



**PRODUCCIÓN DE CELULASAS Y LACASAS DE *Pleurotus ostreatus* POR  
FERMENTACIÓN SÓLIDA USANDO SUBPRODUCTOS DE MAÍZ COMO  
SUSTRATOS**

**[PRODUCTION OF CELLULASES AND LACCASES OF *Pleurotus ostreatus* BY SOLID  
FERMENTATION USING MAIZE BYPRODUCTS AS SUBSTRATES]**

**Brenda Karina Morales-Campos<sup>1</sup>, María González-Melo<sup>1</sup> Paulino Sánchez-Santillán<sup>2§</sup>, Nicolás Torres-Salado<sup>2</sup>, Adelaido Rafael Rojas-García<sup>2</sup>, María de los Angeles Maldonado-Peralta<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Licenciatura de Médico Veterinario Zootecnista, Facultad de Medicina Veterinaria No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero, México. C.P.41940. <sup>2</sup>Facultad de Medicina Veterinaria No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero, México. C.P.41940. <sup>§</sup>Autor para correspondencia: (sanchezsantillanp@gmail.com).

**RESUMEN**

*Pleurotus ostreatus* es un hongo de podredumbre blanca capaz de producir enzimas fibrolíticas. El objetivo fue cuantificar la producción de celulasas y lacasas de la cepa MR de *P. ostreatus* mediante fermentación sólida (FS) a 5 y 10 días usando olote de elote, totomoxtle de elote y el rastrojo de maíz como sustratos. En un matraz Erlenmeyer se colocó un tipo de sustrato con 80% de humedad y se esterilizó 121 °C, 15 min y 15 PSI; se inóculo con 5% de semilla de la cepa MR de *P. ostreatus* y se incubó a temperatura ambiente por 5 y 10 d. En cada tiempo de fermentación se obtuvo el extracto crudo enzimático y se cuantificó la actividad de celulasas y lacasas. El diseño experimental fue un arreglo factorial 3 x 2 dentro de un diseño completamente al azar, considerando como factores al tipo de sustrato y tiempo de FS. Los resultados indicaron que las celulasas no tienen diferencias entre niveles del factor sustrato y que no hay interacción entre factores ( $p > 0.05$ ). Las lacasas presentaron interacción entre factores y diferencias en los niveles de ambos factores ( $p \leq 0.05$ ). La actividad celulasas promedio 1.56 U g<sup>-1</sup> MS ( $p > 0.05$ ) en los 3 sustratos y mayor actividad de lacasas en el rastrojo de maíz. Las celulasas fueron mayores a los 10 d de FS y las lacasas a los 5 d de FS ( $p \leq 0.05$ ). La mayor producción de lacasas fue en rastrojo de maíz a los 5 d de FS ( $p \leq 0.05$ ). En conclusión, la cepa MR de *P. ostreatus* tiene la capacidad de producir mayor cantidad de enzimas en rastrojo de maíz y el mejor tiempo de FS es 5 d para lacasas y 10 d para celulasas.

**Palabras clave:** Olote, rastrojo de maíz, totomoxtle.

**ABSTRACT**

*Pleurotus ostreatus* is a white-pored fungus capable of producing fibrolytic enzymes. The objective was to quantify the production of cellulases and laccases of the MR strain of *P. ostreatus* by solid fermentation (FS) at 5 and 10 days using corn olote, corn totomoxtle and corn stover as substrates. In a Erlenmeyer flask, a type of substrate with 80% humidity was placed and sterilized at 121 °C, 15 min and 15 PSI; inoculated with 5% seed of the MR strain of *P. ostreatus* and incubated at room temperature for 5 and 10 days. In each time of fermentation, the crude enzymatic extract was



obtained and the cellulase and laccase activity was quantified. The experimental design was a 3 x 2 factorial arrangement within a completely randomized design, considering as factors the type of substrate and FS time. The results indicated that the cellulases do not have differences between levels of the substrate factor and that there is no interaction between factors ( $p > 0.05$ ). The laccases presented interaction between factors and differences in the levels of both factors ( $p \leq 0.05$ ). The cellulase activity average  $1.56 \text{ U g}^{-1} \text{ DM}$  ( $p > 0.05$ ) in the 3 substrates and higher activity of laccases in the corn stubble. Cellulases were higher at 10 d of FS and laccases at 5 d of FS ( $p \leq 0.05$ ). In conclusion, the MR strain of *P. ostreatus* has the capacity to produce more enzymes in corn stover and the best FS time is 5 d for laccases and 10 d for cellulases.

