

UTILIZACION DE LA CELULOSA Y PAJA DE CAÑA POR CULTIVOS DE TRICHODERMA VIRIDE

A. Herrera, G. Guerra, A. Castillo, G. Casado y H. García

Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

Recibido: 19 de diciembre de 1986

Recibido: 28 de marzo de 1988

ABSTRACT. *Trichoderma viride* C-9 and *T. reesei* QM-9414 were grown on filter paper as cellulose, as well as, carboxymethylcellulose and leaves of sugar cane, respectively, in a mineral basal medium. *T. reesei* QM-9414 was used as reference culture. The greatest accumulation of sugars present in the supernatant media was reached in the cultures with sugar cane leaf.

RESUMEN. Se estudió el comportamiento de *Trichoderma viride* C-9, y *T. reesei* QM-9414 en presencia de papel de filtro como celulosa y carboximetilcelulosa; así como paja de caña sin tratamiento empleándose como únicas fuentes de carbono en un medio salino. *T. reesei* QM-9414 fue empleada como cultivo de referencia. La mayor acumulación de azúcares reductores en el medio de fermentación se alcanzó en los cultivos con paja de caña.

INTRODUCCION

Los problemas fundamentales para la hidrólisis de la celulosa, derivan de la estructura cristalina organizada que ella posee y de la presencia de lignina en los tejidos vegetales, que compacta extraordinariamente las fibras celulósicas del vegetal.¹ Mediante la hidrólisis química o a través de una sacarificación enzimática, es posible obtener glucosa a partir de los sustratos celulósicos.²

Okada,³ encontró que la especie *Trichoderma viride* tiene actividad celulolítica en presencia de celulosa. Varios autores⁴⁻⁶ han discutido la influencia de la fuente de carbono, sustancias orgánicas y metales en la producción de enzimas celulolíticas.

Karrer y col.,⁷ diferenciaron los materiales celulósicos en relación a la acción enzimática sobre éstos, debido a las diversas estructuras físicas de las sustancias, citándose por Fuller y Norman,⁸ el criterio convencional de probar la capacidad de los microorganismos de utilizar la celulosa, haciéndolas crecer en presencia de papel de filtro como única fuente de carbono.

Resse y Levinson,⁹ sugirieron la existencia del componente C₁ en el sistema enzimático celulasa, siendo responsable de la degradación de las formas celulósicas altamente organizadas. La acción del complejo enzimático celulasa, sobre celulosa cristalina, rinde glucosa.⁶

Cabe destacar que la mayor parte de los estudios realizados sobre la biodegradación de los materiales celulósicos se ha centrado en sustratos químicamente puros, tales como algodón, papel de filtro, carboximetilcelulosa y otros.^{5,8,9}

El empleo de materiales celulósicos de caña como única fuente de carbono ha sido descrito por varios autores, con buenos resultados en cultivos líquidos agitados, empleando bacterias y hongos celulolíticos.¹⁰⁻¹⁵

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos. Se emplearon las especies fúngicas celulolíticas *Trichoderma viride*, cepa C-9; proveniente de un laboratorio de Fermentaciones de la Universidad de La Habana y *T. reesei*, cepa QM-9414.

Conservación de los microorganismos. Fueron conservados en medio agar-papa-glucosa, incubándose durante 7 d a 28°C. Posteriormente, fueron mantenidas en refrigeración a 4°C.

Medio de cultivo. Se utilizó el medio salino citado por Mandels y col.,¹⁶ ajustándose el pH inicial a 5. Como única fuente de carbono, al 1%, se empleó papel de filtro Whatman No. 1 (1 cm²); carboximetilcelulosa (BDH) con grado de sustitución 0,7 a 0,8 y paja de caña molida y seca, sin tratamiento químico y a concentraciones de 2; 4 y 6% en los medios de cultivo. En algunos experimentos fueron empleadas azúcares simples: manosa, xilosa, arabinosa y celobiosa, como únicas fuentes de carbono y energía, al 1%, respectivamente.

Condiciones de cultivo. Se utilizaron cultivos líquidos agitados en zaranda giratoria a 120 r/min durante 7 d, ajustándose la temperatura a 28°C. Las fermentaciones se realizaron en erlenmeyers de 500 mL de capacidad, con 200 mL volumen efectivo. El inóculo se preparó a partir de una suspensión de esporas de 10⁵ a 10⁷/mL, de un cultivo joven de 7 d de incubación. La biomasa fue determinada por gravimetría mediante peso seco.

