

# Establecimiento de las Condiciones de Operación para la Producción de Lacasas por *Trametes versicolor* en Fermentación Sólida

Leticia Soto Vázquez<sup>1</sup>, Ulises Durán Hinojosa<sup>2</sup>, Isabel Membrillo Venegas<sup>1</sup>, Mayola García Rivero<sup>1</sup> y María Aurora Martínez Trujillo<sup>1\*</sup>



## RESUMEN

La fermentación en cultivo sólido es una excelente alternativa para producir elevadas cantidades de enzimas por hongos de la pudrición blanca. Muchos factores ambientales tienen influencia en el desarrollo del cultivo, y conocer dicha influencia permite controlar esos factores para incrementar la producción de la enzima en cuestión. En el presente trabajo se estudió el efecto de la porosidad sobre la producción de lacasas por *Trametes versicolor* en cultivo sólido. Para ello, se emplearon diferentes relaciones de altura de soporte y diámetro del contenedor, estimando la densidad aparente y la correspondiente porosidad del soporte en cada relación. La mayor actividad de lacasas (61.90  $\pm$  0.19 U/g<sub>s</sub>) se obtuvo con una densidad

## Acerca de los autores...

<sup>1</sup> División de Ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec.

<sup>2</sup> Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria.

\* Autor para correspondencia: amartinezt@tese.edu.mx

aparente de 0.1835 g/cm<sup>3</sup>, correspondiente a una relación altura:diámetro del soporte de 1.2:3.4 cm y una porosidad de 56.7%, empleando como sustrato/ soporte salvado de trigo. Aun cuando se incrementó la producción original de lacasas, se observaron problemas de compactación en el soporte, por lo que se probaron distintas combinaciones de salvado de trigo con bagazo de caña. De esta manera, se incrementó a 89.91 ± 0.34 U/gs la producción de lacasas, cuando se empleó una combinación 80:20 de bagazo de caña:salvado de trigo.

**Palabras clave:** Hongos de la pudrición blanca, porosidad del soporte, densidad aparente, bagazo de caña, salvado de trigo.

## ABSTRACT

*Solid state culture is an excellent alternative to produce high amounts of enzymes by white rot fungi. Many environmental factors have an influence on the development of the culture, and by knowing this influence is possible to control those factors in order to increase the production of certain enzyme. In this work the effect of porosity on the production of laccases by *Trametes versicolor* in solid state culture was studied. Different ratios of support height and container diameter were used, estimating the apparent density and the corresponding porosity of the support in each relation. The highest laccase activity (61.90 ± 0.19 U / gs) was obtained with an apparent density of 0.1835 g/cm<sup>3</sup>, corresponding to a height:diameter ratio of 1.2: 3.4 cm and a porosity of 56.7%, using wheat bran as substrate/support. Even when the original laccases production was increased, problems of support compaction were observed; so, different combinations of wheat bran with cane bagasse were tested. In this way, laccases production was increased to 89.91 ± 0.34 U/gs, when an 80:20 combination of cane bagasse: wheat bran was used.*

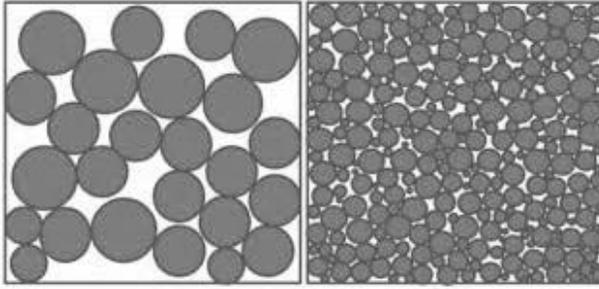
**Key words:** White rot fungi, support porosity, apparent density, sugarcane bagasse, wheat bran.

## INTRODUCCIÓN

Diversos factores ambientales, como la humedad y actividad de agua (*A<sub>w</sub>*), la temperatura de incubación, la transferencia de calor, masa y oxígeno, así como el crecimiento del microorganismo pueden tener influencia en el adecuado desarrollo de la fermentación sólida, y por tanto impactan directamente sobre la producción de enzimas por cultivos fúngicos. Estos factores dependen en gran medida de la porosidad del sustrato en dicho sistema de fermentación (Bhargav y col., 2008).

