

Producción de laccasa y ligno-degradación de cascarilla de cebada en cultivo sumergido y agitado, por *Pleurotus smithii* y *Pleurotus ostreatus*

Alejandro Canale-Guerrero¹ y Alan J. Reynolds²

Departamento de Salud Pública¹, Department of Food Science & Technology²
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara¹, University of Reading²
Zapopan, Jal. México¹, Whiteknights. Reading RG6 2AP, England²
cga35024@cucba.udg.mx¹, alan_reynolds@talk21.com²

Abstract— This article shows a relationship between a significant ($P<0.05$) degradation of lignin, from brewery spent grain in submerged and shaken basic culture medium without carbon source, and laccase activity ($P<0.001$) by *Pleurotus smithii* Guzman after the first 7 days of incubation. No decline in laccase activity was observed by the end of the incubation period (35 days). In contrast, *Pleurotus ostreatus* MF 33 in the same culture medium and under the same conditions, degraded lignin significantly ($P<0.001$) during the first 21 days of incubation. The above degradation pattern coincided with a significant ($P<0.001$) increase in laccase activity to a maximum after 21 days of incubation, followed by a decline till the end of incubation time. Lignin was 26 % degraded by *Pleurotus smithii* Guzman, and 10% by *P. ostreatus* MF33, after 7 days of incubation. However, *P. ostreatus* MF33 continued degrading lignin 21 days after inoculation, up until 56%. Cellulose was not degraded at all by both fungi, but hemicelluloses were 27% degraded ($P<0.01$) by *P. smithii* Guzman and 60% ($P<0.001$) by *P. ostreatus* MF33 after 28 and 35 incubation days, respectively.

Keyword— Lignin, cellulose and hemicelluloses degradation, laccase, submerged and shaken culture, brewery spent grain, *Pleurotus smithii* Guzman, *Pleurotus ostreatus* MF 33

Resumen— En este artículo se muestra la relación entre la degradación significativa ($P<0.05$) de la lignina contenida en la cascarilla de cebada de cervecería, en un medio de cultivo básico (MB) sin fuente de carbono y la actividad de la enzima laccasa ($P<0.001$) en cultivo sumergido y agitado de *Pleurotus smithii* Guzman, después de los primeros 7 días de incubación. No se observó disminución de la actividad de la laccasa al final del período de incubación de 35 días. En contraste, *Pleurotus ostreatus* MF33, degradó significativamente ($P<0.001$) la lignina, en el mismo tipo de medio de cultivo y bajo las mismas condiciones de agitación, durante los primeros 21 días de incubación. Esa degradación coincidió con un incremento ($P<0.001$) en la actividad de la laccasa, hasta lograr el máximo después de 21 días y se mantuvo así, hasta el fin del período. La lignina fue 26% degradada por *P. smithii* Guzman y 10% por *P. ostreatus* MF 33, después de 7 días de incubación. Sin embargo, *P. ostreatus* MF 33 continuó la degradación hasta 56% después de 21 días, en cultivo sumergido y agitado. La celulosa no fue significativamente hidrolizada por *P. smithii* Guzman ni por *P. ostreatus* mientras que la hemicelulosa fue degradada (27%) en forma significativa ($P<0.01$) por *P. smithii* Guzman y en 60% ($P<0.001$) por *P. ostreatus* MF33, después de 28 y 35 días de incubación, respectivamente.

Palabras claves—Degradación de lignina, celulosa y hemicelulosa, laccasa, cultivo sumergido y agitado, cascarilla de cebada de cervecería, *Pleurotus smithii* Guzman, *Pleurotus ostreatus* MF 33

I. INTRODUCCIÓN

Las laccasas (benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) son enzimas del grupo de las polifenol-oxidasas, que contienen cobre en su molécula y catalizan la oxidación de varios compuestos fenólicos y compuestos inorgánicos, reduciendo el oxígeno a agua (Giardina *et al*, 2010). Son producidas por plantas superiores, hongos, bacterias, microflora del rumen e insectos (Kunamneni, A., Ballesteros, A., Plou, F.J., Alcalde, M., 2007). Están involucradas en la degradación de lignina, pigmentación, patogénesis (Murugesan *et al*, 2006) y morfogénesis (Tsivileva, Pankratov & Nikitina,

