

RECYT

Año 20 / N° 30 / 2018 / 21–26

Licor de maíz como medio de cultivo para la producción de lacasa por *Phlebia brevispora*

Corn liquor as a culture medium for laccase production by *Phlebia brevispora*

Gaston Ariel Prigioni, María Daniela Rodríguez, Pedro Darío Zapata, Laura Lidia Villalba

Laboratorio de Biotecnología Molecular. Instituto de Biotecnología de Misiones. Facultad de Ciencias

Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Ruta Nacional N° 12, km 7,½.

* E-mail: gastonprigioni@gmail.com

Resumen

El objetivo de este trabajo fue ensayar diferentes medios de cultivo para la producción de lacasa por el hongo *Phlebia brevispora* con el fin de lograr una elevada producción utilizando sustratos de bajo costo. Con el medio compuesto por extracto de malta, extracto soluble de maíz y CuSO_4 se obtuvieron 3.807 U/L al día 14 de incubación. Se ensayó la producción de lacasa con dos extractos solubles de maíz diferentes, uno de grado analítico y el otro de grado industrial, pero no se detectaron diferencias significativas entre el extracto de maíz de grado industrial (3.761 U/L) y el extracto de maíz analítico (3.726 U/L), al día 10 de incubación. Se logró seleccionar un medio de cultivo económico que proporcionó elevada actividad lacasa, reproducible además en biorreactor de 5 L.

Palabras clave: *Phlebia brevispora*; Lacasa; Producción; Licor de maíz; Biorreactor.

Abstract

The objective of this work was to test different culture media in order to achieve high laccase production by *Phlebia brevispora* using low cost substrates. With a medium composed of malt extract, corn liquor and CuSO_4 , 3.807 U/L of laccase at day 14 of incubation were obtained. Laccase production was tested with two different soluble corn extracts, analytical and industrial grade, but no statistical significant differences in laccase production were detected when using corn liquor of industrial (3,761U/L), or analytical grade (3,726U/L), both values attained at day 10 of incubation. Thus, an inexpensive medium for laccase production could be selected, also replicable in a 5 L bioreactor.

Keywords: *Phlebia brevispora*; Laccase; Production; Corn liquor; Bioreactor.

Introducción

Los hongos de pudrición blanca (White-rot fungi: WRF) producen y secretan enzimas ligninolíticas industrialmente relevantes debido a las diversas aplicaciones que tienen en la actualidad [1]. Muchos microorganismos, incluyendo bacterias y hongos, están involucrados en la degradación de biomasa lignocelulósica mediante la producción sinérgica de enzimas lignocelulolíticas [2]. Sin embargo, sólo un pequeño grupo de hongos, como los causantes de pudrición blanca o marrón de la madera, pueden degradar efectivamente la biomasa lignocelulósica. Los WRF descomponen la lignina de la madera, dejando expuesta la celulosa; algunos de estos hongos descomponen lignina y celulosa simultáneamente debido a la producción de potentes enzimas oxidativas e hidrolíticas extracelulares [3].

La lacasa (bencenodiol; oxígeno oxidoreductasa; EC 1.10.3.2) pertenece al grupo de oxidasas polifenólicas que

contienen átomos de cobre en su centro catalítico y usualmente son llamadas oxidasas multicobre. Estas enzimas catalizan la oxidación monoelectrónica de compuestos fenólicos, aromáticos, amínicos y otros sustratos ricos en electrones y el oxígeno es reducido a agua por un mecanismo de radicales libres [4]. El uso de esta enzima ha sido reportado extensivamente en muchos campos, como en remediación de contaminación ambiental, modificación de materiales lignocelulósicos, en la industria de los alimentos y la farmacéutica, para blanqueo de pulpa en la industria de papel y la fabricación de biosensores [4]–[6].

Las lacasas fúngicas, debido a sus características biológicas y usos biotecnológicos e industriales, han sido objeto de numerosas investigaciones. Sin embargo, la producción de lacasas por los hongos de pudrición blanca es relativamente baja en condiciones naturales y no puede satisfacer aún la creciente demanda industrial. Por lo tanto, diversos trabajos se han enfocado en incrementar su producción y en particular utilizando medios de bajo costo. La síntesis y

secreción de lacasas está influenciada por muchos factores, incluyendo los niveles de nutrientes, las condiciones de cultivo, las etapas de desarrollo y la adición de inductores al medio de cultivo [7], [8]. El foco principal de investigación está orientado hacia la optimización de los componentes del medio de cultivo utilizando metodología de superficie de respuesta [9]. La tecnología tradicionalmente más utilizada para la producción de enzimas ligninolíticas es la fermentación sumergida, principalmente porque facilita el control de los parámetros del proceso [10].

