El inóculo para el fermentador consiste de micelio de 24 horas de edad el cual se obtiene de la siguiente manera: se inocula con 10 ml de una suspensión de esporas (D.O. 15) a un matraz fernbach conteniendo un litro de medio de cultivo usado para la producción de enzimas, previamente descrito más 0.2% de tween 80 y se incuba a 37°C y 180 rpm durante 24 horas. La cantidad de inóculo (% p/v) que se utilizó fue variable y éste se especifica en las figuras correspondientes.

3.6. Condiciones de cultivo para la producción de celulasas y xilanasas.

La producción de enzimas a nivel matraz se realizó en matraces erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200 ml del medio de cultivo usado para la producción de enzimas, previamente descrito,

y se inocularon como se mencionó anteriormente. Los matraces se incubaron a 37°C y 180 rpm durante 5 días. La producción de enzimas a nivel fermentador se realizó en fermentadores de 14 litros (Labroferm, New Brunswick Scientific Co.) conteniendo 10 litros de medio de cultivo e inoculado con diferentes volúmenes de micelio según se especifica en las figuras correspondientes. Las condiciones de fermentación a este nivel fueron las siguientes: velocidad de agitación 200 rpm, aereación 0.4 vvm, presión 15 psi y temperatura 37°C. Las variaciones realizadas se especifican en las figuras correspondientes. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

Durante las fermentaciones se tomaron alicuotas de 10 ml para matraz y de 50 ml para fermentadores cada 24 horas, las cuales fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos. En el sobrenadante libre de células se determinaron las actividades de celulasas (PF) y xilanasas, y en algunos casos la de β -glucosidasa y celulasas (CMC), según se especifica en las figuras correspondientes.

3.7. Determinación de la actividad celulolítica sobre papel filtro.

Consiste en cuantificar los grupos reductores solubles -- producidos por la acción de las celulasas sobre el papel filtro (47). Los azúcares reductores se determinaron por el método del ácido 2,3 dinitrosalicílico (DNS) (48). El sistema de reacción

contiene una tira de papel filtro Whatman No. 1 de 1x6 cm que --
equivale aproximadamente a 50 mg de celulosa; un ml de amortigua
dor de citratos 0.075 M, pH 4.8 y 0.5 ml de filtrado del medio -
de cultivo conteniendo a la enzima. Este sistema se incuba a -
50°C durante 60 minutos y al término de este tiempo se adicionan
3 ml de DNS y se ebulen los tubos durante 5 minutos. Se enfrían
a temperatura ambiente y se agregan 15.5 ml de agua destilada a
cada tubo. Se lee a 550 nm en un fotocolorímetro Spectronic 20
Baush and Lomb. La concentración de grupos reductores es calcu-
lada a partir de una curva estandar de glucosa y la actividad en
zimática es expresada como mg de azúcares reductores por milili-
tro de filtrado.

3.8. Determinación de la actividad celulólfica sobre CMC.

Se determinó por medir los grupos reductores liberados -
por la acción de las celulasas sobre la carboximetilcelulosa
(CMC), y cuantificándolos por el método del DNS. El sistema de
reacción contiene 1 ml de la solución de CMC al 7% en amortigua-
dor de citratos 0.1M pH 4.8 y 0.5 ml de filtrado conteniendo a
la enzima. Este sistema se incuba durante 30 min. a 50°C en --
baño maría. La actividad es expresada como mg de azúcares redug
tores por ml de filtrado, calculados a partir de una curva estan
dar de glucosa.

3.9. Determinación de la actividad de β -glucosidasa.

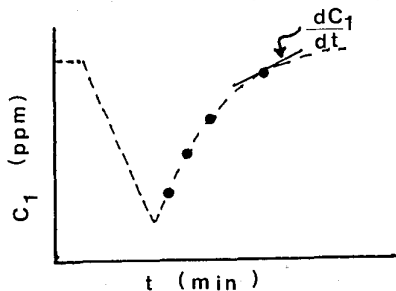
El sistema de reacción contiene: 0.25 ml de una solución 6.0 mM de p-nitrofenol β -D-glucósido (PNFG) en amortiguador de citratos 0.1M pH 4.8, más 0.5 ml de amortiguador de citratos 0.2M pH 4.8 y 0.25 ml del filtrado conteniendo a la enzima. Este sistema se incuba durante 10 minutos a 50°C. Exactamente a este tiempo se retira una alícuota de 0.2 ml y se agrega a un tubo de ensaye que contiene 4.8 ml de carbonato de sodio 0.1M para desarrollar el color y se lee a 420 nm (49). Para la determinación de la actividad se utilizó una curva estandar de p-nitrofenol (PNF). La actividad es expresada como micromoles de PNF por ml de filtrado.

3.10. Determinación de la actividad xilanolítica.

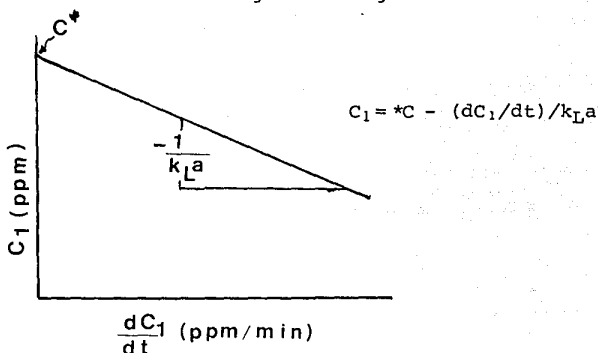
El sistema de reacción contiene un ml de solución de xilanos de lardo (sigma) al 0.75% en amortiguador de citratos 0.075M pH 4.8 y 0.5 ml de filtrado conteniendo a la enzima. La mezcla se incuba durante 15 min. a 50°C en baño maría (49). Los azúcares reductores liberados por la acción de la enzima son determinados por el método DNS y cuantificados en base a una curva estandar de xilosa. La actividad es expresada como mg de azúcares reductores por ml de filtrado.

3.11. Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno.

El coeficiente de transferencia de oxígeno ($k_L a$) nos indica el grado de oxigenación de un cultivo bajo las condiciones en las que trabaja un fermentador. Este se determinó colocando en el fermentador 10 litros de agua y un electrodo de oxígeno disuelto, se fijan las condiciones de agitación y flujos de aire a los niveles deseados y se deja estabilizar a 37°C el tiempo necesario. Una vez estabilizado el contenido de la jarrá y el electrodo de oxígeno al 100% de saturación se añaden 5 gr de sulfito de sodio disuelto en el mínimo volumen de agua y un ml de cloruro de cobalto 0.1N. Al adicionar estos reactivos la concentración de oxígeno disuelto disminuye hasta cerca de cero. Cuando todo el sulfito se oxida a sulfato por el oxígeno presente en la solución, el % de saturación del oxígeno en el líquido empieza a aumentar, en este momento se toman lecturas cada 5 ó 10 seg hasta que llegue nuevamente a 100%. Al expresar los resultados gráficamente se obtiene una gráfica como la que se muestra en la siguiente figura:



C_1 es la concentración de oxígeno en el líquido y es expresada en ppm. Para convertir estas unidades se considera que la máxima saturación del oxígeno en agua para la ciudad de México a 37°C es de 5.41 mg/ml (50). De esta gráfica se sacan las pendientes de algunos puntos de la curva y se grafican C_1 contra dC_1/dt como se muestra en la siguiente figura:



La pendiente de esta recta es $-m = 1/k_{L,a}$ y para calcular su valor solo se despeja $k_{L,a} = 1/m$, expresada en h^{-1} . $*C$ es la concentración de oxígeno en el líquido que está en equilibrio con la fase gaseosa, su valor corresponde a la intersección con el eje de las ordenadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Como se mencionó anteriormente el objetivo de este trabajo está centrado en evaluar los parámetros físico-químicos que afectan la producción de celulasas y xilanasas por *Aureobasidium sp.*, utilizando bagacillo de caña de azúcar no tratado física ni químicamente, como única fuente de carbono.

4.1. Efecto de la temperatura.

Para lograr este objetivo, se evaluó en primer lugar el efecto de la temperatura debido a que éste es un parámetro importante para la producción de enzimas, ya que no siempre la temperatura de máximo crecimiento corresponde a la de máxima producción. Como se mencionó anteriormente la cepa de *Aureobasidium sp.* fue seleccionada a 29°C y todos los estudios realizados con ella, también fueron efectuados a esa temperatura (2,3, 4), sin embargo consideramos conveniente ver si aumentando la temperatura era posible incrementar o bien mantener los niveles de producción de enzimas en *Aureobasidium sp.*. Lo anterior es importante ya que de implementarse este proceso a nivel industrial, debería estar localizado en zonas cañeras que son generalmente de temperaturas altas.

Los resultados obtenidos del efecto de la temperatura se muestran en la Fig. 1, donde se observa que la máxima actividad celulolítica se produce en un rango de temperaturas de 29 a 37°C.

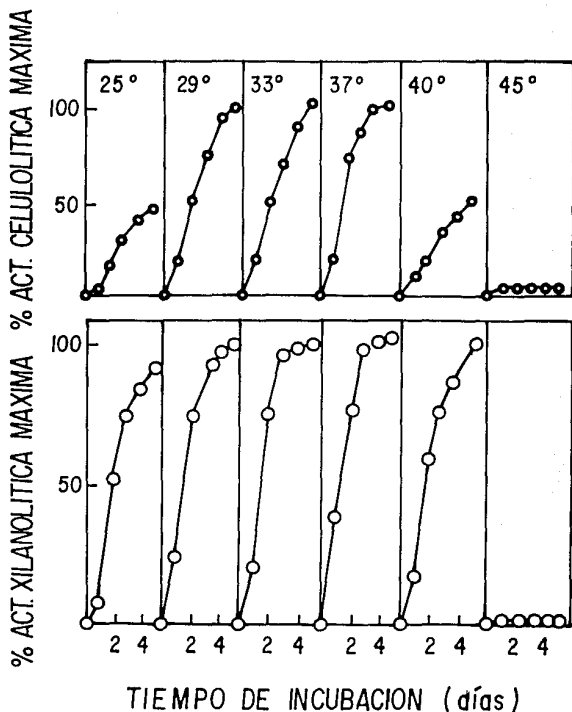


FIG. 1. Efecto de la temperatura sobre la producción de celulasas y xilanasas extracelulares por *Aureobasidium* sp. a partir de bagacillo de caña de azúcar no tratado. Matraces agitados a 180 rpm conteniendo bagacillo al 2%; urea 0.03%; sulfato de amonio 0.14%; fosfato de potasio 0.2% (todas las sales grado industrial), agua de la llave y pH 4.5.

A 25 y 40°C la producción de estas enzimas es menor, obteniéndose se cerca del 50% de la actividad máxima. En cuanto a la producción de actividad xilanolítica observamos que los niveles alcanzados son prácticamente iguales entre 25 y 40°C, es decir, las xilanasas se producen en igual cantidad en un intervalo más amplio de temperaturas en comparación con las celulasas. A 45°C no se detectó actividad celulolítica ni xilanolítica en el filtrado libre de células. Estos datos se pueden apreciar mejor en la Fig. 2 a las 120 hrs. de fermentación. De acuerdo a estos resultados se seleccionó la temperatura de 37°C para el desarrollo de los siguientes experimentos.

