

## MONITOREO DIRECTO DE LA DEGRADACIÓN DEL BAGAZO POR MICROCALORIMETRIA

O. R. Contreras

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Caja Postal 6880, Ciudad de la Habana, Cuba.

J. C. Johnsrud and K. E. Eriksson

Swedish Forest Products Research Laboratory, Box 5604, S-11486 Stockholm, Sweden.

Recebido em 03/04/90

In the present paper the power-time curves of bagasse degraded by white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* nov. (ATCC 32629), *Phanerochaete chrysosporium* K-3 and its cellulase-less mutant 85118-6 are shown. The effect of nitrogen and glucose concentration was tested. The interpretations of the results were corroborated by utilization of the cellulase-less mutant and by trials with pure substrate (cellulose).

## INTRODUCCION

En los últimos años una gran cantidad de trabajos acerca de la degradación de materiales lignocelulósicos han sido publicados. La influencia de diversos parámetros y la selección de microorganismos son los aspectos de mayor consideración dentro de este campo. En la mayoría de los casos el esquema de fermentación en estado sólido es el modelo experimental seleccionado; lo que implica la necesidad de ejecutar una gran cantidad de análisis para conocer las modificaciones de los sustratos, los productos de las diferentes reacciones que tienen lugar y la actividad de las diferentes enzimas que participan, todo lo cual conduce a la caracterización de la acción microbiana. Con relativa frecuencia la reproducibilidad de estos resultados es baja, debido a la gran heterogeneidad y complejidad de estos sistemas.

La medición directa de las modificaciones químicas y físicas durante los procesos de Biotransformación no siempre es posible, por lo tanto resulta evidente que un método capaz de suministrar esta información sería muy útil. La aplicación de la Microcalorimetría para la caracterización de transformaciones microbianas es un ejemplo de la extensión de técnicas de base física a sistemas biológicos. La curva de potencia-tiempo (termograma) que se obtiene por este método representa el efecto neto de todos los procesos físicos y químicos que se originan en la celda de reacción<sup>1</sup>.

Algunas de las aplicaciones de la microcalorimetría en la especialidad de microbiología han incluido trabajos de clasificación bacteriana<sup>2</sup>, detección de actividad en aguas residuales<sup>3</sup>, caracterización de actividad microbiana en el suelo<sup>4</sup> y biodegradabilidad de residuos fibrosos de trigo por cultivos bacterianos mixtos<sup>5</sup>.

En el presente trabajo se muestran las curvas de potencia-tiempo, que representan la degradación del bagazo por las especies de hongos: *Sporotrichum pulverulentum* nov. (ATCC 32629), *Phanerochaete chrysosporium* K-3 y su mutante "celulasa menos" 85118-6. Se investigó el efecto de la concentración de nitrógeno y glucosa. Las interpretaciones de los resultados obtenidos fueron corroborados mediante la utilización del mutante "celulasa-menos" y mediante la ejecución de experimentos empleando sustrato puro (celulosa).

## PARTE EXPERIMENTAL

Para la ejecución de los experimentos se utilizó el Monitor de Bioactividad 2277 de la firma LKB que conforma un

Microcalorímetro Multicanal cuya sensibilidad le permite detectar diferencias de temperatura tan pequeñas como las equivalentes a 1 millionth de 1 Grado Celsius entre la celda de reacción de vidrio de 2,5 mL de volumen total.

**Inóculo.** - Se utilizaron capas de hongos blancos: *Sporotrichum pulverulentum* nov. (ATCC 32629); *Phanerochaete chrysosporium* K-3 y el mutante celulasa-menos 85118-6.

Las cepas fueron conservadas en cuñas de Agar-Malta a 10°C.

La preparación del inóculo partió de una concentración equivalente a 10<sup>6</sup> esporas/mL cultivadas a 37°C en medio Malta líquido sin agitación hasta obtener suficiente micelio (24-48 horas). El micelio se somete a la acción de un homogenizador a mediana velocidad durante 15 segundos, obteniéndose el homogenato-inoculador.