Fonseca y col.[11], [12], han reportado altos niveles de producción de lacasa utilizando el hongo de pudrición blanca *Phlebia brevispora* BAFC 633 con cobre como inductor metálico [13].

El objetivo del presente trabajo fue ensayar diferentes medios de cultivo con el fin de lograr una elevada producción enzimática en cultivos sumergidos utilizando sustratos de bajo costo.

Materiales y Métodos

Microorganismo

La cepa *P. brevispora* BAFC 633 (previamente identificada por taxonomía clásica como *Peniophora* sp. BAFC 633, tal como se describe en Fonseca et al. [14]), fue provista por la Colección de Cultivos Microbiológicos del Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Buenos Aires, Argentina. La cepa original fue mantenida en placa de Petri conteniendo agar-extracto de malta (agar 2% P/V, extracto de malta 1,27% P/V) a 4° C.

Medios de cultivo

Se ensayó la producción enzimática en diferentes medio de cultivos. La composición de los mismos fue la siguiente:

I. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,14% P/V), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,03% P/V), KH_2PO_4 (0,4% P/V), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,04% P/V), extracto de levadura (0,025% P/V), urea (0,03% P/V), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($5,2 \cdot 10^{-7}$ % P/V), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,17 \cdot 10^{-5}$ % P/V), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($3,6 \cdot 10^{-7}$ % P/V) [15].

II. Medio i + CuSO_4 (0,5 mM).

III. Medio i + glucosa (3% P/V) + CuSO_4 (0,5 mM).

IV. Medio i + glucosa (3% P/V).

V. Medio i + extracto soluble de maíz (5% V/V).

VI. Medio i + extracto soluble de maíz (5% V/V) + CuSO_4 (0,5 mM).

VII. Extracto de malta (1,27 %P/V) + extracto soluble de maíz (5% V/V) + CuSO_4 (0,5 mM).

Medios de cultivo con extracto soluble de maíz

Para los medios de cultivo en cuya composición se utilizó extracto soluble de maíz, se ensayó la producción

con dos extractos diferentes, uno de grado analítico provisto por Sigma Aldrich y uno de grado industrial provisto por Glutal S.A., variando la concentración de este último entre el 5% al 45% V/V. El extracto soluble de maíz industrial es un subproducto de la industria de molienda húmeda del maíz.

Condiciones de cultivo

Se inocularon 3 tacos de 6 mm de diámetro provenientes del borde de una colonia crecida 5 días a 28° C en agar-extracto de malta en Erlenmeyers de 100 mL con 20 mL de cada uno de los medios de cultivos anteriormente descriptos. Los Erlenmeyers se incubaron a 28° C durante 14 días. Se tomaron muestras a los 7, 10 y 14 días. El ensayo se realizó por triplicado.

Producción enzimática en biorreactor de 5L

Se inocularon 4 tacos de 6 mm de diámetro provenientes del borde de una colonia crecida 5 días a 28°C en agar-extracto de malta en 4 Erlenmeyers de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo compuesto por extracto de malta (1,27% P/V), extracto soluble de maíz (5% V/V) y CuSO_4 (0,5 mM). Los Erlenmeyers se incubaron por 14 días a 28° C, tiempo en el que se alcanzó una biomasa significativa para ser utilizada como inóculo. Se prepararon 3 L de medio de cultivo. La esterilización del mismo se realizó por tindalización. La aireación fue provista a través de un filtro de 0,22 μm suministrada por una bomba de 5 W de dos canales, con una capacidad de 3,5 L/min. La velocidad de agitación fue de 100 rpm y la temperatura del reactor se mantuvo en $30 \pm 2^\circ \text{C}$. Se tomaron muestras cada 48 h para determinación de actividad enzimática, consumo de carbono y evolución de pH.

Determinación de la actividad enzimática

La determinación de actividad lacasa se realizó empleando la técnica cinética [16], con 2,6- dimetoxifenol (DMP) 5 mM como sustrato, en buffer acetato de sodio 0,1 M (pH 3,6). El cambio de la absorbancia se monitoreó espectrofotométricamente a 469 nm ($E_{469} = 27,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La actividad enzimática se expresó en unidades enzimáticas (U), donde 1 U es equivalente a 1 $\mu\text{M}/\text{min}$ de producto a 30° C. La determinación se realizó por triplicado.

