

CARACTERIZACIÓN DE LACASAS PRODUCIDAS POR *Pleurotus ostreatus* Y EN CO-CULTIVO CON *Trichoderma viride*

Martha Alicia Contreras-Ordóñez, Enrique Galindo y Leobardo Serrano-Carreón
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Post. 510-3, Cuernavaca, 62250 Morelos, México.
Fax (52) (777) 313-8811. alicia@ibt.unam.mx

Palabras clave: *lacasa, purificación, caracterización.*

Introducción. Las lacasas (EC 1.10.3.2.) son multicobre oxidasas que catalizan la oxidación de diversos compuestos aromáticos, usando el oxígeno molecular como aceptor de electrones. Estas enzimas poseen gran potencial en aplicaciones industriales como en el bioblanqueo, clarificación de vinos, análisis de drogas, biosensores, y decolorización de colorantes sintéticos (1). Se ha reportado que la adición de ciertos compuestos aromáticos al medio de cultivo, así como los co-cultivos con *Trichoderma sp.* incrementan la formación de la lacasa y/o regulan la síntesis de algunas isoformas (2). Previamente se observó que en co-cultivos líquidos de *P. ostreatus* CP-50-*T. viride* se incrementó la actividad de lacasa y se modificó el patrón de isoformas. Debido a las propiedades particulares que muestran las distintas isoformas resulta interesante caracterizar lacasas sintetizadas por diferentes cepas y con ello facilitar su aplicación para diferentes propósitos.

En este trabajo se caracterizaron parcialmente tres enzimas con actividad de lacasa. Dos enzimas fueron sintetizadas por *Pleurotus ostreatus* CP-50 en cultivo axénico. La tercera es una proteína modificada a partir de una de las previamente sintetizadas. El procesamiento ocurrió durante los co-cultivos *Pleurotus ostreatus-Trichoderma viride*.

Metodología. Los cultivos se llevaron a cabo en biorreactores de 14 L, con un volumen de trabajo de 10 L. El medio de cultivo contenía extracto de malta al 2%. La purificación se realizó mediante ultrafiltración y tres pasos cromatográficos (intercambio iónico, permeación en gel e interacción hidrofóbica). El perfil electroforético se analizó por PAGE-NATIVE. La determinación de pesos moleculares se realizó mediante SDS-PAGE. Para la caracterización bioquímica se utilizaron los sustratos ABTS, DMP, GUAI y SGZ.

Resultados y discusión. En cultivos axénicos se detectaron dos bandas con actividad de lacasa (lcs1 y lcs2). Durante los co-cultivos lcs1 fue modificada, ahora denominada lcs3 (figura 1 A). Al caracterizar las dos enzimas del cultivo axénico, una de ellas mostró mayor afinidad por los sustratos fenólicos al compararla con lacasas de otras cepas de *P. ostreatus*, además un peso molecular muy bajo. Por su parte la otra enzima presentó

alta estabilidad térmica y al ser procesada durante el co-cultivo, su peso molecular disminuyó (figura 1 B) y su afinidad sobre dos sustratos fenólicos incrementó (tabla 1).

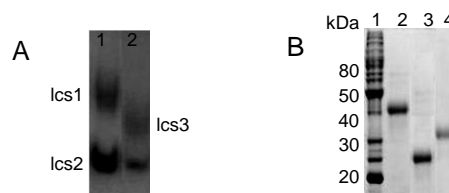


Fig.1. A) PAGE-NATIVE (Carril 1 *P. ostreatus*, Carril 2 *P. ostreatus-T. viride*). B) PAGE-SDS (Carril1 Marcadores peso molecular, carril 2 lcs1, carril 3 lcs2 y carril 4 lcs3).

Tabla 1. Propiedades de las enzimas con actividad de lacasa de *Pleurotus ostreatus* CP-50.

Enzima	MW (kDa)	Km (μM)				t _{1/2} (h) 60 °C
		ABTS	DMP	GUAI	SGZ	
lcs1	44	40	1814	950	18.7	1.96
lcs2	27	132	96.6	354	2.7	0.34
lcs3	35	35	983	1208	4.9	2.19

ABTS, ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico

DMP, 2,6-dimetoxifenol

GUAI, Guaiacol (2, metoxifenol)

SGZ, Siringaldazina (4-Hidroxi-3,5-dimetoxi-benzaldehído hidrazina)

Conclusiones. *P. ostreatus* CP-50 sintetiza dos enzimas con actividad lacasa (lcs1 y lcs2) en medio líquido a base de extracto de malta (2%). Al comparar con otras lacasas reportadas de *P. ostreatus*, lcs2, mostró valores de Km más bajos para sustratos fenólicos, así como un peso molecular menor. Por su parte lcs1 exhibió mayor termoestabilidad. Durante los co-cultivos lcs1 fue modificada (lcs3) y con el procesamiento incrementó su afinidad por dos sustratos fenólicos

Agradecimiento. Apoyo financiero: DGAPA (IN 210107) y CONACyT.

Bibliografía.

- Baldrian, P. (2006) Fungal Laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev* 30: 215–242.
- Velázquez-Cedeño, M., Farnet, Billette, C, Mata, G. and Savoie J-M (2007) Interspecific interactions with *Trichoderma longibrachiatum* induce *Pleurotus ostreatus* defence reactions base on the production of laccase isozymes. *Biotechnol Lett* 29:1583–1590.