

## POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LA PULPA DE CAFÉ PARA PRODUCIR ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS POR FES

Nora García Oduardo, Rosa Catalina Bermúdez Savón, Suyén Rodríguez Pérez, Isabel Arellis Aguilera Rodríguez, Ansoumane Kourouma  
Centro de Estudio de Biotecnología Industrial (CEBI)

*Se evalúa el potencial biotecnológico de la pulpa de café como sustrato para la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares por fermentación en estado sólido (FES), empleando cinco cepas Pleurotus ostreatus y una Pleurotus sajor-caju, una vez terminada la etapa de fructificación y sin afectar la producción de setas comestibles. Se detectó mayor presencia de enzima lacasa, aportando la cepa Pleurotus ostreatus CCEBI 3023 la mayor cantidad de esta enzima (0,139 U g<sup>-1</sup>). Se evalúa la influencia de la mezcla (1:1) pulpa de café con la viruta de madera y con las cáscaras de cacao y coco, observándose que la pulpa induce la producción de la enzima lacasa extracelular al obtenerse la máxima actividad (1,745 U g<sup>-1</sup>) a los 60 días de fermentación con la cepa Pleurotus ostreatus CCEBI 3023. Se comparan los resultados obtenidos en este trabajo con los estudios realizados durante la etapa vegetativa de Pleurotus ostreatus CCEBI 3023 empleando pulpa de café y con los obtenidos en la producción de lacasa de Pleurotus sp. por fermentación sumergida.*

**Palabras clave:** fermentación en estado sólido (FES), pulpa de café, enzimas ligninolíticas.

*Biotechnological potential of coffee pulp as substrate for extracellular ligninolytic enzyme production by solid state fermentation (SSF) using five of Pleurotus ostreatus strains and one Pleurotus sajor-caju strain, after fructification state without mushrooms productions affectation. Maximum laccase production was detected and Pleurotus ostreatus CCEBI 3023 showed a higher laccase activity (0,139 U g<sup>-1</sup>). Influence of mixture (1:1) coffee pulp whit cedar chip, coconut and cocoa shell in the laccase production was evaluated. The coffee pulp induced extracellular laccase enzyme production because whit this substrate the maximum laccase activity was obtained (1,745 U g<sup>-1</sup>) at 60 days of fermentation whit Pleurotus ostreatus CCEBI 3023 strain. The results of this investigation were compared whit the study realized in vegetative state of Pleurotus ostreatus CCEBI 3023 using coffee pulp and whit laccase production of Pleurotus sp. by submerged fermentation.*

**Key words:** solid state fermentation (SSF), coffee pulp, ligninolytic enzyme.

### Introducción

El café es uno de los principales productos de origen agrícola comercializados en los mercados internacionales. Es la segunda materia prima más comercializada en el mundo, sólo detrás del petróleo. Se estima que la producción mundial del año sea de 127 millones de sacos /1/.

El cultivo del café en las zonas montañosas es el 85 % del total que se cultiva en Cuba y en su beneficiado por vía húmeda se generan subproductos: pulpa, mucílago, pergamino, jugo, agua de lavados, etcétera. Se demostró por Bermúdez /2/ que estos subproductos no son completamente aprovechados y se vierten al medio sin tratamiento, lo cual provoca contaminación de aguas y suelos deteriorando el medio ambiente.

La pulpa de café representa el 40 % de todo el grano que se despulpa, por su composición química rica en azúcares, presenta potencialidades que son atractivas para ser empleadas como materia prima en diferentes procesos o tecnologías de FES como son: producción de bioabono, producción de biogás, alimento animal, y como sustrato puro o mezclado en la producción de setas comestibles. Estas tecnologías permiten utilizar un sustrato disponible y barato, eliminar la contaminación y a su vez generar beneficios en el orden económico, social y ambiental /3/.

La pulpa de café también contiene compuestos con efectos antifisiológicos como la cafeína y anti-nutricionales como los taninos y los polifenoles /4/, para la degradación de estos se estudian mecanismos enzimáticos, aprovechando la capacidad de los basidiomicetos /5/.