Consumo de carbono

El contenido de carbono del medio se cuantificó como azúcares reductores siguiendo el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) [17]. La absorbancia se midió espectrofotométricamente a 540 nm y se comparó con estándares de glucosa. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software *STATGRAPHICS Centurion XVI*.

La selección del medio de cultivo se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial para establecer en qué medio y a qué día se conseguía la mayor producción enzimática. En el caso del biorreactor, se realizó un ANOVA simple entre muestras para determinar el día de mayor producción enzimática. En ambos casos el nivel de confianza utilizado fue del 95%.

Resultados y Discusión

Selección de medio de cultivo

En la Fig. 1 se detalla la producción de lacasas obtenida en los diferentes medios de cultivos ensayados. Los siguientes medios de cultivo: medio i, medio ii y medio iii, no aparecen graficados debido a la escasa actividad enzimática registrada. También se observó una marcada diferencia entre el medio compuesto por extracto de malta, extracto soluble de maíz y CuSO_4 , y los demás medios de cultivo ensayados.

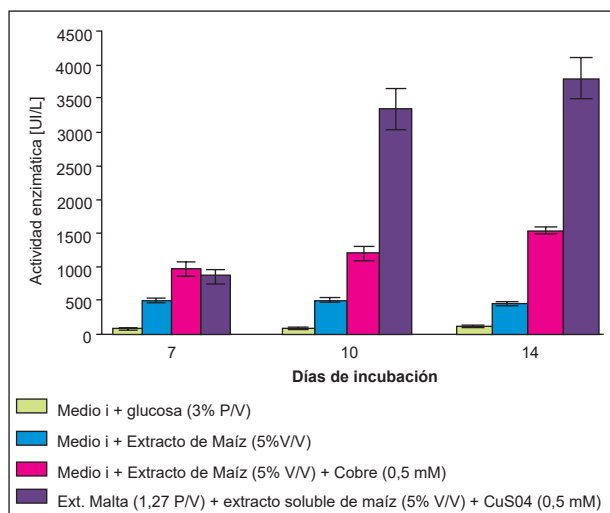


Figura 1: Producción de lacasas por *P. brevispora* en los diferentes medios de cultivos ensayados durante 14 días de cultivo.

Se realizó un ANOVA multifactorial, el cual indicó que ambos factores ensayados (composición del medio y tiempo de cultivo) fueron estadísticamente significativos (p -valor $<0,05$). Se realizó entonces un test de Tukey para establecer entre que niveles de cada factor se presentaron las diferencias estadísticamente significativas (Tabla 1).

Tabla 1: Test de Tukey para A) producción de lacasas por tiempo de cultivo, B) producción de lacasas según el medio de cultivo, por *P. brevispora*.

	Contraste	Significancia	Diferencia	+/- Límites
A	7 - 10		-681	818
	7 - 14	*	-871	818
	10 - 14		-190	818
B	Extracto malta + extracto maíz + CuSO_4 - Medio i + extracto de maíz + CuSO_4	*	1437	1046
	Extracto malta + extracto maíz + CuSO_4 - Medio i + extracto de maíz	*	2185	1046
	Extracto malta + extracto maíz + CuSO_4 - Medio i + glucosa	*	2585	1046
	Medio i + extracto de maíz + CuSO_4 - Medio i + extracto de maíz		748	1046
	Medio i + extracto de maíz + CuSO_4 - Medio i + glucosa	*	1148	1046
	Medio i + extracto de maíz - Medio i + glucosa		400	1046

La mayor producción enzimática se obtuvo con el medio compuesto por extracto de malta (1,27% P/V), extracto soluble de maíz (5% V/V) y CuSO_4 (0,5 mM) al día 14 de incubación (3.807 ± 308 U/L) (Fig. 1). El test de Tukey evidenció que no hubo diferencia significativa, a un nivel de confianza del 95%, con el día 10 (3.352 ± 303 U/L), razón por la cual se podría detener el experimento a los 10 días de cultivo.

