

# Enzimas lacasa en inóculos de *Pleurotus* spp

## *Laccase Enzymes in Inocula Pleurotus spp*

Dra. C. Nora García-Oduardo<sup>I</sup>, nora@cebi.uo.edu.cu, Dra. C. Rosa Catalina Bermúdez-Savón<sup>I</sup>, Lic. Iliuvis Téllez-Suarez<sup>II</sup>, Lic. Madelin Chávez-Toledano<sup>II</sup>, Dra. Isabelle Perraud- Gaime<sup>III</sup>

<sup>I</sup>Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI). Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente, Cuba; <sup>II</sup>Laboratorio Provincial de Criminalística de Santiago de Cuba, Cuba; <sup>III</sup>MBE Biotechnologie et Bioremediation. Aix-Marseille Université, FST StJérôme, IMBE, Francia

### Resumen

El cultivo de las setas comestibles-medicinales *Pleurotus* ha tenido como finalidad propiciar alternativas de manejo de subproductos agrícolas. Este basidiomiceto ha sido objeto de numerosos estudios por constituir un alimento su cuerpo fructífero, ser productor de enzimas de interés industrial y además por ser biotransformador de sustratos lignocelulósicos. Los inóculos de *Pleurotus* en la tecnología establecida para el cultivo de las setas comestibles-medicinales en la Planta de Investigación- Producción del CEBI, se han realizado, empleando sorgo o trigo. Sin embargo, es posible ampliar las posibilidades con otros sustratos. En este trabajo se presentan los resultados de producción de enzimas lacasa en inóculos preparados con, sorgo maíz y pulpa de café con dos cepas, *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3021 y *Pleurotus ostreatus*, CCEBI 3024. El periodo de preparación de los inóculos alcanza 15-21 días, las mediciones de la actividad lacasa se realizaron en períodos de siete días. La extracción del crudo enzimático se realizó en fase acuosa y la determinación de la actividad enzimática lacasa, empleando como sustrato el guayacol. Se comparan los resultados obtenidos en este trabajo con los estudios realizados anteriormente empleando el sorgo como inóculo. Se constata que las mayores producciones de lacasa se obtienen con la pulpa de café. Este estudio contribuye al conocimiento teórico y aporta alternativas para el aseguramiento del proceso productivo de la planta.

**Palabras clave:** pulpa de café, maíz, sorgo, actividad lacasa, inóculo, *Pleurotus* spp.

### Abstract

The cultivation of edible and medicinal mushrooms *Pleurotus* has been aimed at promoting alternative management for agricultural products. This basidiomicete has been the subject of numerous studies because of its fruiting body constitutes a food, being a producer of enzymes with industrial interest and for its ability of biotransformation of lignocellulosic substrates. *Pleurotus* inocula in the established technology for growing edible and medicinal mushrooms in the CEBI Research- Production Plant were performed using sorghum or wheat. However, it is possible to expand the possibilities with other substrates. In this paper, the results of laccase enzymes production in inocula prepared with sorghum, corn and coffee pulp with two strains *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3021 and *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3024 are presented. The period of preparation of seed reaches 15-21 days, the measurements of laccase activity were performed in periods of seven days. Extraction of crude enzyme was performed in aqueous phase, the determination of the laccase enzyme activity, using guaiacol as substrate. The results

obtained in this work with studies in previous work using sorghum as inocula are compared. It is found that higher yields are obtained laccase in coffee pulp. This study contributes to the theoretical knowledge and to provide alternatives for securing the production process of the plant.

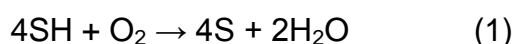
**Keywords:** coffee pulp, corn, sorghum, laccase activity, inocula, *Pleurotus* spp.

## **Introducción**

La expansión global de la agricultura y de la industria alimentaria ha hecho que se incremente la obtención de residuos lignocelulósicos. Estos materiales se componen básicamente por celulosa, hemicelulosa y lignina y son conocidos por ser excelentes sustratos para la producción de enzimas ligninolíticas. Estas enzimas extracelulares son generadas del metabolismo de hongos basidiomicetos, los cuales tienen la capacidad de producirlas y poseen aplicaciones industriales /1 /.