La cepa de *Aureobasidium sp.* produce la máxima actividad celulolítica y xilanolítica en un intervalo más amplio de temperatura que otros microorganismos mesofílicos reportados, lo cual es ventajoso, ya que permitiría a nivel industrial un mayor rango de operación del proceso fermentativo. En *Trichoderma viride* se reporta que el intervalo al cual se obtiene la máxima actividad celulolítica es entre 25° y 28°C (51), y para la producción de xilanasas en este hongo, el intervalo de temperaturas es también limitado, ya que la producción de estas enzimas se reduce al aumentar la temperatura de 25 a 37°C (52). En *Aspergillus terreus* la máxima producción de estas enzimas se obtiene 30°C (53). La capacidad que tiene *Aureobasidium sp.* de producir estas enzimas en un intervalo más amplio de temperaturas, pudiera deberse a que este hongo se aisló y seleccionó de muestras de suelo de cañaveral, que son comúnmente zonas de

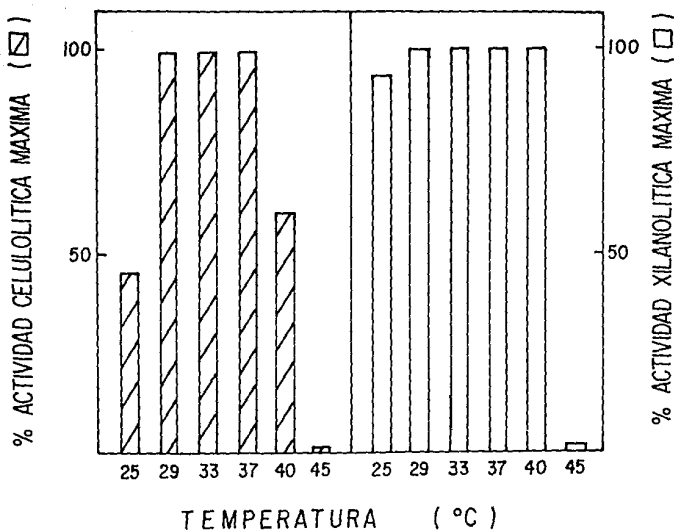


FIG. 2. Producción de celulasas y xilanasas extracelulares por *Aureobasidium sp.* a diferentes temperaturas a las 120 horas de incubación. Las condiciones de cultivo son las mismas que las descritas en la Fig. 1.

altas temperaturas.

Considerando que las placas de PDA que se usaron para preparar el inóculo de los matraces fueron incubadas a 29°C, se evaluó la producción de las enzimas utilizando placas incubadas a 37°C y se comparó la producción con la obtenida a 29°C. Los resultados se muestran en la Fig. 3, donde se observa que prácticamente no hay diferencias en cuanto a la producción de actividad celulolítica y xilanolítica al incubar las placas de PDA tanto a 29 como a 37°C. Sin embargo, resulta más fácil recuperar las esporas de las placas incubadas a 29°C, por lo que se decidió seguir utilizando 29°C para la preparación del inóculo y 37°C para la fermentación.

El hongo *Trichoderma viride* es una de las cepas más potentes en la producción de celulasas extracelulares debido a que produce un sistema celulolítico completo capaz de degradar celulosa cristalina (19). Nuestra cepa de *Aureobasidium* sp. también produce un sistema celulolítico completo (3), por lo que se comparó en las mismas condiciones de cultivo con la doble mutante de *Trichoderma viride*, la cepa QM9414, creciendo ambas a 37°C y midiendo las principales actividades enzimáticas del complejo celulolítico, para ello se utilizó papel filtro (PF), carboximetil celulosa (CMC) y p-nitrofenol β -D-glucósido (PNFG) como sustratos. Los resultados se muestran en la Fig. 4 donde se observa que los niveles de actividades obtenidas a las 120 horas para las actividades sobre PF, CMC y xilanos son de 163, 122 y 112% respectivamente. También se observa que *Aureobasi-*

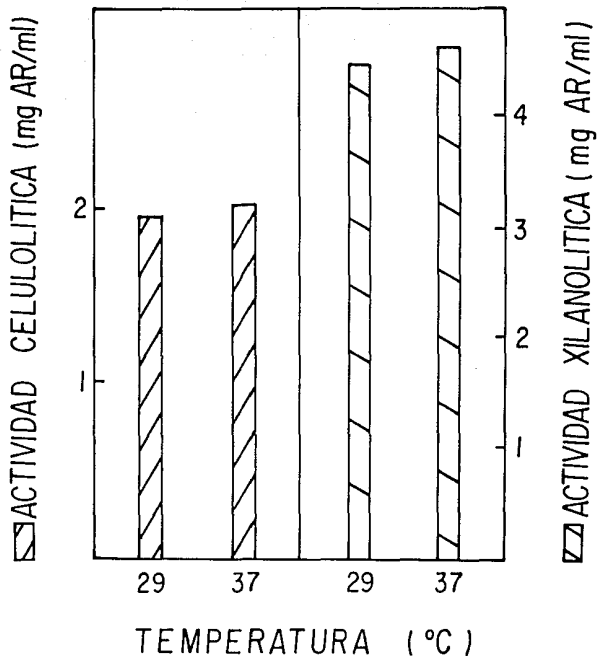


FIG. 3. Efecto de la temperatura de incubación de las placas de PDA sobre la producción de enzimas por *Aureobasidium sp.* en matraces agitados, e incubados a 37°C en las mismas condiciones descritas en la Fig. 1.

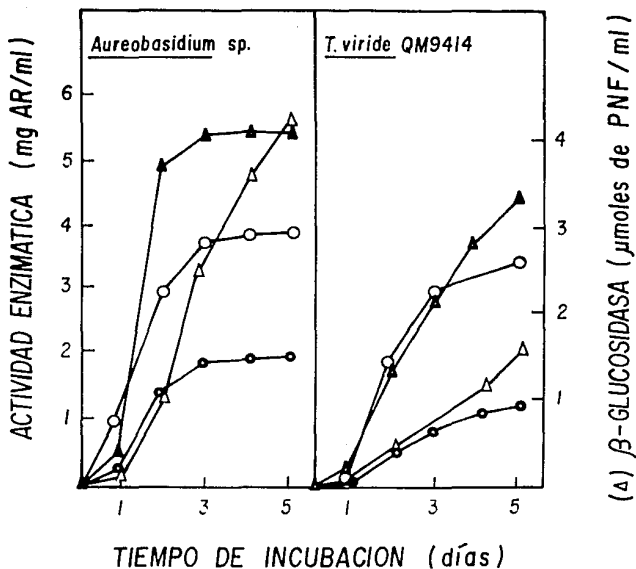


FIG. 4. Producción de celulasas, xilanasas y β -glucosidasa por *Aureobasidium sp.* y *Trichoderma viride* QM9414 crecidos a 37°C en las mismas condiciones descritas en la Fig. 1. Actividad celulolítica sobre PF (●) y CMC (▲); β -glucosidasa (Δ) y actividad xilanolítica (○).

dium sp. requiere de menos tiempo para alcanzar la máxima producción de las actividades. La actividad de β -glucosidasa en nuestra cepa fue de 286% en relación a la de *T. viride*, lo cual resulta interesante, ya que esta actividad en el complejo celolítico de *Trichoderma viride* es limitante para la sacarificación de celulosa cristalina (54). Estos resultados desde el punto de vista de la aplicación de las enzimas son atractivos, debido a que *Aureobasidium sp.* produce una mayor actividad de las enzimas necesarias para degradar celulosa cristalina, que es la forma en que se encuentra en los materiales celulósicos de desecho no tratados física o químicamente.

Con el propósito de comprobar si la diferencia obtenida en los niveles de actividades entre *Aureobasidium sp.* y *T. viride* se debían a un efecto de temperatura en *T. viride*, se evaluó la producción de enzimas por este hongo a 29°C y se compararon con la producción de enzimas por este hongo a 29°C y se comparó con la obtenida a 37°C. Estos resultados se muestran en la Fig. 5, donde se observa que a 29°C la producción de celulasas medidas sobre PF y CMC se incrementa un 30%, en cambio las actividades de xilanasas y β -glucosidasa son prácticamente iguales a las obtenidas a 37°C. Sin embargo, a pesar del incremento en estas actividades, los niveles alcanzados, siguen siendo menores que los de *Aureobasidium sp.*, a excepción de la actividad sobre CMC, que fue un 10% mayor en un solo tiempo (120 horas).

Estos resultados demuestran que entre *T. viride* y *Aureobasidium sp.* si existe una clara diferencia en el comportamiento -

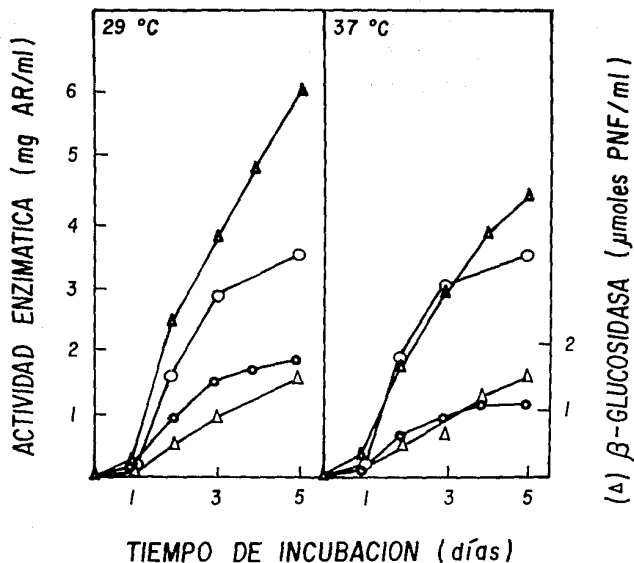


FIG. 5. Producción de celulasas y xilanasas por *Trichoderma viride* QM9414 a 29° y 37°C. Matraces agitados a 180 rpm fueron incubados en las mismas condiciones descritas en la Fig. 1, pero a 29°C y 37°C. Celulasas sobre PF (●) y sobre CMC (▲); β-glucosidasa (Δ) y xilanasas (○).

a la temperatura y que nuestra cepa produce una mayor actividad de celulasas (PF), xilanasas y β -glucosidasa que la doble mutante de *T. viride* QM9414 bajo las mismas condiciones, lo que apoya nuestro interés de seguir evaluando la capacidad de producción de celulasas y xilanasas a 37°C de *Aureobasidium* sp. con el fin de obtener información suficiente para lograr la producción industrial de estas enzimas.

4.2. Efecto del pH inicial del medio de cultivo.

Es bien conocido que el pH del medio de cultivo es uno de los factores más importantes que influyen en la producción y la estabilidad de las enzimas, así como en el crecimiento del microorganismo. Es por ésto que se evaluó la producción de celulasas y xilanasas de *Aureobasidium* sp. creciéndolo a diferentes valores de pH inicial del medio de cultivo.

