

## INDUCCION, EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE CELULASAS FUNGICAS CON SISTEMAS DE CULTIVO EN COLUMNA VERTICAL

María Luciana D'Anna\* y Delia Paula Alvarez

Departamento de Microbiología. Area Micología.  
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.  
Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531. Rosario (2000).  
Provincia de Santa Fe. República Argentina

**Palabras clave:** Celulasas fúngicas, cuantificación.

**Key words:** Fungal cellulases, quantification.

### RESUMEN.

Se ha desarrollado una técnica que induce la producción del complejo enzimático "celulasa" permitiendo el crecimiento de las cepas fúngicas celulolíticas sobre un soporte inerte con un flujo nutritivo unidireccional que simula su situación en el ecosistema edáfico.

El complejo enzimático liberado sobre el sustrato fue extraído a través de eluciones diarias, separado y valorado en su actividad sobre carboximetilcelulosa (B-50-I.C.I. Ltd. Cheshire - U.K.) cuantificando los metabolitos reductores originados en la hidrólisis por el método de Somodgy-Nelson.

La metodología fue aplicada a trece cepas filamentosas aisladas de suelos agrícolas de la pradera pampeana. Paralelamente se procedió a la caracterización físico-química de los suelos citados determinando pH, Aw, %N<sub>2</sub>, %C orgánico oxidable, y composición textural.

### INTRODUCCION.

Numerosos estudios apuntan a evaluar la producción de celulasas fúngicas (con preferencia: exoglucanasas, endoglucanasas, y B-glucosidasas), estimulando a las cepas con sustratos vegetales naturales, celulosas con distinto grado de sustitución, papel filtro, avicel, etc., con el propósito de mejorar la capacidad de los microorganismos para

### SUMMARY

[Introduction, extraction and quantification of fungal cellulases with culture in vertical column systems.]

It was developed a technique to induce the production of the polyenzyme-complex named "cellulase" that allows the growth of the fungal strains on an inert support that seems its situation in the edaphic ecosystem with and unidirected nutritive flow.

The polyenzyme-complex released on the substrate was extracted by dialy elutions, and it was also purified and evaluated in its activity on carboxymethylcellulose (B-50-I.C.I. Ltd. Cheshire-U.K.) testing the reductor metabolites originated in the hydrolysis by the colorimetric method of Somodgy-Nelson.

This methodology was applied to thirteen filamentous strains isolated from soils (pasture ground) of the "Pampa Húmeda".

At the same time, it was done the physic and chemical classification of the cited soils determining pH, Aw, % N<sub>2</sub>, % organic matter and textural composition.

elaborar algunas o todas las enzimas del complejo, Godden y col. (1989); Ghose & Sahai (1979); Cos-sar & Canevasceni (1989); Herr (1979); Acebal y col. (1986); Theodorov, M. y col. (1980) Stevens & Payne (1977).

La cinética y los mecanismos inhibitorios son desde hace más de una década el aspecto central, en la temática de la producción de celulasas a escala industrial, Beltrame y col. 1984.

Ecológicamente el impacto de la actividad celulolítica radica en el rol que juegan los hongos

\* Becaria del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

como recirculadores de los compuestos hidrocarbonados involucrados en el ciclo del Carbono, a través de la degradación de residuos naturales siendo comparativamente escasa la información que se tiene en la bibliografía mundial respecto de la elaboración de celulasas "in situ" (Mustafá & Sharkas, 1982), en suelos cultivables o forestales.

En referencia a esto último, y con el objeto de valorar en su habilidad como productores de endoglucanastas a algunos hongos filamentosos de alta frecuencia de aislamiento en suelos agrícolas, se ideó una técnica sencilla que consta de un sistema unidireccional e interruptor de flujo de nutrientes, con períodos de encharcamiento de 24 horas y un soporte físico simulando a los minerales algiilo-silicatados del suelo, en un intento de inducir y cuantificar la producción de celulasas, contemplando algunas de las situaciones permanentes que caracterizan a los edafocistemas de la Pampa Húmeda Argentina.

