

FERMENTACION DE LA PAJA DE CAÑA PRETRATADA POR TRICHODERMA VIRIDE C-9 Y T. REESEI QM-9414

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

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

Recibido: 19 de diciembre de 1986

Recibido: 6 de junio de 1988

ABSTRACT. The study of straw fermentation of sugar cane (alkaline treated), as sole carbon source and energy is presented, in liquid cultures on rotatory shaker and fermentator of 7 L capacity, with a saline medium. Fermentation studies on rotatory shaker showed an increasing sugar concentration into the supernatants cultures, with a constant pH. The quantities of total soluble carbohydrates and reducing sugars, as well as, CMC-ase and PF-ase were quite similar in both cultures of *T. viride* C-9 and *T. reesei* PF-ase activity QM-9414.

RESUMEN. Se presenta un estudio de la fermentación de la paja de caña (tratada con álcali), como única fuente de carbono y energía en cultivos líquidos, agitados en zaranda rotatoria y en fermentador de 7 L de capacidad, empleando un medio salino. Los estudios realizados en zaranda, con la fuente de carbono al 1 y 2 % respectivamente, mostraron un aumento en la concentración de azúcares solubles en los cultivos sacarificados de paja al 2 %, manteniéndose el pH constante. Las cantidades de carbohidratos totales solubles y azúcares reductores; así como la actividad CMC-asa y PF-asa fueron similares en los cultivos con *Trichoderma viride* C-9 y *T. reesei* QM-9414.

INTRODUCCION

Los países productores de azúcar aún no han estudiado exhaustivamente la amplia gama de posibilidades que ofrecen los subproductos de la caña de azúcar y a su vez, es necesario enfrentar dos problemas de carácter mundial: la alimentación humana y la búsqueda de nuevas fuentes de energía a partir de recursos renovables en períodos relativamente cortos.¹

Los primeros usos que se reportan de los subproductos de la caña son los de bagazo como combustible y para la fabricación de tableros, mieles para la producción de alcohol y para la alimentación animal. Si anteriormente se consideraba el bagazo como un estorbo, hoy día su valor se eleva sensiblemente, por lo que su potencialidad representa desde el punto de vista energético y de la industria derivada. Pero puede pensarse seriamente en el uso de los residuos agrícolas (especialmente la paja, cuya composición química no difiere ostensiblemente del bagazo), los cuales, permitirán una industria autoenergética a corto plazo.²

Por ser Cuba un país agrícola y cañero, resulta de interés la biodegradación de materiales celulósicos de la caña de azúcar para la obtención de azúcares solubles, que pueden ser utilizados por los microorganismos para la producción de etanol, biomasa, ácidos orgánicos y otros.

En este trabajo, se presentan los resultados de un estudio realizado con la paja de la caña como única fuente de carbono y energía, en cultivos líquidos con la especie fúngica *Trichoderma viride* C-9 y *T. reesei* QM-9414.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos. Se empleó una cepa de laboratorio,³ de la especie *Trichoderma viride* C-9 la cual fue comparada con *T. reesei* cepa QM-9414.

Conservación de las cepas. Fueron conservadas en medio extracto de malta-agar, incubándose durante 7 d a 28 °C, al cabo de los cuales se mantiene en refrigeración a 4 °C, resembrándose cada 60 d.

Inóculo. La inoculación se efectuó a partir de una suspensión de 10^5 a 10^7 esporas/mL, de un cultivo joven de 7 d de incubación a 28 °C, a los erlenmeyers y al fermentador. El medio salino y la fuente de carbono empleadas en los inóculos fue similar al medio de fermentación.

Medio de cultivo. El medio de cultivo empleado fue el de Mandels y col.,⁴ con paja de caña pretratada alcalinamente.⁵

Condiciones de cultivo. Los estudios en zaranda rotatoria a 120 r/min fueron realizadas en frascos erlenmeyers de 500 mL de

capacidad con 150 mL de medio líquido, incubados a 30 °C. Las corridas efectuadas en fermentador de 7 L volumen efectivo, pH 5, temperatura de 28 ° y agitación a 150 r/min, con una aireación de 0,5 vvm.