**Index words:** Corn stover, olote, totomoxtle.

## INTRODUCCIÓN

Los hongos de pudrición blanca producen enzimas fibrolíticas mediante fermentación líquida o fermentación en estado sólido; además pueden predigerir de la fracción fibrosa de forrajes y subproductos con altos contenidos de carbohidratos estructurales que se usan como sustratos. En el proceso de fermentación sólida se debe considerar el tipo de forraje, dosis, presentación del producto (líquido o sólido) y su incorporación al sustrato de interés (Peláez-Acero *et al.*, 2011). *Pleurotus ostreatus* es el hongo con más estudios en años anteriores, que se clasifica dentro de los de pudrición blanca. Este hongo en la naturaleza crece sobre residuos de material leñoso o ricos en fibra como troncos, ramas y bagazos; por lo que su cultivo *in vitro* puede hacerse en materiales que tengan alto contenido en fibras (López-Rodríguez *et al.*, 2008). *P. ostreatus* se usa en el tratamiento y mejoramiento de residuos agroindustriales, porque reduce los niveles de lignina permitiendo usarlos eficientemente en la alimentación de rumiantes (Escalona *et al.*, 2001). Las enzimas que produce son celulasas y lacasas, las cuales actúan en la hidrólisis de compuestos polifenólicos, enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 en polisacáridos como la celulosa y hemicelulosa de la pared celular unidos a lignina (Peláez-Acero *et al.*, 2011). Las celulasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 presentes en los polisacáridos de la celulosa (Malherbe y Cloete, 2002) y las lacasas pertenecen al grupo de enzimas polifenoloxidasas, contienen cuatro átomos de cobre en su sitio catalítico, por lo que oxidan una gran variedad de compuestos fenólicos, como diaminas y aminas aromáticas (Mayer y Staples, 2002), no requieren de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para su actividad catalítica y son estables bajo diferentes condiciones (García-Oduardo *et al.*, 2017)

En la década anterior se desarrollaron y probaron productos enzimáticos de extractos compuestos de celulasas exógenas de hongos para mejorar la digestión de los forrajes al interior del rumen. La adicción de enzimas fibrolíticas exógenas incrementan la digestibilidad *in vitro*, *in situ* e *in vivo* de la materia seca y de la fibra detergente neutro (FDN) en alimentos fibrosos, produce cambios en la concentración de ácidos grasos volátiles y en los patrones de fermentación, modifican el pH ruminal, mejora el consumo y la ganancia diaria en peso (Tirado-González *et al.*, 2015). Así, el objetivo fue cuantificar la producción de celulasas y lacasas de *Pleurotus ostreatus* mediante fermentación sólida a 5 y 10 días usando como sustratos subproductos del maíz.



## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, ubicada en la cabecera municipal de Cuajinicuilapa, Guerrero, México. Los microorganismos fueron la cepa MR de *Pleurotus ostreatus*. Para la reactivación de la cepa se preparó un medio de cultivo con base en agar papa-dextrosa (BD Bioxon®). En un matraz Erlenmeyer (Kimax®; 500 mL) se colocaron 7.8 g de agar papa-dextrosa y 200 mL de agua destilada. El medio se esterilizó por 15 min a 15 PSI y 121 °C. El medio se vertió en cajas Petri hasta su solidificación y se conservaron a 4 °C hasta su uso. Las cajas Petri se inocularon con la cepa se incubaron a temperatura ambiente por 4 d. Posteriormente, se preparó el inóculo para inocular los sustratos durante la fermentación sólida. Por lo que se hirvieron 500 g de sorgo entero en 1 L de agua destilada por 30 min y se filtró para eliminar el exceso de agua. A continuación, el sorgo se colocó en un matraz Erlenmeyer, el matraz se tapó y colocó un tapón de algodón y papel de straza para esterilizarlo por 15 min a 15 PSI y 121 °C. En una campana de bioseguridad (Labconco®, USA), el matraz se dejó enfriar a temperatura ambiente y se inoculó con 10 cilindros de agar con micelio (1 cm diámetro) y se incubaron a temperatura ambiente por 10 d.