Determinaciones químicas y bioquímicas. Se empleó el método de Dubois y col.¹⁷ para la determinación de carbohidratos totales solubles y el de Summer y Somers¹⁸ para azúcares reductores. En los casos en que la concentración de azúcares fue inferior a 100 mg/L se añadió 0,1 mg de glucosa en las muestras, restándose los valores de la añadida. La actividad CMC-asa se determinó por el método de Gupta y col.¹⁹ modificado por Miller² y Abín.²¹ El análisis cualitativo de azúcares presentes en los sobrenadantes de las fermentaciones, se realizó según Menzies y Seakin,²² en cromatografía de papel descendente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Crecimiento de *T. viride* C-9 y *T. reesei* QM-9414, en presencia de azúcares simples

T. viride C-9 presentó buen crecimiento en glucosa como fuente de carbono; así como *T. reesei* QM-9414. Ambas especies también se hicieron crecer en presencia de manosa, así como las pentosas arabinosa y xilosa. El consumo de estos azúcares sencillos, comenzó a apreciarse después de las primeras 20 h en unos casos y de las 30 h en otros. La celobiosa fue otro de los azúcares consumidos (Tabla I).

TABLA I

Azúcares residuales presentes en cultivos de *T. viride* C-9 y *T. reesei* QM-9414

Cepas	Fuente de carbono*	Incubación (h)					
		0	21	35	60	84	107
C-9	arabinosa	100	100	100	20	17	15
	xilosa	100	100	100	22	-	12
	glucosa	100	76	-	52	39	12
	manosa	100	100	-	25	19	17
	celobiosa	100	-	43	19	19	10
QM-9414	arabinosa	100	100	100	72	50	40
	xilosa	100	100	53	34	29	24
	glucosa	100	92	72	63	-	12
	manosa	100	100	68	60	55	49
	celobiosa	100	66	33	29	-	13

*La concentración inicial de cada azúcar fue de 10 g/L y se consideró como el 100%

El crecimiento de estas cepas, a partir de los azúcares solubles mencionados anteriormente (Tabla II), ponen de manifiesto sus potencialidades para utilizar los materiales celulósicos, pues éstos en forma de polímeros se encuentran en la paja de caña y otras partes del vegetal.²³ Los tiempos de latencia de los cultivos fúngicos fueron de alrededor de 24 h en las condiciones ensayadas y son los normalmente citados para hongos.^{21,24}

TABLA II

Biomasa fúngica obtenida a partir de varios azúcares simples

Especies	Fuente de carbono (10 g/L)	Biomasa (g/L)
<i>T. viride</i> C-9	arabinosa	3,4
	xilosa	3,5
	glucosa	3,5
	manosa	3,3
	celobiosa	3,6
<i>T. reesei</i> QM-9414	arabinosa	2,4
	xilosa	3,0
	glucosa	3,5
	manosa	2,1
	celobiosa	3,5

Utilización de celulosa y carboximetilcelulosa por los cultivos de *Trichoderma*

Los cultivos de *T. viride* C-9 y *T. reesei* QM-9414 crecieron en presencia de papel de filtro como única fuente de carbono; así como con carboximetilcelulosa. En la figura 1 puede apreciarse que el crecimiento en papel de filtro como única fuente celulósica permitió una acumulación de azúcares reductores por debajo de los 50 mg/L, tanto para *T. viride* C-9, como en *T. reesei* QM-9414, mientras que con carboximetilcelulosa los valores aumentan hasta más de 10 veces (Fig. 2).

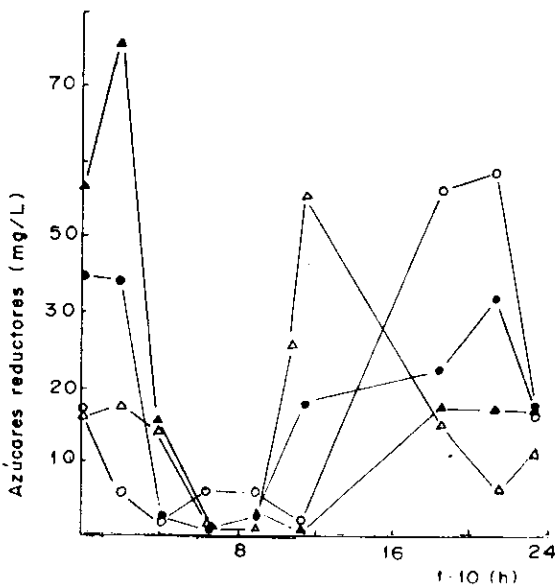


Fig. 1. Acumulación de azúcares reductores en cultivos de *T. viride* C-9 crecidos en papel de filtro y 10 mg/L de glucosa ●, en papel de filtro ○ y de *T. reesei* QM-9414 crecidos en papel de filtro y 10 mg/L de glucosa ▲, en papel de filtro △