Determinaciones químicas y bioquímicas. La determinación de azúcares reductores se realizó por el método del 3-5 dinitrosalicílico.⁶ Los carbohidratos totales solubles por el fenol-sulfúrico.⁷ La determinación del crecimiento mediante proteínas de la biomasa por Biuret.⁸ La determinación cualitativa de azúcares del sobrenadante de la fermentación se realizó por cromatografía.⁹ La actividad CMC-asa se realizó según el método de Gupta y col.,¹⁰ modificado por Abín y col.,¹¹ mientras que para la actividad PF-asa fue empleado el procedimiento de Gupta y colaboradores.¹⁰ Ambas actividades celulolíticas se realizaron en el sobrenadante de los medios fermentados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Biodegradación de la paja de caña al 1 % por *Trichoderma viride* C-9

Cuando se estudiaron los cultivos empleando paja de caña pretratada al 1 % y como única fuente de carbono durante 7 d de fermentación, se alcanzó al cabo de las 24 h la mayor acumulación de carbohidratos totales solubles y azúcares reductores (0,25 y 0,18 g/L, respectivamente), decayendo sus concentraciones a partir de las 48 h con un ligero aumento al final de la fermentación.

Por otro lado, a partir de las 24 h de la actividad celulolítica CMC-asa incrementó paulatinamente hasta alcanzar 0,35 U/mL al final de la fermentación, detectándose que casi toda la fuente de carbono había sido consumida por el hongo. Sin embargo, debe tenerse presente que la lignina no fue consumida y que ésta se encontraba disminuida debido al pretratamiento alcalino cuya función es designificar parcialmente al material celulósico.⁵ La actividad celulolítica PF-asa se mantuvo por debajo de 0,1 U/mL. Debe tenerse presente que estos valores no pueden ser comparados con los reportados por otros autores que han utilizado celulosa y no paja de caña, como fuente de carbono.

El pH se mantuvo más o menos constante durante la fermentación, en parte por el efecto tampón de las sales y por lo citado por varios autores,^{4,12} en relación con el amonio. La biomasa fúngica se determinó mediante las proteínas de ésta, pues no fue posible utilizar, debido principalmente a la imposibilidad de separar dos fases sólidas: la masa micelial y las partículas de la paja de caña. En la figura 1 puede apreciarse un perfil característico obtenido con uno de los cultivos de *T. viride* C-9.

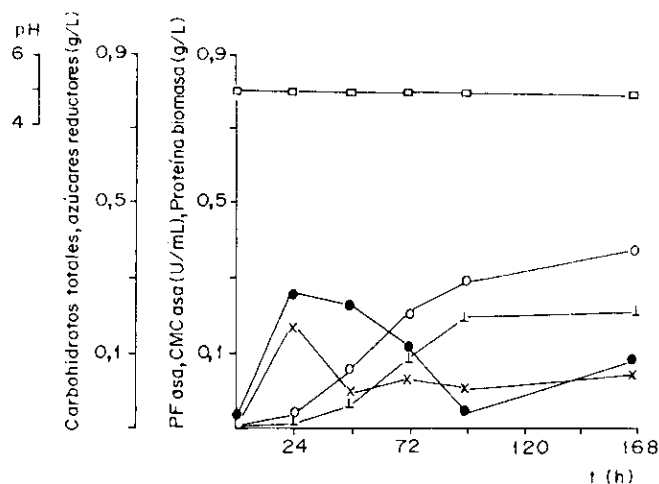


Fig. 1. Fermentación de la paja de caña pretratada con sosa y a concentración del 1 % con la especie *T. viride* C-9. \square Biomasa fúngica; \circ carbohidratos totales solubles; \times azúcares reductores; \bullet actividad CMC-asa; \blacktriangle actividad PF-asa; \square pH

El análisis cromatográfico cualitativo de licores fermentados de 24 y 48 h, contra patrones de azúcares sencillos, reveló que la mezcla de hidrólisis estaba compuesta por polímeros que avanzaron poco en el solvente a partir del punto de aplicación y por celobiosa que apareció como componente mayoritario. No se detectó glucosa (Tabla I).

