

Evaluación de actividad enzimática oxidasa en sustrato residual de hongos comestibles

Garay, Sofía^a; Groff, M Carla^{a,b,c}; Quiroga, Valentina^a; Garrofé Mariana^a; Rodríguez, Laura A^a.

^a Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, UNSJ. (IBT-FI-UNSJ)

^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

^c Instituto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UNSJ (IIQ-FI-UNSJ)

laurirodriguez@gmail.com

Resumen

Es posible cultivar hongos comestibles (HC) en sustratos preparados con residuos agroindustriales. Algunos de los residuos evaluados, de tipo lignocelulósicos y con elevado contenido de Compuestos Fenólicos (CF) son el Alperujo (AL) y restos de Poda de olivo (PO), y Orujo (OU) y Escobajo (Es) de la Vid. Son considerados fitotóxicos y es necesario realizar un tratamiento para su disposición final. El cultivo de HC es una Fermentación en Estado Sólido (FES) con hongos del género *Pleurotus* durante la cual se producen enzimas como metabolitos fúngicos. Una vez finalizado el cultivo, queda un sustrato residual de hongo (SRH), que es el material lignocelulósico biodegradado y enriquecido en enzimas oxidasas, del tipo ligninolíticas. Se han reportado diversas aplicaciones para este SRH, por ejemplo, como enmienda de suelos o biofertilizantes. En este trabajo, el objetivo es determinar la presencia de actividades enzimáticas del tipo Lacasas (Lac) y Lignin Peroxidasas (LiP), conocidas por su capacidad degradadora de compuestos fenólicos para un posterior uso del SRH como matriz enzimática para biorremediación de fitosanitarios ensamblada en camas biológicas. Las AE's y CF se midieron sobre extractos acuosos, con técnicas espectrofotométricas. Como testigo de la FES se utilizó un sustrato preparado con viruta de álamo. Los ensayos se encuentran en curso, pero hasta el momento se ha determinado que las AE's de los SRH es mayor en los sustratos de AL-PO y OU-Es que en el testigo. Y también, que dicha actividad se corresponde con un mayor abatimiento del CF.

Palabras clave: Biorremediación, sustrato residual de hongo, residuos sólidos agroindustriales.

INTRODUCCIÓN

En un marco de Economía Circular, residuos agroindustriales de naturaleza lignocelulósica como al Alperujo -AL (restos de aceituna molida con agua de vegetación), Orujo de uva - OU (pulpa y hollejo pepitas prensadas) residuos de poda de olivo - PO, vid, escobajos - ES, sirven como sustrato para el cultivo de hongos comestibles.

Se denomina Fermentación en Estado Sólido (FES) al bioproceso que se aplica en ausencia de agua, pero con un adecuado nivel de humedad para promover el crecimiento de microorganismos (Grau et al., 2020). Una de las ventajas de la FES es que se pueden utilizar sustratos de bajo costo, como los residuos agroindustriales, permitiendo su valorización, ya que al mismo tiempo que se degradan, se pueden obtener compuestos útiles con valor agregado (Pandey et al., 2000).

Usualmente en las FES, se emplean hongos filamentosos por su capacidad de crecimiento y colonización en biomasa de naturaleza lignocelulósica. Dentro de los hongos de la podredumbre blanca, el

Pleurotus ostreatus es comestible, muy conocido por su potencial de degradación de la lignocelulosa gracias a la secreción de enzimas extracelulares ligninolíticas (peroxidasas y oxidasas) y celulolíticas (celulasa y hemicelulas) (Anele et al., 2009).

El empleo de estas fuentes particulares de biomasa como base de sustrato para el cultivo de hongos comestibles se ha reportado en un número reducido de trabajos (Melanouri et al, 2022; Papadaki et al., 2019; Petre et al, 2016) y recientemente también por el equipo de investigadores de este trabajo (Escuela et al., 2023). En el mismo se reporta la producción de basidiomas (i.e.: fructificaciones, “hongos”) de hongos comestibles *Pleurotus ostreatus* cultivados en sustratos preparados en mezclas de Alperujo y Poda de Olivo y Orujo de Uva y Escobajo. Posterior a la producción de basidiomas se obtiene un subproducto denominado Sustrato Residual (SRHongos) que consiste en una biomasa biotransformada por micelio con una proporción de hifas residuales que puede aplicarse directamente como biomaterial, forraje, enmienda biofertilizante o matriz enzimática para biorremediación. También es posible

extraer del SRHongos moléculas de interés como enzimas lacasas-peroxidadas, azúcares (ej. para biocombustibles) y polímeros de carbohidratos (Levin et al, 2012; Grassi et al, 2011; Colavolpe et al, 2012; Kuhar et al, 2015).