En presencia de papel de filtro como celulosa, ambas especies consumen los azúcares reductores en las primeras 8 h, incluyendo aquí la adición de 10 mg/L de glucosa inicialmente al medio, a fin de favorecer el proceso de germinación de las esporas y que se ha comprobado en especies fúngicas celulolíticas, aunque a concentración 10 veces superior.²¹

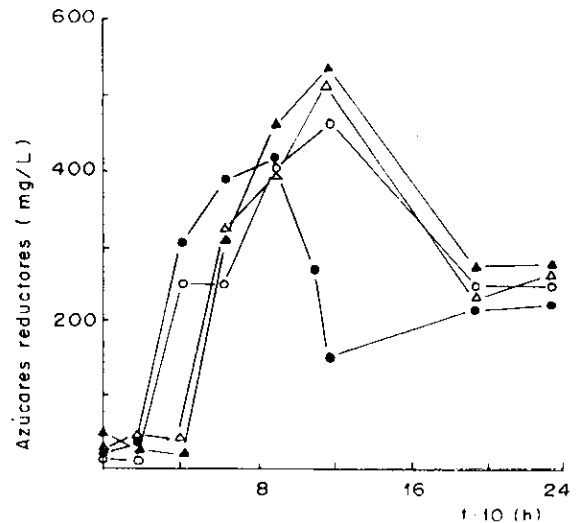


Fig. 2. Acumulación de azúcares reductores en cultivos de *T. viride* C-9 crecidos en carboximetilcelulosa y 10 mg/L de glucosa ●, en carboximetilcelulosa ○ y de *T. reesei* QM-9414 crecidos en carboximetilcelulosa y 10 mg/L de glucosa ▲ y en carboximetilcelulosa △

Los cultivos crecidos en presencia de carboximetilcelulosa, presentan un aumento apreciable en la acumulación de azúcares reductores, a partir de las 30 a 40 h de incubación (Fig. 2), lo que pone de manifiesto la actividad celulolítica de las endoglucosidas y exoglucosidas,²⁵ que también es apreciada en los cultivos con papel de filtro (Fig. 1).

Comportamiento de los azúcares reductores en cultivos de *T. viride* C-9 y *T. reesei* QM-9414; crecidas en paja de caña

Las fermentaciones con paja de caña sin tratamiento químico, con *T. viride* C-9 y *T. reesei* QM-9414, mostraron perfiles de acumulación de azúcares reductores, en correspondencia con la concentración de la paja presente en los cultivos (Figuras 3 y 4) y que son comparables a los cultivos crecidos con carboximetilcelulosa como única fuente de carbono.

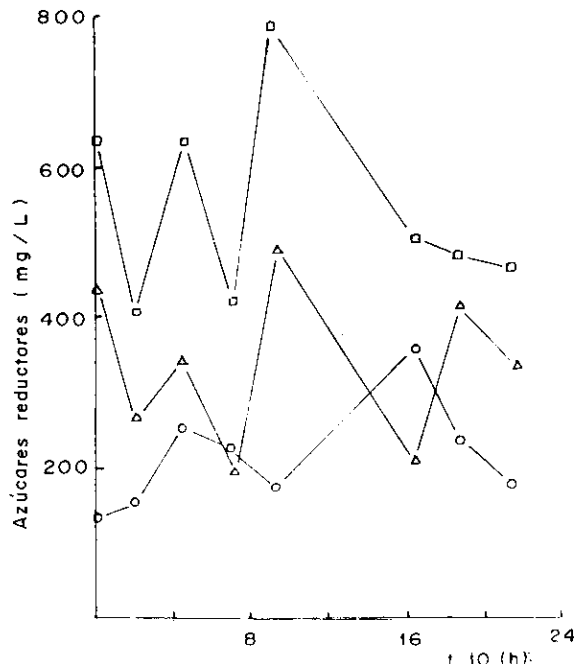


Fig. 3. Acumulación de azúcares reductores en cultivos de *T. viride* C-9, utilizando paja sin tratar al 2% ○, 4% ▲ y 6% □.