El efecto del pH se evaluó en un rango de 3.0 a 7.0, los resultados obtenidos sobre la producción de enzimas y variación de pH se muestran en la Fig. 6. En la parte superior se observa que la variación de pH inicial durante la fermentación fue mayor en el rango de 3.0 a 5.0, mientras que a pH más altos no hay gran diferencia entre el pH inicial y pH final de la fermentación. La máxima producción de actividad celulolítica se obtiene cuando se utilizó un pH inicial de 4.5, y, a valores de pH diferentes de 4.5, la producción fue menor, por ejemplo a pH de 3.0 y pH de 7.0 se produce a las 120 horas, el 20% y 60% de

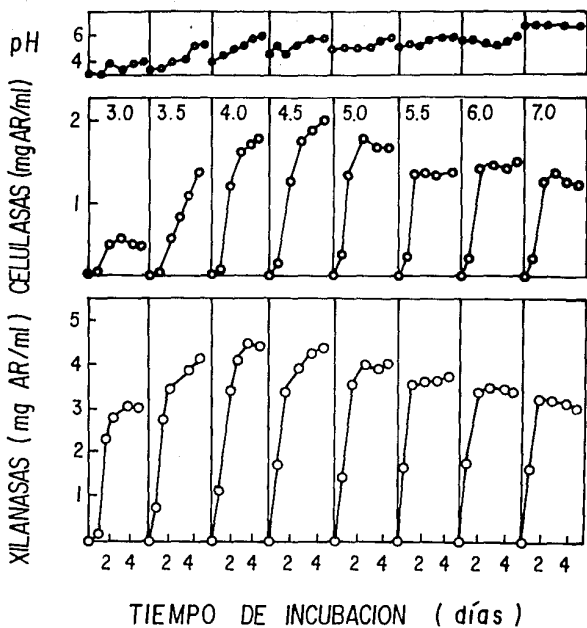


FIG. 6. Efecto del pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de celulasas (●) y xilanasas (○) por *Aureobasidium sp.* crecido en matraces agitados a 180 rpm conteniendo el medio descrito en la Fig. 1, a diferentes valores iniciales de pH e incubados a 37°C.

la actividad respectivamente. A valores de pH superiores a 5.0 los niveles de actividad celololítica en el medio de cultivo ya no aumenta después de las 48 horas. Se ha reportado que en - - *Aspergillus terreus* crecido sobre bagazo de caña tratado, la máxima producción de estas enzimas también se obtiene a pH 4.5, - pero a pH de 3.0 y de 7.0 se obtiene el 72 y 14% respectivamente (53). Es decir la producción de celulasas en *Aspergillus terreus* a pH 3.0 es menos afectada que a pH 7.0, en cambio en - *Aureobasidium sp.* el efecto a este pH es diferente, o sea, a - pH de 3.0 se produce menos actividad que a pH de 7.0. Por otro lado la producción de celulasas producidas por el *Basidiomiceto* 50F (55) tiene un comportamiento al pH similar al de *A. terreus*.

En cuanto a la producción de xilanasas se observa que la máxima actividad se obtiene a pH 4.0, sin embargo entre 3.5 y 5.0 las diferencias observadas a los 5 días de fermentación son menores del 9%. A valores de pH fuera de este intervalo, es decir a pH 3.0 y pH 7.0, la producción de estas enzimas es menor, obteniéndose 67% y 72% respectivamente. También se observa como en el caso de la actividad celololítica, que a valores de pH superiores a 5.0, la producción de xilanasas se incrementa solamente durante las primeras 48 horas y posteriormente ya no se observa ningún efecto.

El efecto del pH sobre la producción de enzimas en *Aureobasidium sp.* que se ha descrito anteriormente se puede ver más claramente en la Fig. 7, donde se muestran las actividades por-

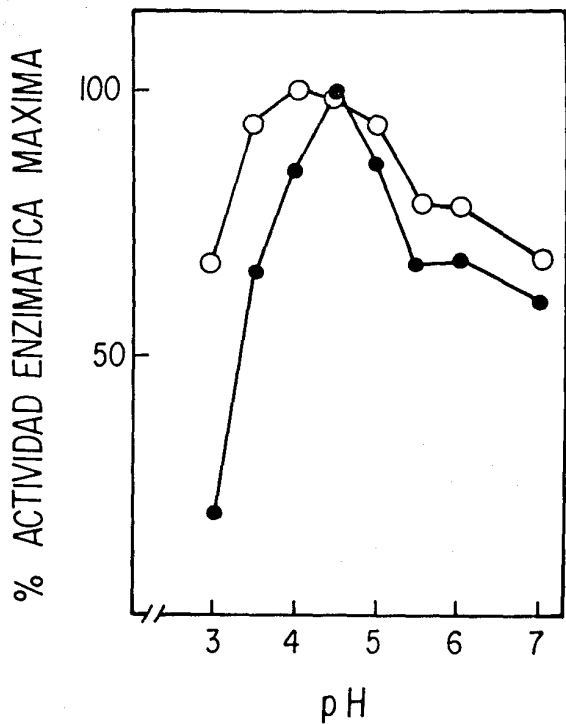


FIG. 7. Producción de celulasas (●) y xilanasas (○) extracelulares por *Aureobasidium sp.* a las 120 horas de incubación y a diferentes valores de pH inicial. Las condiciones de cultivos son las mismas descritas en la Fig. 6.

centuales a las 120 horas de incubación son menores a pH 3.0 y 7.0. Sin embargo las celulasas a los mismos valores de pH presentan una menor producción que las xilanasas. A pH 3.0 se produce el 20% de la actividad celulolítica en relación a la máxima, pero al mismo valor de pH se produce el 67% de la actividad xilanolítica. En todos los valores de pH diferentes a 4.5 la actividad celulolítica fue menor, lo que indica una mayor sensibilidad de la producción de celulasas al cambio de pH inicial del medio de cultivo que las xilanasas.

La disminución de la producción de las enzimas se puede deber a un efecto sobre la biosíntesis, pero también puede haber un efecto sobre la estabilidad. Por tal motivo se determinó la estabilidad de las celulasas y xilanasas preincubándolas a 37°C durante 72 horas a los mismos valores de pH. En la Fig. 8, se observa que a pH de 5.0 se conserva el 100% de la actividad de ambas enzimas. A pH de 4.5 son prácticamente igual de estables, sin embargo a los otros pH si hay una disminución en la actividad de las celulasas y xilanasas. A pH de 3.0 la actividad celulolítica disminuye hasta el 14% a las 72 horas, mientras que la actividad xilanolítica llega a un 40%. A pH de 7.0 la actividad de ambas enzimas baja a un 40%. Estos resultados demuestran que la estabilidad de ambas enzimas se ve afectada por el pH, por lo que es un factor importante que también contribuye a la disminución de la actividad detectada en el medio de cultivo durante la fermentación.

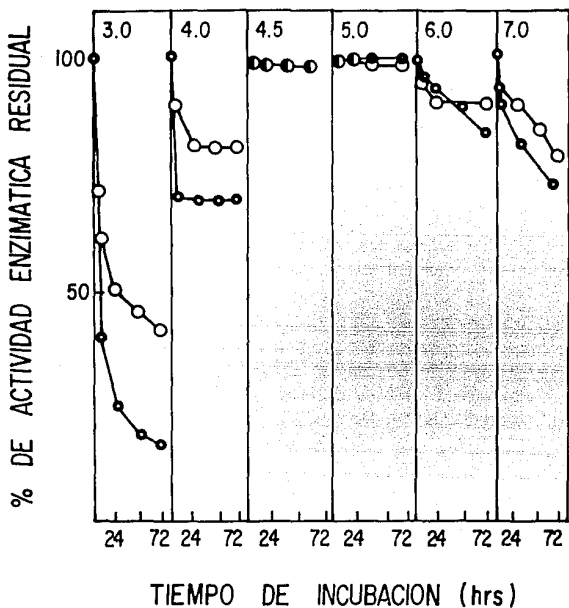


FIG. 8. Estabilidad de las celulasas (●) y xilanasas (○) de *Aureobasidium* sp. a diferentes valores de pH. Los filtrados libres de células se ajustaron a los valores de pH indicados y se preincubaron por diferentes tiempos a 37°C.

A pesar de la importancia que tiene la estabilidad al pH de estas enzimas, llama la atención el hecho de que prácticamente no hay información sobre la estabilidad de las enzimas en los reportes sobre el efecto del pH en la producción de las celulasas y xilanasas.

Considerando todo lo anterior y debido a que la producción de celulasas es mayor a pH 4.5 con una estabilidad prácticamente igual, se seleccionó el valor de 4.5 como el pH inicial para la producción de enzimas por *Aureobasidium* sp.. Este valor de pH también se ha reportado como el valor de pH donde se obtiene la máxima producción de actividad celulolítica para varios hongos entre los que se incluyen: *Eupenicillium javanicum* (56), *Aspergillus terreus* (53), *Basidiomiceto* 50F (55), *Trichothecium roseum* y *A. niger* (57).

4.3. Experimentos a nivel fermentador de 14 litros.

Los experimentos de temperatura y pH descritos hasta el momento, se realizaron en matraces agitados, ya que a este nivel se pueden manejar simultáneamente un mayor número de experimentos que en el fermentador. Sin embargo existen otros parámetros que tienen que ser evaluados a nivel de fermentador, ya que es necesario tener un mejor control de las condiciones de fermentación y porque este sistema es más representativo que el matraz de lo que será el proceso de producción a mayor escala. Es por ésto que de aquí en adelante todos los experimentos se realizarán a nivel de fermentador de 14 litros.

4.3.1. Efecto de la edad del inóculo.

La edad del inóculo es un factor importante que influye directamente sobre los rendimientos de metabolitos y enzimas. En nuestro estudio con *Aureobasidium* sp. se sabía que era posible reemplazar un inóculo de esporas con un cultivo micelial de 24 horas, sin que se afectara negativamente la producción de celulasas y xilanasas (3). Sin embargo solo se había probado este tiempo, como edad del inóculo, por lo que se evaluó la producción de las enzimas utilizando tanto 24 como 48 horas de edad. Los resultados se muestran en la Fig. 9, donde se observa que con el inóculo de 24 horas es mayor la producción de ambas enzimas, que cuando se usa uno de 48 horas. Con el inóculo de 48 horas la producción de celulasas disminuye un 20% y la de

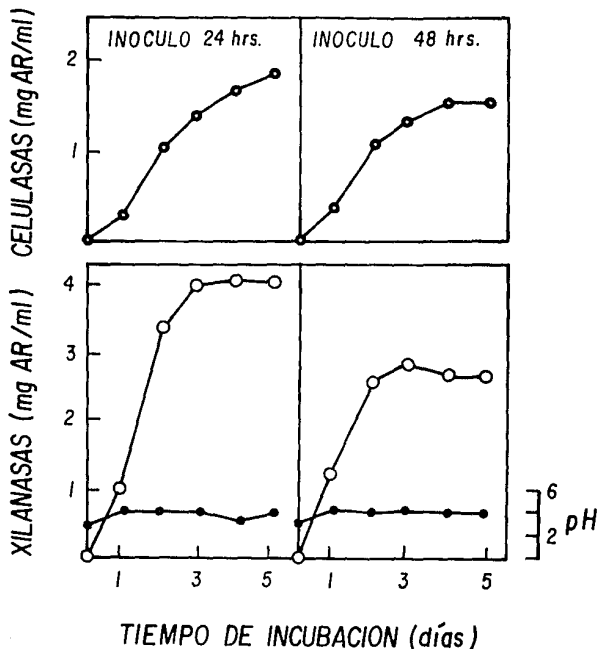


FIG. 9. Producción de celulasas (●) y xilanasas (○) por *Aureobasidium* sp. en fermentadores de 14 litros. Como inóculo se utilizó micelio de 24 y 48 horas crecido en el mismo medio (10%). El medio de cultivo es el mismo descrito en la primera gráfica y las condiciones a este nivel son: 200 rpm, 0.4 vvm, pH 4.5 y 37°C.

xilanasas un 30%. La causa de la disminución en la producción de enzimas con este inóculo no la sabemos, sin embargo es probable que se deba a que a este tiempo el inóculo lleve una mayor cantidad de enzimas, lo que ocasione que los niveles de azúcares liberados en el medio de fermentación, aumenten a niveles que repriman la síntesis de enzimas. En *Trichoderma viride* se ha reportado un comportamiento similar con inóculos de más de 36 horas (58).

