

PRODUCCION DE LACASAS Y GENERACION DE NUEVAS ISOFORMAS EN CULTIVOS LIQUIDOS DE *Agaricus bisporus* INFECTADOS CON *Trichoderma* spp.

Celia Flores¹, Guadalupe Espinoza¹, 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, *Agaricus bisporus*.

Introducción. Las lacasas son enzimas polifenoloxidasas de baja especificidad por sustratos, lo que les permite oxidar un amplio rango de compuestos. *Agaricus bisporus* es un hongo escasamente estudiado en la producción de lacasa. En cultivos en medio sólido, el hongo produce cantidades importantes de la enzima y mediante inducción biológica, con cepas de *Trichoderma*, su producción se incrementa significativamente (1).

En el presente trabajo se estudió la producción y el perfil de lacasas producidas en cultivos líquidos (matraces agitados) de *Agaricus bisporus* infectados con dos cepas de *Trichoderma*.

Metodología. Se evaluaron 2 cepas de *Trichoderma*: *T. viride* y *T. sp.* La infección (5×10^3 esporas/mL de *T. spp.*) se realizó a los cinco y a los nueve días de cultivo, que correspondieron al inicio y a mitad de la fase lineal de crecimiento, respectivamente. Las cepas de *Trichoderma* utilizadas no son productoras de lacasa. Los cultivos se realizaron por triplicado, en matraces con 100 mL de medio extracto de malta (20 g/L), pH (inicial) de 6.0, 25°C, 150 rpm. Para los cultivos, se generaron inóculos en medio líquido. Se recuperaron las células y con la adición de agua destilada se preparó una suspensión. 1 mL de ella se inoculó en 100 mL de medio. Se determinó actividad lacasa (con ABTS, DMP, siringaldazina y guaiacol), proteína (Bradford) y el perfil de isoformas (geles nativos). Los co-cultivos fueron comparados con un cultivo control (cultivo axénico).

Resultados y discusión. En los cultivos axénicos de *A. bisporus* la producción de la lacasa estuvo asociada a etapas tempranas del crecimiento de *A. bisporus*. En los co-cultivos infectados a los cinco días de cultivo, la producción de la enzima disminuyó significativamente respecto del cultivo control con ABTS como sustrato (Cuadro 1). Al infectar los cultivos de *A. bisporus* a los nueve días, los resultados fueron similares a los cultivos infectados a los cinco días, excepto que en el co-cultivo con la cepa de *T. viride* se observó un incremento en la producción de la enzima (cuantificada con siringaldazina como sustrato) respecto del cultivo control (Cuadro 2). El tiempo de infección ejerció efectos importantes en la generación de isoformas. El cultivo axénico de *A. bisporus* presentó las isoformas lacA y lacB (Figura 1a). Al infectar a los 5 días de cultivo, en ambos co-cultivos no se detectó lacA, mientras que lacB permaneció presente

Cuadro 1. Máximas actividades volumétricas obtenidas en el cultivo axénico de *A. bisporus* y en los co-cultivos infectados a los 5 días de cultivo.

Cultivos	Actividad volumétrica (U/L)			
	SUSTRATOS			
	ABTS	DMP	SIRINGALDAZINA	GUAIACOL
Control	112.0 ^a	686.3 ^a	247.9 ^a	88.9 ^a
<i>A. bisporus</i> - <i>T. viride</i>	25.2 ^b	308.4 ^b	166.1 ^a	52.3 ^a
<i>A. bisporus</i> - <i>T. sp.</i>	23.8 ^b	772.2 ^a	256.4 ^a	72.6 ^a

Diferentes índices superiores para cada columna indican actividades volumétricas diferentes estadísticamente ($p \geq 0.05$). DMP: 2, 6 Dimetoxifenol; ABTS: 2,2'-Azinobis(3-etilbenzo-tiazolin-6-sulfonato); Siringaldazina: N,N'-bis(3,5-dimetoxi-4-hidroxibencilideno)hidrazina

Cuadro 2. Máximas actividades volumétricas obtenidas en el cultivo axénico de *A. bisporus* y en los co-cultivos infectados a los 9 días de cultivo.

Cultivos	Actividad volumétrica (U/L)			
	SUSTRATOS			
	ABTS	DMP	SIRINGALDAZINA	GUAIACOL
Control	110.0 ^a	814.9 ^a	161.9 ^a	138.5 ^a
<i>A. bisporus</i> - <i>T. viride</i>	74.2 ^b	629.5 ^b	379.1 ^b	105.6 ^a
<i>A. bisporus</i> - <i>T. sp.</i>	74.0 ^b	885.1 ^a	250.5 ^c	137.4 ^a

Diferentes índices superiores para cada columna indican actividades volumétricas diferentes estadísticamente ($p \geq 0.05$).

(Figura 1a). Al infectar a los 9 días, en el co-cultivo con *T. viride* no se detectaron lacA y lacB, y se observó lacC. En el co-cultivo *A. bisporus*-*T. sp.* no se detectó lacA, lacB se mantuvo presente y se generó lacC (Figura 1b).

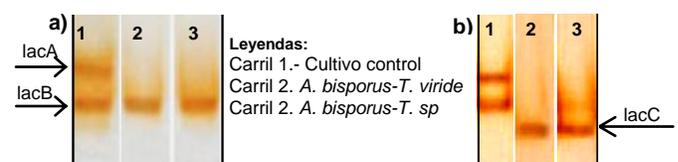


Figura 1.- Generación de isoformas en la interacción de *A. bisporus*-*Trichoderma* spp. a) Infección a los 5 días. b) Infección a los 9 días.

Conclusiones. Se incrementó la producción de la enzima (cuantificada con siringaldazina como sustrato) al infectar a los nueve días de cultivo. Se modificó el perfil de isoformas en función de tiempo de infección.

Agradecimientos. Financiamiento: DGAPA (IN 210107). *A. bisporus* y *T. sp.* fueron donadas por el Dr. Hermilo Leal (Fac. /UNAM). *T. viride* fue donada por el M. en C. Armando Carrillo (CIAD, unidad, Culiacán).

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.