2010). Actualmente existen nuevas aplicaciones de las laccasas, gracias a su amplio rango de sustratos (Giardina *et al*, 2010). En esa base, Brijwani, Rigdon y Vadlani (2010) encontraron que las laccasas están siendo aplicadas en procesos de biorremediación, al degradar los fenoles que son parte importante de los colorantes vertidos a los acuíferos por parte de las industrias procesadoras de textiles y en desarrollos analíticos que incluyen la elaboración de biosensores para ensayos enzimáticos e inmunológicos. Sin embargo, nuestra atención está enfocada al estudio de la producción de la enzima laccasa, por su participación en la degradación de lignina y su aplicación en la industria de alimentos y bebidas puesto que esta enzima, según Brijwani, Rigdon y Vadlani (2010) se utiliza extensivamente en la estabilización del color, transparencia y sabor de bebidas (jugos de frutas, vinos y cervezas) al actuar sobre los fenoles y polifenoles provenientes de la ligninas presentes en las materias primas involucradas. En la industria de la panificación y repostería, son usadas para aumentar la fuerza de cohesión del gluten en la masa, aumentar el volumen de la misma, mejorar la estructura de la miga y la suavidad del pan. Las harinas de trigo, cebada y centeno contienen gluten, el cual es responsable de la formación de la matriz proteica entrecruzada que imparte propiedades de extensibilidad a la masa del pan, misma que está ausente en harinas de avena, maíz y papa. Estas harinas han adquirido importancia en el desarrollo de productos libres de gluten, lo cual favorecería a las personas con la enfermedad celíaca, sensibles a esa proteína. Las laccasas, junto con las proteasas, juegan un papel importante en las harinas sin gluten, al aumentar las propiedades de textura de la masa, disminuyendo la dureza de la miga y la propiedad de masticabilidad.

Por otro lado, resulta interesante saber que no existen en la literatura reportes de la actividad enzimática de *Pleurotus smithii* Guzman sobre la celulosa y la hemicelulosa, ni respecto de la relación entre la degradación de lignina y la actividad de la enzima laccasa del hongo mencionado en cultivo líquido y agitado, adicionado de un desecho agroindustrial, como la cascarilla de cebada de cervecería. Aliyu & Bala (2010) han reportado que E.E.U.U ha producido alrededor de 3.4 millones de Tons de cascarilla por año; Gran Bretaña, arriba de 0.5 millones de Tons anualmente y Brasil, 8.5 billones de litros por año. También reportan que la cascarilla de cebada de cervecería ha sido sustrato para producir alimento para ganado, carpóforos de *Pleurotus ostreatus*, generar enzimas, ácido láctico, bioetanol, ácidos hidroxicinámicos, xilitol y pululana. Aun así, Aliyu & Bala (2010) consideran que es poca la demanda de este subproducto y sugieren mayores estudios de aplicación de la cascarilla de cervecería.

El propósito del presente trabajo fue determinar la degradación lignina, celulosa y hemicelulosa, presentes en la cascarilla de cebada de cervecería y la relación entre la actividad de la enzima laccasa y la degradación de lignina, en forma comparativa, por los hongos, *Pleurotus smithii* Guzman y *P.ostreatus* MF 33 en cultivo sumergido y agitado.

II. MATERIALES Y METODOS

Pleurotus smithii Guzman fue descrito por primera vez, por Guzman (1975) y su fase imperfecta o asexual, *Anthromycopsis smithii* Guzman en América del Sur, por Guzman, Valenzuela y Canale, en 1980. El cultivo en estudio en este trabajo corresponde a la fase imperfecta o asexual de *Pleurotus smithii* Guzman y la fase micelial en el caso de *Pleurotus ostreatus* MF33 correspondiente a una cepa donada por Cadbury-Schwepes de Reading, Inglaterra.

