



Production of laccases of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation

Producción de lacasas de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida

Ana Patricia Meza-Coyotzi¹, Rubén Díaz-Godínez³, Edna María Hernández-Domínguez², Gerardo Díaz-Godínez^{3*}

¹Maestría en Biotecnología y Manejo de Recursos Naturales, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlaxcala, México.

²Instituto Tecnológico Superior del Oriente del Estado de Hidalgo, Apan, Hidalgo, México.

³Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB), Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlaxcala, México. *Correo: diazgdo@hotmail.com

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.1.114>

ABSTRACT

The laccases have been studied for years for their usefulness in applications of bioremediation, as well as for their application in the food industry, textile industry, paper industry, etc., since being oxidoreductases enzymes have the capacity to oxidize phenolic compounds. *Pleurotus ostreatus* is a basidiomycete of white rot, which has as part of multienzymatic complex ligninolitic to the laccase and has been reported to have a high production of it. One method to obtain it is the submerged fermentation that consists of developing the microorganism in a liquid culture medium containing the necessary nutrients.

Keywords: Laccases, *Pleurotus ostreatus*, Submerged fermentation.

RESUMEN

Las lacasas han sido estudiadas desde hace años por su utilidad en aplicaciones de biorremediación, así como para su aplicación en la industria alimentaria, industria textil, industria de papel, etc., ya que al ser enzimas oxidoreductasas tienen la capacidad de oxidar compuestos fenólicos. *Pleurotus ostreatus* es un basidiomiceto de pudrición blanca, que tiene como parte de complejo multienzimático ligninolítico a la lacasa y se ha reportado que tiene una elevada producción de la misma. Un método para obtenerla es la fermentación sumergida que consiste en desarrollar el microorganismo en un medio de cultivo líquido, que contenga los nutrientes necesarios.

Palabras clave: Lacasas, *Pleurotus ostreatus*, Fermentación sumergida.

1. INTRODUCCIÓN

Las lacasas han sido estudiadas por su gran importancia en diferentes industrias y como método de biorremediación, ya que son enzimas oxidoreductasas capaces de oxidar los compuestos fenólicos. El género *Pleurotus* comprende una variedad de hongos que dentro de su sistema ligninolítico producen lacasas, siendo el *Pleurotus ostreatus* uno de los más estudiados.

El objetivo de éste trabajo es la recopilación de información relacionada con la producción de lacasas por *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida, así como la importancia de ello.

2. GÉNERO *PLEUROTUS*

El género *Pleurotus* es un grupo cosmopolita que tiene una amplia variedad de hongos con valor nutrimental alto, además de propiedades terapéuticas y producción de enzimas incluidas las ligninolíticas como la lacasa y las peroxidasas (Pawlik *et al.*, 2012). Es un grupo de setas más cultivados y sus poblaciones de hongos se desarrollan por medio de reproducción sexual y asexual (Cohen *et al.*, 2002). Éste género tiene especies color blanco, amarillento, rosado o grisáceo, de forma de concha de ostra o embudo; el estípite de tamaño corto, mediano o largo y puede carecer de éste; con laminillas decurrentes sobre la base del estípite; esporas color blanco, crema o lila con forma cilíndrica (Díaz-Godínez, 2009).

Las especies pertenecientes a *Pleurotus* secretan diversas oxidasas y fenoloxidasas y esto les permite crecer en sustratos que contienen lignina y compuestos fenólicos (Salmones & Mata, 2005).

2.1. *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus es un hongo basidiomiceto con forma de ostra, comúnmente es conocido como seta. Tiene un sombrero de 4 a 14 cm de diámetro en forma de ostra, color blanquecino o grisáceo, láminas decurrentes, el cuerpo fructífero crece en forma gregaria sobre troncos o restos vegetales (Rodríguez, 1996). Tiene un sistema lignocelulósico que se ha utilizado en la degradación de los residuos agroindustriales y biorremediación de contaminantes (Rodríguez-da Luz *et al.*, 2015). Se ha reportado que *Pleurotus ostreatus* contiene isoenzimas de lacasa codificadas por familias multigénicas que presentan diferencias en las propiedades catalíticas, mecanismos de regulación y de localización. La actividad transcripcional de los genes codificantes de lacasa es regulada por iones metálicos, compuestos aromáticos y derivados de lignina, concentración de nitrógeno y carbono, los cuales pueden actuar como antagonistas o también de una forma sinérgica (Garrido-Bazán, 2016).