## MATERIALES Y METODOS.

### Instrumental.

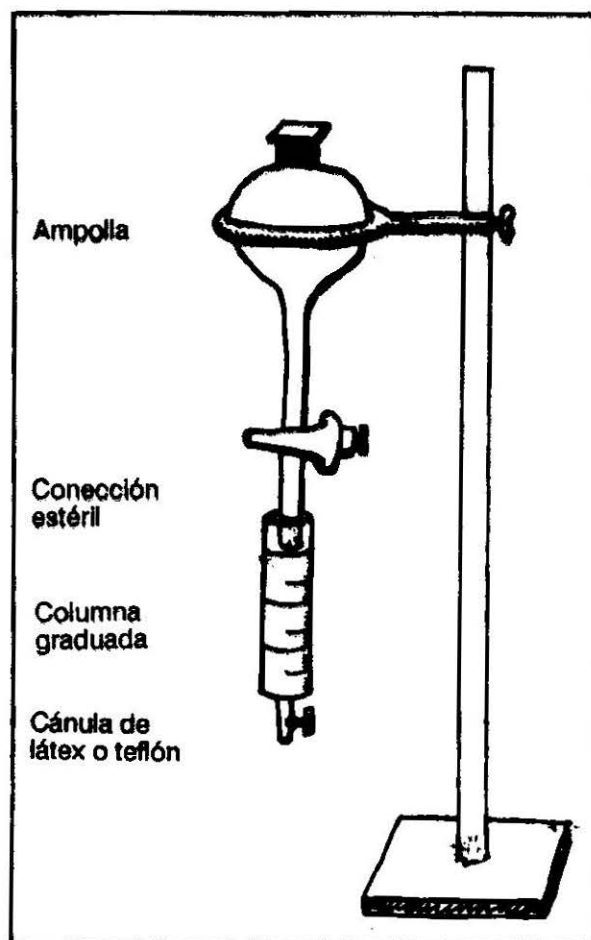
Se empleó un sistema de siembra provisto de una columna de 20 ml con una ampolla adosada a su extremo superior y un cateter de látex o teflón en el inferior, esterilizados con óxido de etileno (Figura N° 1).

La columna posee en su interior una mezcla en partes iguales de perlas y roturas de vidrio hasta cubrir tres cuartas partes del volumen con el agregado de 0,8 gr. de Carboximetilcelulosa (Grado B-50-I.C.I. Ltd. Cheshire, U.K.), asegurando su distribución homogénea entre el soporte vítreo y 5 ml de agua destilada estéril conteniendo el inóculo fúngico en una concentración de  $10 \times 10^6$  conidios por mililitro (cuantificada en cámara de Neubauer).

La ampolla, contiene medio líquido exento de fuente hidrocarbonada, con la siguiente composición en gr./l.:  $(NH_4)_2 \cdot SO_4$ , 1,400; K .  $H_2PO_4$ , 2,000; Mg .  $SO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,300; Ca .  $Cl_2$ , 0,300; Fe .  $SO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,005; Mn .  $SO_4 \cdot H_2O$ , 0,002; Zn .  $SO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,002;  $CoCl_2$ , 0,002; EDTA .  $Na_2 \cdot 2H_2O$ , 0,050; Peptona (Oxoid), 1,000; Cloromicetina, 0,005 1% de medio, pH 5,5 autoclavado 10 minutos a 120° C. en cuatro soluciones separadas a fin de evitar precipitaciones y floculaciones:

Figura N° 1

Dispositivo empleado para inducir la producción del complejo.



### Procedimiento.

La incorporación del medio nutritivo al sistema, marcó el comienzo del ensayo (Tiempo 0). Diariamente fueron eluidos 2 ml restituyéndose idéntico volumen a partir de la ampolla que lo contenía.

Cada eluato se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 15 minutos, posteriormente se ajustó el pH del sobrenadante a 4,8 y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Hidrolisis:** a fin de evaluar la actividad del complejo enzimático se colocaron 0,5 ml del líquido sobrenadante (en dilución adecuada) y 0,5 ml de solución de carboximetilcelulosa (Grado B-50-I.C.I. Ltd. Cheshire, U.K.) al 1% p/v en buffer citrato sódico (0,1 M - pH 4,8), en un baño termostatzado a  $50^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . durante 30 minutos.

**Colorimetría para metabolitos reductores.** Los productos de la hidrolisis se cuantificaron con el método de Somodgy-Nelson.

#### Cepas fúngicas.

Se utilizaron trece cepas fúngicas filamentosas aisladas en Agar-C.M.C., de suelos de pradera con cinco años de no laboreo (sin cultivo) en muestreos del horizonte  $A_{11}$  (0-10 cm).

#### Determinación de las características físico-químicas y texturales de los suelos.

Para el Carbono orgánico oxidable se empleó la técnica propuesta por Walkley-Black; Nitrógeno total determinado por el método Kjeldahl.

En la composición textural se emplearon los análisis granulométricos (modificación de la metodología de Robinson).