Los inóculos de ambos hongos, fueron preparados de la siguiente manera: *Pleurotus smithii* Guzman fue cultivado a temperatura de 25°C en placas con Agar Extracto de Malta durante 5 días. El crecimiento obtenido en forma de sinemas de la fase imperfecta, fue suspendido en 100 ml de agua destilada, en condiciones asépticas. La suspensión fue luego homogenizada y se usó para inocular los matraces con medio de cultivo básico (MB) adicionado de cascarilla de cebada (MBCC). El hongo *Pleurotus ostreatus* MF 33 fue cultivado de la misma forma. El micelio de *P. ostreatus* fue suspendido en

agua destilada estéril, homogeneizado y luego usado para inocular los 18 matraces con MB adicionados de cascarilla de cebada (MBCC).

La composición del medio MB en g/L, es la siguiente: fosfato de potasio dibásico, 0.5; sulfato de magnesio, 0.5; cloruro de calcio, 0.1; sulfato ferroso heptahidratado, 0.001; cloruro de amonio, 0.1 y casaminoácidos libres de vitaminas, 2.62. Todos los ingredientes fueron disueltos en el orden mostrado, en 1000 ml de agua destilada y el pH ajustado a 5 con ácido clorhídrico 1M. El medio de MB adicionado de cascarilla de cebada (MBCC) se preparó de la siguiente forma: dos series de 18 matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, conteniendo 50 ml de MB y adicionados de 2.5 g (base seca) de cascarilla de cebada, por matraz, fueron tapados con tapón de algodón-gasa y esterilizados a 121°C por 15 min. Después de enfriados a temperatura ambiente, una serie de 18 matraces fue inoculada con 15 ml del inóculo de *P. smithii* Guzman y la otra, con 15 ml del inóculo de *P. ostreatus* MF 33.

Los matraces inoculados fueron incubados a 25°C en un agitador orbital a 250 rpm durante 35 días. Tres matraces de cada hongo fueron retirados cada 7 días del agitador, para ser procesados como sigue: el contenido de cada matraz fue filtrado al vacío, a través de filtros Whatman GF/A de microfibra de vidrio. El filtrado fue usado para determinar pH, azúcares reductores (Fuller, 1966), actividad de la enzima laccasa de acuerdo al método descrito por Wood and Goodenough (1977). El residuo fue lavado 5 veces con agua destilada y después, secado a peso constante a 80°C para la determinación de peso seco, lignina, celulosa y hemicelulosa. Estas tres últimas, mediante el análisis de fibra en forrajes (Goering & Van Soest, 1970; Cullison, 1979). Se tomaron 3 réplicas (3 matraces Erlenmeyer) con el medio de cultivo estéril pero sin inóculo, como control.

III. RESULTADOS

A. MB adicionado de cascarilla de cebada (MBCC)

P.smithii Guzman realizó una rápida y significativa ($P<0.05$) degradación de lignina (26%) durante los primeros 7 días después de la inoculación. Por otro lado, *P. ostreatus* MF33, degradó la lignina (56%) en forma significativa ($P<0.001$) durante los primeros 21 días después de la inoculación. La celulosa no fue significativamente degradada por *P. smithii* Guzman ni por *P. ostreatus* mientras que la hemicelulosa fue degradada (27%) en forma significativa ($P<0.01$) por *P. smithii* Guzman y en 60% ($P<0.001$) por *P.ostreatus* MF33, después de 28 y 35 días de incubación, respectivamente (Fig. 1).