TABLA I

Análisis cualitativo de azúcares por cromatografía de cultivos agitados en zaranda, con paja de caña como única fuente de carbono

(Rf)							
Xilosa	Galactosa	Glucosa	Manosa	Celobiosa	Arabinosa	24 (h)	48 (h)
0,33	0,19	0,22	0,25	0,12	0,26	0,12	0,12
0,29	0,18	0,20	0,25	0,09	0,27	0,09	0,09

Biodegradación de la paja de caña al 2 % por *Trichoderma viride* C-9

Al duplicar la concentración de la fuente de carbono (Fig. 2), se incrementó la concentración de carbohidratos totales solubles y azúcares reductores, mientras que la actividad PF-asa es solo ligeramente superior a las 24 y 48 h de fermentación, manteniéndose el pH casi constante.

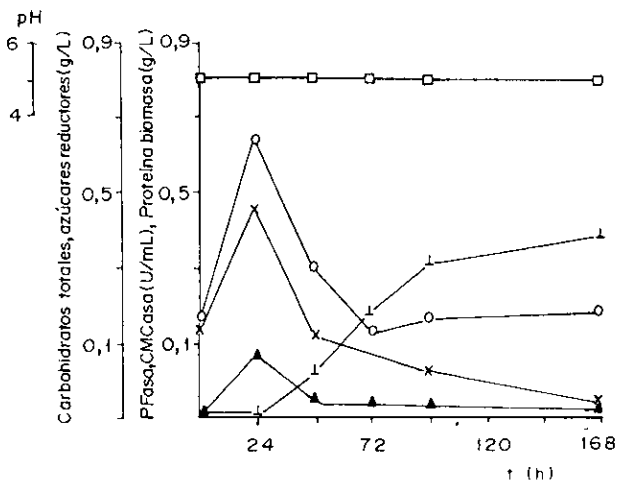


Fig. 2. Fermentación de la paja de la caña pretratada con sosa y a concentración del 2 % con la especie *T. viride* C-9. \square Biomasa fúngica; \bullet carbohidratos totales solubles; \times azúcares reductores; \circ actividad CMC-asa; \blacktriangle actividad PF-asa; \square pH

A las 24 h se alcanzaron 0,45 g/L de azúcares reductores y una actividad PF-asa de 0,1 U/mL, mientras que la actividad celulolítica CMC-asa tuvo un comportamiento similar a la fermentación anterior. En el líquido sacarificado se encontró algo de arabinosa y celobiosa en mayor proporción a las 24 y 48 h de fermentación (Tabla II).

TABLA II

Análisis cualitativo de azúcares por cromatografía de cultivos en fermentador, con paja de caña al 1 %, como fuente de carbono

(Rf)							
Xilosa	Galactosa	Glucosa	Manosa	Celobiosa	Arabinosa	24 (h)	48 (h)
0,31	0,18	0,20	0,24	0,09	0,27	0,09	0,09
0,32	0,19	0,22	0,25	0,12	0,30	0,12	0,12

Al comparar ambas fermentaciones, se pone de manifiesto que un aumento de la paja de caña de 1 a 2 %, provoca un cierto aumento en la concentración de carbohidratos totales solubles y azúcares reductores así como que las actividades celulolíticas PF-asa y CMC-asa tuvieron un comportamiento similar a la fermentación anterior. Este aumento de los carbohidratos totales solubles y azúcares reductores, no se debe tanto a un aumento de la actividad celulolítica, sino al hecho de que el cultivo se encuentra en fase de adaptación y la demanda de estos azúcares no es de consideración, teniendo en cuenta la biomasa presente a las 24 h.

Si se tiene en cuenta que el medio no fue sometido a regulación externa del pH después de inoculado, el hecho de que dicho pH se haya mantenido con cierta constancia, indica que el sustrato celulósico se metabolizó lentamente, lo cual concuerda con lo planteado por varios autores.^{4,12}

Utilización de la paja de caña al 1 % en fermentador por *T. viride* C-9

En la figura 3 se expone el perfil fermentativo de una de las experiencias realizadas en fermentador.