Hay que señalar que en la literatura son pocos los trabajos sobre producción de celulasas en los que se utiliza micelio como inóculo, y en ellos la edad del inóculo que se emplea es mayor que la que usamos para *Aureobasidium sp.*. Por ejemplo con *Termomonospora sp.* se usan cultivos de 72 horas como inóculo (59); en *T. viride*, 36 horas (58); *Penicillium pinophilus* y *Trichoderma harzianum*, 72 horas (60,61) y en *Aspergillus fumigatus*, 48 horas (20). Los resultados obtenidos con *Aureobasidium sp.* indican que este hongo se comporta diferente a los mencionados anteriormente, ya que en el se requiere de un inóculo de 24 horas de edad para obtener una mayor producción de las enzimas, en cambio en los otros hongos se necesita más tiempo de incubación del inóculo para obtener la mayor producción de enzimas. Por los resultados obtenidos se seguirá utilizando 24 horas como edad del inóculo en los siguientes experimentos.

4.3.2. Efecto del volumen de inóculo.

Dado que existe interés de escalar el proceso para la producción de celulasas y xilanasas por *Aureobasidium sp.*, se evaluó la reducción del volumen de inóculo para el fermentador, con el fin de determinar el volumen mínimo al cual no se afecta negativamente la producción de enzimas. Se ha reportado que a escala industrial los volúmenes de inóculo empleados en diferentes procesos están en el intervalo del 0.2% al 10% (v/v) (62). Con *Aureobasidium sp.* el volumen de inóculo que se estaba empleando para la producción de enzimas en fermentador de 14 litros había sido del 10% (v/v), y por lo tanto se decidió probar las siguientes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 y 10% (v/v). Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 10, donde se observa que la producción de celulasas prácticamente es igual entre 0.1 y 10% de inóculo. La producción de xilanasas se incrementa 12% con volúmenes de inóculo menores de 2.5%. Con un inóculo de 0.05%, es decir, 5 mililitros del cultivo de 24 horas de *Aureobasidium sp.* inoculados en el fermentador con 10 litros de medio, se observa que la producción de celulasas disminuye un 33% con respecto al máximo, en cambio la producción final de xilanasas prácticamente no se afecta.

Estos resultados son interesantes, ya que es posible reducir de 10% a 0.1% el volumen de inóculo sin afectar negativamente la producción final de las enzimas, es decir una reducción de 100 veces la concentración.

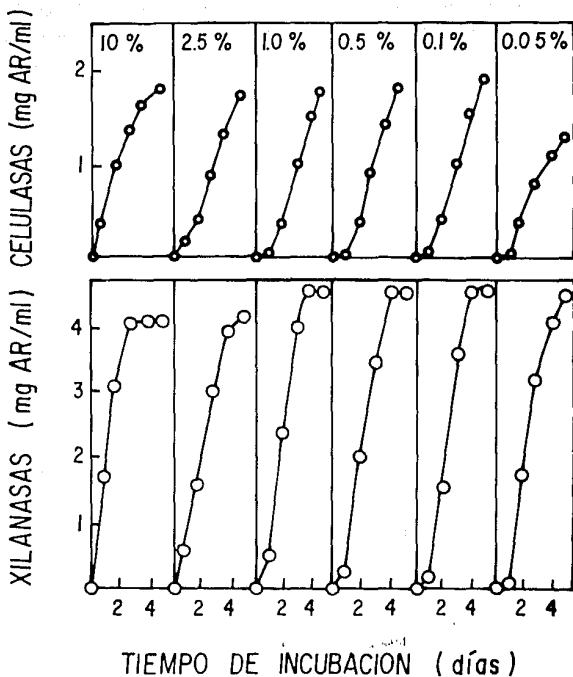


FIG. 10. Efecto del volumen de inóculo sobre la producción de celulasas (●) y xilanasas (○) por *Aureobasidium sp.*, crecido en las mismas condiciones descritas en la Fig. 9 e inoculado con diferentes volúmenes de inóculo micelial de 24 horas de edad.

Por ello el volumen de inóculo de 0.1% se seleccionó para utilizarlo en los siguientes experimentos.

El efecto de volúmenes variables de inóculo sobre la producción de las enzimas es difícil de comparar con la literatura, ya que no se encontraron datos publicados de este efecto sobre la producción de celulasas y xilanasas en otros hongos, sin embargo si hay datos del uso de un solo volumen de inóculo sin probar volúmenes variables, por ejemplo con *Aspergillus fumigatus* solamente se utilizó un volumen de inóculo del 15% (20). Con *Penicillium pinophilum* y *Trichoderma harzianum* se usó 5% (60,61); *T. viride*, 10% (58) y *A. terreus*, 8% (63). Existen reportes en la literatura del efecto de volúmenes variables de inóculo sobre la producción de fructofuranosidasa (64), alcohol (65) y levana (66). En estos casos la cantidad de compuesto sintetizado es mayor cuando se usan volúmenes de inóculo menores del 10%, en cambio con volúmenes mayores la producción es menor, también se reporta en todos los casos que con inóculos menores del 5% se presenta una fase lag de 24 horas, debidas a un crecimiento lento del microorganismo. Por ejemplo la producción de fructofuranosidasa por *Aspergillus awamori* se evaluó con volúmenes de inóculos de 5% a 0.5%, resultando mayor la producción con un inóculo del 0.5%, a concentraciones mayores la producción disminuye (64). En cuanto a la producción de alcohol, se han estudiado volúmenes de inóculo del 2% al 60% resultando que la mayor producción se obtiene con 2%, a volúmenes mayores la producción disminuye hasta un 15% (65).

Es importante señalar que no se encontró ningún reporte en la literatura en el que se haya logrado reducir el volumen de inóculo hasta valores del 0.1% (v/v) como en el caso de la producción de celulasas y xilanasas por *Aureobasidium sp.*

El uso de un volumen de inóculo tan pequeño como el encontrado para *Aureobasidium sp.* tiene como ventaja una mayor facilidad de manejo del inóculo al escalar el proceso, es decir, es más sencillo manejar 10 litros de inóculo (0.1%) que 100 litros (10%) para un fermentador de 1000 litros, y además de esta manera se reducirán los costos de producción.

4.3.3. Influencia de surfactantes.

Es bien conocido que la biosíntesis de enzimas se incrementa por la adición de varias sustancias que actúan como activadoras. Por ejemplo la producción de celulasas y xilanasas en muchos hongos es incrementada por la adición al medio de cultivo de surfactantes tales como: Tween 80, Triton X-100 y monopalmitato de sacarosa (56).

En *Aureobasidium sp.* se sabe que el Tween 80 estimula la producción de celulasas cuando se adiciona a matraces conteniendo un medio de cultivo con celulosa microcristalina (2). Sin embargo a nivel de fermentador de 14 litros y utilizando un inóculo pequeño, no se ha evaluado su efecto, por lo que se decidió estudiar la influencia de algunos surfactantes sobre la pro

ducción de celulasas y xilanasas. Se probaron Tween 80 (éster de polioxi-etilen sorbitan); MAZU DF7940 (polipropilén glicol) y MAZU DF2100 (silicón), éstos dos últimos de grado industrial.

En la Fig. 11 se muestran los resultados de la adición de 0.2% de Tween 80 y MAZU DF7940 al medio de cultivo del inóculo, observándose que en ausencia de estos surfactantes la producción de enzimas es menor, ya que solo se obtiene cerca del 55% para celulasas y 75% para xilanasas tomando como referencia a las actividades obtenidas con Tween 80. La adición de estos surfactantes al medio de cultivo del inóculo estimula la producción de ambas enzimas, resultando ser ligeramente mayor la estimulación de celulasas con Tween 80 y la de xilanasas con MAZU DF7940. De estos resultados se concluye que es conveniente el uso de estos surfactantes en el medio de cultivo del inóculo con el fin de obtener mayores niveles en la producción de celulasas y xilanasas.

Después de estos experimentos se evaluó el efecto de estos mismos surfactantes, en el medio de cultivo de producción del fermentador. En la Fig. 12 se muestra el efecto del Tween 80, donde se observa que a las concentraciones probadas de 0.1 y 0.2% no hay ningún efecto sobre la producción de celulasas y xilanasas, ya que prácticamente se obtiene la misma actividad de las enzimas en presencia y ausencia del Tween 80 en el medio de producción.

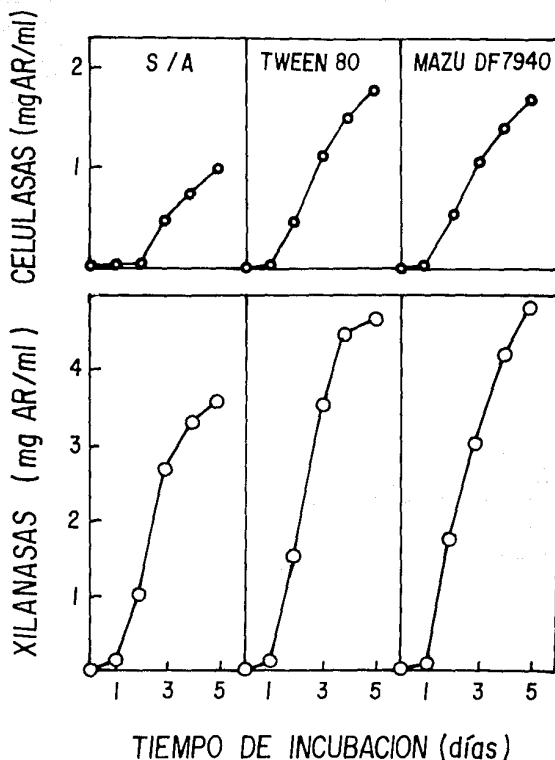


FIG. 11. Efecto de la adición de los surfactantes - Tween 80 y MAZU DF7940 en el medio de cultivo del inóculo sobre la producción de celulosas (●) y xilanasas (○) por *Aureobasidium sp.* crecido en las condiciones descritas en la Fig. 9, e inculado con 0.1% (v/v) de inóculo micelial de 24 horas de edad. S/N sin adición de surfactante.

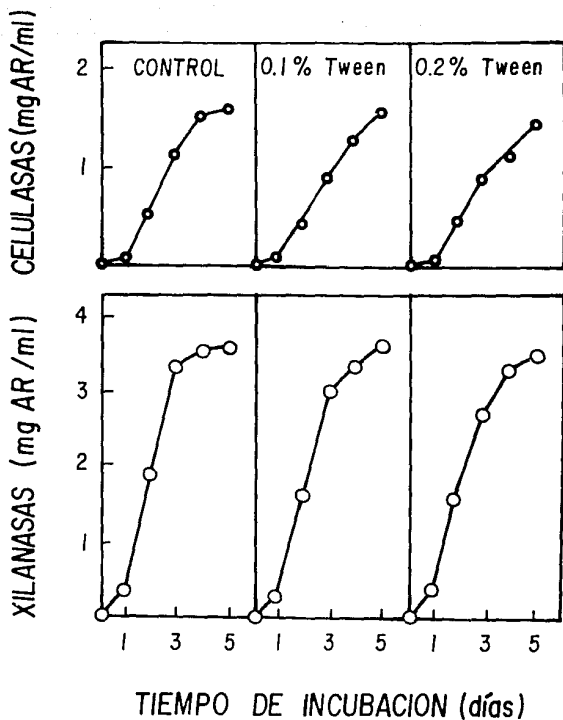


FIG. 12. Efecto del surfactante Tween 80 a dos concentraciones sobre la producción de celulasas (●) y xilanasas (○) por *Aureobasidium* sp.. Las condiciones de cultivo son las descritas en la Fig. 9 e inoculado con 0.1% (v/v) de micelio de 24 horas.

También se probaron 0.1% y 0.2% de los surfactantes grado industrial MAZU DF7940 y MAZU DF2100 como se muestran en las Figs. 13 y 14 respectivamente, donde se observa que prácticamente no se afecta la producción de celulasas y xilanasas.