Medios de cultivo con extracto soluble de maíz

Como el medio que presentó mayor producción enzimática resultó ser el compuesto por extracto soluble de maíz, a continuación se ensayó la producción enzimática con dos tipos de extractos de maíz, uno de grado analítico y otro residuo de la actividad industrial, este último a diferentes concentraciones. En la Figura 2 se observa que con el extracto soluble de maíz de grado analítico al 5% se obtuvieron 3.726 ± 291 U/L de lacasas mientras que con el extracto industrial en la misma concentración la producción de lacasas alcanzó 3.761 ± 282 U/L, ambos al día 10 de incubación, no se detectaron por lo tanto diferencias significativas entre los extractos utilizados.

En la Figura 2 se observa además que, en general, la producción de lacasa disminuyó al aumentar la concentración de extracto soluble de maíz de grado industrial en el medio de cultivo, por lo tanto, se recomienda su uso como fuente de carbono en la misma concentración que el extracto soluble de maíz de grado analítico.

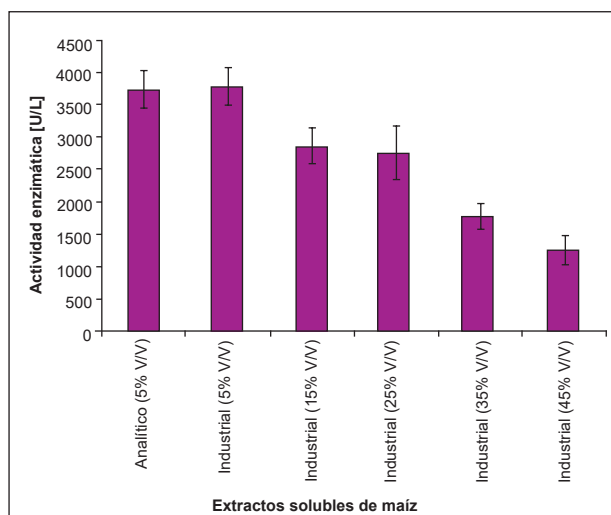


Figura 2: Actividad de lacasas producida por *P. brevispora* con los diferentes extractos solubles de maíz (grado analítico e industrial).

En la Tabla 2, se reportan resultados de diversos autores sobre producción de lacasas por diferentes especies utilizando diversos sustratos e inductores, en general de bajo costo.

Tabla 2: Producción de lacasas por otros microorganismos utilizando diferentes sustratos e inductores.

Cepa	Sustrato	Inductor	Producción de lacasa	Referencia
<i>Cerrena consors</i>	Alpechín	Cobre	10000 U/L	[18]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Bagazo de caña de azúcar y vinaza	-	325 U/L	[19]
<i>Phellinus noxius hp f17</i>	Glucosa, tartrato de amonio	Tween 80	780 U/L	[9]
<i>Pycnoporus sanguineus CCT-4518</i>	Extracto de malta, sulfato de cobre.	2,5-xilidina	2019 U/L	[20]
<i>Pycnoporus sanguineus CCT-4518</i>	Extracto de malta, sulfato de cobre.	Etanol	1035 U/L	[20]
<i>Pleurotus ostreatus CP-50</i>	Extracto de malta, peptona, extracto de levadura, triptona, glucosa.	Cobre	8000 U/L	[21]
<i>Pleurotus ostreatus CP-50</i>	Extracto de malta, peptona, extracto de levadura, triptona, glucosa.	Cobre + Lignina	12000 U/L	[21]
<i>Phlebia brevispora BAFC 633</i>	Extracto de malta, extracto soluble de maíz (analítico).	Cobre	3726 U/L	Este trabajo
<i>Phlebia brevispora BAFC 633</i>	Extracto de malta, extracto soluble de maíz (industrial).	Cobre	3761 U/L	Este trabajo

Se puede observar que los valores de actividad obtenidos en el presente trabajo se sitúan dentro de lo reportado en la bibliografía.

Producción en biorreactor de 5 L

En el caso de la producción en biorreactor se realizó un ANOVA de un solo factor, para determinar el tiempo

de cultivo de mayor producción enzimática. Se midió la actividad de lacasas y se comparó con la inmediata anterior, hasta que las medidas no presentaron diferencias significativas a un nivel de confianza del 95%, se utilizó entonces ese tiempo de cultivo para detener el experimento. En la Figura 3A se observan las medias de la actividad de lacasas y los intervalos de confianza durante el transcurso del cultivo.