El control de la porosidad en la fermentación sólida cobra gran importancia, debido a que permite describir la relación que hay entre el volumen de las cavidades huecas y el volumen total del sustrato. Así, la porosidad del sustrato está determinada por los huecos que hay entre las partículas del sustrato, mejor conocidos como poros. Éstos generalmente son de forma irregular, permitiendo la circulación de nutrientes, agua, aire y el crecimiento del hongo (Salamanca-Jiménez y Khalajabadi, 2005). Por lo tanto, el tamaño del sustrato y su distribución, condicionan el tamaño, la repartición y la forma de los poros que se forman en el soporte. Es decir, mientras mayor sea el tamaño de las partículas del sustrato, mayor será el tamaño de los poros que se formen entre ellas, pero el número de poros será menor si las partículas del sustrato son pequeñas (Blanquer *et al.*, 2007). Para ejemplificar con mayor precisión

lo anteriormente mencionado, la Figura 1 muestra un ejemplo de distribución de partículas según su tamaño.



**Figura 1**

Distribución de partículas en un soporte usado para el desarrollo de la fermentación sólida.

Cabe mencionar que la porosidad del sistema está expresado por el porcentaje de huecos existentes en dicho sistema y está altamente condicionada por la textura y la estructura del sustrato. Así, la porosidad en los soportes utilizados en la fermentación sólida determina a su vez la densidad. A este respecto, existen dos tipos de densidad relacionados con la fermentación sólida: la densidad aparente y la densidad real.

La densidad real está asociada únicamente al tamaño de las partículas sólidas, es decir, a su textura. Para ello es necesario tomar en cuenta que si las partículas son pequeñas ocuparán menos espacio que las partículas grandes (Blanquer *et al.*, 2007). Una manera de mantener un tamaño de partícula constante en el sistema de fermentación es moler el sustrato y tamizarlo.

Los materiales porosos, como los sustratos utilizados en la fermentación sólida, presentan una densidad aparente, que es aquella que contempla tanto el espacio que ocupan las partículas como la de los huecos. Esta densidad es un factor que influye en mayor grado sobre la productividad de un cultivo, siendo éste uno de los factores mayormente utilizados para describir los fenómenos de compactación, debido a que refleja principalmente el volumen de los poros existentes en el sustrato (Rubio y Lavado, 1990; Salamanca-Jiménez y Khalajabadi, 2005). Con base en lo anterior, es posible deducir que el espacio poroso total de incrementará a medida que la textura del sustrato sea más fina, resultando en una disminución de la densidad aparente. Como consecuencia, la densidad aparente es una propiedad afectada por la textura, la consolidación y la profundidad del lecho del sustrato utilizado en la fermentación sólida (Thompson y Troeh, 2002).

El presente estudio, tuvo por objetivo identificar el efecto de la densidad aparente y la porosidad del soporte sobre el desarrollo de la fermentación sólida desarrollada por *Trametes versicolor* para la producción de lacasas.

## METODOLOGÍA

### 1. Microorganismos empleados en el desarrollo de la fermentación sólida

Para la producción de lacasas se utilizó una cepa de *Trametes versicolor*, la cual se mantuvo en refrigeración en cajas Petri, que contenían agar de extracto de malta, mediante resiembra periódicas.

### 2. Composición del medio mineral

Para la producción de lacasas, se preparó un medio basal Kirk para el crecimiento del microorganismo, que contenía en g/L: Tartrato de sodio, 0.275;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,

0.55;  $K_2HPO_4$ , 2.2;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.145;  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.44; glucosa, 8.2;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.28; solución de elementos traza: 11 mL ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.5; NaCl, 1;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.185;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.11;  $Na_2MO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.011;  $H_3BO_3$ , 0.011). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5 mediante la adición de una solución de HCl 1M. El medio se esterilizó a 121 °C y 1.5 psia durante 20 minutos.

### 3. Condiciones favorables en fermentación sólida para la producción de lacasas

Para la identificación del efecto de las densidades de sustrato sobre la operación y desarrollo de la fermentación sólida, se trabajó inicialmente con frascos de diferentes tamaños, controlando la relación entre la altura del sustrato y el diámetro del frasco. Para ello, se consideraron como variables independientes la densidad aparente de la cama de sustrato y la porosidad del sistema de fermentación.

La densidad aparente de los soportes en cada condición experimental probada, se calculó a partir de la cantidad en gramos de sustrato utilizado y el volumen que ocupó como soporte, mediante la siguiente fórmula:

$$\delta a = \frac{P}{v_{oc}}$$

Donde:

$\delta a$ : Densidad aparente (g/cm<sup>3</sup>).

$P$ : Peso del sustrato (g).

$v_{oc}$ : Volumen que ocupa el material dentro del recipiente (cm<sup>3</sup>).

El  $v_{oc}$  se calculó a partir de la altura del soporte y el diámetro interno del recipiente utilizado para cada unidad experimental. Las densidades aparentes que se trabajaron en los diferentes experimentos, fueron propuestas a partir del diámetro del recipiente utilizado, y de la altura del sustrato elegida, como se muestran en la Tabla 1.

