



## EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE $\beta$ -GLUCANASAS DE *Trichoderma harzianum* Rifai (Hyphocreales) SECRETADAS AL MEDIO DE CULTIVO Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA *in vitro*

Jorge Eugenio Corrales Ocampo, Gisela Jareth Lino López, Juan Alberto Osuna Castro, Oscar Rebolledo Domínguez, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima, Tecomán, Colima, C.P. 28100, oscard@hotmail.com, osuna\_juan@hotmail.com

*Palabras clave:* Cinética enzimática,  $\beta$ -glucanasas, *Trichoderma harzianum*.

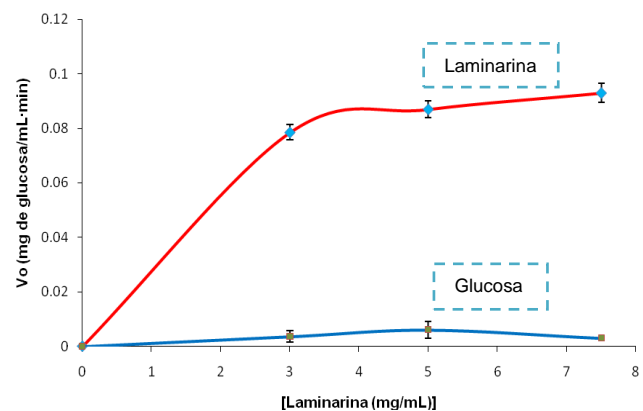
**Introducción.** Las especies del género *Trichoderma* son hongos micoparasíticos usados como agentes de control biológico sobre hongos fitopatógenos (1). Uno de los mecanismos de acción biocontroladora de *Trichoderma* más conocido es la secreción de enzimas líticas extracelulares como: proteasas, quitinasas y  $\beta$ -glucanasas que degradan la pared celular fúngica (1). Las  $\beta$ -glucanasas (exo- y endo-) se caracterizan por hidrolizar enlaces  $\beta$ -glucosídicos presentes en polímeros de glucosa y se clasifican en tres tipos:  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,4- y  $\beta$ -1,6-glucanasas (2). Actualmente, estas enzimas tienen gran importancia en la producción de bioetanol (biocombustible que podrían ser sustituto de hidrocarburos en la industria), obtenido a partir de la conversión de polímeros de glucosa (3). Se sabe que *T. harzianum* produce  $\beta$ -glucanasas y que su inducción depende del tipo de fuente de carbono que se emplee en su medio de cultivo (1).

En el presente trabajo se reporta el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de  $\beta$ -glucanasas por *T. harzianum* Th-397 y su caracterización cinética.

**Metodología.** En un medio de cultivo líquido suplementado con laminarina 0.1% o glucosa al 2% se inoculó estructura miceliar de *T. harzianum* y se incubó a 25 °C, 180 rpm durante 9 días (1). Se realizaron muestreos de medio de cultivo cada 24 h y se centrifugaron a 11,000 rpm durante 40 min (2). Al sobrenadante obtenido, se le determinó azúcares reductores (glucosa) (4). Las muestras del día 9 se dializaron contra agua a 4 °C, se liofilizaron y se resuspendieron en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5. Se midió la actividad enzimática de  $\beta$ -glucanasas, incubando 6.5  $\mu$ g de extracto proteínico con diferentes concentraciones de laminarina (0, 0.25, 1, 3, 5, 7.5, 10, 12.5 mg/mL) como sustrato durante 15 min a 30 y 50 °C (5). Posteriormente se cuantificó la cantidad de glucosa liberada (4).

**Resultados.** Los medios de cultivo líquido suplementado con laminarina y glucosa mostraron un descenso de la glucosa liberada en un 45% y 80% respectivamente, al término del experimento respecto al día cero. La actividad enzimática de  $\beta$ -glucanasas secretadas al medio de cultivo líquido con laminarina presentó alta

actividad sobre el sustrato laminarina a 50 °C, mientras que las proteínas del medio suplementado con glucosa no produjeron hidrólisis (Figura 1). La cinética enzimática de  $\beta$ -glucanasas fue mayor a los 50 °C y menor a 30 °C, siguiendo un comportamiento tipo Michaelis-Menten con parámetros cinéticos a 50 °C de  $K_m=1.613$  mg/mL y  $V_{max}=0.116$  mg/mL-h y 30 °C con  $K_m=6.23$  mg/mL y  $V_{max}=0.103$  mg/mL-h.



**Fig. 1.** Comparación de las cinéticas de  $\beta$ -glucanasas secretadas al medio suplementado con glucosa (■) o laminarina (♦) a distintas concentraciones de sustrato laminarina e incubadas a 50 °C.

**Conclusión.** La fuente de carbono es determinante para la producción de  $\beta$ -glucanasas de *T. harzianum* Th-397 y su comportamiento cinético *in vitro*.

### Bibliografía.

1. Harman, G. E., Hayes, C. K., Lorito, M., Broadway, R. M., Di-Pietro, A., Peterbauer, C. y Tronsmo, A. (1993). *Phytopathology*. vol (83): 313-393.
2. Mustafa, M., Aziz, N. A. A., Kaimi, A., Noor, N. S., Ahmad, S. H. B. y Ithnin, N. (2009). *Pertanika J. Sci. Technol.* vol (17): 137-147.
3. Lin, Y. y Tanaka, S. (2006). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol (69): 627-642.
4. Ting, S. V. (1956). *J. Agric. Food Chem.* vol (4): 263-266.
5. Vázquez-Garcidueñas, S., Leal-morales, C. A. y Herrera-Estrella, A. (1998). *Appl. Environ. Microbiol.* vol (64): 1442-1446.