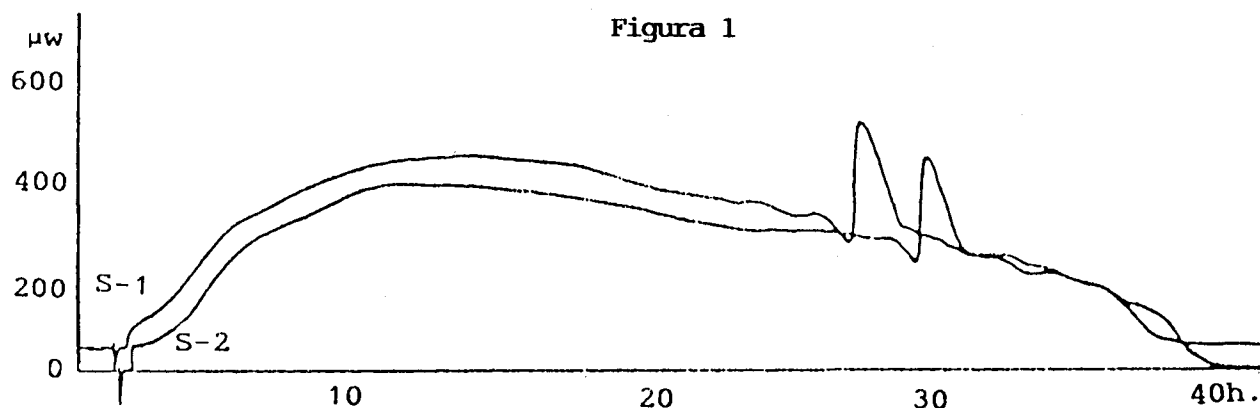
**Procedimiento.** - En la celda de reacción de 2,5 mL se añade 1,25 mL de la solución salina de Norkrands<sup>6</sup> incluyendo: dimethylsuccinato 0,15%, la fuente nitrogenada a 2,6 mM (base nitrógeno) (nivel bajo) y 26 mM (nivel alto), glucosa 0,25% y 50 mg de bagazo de caña finamente molido o celulosa de bagazo. La inoculación se ejecuta añadiendo 200 mg del homogenato micelial, que originalmente posee 0,5 mg de proteína por mL de homogenato, a continuación las celdas con sus controles (celdas no inoculadas) se ubican en posición de precalentamiento del Microcalorímetro durante 25 minutos, seguidamente a la posición lectura donde permanecen hasta concluido el experimento. La temperatura del Microcalorímetro se fijó en 37°C; el equipo se operó en dos rangos de sensibilidad: 3 y 10  $\mu$ W y la velocidad del registrador se mantuvo a 0,2 mm/min.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1 se muestran las curvas de potencia-tiempo de dos muestras idénticas, utilizadas para evaluar la reproducibilidad del sistema. La caracterización de la gráfica se realizó mediante la definición paramétrica de los eventos más importantes que la componen. Primero se calculó la velocidad máxima inicial (V.M.I.) que comprende el segmento exponencial de la gráfica resuelto por el cálculo de la pendiente (M), expresada en  $\mu$ W/min, asumiendo su relación con la velocidad específica de crecimiento del microorganismo. Después se calculó la primera altura máxima (P.A.M.) y a qué tiempo se origina, también la velocidad de decremento y el tiempo total del experimento. Los valores de las señales obtenidas (tabla 1)

TABLA 1 - Caracterización cuantitativa de la curva de potencia-tiempo para ilustrar la reproducibilidad del sistema (bagazo).