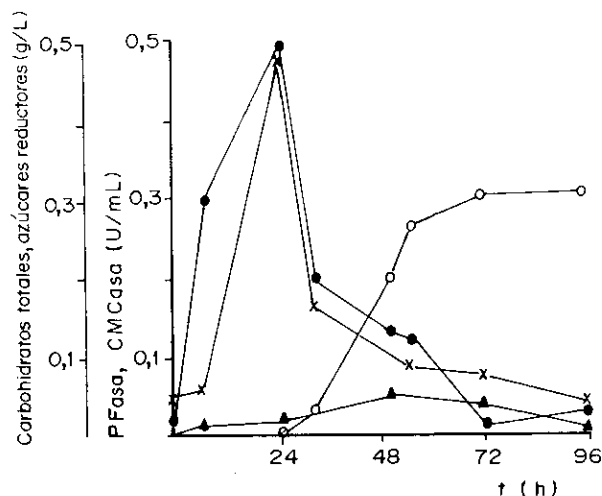


Fig. 3. Fermentación a escala de banco (7 L), de la paja de caña pretratada con sosa y a la concentración del 1 % con la especie *T. viride* C-9. \square Biomasa fúngica; \bullet carbohidratos totales solubles; \times azúcares reductores; \circ actividad CMC-asa; \blacktriangle actividad PF-asa

En esta figura se observa que a las 26 h de cultivo la concentración de carbohidratos totales solubles y azúcares reductores tuvo un máximo de 0,54 y 0,47 g/L, respectivamente; disminuyendo posteriormente hasta valores muy próximos a la concentración inicial. La actividad CMC-asa se incrementa paulatinamente hasta tomar un valor de 0,3 U/mL al final de la fermentación, mientras que la actividad PF-asa presentó valores inferiores a 0,1 U/mL.

La celobiosa también volvió a ser detectada en los cromatogramas de los sobrenadantes de la fermentación de la paja de caña (Tabla II), por lo que se considera que su presencia puede actuar como inhibidora de las celulasas.^{13,14} La glucosa no fue detectada en los sobrenadantes de los licores fermentados, lo cual significa que es consumida por el cultivo fúngico en la misma proporción en que se produce. Debe señalarse que, tanto en la especie *T. viride* como en *T. reesei* se ha reportado actividad extracelular β -glucosidasa.¹⁴⁻¹⁶

Utilización de la paja de caña al 1 % en fermentador por *T. reesei* QM-9414

Al comparar el perfil de fermentación de *T. viride* C-9 con la mutante *T. reesei* QM-9414, en las mismas condiciones de cultivo, se aprecia que *T. viride* C-9 acumuló cantidades superiores de carbohidratos totales solubles y azúcares reductores a las 24 h de fermentación (Figuras 3 y 4), siendo la actividad enzimática celulolítica ligeramente superior en cuanto a PF-asa en las primeras 48 h, no así, en cuanto a la actividad CMC-asa.

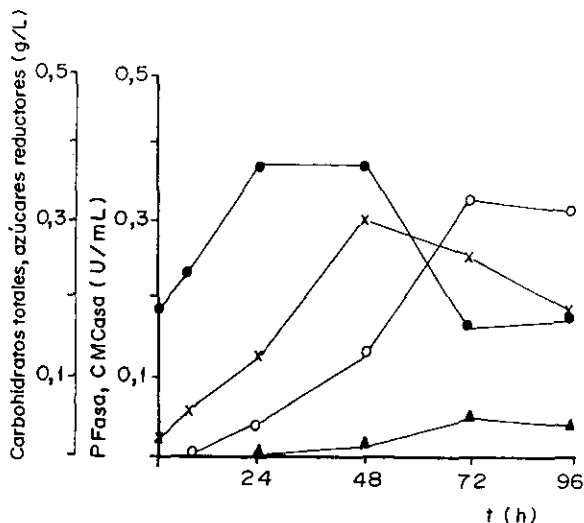


Fig. 4. Fermentación a escala de banco (7 L) de la paja de caña pretratada con sosa y a la concentración del 1 % con la especie *T. reesei* QM-9414. Δ Biomasa fúngica; \bullet carbohidratos totales solubles; \times azúcares reductores; \circ actividad CMC-asa; \blacktriangle actividad PF-asa

Puede apreciarse en la Tabla II que se detecta celobiosa en los sobrenadantes de la fermentación de *T. reesei* QM-9414. El perfil fermentativo de esta cepa, aunque bastante similar a *T. viride* C-9 en el comportamiento de las celulasas, se aprecia que la concentración, tanto de carbohidratos totales solubles como de azúcares reductores se mantiene relativamente alta hasta después de las 48 h (Fig. 4).