Estos resultados se pueden ver mejor en la Tabla II, donde se observa que un incremento al doble en la concentración de estos surfactantes no tienen un efecto sobre la producción de enzimas, por lo tanto no es necesaria su utilización como componentes del medio de producción en el fermentador.

En la literatura se ha reportado que el Tween 80 al 0.1% es un surfactante necesario en *Trichoderma viride* para obtener altos rendimientos en celulasas (67). En *Pellicularia filamentososa* este surfactante aumenta 1.5-1.7 veces la producción de celulasas y 2.8 veces la producción de β -glucosidasa (68). En *Scytalidium lignicola* también se incrementa la producción de celulasas por este surfactante (69). En cuanto a la producción de xilanasas se ha reportado que también aumenta al adicionar Tween 80 y monopalmitato de sacarosa en el medio de cultivo, por ejemplo en *Aspergillus fumigatus* QM45h la producción de estas enzimas se incrementa 4 veces con 0.1% de estos surfactantes (70) y en *Aspergillus terreus* las xilanasas aumentan 21% con Tween 80 (0.1%) en el medio de cultivo (71).

El uso de surfactantes grado industrial no ha sido reportado en la literatura. Sin embargo, algunos autores han reemplazado al Tween 80 por otras fuentes de ácidos grasos más eco-

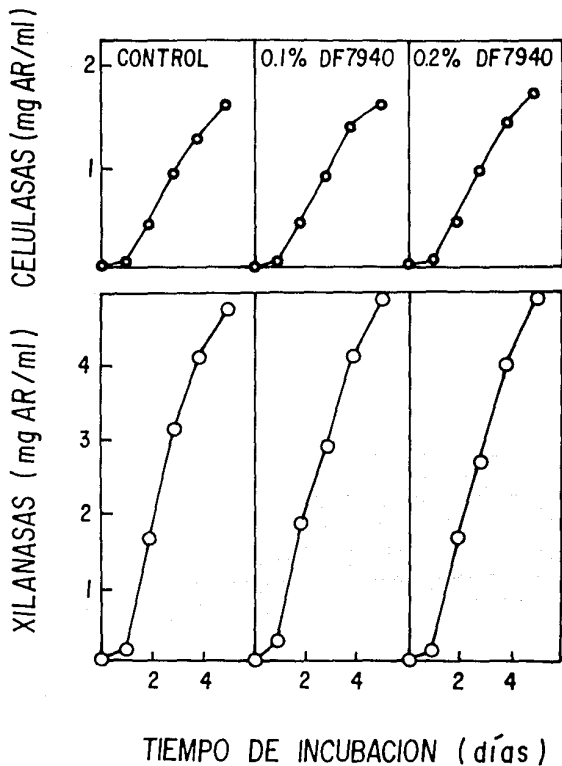


FIG. 13. Efecto del surfactante MAZU DF7940 a dos concentraciones sobre la producción de celulasas (●) y xilanasas (○) por *Aureobasidium* sp.. Las condiciones de cultivo son las descritas en la Fig. 12.

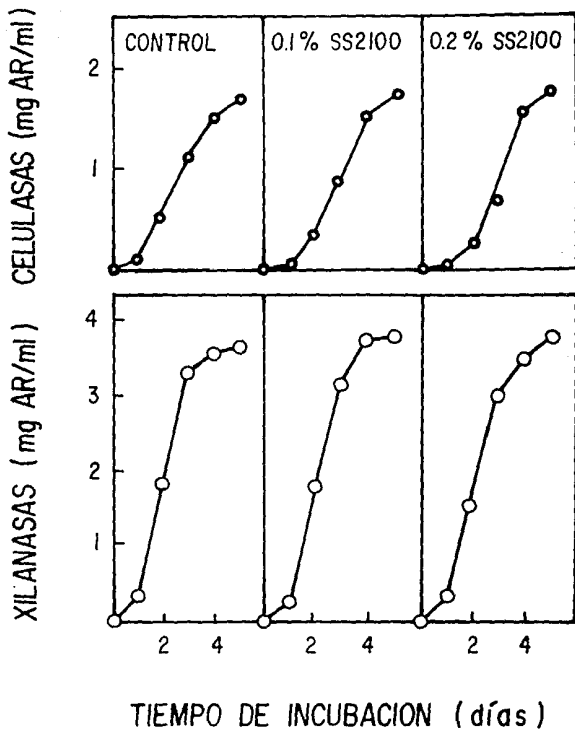


FIG. 14. Efecto del surfactante MAZU SS2100 a dos concentraciones sobre la producción de celulasas (●) y xilanasas (○) por *Aureobasidium sp.*. Las condiciones de cultivo son las descritas en la Fig. 12.

TABLA II

EFFECTO DE SURFACTANTES SOBRE LA PRODUCCION DE CELULASAS
Y XILANASAS POR *Aureobasidium* sp. CULTIVADO EN
FERMENTADORES DE 14 LITROS

| SURFACTANTE | | CELULASAS | XILANASAS |
|-------------|--------|-----------|-----------|
| NINGUNO | | 100 | 100 |
| TWEEN 80 | (0.1%) | 110 | 100 |
| TWEEN 80 | (0.2%) | 97 | 98 |
| MAZU DF7940 | (0.1%) | 103 | 103 |
| MAZU DF7940 | (0.2%) | 110 | 103 |
| MAZU SS2100 | (0.1%) | 97 | 105 |
| MAZU SS2100 | (0.2%) | 97 | 103 |

*) Las actividades son expresadas como % de la actividad producida con respecto al control, a las 96 horas de fermentación.

Las condiciones de fermentación son: agitación 200 rpm, aereación 0.4 vvm, 37°C, pH 4.5 e inoculado con 0.1% de volumen de inóculo de 24 horas de edad.

nómicas, como por ejemplo ácido oleico el cual incrementa 1.5 - veces la producción de xilanasas en el hongo *Irpex lactus* (72). También se han evaluado aceites vegetales de maíz, soya y semillas de algodón, sin embargo los rendimientos en enzimas obtenidos son menores que con Tween 80 (73).

4.3.4. Efecto de la Aereación y Agitación.

La producción de enzimas por microorganismos es influenciada por varios factores, especialmente por el grado de aereación y agitación, por lo que la optimización de estos parámetros es un prerrequisito indispensable para su producción a escala industrial. El propósito de la aereación y agitación en los fermentadores es suplementar a los microorganismos el oxígeno necesario, así como mezclar los medios de cultivo, de tal manera que se obtenga una suspensión uniforme de nutrientes, microorganismos y oxígeno (74).

En los estudios anteriores de *Aureobasidium sp.* a nivel de fermentador de 14 litros la aereación y agitación se habían fijado a 0.4 vvm y 200 rpm respectivamente, sin embargo no se había evaluado el efecto de la variación de estos parámetros sobre la producción de celulasas y xilanasas por *Aureobasidium sp.* La agitación se estudió a tres niveles: 200, 140 y 100 rpm con cuatro niveles de aereación cada una: 0.2, 0.4, 0.6 y 1.0 vvm. Decidimos evaluar velocidades de agitación menores de 200 rpm, debido a que los fermentadores a nivel industrial no operan a -

velocidades de agitación mayores de entre 75 y 140 rpm, por lo que este parámetro resulta crítico al escalar un proceso fermentativo.

Los resultados del efecto de diferentes flujos de aire a una velocidad de agitación constante de 200 rpm sobre la producción de celulasas y xilanasas se muestran en la Fig. 15, donde se observa que la mayor producción de celulasas se obtiene con una aereación de 0.4 vvm (4 litros/min.). Cuando los niveles de aire son incrementados de 4 litros/min a 10 litros/min se observa una menor producción de estas enzimas, lo mismo se observa con una aereación de 0.2 vvm.

La producción de xilanasas se incrementa hasta en un 16% al aumentar la aereación de 0.2 vvm a 0.6 vvm, en cambio con un flujo de aire mayor a éstos, la producción de estas enzimas disminuye.

Al reducir la velocidad de agitación de 200 rpm a 140 rpm y evaluar diferentes flujos de aire (Fig. 16) se observa que a medida que se incrementan los niveles de aereación, la producción de celulasas aumenta, de tal manera que con 1 vvm (10 litros/min) se obtiene una mayor producción de estas enzimas, alcanzando los mismos niveles de actividad que los obtenidos con 200 rpm y 0.4 vvm. En cuanto al comportamiento de la producción de xilanasas en estas condiciones se observa que a medida que se incrementa la aereación de 0.2 a 0.4 vvm aumenta la producción, en cambio a una aereación mayor disminuye.

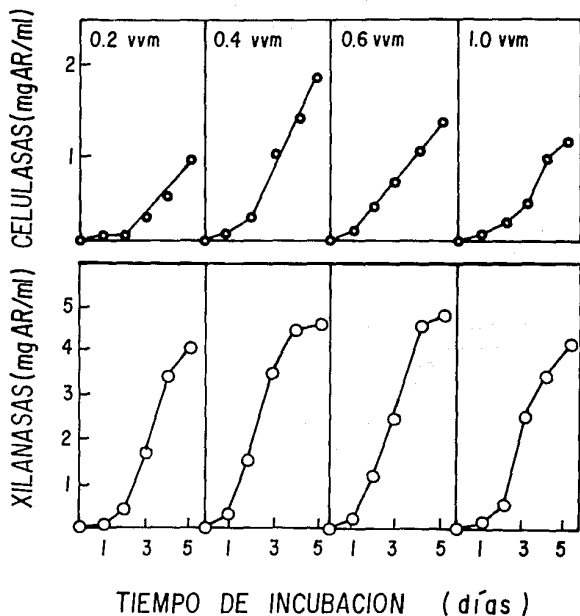


FIG. 15. Efecto de diferentes flujos de aire y agitación de 200 rpm sobre la producción de celulasas (●) y xilanasas (○) por *Aureobasidium* sp.. Las condiciones del fermentador son: 27°C, pH 4.5, agitación y aereación como se indica e inoculado con 0.1% (v/v) de micelio de 24 horas.

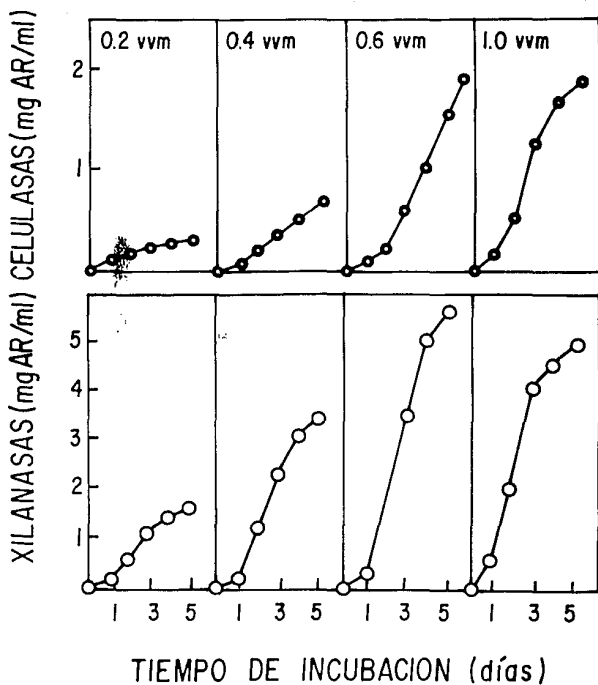


FIG. 16. Efecto de diferentes flujos de aire y agitación de 140 rpm sobre la producción de celulasas (●) y xilanasas (○) por *Aureobasidium* sp.. Las condiciones de cultivos son las descritas en la Fig. 15.