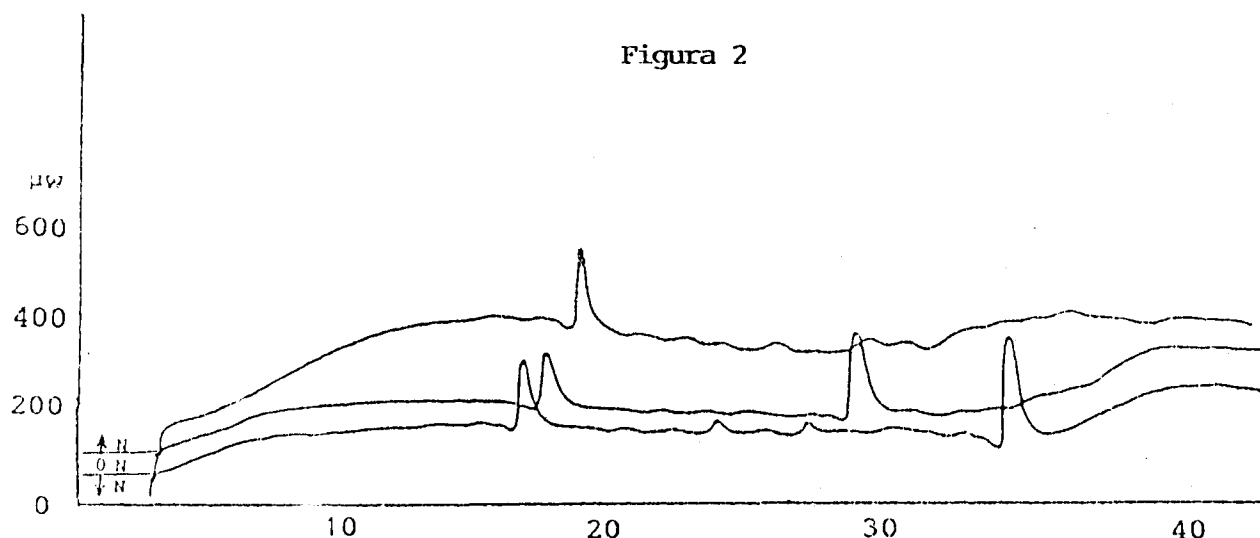
	Velocidad Máxima Inicial ( $\mu$ W/Min)	Altura Máxima ( $\mu$ W)	Tiempo (h)	Pico			Velocidad de Decrecimiento $\mu$ W/Min	Tiempo Total (h)
				Altura Max $\mu$ W	Tiempo (h)	Duración (h)		
Muestra 1	0,42	117	10,5	135	28,7	1,6	0,42	39,2
Muestra 2	0,42	118	11,5	139	26,4	1,7	0,38	37,5



fueron muy similares demostrando la buena reproducibilidad del sistema.

En la figura 2 se muestran las curvas de potencia-tiempo de muestras que no contienen fuente de nitrógeno y con bajo y alto contenido de este elemento; también se muestra el efecto de la sustitución del aire por oxígeno en la fase gaseosa

mayor velocidad de crecimiento, un comportamiento similar se observó en P.A.M. y A.M.P., todo lo cual indica fuertemente una relación entre el crecimiento fúngico y la concentración de nitrógeno en el medio. En S.A.M., se observó un incremento con relación a P.A.M., en ausencia y bajo nivel de nitrógeno, cuando se empleó alto nivel de nitrógeno el valor de S.A.M. fue elevado pero no mostró diferencias con rela-



de la celda de reacción. En presencia de oxígeno se observó una prolongación de la actividad microbiana dado por una segunda altura máxima (S.A.M.), después de obtenido el primer pico. La V.M.I. fue muy similar en ausencia de nitrógeno y en presencia de bajo nivel, mientras que el nivel alto de nitrógeno produjo un incremento de este indicador, evidenciando una

ción a P.A.M.. La diferencia en S.A.M. fue ligeramente superior en ausencia de nitrógeno en el medio en comparación con bajo nivel de nitrógeno. Este comportamiento probablemente se encuentre relacionado con las fases del metabolismo secundario características de la interacción del hongo con la lignina del sustrato (tabla 2).

TABLA 2 - Efecto de la concentración de nitrógeno sobre la curva de potencia-tiempo en la degradación de bagazo por *S. pulverulentum* nov.

	Velocidad	Altura	Tiempo	Pico			Segunda	Tiempo
	Maxima Inicial ( $\mu\text{W}/\text{Min}$ )	Maxima ( $\mu\text{W}$ )	(h)	Altura Max $\mu\text{W}$	Tiempo (h)	Duración (h)	Altura Maxima ( $\mu\text{W}$ )	(h)
No nitrógeno	0,31	170	10,8	270	13,8	1,0	275	37,1
Nitrógeno bajo	0,35	170	10,0	308	13,0	1,2	245	37,9
Nitrógeno alto	0,50	300	12,1	445	15,4	0,7	300	33,3

Es bien conocido que la biodegradación de la lignina es parte del metabolismo secundario fúngico, y que es inhibida cuando el glutamato es utilizado como fuente de nitrógeno en el medio<sup>7-8</sup>. El efecto del glutamato como fuente de nitrógeno se muestra en la figura 3. V.M.I., P.A.M. y A.M.P. fueron superiores cuando el glutamato fue utilizado. La diferencia entre S.A.M. y P.A.M. fue superior cuando una fuente inorgánica de nitrógeno fue utilizada. Además, después del inicio de S.A.M., la potencia mostró un notable decremento cuando el glutamato fue utilizado como fuente de nitrógeno. Esta diferencia ascendió hasta 80  $\mu\text{W}$  a las 40,8 horas de iniciado el experimento, comparado con la fuente de nitrógeno inorgánico (tabla 3).