2.1.1. Clasificación taxonómica

Reino: Fungi
Grupo: Eumycota
Clase: Basidiomycetes
Orden: Agaricales
Familia: Pleurotaceae
Género: *Pleurotus*
(Rodríguez, 1996).

2.1.2. Ciclo de vida

El *Pleurotus* se reproduce por heterotalismo, es decir, se necesitan dos micelios para llevar a cabo la reproducción. La figura 1 muestra este proceso en el cual las basidiosporas con un núcleo germinan y da origen al micelio primario (A), posteriormente se fusionan dos micelios primarios compatibles y hay un intercambio nucleico llamado plasmogamia (B) que forma el micelio secundario dicariótico en el cual hay presencia de fíbulas (C), después hay una fusión nuclear llamada cariogamia en los basidios encontrados en las laminillas del cuerpo fructífero (D), posteriormente ocurre la meiosis que da origen a las células haploides o basidiosporas y éstas son expulsadas hacia el exterior (E), reanudando el ciclo de reproducción (Sánchez & Viniegra-González, 1996).

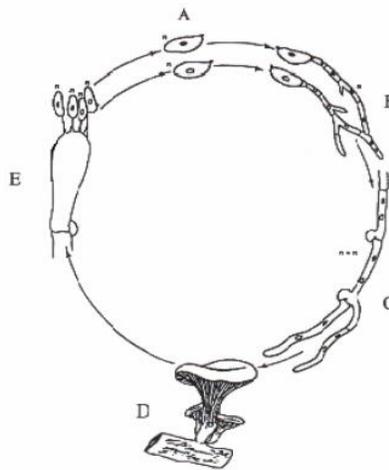


Figura 1. Ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus*
Fuente: Sánchez & Viniegra-González, 1996.

2.3. Sistema ligninolítico

El sistema ligninolítico de *Pleurotus* ha sido estudiado en los últimos años reportando la caracterización de tres grupos de enzimas ligninolíticas, como son manganeso peroxidasa (MnP), peroxidasa versátil (VP) y lacasa. Siendo de importancia ya que se utilizan en diferentes aplicaciones biotecnológicas (Cohen, 2002).

La enzima Manganeso peroxidasa está involucrada en la despolimerización de la lignina, se divide en dos dominios estructurales, un proximal y un distal, que envuelven al grupo prostético y su estructura es conformada por 10-11 α -hélices.

Su ciclo catalítico tiene tres reacciones, primero la reacción del sitio activo de la enzima con el peróxido de hidrógeno, lo que produce una reducción de H_2O_2 a H_2O y la oxidación por dos electrones de la proteína férrica al Compuesto I, posteriormente éste se reduce por una molécula de sustrato reductor (AH) que da como resultado un radical del sustrato y el Compuesto II, finalmente éste se reduce hasta el estado nativo de la enzima que contiene Fe.

La peroxidasa versátil (VP) tiene la capacidad de oxidar Mn^{2+} a Mn^{3+} y catalizar las reacciones sobre sustratos aromáticos en ausencia de Mn^{2+} , tiene la capacidad de oxidar al alcohol veratílico a veratril aldehído, también dimetoxibenceno y dímeros de lignina (Dávila & Vázquez-Duhalt, 2006).

2.3.1. Enzimas lacasas

Las lacasas son enzimas multi cobre oxidoreductasas que oxidan compuestos fenólicos, utilizando oxígeno molecular como aceptor de electrones, éstas son producidas por plantas, bacterias, insectos y hongos (Télliz-Télliz, 2008). Conservan su actividad en un pH de 3 a 10 y a una temperatura de 5 a 55° C (Ramírez *et al.*, 2003).

La lacasa se describió por primera vez en 1883 por Yoshida al extraerla del exudado del árbol de laca japonés *Rhus vernicifera*, del cual se deriva el nombre de la lacasa. También se han reportado lacasas en insectos, bacterias y en mayor abundancia en hongos de pudrición blanca (Rodríguez & Toca-Herrera, 2006).