Como se muestra en la Figura 17, con una agitación de -- 100 rpm y diferentes flujos de aire se obtienen resultados similares a los descritos anteriormente, es decir, a medida que se incrementa la aereación, también aumenta la producción de celulasas, sin embargo los niveles alcanzados en este caso son menores a los obtenidos en las agitaciones de 200 rpm y 140 rpm, inclusive con la aereación más alta (1 vvm) la producción de celulasas al final de la fermentación solo representa el 92% de la máxima producción obtenida en las condiciones anteriores. En cuanto a la producción de xilanasas ésta se incrementa al aumentar los flujos de aire de 0.2 a 1.0 vvm.

De acuerdo a estos resultados la producción de celulasas y xilanasas presentan un comportamiento muy similar, ya que a medida que se reduce la agitación se requieren de volúmenes de aire mayores para obtener niveles de producción más altos, es decir, a 200 rpm la máxima producción de ambas enzimas se obtiene con una aereación de 0.4 vvm, mientras que a 140 rpm y 100 rpm se requiere una aereación mayor, o sea de un 1.0 vvm. Cabe señalar que en las condiciones mencionadas anteriormente, en la primera y en la última, la producción de xilanasas al final de la fermentación es prácticamente la misma (4.5 mg AR/ml), en cambio con 140 rpm y 0.6 vvm la máxima producción de estas enzimas es de 5.6 mg AR/ml, lo que representa un incremento del 24%. En cuanto a la producción de celulasas los niveles de actividad obtenidos en estas condiciones son prácticamente iguales (1.8 mg AR/ml), a diferencia de la tercera condición (100 rpm

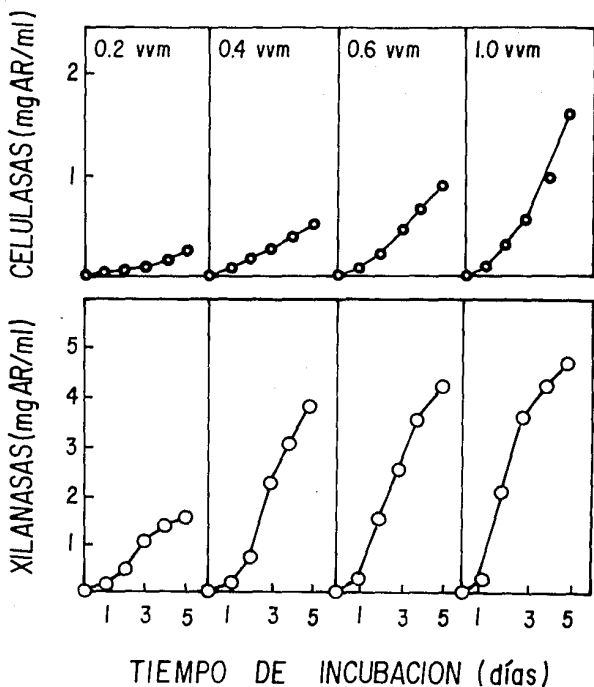


FIG. 17. Efecto de diferentes flujos de aire y agitación de 100 rpm sobre la producción de celulasas (●) y xilanasas (○) por *Aureobasidium sp.*. Las condiciones de cultivo son las descritas en la Fig. 15.

y 1.0 vvm) en la que solo se obtiene el 92% de la actividad. -
Por lo tanto la máxima producción de celulasas es obtenida a -
dos combinaciones de aereación y agitación: 200 rpm y 0.4 vvm -
y 140 rpm con 1.0 vvm y la de xilanasas a una, con 140 rpm y -
0.6 vvm.

El hecho de que se obtuviera una mayor producción de celu -
lasas a dos condiciones de agitación (200 y 140 rpm) resulta -
interesante debido a que 140 rpm es la máxima velocidad que al -
canzan los fermentadores de 22 000 litros que se encuentran en
nuestro país, por lo que no habría restricciones al respecto, -
en caso de ser posible su escalamiento a este nivel.

De la evaluación de estos parámetros sobre la producción
de celulasas y xilanasas por *Aureobasidium* sp. se notan dos -
efectos, los cuales se ven más claramente en la Figura 18. El
primero es que se obtiene una baja producción de enzimas con -
flujos de aire bajos a las velocidades de agitación evaluadas,
posiblemente debidas a una insuficiente transferencia de oxígeno,
tal que no permite un buen crecimiento del hongo y por lo -
tanto, la producción de enzimas es menor. Esta posibilidad es
apoyada por el hecho de que a menor velocidad de agitación se -
requieran mayores flujos de aire para incrementar la producción
de enzimas. También se observa que a mayor velocidad de agita -
ción (200 rpm) y aereaciones altas, es decir, mayor de 0.4 vvm
para celulasas y 0.6 vvm para xilanasas, se presenta un efecto
negativo sobre la producción de ambas actividades, siendo mayor

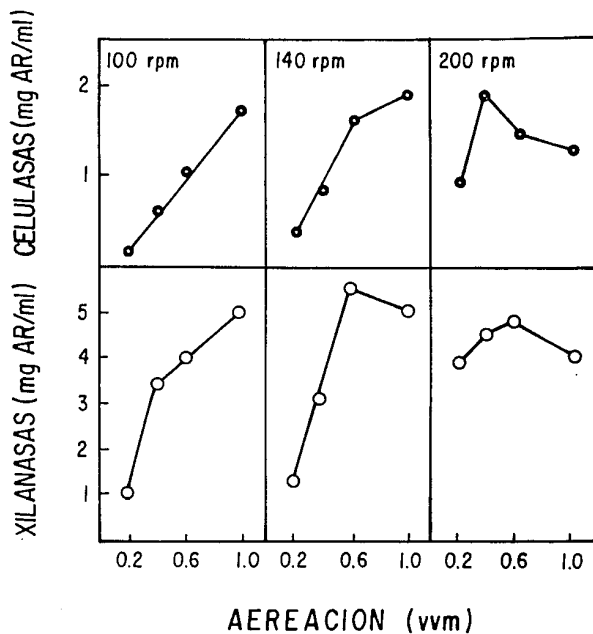


FIG. 18. Efecto de diferentes velocidades de agitación y aereación sobre la producción de celulasas (●) y xilanasas (○) por *Aureobasidium* sp. a las 120 hrs. de incubación. Las condiciones de cultivo son las mismas descritas en las Figs. 15 a 17.

la influencia sobre la producción de celulasas que sobre las -- xilanasas, es decir, la producción disminuye un 40% para celulasas y un 15% para xilanasas. Es probable que este efecto sea debido a que en estas condiciones de alta aereación hay pérdida de las actividades enzimáticas. Para probar esta posibilidad se determinó la estabilidad de las enzimas de un filtrado libre de células a la aereación de 1 vvm durante 48 horas y manteniendo a 37°C con agitación. Los resultados obtenidos indican que un flujo de aire de 1 vvm no tiene efecto sobre la actividad de ambas enzimas, por lo que se descarta esta posibilidad (Fig. 19). Por lo tanto, la razón de la disminución de la actividad de las enzimas no la sabemos, pero es probable que en estas condiciones de 200 rpm y 1 vvm, se produzca algún daño en el micelio lo que ocasiona que los niveles de actividad en el medio de cultivo sean menores.

En *Aspergillus fumigatus* se ha reportado que a velocidades de agitación mayores de 300 rpm con flujos de aire de 1 vvm, la producción de celulasas y β -glucosidasa es afectada negativamente debido a la presencia de un inhibidor (no identificado) - de estas actividades, el cual es liberado por ruptura del micelio (20).

En la literatura hay reportes sobre el efecto de la aereación y agitación en la producción de celulasas, así como de las condiciones a las cuales se obtiene la máxima producción de enzimas, las cuales varían dependiendo del microorganismo. En -

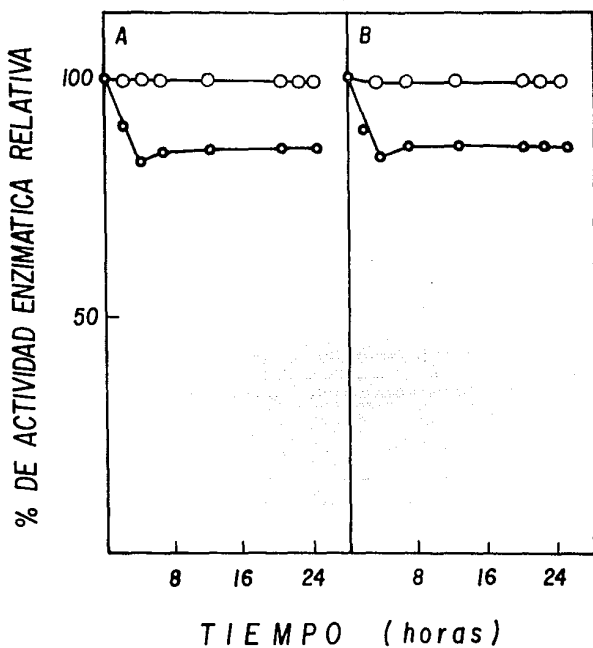


FIG. 19. Efecto de la aereación de 1 vvm sobre la estabilidad de las celulasas (●) y xilanasas (○) de *Aureobasidium sp.*. Los filtrados libres de células a pH 5.0 se incubaron a 37°C por diferentes tiempos con aereación de 1 vvm (B) y sin aereación (A).

Trichoderma viride la producción de celulasas varía en función de la velocidad de agitación, siendo 400 rpm y 0.4 vvm las mejores condiciones de producción, a velocidades mayores o menores a ésta, la producción de enzimas es menor (58). Para *C. cellulolyticum* la máxima actividad de celulasas se obtiene con -- 300 rpm, a velocidades mayores la producción es menor (75). En *Aspergillus fumigatus* se obtiene la máxima actividad de endoglucanasas y β -glucosidasa con 100 rpm y 1 vvm a velocidades de agitación mayores disminuye la producción (20). En *Trichoderma viride* se encontró que las condiciones de agitación óptimas para cada componente del sistema enzimático varían, ya que para celulasas sobre PF y CMC son 300 y 200 rpm respectivamente, -- mientras que para la β -glucosidasa se requiere de una agitación 400 rpm, estos valores se determinaron con una aereación constante de 0.2 vvm (76).

De los resultados obtenidos en este trabajo, al igual que lo reportado en literatura, también se observa que la producción de actividad celulolítica y xilanolítica depende de los niveles de aereación y agitación, sin embargo el comportamiento de *Aureobasidium sp.* en las condiciones evaluadas, solo es parcialmente comparable con la literatura, debido a que todos los trabajos reportados evalúan intervalos de aereación y agitación más altos.

4.3.5. Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno ($k_{L,a}$).

El coeficiente de transferencia de oxígeno ($k_{L,a}$) nos permite evaluar la capacidad de oxigenación de un fermentador. La oxigenación de un cultivo está dado por las condiciones de aereación y agitación a las que trabaja un fermentador. En la literatura se han reportado varios métodos para determinar el $k_{L,a}$, entre ellos están el método del sulfito, el transitorio y el estático (77). Sin embargo, todos estos métodos son indirectos - porque se llevan a cabo en ausencia de células.

Otros métodos para estimar el $k_{L,a}$ considerando las condiciones de cultivo y en presencia de células son el método dinámico y el de balance de oxígeno en "steady-state", el primero - de éstos es el más empleado (78).

Los valores de $k_{L,a}$ obtenidos por todos estos métodos no - pueden ser comparados entre sí, sin embargo un mismo método puede ser usado para medir la capacidad de oxigenación de diferentes fermentadores.

No existe un método que de resultados absolutamente correctos y la magnitud del error no puede ser exactamente estimado - porque éstos dependen de las propiedades físico-químicas del medio líquido, la respuesta del electrodo de oxígeno y del cambio de etapa en la velocidad de aereación.