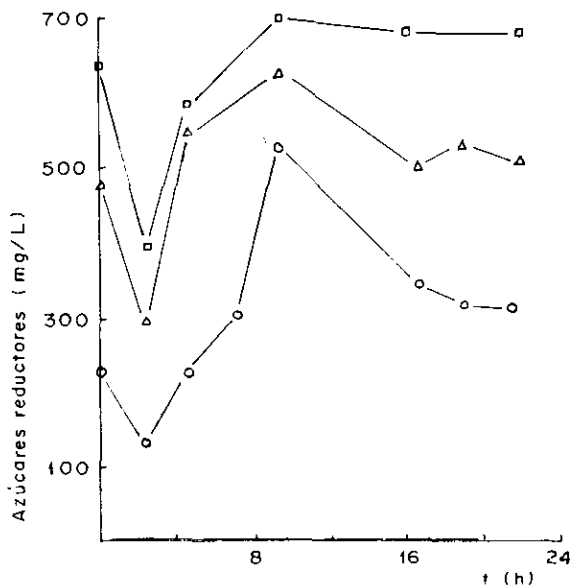


Fig. 4. Acumulación de azúcares reductores en cultivos de *T. viride* QM-9414 utilizando paja sin tratar al 2% ○ 4% △ y 6% □

La presencia de altas concentraciones de azúcares reductores, como producto de la hidrólisis enzimática de los materiales celulósicos, resulta muy deseable, por cuanto permitiría la mejor utilización de la fuente de carbono por estos u otros microorganismos.

Los perfiles de actividad celulolítica en presencia de papel de filtro y carboximetilcelulosa como únicas fuentes de carbono, pueden apreciarse en las figuras 5 y 6, explicando éstos la acumulación de azúcares reductores apreciados en las figuras 1 y 2, producto de la hidrólisis enzimática celulolítica.

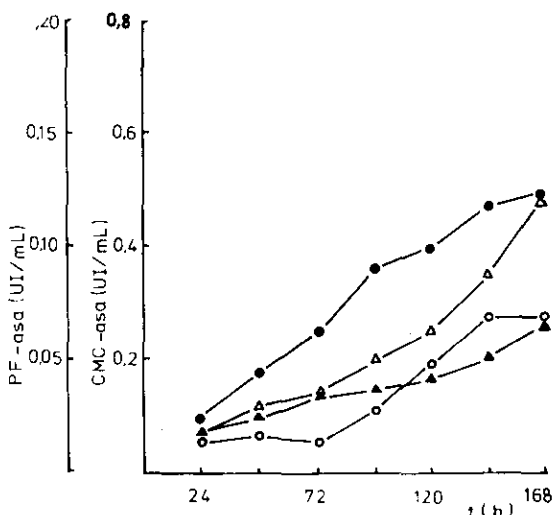


Fig. 5 Cultivo de *T. viride* C-9, en celulosa: ○ actividad CMC-asa, △ PF-asa. Cultivo en carboximetilcelulosa: ● actividad CMC-asa, ▲ PF-asa

Azúcares presentes en el sobrenadante de la fermentación de la paja de caña

Los sobrenadantes de los cultivos fúngicos centrifugados y desalinizados, fueron investigados en relación con la presencia de azúcares sencillos, frente a patrones de arabinosa, xilosa, glucosa, manosa, galactosa y celobiosa, detectándose sólo glucosa

($R_f = 0,18$) y celobiosa ($R_f = 0,13$), en los cultivos con papel de filtro y carboximetilcelulosa. Los cromatogramas revelaron también manchas con un R_f corto, inferior al obtenido con celobiosa, lo cual hace suponer la presencia de pequeños oligosacáridos. Iguaes resultados se han obtenido con los sobrenadantes de la fermentación de la paja de caña, apareciendo también glucosa y celobiosa, así como oligosacáridos pequeños, lo cual se explica por el tipo de hidrólisis de las β -glucosidasas sobre los materiales celulósicos.^{24,25}