Diámetro (cm)	Altura del sustrato (cm)	Densidad aparente (g/cm <sup>3</sup> )
3.1	0.6	0.110
3.4	1.2	0.183
3.9	1.8	0.186
4.6	2.4	0.150
5.8	3.0	0.202
7.4	3.6	0.181

**Tabla 1**

Densidades aparentes para la evaluación de la condición de operación favorable para la máxima producción de lacasas.

En lo que respecta a la densidad real, ésta fue calculada a partir de la siguiente

$$\rho_r = \frac{P_S}{V_T}$$

$\rho_r$  = Densidad real (g/cm<sup>3</sup>).

$P_S$  = Peso del soporte sólido (g).

$V_T$  = Volumen total ocupado por el soporte sólido (cm<sup>3</sup>). El cual se calculó a partir del área de la base del recipiente y de la altura del sustrato.

Para calcular la porosidad del sistema de fermentación sólida, se utilizó aquella condición en donde se obtuvo mayor producción enzimática, a partir de la siguiente ecuación:

$$\%Porosidad = 100 - \left( \frac{\delta_r}{\delta_a} \right) * 100$$

Donde:

$\delta_r$ : Densidad real (g/cm<sup>3</sup>).

$\delta_a$ : Densidad aparente (g/cm<sup>3</sup>).

## 1. Combinación de sustratos sólidos para la producción de lacasas

Al llevarse a cabo la fermentación sólida con las densidades aparentes descritas en la Tabla 1, se presentaron problemas de compactación, aun en los casos donde las alturas del sustrato no eran tan grandes. Debido a lo anterior, se decidió realizar una combinación de dos sustratos (bagazo de caña y salvado de trigo), respetando la altura de sustrato y densidad aparente que presentó la mayor actividad de lacasas. Los porcentajes de sustratos que conformaron las diferentes combinaciones experimentales se muestran en la Tabla 2.

Experimento	Bagazo de caña (%)	Salvado de trigo (%)
1	100	0
2	80	20
3	60	40
4	40	60
5	20	80
6	0	100

**Tabla 2**

Porcentajes de combinación de sustratos sólidos utilizados para el desarrollo de la fermentación sólida.

El criterio para elegir la combinación con la cual se trabajaría en los experimentos posteriores, fue aquella donde se lograra obtener una máxima producción de lacasas.

## 2. Condiciones de operación para el desarrollo de los cultivos sólidos ante las distintas condiciones experimentales

Los cultivos sólidos desarrollados en las diferentes condiciones experimentales descritas previamente, se llevaron a cabo en frascos o vasos de vidrio, dependiendo del diseño de cada experimento. A cada unidad se le adicionaron 2 mL de agua destilada por cada gramo de soporte utilizado, con la finalidad de hidratarlo para su posterior esterilización. A continuación fueron adicionados 2 mL de medio basal 5X por cada gramo de soporte utilizado en condiciones asépticas.

La cantidad de inóculo empleado para dicha fermentación fue de cuatro discos de *Trametes versicolor* de 1 cm de diámetro por cada gramo de sustrato adicionado a cada unidad experimental, incubándose a temperatura ambiente (25.3 ± 2 °C).

### 3. Recuperación del extracto enzimático

Para la recuperación de las enzimas producidas en los cultivos sólidos, se adicionó a cada unidad experimental 80 mL de regulador de acetatos pH 5 (100mM), moliéndose por cinco minutos con un procesador Braun® y posteriormente fueron sometidos a agitación constante (200 rpm) a 4 °C durante 30 minutos. El extracto enzimático se recuperó por centrifugación a 4000 rpm y se conservó en congelación hasta su análisis.

### 4. Cuantificación de la actividad de las lacasas

La actividad de lacasas se cuantificó con una solución de guayacol (10 mmol) en regulador de acetatos pH 5. En cada tubo se colocaron 0.950 mL de esta solución con 0.05 mL de muestra, y para el blanco se utilizó agua. Luego de la adición de la muestra o agua se agitó vigorosamente el tubo y pasados 10 minutos, se registró la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 470 nm. Una unidad de actividad de Lacasas se definió como los moles de guayacol oxidado  $\text{min}^{-1}\text{L}^{-1}$ , con  $\epsilon_{470\text{nm}} = 26600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Forchiassin, 2005).

### 5. Análisis estadístico de los resultados

Todos los experimentos se realizaron por duplicado, por lo que se reportan como el promedio  $\pm$  la desviación estándar de las mediciones. La comparación de medias se hizo mediante la técnica de diferencia mínima significativa (LSD) (Montgomery, 2004).