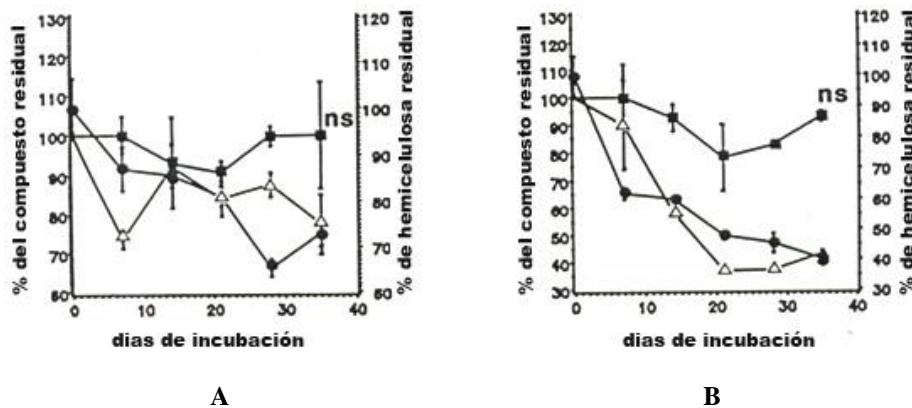


Fig. 1. Cinética de degradación de lignina, celulosa y hemicelulosa, por *P. smithii* Guzman (A) y *P. ostreatus* MF33 (B), en medio de cultivo MB sumergido y agitado, con cascarilla de cebada, incubados a 25°C en un agitador orbital a 250 rpm durante 35 días. % de lignina residual (Δ), % de celulosa residual (\blacksquare), % de hemicelulosa residual (\bullet)

Cada valor representa la media de tres réplicas. Las líneas verticales en las gráficas indican el error estándar. ns = no significativo.

Después de los primeros 7 días de incubación, se observó una rápida y significativa ($P < 0.05$) degradación de lignina (26%) por *P.smithii* Guzman correspondiente a un incremento significativo ($P < 0.001$) de la actividad de la enzima laccasa. Por su parte, *P. ostreatus* MF33 degradó significativamente ($P < 0.001$) la lignina en un 10% con un incremento significativo ($P < 0.001$) de la laccasa. Sin embargo, *P.ostreatus* MF33, continuó degradando la lignina en forma significativa ($P < 0.001$) hasta alcanzar 56% durante los primeros 21 días después de la inoculación, seguida del incremento correspondiente de laccasa (Fig. 2).

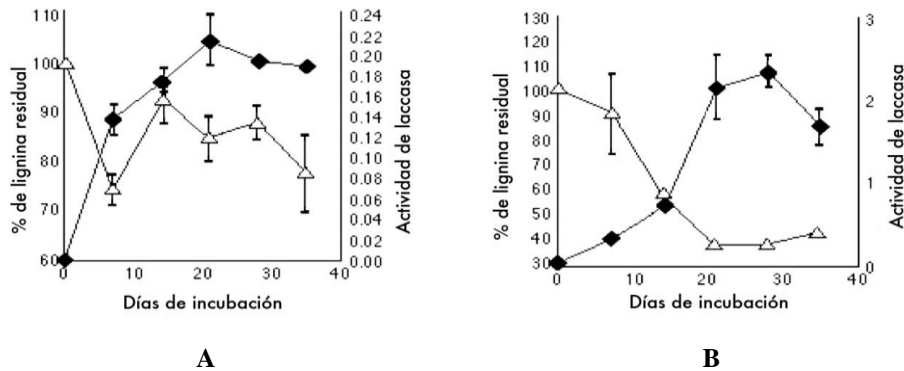


Fig. 2. Cinética de degradación de lignina y actividad de la enzima laccasa, por *Pleurotus smithii* Guzman (A) y *P. ostreatus* MF33 (B), en el medio de cultivo MB sumergido y agitado, adicionado de cascarilla de cebada de cervecería, incubado a 25°C en un agitador orbital a 250 rpm durante 35 días. % de lignina residual (△). Unidades de actividad de la enzima laccasa (◆). Cada valor representa la media de tres réplicas. Las líneas verticales en las gráficas indican el error estándar.