Tabla I  
Caracterización físico-química y textural del suelo muestreado

Característica	Composición porcentual (%)
Limo	67,8
Arcilla	21,3
Arena	10,8
Calcáreo	0,1
Materia Orgánica (MA)	6,03
C. org. (fácilmente oxidable) (MA)	2,69
Nitrógeno total (MA)	0,595
pH (MA)	6,29
$A_w$ (Actividad de agua) (MA)	0,805-0,989
Relación C/N	4,531

(media aritmética) (MA)

Determinaciones aceptadas con un grado de significación de 95% -  $p < 0,05$ .

## RESULTADO Y CONCLUSION

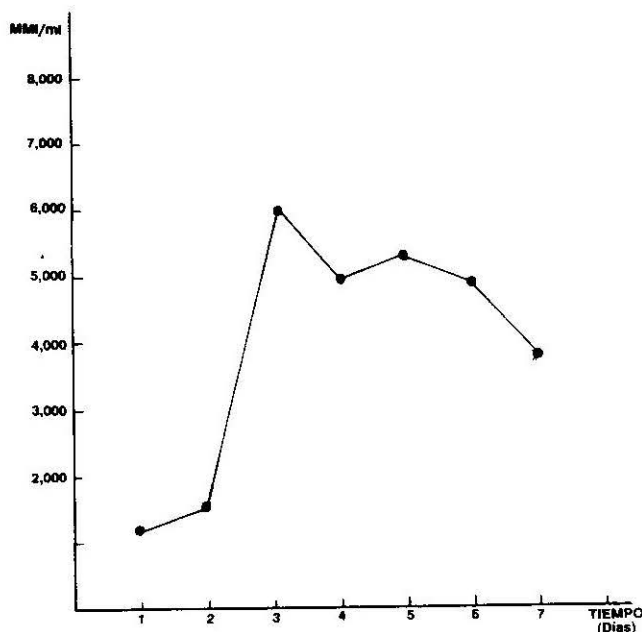
La Tabla I muestra las características físico-químicas de los suelos muestreados. De acuerdo con esos datos la naturaleza predominantemente franco-limosa constituye la textura de los suelos muestreados y es notable el porcentaje de Materia orgánica y Nitrógeno total, acorde con el historial de pastoreo de estas tierras. El pH ligeramente ácido y una  $A_w$  adecuada junto a una buena estructuración del perfil  $A_{11}$  contribuyen a calificar a esta zona como de pradera fértil.

En la Tabla II se presentan los valores de azúcares reductores (en u moles de glucosa/ml de eluato) para las cepas estudiadas.

Los comportamientos integrados de cada cepa se exponen en la Tabla II.

La cepa de *Trichoderma koningii* respondió similarmente a una curva de crecimiento típica con 24 horas de fase L.A.G.; mostró actividad homogénea diariamente y alcanzó un climax metabólico que se sostuvo aproximadamente 72 horas y decayó con lentitud hacia el final del período. Exhibió un pico productivo del orden de 5000 u moles de azúcares reductores por mililitro de eluato y una media aritmética de 3,710 (Tabla 2 y Gráfico 1).

Gráfico N° 1  
Género *Trichoderma*. Especie: *T. koningii*



Ref.: u mol/ml = micromoles de azúcares reductores detectados por mililitro de eluato centrifugado.

Tabla II

Cuantificación de metabolitos reductores resultantes de la hidrólisis. En micromoles de glucosa/ml de eluato centrifugado.

Cepas fúngicas	1	2	3	4	5	6	7	X	S
1. <i>Penicillium madriti</i> G. Smith	0,978	1,200	0,536	0,595	0,490	0,490	0,768	0,722	0,275
2. <i>Penicillium janthinellum</i> Biourge	0,704	1,616	0,454	0,992	0,277	0,383	1,046	0,777	0,476
3. <i>Trichoderma koningii</i> Oudem.	1,184	1,504	5,856	5,040	5,224	4,808	3,664	3,897	1,865
4. <i>Aspergillus terreus</i> Thom	0,700	3,292	4,396	4,066	4,726	4,286	4,506	3,710	1,404
5. <i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	1,793	2,211	2,211	1,247	1,202	1,440	1,890	1,713	0,425
6. <i>Aspergillus fumigatus</i> Fres	0,766	0,660	0,407	0,260	0,420	0,394	0,327	0,462	0,183
7. <i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht emend Sny & Hans	0,201	0,366	0,510	0,683	2,094	2,748	2,954	1,365	1,191
8. <i>Fusarium heterosporum</i> Nees	0,304	5,571	4,489	0,340	0,181	0,583	4,951	2,346	2,509
9. <i>Fusarium lateritium</i> Nees	1,257	1,092	1,808	1,422	0,982	1,841	4,176	1,797	1,100
10. <i>Fusarium tabacinum</i>	0,147	0,202	--	--	--	0,223	0,307	0,126	0,126
11. <i>Fusarium tricinatum</i> (Corda) Sacc.	0,546	0,377	0,377	0,763	0,956	0,956	1,871	0,835	0,518
12. <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	0,625	8,185	4,206	2,654	0,329	1,280	1,226	2,644	2,782
13. <i>Mucor racemosus</i> f. <i>sphaerosporus</i> (Hagen) Schipper	4,136	3,309	4,674	2,802	3,348	3,504	2,022	3,480	0,860