Al igual que la pulpa de café, subproductos agrícolas como la viruta de madera las cáscaras de cacao y coco son empleados como sustratos naturales en FES, reportándose fundamentalmente como materias primas para la producción de setas comestibles /6/ por su composición de lignina, celulosa, hemicelulosa y otros. Actualmente no existe ningún tratamiento para estos subproductos y su disposición final en el terreno de cultivo trae aparejado descomposición. El monto de estos subproductos no se equipara con el de la pulpa de café, pero pudiera ser provechosa su valorización por FES.

Entre los microorganismos estudiados y empleados para la biotransformación de los compuestos antes mencionados y a la vez producir setas comestibles dándole valor a la pulpa de café; está el *Pleurotus* sp. 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 /7/.

En los mecanismos ligninolíticos de *Pleurotus* spp., la enzima lacasa juega un papel importante en la biodegradación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas /8/. Los estudios realizados se dirigen hacia la producción de esta enzima extracelular empleando cultivos líquidos /9/ siendo escasos los estudios de la producción de esta enzima por FES. Recientemente están los trabajos de Mata /10/ con *Pleurotus* spp. como productor de lacasa en pulpa de café. También con este hongo se obtuvieron cantidades significativas de estas fenoxidasas y sus isoformas, durante la eliminación del color del líquido residual de la pasteurización de la pulpa de café /9/.

En el presente trabajo, el objetivo es evaluar el potencial biotecnológico de la pulpa de café como sustrato para la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares por fermentación en estado sólido (FES) empleando *Pleurotus* spp.

## Materiales y métodos

Cepas. Seis cepas de *Pleurotus* spp. fueron estudiadas: *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm CCEBI 3021; *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3022, CCEBI 3023 y CCEBI 3025; *Pleurotus ostreatus* (Florida) CCEBI 3024 (referencia) y *Pleurotus*

*sajor-caju* (Fr.) Sing CCEBI 3027; pertenecientes a la colección de cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente. Las cepas fueron conservadas en agar papa dextrosa y se incubaron a 25°C.

Sustratos. Pulpa de café (*Coffea arábica* L.) procedente del centro de beneficio húmedo “El Ramón” en el municipio Santiago de Cuba; cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), del cacaotal de la finca “La Mandarina” en el municipio III Frente; cáscaras de coco (*Cocos nucifera*, Lin.), de la zona de El Cristo y viruta de cedro (*Teona ciliata* Roem), de la carpintería de la Universidad de Oriente. Todos procedentes de la provincia Santiago de Cuba.

Se realizó el estudio sobre los sustratos puros y sus formulaciones binarias (1:1) empleando bolsas de polietileno transparentes (2 Kg) como biorreactor. El tiempo de fermentación fue de 60 días /7/.

## Determinación de la actividad enzimática ligninolítica de las cepas estudiadas en pulpa de café

La pulpa fermentada fue sometida a extracción sobre hielo con diferentes tampones para las determinaciones enzimáticas. Para la actividad lacasa se empleó el guayacol como sustrato /9/; para la actividad manganeso peroxidasa se siguió el método de Pick y Keisare /11/ con modificaciones /9/ y para la actividad versátil peroxidasa se emplearon las mismas condiciones que para la anterior, pero en ausencia de  $MnSO_4$ .

## Determinación de la actividad lacasa en las mezclas de sustratos

Se determinó empleando el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) a pH 3, 30°C. La oxidación del ABTS se siguió a través del incremento de la absorbancia a 420 nm. La actividad enzimática se expresó en  $U\ g^{-1}$  de sustrato seco y se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu$ mol de ABTS oxidado, en un minuto bajo las condiciones especificadas /12/.

---

## Tratamiento estadístico de los resultados

Para las comparaciones de las medias de los tratamientos a posteriori se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan. Se utilizó el paquete informático Statgraphics Plus versión 5,1/Abril 2002 y todas las pruebas se realizaron con el criterio que define la significación estadística de tipo 1,  $p < 0,05$ .

## Resultados y discusión

### Evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de las cepas estudiadas en pulpa de café

Conociendo que los hongos de pudrición blanca son el único grupo de microorganismos capaces degradar de todos los polímeros básicos de la madera, debido a la capacidad de sintetizar enzimas extracelulares ligninolíticas, responsables de la degradación de los mayores componentes del sustrato, dígase celulosa, hemicelulosa y lignina, a compuestos de bajo peso molecular, que pueden ser asimilados para la nutrición fúngica /13/, se realizó la evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de la pulpa fermentada.