En las condiciones experimentales señaladas anteriormente, los resultados detectados en S.A.M., como componente de las curvas de potencia-tiempo, muestran que la lignina y la celulosa probablemente se degradan simultáneamente (figura 3).

El incremento de la concentración de glucosa en el medio desde 0,25% hasta 1% produjo una disminución de todas las señales en las curvas potencia-tiempo (figura 4, tabla 4), aunque debemos señalar que este efecto fue mas significativo para el A.M.P.. Estos resultados pudieran ser explicados por la ocurrencia de una inhibición del complejo celulasa, teniendo en cuenta la sensibilidad de este complejo a la concentración de glucosa<sup>9</sup>.

TABLA 3 - Efecto de la sustitución de la fuente inorganica de nitrógeno por glutamato en la curva de potencia-tiempo de la degradación del bagazo por *S. pulverulentum* nov.

	Velocidad	Altura	Tiempo	Pico			Segunda	Tiempo	Potencia
	Máxima Inicial ( $\mu\text{W}/\text{Min}$ )	Máxima ( $\mu\text{W}$ )	(h)	Altura Max $\mu\text{W}$	Tiempo (h)	Duración (h)	Altura Máxima ( $\mu\text{W}$ )	(h)	a 40,8 h ( $\mu\text{W}$ )
Fuente inorganica de nitrógeno	0,55	200	8,3	588	22,2	3,4	373	30,6	270
Glutamato	0,73	250	8,3	658	21,5	3,2	380	29,4	190

