

OBTENCIÓN DE CELULASAS DE *ASPERGILLUS NIGER*. TÉCNICA DE CULTIVO Y MÉTODO DE SEPARACIÓN

Julio Dustet, Maylín Carmenate, Taimí Haramboure, Odette Hernández, José L. Martínez
Grupo de Biotecnología Aplicada. Centro de Estudios de Ingeniería de Procesos (CIPRO)
Facultad de Ingeniería Química. ISPJAE.
Calle 127 s/n, Marianao, Ciudad de la Habana, Cuba
E-mail: jcdm@quimica.ispjae.edu.cu

Palabras clave: *celulasas, fermentación sólida, sistemas bifásicos acuosos*

Introducción. Las celulasas son en la actualidad una de las enzimas que tienen aplicaciones importantes en la industria textil, en la industria de producción de detergentes, en la producción de alimentos y en la formulación de medicamentos. En Cuba el bagazo de caña de azúcar representa un sustrato atractivo para la producción de celulasas.

Objetivo del trabajo es presentar los resultados obtenidos en la producción de celulasas de *Aspergillus niger* a escala de laboratorio.

Metodología. Se empleó la cepa J-1 de la especie *Aspergillus niger* del cepario del CIPRO. Se utilizó la fermentación en estado sólido como técnica de cultivo para producir las enzimas. Las condiciones de fermentación se describen en (1). El bagazo de caña se trató con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ de acuerdo al procedimiento descrito en (1). La cinética de expresión de enzimas se determinó en columnas de 20 gramos húmedos de capacidad. Para aumentar el tamaño de escala se usó un biorreactor de 8 kg de sólido húmedo de capacidad cuyas características de diseño se describen en (1). El crudo enzimático se separó prensando el sólido. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. Las actividades enzimáticas medidas fueron la de papel de filtro (PFasa) y la carboximetilcelulasa (CMCasa) de acuerdo al procedimiento descrito en (2). Ambas actividades se expresan en unidades internacionales por gramo de materia seca (UI/gms).

Los crudos enzimáticos se caracterizaron en base a la estabilidad en función del pH y de la temperatura. Se utilizó como método de separación para las enzimas presentes en el crudo un sistema bifásico acuoso formado a partir de Polietilenglicol 600 (PEG) la sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y agua. Los detalles se describen en (3).

Resultados y Discusión. La cinética de expresión de celulasas demostró que a las 48 horas se producían 3 UI/gms de actividad PFasa y 12 UI/gms de CMCasa. En este tiempo ya se expresaba más del 80% de la actividad máxima (obtenida a las 108 horas) en ambos casos. Por la razón anterior el tiempo de fermentación seleccionado fue 48 horas, lo cual garantiza la operación del biorreactor en un punto de mayor productividad. Los resultados del escalado al biorreactor de 8 kg para la actividad PFasa fueron en un caso 2.78 UI/gms y en otro 3.16 UI/gms, lo que se consideró

como una reproducción de los resultados de los estudios en las columnas. Estos resultados son importantes teniendo en cuenta que el cambio de escala en relación de masas iniciales fue de 400 veces. En la operación del biorreactor se logró disminuir los gradientes de temperatura en la dirección altura (40 cm de cama de sólido húmedo) utilizando un flujo de aire máximo de 5 litros por minuto por kg de masa húmeda inicial y utilizando una diferencia entre la temperatura de entrada del aire y la temperatura media del cultivo (35 °C) de 2 °C.

Los estudios de estabilidad demostraron que ambas actividades mantenían el 100% de su actividad inicial durante 24 horas a 30 °C conservadas en acetato de sodio 50 mM y a pH igual 4.

Se realizaron varios ensayos para formar diferentes sistemas bifásicos entre los componentes antes mencionados. Se formaron sistemas de dos fases cuando se mezclaron en proporción volumétrica 1:1 PEG 100% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 y 2 M, PEG al 80% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5, 2 y 3 M, PEG al 60% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, 3 y 4 M, PEG al 40% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 y 4 M. En un solo paso de separación en el sistema formado por PEG al 100% con 1.5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 20 °C se logró un factor de purificación de 7.6 para la actividad CMCasa y de 7.82 para la PFasa con un recobrado de 54% y 56% respectivamente. La actividad enzimática se concentró en la fase de tope. Este fue el mejor sistema bifásico para la separación de todos los estudiados.

Conclusiones. La fermentación en estado sólido representa una técnica de cultivo apropiada para producir celulasas de *Aspergillus niger*. Las enzimas producidas por la cepa J-1 presentan gran estabilidad a temperaturas cercanas a la ambiental no siendo necesario su refrigeración posterior a la separación del crudo del medio de fermentación. Se considera que la separación por sistemas bifásicos acuosos puede ser una técnica apropiada para utilizarla en la estrategia de purificación de las celulasas producidas por este microorganismo.

Bibliografía.

1. Dustet J. (1999), Tesis Doctoral. Facultad de Ingeniería Química. ISPJAE. C de la Habana, Cuba.
2. Mandel M. (1976), Biotechnology Bioeng. Symp., vol 6, 21-33.
3. Haramboure T. (1998), Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería Química. ISPJAE. C de la Habana, Cuba.