Los sustratos fueron rastrojo de maíz, totemoxtle (hojas que cubren al elote de maíz) y elote del elote. Los sustratos se deshidrataron en una estufa (Felisa® FE-293A, México) por 72 h a 60 °C; posteriormente se molieron en molino convencional con malla de 0.5 cm de diámetro. En un matraz Erlenmeyer se colocaron 11 g de un tipo de sustrato y 39 g de agua destilada, se homogeneizaron para tener un sustrato con 80% de humedad. Al matraz se le colocó un tapón de algodón y papel de straza y se esterilizó durante 15 min a 15 PSI y 121 °C.

Fermentación sólida: En una campana de bioseguridad (Labconco®, USA), los matraces con el sustrato estéril se inocularon con 5% de semilla de la cepa MR de *P. ostreatus*, posteriormente se colocó un tapón de algodón y se dejaron incubar a una temperatura ambiente (30 °C promedio) por 5 y 10 d.

Extracto crudo enzimático: A los 5 y 10 d de fermentación sólida (FS), el contenido del matraz se extrajo y se depositó en un mortero con agua destilada en relación 1:1.5, se maceró por 20 min, se filtró a través de gasas y se prensó manualmente para obtener el extracto crudo enzimático (ECE). El ECE se centrifugó por 25 min a 9,710 x g y 4 °C. Al sobrenadante se le cuantificó la actividad enzimática de celulasas y lacasas.

Celulasas: La actividad enzimática celulasas se midió usando el método de azúcares reductores descrito por Miller (1959). El sustrato fue carboximetilcelulosa (CMC; Sigma-Aldrich®) al 0.5% (2.5 g de carboximetilcelulosa en 500 mL de amortiguador de citrato 50 mM y pH 4.8). Además, se preparó una solución glucosa 10 mM [0.18 g de dextrosa (Merk®) 100 mL<sup>-1</sup> de amortiguador de citratos 50 mM y pH 4.8] para una curva estándar. La mezcla de reacción contenía 0.9 mL de CMC 5% y 0.1 mL de ECE. A continuación, se incubaron 30 min a 50 °C, se agregaron 1.5 mL de solución dinitrosalicílico (DNS) y se hirvió por 5 min, e inmediatamente se introdujeron en un recipiente de agua helada y se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Jenway® 6850, China.). Cabe destacar, se preparó un blanco con 0.9 mL de CMC 5%, se incubó 30 min a



50 °C, se agregaron 1.5 mL de DNS y 0.1 mL de ECE y se hirvió por 5 min, e inmediatamente se introdujeron en un recipiente de agua helada y se midió la absorbancia a 540 nm. La unidad se definió como la cantidad de enzimas que libera 1  $\mu\text{mol min}^{-1}$  de glucosa.

Lacasas: La cuantificación de la actividad enzimática lacasa se determinó usando como sustrato ABTS (2,2' azino-bis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico], 420 nm=36,000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) según Bressler *et al.* (2000). La mezcla de reacción de cada muestra contenía 1.6 mL de agua destilada, 0.2 mL de ECE y 0.2 mL de reactivo ABTS. A continuación, se incubaron 1 min a 40 y se midió la absorbancia a 420 nm cada 10 segundos por 2 min en un espectrofotómetro.