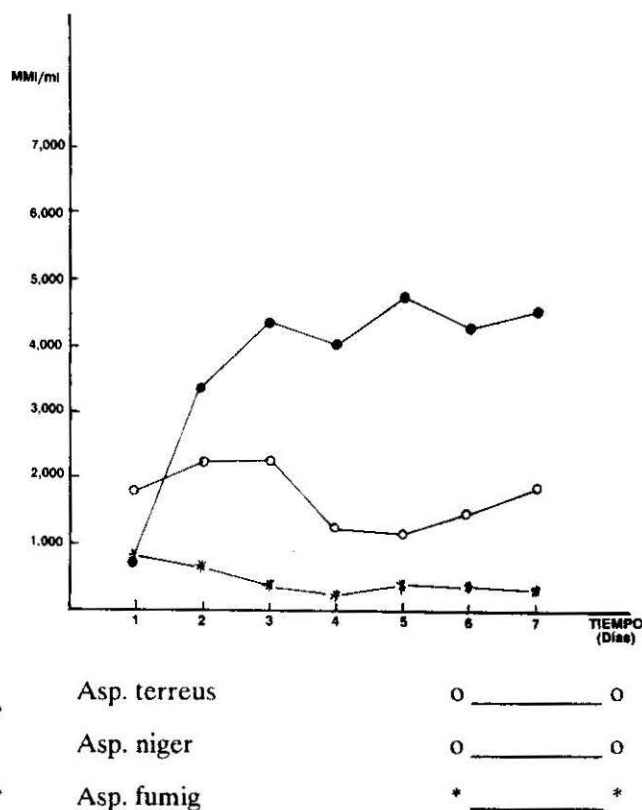
Estos resultados son comparables a los obtenidos por otros investigadores (6) (12) para este género fúngico.

Las cepas de *Fusarium* mostraron comportamientos disímiles: *F. tricinctum* y *F. oxysporum* responden a la inducción como lo hace *T. koningii* y es mencionado que *F. oxysporum* registró la mayor frecuencia de aislamiento, hallazgo que confirmaron otros autores para suelos agrícolas de la pradera pampeana (1)

*F. tabacinum* se mostró como un productor pobre en las condiciones del ensayo.

*Aspergillus terreus* fue el más activo de entre las especies de este género (*A. niger* y *A. fumigatus*) (Gráfico 2)

Gráfico Nº 2  
Género *Aspergillus*



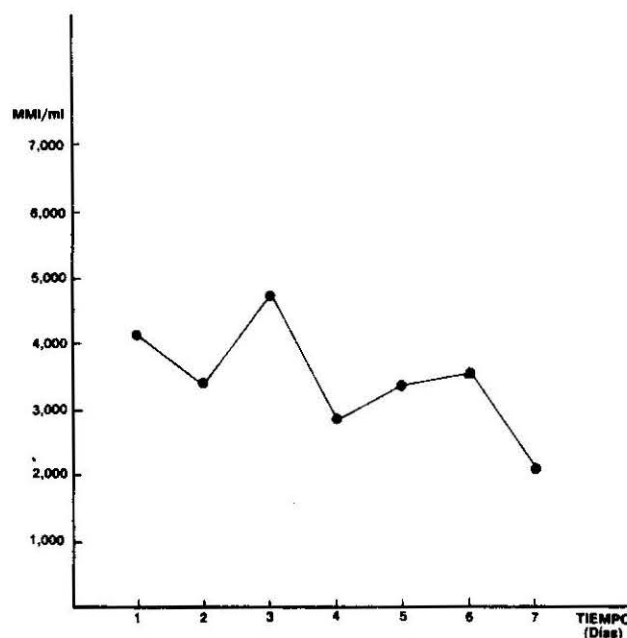
Ref.:  $\mu\text{mol/ml}$  = micromoles de azúcares reductores detectados por mililitro de eluato centrifugado.

*Mucor racemosus f. sphaerosporus* inició su actividad celulolítica aparentemente en las 24 horas de su fase de latencia de manera que al comenzar el ensayo alcanzó valores del orden de 4,000  $\mu\text{moles/ml}$  de lo que es inferible su importancia como microorganismo competidor en ecosistemas edáficos con disponibilidad celulósica (Gráfico 3).

