

Evaluación de la producción de lacasa de *Pleurotus spp*

Evaluation of Laccase Production for Pleurotus spp

Dra. C. Nora García-Oduardo^I, norag@uo.edu.cu; Dra. C. Rosa Catalina Bermúdez-Savón^I,
Lic. Irina Castillo-Rojas^I, Dra. Isabel Perraud-Gaime^{II}, MSc. Migdalia Serrano-Alberni^I

^ICentro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI); ^{II}IMBE-Biotechnologie
et Bioremediation. Aix-Marseille Université, Francia

Resumen

El género *Pleurotus* spp. presenta un complejo multienzimático ligninolítico, dentro del cual se encuentran las lacasas (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioxígeno:óxido-reductasa). Estas forman parte del grupo enzimático llamadas oxidasas azules, que a diferencia de la mayoría, reducen el oxígeno y producen agua en lugar de peróxido. En este trabajo, se evalúa la actividad lacasa de tres cepas: *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3021, *Pleurotus ostreatus*, var. *Florida* CCEBI 3024 y *Pleurotus sajor-caju* CCEBI 3027, cultivadas sobre pulpa de café. La determinación de la actividad lacasa se realizó en las fases de inóculo y colonización. El proceso se llevó a cabo realizando la extracción acuosa del crudo enzimático, empleando como sustrato guayacol. Los resultados muestran que la cepa con mayor actividad lacasa en fase de inóculo fue la CCEBI 3024 con $5,214 \pm 0,059 \text{ Ug}^{-1}$; en la fase de colonización la cepa CCEBI 3021 con $4,512 \pm 0,479 \text{ Ug}^{-1}$.

Palabras clave: actividad lacasa, *pleurotus spp*, inóculo, colonización.

Abstract

The genus *Pleurotus* spp. presents a ligninolytic multi-enzyme complex, within which are laccases (EC 1.10.3.2, p-diphenol:dioxygen:oxidoreductase). These are part of the enzyme group called oxidases blue unlike most produce reduce oxygen and water instead of peroxide. In this work, is evaluated the laccase activity of three strains: *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3021, *Pleurotus ostreatus*, var *Florida* CCEBI 3024 and *Pleurotus sajor-caju* CCEBI 3027, cultivated on coffee pulp. Determination of laccase activity was carried out in inoculum and colonization stages. The process was carried out by conducting the aqueous extraction of crude enzyme, using guaiacol as substrate. The results show that the strain with the highest laccase activity in stage of inoculum was CCEBI 3024 with $5,214 \pm 0,059 \text{ Ug}^{-1}$; at the stage of colonization CCEBI 3021 with $4,512 \pm 0,479 \text{ Ug}^{-1}$.

Keywords: laccase activity, *pleurotus spp*, inoculum, colonization.

Introducción

Dentro de las enzimas constituyentes del complejo multienzimático ligninolítico de *Pleurotus* spp. se encuentran las lacasas (p-difenol:dioxígeno:

óxido-reductasa, EC 1.10.3.2), llamadas oxidasas azules, que a diferencia de la mayoría, reducen el oxígeno y producen agua en lugar de peróxido. Participan en la degradación de compuestos de baja masa molecular derivados de la despolimerización de la lignina como aldehídos, ácidos aromáticos e hidroquinonas. La oxidación de estas últimas posibilita la producción del anión superóxido, que junto con el peróxido de hidrógeno son los precursores del radical hidroxilo, el cual podría ser el responsable de la degradación inicial de la lignocelulosa, cuando esta no es accesible para las enzimas.

Se han atribuido tres posibles funciones a las lacasas fúngicas: formación de pigmentos, degradación de la lignina y la detoxificación. Sus capacidades son notablemente diferentes dependiendo de la fuente, número de isoformas, masa molar, pH óptimo y la especificidad para el sustrato /1/.