## RESULTADOS

Para encontrar las condiciones de producción máxima de lacasas en fermentación sólida por *T. versicolor*, se partió de un estudio previo desarrollado por Domínguez-Morales (2013). A partir de los resultados obtenidos en aquel trabajo, se pretendió escalar el sistema de fermentación, de tal manera que fuera posible mantener la producción ya reportada luego de optimizar las condiciones del cultivo.

### 1. Condiciones de operación para la producción de lacasas en fermentación sólida

El escalamiento del sistema de fermentación se realizó inicialmente al manejar diferentes alturas del sustrato y diámetros del contenedor. Al realizar estos ensayos se pudo observar que cuando se utilizan alturas mayores del sustrato, el hongo no alcanzaba a poblar por completo el soporte, quedándose en la parte superficial y ocasionando problemas de transferencia de masa. Al respecto, se tomaron en cuenta algunos aspectos como la densidad aparente y la porosidad, los cuales permitieron conocer el sistema idóneo para la obtención de una mayor producción enzimática, utilizando la formulación del medio optimizado por Domínguez-Morales (2013). De esta manera, se identificaron las condiciones favorables de operación. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Diámetro del contenedor (cm)	Altura del sustrato (cm)	Densidad aparente (g/cm <sup>3</sup> )	Porosidad (%)	Lacasas producidas (U/g)
3.1	0.6	0.1104	55.77	54.06 ± 0.04 <sup>B</sup>
3.4	1.2	0.1835	56.70	61.90 ± 0.19 <sup>A</sup>
3.9	1.8	0.1860	42.72	21.36 ± 0.19 <sup>C</sup>
4.6	2.4	0.1504	41.64	20.06 ± 0.60 <sup>D</sup>
5.8	3	0.2018	39.34	4.29 ± 0.94 <sup>E</sup>
7.4	3.6	0.1808	43.90	0.15 ± 0.04 <sup>F</sup>
LSD				0.1605

**Tabla 3**

Actividad de lacasas obtenidas a partir de diferentes densidades aparentes.

\*\*Los valores de cada columna con distinta letra mayúscula, son diferentes estadísticamente ( $p < 0.05$ ) con base en el valor de LSD correspondiente.

La productividad enzimática en SSF fue mayor al trabajar con una densidad aparente de 0.1835 g/cm<sup>3</sup>, donde se obtuvieron 61.89 U/g, siendo 114.50% mayor, en comparación cuando se trabajó con una densidad aparente de 0.180 g/cm<sup>3</sup>.

Este fenómeno puede ser explicado por la densidad aparente del sistema de fermentación, debido a que se ha reportado por algunos grupos de investigación, que al tener un valor pequeño de la densidad aparente, la porosidad del sistema es mayor, lo que permitiría la transferencia óptima de nutrientes, oxígeno e invasión del hongo sobre el sustrato sólido. Se debe tener en cuenta que una de las variables que afecta directamente la densidad aparente del sistema, y por tanto la porosidad, es la profundidad de la cama del sustrato. Aunque la densidad aparente de dicho sistema en un principio tenga una porosidad favorable para el desarrollo del cultivo y producción de la enzima, a medida que el hongo va poblando el soporte de manera superficial, la densidad aparente aumenta; con ello disminuye la porosidad del sistema y, en consecuencia, la transferencia de masa se reduce drásticamente, impidiendo una producción favorable de enzimas (Thompson y Troeh, 2002).

Aun cuando con el intento de escalamiento se logró mantener e incluso incrementar la actividad de lacasas obtenidas luego de la optimización, se observaron problemas de compactación, debido al crecimiento de *T. versicolor* sobre el bagazo de caña, ocasionado problemas de transferencia de oxígeno.

(%) Bagazo de caña	(%) Salvado de trigo	Lacasas (U/g)
100	0	38.41 ± 0.15 <sup>D</sup>
80	20	89.91 ± 0.34 <sup>A</sup>
60	40	60.15 ± 0.83 <sup>B</sup>
40	60	15.65 ± 0.13 <sup>E</sup>
20	80	55.10 ± 0.08 <sup>C</sup>
0	100	5.92 ± 0.32 <sup>F</sup>
LSD		0.1730

**Tabla 4**

Combinación de sustratos para la producción de lacasas.

\*\*Los valores de cada columna con distinta letra mayúscula, son diferentes estadísticamente ( $p < 0.05$ ) con base en el valor de LSD correspondiente.