En este trabajo se presentan parte de los resultados del estudio y caracterización de los subproductos resultantes del cultivo de hongos, para su potencial aplicación en biorremediación, mejoramiento de la estructura física del suelo y/o la fertilización del mismo.

OBJETIVOS

En este trabajo, el objetivo es determinar la presencia de actividades enzimáticas del tipo Lacasas (Lac) y Lignin Peroxidadas (LiP), conocidas por su capacidad degradadora de compuestos fenólicos para un posterior uso del SRH como matriz enzimática para biorremediación de fitosanitarios ensamblada en camas biológicas. Adicionalmente se midieron compuestos fenólicos hidrosolubles en los sustratos antes y después de fermentar para establecer el grado de abatimiento de los mismos y su efecto en la fitotoxicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustrato Residual de Hongos SRH: provienen de bloques de cultivo de 1 Kg preparados con mezclas de Sustrato: AL:PO y OU:ES en proporciones 1:1(v:v %) con ajuste de humedad al 60 %, esterilizado 121 °C, en 3 ciclos de 1 h. Inóculo: Pleurotus ostreatus 10% p/p semilla de micelio (previamente formulado en AL y OU con granos de avena en proporción 1:1). Incubación: 24 °C, hasta colonización completa. Inducción: (4°C por 24 horas) y fructificación (20-24°C, HR > 80 %, con renovación de aire). Se cultivó también un bloque con sustrato a base de viruta de Álamo como testigo. El tiempo de fructificación, eficiencia biológica y n° de oleadas fué dependiente de cada tipo de sustrato. Los bloques se trabajaron por triplicado. Una vez cumplido el ciclo de cultivo, los SRH se guardaron a 4°C hasta la realización de las determinaciones.

Extractos acuosos: para la determinación de los compuestos hidrosolubles. Se obtuvieron pesando 5 g de sustrato húmedo en 20 ml de agua destilada. Luego se llevó a agitación a 230 rpm por 30 min, a T° ambiente. Posteriormente se filtró y ultra centrifugó a 20000 rpm durante 5 min.

Contenido de Humedad: en balanza para peso seco marca OHAUS modelo MB35 con lámpara halógena. T° 105°C, en modo automático de tiempo hasta peso seco constante.

Compuestos fenólicos hidrosolubles: por el método de Fenoles Totales utilizando el Reactivo de Folin Ciocalteau (Folin y Ciocalteau, 1927) y ácido Gálico como reactivo patrón para la curva de calibración. Medición de absorbancia a 590 nm, luego de 60 min de reacción en espectrofotómetro marca ThermoScientific modelo Multiskan FC microplates.

Actividad enzimática Lacasa (Lac): método cualitativo (Li et al., 2008; Couto y Herrera, 2007), colorimétrico basado en el cambio de coloración del medio por oxidación del reactivo ABTS (2,2'- Azinobis (3 – Etil Benzotiazolin)-6-Sulfonato de amonio).

Actividad Enzimática Lignina Peroxidasa (LiP): método cualitativo (Fernandez y Henao, 2007), colorimétrico basado en el cambio de coloración del medio por oxidación del reactivo alcohol veratrílico midiendo la absorbancia a 310 nm. La mezcla de reacción además contiene H₂O₂.

En ambos casos la actividad enzimática se midió como 1 µmol de producto oxidado por minuto por mg de sustrato seco. El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante un Análisis de la Varianza no paramétrico (ANOVA). La separación de medias a posteriori se realizó por método de Tukey con un nivel de significancia menor a 0,05.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados de las determinaciones de las actividades enzimáticas en el SRH luego de finalizado el ciclo de cultivo.