Estas enzimas son de las más estudiadas ya que se ha reportado que participa en la descomposición de lignocelulosa y está asociada a una rápida adaptación del hongo a un sustrato nuevo (Salmones & Mata, 2005) y además pueden catalizar la oxidación de una serie de sustratos de referencia tales como ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), catecol (CAT), L-3, 4-dihidroxiifenilalanina (DOPA), 2,6-dimetoxifenol (DMP), guayacol (GUA) y siringaldazina (SGZ) (Wong *et al.*, 2013).

Las lacasas fúngicas son fenol oxidasas extracelulares que son producidas por el micelio de los hongos ligninolíticos, como basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetos; oxidan compuestos aromáticos. Catalizan el desplazamiento de un electrón y un protón de hidroxilos fenólicos que da como resultado la formación de radicales libres fenoxilo y

amino. Las lacasas oxidan ácidos fenólicos y metoxifenólicos, pero también los descarboxila y desmetila (Dávila & Vázquez-Duhalt, 2006).

Lacasas, peroxidasas de manganeso y peroxidasas de lignina pertenecen al complejo enzimático que degradan la lignina y se clasifican como fenoloxidasas (Téllez-Téllez *et al.*, 2005). Dado que pueden actuar sobre una gran variedad de sustratos se han estudiado para aplicaciones de biorremediación, así como para su aplicación en la industria alimentaria, industria textil, industria de papel, producción de bioetanol, etc (Karp *et al.*, 2015; Castanera *et al.*, 2012).

3. FERMENTACIÓN SUMERGIDA

La fermentación desde un punto de vista biotecnológico se refiere al proceso en que los microorganismos producen metabolitos y biomasa, en la que la descomposición de sustratos se produce por enzimas producidas por los mismos microorganismos (Arango, 2013). Estudios de enzimas lacasas en *Pleurotus* se han enfocado en la producción extracelular, usando cultivos crecidos en medio líquido para su purificación y posteriormente su caracterización (Téllez-Téllez *et al.*, 2005).

La fermentación sumergida o también llamada fermentación líquida es una técnica donde el crecimiento del microorganismo se desarrolla en un medio de cultivo líquido que contiene los nutrientes necesarios para ello y se controlan las condiciones fisicoquímicas. El desarrollo del microorganismo tiene una forma típica, con una fase de adaptación, crecimiento o también llamada fase logarítmica, fase estacionaria y una fase de muerte (Sánchez *et al.*, 2015).

Téllez-Téllez *et al.* (2008) reportaron por primera vez que *Pleurotus ostreatus* mostró una producción de lacasa en fermentación sumergida elevada con respecto a la producción de lacasa en fermentación estado sólido, además de mayor producción de biomasa y cuatro isoformas de lacasa, lo cual indica que *Pleurotus ostreatus* se desempeña mejor en fermentación sumergida.

Garrido-Bazán *et al.*, (2016) reportaron que la fermentación líquida de *Pleurotus ostreatus* en medio basal tuvo un aumento en la actividad de lacasa desde el inicio hasta la actividad máxima a las 408 h con 239 U/mL. Comparado con una fermentación líquida suplementada con colorante azul brillante Remazol que tuvo una actividad de lacasa baja (25 U/ mL) a las 336 h y alcanzó la máxima actividad a las 480 h (452 U/mL) (Garrido-Bazán *et al.* 2016).

Ramírez *et al.* (2003) reportó que el crecimiento y producción de lacasa de *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido con el medio Lac 12 tuvo una velocidad de producción entre 10 y 15 días, con actividad promedio de 10 U/mL y biomasa de 2.8g/125 mL. Lo cual indicó un incremento en la concentración de la enzima en el punto estacionario del crecimiento micelial y un aumento en el colapso de los pellets en estado húmedo, infiriendo el metabolismo secundario, en el que ocurre la producción extracelular de la enzima.