El medio de cultivo MB carece de ex profeso, de carbohidratos como fuente de carbono. Los azúcares reductores fueron generados probablemente, a partir del almidón remanente proveniente de la cebada, durante los primeros 7 días de incubación en el medio de cultivo inoculado con *P. smithii* Guzman, el cual comenzó a utilizar estos azúcares para poder sustentar la degradación de lignina 7 días después hasta casi su consumo total. En el caso de *P. ostreatus* MF33, los azúcares reductores fueron producidos en gran cantidad durante los primeros 7 días después de la inoculación y al igual que *P. smithii* Guzman, provienen probablemente del almidón residual de la cebada. Sin embargo, los mismos fueron utilizados 7 días después por *P.ostreatus* MF33, hasta casi agotarlos, para la degradación de lignina (Fig. 3).

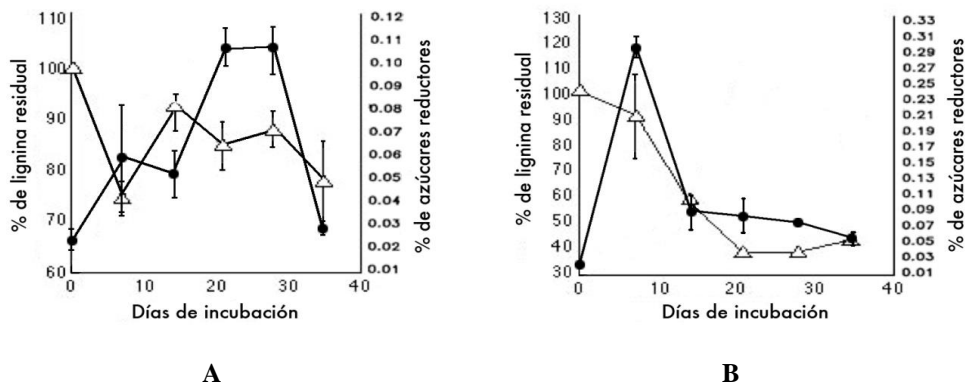


Fig. 3. Cinética de degradación de lignina y generación de azúcares reductores, por *Pleurotus smithii* Guzman (A) y *P. ostreatus* MF33 (B), en el medio de cultivo MB sumergido y agitado, adicionado de cascarilla de cebada de cervecería, incubado a 25°C en un agitador orbital a 250 rpm durante 35 días. % de lignina residual (Δ) y % de azúcares reductores residuales (\bullet). Cada valor representa la media de tres réplicas. Las líneas verticales en las gráficas indican el error estándar.

Respecto del pH en el caso de *P. smithii* Guzman (Fig. 4A) los cambios en pH en el medio de cultivo, fueron significativos ($P < 0.05$) a lo largo del período de incubación de 35 días. El pH bajó de 6.3 a 6.1, después de catorce días de la inoculación, para luego subir gradualmente y alcanzar el valor de 6.82 al final del período de incubación. La actividad de la enzima laccasa se vió favorecida por un pH inicial entre 6.3 y 6.1 a los 14 días de incubación, cuando se alcanzó una actividad de 0.138 unidades, aunque la máxima actividad de la laccasa fue de 0.21 Unidades a los 21 días. En el caso de *P. ostreatus* MF33, los cambios de pH observados en el medio de cultivo durante el período de incubación de 35 días, fueron significativos ($P < 0.001$). El pH bajó, de 6.2 a 5.5 durante los primeros 7 días, pero aumentó a 7.6 a través de los siguientes 14 días, permaneciendo constantes hasta el final del período de incubación. (Fig. 4B).