Rep	Sustrato	LiP U/mg s.srh	Lac U/mg s.srh
a	OU/ES	53,413	0,0190
b	OU/ES	64,466	0,0104
c	OU/ES	68,838	0,0008
a	AL-PO	206,086	0,0321
b	AL-PO	191,700	0,0371
c	AL-PO	314,048	0,0364
a	Testigo	83,846	0,0100
b	Testigo	139,567	0,0166
c	Testigo	90,562	0,0120

Tabla 1. Actividades enzimáticas en sustratos de cultivo y testigo

Las gráficas 1 y 2 muestran la comparación de medias por Análisis de la variación para las variables Lac y Lip de los distintos sustratos evaluados.

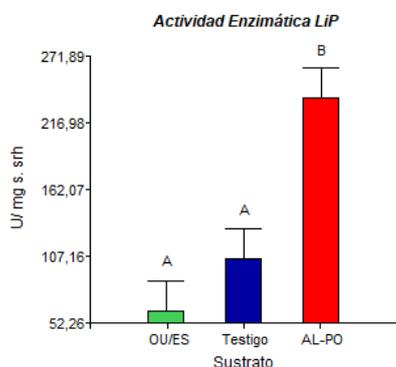


Figura 1. Comparación de medias en la variable LiP entre distintos tratamientos

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$ Tukey).

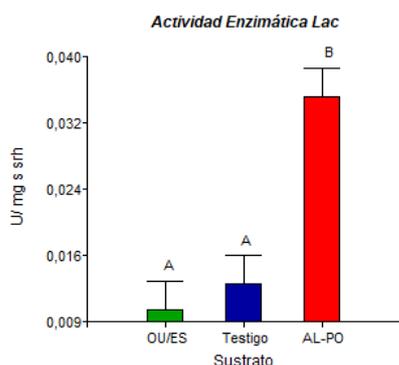


Figura 2. Comparación de medias en la variable LiP entre distintos tratamientos

En la tabla 2 se muestra el resultado del porcentaje de disminución o abatimiento de CF para cada sustrato evaluado.

Rép	Sustrato	CF µg AG/g.s.srh	Disminución CF %
a	OU/ES	104,24	74%
b	OU/ES	47,04	88%
c	OU/ES	65,50	84%
a	AL-PO	79,51	97%
b	AL-PO	353,43	85%
c	AL-PO	22,97	99%

Tabla 2. Compuestos Fenólicos y porcentaje de disminución en el SRH

No se incluyen en la tabla los resultados de CF de AL y OU que fueron 2400 y 404 ppm (medido como µg AG/ g.s.srh) respectivamente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los compuestos fenólicos analizados en cada uno de los SRH en todos los casos fueron menores al contenido inicial de CF de los sustratos utilizados para el cultivo. Los porcentajes de disminución, dependiendo el sustrato fueron entre 70% y 80% para las mezclas de OU y entre 80% y casi 100% para las mezclas con AL. Estos resultados indican que los CF son metabolizables por *Pleorotus ostreatus* para su crecimiento y acorde con lo reportado por otros autores (Sanjust et al., 1991; Tomati et al., 1991). Desde el punto de la aplicación del SRH como enmienda para mejorar la estructura fisicoquímica del suelo, la disminución de compuestos fenólicos es importante ya que son estos compuestos, los atribuibles a los efectos fitotóxicos de Alperujo (Pinho et al., 2017) y Orujo de Uva (Ilyas, et al., 2021).

En relación con el contenido de humedad los valores obtenidos son los esperados luego de ciclos de cultivos de entre 60 y 70 días. La principal razón de su medición es establecer su valor para poder estandarizar luego el resto de las mediciones y expresara en gramo seco de sustrato residual de hongo (g s.srh).

Los resultados del ANOVA para las actividades enzimáticas medidas, tanto para Lac y Lip muestran que no hay diferencia significativa entre Lac del SRH en sustratos de OU y Testigo, pero si hay diferencia significativa con la Lac medida en los sustratos de AL. La misma situación se presenta con la LiP medida. La presencia de estas enzimas es coincidente por lo reportado en diversas publicaciones y específicamente porque está demostrado que catalizan la metabolización de muchas estructuras similares a ligninas, por ejemplo, los compuestos fenólicos (Phan et al., 2012; Wang et al., 2015).