La importancia de este trabajo radica precisamente en el aporte al desarrollo de la biotecnología ambiental e industrial al plantear el aprovechamiento de subproductos agroindustriales como la pulpa de café, con la utilización de *Pleurotus* spp. haciendo uso de la fermentación sólida como técnica biotecnológica, para la producción de enzimas, además de alimento humano de alta calidad, alimento animal y bioabono. En el caso de la pulpa de café, es incompleta la información que se tiene acerca de la producción de enzimas en las diferentes fases del cultivo por fermentación sólida, pues se ha estudiado en la etapa de fructificación /2, 3/, por lo tanto, el objetivo de este trabajo es profundizar en el conocimiento de este aspecto, determinando la actividad lacasa en la fase de inóculo de tres cepas diferentes, así como su comportamiento en la fase de colonización, lo cual propiciaría un mejor aprovechamiento de esta tecnología, para generar productos de alto valor agregado

Materiales y métodos

El trabajo experimental se desarrolló en la planta de investigación-producción del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Se emplearon las cepas: *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3021, *Pleurotus ostreatus* var. *Florida* CCEBI 3024 (referencia) y *Pleurotus sajor-caju* CCEBI 3027, 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. Se utilizó semilla de maíz como sustrato para el inóculo y la pulpa de café *Coffea arábica*, previamente secada y almacenada para el cultivo en bolsas, cumpliendo la metodología establecida en la planta /4/.

Para la determinación de la actividad enzimática lacasa se procedió según la metodología /2/. Para la extracción de las muestras del inóculo y del cultivo colonizado, se suspendieron 3 g de cada sólido en 50 mL de buffer fosfato a pH 6,4, se pone en zaranda suavemente durante 2 h, después se filtra con una gasa y el sobrenadante se centrifugó durante 10 min a 5,000 rpm. Al sobrenadante clarificado (crudo enzimático) se le midió actividad lacasa. La actividad fue medida siguiendo la oxidación del guayacol a 460nm ($\epsilon=6740 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), en una mezcla de reacción a 30 °C que contiene 1mL de guayacol con una concentración de 20 mmol/L, 800 μL de tampón fosfato a pH 6,4 y 200 μL del crudo enzimático; para un volumen final del ensayo de 2mL. La actividad enzimática se expresó en Ug^{-1} de sustrato seco, una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de enzima que produce un incremento de absorbancia de 1 $\Delta\text{A}/\text{min}$. Para cada cepa se procesaron tres réplicas.

Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el software STATGRAPHICS *Plus*TM 5.1 (versión abril 2002). 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

La fase de inóculo, la cual se refiere a cultivo en semilla soporte, tuvo una duración de dieciocho días, la cepa CCEBI 3021 presentó un buen desarrollo del crecimiento micelial, al igual que la cepa CCEBI 3024; al respecto la CCEBI 3027 presentó un desarrollo lento, pero logró completar la fase al invadir toda la semilla soporte. Es necesario señalar que el soporte empleado para la preparación del inóculo fue semilla de maíz, en otros trabajos se han empleado semillas de trigo/2/, sorgo/5/. Ante tal condición, todas las cepas

colonizaron el sustrato, lo que evidencia que esta semilla también puede ser empleada con buenos resultados.

Las cepas estudiadas fueron escogidas por sus potencialidades para la excreción de enzimas lacasas /2, 6, 7/. La fermentación en estado sólido se realizó con las cepas CCEBI 3021, 3024 y 3027. La cepa de referencia, CCEBI 3024, ha sido estudiada para decolorar los efluentes vinaza de destilería y el extracto líquido obtenido de la pasteurización de la pulpa de café, reportándose valores de actividad lacasa de $8,53 \pm 0,73 \text{ U mL}^{-1}$, a los nueve días de cultivo sobre este último residual /7/.

En este trabajo se realizaron determinaciones de actividad lacasa en diferentes fases del proceso de cultivo. Se obtuvo que la cepa con mayor actividad lacasa en inóculo fue la cepa CCEBI 3024, con valor de $5,214 \text{ Ug}^{-1}$, muy similar a la CCEBI 3027 ($5,016 \text{ Ug}^{-1}$), pero estadísticamente diferentes y superiores a la 3021 ($3,846 \text{ Ug}^{-1}$). Por primera vez se refiere la determinación de la actividad lacasa a nivel de inóculo. Ver tabla 1. En ella se presentan los valores promedios de tres réplicas \pm la desviación estándar. Letras iguales para un mismo parámetro, refiere no existencia de diferencias estadísticas significativas entre las medias de las cepas. ($\alpha=0,05$).