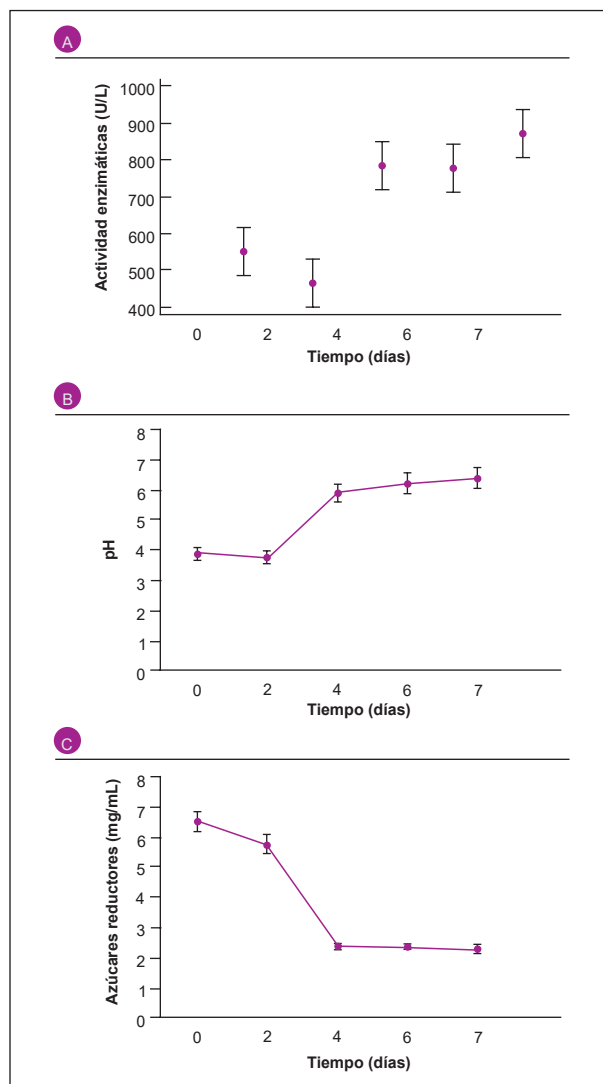


Figura 3: (A) Medias e intervalos de confianza (95%) para la producción de lacasas por *P. brevispora* en biorreactor de 5 L. (B) Evolución de pH y (C) consumo de carbono durante la producción de lacasas por *P. brevispora*.

El cultivo en biorreactor se mantuvo hasta el día 7, momento en que se alcanzó la mayor actividad enzimática (872 U/L).

Se midió el pH a lo largo del cultivo para verificar la existencia de variaciones importantes, ya que esto se reflejaría en la necesidad de adicionar bombas de ajuste de pH al biorreactor. Se observó que el medio seleccionado requiere de la corrección de pH durante el transcurso del cultivo (Fig. 3B). También se estudió el consumo de las fuentes de carbono seleccionadas (cuantificado a través del

contenido de azúcares reductores en el medio) y su relación con la producción de lacasa. Se observó un consumo abrupto desde el inicio del cultivo hasta el día 4. (Fig. 3C).

Conclusiones

Se logró seleccionar un medio de cultivo que resultó en una elevada producción de lacasas utilizando *P. brevispora*. En base al análisis estadístico se observó que el extracto de maíz de grado industrial, residuo del proceso de maceración del maíz, tuvo igual efecto que el extracto de maíz analítico sobre la actividad lacasa utilizándose al 5% V/V. Estos resultados permiten la selección de un residuo industrial para la composición del medio de cultivo, el cual presenta ventajas económicas frente a componentes de grado analítico. Se logró además escalar la producción de lacasa en biorreactor de 5 L (872 U/L), sin embargo aún quedan variables por estudiar, como el control de pH y la alimentación de medio fresco, de manera de alcanzar actividades enzimáticas cercanas a las obtenidas en Erlenmeyers (1726 U/L) al día 7 de incubación.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por PICTO, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Los autores agradecen también el financiamiento por parte de la Secretaría General de Ciencia y Tecnología, a través del proyecto de innovación 16Q477.