De acuerdo a las condiciones de trabajo y los valores registrados, la producción de celulasa fue mayor que 1 micromol de glucosa/ml en el 61,5% de las hongos estudiados y mayor que 3, en el 23,1% de ellos.

Resta destacar que los resultados obtenidos son fácilmente reproducibles hecho que permite trabajar con un nivel de confiabilidad muy aceptable.

Gráfico 3  
Género *Mucor*. Especie: *M. racemosus f. sphaerosporus*



Ref.:  $\text{Mmol/ml}$  = micromoles de azúcares reductores detectados por mililitro de eluato centrifugado.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Apoyo estadístico otorgado por el Departamento de Matemáticas y Estadísticas. Asesoramiento de Graduados. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

## REFERENCIAS

1. Acebal, C.; Castillon, M.; Estrada, P.; Mata, I.; Costa, E.; Aguado, J.; Romero, D.; & Jimenez, F. (1986). Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* Q.M. 9414 on physically treated wheat straw. *App. Microbiol. Biotechnol.* 24: 218-223.
2. Beltrame, P.L.; Carniti, P.; Focher, B.; Marzetti, A.; & Sarto, V.: (1984). Enzymatic hydrolysis of cellulosic material: A kinetic Study. *Biotech. and Bioeng.* 26: 1233-1238.
3. Cabello M.N. (1983). Microflora de Suelo de la Región Interserrana (Partido de Coronel Suárez. Provincia de Buenos Aires). *Bol. Soo. Argent.* 22: 7-20.
4. Cabello M.N. (1986). Variación vertical y estacional de los hongos del suelo de la Región Interserrana. *Ciencia del Suelo.* 4: 147-154.
5. Chester C.G.C. (1974). A method for isolating soil fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 24: 352-355.
6. Cossar, D. and Canevascini, G. (1986). Cellulase Enzyme Production During Continuous Culture Growth of *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 306-310.
7. Eggins H.O.W. y G.F.Pugh (1962). Isolation of cellulosic decomposing fungi from soil. *Nature.* 193: 94-95.
8. Fisher R.A. & Yates I. (1963). *Statistical tables for biological, agricultural and medical research.* Oliver & Boyd. London. 2nd.Ed.
9. Gasoni L. y Rimolo M. (1983). Evolución de la microflora en campos anegables de la Pampa Deprimida. *Ciencia del Suelo.* 1: (2): 97-103.
10. Ghose, T. & Sahai V. (1979). Production of Cellulases by *Trichoderma reesei* Q.M.9414 in Fed-Batch and Continuous-Flow Culture with Cell Recycle. *and Bioengin.* 21, 283-296.
11. Godden, B.; Legon, T.; Helvenstein, P. and Michel P. (1989). Regulation of the Production of Hemicellulolytic and Cellulolytic Enzymes by a *Streptomyces* sp. Growing on Lignocellulose. *J.of Gen.Microb.* 135, 285-292.
12. Godeas A.M. (1983). Estudios cuali y cuantitativos de los hongos del suelo del bosque de *Nothofagus dombeyi*. *Ciencia del Suelo* 1: (1): 22-31.
13. Herr, D. (1979). Secretion of Cellulase and B-Clucosidase by *Trichoderma viride* ITCC-1433 in Submerged Culture on Different Substrates. *Biotech.and Bioeng.* 21, 1361-1371.
14. Mustafa A.F. & Sharkas M.S. (1982). Fungi associated with cellulose decomposition in the tidal mudflats of Kuwait. *Mycopathologia* 78: 185-190.
15. Norris J.R. and Ribbons D.W. (1971). *Methods in Microbiology.* 5-A.P.L. & N.Y.
16. Onions, A.H.S.; Allsopp, D. & Eggins, H.O.W. (1981). *Smith's Introduction to Industrial Mycology.* Ed. John Wiley & Sons.
17. Oso, B. (1978). The Production of cellulase by *Talaromyces emersonii*. *Mycologia:* 70: 577-585.
18. Sánchez C. (1987). Descomposición fúngica de la celulosa en un pastizal de la Pampa Deprimida. *Ciencia del Suelo* 5: (2).
19. Stevens, D.J.H. and Payne J. (1977). Cellulase and xylanase production by yeasts of the genus *Trichosporon*. *Jour. of Gen. Micr.* 100: 381-393.
20. Theodorov M.K., Basin M.J. & Trinci A.P.J. (1980). Cellulose degradation in a structure ecosystem which is analogous to soil. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 75: 445-450.