Si se atiende al hecho de que la cepa mutante ha sido citada por numerosos autores como superproductora de celulasas,^{16,17} con una actividad celulolítica alta en cultivos con celulosa pura; sin

embargo, en las condiciones de cultivo ensayadas, utilizando paja de caña como única fuente de carbono, tiene perfiles de fermentación muy similares, es obvio que *T. viride* C-9, es un aislamiento que promete en cuanto a sus potencialidades como biodegradador de materiales celulósicos.

CONCLUSIONES

Los perfiles fermentativos de *T. viride* C-9 y *T. reesei* QM-9414, en presencia de paja de caña como única fuente de carbono, son similares.

La mayor acumulación de los productos de hidrólisis enzimática, de tipo soluble (carbohidratos totales solubles y azúcares reductores), tuvo lugar a las 24 h de fermentación en *T. viride* C-9 y hasta las 48 h con *T. reesei* QM-9414 en paja al 2 %.

De los productos finales de la hidrólisis celulolítica fue detectada la celobiosa en todos los sobrenadantes de la fermentación y en mucha menor proporción la arabinosa.

La actividad celulolítica PF-asa y CMC-asa se comportó de modo bastante similar en *T. viride* C-9 y *T. reesei* QM-9414, en presencia de paja de caña como única fuente de carbono.

RECONOCIMIENTOS

Esta investigación fue auspiciada por la Fundación Internacional para la Ciencia (IFS), de Estocolmo, Suecia, bajo el proyecto E-687.

BIBLIOGRAFIA

1. Alfonso A. XVIII Congreso GEPLACEA, La Habana, Cuba, 1983.
2. Díaz L. XVIII Congreso GEPLACEA, La Habana, Cuba, 1983.
3. Guerra G., Abín L. y Herrera A. *Revista de Ciencias Biológicas*, 15, 17, 1984.
4. Mandels M., Sternberg D. and Andreotti E. SITRA Symposium, Hydrolysis of Cellulose, Helsinki, 1975.
5. Herrera A. y Pérez J. *Ciencias, Serie 5*, No. 17, 1976.
6. Summer J.R. and Somers G.F. Laboratory Experiment in Biological Chemistry. Academic Press Inc., New York, 1944.
7. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. *Anal. Chem.*, 28, 350, 1956.
8. Herbert D., Philips P.J. and Strang R.E. *Methods in Microbiology*, 5B, 209, 1971.
9. Menzies I.S. and Seakins J.W.T. Chromatographic and Electrophoretic Techniques 310, (ed. I. Smith) Vol. 1, 1969.
10. Gupta I.K., Das N.B. and Gupta Y.P. *Agr. Biol. Chem.*, 36, 1961, 1972.
11. Abín L., Guerra G. y Herrera A. *Revista de Ciencias Biológicas*, 14, 331, 1983.
12. Sternberg D. *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 1751, 1976.
13. Mandels M. *Am. Soc. Microbiol. News*, 47, 174, 1981.
14. Sternberg D., Vijayakumar P. and Reese E.T. *Can. J. Microbiol.*, 23, 139, 1977.
15. Tanguy S.R., Blanch H.W. and Wilke Ch.R. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1837, 1981.
16. Reese E.T., Maguire A.H. and Parrish F.W. *Can. J. Biochem.*, 46, 25, 1968.
17. Sternberg D. and Mandels G.R. *Exp. Mycology*, 6, 115, 1982.

Farmacología experimental de la drogas ansiolíticas, antipsicóticas y antidepresivas

Colectivo de autores

Se discuten los aspectos teóricos concernientes al mecanismo de acción de los ansiolíticos benzodiazepínicos y otros, las ventajas y desventajas de los métodos de tamizaje farmacológicos de estas drogas, incluyendo los conductuales, los electrofisiológicos y bioquímicos. Se discuten los principales efectos colaterales inducidos por ellas, sus características y posible etiología y las diferencias entre los neurolépticos clásicos y atípicos.