Se observa en todo momento mayor actividad de enzima lacasa que manganeso peroxidasa y versátil peroxidasa (tabla 1), lo que podría estar dado porque aún cuando la pulpa de café contiene compuestos fenólicos propicios para inducir estas enzimas, para la actividad efectiva de las

peroxidases se requiere de  $H_2O_2$  como cofactor; lo que presupone la participación de otras enzimas auxiliares para la producción extra e intracelular de  $H_2O_2$  /14/.

En la tabla 1 se reflejan los valores promedios de tres réplicas y su desviación estándar. Las letras iguales para una misma actividad enzimática, refiere no existencia de diferencias estadísticas significativas entre las medias de las cepas (Prueba de Duncan,  $p < 0,05$ ).

Un comportamiento similar se refiere para *Pleurotus ostreatus* cultivado en paja de trigo y en cultivo líquido sintético, planteándose la diferencia entre los mecanismos para la degradación de la lignina por las lacasas y las peroxidases, no estando aún del todo claro el rol de las primeras en la degradación /14, 15/.

Comparando el comportamiento productivo de setas comestibles de las seis cepas estudiadas y su relación con excreción de la enzima lacasa es notorio que las cepas más productoras de setas, CCEBI 3027 y CCEBI 3021 /6/, no fueran las de mayor actividad lacasa (0,0843 y 0,0727  $U \cdot g^{-1}$ , respectivamente). Se refiere /10/ que la actividad lacasa disminuye drásticamente durante la formación y desarrollo de las fructificaciones, las cepas con menor actividad lacasa, correspondientes a la especie *Pleurotus djamor*, presentaron las eficiencias biológicas más altas. Se sugiere que el monitoreo de la enzima lacasa durante la fase de colonización pudiera estimar la cantidad biomasa (setas) en la fructificación /16/.

Tabla 1  
Actividades enzimáticas lacasa, manganeso peroxidasa y versátil peroxidasa de las cepas de *Pleurotus* spp. luego de 60 días de cultivo sobre pulpa de café

Cepas	Actividad enzimática ( $10^2$ ) $Ug^{-1}$ sustrato seco		
	Lacasa	Manganeso peroxidasa	Versátil peroxidasa
CCEBI 3021	7,27±0,11 <sup>a</sup>	2,86±0,31 <sup>b</sup>	4,77±0,08 <sup>a</sup>
CCEBI 3022	9,60±0,25 <sup>c</sup>	3,58±0,31 <sup>b</sup>	8,65±0,08 <sup>a</sup>
CCEBI 3023	13,97±0,41 <sup>d</sup>	5,89±0,31 <sup>c</sup>	8,68±0,08 <sup>a</sup>
CCEBI 3024	7,47±0,04 <sup>a</sup>	2,5±0,31 <sup>a</sup>	5,60±0,08 <sup>c</sup>
CCEBI 3025	7,57±0,04 <sup>a</sup>	3,64±0,31 <sup>b</sup>	5,10±0,08 <sup>b</sup>
CCEBI 3027	8,43±0,01 <sup>b</sup>	6,75±0,31 <sup>c</sup>	6,58±0,08 <sup>d</sup>

Se reflejan los valores promedios de tres réplicas  $\pm$  la desviación estándar. Letras iguales para una misma actividad enzimática, refiere no existencia de diferencias estadísticas significativas entre las medias de las cepas (Prueba de Duncan,  $p < 0,05$ ).

Todo esto corrobora la alta relación entre la cantidad de biomasa de los hongos y la producción de enzima lacasa y se evalúa la producción de ésta durante la fermentación en estado sólido de la pulpa de café mezclada, teniendo presente que es la cepa CCEBI 3023 la que presenta el mayor valor de actividad lacasa ( $0,1397 U g^{-1}$ ).