GAP y MDR poseen una beca del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Bibliografía

- Kumar, V. P., Naik, C. y Sridhar, M. *Production, purification and characterization of novel laccase produced by Schizophyllum commune NI-07 with potential for delignification of crop residues*. Appl. Biochem. Microbiol. 51(4): 432–441, 2015.
- Pérez J., Muñoz-Dorado J., de la Rubia T. y Martínez J. *Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview*. Int. Microbiol. 5(2): 53–63, 2002.
- Manavalan T., Manavalan A. y K. Heese. *Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi*. Curr. Microbiol. 70(4): 485–498, 2015.
- Baldrian P. *Fungal laccases: Occurrence and properties*. FEMS Microbiol. 30(2): 215–242, 2006.
- Kudanga T., Nyanhongo G. S., Guebitz G. M. y Burton S. *Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review*. Enzyme Microb. Technol. 48(3): 195–208, 2011.
- Rodríguez-Delgado M. M., Alemán-Nava G.S., Rodríguez-Delgado J. M., Dieck-Assad G., Martínez-Chapa S. O., Barceló D., Parra R. *Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds*. Trends Anal. Chem. 74: 21–45, 2015.
- Bertrand B., Martínez Morales F., Tinoco R., Rojas-Trejo S., Serrano-Carreón L. y Trejo-Hernández M. R. *Induction of laccases in Trametes versicolor by aqueous wood extracts*. World J. Microbiol. Biotechnol. 30(1): 135–142, 2014.
- Majeau J. A., Brar S. K. y Tyagi R. D. *Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants*. Bioresour. Technol. 101(7): 2331–2350, 2010.
- Poojary H. y Mugeraya G. *Laccase production by Phellinus noxius hp F17: Optimization of submerged culture conditions by response surface methodology*. Res. Biotechnol. 3(1): 9–20, 2012.
- Singhania R. R., Sukumaran R. K., Patel A. K., Larroche C y Pandey A. *Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases*. Enzyme Microb. Technol. 46(7): 541–549, 2010.
- Fonseca M. I., Fariña J. I., Sanabria N. I., Villalba L. L. y Zapata P. D. *Influence of culture on laccase production, growth and isoenzymes patterns in native white rot fungi from the Misiones rainforest (Argentina)*. BioResources. 8(2): 2855–2866, 2013.
- Fonseca M. I., Ramos-Hryb A. B., Fariña J. I., Sawostjanik Afanasiuk S. S., Villalba L. L. y Zapata P. D. *Effect of chemical and metallic compounds on biomass, mRNA levels and laccase activity of Phlebia brevispora BAFC 633*. World J. Microbiol. Biotechnol. 30(8): 2251–2262, 2014.
- Preussler C. A., Shimizu E., Villalba L. L. y Zapata P. D. *Inducción con cobre de la enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca Trametes villosa (sw.: Fr.) Kreisel*. Rev. Cienc. y Tecnol. 11(12): 9–16, 2009.
- Fonseca M. I., Fariña J. I., Sadañoski M. A., D'Errico R., Villalba L. L. y Zapata P. D. *Decolorization of Kraft liquor effluents and biochemical characterization of laccases from Phlebia brevispora BAFC 633*. Int. Biodeterior & Biodegradation. 104: 443–451, 2015.
- Mandels M. y Reese E. T. *Induction of cellulase in Trichoderma viride as influenced by carbon sources and metals*. J. Bacteriol. 73(2): 269–278, 1956.
- Fonseca M. I., Fariña J. I., Castrillo M. L., Rodríguez M. D., Nuñez C. E., Villalba L. L., Zapata P. D. *Biopulping of wood chips with Phlebia brevispora BAFC 633 reduces lignin content and improves pulp quality*. Int. Biodeterior & Biodegradation. 90: 29–35, 2014.
- Miller G. L. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Anal. Chem. 31(3): 426–428, 1959.
- Mann J., Markham J. L., Peiris P., Spooner-Hart R. N., Holford P. y (Nair) Tan G. N. *Use of olive mill wastewater as a suitable substrate for the production of laccase by Cerrena consors*. Int. Biodeterior. & Biodegradation. 99: 138–145, 2015.
- Aguiar M. M., Romanholo Ferreira L. F. y Rosim Monteiro R. T. *Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi*. Brazilian

Arch. Biol. Technol. 53(5): 1245–1254, 2010.

20. Valeriano V. S., Silva A. M. F., Santiago M. F., Bara M. T. F. y Garcia T. A. *Production of laccase by Pycnoporus sanguineus using 2,5-Xylidine and ethanol*. *Brazilian J. Microbiol.* 40(4): 790–794, 2009.
21. Tinoco R., Acevedo A., Galindo E. y Serrano-Carreón L. *Increasing Pleurotus ostreatus laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38: 531–540, 2011.

Recibido: 11/11/2016.

Aprobado: 06/07/2018.