Debido a lo anterior, se decidió modificar la porosidad del sistema, preparando el soporte mediante una combinación de bagazo de caña y salvado de trigo, con la finalidad de evitar la compactación de la cama de sustrato cuando el hongo crecía sobre éste. Como se puede apreciar en la Tabla 4, la producción enzimática más alta (89.91 U/g; 78.8% porosidad) se obtuvo al utilizar la combinación de 80% de bagazo de caña y 20% de salvado de trigo en el sistema, mientras que la menor producción (15.65U/g) se obtuvo al utilizar sólo al salvado de trigo al 100%.

Al respecto, no hay estudios en los que se profundice la combinación de sustratos sólidos para aumentar la porosidad del sistema, sin embargo existen reportes en los cuales se ha encontrado que al combinar los sustratos se logra obtener mayores productividades enzimáticas, y la elección de los sustratos que se combinan para establecer el soporte de la fermentación sólida, está centrada particularmente en la composición química de los residuos agroindustriales que se pretendan utilizar (Pandey *et al.*, 2000).

Considerando los resultados obtenidos en esta fase experimental, la actividad enzimática se logró incrementar en un 145.25% luego del escalamiento.

Una de las principales ventajas que se obtuvieron al escalar el proceso, es que mejoraron considerablemente las productividades enzimáticas de lacasas, al controlar factores que si bien a menor escala no generan problemas en la transferencia de masa y calor, cuando la escala se incrementa, estas productividades podrían decaer drásticamente si factores como la densidad aparente y la porosidad del soporte no son controlados.

Las aplicaciones que pueden tener este tipo de cultivos escalados en fermentación sólida respecto a otros tipos de fermentación, radican principalmente en el bioblanqueamiento de la pulpa de jonote en la industria del papel, donde investigaciones como la realizada por Licona-Soto (2014), sugieren el uso de tratamientos biológicos, en donde los filtrados enzimáticos ricos en lacasas, brindan grandes ventajas como la disminución del impacto ambiental, al obtener licores con menor carga contaminante.

Para que realmente los filtrados enzimáticos obtenidos en el presente trabajo sean utilizados en aplicaciones industriales, es necesario realizar un estudio de caracterización de las enzimas producidas durante la fermentación sólida, con el cual sea posible proporcionar información acerca de la estabilidad de las enzimas ante condiciones de pH, temperatura y exposición a sustancias químicas o metálicas por el tiempo que dure algún proceso en específico donde su uso sea requerido.

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se observa que las condiciones favorables para la producción de lacasas se obtienen al mantener una densidad aparente baja en el soporte y una alta porosidad, ya que esto permite la transferencia de nutrientes y oxígeno. Lo anterior dio como resultado el desarrollo del hongo y una producción enzimática favorable.

La mayor producción de lacasas (89.9  $\pm$  0.33 U/g) se obtuvo al manejar una densidad de 0.183 g/cm<sup>3</sup>, con una porosidad del 78.83%. Dicha porosidad se logró al utilizar una combinación de 80% de bagazo de caña y 20% de salvado de trigo.

## REFERENCIAS

- Bhargav S.**, Panda B. P., Ali M, and Javed S. (2008). Solid-state Fermentation: An Overview. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 22 (1): 49-70.
- Blanquer G.**, Asencio I. Ramón M. (2007). *El espacio poroso del suelo*. Universidad Politécnica de Valencia: Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. 25-32 pp.
- Domínguez-Morales D.** (2013). Optimización de la producción de xilanasas y lacasas fúngicas mediante el empleo de la Metodología de Superficie de Respuesta. Tesis para obtener el grado de ingeniero Bioquímico: Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. México.
- Forchiassin F.** (2005). *Manual de micología experimental*. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires, Argentina. 29 pp.
- Licona-Soto S.R.** (2014). Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas: Bioproceso integrado para el tratamiento biológico de la pulpa de jonote. Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. México, 90 pp.
- Montgomery, D.C.** (2004). *Diseño y análisis de experimentos*. Limusa-Wiley, primera edición. México.
- Pandey A.**, Soccol, Carlos R C, Nigam P., Soccol V. T. (2000). Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* 74. 69 pp.
- Rubio G.** y Lavado R. (1990). *Efectos de alternativas de manejo pastoril sobre la densidad aparente de un natracualf*. Buenos Aires. Facultad de Agronomía. UBA. (8):79-82 pp.
- Salamanca-Jiménez A.** y Khalajabadi S.S. (2005). La densidad aparente y su relación con otras propiedades de los suelos de la zona cafetalera colombiana. *Cenicafé* 56(4): 381-397.
- Thompson L.** y Troeh F. (2002). *Los suelos y su fertilidad*. Editorial Reverté, Cuarta edición. Págs. 75-85.