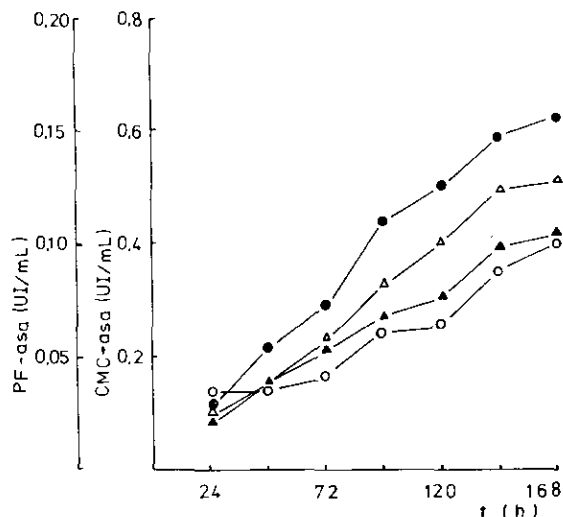


Fig. 6. Cultivo de *T. reesei* QM-9414, en celulosa: ○ actividad CMC-asa, △ PF-asa. Cultivo en carboximetilcelulosa: ● actividad CMC-asa, ▲ PF-asa

CONCLUSIONES

T. viride C-9 y *T. reesei* QM-9414, crecieron en presencia de arabinosa, xilosa, glucosa, manosa y celobiosa, empleadas como únicas fuentes de carbono, respectivamente. La glucosa y celobiosa estuvieron entre los azúcares más asimilados, siendo éstos los productos de hidrólisis de los materiales celulósicos.

El papel de filtro suministrado como única fuente de carbono celulósico, fue degradado por ambas especies fúngicas, rindiendo azúcares reductores. La carboximetilcelulosa fue mejor degradada, con mayor producción de azúcares reductores en los cultivos.

Los cromatogramas obtenidos de los sobrenadantes de los licores fermentados de papel de filtro, carboximetilcelulosa y paja de caña sin tratamiento, revelaron la presencia de glucosa y celobiosa, así como de oligosacáridos no identificados.

RECONOCIMIENTOS

Esta investigación se realizó bajo el proyecto E-687, auspiciado por International Foundation for Sciences (IFS), de Estocolmo, Suecia.

BIBLIOGRAFIA

1. Van Dillewijn C. Botánica de la caña de azúcar. Ed. Revolucionaria, La Habana, 1968.
2. Andren R.K., Mandels M. and Medeiros J.F. *Appl. Polymer Symposium*, 28, 205, 1975.
3. Okada G. *J. Biochem. (Tokyo)*, 77, 33, 1975.
4. Hulme M.A.S. and Stranks D.W. *J. Biol. Sci.*, 27, 457, 1974.
5. Mandels M. and Reese E.T. *J. Bacteriol.*, 79, 816, 1960.
6. Nisizawa T., Suzuki H., Nakayama M. and Nisizawa K. *J. Biochem.*, 70, 375, 1971.
7. Karrer P., Schubert P. and Wehali W. *Helvetica Chim. Acta*, 8, 797, 1925.
8. Fuller N.H. and Norman A.G. *J. Bacteriol.*, 46, 273, 1943.
9. Reese E.T. and Levinson H.S. *J. Bacteriol.*, 59, 485, 1950.
10. Herrera A. *Ciencias, Serie 5*, No. 13, 1975.

11. Herrera A. y Pérez J. *Ciencias, Serie 5*, No. 15, 1976.
12. Díaz L. y Herrera A. *Revista de Ciencias Biológicas*, 14, 283, 1983.
13. Abín L., Guerra G. y Herrera A. *Revista de Ciencias Biológicas*, 14, 331, 1983.
14. Guerra G., Abín L. y Herrera A. *Revista de Ciencias Biológicas*, 15, 17, 1984.
15. Enríquez A. *Biotechnol. Biceng.*, 23, 1 423, 1981.
16. Mandels M., Stenberg D. and Andreotti E. *SITRA Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*, 165, Helsinki, 1975.
17. Dubois M., Gilles K., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. *Nature*, 108, 167, 1951.
18. Summer J.R. and Somers G.F. *Laboratory Experiments in Biological Chemistry*. Op. Academic Press, Inc., New York, 1944.
19. Gupta I.K., Das N.B. and Gupta Y.P. *Agr. Biol. Chem.*, 36, 1961, 1972.
20. Miller G.L. *Anal. Chem.*, 31, 426, 1959.
21. Abín L. Trabajo de Diploma, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, 1977.
22. Menzies I.S. and Seakins J.W.T. Chapter 20, *Sugar*, 310, Chromatographic and electrophoretic techniques (ed. I. Smith), vol. 1, 1969.
23. Herrera A. Tesis para optar por el grado de Candidato a Doctor, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, 1980.
24. Shewale J.G. *Internat. J. Biochem.*, 14, 435, 1982.
25. Suomalainen H. and Oura E. *Physiology and Biochemistry of Yeasts*, 2, Academic Press, 1969.