Los resultados son alentadores y a futuro se pretende establecer al grado de fitotoxicidad del SRH con estudios de germinación con semillas con protocolos estandarizados, y en términos de las actividades enzimáticas, realizar ensayos de degradación con compuestos coloreados y/o ensayos de degradabilidad de fitosanitarios para posteriormente acoplarlo a camas biológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Anele, U.Y.; Anike, F.N.; Davis-Mitchell, A.; Isikhuemhen, O.S. (2021) Solid-state fermentation with *Pleurotus ostreatus* improves the nutritive value of corn stover-kudzu biomass. *Folia Microbiol.* 66, 41–48.
- Ashok Pandey, Carlos R. Soccol, Poonam Nigam, Debora Brand, Radjiskumar Mohan, Sevastianos Roussos. 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 6, Issue 2, 2000, 153-162, ISSN 1369-703X,
- B. Colavolpe, G. Casanovas, F. Reymundo, F. Della Vecchia, E. Albertó, A. Iorio F.2012. Utilización de los desechos de la producción de hongos comestibles como Co-digestor para obtener biogás. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*. Vol. 16.
- Couto, S.R. and Toca-Herrera, J.L. (2007) Laccase Production at Reactor Scale by Filamentous Fungi. *Biotechnology Advances*, 25, 558-569.
- Escuela, R., Garay S., Martín L., Muñoz J., Río M B., Groff C., Rodríguez L. (2023). Cuyo agroindustrial waste valorization. Solid state fermentation for edible mushrooms cultivation. XLI Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. 30 de noviembre y 01 de diciembre de 2023. San Juan. Argentina.
- Folin O., Ciocalteu V. (1927). On tyrosine and tryptofan determinations in protein. *Journal of Biology Chemistry*. 73: 627–650
- Grassi et al 2011 Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65 (4), 635-643
- Grau, A.; Lerma, J.; Heredia, A.; Andrés, A. Enhancing the Nutritional Profile and Digestibility of Lentil Flour by Solid State Fermentation with *Pleurotus ostreatus*. *Food Funct*, 2020, 11, 7905–7912.
- Ilyas, T., Chowdhary, P., Chaurasia, D., Gnansounou, E., Pandey, A., & Chaturvedi, P. (2021). Sustainable green processing of grape pomace for the production of value-added products: An overview. In *Environmental Technology and Innovation* (Vol. 23). Elsevier B.V.
- Inês A. Pinho, Daniela V. Lopes, Rui C. Martins, Margarida J. Quina (2017). Phytotoxicity assessment of olive mill solid wastes and the influence of phenolic compounds, *Chemosphere*, 185, 258-267, ISSN 0045-6535,
- Kuhar et al 2015. Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation *Int. Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 238-243.
- Li Airong, Zhu Yue, Xu Liang, Zhu Wenqing and Tian Xingjun (2008). Comparative study on the determination of assay for laccase of *Trametes* sp. *African Journal of Biochemistry Research* Vol.2. 8:181-183. ISSN 1996-0778
- Levin et al 2012 Efficient azoic dye degradation by *Trametes trogii* and a novel strategy to evaluate products released *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 75, 214-222
- Melanouri et al 2022 Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. *Carbon Resources Conversion*, 5(1), 61-70
- Papadaki, Aikaterini, Vasiliki Kachrimanidou, Seraphim Papanikolaou, Antonios Philippoussis, and Panagiota Diamantopoulou. 2019. "Upgrading Grape Pomace through *Pleurotus* spp. Cultivation for the Production of Enzymes and Fruiting Bodies" *Microorganisms* 7, no. 7: 207.
- Petre et al 2016 Controlled cultivation of mushrooms on winery and vineyard wastes In *Mushroom Biotechnology* (pp. 31-47). Academic Press
- Phan, C. W., & Sabaratnam, V. (2012). Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 4, 863–873.
- Sanjust, E., Pompei, R., Rescign, A., Rinaldi, A. and Ballero, M. (1991). Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* species. *Appl. Biochem. Biotechnolo.*, 31, 223-235.
- Tomati, U., Galli, E., diLena, G. and Buffone, R. (1991). Introduction of laccase in *Pleurotus ostreatus* mycelium grown in olive mill waste waters. *Agrochimica*, 35, 275-279.
- Wang, S., Xu, F., Li, Z., Zhao, S., Song, S., Rong, C., Geng, X., Liu, Y., (2015). The spent mushroom substrates of *Hypsizygus marmoreus* can be an effective component for growing the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Sci. Hortic.* 186, 217–222.