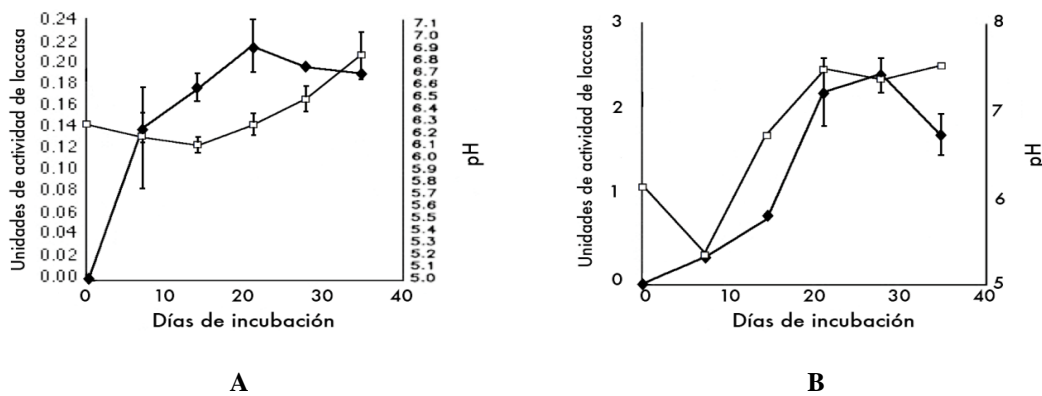


Fig. 4. Actividad de la enzima laccasa y cambios de pH, durante la degradación de cascarilla de cebada de cervecería, por *P.smithii* Guzman (A) y *P.ostreatus* MF33 (B), en medio de cultivo MB sumergido y agitado, incubados a 25°C en un agitador orbital a 250 rpm durante 35 días de incubación. Unidades de actividad de laccasa (\blacklozenge) y pH (\square). Cada valor representa la media de tres réplicas. Las líneas verticales en las gráficas indican el error estándar.

IV. DISCUSIÓN

Ambos, *P. smithii* Guzman y *P. ostreatus* MF 33 degradaron significativamente la lignina de la cascarilla de cebada con la correspondiente actividad mostrada por la enzima laccasa, en el medio de cultivo líquido MBCC sumergido y agitado, lo cual concuerda con los conceptos de Ander & Ericksson, 1983 y Eggeling, 1983, que al considerar la degradación de lignina como un proceso eminentemente aerobio, es posible aumentar la degradación de ese compuesto, facilitando la transferencia de oxígeno en el medio de cultivo lo que favorece la formación de una mata micelial delgada, en un cultivo líquido agitado. El sistema ligninolítico no es inducido por la lignina pero es constitutivo en el metabolismo secundario, disparado por la limitación en carbohidratos, nitrógeno, amonio o azufre y depende de la finalización del crecimiento vegetativo (Kirk, Higuchi, Chang, 1980, Ander & Ericksson, 1983, Leatham & Kirk, 1983). Puesto que la degradación de lignina es un proceso lento y demandante de energía, es necesaria una fuente de carbono alternativa, fácilmente metabolizable (Amel & Drew, 1980). Este fue el caso de ambos, *P.smithii* Guzman y *P. ostreatus* MF33, ya que en un medio de cultivo sin fuente de carbono, los carbohidratos provinieron, de la degradación del almidón, presente en los residuos de la cascarilla de cebada, como lo demostró Canale-Guerrero en 1988 y una vez degradada la lignina, las enzimas pudieron penetrar la mata de lignocelulosa (Dashtban, Schraft, Syed, Qin, 2010) y degradar la hemicelulosa, (0.06% y 0.30% correspondientemente, después de 7 días de incubación). El pH menor a 6.5 en el medio de cultivo MBCC favoreció la actividad de la enzima laccasa y la consecuente degradación de lignina por ambos hongos lo que coincide con Singh & Kumer (2010) quienes reportan que la actividad de las laccasas fúngicas es favorecida en un pH ácido.

V. CONCLUSION

El hongo *P. smithii* Guzman logró degradar el 26 % de lignina presente en la cascarilla de cebada a los 7 días y *P. ostreatus*, el 56 % al cabo de 21 días, en cultivo sumergido y agitado. Ninguno de los dos hongos degradó la celulosa y por consiguiente, los carbohidratos que favorecieron la lignodegradación provinieron del almidón remanente de la cascarilla de cebada. Los reportes en la literatura indican la necesidad de oxígeno por las enzimas que hidrolizan la lignina, de esta forma la actividad de la enzima laccasa es favorecida por la presencia de oxígeno para la degradación de lignina Otro punto importante fue que el pH ácido promovió la degradación de la lignina presente por ambos hongos.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen la intervención del M en B.A. Oscar Carbajal Mariscal de la Unidad Multimedia Instruccional del CUCBA-UDG, por las adaptaciones hechas a las figuras presentadas en este trabajo.