El género *Pleurotus* spp pertenece a los hongos basidiomicetos, son capaces de producir una extensa despolimerización-mineralización aerobia de la lignina y estructuras relacionadas, por lo que poseen la capacidad de degradar diversos compuestos, al tener un sistema enzimático ligninolítico extracelular de baja especificidad. De todas ellas, las lacasas (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioxígeno:óxido-reductasa), son las más prometedoras para actuales y futuras aplicaciones industriales; por ser producidas constitutivamente, no requerir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para su actividad catalítica, ser estables bajo diferentes condiciones, entre otras características /2 /.

Las lacasas se caracterizan por su capacidad de catalizar la reacción de reducción de oxígeno molecular a agua, acoplada a la oxidación de diferentes sustratos como pueden ser fenoles, aminas, ligninas y otros compuestos inorgánicos de acuerdo con la siguiente reacción:



Como ventaja adicional, con la presencia de mediadores las lacasas presentan una gama amplia de sustratos (S) y luego son capaces de oxidar compuestos con un potencial redox superior al propio/3 /.

Para la valoración de la producción de enzimas lacasas, se han realizado estudios en fuentes comerciales de lignina para desarrollar una actividad

enzimática óptima para degradar colorantes y otros contaminantes /4, 5, 6 /. En nuestro grupo desde hace varios años se ha trabajado para incrementar la producción de lacasas de *Pleurotus spp* por fermentación sólida de sustratos lignocelulósicos naturales, empleando diferentes estrategias experimentales. Entre las estrategias utilizadas para lograr este fin se encuentra la formulación de inóculos. El objetivo de este trabajo es la evaluación de la actividad enzimática de lacasa producida mediante el cultivo *Pleurotus spp* en fase de inóculo, empleando dos cepas en tres sustratos diferentes.

### *Materiales y métodos*

El trabajo experimental se desarrolló en los laboratorios del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) y del Laboratorio Provincial de Criminalística de Santiago de Cuba.

Se emplearon las cepas: *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3021, *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3024 (referencia), pertenecientes a la Colección de Cultivo del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Universidad de Oriente, conservadas en agar extracto de malta a 4 °C.

Los sustratos empleados: maíz, sorgo y pulpa de café, se limpiaron previamente, se hirvieron durante 15 minutos, se escurrieron y se esterilizaron en autoclave vertical BK-25 a 121 °C durante una hora. La inoculación de los sustratos se realiza en flujo laminar CBL-201-03 Cle Air, colocando una porción del hongo en el centro de cada placa Petri de 12,5 cm de diámetro. Luego estas placas se envuelven con papel cromado y se colocaron en los estantes ubicados en el cuarto de colonización. A los 7, 14 y 21 días se realizaron análisis de actividad enzimática lacasa extracelular.

Para la obtención del crudo enzimático se suspendieron 3 g de cada sustrato en 50 mL de buffer fosfato, se pone en zaranda MIZARD.2001 durante 2 h, después se filtra con gasa y el filtrado se centrifugó durante 10 min a 5 000 rpm en centrifuga clínica Heal Force. Al sobrenadante clarificado se le midió actividad enzimática lacasa extracelular.

La actividad lacasa se determinó para todas las muestras, siguiendo la oxidación del guayacol a 460nm ( $\epsilon=6740 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) en espectrofotómetro Cintra 101 en una mezcla de reacción a 30°C que contiene 1mL de guayacol con una

concentración de 20 mmol/L, 800  $\mu$ L de tampón fosfato a pH 6.4 y 200  $\mu$ L del crudo enzimático; para un volumen final del ensayo de 2mL. La actividad enzimática se expresó en Ug-1 de sustrato, una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de enzima que produce un incremento de absorbancia de 1  $\Delta$ A/min.

En cada estudio se realizaron experimentos tipos, en los cuales se procesaron 3 réplicas para cada tratamiento. Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el software Statgraphics® Centurion XV. En el caso de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos experimentales, las medias serán comparadas mediante el test de rangos múltiples de Duncan. En todos los casos se utilizará un nivel de significación del 0,05 %.

### ***Resultados y discusión***

Las lacasas extracelulares pueden ser producidas constitutivamente en pequeñas cantidades; sin embargo, la producción puede ser incrementada considerablemente por una amplia variedad de sustancias, principalmente compuestos aromáticos o fenólicos relacionados con la lignina o derivados de ella. Los granos como el maíz y el sorgo, así como la pulpa de café, contienen lignina, ellos pueden representar una forma más sencilla y barata de inducir secreción de lacasa /3 /.