#### Evaluación de la actividad enzimática lacasa de *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3023 sobre las mezclas de sustratos

Al evaluar la presencia de enzima lacasa extracelular en la pulpa de café mezclada y fermentada por la cepa CCEBI 3023, una vez cosechadas las setas (60 días de fermentación) se evidencia que la pulpa de café favorece la producción de enzimas lacasas, al ser superiores los valores de producción de esta enzima en la pulpa de café pura que en la mezclada (tabla 2).

Tabla 2  
Producción de enzima lacasa por *Pleurotus ostreatus*, cepa CCEBI 3023, sobre pulpa de café al 100 % y mezclada luego de 60 días de cultivo

Sustratos	Actividad lacasa ( $Ug^{-1}$ )
Pulpa de café	1,745±0,013 <sup>d</sup>
Pulpa de café : cáscara de cacao	1,234±0,004 <sup>c</sup>
Pulpa de café : cáscara de coco	0,447±0,016 <sup>b</sup>
Pulpa de café : viruta de cedro	0,308±0,036 <sup>a</sup>

Se reflejan los valores promedios de tres réplicas  $\pm$  la desviación estándar. Letras iguales para la actividad lacasa, refiere no existen-

cia de diferencias estadísticas significativas entre las medias de las cepas: sustratos (Prueba de Duncan,  $p < 0,05$ ).

Por primera vez se refiere la producción de la enzima lacasa durante la etapa de fructificación del *Pleurotus spp.* crecido sobre mezclas de sustratos lignocelulósicos y mediante fermentación en estado sólido, además se observa la influencia del contenido de nitrógeno del sustrato en la producción de esta enzima, ya que la mezcla con viruta es la de menor contenido de nitrógeno, según se refiere en trabajos anteriores /7/.

Comparando los valores obtenidos de enzima lacasa para la pulpa de café pura (0,139 Ug<sup>-1</sup> tabla 1 y 1,745 Ug<sup>-1</sup> tabla 2) se observa que existe una diferencia de 1,6 unidades, varios autores refieren diferencias de actividad lacasa para diferentes sustratos de ensayo, en el primero fue guayacol y en el segundo fue ABTS /17/.

Al estudiar la actividad lacasa durante la etapa vegetativa de *Pleurotus* empleando las columnas de vidrio Raimbault, la cepa CCEBI 3023 expresó el valor mayor (25,1 Ug<sup>-1</sup>), superior a la cepa de referencia, CCEBI 3024, (17,9 Ug<sup>-1</sup>). Los máximos valores de actividad se lograron entre el cuarto y quinto día de fermentación /6/.

Estudios sobre actividad lacasa de *Pleurotus ostreatus* (Florida), CCEBI 3024 (referencia), empleando bolsas de polietileno transparentes (250g) como biorreactor y evaluando cada siete días el comportamiento de la enzima, se obtuvo un máximo de 2,41 Ug<sup>-1</sup> a los 14 días de cultivo /18/. Esta misma cepa se empleó en la decoloración del extracto líquido obtenido de la pasteurización de la pulpa de café, reportándose valores de actividad lacasa de 8,53 UmL<sup>-1</sup>, a los nueve días de cultivo /9/.

La diferencia entre la pulpa de café que se emplea en los biorreactores de bolsas de polietileno y la pulpa de café en las columnas Raimbault esta en el método de tratamiento utilizado, la primera es pasteurizada (inmersión en agua caliente durante una hora) y pierde muchos compuestos solubles; la segunda es esterilizada 121°C durante 20 min y se mantienen en mayor concentración los compuestos que aporta la pulpa de café. Independientemente de lo anterior, la pulpa de café fermentada por *Pleurotus spp.* presenta potencialidades para la producción de enzimas ligninolíticas.

## Conclusiones

1. En la evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de la pulpa de café fermentada, se observa mayor actividad de enzima lacasa que manganeso peroxidasa y versátil peroxidasa.
2. Se seleccionó la cepa *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3023 como la mejor productora de enzimas lacasas, al mostrar el mayor valor de actividad lacasa (1,74 U g<sup>-1</sup>).
3. La pulpa de café favorece la producción de enzimas lacasas, al ser superiores los valores de producción de esta enzima en la pulpa de café pura que en la mezclada.