Previamente habíamos realizado la evaluación de diferentes condiciones de aereación y agitación sobre la producción de celulasas y xilanasas, por lo que consideramos conveniente determinar el valor numérico de oxigenación ($k_{L,a}$) que se estaba dando en las diferentes condiciones evaluadas. Inicialmente, intentamos aplicar el método dinámico, sin embargo se presentó el problema de que no se tenía una respuesta rápida del electrodo de oxígeno, debido a que las partículas del bagacillo de caña interferían. Por esta razón se eligió el método transitorio, el cual es sencillo y rápido, y nos permite comparar los niveles de oxigenación proporcionados en las diferentes condiciones de aereación y agitación de un fermentador (77).

En la Tabla III se muestran los valores de $k_{L,a}$ obtenidos en las diferentes condiciones de aereación y agitación, observándose que los valores de $k_{L,a}$ se incrementan conforme aumenta la agitación y la aereación y los valores más altos se obtienen con una agitación de 200 rpm. Es interesante señalar que se obtiene la misma oxigenación a dos condiciones diferentes: 140 rpm, 1 vvm y con 200 rpm, 0.4 vvm. A 200 rpm y 1 vvm el valor de $k_{L,a}$ se duplica con respecto a los mencionados anteriormente.

La correlación entre el $k_{L,a}$ y la producción de celulasas y xilanasas por *Aureobasidium* sp. se muestra en la Figura 20, donde se observa que el valor óptimo para la producción de celulasas y xilanasas es prácticamente el mismo y corresponde a un valor de 12.6 hr. A valores de $k_{L,a}$ diferentes a éste, la pro--

TABLA III

DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE
 OXIGENO (k_{La}) POR EL METODO TRANSITORIO, A UN
 FERMENTADOR DE 14 LITROS, BAJO DIFERENTES
 CONDICIONES DE AEREACION Y AGITACION

| Agitación (rpm) | Aereación (vvm) | k_{La} (h^{-1}) |
|--------------------|--------------------|--------------------------|
| 100 | 0.2 | 5.357 |
| | 0.4 | 5.540 |
| | 1.0 | 9.960 |
| 140 | 0.2 | 6.930 |
| | 0.4 | 8.000 |
| | 1.0 | 12.400 |
| 200 | 0.2 | 11.070 |
| | 0.4 | 12.600 |
| | 1.0 | 24.000 |

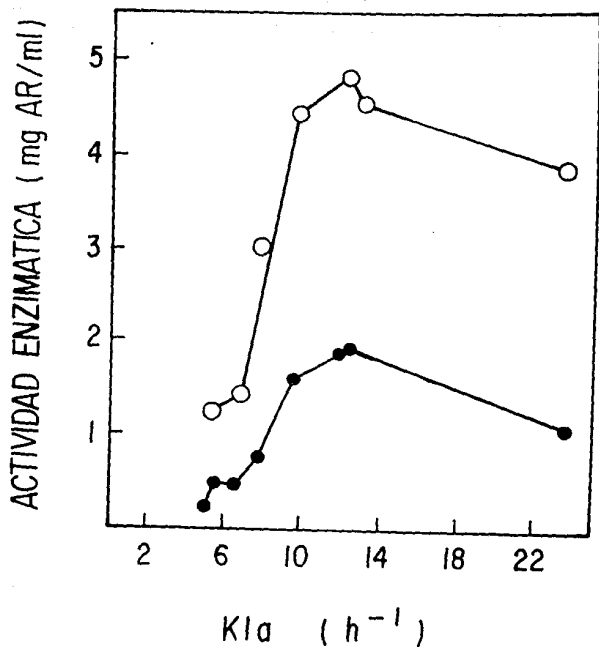


FIG. 20. Efecto del k_{La} sobre la producción de celulasas (●) y xilanasas (○) por *Aureobasidium sp.* Los valores de k_{La} se obtuvieron por el método - - transitorio en las diferentes condiciones de aereación y agitación descritas en la Fig. 18.

ducción de enzimas es menor. El valor de k_{La} al cual se obtiene una mayor producción de enzimas, corresponde al obtenido en dos condiciones diferentes de aereación y agitación: 0.4 vvm, - 200 rpm y a 1.0 vvm, 140 rpm. De estas dos condiciones la segunda tiene mayores posibilidades de ser aplicada en fermentadores de la industria nacional, ya que éstos trabajan a bajas velocidades de agitación (75-140 rpm) (Ríos, L.: comunicación personal).

Los resultados obtenidos no pueden ser numéricamente comparados con la literatura, ya que los métodos empleados para su determinación son diferentes.

Sin embargo, se mencionarán algunos de los valores reportados y las condiciones a las que se obtienen. Para la producción de celulasas por *T. viride* el k_{La} medido por el método dinámico tiene un valor óptimo de 228 hr., y corresponde a una agitación de 400 rpm y una aereación de 0.4 vvm, a valores mayores o menores a éste le corresponde una baja producción de enzimas (58).

La producción de endoglucanasas y β -glucosidasa por *Aspergillus fumigatus* el k_{La} óptimo es de 10 hr., medido por el método dinámico y corresponde a una velocidad de agitación de 100 rpm y una aereación de 1.0 vvm, a valores mayores se obtiene una menor producción de estas enzimas (20).

4.3.6. Efecto del control de pH.

El control de pH durante la producción de celulasas ha sido estudiado en varios microorganismos, encontrándose que en algunos de ellos aumenta la producción de enzimas cuando se controla el pH (80). En *Aureobasidium sp.* este parámetro no ha sido evaluado por lo que se estudió el efecto de controlar el pH durante la fermentación, a valores de 4.0, 5.0 y 6.0. Estos valores se seleccionaron considerando que a un pH inicial de 4.5 se obtiene la mayor producción de enzimas y sin control de pH durante la fermentación, éste varía en el intervalo de 4.0 a 6.0. Por otro lado, los valores a los cuales se ha controlado el pH en otros hongos, se encuentran en el intervalo seleccionado.

Los resultados obtenidos de controlar el pH a 4.0, 5.0 y 6.0 a partir de las 24 horas con un equipo para monitoreo y control constante de pH, se muestran en la Figura 21, donde se observa que la producción de celulasas disminuye cuando se controla el pH, particularmente a pH 6.0, ya que baja un 79% y a pH 4.0 y 5.0 disminuye en 40%. En cuanto a la producción de xilanas el efecto de control de pH es menor que sobre el de celulasas, ya que a pH 4.0 y 5.0 la producción de estas enzimas es prácticamente igual a la obtenida cuando no se controla el pH durante la fermentación y controlando a pH 6.0 disminuye solo un 10%.

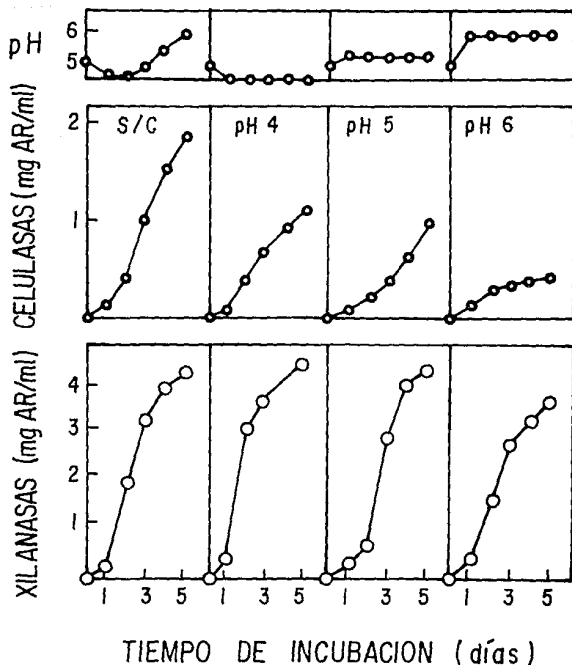


FIG. 21. Efecto de controlar el pH del medio de cultivo desde las 24 horas de incubación a pH 4.0, 5.0 y 6.0 sobre la producción de celulosas (●) y xilanas (○) por *Aureobasidium* sp.. Las condiciones de fermentación son 37°C, 0.4 vvm, 200 rpm y 0.1% volumen de inóculo y pH inicial de 4.5 en todos los casos. Al control no se le controló el pH durante la fermentación.

Los resultados obtenidos demuestran que el control de pH durante la fermentación no es recomendable para la producción de celulasas por *Aureobasidium sp.* debido a la disminución de la actividad, por lo que es mejor, que el pH no se controle durante la fermentación. La razón de la disminución de la actividad no la sabemos.

Se ha reportado que en *A. awamori* la producción de celulasas aumenta al controlar el pH a 5.0 (81).

En *T. viride* la producción de celulasas se incrementa controlando el pH a 5.5 debido a que sin control, el pH baja a 2.7, probablemente el aumento aparente en la producción se debe a que a pH 5.5 hay menos inactivación de las celulasas (80). En un cultivo mixto de *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride* la actividad de celulasas (PF) y xilanasas aumenta un 4% al controlar el pH a 4.8 durante la fermentación (82).

Otra manera de controlar el pH durante la fermentación es alternando el pH a dos valores mediante la adición de una base o un ácido en forma gradual tal, que a cierto intervalo de tiempo el pH se encuentre en el valor más alto y a un tiempo igual el pH se encuentre en el valor más bajo y así sucesivamente. En *T. viride* se ha reportado que alternando el pH durante la fermentación a 5.2 y 3.0 la producción de celulasas se incrementa 1.3 veces comparando con los niveles de actividad que se obtienen al controlar el pH a 5.2 (83).

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se demostró que la cepa silvestre del hongo levaduriforme *Aureobasidium* sp. produce un sistema celulolítico completo (PFasa, CMCasa y β -glucosidasa) y xilanasas extracelulares, en un medio con pocas sales minerales grado industrial, agua de la llave y bagacillo de caña sin ningún pretratamiento físico y/o químico. Los niveles de actividades que produce este hongo se comparan favorablemente con los de la doble mutante de *Trichoderma viride* QM9414 cultivados en las mismas condiciones. También se demostró que los niveles de actividad celulolítica y xilanolítica producidos por *Aureobasidium* sp., son prácticamente iguales a nivel de matraz, como en fermentadores de 14 litros, lo cual es importante ya que generalmente los niveles de producción disminuyen al pasar de una escala a otra.

Se determinaron las condiciones de fermentación (temperatura y pH inicial), a las cuales se obtiene una mayor producción de actividad de las enzimas, y que corresponden a 37° y a un pH inicial de 4.5. También se encontró que este hongo es capaz de producir celulasas y xilanasas en un intervalo de temperaturas, más amplio que el de otros hongos mesofílicos celulolíticos, posiblemente debido a que *Aureobasidium* sp. fue aislado de zonas de cañaveral, las cuales están situadas en zonas de altas temperaturas. El inóculo más adecuado para el fermentador fue un cultivo micelial de 24 horas de edad y la relación de volumen de inóculo a este nivel se reduce de 10% a 0.1% (v/v),

sin afectar la producción final de ambas enzimas, es decir, se obtuvo una reducción de 100 veces, en el volumen de inóculo, lo que significa una mayor facilidad de manejo del mismo y una disminución en los costos de producción.