Tabla 1
Actividad lacasa de *Pleurotus* spp. sobre pulpa de café en fase de inóculo y colonización (Ug^{-1})

Cepas	Inóculo (18 días)	Colonización (44 días)
CCEBI3021	$3,846 \pm 0,075^c$	$4,512 \pm 0,479^b$
CCEBI 3024	$5,214 \pm 0,059^a$	$0,162 \pm 0,054^a$
CCEBI 3027	$5,016 \pm 0,135^b$	$0,294 \pm 0,074^a$

En la fase de colonización, que se extendió por 44 días, se observa que la cepa CCEBI 3021 posee la mayor actividad lacasa ($4,512 \text{ Ug}^{-1}$). Para el caso de las cepas CCEBI 3024 y CCEBI 3027 se obtuvieron valores poco significativos ($0,162$ y $0,294 \text{ Ug}^{-1}$, respectivamente) los que pudieron haberse dado por la lenta colonización del hongo. En estudio cinético usando columnas de Raimbault /2/, se plantea que otra cepa de la Colección de Cultivos, la cepa CCEBI 3023, presentó el mayor valor de actividad lacasa, 25 Ug^{-1} , al cuarto

día de cultivo, sin embargo ésta presenta los menores valores de biomasa micelial.

En estudios realizados /6/, se plantea que la excreción de enzimas al medio extracelular sigue un patrón de pulsos, a partir del día 8 se produce un gran pico de producción, seguido de un descenso a partir del día 12 y un incremento nuevamente a los 24 días. Sin embargo, hay autores que plantean que los valores de actividad enzimática pueden estar influenciados por la adición de agua fresca y la mezcla para el muestreo /8/. Sería interesante para el futuro, realizar este estudio para cada fase a intervalos de tiempo menores, por ejemplo, determinando la actividad enzimática cada 7 días.

Conclusiones

- 1. Por primera vez se determina actividad lacasa en la fase de inóculo, mostrando superioridad la cepa CCEBI 3024 con $5,214 \text{ Ug}^{-1}$.**
- 2. En la fase de colonización, la cepa la CCEBI 3021 superó a la CCEBI 3024, con un valor de actividad enzimática de $4,512 \text{ Ug}^{-1}$.**

Bibliografía

1. KANT, K.; CHANDER, R. "Laccase enzyme revisited and function redefined". *Indian J. Microbiol.* vol. 48, 2008, pp. 309-316.
2. 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.
3. MAYER, A.; STAPLES, M. "Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*", vol. 60, 2002, pp. 51-565.
4. BERMÚDEZ SAVÓN, Rosa C.; GARCÍA, N. "Cultivo de setas comestibles (*Pleurotus*) en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Cuba". En: D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora (Eds). *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. México: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales: Producción, Desarrollo y Consumo. Colegio de Posgraduados, pp. 489-512, 2010.
5. SÁNCHEZ, J.E.; ROYSE, D.J. *La Biología y el Cultivo de Pleurotus spp*. México, D.F.Limusa. p. 290, 2002 ISBN 968-18-6357-7.

6. MENDOZA, G. “Estudio de enzimas ligninolíticas producidas por *Pleurotus ostreatus* y *Lentinula edodes* usando diferentes inductores”. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Madrid, 2012.
7. RODRÍGUEZ PÉREZ, Suyén. “Decoloración de los residuales de la pasteurización de la pulpa de café y la vinaza por *Pleurotus* spp. Tesis de Doctorado. CEBI. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba, 2006.
8. MASUTTI, D. *et al.* Production of enzymes from rice husk and wheat straw in solid-state fermentation. *Chemical Engineering Transaction*, vol. 27, 2012, pp. 133–138.