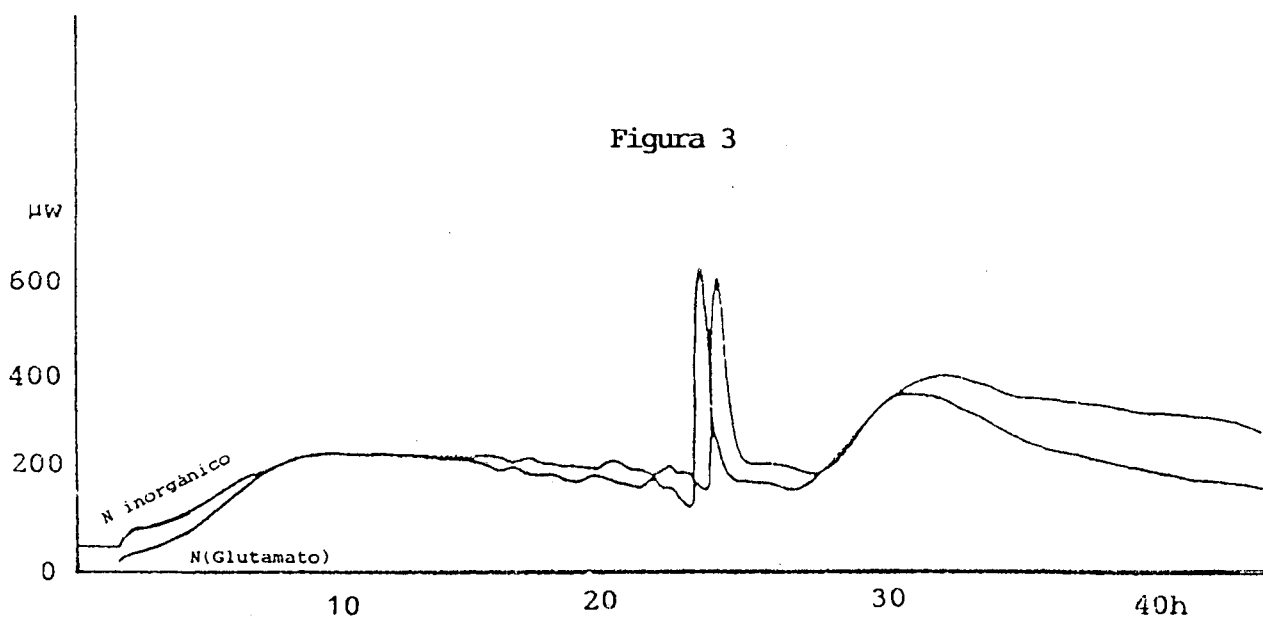


Figura 4

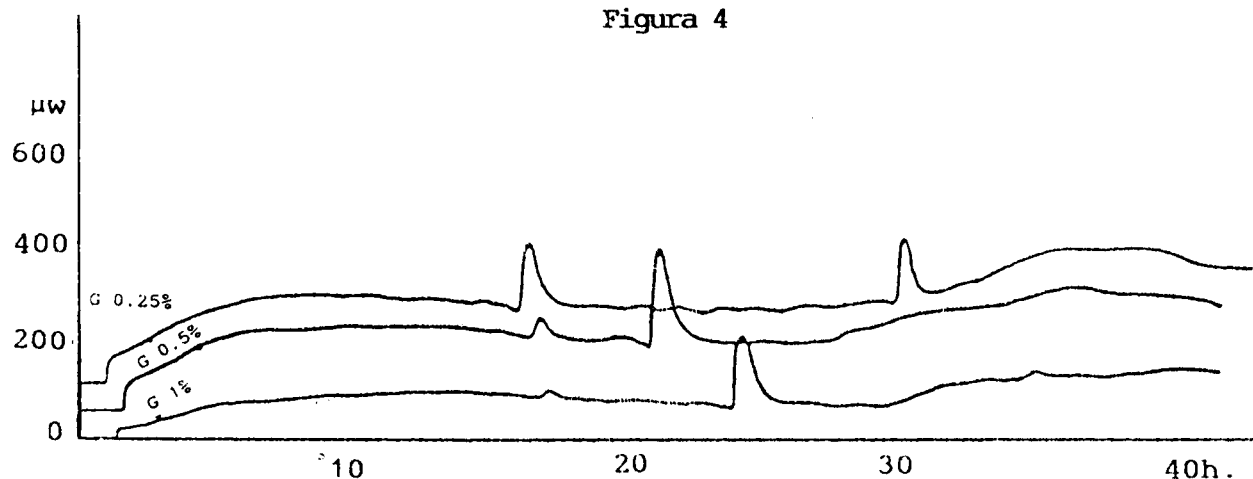


TABLA 4 - Efecto de la concentración de glucosa sobre la curva de potencia-tiempo de la degradación del bagazo por *S. pulverulentum nov.*

	Velocidad Maxima Inicial ( $\mu\text{W}/\text{Min}$ )	Altura Maxima ( $\mu\text{W}$ )	Tiempo (h)	1-Pico			2-Pico			Segunda Altura Maxima ( $\mu\text{W}$ )	Tiempo (h)
				Altura Max $\mu\text{W}$	Tiempo (h)	Duración (h)	Altura Max $\mu\text{W}$	Tiempo (h)	Duración (h)		
Glucosa 0,25%	0,55	195	7,5	308	15,2	1,4	315	28,7	0,8	290	34,4
Glucosa 0,50%	0,60	180	7,5	192	15,0	0,8	340	19,3	1,5	260	28,7
Glucosa 1,0	0,30	95	9,2	108	15,2	0,8	220	22,3	1,4	155	32,5

A los efectos de identificar la señal obtenida a partir de la degradación de la celulosa en la curva de potencia-tiempo se ejecutó un experimento de degradación de bagazo empleando la cepa *P. chrysosporium* K-3 y su mutante 85118-6 incapaz de producir el complejo celulasa (mutante "celulasa menos"). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5. Como puede apreciarse el mutante "celulasa menos" no produjo el pico comunmente observado en la degradación del bagazo.