## Bibliografía

1. OIC., Organización Internacional del Café, *Carta del Director Ejecutivo, Informe sobre el mercado del café*, <http://www.ico.org/documents/>, Mayo 2008.
2. Bermúdez, R. C.; Cárdenas, J. R.; Serrat, M.; García, N.; Gross, P.; Orberá, T., *Caracterización técnica socio económica y ambiental de las despulpadoras de café de la provincia Santiago de Cuba*, en Informe Técnico de Proyecto Nacional de Ciencia y Técnica, *Valorización de los residuales del café*, Centro Estudios Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, págs. 120, 1999.
3. Chang, S. T., *Mushroom cultivation using the "ZERI" principle: potential for application in Brazil*, en *Micología Aplicada International*, vol. 19, núm. 2, págs. 33-34, 2007.
4. Ramirez-Corone, I. A., *Les tanins condensés de la pulpe de café: études structurales et dégradation enzymatique*, Tesis doctoral, Facultad de Ciencias y Tecnología Paul Cezanne, Universidad de Marsella, Francia, págs. 166, 2004.
5. Salmones, D.; Mata, G.; Waliszewski, K., *Comparative culturing of Pleurotus spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation*, en *Bioresource Technology*, vol. 96, págs. 537-544, 2005.
6. García, N., *Producción de setas comestibles y enzimas lacasas por fermentación en estado sólido de la pulpa de café con Pleurotus spp.* Tesis de Doctor en Ciencias Técnicas, Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, págs. 150, 2008.
7. García, N.; Bermúdez, R. C.; Augur, C.; Roussos, S.; Perraud-Gaime, I., *Producción de lacasa extracelular, remoción de fenoles y cafeína por Pleurotus spp. cultivado en pulpa de café*, en

- 
- Tecnología Química, Ediciones Universidad de Oriente, vol. XXVII, núm. 3, págs. 83-91, ISSN 0041-8420, 2007.
8. Ikehata, K.; Buchanan, I.; Smith, D., *Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidase and laccases for waste treatment*, en *Journal Environmental Engineering and Science*, vol. 3, págs. 1-19, 2004.
  9. Rodríguez, S.; García, N.; Bermúdez, R.C.; Fernández, M.; Augur, C., *Decolourisation of mushroom farm wastewater by *Pleurotus ostreatus**, en *Biodegradation*, vol., 19, págs. 519-526, 2008.
  10. Mata, G.; Murrieta-Hernández, D., Iglesias-Andreu, L., *Changes in lignocellulolytic enzyme activities in six *Pleurotus* spp. strains cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma* spp.*, en *World J Microbiol Biotechnol.*, vol. 21, págs. 143-150, 2005.
  11. Pick, E.; Keisare, Y. A., *Simple colorimetric method for a measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture*, en *Journal of Immunology Methods*, vol. 38, págs.161-170, 1980.
  12. Palmieri, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Scaloni, A.; Capasso, A.; Sannia, G., *A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus**, en *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, págs. 31301-31307, 1997.
  13. Kachlishvili, E.; Penninckx, M.; Tsiklauri, N.; Elisashvili, V., *Effect of nitrogen source on lignocellulosic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation*, en *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005.
  14. Leonowicz, A.; Cho, N.; Luterek, J.; Wilkolazka, A.; Wojtas-Wasilewska, M.; Matuszewska, A.; Hofrichter, M.; Wesenberg, D., *Fungal laccase: properties and activity on lignin*, en *Journal of Basic Microbiology*, vol. 41, págs.185-227, 2001.
  15. Valásková, V.; Baldrian, P.; *Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus**, en *Research in Microbiology*, vol.157, págs.119-124, 2006.
  16. In der Wiesche, C.; Molter, M.; Zadrazil, S.; Aksu, S., *Activities of ligninolytic enzymes as a means for monitoring the colonization of straw substrate pretreated at different temperatures by *Pleurotus ostreatus**, en *Mushroom Science*, vol.15, págs.391-398, 2000.
  17. Téllez-Téllez, M.; Sánchez, C.; Loera, O.; Díaz-Godínez, G.; *Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase of *Pleurotus* species*, en *Biotechnology Letters*, vol. 27, págs.1391-1394, 2005.
  18. Kourouma, A., *Obtención de lacasas de *Pleurotus* sp. en residuales del café*. Tesis de Master en Biotecnología, Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, págs. 42, 2007.