Se tiene información del comportamiento de la producción de lacasas por el empleo del *Pleurotus* en paja de trigo /7/, cáscara de plátano y bagazo de caña /8, 9/, pero casi todos se refieren a la producción de esta enzima en las etapas de colonización y fructificación.

Las cinéticas de fermentación en estado sólido con *P. ostreatus* se han investigado básicamente para la caracterización en procesos de delignificación, se reportan estudios realizados sobre diferentes tipos de sustratos, entre ellos la paja con *P. ostreatus*, donde se definió que el ataque fúngico sobre la lignina y los polisacáridos, tiene como resultado un incremento en la digestibilidad del sustrato, contenido de proteínas y actividad lacasa /10/.

En la tabla 1 se muestran las actividades enzimáticas con los diferentes sustratos para la cepa CCEBI 3024. Para cada sustrato hay diferencias

significativas para cada tiempo de incubación, sin embargo con la pulpa de café se alcanzan los mayores valores, luego le sigue el sorgo y el de menor valor es el maíz. Este comportamiento es esperado, pues la composición del sorgo y el maíz, a pesar de ser semejantes, en el sorgo hay presencia de polifenoles, al igual que en la pulpa de café que también los contiene /11, 12/.

**Tabla 1**  
**Cinética de producción de lacasa de los inóculos con la cepa CCEBI 3024. (Ug<sup>-1</sup>). 10<sup>-2</sup>**

Tiempo de incubación (días)	Sustratos		
	Pulpa de café	Sorgo	Maíz
7	7,10±0,03c	3,23±0,05b	2,13±0,10c
14	11,70±0,02b	8,84±0,07a	4,14±0,10b
21	12,38±0,08a	8,73±0,10a	4,95±0,10a

Se presentan los valores promedios de tres réplicas ± la desviación estándar. Letras iguales para un mismo sustrato, refiere no existencia de diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tiempos de incubación. (α=0.05)

Solamente con el sorgo no existen diferencias entre los 14 y 21 días. Este resultado es semejante al obtenido por /13 /, en que la producción de lacasa por *Pleurotus* sobre bagazo de caña fue constante entre los 7 y los 14 días.

En la tabla 2 se presentan las actividades enzimáticas con la cepa CCEBI 3021.

**Tabla 2**  
**Cinética de producción de lacasa de los inóculos con la cepa CCEBI 3021. (Ug<sup>-1</sup>). 10<sup>-2</sup>**

Tiempo de incubación (días)	Sustratos		
	Pulpa de café	Sorgo	Maíz
7	18,34±0,60a	13,19±0,20b	17,58±0,09b
14	16,92±0,20b	5,65±0,10c	19,04±0,10a
21	14,35±0,20c	21,77±0,0a	5,01±0,02c

Se presentan los valores promedios de tres réplicas ± la desviación estándar. Letras iguales para un mismo sustrato, refiere no existencia de diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tiempos de incubación. (α=0.05)

Para cada sustrato hay diferencias significativas para cada tiempo de incubación, no se observa regularidad como con la cepa CCEBI 3024, y además es más marcado el comportamiento a la presencia de mínimos y máximos. Este resultado se corresponde a los presentados por /7/, que plantea que la excreción de enzimas al medio extracelular sigue un patrón de pulsos.

Es interesante que la tendencia es de tener mayores valores de actividad enzimática con esta cepa que con la con la CCEBI 3024.

Al realizar la comparación estadística (figura 1), se observa que la producción de lacasa es superior para todos los tiempos de incubación con la CCEBI 3021, excepto para el sorgo a los 14 días de incubación, donde es mayor para la CCEBI 3024.