Este resultado demuestra que la degradación de la celulosa pudiera estar relacionada con este pico. Para confirmar esta hipótesis se ejecutó un experimento bajo las mismas condiciones utilizando como sustrato celulosa obtenida a partir de bagazo de caña. A partir de los datos reflejados en la tabla 6 y figura 6 se puede apreciar que la V.M.I., P.A.M. y el tiempo en que se alcanza esta última señal, fueron muy similares para la cepa salvaje y el mutante "celulasa menos". Incluso se

TABLA 5 - Curva de potencia-tiempo de la degradación del bagazo por la cepa K3 de la especie *P. chrysosporium* y su mutante 85118-6 (nitrógeno bajo).

	Velocidad Maxima Inicial ( $\mu\text{W}/\text{Min}$ )	Altura Maxima ( $\mu\text{W}$ )	Tiempo (h)	Pico			Segunda Altura Maxima ( $\mu\text{W}$ )	Tiempo (h)
				Altura Max $\mu\text{W}$	Tiempo (h)	Duración (h)		
Cepa K3	0,40	150	6,7	293	16,7	1,4	237	30,8
85118-6	0,42	150	12,5	0	0,0	0,0	115	30,8

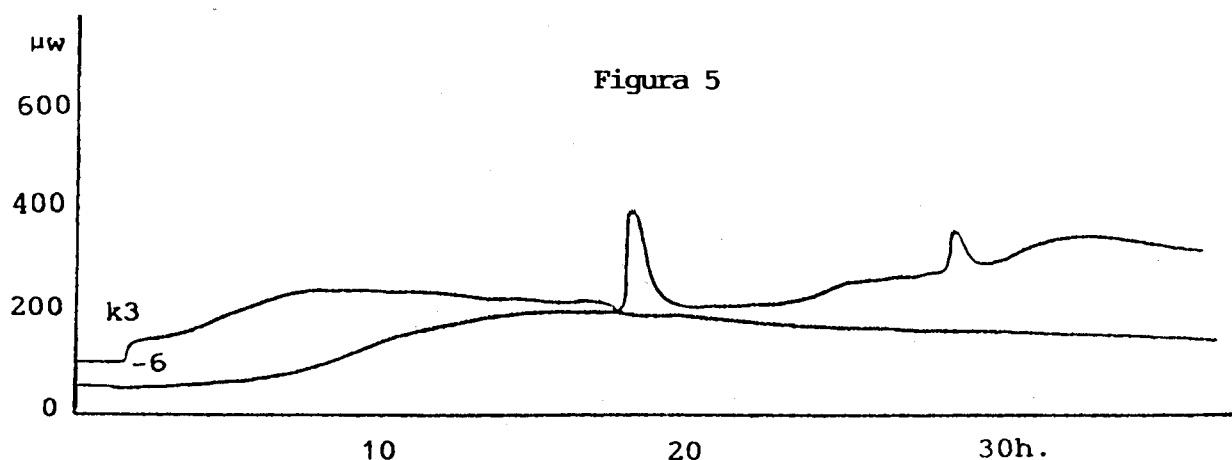
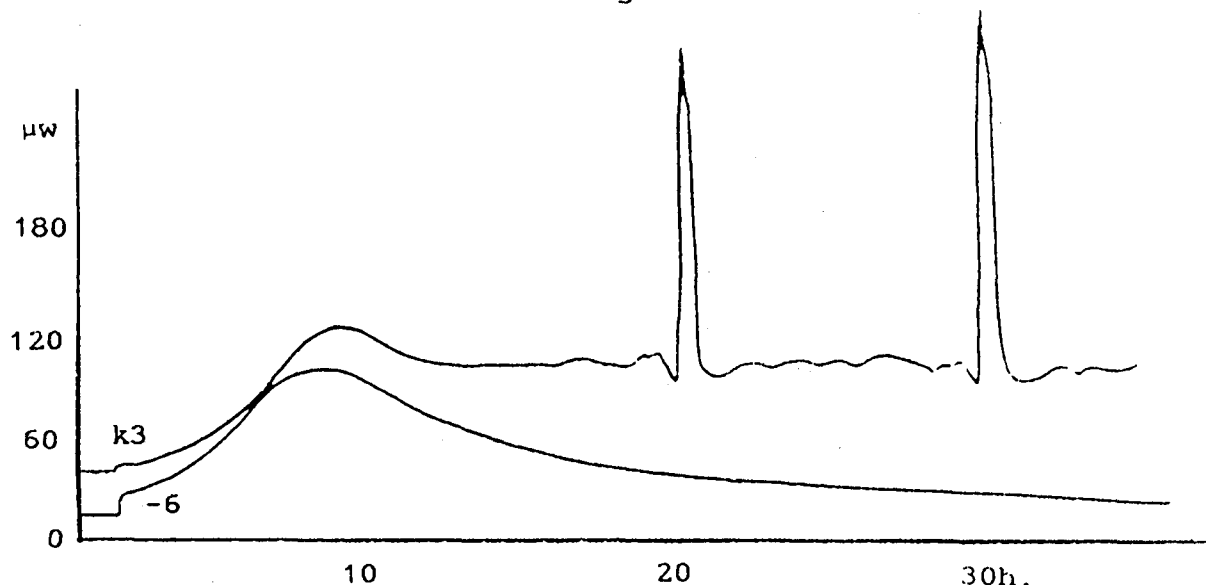