REFERENCIAS

- Aliyu, S. & Bala, M. (2011) Brewer's Spent Grain: A Review of its Potentials and Applications. *African Journal of Biotechnology* 10(3): 324-331
- Amel, G.I., Drew, S.W. (1980) Microbiology of lignin degradation. *Annual Reports on Fermentation Processes* 4: 67-103.
- Ander, P., Ericksson, K.E. (1983) Physiological requirements for degradation of lignin-related substances by *Sporotrichum pulverulentum*". *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 18 (6): 374-380.
- Brijwani, K., Rigdon, A., Vadlani, P.V. (2010). Fungal Laccases: Production and Applications in Food Processing. *Enzyme Research*. 2010:1-10
- Canale-Guerrero, A. (1988) Aspects of the Physiology Of *Antromycopsis Smithii* And *Pleurotus Ostreatus* MF33 In Supplemented Agricultural Wastes. Ph.D. Thesis. Department of Food Science And Technology. University Of Reading, Uk.
- Cullison, A. (1979) Feeds and Feeding. Rest. Publ. Co.

- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T. A., & Qin, W S. (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 1: 36-50.
- Eggeling, L. (1983) Lignin: An exceptional biopolymer...and a rich resource? , *Trends in Biotechnology* 1 (4):123-127.
- Fuller, L. (1966) Automated determination of sugars. *Automation in Analytical Chemistry. Technicon Symposia. Vol. III. England.*
- Giardina, P., Faraco, V., Pezella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G. (2010) Laccases: a Never Ending Story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67:369-385.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J. (1970) Forage Fibre Analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agriculture Handbook. No. 379. U.S. Department of Agriculture.*
- Guzman, G. (1975) New and Interesting Species of Agaricales of Mexico. Pp 100-102 In: Bigelow, H.E. & Thiers, H.D. (Editors) 1975. *Studies on Higher Fungi. Beihefte Zur Nova Hegwigia. Heft 51: 99-118. J. Cramer.*
- Guzman, G., Valenzuela, R., Canale, A. (1980) First record of *Pleurotus smithii* from South America and the asexual state in the mexican cultures”, *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 14: 17-26
- Kirk, T.K., Higuchi, T., Chang, T. (1980) Lignin biodegradation: microbiology, Chemistry and potential applications, (CRC Press, Inc, Boca Raton, USA).
- Kunamneni, A., Ballesteros, A., Plou, F.J., Alcalde, M., (2007). Fungal Laccases. A Versatile Enzyme for Biotechnological Applications. *Communicating Current Research And Educational Topics And Trends In Applied Microbiology. A.Mendez Vilas (Ed.). Formatex. Pp. 233-245*
- Leatham, G.F. and Kirk, T.K. (1983) Regulations of ligninolytic activity nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes, *FEMS Microbiology Letters* 16:63-67.
- Murugesan, K., Arulmani, M., Nam, I, H., Kim, Y.M., Chang Y.S., Kalaichelvan, P.T. (2006). Purification and Characterization of Laccase Produced by a White-Rot Fungus *Pleurotus Sajor-Caju* Under Submerged Culture Condition and its Potential in Decolorization of Azo Dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:939-946.
- Singh A.D. & Kumar S.R. (2010) Ligninolytic Fungal Laccases and their Biotechnological Applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160: 1760-1788.
- Tsivileva, O.M., Pankratov, A.N., Nikitina, V.E. (2010) Extracellular protein production and morphogenesis of *Lentinula edodes* in submerged culture. *Mycol. Progress.* 9:157-167.
- Wood, D.A., Goodenough, P.W. (1977) Fruiting of *agaricus bisporus*. Changes in extracellular enzyme activities during growth and fruiting. *Archives of Microbiol* 114: 161-165.