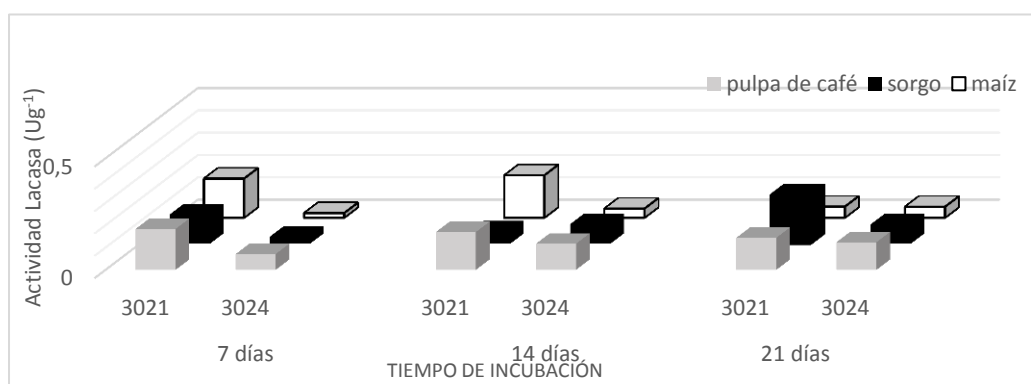


Fig.1 Comparación de la cinética de producción de lacasa con las dos cepas y los tres sustratos (Ug<sup>-1</sup>).

En estudios realizados en la producción de lacasas sobre pulpa de café, pero en la fase de fructificación /12/ se observan valores semejantes para estas dos cepas  $(7,27 \pm 0,11) \cdot 10^2 \text{ Ug}^{-1}$  para la CCEBI 3021 y  $(7,47 \pm 0,04) \cdot 10^2 \text{ Ug}^{-1}$  para la CCEBI 3024.

Los resultados muestran que los tiempos de incubación, así como los diferentes sustratos influyen en las cantidades de lacasa que se producen. Por otra parte, esto indica que es necesario continuar estudiando y profundizando en cuales son los compuestos que pueden ser inductores de lacasas /14/.

## Conclusiones

- 1. Con la cepa CCEBI 3024 se obtienen mayores valores de actividad enzimática empleando como sustrato la pulpa de café.**
- 2. Con la cepa CCEBI 3021 se obtienen mayores valores de actividad enzimática para todos los tiempos de incubación, excepto para el sorgo a los 14 días.**

**3. Los resultados indican que los tiempos de incubación, así como los diferentes sustratos influyen en las cantidades de lacasa que se producen.**

**Bibliografía**

1. GIL L M, K MANJARRES-PINZÓN., “Influencia de la adición de una fuente de nitrógeno en la producción de ligninasas”. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2012, Vol 10, núm. 1, p. 173-181.
2. BALDRIAN P., “Fungal laccases - occurrence and properties”. *FEMS Microbiol*, 2006, Vol 30, p. 215-242.
3. QUINTERO D., J. *et al.* “Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos”. *Redalyc*. 2006, Vol 13, núm.2, p. 61-67.
4. GARCÍA, T.A.M. Y TORRES, S.R.G. “Producción de enzimas ligninolíticas por basidiomicetes mediante la técnica de fermentación en sustrato solido”. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2003, Vol 5, p. 56-64.
5. RODRÍGUEZ S *et al.* “Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* con potencialidades para la decoloración de efluentes industriales”. *Rev. Mexicana de Micología*, 2006, Vol.23, p. 9-15.
6. SÁNCHEZ C. “Lignocelulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi”. *Biotechnol Adv*, 2009, Vol 27, núm. 2, p. 85-194.
7. MENDOZA G., Estudio de enzimas ligninolíticas producidas por *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* usando diferentes inductores. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Madrid, España, 2012.
8. MANJARRÉS K., *et al.* “Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña”. *Revista Lasallista de investigación*, 2010, Vol 7, núm. 2, p. 9-15.
9. MASUTTI D *et al.* “Production of enzymes from rice husk and wheat straw in solid-state fermentation”. *Chemical Engineering Transaction*. 2012, Vol 27, p. 133–138.
10. RAMÍREZ N E *et al.* “Caracterización de la lacasa por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*” *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2003, Vol 5, p. 64-72.
11. DOMANSKI C *et al.* “Composición y calidad del grano de sorgo”. *Sitio Argentino de Producción Animal*. Actualización 1997, Vol 7, p.47-50.
12. GARCÍA ODUARDO Nora. “Producción de setas comestibles y enzimas lacasas por fermentación en estado sólido de la pulpa de café con *Pleurotus spp*”. Tesis de Doctorado. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, 2008.
13. BONIFACINO BUTTIGLIONE. Silvana A. Estudios de deslignificación de bagazo de caña de azúcar para su uso en la producción de bioetanol Trabajo de Diploma de Lic en Bioquímica. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay, 2012.
14. SÁNCHEZ, J.E.; ROYSE, D.J. La Biología y el Cultivo de *Pleurotus spp*. México, D.F. Limusa. 290p, 2002 ISBN 968-18-6357-7.