Figura 5

TABLA 6 - Curva de potencia-tiempo de la degradación de la celulosa de bagazo por la Cepa K3 de la especie *P. chrysosporium* y su mutante 85118-6 (nitrógeno bajo).

	Velocidad Maxima Inicial ( $\mu\text{W}/\text{Min}$ )	Altura Maxima ( $\mu\text{W}$ )	Tiempo (h)	1-Pico			2-Pico		
				Altura Max $\mu\text{W}$	Tiempo (h)	Duración (h)	Altura Max $\mu\text{W}$	Tiempo (h)	Duración (h)
Cepa K3	0,35	84	7,4	240	17,7	0,8	261	28,5	1,0
CEL-less-6	0,32	84	6,7	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0

Figura 6



muestra claramente que la cepa salvaje es capaz de mantener el nivel de potencia y producir 2 picos; mientras que el mutante "celulasa menos" no fue capaz de mantener la potencia después que la glucosa agregada al medio ha sido consumida, ni de producir pico alguno.

Los resultados obtenidos demuestran que el monitoreo directo de la degradación de materiales lignocelulósicos en fermentación sólida, es posible mediante la utilización de la técnica microcalorimétrica.

Los eventos fundamentales de la degradación de los componentes del bagazo se mostraron claramente y en concordancia con lo reportado por la literatura para los efectos examinados, evidenciando la posibilidad de la utilización de la técnica descrita en estudios a distintos niveles de interacción de sustratos complejos naturales y simulados; la información obtenida por esta vía posee gran importancia para su aplicación en procesos de optimización de la actividad biodegradativa y potencialmente para comprobar la efectividad de diferentes asociaciones microbianas en condiciones que se asemejan en gran medida a las que se presentan en condiciones reales.

Las ventajas que han sido mencionadas posibilitarán la obtención de una información de gran valor en la denominada

Fermentación en Estado Sólido, a nuestro entender de difícil acceso por otros métodos. Las implicaciones económicas de esta modalidad fermentativa en el futuro deberán motivar la atención de los biotecnólogos para aplicarla en diversos procedimientos tecnológicos, y en ese momento la técnica microcalorimétrica mostrará su indudable valor.

La caracterización de mutantes por este método produce una imagen muy precisa.

#### REFERENCIAS

1. Newell, R.D. (1980) "Biological Microcalorimetry". Ed. A.E. Beezer. A.P. p. 163.
2. Monk, P.; Wadso, I.; *J. Appl. Bact.* (1975) **38**, 71.
3. Redl, B.; Tiefenbrunner, F.; *Water Res.* (1981) **15**, 87.
4. Ljungholm, K. B.; Noren, B.; Wadso, I.; *Oikos* (1979) **33**, 24.
5. Fardeau, M. L.; Plasse, F.; Belaich, J. P.; *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1980) **10**, 133.
6. Eriksson, K. E.; Grunewald, A.; Vallander, L.; *Biotechnol. Bioeng.* (1980) **22**, 363.
7. Fenn, P.; Kirk, T. H.; *Arch. Microbiol.* (1981) **130**, 59.
8. Buswell, J. A.; Ander, F.; Eriksson, K. E.; *Arch. Microbiol.* (1982) **133**, 2165.
9. Eriksson, K. E.; Hamp, S.; *Eur. J. Biochem.* (1978) **90**, 183.