Para la actividad enzimática de celulasas y lacasas se usó un arreglo factorial 3 x 2 dentro de un diseño completamente al azar, considerando como factores al tipo de sustrato (rastrojo de maíz, olote y totomoxtle) y tiempo de fermentación sólida (5 y 10 d). Las medias se ajustaron por mínimos cuadrados usando el PROC LSMEANS de SAS® (2011) y comparadas con la prueba de Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza indica que las celulasas no tienen diferencias entre los niveles del factor sustrato y que no hay interacción entre sustrato y día de fermentación ( $p > 0.05$ ), mientras los niveles de día de fermentación sólida mostraron diferencias ( $p \leq 0.05$ ). En el caso de las lacasas se presentó interacción entre el factor sustrato y día de fermentación, además de los niveles en ambos factores ( $p \leq 0.05$ ). La actividad celulasas promedio 1.56  $\text{U g}^{-1} \text{MS}$  ( $p > 0.05$ ) en los 3 sustratos, mientras en el rastrojo de maíz se produjo 353 % mayor actividad lacasa que en totomoxtle y olote de maíz ( $p \leq 0.05$ ). Esta variación en la producción enzimática de los ECE se asume a la composición de los sustratos, dado que el rastrojo está compuesto por panoja, tallos, caña y espiga principalmente, las cuales poseen características fisicoquímicas propias que promueve mayor actividad enzimática (Basaure, 2008).

La producción de celulasas a los 10 d es 4.2 veces mayor que a los 5 días de fermentación sólida ( $p \leq 0.05$ ). En contraste, la producción de lacasas a los 5 d es 5.4 veces mayor que a los 10 d ( $p \leq 0.05$ ; Cuadro 1). Resultados inferiores fueron publicados por Sánchez-Santillán *et al.* (2015) en actividad de celulasas y lacasas usando *P. ostreatus* como inóculo y bagazo de caña de azúcar como sustrato de la fermentación sólida. Estos resultados se asumen a que los sustratos usados en el presente estudio son materiales lignocelulolíticos, por lo que la cepa MR de *P. ostreatus* requiere primero hidrolizar la lignina para posteriormente acceder a la celulosa (Church *et al.*, 2004). Los resultados del presente estudio y los de Sánchez-Santillán *et al.* (2015) concuerdan que la mayor producción de enzima lacasa se presenta en los primeros 7 d de fermentación sólida, independientemente del tipo de sustrato empleado.



**Cuadro 1.** Actividad de celulasas y lacasas de la cepa MR de *Pleurotus ostreatus* en diferentes subproductos de maíz con 5 y 10 días de fermentación sólida.

Variables	Celulasas	Lacasas
p-valor del análisis de varianza		
Sustrato	0.0832	<.0001
Día	<.0001	<.0001
Sustrato*Día	0.5303	<.0001
Factor sustrato		
Olote	1.34 <sup>a</sup>	151.48 <sup>b</sup>
Rastrojo	1.80 <sup>a</sup>	701.44 <sup>a</sup>
Totomoxtle	1.53 <sup>a</sup>	157.62 <sup>b</sup>
Factor día		
5 de fermentación sólida	0.60 <sup>b</sup>	569.79 <sup>a</sup>
10 de fermentación sólida	2.51 <sup>a</sup>	103.90 <sup>b</sup>
Interacción sustrato*día		
Olote      5 de fermentación sólida	0.489 <sup>b</sup>	224.89 <sup>b</sup>
Rastrojo      5 de fermentación sólida	0.735 <sup>b</sup>	1275.78 <sup>a</sup>
Totomoxtle      5 de fermentación sólida	0.582 <sup>b</sup>	208.71 <sup>b</sup>
Olote      10 de fermentación sólida	2.185 <sup>a</sup>	78.08 <sup>b</sup>
Rastrojo      10 de fermentación sólida	2.863 <sup>a</sup>	127.09 <sup>b</sup>
Totomoxtle      10 de fermentación sólida	2.475 <sup>a</sup>	106.54 <sup>b</sup>
Error Estándar de la Media	0.245	103.559

<sup>abc</sup> Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencias ( $p \leq 0.05$ ).

El uso de rastrojo de maíz como sustrato inoculado con la cepa MR de *P. ostreatus* mediante una fermentación sólida de 5 d produjo 800% mayor actividad de lacasas que el totomoxtle y olote a los 5 o 10 d ( $p \leq 0.05$ ). Cabe destacar, en el propio rastrojo se reduce 90% la actividad de lacasas de los 5 a los 10 d ( $p \leq 0.05$ ). Esto se puede asumir a la composición de los sustratos, porque el olote tiene 34% de hemicelulosa, del cual alrededor de 94% son xilanasas, por lo que no estimula a la cepa MR de *P. ostreatus* a producir celulasas y lacasas (Córdoba *et al.*, 2013); por su parte, el contenido de lignina en las hojas de mazorca o totomoxtle es bajo, por lo que la producción de lacasa es inferior comparado con el rastrojo de maíz (Prado-Martínez *et al.*, 2012).