4. CONCLUSIÓN

Pleurotus ostreatus debido a sus características en el sistema lignocelulósico es usado en los procesos de degradación de residuos agroindustriales y de biorremediación de contaminantes, principalmente por la producción de la enzima lacasa, que participa en la degradación de lignina y otros contaminantes cenobíticos y recalcitrantes. Uno de los métodos de producción de lacasa, es la fermentación sumergida o también llamada fermentación líquida, en la cual se han reportado una actividad de lacasa alto, lo que sugiere es un método donde *Pleurotus ostreatus* tiene un mejor desempeño en este tipo de condiciones de crecimiento.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Arango CS & Nieto IJ., 2013. Biotechnological cultivation of edible macrofungi: An alternative for obtaining nutraceuticals. *Revista Iberoamericana de Micología*. 30(1): 1-8.
- Castanera R., Pérez G., Omarini A., Alfaro M., Pisabarro A.G., Faraco V., Amore A. & Ramírez L. 2012. Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase genes in submerged and solid-state fermentation cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. (78): 4037-4045.
- Cohen R., Persky L. & Hadar Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58:582–594.
- Dávila G. & Vázquez-Duhalt R. 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*. (xxx): 29-55.
- Díaz-Godínez R. 2009. Efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad de lacasas. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.
- Garrido-Bazán V., Téllez-Téllez M., Herrera-Estrella A., Díaz-Godínez G., Nava-Galicia S., Villalobos-Lopez M.A., Arroyo-Becerra A. & Bibbins-Martínez M. 2016. Effect of textile dyes on activity and differential regulation of laccase genes from *Pleurotus ostreatus* grown in submerged fermentation. *AMB Express*. (6):1-9.

Karp S.G., Faraco V., Amore A., Junior L.A., Soccol V.T. & Soccol C.R. 2015. Statistical optimization of laccase production and delignification of sugarcane bagasse by *Pleurotus ostreatus* in solid-state fermentation. *BioMed Research International*. 1-8.

Pawlik A., Janusz G., Koszerny J., Malek W. & Rogalski J., 2012. Genetic diversity of the edible mushroom *Pleurotus* sp. by amplified fragment length polymorphism. *Current Microbiology*. (65):438–445.

Ramírez N.E., Vargas M.C., Ariza J.C., Martínez C. 2003. Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. (2): 64-72.

Rodrigues-da Luz J.M., Albino-Paes S., Gonçalves-Riberio K.V., Rodrigues-Mendes I. & Megumi-Kasuya M.C. 2015. Degradation of green polyethylene by *Pleurotus ostreatus*. *PLoS ONE*. 10(6): e0126047.

Rodríguez Macías R. 1996. Caracterización de cepas del hongo comestible *Pleurotus* spp en medios de cultivo y su evaluación en substratos lignocelulósicos forrajeros para la producción de carpóforos. Tesis de Maestría, Universidad autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.

Rodriguez-Couto S. & Toca-Herrera J.L. 2006. Lacasses in the textile industry. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 1(4): 115-120.

Salmones D. & Mata G., 2005. Efecto de la presencia de compuestos solubles de lignina y fenoles sobre la producción de lacasa y biomasa en cultivos de *Pleurotus* spp. *Revista Mexicana de Micología*. (21):63-69.

Sánchez Hernández C., Díaz-Godínez R. & Díaz-Godínez G. 2015. Metabolismo microbiano. *UAT*.73-80.

Sánchez C. & Viniegra-González G. 1996. Detection of highly productive strains of *Pleurotus ostreatus* by their tolerance to 2-deoxy-D-glucose in starch-based media. *Mycological Research*. (100): 455-461.

Téllez-Téllez M., Fernández F.J., Montiel-González A.M., Sánchez C. & Díaz-Godínez G. 2008. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (81): 675-679.

Téllez-Téllez M., Sánchez C., Loera O. & Díaz-Godínez G. 2005. Differential patterns of constitutive intracellular laccases of the vegetative phase of *Pleurotus* species. *Biotechnology Letters*. 27: 1391–1394.

Wong K.S., Cheung M.K., Au C.H. & Kwan H.S. 2013. A novel *Lentinula edodes* laccase and its comparative enzymology suggest guaiacol-based laccase engineering for bioremediation. *PLoS ONE* 8(6): e66426.