

PRODUCCION DE LACASAS EN CULTIVOS LIQUIDOS DE *Pleurotus ostreatus* INFECTADOS CON *Trichoderma* spp.

Celia Flores¹, Rocío Casasanero¹, Ma. del Refugio Trejo², Enrique Galindo y Leobardo Serrano-Carreón¹
¹Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología. ²Centro Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Apdo. Post. 510-3, Cuernavaca, 62250 Morelos, MEXICO. Fax: (52) (777) 3 13 88 11, e-mail: celia@ibt.unam.mx

Palabras clave: lacasas, interacción biológica, *Trichoderma* spp.

Introducción. Las lacasas (EC 1.10.3.2), son enzimas utilizadas en la oxidación de compuestos xenobióticos. Para incrementar la producción de la enzima, recientemente se ha utilizado la inducción biológica mediante cepas del género *Trichoderma* (1). Sin embargo, hasta este momento, en las interacciones biológicas en medio líquido, no se han evaluado parámetros de cultivo como el tiempo de infección y la agitación que pueden influir en la producción de la enzima y en la estabilidad de la actividad volumétrica.

En este trabajo se evaluó la interacción *Pleurotus ostreatus-Trichoderma viride* en cultivos líquidos. Se evaluaron dos tiempos de infección sobre la producción de la enzima y el perfil electroforético de lacasas generadas. Se analizó también la estabilidad de la actividad volumétrica durante el co-cultivo.

Metodología. Los cultivos se realizaron por triplicado, en matraces con 100 mL de medio extracto de malta (20 g/L), pH (inicial) de 6.0, a 25°C y 150 rpm. La infección (1×10^5 esporas/mL de *T. viride*) se realizó a las 30 h y a las 48 h (inicio y mitad de fase lineal de crecimiento, respectivamente). *T. viride* no fue productora de lacasa. Se generaron inóculos en medio líquido, se recuperaron las células y se preparó una suspensión. 1 mL de ella se inoculó en los matraces. Se determinó: biomasa (gravimetría), actividad lacasa (con DMP), proteína (Bradford) y el perfil de isoformas (geles nativos). Los experimentos fueron comparados con un cultivo control (sin infección).

Resultados y discusión. Al infectar los cultivos líquidos a las 30 h, la actividad volumétrica (AV) se incrementó 2.4 veces respecto del cultivo control (Cuadro 1). Al infectar a las 48 h de incubación, no existieron diferencias en la producción de la enzima, respecto del cultivo control (Cuadro 1). En cultivos líquidos estáticos el crecimiento del hongo y la AV se redujo significativamente respecto de los cultivos agitados, lo cual se reflejó en las productividades específicas máximas de producción de la enzima: $6.4 \text{ U g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $2.7 \text{ U g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para cultivos agitados y estáticos, respectivamente. El patrón de isoformas cambió en el cultivo respecto del cultivo control: el cultivo control presentó dos isoformas: lcc1 y lcc2 (Figura 1). En el co-cultivo la isoforma lcc1 no se observó y se apreció la isoforma (lcc3), mientras que lcc2 no sufrió cambios. Por otro lado, una vez alcanzado el máximo en la AV, ésta disminuyó en el co-cultivo y en el

Cuadro 1. Producción de lacasas por *P. ostreatus* en interacción con *T. viride*, en cultivos líquidos agitados y en cultivos líquidos estáticos.

Tiempo de cultivo	Cultivos agitados				Cultivos estáticos	
	Biomasa (g/L)	Actividad en DMP (U/L)			Biomasa (g/L)	Actividad DMP (U/L)
		Control	Infección a 30 h	Infección a 48 h		
48	0.76 ^a	236.9 ^{cd}	159.3 ^{bc}	236.9 ^{cd}	0.48 ^a	56.5 ^a
72	1.6 ^{bc}	161.6 ^{bc}	388.3 ^e	277.6 ^d	0.44 ^a	88 ^b
96	1.63 ^c	83.1 ^{ab}	140.7 ^{bc}	136.2 ^{bc}	0.50 ^a	97.6 ^{bc}
144	2.3 ^d	56.1 ^a	166.3 ^{bc}	121.4 ^{ab}	0.56 ^a	104.4 ^c

En la comparación entre biomasa y entre actividad volumétrica, diferentes letras indican diferencias significativas ($p = 0.05$). DMP: 2, 6 Dimetoxifenol. Los cultivos líquidos estáticos fueron infectados a las 72 horas de cultivo.

control (Cuadro1). Por ello, se analizó la estabilidad de la AV en el sobrenadante libre de células y ante la presencia de *T. viride* o de *P. ostreatus*. En ellos, la AV disminuyó hasta un 80% (datos no presentados). Sin embargo, en los co-cultivos la AV fue siempre mayor. Ello indicó que durante los co-cultivos existe simultáneamente una biosíntesis de la enzima y una degradación/inactivación de la AV. Además, el cambio observado en el patrón de isoformas es producido por *T. viride* sobre la enzima biosintetizada (Figura 1).

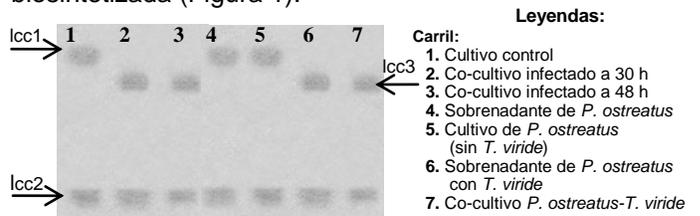


Figura 1.- Patrón electroforético en la interacción *P. ostreatus-T. viride*.

Conclusiones. La actividad volumétrica cuantificada en los co-cultivos es el balance entre la velocidad de biosíntesis y la velocidad de degradación/inactivación. El cambio en el patrón de isoformas es debido a un procesamiento de la enzima por *T. viride*.

Agradecimientos. Financiamiento: DGAPA (IN 210107). *T. viride* fue donada por el M. en C. A. Carrillo (CIAD, unidad Culiacán). *P. ostreatus* fue donado por el Dr. D. Martínez (Colegio de Postgraduados, campus Puebla).

Bibliografía

1. Flores, C., Vidal, C., Trejo-Hernández, M.R., Galindo, E. and Serrano-Carreón, L. (2009). Selection of *Trichoderma* strains capable of increasing laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures. *J. Appl. Microbiol.* 106: 249–257.