Asimismo se demostró que *Aureobasidium* sp. no requiere de la adición de surfactantes al medio de cultivo, sin embargo, en el medio de cultivo del inóculo si es necesario agregarlo a fin de obtener altos niveles en la producción de enzimas. La máxima producción de celulasas y xilanasas es obtenida a dos diferentes combinaciones de agitación y aereación: 200 rpm, 0.4 vvm y 140 rpm, 1 vvm, estas condiciones coinciden en un mismo valor de k_{La} , que corresponde a 12.4 h^{-1} , medido por el método transitorio. El efecto de la aereación y agitación sobre la producción de celulasas y xilanasas consiste en que al disminuir la velocidad de agitación se requiere de un mayor flujo de aire a fin de obtener una mayor actividad, mientras que con bajas velocidades de agitación y bajos flujos de aire, se obtienen bajos niveles de actividad, debido a una insuficiente transferencia de oxígeno, lo cual se demostró por los bajos valores de k_{La} encontrados en estas condiciones.

Por último se observó que el control de pH durante la fermentación tiene un efecto negativo sobre la producción de celulasas, por lo que no es recomendable que el pH se controle y varíe de acuerdo a los cambios que ocurren durante la fermentación.

Los avances logrados en este trabajo son interesantes, ya que nos permitió mejorar las condiciones de producción, y de manera indirecta reducir los costos de producción, así como conocer la influencia que tienen algunos parámetros físico-químicos sobre la producción de celulasas y xilanasas de *Aureobasidium* - sp.; sin embargo, a través de todos estos estudios, los niveles de actividad final de las enzimas producidos no se incrementaron, posiblemente, debido a la incapacidad intrínseca del microorganismo de aumentar su biosíntesis y/o secreción al medio de cultivo, en respuesta a las variaciones de su medio ambiente. - Como otra alternativa para incrementar los niveles de actividad, se sugiere el mejoramiento genético de la cepa a fin de obtener cepas hiperproductoras de celulasas y xilanasas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- López, R. Ph.D. Thesis. National Center of Scientific Research. Habana, Cuba. (1975).
- 2.- Gilbón, A., Larios, G. & Huitrón, C. Rev. Tecnol. Aliment. (Mex). 16:24 (1981).
- 3.- Acuña, M.E. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico - de Sonora (1983).
- 4.- Huitrón, C., Saval, S. & Acuña, M.E. Ann. of the N.Y. Acad. of Sciences. 434:110-114 (1984).
- 5.- Ghose, T.K. Adv. Biochem. Eng. 6:39-74 (1977).
- 6.- Berghem, L.E., Pettersson, L.G. & Axiö-Frederiksson, U.B. Eur. J. Biochem. 53:55-62 (1975).
- 7.- Wood, T.M. & McCrae, S.I. Carboh. Res. 57:117 (1977).
- 8.- Reilly, P.J. In Trends in the Biology of Fermentation for fuels and chemical. Edited by Hollaender, A. Plenum Press. 111-129 (1981).
- 9.- Bungay, H.R. Production and Feeding of Single Cell Protein. Edited by Ferranti & Frechter, A. Applied Science Publishers. 15-22 (1983).
- 10.- Aspinall, G.O. The Biochemistry of Plants. Vol. 3: 473-500. Academic Press N.Y. (1980).
- 11.- Wilke, C.R. Biotechnol. Bioeng. Sym. 6:155 (1976).

- 12.- Peterson, A. Fungal Enzymes. 101-129 (1987).
- 13.- Anuario Estadístico de Comercio Exterior, México. (1985-1988).
- 14.- Skladnev A.A. & Kalunyants, K.A. Prikl. Biokh. Mikrobiol. 18:816-820 (1982).
- 15.- González, P., Cea, A., Gilbón, A., Herz, J. & Huitrón, C. Biotecnología de Enzimas. Editado por Huitrón, C. 309 (1983).
- 16.- Hsing-Hsiung, H. & Shung-Chang, J. J. Ferment. Technol. 63:189-192 (1985).
- 17.- Fratzke, A.R. & Reilly, P.J. Process Biochemistry. September 27-29 (1977).
- 18.- García, M.D., Ogawa, T., Shinmyo, A. & Enatsu, T. J. Ferment. Technol. 52:378-387 (1974).
- 19.- Mandels, M., Reese, T.E. J. Bacteriol. 73:269-278 (1957).
- 20.- Wase, J.D., McManamey W. & Alope, K.V. Biotechnol. Bioeng. 27:1166-1172 (1985).
- 21.- Takao, S., Kamagata, Y. & Sasaki, H. J. Ferment. Technol. 63:127-134 (1985).
- 22.- Merchant, R., Merchant, F. & Margaritis, A. Biotechnol. Letters. 10:513-516 (1988).
- 23.- Hayashida, S., Yoshioka, H. Agric. Biol. Chem. 44:1721 (1980).

- 24.- Sens A. & Chakrabarty. Can. J. Microbiol. 28:271-277 (1982).
- 25.- Van Zyl, W. Biotechnol. Bioeng. 27:1367-1373 (1985).
- 26.- Ishaque, M. & Klueftel, D. Can. J. Microbiol. 26:183-189 (1980).
- 27.- Crawford, D., McCoy, E., Harkin, J. & Jones, F. Biotechnol. Bioeng. 15:833-843 (1973).
- 28.- Dhillon, N., Chhibber, S., Saxena, N., Pajni, S. & Vedehra, D.A. Biotechnol. Letters. 7:695-697 (1985).
- 29.- Rapp, P. & Wagner, F. Appl. Environ. Microbiol. 51:746-752 (1986).
- 30.- Leatherwood, J.M. Appl. Microbiol. 13:771 (1965).
- 31.- Forsberg, C., Beveridge, J. & Hellstrom, A. Appl. Environ. Microbiol. 42:886-893 (1981).
- 32.- Himova, M., Biely, P. & Vrsanska, M. Arch. Microbiol. 138:371-376 (1980).
- 33.- Biely, P. Trends in Biotechnol. 3:286 (1985).
- 34.- Leathers, T.D. Appl. Environ. Microbiol. 52:1026 (1986).
- 35.- Gilbón, A., Huitrón, C., González-Farías, F. & Ulloa, M. Mycologia. 78:810 (1986).
- 36.- Ross, A., Schügerl, K. & Scheiding, W. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18:29-37 (1983).

- 37.- Larios de Anda, G. Tesis de Doctorado. Universidad de Dijon, Francia. (1984).
- 38.- Illanes, A. & Rossi, M. Revista Argentina de Microbiología. 12:79-86 (1980).
- 39.- Reese, E.T. & Mandels, M. J. Bacteriol. 79:816 (1970).
- 40.- Mandels, M. Biotechnol. Bioeng. Symp. 5:81 (1975).
- 41.- Durand, H., Baron, M., Calmels, T. & Tiraby, G. FEMS Symp. 43. Edited Aubert, J., Beguin, P. & Millet, J. 135-151 (1988).
- 42.- Woodward, J. Topics in Enzyme Microbial. Technol. 2:81 (1980).
- 43.- Ryu, D.D. & Mandels, M. Enzyme Microb. Technol. 2:81 (1980).
- 44.- Montenecourt, B., Nhlopa, S., Trimiño-Vázquez, H., Cuskey, S. & Eveleigh, D. Trends in the Biology of Fermentation for fuels and Chemicals. Edited by Hollander, A. Plenum Press, N.Y. 35-55 (1981).
- 45.- Tangnu, S., Blanch, H., & Wilke, D.R. Biotechnol. Bioeng. 23:1837 (1981).
- 46.- Linko, M. Production & Feeding of Single Cell Protein. Edited by Ferranti & Fiechter. Applied Science Publishers. 26-29 (1983).
- 47.- Mandels, M., Andreotti, R. & Roche, C. Biotech. Bioeng. Symp. 6:21 (1976).

- 48.- Miller, G.L. Anal. Chem. 31:426-428 (1959).
- 49.- Larios de Anda, G. Tesis de Maestría. C.C.H., UNAM. (México) (1981).
- 50.- Bailey, J.E. & Ollis, D. Biochemical Engineering Fundamentals. International Student Editions. McGraw Hills. 418 (1977).
- 51.- Mandels, M. and Weber, J. Adv. Chem. Ser. 95:391 (1969).
- 52.- Suh, D.H., Becker, D.T., Sands, J.A. & Montencourt, B.S. Biotechnol. Bioeng. 32:821-825 (1988).
- 53.- Souza, J.D. & Volfova, D. Eur. J. Appl. Microbiol. 16:123-125 (1982).
- 54.- Bisset, J.E. & Sternberg, D. Appl. Environ. Microbiol. 35:750-755 (1978).
- 55.- Menezes, T. Col. ITAL, Campinas. 10:153-168 (1979).
- 56.- Taniguchi, M., Tanaka, M., Matsuno, R. & Kamikubo, T. J. Ferment. Technol. 58:143-148 (1980).
- 57.- Salmanova, L.S. & Zhdanova, L.A. Microbiology. 11:214-218 (1973).
- 58.- Mukhopadhyay, S.N. & Ghose, T.K. Biotechnol. Letters. 1:205-209 (1979).
- 59.- Moreira, A.R., Phillips, J.A. & Humphrey, A.E. Biotechnol. Bioeng. 23:1339-1347 (1981).

- 60.- Brown, J.A., Collin, S. & Wood, T.M. Enzyme Microb. Technol. 9:176-180 (1987).
- 61.- Senior, D.J., Mayers, P.R. & Saddler, J.N. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32:137-142 (1989).
- 62.- Huckenhull, D.J. Fungal Biotechnology. Academic Press. Edited by Smith, E. 1-23 (1980).
- 63.- Garg, S.K. & Neelakantan, S. Biotechnol. Bioeng. 23: 1653-1659 (1981).
- 64.- Serova, Y. & Dobrolinskaya, G.M. Microbiologiya. 11: 207-209 (1975).
- 65.- Strehaiano, P., Mota, M. & Goma, G. Biotechnol. Letters. 5:135-140 (1983).
- 66.- Ismailova, D.Y. & Loginova, L. Mikrobiologiya. 11:676-681 (1975).
- 67.- Reese, E.T. & Maquire, A. Appl. Microbiol. 17:242-245 (1969).
- 68.- Taniguchi, M., Tanaka, M., Matsuno, R. & Kamikubo, T. J. Ferment. Technol. 58:143-148 (1980).
- 69.- Desai, J.D., Desai, A.J. & Patel, N.P. J. Ferment. Technol. 60:117 (1982).
- 70.- Reese, E.T. & Maguire, A. Appl. Microbiol. 17:242-245 (1969).

- 71.- Ismailova, D.Y. & Loginova, L.G. Microbiology. 11:
600-604 (1975).
- 72.- Kawai, M., Noguchi, S., Shimura, G., Suga, Y. & Samijo, H.
Agr. Biol. Chem. 42:333-337 (1978).
- 74.- Aiba, S. & Okabe, M. Adv. Biochem. Eng. 7:111-130 (1977).
- 75.- Hecht, V., Schügerl & Scheiding, W. J. Chem. Technol.
Biotechnol. 33:231 (1983).
- 76.- Mukatoka, S., Kobayashi, N. & Takahashi, J. Biotechnol.
Bioeng. 32:760-763 (1988).
- 77.- Taguchi, H., Suga, K. & Yoshida, T. Preceeding of the 4th
International Fermentation Sym. 83 (1972).
- 78.- Bandyopadhyay, B., Humphrey, A.E. & Taguchi, H.
Biotechnol. Bioeng. 9:533-544 (1967).
- 79.- García-Hernández, F. Tesis de Maestría. Universidad de
Londres, Inglaterra. (1974).
- 80.- Sternberg, D. Appl. Environ. Microbiol. 31:648-654 (1977).
- 81.- Kawai, S., Honda, H., Tanase, T., Taya, M., Iijima, S. &
Lobayashi, T. Agric. Biol. Chem. 51:59-63 (1987).
- 82.- Topobrata, P. Process Biochemistry. June, 104-108 (1989).
- 83.- Mukhopadhyay, S. J. Ferment. Technol. 59:309-313 (1981).