ELECTROENCEFALOGRAFO DIGITAL DEL MEDICID - 03M

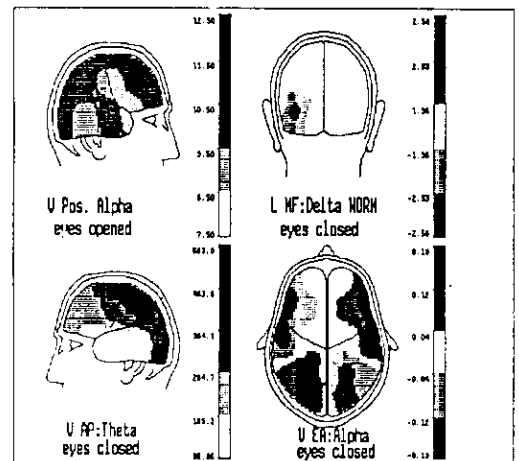
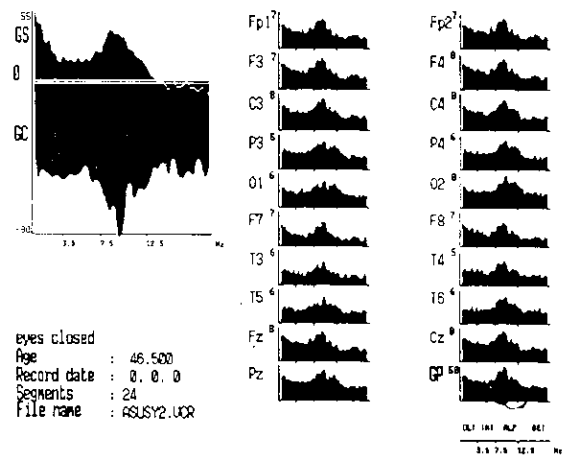
El ELECTROENCEFALOGRAFO DIGITAL combina las funciones de un electroencefalógrafo tradicional de papel con el análisis cuantitativo del electroencefalograma, por lo que se integran las posibilidades de estudio que estas técnicas permiten.

Posibilidades del software:

- *Presentación del EEG en la pantalla en lugar del papel*
- *Los datos clínicos del paciente y la estrategia de registro pueden ser definidos por el usuario. En ésta última hasta 20 estados funcionales y 9 marcas de eventos*
- *El registro se realiza con montaje monopolar. Fuera de línea puede ser visto hasta con 10 montajes bipolares*
- *Selección de los segmentos de EEG para el análisis cuantitativo*
- *Cálculo de "zero crossing" y diferencia de amplitud en el intervalo definido*
- *Creación del reporte normalizado para la interpretación visual del EEG*
- *Graficación de los espectros incluyendo el multivariado generalizado*
- *Cálculo del Modelo Espectral de Banda Ancha*
- *Cálculo del Modelo Espectral Xi-Alfa*
- *Normas poblacionales de regresión con la edad para todas las medidas (5 a 97 años)*
- *Mapas de transformada Z para todas las medidas (método neurométrico)*
- *Cálculo de las derivaciones de fuentes*
- *Mapas topográficos de voltaje y derivaciones de fuentes*

Posibilidades del hardware:

- *Hasta 23 amplificadores de EEG con ganancia 10 000, filtros pasabanda entre 0,3 y 30 Hz y filtro notch de 60 Hz (50 Hz), con ruido de 2 μ V (RMS)*
- *Pulso cuadrado de calibración de 10 Hz y 50 μ V (pico a pico)*
- *Convertor A/D de 12 bits con signo*
- *Microcomputadora IBM compatible XT/AT*



**PRODUCIDO Y EXPORTADO POR:
PRODUCED AND EXPORTED BY:**

Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Avenida 25 y calle 158, Cubanacán, Playa
Ciudad de La Habana, Cuba
Apartados Postales 6880 y 6990
Teléfono: 21 8066 Télex: 51 1582 CNIC CU