### CONCLUSIONES

La producción de enzimas celulasas y lacasas depende de la composición química del sustrato y del tiempo de fermentación, por lo que la cepa MR de *P. ostreatus* tiene la capacidad de producir la mayor cantidad de enzimas en el rastrojo de maíz y el tiempo de fermentación solida ideal para lacasas son 5 d y de 10 d para celulasas.

### AGRADECIMIENTOS

Al cuerpo académico “Producción Sustentable de Rumiantes en el Trópico”.

### LITERATURA CITADA

Basaure, P. 2008. Maíz composición del rastrojo. Manual de lombricultura. 1-2.



- Bressler, D. C. and P. M. Fedorak. 2000. Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorine, and dibenzothiophene by the laccase of *Coriolopsis gallica*. *Biotechnology Letters* 22: 1119-1125.
- Church, D. C., K. R. Pond y W.G. Pond. 2004. *Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales*. 2ª Edición. México, D.F. Limusa. pp. 50-60 p.
- Córdoba, J. A., E. Salcedo, R. Rodríguez, J. F. Zamora, R. Manríquez, H. Contreras, J. Robledo y E. Delgado. 2013. Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas. *Revista Latinoamericana de Química* 41(3): 1-2.
- Escalona, C. L., P. I. Ponce, A. M. Estrada, G. S. Solano, O. S. Ricardo y M. E. Cutiño. 2001. Cambios en la composición bromatológica del GARNVER inoculado con una cepa de *Pleurotus ostreatus*. *Revista Producción Animal* 13(1): 21-24.
- García-Oduardo, N., R. C. Bermúdez-Savon, L. Tellez-Suarez, M. Chávez-Toledano, I. Perraud-Gaime. 2017. Enzimas lacasa en inoculos de *Pleurotus* spp. *Revista Tecnología Química* 37(1): 39-41.
- López-Rodríguez, C., R. Hernández-Corredor, C. Suarez-Franco and M. Borrero. 2008. Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. *Universitas Scientiarum* 13(2): 128-129.
- Malherbe, S. and E. T. Cloete. 2002. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Reviews Environmentak Science Biotechnology* 1: 105-114.
- Mayer, A. M. and C.R. Staples. 2002. Laccase: new functions for and old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry* 31(3): 426-428.
- Peláez-Acero, A., M. Meneses-Mayo, L. A. Miranda-Romero, M. Ayala-Martínez, M. M. Crosby-Galván, O. Loera-Corral y M. D. Megías-Rivas. 2011. Enzimas fibrolíticas producidas por fermentación en estado sólido para mejorar los ensilajes de caña de azúcar. *Revista Agrociencia* 45(6): 675-685.
- Prado-Martínez, M., J. Anzaldo-Hernández, B. Becerra-Aguilar, H. Palacios-Juárez, J de J. Vargas-Radillo y M. Rentería-Urquiza. 2012. Caracterización de hojas de maíz y de bagazo de caña para la elaboración de una pulpa celulósica mixta. *Madera y Bosques* 18(3): 2-3
- Sánchez-Santillán, P., M. Meneses-Mayo, L. A. Miranda-Romero, E. Santellano-Estrada y B. Alarcón-Zúñiga. 2015. Actividad fibrolítica y producción de gas por *Pleurotus ostreatus*-IE8 y *Fomes fomentarius*-EUM1 en bagazo de caña. *Revista MVZ Córdoba*. 20(supl): 4907-4916.
- SAS. 2011. SAS/STAT Software. Versión 9.3. Cary, NC SAS, USA: Institute INC
- Tirado-González, D. N., G. Tirado-Estrada y L. A. Miranda-Romero. 2015. Sobre el efecto de enzimas fúngicas en la alimentación de rumiantes. *Sitio Argentino de Producción Animal* 40(11): 758-759.